

UNIwersYTET JANA KOCHANOWSKIEGO W KIELCACH

SZKOŁA DOKTORSKA

SEKCJA NAUK ŚCISŁYCH I PRZYRODNICZYCH

DYSCYPLINA NAUKI BIOLOGICZNE

Magdalena Stawiarz

**ANALIZA WYSTĘPOWANIA MUTACJI U PACJENTÓW
Z OSTRĄ BIAŁACZKĄ SZPIKOWĄ Z ZASTOSOWANIEM
SEKWENCJONOWANIA NASTĘPNEJ GENERACJI**

**Praca doktorska napisana
pod kierunkiem
dr. hab. Artura Kowalika, Profesora UJK**

Kielce 2026

Serdecznie dziękuję mojemu promotorowi, dr. hab. prof. UJK Arturowi Kowalikowi za merytoryczne wsparcie, cenne wskazówki oraz czas poświęcony na konsultacje podczas przygotowywania niniejszej rozprawy. Okazana pomoc i opieka naukowa miały istotny wpływ na kształt i realizację pracy.

Serdecznie dziękuję dr Sylwii Kościółek-Zgódce za pomoc w przygotowaniu danych klinicznych pacjentów, która znacząco przyczyniła się do realizacji niniejszej pracy, a także za cenne wsparcie merytoryczne oraz cenne uwagi w trakcie redagowania pracy.

1 Spis treści

1	Spis treści.....	3
2	Wykaz skrótów i oznaczeń.....	5
3	Wstęp.....	7
3.1	Ostra białaczka szpikowa.....	7
3.2	Epidemiologia ostrej białaczki szpikowej.....	9
3.3	Objawy choroby.....	10
3.4	Czynniki zwiększające ryzyko zachorowania.....	10
3.5	Klasyfikacja molekularna ostrej białaczki szpikowej.....	12
3.6	Metody diagnostyczne.....	18
3.7	Profil mutacji.....	22
3.8	Przegląd terapii celowanych ukierunkowanych na określone mutacje genowe.....	23
3.9	Sekwencjonowanie.....	26
3.9.1	Sekwencjonowanie nowej generacji.....	26
3.9.2	Przygotowanie bibliotek NGS.....	28
3.9.3	Sekwencjonowanie i analiza danych.....	29
3.9.4	Znaczenie NGS w diagnostyce AML.....	31
4	Cel pracy.....	33
5	Materiały i metody.....	34
5.1	Materiały.....	34
5.1.1	Materiał badawczy.....	34
5.2	Metody.....	36
5.2.1	Izolacja materiału genetycznego.....	37
5.2.2	Reakcja odwrotnej transkrypcji.....	39
5.2.3	Elektroforeza agarozowa.....	40
5.2.4	Pomiar stężenia DNA i cDNA.....	40
5.2.5	Zestaw Oncomine Myeloid.....	41
5.2.6	Sekwencjonowanie.....	44
5.2.7	Analiza danych Ion Torrent.....	48
5.2.8	Ocena patogenności.....	48
5.2.9	Programy i aplikacje komputerowe.....	49
6	Wyniki.....	52
6.1	Charakterystyka grupy badanej.....	52
6.2	Ocena profilu molekularnego - identyfikacja zmian genetycznych i genów fuzyjnych.....	57

6.3	Charakterystyka molekularna wykrytych wariantów genetycznych	59
6.4	Ocena współwystępowania mutacji w badanych genach. Identyfikacja najczęściej współistniejących zmian genetycznych.....	66
6.5	Ocena skuteczności stratyfikacji pacjentów do terapii ukierunkowanych molekularnie z wykorzystaniem NGS.....	69
7	Dyskusja.....	72
8	Podsumowanie i wnioski	86
9	Streszczenie.....	88
10	Abstract.....	90
11	Dorobek naukowy	92
12	Spis załączników	98
13	Spis rycin	99
14	Spis tabel.....	101
15	Bibliografia	102

2 Wykaz skrótów i oznaczeń

ALL - ostra białaczka limfoblastyczna (ang. *acute lymphoblastic leukemia*)

AML - ostra białaczka szpikowa (ang. *acute myeloid leukemia*)

AML-MR - (ang. *acute myeloid leukemia myelodysplasia-related*)

allo-HSCT - allogeniczne przeszczepienie krwiotwórczych komórek macierzystych (ang. *allogeneic stem cell transplantation*)

AR - wskaźnik alleliczny (ang. *allelic ratio*)

bp - pary zasad (ang. *base pair*)

bZIP - domena bZIP, region zamka leucynowego (ang. *basic leucine zipper*)

CBF - czynnik wiążący rdzeń (ang. *core-binding factor*)

cDNA - komplementarna cząsteczka DNA (ang. *complementary DNA*)

CE - elektroforeza kapilarna (ang. *capillary electrophoresis*)

CHIP - klonalna hematopoeza o nieokreślonym potencjale (ang. *clonal hematopoiesis of indeterminate potential*)

CML - przewlekła białaczka szpikowa (ang. *chronic myeloid leukemia*)

DEL - delecja (ang. *deletion*)

DIC - zespół rozsianej koagulacji wewnątrznaczyniowej (ang. *disseminated intravascular coagulation*)

DNA - kwas deoksyrybonukleinowy (ang. *deoxyribonucleic acid*)

EDTA - kwas wersenowy (ang. *ethylenediaminetetraacetic acid*)

ELN - European LeukemiaNet

EMA - Europejska Agencja Leków (ang. *European Medicines Agency*)

FDA - Agencja ds. Żywności i Leków (ang. *Food and Drug Administration*)

FISH - fluorescencyjna hybrydyzacja *in situ* (ang. *fluorescence in situ hybridization*)

FLT3 - kinaza tyrozynowa typu 3 (ang. *FMS-like tyrosine kinase 3*)

HMA - hipometylujące analogi nukleozydów (ang. *hypomethylating agents*)

ICC - klasyfikacja ICC (ang. *International Consensus Classification*)

IDH - dehydrogenaza izocytrynianowa (ang. *isocitrate dehydrogenase*)

IGV - przeglądarka genomowa do wizualizacji danych sekwencjonowania (ang. *integrative genomics viewer*)

INS - insercja (ang. *insertion*)

ISPs - sferyczne cząsteczki nośnikowe (ang. *ion sphere particle*)

ITD - wewnętrzna duplikacja tandemowa (ang. *internal tandem duplication*)

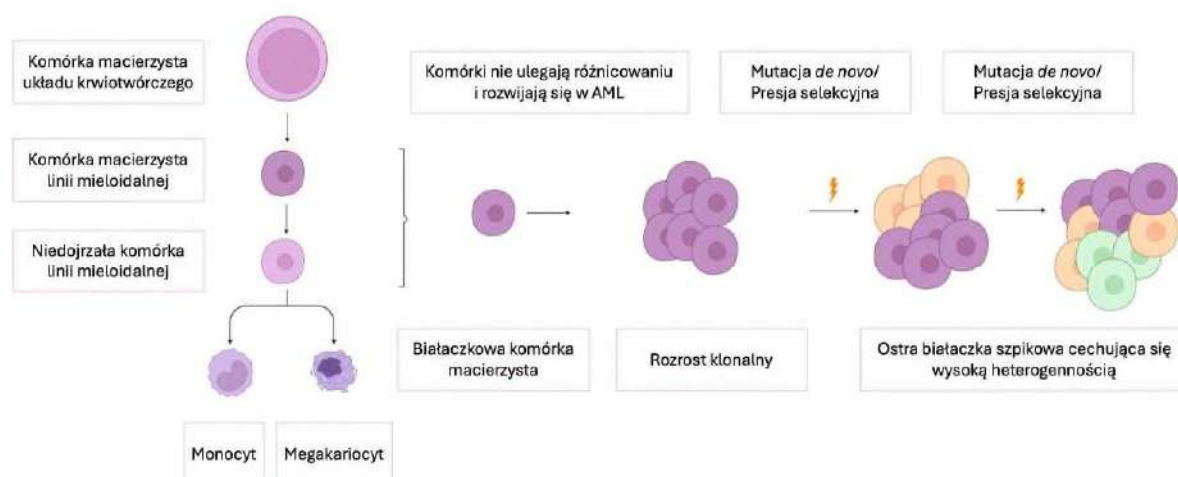
LFS - Zespół Li-Fraumeni (ang. *Li-Fraumeni syndrome*)

LOH - utrata heterozygotyczności (ang. *loss of heterozygosity*)
 MDS - zespół mielodysplastyczny (ang. *myelodysplastic syndrome*)
 MPN - nowotwory mieloproliferacyjne (ang. *myeloproliferative syndrome*)
 MRD - mierzalna choroba resztkowa (ang. *measurable residual disease*)
 NFZ - Narodowy Fundusz Zdrowia
 NGS - Sekwencjonowanie następnej generacji (ang. *next-generation sequencing*)
 NTC - kontrola bez matrycy (ang. *no template control*)
 OS - całkowite przeżycie (ang. *overall survival*)
 PCR - łańcuchowa reakcja polimerazy (ang. *polymerase chain reaction*)
 QC - kontrola jakości (ang. *quality control*)
 qPCR - ilościowa reakcja PCR (ang. *quantitative PCR*)
 RNA - kwasy rybonukleinowy (ang. *ribonucleic acid*)
 RNA-seq - sekwencjonowania RNA (ang. *RNA sequencing*)
 RT - odwrotna transkrypcja (ang. *reverse transcription*)
 R/R AML - nawrotowa lub oporna na leczenie AML (ang. *relapsed/refractory acute myeloid leukemia*)
 SBS - sekwencjonowanie przez syntezę (ang. *sequencing by synthesis*)
 SHB - sekwencjonowanie przez hybrydyzację (ang. *sequencing by hybridization*)
 SNP - substytucje pojedynczych nukleotydów (ang. *single nucleotide polymorphisms*)
 UHS-NGS - ultraczułe sekwencjonowanie NGS (ang. *ultra-high-sensitivity next-generation sequencing*, UHS-NGS)
 VAF - częstość alleliczna wariantu (ang. *variant allelic frequency*)
 VCF - pliki zawierające listę wykrytych wariantów genetycznych (ang. *variant calling format*)
 VUS - zmiana o nieokreślonym znaczeniu klinicznym (ang. *variant of uncertain Significance*)
 TKD - domena kinazy tyrozynowej (ang. *tyrosine kinase domain*)
 WES - sekwencjonowania całego eksonu (ang. *whole exome sequencing*)
 WGS - sekwencjonowanie całogenomowe (ang. *whole genome sequencing*)
 WHO - Światowa Organizacja Zdrowia (ang. *World Health Organization*)

3 Wstęp

3.1 Ostra białaczka szpikowa

Ostra białaczka szpikowa (ang. *acute myeloid leukemia*, AML) to nowotworowa choroba układu krwiotwórczego, charakteryzująca się niekontrolowaną, klonalną proliferacją nieprawidłowych komórek macierzystych i progenitorowych szpiku w tkance krwiotwórczej (ryc. 1.) (Saultz & Garzon, 2016; Xiang i in., 2022). Powstałe w wyniku transformacji nowotworowej niedojrzałe komórki blastyczne wykazują zaburzone różnicowanie oraz gromadzą się w szpiku kostnym, hamując prawidłową hematopoezę. Skutkiem tego często rozwijają się małopłytkowość, niedokrwistość oraz neutropenia (Tebbi, 2021; B. Kumar i in., 2018). Ponadto w wyniku niehamowanej proliferacji komórki białaczkowe przedostają się ze szpiku kostnego do krwi obwodowej, po czym mogą naciekać różne narządy, takie jak węzły chłonne, wątroba, śledziona, płuca, przewód pokarmowy, skóra lub błony śluzowe (El-Refaei & Al Qahtani, 2016).



Rycina 1. Schemat patogenezy ostrej białaczki szpikowej. Rycina na podstawie (Xiang i in., 2022).

Postęp w diagnostyce molekularnej znacząco wpłynął na sposób rozpoznawania i leczenia ostrej białaczki szpikowej, poszerzając naszą wiedzę na temat mechanizmów jej patogenezy. Umożliwia to rozwój terapii celowanych i efektywną stratyfikację ryzyka, co stanowi fundament spersonalizowanego podejścia terapeutycznego (Döhner i in., 2022; Patel i in., 2012).

Zastosowanie technologii sekwencjonowania następnej generacji (ang. *next-generation sequencing*, NGS), znacząco wpłynęło na podejście do diagnostyki AML.

Diagnostyka molekularna AML obejmuje identyfikację aberracji genetycznych, takich jak translokacje chromosomalne, mutacje oraz zmiany ekspresji genów, które są kluczowe w rozwoju i progresji choroby. NGS umożliwia kompleksową analizę pojedynczych genów oraz paneli genowych, co pozwala na precyzyjną diagnostykę, dokładniejszą ocenę rokowania oraz dobór terapii dostosowanej do indywidualnego profilu molekularnego pacjenta (Haferlach, 2020; Kohlmann i in., 2014).

Włączenie diagnostyki molekularnej do praktyki klinicznej umożliwiło klasyfikację AML na odrębne podtypy molekularne i genetyczne, charakteryzujące się specyficznymi implikacjami prognostycznymi i terapeutycznymi. Mutacje w genach, takich jak np. *FLT3*, *NPM1* i *CEBPA*, korelują z określonym przebiegiem klinicznym oraz odpowiedzią na leczenie (Arber i in., 2022; Döhner i in., 2022). Sekwencjonowanie RNA okazało się niezwykle przydatnym narzędziem w wykrywaniu genów fuzyjnych w AML, umożliwiając identyfikację zarówno znanych, jak i nowych rearanżacji, co wyraźnie podnosi precyzję diagnostyczną (Kerbs i in., 2022).

Zatwierdzenie przez Agencję ds. Żywności i Leków (ang. *Food and Drug Administration*, FDA) i Europejską Agencję Leków (ang. *European Medicines Agency*, EMA) terapii celowanych, m.in. dla mutacji w genach *IDH1*, *IDH2* i *FLT3*, znacząco wpłynęło na leczenie AML, umożliwiając dostosowanie strategii terapeutycznych do indywidualnego profilu genetycznego pacjenta (Dash & Dinanuer, 2021). Zastosowanie inhibitorów *FLT3* (np. midostauryny) oraz inhibitorów *IDH1* (np. ivosidenibu) przyniosło obiecujące rezultaty u pacjentów z określonymi zmianami genetycznymi, co podkreśla istotną rolę diagnostyki molekularnej w doborze odpowiedniego leczenia (DiNardo i in., 2018; Papaemmanuil i in., 2016; Stone i in., 2017). Ponadto, techniki takie jak NGS i reakcja łańcuchowa polimerazy (ang. *polymerase chain reaction*, PCR), stały się niezbędne w wykrywaniu zmian genetycznych, oferując wysoką czułość i specyficzność w wykrywaniu mierzalnej choroby resztkowej (ang. *measurable residual disease*, MRD), która stanowi kluczowy czynnik prognostyczny oraz podstawę do podejmowania decyzji terapeutycznych (Duncavage i in., 2022; Heuser i in., 2021).

Diagnostyka molekularna odgrywa centralną rolę we współczesnym leczeniu AML, jak przedstawiono w najnowszej klasyfikacji, integrującej dane morfologiczne, kliniczne i genomowe (Arber i in., 2022; Döhner i in., 2022).

3.2 Epidemiologia ostrej białaczki szpikowej

Ostra białaczka szpikowa to najczęściej występujący nowotwór złośliwy krwi u dorosłych, stanowi ok. 80% wszystkich zachorowań na ostre białaczki. W przypadku dzieci AML występuje stosunkowo rzadko i stanowi ok. 15% zachorowań (Szmajda i in., 2017).

W Polsce AML stanowi około 2,4% wszystkich zachorowań na nowotwory złośliwe, a rocznie rejestruje się około 800 nowych przypadków choroby. Szacuje się jednak, że rzeczywista liczba zachorowań może być wyższa, ponieważ u pacjentów w podeszłym wieku oraz z licznymi chorobami współistniejącymi diagnoza AML nie zawsze jest określona lub bywa przypisywana innym jednostkom chorobowym. Może to prowadzić do niedoszacowania danych epidemiologicznych (Seferyńska & Warzocha, 2014).

Zachorowalność na AML wyraźnie wzrasta wraz z wiekiem. Szczególnie wysokie ryzyko występuje u osób powyżej 60. roku życia. Mediana wieku chorych na AML wynosi 67 lat (SEER Cancer Statistics Review 1975-2007. Dostępne na: www.seer.cancer.gov. Data dostępu 28.01.2015 r.) (Wierzbowska, 2020).

Średni roczny współczynnik zapadalności w populacji ogólnej wynosi około 4 przypadki na 100 tysięcy mieszkańców, natomiast w populacji osób powyżej 70. roku życia sięga 15-20 przypadków na 100 tysięcy. W 2014 roku odnotowano w Polsce 1,6 tysiąca nowych przypadków AML, co odpowiada współczynnikowi zapadalności na poziomie 4,1/100 tys. mieszkańców. Liczbę chorych oszacowano wówczas na około 4,2 tysiąca, a chorobowość wynosiła 10,9/100 tys. Zachorowalność na AML jest wyższa u mężczyzn niż u kobiet i dotyczy to wszystkich grup wiekowych. Szacuje się, że współczynnik zapadalności u mężczyzn wynosi 4,56/100 tys./rok, a u kobiet 3,0/100 tys./rok (Budziszewska i in., 2017; De Angelis i in., 2015; Stabellini i in., 2022)

W ostatnich latach obserwowana jest znaczna poprawa w leczeniu AML, jednak nadal etiologia choroby nie została w pełni zdefiniowana. AML postępuje szybko i bez wdrożonego leczenia w krótkim czasie prowadzi do zgonów pacjentów. Naturalny przebieg nieleczzonej choroby jest bardzo agresywny i prowadzi do zgonu w ciągu 2-3 miesięcy. Zastosowanie odpowiedniego leczenia umożliwia jednak uzyskanie dłuższego przeżycia, średnio od 3 do 5 lat. Dane z systemu Narodowego Funduszu Zdrowia (NFZ) z lat 2009-2014 wskazują, że mediana całkowitego przeżycia (ang. *overall survival*, OS) w tej grupie wynosiła 6 miesięcy. Trzyletnie OS osiągnęło 26,5% pacjentów, natomiast pięcioletnie OS 23,4% (Budziszewska i in., 2017). Pomimo

że wskaźniki przeżycia uległy znacznej poprawie w młodszych grupach wiekowych, to jednak rokowanie u starszych pacjentów jest w dalszym ciągu złe (Deschler & Lübbert, 2006).

3.3 Objawy choroby

Pacjenci często zgłaszają się do lekarza z zespołem objawów, takich jak gorączka, ból kości i stawów, osłabienie oraz oznaki zakażenia (np. płuc czy jamy ustnej). Najważniejsze objawy kliniczne ostrej białaczki szpikowej są związane z naciekaniem szpiku, krwi oraz innych narządów przez komórki białaczkowe. To prowadzi do zespołu objawów wynikających z niedokrwistości (osłabienie, zawroty głowy), małopłytkowości (wybroczyny na skórze i błonach śluzowych jamy ustnej, krwotoki, krwawienia z nosa i dziąseł), neutropenii (zakażenia grzybicze i bakteryjne w tkankach i narządach), leukostazy (zaburzenia czynności ośrodkowego układu nerwowego, zaburzenia pracy serca) oraz objawów związanych z upośledzeniem odporności (np. bolesne afty i owrzodzenia jamy ustnej, zwiększona podatność na zakażenia). Objawy AML mogą być także mniej specyficzne, takie jak zmniejszenie masy ciała, bóle kostne czy nadmierne pocenie się (Deschler & Lübbert, 2006; Wierzbowska, 2020; Vakiti i in., 2025).

W przebiegu AML mogą występować stany bezpośredniego zagrożenia życia, takie jak leukostaza, zespół lizy guza oraz ciężkie zaburzenia krzepnięcia, w tym zespół rozsianej koagulacji wewnątrznaczyniowej (ang. *disseminated intravascular coagulation*, DIC). DIC może objawiać się krwawieniami z błon śluzowych jamy ustnej, obecnością purpury i wybroczyn na skórze kończyn, a także krwawieniem z miejsc wkłuć dożylnych. Powikłania te wymagają natychmiastowego wdrożenia leczenia, często jeszcze przed zakończeniem pełnej diagnostyki genetycznej oraz świadczą o ciężkim przebiegu choroby (Strasser i in., 2025; Vakiti i in., 2025).

3.4 Czynniki zwiększające ryzyko zachorowania

Pomimo znacznego postępu w leczeniu ostrej białaczki szpikowej mechanizmy rozwoju choroby nadal nie są w pełni poznane. Występowanie AML związane jest z szeregiem czynników genetycznych i środowiskowych, takich jak narażenie na promieniowanie, głównie jonizujące, zawodowe narażenie na benzen, przyjmowanie leków alkilujących oraz inhibitorów topoizomerazy, zespoły dziedziczne, mutacje w określonych genach, palenie tytoniu, wiek i wiele innych nieznanych czynników, jednak żaden bezpośredni związek z rozwojem choroby nie został dotychczas

udowodniony (Yi i in., 2020; Wierzbowska, 2020; Guo i in., 2022). Istnieje również kilka wrodzonych schorzeń, które mogą zwiększać ryzyko rozwoju AML. Najczęstszym z nich jest najprawdopodobniej zespół Downa, który wiąże się z 10-18-krotnym wzrostem ryzyka rozwoju AML (Khan i in., 2011; El-Refaei & Al Qahtani, 2016; Verma i in., 2023).

Innym schorzeniem mogącym przyczyniać się do rozwoju AML jest zespół Li-Fraumeni (ang. *Li-Fraumeni syndrome*, LFS). To autosomalna dominująca choroba związana z wysokim ryzykiem wystąpienia szerokiej gamy nowotworów u pacjentów i ich rodzin. LFS wiąże się z mutacjami germinalnymi w genie *TP53*. Mutacje w *TP53* zwiększają ryzyko rozwoju nowotworów poprzez zmniejszenie zdolności organizmu do usuwania komórek nowotworowych (Choe i in., 2023; Chamarthi & Kasi, 2025). Choroba ta została opisana po raz pierwszy w 1969 roku przez dwóch lekarzy, Fredericka Li i Josepha Fraumeni, którzy zauważyli występowanie wielu przypadków raka piersi i nowotworów dziecięcych w jednej rodzinie (F. P. Li i in., 1988; F. P. Li & Fraumeni, 1969). Obecnie wiadomo, że LFS jest spowodowany mutacjami germinalnymi w genie *TP53*, które dziedziczą się w sposób autosomalny dominujący (Swaminathan i in., 2019). Pacjenci, u których stwierdzono zespół LFS są narażeni na zwiększone ryzyko rozwoju wielu pierwotnych nowotworów, w tym raka piersi, mięsaka tkanek miękkich, guzów mózgu, kostniakomięsaka i raka kory nadnerczy (Kratz i in., 2021; Chamarthi & Kasi, 2025). Inne nowotwory związane z LFS obejmują nowotwory jajnika, przewodu pokarmowego, trzustki, układu moczowo-płciowego, skóry, nerek, tarczycy, prostaty i płuc (Kerrigan i in., 2021; Benusiglio i in., 2021). Najczęściej występującym hematologicznym nowotworem związanym z LFS jest hipodiploidalna ostra białaczka limfoblastyczna (ang. *acute lymphoblastic leukemia*, ALL), ale również ostra białaczka szpikowa, przewlekła białaczka szpikowa (ang. *chronic myeloid leukemia*, CML) i zespoły mielodysplastyczne (ang. *myelodysplastic syndrome*, MDS). Częstość występowania białaczek w LFS wynosi ok. 4% (Bougeard i in., 2015; Swaminathan i in., 2019; Bundrant i in., 2024).

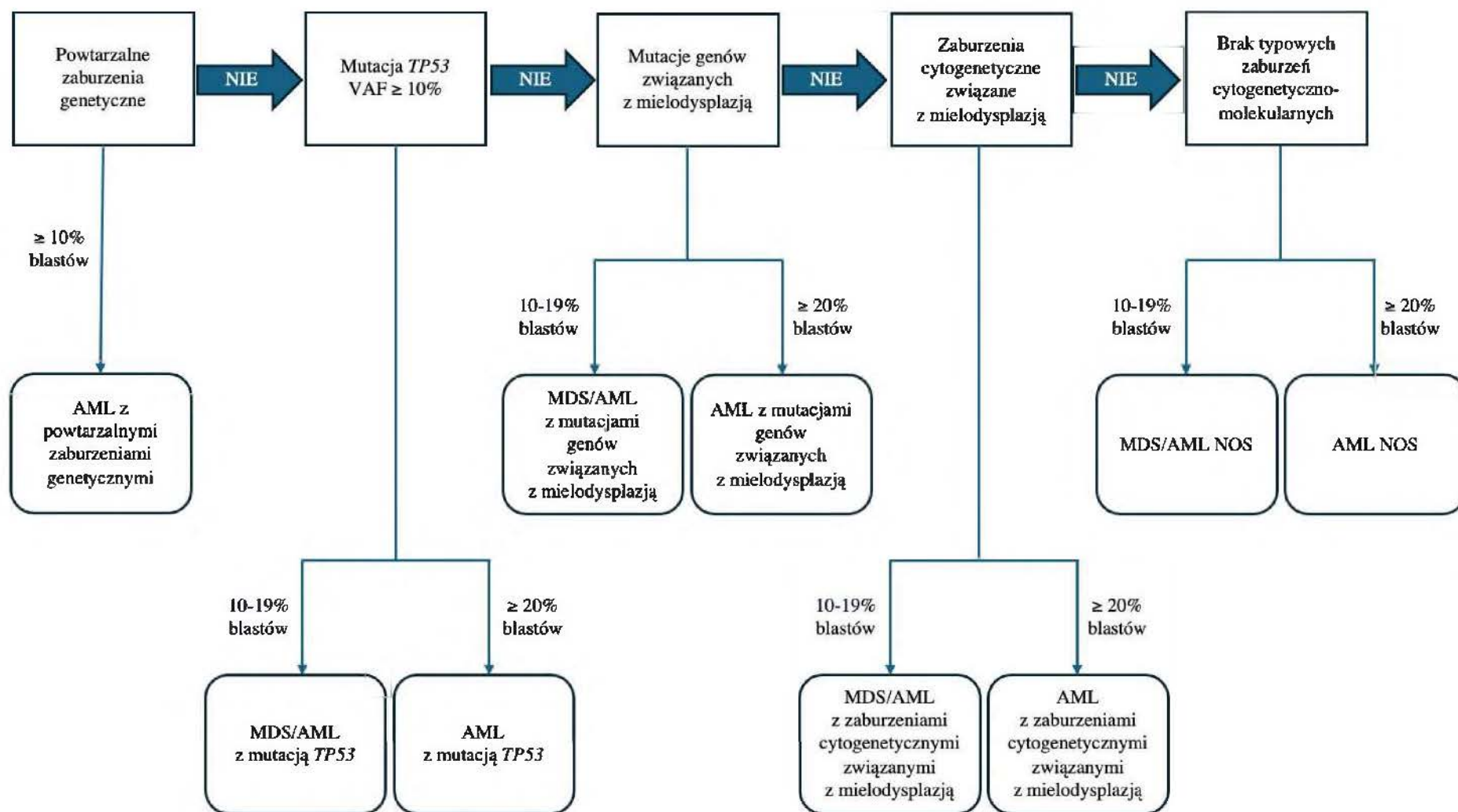
Wpływ na rozwój AML wykazują choroby układu krwiotwórczego, takie jak mieloprolifracje, zespoły mielodysplastyczne czy nocna napadowa hemoglobinuria. Jednak większość przypadków AML rozwija się *de novo*, bez możliwości do uchwycenia ekspozycji na czynnik leukemogenny (Deschler & Lübbert, 2006; Jabbour i in., 2014; Grosicki, 2014; Dunbar i in., 2020; Capelli i in., 2022; McKinnell i in., 2022).

3.5 Klasyfikacja molekularna ostrej białaczki szpikowej

W 2022 roku opublikowano trzy niezależne propozycje uaktualnienia klasyfikacji ostrych białaczek szpikowych. Klasyfikacja ICC (ang. *International Consensus Classification*) nowotworów mieloidalnych i ostrych białaczek, wytyczne ELN (ang. *European LeukemiaNet*) oraz V edycja klasyfikacji Światowej Organizacji Zdrowia (ang. *World Health Organization*, WHO) nowotworów układu krwiotwórczego i chłonnego.

Hierarchiczna klasyfikacja ICC, odnosząca się do nowotworów mieloidalnych i ostrych białaczek (ang. *International Consensus Classification of Myeloid Neoplasms and Acute Leukemias*), została opracowana w oparciu o ocenę odsetka komórek blastycznych oraz występowanie charakterystycznych zmian molekularnych i cytogenetycznych (ryc. 2.). W liczeniu odsetka blastów uwzględnia się mieloblasty, monoblasty oraz megakarioblasty. W przypadkach AML z różnicowaniem monocytarnym lub mielomonocytarnym, do puli blastów zalicza się także promonocyty i monoblasty. Promielocyty są natomiast brane pod uwagę wyłącznie przy obecności rearanżacji genu *RARA*, takich jak *PML::RARA* lub innych wariantów fuzyjnych.

W nowej klasyfikacji ICC obniżono wymagany próg blastów do 10% w sytuacji, gdy w próbce stwierdza się określone zmiany molekularne. Wprowadzono również pojęcie pośredniego rozpoznania MDS/AML obejmującego przypadki na pograniczu zespołów mielodysplastycznych i ostrej białaczki szpikowej (Arber i in., 2022; Döhner i in., 2022). Szczegółowe podtypy AML według tej klasyfikacji przedstawiono w tabeli 1.



Rycina 2. Hierarchia rozpoznania AML na podstawie wytycznych International Consensus Classification (Arber i in., 2022; Döhner i in., 2022).

Tabela 1. Klasyfikacja ostrej białaczki szpikowej wg ICC 2022 (Arber i in., 2022).

Klasyfikacja ICC		Blasty (%)
AML z powtarzalnymi zaburzeniami genetycznymi	• APL z t(15;17)(q24.1;q21.2)/ <i>PML::RARA</i> lub innymi rearanżacjami <i>RARA</i>	≥10
	• AML z t(8;21)(q22;q22.1)/ <i>RUNX1::RUNX1T1</i>	≥10
	• AML z inv(16)(p13.1q22) lub t(16;16)(p13.1;q22)/ <i>CBFB::MYH11</i>	≥10
	• AML z t(9;11)(p21.3;q23.3)/ <i>MLLT3::KMT2A</i> lub innymi rearanżacjami <i>KMT2A</i>	≥10
	• AML z t(6;9)(p22.3;q34.1)/ <i>DEK::NUP214</i>	≥10
	• AML z inv(3)(q21.3q26.2) or t(3;3)(q21.3;q26.2)/ <i>GATA2, MECOM(EV11)</i> lub innymi rearanżacjami <i>MECOM</i>	≥10
	• AML z innymi rzadkimi, nawracającymi translokacjami	≥10
	• AML z mutacją <i>NPM1</i>	≥10
	• AML z mutacjami w obrębie ramki odczytu regionu bZIP genu <i>CEBPA</i>	≥10
	• AML z t(9;22)(q34.1;q11.2)/ <i>BCR::ABL1</i>	≥20
Mutacja <i>TP53</i> VAF ≥ 10%	• MDS/AML z mutacją <i>TP53</i>	10-19
	• AML z mutacją <i>TP53</i>	≥20
Mutacje genów związanych z mielodysplazją*	MDS/AML z mutacjami genów związanych z mielodysplazją	10-19
	AML z mutacjami genów związanych z mielodysplazją * <i>ASXL1, BCOR, EZH2, RUNX1, SF3B1, SRSF2, STAG2, U2AF1, ZRSR2</i>	≥20
Zaburzenia cytogenetyczne [#] związane z mielodysplazją	MDS/AML z zaburzeniami cytogenetycznymi związanymi z mielodysplazją	10-19
	AML z zaburzeniami cytogenetycznymi związanymi z mielodysplazją [#] Złożony kariotyp, del(5q)/t(5q)/add(5q); -7/del(7q); +8; del(12p)/t(12p)/(add)(12p); i(17q), -17/add(17p) or del(17p); del(20q); and/or idic(X)(q13)	≥20
Brak typowych zaburzeń cytogenetyczno-molekularnych	MDS/AML NOS	10-19
	AML NOS	≥20
Mięsak szpikowy		

Ostra białaczka z nieokreślonej linii: - Ostra białaczka niezróżnicowana - MPAL z t(9;22)(q34.1;q11.2)/<i>BCR::ABL1</i> - MPAL z t(v;11q23.3)/z rearanżacją <i>KMT2A</i> - MPAL, B/szpikowa inaczej nieokreślona - MPAL, T/szpikowa inaczej nieokreślona
Prolifерacje mieloidalne związane z zespołem Downa: Przemijająca nieprawidłowa mielopoeza związana z zespołem Downa Białaczka mieloidalna związana z zespołem Downa
Nowotwór z blastycznych plazmocytoidalnych komórek dendrytycznych

Zaktualizowana w 2022 roku klasyfikacja European LeukemiaNet (ELN) jest zgodna z systemem ICC, jednak koncentruje się przede wszystkim na stratyfikacji pacjentów z AML według ryzyka molekularnego, co ma na celu usprawnienie doboru strategii terapeutycznych (Lachowiec i in., 2022; Mrózek i in., 2023; Rausch i in., 2023). W klasyfikacji tej wyróżnia się trzy grupy ryzyka: korzystną, pośrednią i niekorzystną, określane na podstawie profilu genetycznego, ze szczególnym uwzględnieniem obecności mutacji *FLT3*-ITD (tab. 2.) Dodatkowo jedną z ważniejszych zmian w aktualnych wytycznych jest rezygnacja z wykorzystania wskaźnika allelicznego (ang. *allelic ratio*, AR) *FLT3*-ITD w stratyfikacji ryzyka (Döhner i in., 2022).

Tabela 2. Klasyfikacja ryzyka u chorych z nowo rozpoznaną AML według wg wytycznych ELN 2022 (Döhner i in., 2022).

Kategoria ryzyka	Aberracje cytogenetyczne i molekularne
Korzystne	t(8;21)(q22;q22.1)/<i>RUNX1::RUNX1T1</i>^a inv(16)(p13.1q22)/t(16;16)(p13.1;q22)/ <i>CBFB::MYH11</i>^a <i>NPM1</i>^{mut} bez mutacji <i>FLT3</i>-ITD^b bZIP <i>CEBPA</i>^c
Pośrednie	<i>NPM1</i>^{mut} z <i>FLT3</i>-ITD^b <i>NPM1</i>^{wt} z <i>FLT3</i>-ITD (bez niekorzystnych zmian genetycznych) t(9;11)(p21.3;q23.3)/<i>MLLT3::KMT2A</i>^d Nieprawidłowości cytogenetyczne i/lub molekularne niesklasyfikowane jako korzystne lub niekorzystne
Niekorzystne	t(6;9)(p23.3;q34.1)/<i>DEK::NUP214</i> t(v;11q23.3)/rearanżacja <i>KMT2A</i>^e t(9;22)(q34.1;q11.2)/<i>BCR::ABL1</i> t(8;16)(p11.2;p13.3)/<i>KAT6A::CREBBP</i> inv(3)(q21.3q26.2)/t(3;3)(q21.3;q26.2)/<i>GATA2</i>, <i>MECOM(EV11)</i> t(3q26.2;v)/rearanżacja <i>MECOM(EV11)</i> -5 lub del(5q); -7; -17/abn(17p) złożony kariotyp^f, kariotyp monosomalny^g mutacja <i>ASXL1</i>, <i>BCOR</i>, <i>EZH2</i>, <i>RUNX1</i>, <i>SF3B1</i>, <i>SRSF2</i>, <i>STAG2</i>, <i>U2AF1</i>, <i>ZRSR2</i>^h mutacja <i>TP53</i>ⁱ

^a współistnienie mutacji genu *KIT* i/lub *FLT3* nie zmienia klasyfikacji ryzyka

^b AML z mutacją *NPM1* i nieprawidłowościami cytogenetycznymi złego ryzyka powinna być klasyfikowana jako ryzyko niekorzystne

^c niezależnie czy mutacja jest mono- czy bialleliczna

^d obecność t(9;11) jest nadrzędna nad współistniejącymi mutacjami genów o złym rokowaniu

^e z wyjątkiem częściowej duplikacji tandemowej *KMT2A* (PTD)

^f karyotyp złożony oznacza ≥ 3 niezależne anomalie chromosomalne przy braku innych powtarzalnych nieprawidłowości genetycznych definiujących przynależność do podgrupy, z wyjątkiem karyotypu hiperdiploidalnego z trzema lub więcej trisomiami lub polisomiami bez współistniejących nieprawidłowości strukturalnych

^g karyotyp monosomalny oznacza obecność co najmniej 2 monosomii (z wyłączeniem utraty chromosomu X lub Y) lub pojedyncza monosomia autosomalna, w połączeniu z co najmniej jedną strukturalną nieprawidłowością chromosomową (z wyłączeniem *core-binding factor-AML*)

^hobecnie tych markerów nie należy stosować jako negatywnego wskaźnika prognostycznego, jeśli rozpoznano AML korzystnego ryzyka

ⁱ VAF $\geq 10\%$, niezależnie od statusu allelicznego (mono- lub bialleliczna), mutacje *TP53* są znacząco związane z AML o złożonym i monosomalnym karyotypie

W piątej edycji klasyfikacji WHO z 2022 roku AML została podzielona na dwie zasadnicze kategorie: AML z charakterystycznymi zmianami genetycznymi oraz AML określana na podstawie cech różnicowania (tab. 3.). W większości przypadków zdefiniowanych genetycznie rozpoznanie może być postawione niezależnie od progu 20% blastów, z wyjątkiem AML z fuzją *BCR::ABL1* oraz AML z mutacją *CEBPA*, gdzie konieczne jest przekroczenie tej wartości ($>20\%$) (Khoury i in., 2022).

W przypadku AML z mutacją *CEBPA*, klasyfikacja obejmuje zarówno mutacje bialleliczne, jak i monoalleliczne w obrębie domeny regionu zamka leucynowego bZIP (ang. *basic leucine zipper*). Zmieniono również nomenklaturę, termin ostra białaczka szpikowa związana z mielodysplazją AML-MR (ang. *acute myeloid leukemia myelodysplasia-related*) zastąpił wcześniejsze określenie „AML z cechami związanymi z mielodysplazją”. Rozpoznanie AML-MR wymaga obecności co najmniej 20% blastów oraz potwierdzenia zmian cytogenetycznych i/lub molekularnych typowych dla nowotworów mielodysplastycznych. Co istotne, cechy morfologiczne utraciły swoją samodzielną wartość diagnostyczną przy rozpoznaniu AML-MR. Przypadki, w których dochodzi do transformacji z MDS lub MDS/MPN, również klasyfikowane są jako AML-MR. Do grupy AML opartej na różnicowaniu zalicza się natomiast przypadki niewykazujące specyficznych zaburzeń genetycznych. Przewiduje się, że liczebność tej kategorii będzie się stopniowo zmniejszać wraz z identyfikacją nowych, charakterystycznych zmian molekularnych, umożliwiających bardziej precyzyjne przyporządkowanie diagnostyczne (Khoury i in., 2022; Huber i in., 2023).

Tabela 3. Klasyfikacja AML wg WHO 2022 (Khoury i in., 2022).

Ostra białaczka szpikowa (AML) z określonymi aberracjami genetycznymi
Ostra białaczka promielocytowa z fuzją <i>PML::RARA</i>
Ostra białaczka szpikowa z fuzją <i>RUNX1::RUNX1T1</i>
Ostra białaczka szpikowa z fuzją <i>CBFB::MYH11</i>
Ostra białaczka szpikowa z fuzją <i>DEK::NUP214</i>
Ostra białaczka szpikowa z fuzją <i>RBM15::MRTFA</i>
Ostra białaczka szpikowa z fuzją <i>BCR::ABL1</i>
Ostra białaczka szpikowa z rearanżacją <i>KMT2A</i>
Ostra białaczka szpikowa z rearanżacją <i>MECOM</i>
Ostra białaczka szpikowa z rearanżacją <i>NUP98</i>
Ostra białaczka szpikowa z mutacją <i>NPM1</i>
Ostra białaczka szpikowa z mutacją <i>CEBPA</i>
Ostra białaczka szpikowa związana z mielodysplazją (AML-MR)
Ostra białaczka szpikowa z innymi określonymi aberracjami genetycznymi
Ostra białaczka szpikowa definiowana na podstawie różnicowania
Ostra białaczka szpikowa o minimalnym różnicowaniu
Ostra białaczka szpikowa bez dojrzewania
Ostra białaczka szpikowa z dojrzewaniem
Ostra białaczka bazofilowa
Ostra białaczka mielomonocytowa
Ostra białaczka monocytowa
Ostra białaczka erytroidalna
Ostra białaczka megakarioblastyczna

3.6 Metody diagnostyczne

Do diagnostyki AML podstawowym materiałem biologicznym jest szpik kostny oraz krew obwodowa. Oba typy materiału wykorzystywane są również w analizie choroby resztkowej. Zalecanym antykoagulantem do pobierania próbek jest kwas wersenowy EDTA (ang. *ethylenediaminetetraacetic acid*), ponieważ heparyna może

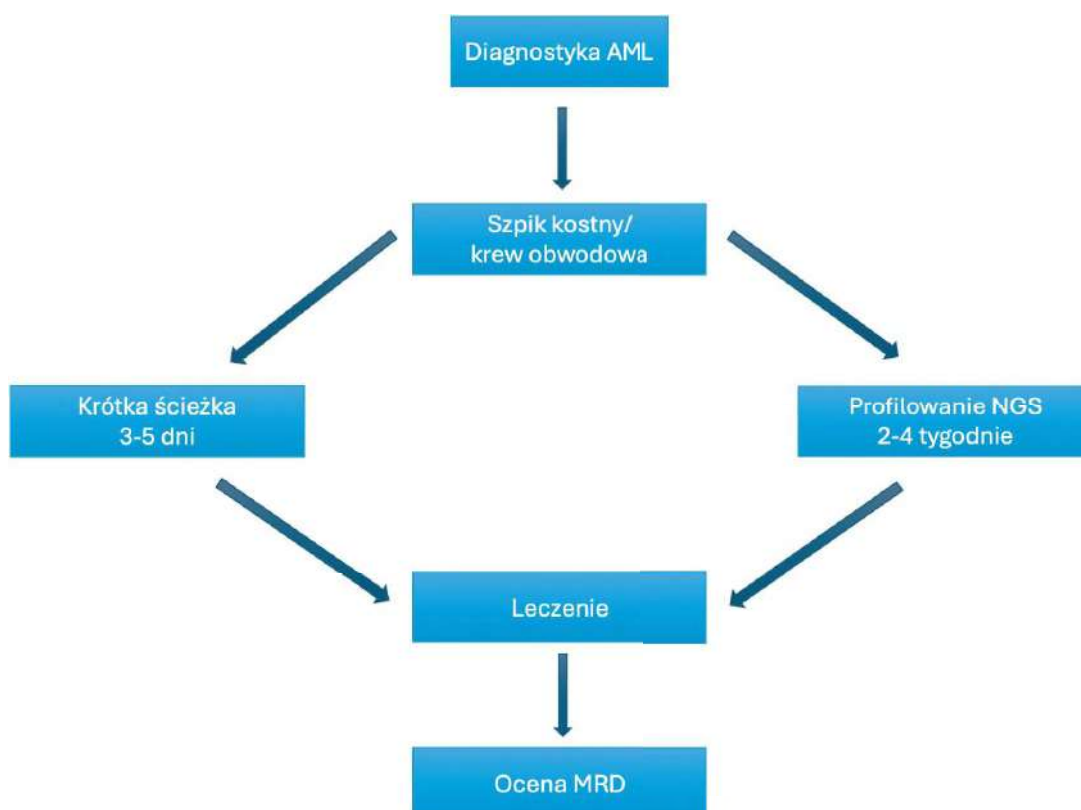
hamować reakcję PCR, co może prowadzić do zaburzenia wyników badań molekularnych (Yokota i in., 1999).

Standardowa diagnostyka AML obejmuje immunofenotypowanie z wykorzystaniem cytometrii przepływowej, badanie morfologiczne, zastosowanie technik cytogenetycznych oraz metod molekularnych (Mrózek i in., 2009; Shumilov i in., 2018). W przypadku chorób molekularnie heterogennych, takich jak AML, konieczne wydaje się również stosowanie metod detekcji obejmujących całe geny, które umożliwiają wiarygodne wykrywanie specyficznych dla pacjenta wariantów (Levine & Valk, 2019).

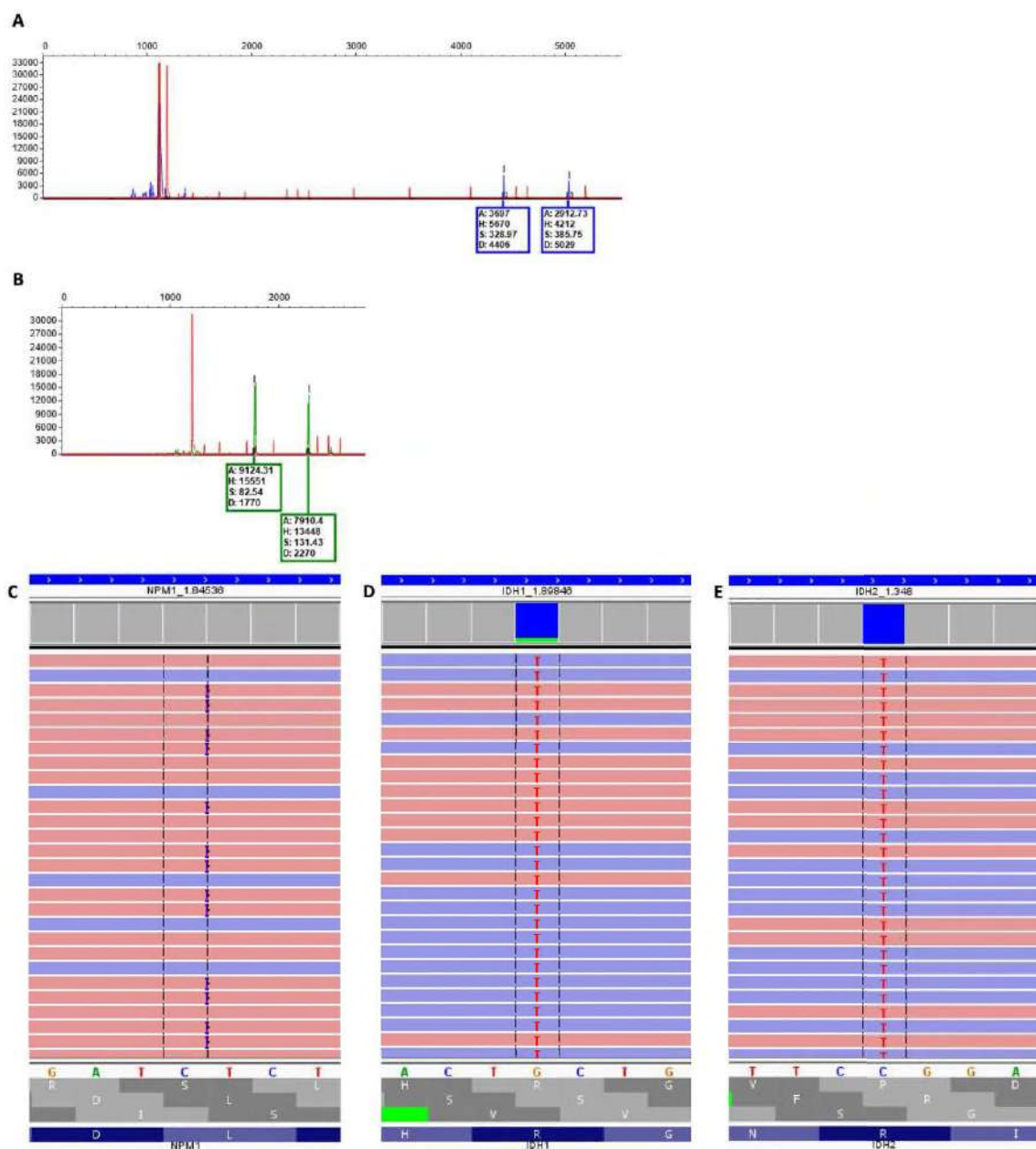
Wytyczne ELN z 2022 roku zawierają zaktualizowaną stratyfikację prognostyczną, opartą na nieprawidłowościach cytogenetycznych i molekularnych wykrytych podczas diagnozy AML (tab. 4.). Molekularna diagnostyka AML przebiega dwutorowo, obejmując jednoczesną realizację tzw. krótkiej ścieżki (elektroforeza kapilarna (ang. *capillary electrophoresis*, CE), reakcja Real-Time PCR ilościowa (ang. *quantitative real-time PCR*, qPCR, RT-qPCR, RQ-PCR), fluorescencyjna hybrydyzacja *in situ* (ang. *fluorescence in situ hybridization*, FISH)) oraz rozszerzonego profilowania genomowego metodą NGS, zgodnie ze schematem przedstawionym na rycinie (ryc. 3.). W praktyce klinicznej decyzje terapeutyczne u pacjentów z AML podejmuje się często przed uzyskaniem wyniku badania NGS, dlatego też istotnie jest prowadzenie dodatkowej krótkiej ścieżki. Krótka ścieżka dotyczy analiz kluczowych markerów diagnostycznych, których wyniki powinny być dostępne w krótkim czasie, zazwyczaj w ciągu 3-5 dni od pobrania materiału biologicznego. Równolegle prowadzone jest profilowanie NGS, trwające zwykle 2-4 tygodnie, umożliwiające kompleksową ocenę zmian molekularnych w szerokim panelu genów związanych z patogenezą chorób mieloproliferacyjnych (Chaudhary i in., 2024; Döhner i in., 2022). Na rycinie 4. zostały przedstawione przykłady wyników badań molekularnych na obecność mutacji genów w ramach krótkiej ścieżki.

Tabela 4. Badania wykonywane w przy rozpoznaniu AML wg wytycznych ELN, 2022.

Badania genetyczne		Sugerowany czas wyników
Cytogenetyka		5-7 dni (krótka ścieżka)
Badania molekularne na obecność mutacji genów		
<i>FLT3</i> (ITD i TKD), <i>IDH1</i> , <i>IDH2</i> , <i>NPM1</i>		3-5 dni (krótka ścieżka)
<i>CEBPA</i> , <i>DDX41</i> , <i>TP53</i> , <i>ASXL1</i> , <i>BCOR</i> , <i>EZH2</i> , <i>RUNX1</i> , <i>SF3B1</i> , <i>SRSF2</i> , <i>STAG2</i> , <i>U2AF1</i> , <i>ZRSR2</i>		w pierwszym cyklu leczenia (profilowanie NGS)
Badania molekularne na obecność genów fuzyjnych		
<i>PML::RARA</i> , <i>CBFB::MYH11</i> , <i>RUNX1::RUNX1T1</i> , rearanżacje <i>KMT2A</i> , <i>BCR::ABL1</i>		3-5 dni (krótka ścieżka)
Dodatkowe geny zalecane do testowania w trakcie diagnozy		
<i>ANKRD26</i> , <i>BCORL1</i> , <i>BRAF</i> , <i>CBL</i> , <i>CSF3R</i> , <i>DNMT3A</i> , <i>ETV6</i> , <i>GATA2</i> , <i>JAK2</i> , <i>KIT</i> , <i>KRAS</i> , <i>NRAS</i> , <i>NF1</i> , <i>PHF6</i> , <i>PPM1D</i> , <i>PTPN11</i> , <i>RAD21</i> , <i>SETBP1</i> , <i>TET2</i> , <i>WT1</i> (profilowanie NGS)		



Rycina 3. Schemat dwutorowego postępowania w diagnostyce molekularnej AML.



Rycina 4. Przykłady wyników badań molekularnych na obecność mutacji genów w ramach krótkiej ścieżki. Analiza fragmentów A - FLT3-ITD, B - FLT3 TKD. Wizualizacja za pomocą Integrative Genomics Viewer (IGV) C - NPM1 c.860_863dup p.(Trp288CysfsTer12), D - IDH1 c.395G>A p.(Arg132His), E - IDH2 c.419G>A p.(Arg140Gln).

3.7 Profil mutacji

Osoby chore na AML charakteryzują się występowaniem szerokiego profilu zmian genetycznych. Różne mutacje genów identyfikowane są u 55% chorych. Na podstawie występowania tych zmian chorych można zakwalifikować do odrębnych grup, które charakteryzują się zróżnicowanym rokowaniem oraz zmienną odpowiedzią na terapię (Döhner i in., 2017).

AML charakteryzuje się wysokim stopniem niejednorodności pod względem nieprawidłowości chromosomowych, mutacji genów oraz zmian w ekspresji wielu genów i mikroRNA. Nieprawidłowości cytogenetyczne można wykryć u około 50% do 60% nowo zdiagnozowanych pacjentów z AML. Większość przypadków AML wiąże się z nielosowymi translokacjami chromosomów, które często skutkują rearanżacją genów (C. C. Kumar, 2011). Analiza cytogenetyczna dużych strukturalnych nieprawidłowości chromosomalnych dostarczyła pierwszego genetycznego schematu prognostycznego w AML dzieląc pacjentów na podstawie ich kariotypu na tych z korzystną, pośrednią lub niekorzystną cytogenetyką i korelując z pięcioletnim ogólnym przeżyciem odpowiednio ~60%, od 30% do 40% i od 5% do 10% (DiNardo & Cortes, 2016; C. C. Kumar, 2011). Około 40% do 50% pacjentów z AML charakteryzuje się prawidłowym kariotypem (nieobecnością translokacji genetycznych) i reprezentują oni największy podzbiór. Wszystkie przypadki cytogenetycznie prawidłowych AML są obecnie sklasyfikowane w grupie pośredniego ryzyka, jednak ta grupa jest dość niejednorodna i nie wszyscy pacjenci z tej podgrupy wykazują taką samą reakcję na leczenie (Mrózek, 2022). W ciągu ostatniej dekady technologia sekwencjonowania DNA ujawniła nawracające mutacje genów, niewykrywalne standardową analizą cytogenetyczną, które dodatkowo przyczyniają się do patogenezy AML. Wiele z tych mutacji wykazuje znaczenie prognostyczne, zarówno niezależnie, jak i w kontekście współwystępujących mutacji. Szczególną uwagę należy zwrócić na zmiany genów uznawanych za część klonalnej hematopoezy o nieokreślonym potencjale (ang. *clonal hematopoiesis of indeterminate potential*, CHIP), np. *DNMT3A*, *TET2*, *ASXL1*. Zmiany te mogą występować u osób starszych bez cech choroby nowotworowej i nie zawsze mają bezpośrednie znaczenie prognostyczne i terapeutyczne. W związku z tym ich obecność powinna być interpretowana w kontekście klinicznym oraz innych współistniejących zmian genetycznych. Jednocześnie trwają prace nad terapiami celowanymi, ukierunkowanymi na konkretne zmiany molekularne i klasy genetyczne (DiNardo & Cortes, 2016; Hou

& Tien, 2020). Nawet 86% przypadków AML wiąże się z obecnością co najmniej dwóch zmian, co więcej nowe zmiany mogą pojawiać się zarówno w trakcie rozwoju choroby jak i w czasie terapii (Döhner i in., 2017; Roussel i in., 2020).

3.8 Przegląd terapii celowanych ukierunkowanych na określone mutacje genowe

Kluczowym elementem współczesnego podejścia do leczenia AML jest personalizacja terapii, oparta na szczegółowej charakterystyce molekularnej choroby u poszczególnych pacjentów. Precyzyjna identyfikacja specyficznych mutacji genetycznych za pomocą NGS umożliwia dostosowanie strategii terapeutycznych do indywidualnych potrzeb pacjentów, co znacząco zwiększa skuteczność leczenia. Personalizacja terapii na podstawie profilu mutacji może prowadzić do lepszych wyników leczenia, w tym wydłużenia okresów remisji oraz ogólnego wydłużenia życia pacjentów. Identyfikacja zmian genetycznych staje się kluczowym elementem w rozwoju nowych terapii ukierunkowanych. W ostatnich latach dynamicznie poszerza się zakres dostępnych opcji terapeutycznych, które mogą być wykorzystywane w praktyce klinicznej (Döhner i in., 2022).

Największe znaczenie kliniczne w AML mają obecnie inhibitory *FLT3* oraz inhibitory *IDH1/IDH2*, które są najlepiej przebadane i szeroko stosowane w praktyce klinicznej. Dodatkowo trwają również intensywne badania nad innymi lekami ukierunkowanymi na określone zmiany molekularne. Obiecujące wyniki wykazują inhibitory białka BCL-2, takie jak wenetoklaks (VEN), które w połączeniu z hipometylującymi analogami nukleozydów (ang. *hypomethylating agents*, HMA) stanowią ważną opcję terapeutyczną, zwłaszcza u pacjentów starszych oraz niekwalifikujących się do intensywnej chemioterapii. Terapia VEN+HMA charakteryzuje się wysokim odsetkiem odpowiedzi, jednak często obserwuje się krótkotrwałość remisji, zwłaszcza u pacjentów z mutacją genu *TP53*. (Brown i in., 2024; DiNardo, Jonas, i in., 2020). Występowanie mutacji *TP53* wiąże się z bardzo niekorzystnym rokowaniem, niskim odsetkiem odpowiedzi na leczenie oraz krótkim czasem przeżycia. Pomimo intensywnych badań klinicznych, skuteczne strategie terapeutyczne w tej grupie pacjentów pozostają ograniczone. Jednak trwają badania nad cząsteczkami ukierunkowanymi na zmutowane białko p53, takimi jak APR-246 (eprenetapopt), które mogą stanowić nową opcję terapeutyczną dla pacjentów z najwyższym ryzykiem nawrotu choroby po allogenicznym przeszczepieniu

krwiotwórczych komórek macierzystych (ang. *allogeneic stem cell transplantation*, allo-HSCT), w szczególności u osób z zaburzeniami chromosomu 17p oraz mutacjami genu *TP53* (Sallman i in., 2021; Z. Wang i in., 2023).

▪ **Inhibitory *FLT3***

Mutacje w genie kinazy tyrozynowej typu 3 (ang. *FMS-like tyrosine kinase 3*, *FLT3*) wykrywa się u około 30% pacjentów z AML. Najczęściej obserwowaną zmianą jest wewnętrzna duplikacja tandemowa (ang. *internal tandem duplication*, ITD), która wiąże się z niekorzystnym rokowaniem i zaliczana jest do czynników wysokiego ryzyka (Döhner i in., 2022; Fedorov i in., 2023; Negotei i in., 2023). U chorych na AML obecność mutacji *FLT3*-ITD wiąże się z wyższym ryzykiem nawrotu choroby oraz krótszym czasem przeżycia wolnego od białaczki w porównaniu z pacjentami bez mutacji. Zmiana ta zwykle utrzymuje się w momencie nawrotu u większości pacjentów, u których była obecna w chwili rozpoznania. Ponadto klony z mutacją *FLT3*-ITD mogą pojawić się dopiero w nawrocie, nawet jeśli nie były wykrywalne w momencie diagnozy, co wynika z ewolucji klonalnej. Występowanie mutacji *FLT3*-ITD w nawrocie AML po allo-HSCT wiąże się z niekorzystnym rokowaniem, zwłaszcza przy wysokim wskaźniku allelicznym, zwiększając ryzyko ponownego nawrotu i zgonu (Brunet i in., 2012; N. Daver i in., 2019).

Do inhibitorów *FLT3* zalicza się kinazy tyrozynowe pierwszej generacji, o wielokierunkowym działaniu m.in. midostauryne, sorafenib oraz selektywne inhibitory nowej generacji, do których należą m.in. gilteritinib, quizartinib oraz crenolanib (Antar i in., 2020; Negotei i in., 2023).

Midostauryna jest inhibitorem kinazy tyrozynowej pierwszej generacji, który wykazuje wysoką skuteczność, wobec mutacji ITD oraz mutacji w domenie kinazy tyrozynowej *FLT3*-TKD (ang. *Tyrosine Kinase Domain*, TKD) genu *FLT3*. Lek ten został uznany za skuteczną opcję terapeutyczną w leczeniu pacjentów z nawrotową lub oporną na leczenie postacią AML. Skuteczność midostauryny w skojarzeniu ze standardową chemioterapią oceniano w randomizowanym badaniu fazy III RATIFY u pacjentów poniżej 60. roku życia z AML z mutacją *FLT3* (ITD lub TKD). Wyniki wykazały, że zastosowanie midostauryny w skojarzeniu z chemioterapią 3 + 7 oraz konsolidacją wysokodawkowaną cytarabiną istotnie poprawia wyniki leczenia, co doprowadziło do uznania tej terapii za nowy standard postępowania w leczeniu pierwszej linii u pacjentów z AML *FLT3* dodatnią.

Gilterytynib jest obecnie jedynym inhibitorem kinaz tyrozynowych dopuszczonym w Europie do leczenia nawrotowej lub opornej na leczenie AML. Należy do inhibitorów drugiej generacji, charakteryzujących się wysoką selektywnością, działając poprzez hamowanie aktywności kinazy tyrozynowej. Wyniki badania rejestracyjnego ADMIRAL wykazały, że terapia gilterytynibem prowadzi do wydłużenia całkowitego czasu przeżycia oraz zwiększenia odsetka uzyskiwanych całkowitych remisji (Molica i in., 2023; Negotei i in., 2023; Perl i in., 2019; Zhao i in., 2022).

▪ Inhibitory *IDH1* i *IDH2*

Mutacje w genie dehydrogenazy izocytrynianowej (ang. *isocitrate dehydrogenase*, *IDH*) stwierdza się u około 20% chorych na AML. Zmiany w genach *IDH1* oraz *IDH2* prowadzą do zaburzeń metabolizmu komórkowego oraz regulacji epigenetycznej. W wyniku tych mutacji dochodzi do akumulacji 2-hydroksyglutaranu (2-HG), który powoduje hipermetylację DNA, nieprawidłową ekspresję genów oraz nasiloną proliferację komórek przy jednoczesnym zahamowaniu ich różnicowania. Mutacje *IDH1* i *IDH2* dotyczą konserwatywnych reszt argininy, odpowiednio R132 w genie *IDH1* oraz R140 i R172 w genie *IDH2* (Figuerola i in., 2010; Issa & DiNardo, 2021; Megías-Vericat i in., 2019; Messina i in., 2022).

Inhibitory dehydrogenazy izocytrynianowej stanowią kolejną grupę związków stosowanych w leczeniu podtrzymującym po allo-HSCT. Inhibitory *IDH*, takie jak ivosidenib i enasidenib, są stosowane odpowiednio u pacjentów z mutacją *IDH1* i *IDH2*.

Ivosidenib jest silnym inhibitorem produkcji 2-hydroksyglutaranu przez zmutowany enzym *IDH1* i wykazuje aktywność kliniczną głównie poprzez indukcję różnicowania i dojrzewania komórek nowotworowych. Ivosidenib wykazał obiecujące rezultaty, obejmujące zarówno odsetek i czas trwania całkowitej remisji, jak i częstość remisji całkowitej, remisji całkowitej z częściowym odzyskiem hematologicznym, a także całkowitą odpowiedź na leczenie oraz całkowite przeżycie. W Polsce Ivosidenib w skojarzeniu z lekami hipometylującymi jest terapią pierwszej linii u pacjentów z AML z mutacją genu *IDH1* niekwalifikujących się do intensywnej chemioterapii (Dang i in., 2009; DiNardo i in., 2018; Figuerola i in., 2010; Popovici-Muller i in., 2018; Rohle i in., 2013).

Inhibitor *IDH2* Enasidenib działa poprzez hamowanie produkcji onkometabolitu 2-hydroksyglutaranu, co prowadzi do przywrócenia prawidłowego procesu różnicowania komórek mieloidalnych i ograniczenia proliferacji komórek białaczkowych. Enasidenib

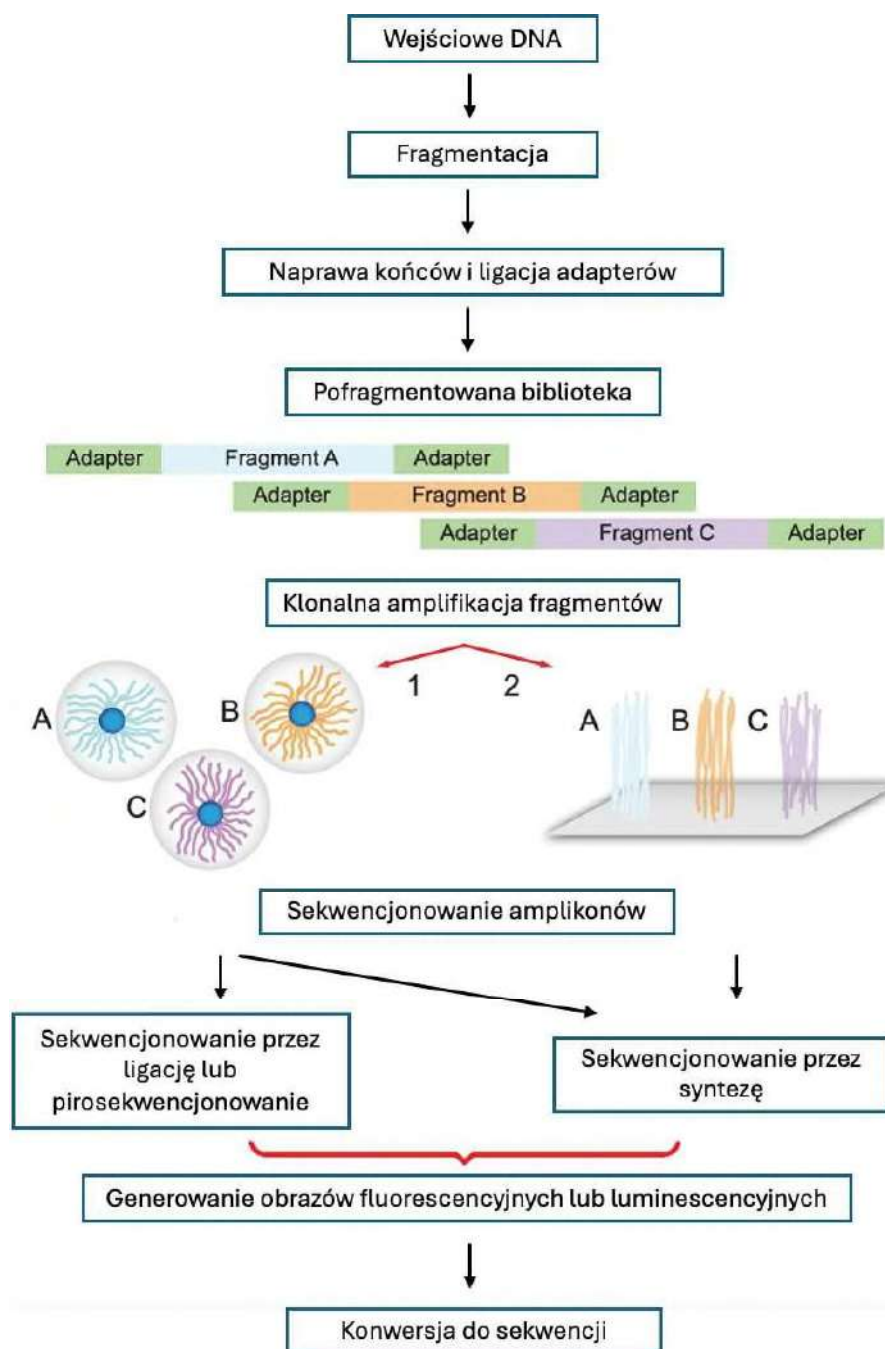
został zatwierdzony w Stanach Zjednoczonych do leczenia dorosłych pacjentów z nawrotową lub oporną na leczenie AML (ang. *relapsed/refractory acute myeloid leukemia*, R/R AML) z obecnością mutacji *IDH2* (Jiménez-Vicente i in., 2025; Stein i in., 2017; Yen i in., 2017)

3.9 Sekwencjonowanie

Wprowadzenie technik sekwencjonowania DNA było przełomem, który zrewolucjonizował wiele obszarów nauk przyrodniczych, takich jak biologia molekularna, biotechnologia czy medycyna. Dzięki postępowi w tej dziedzinie możliwe stało się nie tylko analizowanie całych genomów, ale również badanie różnorodności biologicznej oraz identyfikacja zmian genetycznych leżących u podłoża wielu chorób. Szczególnie istotne znaczenie zyskały metody sekwencjonowania nowej generacji, które umożliwiły równoległe sekwencjonowanie milionów cząsteczek DNA, znacznie zwiększając szybkość i efektywność analiz. Obecnie NGS jest powszechnie stosowany w diagnostyce klinicznej, gdzie odgrywa kluczową rolę w identyfikacji mutacji i profilowaniu molekularnym (Shendure & Ji, 2008; Metzker, 2010).

3.9.1 Sekwencjonowanie nowej generacji

W przeciwieństwie do klasycznej metody Sanger, technologie NGS bazują na alternatywnych reakcjach chemicznych, które umożliwiają znacznie większą skalę sekwencjonowania oraz wyższą przepustowość (Qin, 2019; Rizzo & Buck, 2012). Ogólną zasadę procesu NGS przedstawiono na rycinie poniżej (ryc. 5.).



Rycina 5. Etapy procesu sekwencjonowania nowej generacji z wykorzystaniem platform wymagających klonalnej amplifikacji matryc (Illumina, Life Technologies). Materiał DNA jest najpierw przetwarzany do postaci biblioteki sekwencyjnej poprzez fragmentację, naprawę końców oraz przyłączenie adapterów specyficznych dla danej platformy. Następnie uzyskane fragmenty biblioteki poddawane są klonalnej amplifikacji, realizowanej metodą emulsyjnego PCR w emulsji wodaolej (Life Technologies) (1) lub techniką amplifikacji mostkowej na stałej powierzchni (Illumina) (2). Technologia Life Technologies - Ion Torrent wykorzystuje PCR emulsyjny oraz sekwencjonowanie przez syntezę. Proces sekwencjonowania w komorze przepływowej generuje sygnały luminescencyjne lub fluorescencyjne, które są następnie przetwarzane algorytmicznie na odczyty sekwencji. Rycina na podstawie (Voelkerding i in., 2010).

Główne podejścia w ramach NGS można podzielić na dwie kategorie: sekwencjonowanie przez syntezę (ang. *sequencing by synthesis*, SBS) oraz sekwencjonowanie przez hybrydyzację (ang. *sequencing by hybridization*, SHB). SBS wykorzystuje zasady podobne do metody Sanger, jednak skupia się na odczycie znacznie krótszych fragmentów DNA, co wiąże się z wyższym ryzykiem błędów, kompensowanym poprzez głębokie pokrycie sekwencji, generowane są miliony, a nawet miliardy krótkich odczytów, które umożliwiają zbudowanie konsensusowej sekwencji (Slatko i in., 2018). SHB polega na wykorzystaniu krótkich sond oligonukleotydowych o znanej sekwencji, które wiążą się komplementarnie z badanym DNA. Wzorzec hybrydyzacji pozwala następnie na odtworzenie sekwencji analizowanego fragmentu (Drmanac i in., 2002).

3.9.2 Przygotowanie bibliotek NGS

Pierwszy etap stanowi przygotowanie bibliotek NGS. Obejmuje on przygotowanie krótkich fragmentów DNA lub cDNA (otrzymanych z RNA), do których dołączane są adaptory, czyli krótkie sekwencje DNA specyficzne dla danej technologii. Dodatkowo każda próbka otrzymuje unikatowe sekwencje identyfikacyjne, tzw. barcodes (ang. *barcodes*). Barcodes pozwalają na jednoznaczne oznaczenie poszczególnych próbek w trakcie jednego przebiegu sekwencjonowania oraz na prawidłowe przypisanie uzyskanych odczytów do odpowiedniego materiału na etapie analizy bioinformatycznej. Zastosowanie barcodów umożliwia analizę wielu próbek w jednym przebiegu (Boone i in., 2018; Haynes i in., 2019).

Proces rozpoczyna się od izolacji DNA lub RNA z materiału biologicznego. W przypadku RNA konieczna jest jego konwersja do cDNA przy użyciu odwrotnej transkryptazy (Chen i in., 2018; Head i in., 2014). Następnie przystępuje się do dostosowania fragmentów DNA/cDNA do wymagań konkretnej platformy sekwencjonującej. Obejmuje to ich fragmentację, zwykle do rozmiaru 300-500 par zasad, przy użyciu metod enzymatycznych lub mechanicznych, a także przyłączenie adapterów umożliwiających hybrydyzację z powierzchnią komory przepływowej (Head i in., 2014). Ostatnim krokiem przed rozpoczęciem sekwencjonowania jest amplifikacja bibliotek. Wykonuje się ją za pomocą reakcji PCR z ograniczoną liczbą cykli (zazwyczaj 7-9), tak aby zapewnić odpowiednią ilość materiału, bez znacznego zwiększenia liczby duplikatów.

W kolejnym kroku biblioteki są mieszane w odpowiednich proporcjach, tworząc tzw. pulę (ang. *pool*). Do jednej puli łączy się próbki przygotowane tą samą metodą, ale oznaczone różnymi barcodami (Hess i in., 2020). Im precyzyjniej dobrane są stężenia poszczególnych bibliotek, tym bardziej równomierna będzie liczba uzyskanych odczytów przypadających na każdą z próbek.

3.9.3 Sekwencjonowanie i analiza danych

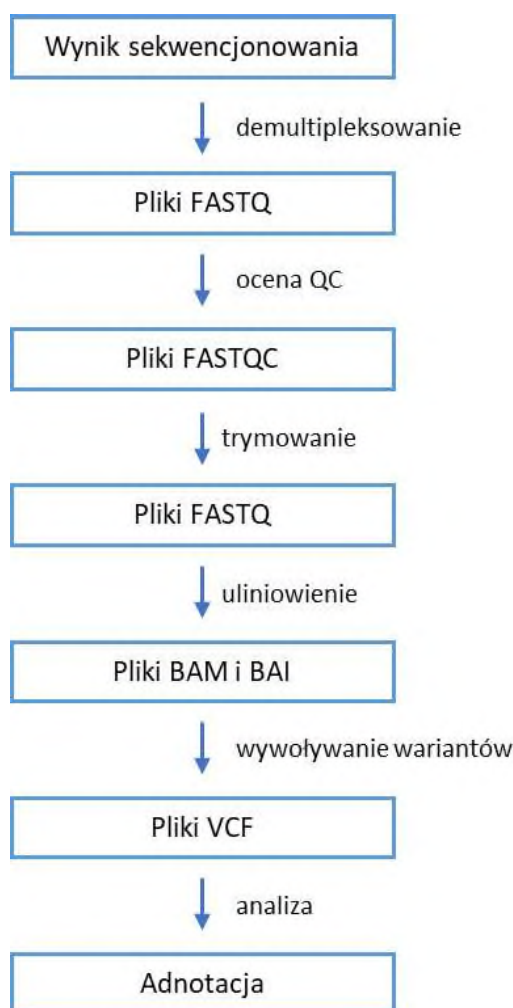
Proces sekwencjonowania różni się w zależności od zastosowanej technologii, jednak jego ogólna zasada jest podobna. Wykonywane są cykle inkorporacji zasad azotowych oraz ich detekcji. W zależności od technologii wykorzystywany jest np. sygnał fluorescencyjny (Illumina) lub zmiana pH (Ion Torrent). Sekwencjonowanie polega na identyfikacji kolejnych zasad (A, C, G, T) obecnych we fragmentach DNA. W zależności od platformy, czas trwania sekwencjonowania może wynosić od kilku (Ion Torrent) do kilkudziesięciu godzin (Illumina). Ostatnią fazą całego procesu jest analiza bioinformatyczna danych, czyli tzw. analiza *in silico* w trakcie potoku analizy danych (ang. *analytical pipeline*) (ryc. 6). Otrzymane dane surowe są porządkowane i przetwarzane z wykorzystaniem wyspecjalizowanych algorytmów. Celem jest porównanie sekwencji próbki z genomem referencyjnym, identyfikacja różnic (np. mutacji, delecji, insercji), a następnie ich biologiczna i kliniczna interpretacja (Bhat i in., 2022; Cabello-Aguilar i in., 2023; Larson i in., 2023).

Pierwszym etapem analizy, jeszcze na poziomie pamięci sekwenatora jest proces demultipleksowania, który polega na przypisaniu odczytów (ang. *reads*) do poszczególnych próbek. Następnie generowane są dane z surowymi odczytami tzw. pliki FASTQ. Jest to standardowy format plików tekstowych, w którym zapisywane są surowe dane sekwencjonowania uzyskane bezpośrednio z platformy NGS. Zawierają one odczyty tj. sekwencje nukleotydów oraz informacje o jakości każdego z odczytanych nukleotydów. Pliki FASTQ stanowią najważniejsze pliki wyjściowe z pierwszego etapu analizy NGS i są punktem wyjścia dla dalszego przetwarzania bioinformatycznego. Należy przeprowadzić ocenę kontroli jakości (ang. *quality control*, QC) uzyskanych plików. W celu podniesienia jakości uzyskanych wyników możliwe jest odrzucenie sekwencji o złej jakości, a także odcięcie zidentyfikowanych adapterów w procesie trymowania (ang. *trimming*). Po tym procesie można na nowo wykonać proces kontroli i wygenerować pliki FASTQC (Larson i in., 2023; Ward i in., 2020; Wilkins i in., 2021).

Kolejny etap potoku analizy danych stanowi uliniowanie (ang. *alignment*), które stanowi proces dopasowywania odczytów sekwencji uzyskanych w wyniku sekwencjonowania do genomu referencyjnego. W wyniku uliniowania generowany jest plik BAM, który przechowuje informacje o dopasowaniu odczytów do genomu referencyjnego oraz BAI, który stanowi tzw. indeks mapowania. Dzięki dostępowi do plików BAM i BAI możliwa jest wizualizacja danych dla konkretnych regionów z zastosowaniem narzędzi do wizualizacji np. przeglądarka genomowa do wizualizacji danych sekwencjonowania (ang. *integrative genomics viewer*, IGV) (Reinert i in., 2015; Satam i in., 2023).

Uliniowanie umożliwia wykrycie różnic pomiędzy sekwencją badaną a genomem referencyjnym, co stanowi podstawę do dalszego etapu analizy, jakim jest wywoływanie wariantów (ang. *variant calling*). W trakcie tego procesu generowane są pliki VCF (ang. *variant calling format*). Pliki VCF służą do przechowywania informacji o wariantach genetycznych wykrytych podczas analizy. Zawierają one szczegółowe dane o lokalizacji zmiany, rodzaju zmiany oraz częstości występowania allelu wariantu (ang. *variant allelic frequency*, VAF) (Koboldt, 2020; Koroglu & Bilguvar, 2025).

Ostatnim etapem analizy jest adnotacja, której celem jest nadanie wykrytym wariantom biologicznego i klinicznego znaczenia na podstawie danych zawartych w pliku VCF. Proces ten obejmuje weryfikację zmian w dostępnych bazach danych i narzędziach bioinformatycznych, ocenę częstości występowania wariantów w populacji oraz określenie ich potencjalnej patogenności (Cingolani, 2022; Pilalis i in., 2025; Tuteja i in., 2022).



Rycina 6. Schemat głównych etapów potoku bioinformatycznego analizy danych NGS.

3.9.4 Znaczenie NGS w diagnostyce AML

Sekwencjonowanie następnej generacji jest metodą nowoczesną i wysokoprzepustową, która umożliwia jednoczesną analizę wielu genów. W kontekście AML, NGS pozwala na szybkie i precyzyjne wykrycie mutacji w dużej liczbie próbek. Jest to niezbędne dla dokładnej diagnostyki molekularnej oraz identyfikacji rzadkich mutacji i rearanżacji genowych, które mogą mieć istotne znaczenie prognostyczne i terapeutyczne. Zwiększenie efektywności diagnostycznej poprzez kompleksowe profilowanie genetyczne prowadzi do lepszego zrozumienia heterogenności genetycznej choroby. Jednak NGS nie jest pozbawiony ograniczeń, do których należą wydłużony czas uzyskania wyniku, relatywnie wysokie koszty oraz ograniczony zakres analiz wynikający ze stosowanych paneli diagnostycznych (Döhner i in., 2022; Guijarro i in., 2023; Salman, 2024).

Strategie oparte na metodzie NGS nie są obecnie wystandaryzowane jako samodzielna technika oceny MRD. Jednak stosowanie ultraczułego sekwencjonowania NGS (ang. *ultra-high-sensitivity next-generation sequencing*, UHS-NGS) może być istotne w ocenie MRD, przy czym oczekiwana czułość UHS-NGS powinna wynosić poniżej 0,1%, a optymalnie $\leq 0,01\%$ (Cloos i in., 2026).

4 Cel pracy

Celem niniejszej rozprawy doktorskiej jest określenie profilu mutacji z wykorzystaniem technologii sekwencjonowania nowej generacji u pacjentów ze zdiagnozowaną ostrą białaczką szpikową hospitalizowanych w Świętokrzyskim Centrum Onkologii w latach 2020-2023.

Cele szczegółowe:

1. Identyfikacja zmian genetycznych i genów fuzyjnych w panelu wybranych genów u pacjentów z ostrą białaczką szpikową z zastosowaniem technologii sekwencjonowania nowej generacji oraz określenie częstości mutacji w poszczególnych genach w analizowanej populacji.
2. Charakterystyka molekularna wykrytych wariantów genetycznych z uwzględnieniem ich klasyfikacji funkcjonalnej (*missense, nonsense, frameshift, in-frame, splice site, fusion*) oraz ocena częstości występowania poszczególnych typów zmian w badanej grupie pacjentów.
3. Ocena współwystępowania mutacji w badanych genach. Identyfikacja najczęściej współlistniejących zmian genetycznych.
4. Ocena skuteczności stratyfikacji pacjentów do terapii ukierunkowanych molekularnie z wykorzystaniem NGS.

5 Materiały i metody

5.1 Materiały

5.1.1 Materiał badawczy

Materiał biologiczny do analizy pochodził od pacjentów z rozpoznaniem ostrej białaczki szpikowej, hospitalizowanych w Świętokrzyskim Centrum Onkologii w latach 2020-2023. Do badań wykorzystano próbki szpiku kostnego (2 ml) i/lub krwi obwodowej (10 ml). Analizie poddano materiał od 109 pacjentów w wieku od 19 do 84 lat (tab. 5.).

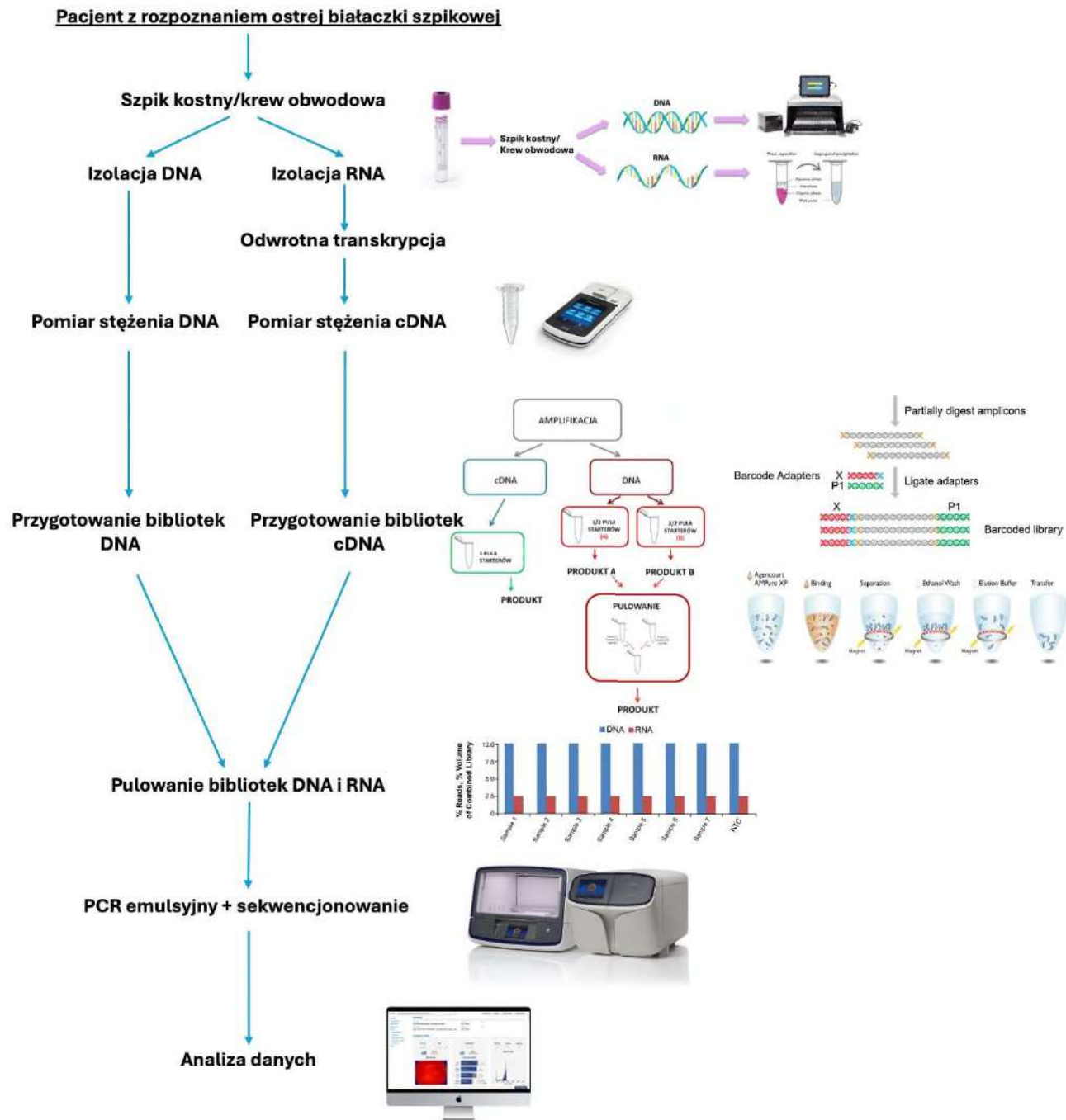
Wszyscy pacjenci wyrazili zgodę na wykorzystanie materiału do celów naukowych, wypełniając odpowiednie pola w formularzu świadomej zgody na przeprowadzenie badań genetycznych (Załącznik 1. Deklaracja świadomej zgody na wykonanie badania genetycznego).

Tabela 5. Charakterystyka grupy badanej.

Okres hospitalizacji	Rozpoznanie	Płeć	Liczebność grupy	Wiek pacjentów w momencie rozpoznania AML [lata]			Kariotyp			
				zakres	średnia	mediana	prawidłowy [%]	nieprawidłowy [%]	brak metafaz [%]	brak danych [%]
2020-2023	AML	Kobiety	43	19-81	58,6	63	14 [12,8]	22 [20,2]	2 [1,8]	5 [4,6]
		Mężczyźni	66	26-84	60,3	65	17 [15,6]	34 [31,2]	8 [7,3]	7 [6,4]
		Ogółem	109	19-84	59,5	65	31 [28,4]	56 [51,4]	10 [9,2]	12 [11,0]

5.2 Metody

Materiał genetyczny pacjentów poddano analizie z zastosowaniem metod biologii molekularnej, zgodnie ze schematem przedstawionym poniżej (ryc. 7.).



Rycina 7. Schemat części doświadczalnej pracy.

5.2.1 Izolacja materiału genetycznego

Materiał badany stanowił szpik kostny (2 ml) i/lub krew obwodowa (10 ml). Jako antykoagulant zastosowano wersenian dwusodowy (EDTA). Z materiału biologicznego wyizolowano materiał genetyczny DNA oraz RNA.

5.2.1.1 Izolacja DNA

Materiał genetyczny jakim jest DNA (kwas deoksyrybonukleinowy) wyizolowano z wykorzystaniem izolacji automatycznej za pomocą urządzenia Maxwell® RSC (Promega). Do procesu izolacji został zastosowany zestaw Maxwell® RSC Whole Blood DNA Kit, umożliwiający izolację genomowego DNA z krwi obwodowej/szpiku kostnego z próbek świeżych lub mrożonych. Postępowano zgodnie z instrukcją producenta. Użyto 300 µl krwi obwodowej i/lub 100 µl szpiku kostnego. Elucję przeprowadzono w 100 µl buforu elucyjnego. Otrzymane DNA przechowywano w temperaturze 4 °C do dalszych analiz.

5.2.1.2 Oczyszczanie DNA

Izolaty DNA zostały poddane oczyszczaniu z wykorzystaniem zestawu Anti-Inhibitor Kit firmy A&A Biotechnology zgodnie z instrukcją producenta. Oczyszczanie wykonano w celu poprawienia jakości DNA poprzez usunięcie inhibitorów reakcji enzymatycznych. Otrzymane DNA przechowywano w temperaturze 4 °C do dalszych analiz.

5.2.1.3 Izolacja RNA

Materiał genetyczny jakim jest RNA (kwasy rybonukleinowy) został wyizolowany manualnie z zastosowaniem zmodyfikowanej metody Chomczyńskiego/Sacchi. Do izolacji użyto świeżo pobranego materiału (krew obwodowa i/lub szpik kostny). Proces izolacji został podzielony na dwa etapy.

Etap pierwszy, przeprowadzany bezpośrednio po pobraniu materiału (tego samego dnia), polegał na wyodrębnieniu komórek jednojądrzastych z zastosowaniem buforu do lizy erytrocytów (tab. 6.) z 10 ml krwi obwodowej i/lub 2 ml szpiku kostnego. Następnie uzyskany pellet komórkowy zawieszano w 1 ml odczynnika TRIzol™ (Thermo Fisher Scientific) w probówce typu Eppendorf poprzez wielokrotne przetłoczenie zawiesiny

przez strzykawkę z igłą o średnicy 0,7 mm. Materiał przechowywano w temperaturze -80 °C do czasu rozpoczęcia drugiego etapu izolacji.

Tabela 6. Skład burofu do lizy erytrocytów.

Składnik	Ilość
0.15 molowy NH ₄ Cl	4g
0.01 molowy KHCO ₃	0.5g
0.13 molowy EDTA	0.175g
woda wolna od nukleaz	500ml

Etap drugi, izolacji właściwej, rozpoczęto od powolnego rozmrożenia lizatu zawieszonego w TRIzolu, intensywnego wymieszania oraz inkubacji (37 °C, 330 RPM, 10 min.) oraz schłodzenia na lodzie przez 10 min. Następnie dodawano 200 µl schłodzonego chloroformu, intensywnie mieszano i inkubowano (temp. pokojowa, 1000 RPM, 15 min.), po czym wirowano (4 °C, 12000 obr./min., 10 min.). Fazę wodną zawierającą RNA przenoszono do nowych próbek i ponownie ekstrahowano chloroformem w celu usunięcia zanieczyszczeń białkowych i DNA. Do uzyskanej fazy wodnej dodawano 500 µl schłodzonego izopropanolu, w celu wytrącenia RNA, inkubowano 10 min. w temperaturze pokojowej i wirowano (4 °C, 12000 obr./min., 10 min.). Po usunięciu supernatantu pellet RNA przemywano 1 ml 75% etanolu, wirowano (4 °C, 7500 obr./min., 5 min.) i osuszano przez 10 min. Następnie RNA rozpuszczano w 20 µl jałowej wody wolnej od nukleaz poprzez inkubację (56 °C, 330 RPM, 10 min.). Następnie oceniono stężenie i czystość wyizolowanego materiału za pomocą urządzenia Nano Drop One firmy Thermo Fisher Scientific. Izolaty przechowywano w temperaturze -80 °C do dalszych analiz.

5.2.2 Reakcja odwrotnej transkrypcji

RNA poddano procesowi odwrotnej transkrypcji (ang. *reverse transcription*, RT) celem uzyskania cDNA na matrycy RNA. Zastosowano zestaw Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit for RT-qPCR firmy Thermo Fisher Scientific zgodnie z instrukcją producenta.

Dodatkowy etap, po procesie odwrotnej transkrypcji, stanowiło wykonanie klasycznej łańcuchowej reakcji polimerazy (ang. *polymerase chain reaction*, PCR), celem potwierdzenia poprawności wykonania izolacji RNA oraz prawidłowego przepisania informacji genetycznej zawartej w RNA na cDNA. Przeprowadzono reakcję dla genu referencyjnego *BCR* wykorzystując odpowiednie sekwencje starterów zamieszczonych w tabeli poniżej (tab. 7.).

Tabela 7. Sekwencje starterów dla reakcji kontrolnej.

Nazwa genu	Sekwencja referencyjna	Nazwa startera	Sekwencja startera	Długość produktu [pz]
<i>BCR</i>	NM_004327.4	<i>BCR-R</i>	ATGTCCGTGGCCACACCGGACAC	870
		<i>BCR-12</i>	AGAACATCCGGGAGCAGCAGAAGAA	

Skład mieszaniny reakcyjnej przygotowano wg objętości podanych w tabeli 8. Reakcję przeprowadzono z wykorzystaniem termocyklera Veriti firmy Thermo Fisher Scientific z zachowaniem odpowiedniego profilu temperaturowego (tab 9.).

Tabela 8. Skład mieszaniny reakcyjnej PCR kontrolnego dla genu *BCR*.

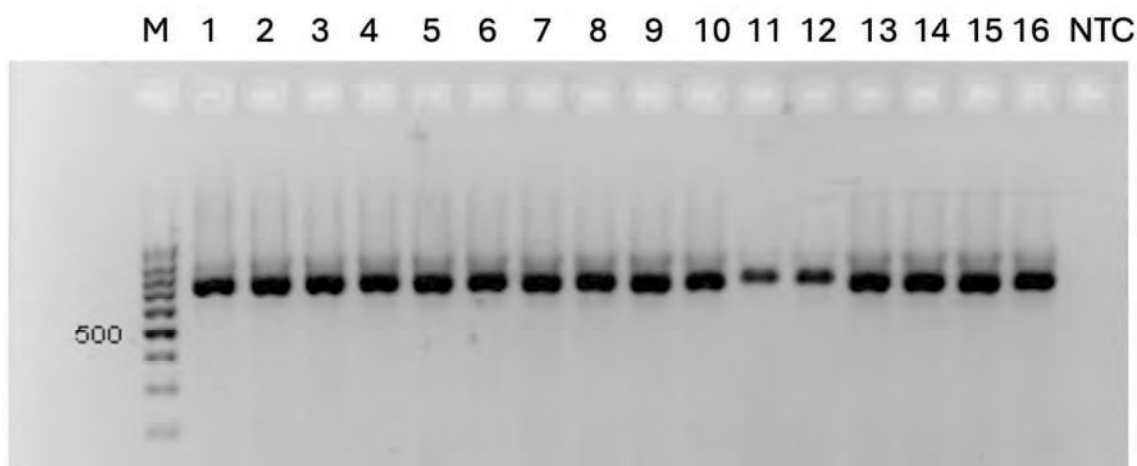
Składniki	Objętość (μl)/1 próbkę
mix Syber Green	5
<i>BCR-R</i>	1
<i>BCR-12</i>	1
H ₂ O	1
cDNA	2

Tabela 9. Profil temperaturowy łańcuchowej reakcji polimerazy.

Temperatura [°C]	Czas	Liczba cykli
95	3 min.	1
95	45 s.	
65,5	45 s.	35
72	30 s.	
72	1 min.	1

5.2.3 Elektroforeza agarozowa

Produkty reakcji PCR wizualizowano metodą elektroforezy w 2% żelu agarozowym przez 40 min przy napięciu 120 V, a następnie analizowano z użyciem transiluminatora. Oczekiwano uzyskania prążka produktu PCR o długości około 870 pz we wszystkich badanych próbkach, przy jednoczesnym braku amplifikacji w kontroli bez matrycy (ang. *no template control*, NTC). W przypadku braku produktu amplifikacji procedurę izolacji RNA i reakcję PCR powtarzano. Przykładowy obraz elektroforezy przedstawiono na ryc. 8.



Rycina 8. Rozdział elektroforetyczny produktów PCR dla genu BCR. M - wzorzec masy molekularnej 100-1000 pz, 1-16 próby badane (produkt o wielkości 870 pz), NTC - *non-template control*.

5.2.4 Pomiar stężenia DNA i cDNA

Stężenie otrzymanych DNA i cDNA zmierzono za pomocą fluorymetru Qubit 4 firmy Thermo Fisher Scientific z zastosowaniem zestawu Qubit™ 1X dsDNA Broad Range (BR) Assay Kits firmy Thermo Fisher Scientific według instrukcji producenta.

5.2.5 Zestaw Oncomine Myeloid

Wykonano sekwencjonowanie NGS z wykorzystaniem panelu Oncomine™ Myeloid Research Assay firmy Thermo Fisher Scientific obejmującego geny charakterystyczne dla nowotworów proliferacyjnych, w tym ostrej białaczki szpikowej. Pozwala on na detekcję zmian w 40 genach (tab. 10.) i 29 genach kierujących fuzji (tab. 11.). Materiałem badanym wykorzystywanym do wykrywania zmian w genach było DNA, natomiast do identyfikacji genów fuzyjnych zastosowano cDNA otrzymane na matrycy RNA.

Tabela 10. Geny (CDS) oraz hotspoty oceniane w panelu Oncomine™ Myeloid Research Assay.

Geny badane w regionach hotspot		Geny badane w całości*	Geny fuzyjne (fuzje zawierające jednego z poniższych partnerów)	
ABL1	KRAS	ATRX	ABL1	MYB
ANKRD26	MET	BCOR	ALK	MYBL1
ASXL1	MPL	CEBPA	BCL2	MYH11
BCOR	MYD88	ETV6	BRAF	NTRK3
BRAF	NPM1	EZH2	CCND1	NUP98
CBL	NRAS	IKZF1	CREBBP	NUP214
CSF3R	PPM1D	IKZF1	EGFR	PDGFRA
DDX41	PTPN11	NF1	ETV6	PDGFRB
DNMT3A	SETBP1	PHF6	FGFR1	RARA
FLT3	SF3B1	RB1	FGFR2	RBM15
GATA2	SMC1A	RUNX1	FUS	RUNX1
HRAS	SMC3	SH2B3	HMGA2	TCF3
IDH1	SRSF2	STAG2	JAK2	TFE3
IDH2	TP53	TET2	KMT2A (MLL, w tym MLL-PTD)	
JAK2	U2AF1		MECOM	
KIT	ZRSR2			

*obejmują sekwencje kodujące (CDS, ang. *coding sequence*) wraz z przyległymi miejscami splicingowymi

Tabela 11. Geny fuzyjne oceniane z wykorzystaniem panelu Oncomine™ Myeloid Research Assay.

Gen fuzyjny (kierujący)	Gen partnerowy	Liczba wariantów
KMT2A	ABI1, ABI2, ACACA, ACER1, ACTN4, ADARB2, AFF1, AFF3, AFF4, APBB1IP, ARHGAP26, ARHGEF12, ARHGEF17, ATG16L2, BTBD18, c11orf88, CASC5, CASP8AP2, CBL, CDK6, CEP170B, CREBBP, CT45A2, DAB2IP, DCP1A, DCPS, ELL, ENAH, EP300, EPS15, FLNA, FNBP1, FOXO3, FOXO4, FRYL, GAS7, GMPS, GPHN, KIAA1524, LASP1, LPP, MAML2, MAPRE1, MEF2C, MLLT1, MLLT10, MLLT11, MLLT3, MLLT4, MLLT6, MYH11, MYO18A, MYO1F, NCKIPSD, NEBL, NKAIN2, NRIP3, NUP98, PDS5A, PICALM, RABGAP1L, RNF115, RPS3, SARNP, SEPT11, SEPT2, SEPT5, SEPT6, SEPT9, SH3GL1, SMAP1, SORBS2, TECR, TET1, TIRAP, TOP3A, USP2, UVRAG, ZFYVE19	199
BRAF	AGAP3, AGK, AGTRAP, AKAP9, AP3B1, ARMC10, ATG7, BCL2L11, BTF3L4, C7orf73, CCDC91, CCNY, CDC27, CEP89, CLCN6, CUL1, CUX1, DYNC1I2, EPS15, FAM114A2, FAM131B, FCHSD1, GATM, GHR, GNAI1, GTF2I, HERPUD1, KCTD7, KDM7A, KIAA1549, KLHL7, LSM12, LSM14A, MACF1, MAD1L1, MKRN1, MYRIP, MZT1, NUB1, NUDCD3, PAPSS1, PLIN3, RAD18, RBMS3, RNF130, RP2, SLC12A7, SLC45A3, SND1, SOX6, STRN3, TANK, TAX1BP1, TMEM178B, TMPRSS2, TRIM24, TRIM4, UBN2, ZC3HAV1, ZKSCAN5, ZSCAN30	95
ETV6	ABL1, ABL2, ACSL6, ANLN, ARNT, ATP2B1, CDX2, CHIC2, DUSP16, FGFR3, FLT3, FRK, GOT1, INO80D, ITPR2, JAK2, LRP6, LYN, MECOM, MN1, NCOA2, NTRK2, NTRK3, PDGFRA, PDGFRB, PER1, PRDM16, PTPRR, RUNX1, SYK	52
ABL1	BCR, CABIN1, EML1, FOXP1, INPP5D, PRDM12, RALGPS1, RANBP2, RCSD1, SFPQ, SNX2, SPECC1L, ZMIZ1	49
RARA	ADAMTS17, BCOR, FIP1L1, IRF2BP2, NABP1, NPM1, NUMA1, PML, PRKAR1A, STAT5B, TBL1XR1, ZBTB16	45
RUNX1	AFF3, CBFA2T2, CBFA2T3, CEP76, CLCA2, EVX1, KIAA1549L, LPXN, MACROD1, MECOM, MRPS6,	39

	NOL4L, PRDM16, PRDX4, RPL22, RUNX1T1, SH3D19, TRPS1, USP1, USP42, YTHDF2, ZFPM2, ZNF687	
PDGFRB	ATF7IP, BIN2, CAPRIN1, CCDC6, CCDC88C, CEP85L, CPSF6, DTD1, EBF1, ERC1, GIT2, GOLGA4, GOLGB1, HIP1, KANK1, MPRIP, MYO18A, NDE1, NIN, PDE4DIP, PRKG2, RABEP1, SART3, SPECC1, TNIP1, TP53BP1, TPM3, TRIP11, WDR48, ZEB2	36
JAK2	ATF7IP, BCR, BICD2, EBF1, OFD1, PAX5, PCM1, PPFIBP1, SEC31A, SPAG9, SSBP2, STRN3, TERF2, TPM3, TPR	31
FGFR1	ADAM32, BAG4, BCR, CNTRL, CPSF6, CUX1, ERVK3_1, FGFR1OP, FGFR10P2, FN1, HOOK3, LRRFIP1, MYO18A, RANBP2, SQSTM1, TACC1, TPR, TRIM24, WHSC1L1, ZMYM2	27
PDGFRA	BCR, CDK5RAP2, FIP1L1, FOXP1, KDR, KIF5B, SCAF11, STRN, TNKS2	27
MYH11	CBFB	19
TCF3	HLF, PBX1, TFPT, ZNF384	15
MLLT10	DDX3X, HNRNPH1, NAP1L1, NUP98, PICALM	14
NUP214	ABL1, BRAF, DEK, XKR3, SET	14
CREBBP	KAT6A, KAT6B	8
HMGA2	FHIT, LPP, RAD51B	3
RBM15	MKL1	2
TFE3	GRIPAP1, SFPQ	2
ALK	MROH2B	1
BCL2	AFF3	1
CCND1	FSTL3	1
FGFR2	CCDC6	1
FUS	DDIT3	1
MECOM	PSMD2	1
MET	KIF5B	1

MLLT3	PAX5	1
MYBL1	C8orf34	1
NTRK3	COX5A	1
		687

5.2.6 Sekwencjonowanie

Proces przygotowania bibliotek można podzielić na kilka etapów, takich jak: amplifikacja matrycy DNA i cDNA, częściowe trawienie ampikonów, ich ligacja z barcodami oraz oczyszczanie z zastosowaniem kulek magnetycznych. Etapy przygotowania bibliotek zostały przedstawione na schemacie zamieszczonym poniżej. (ryc. 9.).



Rycina 9. Schemat przygotowania bibliotek.

Przygotowano biblioteki do reakcji sekwencjonowania na podstawie instrukcji producenta, jednak wprowadzając pewne modyfikacje, mające na celu usprawnienie procesu, takie jak oczyszczanie materiału przed jego amplifikacją, zmniejszenie objętości odczynników oraz zwiększenie ilości matrycy do reakcji PCR.

Przygotowanie bibliotek

- **Amplifikacja**

Pierwszy etap przygotowania bibliotek stanowi amplifikacja matrycy DNA i cDNA przy użyciu zestawu Oncomine™ Myeloid Research Assay firmy Thermo Fisher Scientific. Reakcje przeprowadzono z wykorzystaniem termocyklera Veriti (Thermo Fisher Scientific) zgodnie z profilami temperaturowymi i składami mieszanin

reakcyjnych przedstawionymi w tabelach poniżej. Ilość matrycy oraz warunki reakcji zoptymalizowano na podstawie instrukcji producenta, z uwzględnieniem modyfikacji.

Tabela 12. Skład mieszaniny reakcyjnej dla cDNA.

Odczynnik	Objętość
5x IonAmpliseq HiFi Mix	4 µl
5x Oncomine Myeloid RNA Panel	4 µl
H ₂ O	<12 µl
cDNA	40 ng

Tabela 13. Profil temperaturowy łańcuchowej reakcji polimerazy dla cDNA.

Temperatura [°C]	Czas	Liczba cykli
99	2 min.	1
98	15 s.	27
60	4 min.	
10	∞	1

Tabela 14. Skład mieszaniny reakcyjnej dla DNA.

Odczynnik	Objętość
5x IonAmpliseq HiFi Mix	2,5
5x Primer Pool (1/2) lub 5x Primer Pool (2/2)	2
H ₂ O	< 6,5
DNA	40 ng

Tabela 15. Profil temperaturowy łańcuchowej reakcji polimerazy dla DNA.

Temperatura [°C]	Czas	Liczba cykli
99	2 min.	1
99	15 s.	16
60	4 min.	
10	∞	1

Powstałe produkty przechowywano krótkoterminowo w 10 °C, w przypadku dłuższego przechowywania (powyżej jednej doby) w -20 °C.

- **Częściowe trawienie amplikonów**

Produkty amplifikacji poddano częściowemu enzymatycznemu trawieniu amplikonów za pomocą odczynnika FuPa Reagent (Ion AmpliSeq™ Library Kit Plus, Thermo Fisher Scientific) wg instrukcji producenta. Produkty reakcji przechowywano w -20 °C do czasu dalszych analiz.

- **Ligacja z unikatowymi indeksami**

W tym etapie indeksowe sekwencje DNA są ligowane (przyłączane) do końców fragmentów DNA/cDNA, otrzymanych w procesie fragmentowania z wykorzystaniem zestawu Ion Xpress™ Barcode Adapters Kit firmy Thermo Fisher Scientific wg instrukcji producenta. Indeksy pełnią funkcję znaczników próbek, umożliwiając wiązanie amplikonów ze sferami (ang. *Ion Sphere Particle*, ISPs) podczas emulsyjnego PCR oraz sekwencjonowanie wielu próbek w jednym przebiegu NGS.

- **Oczyszczanie bibliotek**

W kolejnym etapie przeprowadzono oczyszczanie bibliotek z zastosowaniem odczynnika Agencourt™ AMPure™ XP Reagent firmy Beckman Coulter, stanowiącego zawieszinę złoża magnetycznego, wg instrukcji producenta. Podczas oczyszczania bibliotekę kilkakrotnie inkubowano z kulkami magnetycznymi oraz poddawano naprzemiennym płukaniom 70% etanolem. Celem procedury jest oczyszczenie DNA/cDNA z resztek reakcji oraz zateżnienie DNA/cDNA.

- **Pomiar stężenia bibliotek**

Stężenie bibliotek zmierzono metodą qPCR, wykorzystując zestaw Ion Library TaqMan® Quantitation Kit firmy Thermo Fisher Scientific oraz termocykler QuantStudio firmy Thermo Fisher Scientific. W tym celu przygotowano 100-krotne rozcieńczenia badanych próbek (bibliotek) oraz serię rozcieńczeń standardu *E. coli* DH10B Ion (miano rozcieńczeń 6,8 pM, 0,68 pM oraz 0,068 pM,). Postępowano wg instrukcji producenta.

- **Standaryzacja i pulowanie bibliotek**

Biblioteki zostały znormalizowane do stężenia 100 pM. W tym celu do każdej próbki badanej dodano odpowiednią objętość wody wolnej od nukleaz. Dokonano przeliczeń wg tabeli zamieszczonej poniżej (tab. 16.)

Tabela 16. Przykładowy schemat wykonywania rozcieńczeń bibliotek do PCR emulsyjnego.

ROZCIEŃCZENIA					
Sample Name	Quantity	objętość wody na 1 ul próbki	objętość wody na 8 ul próbki	nr barcodu	materiał
		-1	*8	BC	
1	2,813	1,81	14,50	1	DNA
2	2,623	1,62	12,98	2	
3	3,235	2,24	17,88	3	
4	2,033	1,03	8,26	4	
5	1,773	0,77	6,18	5	
6	2,056	1,06	8,45	6	
7	2,331	1,33	10,65	7	
8	5,209	4,21	33,67	8	
Sample Name	Quantity	objętość wody na 1 ul próbki	objętość wody na 2 ul próbki	nr barcodu	materiał
		-1	*2	BC	
9	10,362	9,36	18,72	9	RNA
10	10,448	9,45	18,90	10	
11	6,285	5,29	10,57	11	
12	4,734	3,73	7,47	12	
13	8,743	7,74	15,49	13	
14	10,103	9,10	18,21	14	
15	15,182	14,18	28,36	15	
16	6,328	5,33	10,66	16	

Rozcieńczone biblioteki DNA i cDNA zmieszano w stosunku 80:20 (biblioteka DNA 8 µl : biblioteka RNA 2 µl) oraz zebrano w jedną pulę. Otrzymaną pulę rozcieńczono wodą wolną od nukleaz w proporcji 21 µl wody wolnej od nukleaz + 7 µl puli bibliotek, z czego pobrano 25 µl ostatecznie rozcieńczonych bibliotek i przeniesiono do specjalnej probówki typu Eppendorf kompatybilnej z Ion Chef Instrument (Ion 510™ & Ion 520™ & Ion 530™ Kit - Chef).

- **PCR emulsyjny i sekwencjonowanie**

PCR emulsyjny przeprowadzono z wykorzystaniem aparatu Ion Chef™ Instrument, następnie sekwencjonowanie wykonano z wykorzystaniem Ion GeneStudio™ S5 (Thermo Fisher Scientific) zgodnie z instrukcją producenta. Przebieg NGS zaplanowano w oprogramowaniu Ion Torrent™ Software. W jednym przebiegu sekwencjonowano

maksymalnie 12 próbek DNA oraz 12 próbek RNA z użyciem chipu Ion 530™. Do przygotowania reakcji zastosowano odczynniki Ion 510™ & Ion 520™ & Ion 530™ Kit oraz Ion Supplies.

5.2.7 Analiza danych Ion Torrent

Po zakończonym procesie sekwencjonowania dokonano analizy danych z wykorzystaniem serwera S5 Torrent Serwer z wykorzystaniem wtyczek rekomendowanych do panelu Oncomine Myeloid Reseach Assay tj. coverage Analysis oraz variant Caller. Pliki BAM i VCF zaimportowano na indywidualne konto Ion Reporter za pomocą wtyczki Ion Reporter Uploader. Analizę przeprowadzono z wykorzystaniem workflow Oncomine Myeloid Research - 530 - w4.3 - DNA and Fusions - Single Sample. Wszystkie analizy wykonano z użyciem ludzkiego genomu referencyjnego GRCh37 (hg19). Do interpretacji wyników wykorzystano najbardziej aktualne sekwencje referencyjne dla poszczególnych genów, pobrane z bazy Ensembl (<https://www.ensembl.org/index.html>). W analizach stosowano transkrypty typu MANE Select Canonical, zapewniające najwyższą zgodność między referencyjną sekwencją genomową a funkcjonalnym transkryptem wykorzystywanym w raportowaniu wariantów (Dyer i in., 2025).

5.2.8 Ocena patogenności

Wykryte warianty zostały poddane szczegółowej ocenie pod kątem ich potencjalnej patogenności z wykorzystaniem ogólnodostępnych baz danych oraz narzędzi bioinformatycznych (ryc. 10.). Na podstawie przeprowadzonych analiz raportowano wyłącznie zmiany patogenne oraz prawdopodobnie patogenne, natomiast warianty o nieokreślonym znaczeniu klinicznym (ang. *variant of uncertain significance*, VUS) oraz zmiany prawdopodobnie łagodne i łagodne nie zostały uwzględnione w dalszej interpretacji.

A **Franklin** by QIAGEN

Search Page > IDH1:c.395G>A

IDH1:c.395G>A

chr2-209113112 C>T | p.Arg132His | NM_005896.4 | rs121913500 (M) | UCSC (M) | TraP (M) | gnomAD (M)

Classify Variant | Follow | Save Case | Export Summary

AMP Classification
Tier 1

B **OncoKB** Levels of Evidence Actionable Genes Oncology Therapies CDx Cancer Genes API / License About

IDH1 / R132H

IDH1 R132H

Oncogenic • Switch-of-function • Level 1 • Level Dx2 • Level Px2 • FDA Level 2

IDH1, a cell metabolism enzyme, is recurrently mutated in various cancer types including acute myeloid leukemia and gliomas.

The IDH1 R132H mutation is known to be oncogenic.

C **Varsome** IDH1:c.395G>A

chr2-209113112-C-T IDH1:p.R132H

3 users classified this variant as Pathogenic, 1 as Likely Pathogenic

Submit to ClinVar | Link publication | Classify | Share | All Links | Favorites

General Information: SNV
IDH1(NM_005896.4):c.395G>A
p.(Arg132His)

Gene: IDH1

Community Contributions: Classifications: 4 Publications: 24

Publications (2)
Variant: 554
Genes: 3016

Transcripts: NM_005896.4 - RefSeq
MAINE Select

Region Browser

Summit Classification: Only available in Premium

Clinical: Only available in Premium
Cancer: Only available in Premium

ICGC Summary: No data available

LMG: ****
Oligodendroglioma

DeCM: Likely Pathogenic
Disease: 1
Drug: 0

PMKB: Tier 1 Evidence: 7
Myeloproliferative Neoplasm

Cancer Samples Summary: Samples: 3035 Sources: 3

PhosphoSite: Only available in Premium

Spleen: Top 4 events in proosomal splice site

Expression Data: Top: adrenal_gland
Tissues: 64

UTR: No data available

Structural Variants

Beacon Network

Combine Classification

Conservation Scores: phyloP100: 6.00

Uniprot variants: No data available

IN-Silico Prediction: PP2: Pathogenic

IN-Silico Prediction: PP3: Pathogenic

Protein: Only available in Premium

Frequencies: exons: f = 0 (cov: 67.7)
genomes: not found (cov: 25.2)

Interplay: No data available

ClinGen: No data available

Protein Viewer

D **ClinVar** Genomic variation as it relates to human health

Advanced search

Search ClinVar

About Access Submit Stats FTP Help

NM_005896.4(IDH1):c.395G>A (p.Arg132His)

Cite Follow Print Download

We've updated the full submission template; previous versions are no longer supported. Download the latest version from the ClinVar FTP site and read more about the available templates.

Germine

Classification: Pathogenic/Likely pathogenic
8 out of 10 submissions contributed to this classification

Somatic

No data submitted for somatic clinical impact

Somatic

Oncogenicity: 5 stars
Oncogenic: This classification is based on the single submission received

Rycina 10. Sposób oceny patogenności wariantu genetycznego na przykładzie zmiany IDH1:c.395G>A (p.Arg132His) z wykorzystaniem wybranych baz danych i narzędzi bioinformatycznych. A - Franklin by QIAGEN, B - OncoKB, C - Varsome, D - ClinVar.

5.2.9 Programy i aplikacje komputerowe

W pracy wykorzystano bazy danych, narzędzia bioinformatyczne oraz programy dostępne online poprzez sieć Internet.

- **Analiza odczytów sekwencji**

Uzyskane odczyty sekwencji analizowano z zastosowaniem następujących programów:

Ion Reporter (<https://ionreporter.thermofisher.com/ir/>): zaawansowane narzędzie analityczne firmy Thermo Fisher Scientific do interpretacji danych NGS. Umożliwia analizę wariantów oraz fuzji genowych.

Serwer Ion Torrent: platforma do zarządzania przebiegiem sekwencjonowania oraz wstępną analizą danych. Pozwala na planowanie procesów sekwencjonowania, kontrolę jakości i generowanie plików wynikowych, takich jak BAM i VCF.

IGV (Integrative Genomics Viewer) (<https://igv.org/>): interaktywna przeglądarka genomowa do wizualizacji danych sekwencjonowania. Pozwala na przeglądanie wariantów oraz ocenę jakości odczytów (Robinson i in., 2011).

Mutalyzer (<https://v2.mutalyzer.nl/>): narzędzie do sprawdzania poprawności zapisu wariantów genetycznych zgodnie z nomenklaturą HGVS. Pomaga również w konwersji między różnymi formatami zapisu mutacji (Lefter i in., 2021; Vis i in., 2015).

- **Narzędzia do interpretacji wariantów**

Do opisywania znaczenia wariantów wykorzystano następujące narzędzia bioinformatyczne:

ClinVar (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>): baza danych zawierająca informacje o klinicznym znaczeniu wariantów genetycznych. Pozwala na sprawdzenie, czy dany wariant był wcześniej opisywany i jakie ma znaczenie patogenne (Landrum i in., 2014).

VarSome (<https://varsome.com/>): platforma integrująca wiele baz danych do interpretacji wariantów zgodnie z wytycznymi ACMG. Umożliwia dostęp do danych populacyjnych, predykcyjnych i funkcjonalnych (Kopanos i in., 2019).

COSMIC (<https://cancer.sanger.ac.uk/cosmic>): baza danych nowotworowych mutacji somatycznych. Zawiera informacje o częstości i typie mutacji występujących w różnych typach nowotworów (Tate i in., 2019).

Franklin (<https://franklin.genoox.com/>): internetowe narzędzie bioinformatyczne służące do interpretacji wariantów genetycznych w kontekście klinicznym.

Automatycznie klasyfikuje warianty zgodnie z ACMG i zapewnia dostęp do literatury i danych referencyjnych.

OncoKB (<https://www.oncokb.org/>): baza o wariantach molekularnych i ich znaczeniu klinicznym w onkologii. Zawiera informacje o terapii celowanej, mutacjach i odpowiedzi na leczenie (Chakravarty i in., 2017; Suehnholz i in., 2024).

Cancer Genome Interpreter (<https://www.cancergenomeinterpreter.org/home>): narzędzie bioinformatyczne służące do interpretacji klinicznej zmian genetycznych wykrytych w nowotworach (Muiños i in., 2021; Tamborero i in., 2018).

SpliceAI (<https://spliceailookup.broadinstitute.org>): narzędzie predykcyjne oparte na sztucznej inteligencji służące do oceny wpływu wariantów na splicing RNA. Pomocne w identyfikacji potencjalnie patogennych zmian wpływających na składanie eksonów (Jaganathan i in., 2019; Zeng & Li, 2022).

Ensembl (<https://www.ensembl.org/index.html>): baza danych genomowych udostępniająca adnotacje genów, transkryptów oraz wariantów genetycznych dla wielu gatunków. Umożliwia przeglądanie sekwencji, regionów genowych oraz dostęp do informacji o znanych mutacjach (Dyer i in., 2025).

- **Analiza statystyczna i wizualizacja danych**

Do analizy i wizualizacji wariantów wykorzystano następujące narzędzia:

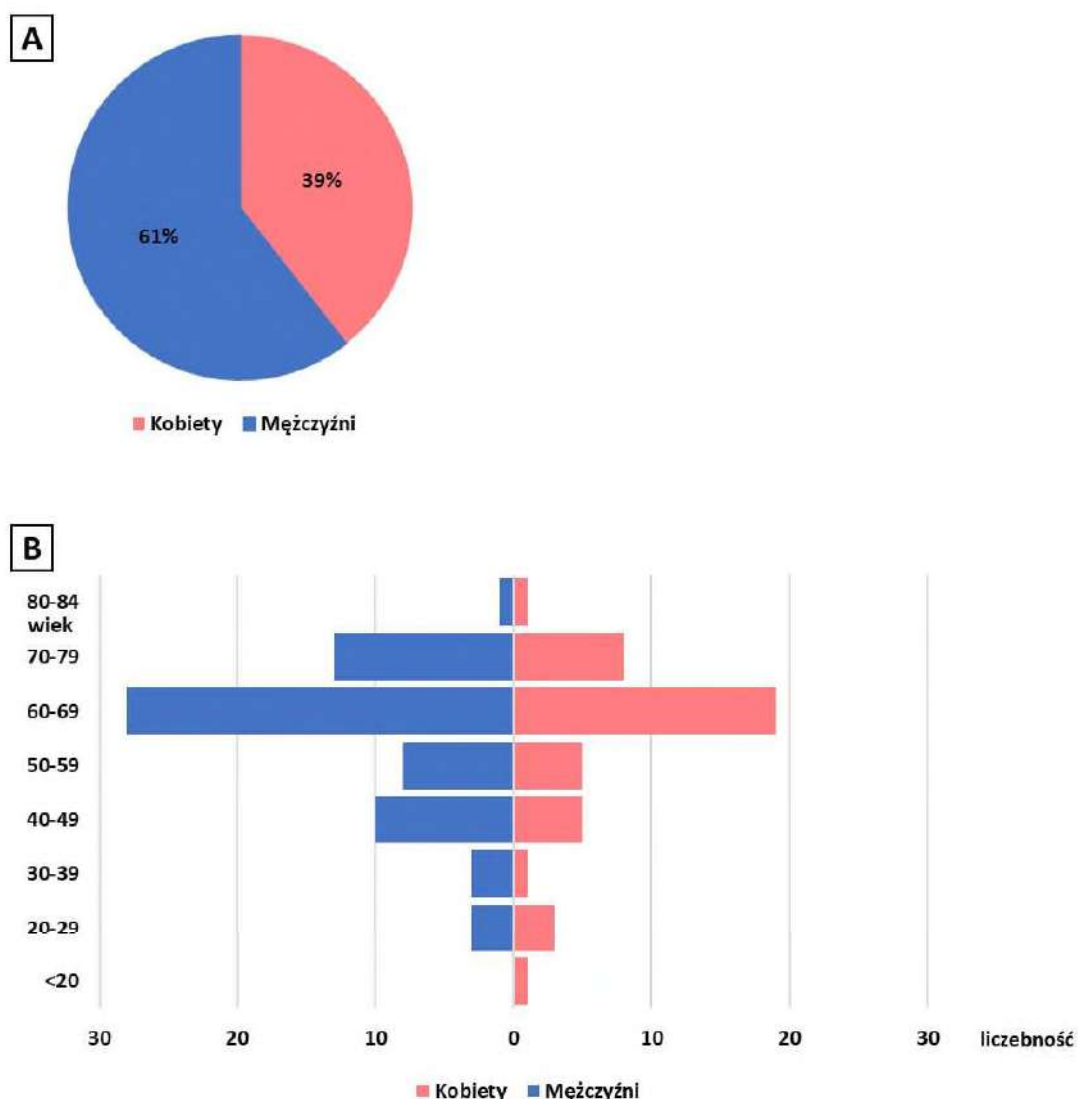
R Studio (<https://www.r-project.org/>): zintegrowane środowisko programistyczne przeznaczone do pracy z językiem R, wykorzystywane głównie do analizy danych, obliczeń statystycznych oraz tworzenia wizualizacji. Do obróbki oraz wizualizacji danych zastosowano pakiet maftools (Mayakonda i in., 2018).

cBioPortal (<https://www.cbioportal.org/>): platforma internetowa do eksploracji danych genomowych z nowotworów. Pozwala na analizę mutacji, zmian liczby kopii, fuzji oraz danych klinicznych pacjentów. Do szczegółowej wizualizacji mutacji w wybranych genach wykorzystano narzędzie MutationMapper, co umożliwiło przedstawienie lokalizacji zmian w kontekście struktury białka (Cerami i in., 2012; de Bruijn i in., 2023; Gao i in., 2013).

6 Wyniki

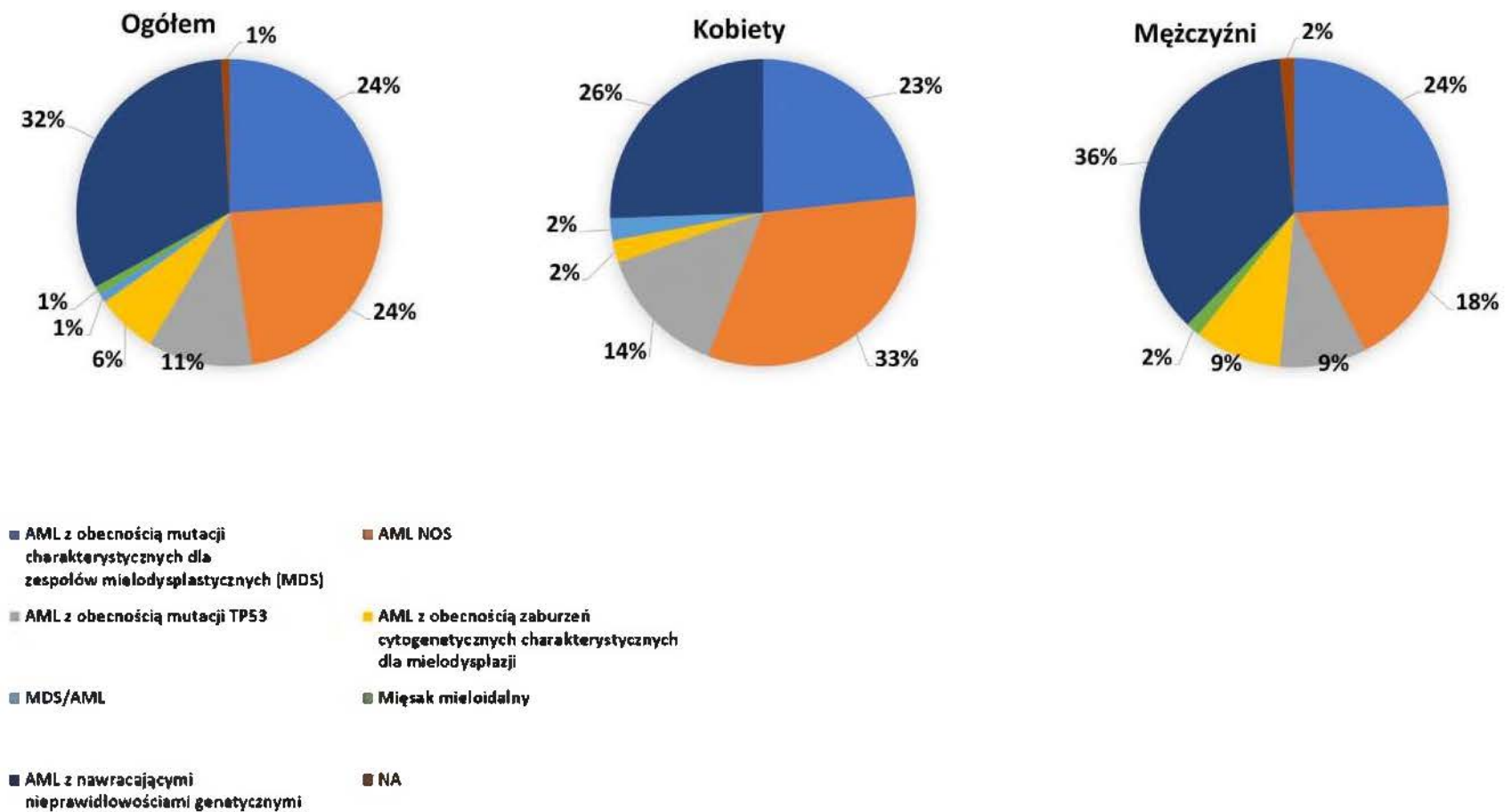
6.1 Charakterystyka grupy badanej

Analizie poddano 109 pacjentów z rozpoznaniem AML leczonych w Świętokrzyskim Centrum Onkologii w latach 2020-2023. W celu scharakteryzowania grupy badanej dokonano analizy danych demograficznych, obejmujących płeć i wiek pacjentów w momencie rozpoznania AML. Wyniki zestawiono na rycinie (ryc. 11.). Badana grupa liczyła 109 osób, w tym 43 kobiety (39%) oraz 66 mężczyzn (61%). Wiek pacjentów mieścił się w przedziale od 19 do 84 lat. Najliczniejszą grupę stanowili chorzy w wieku 60-69 lat, zarówno wśród kobiet (19 osób), jak i mężczyzn (28 osób). Mediana wieku badanej populacji wynosiła 65 lat (65 lat u mężczyzn oraz 63 lata u kobiet).



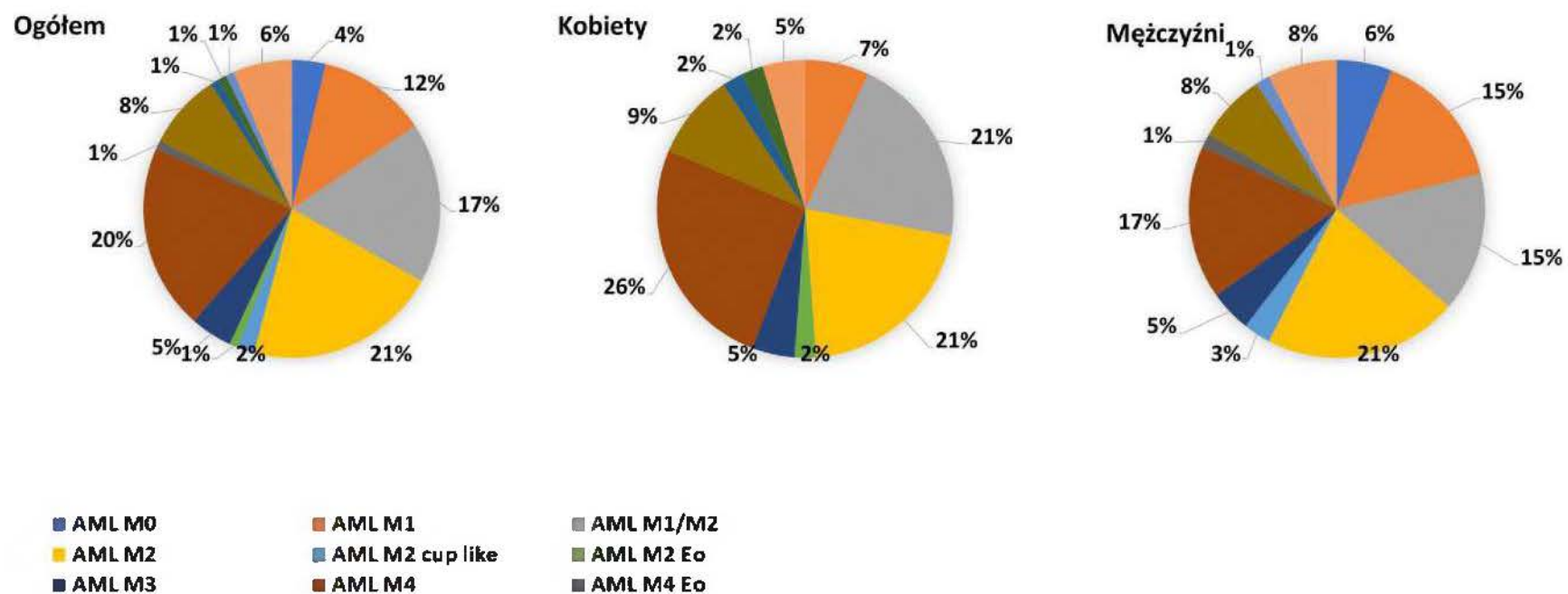
Rycina 11. Charakterystyka grupy badanej, A - struktura płci badanej grupy pacjentów, B - piramida wieku i płci badanej grupy pacjentów.

Zgodnie z klasyfikacją WHO 2022 pacjentów zakwalifikowano do odpowiednich podtypów AML (ryc. 12.). Najliczniejszą grupę stanowili chorzy z AML z nawracającymi nieprawidłowościami genetycznymi (35 przypadków, 24 kobiety i 11 mężczyzn), a także pacjenci z AML z obecnością mutacji charakterystycznych dla zespołów mielodysplastycznych (26 przypadków, 10 kobiet i 16 mężczyzn) oraz AML NOS (26 przypadków, 14 kobiet i 12 mężczyzn). Zaobserwowano również grupę 12 przypadków AML z mutacją TP53 (6 kobiet i 6 mężczyzn). Pozostałe podtypy odnotowano z niewielką liczbą przypadków: AML z obecnością zaburzeń cytogenetycznych charakterystycznych dla mielodysplazji (7 przypadków), MDS/AML (1 przypadek) i mięsak mieloidalny (1 przypadek).



Rycina 12. Charakterystyka badanej grupy pacjentów z ostrą białaczką szpikową według klasyfikacji WHO.

Zgodnie z klasyfikacją FAB pacjentów zakwalifikowano do odpowiednich podtypów AML (ryc. 13.). Najczęściej występującymi podtypami były AML M2 (23 przypadki, 9 kobiet i 14 mężczyzn) oraz AML M4 (22 przypadki, 11 kobiet i 11 mężczyzn). Kolejno przypisano pacjentów do typów AML M1/M2 (19 przypadków, 9 kobiet i 10 mężczyzn) i AML M1 (13 przypadków, 3 kobiety i 10 mężczyzn). Pozostałe warianty FAB tj. AML M3, AML M5, AML M6 oraz mięsak mieloidalny, stanowiły mniejszy odsetek badanej grupy pacjentów. Klasyfikacja FAB ma obecnie ograniczone znaczenie kliniczne i nie wpływa na decyzje terapeutyczne. W niniejszej pracy została przedstawiona jedynie poglądowo, w celu uzupełnienia charakterystyki badanej grupy.

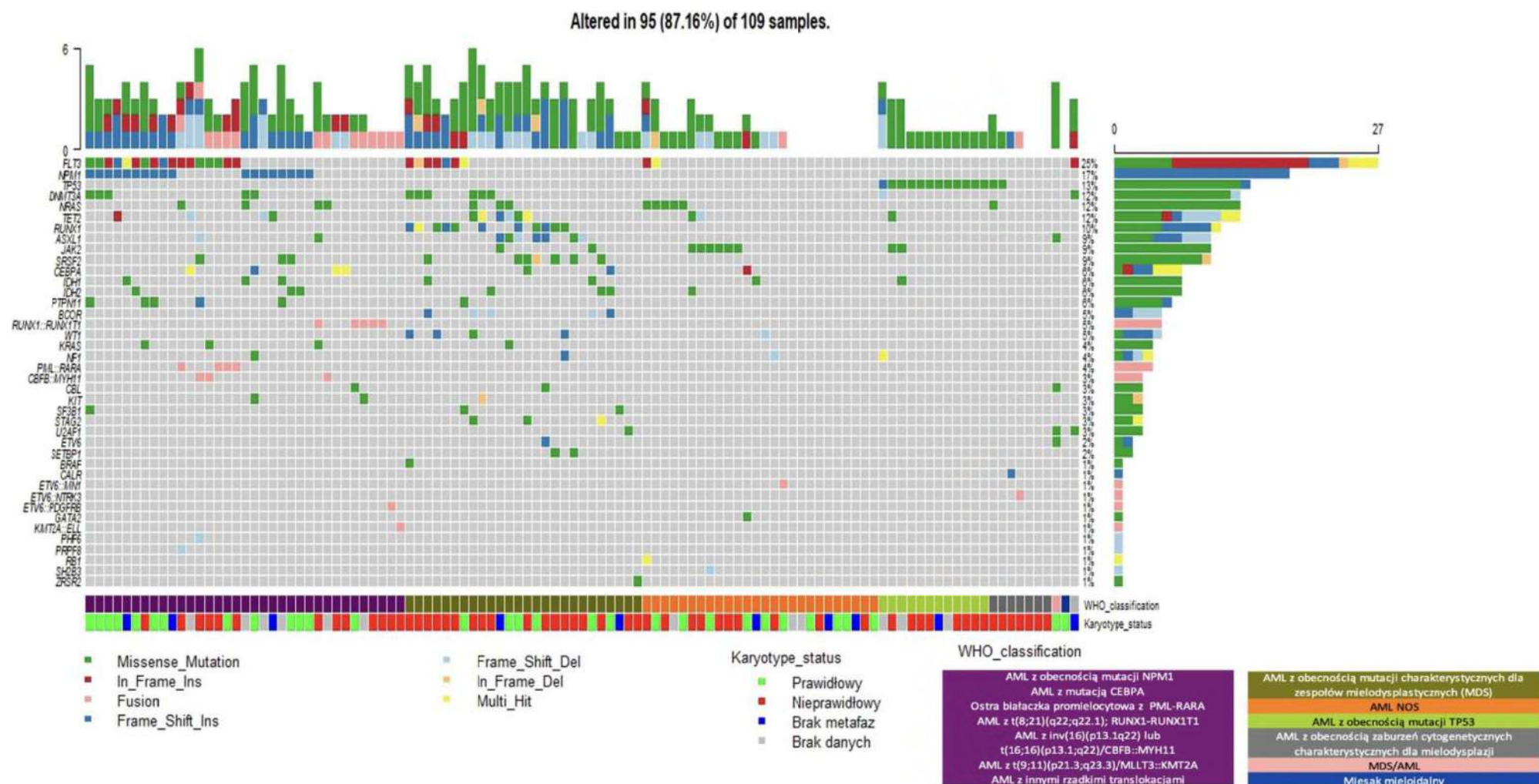


Rycina 13. Charakterystyka badanej grupy pacjentów z ostrą białaczką szpikową według klasyfikacji FAB.

6.2 Ocena profilu molekularnego - identyfikacja zmian genetycznych i genów fuzyjnych

Analiza profilu mutacji metodą sekwencjonowania nowej generacji została przeprowadzona u 109 pacjentów z ostrą białaczką szpikową. U 95 chorych (87,16%) wykryto co najmniej jedną zmianę genetyczną, podczas gdy u pozostałych pacjentów nie stwierdzono obecności zmian patogennych ani prawdopodobnie patogennych w badanych genach (ryc. 14.).

Łącznie stwierdzono obecność zmian w 33 różnych genach (*FLT3*, *NPM1*, *TP53*, *DNMT3A*, *NRAS*, *TET2*, *RUNX1*, *ASXL1*, *JAK2*, *SRSF2*, *CEBPA*, *IDH1*, *IDH2*, *PTPN11*, *BCOR*, *WT1*, *KRAS*, *NF1*, *CBL*, *KIT*, *SF3B1*, *STAG2*, *U2AF1*, *ETV6*, *SETBP1*, *BRAF*, *CALR*, *GATA2*, *PHF6*, *PRPF8*, *RB1*, *SH2B3*, *ZRSR2*) oraz zidentyfikowano 7 typów rearanżacji fuzyjnych (*RUNX1::RUNX1T1*, *PML::RARA*, *CBFB::MYH11*, *ETV6::MN1*, *ETV6::NTRK3*, *ETV6::PDGFRB*, *KMT2A::ELL*). Najczęściej obserwowano zmiany w genach: *FLT3* (25%), *NPM1* (17%), *TP53* (13%), *DNMT3A* (12%), *NRAS* (12%) oraz *TET2* (12%). Zmiany w pozostałych genach występowały z frekwencją poniżej 10%.



Rycina 14. Zestawienie zmian molekularnych wykrytych w analizowanej grupie pacjentów z ostrą białaczką szpikową.

6.3 Charakterystyka molekularna wykrytych wariantów genetycznych

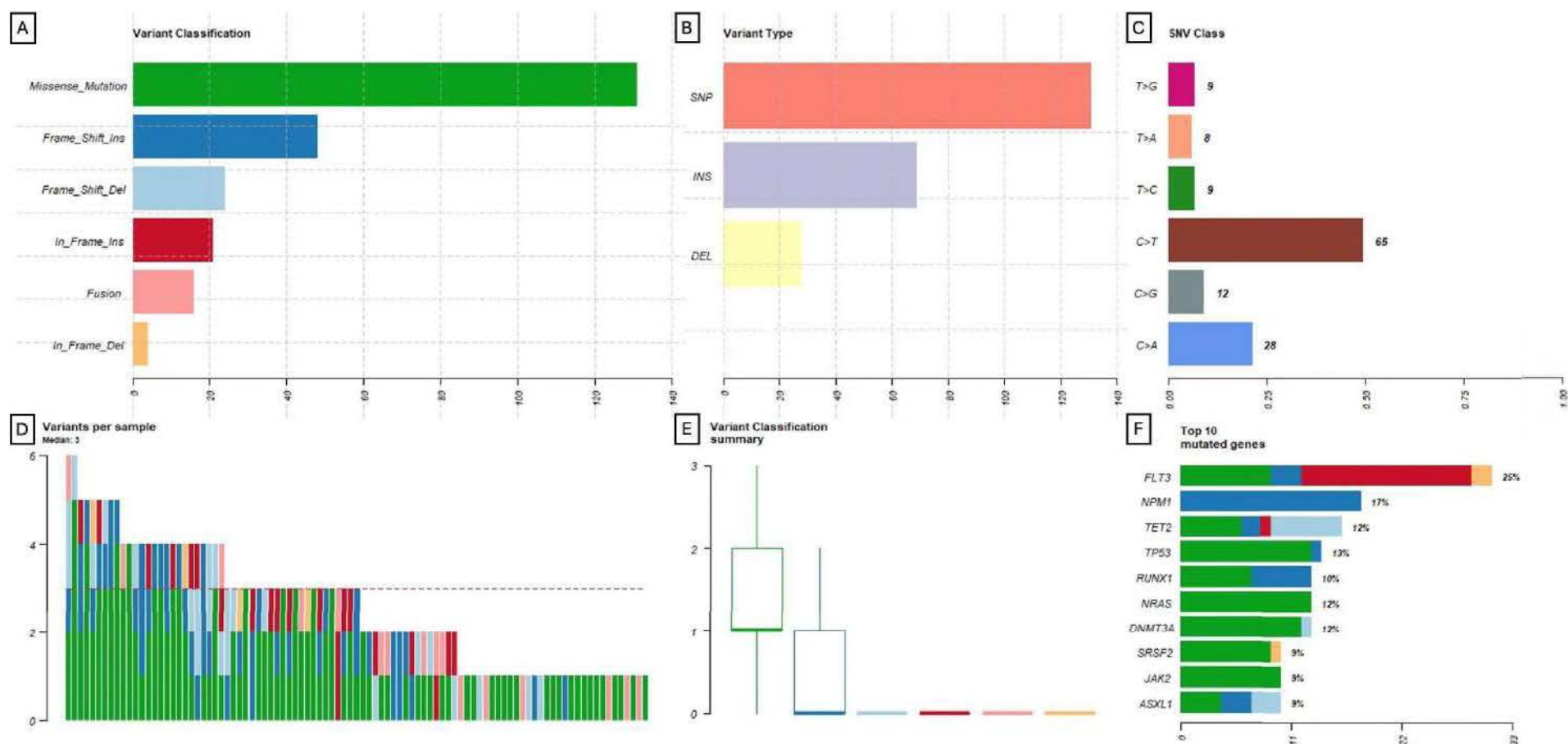
Analiza klasyfikacji wariantów (ryc. 15. A) wykazała, że w badanej kohorcie pacjentów z AML zdecydowaną większość stanowiły mutacje typu *missense* (131 zmian). Drugą, co do częstości występowania, kategorią były mutacje typu *frameshift insertion* tj. insercje powodujące przesunięcie ramki odczytu, których łącznie stwierdzono 48. Następnie odnotowano zmiany typu *frameshift deletion*, delecje powodujące przesunięcie ramki odczytu, w łącznej liczbie 24 zmian. Kolejną kategorią były insercje (21 zmian) i delecje (4 zmiany) *in-frame*, które nie powodują zmiany ramki odczytu. W analizowanej grupie zaobserwowano także kilka przypadków fuzji genowych (16 zmian), charakterystycznych dla części przypadków AML.

Pod względem rodzaju wariantów (ryc. 15. B) dominowały substytucje pojedynczych nukleotydów (ang. *single nucleotide polymorphisms*, SNP), stanowiące ponad połowę wszystkich zmian (131 zmian). W dalszej kolejności zidentyfikowano 69 insercji (ang. *insertion*, INS) oraz 28 delecji (ang. *deletion*, DEL), zarówno powodujących przesunięcie ramki odczytu jak i niezmieniających ramki odczytu.

Analiza klas substytucji (ryc. 15. C) wykazała, że zdecydowanie najczęstszym rodzajem zmiany była tranzycja C>T, zidentyfikowana w 65 przypadkach. Na drugim miejscu znalazły się zmiany C>A (28 przypadków) oraz C>G (12 przypadków). Zmiany T>G, T>A i T>C odnotowywano znacznie rzadziej, <10 przypadków każda.

Liczba mutacji na próbkę (ryc. 15. D) była zróżnicowana. Odsetek pacjentów pozbawionych mutacji patogennych lub prawdopodobnie patogennych wyniósł około 13%. Większość pacjentów posiadała od 1 do 3 mutacji. Mediana zmian wyniosła 3 warianty patogenne lub prawdopodobnie patogenne na pacjenta. W nielicznych przypadkach obserwowano 5 (9 przypadków) lub 6 (2 przypadki) zmian jednocześnie.

W podsumowaniu klas wariantów (ryc. 15. E) zaobserwowano, że najczęściej występującym typem zmian na próbkę były mutacje typu *missense* (mediana 1, zakres 0-3). Mutacje typu *frameshift insertion* występowały rzadziej (mediana 0, zakres do 2). Pozostałe klasy wariantów, tj. *frameshift deletion*, insercje i delecje *in-frame* oraz fuzje genowe, obserwowano sporadycznie w pojedynczych próbkach. Dla większości genów profil mutacyjny był względnie homogeny, z dominacją wariantów typu *missense*. Wyjątek stanowił gen *NPM1*, w którym obserwowano głównie charakterystyczne insercje typu *frameshift*. Natomiast geny *FLT3* i *TET2* wykazywały bardziej heterogeny charakter zmienności, obejmujący różnorodne klasy wariantów (ryc. 15. F).



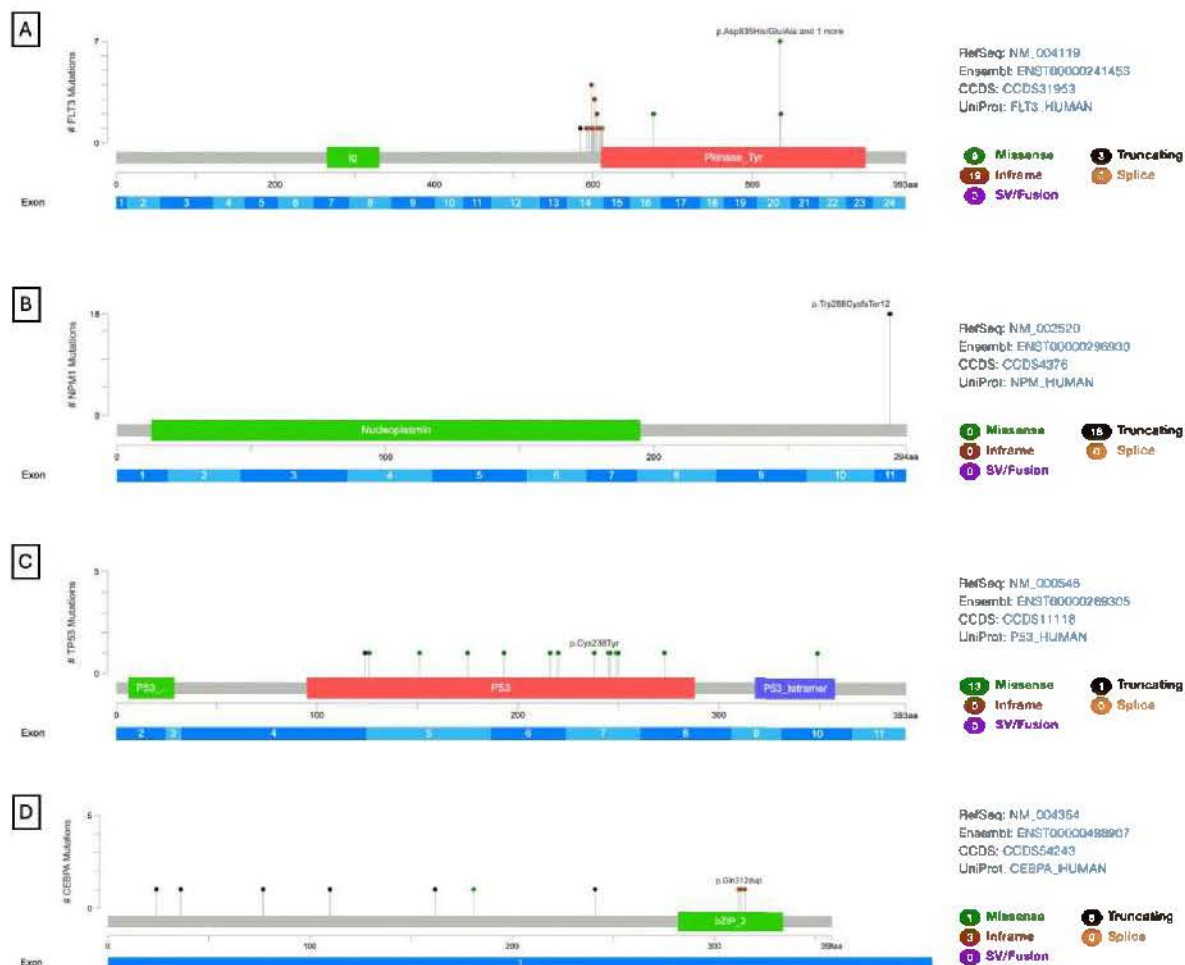
Rycina 15. Charakterystyka molekularna analizowanych zmian. A - klasyfikacja wariantów; B - rodzaje wariantów; C - klasy substytucji; D - liczba wariantów na próbkę; E - rozkład klas wariantów; F - dziesięć geny najczęściej ulegające mutacjom.

W genie *FLT3*, obejmującym 24 eksony, określono najczęściej występujące warianty. Dla badanej kohorty pacjentów zostały one zlokalizowane są w obrębie eksonów 14 i 15, kodujących domenę okołobłonową. Dodatkowo raportowano zmiany w obrębie domeny kinazy tyrozynowej. Zmiany występujące w domenie TKD najczęściej zlokalizowane są w kodonie 835. Natomiast zmiany w domenie ITD charakteryzują się różnorodnością i wynikają z duplikacji fragmentu sekwencji obejmującego od 3 do 400 par zasad, co skutkuje zróżnicowanym wzorem zmian. Wykryte warianty genu *FLT3* mają różny charakter. W badanej grupie odnotowano zmiany typu *missense* (zielone kropki, 9 zmian), *truncating* (czarne, 3 zmiany) oraz *in-frame* (różowe, 19 zmian) (ryc. 16. A).

Mutacje *NPM1* koncentrują się w obrębie eksonu 11 i obejmują głównie insercje typu *frameshift* prowadzące do przesunięcia ramki odczytu (ryc. 16. B). Najczęściej rejestrowaną zmianą dla badanej kohorty pacjentów była mutacja p.Trp288CysfsTer12. W badanej grupie pacjentów stwierdzono 18 takich zmian.

Zmiany w genie *TP53* obejmują głównie mutacje typu *missense* (11 wykrytych zmian), prowadzące do utraty funkcji białka p53. Mutacje w genie *TP53* są rozproszone głównie w domenie wiążącej DNA, nie wykazując charakterystycznych *hotspotów* (ryc. 16. C).

W genie *CEBPA*, wyróżniona została domena bZIP, tj. region zamka leucynowego, odpowiedzialna za wiązanie DNA (ryc. 16. D). Mutacje genu *CEBPA* występują zarówno w N- jak i C-końcowej części genu. Wykryte warianty genu *CEBPA* dla badanej grupy pacjentów wykazują różny charakter. Odnotowano zmiany typu *missense* (zielone kropki, 1 zmiana), *truncating* (czarne, 6 zmian) oraz *inframe* (różowe, 3 zmiany).

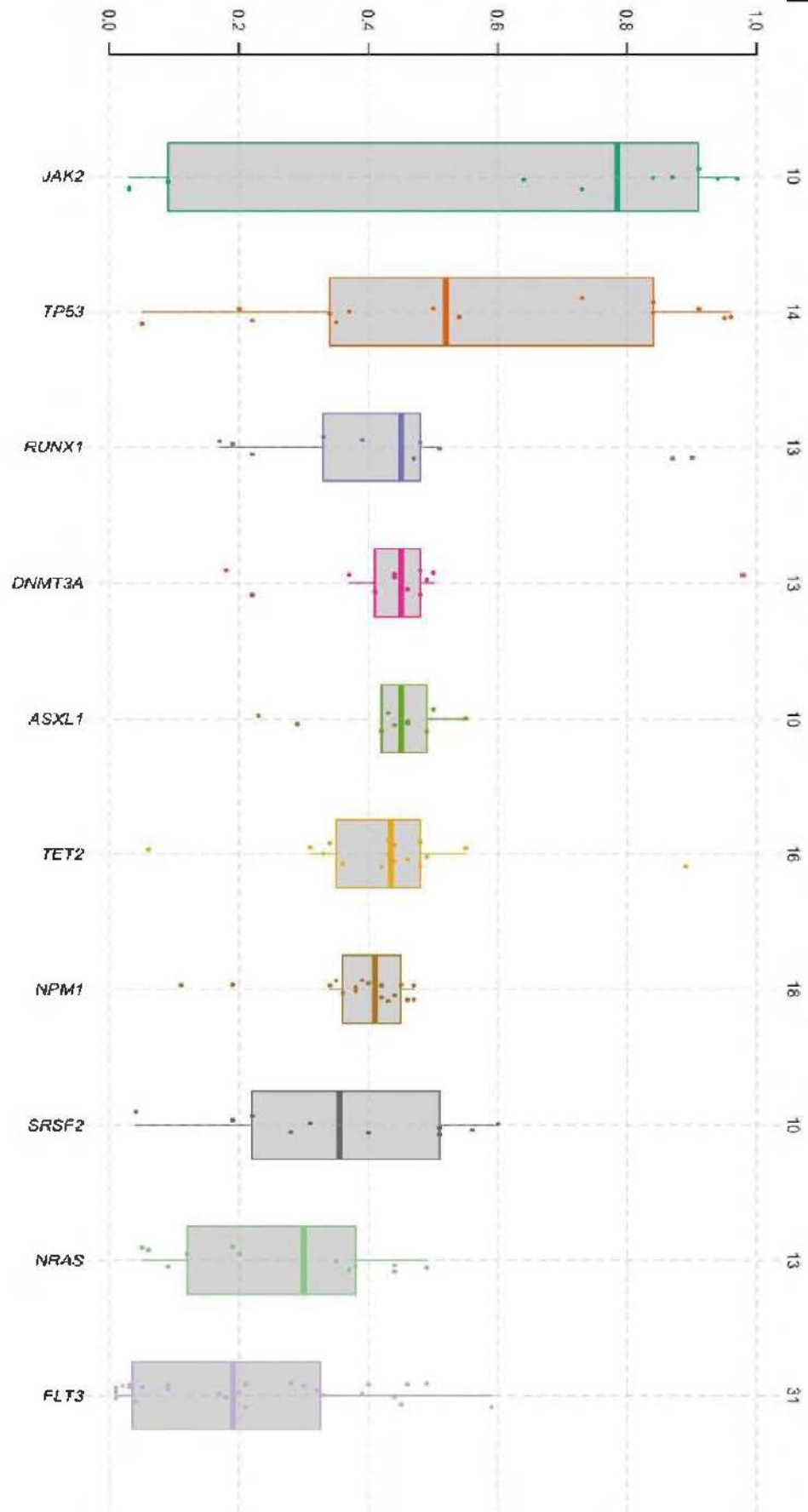


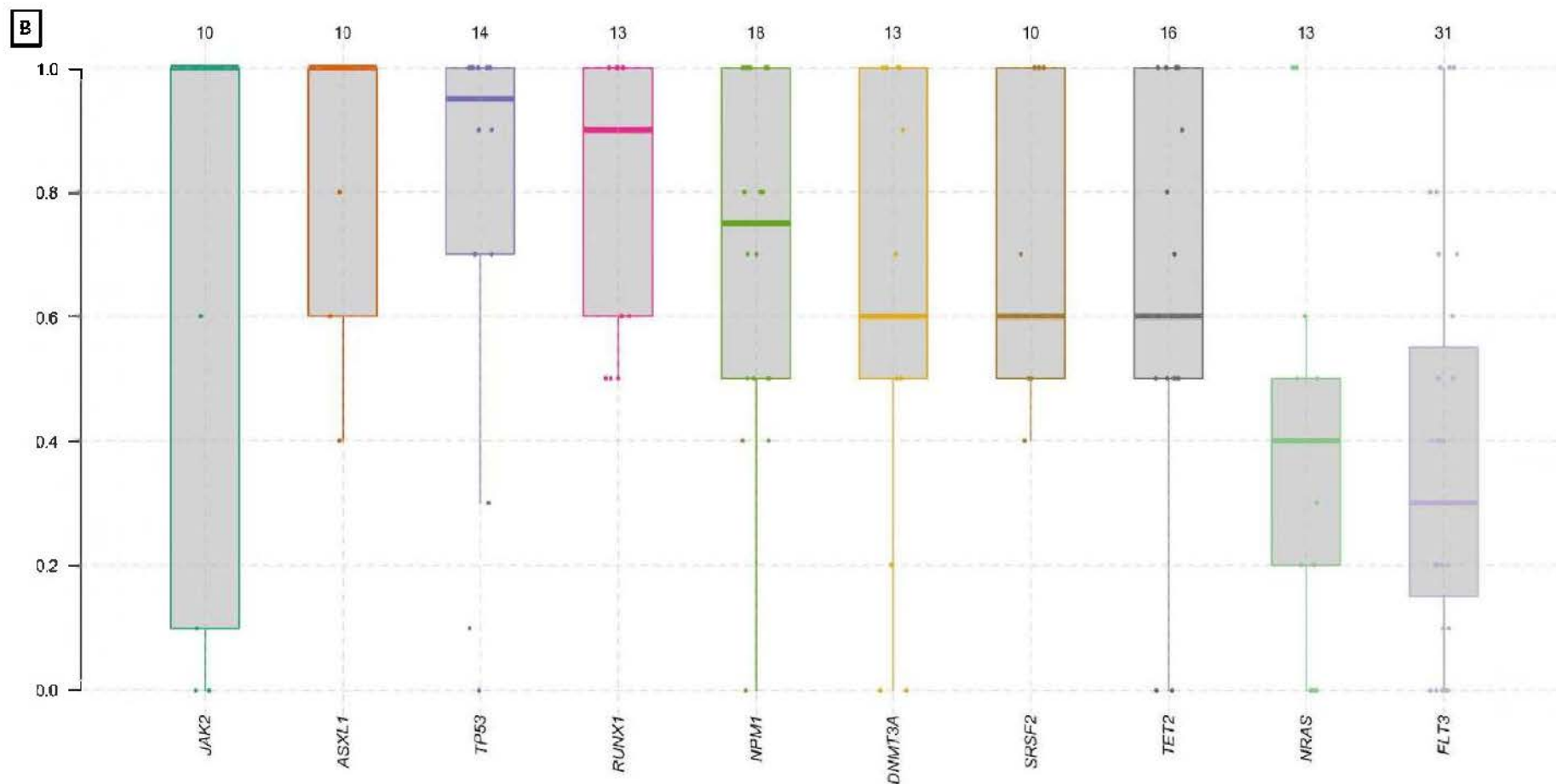
Rycina 16. Wizualizacja lokalizacji mutacji w genach A - FLT3, B - NPM1, C - TP53 oraz D - CEBPA uzyskana przy użyciu narzędzia cBioPortal Mutation Mapper (www.cbioportal.org/MutationMapper).

Analiza częstości allelicznej wariantów w genach najczęściej ulegających mutacjom w badanej kohorcie AML pozwala na ocenę ich roli w inicjacji i progresji białaczki. Rycina 17. przedstawia rozkład VAF dla dziesięciu genów najczęściej ulegających mutacjom w badanej kohorcie. Liczba odnotowanych wariantów dla poszczególnych genów była zróżnicowana i wynosiła odpowiednio: *JAK2* (10), *TP53* (14), *RUNX1* (13), *DNMT3A* (13), *ASXL1* (10), *TET2* (16), *NPM1* (18), *SRSF2* (10), *NRAS* (13), *FLT3* (31).

Na rycinie 17. A przedstawiono rozkład VAF bez uwzględniania odsetka blastów. Przedstawione wartości odzwierciedlają częstość alleliczną mutacji w całkowitej populacji komórek badanego materiału. Wartości VAF różniły się pomiędzy analizowanymi genami. Najwyższą wartość mediany VAF (ok. 0,8) oraz największy rozrzut VAF (od wartości bliskich 0 do 1) odnotowano dla genu *JAK2*. Dla genu *FLT3* zaobserwowano najniższą wartość mediany VAF (ok. 0,2) oraz umiarkowany rozrzut VAF od wartości bliskich 0 do 0,6. Geny *JAK2* oraz *TP53* prezentowały najszerszy zakres obejmujący zarówno wysokie jak i niskie wartości VAF. Również dla genów *SRSF2*, *NRAS* oraz *FLT3* obserwowano wartości VAF odbiegające od mediany. Dla genów *RUNX1*, *DNMT3A*, *ASXL1*, *TET2* oraz *NPM1* mediany VAF mieściły się w zakresie wartości pośrednich (ok. 0,4-0,5), a rozkłady wartości były skupione wokół mediany.

Na rycinie 17. B przedstawiono wartości VAF po korekcji o odsetek blastów w próbkach ($VAF_{skorygowany} = VAF / \% \text{ blastów}$). Po korekcji obserwowano przesunięcie wartości VAF w kierunku wyższych wartości. W związku z tym odnotowano zwiększenie median dla analizowanych genów. Dla większości genów (*JAK2*, *ASXL1*, *TP53*, *RUNX1*, *NPM1*, *DNMT3A*, *SRSF2*, *TET2*) znaczna część wartości VAF osiągała wartości bliskie 1. Dla genów *NRAS* oraz *FLT3* mediany VAF po korekcji pozostawały niższe w porównaniu z pozostałymi genami (*NRAS* mediana ok. 0,4, *FLT3* mediana ok. 0,3). Rozkłady wartości VAF cechowały się większym rozproszeniem wartości (od wartości bliskich 0 do 1) po korekcji odsetka blastów vs. przed korekcją dla większości analizowanych genów.

A



Rycina 17. Częstość alleliczna wariantów (VAF) w genach najczęściej ulegającym mutacjom w badanej grupie pacjentów z AML. A - wartości VAF bez uwzględnienia odsetka blastów, B - wartości VAF po korekcji o odsetek blastów w próbkach.

Uzyskane wyniki wariantów genetycznych przeanalizowano w celu wytypowania wariantów potencjalnie germinalnych. Ustalono następujące kryteria przesiewowe: mutacje w genach związanych z dziedziczną predyspozycją do nowotworów mieloidalnych tj. *DDX41*, *CEBPA*, *TP53*, *MPL* i *GATA2*, zmiany o charakterze patogennym i prawdopodobnie patogennym oraz warianty wykazujące VAF w zakresie 40-60%.

W analizowanej kohorcie zidentyfikowano cztery warianty spełniające powyższe kryteria przesiewowe dla wariantów potencjalnie germinalnych (tab. 17.). W pozostałych genach nie znaleziono wariantów spełniających zadane kryteria.

Tabela 17. Warianty o największym prawdopodobieństwie podłoża germinalnego.

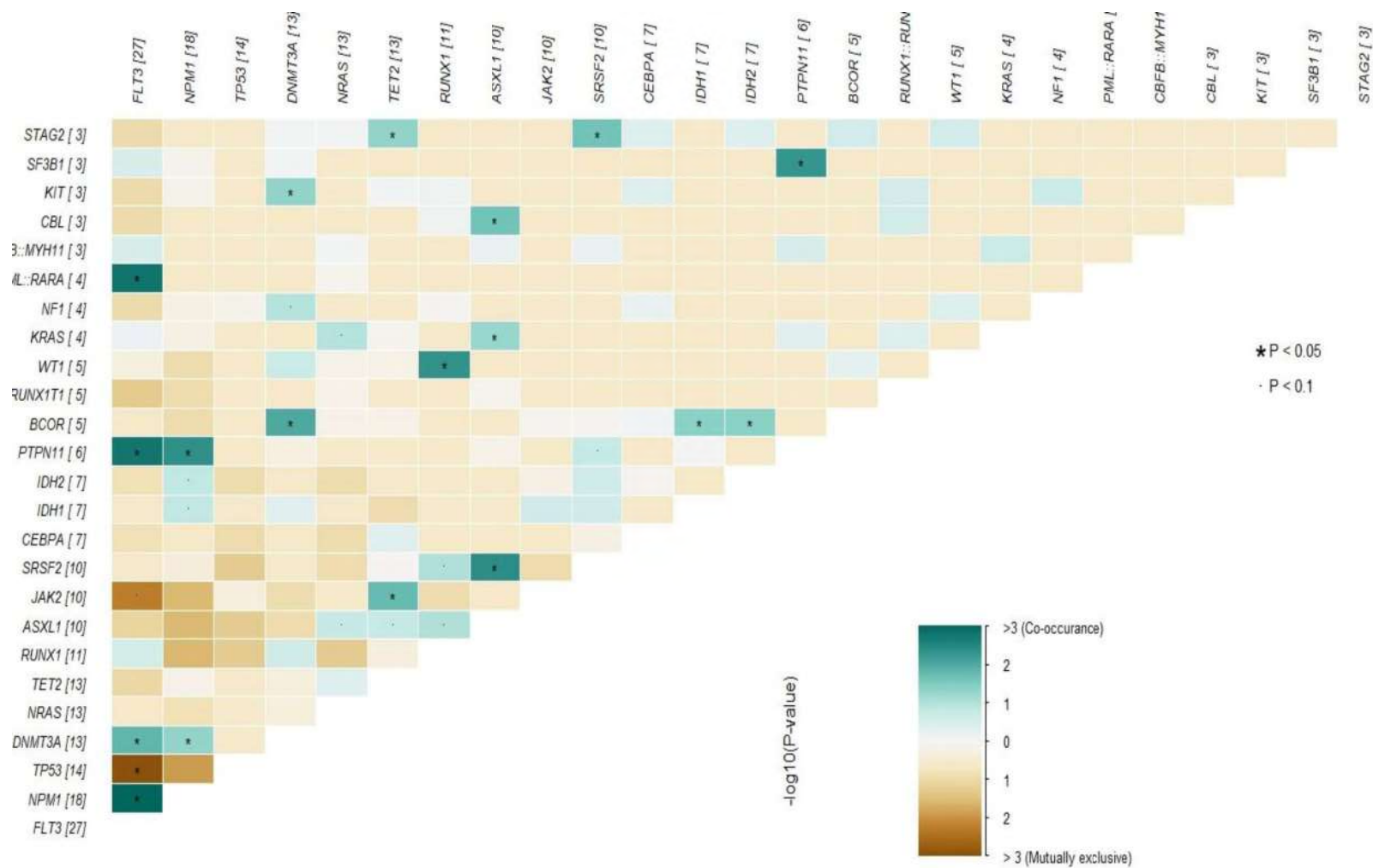
Numer pacjenta	Gen	Sekwencja referencyjna	Zmiana sekwencji nukleotydów	Zmiana sekwencji aminokwasów	Typ mutacji	VAF [%]	% blastów w szpiku wyjściowo
5510/20	CEBPA	NM_004364.5	c.484_485insC	p.Gln162ProfsTer8	frameshift	47	95
5510/20	CEBPA	NM_004364.5	c.229_232delTTCC	p.Phe77TrpfsTer82	frameshift	46	95
6082/22	CEBPA	NM_004364.5	c.101_107delCCCGGGG	p.Gly36AlafsTer122	frameshift	47	95
6082/22	CEBPA	NM_004364.5	c.937_939dup	p.Lys313dup	in-frame	48	95

6.4 Ocena współwystępowania mutacji w badanych genach. Identyfikacja najczęściej współlistniejących zmian genetycznych

Analiza interakcji somatycznych pomiędzy najczęściej zmienionymi genami w badanej kohorcie pacjentów (ryc. 18.) ujawniła obecność wzorców współwystępowania i wzajemnego wykluczania pomiędzy parami poszczególnych genów. Analiza wykazała liczne interakcje pomiędzy badanymi genami, osiągające poziom istotności statystycznej. Łącznie zidentyfikowano 27 par genów charakteryzujących się istotnym współwystępowaniem mutacji, w tym 18 par z poziomem istotności $p < 0,05$. Ponadto odnotowano dwie pary genów, dla których stwierdzono istotne statystycznie zjawisko wzajemnego wykluczania się mutacji, w tym jedną z poziomem istotności $p < 0,05$.

Zaobserwowane interakcje z poziomem istotności $p < 0,05$:

- Mutacje w genie *STAG2* współwystępowały z mutacjami w genach *TET2* i *SRSF2*.
- Mutacje w genie *SF3B1* współwystępowały z mutacjami w genie *PTPN11*.
- Mutacje w genie *KIT* współwystępowały z mutacjami w genie *DNMT3A*.
- Mutacje w genie *CBL* współwystępowały z mutacjami w genie *ASXL1*.
- Fuzja genów *PML::RARA* współwystępowała z mutacjami w genie *FLT3*.
- Mutacje w genie *KRAS* współwystępowały z mutacjami w genie *ASXL1*.
- Mutacje w genie *WT1* współwystępowały z mutacjami w genie *RUNX1*.
- Mutacje w genie *BCOR* współwystępowały z mutacjami w genach *DNMT3A*, *IDH1* oraz *IDH2*.
- Mutacje w genie *PTPN11* współwystępowały z mutacjami w genach *FLT3* i *NPM1*.
- Mutacje w genie *SRSF2* współwystępowały z mutacjami w genie *ASXL1*.
- Mutacje w genie *JAK2* współwystępowały z mutacjami w genie *TET2*.
- Mutacje w genie *DNMT3A* współwystępowały z mutacjami w genach *FLT3* i *NPM1*.
- Mutacje w genie *TP53* wykluczały się z mutacjami w genie *FLT3*.
- Mutacje w genie *NPM1* współwystępowały z mutacjami w genie *FLT3*.

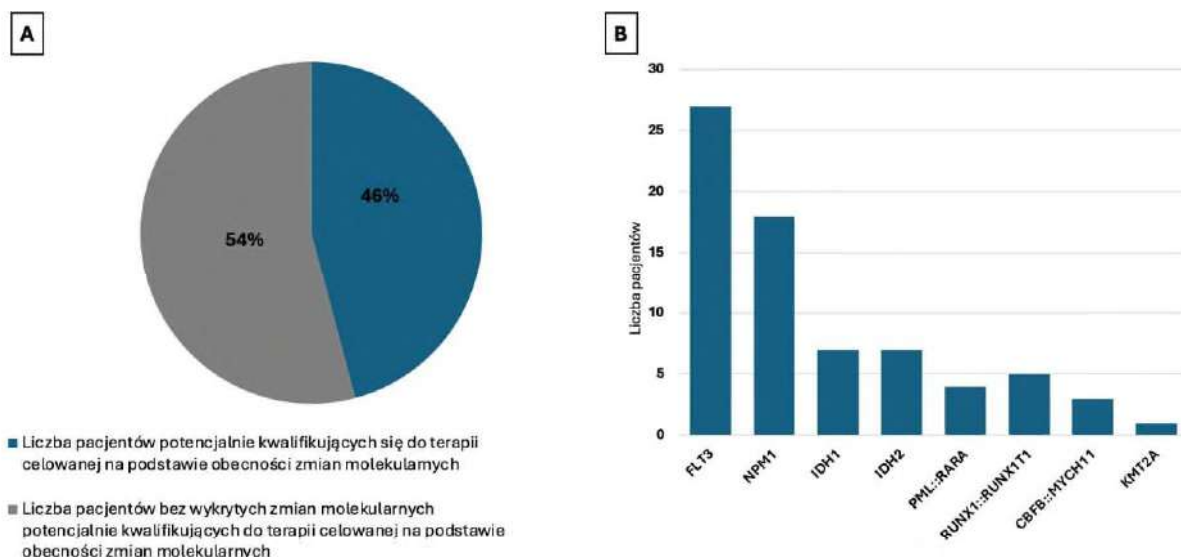


Rycina 18. Interakcje somatyczne pomiędzy najczęściej zmienionymi genami w badanej kohorcie pacjentów z AML.

6.5 Ocena skuteczności stratyfikacji pacjentów do terapii ukierunkowanych molekularnie z wykorzystaniem NGS

W niniejszej pracy oceniono możliwość kwalifikacji pacjentów do leczenia ukierunkowanego molekularnie, na podstawie wykrytych zmian genetycznych. W badanej grupie 109 pacjentów z AML u 50 osób (46%) stwierdzono obecność co najmniej jednej zmiany genetycznej, która potencjalnie umożliwia zastosowanie terapii celowanej (ryc. 19.). Do tej grupy zaliczono pacjentów z mutacjami w genach *FLT3*, *NPM1*, *IDH1*, *IDH2*, a także z obecnością rearanżacji *PML::RARA* oraz fuzji charakterystycznych dla CBF-AML tj. *RUNX1::RUNX1T1*, *CBFB::MYH11* oraz fuzji genu *KMT2A*.

Najczęściej występujące zmiany potencjalnie kwalifikujące do terapii celowanej to zmiany genów *FLT3*, obecne u 27 pacjentów (25%), następnie mutacje *NPM1* (18 pacjentów, 17%), *IDH1* i *IDH2* (odpowiednio po 7 pacjentów, 6%), rearanżacja *PML::RARA* (4 pacjentów, 4%), fuzja *RUNX1::RUNX1T1* (5 pacjentów, 5%), *CBFB::MYH11* (3 pacjentów, 3%), fuzja genu *KMT2A* (1 pacjent, 1%). Część pacjentów wykazywała współwystępowanie więcej niż jednej zmiany potencjalnie kwalifikującej do terapii celowanej.



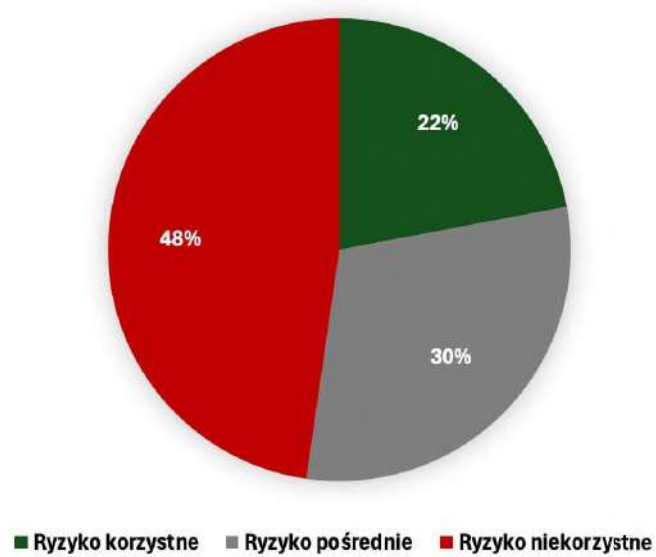
Rycina 19. A - odsetek pacjentów potencjalnie kwalifikujących się do terapii celowanej na podstawie obecności zmian molekularnych. B - liczba pacjentów, u których stwierdzono poszczególne zmiany genetyczne umożliwiające zastosowanie leczenia ukierunkowanego (*FLT3*, *NPM1*, *IDH1*, *IDH2*, *PML::RARA*, *RUNX1::RUNX1T1*, *CBFB::MYH11*, *KMT2A* fuzja).

W analizowanej kohorcie pacjentów dokonano również stratyfikacji ryzyka zgodnie z wytycznymi European LeukemiaNet (ryc. 20.). Pacjentów przypisano do poszczególnych grup na podstawie danych molekularnych oraz cytogenetycznych o udokumentowanym znaczeniu prognostycznym. Do grupy o ryzyku korzystnym zaliczono pacjentów z obecnością rearanżacji charakterystycznych dla CBF-AML tj. *RUNX1::RUNX1T1* lub *CBFB::MYH11*, pacjentów z obecnym wariantem genu *NPM1* bez towarzyszących zmian *FLT3*-ITD oraz pacjentów z obecną zmianą genu *CEBPA* typu bZIP *in-frame*.

Grupa o pośrednim ryzyku obejmowała pacjentów bez jednoznacznych markerów ryzyka korzystnego lub niekorzystnego oraz posiadających nieprawidłowości cytogenetyczne i/lub molekularne niesklasyfikowane jako korzystne lub niekorzystne. Za pacjentów o ryzyku pośrednim uznano m.in. osoby posiadające zmiany genu *NPM1* z towarzyszącą zmianą *FLT3*-ITD oraz pacjentów z mutacją *FLT3*-ITD bez zmian genu *NPM1* oraz bez współistniejących niekorzystnych zmian genetycznych.

Grupa ryzyka niekorzystnego obejmowała pacjentów z obecnością zmian w genach: *TP53*, *ASXL1*, *BCOR*, *EZH2*, *RUNX1*, *SF3B1*, *SRSF2*, *STAG2*, *U2AF1* oraz *ZRSR2*, jednak te geny nie były wykorzystywane jako niekorzystny czynnik prognostyczny, jeśli współwystępowały z podtypami AML o korzystnym rokowaniu. Do grupy pacjentów o ryzyku niekorzystnym przypisano również pacjentów posiadających złożony kariotyp.

Jeżeli u jednego pacjenta współistniało kilka zmian o różnym znaczeniu prognostycznym, stosowano zasadę priorytetu kategorii o gorszym rokowaniu zgodnie z podejściem ELN. Na tej podstawie wytypowano pacjentów w trzech grupach prognostycznych. Ryzyko korzystne 24 pacjentów (22%), ryzyko pośrednie 33 pacjentów (30%) oraz ryzyko niekorzystne 52 pacjentów (48%).



Rycina 20. Stratyfikacja ryzyka pacjentów z badanej kohorty według kryteriów European LeukemiaNet (ELN 2022).

7 Dyskusja

Ostra białaczka szpikowa jest agresywnym nowotworem układu krwiotwórczego, którego cechą charakterystyczną jest klonalna proliferacja niedojrzałych komórek hematopoetycznych. Proces ten skutkuje zaburzeniami w procesie erytropoezy i megakariopoezy, co prowadzi do szybkiego rozwoju niewydolności szpiku (Vakiti i in., 2025). AML stanowi najczęstszą postać ostrej białaczki u dorosłych, tj. ok. 80% wszystkich zachorowań na ostre białaczki. Najczęściej chorują osoby starsze, a szczyt zachorowań przypada na 65. rok życia (Appelbaum i in., 2006; Döhner i in., 2015; Szmajda i in., 2017).

AML cechuje się znaczną heterogennością oraz klonalnym charakterem. Badania wskazują, że w przebiegu choroby często współistnieje wiele odrębnych klonów, z których każdy zawiera specyficzne zmiany genetyczne. W momencie rozpoznania AML w większości przypadków obserwuje się złożoną strukturę klonalną obejmującą klon założycielski oraz subklony. Struktura klonalna w kolejnych etapach choroby może ulegać zmianom. Pod wpływem leczenia część klonów może zaniknąć, inne mogą się rozrastać lub mogą pojawić się nowe klony. AML charakteryzuje się obecnością licznych zmian molekularnych w różnych genach oraz występowaniem wielu wariantów fuzyjnych (Ding i in., 2012; Cancer Genome Atlas Research Network i in., 2013; Desai i in., 2022).

W 2022 roku wprowadzono istotne zmiany w klasyfikacji WHO oraz w wytycznych ELN dotyczących AML. Opublikowano także wersję międzynarodowej klasyfikacji ICC (Arber i in., 2022; Döhner i in., 2022; Khoury i in., 2022; Salman, 2024). Klasyfikacja ELN z 2022 roku jest spójna z klasyfikacją ICC, jednak w większym stopniu kładzie nacisk na molekularną charakterystykę AML. Analiza profilu genetycznego, w tym obecności określonych mutacji i nieprawidłowości cytogenetycznych, umożliwia dokładniejsze przypisanie pacjentów do odpowiednich grup ryzyka (korzystne, pośrednie oraz niekorzystne). Przekłada się to bezpośrednio na dobór strategii terapeutycznej i rokowanie pacjentów (Döhner i in., 2022).

Dokładna charakterystyka zmian genetycznych u pacjentów z AML wymaga zastosowania nowoczesnych metod analitycznych, umożliwiających jednoczesne wykrywanie oraz analizę szerokiego spektrum zmian genetycznych. Kluczową rolę w tym zakresie odgrywają techniki sekwencjonowania następnej generacji NGS, które w ostatnich latach zrewolucjonizowały diagnostykę molekularną AML. Zastosowanie

NGS pozwala na równoczesną analizę licznych genów istotnych w procesie patogenezy choroby, przy jednoczesnym zachowaniu wysokiej czułości i specyficzności. Technologia ta pozwala na identyfikację zarówno częstych, dobrze scharakteryzowanych mutacji kierujących, jak i rzadkich wariantów o potencjalnym znaczeniu patogennym. Umożliwia wykrywanie mutacji punktowych, większych zmian strukturalnych oraz fuzji genowych. W efekcie sekwencjonowanie NGS stało się istotnym narzędziem zarówno w badaniach naukowych, jak i w rutynowej diagnostyce klinicznej AML. Pozwala na bardziej precyzyjną klasyfikację molekularną oraz dobór terapii celowanych (Döhner i in., 2022; Leisch i in., 2019; Papaemmanuil i in., 2016; Wurm i in., 2025).

Celem niniejszej rozprawy była identyfikacja mutacji oraz genów fuzyjnych w panelu wybranych genów u pacjentów z AML z wykorzystaniem technologii NGS. Dodatkowo określono częstość występowania poszczególnych zmian genetycznych w analizowanej populacji oraz oceniono możliwość zastosowania terapii ukierunkowanych molekularnie.

Charakterystyka grupy badanej

Badaniem objęto 109 pacjentów leczonych w Świętokrzyskim Centrum Onkologii w latach 2020-2023. Charakterystyka wiekowa badanej kohorty pozostaje zgodna z obserwacjami opisywanymi w literaturze, zarówno w badaniach międzynarodowych, jak i krajowych. AML jest rodzajem nowotworu hematologicznego, który występuje przede wszystkim u osób dorosłych, a ryzyko zachorowania wzrasta wraz z wiekiem. Mediana wieku w momencie diagnozy wynosi około 65-70 lat, choroba dotyczy głównie populacji osób starszych (Döhner i in., 2022; Wierzbowska, 2020). Charakterystyka grupy badanej jest zatem zgodna z danymi literaturowymi. Mediana wieku badanej kohorty pacjentów wynosiła 65 lat, a najliczniejszą grupę stanowili chorzy w wieku 60-69 lat. Rozkład pacjentów według płci w analizowanej kohorcie również jest zgodny z tendencjami opisywanymi w literaturze, które wskazują na nieznacznie wyższą częstość występowania AML u mężczyzn (Budyszewska i in., 2017; De Angelis i in., 2015; Stabellini i in., 2022). W badanej grupie pacjentów na 109 osób 43 (39%) stanowiły kobiety natomiast 66 (61%) mężczyźni.

Obecnie diagnostyka AML opiera się na klasyfikacjach WHO i ICC oraz stratyfikacji ryzyka ELN, uwzględniających dane cytogenetyczne i molekularne. Zgodnie z aktualną klasyfikacją WHO 2022 pacjentów zakwalifikowano do odpowiednich podtypów AML. Najliczniejszą grupę stanowili chorzy z AML z nawracającymi

nieprawidłowościami genetycznymi, a następnie pacjenci z AML z obecnością mutacji charakterystycznych dla zespołów mielodysplastycznych, AML NOS oraz AML z mutacją *TP53*. Pozostałe podtypy odnotowano z niewielką liczbą przypadków. Rozkład typów AML wg WHO 2022 w badanej grupie pacjentów jest zgodny z danymi literaturowymi i hierarchiczną klasyfikacją, które wskazują, że najczęściej rozpoznawanym typem jest AML z nawracającymi nieprawidłowościami genetycznymi (Arber i in., 2022; Döhner i in., 2022).

Dokonano również klasyfikacji pacjentów według systemu FAB. Klasyfikacja FAB, oparta na cechach morfologicznych blastów, ma obecnie ograniczone znaczenie i stosowana jest w charakterze pomocniczym jako klasyfikacja uzupełniająca. Najczęściej występującymi podtypami w badanej kohorcie były AML M2 tj. ostra białaczka mieloblastyczna z cechami dojrzewania oraz AML M4 tj. ostra białaczka mielomonocytowa. Rozkład typów AML wg klasyfikacji FAB w opisywanej grupie pacjentów również jest zgodny z opisywanym w literaturze. Najwięcej przypadków zaliczanych jest do ostrej białaczki mieloblastycznej z cechami dojrzewania tak jak w opisywanej grupie badanej (Hasham i in., 2022).

Ocena profilu molekularnego - identyfikacja zmian genetycznych i genów fuzyjnych

Pierwszym celem niniejszej rozprawy doktorskiej była charakterystyka profilu zmian genetycznych oraz genów fuzyjnych wśród pacjentów z grupy badanej. Molekularne podłoże AML było intensywnie badane przez ostatnie dekady, początkowo głównie z wykorzystaniem analiz cytogenetycznych. Nawracające aberracje strukturalne chromosomów szybko stały się istotnymi markerami diagnostycznymi i prognostycznymi. Potwierdzało to kluczową rolę nabytych zmian genetycznych w patogenezie choroby (Akkari i in., 2022; Snaith i in., 2024). Ze względu na dużą liczbę oraz różnorodność mutacji, które mogą być wykryte w momencie rozpoznania, obecnie zalecane jest stosowanie szerokiego profilowania molekularnego (Duncavage i in., 2022). Wprowadzenie metod sekwencjonowania pozwoliło na identyfikację powtarzających się zmian w genach, takich jak *FLT3*, *NPM1*, *KIT*, *CEBPA* i *TET2*, oraz odkrycie nowych, istotnych zmian np. w genach *DNMT3A* i *IDH1* (Cancer Genome Atlas Research Network i in., 2013; Kayser & Levis, 2023). W badaniach prowadzonych na dużych kohortach pacjentów z AML, takich jak TCGA i Beat AML, stosowano głównie technologie sekwencjonowania całego egzomu (ang. *whole exome sequencing*, WES), sekwencjonowania RNA (ang. *RNA sequencing*, RNA-seq) oraz w przypadku

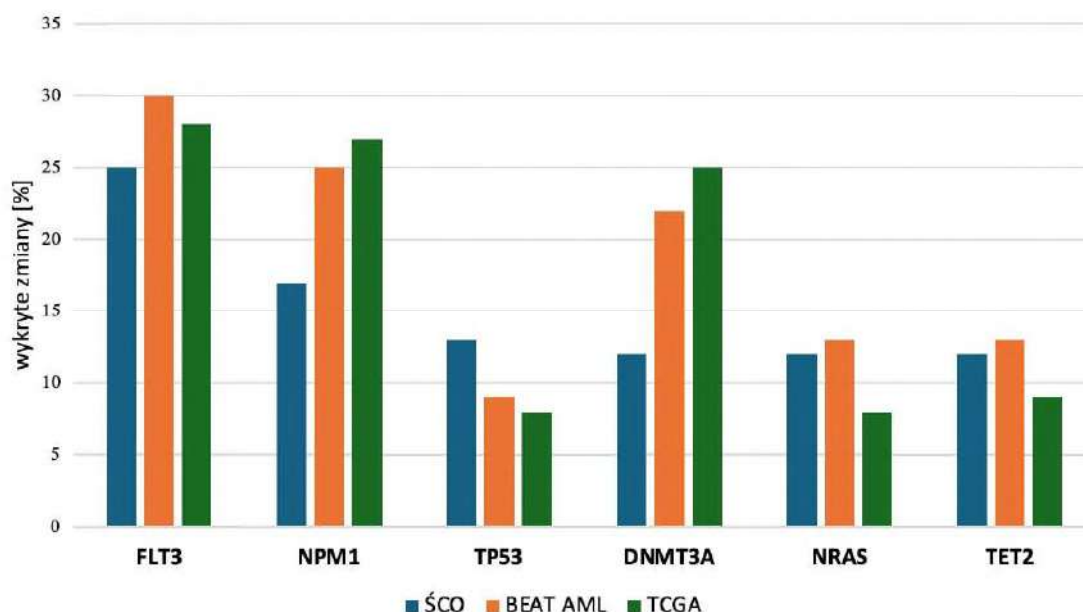
wybranych próbek również sekwencjonowania całego genomu (ang. *whole genome sequencing*, WGS). Umożliwiło to szeroką charakterystykę zmian genetycznych w AML. W niniejszej pracy zastosowano sekwencjonowanie panelowe, które mimo ograniczonego zakresu genów, zapewnia większą głębokość pokrycia. Dodatkowo w sekwencjonowaniu panelowym zastosowano detekcję wariantów głównie w genach o już udokumentowanym znaczeniu klinicznym i prognostycznym. Podejście panelowe stanowi uzasadnioną metodę w diagnostyce klinicznej, podczas gdy WES/WGS pełnią obecnie rolę narzędzi naukowych (Cancer Genome Atlas Research Network i in., 2013; Haferlach 2020, Bottomly i in., 2022).

Pomimo szerokiego panelu mutacji, najnowsze badania wskazują, że u niewielkiej części pacjentów z AML (ok. 2-5%) nie stwierdza się mutacji w żadnym z genów związanych z AML. Podkreśla to heterogenność molekularną choroby oraz potrzebę kompleksowego profilowania genomowego (Cancer Genome Atlas Research Network i in., 2013; Chaudhary i in., 2024; Papaemmanuil i in., 2016).

W analizowanej w niniejszej pracy kohorcie 109 dorosłych pacjentów z AML zmiany genetyczne wykryto u 95 (87,2%) chorych. Uzyskany odsetek jest porównywalny z wynikami dużych, wieloośrodkowych badań z wykorzystaniem technologii NGS, w których zmiany wykrywano u 86-96% pacjentów (m.in. Papaemmanuil i in., 2016; TCGA, 2013; Yu i in., 2020). W badaniach Papaemmanuil i współpracowników wykazano obecność co najmniej jednej mutacji kierującej w 96% analizowanych próbek. Wyniki te podkreślają powszechność zmian genetycznych w AML oraz znaczenie kompleksowego profilowania molekularnego w diagnostyce AML (Papaemmanuil i in., 2016). Podobnie w badaniu Jifeng Yu wykryto co najmniej jedną mutację niesynonimiczną u 279 pacjentów z AML (85,8% badanej kohorty) (Yu i in., 2020). Wyniki te potwierdzają, że profilowanie molekularne metodą NGS jest kluczowym narzędziem współczesnej diagnostyki i klasyfikacji AML (Cancer Genome Atlas Research Network i in., 2013; Jongen-Lavrencic i in., 2018).

W analizowanej kohorcie pacjentów wytypowano sześć genów najczęściej ulegających mutacjom. Były to geny *FLT3*, *NPM1*, *TP53*, *DNMT3A*, *NRAS* oraz *TET2*. Uzyskane wyniki dotyczące częstości mutacji w tych genach są zbliżone do danych raportowanych w dużych kohortach badawczych, m.in. BEAT AML i TCGA (Cancer Genome Atlas Research Network i in., 2013, Bottomly i in., 2022). Zestawienie wyników omawianych genów przedstawiono na rycinie 20. Potwierdza to reprezentatywność badanej grupy i zgodność z obserwacjami innych ośrodków (Wen i in., 2021; Bibault

i in., 2015; Negotei i in., 2023; Othman i in., 2024; Ranieri i in., 2022; R. Wang i in., 2022).



Rycina 21. Porównanie częstości mutacji wybranych genów w analizowanej kohorcie pacjentów (ŚCO) z danymi pochodzącymi z dużych kohort badawczych BEAT AML oraz TCGA (Cancer Genome Atlas Research Network i in., 2013, Bottomly i in., 2022).

Wśród uzyskanych wyników warto zwrócić uwagę na grupę pacjentów z mutacjami w genie *TP53*. Zmiany te stanowią jedną z najczęściej obserwowanych mutacji w analizowanej kohorcie. Obecność tych zmian ma istotne znaczenie kliniczne, ponieważ mutacje genu *TP53* są związane z niekorzystnym rokowaniem, opornością na leczenie, wysokim ryzykiem nawrotu choroby oraz klasyfikują pacjentów do podgrupy AML z obecną zmianą genu *TP53* zgodnie z aktualnymi klasyfikacjami WHO 2022 i ICC 2022. Dodatkowo analiza dostępnych danych molekularnych oraz cytogenetycznych, pozwoliła na wytypowanie dwóch pacjentów z utratą heterozygotyczności (ang. *Loss of Heterozygosity*, LOH) genu *TP53*, stanowiącą szczególną podgrupę chorych o wyjątkowo niekorzystnym rokowaniu (DiNardo, Tiong, i in., 2020; Döhner i in., 2022).

Analiza badanej kohorty ujawniła obecność siedmiu rearanżacji genowych: *RUNX1::RUNX1T1*, *PML::RARA*, *CBFB::MYH11*, *ETV6::MNI*, *ETV6::NTRK3*, *ETV6::PDGFRB* oraz *KMT2A::ELL*. Fuzje *RUNX1::RUNX1T1* i *CBFB::MYH11*, stanowiące odpowiednio 5% i 3% wszystkich wykrytych zmian w badanej kohorcie,

należą do charakterystycznych rearanżacji obserwowanych w ostrej białaczce szpikowej związanej z czynnikiem wiążącym rdzeń (ang. *core-binding factor* AML, CBF-AML). Podtyp ten definiowany jest przez obecność translokacji t(8;21)(q22;q22) lub inwersji inv(16)(p13q22)/translokacji t(16;16)(p13;q22), określanych odpowiednio jako t(8;21) i inv(16). Zmiany te prowadzą do zaburzenia genów kodujących podjednostki czynnika wiążącego rdzeń, który stanowi kluczowy regulator transkrypcji w procesie prawidłowej hematopoezy. Translokacja t(8;21) skutkuje powstaniem genu fuzyjnego *RUNX1::RUNX1T1*, natomiast rearanżacje inv(16) prowadzą do utworzenia genu fuzyjnego *CBFB::MYH11*. CBF-AML stanowi około 12-15% wszystkich przypadków AML i zaliczana jest do grupy AML z nawracającymi nieprawidłowościami genetycznymi. Aberracje te mają istotne znaczenie diagnostyczne oraz prognostyczne, gdyż wiążą się z korzystną odpowiedzią na leczenie i zwiększoną wrażliwością na cytarabinę. Pomimo ogólnie lepszego rokowania, dane z badań obejmujących długoterminową obserwację wskazują, że mediana całkowitego przeżycia (ang. *overall survival*, OS) w tej grupie pacjentów wynosi około 5 lat, co sugeruje potrzebę prowadzenia dalszych badań (Sangle & Perkins, 2011; Borthakur & Kantarjian, 2021; Darwish i in., 2023).

W analizowanej kohorcie pacjentów fuzja *PML::RARA* stanowiła 4% wszystkich wykrytych zmian. Jest to aberracja charakterystyczna dla ostrej białaczki promielocytowej (ang. *acute promyelocytic leukemia*, APL), stanowiąca kluczowy marker diagnostyczny tej jednostki chorobowej. Fuzja *PML::RARA* występuje w około 95% przypadków APL i najczęściej wynika z translokacji t(15;17)(q22;q12-21). Zmiana ta prowadzi do połączenia genu białaczki promielocytowej (*PML*) z genem receptora kwasu retinowego alfa (*RARA*). W rezultacie czego zablokowany zostaje proces różnicowania komórek na etapie promielocytów i następuje ich akumulacja w szpiku kostnym. APL z obecnością fuzji *PML::RARA* zgodnie z wytycznymi WHO klasyfikowana jest jako podtyp AML z nawracającymi nieprawidłowościami genetycznymi (Döhner i in., 2022; Sanz i in., 2019).

W analizowanej grupie badanej zidentyfikowano również rzadkie rearanżacje, takie jak *ETV6::MNI*, *ETV6::PDGFRB*, *ETV6::NTRK3* oraz *KMT2A::ELL*, z częstością wynoszącą po 1% każda. Powyższe fuzje genów należą do grupy nietypowych aberracji genetycznych o zróżnicowanym znaczeniu biologicznym i klinicznym. Fuzje genu *KMT2A*, w tym *KMT2A::ELL*, wiążą się zazwyczaj z niekorzystnym rokowaniem, a pacjenci są często kwalifikowani do terapii według schematów dla grup wysokiego

ryzyka (Muntean & Hess, 2012; Marschalek, 2016). Z kolei obecność fuzji *ETV6::PDGFRB* może stanowić potencjalny cel terapii ukierunkowanej. Badania wykazały, że chorzy z tą rearanżacją odpowiadają na leczenie imatynibem, uzyskując szybkie i głębokie remisje hematologiczne oraz molekularne (Lierman & Cools, 2007). Fuzje *ETV6::NTRK3* występują wyjątkowo rzadko w AML, natomiast zostały szerzej opisane w nowotworach litych, takich jak wydzielniczy rak piersi czy wrodzony włókniakomięsak. Wyniki badań klinicznych i przedklinicznych sugerują, że obecność tej rearanżacji może wiązać się z potencjalną wrażliwością na inhibitory TRK np. entrectynib (Kralik i in., 2011; Smith i in., 2018; Joshi i in., 2019). Fuzja *ETV6::MNI* również stanowi rzadką, ale nawracającą nieprawidłowość chromosomową w nowotworach szpiku. Jej znaczenie kliniczne i prognostyczne nie zostało dotychczas jednoznacznie określone. Wyniki badań *in vitro* sugerują, że rearanżacja *ETV6::MNI* wykazuje właściwości onkogenne, a jej nadekspresja może zwiększać oporność komórek białaczkowych na idarubicynę. Sugeruje to potencjalny udział powyższej fuzji w procesie leukemogenezy i progresji choroby (Gong i in., 2018).

Ze względu na niską częstość występowania, dostępne dane kliniczne dotyczące znaczenia prognostycznego i terapeutycznego rzadko występujących fuzji w AML są ograniczone. Jednak ich identyfikacja ma istotne znaczenie diagnostyczne i potencjalnie terapeutyczne, szczególnie w kontekście kwalifikacji pacjentów do przyszłych terapii celowanych. Między innymi z tego właśnie względu zastosowanie technologii NGS stanowi niezwykle cenne narzędzie w kompleksowej diagnostyce molekularnej AML. Panele NGS pozwalają nie tylko na wykrywanie dobrze poznanych i często występujących wariantów fuzyjnych, ale również na identyfikację rzadkich lub nietypowych rearanżacji, które mogłyby pozostać niewykryte przy stosowaniu wyłącznie metod ukierunkowanych. Tak szerokie podejście diagnostyczne, jakim jest stosowanie NGS, zwiększa szansę na pełną charakterystykę molekularną AML. Może to mieć kluczowe znaczenie dla właściwej stratyfikacji ryzyka i doboru terapii dla pacjentów.

Charakterystyka molekularna wykrytych wariantów genetycznych

Zastosowanie techniki NGS pozwala na identyfikację wielu typów zmian molekularnych w badanych genach, pozwalając na szerokie przedstawienie profilu mutacji wśród pacjentów. Drugim celem szczegółowym niniejszej rozprawy doktorskiej była charakterystyka molekularna wykrytych wariantów genetycznych z uwzględnieniem ich klasyfikacji funkcjonalnej. W przypadku analizowanej kohorty dominującą formą

zmian były mutacje zmiany sensu, które najczęściej wynikały z polimorfizmu nukleotydów (SNP). Ten typ zmian jest jednym z najczęstszych mechanizmów prowadzących do zaburzeń funkcji białek sygnałowych, regulatorowych i epigenetycznych w AML. Kolejnymi często identyfikowanymi zmianami były insercje oraz delecje powodujące przesunięcie ramki odczytu. Są to zmiany charakteryzujące się silnym wpływem na strukturę białka, często skutkującym utratą funkcji. Z kolei sporadyczne wykrycie insercji/delecji niepowodujących przesunięcia ramki odczytu oraz fuzji genowych potwierdza, że choć są one rzadsze, mogą odgrywać ważną rolę diagnostyczną i prognostyczną. Prezentowana w badanej kohorcie klasyfikacja wariantów jest zgodna z typowym rozkładem typów zmian badanej jednostki chorobowej (G. Li i in., 2020; Shi i in., 2020; N. Zhang i in., 2020; Shultz i in., 2022).

Analiza klas substytucji wykazała przewagę tranzycji C>T, co jest często obserwowane w nowotworach związanych z procesami deaminacji cytozyny i starzeniem komórek, co może odzwierciedlać patogenezę AML u części pacjentów, zwłaszcza w starszym wieku. Charakterystyka molekularna wykrytych zmian, uwzględniająca klasyfikację wariantów, typy wariantów oraz klasy substytucji, wykazała zgodność uzyskanych wyników z danymi dostępnymi w piśmiennictwie. Obserwowane profile mutacyjne wskazują na podobieństwo badanej kohorty pacjentów z AML do populacji opisywanych w innych badaniach, co potwierdza reprezentatywność analizowanej grupy (G. Li i in., 2020; Shi i in., 2020; N. Zhang i in., 2020; Shultz i in., 2022).

Analiza rozkładu liczby mutacji na pacjenta wykazała, że większość badanych osób posiadała od jednej do trzech zmian genetycznych, co jest charakterystyczne dla chorych z AML. U ok. 13% pacjentów nie wykryto zmian w żadnym z analizowanych genów. Jest to zgodne z danymi literaturowymi i może odzwierciedlać zarówno ograniczenia zastosowanego panelu, jak i heterogenność molekularną AML, która może obejmować zmiany zlokalizowane poza badanym zestawem genów (R. Wang i in., 2020; Kurzer & Weinberg, 2023).

W niniejszej pracy przeprowadzono analizę lokalizacji mutacji w genach *FLT3*, *NPM1*, *TP53* oraz *CEBPA* w badanej kohorcie pacjentów. W analizie skupiono się na powyższych genach, ze względu na ich kluczowe znaczenie kliniczne i prognostyczne, zgodnie z aktualnymi wytycznymi diagnostycznymi (Döhner i in., 2022). Geny *NPM1* i *FLT3*, charakteryzują się występowaniem mutacji w typowych, dobrze zdefiniowanych regionach. W genie *FLT3* większość zmian koncentrowała się w rejonie obejmującym eksony 14 i 15, w obrębie domeny okołobłonowej. Jest to typowa lokalizacja dla

wewnętrznych tandemowych duplikacji (ITD), które stanowią klasyczny typ mutacji genu *FLT3* o istotnym znaczeniu klinicznym. Dodatkowo zaobserwowano mutacje w domenie kinazy tyrozynowej (TKD), w tym w kodonie 835, który stanowi charakterystyczne miejsce mutacji punktowych typu zmiany sensu genu *FLT3* (Koga i in., 2025; Schranz i in., 2018).

Mutacje genu *NPM1* koncentrowały się w eksonie 11 i obejmowały jeden typ insercji prowadzącej do przesunięcia ramki odczytu. W analizowanej kohorcie pacjentów jedynym zarejestrowanym wariantem była zmiana p.Trp288CysfsTer12, typowa dla AML z mutacją *NPM1*. Jest to wariant mutacji typu A, stanowiący około 75-80% wszystkich mutacji *NPM1* występujących w AML (Chin i in., 2023; Hindley i in., 2021).

Natomiast w genach, takich jak *TP53* i *CEBPA*, zmiany mogą być rozproszone i nie wykazują jednego charakterystycznego wzorca. W genie *TP53* mutacje były rozproszone i nie wykazywały wyraźnych hotspotów. Dominowały tutaj warianty typu zmiany sensu, które były zlokalizowane w domenie wiążącej DNA (eksony 5-8). Odpowiada to typowemu profilowi mutacyjnemu genu *TP53* w AML. Tego typu zmiany prowadzą do utraty funkcji białka p53 i są silnie związane z niekorzystnym rokowaniem oraz opornością na leczenie (Prochazka i in., 2019).

Mutacje genu *CEBPA* występowały zarówno w części N-, jak i C-końcowej genu, obejmując m.in. domenę bZIP odpowiedzialną za wiązanie DNA. Charakter tych zmian ma istotne znaczenie prognostyczne. Mutacje niezmieniające ramki odczytu w domenie bZIP są związane z korzystnym rokowaniem u chorych na AML niezależnie od tego, czy występują jako mutacje bialleliczne, czy monoalleliczne (Döhner i in., 2022). Obserwowany rozkład mutacji w genie *CEBPA* w analizowanej kohorcie również odpowiada znanym schematom opisanym w literaturze (Wakita i in., 2022; Y. Zhang i in., 2020). Różnorodność lokalizacji mutacji uzasadnia zastosowanie NGS. Technologia ta pozwala analizować całe geny i wykrywać zarówno klasyczne miejsca mutacji (ang. *hotspots*), jak i rzadkie warianty, czego nie umożliwiają ukierunkowane testy PCR.

Kolejnym istotnym elementem prezentowanej rozprawy doktorskiej jest analiza częstości allelicznej wariantów w genach najczęściej ulegających mutacjom w badanej kohorcie AML. W zależności od obserwanego poziomu VAF można wnioskować o klonalnym charakterze poszczególnych mutacji oraz ich znaczeniu jako tzw. mutacji założycielskich (ang. *founding mutations*). (Döhner i in., 2022; Vosberg & Greif, 2019). Wartości VAF nieuwzględniające korekcji o odsetek blastów w większości analizowanych genów mieściły się w zakresie wartości pośrednich. Ze względu na to że

AML jest chorobą wywodzącą się z populacji blastów, zastosowano korekcję VAF o procentową zawartość blastów w badanych próbkach. Takie podejście umożliwia bardziej precyzyjne oszacowanie rzeczywistego udziału allelu zmutowanego w populacji komórek nowotworowych. Analiza rozkładu wartości VAF po uwzględnieniu korekcji o odsetek blastów wykazała zróżnicowany charakter klonalny mutacji w badanej kohorcie AML. Mutacje w genach *TP53*, *RUNX1*, *ASXL1*, *DNMT3A*, *TET2*, *SRSF2* oraz *NPM1* charakteryzowały się wyższymi medianami VAF oraz obecnością licznych przypadków z wartościami zbliżonymi do 1. Może to sugerować ich klonalny charakter oraz potencjalnie wcześniejsze pojawienie się w procesie leukemogenezy (Hirsch i in., 2016; Miles i in., 2020).

Szczególną uwagę zwracają przypadki z bardzo wysokimi wartościami VAF dla genu *TP53*. Zmiany te często występują jako zmiany klonalne dominujące, silnie powiązane z niekorzystnym rokowaniem (Corces-Zimmerman i in., 2014; Schmalbrock i in., 2021; Cocciardi i in., 2019). Uwzględniając dostępne dane cytogenetyczne obejmujące informacje o delecji ramienia 17p genu *TP53* można wnioskować o utracie heterozygotyczności w kilku przypadkach. Takie sytuacje wiążą się z wyjątkowo niekorzystnym rokowaniem (Barbosa i in., 2019; Short i in., 2020; Shahzad i in., 2024).

Interesującą obserwacją była wysoka mediana VAF dla mutacji genu *JAK2*, wynosząca około 1. Taki profil może sugerować klonalny charakter oraz występowanie w stanie homozygotycznym lub utratę heterozygotyczności, do której może dochodzić m.in. w wyniku disomii jednorodzicielskiej (ang. *uniparental disomy*, UPD) obejmującej ramię krótkie chromosomu 9 (9p), na którym zlokalizowany jest gen *JAK2* (Milosevic Feenstra i in., 2020; Ushijima i in., 2024).

Zmiany w genach *FLT3* oraz *NRAS* wykazywały niższe mediany VAF co może sugerować ich charakter subklonalny. Wyniki te są zgodne z modelem ewolucji klonalnej AML. Mutacje aktywujące szlaki proliferacyjne pełnią rolę wtórnych zdarzeń i pojawiają się w późniejszych etapach progresji choroby (Papaemmanuil i in., 2016; N. Daver i in., 2019; Bergeron i in., 2023).

Ocena współwystępowania mutacji w badanych genach. Identyfikacja najczęściej współistniejących zmian genetycznych

Kolejnym celem niniejszej rozprawy doktorskiej była analiza interakcji pomiędzy najczęściej zmienionymi genami w badanej kohorcie, która ujawniła obecność kilku

wzorców. W analizowanej kohorcie odnotowano częste współwystępowanie mutacji w genach *FLT3* i *NPM1*, co jest zgodne z danymi literaturowymi wskazującymi na ścisły związek pomiędzy tymi zmianami w patogenezie AML. Mutacje w genie *NPM1* należą do najczęstszych zmian molekularnych w grupie pacjentów z AML o prawidłowym kariotypie, występując u około 50-60% chorych dorosłych. Ich obecność wiąże się z korzystnym rokowaniem, szczególnie w przypadkach bez współistniejącej mutacji *FLT3*-ITD. Pacjenci z obecną mutacją genu *NPM1* charakteryzują się wyższym odsetkiem całkowitych remisji hematologicznych oraz dłuższym przeżyciem wolnym od choroby i zdarzeń w porównaniu z chorymi bez tej zmiany (Lewandowski, 2012; Lachowiec i in., 2020). Z kolei mutacje genu *FLT3* występują u około 30% dorosłych pacjentów z nowo rozpoznanym AML. Dominującą formą wariantów genu *FLT3* jest wewnętrzna tandemowa duplikacja (*FLT3*-ITD). Obecność tej mutacji jest uznawana za czynnik złego rokowania i wiąże się ze zwiększonym ryzykiem nawrotu choroby (Wiśniewski i in., 2018; Lachowiec i in., 2020). Badania kliniczne wykazały jednak, że zastosowanie inhibitorów kinazy tyrozynowej, takich jak midostauryna, w połączeniu ze standardową chemioterapią znacząco poprawia wyniki leczenia chorych z mutacją genu *FLT3* (Stone i in., 2017).

Współwystępowanie mutacji *NPM1* i *FLT3*-ITD stanowi szczególny podtyp AML, według klasyfikacji ELN 2022. Zgodnie z aktualnymi wytycznymi, obecność mutacji *NPM1* bez towarzyszącej zmiany *FLT3*-ITD wiąże się z korzystnym rokowaniem, natomiast mutacja *NPM1* współistniejąca z *FLT3*-ITD, klasyfikowana jest jako grupa ryzyka pośredniego (Döhner i in., 2022). Obecność *NPM1* może częściowo łagodzić negatywny wpływ *FLT3*-ITD. Mutacja *NPM1* pojawia się jako zdarzenie inicjujące, a zmiana *FLT3*-ITD jako zdarzenie wtórne napędzające proliferację komórek białaczkowych (Papaemmanuil i in., 2016; Döhner i in., 2022; Y. Li i in., 2023).

Kolejnym przykładem współwystępowania zmian jest obecność fuzji *PML::RARA* ze zmianami w genie *FLT3*. Fuzja *PML::RARA*, charakterystyczna dla ostrej białaczki promielocytowej, występuje w 5-10% przypadków AML i determinuje zastosowanie leczenia ukierunkowanego na receptory kwasu retinowego (ATRA) oraz trójtlenek arsenu (ATO). Wprowadzenie powyższego schematu leczenia znacząco poprawia rokowanie pacjentów (Wierzbowska & Gołos, 2013; Lv i in., 2019; Tripon i in., 2020). Zmiany genu *FLT3*, głównie typu ITD, współwystępują z wyżej wymienioną fuzją w około 30-40% przypadków i są związane z nadmierną aktywacją szlaku proliferacyjnego (Liquori i in., 2020). Znaczenie prognostyczne współwystępowania

fuzji *PML::RARA* i wariantów *FLT3*-ITD nie zostało jednoznacznie określone, jednak wiele badań wskazuje na negatywny wpływ na przebieg kliniczny. Szczególnie istotne jest to w przypadku wysokiego stosunku alleli zmutowanych do typu dzikiego wariantu *FLT3*-ITD (Testa & Lo-Coco, 2016; Tripon i in., 2020). W związku z tym współwystępowanie powyższych zmian może wskazywać na istnienie podgrupy pacjentów wymagających intensywniejszego monitorowania choroby resztkowej oraz rozważenia wczesnego zastosowania terapii celowanych inhibitorami *FLT3* (Stone i in., 2017; N. Daver i in., 2019).

Innym przykładem współwystępowania zmian molekularnych jest jednoczesna obecność mutacji w genach *FLT3* i *KRAS/NRAS*. W badanej grupie zidentyfikowano pięciu (4,6%) takich pacjentów (dwóch ze zmianami genów *FLT3* i *KRAS* oraz trzech ze zmianami genów *FLT3* i *NRAS*). Mutacje w genach *KRAS* i *NRAS* prowadzą do konstytutywnej aktywacji szlaku RAS/MAPK, odgrywającego kluczową rolę w regulacji proliferacji i przeżycia komórek nowotworowych. Aktywacja tego szlaku może ograniczać skuteczność inhibitorów *FLT3* oraz sprzyjać rozwojowi oporności na leczenie. Może to stanowić biologiczne uzasadnienie dla rozważania stosowania inhibitorów MEK jako potencjalnej strategii terapeutycznej u wybranych pacjentów. Należy jednak podkreślić, że podejście to nie stanowi obecnie standardu leczenia AML, ale może znajdować zastosowanie w ramach terapii skojarzonych (McMahon i in. 2019, Eguchi i in., 2020, Alawieh i in., 2024).

Istotną obserwacją wynikającą z analizy interakcji somatycznych pomiędzy najczęściej zmienionymi genami w badanej kohorcie pacjentów jest odnotowanie pary genów wykazujących wzajemne wykluczanie się mutacji. Może to wskazywać na alternatywne ścieżki molekularne prowadzące do transformacji nowotworowej. Zjawisko to sugeruje, że obecność jednego wariantu może eliminować presję selekcyjną na wystąpienie innego wariantu (Papaemmanuil i in., 2016). W analizowanej kohorcie pacjentów zaobserwowano wzajemne wykluczanie się zmian genów *TP53* i *FLT3*. Mutacje *TP53* stanowią odrębną kategorię zmian typowo występujących w AML o złożonym kariotypie i wiążących się z bardzo niekorzystnym rokowaniem (Döhner i in., 2022; Weinberg i in., 2022). Z kolei wariant *FLT3*-ITD jest częściej obserwowany w AML z prawidłowym kariotypem. Wzajemne wykluczanie zmian genów *TP53* i *FLT3* może zatem odzwierciedlać rozbieżne mechanizmy patogenezy AML. Z jednej strony obecna jest leukemogeneza napędzana niestabilnością genomową (*TP53*), z drugiej

z kolei można obserwować proliferację zależną od aktywacji kinaz sygnałowych (*FLT3*) (N. G. Daver i in., 2022).

Zidentyfikowane wzorce współwystępowania i wzajemnego wykluczania są spójne z opisanymi podziałami biologicznymi AML, opartymi na mechanizmach molekularnych. Potwierdzają one heterogenność choroby oraz znaczenie kompleksowego profilowania genetycznego (Papaemmanuil i in., 2016).

Ocena skuteczności stratyfikacji pacjentów do terapii ukierunkowanych molekularnie z wykorzystaniem NGS

Ostatnim celem pracy była ocena skuteczności stratyfikacji pacjentów do terapii ukierunkowanej molekularnie. Wyniki przeprowadzonej analizy wskazują, że w badanej kohorcie 109 pacjentów 46% (50 przypadków) posiadało co najmniej jedną zmianę genetyczną, która mogłaby stanowić potencjalne wskazanie do leczenia ukierunkowanego molekularnie. Mutacje genu *FLT3* stanowią jeden z najlepiej scharakteryzowanych markerów terapii celowanej w AML. Dodanie inhibitorów kinazy, takich jak midostauryna, gilteritinib czy sorafenib, do standardowej chemioterapii znacząco wydłuża całkowite przeżycie i przeżycie wolne od zdarzeń u pacjentów z AML z obecną mutacją genu *FLT3* (Stone i in., 2017; Voso i in., 2020; Szczepaniak & Rzetelska, 2022).

W przypadku pacjentów z mutacją *NPM1* lub rearanżacją genu *KMT2A* obiecujące wyniki wykazują obecnie badania kliniczne z zastosowaniem inhibitorów meniny (np. revumenib) (Issa i in., 2023; Arellano i in., 2025). Podobnie mutacje w genach *IDH1* i *IDH2*, umożliwiają zastosowanie inhibitorów, ivosidenibu i enasidenibu, które wykazały skuteczność zarówno w leczeniu nawrotowej, jak i nowo rozpoznanej AML (Stein i in., 2017; Venugopal i in., 2022; Montesinos i in., 2022).

Istotne znaczenie kliniczne wykazują również pacjenci z obecnością rearanżacji *PML::RARA*, typowej dla ostrej białaczki promielocytowej. W tej grupie chorych zastosowanie terapii skojarzonej kwasem all-trans retinowym i trójtlenkiem arsenu pozwala uzyskać bardzo wysokie odsetki remisji całkowitych i długotrwałe przeżycie (Liquori i in., 2020; A. Zhang & Qiu, 2025). Z kolei pacjenci z CBF-AML, z obecnością translokacji *RUNX1::RUNX1T1* lub *CBFB::MYH11*, charakteryzują się zazwyczaj korzystnym rokowaniem przy zastosowaniu standardowych protokołów chemioterapii z terapią celowaną gemtuzumabem ozogamycyny (Bourne i in., 2024; Ronnacker i in., 2025).

Warto podkreślić, że część pacjentów wykazywała współwystępowanie więcej niż jednej zmiany potencjalnie kwalifikującej do terapii celowanej, co odzwierciedla złożony charakter molekularny AML. Uzyskane wyniki wskazują, że niemal połowa analizowanych przypadków mogłaby potencjalnie odnieść korzyść z leczenia celowanego. Podkreśla to znaczenie kompleksowego profilowania genetycznego w procesie diagnostyczno-terapeutycznym chorych na AML. Należy jednak zaznaczyć, że obecność zmian molekularnych stanowi jedynie jeden z czynników branych pod uwagę przy kwalifikacji do terapii ukierunkowanych. Ostateczna decyzja terapeutyczna wymaga uwzględnienia dodatkowych parametrów klinicznych, takich jak ogólny stan pacjenta, wiek, choroby współistniejące, wyniki badań laboratoryjnych oraz wcześniejsze leczenie. Dostępność leków celowanych może być również ograniczona ze względu na aktualne programy lekowe oraz objęcie refundacją jedynie wybranych chorych z AML, spełniających określone kryteria kwalifikacji do programów lekowych. Niemniej jednak uzyskane dane wskazują na istotny potencjał zastosowania terapii celowanych w oparciu o profil molekularny pacjentów z AML (Döhner i in., 2022).

Dodatkowo analizując uzyskane wyniki badań profilowania genetycznego badanej kohorty oraz dostępne dane cytogenetyczne dokonano stratyfikacji ryzyka pacjentów według aktualnych kryteriów European LeukemiaNet (ELN 2022). W trakcie przeprowadzonej analizy zastosowano priorytet dla zmian o gorszym rokowaniu w przypadku współwystępowania zmian o różnym znaczeniu prognostycznym. Podejście takie jest zgodne z wytycznymi ELN, gdzie hierarchiczna struktura zmian o niekorzystnym znaczeniu determinuje ostateczną klasyfikację pacjentów do grupy ryzyka (Döhner i in., 2022). W celu określenia ryzyka dla pacjentów oprócz danych molekularnych uwzględniono również dostępne dane cytogenetyczne. Uzyskany rozkład pacjentów pomiędzy poszczególnymi kategoriami ryzyka to 22% pacjentów w grupie ryzyka korzystnego, 30% w grupie ryzyka pośredniego oraz 48% w grupie ryzyka niekorzystnego. Otrzymane dane wskazują na przewagę przypadków pacjentów z grupy ryzyka niekorzystnego co jest zgodne z obserwacjami innych badań obejmujących populację dorosłych pacjentów z AML (Jentzsch i in., 2021, 2022; Hoff i in., 2024). Wysoki odsetek przypadków w grupie niekorzystnego ryzyka podkreśla znaczenie szerokiej diagnostyki molekularnej z wykorzystaniem paneli NGS. Istotna jest również kompleksowa analiza cytogenetyczno-molekularna, która ma bezpośrednie przełożenie na stratyfikację ryzyka pacjentów oraz wybór optymalnego postępowania terapeutycznego.

8 Podsumowanie i wnioski

W prezentowanej rozprawie doktorskiej przeprowadzono analizę profilu mutacji u pacjentów ze zdiagnozowaną ostrą białaczką szpikową, leczonych w Świętokrzyskim Centrum Onkologii w latach 2020-2023. Głównym celem badania było szczegółowe określenie i charakterystyka profilu mutacji w badanej kohorcie pacjentów. Na podstawie przeprowadzonej analizy wyników badań wysunięto następujące wnioski:

1. U 95 pacjentów (87,16%) wykryto co najmniej jedną zmianę genetyczną, natomiast u pozostałych 14 osób (12,84%) nie stwierdzono obecności wariantów patogennych ani prawdopodobnie patogennych w badanych genach. W analizowanej grupie najczęściej mutacjom ulegał gen *FLT3* (25%). Drugim najczęściej mutowanym genem był *NPM1* (17%). Na trzecim miejscu znalazły się mutacje genu *TP53* (13%). Zidentyfikowano 7 wariantów rearanżacji fuzyjnych (*RUNX1::RUNX1T1*, *PML::RARA*, *CBFB::MYH11*, *ETV6::MNI*, *ETV6::NTRK3*, *ETV6::PDGFRB*, *KMT2A::ELL*). Uzyskane wyniki dotyczące częstości mutacji w analizowanych genach są zgodne z danymi pochodzącymi z dużych, wieloośrodkowych badań wykorzystujących technologię NGS, takich jak BEAT AML i TCGA. Wskazuje to na reprezentatywność badanej kohorty oraz spójność uzyskanych wyników z obserwacjami raportowanymi w innych ośrodkach.
2. Analiza klasyfikacji wykrytych wariantów wykazała, że w badanej kohorcie pacjentów z AML zdecydowaną większość stanowiły mutacje typu *missense*. Pod względem rodzaju zidentyfikowanych wariantów dominowały substytucje pojedynczych nukleotydów, które stanowiły ponad połowę wszystkich wykrytych zmian. W dalszej kolejności obserwowano insercje i delecje, obejmujące zarówno mutacje prowadzące do przesunięcia ramki odczytu, jak i zmiany niepowodujące jej zaburzenia. Ponadto wykryto kilka różnych wariantów fuzji genowych. Liczba wykrytych mutacji na próbkę była zróżnicowana. Większość chorych miała od 1 do 3 wariantów, a mediana wyniosła 3 mutacje na pacjenta. U części osób obserwowano większą akumulację zmian tj. 5 zmian (9 przypadków) lub 6 zmian (2 przypadki) jednocześnie.
3. Analiza interakcji somatycznych ujawniła charakterystyczne dla AML wzorce współwystępowania i wzajemnego wykluczania mutacji. Najczęściej obserwowano współwystępowanie mutacji genów *NPM1* i *FLT3*. Stwierdzono

również wyraźne wzajemne wykluczanie między mutacjami *FLT3* i *TP53* oraz *FLT3* i *JAK2*. W badanej kohorcie u 4,6% chorych mutacjom *FLT3* towarzyszyły mutacje w genach *KRAS* i *NRAS*, które, jak wskazują opublikowane dane, mogą mieć wpływ na gorszą odpowiedź na leczenie.

4. Przeprowadzona analiza wykazała, że niemal połowa pacjentów z badanej kohorty (46%) posiadała zmiany genetyczne umożliwiające zastosowanie terapii ukierunkowanych molekularnie (biorąc pod uwagę jedynie dobór terapii na podstawie wykrytych zmian genetycznych). Najczęściej dotyczyły one genów *FLT3*, *NPM1*, *IDH1*, *IDH2* oraz rearanżacji *PML::RARA*, *RUNX1::RUNX1T1*, *CBFB::MYH11* i *KMT2A*. Należy tutaj podkreślić znaczenie mutacji genów *FLT3* i *IDH1*, ze względu na dostępne inhibitory, *NPM1*, ze względu na możliwość monitorowania MRD, a także zmiany genu *TP53*, które wiążą się z wybitnie złym rokowaniem pacjentów. Zmiany te wpływają na konkretne decyzje kliniczne. Inne zmiany, jak np. *DNMT3A*, *TET2* czy *ASXL1* stanowią raczej dodatek do diagnozy lub mogą być związane z klonalną hematopoezą o nieokreślonym potencjale i nie zawsze wpływają na decyzje terapeutyczne i rokowanie pacjentów.

Wyniki prowadzonych badań potwierdzają heterogeny charakter patogenezy AML. Pokazują również istotne znaczenie wykorzystania technologii NGS, umożliwiające szerokie profilowanie zmian molekularnych, co pozwala na szczegółową charakterystykę zmian krajobrazu genetycznego AML. Kompleksowe profilowanie molekularne AML stanowi kluczowy element nowoczesnej diagnostyki i może istotnie wpłynąć na dobór skuteczniejszego, spersonalizowanego leczenia.

9 Streszczenie

Ostra białaczka szpikowa (ang. *acute myeloid leukemia*, AML) jest przykładem nowotworu mieloidalnego o dynamicznym i agresywnym przebiegu. Choroba ta dotyczy wszystkich grup wiekowych, jednak mediana zachorowalności wynosi około 65 lat. AML jest heterogennym i agresywnym klonalnym zaburzeniem komórek progenitorowych układu krwiotwórczego. Cechuje się dużym zróżnicowaniem pod względem nieprawidłowości chromosomalnych, mutacji genowych oraz zmian w ekspresji licznych genów. W ostatniej dekadzie osiągnięto istotny postęp w zrozumieniu patogenezy AML. Co istotne, nawet do 86% przypadków AML wiąże się z obecnością co najmniej dwóch mutacji, a w trakcie rozwoju choroby oraz leczenia mogą pojawiać się kolejne zmiany genetyczne.

Wysoka heterogenność genetyczna AML wymaga zastosowania metod diagnostycznych o dużej przepustowości, które umożliwiają wykrycie wielu mutacji w jednym badaniu. Sekwencjonowanie następnej generacji (ang. *next-generation sequencing*, NGS) stanowi innowację w dziedzinie analizy genomowej. Techniki NGS pozwalają na identyfikację szerokiego spektrum zmian genetycznych: mutacji pojedynczych nukleotydów, delecji i insercji, a także fuzji genowych. Powszechne zastosowanie NGS w diagnostyce i badaniach AML stało się możliwe dzięki wprowadzeniu komercyjnych paneli, które umożliwiają jednoczesną analizę wielu genów istotnych w rozwoju nowotworów szpiku. Dzięki temu możliwe jest określenie indywidualnego profilu mutacyjnego pacjenta, co przyspiesza proces diagnostyczny i pozwala na szybsze wdrożenie terapii spersonalizowanej.

Celem niniejszej pracy była analiza profilu mutacyjnego u 109 pacjentów z rozpoznaniem ostrej białaczki szpikowej, hospitalizowanych w Świętokrzyskim Centrum Onkologii w Kielcach w latach 2020-2023.

Materiał do badań stanowiło DNA i RNA izolowane ze szpiku kostnego i/lub krwi obwodowej. Profil mutacyjny określono metodą NGS z wykorzystaniem technologii Ion Torrent. Do amplifikacji materiału genetycznego i przygotowania bibliotek zastosowano zestaw OncoPrint™ Myeloid Research Assay firmy ThermoFisher Scientific, który umożliwia analizę 40 genów oraz panelu 29 genów kierujących fuzji (łącznie 687 izoform fuzyjnych), charakterystycznych dla AML, zespołów mielodysplastycznych (ang. *myelodysplastic syndrome*, MDS) i nowotworów mieloproliferacyjnych (ang. *myeloproliferative syndrome*, MPN).

Uzyskane wyniki potwierdziły wysoką heterogenność genetyczną w badanej kohorcie pacjentów z AML hospitalizowanych w Świętokrzyskim Centrum Onkologii w Kielcach. Zmiany molekularne zidentyfikowano u 95 chorych (87,16%). Wykryto mutacje w klasycznych markerach genetycznych AML, takich jak: *FLT3* (ITD i TKD), *CEBPA*, *NPM1*, *TP53*, *RUNX1*, *ASXL1*, *IDH1*, *IDH2* oraz fuzje genowe *RUNX1::RUNX1T1*, *CBFB::MYH11* i *PML::RARA*. Do genów najczęściej wykazujących obecność mutacji należały *FLT3* (25%) oraz *NPM1* (17%), które są charakterystyczne dla AML i mają istotne znaczenie kliniczne. Ponadto wykryto mutacje w genach, które nie są rutynowo analizowane w podstawowej diagnostyce AML, m.in. *JAK2*, *CALR*, *BCOR*, *MPL*. Zmiany te występowały rzadziej i mają niejasne znaczenie rokownicze, co wskazuje na potrzebę dalszych badań. Dodatkowo analiza danych pozwoliła na wskazanie zjawisk współwystępowania i wzajemnego wykluczania się mutacji, co sugeruje istnienie specyficznych interakcji pomiędzy genami zaangażowanymi w rozwój AML oraz ich odrębnych szlaków. Przeprowadzone analizy genetyczne mogą stanowić podstawę wdrażania terapii celowanych dla pacjentów posiadających mutacje w określonych genach np. *FLT3*, *IDH1*, *IDH2*.

Uwzględnienie większej liczby genów w badaniach diagnostycznych może przyczynić się do wdrożenia bardziej skutecznych schematów terapeutycznych. Otrzymane wyniki potwierdzają zasadność stosowania metod wysokoprzepustowego sekwencjonowania następnej generacji w diagnostyce AML.

10 Abstract

Acute myeloid leukemia (AML) is an example of a myeloid malignancy characterized by a dynamic and aggressive clinical course. The disease affects all age groups, however the median age at diagnosis is approximately 65 years. AML is a heterogeneous and aggressive clonal disorder of hematopoietic progenitor cells. It is characterized by substantial diversity in chromosomal abnormalities, gene mutations, and alterations in the expression of numerous genes. Over the past decade, significant progress has been made in understanding the pathogenesis of AML. Importantly, up to 86% of AML cases are associated with the presence of at least two mutations, and additional genetic alterations may emerge during disease progression and treatment.

The high genetic heterogeneity of AML necessitates the use of high-throughput diagnostic methods that enable the detection of multiple mutations within a single assay. Next-generation sequencing (NGS) represents a major innovation in genomic analysis. NGS technologies allow for the identification of a wide spectrum of genetic alterations, including single-nucleotide variants, insertions and deletions, as well as gene fusions. The widespread application of NGS in AML diagnostics and research has been made possible by the introduction of commercial panels that enable the simultaneous analysis of multiple genes relevant to myeloid malignancies. This approach allows for the determination of an individual patient's mutational profile, thereby accelerating the diagnostic process and facilitating earlier implementation of personalized therapy.

The aim of this study was to analyze the mutational profile of 109 patients diagnosed with acute myeloid leukemia who were hospitalized at the Holy Cross Cancer Center in Kielce between 2020 and 2023.

The study material consisted of DNA and RNA isolated from bone marrow and/or peripheral blood samples. Mutational profiling was performed using NGS based on Ion Torrent technology. Genetic material amplification and library preparation were carried out using the OncoPrint™ Myeloid Research Assay (Thermo Fisher Scientific), which enables the analysis of 40 genes as well as a panel of 29 fusion driver genes (a total of 687 fusion isoforms) associated with AML, myelodysplastic syndromes (MDS), and myeloproliferative neoplasms (MPN).

The obtained results confirmed the high genetic heterogeneity of the AML patient cohort treated at the Holy Cross Cancer Center in Kielce. Molecular alterations were identified in 95 patients (87.16%). Mutations were detected in classical AML genetic

markers, including *FLT3* (ITD and TKD), *CEBPA*, *NPM1*, *TP53*, *RUNX1*, *ASXL1*, *IDH1*, and *IDH2*, as well as in gene fusions such as *RUNX1::RUNX1T1*, *CBFB::MYH11*, and *PML::RARA*. The genes most frequently harboring mutations were *FLT3* (25%) and *NPM1* (17%), which are characteristic of AML and have significant clinical relevance. Additionally, mutations were identified in genes that are not routinely analyzed in standard AML diagnostics, including *JAK2*, *CALR*, *BCOR*, and *MPL*. These alterations occurred less frequently and have unclear prognostic significance, indicating the need for further investigation. Furthermore, data analysis revealed patterns of co-occurrence and mutual exclusivity of mutations, suggesting the existence of specific interactions among genes involved in AML development and their participation in distinct molecular pathways. The conducted genetic analyses may provide a basis for the implementation of targeted therapies in patients harboring mutations in specific genes, such as *FLT3*, *IDH1*, and *IDH2*.

Incorporating a broader range of genes into diagnostic testing may contribute to the development of more effective therapeutic strategies. The obtained results support the validity of using high-throughput parallel sequencing methods in the diagnosis of acute myeloid leukemia.

11 Dorobek naukowy

Doniesienia i referaty ustne na konferencjach naukowych

1. VI Ogólnopolska Konferencja Doktorantów Nauk o Życiu - BIOOPEN, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytet Łódzki, 15-16 kwietnia 2021 r.
Analiza występowania mutacji u pacjentów z ostrą białaczką szpikową z zastosowaniem sekwencjonowania następnej generacji
2. XXIX Zjazd polskiego towarzystwa hematologów i transfuzjologów Highlights 2021, 2-3.09. 2021
Profilowanie zmian genetycznych wśród pacjentów z ostrą białaczką szpikową hospitalizowanych w Świętokrzyskim Centrum Onkologii w Kielcach z wykorzystaniem sekwencjonowania następnej generacji
3. XXIX Zjazd polskiego towarzystwa hematologów i transfuzjologów Highlights 2021, 2-3.09, 2021
Zastosowanie NGS w diagnostyce nowotworów mieloproliferacyjnych - przypadek MPN ETV6-PDGFRB (+)
4. XIII spotkanie Zespołów Laboratoriów Hematologii Molekularnej, 23-24.09.2021 Kraków
Diagnostyczny panel NGS w AML na aparacie ION Torrent - prezentacja wyników własnych
5. Świętokrzyski Festiwal Nauki - Uniwersytet Jana Kochanowskiego w Kielcach, 9-10 października 2021 r.
Prowadzenie wykładu pt. „Nowotwory pod lupą”
6. Noc Biologów - Instytut Biologii, Wydział Nauk Ścisłych i Przyrodniczych Uniwersytetu Jana Kochanowskiego w Kielcach, 14 stycznia 2022 r.
Prowadzenie zajęć laboratoryjnych w pracowni komputerowej pt. „Biologia w krzemie” - wprowadzenie do metod in silico.”
7. VII Ogólnopolska Konferencja Doktorantów Nauk O Życiu - BIOOPEN, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytet Łódzki, 7-8 kwietnia 2022 r.
Zastosowanie Sekwencjonowania Następnej Generacji w profilowaniu mutacji wśród pacjentów z ostrą białaczką szpikową
8. VI Ogólnopolska Konferencja Genetyczna GENOMICA, Wydział Biochemii, Biotechnologii i Biofizyki, Uniwersytet Jagielloński, 20-22 maja 2022 r.

Zastosowanie sekwencjonowania nowej generacji (NGS) w diagnostyce ostrej białaczki szpikowej

9. 5 Forum Doktorantów Uniwersytetu Jana Kochanowskiego w Kielcach, 2-3 czerwca 2022 r.

Acute myeloid leukemia driver mutations and how to find them?

10. 6 Forum Doktorantów Uniwersytetu Jana Kochanowskiego w Kielcach, 1-2 czerwca 2023 r.

Postępy w diagnostyce ostrej białaczki szpikowej wśród pacjentów Świętokrzyskiego Centrum Onkologii w Kielcach: zastosowanie sekwencjonowania nowej generacji (Next Generation Sequencing, NGS)

11. V Międzynarodowa Konferencja Hematologia Kliniczna i Doświadczalna, Lublin, 10-12 maja 2024 r.

Charakterystyka molekularna pacjentów z ostrą białaczką szpikową z zastosowaniem sekwencjonowania nowej generacji leczonych w Świętokrzyskim Centrum Onkologii

12. 7 Forum Doktorantów Uniwersytetu Jana Kochanowskiego w Kielcach, 6 czerwca 2024 r.

Molecular characterization of patients with acute myeloid leukemia at the Holy Cross Cancer Center using next-generation sequencing

13. Noc Biologów - Instytut Biologii, Wydział Nauk Ścisłych i Przyrodniczych Uniwersytetu Jana Kochanowskiego w Kielcach, 16 stycznia 2026 r.

Prowadzenie warsztatów pt. „Genetyczne puzzle: odkrywamy DNA i układamy kariotyp.”

Publikacje naukowe

1. Analysis of mutation occurrence in patients with acute myeloid leukemia using next-generation sequencing - publikacja pokonferencyjna, publikacja abstraktu, Vol. 17 (2021): VI PhD Students National Conference of Life Sciences BIOOPEN 2021. Post-Conference Communications and Articles, 2021, Magdalena Stawiarz, Artur Kowalik
2. Sekwencjonowanie nowej generacji - historia, przebieg procesu i rodzaje sekwencjonowania - rozdział w monografii naukowej pt. Osiągnięcia

- i perspektywy badawcze z zakresu nauk przyrodniczych. Lublin 2023, wydawnictwo naukowe Tygiel, Magdalena Stawiarz
3. Mierzalna choroba resztkowa w ostrej białaczce szpikowej - rozdział w monografii naukowej pt. Współczesne problemy medycyny i ochrony zdrowia - strategie trendy i perspektywy. Tom 2. Lublin 2023, wydawnictwo naukowe Tygiel, Magdalena Stawiarz
 4. High-Resolution RNA-Sequencing Reveals *TRIM33::CSDE1* Gene Fusion in Metastasizing Vulvar Melanoma, Melanoma Research, 2025, Magdalena Stawiarz, Mai P Hoang, Artur Kowalik
 5. Ostra białaczka szpikowa - Standardy Diagnostyki Genetycznej PTGC, Badania genetyczne w nowotworach hematologicznych dzieci i dorosłych, rozdział w pracy zbiorowej pod redakcją MZ 2025, wysłane do druku, Magdalena Stawiarz, Iwona Solarska, Artur Kowalik

Projekty naukowe

1. Otrzymanie środków w ramach - Projektu Dla Doktorantów na realizację badań naukowych lub twórczości artystycznej prowadzonej przez doktorantów Uniwersytetu Jana Kochanowskiego w Kielcach, 2021 r.
2. Otrzymanie środków w ramach - Projektu Dla Doktorantów na realizację badań naukowych lub twórczości artystycznej prowadzonej przez doktorantów Uniwersytetu Jana Kochanowskiego w Kielcach, 2024 r.
3. MAGIC-AML - Multiarm, Multicenter, RANdomized, Molecularly-Guided Controlled Trial of Personalized Treatment Strategy - of Acute Myeloid Leukemia, Uniwersytet Medyczny w Łodzi, projekt finansowany przez ABM - jako wykonawca w projekcie, wykonywanie badań metodą NGS dla pacjentów z AML w trakcie kwalifikacji i leczenia.
4. A Comprehensive Study Protocol for the Application of Next-Generation Sequencing (NGS)-Based FLT3-ITD MRD Detection in Acute Myeloid Leukemia (AML) Patients Using Targeted DNA and RNA Approaches, projekt finansowany przez grant uzyskany od firmy Astellas - jako wykonawca w projekcie, wykonywanie badań metodą NGS dla pacjentów z AML w trakcie kwalifikacji i leczenia.

5. Otrzymanie środków w ramach - Projektu Dla Doktorantów na realizację badań naukowych lub twórczości artystycznej prowadzonej przez doktorantów Uniwersytetu Jana Kochanowskiego w Kielcach, 2025 r.

Kursy, szkolenia i certyfikaty

1. Warsztaty: Profilowanie całogenomowe nowotworów z wykorzystaniem technologii WGS (Whole Genome Sequencing), Uniwersytet Adama Mickiewicza w Poznaniu i MNM Diagnostics, 2019 r.
2. Szkolenie w zakresie standaryzacji diagnostyki mutacji FLT3 w zakresie terminowego wydawania wyników badania przesiewowego FLT3-ITD i FLT3 TKD w czasie 48-72 godzin oraz oceny ilościowej allelic ratio FLT3-ITD:wt wg protokołu PALG-RATIFY w ramach projektu PALG - we współpracy SHM PTGC, 2020 r.
3. Szkolenie: Obsługa urządzenia Quant Studio 5 Real Time, Thermo Fisher Scientific, 2021 r.
4. Szkolenie: Obsługa urządzenia epMotion 5075 z oprogramowaniem epBlue w wersji 40.7, Eppendorf Poland Sp. z o.o, 2021 r.
5. Szkolenie: Podstawy analizy danych w środowisku R, StatSoft Polska, 2021 r.
6. Szkolenie: Wprowadzenie do obróbki i analizy danych NGS, ideas 4 biology, 2021 r.
7. Webinar: Polska Szkoła Hematologii, sesja jesienna, Hematoonkologia.pl, 2023 r.
8. Szkolenie: Sekwencjonowanie Nowej Generacji w diagnostyce laboratoryjnej, Medical Update, 2024 r.
9. Staż: Staż naukowy w Wojewódzkim Wielospecjalistycznym Centrum Onkologii i Traumatologii im. M. Kopernika w Łodzi, Pracowni Immunologii Klinicznej Transplantacyjnej i Genetyki, w zakresie biologii molekularnej, 02.2024 - 03.2024 r.
10. Konferencja: Wyzwania i Standardy w Hematologii, 2024 r.
11. Konferencja: Nowotwory układu krwiotwórczego w praktyce klinicznej. Teraźniejszość i przyszłość, Łódź, 2024 r.
12. Konferencja: EHA NEWS 2024: Doniesienia z 29 Kongresu Europejskiego Towarzystwa Hematologicznego, 2024 r.

13. Bioinformatyka dla biologów: analiza profilu transkryptomicznego uzyskanego metodą wysokoprzepustowego sekwencjonowania (NGS) przy użyciu GALAXY”, 2025 r.
14. Studia podyplomowe: Bioinformatyka i biostatystyka w biologii i medycynie, Uniwersytet Jana Kochanowskiego w Kielcach, 2024/2025

Załącznik 1. Deklaracja świadomej zgody na wykonanie badania genetycznego.

DEKLARACJA ŚWIADOMEJ ZGODY NA WYKONANIE BADANIA GENETYCZNEGO

DANE OSOBY BADANEJ

Imię i Nazwisko	
Data urodzenia	
PESEL	
Adres	

DANE OPIEKUNA USTAWOWEGO (TYLKO GDY DOTYCZY)

Imię i Nazwisko	
Data urodzenia	
PESEL	
Adres	

WYRAŻAM ZGODĘ NA WYKONANIE BADANIA GENETYCZNEGO NA MATERIALE:

- krew obwodowa/ szpik
- wymaz
- tkanka świeża
- blok(i) parafinowy(e) HP/ CELL BLOCK/ BACC nr.....

w celu wykonania badań molekularnych, mających na celu identyfikację zmian w DNA/RNA w związku z podejrzeniem/rozpoznaniem klinicznym choroby:

.....

Zostałem/-am poinformowany/-a o istocie podejrzanej choroby i znaczeniu wykonywanych badań molekularnych dla ustalenia rozpoznania/leczenia/ oceny predyspozycji, przebiegu choroby	TAK	NIE
W przypadku wykonywania badania z krwi - czy w ciągu ostatnich trzech miesięcy była wykonana u osoby badanej transfuzja krwi pełnej lub przeszczep szpiku	TAK	NIE
Wyrażam zgodę na przechowywanie materiału genetycznego DNA/RNA w celu wykonania ewentualnych dodatkowych badań diagnostycznych dla osoby badanej.	TAK	NIE
Wyrażam zgodę na przechowywanie i anonimowe wykorzystanie materiału genetycznego DNA/RNA do badań naukowych, mających na celu rozszerzenie wiedzy na temat molekularnego podłoża diagnozowanej choroby.	TAK	NIE
Wyrażam zgodę na przetwarzanie moich danych osobowych przez Świętokrzyskie Centrum Onkologii w Kielcach zawartych w skierowaniu i zbieranych w celu wykonania badań genetycznych oraz oświadczam, że dopełniono wobec mnie obowiązku informacyjnego zgodnie z Rozporządzeniem Parlamentu Europejskiego i Rady (UE) 2016/679 z dnia 27 kwietnia 2016 r. w sprawie ochrony osób fizycznych w związku z przetwarzaniem danych osobowych i w sprawie swobodnego przepływu takich danych oraz uchyleniem dyrektywy 95/46/WE (ogólne rozporządzenie o ochronie danych).	TAK	NIE

Upoważniam do odbioru (stopień pokrewieństwa oraz imię i nazwisko, PESEL) wyników w przypadku, gdybym sam/a nie mógł/mogła ich odebrać.

DATA I PODPIS OSOBY BADANEJ/ OPIEKUNA USTAWOWEGO.....

DATA PIECZĘĆ PODPIS LEKRZA.....

12 Spis załączników

Załącznik 1. Deklaracja świadomej zgody na wykonanie badania genetycznego..... 97

13 Spis rycin

Rycina 1. Schemat patogenezы ostrej białaczki szpikowej. Rycina na podstawie (Xiang i in., 2022).	7
Rycina 2. Hierarchia rozpoznania AML na podstawie wytycznych International Consensus Classification (Arber i in., 2022; Döhner i in., 2022).	13
Rycina 3. Schemat dwutorowego postępowania w diagnostyce molekularnej AML. ...	20
Rycina 4. Przykłady wyników badań molekularnych na obecność mutacji genów w ramach krótkiej ścieżki. Analiza fragmentów A - FLT3-ITD, B - FLT3 TKD. Wizualizacja za pomocą Integrative Genomics Viewer (IGV) C - NPM1 c.860_863dup p.(Trp288CysfsTer12), D - IDH1 c.395G>A p.(Arg132His), E - IDH2 c.419G>A p.(Arg140Gln).	21
Rycina 5. Etapy procesu sekwencjonowania nowej generacji z wykorzystaniem platform wymagających klonalnej amplifikacji matryc (Illumina, Life Technologies). Materiał DNA jest najpierw przetwarzany do postaci biblioteki sekwencyjnej poprzez fragmentację, naprawę końców oraz przyłączenie adapterów specyficznych dla danej platformy. Następnie uzyskane fragmenty biblioteki poddawane są klonalnej amplifikacji, realizowanej metodą emulsyjnego PCR w emulsji wodaolej (Life Technologies) (1) lub techniką amplifikacji mostkowej na stałej powierzchni (Illumina) (2). Technologia Life Technologies - Ion Torrent wykorzystuje PCR emulsyjny oraz sekwencjonowanie przez syntezę. Proces sekwencjonowania w komorze przepływowej generuje sygnały luminescencyjne lub fluorescencyjne, które są następnie przetwarzane algorytmicznie na odczyty sekwencji. Rycina na podstawie (Voelkerding i in., 2010).	27
Rycina 6. Schemat głównych etapów potoku bioinformatycznego analizy danych NGS.	31
Rycina 7. Schemat części doświadczalnej pracy.	36
Rycina 8. Rozdział elektroforetyczny produktów PCR dla genu BCR. M - wzorzec masy molekularnej 100-1000 pz, 1-16 próby badane (produkt o wielkości 870 pz), NTC - non-template control.	40
Rycina 9. Schemat przygotowania bibliotek.	44
Rycina 10. Sposób oceny patogenności wariantu genetycznego na przykładzie zmiany IDH1:c.395G>A (p.Arg132His) z wykorzystaniem wybranych baz danych i narzędzi bioinformatycznych. A - Franklin by QIAGEN, B - OncoKB, C - Varsome, D - ClinVar.	49

Rycina 11. Charakterystyka grupy badanej, A - struktura płci badanej grupy pacjentów, B - piramida wieku i płci badanej grupy pacjentów.	52
Rycina 12. Charakterystyka badanej grupy pacjentów z ostrą białaczką szpikową według klasyfikacji WHO.	54
Rycina 13. Charakterystyka badanej grupy pacjentów z ostrą białaczką szpikową według klasyfikacji FAB.	56
Rycina 14. Zestawienie zmian molekularnych wykrytych w analizowanej grupie pacjentów z ostrą białaczką szpikową.	58
Rycina 15. Charakterystyka molekularna analizowanych zmian. A - klasyfikacja wariantów; B - rodzaje wariantów; C - klasy substytucji; D - liczba wariantów na próbkę; E - rozkład klas wariantów; F - dziesięć geny najczęściej ulegające mutacjom.	60
Rycina 16. Wizualizacja lokalizacji mutacji w genach A - FLT3, B - NPM1, C - TP53 oraz D - CEBPA uzyskana przy użyciu narzędzia cBioPortal Mutation Mapper (www.cbioportal.org/MutationMapper).	62
Rycina 17. Częstość alleliczna wariantów (VAF) w genach najczęściej ulegających mutacjom w badanej grupie pacjentów z AML. A - wartości VAF bez uwzględnienia odsetka blastów, B - wartości VAF po korekcji o odsetek blastów w próbkach.	65
Rycina 18. Interakcje somatyczne pomiędzy najczęściej zmienionymi genami w badanej kohorcie pacjentów z AML.	68
Rycina 19. A - odsetek pacjentów potencjalnie kwalifikujących się do terapii celowanej na podstawie obecności zmian molekularnych. B - liczba pacjentów, u których stwierdzono poszczególne zmiany genetyczne umożliwiające zastosowanie leczenia ukierunkowanego (FLT3, NPM1, IDH1, IDH2, PML::RARA, RUNX1::RUNX1T1, CBFB::MYH11, KMT2A fuzja).	69
Rycina 20. Stratyfikacja ryzyka pacjentów z badanej kohorty według kryteriów European LeukemiaNet (ELN 2022).	71
Rycina 21. Porównanie częstości mutacji wybranych genów w analizowanej kohorcie pacjentów (ŚCO) z danymi pochodzącymi z dużych kohort badawczych BEAT AML oraz TCGA (Cancer Genome Atlas Research Network i in., 2013, Bottomly i in., 2022).	76

14 Spis tabel

Tabela 1. Klasyfikacja ostrej białaczki szpikowej wg ICC 2022 (Arber i in., 2022). ...	14
Tabela 2. Klasyfikacja ryzyka u chorych z nowo rozpoznaną AML według wg wytycznych ELN 2022 (Döhner i in., 2022).....	16
Tabela 3. Klasyfikacja AML wg WHO 2022 (Khoury i in., 2022).....	18
Tabela 4. Badania wykonywane w przy rozpoznaniu AML wg wytycznych ELN, 2022.	20
Tabela 5. Charakterystyka grupy badanej.....	35
Tabela 6. Skład burofu do lizy erytrocytów.	38
Tabela 7. Sekwencje starterów dla reakcji kontrolnej.	39
Tabela 8. Skład mieszaniny reakcyjnej PCR kontrolnego dla genu BCR.	39
Tabela 9. Profil temperaturowy łańcuchowej reakcji polimerazy.	40
Tabela 10. Geny (CDS) oraz hotspoty oceniane w panelu Oncomine™ Myeloid Research Assay.....	41
Tabela 11. Geny fuzyjne oceniane z wykorzystaniem panelu Oncomine™ Myeloid Research Assay.	42
Tabela 12. Skład mieszaniny reakcyjnej dla cDNA.	45
Tabela 13. Profil temperaturowy łańcuchowej reakcji polimerazy dla cDNA.....	45
Tabela 14. Skład mieszaniny reakcyjnej dla DNA.	45
Tabela 15. Profil temperaturowy łańcuchowej reakcji polimerazy dla DNA.....	45
Tabela 16. Przykładowy schemat wykonywania rozcieńczeń bibliotek do PCR emulsyjnego.	47
Tabela 17. Warianty o największym prawdopodobieństwie podłoża germinalnego.....	66

15 Bibliografia

- Akkari, Y. M. N., Baughn, L. B., Dubuc, A. M., Smith, A. C., Mallo, M., Dal Cin, P., Diez Campelo, M., Gallego, M. S., Granada Font, I., Haase, D. T., Schlegelberger, B., Slavutsky, I., Mecucci, C., Levine, R. L., Hasserjian, R. P., Solé, F., Levy, B., & Xu, X. (2022). Guiding the global evolution of cytogenetic testing for hematologic malignancies. *Blood*, 139(15), 2273–2284. <https://doi.org/10.1182/blood.2021014309>
- Alawieh D, Cysique-Foinlan L, Willekens C, Renneville A. (2024). RAS mutations in myeloid malignancies: revisiting old questions with novel insights and therapeutic perspectives. *Blood Cancer Journal*. 14(1):72. doi: 10.1038/s41408-024-01054-2.
- Antar, A. I., Otrrock, Z. K., Jabbour, E., Mohty, M., & Bazarbachi, A. (2020). FLT3 inhibitors in acute myeloid leukemia: Ten frequently asked questions. *Leukemia*, 34(3), 682–696. <https://doi.org/10.1038/s41375-019-0694-3>
- Appelbaum, F. R., Gundacker, H., Head, D. R., Slovak, M. L., Willman, C. L., Godwin, J. E., Anderson, J. E., & Petersdorf, S. H. (2006). Age and acute myeloid leukemia. *Blood*, 107(9), 3481–3485. <https://doi.org/10.1182/blood-2005-09-3724>
- Arber, D. A., Orazi, A., Hasserjian, R. P., Borowitz, M. J., Calvo, K. R., Kvasnicka, H.-M., Wang, S. A., Baggi, A., Barbui, T., Branford, S., Bueso-Ramos, C. E., Cortes, J. E., Dal Cin, P., DiNardo, C. D., Dombret, H., Duncavage, E. J., Ebert, B. L., Estey, E. H., Facchetti, F., ... Tefferi, A. (2022). International Consensus Classification of Myeloid Neoplasms and Acute Leukemias: Integrating morphologic, clinical, and genomic data. *Blood*, 140(11), 1200–1228. <https://doi.org/10.1182/blood.2022015850>
- Arellano, M. L., Thirman, M. J., DiPersio, J. F., Heiblig, M., Stein, E. M., Schuh, A. C., Žučenka, A., de Botton, S., Grove, C. S., Mannis, G. N., Papayannidis, C., Perl, A. E., Issa, G. C., Aldoss, I., Bajel, A., Dickens, D. S., Kühn, M. W. M., Mantzaris, I., Raffoux, E., ... Blachly, J. S. (2025). Menin inhibition with revumenib for NPM1-mutated relapsed or refractory acute myeloid leukemia: The AUGMENT-101 study. *Blood*, 146(9), 1065–1077. <https://doi.org/10.1182/blood.2025028357>
- Barbosa, K., Li, S., Adams, P. D., & Deshpande, A. J. (2019). The role of TP53 in acute myeloid leukemia: Challenges and opportunities. *Genes, chromosomes & cancer*, 58(12), 875–888. <https://doi.org/10.1002/gcc.22796>
- Bottomly D, Long N, Schultz AR, Kurtz SE, Tognon CE, Johnson K, Abel M, Agarwal A, Avaylon S, Benton E, Blucher A, Borate U, Braun TP, Brown J, Bryant J, Burke R, Carlos A, Chang BH, Cho HJ, Christy S, Coblentz C, Cohen AM, d'Almeida A, Cook R, Danilov A, Dao KT, Degnin M, Dibb J, Eide CA, English I, Hagler S, Harrelson H, Henson R, Ho H, Joshi SK, Junio B, Kaempf A, Kosaka Y, Laderas T, Lawhead M, Lee H, Leonard JT, Lin C, Lind EF, Liu SQ, Lo P, Loriaux MM, Luty S, Maxson JE, Macey T, Martinez J, Minnier J, Montebianco A, Mori M, Morrow Q, Nelson D, Ramsdill J, Rofelty A, Rogers A, Romine KA, Ryabinin P, Saultz JN, Sampson DA, Savage SL, Schuff R, Searles R, Smith RL, Spurgeon SE, Sweeney T, Swords RT, Thapa A, Thiel-Klare K, Traer E, Wagner J, Wilmot B, Wolf J, Wu G, Yates A, Zhang H, Cogle CR, Collins RH, Deininger MW, Hourigan CS, Jordan CT, Lin TL, Martinez ME, Pallapati RR, Pollyea DA, Pomictier AD, Watts JM, Weir SJ, Druker BJ, McWeeney SK, Tyner

- JW. (2022). Integrative analysis of drug response and clinical outcome in acute myeloid leukemia. *Cancer Cell*. 40(8):850-864.e9. doi: 10.1016/j.ccell.2022.07.002.
- Bergeron, J., Capo-Chichi, J.-M., Tsui, H., Mahe, E., Berardi, P., Minden, M. D., Brandwein, J. M., & Schuh, A. C. (2023). The Clinical Utility of FLT3 Mutation Testing in Acute Leukemia: A Canadian Consensus. *Current Oncology*, 30(12), 10410–10436. <https://doi.org/10.3390/curroncol30120759>
- Bhat, Gh. R., Sethi, I., Rah, B., Kumar, R., & Afroze, D. (2022). Innovative in Silico Approaches for Characterization of Genes and Proteins. *Frontiers in Genetics*, 13, 865182. <https://doi.org/10.3389/fgene.2022.865182>
- Bibault, J.-E., Figeac, M., Hélevaut, N., Rodriguez, C., Quief, S., Sebda, S., Renneville, A., Nibourel, O., Rousselot, P., Gruson, B., Dombret, H., Castaigne, S., & Preudhomme, C. (2015). Next-generation sequencing of FLT3 internal tandem duplications for minimal residual disease monitoring in acute myeloid leukemia. *Oncotarget*, 6(26), 22812–22821. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.4333>
- Boone, M., De Koker, A., & Callewaert, N. (2018). Capturing the „ome”: The expanding molecular toolbox for RNA and DNA library construction. *Nucleic Acids Research*, 46(6), 2701–2721. <https://doi.org/10.1093/nar/gky167>
- Borthakur, G., & Kantarjian, H. (2021). Core binding factor acute myelogenous leukemia-2021 treatment algorithm. *Blood Cancer Journal*, 11(6), 114. <https://doi.org/10.1038/s41408-021-00503-6>
- Bougeard, G., Renaux-Petel, M., Flaman, J.-M., Charbonnier, C., Fermey, P., Belotti, M., Gauthier-Villars, M., Stoppa-Lyonnet, D., Consolino, E., Brugières, L., Caron, O., Benusiglio, P. R., Bressac-de Paillerets, B., Bonadona, V., Bonaïti-Pellié, C., Tinat, J., Baert-Desurmont, S., & Frebourg, T. (2015). Revisiting Li-Fraumeni Syndrome From TP53 Mutation Carriers. *Journal of Clinical Oncology*, 33(21), 2345–2352. <https://doi.org/10.1200/JCO.2014.59.5728>
- Bourne, G., Diebold, K., Espinoza-Gutarra, M., Al-Kadhimi, Z., Bachiashvili, K., Rangaraju, S., Vachhani, P., Bhatia, R., & Jamy, O. (2024). Addition of single dose gemtuzumab ozogamicin to intensive induction chemotherapy in core-binding factor acute myeloid leukemia. *Leukemia Research*, 139, 107467. <https://doi.org/10.1016/j.leukres.2024.107467>
- Brown, F. C., Wang, X., Birkinshaw, R., Chua, C. C., Morley, T., Kasapgil, S., Pomilio, G., Blombery, P., Huang, D. C. S., Czabotar, P., Priore, S. F., Yang, G., Carroll, M., Wei, A. H., & Perl, A. E. (2024). Acquired BCL2 variants associated with venetoclax resistance in acute myeloid leukemia. *Blood Advances*, 9(1), 127–131. <https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2024014446>
- Brunet, S., Labopin, M., Esteve, J., Cornelissen, J., Socié, G., Iori, A. P., Verdonck, L. F., Volin, L., Gratwohl, A., Sierra, J., Mohty, M., & Rocha, V. (2012). Impact of FLT3 internal tandem duplication on the outcome of related and unrelated hematopoietic transplantation for adult acute myeloid leukemia in first remission: A retrospective analysis. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of*

Clinical Oncology, 30(7), 735–741. <https://doi.org/10.1200/JCO.2011.36.9868>

Budziszewska, B. K., Więckowska, B., Lech-Marańda, E., Mikołajczyk, T., Dagieli, J., & Jędrzejczak, W. W. (2017). Incidence and disease prevalence for hematologic neoplasms in Poland (2009–2015) as determined on the analysis of the National Health Fund data used in the project ‘Maps of healthcare needs—Database of systemic and implementation analyses’. *Hematology in Clinical Practice*, 8(2), Article 2. <https://doi.org/10.5603/Hem.2017.0013>

Bundrant, B., Gerstein, Y., Arun, B., & DiNardo, C. D. (2024). Hematologic malignancies in Li-Fraumeni syndrome: A case report. *American Journal of Medical Genetics. Part A*, 194(7), e63573. <https://doi.org/10.1002/ajmg.a.63573>

Cabello-Aguilar, S., Vendrell, J. A., & Solassol, J. (2023). A Bioinformatics Toolkit for Next-Generation Sequencing in Clinical Oncology. *Current Issues in Molecular Biology*, 45(12), 9737–9752. <https://doi.org/10.3390/cimb45120608>

Cancer Genome Atlas Research Network, Ley, T. J., Miller, C., Ding, L., Raphael, B. J., Mungall, A. J., Robertson, A. G., Hoadley, K., Triche, T. J., Laird, P. W., Baty, J. D., Fulton, L. L., Fulton, R., Heath, S. E., Kalicki-Veizer, J., Kandoth, C., Klco, J. M., Koboldt, D. C., Kanchi, K.-L., ... Eley, G. (2013). Genomic and epigenomic landscapes of adult de novo acute myeloid leukemia. *The New England Journal of Medicine*, 368(22), 2059–2074. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1301689>

Capelli, D., Menotti, D., Fiorentini, A., Saraceni, F., & Olivieri, A. (2022). Secondary Acute Myeloid Leukemia: Pathogenesis and Treatment. W W. Li (Red.), *Leukemia*. Exon Publications. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK586211/>

Cerami, E., Gao, J., Dogrusoz, U., Gross, B. E., Sumer, S. O., Aksoy, B. A., Jacobsen, A., Byrne, C. J., Heuer, M. L., Larsson, E., Antipin, Y., Reva, B., Goldberg, A. P., Sander, C., & Schultz, N. (2012). The cBio cancer genomics portal: An open platform for exploring multidimensional cancer genomics data. *Cancer Discovery*, 2(5), 401–404. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-12-0095>

Chakravarty, D., Gao, J., Phillips, S. M., Kundra, R., Zhang, H., Wang, J., Rudolph, J. E., Yaeger, R., Soumerai, T., Nissan, M. H., Chang, M. T., Chandralapaty, S., Traina, T. A., Paik, P. K., Ho, A. L., Hantash, F. M., Grupe, A., Baxi, S. S., Callahan, M. K., ... Schultz, N. (2017). OncoKB: A Precision Oncology Knowledge Base. *JCO Precision Oncology*, 2017, PO.17.00011. <https://doi.org/10.1200/PO.17.00011>

Chamarthi V.S., Kasi A. (2025). Li-Fraumeni Syndrome. W *StatPearls*. StatPearls Publishing. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK532286/>

Chaudhary, S., Chaudhary, P., Ahmad, F., & Arora, N. (2024). Acute Myeloid Leukemia and Next-Generation Sequencing Panels for Diagnosis: A Comprehensive Review. *Journal of Pediatric Hematology/Oncology*, 46(3), 125–137. <https://doi.org/10.1097/MPH.0000000000002840>

Chen, G., Qiu, Y., Zhuang, Q., Wang, S., Wang, T., Chen, J., & Wang, K. (2018). Next-generation sequencing library preparation method for identification of RNA viruses on the Ion Torrent Sequencing Platform. *Virus Genes*, 54(4), 536–542.

<https://doi.org/10.1007/s11262-018-1568-x>

Chin, L., Wong, C. Y. G., & Gill, H. (2023). Targeting and Monitoring Acute Myeloid Leukaemia with Nucleophosmin-1 (NPM1) Mutation. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(4), 3161. <https://doi.org/10.3390/ijms24043161>

Choe, J. H., Kawase, T., Xu, A., Guzman, A., Obradovic, A. Z., Low-Calle, A. M., Alaghebandan, B., Raghavan, A., Long, K., Hwang, P. M., Schiffman, J. D., Zhu, Y., Zhao, R., Lee, D.-F., Katz, C., & Prives, C. (2023). Li-Fraumeni Syndrome-Associated Dimer-Forming Mutant p53 Promotes Transactivation-Independent Mitochondrial Cell Death. *Cancer Discovery*, 13(5), 1250–1273. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-22-0882>

Cingolani, P. (2022). Variant Annotation and Functional Prediction: SnpEff. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 2493, 289–314. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-2293-3_19

Cloos J, Valk PJM, Thiede C, Döhner K, Roboz GJ, Wood BL, Walter RB, Wang S, Wierzbowska A, Wei AH, Wu D, Vergez F, Venditti A, van der Reijden BA, van de Loosdrecht AA, Tiong IS, Thol FR, Subklewe M, Roumier C, Reuvekamp T, Ravandi F, Preudhomme C, Plesa A, Othman J, Ossenkoppele GJ, Ofran Y, Mimoun A, Maurillo L, Majchrzak A, de Leeuw D, Kern W, Kim DDH, Ikoma-Colturato MRV, Haaksma LH, Guzman ML, Feuring M, Depreter B, Czyz A, Bücklein V, Baer C, Bachas C, Freeman SD, Buccisano F, Hourigan CS, Dillon R, Heuser M. (2026). 2025 update on MRD in acute myeloid leukemia: a consensus document from the ELN-DAVID MRD Working Party. *Blood*. 2026 Mar 12;147(11):1147-1167. doi: 10.1182/blood.2025031480. PMID: 41397238.

Cocciardi, S., Dolnik, A., Kapp-Schwoerer, S., Rücker, F. G., Lux, S., Blätte, T. J., Skambraks, S., Krönke, J., Heidel, F. H., Schnöder, T. M., Corbacioglu, A., Gaidzik, V. I., Paschka, P., Tleanu, V., Göhring, G., Thol, F., Heuser, M., Ganser, A., Weber, D., ... Döhner, K. (2019). Clonal evolution patterns in acute myeloid leukemia with NPM1 mutation. *Nature Communications*, 10(1), 2031. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-09745-2>

Corces-Zimmerman, M. R., Hong, W.-J., Weissman, I. L., Medeiros, B. C., & Majeti, R. (2014). Preleukemic mutations in human acute myeloid leukemia affect epigenetic regulators and persist in remission. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(7), 2548–2553. <https://doi.org/10.1073/pnas.1324297111>

Dang, L., White, D. W., Gross, S., Bennett, B. D., Bittinger, M. A., Driggers, E. M., Fantin, V. R., Jang, H. G., Jin, S., Keenan, M. C., Marks, K. M., Prins, R. M., Ward, P. S., Yen, K. E., Liao, L. M., Rabinowitz, J. D., Cantley, L. C., Thompson, C. B., Vander Heiden, M. G., & Su, S. M. (2009). Cancer-associated IDH1 mutations produce 2-hydroxyglutarate. *Nature*, 462(7274), 739–744. <https://doi.org/10.1038/nature08617>

Darwish, C., Farina, K., & Tremblay, D. (2023). The core concepts of core binding factor acute myeloid leukemia: Current considerations for prognosis and treatment. *Blood Reviews, Post Transplant Cyclophosphamide for GvHD prophylaxis*, 62, 101117.

<https://doi.org/10.1016/j.blre.2023.101117>

Dash, D. P., & Dinauer, D. (2021). FDA Cleared Companion Diagnostics (CDx) Tests (*IDH1*, *IDH2* and *FLT3*) for Acute Myeloid Leukemia (AML) Patient Care. *Blood*, *138*, 4442. <https://doi.org/10.1182/blood-2021-146931>

Daver, N. G., Maiti, A., Kadia, T. M., Vyas, P., Majeti, R., Wei, A. H., Garcia-Manero, G., Craddock, C., Sallman, D. A., & Kantarjian, H. M. (2022). TP53-Mutated Myelodysplastic Syndrome and Acute Myeloid Leukemia: Biology, Current Therapy, and Future Directions. *Cancer Discovery*, *12*(11), 2516–2529. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-22-0332>

Daver, N., Schlenk, R. F., Russell, N. H., & Levis, M. J. (2019). Targeting FLT3 mutations in AML: Review of current knowledge and evidence. *Leukemia*, *33*(2), 299–312. <https://doi.org/10.1038/s41375-018-0357-9>

De Angelis, R., Minicozzi, P., Sant, M., Dal Maso, L., Brewster, D. H., Osca-Gelis, G., Visser, O., Maynadié, M., Marcos-Gragera, R., Troussard, X., Agius, D., Roazzi, P., Meneghini, E., Monnereau, A., Hackl, M., Zielonke, N., Oberaigner, W., Van Eycken, E., Henau, K., ... Otter, R. (2015). Survival variations by country and age for lymphoid and myeloid malignancies in Europe 2000–2007: Results of EURO CARE-5 population-based study. *European Journal of Cancer, Survival of Cancer Patients in Europe, 1999–2007: The EURO CARE-5 Study*, *51*(15), 2254–2268. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2015.08.003>

de Bruijn, I., Kundra, R., Mastrogiacomio, B., Tran, T. N., Sikina, L., Mazor, T., Li, X., Ochoa, A., Zhao, G., Lai, B., Abeshouse, A., Baiceanu, D., Ciftci, E., Dogrusoz, U., Dufilie, A., Erkoc, Z., Garcia Lara, E., Fu, Z., Gross, B., ... Schultz, N. (2023). Analysis and Visualization of Longitudinal Genomic and Clinical Data from the AACR Project GENIE Biopharma Collaborative in cBioPortal. *Cancer Research*, *83*(23), 3861–3867. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-23-0816>

Desai, R. H., Zandvakili, N., & Bohlander, S. K. (2022). Dissecting the Genetic and Non-Genetic Heterogeneity of Acute Myeloid Leukemia Using Next-Generation Sequencing and In Vivo Models. *Cancers*, *14*(9), 2182. <https://doi.org/10.3390/cancers14092182>

Deschler, B., & Lübbert, M. (2006). Acute myeloid leukemia: Epidemiology and etiology. *Cancer*, *107*(9), 2099–2107. <https://doi.org/10.1002/cncr.22233>

DiNardo, C. D., & Cortes, J. E. (2016). Mutations in AML: Prognostic and therapeutic implications. *Hematology. American Society of Hematology. Education Program*, *2016*(1), 348–355. <https://doi.org/10.1182/asheducation-2016.1.348>

DiNardo, C. D., Jonas, B. A., Pullarkat, V., Thirman, M. J., Garcia, J. S., Wei, A. H., Konopleva, M., Döhner, H., Letai, A., Fenaux, P., Koller, E., Havelange, V., Leber, B., Esteve, J., Wang, J., Pejsa, V., Hájek, R., Porkka, K., Illés, Á., ... Pratz, K. W. (2020). Azacitidine and Venetoclax in Previously Untreated Acute Myeloid Leukemia. *New England Journal of Medicine*. (world). <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2012971>

DiNardo, C. D., Stein, E. M., de Botton, S., Roboz, G. J., Altman, J. K., Mims, A. S., Swords, R., Collins, R. H., Mannis, G. N., Pollyea, D. A., Donnellan, W., Fathi, A. T.,

- Pigneux, A., Erba, H. P., Prince, G. T., Stein, A. S., Uy, G. L., Foran, J. M., Traer, E., ... Kantarjian, H. M. (2018). Durable Remissions with Ivosidenib in IDH1-Mutated Relapsed or Refractory AML. *The New England Journal of Medicine*, 378(25), 2386–2398. <https://doi.org/10.1056/NEJMoal716984>
- DiNardo, C. D., Tiong, I. S., Quaglieri, A., MacRaild, S., Loghavi, S., Brown, F. C., Thijssen, R., Pomilio, G., Ivey, A., Salmon, J. M., Glytsou, C., Fleming, S. A., Zhang, Q., Ma, H., Patel, K. P., Kornblau, S. M., Xu, Z., Chua, C. C., Chen, X., ... Wei, A. H. (2020). Molecular patterns of response and treatment failure after frontline venetoclax combinations in older patients with AML. *Blood*, 135(11), 791–803. <https://doi.org/10.1182/blood.2019003988>
- Ding, L., Ley, T. J., Larson, D. E., Miller, C. A., Koboldt, D. C., Welch, J. S., Ritchey, J. K., Young, M. A., Lamprecht, T., McLellan, M. D., McMichael, J. F., Wallis, J. W., Lu, C., Shen, D., Harris, C. C., Dooling, D. J., Fulton, R. S., Fulton, L. L., Chen, K., ... DiPersio, J. F. (2012). Clonal evolution in relapsed acute myeloid leukemia revealed by whole genome sequencing. *Nature*, 481(7382), 506–510. <https://doi.org/10.1038/nature10738>
- Döhner, H., Estey, E., Grimwade, D., Amadori, S., Appelbaum, F. R., Büchner, T., Dombret, H., Ebert, B. L., Fenaux, P., Larson, R. A., Levine, R. L., Lo-Coco, F., Naoe, T., Niederwieser, D., Ossenkoppele, G. J., Sanz, M., Sierra, J., Tallman, M. S., Tien, H.-F., ... Bloomfield, C. D. (2017). Diagnosis and management of AML in adults: 2017 ELN recommendations from an international expert panel. *Blood*, 129(4), 424–447. <https://doi.org/10.1182/blood-2016-08-733196>
- Döhner, H., Wei, A. H., Appelbaum, F. R., Craddock, C., DiNardo, C. D., Dombret, H., Ebert, B. L., Fenaux, P., Godley, L. A., Hasserjian, R. P., Larson, R. A., Levine, R. L., Miyazaki, Y., Niederwieser, D., Ossenkoppele, G., Röllig, C., Sierra, J., Stein, E. M., Tallman, M. S., ... Löwenberg, B. (2022). Diagnosis and management of AML in adults: 2022 recommendations from an international expert panel on behalf of the ELN. *Blood*, 140(12), 1345–1377. <https://doi.org/10.1182/blood.2022016867>
- Döhner, H., Weisdorf, D. J., & Bloomfield, C. D. (2015). Acute Myeloid Leukemia. *The New England Journal of Medicine*, 373(12), 1136–1152. <https://doi.org/10.1056/NEJMr1406184>
- Drmanac, R., Drmanac, S., Chui, G., Diaz, R., Hou, A., Jin, H., Jin, P., Kwon, S., Lacy, S., Moeur, B., Shafto, J., Swanson, D., Ukrainczyk, T., Xu, C., & Little, D. (2002). Sequencing by hybridization (SBH): Advantages, achievements, and opportunities. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 77, 75–101. https://doi.org/10.1007/3-540-45713-5_5
- Dunbar, A. J., Rampal, R. K., & Levine, R. (2020). Leukemia secondary to myeloproliferative neoplasms. *Blood*, 136(1), 61–70. <https://doi.org/10.1182/blood.2019000943>
- Duncavage, E. J., Bagg, A., Hasserjian, R. P., DiNardo, C. D., Godley, L. A., Iacobucci, I., Jaiswal, S., Malcovati, L., Vannucchi, A. M., Patel, K. P., Arber, D. A., Arcila, M. E., Bejar, R., Berliner, N., Borowitz, M. J., Branford, S., Brown, A. L., Cargo, C. A., Döhner,

- H., ... Cazzola, M. (2022). Genomic profiling for clinical decision making in myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood*, 140(21), 2228–2247. <https://doi.org/10.1182/blood.2022015853>
- Dyer, S. C., Austine-Orimoloye, O., Azov, A. G., Barba, M., Barnes, I., Barrera-Enriquez, V. P., Becker, A., Bennett, R., Beracochea, M., Berry, A., Bhai, J., Bhurji, S. K., Boddu, S., Branco Lins, P. R., Brooks, L., Ramaraju, S. B., Campbell, L. I., Martinez, M. C., Charkhchi, M., ... Yates, A. D. (2025). Ensembl 2025. *Nucleic Acids Research*, 53(D1), D948–D957. <https://doi.org/10.1093/nar/gkae1071>
- Eguchi M, Minami Y, Kuzume A, Chi S. (2020). Mechanisms Underlying Resistance to FLT3 Inhibitors in Acute Myeloid Leukemia. *Biomedicines*. 8(8):245. doi: 10.3390/biomedicines8080245.
- El-Refaei, M., & Al Qahtani, F. (2016). Adult Acute Myeloid Leukemia – A Possible Relation to Disease Invasion and the Impact of Independent Prognostic Markers Associated with Survival Outcome. W D. Bulgin (Red.), *New Aspects in Molecular and Cellular Mechanisms of Human Carcinogenesis*. InTech. <https://doi.org/10.5772/61179>
- Fedorov, K., Maiti, A., & Konopleva, M. (2023). Targeting FLT3 Mutation in Acute Myeloid Leukemia: Current Strategies and Future Directions. *Cancers*, 15(8), 2312. <https://doi.org/10.3390/cancers15082312>
- Figueroa, M. E., Abdel-Wahab, O., Lu, C., Ward, P. S., Patel, J., Shih, A., Li, Y., Bhagwat, N., Vasanthakumar, A., Fernandez, H. F., Tallman, M. S., Sun, Z., Wolniak, K., Peeters, J. K., Liu, W., Choe, S. E., Fantin, V. R., Paietta, E., Löwenberg, B., ... Melnick, A. (2010). Leukemic IDH1 and IDH2 mutations result in a hypermethylation phenotype, disrupt TET2 function, and impair hematopoietic differentiation. *Cancer Cell*, 18(6), 553–567. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2010.11.015>
- Gao, J., Aksoy, B. A., Dogrusoz, U., Dresdner, G., Gross, B., Sumer, S. O., Sun, Y., Jacobsen, A., Sinha, R., Larsson, E., Cerami, E., Sander, C., & Schultz, N. (2013). Integrative analysis of complex cancer genomics and clinical profiles using the cBioPortal. *Science Signaling*, 6(269), p11. <https://doi.org/10.1126/scisignal.2004088>
- Gong, S., Guo, M., Tang, G., Yang, J., & Qiu, H. (2018). Overexpression of TEL-MN1 Fusion Enhances Resistance of HL-60 Cells to Idarubicin. *Chemotherapy*, 63(6), 308–314. <https://doi.org/10.1159/000495073>
- Grosicki, S. (2014). Zależna od terapii ostra białaczka szpikowa—Czynniki ryzyka i leczenie. *Hematologia* 2014, 5 (2), 136–144.
- Guijarro, F., Garrote, M., Villamor, N., Colomer, D., Esteve, J., & López-Guerra, M. (2023). Novel Tools for Diagnosis and Monitoring of AML. *Current Oncology*, 30(6), 5201. <https://doi.org/10.3390/curroncol30060395>
- Guo, Y., Wang, W., & Sun, H. (2022). A systematic review and meta-analysis on the risk factors of acute myeloid leukemia. *Translational Cancer Research*, 11(4), 796–804. <https://doi.org/10.21037/tcr-22-27>
- Haferlach, T. (2020). Advancing Leukemia Diagnostics: Role of Next Generation Sequencing (NGS) in Acute Myeloid Leukemia. *Hematology Reports*, 12(s1), Article s1.

<https://doi.org/10.4081/hr.2020.8957>

Hasham, S., Taj, A. S., Masood, T., & Haq, Dr. M. I. U. (2022). Frequency of Fab Subtype and Linicohaematological Manifestation in Elderly Acute Myeloid Leukemia Patients in Tertiary Care Hospitals Peshawar. *Scholars Journal of Applied Medical Sciences*, 10(9), 1425–1430. <https://doi.org/10.36347/sjams.2022.v10i09.002>

Haynes, B. C., Blidner, R. A., Cardwell, R. D., Zeigler, R., Gokul, S., Thibert, J. R., Chen, L., Fujimoto, J., Papadimitrakopoulou, V. A., Wistuba, I. I., & Latham, G. J. (2019). An Integrated Next-Generation Sequencing System for Analyzing DNA Mutations, Gene Fusions, and RNA Expression in Lung Cancer. *Translational Oncology*, 12(6), 836–845. <https://doi.org/10.1016/j.tranon.2019.02.012>

Head, S. R., Komori, H. K., LaMere, S. A., Whisenant, T., Van Nieuwerburgh, F., Salomon, D. R., & Ordoukhanian, P. (2014). Library construction for next-generation sequencing: Overviews and challenges. *BioTechniques*, 56(2), 61–64, 66, 68, passim. <https://doi.org/10.2144/000114133>

Hess, J. F., Kohl, T. A., Kotrová, M., Rönsch, K., Paprotka, T., Mohr, V., Hutzenlaub, T., Brüggemann, M., Zengerle, R., Niemann, S., & Paust, N. (2020). Library preparation for next generation sequencing: A review of automation strategies. *Biotechnology Advances*, 41, 107537. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2020.107537>

Heuser, M., Freeman, S. D., Ossenkoppele, G. J., Buccisano, F., Hourigan, C. S., Ngai, L. L., Tetters, J. M., Bachas, C., Baer, C., Béné, M.-C., Bücklein, V., Czyz, A., Denys, B., Dillon, R., Feuring-Buske, M., Guzman, M. L., Haferlach, T., Han, L., Herzig, J. K., ... Cloos, J. (2021). 2021 Update on MRD in acute myeloid leukemia: A consensus document from the European LeukemiaNet MRD Working Party. *Blood*, 138(26), 2753–2767. <https://doi.org/10.1182/blood.2021013626>

Hindley, A., Catherwood, M. A., McMullin, M. F., & Mills, K. I. (2021). Significance of NPM1 Gene Mutations in AML. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(18), 10040. <https://doi.org/10.3390/ijms221810040>

Hirsch, P., Zhang, Y., Tang, R., Joulin, V., Boutroux, H., Pronier, E., Moatti, H., Flandrin, P., Marzac, C., Bories, D., Fava, F., Mokrani, H., Betems, A., Lorre, F., Favier, R., Féger, F., Mohty, M., Douay, L., Legrand, O., ... Delhommeau, F. (2016). Genetic hierarchy and temporal variegation in the clonal history of acute myeloid leukaemia. *Nature Communications*, 7, 12475. <https://doi.org/10.1038/ncomms12475>

Hoff, F. W., Blum, W. G., Huang, Y., Welkie, R. L., Swords, R. T., Traer, E., Stein, E. M., Lin, T. L., Archer, K. J., Patel, P. A., Collins, R. H., Baer, M. R., Duong, V. H., Arellano, M. L., Stock, W., Odenike, O., Redner, R. L., Kovacsosics, T., Deininger, M. W., ... Madanat, Y. F. (2024). Beat-AML 2024 ELN–refined risk stratification for older adults with newly diagnosed AML given lower-intensity therapy. *Blood Advances*, 8(20), 5297–5305. <https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2024013685>

Hou, H.-A., & Tien, H.-F. (2020). Genomic landscape in acute myeloid leukemia and its implications in risk classification and targeted therapies. *Journal of Biomedical Science*, 27(1), 81. <https://doi.org/10.1186/s12929-020-00674-7>

- Huber, S., Baer, C., Hutter, S., Dicker, F., Meggendorfer, M., Pohlkamp, C., Kern, W., Haferlach, T., Haferlach, C., & Hoermann, G. (2023). AML classification in the year 2023: How to avoid a Babylonian confusion of languages. *Leukemia*, 37(7), 1413–1420. <https://doi.org/10.1038/s41375-023-01909-w>
- Issa, G. C., Aldoss, I., DiPersio, J., Cuglievan, B., Stone, R., Arellano, M., Thirman, M. J., Patel, M. R., Dickens, D. S., Shenoy, S., Shukla, N., Kantarjian, H., Armstrong, S. A., Perner, F., Perry, J. A., Rosen, G., Bagley, R. G., Meyers, M. L., Ordentlich, P., ... Stein, E. M. (2023). The menin inhibitor revumenib in KMT2A-rearranged or NPM1-mutant leukaemia. *Nature*, 615(7954), 920–924. <https://doi.org/10.1038/s41586-023-05812-3>
- Issa, G. C., & DiNardo, C. D. (2021). Acute myeloid leukemia with IDH1 and IDH2 mutations: 2021 treatment algorithm. *Blood Cancer Journal*, 11(6), 107. <https://doi.org/10.1038/s41408-021-00497-1>
- Jabbour, E., Ghanem, H., Huang, X., Ravandi, F., Garcia-Manero, G., O'Brien, S., Faderl, S., Pierce, S., Choi, S., Verstovsek, S., Brandt, M., Cortes, J., & Kantarjian, H. (2014). Acute Myeloid Leukemia Following Myelodysplastic Syndrome and Failure of Therapy with Hypomethylating Agents: An Emerging Entity With a Poor Prognosis. *Clinical lymphoma, myeloma & leukemia*, 14(2), 93–97. <https://doi.org/10.1016/j.clml.2013.10.013>
- Jaganathan, K., Panagiotopoulou, S. K., McRae, J. F., Darbandi, S. F., Knowles, D., Li, Y. I., Kosmicki, J. A., Arbelaez, J., Cui, W., Schwartz, G. B., Chow, E. D., Kanterakis, E., Gao, H., Kia, A., Batzoglou, S., Sanders, S. J., & Farh, K. K.-H. (2019). Predicting Splicing from Primary Sequence with Deep Learning. *Cell*, 176(3), 535-548.e24. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.12.015>
- Jentzsch, M., Bischof, L., Ussmann, J., Backhaus, D., Brauer, D., Metzeler, K. H., Merz, M., Vucinic, V., Franke, G.-N., Herling, M., Platzbecker, U., & Schwind, S. (2022). Prognostic impact of the AML ELN2022 risk classification in patients undergoing allogeneic stem cell transplantation. *Blood Cancer Journal*, 12(12), 170. <https://doi.org/10.1038/s41408-022-00764-9>
- Jentzsch, M., Grimm, J., Bill, M., Brauer, D., Backhaus, D., Goldmann, K., Schulz, J., Niederwieser, D., Platzbecker, U., & Schwind, S. (2021). ELN risk stratification and outcomes in secondary and therapy-related AML patients consolidated with allogeneic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplantation*, 56(4), 936–945. <https://doi.org/10.1038/s41409-020-01129-1>
- Jiménez-Vicente, C., Beneit, P., Cano-Ferri, I., Merchán, B., Arnan, M., Guiñón, A. G., Martínez-Bilbao, C., Alfonso, A., Martínez-Sánchez, P., Alonso-Domínguez, J. M., López-Godino, O., Castaño-Díez, S., Zugasti, I., Esteve, J., Díaz-Beyá, M., & de la Fuente, A. (2025). Enasidenib as treatment for AML with IDH2 mutation: Multicenter real-life study of the early-access program in Spain. *Annals of Hematology*. <https://doi.org/10.1007/s00277-025-06464-1>
- Jongen-Lavrencic, M., Grob, T., Hanekamp, D., Kavelaars, F. G., Hinai, A. al, Zeilemaker, A., Erpelinck-Verschueren, C. A. J., Gradowska, P. L., Meijer, R., Cloos, J., Biemond, B. J., Graux, C., Kooy, M. van M., Manz, M. G., Pabst, T., Passweg, J. R.,

- Havelange, V., Ossenkoppele, G. J., Sanders, M. A., ... Valk, P. J. M. (2018). Molecular Minimal Residual Disease in Acute Myeloid Leukemia. *New England Journal of Medicine*, 378(13), 1189–1199. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1716863>
- Joshi, S. K., Davare, M. A., Druker, B. J., & Tognon, C. E. (2019). Revisiting NTRKs as an emerging oncogene in hematological malignancies. *Leukemia*, 33(11), 2563–2574. <https://doi.org/10.1038/s41375-019-0576-8>
- Kayser, S., & Levis, M. J. (2023). The clinical impact of the molecular landscape of acute myeloid leukemia. *Haematologica*, 108(2), 308–320. <https://doi.org/10.3324/haematol.2022.280801>
- Kerbs, P., Vosberg, S., Krebs, S., Graf, A., Blum, H., Swoboda, A., Batcha, A. M. N., Mansmann, U., Metzler, D., Heckman, C. A., Herold, T., & Greif, P. A. (2022). Fusion gene detection by RNA-sequencing complements diagnostics of acute myeloid leukemia and identifies recurring NRIP1-MIR99AHG rearrangements. *Haematologica*, 107(1), 100–111. <https://doi.org/10.3324/haematol.2021.278436>
- Kerrigan, K., Chan, J., Vagher, J., Kohlmann, W., Naumer, A., Anson, J., Low, S., Schiffman, J., & Maese, L. (2021). Lung Cancer in Li-Fraumeni Syndrome. *JCO Precision Oncology*, 5, PO.20.00468. <https://doi.org/10.1200/PO.20.00468>
- Khan, I., Malinge, S., & Crispino, J. D. (2011). Myeloid Leukemia in Down Syndrome. *Critical reviews in oncogenesis*, 16(1–2), 25–36. <https://doi.org/10.1615/critrevoncog.v16.i1-2.40>
- Khoury, J. D., Solary, E., Abla, O., Akkari, Y., Alaggio, R., Apperley, J. F., Bejar, R., Berti, E., Busque, L., Chan, J. K. C., Chen, W., Chen, X., Chng, W.-J., Choi, J. K., Colmenero, I., Coupland, S. E., Cross, N. C. P., De Jong, D., Elghetany, M. T., ... Hochhaus, A. (2022). The 5th edition of the World Health Organization Classification of Haematolymphoid Tumours: Myeloid and Histiocytic/Dendritic Neoplasms. *Leukemia*, 36(7), 1703–1719. <https://doi.org/10.1038/s41375-022-01613-1>
- Koboldt, D. C. (2020). Best practices for variant calling in clinical sequencing. *Genome Medicine*, 12, 91. <https://doi.org/10.1186/s13073-020-00791-w>
- Koga, S., Du, W., Yang, G., & Zhang, L. (2025). Molecular Testing of FLT3 Mutations in Hematolymphoid Malignancies in the Era of Next-generation Sequencing. *Journal of Clinical and Translational Pathology*, 5(1), 30–40. <https://doi.org/10.14218/JCTP.2025.00008>
- Kohlmann, A., Bacher, U., Schnittger, S., & Haferlach, T. (2014). Perspective on how to approach molecular diagnostics in acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndromes in the era of next-generation sequencing. *Leukemia & Lymphoma*, 55(8), 1725–1734. <https://doi.org/10.3109/10428194.2013.856427>
- Kopanos, C., Tsiolkas, V., Kouris, A., Chapple, C. E., Albarca Aguilera, M., Meyer, R., & Massouras, A. (2019). VarSome: The human genomic variant search engine. *Bioinformatics*, 35(11), 1978–1980. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bty897>
- Koroglu, M. N., & Bilguvar, K. (2025). A Comprehensive Bioinformatics Approach to Analysis of Variants: Variant Calling, Annotation, and Prioritization. *Methods in*

Molecular Biology (Clifton, N.J.), 2889, 207–233. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-4322-8_15

Kralik, J. M., Kranewitter, W., Boesmueller, H., Marschon, R., Tschurtschenthaler, G., Rumpold, H., Wiesinger, K., Erdel, M., Petzer, A. L., & Webersinke, G. (2011). Characterization of a newly identified ETV6-NTRK3 fusion transcript in acute myeloid leukemia. *Diagnostic Pathology*, 6, 19. <https://doi.org/10.1186/1746-1596-6-19>

Kratz, C. P., Freycon, C., Maxwell, K. N., Nichols, K. E., Schiffman, J. D., Evans, D. G., Achatz, M. I., Savage, S. A., Weitzel, J. N., Garber, J. E., Hainaut, P., & Malkin, D. (2021). Analysis of the Li-Fraumeni Spectrum Based on an International Germline TP53 Variant Data Set. *JAMA Oncology*, 7(12), 1–7. <https://doi.org/10.1001/jamaoncol.2021.4398>

Kumar, B., Garcia, M., Weng, L., Jung, X., Murakami, J. L., Hu, X., McDonald, T., Lin, A., Kumar, A. R., DiGiusto, D. L., Stein, A. S., Pullarkat, V. A., Hui, S. K., Carlesso, N., Kuo, Y.-H., Bhatia, R., Marcucci, G., & Chen, C.-C. (2018). Acute myeloid leukemia transforms the bone marrow niche into a leukemia-permissive microenvironment through exosome secretion. *Leukemia*, 32(3), 575–587. <https://doi.org/10.1038/leu.2017.259>

Kumar, C. C. (2011). Genetic Abnormalities and Challenges in the Treatment of Acute Myeloid Leukemia. *Genes & Cancer*, 2(2), 95–107. <https://doi.org/10.1177/1947601911408076>

Kurzer, J. H., & Weinberg, O. K. (2023). Updates in molecular genetics of acute myeloid leukemia. *Seminars in Diagnostic Pathology, Molecular updates in myeloid neoplasms*, 40(3), 140–151. <https://doi.org/10.1053/j.semdp.2023.04.002>

Lachowiez, C. A., Loghavi, S., Kadia, T. M., Daver, N., Borthakur, G., Pemmaraju, N., Naqvi, K., Alvarado, Y., Yilmaz, M., Short, N., Ohanian, M., Pierce, S. R., Patel, K. P., Qiao, W., Ning, J., Sasaki, K., Takahashi, K., Jabbour, E., Andreeff, M., ... DiNardo, C. D. (2020). Outcomes of older patients with NPM1-mutated AML: Current treatments and the promise of venetoclax-based regimens. *Blood Advances*, 4(7), 1311–1320. <https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2019001267>

Lachowiez, C. A., Long, N., Saultz, J., Gandhi, A., Newell, L. F., Hayes-Lattin, B., Maziarz, R. T., Leonard, J., Bottomly, D., McWeeney, S., Dunlap, J., Press, R., Meyers, G., Swords, R., Cook, R. J., Tyner, J. W., Druker, B. J., & Traer, E. (2022). Comparison and validation of the 2022 European LeukemiaNet guidelines in acute myeloid leukemia. *Blood Advances*, 7(9), 1899–1909. <https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2022009010>

Landrum, M. J., Lee, J. M., Riley, G. R., Jang, W., Rubinstein, W. S., Church, D. M., & Maglott, D. R. (2014). ClinVar: Public archive of relationships among sequence variation and human phenotype. *Nucleic Acids Research*, 42(Database issue), D980–985. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt1113>

Larson, N. B., Oberg, A. L., Adjei, A. A., & Wang, L. (2023). A clinician's guide to bioinformatics for next-generation sequencing. *Journal of thoracic oncology: official publication of the International Association for the Study of Lung Cancer*, 18(2), 143–157. <https://doi.org/10.1016/j.jtho.2022.11.006>

- Lefter, M., Vis, J. K., Vermaat, M., den Dunnen, J. T., Taschner, P. E. M., & Laros, J. F. J. (2021). Mutalyzer 2: Next generation HGVS nomenclature checker. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 37(18), 2811–2817. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btab051>
- Leisch, M., Jansko, B., Zaborsky, N., Greil, R., & Pleyer, L. (2019). Next Generation Sequencing in AML—On the Way to Becoming a New Standard for Treatment Initiation and/or Modulation? *Cancers*, 11(2), 252. <https://doi.org/10.3390/cancers11020252>
- Levine, R. L., & Valk, P. J. M. (2019). Next-generation sequencing in the diagnosis and minimal residual disease assessment of acute myeloid leukemia. *Haematologica*, 104(5), Article 5. <https://doi.org/10.3324/haematol.2018.205955>
- Lewandowski, K. (2012). Znaczenie prognostyczne zaburzeń molekularnych u chorych na ostrą białaczkę szpikową z prawidłowym kariotypem. *Hematologia*, 3(3), 231–242.
- Li, F. P., & Fraumeni, J. F. (1969). Soft-tissue sarcomas, breast cancer, and other neoplasms. A familial syndrome? *Annals of Internal Medicine*, 71(4), 747–752. <https://doi.org/10.7326/0003-4819-71-4-747>
- Li, F. P., Fraumeni, J. F., Mulvihill, J. J., Blattner, W. A., Dreyfus, M. G., Tucker, M. A., & Miller, R. W. (1988). A cancer family syndrome in twenty-four kindreds. *Cancer Research*, 48(18), 5358–5362.
- Li, G., Gao, Y., Li, K., Lin, A., & Jiang, Z. (2020). Genomic analysis of biomarkers related to the prognosis of acute myeloid leukemia. *Oncology Letters*, 20(2), 1824–1834. <https://doi.org/10.3892/ol.2020.11700>
- Li, Y., Yang, W., Patel, R. M., Casey, E. B., Denby, E., Mendoza-Castrejon, J., Rodriguez-Lopez, P., & Magee, J. A. (2023). FLT3ITD drives context-specific changes in cell identity and variable interferon dependence during AML initiation. *Blood*, 141(12), 1442–1456. <https://doi.org/10.1182/blood.2022016889>
- Lierman, E., & Cools, J. (2007). ETV6 and PDGFRB: A license to fuse. *Haematologica*, 92(2), 145–147. <https://doi.org/10.3324/haematol.11187>
- Liquori, A., Ibañez, M., Sargas, C., Sanz, M. Á., Barragán, E., & Cervera, J. (2020). Acute Promyelocytic Leukemia: A Constellation of Molecular Events around a Single PML-RARA Fusion Gene. *Cancers*, 12(3), 624. <https://doi.org/10.3390/cancers12030624>
- Lv, L., Yang, L., Cui, H., & Ma, T. (2019). A complex translocation (1;17;15) with spliced short-type PML-RARA fusion transcripts in acute promyelocytic leukemia: A case report. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 17(2), 1360–1366. <https://doi.org/10.3892/etm.2018.7091>
- Marschalek, R. (2016). Systematic Classification of Mixed-Lineage Leukemia Fusion Partners Predicts Additional Cancer Pathways. *Annals of Laboratory Medicine*, 36(2), 85–100. <https://doi.org/10.3343/alm.2016.36.2.85>
- Mayakonda, A., Lin, D.-C., Assenov, Y., Plass, C., & Koeffler, H. P. (2018). Maftools: Efficient and comprehensive analysis of somatic variants in cancer. *Genome Research*, 28(11), 1747–1756. <https://doi.org/10.1101/gr.239244.118>
- McKinnell, Z., Karel, D., Tuerff, D., Sh Abraham, M., & Nassereddine, S. (2022). Acute

Myeloid Leukemia Following Myeloproliferative Neoplasms: A Review of What We Know, What We Do Not Know, and Emerging Treatment Strategies. *Journal of Hematology*, 11(6), 197–209. <https://doi.org/10.14740/jh1042>

McMahon CM, Ferng T, Canaani J, Wang ES, Morrisette JJD, Eastburn DJ, Pellegrino M, Durruthy-Durruthy R, Watt CD, Asthana S, Lasater EA, DeFilippis R, Peretz CAC, McGary LHF, Deihimi S, Logan AC, Luger SM, Shah NP, Carroll M, Smith CC, Perl AE. (2019). Clonal Selection with RAS Pathway Activation Mediates Secondary Clinical Resistance to Selective FLT3 Inhibition in Acute Myeloid Leukemia. *Cancer Discovery* 9(8):1050-1063. doi: 10.1158/2159-8290.CD-18-1453

Megías-Vericat, J. E., Ballesta-López, O., Barragán, E., & Montesinos, P. (2019). IDH1-mutated relapsed or refractory AML: Current challenges and future prospects. *Blood and Lymphatic Cancer: Targets and Therapy*, 9, 19–32. <https://doi.org/10.2147/BLCTT.S177913>

Messina, M., Piciocchi, A., Ottone, T., Paolini, S., Papayannidis, C., Lessi, F., Fracchiolla, N. S., Forghieri, F., Candoni, A., Mengarelli, A., Martelli, M. P., Venditti, A., Carella, A. M., Albano, F., Mancini, V., Massimo, B., Arena, V., Sargentini, V., Sciumè, M., ... Voso, M. T. (2022). Prevalence and Prognostic Role of IDH Mutations in Acute Myeloid Leukemia: Results of the GIMEMA AML1516 Protocol. *Cancers*, 14(12), 3012. <https://doi.org/10.3390/cancers14123012>

Metzker, M. L. (2010). Sequencing technologies—The next generation. *Nature Reviews. Genetics*, 11(1), 31–46. <https://doi.org/10.1038/nrg2626>

Miles, L. A., Bowman, R. L., Merlinsky, T. R., Csete, I. S., Ooi, A. T., Durruthy-Durruthy, R., Bowman, M., Famulare, C., Patel, M. A., Mendez, P., Ainali, C., Demaree, B., Delley, C. L., Abate, A. R., Manivannan, M., Sahu, S., Goldberg, A. D., Bolton, K. L., Zehir, A., ... Levine, R. L. (2020). Single-cell mutation analysis of clonal evolution in myeloid malignancies. *Nature*, 587(7834), 477–482. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2864-x>

Milosevic Feenstra, J. D., Schischlik, F., Jäger, R., Ivanov, D., Eisenwort, G., Keller, A., Schuster, M., Hadzijušufovic, E., Krauth, M.-T., Spörk, R., Gisslinger, B., Koller, E., Fillitz, M., Pfeilstocker, M., Sliwa, T., Keil, F., Bock, C., Gisslinger, H., Kralovics, R., & Valent, P. (2020). Overexpression of PD-L1 Correlates with JAK2-V617F Mutational Burden and Is Associated with Chromosome 9p Uniparental Disomy in MPN. *Blood*, 136(Supplement 1), 24. <https://doi.org/10.1182/blood-2020-137447>

Molica, M., Perrone, S., & Rossi, M. (2023). Gilteritinib: The Story of a Proceeding Success into Hard-to-Treat FLT3-Mutated AML Patients. *Journal of Clinical Medicine*, 12(11), 3647. <https://doi.org/10.3390/jcm12113647>

Montesinos, P., Recher, C., Vives, S., Zarzycka, E., Wang, J., Bertani, G., Heuser, M., Calado, R. T., Schuh, A. C., Yeh, S.-P., Daigle, S. R., Hui, J., Pandya, S. S., Gianolio, D. A., Botton, S. de, & Döhner, H. (2022). Ivosidenib and Azacitidine in IDH1-Mutated Acute Myeloid Leukemia. *New England Journal of Medicine*, 386(16), 1519–1531. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2117344>

- Mrózek, K. (2022). Molecular cytogenetics in acute myeloid leukemia in adult patients: Practical implications. *Polish Archives of Internal Medicine*, 132(7–8), 16300. <https://doi.org/10.20452/pamw.16300>
- Mrózek, K., Harper, D. P., & Aplan, P. D. (2009). Cytogenetics and Molecular Genetics of Acute Lymphoblastic Leukemia. *Hematology/Oncology Clinics of North America, Recent Progress in the Treatment of Acute Lymphoblastic Leukemia*, 23(5), 991–1010. <https://doi.org/10.1016/j.hoc.2009.07.001>
- Mrózek, K., Kohlschmidt, J., Blachly, J. S., Nicolet, D., Carroll, A. J., Archer, K. J., Mims, A. S., Larkin, K. T., Orwick, S., Oakes, C. C., Kolitz, J. E., Powell, B. L., Blum, W. G., Marcucci, G., Baer, M. R., Uy, G. L., Stock, W., Byrd, J. C., & Eisfeld, A.-K. (2023). Outcome prediction by the 2022 European LeukemiaNet genetic-risk classification for adults with acute myeloid leukemia: An Alliance study. *Leukemia*, 37(4), 788–798. <https://doi.org/10.1038/s41375-023-01846-8>
- Muiños, F., Martínez-Jiménez, F., Pich, O., Gonzalez-Perez, A., & Lopez-Bigas, N. (2021). In silico saturation mutagenesis of cancer genes. *Nature*, 596(7872), 428–432. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03771-1>
- Muntean, A. G., & Hess, J. L. (2012). The pathogenesis of mixed-lineage leukemia. *Annual Review of Pathology*, 7, 283–301. <https://doi.org/10.1146/annurev-pathol-011811-132434>
- Negotei, C., Colita, A., Mitu, I., Lupu, A. R., Lapadat, M.-E., Popovici, C. E., Crainicu, M., Stanca, O., & Berbec, N. M. (2023). A Review of FLT3 Kinase Inhibitors in AML. *Journal of Clinical Medicine*, 12(20), 6429. <https://doi.org/10.3390/jcm12206429>
- Othman, J., Potter, N., Ivey, A., Tazi, Y., Papaemmanuil, E., Jovanovic, J., Freeman, S. D., Gilkes, A., Gale, R., Rapoz-D'Silva, T., Runglall, M., Kleeman, M., Dhami, P., Thomas, I., Johnson, S., Canham, J., Cavenagh, J., Kottaridis, P., Arnold, C., ... Dillon, R. (2024). Molecular, clinical, and therapeutic determinants of outcome in NPM1-mutated AML. *Blood*, 144(7), 714–728. <https://doi.org/10.1182/blood.2024024310>
- Papaemmanuil, E., Gerstung, M., Bullinger, L., Gaidzik, V. I., Paschka, P., Roberts, N. D., Potter, N. E., Heuser, M., Thol, F., Bolli, N., Gundem, G., Loo, P. V., Martincorena, I., Ganly, P., Mudie, L., McLaren, S., O'Meara, S., Raine, K., Jones, D. R., ... Campbell, P. J. (2016). Genomic Classification and Prognosis in Acute Myeloid Leukemia. *New England Journal of Medicine*, 374(23), 2209–2221. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1516192>
- Patel, J. P., Gönen, M., Figueroa, M. E., Fernandez, H., Sun, Z., Racevskis, J., Vlierberghe, P. V., Dolgalev, I., Thomas, S., Aminova, O., Huberman, K., Cheng, J., Viale, A., Socci, N. D., Heguy, A., Cherry, A., Vance, G., Higgins, R. R., Ketterling, R. P., ... Levine, R. L. (2012). Prognostic Relevance of Integrated Genetic Profiling in Acute Myeloid Leukemia. *New England Journal of Medicine*, 366(12), 1079–1089. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1112304>
- Perl, A. E., Martinelli, G., Cortes, J. E., Neubauer, A., Berman, E., Paolini, S., Montesinos, P., Baer, M. R., Larson, R. A., Ustun, C., Fabbiano, F., Erba, H. P., Stasi, A.

- D., Stuart, R., Olin, R., Kasner, M., Ciceri, F., Chou, W.-C., Podoltsev, N., ... Levis, M. J. (2019). Gilteritinib or Chemotherapy for Relapsed or Refractory FLT3-Mutated AML. *New England Journal of Medicine*, 381(18), 1728–1740. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1902688>
- Pilalis, E., Zisis, D., Andrinopoulou, C., Karamanidou, T., Antonara, M., Stavropoulos, T. G., & Chatziioannou, A. (2025). Genome-wide functional annotation of variants: A systematic review of state-of-the-art tools, techniques and resources. *Frontiers in Pharmacology*, 16, 1474026. <https://doi.org/10.3389/fphar.2025.1474026>
- Popovici-Muller, J., Lemieux, R. M., Artin, E., Saunders, J. O., Salituro, F. G., Travins, J., Cianchetta, G., Cai, Z., Zhou, D., Cui, D., Chen, P., Straley, K., Tobin, E., Wang, F., David, M. D., Penard-Lacronique, V., Quivoron, C., Saada, V., Botton, S. de, ... Yen, K. (2018). Discovery of AG-120 (Ivosidenib): A First-in-Class Mutant IDH1 Inhibitor for the Treatment of IDH1 Mutant Cancers. *ACS Medicinal Chemistry Letters*, 9(4), 300. <https://doi.org/10.1021/acsmchemlett.7b00421>
- Patrick R. Benusiglio, Vincent Fallet, Mateo Sanchis-Borja, Florence Coulet, Jacques Cadranel (2021). Lung cancer is also a hereditary disease. *European Respiratory Review : An Official Journal of the European Respiratory Society*, 30(162). <https://doi.org/10.1183/16000617.0045-2021>
- Prochazka, K. T., Pregartner, G., Rücker, F. G., Heitzer, E., Pabst, G., Wölfler, A., Zebisch, A., Berghold, A., Döhner, K., & Sill, H. (2019). Clinical implications of subclonal TP53 mutations in acute myeloid leukemia. *Haematologica*, 104(3), 516–523. <https://doi.org/10.3324/haematol.2018.205013>
- Qin, D. (2019). Next-generation sequencing and its clinical application. *Cancer Biology & Medicine*, 16(1), 4–10. <https://doi.org/10.20892/j.issn.2095-3941.2018.0055>
- Ranieri, R., Pianigiani, G., Sciabolacci, S., Perriello, V. M., Marra, A., Cardinali, V., Pierangeli, S., Milano, F., Gionfriddo, I., Brunetti, L., Martelli, M. P., & Falini, B. (2022). Current status and future perspectives in targeted therapy of NPM1-mutated AML. *Leukemia*, 36(10), 2351–2367. <https://doi.org/10.1038/s41375-022-01666-2>
- Rausch, C., Rothenberg-Thurley, M., Dufour, A., Schneider, S., Gittinger, H., Sauerland, C., Görlich, D., Krug, U., Berdel, W. E., Woermann, B. J., Hiddemann, W., Braess, J., von Bergwelt-Baildon, M., Spiekermann, K., Herold, T., & Metzeler, K. H. (2023). Validation and refinement of the 2022 European LeukemiaNet genetic risk stratification of acute myeloid leukemia. *Leukemia*, 37(6), 1234–1244. <https://doi.org/10.1038/s41375-023-01884-2>
- Reinert, K., Langmead, B., Weese, D., & Evers, D. J. (2015). Alignment of Next-Generation Sequencing Reads. *Annual Review of Genomics and Human Genetics*, 16, 133–151. <https://doi.org/10.1146/annurev-genom-090413-025358>
- Rizzo, J. M., & Buck, M. J. (2012). Key principles and clinical applications of „next-generation” DNA sequencing. *Cancer Prevention Research (Philadelphia, Pa.)*, 5(7), 887–900. <https://doi.org/10.1158/1940-6207.CAPR-11-0432>
- Robinson, J. T., Thorvaldsdóttir, H., Winckler, W., Guttman, M., Lander, E. S., Getz, G.,

- & Mesirov, J. P. (2011). Integrative Genomics Viewer. *Nature biotechnology*, 29(1), 24–26. <https://doi.org/10.1038/nbt.1754>
- Rohle, D., Popovici-Muller, J., Palaskas, N., Turcan, S., Grommes, C., Campos, C., Tsoi, J., Clark, O., Oldrini, B., Komisopoulou, E., Kunii, K., Pedraza, A., Schalm, S., Silverman, L., Miller, A., Wang, F., Yang, H., Chen, Y., Kernysky, A., ... Mellinghoff, I. K. (2013). An inhibitor of mutant IDH1 delays growth and promotes differentiation of glioma cells. *Science (New York, N.Y.)*, 340(6132), 626–630. <https://doi.org/10.1126/science.1236062>
- Ronnacker, J., Muller, P. J., Mikesch, J.-H., Zukunft, S., Weinbergerová, B., Šrámek, J., Valka, J., Novak, J., Zak, P., Szotkowski, T., Koristek, Z., Krekeler, C., Unglaub, J. M., Sauer, T., Ruhnke, L., Kraus, S., Schaffrath, J., Müller, L. P., Kaes, S., ... Hanoun, M. (2025). Gemtuzumab ozogamicin in first-line treatment of CBF-AML: Insights from a retrospective multi-center analysis. *Leukemia*, 39(9), 2174–2180. <https://doi.org/10.1038/s41375-025-02700-9>
- Roussel, X., Daguindau, E., Berceanu, A., Desbrosses, Y., Warda, W., Neto da Rocha, M., Trad, R., Deconinck, E., Deschamps, M., & Ferrand, C. (2020). Acute Myeloid Leukemia: From Biology to Clinical Practices Through Development and Pre-Clinical Therapeutics. *Frontiers in Oncology*, 10, 599933. <https://doi.org/10.3389/fonc.2020.599933>
- Sallman, D. A., DeZern, A. E., Garcia-Manero, G., Steensma, D. P., Roboz, G. J., Sekeres, M. A., Cluzeau, T., Sweet, K. L., McLemore, A., McGraw, K. L., Puskas, J., Zhang, L., Yao, J., Mo, Q., Nardelli, L., Al Ali, N. H., Padron, E., Korbel, G., Attar, E. C., ... Komrokji, R. S. (2021). Eprenetapopt (APR-246) and Azacitidine in TP53-Mutant Myelodysplastic Syndromes. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 39(14), 1584–1594. <https://doi.org/10.1200/JCO.20.02341>
- Salman, H. (2024). Comparative Analysis of AML Classification Systems: Evaluating the WHO, ICC, and ELN Frameworks and Their Distinctions. *Cancers*, 16(16), 2915. <https://doi.org/10.3390/cancers16162915>
- Sangle, N. A., & Perkins, S. L. (2011). Core-binding factor acute myeloid leukemia. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*, 135(11), 1504–1509. <https://doi.org/10.5858/arpa.2010-0482-RS>
- Sanz, M. A., Fenaux, P., Tallman, M. S., Estey, E. H., Löwenberg, B., Naoe, T., Lengfelder, E., Döhner, H., Burnett, A. K., Chen, S.-J., Mathews, V., Iland, H., Rego, E., Kantarjian, H., Adès, L., Avvisati, G., Montesinos, P., Platzbecker, U., Ravandi, F., ... Lo-Coco, F. (2019). Management of acute promyelocytic leukemia: Updated recommendations from an expert panel of the European LeukemiaNet. *Blood*, 133(15), 1630–1643. <https://doi.org/10.1182/blood-2019-01-894980>
- Satam, H., Joshi, K., Mangrolia, U., Waghoo, S., Zaidi, G., Rawool, S., Thakare, R. P., Banday, S., Mishra, A. K., Das, G., & Malonia, S. K. (2023). Next-Generation Sequencing Technology: Current Trends and Advancements. *Biology*, 12(7), 997. <https://doi.org/10.3390/biology12070997>

- Saultz, J. N., & Garzon, R. (2016). Acute Myeloid Leukemia: A Concise Review. *Journal of Clinical Medicine*, 5(3), 33. <https://doi.org/10.3390/jcm5030033>
- Schmalbrock, L. K., Dolnik, A., Cocciardi, S., Sträng, E., Theis, F., Jahn, N., Panina, E., Blätte, T. J., Herzig, J., Skambraks, S., Rücker, F. G., Gaidzik, V. I., Paschka, P., Fiedler, W., Salih, H. R., Wulf, G., Schroeder, T., Lübbert, M., Schlenk, R. F., ... Bullinger, L. (2021). Clonal evolution of acute myeloid leukemia with FLT3-ITD mutation under treatment with midostaurin. *Blood*, 137(22), 3093–3104. <https://doi.org/10.1182/blood.2020007626>
- Schranz, K., Hubmann, M., Harin, E., Vosberg, S., Herold, T., Metzeler, K. H., Rothenberg-Thurley, M., Janke, H., Bräundl, K., Ksienzyk, B., Batcha, A. M. N., Schaaf, S., Schneider, S., Bohlander, S. K., Görlich, D., Berdel, W. E., Wörmann, B. J., Braess, J., Krebs, S., ... Greif, P. A. (2018). Clonal heterogeneity of FLT3-ITD detected by high-throughput amplicon sequencing correlates with adverse prognosis in acute myeloid leukemia. *Oncotarget*, 9(53), 30128–30145. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.25729>
- Seferyńska, I., & Warzocha, K. (2014). A registry report from the Institute of Hematology and Transfusion Medicine on adult morbidity for acute leukemias between 2004–2010 in Poland made on behalf of the Polish Adult Leukemia Group (PALG). *Hematology in Clinical Practice*, 5(2), Article 2.
- Shahzad, M., Amin, M. K., Daver, N. G., Shah, M. V., Hiwase, D., Arber, D. A., Kharfan-Dabaja, M. A., & Badar, T. (2024). What have we learned about TP53-mutated acute myeloid leukemia? *Blood Cancer Journal*, 14(1), 202. <https://doi.org/10.1038/s41408-024-01186-5>
- Shendure, J., & Ji, H. (2008). Next-generation DNA sequencing. *Nature Biotechnology*, 26(10), 1135–1145. <https://doi.org/10.1038/nbt1486>
- Shi, L., Huang, Y., Huang, X., Zhou, W., Wei, J., Deng, D., & Lai, Y. (2020). Analyzing the key gene expression and prognostics values for acute myeloid leukemia. *Translational Cancer Research*, 9(11), 7284–7298. <https://doi.org/10.21037/tcr-20-3177>
- Shimony, S., Stahl, M., & Stone, R. M. (2025). Acute Myeloid Leukemia: 2025 Update on Diagnosis, Risk-Stratification, and Management. *American Journal of Hematology*, 100(5), 860–891. <https://doi.org/10.1002/ajh.27625>
- Short, N. J., Montalban-Bravo, G., Hwang, H., Ning, J., Franquiz, M. J., Kanagal-Shamanna, R., Patel, K. P., DiNardo, C. D., Ravandi, F., Garcia-Manero, G., Takahashi, K., Konopleva, M., Daver, N., Issa, G. C., Andreeff, M., Kantarjian, H., & Kadia, T. M. (2020). Prognostic and therapeutic impacts of mutant TP53 variant allelic frequency in newly diagnosed acute myeloid leukemia. *Blood Advances*, 4(22), 5681–5689. <https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2020003120>
- Shultz, C., Gates, C., Petros, W., Ross, K., Veltri, L., Craig, M., Wen, S., Primerano, D. A., Hazlehurst, L., Denvir, J., & Sdrimas, K. (2022). Association of genetic variants and survival in patients with acute myeloid leukemia in rural Appalachia. *Cancer Reports*, 6(3), e1746. <https://doi.org/10.1002/cnr2.1746>
- Shumilov, E., Flach, J., Kohlmann, A., Banz, Y., Bonadies, N., Fiedler, M., Pabst, T., &

- Bacher, U. (2018). Current status and trends in the diagnostics of AML and MDS. *Blood Reviews*, 32(6), 508–519. <https://doi.org/10.1016/j.blre.2018.04.008>
- Slatko, B. E., Gardner, A. F., & Ausubel, F. M. (2018). Overview of Next Generation Sequencing Technologies. *Current protocols in molecular biology*, 122(1), e59. <https://doi.org/10.1002/cpmb.59>
- Smith, K. M., Fagan, P. C., Pomari, E., Germano, G., Frasson, C., Walsh, C., Silverman, I., Bonvini, P., & Li, G. (2018). Antitumor Activity of Entrectinib, a Pan-TRK, ROS1, and ALK Inhibitor, in ETV6-NTRK3-Positive Acute Myeloid Leukemia. *Molecular Cancer Therapeutics*, 17(2), 455–463. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-17-0419>
- Snaith, O., Poveda-Rogers, C., Laczko, D., Yang, G., & Morrisette, J. J. D. (2024). Cytogenetics and genomics of acute myeloid leukemia. *Best Practice & Research Clinical Haematology*, 37(1), 101533. <https://doi.org/10.1016/j.beha.2023.101533>
- Stabellini, N., Tomlinson, B., Cullen, J., Shanahan, J., Waite, K., Montero, A. J., Barnholtz-Sloan, J. S., & Hamerschlag, N. (2022). Sex differences in adults with acute myeloid leukemia and the impact of sex on overall survival. *Cancer Medicine*, 12(6), 6711–6721. <https://doi.org/10.1002/cam4.5461>
- Stein, E. M., DiNardo, C. D., Pollyea, D. A., Fathi, A. T., Roboz, G. J., Altman, J. K., Stone, R. M., DeAngelo, D. J., Levine, R. L., Flinn, I. W., Kantarjian, H. M., Collins, R., Patel, M. R., Frankel, A. E., Stein, A., Sekeres, M. A., Swords, R. T., Medeiros, B. C., Willekens, C., ... Tallman, M. S. (2017). Enasidenib in mutant IDH2 relapsed or refractory acute myeloid leukemia. *Blood*, 130(6), 722–731. <https://doi.org/10.1182/blood-2017-04-779405>
- Stone, R. M., Mandrekar, S. J., Sanford, B. L., Laumann, K., Geyer, S., Bloomfield, C. D., Thiede, C., Prior, T. W., Döhner, K., Marcucci, G., Lo-Coco, F., Klisovic, R. B., Wei, A., Sierra, J., Sanz, M. A., Brandwein, J. M., de Witte, T., Niederwieser, D., Appelbaum, F. R., ... Döhner, H. (2017). Midostaurin plus Chemotherapy for Acute Myeloid Leukemia with a FLT3 Mutation. *The New England Journal of Medicine*, 377(5), 454–464. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1614359>
- Strasser, B., Mustafa, S., Seier, J., Tomasits, J., & Haushofer, A. (2025). Hematopathological Patterns in Acute Myeloid Leukemia with Complications of Overt Disseminated Intravascular Coagulation. *Diagnostics*, 15(3), 383. <https://doi.org/10.3390/diagnostics15030383>
- Suehnholz, S. P., Nissan, M. H., Zhang, H., Kundra, R., Nandakumar, S., Lu, C., Carrero, S., Dhaneshwar, A., Fernandez, N., Xu, B. W., Arcila, M. E., Zehir, A., Syed, A., Brannon, A. R., Rudolph, J. E., Paraiso, E., Sabbatini, P. J., Levine, R. L., Dogan, A., ... Chakravarty, D. (2024). Quantifying the Expanding Landscape of Clinical Actionability for Patients with Cancer. *Cancer Discovery*, 14(1), 49–65. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-23-0467>
- Swaminathan, M., Bannan, S. A., Routbort, M., Naqvi, K., Kadia, T. M., Takahashi, K., Alvarado, Y., Ravandi-Kashani, F., Patel, K. P., Champlin, R., Kantarjian, H., Strong, L., & DiNardo, C. D. (2019). Hematologic malignancies and Li-Fraumeni syndrome. *Cold*

Spring Harbor Molecular Case Studies, 5(1), a003210.
<https://doi.org/10.1101/mcs.a003210>

Szczepaniak, A., & Rzetelska, Z. (2022). Midostaurin added to standard therapy in FLT3-positive acute myeloid leukaemia treatment. *Hematology in Clinical Practice*, 13(2), 69–74. <https://doi.org/10.5603/HCP.a2022.0011>

Szmajda, D., Balcerczak, E., & Krygier, A. (2017). Standardy diagnostyki oraz nowe trendy w leczeniu ostrej białaczki szpikowej. *Acta Haematologica Polonica*, 48(4), 291–299. <https://doi.org/10.1016/j.achaem.2017.07.009>

Tamborero, D., Rubio-Perez, C., Deu-Pons, J., Schroeder, M. P., Vivancos, A., Rovira, A., Tusquets, I., Albanell, J., Rodon, J., Tabernero, J., de Torres, C., Dienstmann, R., Gonzalez-Perez, A., & Lopez-Bigas, N. (2018). Cancer Genome Interpreter annotates the biological and clinical relevance of tumor alterations. *Genome Medicine*, 10(1), 25. <https://doi.org/10.1186/s13073-018-0531-8>

Tate, J. G., Bamford, S., Jubb, H. C., Sondka, Z., Beare, D. M., Bindal, N., Boutselakis, H., Cole, C. G., Creatore, C., Dawson, E., Fish, P., Harsha, B., Hathaway, C., Jupe, S. C., Kok, C. Y., Noble, K., Ponting, L., Ramshaw, C. C., Rye, C. E., ... Forbes, S. A. (2019). COSMIC: The Catalogue Of Somatic Mutations In Cancer. *Nucleic Acids Research*, 47(Database issue), D941–D947. <https://doi.org/10.1093/nar/gky1015>

Tebbi, C. K. (2021). Etiology of Acute Leukemia: A Review. *Cancers*, 13(9), Article 9. <https://doi.org/10.3390/cancers13092256>

Testa, U., & Lo-Coco, F. (2016). Prognostic factors in acute promyelocytic leukemia: Strategies to define high-risk patients. *Annals of Hematology*, 95(5), 673–680. <https://doi.org/10.1007/s00277-016-2622-1>

Tripon, F., Crauciuc, G. A., Bogliș, A., Moldovan, V., Sándor-Kéri, J., Benedek, I. J., Trifa, A. P., & Bănescu, C. (2020). Co-occurrence of PML-RARA gene fusion, chromosome 8 trisomy, and FLT3 ITD mutation in a young female patient with de novo acute myeloid leukemia and early death: A CARE case report. *Medicine*, 99(14), e19730. <https://doi.org/10.1097/MD.00000000000019730>

Tuteja, S., Kadri, S., & Yap, K. L. (2022). A performance evaluation study: Variant annotation tools - the enigma of clinical next generation sequencing (NGS) based genetic testing. *Journal of Pathology Informatics*, 13, 100130. <https://doi.org/10.1016/j.jpi.2022.100130>

Ushijima, Y., Naruse, S., Ishikawa, Y., Kawashima, N., Sanada, M., Nakashima, M., Kim, J. H., Terakura, S., Kihara, R., Watamoto, K., Nishiyama, T., Kitamura, K., Matsushita, T., & Kiyoi, H. (2024). Initiating-clone analysis in patients with acute myeloid leukemia secondary to essential thrombocythemia. *Scientific Reports*, 14(1), 15906. <https://doi.org/10.1038/s41598-024-66461-8>

Vakiti, A., Reynolds, S. B., & Mewawalla, P. (2025). Acute Myeloid Leukemia. W *StatPearls*. StatPearls Publishing. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK507875/>

Venugopal, S., Takahashi, K., Daver, N., Maiti, A., Borthakur, G., Loghavi, S., Short, N. J., Ohanian, M., Masarova, L., Issa, G., Wang, X., Carlos, B.-R., Yilmaz, M., Kadia, T.,

- Andreeff, M., Ravandi, F., Konopleva, M., Kantarjian, H. M., & DiNardo, C. D. (2022). Efficacy and safety of enasidenib and azacitidine combination in patients with IDH2 mutated acute myeloid leukemia and not eligible for intensive chemotherapy. *Blood Cancer Journal*, 12(1), 10. <https://doi.org/10.1038/s41408-021-00604-2>
- Verma, A., Lupo, P. J., Shah, N. N., Hitzler, J., & Rabin, K. R. (2023). Management of Down Syndrome-Associated Leukemias: A Review. *JAMA Oncology*, 9(9), 1283–1290. <https://doi.org/10.1001/jamaoncol.2023.2163>
- Vis, J. K., Vermaat, M., Taschner, P. E. M., Kok, J. N., & Laros, J. F. J. (2015). An efficient algorithm for the extraction of HGVS variant descriptions from sequences. *Bioinformatics* (Oxford, England), 31(23), 3751–3757. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btv443>
- Voelkerding, K. V., Dames, S., & Durtschi, J. D. (2010). Next generation sequencing for clinical diagnostics-principles and application to targeted resequencing for hypertrophic cardiomyopathy: A paper from the 2009 William Beaumont Hospital Symposium on Molecular Pathology. *The Journal of Molecular Diagnostics: JMD*, 12(5), 539–551. <https://doi.org/10.2353/jmoldx.2010.100043>
- Vosberg, S., & Greif, P. A. (2019). Clonal evolution of acute myeloid leukemia from diagnosis to relapse. *Genes, Chromosomes & Cancer*, 58(12), 839–849. <https://doi.org/10.1002/gcc.22806>
- Voso, M. T., Larson, R. A., Jones, D., Marcucci, G., Prior, T., Krauter, J., Heuser, M., Lavorgna, S., Nomdedeu, J., Geyer, S. M., Walker, A., Wei, A. H., Sierra, J., Sanz, M. A., Brandwein, J. M., de Witte, T. M., Jansen, J. H., Niederwieser, D., Appelbaum, F. R., ... Lo-Coco, F. (2020). Midostaurin in patients with acute myeloid leukemia and FLT3-TKD mutations: A subanalysis from the RATIFY trial. *Blood Advances*, 4(19), 4945–4954. <https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2020002904>
- Wakita, S., Sakaguchi, M., Oh, I., Kako, S., Toya, T., Najima, Y., Doki, N., Kanda, J., Kuroda, J., Mori, S., Satake, A., Usuki, K., Ueki, T., Uoshima, N., Kobayashi, Y., Kawata, E., Tajika, K., Nagao, Y., Shono, K., ... Yamaguchi, H. (2022). Prognostic impact of *CEBPA* bZIP domain mutation in acute myeloid leukemia. *Blood Advances*, 6(1), 238–247. <https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2021004292>
- Wang, R., Chen, C., Jing, Y., Qin, J., Li, Y., Chen, G., Zhou, W., Li, Y., Wang, J., Li, D., Zhao, H., Wang, B., Wang, L., Wang, H., Wang, M., Gao, X., & Yu, L. (2020). Characteristics and prognostic significance of genetic mutations in acute myeloid leukemia based on a targeted next-generation sequencing technique. *Cancer Medicine*, 9(22), 8457–8467. <https://doi.org/10.1002/cam4.3467>
- Wang, R., Xu, P., Chang, L.-L., Zhang, S.-Z., & Zhu, H.-H. (2022). Targeted therapy in NPM1-mutated AML: Knowns and unknowns. *Frontiers in Oncology*, 12, 972606. <https://doi.org/10.3389/fonc.2022.972606>
- Wang, Z., Hu, H., Heitink, L., Rogers, K., You, Y., Tan, T., Suen, C. L. W., Garnham, A., Chen, H., Lieschke, E., Diepstraten, S. T., Chang, C., Chen, T., Moujalled, D., Sutherland, K., Lessene, G., Sieber, O. M., Visvader, J., Kelly, G. L., & Strasser, A.

- (2023). The anti-cancer agent APR-246 can activate several programmed cell death processes to kill malignant cells. *Cell Death & Differentiation*, 30(4), 1033–1046. <https://doi.org/10.1038/s41418-023-01122-3>
- Ward, C. M., To, T.-H., & Pederson, S. M. (2020). ngsReports: A Bioconductor package for managing FastQC reports and other NGS related log files. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 36(8), 2587–2588. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btz937>
- Weinberg, O. K., Siddon, A., Madanat, Y. F., Gagan, J., Arber, D. A., Dal Cin, P., Narayanan, D., Ouseph, M. M., Kurzer, J. H., & Hassarjian, R. P. (2022). TP53 mutation defines a unique subgroup within complex karyotype de novo and therapy-related MDS/AML. *Blood Advances*, 6(9), 2847–2853. <https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2021006239>
- Wen, X., Xu, Z., Jin, Y., Xia, P., Ma, J., Qian, W., Lin, J., & Qian, J. (2021). Association Analyses of TP53 Mutation With Prognosis, Tumor Mutational Burden, and Immunological Features in Acute Myeloid Leukemia. *Frontiers in Immunology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.717527>
- Wierzbowska, A. (2020). 1.10. Ostra białaczka szpikowa. *Onkologia w Praktyce Klinicznej - Edukacja*, 6(A), Article A.
- Wierzbowska, A., & Gołos, A. (2013). Current management of acute promyelocytic leukemia. *Hematology in Clinical Practice*, 4(4), 291–300.
- Wilkins, O. G., Capitanchik, C., Luscombe, N. M., & Ule, J. (2021). Ultraplex: A rapid, flexible, all-in-one fastq demultiplexer. *Wellcome Open Research*, 6, 141. <https://doi.org/10.12688/wellcomeopenres.16791.1>
- Wiśniewski, K., Białopiotrowicz, E., & Góra-Tybor, J. (2018). Zaburzenia mechanizmów epigenetycznych w ostrej białaczce szpikowej. *Hematologia*, 9(2), 100–109. <https://doi.org/10.5603/Hem.2018.0012>
- Wurm, S., Waltersdorfer, M., Loindl, S., Moritz, J. M., Herzog, S. A., Bachmaier, G., Berghold, A., Kashofer, K., Beham-Schmid, C., Hoefler, G., Greinix, H. T., Wölfler, A., Reinisch, A., Sill, H., & Zebisch, A. (2025). Acute myeloid leukemia in the next-generation sequencing era. *Wiener Klinische Wochenschrift*, 137(15), 504–516. <https://doi.org/10.1007/s00508-024-02463-w>
- Xiang, W., Lam, Y. H., Periyasamy, G., & Chuah, C. (2022). Application of High Throughput Technologies in the Development of Acute Myeloid Leukemia Therapy: Challenges and Progress. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(5), 2863. <https://doi.org/10.3390/ijms23052863>
- Yen, K., Travins, J., Wang, F., David, M. D., Artin, E., Straley, K., Padyana, A., Gross, S., DeLaBarre, B., Tobin, E., Chen, Y., Nagaraja, R., Choe, S., Jin, L., Konteatis, Z., Cianchetta, G., Saunders, J. O., Salituro, F. G., Quivoron, C., ... Su, S.-S. M. (2017). AG-221, a First-in-Class Therapy Targeting Acute Myeloid Leukemia Harboring Oncogenic IDH2 Mutations. *Cancer Discovery*, 7(5), 478–493. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-16-1034>
- Yi, M., Li, A., Zhou, L., Chu, Q., Song, Y., & Wu, K. (2020). The global burden and

- attributable risk factor analysis of acute myeloid leukemia in 195 countries and territories from 1990 to 2017: Estimates based on the global burden of disease study 2017. *Journal of Hematology & Oncology*, 13, 72. <https://doi.org/10.1186/s13045-020-00908-z>
- Yokota, M., Tatsumi, N., Nathalang, O., Yamada, T., & Tsuda, I. (1999). Effects of heparin on polymerase chain reaction for blood white cells. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, 13(3), 133–140. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-2825\(1999\)13:3<133::AID-JCLA8>3.0.CO;2-0](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-2825(1999)13:3<133::AID-JCLA8>3.0.CO;2-0)
- Yu, J., Li, Y., Li, T., Li, Y., Xing, H., Sun, H., Sun, L., Wan, D., Liu, Y., Xie, X., & Jiang, Z. (2020). Gene mutational analysis by NGS and its clinical significance in patients with myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukemia. *Experimental Hematology & Oncology*, 9, 2. <https://doi.org/10.1186/s40164-019-0158-5>
- Zeng, T., & Li, Y. I. (2022). Predicting RNA splicing from DNA sequence using Pangolin. *Genome Biology*, 23(1), 103. <https://doi.org/10.1186/s13059-022-02664-4>
- Zhang, A., & Qiu, S. (2025). Advances in RAR α fusion genes in acute promyelocytic leukemia. *Experimental Hematology*, 149, 104822. <https://doi.org/10.1016/j.exphem.2025.104822>
- Zhang, N., Zhang, P., Chen, Y., Lou, S., Zeng, H., & Deng, J. (2020). Clusterization in acute myeloid leukemia based on prognostic alternative splicing signature to reveal the clinical characteristics in the bone marrow microenvironment. *Cell & Bioscience*, 10, 118. <https://doi.org/10.1186/s13578-020-00481-5>
- Zhang, Y., Wang, F., Chen, X., Zhang, Y., Wang, M., Liu, H., Teng, W., Cao, P., Nie, D., Ma, X., Wang, T., Lu, P., & Liu, H. (2020). Companion gene mutations and their clinical significance in AML with double mutant CEBPA. *Cancer Gene Therapy*, 27(7), 599–606. <https://doi.org/10.1038/s41417-019-0133-7>
- Zhao, J. C., Agarwal, S., Ahmad, H., Amin, K., Bewersdorf, J. P., & Zeidan, A. M. (2022). A review of FLT3 inhibitors in acute myeloid leukemia. *Blood Reviews*, 52, 100905. <https://doi.org/10.1016/j.blre.2021.100905>