

Važnost određivanja IDH1 i IDH2 mutacija u bolesnika s dijagnozom akutne mijeloične leukemije

Vasiljević, Marija

Master's thesis / Diplomski rad

2024

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry / Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:873380>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2025-02-24**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb](#)



Marija Vasiljević

**Važnost određivanja *IDH1* i *IDH2* mutacija u
bolesnika s dijagnozom akutne mijeloične
leukemije**

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2024.

Ovaj diplomski rad je prijavljen na Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i izrađen u Kliničkom zavodu za laboratorijsku dijagnostiku Kliničkog bolničkog centra Zagreb pod stručnim vodstvom prof. dr. sc. Dunje Rogić, spec. med. biochem. i suvoditeljstvom Margarete Radić Antolic, spec. med. biochem.

Zahvaljujem se prof. dr. sc. Dunji Rogić, spec. med. biochem. na pruženoj prilici, povjerenju i mogućnosti izrade ovog diplomskog rada. Posebno se zahvaljujem Margareti Radić Antolic, spec. med. biochem. na svim savjetima, susretljivosti, prenesenom znanju i ažurnosti. Također, bih se zahvalila Moniki Kolundžić, mag. med. biochem. i doc. dr. sc. Ivani Lapić, spec. med. biochem. na pomoći prilikom izrade ovog diplomskog rada.

Veliko hvala obitelji i prijateljima na neprekidnoj potpori i strpljenju tijekom cijelog školovanja.

SADRŽAJ

1.	UVOD	1
1.1.	AKUTNA MIJELOIČNA LEUKEMIJA	1
1.2.	PODJELA AKUTNE MIJELOIČNE LEUKEMIJE	3
1.3.	PROGNOSTIČKI ČIMBENICI U AKUTNOJ MIJELOIČNOJ LEUKEMIJI	4
1.4.	IZOCITRAT DEHIDROGENAZE	6
1.4.1	<i>IDH</i> mutacije	6
1.5.	TERAPIJA AKUTNE MIJELOIČNE LEUKEMIJE	9
1.5.1.	Inhibitori izocitrat dehidrogenaza	9
2.	OBRAZLOŽENJE TEME	11
3.	MATERIJALI I METODE	12
3.1.	ISPITANICI I BIOLOŠKI UZORCI.....	12
3.2.	MATERIJALI.....	12
3.3.	METODE	13
3.3.1.	Izdvajanje DNA.....	13
3.3.2.	Određivanje koncentracije izdvojene DNA	14
3.3.3.	Lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu.....	14
3.3.4.	Sangerovo sekvenciranje.....	17
4.	REZULTATI	23
5.	RASPRAVA	29
6.	ZAKLJUČCI	31
7.	POPIS KRATICA, OZNAKA I SIMBOLA	32
8.	LITERATURA	35
9.	SAŽETAK/SUMMARY	40

1. UVOD

1.1. AKUTNA MIJELOIČNA LEUKEMIJA

Akutna mijeloična leukemija (AML) heterogena je zloćudna bolest krvotvornog sustava, koju karakterizira klonalna ekspanzija krvotvornih matičnih stanica usmjerenih u mijeloičnu lozu. Veliki broj tih nezrelih nefunkcionalnih stanica nakuplja se u koštanoj srži rezultirajući potiskivanjem normalne hematopoeze. Kako je normalna hematopoeza potisnuta, simptomi bolesti su slabost, umor, bljedilo i dispneja kao posljedica anemije, krvarenje i diseminirana intravaskularna koagulacija (DIK) kao posljedica trombocitopenije te simptomi lokalnih ili generaliziranih infekcija kao posljedica neutropenije (Pelcovits and Niroula, 2020). Može doći i do hepatomegalije, splenomegalije i limfadenopatije zbog infiltracije jetre, slezene odnosno limfnih čvorova blastima. Budući da je bolest heterogena, laboratorijski su nalazi varijabilni. Iako se leukemije tradicionalno opisuju povišenim brojem leukocita, zapravo je u oko 50 % slučajeva broj leukocita ili unutar referentnog intervala ili snižen (McKenzie i sur., 2014). U perifernoj je krvi često snižen broj eritrocita i koncentracija hemoglobina te povećana distribucija volumena eritrocita (RDW, engl. *red blood cell distribution width*). U eritrocitima na razmazu periferne krvi mogu se vidjeti Howell-Jollyjeva ili Pappenheimerova tjelešca, a i eritrociti s jezgrom te shistociti ako dođe do DIK-a. Obično je prisutna trombocitopenija s hipogranuliranim trombocitima i trombocitima većeg volumena te monocitoza, neutropenija, blaga eozinofilija i bazofilija. Ostali laboratorijski nalazi reflektiraju povećanu proliferaciju - hiperurikemija, povišena aktivnost laktat dehidrogenaze te hiperkalcemija. Ako kompletna krvna slika upućuje na leukemiju, dalje se analizira aspirat i bioptat koštane srži. Morfološki je kriterij za dijagnostiku AML bio prisutnost više od 20 % blasta u perifernoj krvi, ali je on, u petom izdanju klasifikacije Svjetske zdravstvene organizacije (SZO) hematolimfoidnih tumora, ukinut za AML s definirajućim genskim abnormalnostima izuzev AML-a s *BCR::ABL1* fuzijom (engl. *break point cluster region-abelson*) i *CEBPA* mutacijom (engl. *CCAAT enhancer binding protein alpha*) (Khoury i sur., 2022). U AML-u koštana je srž hipercelularna s dominacijom blasta te ponekad dolazi do fibroze. Dijagnoza AML-a i klasifikacija u podtipove postavlja se imunofenotipizacijom, citogenetikom i molekularnom dijagnostikom. Imunofenotipizacija ima važnu ulogu u razlikovanju AML-a od akutne limfoblastične leukemije (ALL) te u praćenju mjerljive ostatne bolesti (MRD, engl. *measurable residual disease*). Provodi se multiparametarskom protočnom citometrijom, pomoću koje se identificiraju površinski stanični i unutarstanični biljezi. Budući da se citogenetske promjene javljaju u 50 do 60 % bolesnika s dijagnozom AML-a, konvencionalna citogenetska analiza obavezna je u dijagnostici (Kumar,

2011). Alternativno, citogenetska analiza se može odraditi metodom fluorescentne *in situ* hibridizacije (FISH). Molekularna dijagnostika omogućuje detekciju promjena u deoksiribonukleinskoj kiselini (DNA, engl. *deoxyribonucleic acid*) i ribonukleinskoj kiselini (RNA, engl. *ribonucleic acid*) metodama lančane reakcije polimerazom (PCR, engl. *polymerase chain reaction*) te inačicama te metode, Sangerovim sekvenciranjem te sekvenciranjem sljedeće generacije (NGS, engl. *next generation sequencing*). Genska bi se analiza trebala provesti za sve genske promjene koje su potrebne za postavljanje dijagnoze, stratifikaciju rizika i identifikaciju novih lijekova te bi idealno rezultati trebali biti dostupni unutar tri do pet dana (Döhner i sur., 2022).

AML je rijetka zloćudna bolest, čini otprilike 1 % svih novo dijagnosticiranih tumora u Sjedinjenim Američkim Državama (SAD) (<https://seer.cancer.gov/statfacts/html/amyl.html>). U svijetu je 2021. zabilježeno 144 645 slučajeva AML-a, a dominantnije je bila prisutna među odraslom populacijom te u bolesnika muškog spola (Zhou i sur., 2024). Zapravo je AML bolest starije životne dobi s medijanom od 67 godina (Grković i Labar, 2011). U Hrvatskoj oboli 2,5 osobe na 100 000 stanovnika godišnje (Labar i sur., 2017).

Bolest nastaje zbog niza promjena u genima uključenim u stanični metabolizam i epigenetsku regulaciju, a u čimbenike rizika ubrajamo infekcije RNA virusima, neke nasljedne (Downov sindrom, Turnerov sindrom, neurofibromatoza...) i stečene (kronična mijeloična leukemija, mijelofibroza, policitemija rubera vera, kronična limfocitna leukemija...) bolesti, ionizirano zračenje te izlaganje određenim kemijskim tvarima poput citostatika (Labar i sur., 2017; Vakiti i Mewawalla, 2024). Ipak, u većini slučajeva se AML pojavljuje *de novo*, odnosno bez jasnog uzročnika. U više od 97 % slučajeva javljaju se genske mutacije, ali važne su i kromosomalne promjene poput transokacija (De Kouchkovsky i Abdul-Hay, 2016). Te različite, ali suradne izmjene daju proliferacijsku prednost i prednost u preživljavanju te onemogućuju diferencijaciju i apoptozu. Ove promjene ili mutacije dijele se u dvije klase. Promjene klase 1 daju prednost u preživljavanju i/ili proliferaciji, ali ne utječu na diferencijaciju. To su primjerice mutacije u genu *FLT* (engl. *Fms-like tyrosine kinase*) i onkogenu *Ras* (engl. *rat sarcoma virus*) te fuzija *BCR::ABL* (Rubnitz i sur., 2010). Promjene ili mutacije klase 2 onemogućuju diferencijaciju i apoptozu. Neke od najčešćih promjena su translokacije *RUNX1::RUNX1T1* (engl. *runt-related transcription factor 1/RUNX1 partner transcriptional corepressor 1*), *CBFB::SMMHC* (engl. *core-binding factor subunit beta/smooth muscle myosin heavy chain*), *PML::RARα* (engl. *promyelocytic leukemia/retinoic acid receptor alpha*) i preustroj *MLL* (engl. *mixed-lineage leukemia 1*) gena (Labar i sur., 2017; Rubnitz i sur., 2010). Oba tipa promjena

zajedno dovode do fenotipa AML-a. U posljednje vrijeme, uvodi se i treća klasa koju čine geni uključeni u epigenetsku regulaciju. Mutacije tih gena utječu i na diferencijaciju i na proliferaciju. To su, na primjer, mutacije u genima *DNMT3A* (engl. *deoxyribonucleic acid methyltransferase 3 alpha*), *IDH1* i *IDH2* (engl. *isocitrate dehydrogenase*) te *TET2* (engl. *tet methylcytosine dioxygenase 2*) genu (De Kouchkovsky i Abdul-Hay, 2016).

1.2. PODJELA AKUTNE MIJELOIČNE LEUKEMIJE

Kako je AML heterogena bolest, odnosno karakteriziraju ju brojne kromosomalne i genske promjene, postojala je potreba podjele na podtipove radi lakšeg razumijevanja genetike i patofiziologije, standardizacije dijagnostike, kliničkog značaja i primjene odgovarajuće terapije. Originalna podjela temeljila se na svjetlosnoj mikroskopiji te znakovima i simptomima u vrijeme postavljanja dijagnoze, a sustav FAB (engl. *French-American-British Classification*) iz 1976. na morfologiji i citokemiji. Danas to nije dovoljno te se najnovija klasifikacija AML-a prema SZO temelji, osim na morfologiji i citokemiji, na imunofenotipizaciji, citogenetici, molekularnoj genetici i kliničkoj slici. AML se u petom izdanju SZO klasifikacije dijeli na AML s definirajućim genskim abnormalnostima i na AML definiran diferencijacijom (Tablica 1). Uvedena je i nova kategorija AML-a s drugim definiranim genskim promjenama u koje se ubrajaju svi novi i/ili neučestali podtipovi.

Tablica 1. Podjela AML-a prema petom izdanju klasifikacije SZO iz 2022. (preuzeto i prilagođeno prema Khoury i sur. (2022)).

Akutna mijeloična leukemija s definirajućim genetskim promjenama

APL s *PML::RAR α* fuzijom

AML s *RUNX1::RUNX1T1* fuzijom

AML s *CBFB::MYH11* fuzijom

AML s *DEK::NUP214* fuzijom

AML s *RBM15::MRTFA* fuzijom

AML s *BCR::ABL1* fuzijom

AML s *KMT2A* preustrojem

AML s *MECOM* preustrojem

AML s *NUP98* preustrojem

AML s *NPM1* mutacijom

AML s *CEBPA* mutacijom

AML, povezana s mijelodisplazijom
AML s drugim definiranim genskim promjenama
Akutna mijeloična leukemija definirana diferencijacijom
AML s minimalnom diferencijacijom
AML bez maturacije
AML s maturacijom
Akutna bazofilna leukemija
Akutna mijelomonocitna leukemija
Akutna monocitna leukemija
Akutna eritroidna leukemija
Akutna megakarioblastična leukemija

Prema iskustvu s četvrtim izdanjem klasifikacije SZO-a iz 2016. godine, rezultatima kliničkih istraživanja i novim spoznajama o hematološkim zloćudnim bolestima, stručnjaci iz područja klinike, patologije i genetike razvili su novu klasifikaciju ICC (engl. *International Consensus Classification*). ICC podjela temelji se na hijerarhijskom pristupu, prema kojem se daje prednost određenim genskim i citogenetskim promjenama. Prvo se pretražuje postoje li određene rekurentne genske promjene poput *PML::RARα* i *RUNX1::RUNX1T1* translokacija. Za dijagnozu AML-a, ova kategorija zahtijeva prisutnost više od 10 % blasta u perifernoj krvi ili koštanoj srži, izuzev *BCR::ABL* translokacije koja zahtijeva više od 20 % blasta (Weinberg i sur., 2023). Izdvojena je posebna skupina AML-a s mutacijom protoonkogen *TP53* (engl. *tumor protein 53*) jer se ta mutacija povezuje s uniformno lošom prognozom (Weinberg i sur., 2023). Ako kod bolesnika nije pronađena niti jedna od ovih genetskih promjena, pretražuje se postoje li genetske promjene povezane s mijelodisplazijom poput *ASXL1* (engl. *additional sex combs like 1*), *BCOR* (engl. *B-cell lymphoma 6 corepressor*) ili *RUNX1* te citogenetske promjene povezane s mijelodisplazijom (Arber i sur., 2022). Ako nije nađena niti jedna od ovih promjena, osoba se svrstava u kategoriju AML-a koju nije moguće drugačije specificirati (AML-NOS, engl. *acute myeloid leukemia - not otherwise specified*) (Shimony i sur., 2023).

1.3. PROGNOŠTIČKI ČIMBENICI U AKUTNOJ MIJELOIČNOJ LEUKEMIJI

Prognošički čimbenici služe za procjenu odgovora na terapiju, trajanja remisije, vjerojatnosti pojave recidiva i sveukupnog preživljavanja u odraslih osoba s *de novo* AML-om. Važni su i za određivanje načina, vrste, trajanja i intenziteta liječenja. U AML-u prognošički su pokazatelji bolesnikova dob, opći status, citogenetske i molekularne promjene, leukemijska

masa te sekundarna leukemija. Općenito, osobe mlađe od 65 godina imaju povoljniju prognozu (Kantarjian i sur., 2006), a osim „kalendarske“ dobi, ulogu igra i biološka dob (Grković i Labar, 2011). Hipocelularna leukemija pozitivan je prognostički čimbenik dok je leukemija koja se razvija iz mijelodisplastičnog sindroma i mijeloproliferativne bolesti te leukemija koja nastaje nakon kemoterapije ili zračenja nepovoljni čimbenik. Kako su citogenetske i molekularne genske promjene najznačajniji pokazatelji, na temelju njih ELN (engl. *European LeukemiaNet*) dijeli akutnu mijeloičnu leukemiju u tri kategorije rizika, povoljnu, srednju i nepovoljnu (Tablica 2).

Tablica 2. Klasifikacija rizika prema ELN-u pri početnoj dijagnozi iz 2022. (preuzeto i prilagođeno prema Döhner i sur. (2022)).

Kategorija rizika	Genetske promjene
Povoljna	t(8;21)(q22;q22.1)/ <i>RUNX1::RUNX1T1</i>
	inv(16)(p13.1q22) ili t(16;16)(p13.1;q22)/ <i>CBFB::MYH11</i>
	mutirani <i>NPM1</i> bez <i>FLT3-ITD</i>
	bZIP mutirani u okviru čitanja <i>CEBPA</i>
Srednja	mutirani <i>NPM1</i> s <i>FLT3-ITD</i>
	divlji tip <i>NPM1</i> s <i>FLT3-ITD</i> (bez nepovoljnih genetskih lezija)
	t(9;11)(p21.3;q23.3)/ <i>MLLT3::KMT2A</i>
	citogenetske i/ili druge molekularne promjene koje nisu kvalificirane kao povoljne ili nepovoljne
Nepovoljna	t(6;9)(p23.3;q34.1)/ <i>DEK::NUP214</i>
	t(v;11q23.3)/ <i>KMT2A</i> -preustroj
	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) ili t(3;3)(q21.3;q26.2)/ <i>GATA2, MECOM(EV11)</i>
	t(3q26.2;v)/ <i>MECOM(EV11)</i> -preustroj 25 ili del(5q); 27; 217/abn(17p)

	kompleksni kariotip, monosomni kariotip
	mutirani <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/ili <i>ZRSR2</i>
	mutirani <i>TP53</i>

MRD se može koristiti za procjenu prognoze, praćenja i odgovora na terapiju. Najkorištenije metode određivanja MRD-a su multiparameterska protočna citometrija i lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu (qPCR, engl. *real-time polymerase chain reaction*). Kod osoba koje su postigle MRD, petogodišnje ukupno preživljavanje (OS, engl. *overall survival*) iznosi 68 %, a petogodišnje ukupno preživljavanje iznosi 34 %, za one koji nisu postigli MRD (Shimony i sur., 2023).

1.4. IZOCITRAT DEHIDROGENAZE

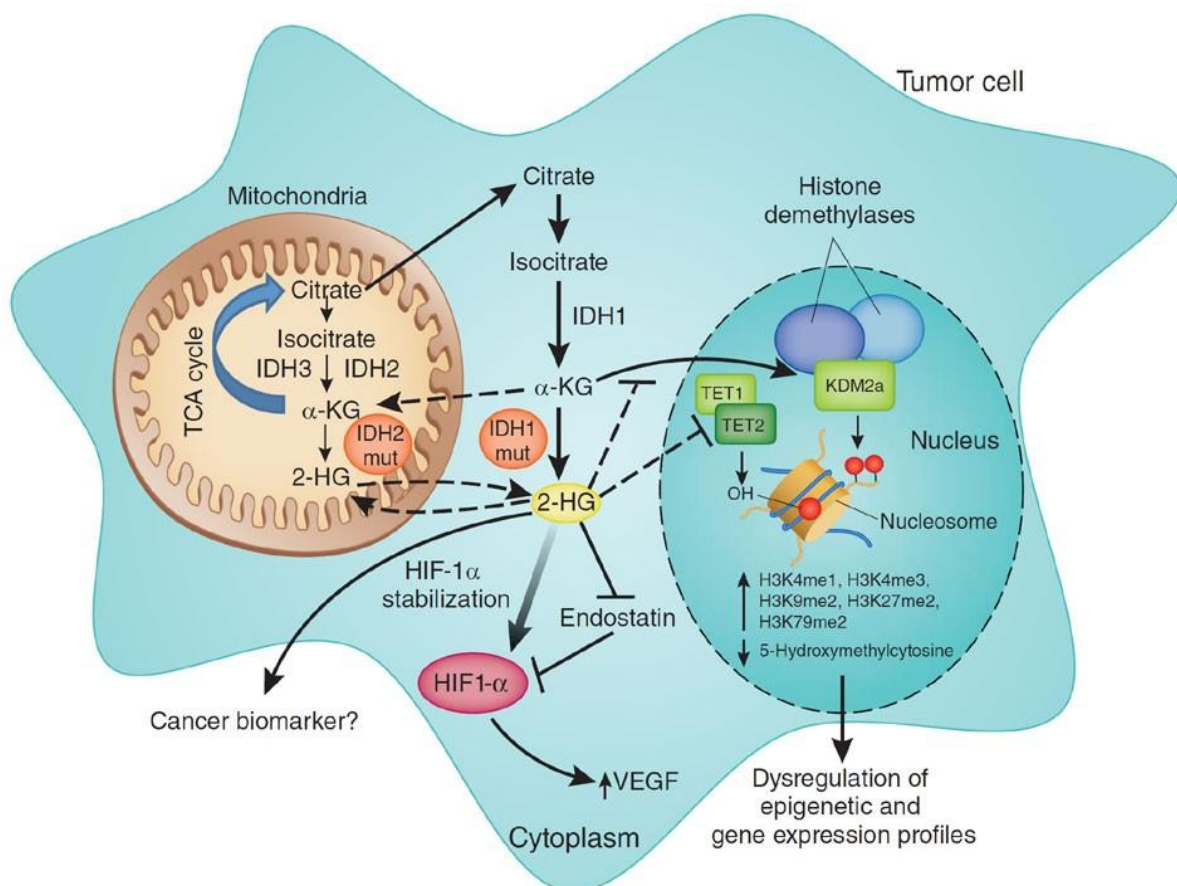
Izocitrat dehidrogenaze (IDH) su enzimi uključeni u metabolizam stanice. Dio su Krebsovog ciklusa te su zajedno s putom pentoza fosfata važne za generiranje nikotinamid adenin dinukleotid fosfata (NADPH, engl. *nicotinic adenine dinucleotide phosphate*). IDH obitelj čine tri enzima izocitrat dehidrogenaza jedan, dva i tri. IDH1 i IDH2 su homodimerni enzimi kodirani *IDH1* i *IDH2* genima lociranim na kromosomima 2q34 i 15q26 (Byun i sur., 2022). IDH3 je tetramerni enzim čiji je gen lociran na kromosomu 15q25. IDH1 se nalazi u citosolu i peroksisoma, a IDH2 i IDH3 u mitohondrijima. IDH proteini kataliziraju reverzibilnu reakciju NAD^+ ili NADP^+ ovisne oksidativne dekarboksilacije izocitarata do α -ketoglutarata (α -KG) (Rakheja i sur., 2012). Oksidacijom izocitrata proizvede se jedan ekvivalent NADPH. NADPH je esencijalan redukcijski faktor koji redukcijom glutationa i tioredoksina kontrolira stanične obrambene mehanizme protiv oksidativnog oštećenja (Dang i sur., 2016). Također, mnoge dioksisgenaze ovise o adekvatnim razinama α -KG za obavljanje svoje funkcije.

1.4.1 IDH mutacije

Mutacije gena za izocitrat dehidrogenazu nalazimo u oko 20 % *de novo* dijagnosticiranih slučajeva akutne mijeloične leukemije (EINahass i sur., 2020). Bolesnici s *IDH* mutacijama, pri dijagnozi su često stariji, imaju povišene trombocite i blaste u perifernoj krvi i koštanoj srži te izraženiju neutropeniju (Byun i sur., 2022). Osim u AML-u javljaju se i u ograničenom broju drugih tumora uključujući gliome, kolangiokarcinom, hondrosarkom, angioimunoblastični T-stanični limfom te mijeloične malignitete poput mijelodisplastičnog sindroma i mijeloproliferativnih neoplazmi (Favre i sur., 2022; Wouters, 2021). *IDH* mutacije su

dominantno somatske, rijetko spolne, većinom heterozigotne i međusobno isključive te se javljaju puno češće kod normalnog kariotipa. Mutacije *IDH1* i *IDH2* gena predstavljaju rane događaje u patogenezi bolesti te mogu pokrenuti tumorigenezu (Figueroa i sur., 2010). Nije pokazano da su mutacije *IDH3* gena onkogene (Medeiros i sur., 2017). *IDH* mutacije ostaju stabilne tijekom tijeka bolesti te se prezentiraju i nakon povratka bolesti. Najčešća je komutacija mutacija *NPM1* (engl. *nucleophosmin 1*) gena, ali česte su i mutacije *DNMT3A*, *SRSF2* (engl. *serine and arginine rich splicing factor 2*) te *FLT3* gena (Wouters, 2021). *IDH* mutacije su zamjenske mutacije (engl. *missense mutation*) locirane na tri *hotspot* kodona *IDH1^{R132}*, *IDH2^{R140}* i *IDH2^{R172}*. Dolazi do zamjene jednog od tri konzervirana argininska ostataka u aktivnom središtu enzima ključna za vezanje izocitrata hidrofilnim interakcijama. Posljedično, smanjuje se afinitet enzima za izocitrat, a povećava za α -KG. Mutirani enzimi stječu neomorfnu enzimsku aktivnost te kataliziraju NADPH ovisnu redukciju α -KG do onkogenog R-enantiomera 2-hidroksiglutarata (R-2-HG). U homeostazi je R-2-HG prisutan u niskim koncentracijama te njegova metabolička funkcija nije poznata. Kada je prisutna mutacija *IDH* gena, R-2-HG se nakuplja te zbog strukturne sličnosti s α -KG djeluje kao kompetitivni inhibitor α -KG ovisnih dioksigenaza (Dang i sur., 2016; Inoue i sur., 2016). Na povišene razine R-2-HG, najosjetljiviji su kromatin modificirajući enzimi histon lizin demetilaze koje sadrže JumonjiC domenu i TET 5-metilcitozin dioksigenaze 2, a niske razine α -KG utječu najviše na prolil hidroksilaze (Rakheja i sur., 2012). Ove dioksigenaze uključene su u razne stanične procese poput demetilacije histona, DNA modifikacije te prilagodbe hipoksiji. Inhibicija ovih epigenetskih regulatora dovodi do hipermetilacije DNA i histona čime se mijenja ekspresija određenih gena (Xu i sur., 2011). Što znači da prekomjerna ekspresija mutiranih *IDH* enzima može inducirati hipermetilaciju histona i DNA te na taj način blokirati staničnu diferencijaciju. Pokazano je da R-2-HG aktivira HIF (engl. *hypoxia-inducible factor*) proril hidroksilazu (Chaturvedi i sur., 2013). HIF prolil-4-hidroksilaza obilježava HIF transkripcijski faktor za poliubikvitinaciju te degradaciju u proteosomu. Niske razine HIF-a utječu na neke mehanizme transformacije, ali ujedno i potiskuju angiogenezu, koja je važna za agresivnost tumora (Koivunen i sur., 2012). Također, leukemijske stanice parakrinom sekrecijom R-2-HG induciraju stabilizaciju NF- κ B (engl. *nuclear factor kappa-light-chain enhancer of activated B cells*) signalnog puta i transkripcijsku aktivnost u stromalnim stanicama što ih potiče na sekreciju interleukina 6 i 8 te komponente komplementa 5, koji stimuliraju proliferaciju blasta (Byun i sur., 2022). Ujedno, R-2-HG smanjuje aktivnost citokrom C oksidaze i na taj način dovodi do povećane ovisnosti o antiapoptotskom proteinu BCL2 (engl. *B-cell leukemia/lymphoma 2*) (Issa i DiNardo, 2021; Wouters, 2021).

Budući da su mutacije stabilne, moguće ih je koristiti kao marker za praćenje bolesti, odgovora na terapiju i mjerenja MRD-a (Rakheja i sur., 2012). Također, mjerenje 2-HG ima potencijalno dijagnostičko i prognostičko značenje jer su njegove razine pedeset puta više kod bolesnika s *IDH* mutacijama nego kod divljeg tipa *IDH*-a (*IDHwt*, engl. *wild type IDH*) te dobro korelira s brojem leukocita (DiNardo i sur., 2013). Prognostička značajnost *IDH* mutacija je kontroverzna. Povezuje ih se i s nepovoljnim, srednjim i povoljnim ishodom, a mogući uzrok toj razlici je različitost u metodologiji (Medeiros i sur., 2017). Za sada *IDH* mutacije nisu uvrštene ni u jednu ELN prognostičku skupinu zbog nedovoljno dokaza, a čini se da na prognostički značaj *IDH* mutacija utječu komutacije te lokacija mutacija (Medeiros i sur., 2017). Marcucci i sur. (2010) utvrdili su genskom analizom uzorka 358 bolesnika s dijagnozom AML-a da nema značajnije razlike u ishodu između bolesnika s mutiranim *IDH1* i *IDH2^{R140}* i onih s *IDHwt*. S druge strane, pokazali su da je stopa potpune remisije (CR, engl. *complete remission*) kod bolesnika s mutacijom *IDH2^{R172}* značajnije niža nego kod bolesnika s *IDHwt* te da je ta razlika bila značajnija u bolesnika starijih od 60 godina.



Slika 1. Neomorfna aktivnost IDH1 i IDH2 te signalni putevi α -KG (preuzeto iz Prensner i Chinnaiyan, (2011)).

1.5. TERAPIJA AKUTNE MIJELOIČNE LEUKEMIJE

Cilj terapije AML-a je kontrola te ako je moguće iskorjenjivanje bolesti. Idealno, to se postiže intenzivnom uvodnom kemoterapijom nakon čega slijedi postremisijska terapija. Uvodna terapija, koja se sastoji od antraciklina i citarabina (7 + 3 režim), standard je za sve bolesnike koji su podobni za intenzivnu kemoterapiju. Bolesnicima starijim od 75 godina te onima koji nisu podobni za intenzivnu kemoterapiju propisuje se venetoklaks u kombinaciji s hipometilacijskim lijekovima. Stopa petogodišnjeg OS-a nakon standardne terapije kod mlađih osoba iznosi 40 do 50 % , a 10 do 15 % kod recidiva, starijih osoba, onih kojima je dijagnosticiran sekundarni AML te kod onih kod kojih terapija nije djelovala (Stein i sur., 2017). Postoji ograničen broj lijekova koji se može primijeniti ako standardna terapija ne djeluje ili je došlo do recidiva (R/R AML, engl. *relapsed or refractory AML*). Glavna terapija R/R AML-a alogena je transplantacija hematopoetskih matičnih stanica, ako su osobe podobne za intenzivnu kemoterapiju. Zbog brojnih bolesnika koji ne mogu tolerirati intenzivnu uvodnu i potpurnu terapiju, potrebna su nova rješenja. Odobrene spasonosne opcije postoje samo za one s *FLT3* mutacijama (gilteritinib, sorafemib i druge) i one s *IDH* mutacijama (ivosidenib i enasidenib). Iako je napredak molekularne patogeneze i razvoja novih lijekova za AML značajan, liječenje R/R AML-a i dalje ostaje zahtjevno.

1.5.1. Inhibitori izocitrat dehidrogenaza

Nekoliko malih molekula, s ciljem inhibicije mutiranih IDH, razvijeno je ili je još uvijek u kliničkom razvoju. Postoje inhibitori isključivo IDH1 (ivosidenib, olutasidenib, IDH305, BAY1436032), isključivo IDH2 (enasidenib) te inhibitori i IDH1 i IDH2 (vorasidenib, HMPL306, LY3410738). Kernytsky i sur. (2015) pokazali su da selektivna inhibicija mutiranih IDH može poništiti hipermetilaciju DNA i histona blokirajući proizvodnju R-2-HG-a što dovodi do aktivacije gena uključenih u staničnu diferencijaciju. Trenutno je *Food and Drug Administration* (FDA) jedino odobrila ivosidenib i enasidenib. Metaanalizom koju su proveli Chen i sur. (2023), zaključeno je da dok se terapija isključivo IDH inhibitorima ili u kombinaciji nije pokazala efikasnijom no drugih terapija kod *de novo* dijagnosticiranih IDH AML bolesnika, ali da je obećavajuća terapija za R/R IDH AML. Ovi su lijekovi većinom i ispitani kod bolesnika s R/R AML-om te njihovim korištenjem oko 20 % bolesnika postiže CR, a stopa ukupnog odgovora uključujući i hematološko poboljšanje iznosi oko 40 % (DiNardo i sur., 2018). S druge strane Europska agencija za lijekove (EMA, engl. *European Medicines Agency*) odobrila je jedino ivosidenib za liječenje novodijagnosticiranog AML-a kod bolesnika s *IDH1* R132 mutacijom, koji nisu podobni za liječenje standardnom kemoterapijom. Ivosidenib i enasidenib

bolesnici dobro podnose i kao monoterapiju i u kombinaciji s kemoterapijom. Najčešći teški štetni simptomi oba lijeka su sindrom diferencijacije te produljenje QT intervala kod ivosideniba i hiperbilirubinemija kod enasideniba (Döhner i sur., 2022; Norsworthy i sur., 2019). Rezistencija na ove lijekove povezana je s *NRAS* komutacijama i prisutnosti više od šest mutacija istovremeno (Choe i sur., 2020; Kantarjian i sur., 2021).

2. OBRAZLOŽENJE TEME

Akutna mijeloična leukemija heterogena je bolest, koju karakterizira široki spektar molekularnih promjena. Neke od tih promjena ključni su pokretač leukemijskog procesa te utječu na izgled kliničke slike. Kako se pomoću epigenetskih i genetskih analiza uzoraka bolesnika s dijagnozom AML-a došlo do novih spoznaja o molekularnim promjenama i patogenezi AML-a tako su se počele razvijati i nove terapije. Uspješan razvoj ciljanih terapija za bolesnike s *FLT3* te *IDH1* i *IDH2* mutacijama doveo je do poboljšanja stope odgovora i ishoda kod bolesnika kod kojih su pronađene ove mutacije (Testa i sur., 2020). Rezultati genske analize na prisustvo ovih mutacija trebali bi biti dostupni unutar 3 do 5 dana od zaprimanja uzorka kako bi se identificiralo prisustvo meta terapija (Döhner i sur., 2022). Stoga je cilj ovog rada uspostavljanje dijagnostičkog postupka za dokazivanje najčešćih mutacija u genima *IDH1* i *IDH2*.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. ISPITANICI I BIOLOŠKI UZORCI

U svrhu ovog istraživanja analizirano je 40 uzoraka aspirata koštane srži bolesnika s dijagnozom akutne mijeloične leukemije kojima je prethodno dokazana *NPM1* mutacija. Uzorci su analizirani u Kliničkom zavodu za laboratorijsku dijagnostiku Kliničkog bolničkog centra Zagreb u razdoblju od 2020. do 2023. godine. Svi ispitanici potpisali su informirani pristanak za dobrovoljno sudjelovanje u istraživanjima.

3.2. MATERIJALI

Tablica 3. Kompleti reagensa korišteni tijekom izvedbe eksperimenta.

NAZIV	SADRŽAJ	PROIZVOĐAČ
komplet reagensa za izdvajanje DNA <i>QIAamp</i> [®] <i>DNA Blood Mini Kit</i>	<ul style="list-style-type: none">• kolone za odvajanje DNA (<i>QIAamp</i>[®] <i>Mini Spin Columns</i>)• epruvete za prikupljanje DNA (<i>Collecton Tubes</i>, 2 mL)• pufer AL• koncentrirani pufer AW1• koncentrirani pufer AW2• pufer AE• liofilizirana proteaza (<i>QIAGEN</i>[®] <i>Protease</i>)• otapalo za proteazu• adapteri za rotor	QIAGEN, Njemačka
komplet reagensa za određivanje koncentracije izdvojene DNA <i>Qubit</i> [™] <i>dsDNA Broad Range Assay Kit</i>	<ul style="list-style-type: none">• <i>Qubit</i>[™] <i>dsDNA BR</i> reagens• <i>Qubit</i>[™] <i>dsDNA BR</i> pufer• <i>Qubit</i>[™] <i>dsDNA BR</i> standard #1• <i>Qubit</i>[™] <i>dsDNA BR</i> standard #2	Thermo Fisher Scientific, SAD
komplet reagensa za detekciju <i>IDH1/IDH2</i> mutacija <i>EasyPGX</i> [®] <i>ready IDH1/2</i>	<ul style="list-style-type: none">• osam mikroepreveta u nizu koje sadrže liofilizirane specifične početnice i probe (<i>EasyPGX</i>[®] <i>IDH1/2 strips</i>)• čepovi za osam mikroepreveta u nizu (<i>8-strip flat optical caps</i>)• liofilizirana <i>EasyPGX</i>[®] <i>IDH1/2</i> pozitivna kontrola	Diatech Pharmacogenetics, Italija

	<ul style="list-style-type: none"> voda bez DNAaze i RNAaze 	
komplet reagensa za umnažanje PCR-om <i>AmpliTaq Gold® DNA Polymerase Kit</i>	<ul style="list-style-type: none"> <i>AmpliTaq Gold® DNA</i> polimeraza <i>GeneAmp 10x koncentriran PCR Gold®</i> pufer 25 mM otopina MgCl₂ 	Thermo Fisher Scientific, SAD
komplet reagensa za pročišćivanje PCR produkata <i>ExoProStar™ 1-Step</i>	<ul style="list-style-type: none"> <i>illustra™</i> smjesa egzonukleaze I i alkalne fosfataze 	Cytiva, Ujedinjeno Kraljevstvo
komplet reagensa za reakciju sekvenciranja	<ul style="list-style-type: none"> reakcijska smjesa <i>BigDye™ Terminator v3.1 Ready Reaction Mix</i> 5x pufer za sekvenciranje <i>BigDye™ terminator v1.1 & v3.1 Sequencing Buffer</i> 	Thermo Fisher Scientific, SAD
komplet reagensa za pročišćivanje produkta PCR-a s obilježenim nukleotidima	<ul style="list-style-type: none"> <i>NucleoSEQ®</i> kolonice <i>Sterilne epruvete</i> 	Macherey-Nagel Bioanalysis™, Njemačka

Tablica 4. Korišteni uređaji.

NAZIV	PROIZVOĐAČ
uređaj za izdvajanje DNA <i>QIAcube®</i>	QIAGEN, Njemačka
<i>Qubit® 3.0</i> fluorometar	Thermo Fisher Scientific, SAD
uređaj za qPCR <i>EasyPGX® instrument qPCR 96</i>	Diatech Pharmacogenetics, Italija
uređaj za PCR <i>MiniAmp™ Plus Thermal Cycler</i>	Thermo Fisher Scientific, SAD
uređaj za kapilarnu elektroforezu <i>AB Genetic Analyzer 3130xl</i>	Thermo Fisher Scientific, SAD

3.3. METODE

3.3.1. Izdvajanje DNA

Izdvajanje genomske DNA iz stanica aspirata koštane srži provedo se uporabom komercijalno dostupnog kompleta reagensa *QIAamp® DNA Blood Mini Kit* na automatiziranom uređaju *QIAcube®*.

Prvi je korak na 20 µL *QIAGEN®* proteaze dodati 200 µL uzorka u sterilnim mikroeprevetama. Zatim se dodaje 200 µL pufera za lizu (pufer AL) te 200 µL etanola prilikom čega dolazi do lize stanica, razgradnje proteina te oslobađanja DNA. Slijedi korak pročišćivanja s 500 µL pufera AW1 pa 500 µL AW2 prilikom čega se DNA veže za silika membranu, a proteini i ostale interferirajuće tvari prolaze kroz njene pore. Posljednji je korak eluiranje s 200

μL pufera AE. Pufer AE kida veze između DNA i silika membrane te u eluatu nalazimo čistu izdvojenu DNA.

3.3.2. Određivanje koncentracije izdvojene DNA

Koncentracija izdvojene DNA određivala se na *Qubit*[®] 3.0 fluorometru pomoću komercijalno dostupnog kompleta reagensa *Qubit*[®] *dsDNA Broad Range*.

Priprema se *Qubit*[®] radna otopina razrjeđivanjem *Qubit*[®] *dsDNA BR* reagensa u omjeru 1 naprema 200 s *Qubit*[®] *dsDNA BR* puferom. U svaku se mikroeprevetu otpipetira 190 μL radne otopine i 10 μL standardna odnosno uzorka izdvojene DNA te se epruvete kratko miješaju na vrtložnoj miješalici. Nakon dvominutnog inkubiranja, koncentracije DNA očitavaju se na *Qubit*[®] 3.0 fluorometru. Fluorescentna se boja iz reagensa veže za dvolančanu DNA te nakon obasjavanja fotodiodom, ona boja koja se vezala za DNA emitira fluorescenciju. Fluorometar detektira intenzitet fluorescencije, a koncentracija DNA dobiva se iz grafa ovisnosti fluorescencije o koncentraciji DNA odnosno iz kalibracijske krivulje.

3.3.3. Lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu

Za dokazivanje *IDH1* i *IDH2* mutacija korišten je komercijalni komplet reagensa *EasyPGX*[®] *ready IDH1/2* (Diatech Pharmacogenetics, Italija). Komplet reagensa namijenjen je za kvalitativnu detekciju lančanom reakcijom polimerazom u stvarnom vremenu.

PCR je metoda koja se koristi za brzo *in vitro* umnažanje specifičnih dijelova dvolančane DNA iz vrlo male početne količine DNA u ciklusima. Bazira se na mehanizmima DNA replikacije. Svaki se ciklus sastoji od tri koraka: denaturacije, vezanja početnica i elongacije, koji se provode u različitim vremenskim i temperaturnim uvjetima. U koraku denaturacije, izolirana se DNA zagrijava na temperaturi od oko 95°C pri čemu se njeni lanci razdvajaju u pojedinačne. Kada su lanci DNA razdvojeni, temperatura se spušta na 50 do 65°C, ovisno o korištenim početnicama, te to omogućuje vezanje početnica na DNA kalup. Početnice su kratke oligonukleotidne sekvence komplementarne krajnjim regijama dijela DNA od interesa. Koriste se dvije različite početnice – jedna komplementarna vodećem lancu DNA i druga komplementarna tromom lancu DNA. Komplementarni lanac započet početnicama produljuje se ugradnjom deoksiribonukleozid-trifosfata (dNTP, engl. *deoxyribonucleotide triphosphate*) od 5' prema 3' kraju. Reakciju elongacije katalizira termostabilna Taq polimeraza, koja je izolirana iz termofilne bakterije *Thermus aquaticus* što ju čini stabilnom pri visokim temperaturama pri kojima se odvijaju reakcije PCR-a. Optimalna temperatura za djelovanje Taq polimeraze je 72°C. Nakon polimerizacije temperatura se podiže na 95°C te se započinje novi

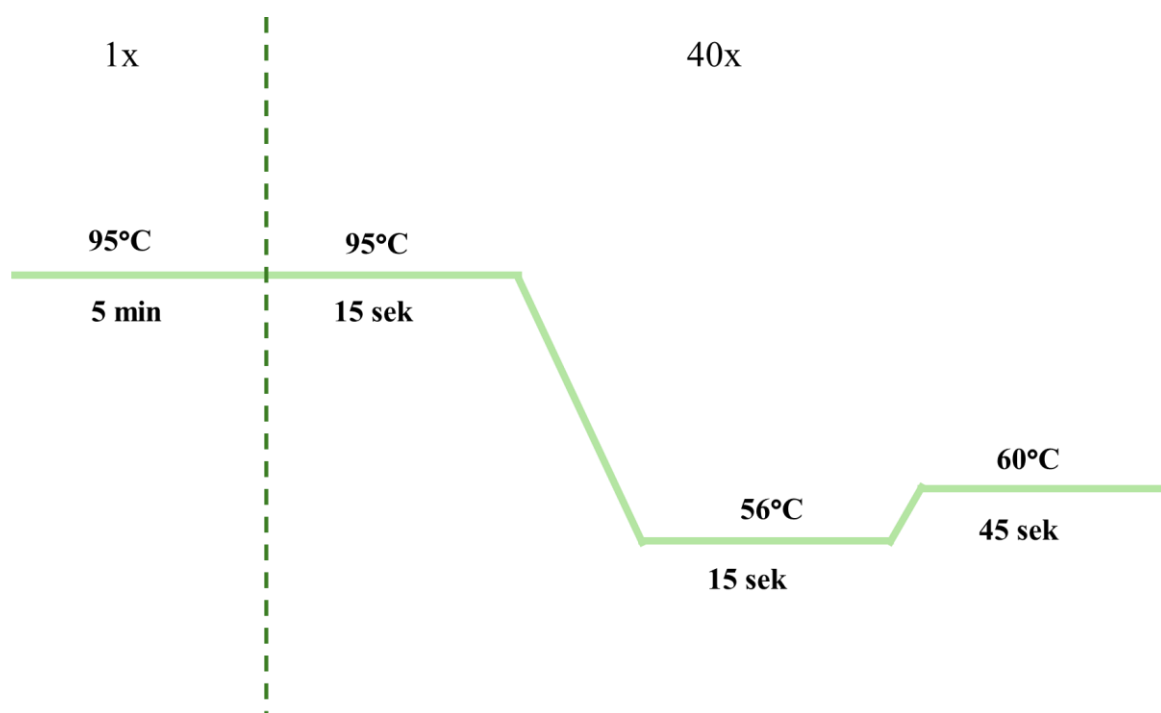
ciklus umnažanja ciljanih sekvenci DNA kalupa. Broj novonastalih lanaca je 2^n , gdje n označava broj PCR ciklusa.

Postoje brojne modifikacije lančane reakcije polimerazom, a korišten je qPCR. qPCR-om se kontinuirano analiziraju produkti za vrijeme reakcija. Kako bi se detektirali PCR produkti najčešće se uz osnovne sastavnice potrebne za PCR koriste i fluorescentno obilježene oligonukleotidne sonde. Na jednom kraju sonde vezana je fluorescentna boja, a na drugome prigušivač. Fluorescentna boja apsorbira zračenje lasera te emitira zračenje neke druge valne duljine (fluorescira). Kada je prigušivač na udaljenosti od nekoliko nanometara, ima svojstvo apsorpcije emitirane fluorescencije. Što znači da ukoliko je sonda čitava odnosno fluorescentna boja i sonda su međusobno blizu, dolazi do potpune apsorpcije fluorescencije i ona se ne bilježi. Ta se pojava naziva fluorescentni rezonantni prijenos energije (FRET, engl. *fluorescence resonance energy transfer*). Taq polimeraza ima 5'→3' egzonukleaznu aktivnost koja joj omogućuje kidanje dNTP-ova koji se nalaze ispred nje. Kako Taq polimeraza sintetizira komplementarni lanac tako dolazi do sonde i hidrolizira ju. Fluorescentna boja i prigušivač se razdvajaju, a detektor mjeri fluorescenciju. Do cijepanja sonde dolazi isključivo ako je ona u potpunosti komplementarna DNA kalupu što i omogućuje pronalazak točkastih mutacija. Ako sonda nije savršeno komplementarna, doći će do kompletnog odvajanja sonde.

Prije pipetiranja uzoraka i kontrola u *EasyPGX® IDH1/2* i *EasyPGX® pos ctrl* mikroeprevete u nizu potrebno je mikroeprevete centrifugirati 10 sekundi te provjeriti nalazi li se liofilizat na dnu jažica. Pozitivna se kontrola otapa u 700 μ L vode te miješa 10 sekundi na vrtložnoj miješalici pa centrifugira 10 sekundi. Kako bi se postiglo potpuno otapanje liofilizata potrebno je dobivenu otopinu ostaviti trideset minuta na sobnoj temperaturi prije korištenja. U odgovarajuću mikroeprevetu dodaje se 25 μ L vode (negativna kontrola), 25 μ L DNA (uzorak) te 25 μ L otopljene pozitivne kontrole (Slika 2). Potom se sadržaj mikroepreveta u nizu miješa na vrtložnoj miješalici 5 sekundi te centrifugira 10 sekundi. Uzorci se stavljaju u uređaj za qPCR *EasyPGX® qPCR instrument 96*, a uvjeti reakcija prikazani su na Slici 3.

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
IDH1 G105G	A	2130/2018H	1692/2020H	2956/2020H	131/2021H	798/2021H	1885/2021H	2604/2022H	277472022H	2246C/2022H	3135/2022H	POS	NEG
IDH1 R132H	B	2130/2018H	1692/2020H	2956/2020H	131/2021H	798/2021H	1885/2021H	2604/2022H	277472022H	2246C/2022H	3135/2022H	POS	NEG
IDH1 R132C	C	2130/2018H	1692/2020H	2956/2020H	131/2021H	798/2021H	1885/2021H	2604/2022H	277472022H	2246C/2022H	3135/2022H	POS	NEG
IDH1 R132x	D	2130/2018H	1692/2020H	2956/2020H	131/2021H	798/2021H	1885/2021H	2604/2022H	277472022H	2246C/2022H	3135/2022H	POS	NEG
IDH2 R140x	E	2130/2018H	1692/2020H	2956/2020H	131/2021H	798/2021H	1885/2021H	2604/2022H	277472022H	2246C/2022H	3135/2022H	POS	NEG
IDH2 R172K	F	2130/2018H	1692/2020H	2956/2020H	131/2021H	798/2021H	1885/2021H	2604/2022H	277472022H	2246C/2022H	3135/2022H	POS	NEG
IDH2 R172x	G	2130/2018H	1692/2020H	2956/2020H	131/2021H	798/2021H	1885/2021H	2604/2022H	277472022H	2246C/2022H	3135/2022H	POS	NEG
IDH1/2 CTRL	H	2130/2018H	1692/2020H	2956/2020H	131/2021H	798/2021H	1885/2021H	2604/2022H	277472022H	2246C/2022H	3135/2022H	POS	NEG

Slika 2. Prikaz pločice za qPCR. Preuzeto iz *EasyPGX*® softvera.



Slika 3. Uvjeti qPCR-a: inicijalna denaturacija na 95°C u trajanju od 5 minuta, denaturacija na 95°C u trajanju od 15 sekundi, vezanje početnica na 56°C u trajanju od 15 sekundi te elongacija na 60°C u trajanju od 45 sekundi. Izrađeno u programu MS Word.

Tablica 5. Popis mutacija koje se mogu detektirati uporabom komercijalnog kompleta reagensa (preuzeto i prilagođeno prema EasyPGX® ready IDH1/2 UserManual, 2021 (Diatech Pharmacogenetics, Italija). *Test ne razlikuje između ovih mutacija. Sve su mutacije zamjenske mutacije. Malo tiskano c označava da je riječ o cDNA sekvenci. Broj u stupcu „Zamjena nukleotida“ označava poziciju nukleotida, a u stupcu „Zamjena AK“ označava poziciju kodona. Velika tiskana slova u stupcu „Zamjena nukleotida“ označavaju koji nukleotid je iz divljeg tipa sekvence (prvo slovo) zamijenjen drugim u mutiranoj sekvenci, a velika slova u stupcu „Zamjena AK“ označavaju koja je aminokiselina iz divljeg tipa (prvo slovo) zamijenjena aminokiselinom iz mutirane sekvence (drugo slovo). A-adenin, C-citozin, C-cistein, G-glicin, G-gvanin, H-histidin, K-lizin, R-arginin, T-timin, x-bilo koja AK

Gen i HGVS nomenklatura	lokus gena	zamjena nukleotida	zamjena AK
IDH1 NG_023319.2	2q34	c.315C>T	G105G
		c.395G>A	R132H
		c.394C>T	R132C
		c.394C>A, c.394C>G, c.395G>T, c.394_395CG>AT, c.394_395CG>GT*	R132x
IDH2 NG_023302.1	15q26.1	c.418C>G, c.418C>T, c.419G>A, c.419G>T*	R140x
		c.514 A/G	R172K
		c.514A>G, c.514A>T, c.515G>C, c.515G>T, c.516G>C, c.516G>T*	R172x

3.3.4. Sangerovo sekvenciranje

Sangerovo je sekvenciranje metoda koja se zasniva na ugradnji dideoksinukleotida (ddNTP, engl. *dideoxynucleotide*) u lanac DNA što uzrokuje preuranjen prestanak sinteze. Dideoksiribonukleotidima nedostaje 3'-OH skupina na deoksiribozi što onemogućava DNA polimerazi katalizu stvaranja fosfodieterske veze sa sljedećim nukleotidom. U automatiziranoj inačici Sangerove metode koriste se četiri različita fluorofora vezana za četiri različita ddNTP-a. Korištenje fluorofora omogućuje odvijanje reakcija sekvenciranja u jedinstvenoj reakcijskoj smjesi. Sangerovo sekvenciranje rezultira stvaranjem elongacijskih produkata koji se razlikuju po duljini za jedan nukleotid. Ti fragmenti DNA razdvajaju se kapilarnom elektroforezom na automatskom sekvenceru. Laser ekscitira fluorescentno obilježene DNA fragmente kako prolaze kroz detekcijski prozor. Svjetlost karakteristične valne duljine koju emitira fluorofor detektira svjetlosni senzor. Detektirani signal se računalno prevodi u oblik elferograma iz kojeg se očitava nukleotidni slijed.

Budući da je dovoljno sekvencirati samo dio DNA od interesa, ciljanu sekvencu potrebno je prvo umnožiti. Za umnažanje PCR-om, koristile su se četiri različite početnice komplementarne sekvencama unutar gena *IDH1* i *IDH2* (Tablica 6). Njihove sekvence i orijentacije navedene su u tablici 6. One dolaze u obliku liofilizata pa ih je potrebno otopiti u sterilnoj vodi te homogenizirati na vrtložnoj miješalici i centrifugirati.

Tablica 6. Oligonukleotidne početnice korištene za PCR i PCR s obilježenim nukleotidima.

POČETNICA	SEKVENCA POČETNICE	ORIJENTACIJA
IDH1 F	5' AGCTCTATATGCCATCACTGC 3'	nizvodna
IDH1 R	5' AACATGCAAAATCACATTATTGCC 3'	uzvodna
IDH2 F	5' AATTTTAGGACCCCCGTCTG 3'	nizvodna
IDH2 R	5' CTGCAGAGACAAGAGGATGG 3'	uzvodna

FASTA sekvenca fragmenta gena *IDH1* s označenim početnicama i mutacijama (početnice su istaknute sivo, kodoni na kojima dolazi do mutacije crveno, nukleotidi koji su dio egzona su podebljani, a oni koji su dio introna nisu) prema NCBI (engl. *The National Center for Biotechnology Information*):

NG_023319.2 HOMO SAPIENS ISOCITRATE DEHYDROGENASE (NADP⁺) 1 (IDH1), REFSEQGENE (LRG_610) ON CHROMOSOME 2.

AGATTTTGGTGTACTCAGAGCCTTCGCTTTCTGCATAATGAGCTCTATATGCCAT
CACTGCAGTTGTAGGTTATAACTATCCATTTGTCTGAAAACTTTGCTTCTAA
TTTTTCTCTTTCAAGCTATGATTTAGGCATAGAGAATCGTGATGCCACCAAC
GACCAAGTCACCAAGGATGCTGCAGAAGCTATAAAGAAGCATAATGTTGGC
GTCAAATGTGCCACTATCACTCCTGATGAGAAGAGGGTTGAGGAGTTCAAGT
TGAAACAAATGTGGAATCACCAAATGGCACCATACGAAATATTCTGGGTGG
CACGGTCTTCAGAGAAGCCATTATCTGCAAAAATATCCCCGGCTTGTGAGT
GGATGGGTAAAACCTATCATCATAGGTGGT**CGT****CATGCCTTATGGGGATCAAGTAA**
GTCATGTTGGCAATAATGTGATTTTGCATGTTTTTTTTTTCATGGCCAGAAAT
TTCCAAC

FASTA sekvenca fragmenta gena *IDH2* s označenim početnicama i mutacijama (početnice su istaknute sivo, kodoni na kojima dolazi do mutacije crveno, nukleotidi koji su dio egzona su podebljani, a oni koji su dio introna nisu) prema NCBI (engl. *The National Center for Biotechnology Information*):

NG_023302.1 HOMO SAPIENS ISOCITRATE DEHYDROGENASE (NADP⁺) 2 (IDH2), REFSEQGENE (LRG_611) ON CHROMOSOME 15.

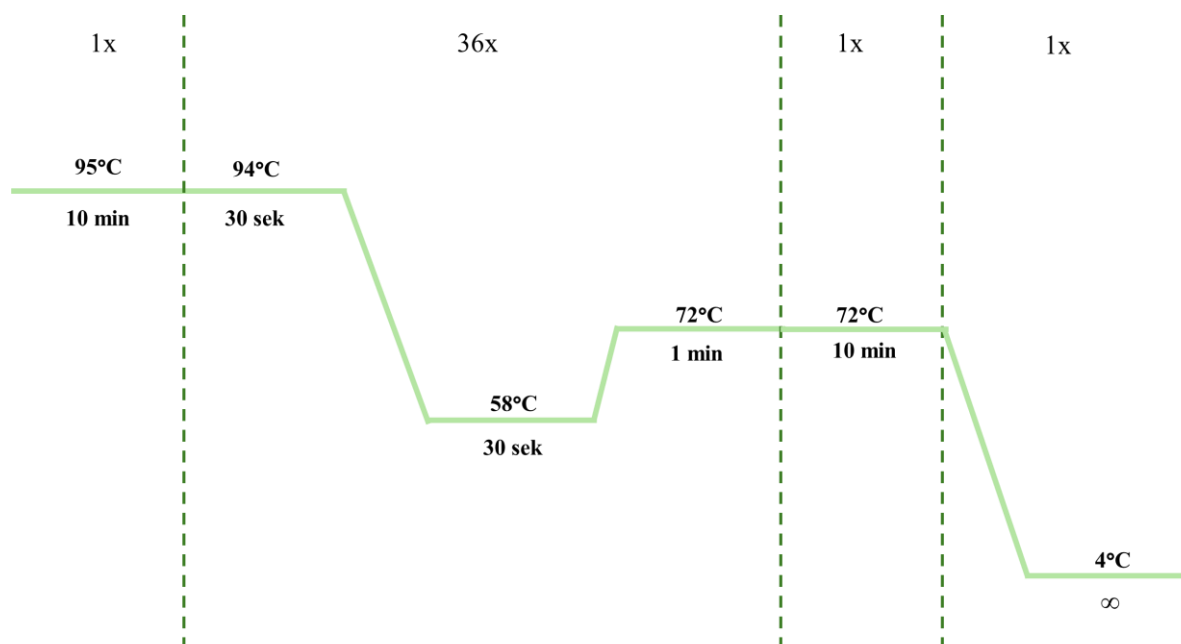
CTAGACTCTACTGCCTTCCTCATGAAGAATTTTAGGACCCCCGTCTGGCTGTGTTGT
TGCTTGGGGTTCAAATTCTGGTTGAAAGATGGCGGCTGCAGTGGGACCACTATTAT
CTCTGTCCTCACAGAGTTCAAGCTGAAGAAGATGTGGAAAAGTCCCAATGGAA
CTATC**CGG**AACATCCTGGGGGGGACTGTCTTCCGGGAGCCCATCATCTGCAA
AAACATCCCACGCCTAGTCCCTGGCTGGACCAAGCCCATCACCATTGGC**AGG**
CACGCCCATGGCGACCAGGTAGGCCAGGGTGGAGAGGGGATCCACTGACCTGG
GCACCCCCCGACTGGAGCTCCTCGCCTAGCCATCCTCTTGTCTCTGCAGTACAAGG
CCACAGACTTTGTGGCAGACCGGGCCGGCACTTTCAAATG

Potrebni reagensi za PCR i pohranjeni uzorci otapaju se na sobnoj temperaturi, a DNA polimeraza se pohranjuje u hladnjaku do upotrebe. Reagensi, izuzev enzima, se kratko pomiješaju na vrtložnoj miješalici te kratko centrifugiraju. Reakcijska smjesa je napravljena prema protokolu prikazanom u Tablici 7 nakon čega je podijeljena na dva dijela. U jednu reakcijsku smjesu je dodano po 1 μ L *IDH1* F i R početnica, a u drugu po 1 μ L *IDH2* F i R početnica.

Tablica 7. Protokol za izradu reakcijske smjese za PCR.

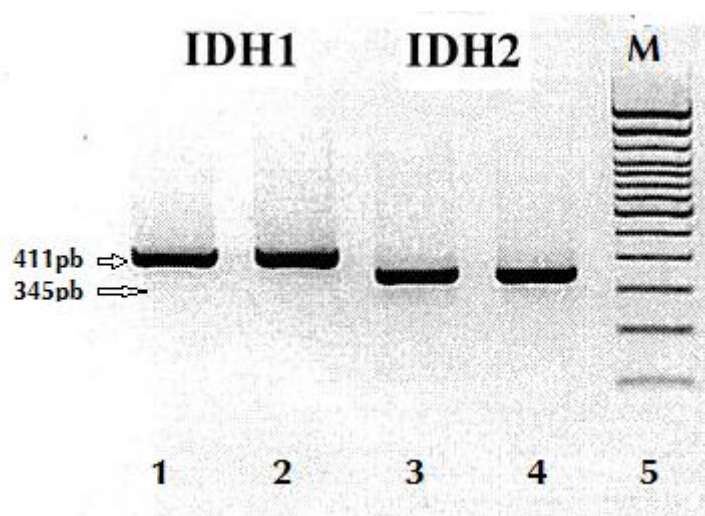
10 x PCR pufer II	5 μ L
25 mM MgCl ₂	3 μ L
10 mM dNTP	4 μ L
ddH ₂ O	32,8 μ L
<i>GOLD® DNA Polymerase</i>	0,25 μ L

Reakcijske smjese *IDH1* i *IDH2* kratko se promiješaju na vrtložnoj miješalici te kratko centrifugiraju. U mikroeprevete za PCR pipetira se 24 μ L reakcijske smjese i 1 μ L izdvojene DNA te se mikroeprevete prenesu u *MiniAmp™ Plus* termoblok.. PCR se provodi prema uvjetima na Slici 4.



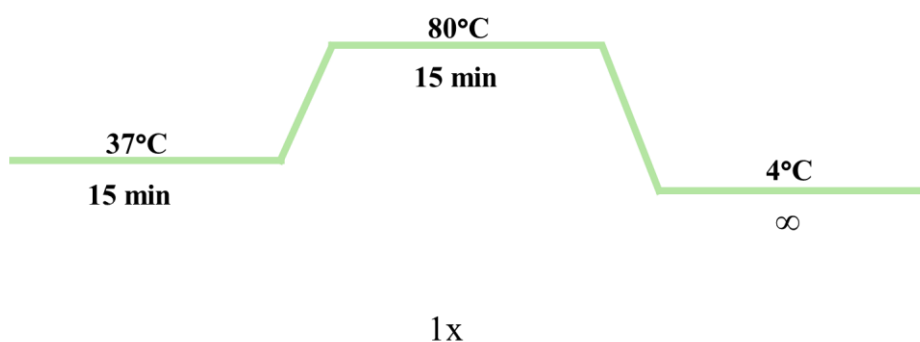
Slika 4. Uvjeti PCR reakcije: inicijalna denaturacija na 95°C 10 minuta, denaturacija na 94°C 30 sekundi, vezanje specifičnih početnica na 58°C 30 sekundi, elongacija na 72°C 1 minutu te završna elongacija na 72°C 10 minuta. Koraci denaturacije, vezanja početnica i elongacije ponavljaju se u 36 ciklusa. Izrađeno u programu MS Word.

Nakon što je proveden PCR, provjerava se prisutnost produkta razdvajanjem na 2 % agaroznom gelu. Produkt veličine 411 parova baza (pb) odgovara *IDH1* sekvenci, a produkt veličine 345 pb odgovara *IDH2* sekvenci (Slika 5).



Slika 5. Prikaz kontrolne elektroforeze na 2 % agaroznom gelu. Produkt veličine 411 pb odgovara *IDH1* sekvenci. Produkt veličine 345 pb odgovara *IDH2* sekvenci.

Slijedi pročišćivanje produkata PCR-a s *ExoProStar*TM *I-Step* kompletom reagensa. *ExoProStar*TM *I-Step* sadrži smjesu *illustra*TM alkalne fosfataze i egzonukleaze I. Ovi su enzimi formulirani za uklanjanje neugrađenih početnica i nukleotida iz reakcija umnažanja. Dok se priprema reakcija, *ExoProStar*TM *I-Step* treba stajati na ledu. U mikroepruvetu se pipetira 10 µL produkta PCR-a i 4 µL *ExoProStar*TM *I-step*. Reakcijska smjesa inkubira se u *MiniAmp*TM *Plus* termobloku 15 minuta na 37°C pa 15 minuta na 80°C kako bi se inaktivirali enzimi (Slika 6).



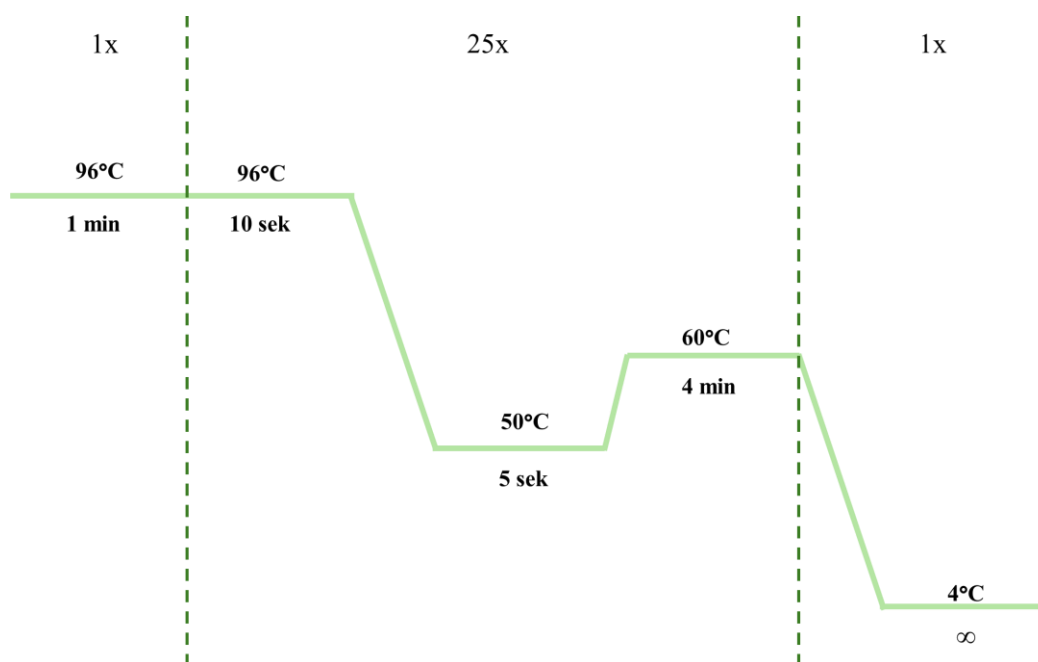
Slika 6. Uvjeti inkubacije reakcijske smjese za pročišćivanje PCR smjese kompletom reagensa *ExoProStar*TM *I-Step*. Izrađeno u programu MS Word.

Nakon pročišćavanja, priprema se PCR smjesa za sekvenciranje. Reagensi iz *BigDye*TM *Terminator v3.1 Cycle Sequencing* kompleta se otapaju na sobnoj temperaturi, miješaju 2 do 3 sekunde na vrtložnoj miješalici te kratko centrifugiraju. PCR smjesa se izrađuje prema protokolu iz Tablice 8. Koriste se R početnice iz PCR-a te ih je prvo potrebno razrijediti.

Tablica 8. Protokol za izradu PCR reakcijske smjese za sekvenciranje.

SASTAV	VOLUMEN
5x Sequencing Buffer	1,75 µL
<i>BigDye</i> TM Terminator Mix	0,5 µL
IDH1 R početnica (3,3 pmol/ µL)	1 µL
IDH2 R početnica (3,3 pmol/ µL)	1 µL

Epruvete sa sastavnicama kompleta reagensa potrebno je kratko miješati na vrtložnoj miješalici pa kratko centrifugirati kako bi se smjesa homogenizirala. Epruvete se odlažu u hladni blok. U sterilne epruvete za PCR dodaje se 6,75 μL produkta pročišćenog s *ExoProStar*TM *1-step* te 3,25 μL pripravljene smjese reagensa. Epruvete s reakcijskom smjesom prenose se na nosač koji se stavlja u *MiniAmp*TM *Plus* termoblok (Slika 7).



Slika 7. Uvjeti PCR-a s obilježenim početnicama: inicijalna denaturacija na 96°C u trajanju od 1 minute, denaturacija na 96°C u trajanju od 10 sekundi, vezanje početnica na 50°C u trajanju od 5 sekundi te elongacija na 60°C u trajanju od 4 minute. Izrađeno u programu MS Word.

Dobiveni produkti PCR-a s obilježenim nukleotidima pročišćavaju se na NucleoSEQ® kolonama. Kolonice se centrifugiraju 30 sekundi na 2600 okretaja u minuti te hidriraju sa 600 μL sterilne vode. Nakon 30 minutne inkubacije na sobnoj temperaturi, skida se čepić s donje strane kolonice, kolonica se stavlja u epruvetu te centrifugira 2 minute na 2600 okretaja u minuti. Eluat se odbacuje, obilježeni se produkt PCR-a otpipetira u sredinu gela u kolonici i centrifugira 5 minuta na 2600 okretaja u minuti. Kolonice se bacaju, a dobiveni eluat sadrži pročišćeni produkt za sekvenciranje. Eluat se stavlja u *MicroAmp*TM *Optical* pločice s 96 jažica, poklapa s pokrovom te stavlja na *Applied Biosystems*® *GA3130xl* analizator za sekvenciranje. Na uređaju se fragmenti DNA odvajaju kapilarnom elektroforezom.

4. REZULTATI

Podatci dobiveni uporabom kompleta reagensa *EasyPGX*® analiziraju se automatski na *EasyPGX*® softveru.

Prvo je potrebno provjeriti zadovoljavaju li pozitivna i negativna kontrola postavljene kriterije. Ako kontrole zadovolje kriterije prihvatljivosti, provjeravaju se razlika vrijednosti graničnog ciklusa za određeni gen i vrijednosti graničnog ciklusa za pozitivnu kontrolu (ΔCq) te razlika $Rn+$ i $Rn-$ (ΔR). Rn je količnik intenziteta fluorescentne emisije boje i intenziteta fluorescentne emisije pasivne referentne boje. $Rn+$ vrijednost dobiva se kada se u reakcijskoj smjesi nalaze sve komponente uključujući i kalup. $Rn-$ vrijednost dobiva se u uzorku u kojem nije došlo do reakcije, na primjer u reakcijskoj smjesi koja ne sadrži kalup.

$$\Delta Cq = (\text{FAM } Cq \text{ vrijednost uzorka}) - (\text{FAM } Cq \text{ vrijednost pozitivne kontrole})$$

$$\Delta R = (Rn+) - (Rn-)$$

Uzorak se klasificira kao „MUT“ ako je ΔCq manja ili jednaka graničnoj vrijednosti za ovaj test i ako je ΔR veći ili jednak graničnoj vrijednosti za ovaj test.

U *EasyPGX*® softveru u dijelu „Rezultati“ postoje dvije tablice „Sažetak“ i „Detalji“.

Tablica „Sažetak“ omogućuje brzi pregled rezultata koji su automatski klasificirani kao „MUT“ ili „WT“. „MUT“ označava da je u tom uzorku detektirana određena mutacija, a ako se u tablici nalazi kratica „WT“ (engl. *wild type*), u uzorku nije pronađena DNA s određenom mutacijom. Svaki red predstavlja jednog bolesnika, a svaki stupac jednu mutaciju.

Analysis Summary		G105G	R132H	R132C	R132x	R140x	R172K	R172x
N.	Name	Results	Results	Results	Results	Results	Results	Results
1	2130/2018H	WT	WT	WT	WT	WT	MUT	WT
2	1692/2020H	WT	WT	WT	WT	MUT	WT	WT
3	2956/2020H	WT	WT	MUT	WT	WT	WT	WT
4	131/2021H	WT	WT	WT	WT	MUT	WT	WT
5	798/2021H	WT	WT	WT	WT	WT	MUT	WT
6	1885/2021H	WT	WT	WT	WT	WT	MUT	WT
7	2604/2022H	WT	WT	MUT	WT	WT	WT	WT
8	27747/2022H	WT	WT	WT	WT	MUT	WT	WT
9	2246C/2022H	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT
10	3135/2022H	MUT	WT	WT	WT	MUT	WT	WT

Slika 8. Prikaz tablice "Sažetak" u *EasyPGX*® softveru.

Tablica „Detalji“ omogućuje detaljniji prikaz rezultata kontrola i svakog uzorka. Svaki red predstavlja jednog bolesnika odnosno kontrolu, a svaki stupac jednu mutaciju. Svaki je red

podijeljen na dva reda budući da su korištene dvije fluorescentne boje FAM i HEX, a svaki je stupac podijeljen na tri stupca: „ ΔCq “, „ ΔR “ i „Rezultati“.

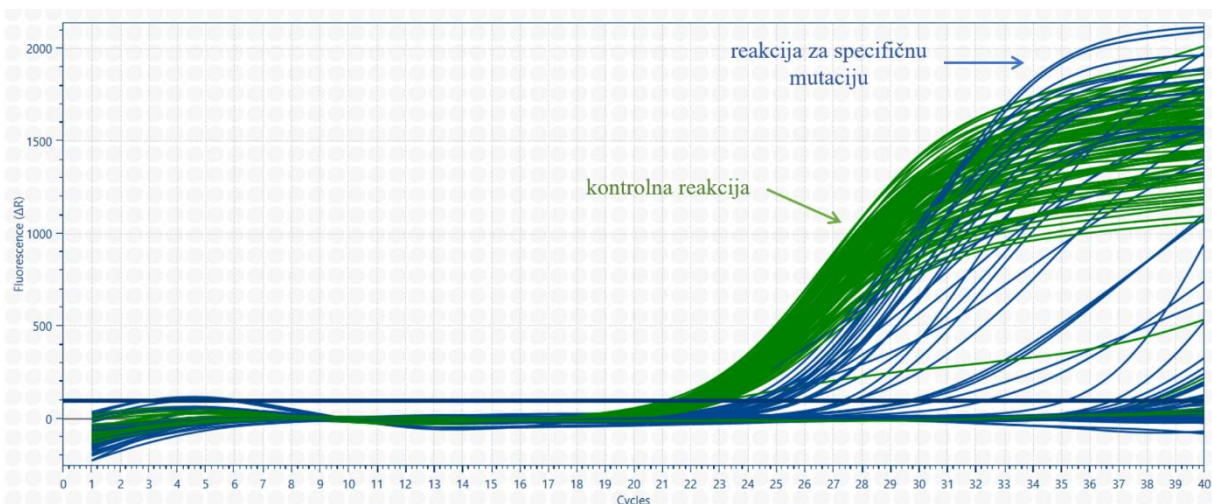
Reaction Controls Analysis

N.	Name	Dye	G105G			R132H			R132C			R132x			R140x			R172K			R172x			CTRL		
			Cq	ΔR	Results	Cq	ΔR	Results	Cq	ΔR	Results	Cq	ΔR	Results	Cq	ΔR	Results	Cq	ΔR	Results	Cq	ΔR	Results	Cq	ΔR	Results
1	Positive	FAM	23.9	1720	OK	24.2	1535	OK	24.8	1694	OK	22.5	1354	OK	24.0	1400	OK	24.2	1801	OK	24.9	1565	OK	24.2	1882	OK
		HEX	21.8	1373	OK	21.4	1565	OK	21.7	1789	OK	21.6	1762	OK	21.6	1613	OK	21.6	1696	OK	22.1	1431	OK	22.0	1318	OK
2	Negative	FAM	No Cq	15	OK	No Cq	-8	OK	No Cq	-21	OK	No Cq	-8	OK	No Cq	39	OK	No Cq	4	OK	No Cq	7	OK	No Cq	0	OK
		HEX	No Cq	30	OK	No Cq	2	OK	38.2	219	OK	No Cq	8	OK	No Cq	44	OK	No Cq	12	OK	No Cq	31	OK	No Cq	54	OK

Analysis of the sample control mix and mutation assay

N.	Name	Dye	G105G			R132H			R132C			R132x			R140x			R172K			R172x			CTRL		
			ΔCq	ΔR	Results	ΔCq	ΔR	Results	ΔCq	ΔR	Results	ΔCq	ΔR	Results	ΔCq	ΔR	Results	ΔCq	ΔR	Results	ΔCq	ΔR	Results	Cq	ΔR	Results
1	2130/2018H	FAM	No Cq	91	WT	No Cq	7	WT	No Cq	22	WT	No Cq	2	WT	No Cq	29	WT	2.5	1533	MUT	14.0	127	WT	25.2	1763	OK
2	1692/2020H	HEX	0.5	1221	OK	0.7	1157	OK	11.8	1378	OK	0.0	1509	OK	0.2	1447	OK	0.0	1560	OK	0.2	1458	OK	22.4	1218	OK
		FAM	No Cq	92	WT	10.2	944	WT	11.8	523	WT	No Cq	-5	WT	5.0	1103	MUT	No Cq	60	WT	No Cq	29	WT	25.0	1887	OK
3	2956/2020H	HEX	-0.2	1553	OK	0.1	1726	OK	-0.1	1799	OK	-0.3	1756	OK	-0.3	1682	OK	-0.3	1834	OK	0.0	1599	OK	22.5	1295	OK
		FAM	13.3	199	WT	No Cq	-24	WT	2.2	1546	MUT	No Cq	12	WT	No Cq	-69	WT	No Cq	90	WT	No Cq	3	WT	25.2	1579	OK
4	131/2021H	HEX	-0.1	1281	OK	-0.4	1613	OK	-0.5	1584	OK	-0.5	1643	OK	0.1	1326	OK	-0.2	1547	OK	-0.4	1443	OK	22.7	1093	OK
		FAM	13.6	241	WT	14.1	191	WT	No Cq	33	WT	No Cq	9	WT	5.2	1081	MUT	No Cq	50	WT	No Cq	73	WT	24.5	1963	OK
5	799/2021H	HEX	0.1	1492	OK	-0.2	1693	OK	0.0	1730	OK	0.0	1651	OK	-0.1	1701	OK	-0.3	1663	OK	1.3	1535	OK	21.9	1331	OK
		FAM	14.6	121	WT	No Cq	-1	WT	12.6	327	WT	No Cq	6	WT	No Cq	-81	WT	1.2	1978	MUT	13.3	242	WT	24.8	1763	OK
6	1885/2021H	HEX	0.1	1410	OK	0.0	1536	OK	-0.2	1663	OK	0.1	1581	OK	0.3	1445	OK	-0.2	1820	OK	0.5	1331	OK	22.1	1197	OK
		FAM	No Cq	85	WT	13.9	110	WT	No Cq	24	WT	No Cq	44	WT	No Cq	-18	WT	4.9	628	MUT	No Cq	8	WT	25.8	1570	OK
7	2604/2022H	HEX	-0.2	1301	OK	-0.8	1708	OK	-0.7	1647	OK	-0.5	1749	OK	-0.5	1638	OK	-0.6	1763	OK	-0.4	1616	OK	23.3	1083	OK
		FAM	12.9	275	WT	No Cq	32	WT	-0.2	1886	MUT	No Cq	24	WT	No Cq	55	WT	No Cq	6	WT	No Cq	35	WT	24.9	2092	OK
8	2774/2022H	HEX	-0.1	1637	OK	-0.5	1893	OK	-0.8	1864	OK	-0.7	1967	OK	-1.0	2013	OK	-0.2	1762	OK	-0.6	1897	OK	22.2	1447	OK
		FAM	14.0	182	WT	13.8	192	WT	No Cq	-8	WT	No Cq	-1	WT	5.1	1081	MUT	No Cq	41	WT	No Cq	7	WT	24.7	2116	OK
9	2246C/2022H	HEX	0.2	1330	OK	-0.4	1661	OK	-0.2	1749	OK	0.0	1776	OK	0.0	1651	OK	-0.3	1831	OK	0.0	1681	OK	22.2	1419	OK
		FAM	No Cq	16	WT	No Cq	-12	WT	No Cq	-2	WT	No Cq	-9	WT	No Cq	-9	WT	No Cq	16	WT	No Cq	0	WT	26.0	1830	OK
10	3135/2022H	HEX	-0.3	1504	OK	-0.7	1881	OK	-0.8	1833	OK	-0.6	1756	OK	-0.2	1600	OK	-0.4	1892	OK	0.0	1524	OK	23.2	1236	OK
		FAM	2.4	1582	MUT	No Cq	1	WT	No Cq	58	WT	No Cq	2	WT	7.0	741	MUT	No Cq	29	WT	No Cq	2	WT	25.4	1822	OK
		HEX	0.2	1184	OK	-0.2	1538	OK	-0.4	1586	OK	-0.2	1583	OK	-0.1	1515	OK	-0.2	1635	OK	-0.2	1376	OK	22.8	1163	OK

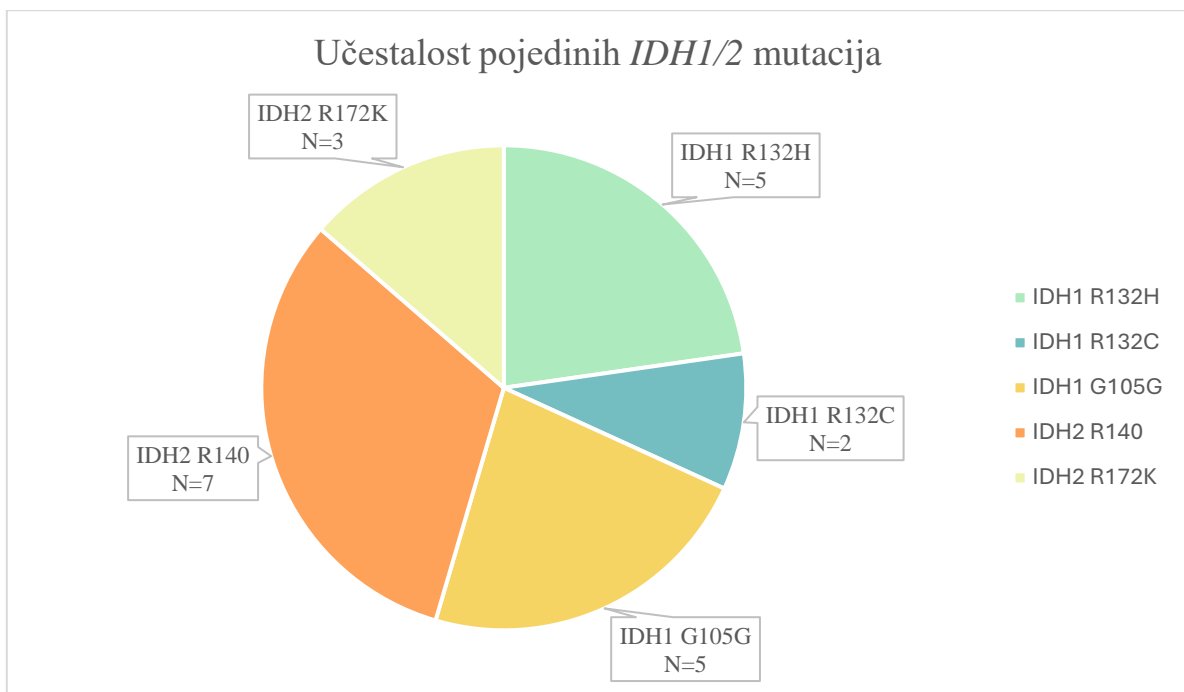
Slika 9. Prikaz tablice "Detalji" u EasyPGX® softveru.



Slika 10. Prikaz rezultata qPCR reakcije. Reakcije detekcije prisutnosti endogenog kontrolnog gena uz pomoć početnica i proba s HEX bojom prikazane su zelenim krivuljama, a reakcije detekcije prisutnosti pojedinih mutacija uz pomoć specifičnih početnica i proba s FAM bojom prikazane su plavim krivuljama. Preuzeto iz EasyPGX® softvera.

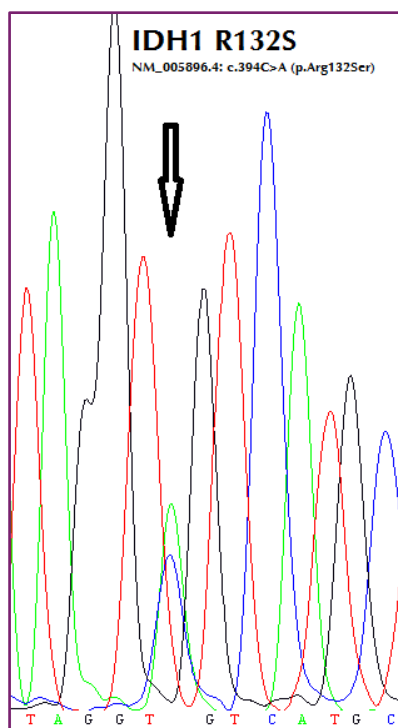
Analizom podataka 40 uzoraka ispitivane skupine bolesnika, u 19 uzoraka dokazane su 22 mutacije u genima *IDH1* i *IDH2*, a u 21 uzorku nije dokazana niti jedna mutacija. Od 22 dokazane mutacije, 12 ih je u *IDH1* genu – 7 na kodonu 132 (5 R132H i 2 R132C) te 5 varijanti G105G. Ostalih 10 mutacija dokazano je u *IDH2* genu – 7 na kodonu R140 te 3 mutacije R172K. Dva bolesnika imala su uz detektiranu mutaciju, detektiran i SNP, prvi *IDH1*^{G105G} i *IDH1*^{R132H} te drugi *IDH1*^{G105G} i *IDH2*^{R140}. Istovremeni pozitivni rezultat za polimorfizam

jednog nukleotida (SNP, engl. *single nucleotide polymorphism*) (G105G) i neku drugu mutaciju za koju komplet reagensa testira je moguć. Ako je uzorak pozitivan za više od jedne mutacije, signal koji je bliži graničnoj vrijednosti je vjerojatno posljedica križne reaktivnosti. U tom slučaju uzorak bi se trebao smatrati pozitivnim samo za onu mutaciju čiji je signal dalji od granične vrijednosti. Ipak, u ovom su istraživanju kod jednog bolesnika nađene dvije mutacije – mutacija *IDH1* R132H i mutacija *IDH2* R140.

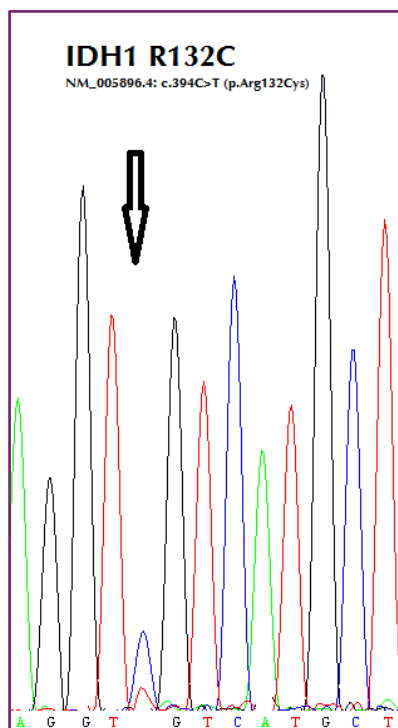


Slika 11. Grafički prikaz učestalosti pojedinih *IDH1/2* mutacija. Izrađeno u programu MS Word.

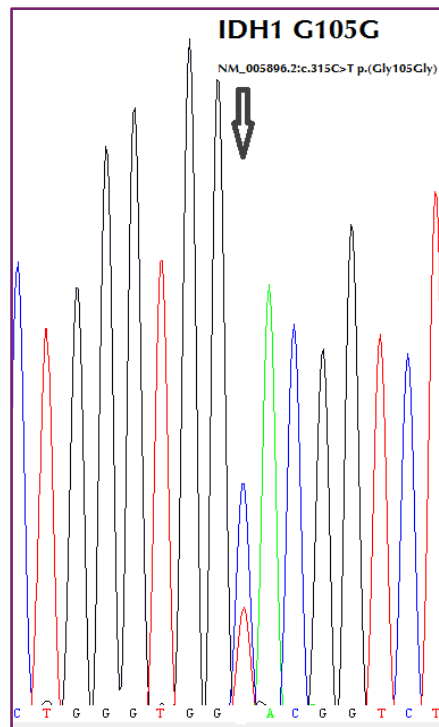
Izdvojena DNA iz 10 uzoraka, 9 mutiranih i 1 nemutirani, sekvencirana je metodom Sangerovog sekvenciranja u svrhu potvrde rezultata te je dobiveno 100 % slaganje. Izdvojene mutirane DNA odabrane su tako da se potvrdi detektiranje svih različitih mutacija pronađenih korištenjem kompleta reagensa *EasyPGX® ready IDH1/2*. Mutacije *IDH* točkaste su mutacije te se na djelomičnim prikazima kromatograma (Slike 12, 13, 14, 15, 16) mogu vidjeti kao prisutnost dva vrška na istoj poziciji.



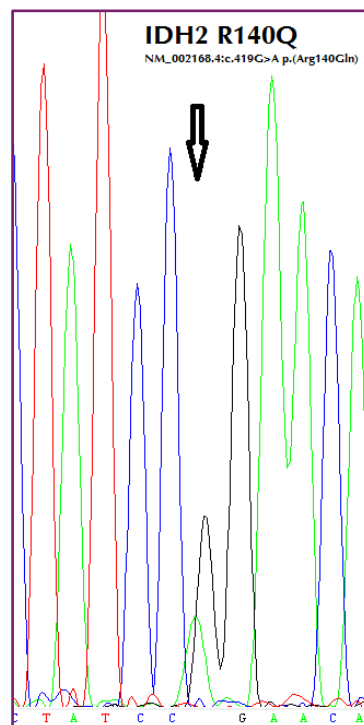
Slika 12. Djelomični prikaz kromatograma uzorka s mutacijom u genu *IDH1* s vrškovima citozina i adenina označenim strelicom. Ova točasta mutacija u kodonu 132 dovodi do zamjene arginina sa serinom. NM_005896.4:c.394C>A (p.Arg132Ser).



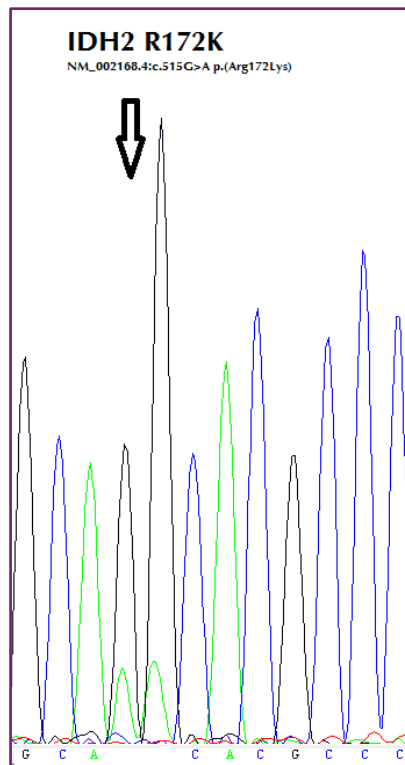
Slika 13. Djelomični prikaz kromatograma uzorka s mutacijom u genu *IDH1* s vrškovima citozina i timina označenim strelicom. Ova točasta mutacija dovodi do zamjene arginina s cisteinom. NM_005896.4:c.394C>T (p.Arg132Cys).



Slika 14. Djelomični prikaz *kromatograma* uzorka s SNP u genu *IDH1* s vrškovima citozina i timina označenim strelicom. Ovaj SNP dovodi do istoznačne zamjene glicina. NM_005896.2:c.315C>T p.(Gly105Gly).



Slika 15. Djelomični prikaz *kromatograma* uzorka s mutacijom u genu *IDH2* s vrškovima gvanina i adenina označenim strelicom. Ova točkasta mutacija dovodi do zamjene arginina s glutaminom. NM_002168.4:c.419G>A p.(Arg140Gln).



Slika 16. Djelomični prikaz kromatograma uzorka s mutacijom u genu *IDH2* s vrškovima gvanina i adenina označenim strelicom. Ova mutacija dovodi do zamjene arginina s lizinom. NM_002168.4:c.515G>A p.(Arg172Lys).

5. RASPRAVA

Cilj ovog rada bio je uspostaviti brzu i osjetljivu metodu za rutinsko određivanje *IDH1* i *IDH2* mutacija kod bolesnika s dijagnozom AML-a. Detekcija ovih mutacija važna je kako bi se identificirali bolesnici koji su pogodni za terapiju IDH inhibitorima. Budući da prema smjernicama ELN-a rezultati analize na prisutnost *IDH* mutacija moraju biti dostupni unutar 3 do 5 dana od zaprimanja uzorka, odabrana je brza *ready to use* metoda iz *EasyPGX*® kolekcije (Diatech Pharmacogenetic, Italija). Kako je cilj bio uspostaviti novu metodu za određivanje *IDH* mutacija, odabrani su uzorci za koje se pretpostavilo da će imati veću učestalost *IDH* mutacija, a to su uzorci bolesnika s prethodno dokazanom *NPM1* mutacijom. Analizom izdvojene DNA iz 40 uzoraka aspirata koštane srži, kod 19 bolesnika dokazane su 22 mutacije u genima *IDH1* i *IDH2*. *IDH* mutacije čine oko 20 % mutacija u bolesnika s dijagnosticiranim AML-om (Elnahass i sur., 2020), a viša je učestalost (55 %) u ovom istraživanju očekivana jer su se analizirali uzorci bolesnika s dokazanom *NPM1* mutacijom. Nađeno je 12 mutacija u *IDH1* genu i 10 mutacija u *IDH2* genu što se ne slaže s literaturnim podacima koji navode da su *IDH2* mutacije učestalije (Im i sur., 2014). U ovom istraživanju su uzeti samo uzorci bolesnika kojima je prethodno potvrđena *NPM1* mutacija, a Zarnegar-Lumley i sur. (2023) su kohortnim istraživanjem uzoraka 3141 bolesnika s dijagnozom AML-a pokazali da su češće komutacije *IDH1* i *NPM1*, nego *IDH2* i *NPM1* što bi mogao biti razlog nesukladnosti učestalosti *IDH1* i *IDH2* mutacija s literaturnim podacima. Također, to može biti i posljedica malog broja ispitanih uzoraka. Ove su mutacije zamjenske mutacije što znači da dolazi do zamjene nukleotida koja može dovesti do zamjene aminokiseline. Značajne su mutacije koje dovode do zamjene jednog od tri argininska ostatka u aktivnom središtu enzima. Prema tome umnožavale i analizirale su se sekvence DNA koje sadrže sljedeće kodone 132, 140 i 172. Sedam mutacija dokazano je na kodonu *IDH1*^{R132}, 7 na kodonu *IDH2*^{R140} te 3 na kodonu *IDH2*^{R172K}. Učestalost mutacija na *IDH2*^{R140} i *IDH2*^{R172K} kodonima približno odgovara literaturnim podacima koji navode da se mutacije na *IDH2*^{R140} kodonu javljaju u oko 80 % slučajeva mutiranog *IDH2* te da se mutacije na kodonu *IDH2*^{R172K} javljaju u oko 20 % slučajeva mutiranog *IDH2* (Stein, 2016). Kod jednog bolesnika detektirane su dvije mutacije - mutacija *IDH1* R132H i mutacija *IDH2* R140. Komutacije *IDH1* i *IDH2* iznimo su rijetke. Moguće objašnjenje za istovremenu prisutnost dviju *IDH* mutacija je postojanje dva klona neoplastičnih stanica od kojih svaka ima svoju *IDH* mutaciju. Tu teoriju o dva klona potvrđuje i nalaz fenotipa u kojem se ističu dvije populacije mijeloblasta stoga je moguće da svaka od njih nosi jednu od dokazanih mutacija. Detektirano je i 5 istoznačnih polimorfizama jednog nukleotida na kodonu 105. Pri tome je kod dva bolesnika uz pozitivan SNP, detektirana i mutacija. Kod prvog je

mutacija nađena na kodonu *IDH1*^{R132H}, a kod drugog na kodonu *IDH2*^{R140}. Funkcionalni učinci ovog polimorfizma nisu još uvijek jasni kao i njegov utjecaj na stopu OS-a i stopu preživljavanja bez recidiva (RFS, engl. *recurrence-free survival*). Wagner i sur. (2010) povezuju *IDH1* SNP rs11554137 s lošijim OS-om i RFS-om dok (Ho i sur., 2011), iako su pokazali da pozitivan SNP korelira s lošijim RFS-om i trendom prema lošijem OS-u, nisu pokazali neovisan lošiji prognostički značaj pozitivnog SNP-a jer se u većini slučajeva pozitivan SNP javljao zajedno s nepovoljnim čimbenicima rizika. Općeniti utjecaj *IDH* mutacija na ishod bolesti i samo liječenje je kompleksan. Ono što se zna je da taj utjecaj ovisi o dobi bolesnika, lokaciji same mutacije i prisutnosti komutacija. Rezultati 10 uzoraka, od čega je 9 mutiranih i 1 neumutiran, uspoređeni su s metodom Sangerovog sekvenciranja te je dobiveno potpuno slaganje. Korištena metoda zadovoljila je temeljne kriterije za upotrebu u laboratorijskoj dijagnostici propisane verifikacijskim protokolom prema normi ISO 15189:2022. Bolesnici kod kojih je dokazana *IDH1* odnosno *IDH2* mutacija kandidati su za terapiju IDH inhibitorima. Točnije, FDA je odobrila upotrebu ivosideniba (inhibitor IDH1) i enasideniba (inhibitor IDH2) kod bolesnika s R/R AML-om, a EMA je odobrila korištenje ivosideniba kod bolesnika s novo dijagnosticiranim *IDH1*^{R132} mutiranim AML-om, koji nisu podobni za liječenje kemoterapijom.

6. ZAKLJUČCI

Zaključci ovog istraživanja su:

- I. Analizom 40 uzoraka bolesnika s dijagnozom akutne mijeloične leukemije, kojima je prethodno dokazana *NPM1* mutacija, *IDH* mutacije su dokazane u uzorcima 19 bolesnika te su ukupno dokazane 22 mutacije.
- II. Usporedbom rezultata 10 uzoraka s metodom Sangerovog sekvenciranja dobiveno je potpuno slaganje.
- III. Uspostavljena je metoda lančane reakcije polimerazom u stvarnom vremenu za dokazivanje *IDH* mutacija. Korišteni komercijalni komplet reagensa zadovoljio je temeljne kriterije za upotrebu u rutinskoj laboratorijskoj dijagnostici.
- IV. U skupini bolesnika s dijagnozom *NPM1* mutiranog AML-a utvrđena je očekivana učestalost *IDH* mutacija.

7. POPIS KRATICA, OZNAKA I SIMBOLA

α -KG – alfa-keto glutarat

ALL – akutna limfatična leukemija

AML – akutna mijeloična leukemija

AML-NOS – akutna mijeloična leukemija koju nije moguće drugačije specificirati (engl. *AML- not otherwise specified*)

ASXL1 – engl. *additional sex combs like 1*

BCL-2 – engl. *B-cell leukemia/lymphoma 2*

BCOR – engl. *B-cell lymphoma 6 corepressor*

BCR::ABL1 – engl. *break point cluster region-abl 1*

CBFB::SMMHC - engl. *core-binding factor subunit beta/smooth muscle myosin heavy chain*

CEBPA - engl. *CCAAT Enhancer Binding Protein Alpha*

CR – potpuna remisija (engl. *complete remission*)

ddNTP – dideoksiribonukleotid (engl. *dideoxynucleotide*)

DIK – diseminirana intravaskularna koagulacija

DNA – deoksiribonukleinska kiselina (engl. *deoxyribonucleic acid*)

DNMT3A – engl. *deoxyribonucleic acid methyltransferase 3 alpha*

dNTP - deoksiribonukleozid-trifosfat (engl. *deoxyribonucleotide triphosphate*)

ELN – engl. *European LeukemiaNet*

EMA - Europska agencija za lijekove (engl. *European Medicines Agency*)

FAB – engl. *French-American-British Classification*

FISH – fluorescentna *in situ* hibridizacija

FLT3 – engl. *Fms-like tyrosine kinase-3*

FRET - fluorescentni rezonantni prijenos energije (engl. *fluorescence resonance energy transfer*)

HIF – engl. *hypoxia-inducible factor*

ICC – engl. *International Consensus Classification*

IDH 1, 2 i 3 – izocitrat dehidrogenaza 1, 2 i 3

IDHwt – engl. *wild type IDH*

MLL – engl. *mixed-lineage leukemia 1*

MRD – mjerljiva ostatna bolest (engl. *measurable residual disease*)

NADH – nikotinamid adenin dinukleotid (engl. *nicotinic adenine dinucleotide*).

NADPH – nikotinamid adenin dinukleotid fosfat (engl. *nicotinic adenine dinucleotide phosphate*)

NCBI - engl. *The National Center for Biotechnology Information*

NF- κ – engl. *nuclear factor kappa-light-chain enhancer of activated B cells*

NGS – sekvenciranje nove generacije (engl. *next generation sequencing*)

NPM1 – engl. *nucleophosmin 1*

OS – ukupno preživljavanje, (engl. *overall survival*)

pb – parovi baza

PCR – lančana reakcija polimerazom (engl. *polymerase chain reaction*)

PML::RAR α – engl. *promyelocytic leukemia/retinoic acid receptor alpha*

qPCR – lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu (engl. *real-time polymerase chain reaction*)

R/R AML – engl. *relapsed or refractory acute myeloid leukemia*

R-2-HG – R-enantiomer 2-hidroksiglutarata

Ras – engl. *rat sarcoma virus*

RDW – distribucija volumena eritrocita (engl. *red blood cell distribution width*)

RFS - stopa preživljavanja bez recidiva (engl. *recurrence-free survival*)

RNA – ribonukleinska kiselina (engl. *ribonucleic acid*)

RUNX1::RUNXIT1 – engl. *runt-related transcription factor 1/RUNX1 partner transcriptional corepressor 1*

SAD – Sjedinjene Američke Države

SNP - polimorfizam jednog nukleotida (engl. *single nucleotide polymorphism*)

SRSF2 – engl. *serine and arginine rich splicing factor 2*

SZO – Svjetska zdravstvena organizacija

TET2 – engl. *tet methylcytosine dioxygenase 2*

TP53 – engl. *tumor protein 53*

WT – divlji tip (engl. *wild type*)

8. LITERATURA

Arber DA, Orazi A, Hasserjian RP, Borowitz MJ, Calvo KR, Kvasnicka HM, i sur. International Consensus Classification of Myeloid Neoplasms and Acute Leukemias: integrating morphologic, clinical, and genomic data. *Blood*, 2022, 140, 1200–1228.

Byun JM, Yoo SJ, Kim HJ, Ahn JS, Koh Y, Jang JH, i sur. IDH1/2 mutations in acute myeloid leukemia. *Blood Res*, 2022, 57, 13–22.

Chaturvedi A, Araujo Cruz MM, Jyotsana N, Sharma A, Yun H, Görlich K, i sur. Mutant IDH1 promotes leukemogenesis in vivo and can be specifically targeted in human AML. *Blood*, 2013, 122, 2877–2964.

Chen X, Xing H, Xie X, Kou L, Li J, Li Y. Efficacy and safety of FDA-approved IDH inhibitors in the treatment of IDH mutated acute myeloid leukemia: a systematic review and meta-analysis. *Clin Epigenetics*, 2023, 15, 113.

Choe S, Wang H, DiNardo CD, Stein EM, de Botton S, Roboz GJ, i sur. Molecular mechanisms mediating relapse following ivosidenib monotherapy in IDH1-mutant relapsed or refractory AML. *Blood Adv*, 2020, 4, 1894–1905.

Dang L, Yen K, Attar EC. IDH mutations in cancer and progress toward development of targeted therapeutics. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol*, 2016, 27, 599–608.

DiNardo CD, Propert KJ, Loren AW, Paietta E, Sun Z, Levine RL, i sur. Serum 2-hydroxyglutarate levels predict isocitrate dehydrogenase mutations and clinical outcome in acute myeloid leukemia. *Blood*, 2013, 121, 4917–4941.

DiNardo CD, Stein EM, De Botton S, Roboz GJ, Altman JK, Mims AS, i sur. Durable Remissions with Ivosidenib in IDH1 - Mutated Relapsed or Refractory AML. *N Engl J Med*, 2018, 378, 2386–2484.

Döhner H, Wei AH, Appelbaum FR, Craddock C, DiNardo CD, Dombret H, i sur. Diagnosis and management of AML in adults: 2022 recommendations from an international expert panel on behalf of the ELN. *Blood*, 2022, 140, 1345–1422.

ElNahass YH, Badawy RH, ElRefaey FA, Nooh HA, Ibrahiem D, Nader HA, i sur. IDH Mutations in AML Patients; A higher Association with Intermediate Risk Cytogenetics. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2020, 21, 721–726.

Favre L, Sako N, Tarfi S, Quang VT, Joy C, Dupuy A, i sur. Evaluation of two new highly multiplexed PCR assays as an alternative to next-generation sequencing for IDH1/2 mutation detection. *Mol Oncol*, 2022, 16, 3916–3942.

Figuroa ME, Abdel-Wahab O, Lu C, Ward PS, Patel J, Shih A, i sur. Leukemic IDH1 and IDH2 mutations result in a hypermethylation phenotype, disrupt TET2 function, and impair hematopoietic differentiation. *Cancer Cell*, 2010, 18, 553–620.

Grković L, Labar B. Akutna mijeloična leukemija u odraslih: dijagnostika i liječenje. *Med Flum*, 2011, 47.

Ho PA, Kopecky KJ, Alonzo TA, Gerbing RB, Miller KL, Kuhn J, i sur. Prognostic implications of the IDH1 synonymous SNP rs11554137 in pediatric and adult AML: a report from the Children's Oncology Group and SWOG. *Blood*, 2011, 118, 4561–4567.

Im AP, Sehgal AR, Carroll MP, Smith BD, Tefferi A, Johnson DE, i sur. DNMT3A and IDH mutations in acute myeloid leukemia and other myeloid malignancies: associations with prognosis and potential treatment strategies. *Leukemia*, 2014, 28, 1774–1857.

Inoue S, Lemonnier F, Mak TW. Roles of IDH1/2 and TET2 mutations in myeloid disorders. *Int J Hematol*, 2016, 103, 627–660.

Issa GC, DiNardo CD. Acute myeloid leukemia with IDH1 and IDH2 mutations: 2021 treatment algorithm. *Blood Cancer J*, 2021, 11, 107.

Kantarjian H, Kadia T, DiNardo C, Daver N, Borthakur G, Jabbour E, i sur. Acute myeloid leukemia: current progress and future directions. *Blood Cancer J*, 2021, 11, 41.

Kantarjian H, O'Brien S, Cortes J, Giles F, Faderl S, Jabbour E, i sur. Results of intensive chemotherapy in 998 patients age 65 years or older with acute myeloid leukemia or high-risk myelodysplastic syndrome: predictive prognostic models for outcome. *Cancer*, 2006, 106, 1090–8.

Kernytsky A, Wang F, Hansen E, Schalm S, Straley K, Gliser C, i sur. IDH2 mutation-induced histone and DNA hypermethylation is progressively reversed by small-molecule inhibition. *Blood*, 2015, 125, 296–303.

Khoury JD, Solary E, Abla O, Akkari Y, Alaggio R, Apperley JF, i sur. The 5th edition of the World Health Organization Classification of Haematolymphoid Tumours: Myeloid and Histiocytic/Dendritic Neoplasms. *Leukemia*, 2022, 36, 1703–1722.

Koivunen P, Lee S, Duncan CG, Lopez G, Lu G, Ramkissoon S, i sur. Transformation by the R Enantiomer of 2-Hydroxyglutarate Linked to EglN Activation. *Nature*, 2012 Feb, 483, 484–492.

Kumar CC. Genetic Abnormalities and Challenges in the Treatment of Acute Myeloid Leukemia. *Genes Cancer*, 2011, 2, 95–107.

Marcucci G, Maharry K, Wu YZ, Radmacher MD, Mrózek K, Margeson D, i sur. IDH1 and IDH2 Gene Mutations Identify Novel Molecular Subsets Within De Novo Cytogenetically Normal Acute Myeloid Leukemia: A Cancer and Leukemia Group B Study. *J Clin Oncol*, 2010, 28, 2348–2403.

McKenzie SB, Landis-Piwowar K i Williams JL. Clinical laboratory hematology. Ujedinjeno Kraljevstvo, Pearson, 2014, str. 596.

Medeiros BC, Fathi AT, DiNardo CD, Pollyea DA, Chan SM, Swords R. Isocitrate dehydrogenase mutations in myeloid malignancies. *Leukemia*, 2017, 31, 272–353.

National Cancer Institute. SEER Cancer Stat Facts: Acute Myeloid Leukemia (AML). 2024., <https://seer.cancer.gov/statfacts/html/amyl.html>, pristupljeno 3. 6. 2024.

Norsworthy KJ, Luo L, Hsu V, Gudi R, Dorff SE, Przepiorka D, i sur. FDA Approval Summary: Ivosidenib for Relapsed or Refractory Acute Myeloid Leukemia with an Isocitrate

Dehydrogenase-1 Mutation. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*, 2019, 25, 3205–3214.

Pelcovits A, Niroula R. Acute Myeloid Leukemia: A Review. *R I Med J*, 2020, 103, 38–40.

Rakheja D, Konoplev S, Medeiros LJ, Chen W. IDH mutations in acute myeloid leukemia. *Hum Pathol*, 2012, 43, 1541–1592.

Rubnitz JE, Gibson B, Smith FO. Acute myeloid leukemia. *Hematol Oncol Clin North Am*, 2010, 24, 35–63.

Shimony S, Stahl M, Stone RM. Acute myeloid leukemia: 2023 update on diagnosis, risk-stratification, and management. *Am J Hematol*, 2023, 98, 502–528.

Stein EM, DiNardo CD, Pollyea DA, Fathi AT, Roboz GJ, Altman JK, i sur. Enasidenib in mutant IDH2 relapsed or refractory acute myeloid leukemia. *Blood*, 2017, 130, 722–753.

Stein EM. Molecular Pathways: IDH2 Mutations—Co-opting Cellular Metabolism for Malignant Transformation. *Clin Cancer Res*, 2016, 22, 16–25.

Testa U, Castelli G, Pelosi E. Isocitrate Dehydrogenase Mutations in Myelodysplastic Syndromes and in Acute Myeloid Leukemias. *Cancers*, 2020, 12, 2427.

Vakiti A, Reynolds SB, Mewawalla P. Acute Myeloid Leukemia. *StatPearls*, 2024.

Wagner K, Damm F, Göhring G, i sur. Impact of IDH1 R132 mutations and an IDH1 single nucleotide polymorphism in cytogenetically normal acute myeloid leukemia: SNP rs11554137 is an adverse prognostic factor. *J Clin Oncol*, 2010, 28, 2356-2364.

Weinberg OK, Porwit A, Orazi A, Hasserjian RP, Foucar K, Duncavage EJ, i sur. The International Consensus Classification of acute myeloid leukemia. *Virchows Arch*. 2023, 482, 27–37.

Wouters BJ. Targeting IDH1 and IDH2 Mutations in Acute Myeloid Leukemia: Emerging Options and Pending Questions. *HemaSphere*. 2021, 5, e583.

Xu W, Yang H, Liu Y, Yang Y, Wang P, Kim SH, i sur. Oncometabolite 2-Hydroxyglutarate Is a Competitive Inhibitor of α -Ketoglutarate-Dependent Dioxygenases. *Cancer Cell*, 2011, 19, 17–30.

Zarnegar-Lumley S, Alonzo TA, Gerbing RB, Othus M, Sun Z, Ries RE, i sur. Characteristics and prognostic impact of IDH mutations in AML: a COG, SWOG, and ECOG analysis. *Blood Adv*, 2023, 7, 5941–5994.

Zhou Y, Huang G, Cai X, Liu Y, Qian B, Li D. Global, regional, and national burden of acute myeloid leukemia, 1990–2021: a systematic analysis for the global burden of disease study 2021. *Biomark Res*, 2024, 12, 101.

9. SAŽETAK/SUMMARY

9.1. SAŽETAK

Akutna mijeloična leukemija visoko je heterogena hematološka zloćudna bolest, koju karakterizira abnormalna proliferacija nezrelih stanica mijeloidne loze. AML je bolest starije životne dobi s medijanom od 67 godina. U pozadini AML-a stoje brojne genetske promjene pa najnovije smjernice za stratifikaciju rizika i postavljanje dijagnoze ističu važnost određivanja citogenetskih i genskih promjena. Iako je došlo do znatnog napretka u dijagnostici i razumijevanju patofiziologije AML-a, osnovna terapija (intenzivna kemoterapija) ostaje ista dok je petogodišnje ukupno preživljavanje i dalje nisko, posebno kod recidiva, starijih osoba, sekundarnog i rezistentnog AML-a. Odobrene spasonosne terapije postoje samo za one s *FLT3* te *IDH1/2* mutacijama. Terapija IDH inhibitorima nije se pokazala učinkovitijom od standardnih terapija kod novodijagnosticiranog AML-a, ali kod bolesnika s R/R AML-om omogućuje postizanje CR u oko 20 % slučajeva dok stopa ukupnog odgovora uključujući i hematološko poboljšanje iznosi oko 40 %. Zbog toga je rana detekcija ovih mutacija postala bitna. ELN nalaže da se genska analiza na prisutnost *IDH1/2* mutacija provede unutar 3 do 5 dana od zaprimanja uzoraka. Prema tome, cilj ovog rada bio je uspostaviti dijagnostički postupak za dokazivanje najčešćih mutacija u genima *IDH1* i *IDH2* u rutinskoj laboratorijskoj dijagnostici. Odabran je brzi i osjetljivi komercijalni test, kojim je analizirano 40 uzoraka izdvojene DNA bolesnika s dijagnozom AML-a kojima je prethodno dokazana *NPM1* mutacija. Dokazane su ukupno 22 mutacije – 12 u *IDH1* genu (7 na kodonu R132 i 5 varijanti G105G) i 10 u *IDH2* genu (7 na kodonu R140 i 3 na kodonu R172). Dio rezultata potvrđen je metodom Sangerovog sekvenciranja uz potpuno slaganje. Utvrđena je očekivana učestalost *IDH* mutacija u skupini bolesnika s *NPM1* mutiranim AML-om te je test zadovoljio temeljne kriterije za uporabu u rutinskoj laboratorijskoj dijagnostici.

9.2. SUMMARY

Acute myeloid leukemia (AML) is a highly heterogeneous hematologic malignancy marked by abnormal proliferation of myeloid progenitors, primarily affecting elderly patients, with a median age of 67 years. Given the numerous genetic abnormalities in AML, current guidelines for risk stratification and diagnosis underscore the importance of identifying cytogenetic and genetic alterations. Although significant advances have been made in AML diagnostics and understanding AML's pathophysiology, intensive chemotherapy remains the standard treatment. Still, 5-year overall survival remains low, particularly for the elderly, relapsed, secondary, and resistant AML. Currently, approved targeted therapies exist only for patients with *FLT3* and *IDH1/2* mutations. While IDH inhibitors have not demonstrated superior efficacy to standard therapy in newly diagnosed AML, in relapsed/refractory AML, they enable complete remission in about 20% of cases, with an overall response rate of approximately 40% when including hematologic improvements. Thus, early detection of these mutations is critical. The European LeukemiaNet (ELN) recommends that genetic analysis for *IDH1/2* mutations be conducted within 3 to 5 days of sample collection. This thesis aimed to establish a diagnostic protocol for the routine laboratory detection of IDH1 and IDH2 mutations. A fast, sensitive commercial test was employed to analyze DNA from 40 AML patients with a previously confirmed *NPM1* mutation. 22 mutations were detected—12 in the *IDH1* gene (7 at codon R132 and 5 G105G variants) and 10 in the IDH2 gene (7 at codon R140 and 3 at codon R172). Sanger sequencing confirmed a subset of results with full concordance. The study confirmed the expected frequency of IDH mutations among *NPM1*-mutated AML patients and demonstrated that the chosen test meets essential criteria for use in routine laboratory diagnostics.

Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu
Farmaceutsko-biokemijski fakultet
Studij: Medicinska biokemija
Zavod za medicinsku biokemiju i hematologiju
Domagojeva 2, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

VAŽNOST ODREĐIVANJA *IDH1* I *IDH2* MUTACIJA U BOLESNIKA S DIJAGNOZOM AKUTNE MIJELOIČNE LEUKEMIJE

Marija Vasiljević

SAŽETAK

Akutna mijeloična leukemija visoko je heterogena hematološka zloćudna bolest, koju karakterizira abnormalna proliferacija nezrelih stanica mijeloidne loze. AML je bolest starije životne dobi s medijanom od 67 godina. U pozadini AML-a stoje broje genetske promjene pa najnovije smjernice za stratifikaciju rizika i postavljanje dijagnoze ističu važnost određivanja citogenetskih i genskih promjena. Iako je došlo do znatnog napretka u dijagnostici i razumijevanju patofiziologije AML-a, osnovna terapija (intenzivna kemoterapija) ostaje ista dok je petogodišnje ukupno preživljavanje i dalje nisko posebno kod recidiva, starijih osoba, sekundarnog i rezistentnog AML. Odobrene spasonosne terapije postoje samo za one s FLT3 te IDH1/2 mutacijama. Terapija IDH inhibitorima nije se pokazala učinkovitijom od standardnih terapija kod novodijagnosticiranog AML-a, ali kod bolesnika s R/R AML-om omogućuje postizanje CR u oko 20 % slučajeva dok stopa ukupnog odgovora uključujući i hematološko poboljšanje iznosi oko 40 %. Zbog toga je rana detekcija ovih mutacija postala bitna. ELN preporuča da se genska analiza na prisutnost IDH1/2 mutacija provede unutar 3 do 5 dana od zaprimanja uzoraka. Prema tome, cilj ovog rada bio je uspostaviti dijagnostički postupak za dokazivanje najčešćih mutacija u genima IDH1 i IDH2 u rutinskoj laboratorijskoj dijagnostici. Odabran je brzi i osjetljivi komercijalni test, kojim je analizirano 40 uzoraka izdvojene DNA bolesnika s dijagnozom AML-a kojima je prethodno dokazana NPM1 mutacija. Dokazane su ukupno 22 mutacije – 12 u IDH1 genu (7 na kodonu R132 i 5 varijanti G105G) i 10 u IDH2 genu (7 na kodonu R140 i 3 na kodonu R172). Dio rezultata potvrđen je metodom Sangerovog sekvenciranja uz potpuno slaganje. Utvrđena je očekivana učestalost IDH mutacija u skupini bolesnika s NPM1 mutiranim AML-om te test zadovoljava temeljne kriterije za uporabu u rutinskoj laboratorijskoj dijagnostici.

Rad je pohranjen u Središnjoj knjižnici Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad sadrži: 41 stranicu, 16 grafičkih prikaza, 8 tablica i 42 literaturna navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: akutna mijeloična leukemija, AML, *IDH1*, *IDH2*, mutacija, qPCR, rutinska dijagnostika

Mentor: **Dr. sc. Dunja Rogić**, redovita profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Ocjenjivači: **Dr. sc. Dunja Rogić**, redovita profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Dr. sc. Ivana Lapić, docentica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Dr. sc. Željka Vogrinc, docentica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad prihvaćen: studeni 2024.

Basic documentation card

University of Zagreb
Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Study: Medical Biochemistry
Department of Medical Biochemistry and Hematology
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Croatia
ili druga adresa

Diploma thesis

IMPORTANCE OF DETECTING *IDH1* AND *IDH2* MUTATIONS IN PATIENTS WITH ACUTE MYELOID LEUKEMIA DIAGNOSIS

Marija Vasiljević

SUMMARY

Acute myeloid leukemia (AML) is a highly heterogeneous hematologic malignancy marked by abnormal proliferation of myeloid progenitors, primarily affecting elderly patients, with a median age of 67 years. Given the numerous genetic abnormalities in AML, current guidelines for risk stratification and diagnosis underscore the importance of identifying cytogenetic and genetic alterations. Although significant advances have been made in AML diagnostics and understanding AML's pathophysiology, intensive chemotherapy remains the standard treatment. Still, 5-year overall survival remains low, particularly for the elderly, relapsed, secondary, and resistant AML. Currently, approved targeted therapies exist only for patients with FLT3 and IDH1/2 mutations. While IDH inhibitors have not demonstrated superior efficacy to standard therapy in newly diagnosed AML, in relapsed/refractory AML, they enable complete remission in about 20% of cases, with an overall response rate of approximately 40% when including hematologic improvements. Thus, early detection of these mutations is critical. The European LeukemiaNet (ELN) recommends that genetic analysis for IDH1/2 mutations be conducted within 3 to 5 days of sample collection. This thesis aimed to establish a diagnostic protocol for the routine laboratory detection of IDH1 and IDH2 mutations. A fast, sensitive commercial test was employed to analyze DNA from 40 AML patients with a previously confirmed NPM1 mutation. 22 mutations were detected—12 in the IDH1 gene (7 at codon R132 and 5 G105G variants) and 10 in the IDH2 gene (7 at codon R140 and 3 at codon R172). Sanger sequencing confirmed a subset of results with full concordance. The study confirmed the expected frequency of IDH mutations among NPM1-mutated AML patients and demonstrated that the chosen test meets essential criteria for use in routine laboratory diagnostics.

The thesis is deposited in the Central Library of the University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry.

Thesis includes: 41 pages, 16 figures, 8 tables and 42 references. Original is in Croatian language.

Keywords: acute myeloid leukemia, AML, *IDH1*, *IDH2*, mutation, qPCR, Sanger sequencing, routine diagnostics

Mentor: **Dunja Rogić, Ph.D.** Full Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Reviewers: **Dunja Rogić, Ph.D.** Full Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Ivana Lapić, Ph.D. Assistant Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Željka Vogrinc, Ph.D. Assistant Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: November 2024.