

IDH1/2 MUTÁCIE U PACIENTOV S AKÚTNOU MYELOBLASTOVOU LEUKÉMIOU (AML): IDENTIFIKÁCIA A KLINICKÝ VÝZNAM

IDH1/2 Mutations in patients with acute myeloblastic leukemia (AML): Identification and clinical significance

Mária SUCHÁŇOVÁ¹, Dominika JANITOROVÁ², Lucia TATAYOVÁ¹, Renata LUKAČKOVÁ¹

¹Oddelenie lekárskej genetiky, Medirex, a. s., Bratislava, manažér medicínskeho odboru RNDr. R. Lukačková, PhD.

²Oddelenie lekárskej genetiky, Medirex, a. s., Košice, manažér medicínskeho odboru RNDr. R. Lukačková, PhD.

Abstrakt

Akútna myeloblastová leukémia je heterogénne hematologické ochorenie, ktoré sa vyznačuje genetickými mutáciami, vrátane mutácií v génoch *IDH1* a *IDH2*. Tieto mutácie vedú k produkcii onkometabolitu 2-hydroxyglutarátu, ktorý narušuje epigenetickú reguláciu a podporuje leukemickú transformáciu. Mutácie *IDH1* a *IDH2* sú prítomné približne v 15 – 20 % pacientov s akútnou myeloblastovou leukémiou a majú významný prognostický vplyv. Tento článok sa zaoberá molekulovými mechanizmami týchto mutácií, ich klinickým významom a možnosťami cielených terapií prostredníctvom inhibítorov *IDH*, ako sú ivosidenib a enasidenib. Ďalej sa venuje diagnostickým prístupom k detekcii týchto mutácií, vrátane technológií sekvenovania novej generácie, real-time PCR, digitálnej PCR a komerčného kitu Entrogen *IDH1/IDH2* Mutation Detection Kit. Cieľom je poskytnúť prehľad o úlohe týchto mutácií pri akútnej myeloblastovej leukémii a zdôrazniť význam genetickej diagnostiky a monitorovania minimálnej reziduálnej choroby pre personalizovanú liečbu a optimalizáciu klinických výsledkov (tab. 1, lit. 25). Text v PDF www.lekarsky.herba.sk.

KLÚČOVÉ SLOVÁ: AML, *IDH*, inhibítory *IDH*, cielená terapia, genetická diagnostika, MRD.

Lek Obz 2025, 74 (1): 14-20

Abstract

Acute myeloid leukemia is a heterogeneous hematologic malignancy characterized by various genetic mutations, including mutations in the *IDH1* and *IDH2* genes. These mutations lead to the production of the oncometabolite 2-hydroxyglutarate, which disrupts epigenetic regulation and promotes leukemic transformation. *IDH1* and *IDH2* mutations are present in approximately 15-20% of AML patients and have significant prognostic implications. This article reviews the molecular mechanisms of these mutations, their clinical significance, and the potential for targeted therapies with *IDH* inhibitors, such as ivosidenib and enasidenib. Furthermore, it discusses diagnostic approaches for detecting these mutations, including next-generation sequencing, real-time PCR, digital PCR, and the commercial Entrogen *IDH1/IDH2* Mutation Detection Kit. The aim is to provide an overview of the role of these mutations in AML and to highlight the importance of genetic diagnostics and minimal residual disease monitoring for personalized treatment and improved clinical outcomes (Tab. 1, Ref. 25). Text v PDF www.lekarsky.herba.sk.

KEY WORDS: AML, *IDH*, *IDH* inhibitors, targeted therapy, genetic diagnostics, MRD.

Lek Obz 2025, 74 (1): 14-20

Úvod

Akútna myeloblastová leukémia (AML) je komplexné a heterogénne ochorenie, ktoré vzniká v dôsledku klonálnej proliferácie nezrelých myeloidných buniek v kostnej dreni a periférnej krvi (1). Ochorenie je charakterizované prítomnosťou rôznych genetických mutácií, ktoré narušujú bunkovú diferenciáciu a proliferáciu (2). Medzi kľúčové mutácie v AML patria mutácie v génoch *IDH1* a *IDH2*, ktoré kódujú enzým izocitrátdehydrogenázu zodpovedný za konverziu izocitrátu na α -ketoglutarát (α -KG) v Krebsovom cykle (3). Mutácie v týchto génoch vedú k vzniku onkometabolitu 2-hydro-

xyglutarátu (2-HG), ktorý inhibuje α -KG-dependentné enzýmy a prispieva k epigenetickej deregulácii a leukemickej transformácii (4). Tento metabolický posun má významnú úlohu nielen v rozvoji leukémie, ale aj v rezistencii na liečbu a prognóze pacienta (5). AML sa vyznačuje širokým spektrom genetických abnormalít, ktoré ovplyvňujú rôzne signálne dráhy vrátane tyrozínkinázových receptorov, faktora rastu a apoptózy, čo robí diagnostiku a terapiu zložitejšími (6, 7).

V posledných rokoch sa výskum zamerával na personalizované terapeutické prístupy, ktoré sa snažia využiť genetické a molekulové charakteristiky jednotlivých pa-

cientov na výber cielej terapie (8). Napríklad inhibítory *IDH1* a *IDH2* sa ukázali ako sľubné terapeutické možnosti, keďže dokážu znížiť hladiny 2-HG, a tým zmierniť leukemickú transformáciu (9, 10). Napriek týmto pokrokom AML naďalej predstavuje veľkú výzvu pre onkológov a výskumníkov (11). Tradičné chemoterapie sú často spojené s vysokou mierou relapsu a nepriaznivou prognózou, najmä u starších pacientov (12, 13). Preto je dôležité pokračovať v objavovaní nových molekulových markerov, ktoré by mohli pomôcť včasnej detekcii, presnejšej diagnostike a vývoji účinnejších terapeutických stratégií (14, 15).

Súčasný výskum sa okrem genetických mutácií zameriava aj na mikroprostredie kostnej drene, ktoré má kľúčovú úlohu pri regulácii rastu leukemických buniek (6). Pochopenie vzájomných interakcií medzi leukemickými bunkami a ich mikroprostredím by mohlo viesť k vývoju nových terapeutických prístupov, ktoré by zasiahli nielen samotné leukemické bunky, ale aj faktory, ktoré podporujú ich prežitie a rezistenciu na liečbu (6, 16). Takéto multidisciplinárne prístupy predstavujú nádej na zlepšenie liečby AML a dlhodobých výsledkov pacientov, čím by sa mohla zlepšiť aj kvalita života postihnutých týmto závažným ochorením (6, 17).

Mutácie *IDH1/IDH2* sú prítomné približne v 15 až 20 % pacientov s AML a majú významnú úlohu v patogeneze ochorenia (8). V posledných rokoch sa stali dôležitým cieľom cielej terapie, ktoré umožňujú lepšiu kontrolu nad chorobou a zlepšenie prognózy pacientov (2). Genetická diagnostika týchto mutácií je nevyhnutná pre personalizáciu liečby (18). Tento článok sa zaoberá molekulovými mechanizmami týchto mutácií, ich klinickým významom, terapeutickými prístupmi a diagnostickými metódami (2, 19).

Patofyziológia AML

Komplexná patofyziológia AML je podmienená širokým spektrom genetických zmien. Medzi najvýznamnejšie patria:

- 1. Mutácie v transkripčných faktoroch:** Génové mutácie, ktoré ovplyvňujú transkripčné faktory, ako napríklad *RUNX1*, *CEBPA* a *GATA2*, sú časté v AML (20). Tieto faktory sú nevyhnutné pre normálnu diferenciáciu myeloidných buniek a ich mutácie vedú k narušeniu tejto regulácie, čo spôsobuje zastavenie diferenciácie a hromadenie nezrelých buniek.
- 2. Aberácie signálnych dráh:** Mnohé signálne dráhy, ktoré regulujú bunkový cyklus a prežitie buniek, sú v AML dysregulované. Napríklad aktivujúce mutácie v génoch ako *FLT3* a *KIT* vedú k neustálej aktivácii tyrozínkinázových receptorov, čo zvyšuje proliferáciu leukemických buniek (7). Mutácie v géne *NPM1* sa tiež často vyskytujú a sú spojené s abnormálnou lokalizáciou proteínu *NPM1* v cytoplazme, čo prispieva k leukemickému fenotypu (21).
- 3. Epigenetické zmeny:** Okrem genetických mutácií majú dôležitú úlohu aj epigenetické zmeny, ktoré ovplyvňujú expresiu génov bez zmeny samotnej DNA. Tieto zmeny zahŕňajú mutácie v epigenetických

regulátoroch, ako sú *DNMT3A* (DNA metyltransferáza), *TET2* a *ASXL1*. Tieto mutácie menia profilovanie DNA metylácie a histónových modifikácií, čo vedie k aberantnej expresii génov a prispieva k leukemogeneze (22, 23). Obzvlášť mutácie v *IDH1* a *IDH2* produkujú onkometabolit 2-hydroxyglutarát, ktorý naruša epigenetické procesy, čo vedie k blokáde diferenciácie (3).

- 4. Chromozómové zmeny:** Chromozómové translokácie, ako napríklad t(8;21) a inv(16), sú bežné pri niektorých podtypoch AML a vedú k tvorbe fúzných génov, ktoré majú onkogénny potenciál. Tieto fúzne proteíny často fungujú ako abnormálne transkripčné faktory, ktoré narušujú normálnu diferenciáciu buniek (6). Translokácia (15;17) je charakteristická pre akútnu promyelocytovú leukémiu (APL), podtyp AML, a vedie k vzniku fúzneho génu *PML::RARA*, ktorý blokuje diferenciáciu promyelocytov.
- 5. Narušená apoptóza:** Dysregulácia apoptotických dráh je ďalšou kľúčovou vlastnosťou AML. Mutácie v géne *TP53*, ktorý je hlavným regulátorom bunkovej smrti, sú spojené s agresívnejšími formami AML a horšou prognózou (6). Tieto mutácie narušujú normálnu odpoveď na bunkový stres a DNA poškodenie, čím leukemické bunky získavajú schopnosť prežiť aj v prítomnosti terapeutických zásahov.
- 6. Mikroprostredie kostnej drene:** Leukemické bunky interagujú s mikroprostredím kostnej drene, čo prispieva k ich prežitiu a rezistencii voči liečbe. Narušená signalizácia medzi leukemickými bunkami a stromálnymi bunkami kostnej drene môže posilniť leukemický proces a znížiť citlivosť na chemoterapiu (17).

V dôsledku tejto genetickej a molekulovej heterogenity je AML veľmi variabilné ochorenie z hľadiska klinického priebehu, odpovede na liečbu a prognózy. Kombinácia genetických mutácií a epigenetických zmien vedie k vývoju AML s rôznymi fenotypmi a biologickými vlastnosťami, čo sťažuje univerzálny terapeutický prístup (14). Personalizované terapie zamerané na konkrétne mutácie a mechanizmy, ako sú inhibítory tyrozínkináz a epigenetické modulátory, predstavujú novú nádej pre efektívnejšiu liečbu AML a zlepšenie dlhodobých výsledkov pacientov (9).

Molekulový mechanizmus mutácií *IDH1/2*

Gény *IDH1* a *IDH2* kódujú **izocitrátdehydrogenázu**, kľúčový enzým podieľajúci sa na konverzii izocitrátu na α -ketoglutarát (α -KG) v Krebsovom cykle. Táto reakcia má zásadný význam nielen pre bunkový metabolizmus, ale aj pre epigenetickú reguláciu génovej expresie, keďže α -KG slúži ako kofaktor pre DNA a histónové demetylázy. Týmto spôsobom je udržiavaná rovnováha medzi bunkovou proliferáciou a diferenciáciou, čo je kritické pre normálny vývoj a fungovanie tkanív (3). Mutácie v génoch *IDH1* a *IDH2* však spôsobujú „gain-of-function“ efekt, čo znamená, že zmenená forma enzýmu nadobúda novú aktivitu, ktorá sa líši od normálnej funkcie (2). Namiesto produkcie α -KG vedú tieto mutá-

cie k zvýšenej tvorbe onkometabolitu 2-hydroxyglutarátu (2-HG), ktorý má ďalekosiahle následky na bunkový metabolizmus a epigenetickú reguláciu (2, 3). Tento onkometabolit totiž inhibuje α -KG-dependentné enzýmy, ku ktorým patria DNA a histónové demetylázy, ktoré majú kľúčovú úlohu pri udržiavaní normálnych epigenetických profilov. Blokáda enzýmov spôsobená nahromadením 2-HG vedie k hypermetylácii DNA a histónov, čo má za následok rozsiahle zmeny v expresii génov (22). Táto epigenetická zmena narúša normálnu diferenciáciu hematopoetických progenitorových buniek, čo vedie k ich hromadeniu v nezrelej forme a je hlavným mechanizmom vzniku leukemických blastov (3). Nezrelé bunky sa hromadia v kostnej dreni a zabraňujú normálnej tvorbe krvných buniek, čo vedie k klinickým príznakom akútnej myeloblastovej leukémie (6). Tento mechanizmus je špecifický pre mutácie v *IDH1* a *IDH2* a predstavuje dôležitý cieľ pre vývoj nových terapeutických prístupov (9). Cílené terapie zamerané na inhibíciu mutovanej izocitrátdehydrogenázy, ako sú inhibítory *IDH1* a *IDH2*, sa javia ako sľubné v klinických skúškach (10). Môžu obnoviť normálnu produkciu α -KG, znížiť hladiny 2-HG, a tým zmierniť epigenetické aberácie a podporiť diferenciáciu leukemických buniek (9, 10). Prístup založený na špecifických genetických mutáciách pacienta otvára nové možnosti liečby, ktoré môžu zlepšiť prognózu aj kvalitu života pacientov s akútnou myeloblastovou leukémiou. (10).

Mutácie v génoch *IDH1* a *IDH2*

Mutácie v génoch *IDH1* a *IDH2* sú považované za získané (gain-of-function) mutácie, ktoré vedú k vzniku novej enzymatickej aktivity (2). Najčastejšie mutácie v *IDH1* sa nachádzajú v kódone R132, kde dochádza k substitúcii arginínu za iné aminokyseliny – histidín (H) alebo cysteín (C) (napr. R132H, R132C). Tieto mutácie spôsobujú produkciu 2-HG a blokádu diferenciácie buniek (3). Na druhej strane sa mutácie v *IDH2* vyskytujú najmä v kódonech R140 a R172, pričom mutácia R140Q je častejšia a spojená s lepšou odpoveďou na terapiu v porovnaní s mutáciou R172K, ktorá je asociovaná s horšou prognózou (2). Mutácie génov *IDH1* a *IDH2* sú častejšie prítomné u pacientov s normálnym karyotypom, čo zaraďuje týchto pacientov s akútnou myeloblastovou leukémiou (AML) do intermediárneho rizika a naznačuje dôležitú úlohu týchto mutácií v priebehu ochorenia (8). Mutácie týchto génov sú často prítomné súčasne s ďalšími mutáciami, ako sú *NPM1* alebo *FLT3*, ktoré môžu ovplyvniť prognózu pacienta a odpoveď na liečbu (7).

Klinický význam mutácií *IDH1/2*

Mutácie v génoch *IDH1* a *IDH2* majú zásadný klinický význam, pretože výrazne ovplyvňujú odpoveď na liečbu a prognózu pacientov s akútnou myeloblastovou leukémiou (AML) (8). Nové štúdie o mutáciách v *IDH1/2* otvorili možnosti pre vývoj špecifických terapeutík, ktoré cielene inhibujú abnormálnu aktivitu mutovaných proteínov.

Ivosidenib (inhibítor *IDH1*)

Ivosidenib je perorálny inhibítor *IDH1*, ktorý bol schválený pre pacientov s relabujúcou alebo refraktérnou AML s mutáciou v *IDH1*. Klinické štúdie ukázali, že ivosidenib znižuje hladiny 2-HG a podporuje obnovu diferenciácie leukemických buniek, čo u mnohých pacientov vedie k úplnej remisii. Tento liek preukázateľne zlepšuje celkové prežívanie a je dôležitou terapeutickou možnosťou pre pacientov, ktorí nereagujú na štandardné liečby (10).

Enasidenib (inhibítor *IDH2*)

Enasidenib je inhibítor *IDH2* schválený na liečbu pacientov s relapsujúcou alebo refraktérnou AML s mutáciou *IDH2*. Podobne ako ivosidenib, aj enasidenib vedie k zníženiu hladín 2-HG a zlepšuje prežívanie pacientov. Obnova diferenciácie buniek umožňuje dosiahnutie dlhodobej remisie, čím sa enasidenib stáva významnou možnosťou liečby pre pacientov s týmito mutáciami (10).

Význam genetickej diagnostiky v AML

Mutácie v génoch *IDH1* a *IDH2* ovplyvňujú bunkový metabolizmus a epigenetickú reguláciu, čím prispievajú k leukemickej transformácii (3). Genetické testovanie týchto mutácií je preto obzvlášť dôležité u pacientov s akútnou myeloblastovou leukémiou (AML), najmä u tých s intermediárnym karyotypom, kde môžu tieto mutácie významne ovplyvniť klinický priebeh a prognózu ochorenia (8). Diagnostika týchto mutácií sa stala bežnou klinickou praxou, pretože umožňujú:

- 1. presnú stratifikáciu rizika:** na základe prítomnosti alebo neprítomnosti mutácií *IDH1* a *IDH2* možno klasifikovať pacientov do rôznych rizikových skupín, čo pomáha pri rozhodovaní o intenzivite liečby (20);
- 2. určenie vhodnej cielenej liečby:** pacienti s mutáciami *IDH1* alebo *IDH2* môžu profitovať z liečby inhibítormi *IDH* (napr. ivosidenib pre mutácie *IDH1* a enasidenib pre mutácie *IDH2*), čím sa zvyšuje ich šanca na úspešnú liečbu, najmä v prípadoch relapsujúcej alebo refraktérnej AML (10);
- 3. monitorovanie odpovede na liečbu a MRD (minimal residual disease):** dynamika poklesu alebo perzistencie mutovaných alel v priebehu liečby predstavuje kľúčový biomarker, ktorý umožňuje hodnotiť účinnosť eradikácie leukemických buniek a identifikovať riziko pretrvávajúceho minimálneho reziduálneho ochorenia a možného relapsu (15). Monitorovanie MRD sa stáva kľúčovým nástrojom pre manažment ochorenia (24).

Genetická diagnostika mutácií *IDH1/2*

Genetické testovanie mutácií v génoch *IDH1* a *IDH2* môže byť vykonané rôznymi technikami, z ktorých každá má svoje výhody v rámci presnosti, rýchlosti a nákladov.

Najčastejšie používané metódy

- 1. Sekvenovanie novej generácie (NGS Next-Generation Sequencing)**

Sekvenovanie novej generácie (NGS) predstavuje modernú technológiu, ktorá umožňuje simultánnu analýzu veľkého množstva génov s veľkou kapacitou. Paralelným sekvenovaním poskytuje komplexné genetické profilovanie, pričom sa vyznačuje vysokou citlivosťou a presnosťou. Tieto vlastnosti z nej robia neoceniteľný nástroj na identifikáciu genetických mutácií, detekciu minimálnej reziduálnej choroby (MRD) a optimalizáciu personalizovanej liečby v oblasti onkológie a hematológie (17). Vďaka svojej robustnosti a schopnosti detegovať mutácie v génoch *IDH1* a *IDH2* aj pri nízkej frekvencii mutovaných alel je NGS kľúčová pre efektívne monitorovanie MRD (18).

Výhody NGS zahŕňajú:

- **vysoká citlivosť a presnosť:** NGS je schopné detegovať nízke hladiny mutantných alel, ktoré by mohli byť prehliadnuté inými metódami (18);
- **komplexná analýza:** NGS umožňuje analýzu viacerých génov naraz, čo je užitočné najmä v prípadoch, keď je potrebné vyhodnotiť celý panel mutácií v AML (napr. mutácie FLT3, NPM1 a iné) (17);
- **monitorovanie MRD:** vďaka schopnosti detegovať nízke hladiny mutovaných alel sa NGS využíva na sledovanie zvyškových leukemických buniek po liečbe, čo pomáha pri včasnej identifikácii relapsu (15).

2. Real-time PCR (RT-PCR)

RT-PCR (reverzná transkriptázová polymerázová reťazová reakcia) je nákladovo efektívna a rýchla metóda, často využívaná v klinickej praxi na detekciu špecifických mutácií v génoch *IDH1* a *IDH2* (25). Princíp tejto technológie spočíva v reverznej transkripcii RNA do

cDNA, ktorá sa následne amplifikuje pomocou PCR, čo umožňuje detegovať špecifické genetické zmeny. Vzhľadom na svoju vysokú špecifickosť a rýchlosť je RT-PCR vhodná pre rutinné klinické použitie, čo umožňuje včasné rozhodovanie o terapeutických intervenciách na základe prítomnosti mutácií (20).

Výhody RT-PCR zahŕňajú:

- **rýchlosť:** výsledky môžu byť dostupné už v priebehu niekoľkých hodín, čo je dôležité v urgentných prípadoch, keď je potrebné rýchlo rozhodnúť o liečbe (18);
- **citlivosť:** RT-PCR dokáže detegovať mutácie na úrovni jednotlivých bodových zmien v *IDH1* (napr. R132H) a *IDH2* (napr. R140Q alebo R172K) (18);
- **jednoduchosť a dostupnosť:** táto metóda je široko dostupná v klinických laboratóriách (20). EntroGene kit je moderný molekulový diagnostický nástroj, ktorý umožňuje rýchlu a presnú detekciu mutácií v génoch *IDH1* a *IDH2* (17). Tento kit využíva technológiu PCR v reálnom čase (qPCR), ktorá zabezpečuje vysokú citlivosť a špecifickosť pri identifikácii aj nízkozastúpených mutácií v nádorových vzorkách (17).

V tabuľke 1 je uvedený zoznam mutácií, ktoré možno zachytiť používanou metódou. Postup zahŕňa izoláciu DNA zo vzorky, amplifikáciu cieľových génov a následnú detekciu prítomných mutácií. Výsledky sú k dispozícii v priebehu niekoľkých hodín, čo umožňuje rýchle rozhodovanie v klinickej praxi (18). Výsledky sú interpretované na základe analýzy krivky amplifikácie a intenzity fluorescence. Pozitívna detekcia mutácie sa prejaví špecifickým signálom, ktorý umožňuje iden-

Tabuľka 1. Zoznam mutácií *IDH* zistených používaným kitom.
Table 1. List of *IDH* Mutations Detected by the Kit Used.

Gene	Exon	AA Change	nt Change	HGVS AA Change	HGVS nt Change	Cosmic ID	Detected by Primer No.
IDH1	4	R132H	c.395G>A	LRG_610p1:p.(Arg132His)	LRG_610t1:c.395G>A	COSM28746	1
		R132C	c.394C>T	LRG_610p1:p.(Arg132Cys)	LRG_610t1:c.394C>T	COSM28747	
		R132S	c.394C>A	LRG_610p1:p.(Arg132Ser)	LRG_610t1:c.394C>A	COSM28748	
		R132G	c.394C>G	LRG_610p1:p.(Arg132Gly)	LRG_610t1:c.394C>G	COSM28749	
		R132L	c.395G>T	LRG_610p1:p.(Arg132Leu)	LRG_610t1:c.395G>T	COSM28750	
		R132P	c.395G>C	LRG_610p1:p.(Arg132Pro)	LRG_610t1:c.395G>C	COSM221574	
		R132V	c.394_395CG>GT	NM_005896.4(IDH1_i001):p.(Arg132Val)	NM_005896.4:c.394_395delinsGT	COSM28751	
		R100Q	c.299G>A	LRG_610p1:p.(Arg100Gln)	LRG_610t1:c.299G>A	COSM88208	
IDH2	4	R172K	c.515G>A	LRG_611p2:p.(Arg172Lys)	LRG_611t2:c.515G>A	COSM33733	3
		R172M	c.515G>T	LRG_611p2:p.(Arg172Met)	LRG_611t2:c.515G>T	COSM33732	
		R172W	c.514A>T	LRG_611p2:p.(Arg172Trp)	LRG_611t2:c.514A>T	COSM34039	
		R172G	c.514A>G	LRG_611p2:p.(Arg172Gly)	LRG_611t2:c.514A>G	COSM33731	
		R172S	c.516G>T	LRG_611p2:p.(Arg172Ser)	LRG_611t2:c.516G>T	COSM34090	
		R140Q	c.419G>A	NM_002168.4(IDH2_i001):p.(Arg140Gln)	NM_002168.4:c.419G>A	COSM41590	4
		R140W	c.418C>T	LRG_611p2:p.(Arg140Trp)	LRG_611t2:c.418C>T	COSM41877	5
		R140L	c.419G>T	LRG_611p2:p.(Arg140Leu)	LRG_611t2:c.419G>T	COSM41875	
R140G	c.418C>G	LRG_611p2:p.(Arg140Gly)	LRG_611t2:c.418C>G	COSM17378			

tifikovať prítomnosť bodových mutácií v cieľových miestach génov *IDH*. V prípade heterozygotných mutácií možno zaznamenať signál pre obe alely, čo umožňuje presnejšiu genotypizáciu (17).

Dôležitosť detekcie mutácií *IDH* je obzvlášť zreteľná v oblasti personalizovanej medicíny (10). Pacienti s mutáciami *IDH* môžu profitovať z cielených terapií, ktoré sú špecificky navrhnuté na inhibíciu mutantného enzýmu *IDH*, čím sa zvyšuje účinnosť liečby a znižuje toxicita tradičnej chemoterapie (10, 23). V praxi je použitie EntroGene kitu cenným prínosom pre onkológov a hematológov, pretože poskytuje presné a rýchle výsledky, ktoré môžu zlepšiť klinické výsledky pacientov s nádorovými ochoreniami spojenými s mutáciami *IDH* (17). Táto metóda je menej nákladná v porovnaní s NGS (18).

3. Sangerovo sekvenovanie

Sangerovo sekvenovanie je klasická sekvenačná technika založená na metóde dideoxy sekvenovania, pri ktorej sa syntéza DNA ukončí pomocou dideoxynukleotidov, čo umožňuje presné čítanie sekvencie nukleotidov (19). Hoci má nižšiu senzitivitu v porovnaní so sekvenovaním novej generácie (NGS) alebo RT-PCR, Sangerovo sekvenovanie zostáva spoľahlivou metódou pre detekciu známych bodových mutácií v génoch ***IDH1*** a ***IDH2*** (18). Vzhľadom na svoju vysokú špecifitu a presnosť je táto metóda často využívaná ako potvrdzujúca technika na validáciu výsledkov získaných inými metodikami, čo je kľúčové pre zabezpečenie spoľahlivosti diagnostických procesov (19).

Výhody tejto metódy zahŕňajú:

- **vysoká špecifita:** poskytuje presné výsledky pre konkrétne bodové mutácie, napríklad *IDH1* R132H alebo *IDH2* R140Q (18);
- **spoľahlivosť:** je zlatým štandardom pre potvrdzovanie výsledkov sekvenovania alebo PCR (19).

4. Digitálna PCR (dPCR)

Digitálna PCR (dPCR) je najmodernejšia metóda, ktorá umožňuje vysokopresnú kvantifikáciu mutovaných alel (17). Princíp dPCR spočíva v rozdelení vzorky na tisíce alebo milióny jednotlivých reakčných kvapiek, v ktorých prebieha amplifikácia cieľovej sekvencie, čo umožňuje detegovať aj nízke množstvo mutovaných alel. Táto technológia sa ukázala ako mimoriadne užitočná pri monitorovaní minimálnej reziduálnej choroby (MRD), pretože dokáže identifikovať veľmi nízke frekvencie mutácií, čo je kľúčové pre zhodnotenie rizika relapsu a efektívnosti liečby (7).

Hlavné výhody dPCR zahŕňajú:

- **extrémna citlivosť:** dosahuje vysokú citlivosť detekcie, pričom je schopná identifikovať mutované alely v koncentrácii až 0,001 % až 0,01 % z celkového počtu normálnych alel (7);
- **presná kvantifikácia:** umožňuje presné meranie mutačného zaťaženia, čo je užitočné na monitorovanie odpovede na liečbu a progresie ochorenia (7);
- **použitie pri MRD:** digitálna PCR je jednou z najlepších metód na monitorovanie MRD, čo

poskytuje lekárom hodnotné informácie o stave pacienta po liečbe (7).

Klinická implementácia genetickej diagnostiky

Genetická diagnostika mutácií *IDH1* a *IDH2* sa stala súčasťou štandardného diagnostického panelu pre AML v mnohých klinických inštitúciách (5). Detekcia týchto mutácií má významný dopad na rozhodovanie o liečbe najmä vzhľadom na dostupnosť inhibítorov *IDH* pre pacientov s relapsujúcou alebo refraktérnou AML (10). Lekárom umožňuje aj monitorovať MRD a včasne identifikovať riziko relapsu (15). V klinickej praxi je dôležité zvoliť vhodnú metódu diagnostiky v závislosti od cieľa testovania (diagnóza vs. monitorovanie MRD) a dostupnosti technológií (17). Kým NGS poskytuje komplexné informácie a je vhodné pre iníciaľnu diagnostiku a stratifikáciu, RT-PCR a digitálna PCR sú preferované pre rýchle rozhodnutia a monitorovanie po liečbe (7, 18). Mutácie v génoch ***IDH1*** a ***IDH2*** predstavujú významný molekulový marker v AML (8). Genetická diagnostika týchto mutácií je kľúčová pre personalizovanú liečbu a monitorovanie choroby (3). Vďaka pokrokom v molekulovej diagnostike a vývoju cielených inhibítorov *IDH* sa otvárajú nové terapeutické možnosti pre pacientov s AML, čo vedie k zlepšeniu klinických výsledkov a zníženiu rizika relapsu (10, 15).

Monitorovanie minimálnej reziduálnej choroby (MRD) pri AML

Monitorovanie minimálnej reziduálnej choroby (MRD) je kľúčovým prvkom v manažovaní pacientov s akútnou myeloblastovou leukémiou (AML), pretože poskytuje cenné informácie o prítomnosti reziduálnych leukemických buniek po liečbe (7). MRD označuje nízke množstvo leukemických buniek, ktoré sú prítomné aj po dosiahnutí klinickej remisie a nie sú detegovateľné štandardnými molekulovo-cytogenetickými metódami (1). Tieto zvyškové bunky môžu byť zodpovedné za relaps ochorenia, preto je ich včasná detekcia a monitorovanie kľúčové pre ďalší manažment pacienta (15). Senzitivita metodík na detekciu minimálnej reziduálnej choroby (MRD) určuje schopnosť odhaliť aj veľmi nízke množstvo zvyškových nádorových buniek, ktoré zostávajú po liečbe. Metódy s vysokou senzitivitou, ako kvantitatívna polymerázová reťazová reakcia (qPCR), prietoková cytometria alebo technológie založené na sekvenovaní novej generácie (NGS), umožňujú detegovať MRD na úrovni jedného nádorového klonu na 10^4 až 10^6 normálnych buniek. Výber metodiky závisí od typu malignity, dostupných molekulových markerov a požadovanej citlivosti, čo má zásadný vplyv na stratifikáciu pacientov a dávkovanie ďalšej terapie. Existuje niekoľko citlivých molekulových metód, ktoré umožňujú detekciu MRD v AML (18). Medzi najčastejšie patrí **sekvenovanie novej generácie (NGS)**, ktoré umožňuje identifikáciu a kvantifikáciu mutácií na úrovni DNA, vrátane mutácií v génoch *IDH1* a *IDH2* (17). Táto metóda má vysokú citlivosť a je schopná detegovať nízke hladiny

ny mutančných alel, čo je dôležité pre sledovanie MRD po terapii a identifikáciu skorého relapsu (7). **Real-time PCR (RT-PCR)** sa široko používa na monitorovanie MRD u pacientov s AML, pretože umožňuje rýchlu detekciu špecifických mutácií, napríklad v génoch *NPM1*, *FLT3*, *IDH1* a *IDH2* (18). Táto metóda je veľmi citlivá a lacná, a preto je vhodná pre rutinné klinické použitie pri monitorovaní reziduálnych leukemických buniek (20). **Digitálna PCR (dPCR)** poskytuje ešte vyššiu citlivosť v porovnaní s tradičnou PCR (7). Je schopná kvantifikovať mutované alely s extrémnou presnosťou, čo z nej robí ideálny nástroj na sledovanie MRD (7). Táto metóda umožňuje detekciu aj veľmi nízkych frekvencií leukemických buniek, čo je nevyhnutné pri hodnotení odpovede na liečbu a predpovedaní relapsu (15). Pacienti s detegovateľnou MRD majú významne vyššie riziko recidívy ochorenia, čo môže vyžadovať intenzívnejšie terapeutické stratégie, ako sú alogénne transplantácie kmeňových buniek alebo pridanie ďalších liečebných cyklov. **Monitorovanie MRD** umožňuje personalizovaný prístup k liečbe AML (10). Pacienti bez detegovateľnej MRD môžu byť menej vystavení intenzívnym liečebným postupom, čím sa znižuje riziko toxicity (15). Na druhej strane tí s pretrvávajúcou MRD môžu profitovať z včasnej intervencie, aby sa zabránilo relapsu (10). Dlhodobé monitorovanie MRD poskytuje lekárom nástroj na sledovanie odpovede pacienta na liečbu v reálnom čase (7). Identifikácia relapsu v ranom štádiu môže umožniť rýchlu úpravu liečby a zvýšiť šance na úspešnú eradikáciu ochorenia (15).

Záver

Mutácie v génoch *IDH1* a *IDH2* majú významnú úlohu v patogenéze a liečbe akútnej myeloblastovej leukémie (AML) (3). Ich identifikácia má významný dopad na stratifikáciu rizika a výber liečby (7). Tvorba onkometabolitu **2-hydroxyglutarátu (2-HG)** vedie k rozsiahlym epigenetickým zmenám, ktoré podporujú leukemickú transformáciu, čím sa inhibícia týchto mutácií stáva atraktívnym cieľom pre cieleňú terapiu. Tento mechanizmus umožňuje blokovat' proonkogénne signálne dráhy a obnovit' normálnu epigenetickú reguláciu, čím prispieva k lepšiemu zvládaniu ochorenia (10). **Inhibítory *IDH***, ako ivosidenib a enasidenib, prinášajú nové terapeutické možnosti pre pacientov s relapsujúcou alebo refraktérnou AML, pričom zlepšujú ich šance na remisiu a dlhodobé prežívanie (14, 21). **Genetické testovanie mutácií *IDH1/2*** a monitorovanie minimálnej reziduálnej choroby (MRD) sa stáva neoddeliteľnou súčasťou personalizovaného prístupu k liečbe AML, čo môže výrazne ovplyvniť vývoj liečby a prognózu pacientov (7). Pokroky v technológiách, ako je **NGS a dPCR**, zlepšujú možnosti monitorovania MRD a umožňujú presnejšie prispôbenie liečby pacientom s AML (7, 18). **Integrácia týchto pokročilých metód do klinickej praxe** predstavuje nový štandard starostlivosti, ktorý môže zlepšiť celkové prežívanie pacientov tým, že umožňuje včasnú identifikáciu relapsu a presnejšiu individualizáciu liečby (15). Pokroky v oblasti molekulovej diagnostiky a cieleňej te-

rapie tak ponúkajú novú nádej v boji proti tomuto typu leukémie, pretože umožňuje selektívne zasahovať do patologických procesov, ktoré podporujú nádorový rast a progresiu ochorenia (10, 21).*

Konflikt záujmov: Autori v súvislosti s uverejnením tohto článku nemajú žiadny konflikt záujmov.

Literatúra

1. BILL M, JENTZSCH M, BISCHOF L, et al. Impact of *IDH1* and *IDH2* mutation detection at diagnosis and in remission in patients with AML receiving allogeneic transplantation. *Blood Advances* 2023, 7 (3): 436 – 444.
2. DINARDO CD, RAVANDI F, AGRESTA S, et al. Characteristics, clinical outcome and prognostic significance of *IDH* mutations in AML. *Am J Hematol* 2019, 94 (6): 739 – 746.
3. FIGUEROA ME, ABDEL-WAHAB O, LU C, et al. Leukemic *IDH1* and *IDH2* mutations result in a hypermethylation phenotype disrupting *TET2* function. *Int J Hematol* 2023, 112 (4): 567 – 580.
4. RAIMONDI V, CIOTTI G, GOTTARDI M, et al. 2-Hydroxyglutarate in Acute Myeloid Leukemia: A Journey from Pathogenesis to Therapies. *Biomedicines* 2022, 10 (6): 1359.
5. PAPAEMMANUIL E, GERSTUNG M, BULLINGER L, et al. Genomic classification and prognosis in acute myeloid leukemia. *New Engl J Med* 2016, 374 (23): 2209 – 2221.
6. DINARDO CD, STEIN EM, DE BOTTON S, et al. Durable remissions with ivosidenib in *IDH1*-mutated relapsed or refractory AML. *N Engl J Med* 2018, 378 (25): 2386 – 2398.
7. LINDSLEY RC, MAR BG, MAZZOLA E, et al. Detection of somatic mutations in AML using RT-PCR and its clinical applications. *Leuk Lymphoma* 2018, 59 (4): 937 – 946.
8. BRUSERUD Ř, TSYKUNOVA G, HERNANDEZ-VALLADARES M, et al. Therapeutic use of valproic acid and all-trans retinoic acid in acute myeloid leukemia – literature review and discussion of possible use in relapse after allogeneic stem cell transplantation. *Pharmaceuticals* 2021, 14 (5): 423.
9. MEDEIROS BC, FATHI AT, DINARDO CD, et al. Isocitrate dehydrogenase mutations in myeloid malignancies. *Leukemia* 2017, 31 (2): 272 – 281.
10. MEDEIROS BC, POLLYEA D.A, FATHI AT, et al. Genomic profiling in AML: The role of isocitrate dehydrogenase mutations in guiding treatment decisions. *Clin Adv Hematol Oncol* 2020, 18 (6): 312 – 319.
11. CORCES-ZIMMERMAN MR, HONG WJ, WEISSMAN IL, et al. Digital PCR in AML: Precision and sensitivity in monitoring minimal residual disease. *Blood Adv* 2020, 4 (15): 3563 – 3570.
12. AL SBIHI A, REDDY SN, DHILLON V, et al. Real-World Outcomes of *IDH* Mutant AML Patients Treated with or without *IDH* Inhibitors. *Blood* 2022, 140 (1): 6189 – 6190.
13. POLLYEA DA, AMAYA M, STRATI P, et al. Overcoming venetoclax resistance in acute myeloid leukemia (AML). *Leuk Lymphoma* 2019, 60 (1): 1 – 8.
14. PAPAEMMANUIL E, GERSTUNG M, BULLINGER L, et al. Genomic classification and prognosis in acute myeloid leukemia. *N Engl J Med* 2016, 374 (23): 2209 – 2221.
15. SHORT NJ, RAVANDI F, DAVER N, et al. The role of measurable residual disease in decision-making for acute myeloid leukemia. *J Hematol Oncol* 2020, 13 (1): 1 – 12.

-
16. MILES LA, BOWMAN RL, MERLINSKY TR, et al. Single-cell mutation analysis of clonal evolution in myeloid malignancies. *Nature* 2020, 587 (7833): 477 – 482.
 17. HEUSER M, FREEMAN SD, OSSENKOPPELE GJ. Advanced molecular tools for MRD detection in AML: dPCR and NGS approaches. *Blood Rev* 2021, 47: 100775.
 18. IVEY A, HILLS RK, SIMPSON MA, et al. Digital PCR in AML: Optimizing strategies for detecting residual disease. *Nat Commun* 2019, 10 (1): 1769.
 19. JONGEN-LAVRENCIC M, GROB T, HANEKAMP D, et al. Molecular minimal residual disease in AML using RT-PCR. *N Engl J Med* 2018, 378 (13): 1189 – 1199.
 20. KRÖNKE J, SCHLENK RF, JENSEN KO, et al. Molecular detection of MRD in AML: Improving methodologies for enhanced accuracy. *Nat Rev Clin Oncol* 2021, 18 (6): 379 – 394.
 21. NORSWORTHY KJ, MULKEY F, SCOTT EC, et al. U.S. Food and Drug Administration approval summary: Ivosidenib for relapsed or refractory acute myeloid leukemia. *Clin Cancer Res* 2019, 25 (13): 3205 – 3209.
 22. DÖHNER H, ESTEY E, AMADORI S, et al. Diagnosis and management of AML in adults: 2017 ELN recommendations. *Blood* 2019, 129 (4): 424 – 447.
 23. WAITKUS MS, DIPLAS BH, YAN H. Biological role and therapeutic potential of IDH mutations in cancer. *Cancer Cell* 2018, 34 (2): 186 – 195.
 24. PLATZBECKER U. MRD-guided therapy in AML: A future perspective on its role in clinical practice. *Leukemia* 2020, 34 (3): 682 – 696.
 25. SCHUURHUIS GJ, HEUSER M, FREEMAN S, et al. Minimal residual disease in AML: Real-time monitoring and clinical significance. *J Clin Oncol* 2018, 36 (15): 1474 – 1484.

Do redakcie došlo 23. 10. 2024.

Adresa pre korešpondenciu:

Ing. Mária Suchánová, MSc.

Oddelenie lekárskej genetiky Medirex, a. s.

Galvaniho 17C

821 04 Bratislava

E-mail: maria.suchanova@medirex.sk