



Εθνικό και Καποδιστριακό
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ



ΜΟΡΙΑΚΟΣ ΚΑΙ ΚΛΙΝΙΚΟΣ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΙΔΙΟΠΑΘΟΥΣ ΘΡΟΜΒΟΚΥΤΤΑΡΑΙΜΙΑΣ

*ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΓΙΑ ΤΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
«ΜΟΡΙΑΚΗ ΙΑΤΡΙΚΗ»*

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ: ΔΗΜΗΤΡΗΣ ΛΟΥΚΟΠΟΥΛΟΣ, ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ ΤΟΥ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟΥ ΜΕΛΕΤΗΣ ΜΥΕΛΟΪΠΕΡΠΛΑΣΤΙΚΩΝ ΝΟΣΗΜΑΤΩΝ ΤΟΥ ΙΔΡΥΜΑΤΟΣ
ΙΑΤΡΟΒΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΕΡΕΥΝΩΝ ΤΗΣ ΑΚΑΔΗΜΙΑΣ ΑΘΗΝΩΝ (ΙΙΒΕΑΑ) ΚΑΙ ΟΜΟΤΙΜΟΣ
ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΤΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΣΧΟΛΗΣ ΤΟΥ ΕΘΝΙΚΟΥ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟΥ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΑΘΗΝΩΝ (ΕΚΠΑ)

ΝΙΚΗ ΡΟΥΓΚΑΛΑ, ΕΙΔΙΚΕΥΟΜΕΝΗ ΑΙΜΑΤΟΛΟΓΙΑΣ Γ.Ν.Α. ΛΑΪΚΟ



ΣΕΠΤΕΜΒΡΙΟΣ 15



Ὅμνυμι Ἀπόλλωνα ἰητρὸν, καὶ Ἀσκληπιὸν, καὶ Ὑγίαν, καὶ Πανάκειαν, καὶ θεοὺς πάντας τε καὶ πάσας, ἱστορας ποιούμενος, ἐπιτελέα ποιήσῃν κατὰ δύναμιν καὶ κρίσιν ἐμήν ὄρκον τόνδε καὶ συγγραφὴν τήνδε. Ἥγησασθαι μὲν τὸν διδάξαντά με τὴν τέχνην ταύτην ἴσα γενέτησιν ἐμοῖσι, καὶ βίου κοινώσασθαι, καὶ χρεῶν χρηρίζοντι μετὰδοσιν ποιήσασθαι, καὶ γένος τὸ ἐξ ωύτέου ἀδελφοῖς ἴσον ἐπικρινέειν ἄρρεσι, καὶ διδάξῃν τὴν τέχνην ταύτην, ἣν χρηρίζωσι μανθάνειν, ἄνευ μισθοῦ καὶ συγγραφῆς, παραγγελίης τε καὶ ἀκροήσιος καὶ τῆς λοιπῆς ἀπάσης μαθήσιος μετὰδοσιν ποιήσασθαι υἱοῖσί τε ἐμοῖσι, καὶ τοῖσι τοῦ ἐμὲ διδάξαντος, καὶ μαθηταῖσι συγγεγραμμένοις τε καὶ ὠρκισμένοις νόμῳ ἱητρικῷ, ἄλλῳ δὲ οὐδενί. Διαιτήμασί τε χρήσομαι ἐπὶ ὠφελείῃ καμνόντων κατὰ δύναμιν καὶ κρίσιν ἐμήν, ἐπὶ δηλήσει δὲ καὶ ἀδικίῃ εἴρξῃν. Οὐ δώσω δὲ οὐδὲ φάρμακον οὐδενὶ αἰτηθεὶς θανάσιμον, οὐδὲ ὑψηγήσομαι ξυμβουλίην τοιήνδε. Ὁμοίως δὲ οὐδὲ γυναικὶ πεσσὸν φθόριον δώσω. Ἀγνῶς δὲ καὶ ὁσίως διατηρήσω βίον τὸν ἐμὸν καὶ τέχνην τὴν ἐμήν. Οὐ τεμέω δὲ οὐδὲ μὴν λιθιῶντας, ἐκχωρήσω δὲ ἐργάτησιν ἀνδράσι πρήξιος τῆσδε. Ἐς οἰκίας δὲ ὁκόσας ἂν ἐσίω, ἐσελεύσομαι ἐπὶ ὠφελείῃ καμνόντων, ἐκτὸς ἐὼν πάσης ἀδικίης ἐκουσίης καὶ φθορίης, τῆς τε ἄλλης καὶ ἀφροδισίων ἔργων ἐπὶ τε γυναικείων σωματῶν καὶ ἀνδρῶν, ἐλευθέρων τε καὶ δούλων. Ἄ ὃ ἂν ἐν θεραπείῃ ἦ ἴδω, ἢ ἀκούσω, ἢ καὶ ἄνευ θεραπείης κατὰ βίον ἀνθρώπων, ἃ μὴ χρή ποτε ἐκλαλέεσθαι ἔξω, σιγήσομαι, ἄρρήτα ἡγεύμενος εἶναι τὰ τοιαῦτα. Ὅρκον μὲν οὖν μοι τόνδε ἐπιτελέα ποιεῶντι, καὶ μὴ ξυγχέοντι, εἴη ἐπαύρασθαι καὶ βίου καὶ τέχνης δοξαζομένῳ παρὰ πᾶσιν ἀνθρώποις ἐς τὸν αἰεὶ χρόνον, παραβαίνοντι δὲ καὶ ἐπιόρκοῦντι, τάναντία τουτέων.

ΠΡΟΛΟΓΟΣ.

Ο τομέας της μοριακής βιολογίας αναδεικνύεται πολλαπλά υποσχόμενος τα τελευταία χρόνια και η συμβολή του στην πρόοδο της ιατρικής είναι αναμφίβολη. Στην ειδικότητα της αιματολογίας, τα μυελοϋπερπλαστικά νοσήματα αποτελούν εδώ και δεκαετίες πεδίο εφαρμογής των μοριακών τεχνικών, από την ταυτοποίηση του χμαιοϊικού μεταγράφου BCR-ABL1 ως το προϊόν του χρωμοσώματος *Philadelphia*. Οι μεταγενέστερες ανακαλύψεις της σημειακής μετάλλαξης JAK2V617F, των μεταλλάξεων στον υποδοχέα της θρομβοποιητίνης, c-MPL, και εκείνων στην πρωτεΐνη του ενδοπλασματικού δικτύου καλρετικουλίνη, άνοιξαν το δρόμο για την κατανόηση της παθογένειας των *Philadelphia* αρνητικών, κλασσικών μυελοϋπερπλαστικών νοσημάτων.

Ως ιατρός, ειδικευόμενη στην αιματολογία, ενδιαφέρομαι για κάθε γνώση που προάγει την ιατρική επιστήμη. Το μεταπτυχιακό πρόγραμμα σπουδών του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών (ΕΚΠΑ) «ΜΟΡΙΑΚΗ ΙΑΤΡΙΚΗ» επέτρεψε την είσοδό μου στο γοητευτικό κόσμο της μοριακής βιολογίας. Θα ήθελα, ως εκ τούτου, να ευχαριστήσω τον πρώην υπεύθυνο του προγράμματος, και καθηγητή Βιολογίας του ΕΚΠΑ, κύριο Νικόλαο Ανάγνου, που με επέλεξε να συμμετάσχω στο πρόγραμμα. Θα ήθελα, επίσης, να ευχαριστήσω, το διευθυντή του εργαστηρίου μελέτης μυελοϋπερπλαστικών νοσημάτων του Ιδρύματος Ιατροβιολογικών Ερευνών της Ακαδημίας Αθηνών (ΙΙΒΕΑΑ) και ομότιμο καθηγητή της Ιατρικής σχολής του ΕΚΠΑ, κύριο Δημήτρη Λουκόπουλο, που με δέχτηκε για την εκπόνηση της διπλωματικής μου διατριβής. Τέλος, το συνεργάτη μου στο εργαστήριο, βιολόγο Ανδρέα Γιαννόπουλο, και πάνω από όλους, την επιστημονική υπεύθυνη του εργαστηρίου, βιολόγο Κατερίνα Ζώη, για την καθοδήγηση και τις πολύτιμες συμβουλές της.

Νίκη Ρουγκάλα

Ειδικευόμενη Αιματολογίας

(Α΄ Παθολογική Κλινική, Γ.Ν.Α. Λαϊκό)

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΟΡΚΟΣ ΙΠΠΟΚΡΑΤΗ.....	2
ΠΡΟΛΟΓΟΣ.....	3
ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ.....	4
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	7
1.1 Μεγακαρυοποίηση.....	8
1.2 Θρομβοκυττάρωση: ορισμός και αιτιολογική ταξινόμηση.....	10
1.3 Ιδιοπαθής θρομβοκυτταραιμία.	13
1.3.1 Γενικά χαρακτηριστικά	13
1.3.2 Αιτιολογία-παθογένεια.	14
1.3.3 Κλινική εικόνα.	15
1.3.4 Εργαστηριακά ευρήματα.	16
1.3.5 Διάγνωση.....	17
1.3.6 Επιπλοκές.	20
1.3.7 Θεραπεία.....	22
1.4 Μοριακός χαρακτηρισμός της ιδιοπαθούς θρομβοκυτταραιμίας..	25
1.4.1 Η οδός μεταγωγής σήματος TPO-cMPL-JAK2.	25
1.4.2 Ο απλότυπος 46/1.....	30
1.4.3 Ιδιοπαθής θρομβοκυτταραιμία που συνοδεύεται από τη μετάλλαξη JAK2V617F.	32
1.4.4 Ιδιοπαθής θρομβοκυτταραιμία που συνοδεύεται από μεταλλάξεις στον υποδοχέα της θρομβοποιητίνης c-MPL.....	34
1.4.5 Ιδιοπαθής θρομβοκυτταραιμία που συνοδεύεται από μεταλλάξεις στο γονίδιο της καλρετικουλίνης.....	35
1.4.6 Ιδιοπαθής θρομβοκυτταραιμία που δε συνοδεύεται από γνωστή μοριακή βλάβη. ...	36
1.4.7 Ιδιοπαθής θρομβοκυτταραιμία που συνοδεύεται από σπανιότερες μεταλλάξεις.....	39
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2. ΒΑΣΙΚΕΣ ΑΡΧΕΣ ΤΩΝ ΜΟΡΙΑΚΩΝ ΤΕΧΝΙΚΩΝ ΠΟΥ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΗΘΗΚΑΝ ΣΤΗΝ ΠΑΡΟΥΣΑ ΜΕΛΕΤΗ.	41
2.1. Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR).	41

2.2 Αντίστροφη μεταγραφή – Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Reverse Transcription PCR , RT-PCR).....	45
2.3 Ανάδειξη των προϊόντων της PCR με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης.....	46
2.4 Amplification Refractory Mutation System-PCR (ARMS-PCR).....	48
2.4 AS PCR (Allele Specific PCR).....	50
2.5 Ανάλυση πρωτοδιάταξης γονιδιώματος (DNA SEQUENCING).....	52
2.5.1 Αυτοματοποίηση του προσδιορισμού της πρωτοδιάταξης του DNA.....	53
2.5.2 Ανίχνευση σημειακών μεταλλάξεων.....	55
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3. ΣΚΟΠΟΣ	56
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4. ΥΛΙΚΑ-ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ.	57
4.1 Αντιδραστήρια.....	57
4.2 Κλινικό υλικό	58
4.3 Μέθοδοι	59
4.3.1 Απομόνωση μονοπυρήνων κυττάρων περιφερικού αίματος ή μυελού των οστών. ...	59
4.3.2 Απομόνωση γενωμικού DNA.....	59
4.3.3 Απομόνωση RNA.....	61
4.3.4 Ποσοτικός προσδιορισμός DNA και RNA (φωτομετρικός προσδιορισμός) και ανάδειξη με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης.....	62
4.3.5 Αντίστροφη μεταγραφή - Σύνθεση cDNA.....	63
4.3.6 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης.....	64
4.3.7 "Φωλιασμένη" (nested) PCR.....	66
4.3.8 Ανίχνευση της μετάλλαξης <i>JAK2V617F</i> με την μέθοδο ARMS PCR (Amplification-Refractory Mutation System)	67
4.3.9 Allele specific PCR για την ανίχνευση μεταλλάξεων στον υποδοχέα της θρομβοποιητίνης c-MPL.....	69
4.3.10 Αυτόματος προσδιορισμός αλληλουχίας (sequencing) για το γονίδιο του cMPL.....	71
4.3.11 Ανίχνευση μεταλλάξεων στο γονίδιο της <i>CALR</i>	72
4.3.12 Προσδιορισμός αλληλουχίας (Sequencing) για το γονίδιο της καλρετικουλίνης.	73

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	75
5.1 Ακεραιότητα του DNA	75
5.2 Ακεραιότητα του RNA	75
5.3 Αντίστροφη μεταγραφή RNA για την σύνθεση cDNA και έλεγχος της ποιότητας του cDNA με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) χρησιμοποιώντας το <i>ABL</i> ως γονίδιο αναφοράς.....	75
5.4 Ανίχνευση της μετάλλαξης <i>JAK2V617F</i> με την μέθοδο ARMS PCR σε ασθενείς με ΙΘ. 77	
5.5 Διερεύνηση μεταλλάξεων στο γονίδιο <i>MPL</i> σε ασθενείς με ΙΘ που είναι αρνητικοί για την μετάλλαξη <i>JAK2V617F</i> , με την μέθοδο Allele specific PCR.	78
5.6 Διερεύνηση μεταλλάξεων στο γονίδιο <i>CALR</i> σε ασθενείς που είναι αρνητικοί για τις μεταλλάξεις <i>JAK2V617F</i> και <i>W515L/K</i> με ενίσχυση του εξονίου 9 με ποιοτική PCR και DNA sequencing.....	80
5.7 Αποτελέσματα της διερεύνησης του γενετικού υπόβαθρου των ασθενών με ΙΘ που συμμετείχαν στη μελέτη.	82
5.8 Στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων.	82
5.9 Επιδημιολογικά, εργαστηριακά και κλινικά χαρακτηριστικά των πασχόντων από ΙΘ, κατανεμμένων στις τέσσερις μοριακές υποομάδες.	83
5.10 Ηλικία, αριθμός λευκών αιμοσφαιρίων, αιμοπεταλίων και τιμή αιματοκρίτη σε πάσχοντες από ΙΘ, ανάλογα με τη μοριακή βλάβη.	84
5.11 Η μετάλλαξη <i>JAK2V617F</i> και ο κίνδυνος θρομβωτικού επεισοδίου.....	87
5.12 <i>CALR</i> θετική ΙΘ: επιδημιολογικά, εργαστηριακά και κλινικά χαρακτηριστικά ανάλογα με τον τύπο της μετάλλαξης.	88
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	90
6.1 Σύγκριση των αποτελεσμάτων με δεδομένα από τη διεθνή βιβλιογραφία.....	91
6.2 Η θρόμβωση στην ΙΘ: πιθανή ερμηνεία και νεότερα προγνωστικά μοντέλα.	94
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7. ΕΠΙΛΟΓΟΣ.....	98
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	99
SUMMARY	100
Βιβλιογραφία.....	101

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.

Η ιδιοπαθής θρομβοκυτταραιμία (ΙΘ) (*essential thrombocythemia, ET*) είναι κλωνική διαταραχή του πολυδύναμου αιμοποιητικού κυττάρου που χαρακτηρίζεται από σταθερή αύξηση του αριθμού των αιμοπεταλίων στο περιφερικό αίμα και υπερπλασία μορφολογικά ώριμων μεγακαρυοκυττάρων στο μυελό των οστών. Συνοδεύεται από αυξημένη επίπτωση θρομβοαιμορραγικών επιπλοκών, ίνωσης και εκτροπής σε οξεία μυελογενή λευχαιμία. Περιγράφηκε για πρώτη φορά ως ξεχωριστή οντότητα το 1934 από τους *Emil Epstein* και *Alfred Goedel* με τον όρο αιμορραγική θρομβοκυτταραιμία, ενώ το 1951 ο *William Dameshek* την κατατάσσει στα μυελοϋπερπλαστικά νοσήματα, μαζί με τη χρονία μυελογενή λευχαιμία (ΧΜΛ), την αληθή πολυκυτταραιμία (ΑΠ) και την πρωτοπαθή μυελοϊνωση (ΠΜ)¹.

Σημείο σταθμός στην κατανόηση της μοριακής βιολογίας της νόσου ήταν η ανακάλυψη, το 2005, της σωματικής μετάλλαξης *JAK2V617F*, παρούσας στο ήμισυ των ασθενών με ΙΘ και ΠΜ, και σχεδόν στο σύνολο εκείνων με ΑΠ. Παρά τη σπουδαιότητα της ανακάλυψης, τα μισά περίπου περιστατικά των δύο πρώτων νοσημάτων παρέμειναν χωρίς χαρακτηρισμένη μοριακή βλάβη. Οι επιπρόσθετες μεταλλάξεις στο γονίδιο του υποδοχέα της θρομβοποιητίνης, *c-MPL*, και της πρωτεΐνης του ενδοπλασματικού δικτύου, καλρετικουλίνης (*CALR*), περιόρισαν σημαντικά αυτόν τον αριθμό. Ανευρίσκονται στο 5% και 25%, αντίστοιχα, των ασθενών με ΙΘ και ΠΜ αλλά όχι στην ΑΠ. Τέλος, σε σποραδικές περιπτώσεις έχουν περιγραφεί μεταλλάξεις σε πλειάδα άλλων γονιδίων (*TET2, CBL, LNK, ASXL1, IDH1/2, IKZF1*), συνήθως σε συνδυασμό με μία από τις τρεις προαναφερόμενες. Η σημασία τους είναι άγνωστη. Αντίθετα, οι μεταλλάξεις σε *JAK2, c-MPL* και *CALR* φαίνεται να είναι αμοιβαία αποκλειόμενες.

Ο μηχανισμός με τον οποίο οι παραπάνω μοριακές βλάβες εμπλέκονται στην παθογένεια της ΙΘ δεν είναι πλήρως κατανοητός. Τα μεταλλαγμένα μόρια *JAK2* και *c-MPL* οδηγούν σε συνεχή ενεργοποίηση την οδό σηματοδότησης *JAK2-STAT*, μέσω της οποίας η θρομβοποιητίνη, βασικός ρυθμιστής της θρομβοποίησης, ασκεί τη δράση της. Αποτέλεσμα της απορρύθμισης της φυσιολογικής διαδικασίας είναι υπερπλασία των μεγακαρυοκυττάρων στο μυελό των οστών και θρομβοκυττάρωση στο περιφερικό αίμα. Για την καλρετικουλίνη τα μέχρι τώρα δεδομένα είναι ασαφή.

Τέλος, θεωρείται ότι υπάρχει κληρονομική προδιάθεση για την εμφάνιση ΙΘ. Αυτό προκύπτει τόσο από τη μελέτη οικογενειών με περισσότερα από ένα προσβεβλημένα μέλη, όσο και από την αναγνώριση του ειδικού απλοτύπου 46/1 ή *GGCC* που μεταξύ άλλων, περιέχει το γονίδιο *JAK2*. Ο 46/1, προβάλλει ως κύριος προδιαθεσικός παράγοντας για την εμφάνιση μυελοϋπερπλαστικού νοσήματος, αυξάνοντας το σχετικό κίνδυνο τρεις έως τέσσερις φορές στα άτομα που τον φέρουν¹³.

Η ανακάλυψη των μεταλλάξεων που αναφέρθηκαν αλλά και του απλότυπου 46/1, βοήθησαν στην καλύτερη κατανόηση των μηχανισμών που καθοδηγούν τη παθολογική θρομβοποίηση. Αντικείμενο της παρούσας μελέτης αποτελεί η διερεύνηση πιθανής συσχέτισης μεταξύ κλινικών, εργαστηριακών και μοριακών παραμέτρων και η σύγκριση με δεδομένα που έχουν προκύψει από τη διεθνή βιβλιογραφία. Απώτερος στόχος αυτών των ερευνών είναι ευκολότερη διάγνωση, καλύτερη διαστρωμάτωση κινδύνου και στοχευμένη θεραπεία των ασθενών με ΙΘ.

1.1 Μεγακαρυοποίηση.

Τα αιμοπετάλια είναι μικρά απύρρηνα κύτταρα με δισκοειδές σχήμα. Εξελικτικά αποτελούν κυτταρικά υπολείμματα πολύ μεγαλύτερων πολυπλοειδικών κυττάρων. Η μεγακαρυοποίηση ξεκινά στην οστεοβλαστική φωλιά (*osteoblastic niche*) του μυελού των οστών όπου το αρχέγονο αιμοποιητικό κύτταρο (*hematopoietic stem cell, HSC*) διέρχεται από μια διαδικασία εξελικτικών σταδίων. Στη συνέχεια, οι δεσμευμένοι προς τη σειρά πρόγονοι μεταναστεύουν προς την αγγειακή φωλιά (*vascular*) και προσκολλώνται στο αγγειακό ενδοθήλιο. Μόλις προσεγγίσουν το ενδοθήλιο τα πρόδρομα μεγακαρυοκύτταρα σταματούν να πολλαπλασιάζονται και υπόκεινται τελική διαφοροποίηση, σχηματισμό προαιμοπεταλίων και απελευθέρωση αιμοπεταλίων στον αγγειακό χώρο⁵¹. Η διαδικασία ελέγχεται από την ενορχηστρωμένη δράση διαφορετικών κάθε φορά μεταγραφικών παραγόντων, υπό την εποπτεία αιμοποιητικών κυτταροκινών με προεξάρχουσα τη θρομβοποιητίνη (**βλ.εικ.1**).

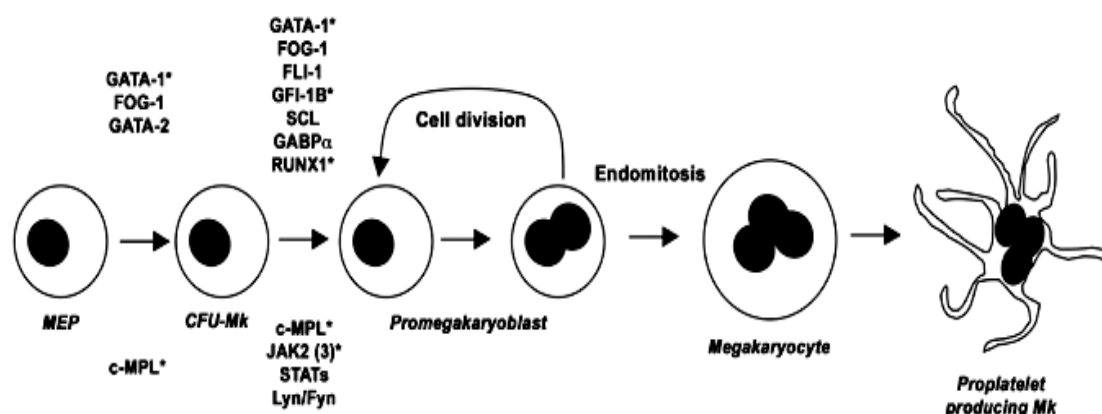
Ειδικότερα, το **HSC** υπό την επίδραση της θρομβοποιητίνης, της ιντερλευκίνης-3 και της κυτταροκίνης **SCF** (*stem cell factor*) δίνει διαδοχικά τη θέση του στα λιγότερο πολυδύναμα κύτταρα **MMP** (*πολυδύναμο προγονικό κύτταρο, multipotent progenitor*), **CMP** (*κοινό πρόγονο των κυττάρων της μυελικής σειράς, common myeloid progenitor*) και **MEP** (*κοινό πρόγονο ερυθρών-μεγακαρυοκυττάρων, megakaryocyte-erythroid progenitor*)⁴. Για τη μετάβαση από το **CMP** στο **MEP**, είναι απαραίτητη η παρουσία του μεταγραφικού παράγοντα *Gata1*, από κοινού με το συμπαράγοντά του, *FOG1*. Το **MEP** έχει διττή εξελικτική δυναμική, με την περαιτέρω μοίρα του να εξαρτάται από την παρουσία ή όχι ενός άλλου μεταγραφικού παράγοντα, του *Fli1*. Συνέκφραση των *Gata1* και *Fli1* δίνει γένεση στο πρώτο σαφώς δεσμευμένο προς τη μεγακαρυοκυτταρική σειρά κύτταρο, **BFU-Mk** (*burst forming unit-megakaryocyte*). Αντίθετη δράση έχει ο *cMyb*, που ευνοεί την ερυθροποίηση⁵⁰. Στη συνέχεια το **BFU-Mk** ωριμάζει προς **CFU-Mk** (*colony forming unit-megakaryocyte*) και διαδοχικά σχηματίζονται η **προμεγακαρυοβλάστη**, η **μεγακαρυοβλάστη**, το **προμεγακαρυοκύτταρο** και το ώριμο **μεγακαρυοκύτταρο** (μεγακαρυοκύτταρα τάξης I-IV).

Υπολογίζεται ότι από τα **BFU-Mk** και **CFU-Mk** με διαδοχικές μιτώσεις σχηματίζονται αποικίες των 100-500 και 4-32 κυττάρων αντίστοιχα. Στο στάδιο της

προμεγακαρυοβλάστης η ικανότητα πολλαπλασιασμού χάνεται. Αντ' αυτού, τα κύτταρα γίνονται πολυπλοειδή μέσω της *ενδομίτωσης*, μίας διαδικασίας παραλλαγής του κυτταρικού κύκλου. Συγκεκριμένα, μετά τις φάσεις *G1* και *S* το κύτταρο εισέρχεται στη μίτωση, αδυνατεί όμως να ολοκληρώσει επιτυχώς την ανάφαση και την τελόφαση, καθώς η διάσπαση της μιτωτικής ατράκτου ξεκινάει πρώιμα, πριν ολοκληρωθεί ο διαχωρισμός των ομόλογων χρωμοσωμάτων^{4,5}. Οι παράγοντες που ρυθμίζουν αν ένα μεγακαρυοκύτταρο θα εισέλθει σε μίτωση ή ενδομίτωση όπως και το γιατί τα πολυπλοειδή κύτταρα δεν υπόκεινται σε απόπτωση, παραμένουν άγνωστοι. Η πολυπλοειδία θεωρείται ότι διευκολύνει τις μετέπειτα αυξημένες ανάγκες πρωτεϊνικής σύνθεσης για το σχηματισμό των προαιμοπεταλίων, αν και σχετικές μελέτες απέτυχαν να συσχετίσουν τον αριθμό τους με το βαθμό πολυπλοειδίας⁴.

Ως αποτέλεσμα της ενδομίτωσης, από το στάδιο της προμεγακαρυοβλάστης και μετά σχηματίζονται απόγονοι με ολοένα και πιο πολυπλοειδικό γενετικό υλικό (*8N-128N*). Τα κύτταρα αυτά έχουν χάσει την ικανότητα πολλαπλασιασμού αλλά συνεχίζουν να ωριμάζουν. Ο πυρήνας γίνεται πολυλοβωτός, το μέγεθος σταδιακά αυξάνεται, ενώ η κυτταρική μεμβράνη σχηματίζει αναδιπλώσεις. Στην επιφάνειά της εκφράζονται τα χαρακτηριστικά κλάσματα διαφοροποίησης της μεγακαρυοκυτταρικής σειράς *CD41*, *CD42* και *CD61* (*clusters of differentiation, CD*). Ταυτόχρονα, στο κυτταρόπλασμα εμφανίζονται τα άλφα και τα πυκνά κοκκία και ξεκινά η σύνθεση των πρωτεϊνών που αποθηκεύουν, όπως ο παράγοντας *von Willebrand* και η θρομβοσπονδίνη. Εμφανίζεται επίσης το μεμβρανικό σύστημα οριοθέτησης (*demarcation membrane system, DMS*), ένα σύνολο μεμβρανών που καλύπτει ολόκληρη την επιφάνεια του κυτταροπλάσματος εκτός από μικρή έκταση στην περιφέρεια του κυττάρου. Θεωρείται το μεμβρανικό απόθεμα από το οποίο θα προέλθουν οι λεπτές, πολυάριθμες κυτταροπλασματικές προσεκβολές που ονομάζονται προαιμοπετάλια και αποτελούν τους προγόνους των αιμοπεταλίων.

Υπάρχουν δύο μοντέλα που ερμηνεύουν την κυκλοφορία των αιμοπεταλίων στην περιφέρεια. Σύμφωνα με το πρώτο τα μεγακαρυοκύτταρα μεταναστεύουν από το μυελό των οστών στην πνευμονική μικροκυκλοφορία όπου κατακερματίζονται σχηματίζοντας τα αιμοπετάλια. Το δεύτερο μοντέλο υποστηρίζει τη δημιουργία μεγακαρυοκυτταρικών προσεκβολών από τις οποίες απελευθερώνονται απευθείας τα αιμοπετάλια στη συστηματική κυκλοφορία, μέσω των κολπικών τριχοειδών του μυελού. Τα δεδομένα που υπάρχουν τόσο από *in vitro* μελέτες κυτταρικής μικροσκοπίας όσο και από *in vivo* μελέτες σημασμένων μεγακαρυοκυττάρων επιβεβαιώνουν ότι ο μυελός των οστών είναι η θέση αιμοπεταλιακής παραγωγής, αν και ένα μικρό ποσοστό δεν αποκλείεται να σχηματίζεται στους πνεύμονες⁴. Υπολογίζεται ότι κάθε μεγακαρυοκύτταρο απελευθερώνει 1000-3000 αιμοπετάλια μέσω μαζικής ανακατανομής των μεμβρανικών επιφανειών και του κυτταροσκελετού και επακόλουθη κλασματοποίηση των προαιμοπεταλίων. Στα τελικά στάδια ωρίμανσης αυτών των δομών, έχει προηγηθεί μετακίνηση κυτταρικών οργάνων και εκκριτικών κυστιδίων στο απώτερο άκρο τους⁵⁰.



Εικόνα 1. Γενική εποπτεία της μεγακαρυοποίησης. Η ωρίμανση των μεγακαρυοκυττάρων από το MEP σε μεγάλα κύτταρα που φέρουν προαιμοπεταλιακές προεξοχές. Αναγράφονται οι σημαντικότεροι μεταγραφικοί παράγοντες και τα σηματοδοτικά μόρια που ενέχονται στα αρχικά στάδια της μεγακαρυοκυτταρικής διαφοροποίησης. MEP, megakaryocyte-erythroid progenitor; CFU-Mk, colony forming unit-megakaryocyte; Mk, megakaryocyte (Από A Wickrema and J D Crispino Erythroid and megakaryocytic transformation, Oncogene 2007 26, 6803–6815; doi:10.1038/sj.onc.1210763 και Karen Peeters Emerging treatments for thrombocytopenia: Increasing platelet production, Drug Discovery Today, vol 13 Sept. 2008).

1.2 Θρομβοκυττάρωση: ορισμός και αιτιολογική ταξινόμηση.

Ο μυελός των οστών ενός φυσιολογικού ενήλικου παράγει καθημερινά περίπου 1×10^{11} αιμοπετάλια. Η θρομβοποιητίνη είναι κατεξοχήν υπεύθυνη για την ισορροπημένη ρύθμιση αυτής της παραγωγής, ώστε ο αριθμός τους να κυμαίνεται σταθερά μεταξύ $150 \times 10^9 / L$ και $450 \times 10^9 / L$ ⁶. Η υπέρβαση της ανώτερης τιμής καλείται θρομβοκυττάρωση και συναντάται σε πληθώρα παθήσεων και κλινικών καταστάσεων (βλ. *πίνακα 1*).

Η θρομβοκυττάρωση μπορεί να ταξινομηθεί αιτιολογικά στην οικογενή, τη συνοδευούσα κλωνικές παθήσεις της μυελικής σειράς και την αντιδραστική. Να σημειωθεί ότι πριν αρχίσει η διερεύνηση ανευρισκόμενης αύξησης της τιμής των αιμοπεταλίων είναι βασικό να αποκλεισθεί η περίπτωση εργαστηριακού λάθους. Αυτό μπορεί να οφείλεται σε κατακερματισμό των ερυθρών αιμοσφαιρίων, όπως στην μικροαγγειακή αιμολυτική αναιμία. Στην τελευταία, τα θραύσματα των ερυθρών είναι τόσο μικρά σε μέγεθος και τόσο πολλά σε αριθμό ώστε μπορεί να καταμετρηθούν λανθασμένα ως αιμοπετάλια από τους αυτόματες αναλυτές. Η εξέταση του επιχρίσματος περιφερικού αίματος από έμπειρο αιματολόγο μπορεί να κάνει τη διάκριση ανάμεσα στις ψευδείς αυτές καταστάσεις.

ΑΙΤΙΟΛΟΓΙΚΗ ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ ΘΡΟΜΒΟΚΥΤΤΑΡΩΣΗΣ
ΝΕΟΠΛΑΣΙΕΣ ΜΥΕΛΙΚΗΣ ΣΕΙΡΑΣ
Ιδιοπαθής θρομβοκυτταραιμία
Αληθής πολυκυτταραιμία
Πρωτοπαθής μυελοϊνωση
Χρονία μυελογενής λευχαιμία
Ανθεκτική αναιμία με δακτυλιοειδείς σιδηροβλάστες και θρομβοκυττάρωση
Μυελοδυσπλαστικό σύνδρομο σχετιζόμενο με έλλειψη 5q , inv3 ή t(3:3)
ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΙΚΗ (ΔΕΥΤΕΡΟΠΑΘΗΣ) ΘΡΟΜΒΟΚΥΤΤΑΡΩΣΗ
Υποσπληνισμός, συγγενής απουσία σπληνός, σπληνεκτομή
Αιμόλυση ή αιμορραγία
Λοίμωξη ή φλεγμονή (φυματίωση, σαρκοείδωση, κροταφική αρτηρίτιδα κα.)
Σιδηροπενική αναιμία
Γενικευμένη κακοήθεια, λεμφώματα
Φαρμακογενής (βινκριστίνη, επινεφρίνη, all-trans ρετινοϊκό οξύ)
Ανάνηψη μετά χημειοθεραπεία, διόρθωση έλλειψης B ₁₂ ή φυλλικού, ή μετά τη χρήση αιθανόλης
ΟΙΚΟΓΕΝΗΣ ΘΡΟΜΒΟΚΥΤΤΑΡΑΙΜΙΑ
Μεταλλάξεις σε TPO, cMPL ή άγνωστα μέχρι σήμερα γονίδια
ΨΕΥΔΗΣ ΘΡΟΜΒΟΚΥΤΤΑΡΩΣΗ
Κρυοσφαιριναιμία
Κυτταροπλασματικός κατακερματισμός στα πλαίσια μυελικών ή λεμφικών νεοπλασιών
Μικροαγγειακή αιμολυτική αναιμία

Πίνακας 1. Αίτια θρομβοκυττάρωσης. Διακρίνονται η κλωνική θρομβοκυτταραιμία, συνοδεύουσα νεοπλασία της μυελικής σειράς, η αντιδραστική ή δευτεροπαθής, συνοδεύουσα φλεγμονώδεις καταστάσεις, η οικογενής και, τέλος, η ψευδής θρομβοκυττάρωση (Philip A. Beer How I treat essential thrombocythemia, blood, 2011 117: 1472-1482, doi:10.1182/blood-2010-08-270033)

Η *οικογενής* ή *κληρονομική* θρομβοκυτταραιμία δεν είναι συχνή και συνήθως οφείλεται σε αυξημένη δράση της θρομβοποιητίνης λόγω ενεργοποιητικών μεταλλάξεων στο γονίδιο της ορμόνης ή του υποδοχέα της. Η μοριακή βιολογία της κληρονομικής θρομβοκυτταραιμίας φαίνεται να είναι αρκετά ετερογενής^{32,33}. Κάποιοι ασθενείς εμφανίζουν αυτοσωματικές κυρίαρχες μεταλλάξεις στο γονίδιο της θρομβοποιητίνης, με αποτέλεσμα τη μετατόπιση ενός ανασταλτικού ανοικτού πλαισίου ανάγνωσης (*open reading frame*) και ευόδωση της μεταγραφής. Έχει επίσης περιγραφεί στη βιβλιογραφία η περίπτωση οικογένειας με κληρονομική μορφή θρομβοκυτταραιμίας, μεταβιβαζόμενης κατά τον κυρίαρχο αυτοσωματικό τύπο, λόγω γαμετικής μετάλλαξης στο κωδικόνιο 617 του γονιδίου *JAK2*, απολήγουσα σε

αντικατάσταση βελίνης από ισολευκίνη. Οι πάσχοντες εμφάνιζαν αυξημένο αριθμό αιμοπεταλίων και θρομβωτικές επιπλοκές, απουσίαζαν όμως άλλα στοιχεία μυελοϋπερπλαστικού νοσήματος⁷. Άλλες περιπτώσεις οικογενούς θρομβοκυτταραιμίας συνοδεύονται από μετάλλαξη στη διαμεμβρανική περιοχή του *cMPL* (*MPL-S505N*) μεταβιβαζόμενη με αυτοσωματικό κυρίαρχο τρόπο. Η μετάλλαξη αυτή έχει περιγραφεί και σε κάποιους ασθενείς με ΙΘ²¹. Τέλος, πολυμορφισμοί στο μόριο του *cMPL* σε οικογένειες αφροαμερικανικής και αραβικής καταγωγής (*MPL-K39N* ή *MPL-Baltimore* και *MPL-P106L* αντίστοιχα) σχετίζονται με αυξημένο αριθμό αιμοπεταλίων.

Στη δεύτερη κατηγορία ανήκουν οι θρομβοκυτταρώσεις που συνοδεύουν κακοήγη νοσήματα της μυελικής σειράς, με τα αιμοπετάλια να είναι τμήμα του νεοπλασματικού κλώνου. Εδώ, εκτός από την ΙΘ ανήκουν τα υπόλοιπα κλασσικά μυελοϋπερπλαστικά νοσήματα, δηλαδή η ΑΠ, η ΠΜ και η ΧΜΛ. Ανήκουν επίσης η ανθεκτική αναιμία με δακτυλιοειδείς σιδηροβλάστες και θρομβοκυττάρωση (*refractory anemia with ringed sideroblasts associated with marked thrombocytosis, RARS-T*) και το μυελοδυσπλαστικό σύνδρομο 5q, που χαρακτηρίζεται από έλλειψη στο μακρύ σκέλος του χρωμοσώματος 5 (*del5q*). Τέλος, διαταραχές στο μακρύ σκέλος του χρωμοσώματος 3 στα πλαίσια μυελοδυσπλαστικού συνδρόμου ή οξείας μυελογενούς λευχαιμίας, μπορεί να συνοδεύονται από θρομβοκυττάρωση. Στην κατηγορία αυτή, παρά τη θρομβοκυττάρωση, τα επίπεδα της θρομβοποιητίνης είναι φυσιολογικά ή αυξημένα, ως αποτέλεσμα μειωμένης πρόσδεσης στον παθολογικό υποδοχέα της. Παρά ταύτα, υπάρχει αυξημένη ευαισθησία του υποδοχέα στη δράση της ορμόνης, με τελικό αποτέλεσμα αυξημένη παραγωγή μεγακαρυοκυττάρων και τελικά αιμοπεταλίων^{32,33}. Εξαιρετικής σημασίας στην παθοφυσιολογία της κλωνικής θρομβοκυττάρωσης είναι η ανεύρεση της μετάλλαξης *JAK2V617F*, παρούσας σε όλους πρακτικά τους ασθενείς με ΑΠ και στο 50%-60% εκείνων με ΙΘ και ΠΜ.²¹ Σημαντικό ποσοστό των νοσούντων από *RARS-T* και σύνδρομο 5q(-) επίσης φέρουν το παθολογικό αλληλίο. Ενεργοποιητικές μεταλλάξεις στο γονίδιο του υποδοχέα της θρομβοποιητίνης απολήγουσες σε αντικατάσταση τρυπτοφάνης από λευκίνη, λυσίνη ή αλανίνη στο εξόνιο 10, χαρακτηρίζουν το 5% περίπου των περιπτώσεων ΙΘ και ΠΜ, ενώ μέχρι σήμερα δεν έχουν βρεθεί στις οικογενείς μορφές. Τέλος, μεταλλάξεις στο μόριο της καλρετικουλίνης απαντώνται στο 25% περίπου των ασθενών με ΙΘ και ΠΜ. Να σημειωθεί ότι η κλωνικότητα, που παραδοσιακά αποτελεί ιδιαίτερο χαρακτηριστικό των σποραδικών μορφών, μπορεί να συνοδεύει και μερικές περιπτώσεις οικογενών θρομβοκυτταραιμιών²¹.

Η κατηγορία της **αντιδραστικής** ή **δευτεροπαθούς** θρομβοκυττάρωσης είναι μακράν η πολυπληθέστερη. Διακρίνεται περαιτέρω σε παροδική και εμμένουσα, ανάλογα με τη φύση της αιτίας που την προκαλεί. Παροδική αύξηση της τιμής των αιμοπεταλίων οφείλεται σε αιμορραγία, οξύ επεισόδιο αιμόλυσης, οξεία φλεγμονή, άσκηση, ιστική βλάβη ή επάνοδο μετά τη χορήγηση μυελοκατασταλτικής αγωγής, βιταμίνης B12 ή διακοπή αλκοόλ. Παρατεινόμενη θρομβοκυττάρωση προκαλούν χρόνιες αιμολυτικές αναιμίες, σιδηροπενική αναιμία, χρόνιες φλεγμονές, λεμφώματα και συμπαγείς όγκοι. Επίσης, μπορεί να οφείλεται σε διενέργεια σπληνεκτομής, λειτουργική ασπληνία ή

χορήγηση φαρμακευτικής αγωγής, όπως βινκριστίνη και ρετινοϊκό οξύ. Σε μία γερμανική αναδρομική μελέτη ο Griesshammer και οι συνεργάτες του βρήκαν ότι σε ένα σύνολο 732 ασθενών με αριθμό αιμοπεταλίων άνω των $500 \times 10^9/L$, οι 643 (δηλαδή το 88%) είχαν αντιδραστική θρομβοκυττάρωση. Μεταξύ αυτών οι συχνότερες αιτίες ήταν ιστική βλάβη, λοιμώξεις, κακοήθειες ή χρόνια φλεγμονή^{32,33}. Παθοφυσιολογικά, η αύξηση του αριθμού των αιμοπεταλίων σε αυτή την κατηγορία οφείλεται στην αυξημένη σύνθεση θρομβοποιητίνης από το ήπαρ, αποτέλεσμα της κυκλοφορούσας ιντερλευκίνης-6 και άλλων προφλεγμονωδών κυτταροκινών^{32,33}.

1.3 Ιδιοπαθής θρομβοκυτταραιμία.

1.3.1 Γενικά χαρακτηριστικά.

Η ΙΘ ανήκει στην κατηγορία των μυελοϋπερπλαστικών νεοπλασιών, κλωνικών διαταραχών του αρχέγονου αιμοποιητικού κυττάρου που χαρακτηρίζονται από υπερπλασία στο μυελό μίας ή περισσότερων σειρών, συνοδευόμενη από σχετικά φυσιολογική ωρίμανση και αποδοτική αιμοποίηση. Ως αποτέλεσμα παρατηρείται αύξηση των κυττάρων της κοκκιδώδους, της ερυθράς ή της μεγακαρυοκυτταρικής σειράς στο περιφερικό αίμα (**βλ. πίνακα 2**). Αυτή η ομάδα νεοπλασιών περιλαμβάνει τη *χρόνια μυελογενή λευχαιμία*, τη *χρόνια ουδετεροφιλική λευχαιμία*, την *αληθή πολυκυτταραιμία*, την *ιδιοπαθή θρομβοκυτταραιμία*, την *πρωτοπαθή μυελοϊνώση*, τη *χρόνια ηωσινοφιλική λευχαιμία*, τη *μαστοκυττάρωση*, και αταξινόμητες περιπτώσεις. Οι παραπάνω παθήσεις μοιράζονται κοινά κλινικά, εργαστηριακά και μορφολογικά ευρήματα όπως η συχνή ανεύρεση σπληνομεγαλίας και ηπατομεγαλίας, ο αυξημένος κίνδυνος θρομβοαιμορραγικών επιπλοκών, η τάση εμφάνισης ίνωσης και εκτροπής σε οξεία μυελογενή λευχαιμία.

Στην ΙΘ η βλάβη αφορά κυρίως στη μεγακαρυοκυτταρική σειρά. Ως εκ τούτου, ανευρίσκεται αυξημένος αριθμός μεγάλων και ώριμων μεγακαρυοκυττάρων στο μυελό των οστών και αιμοπεταλίων στο περιφερικό αίμα, χωρίς ιδιαίτερη αύξηση των λευκών ή ερυθρών αιμοσφαιρίων και χωρίς ίνωση ή λευκοερυθροβλαστική αντίδραση. Η θρομβοκυττάρωση είναι εξ ορισμού μεγαλύτερη των 450.000 κυττάρων ανά μl και δεν αποδίδεται σε άλλη κλωνική πάθηση ή αντιδραστική αιτία.

Είναι σπάνια νόσος, με επίπτωση 1-2.5 συμβάματα ανά 100.000 κατοίκους κατά έτος και μέση ηλικία 60 ετών κατά τη διάγνωση^{3,5}. Μπορεί όμως να παρουσιαστεί σε οποιαδήποτε ηλικία, αν και είναι σπάνια σε παιδιά. Υπάρχει ελαφρά επικράτηση του γυναικείου φύλου (1,6:1) εύρημα που δεν παρατηρείται στην ΠΜ ή τις περιπτώσεις αντιδραστικής θρομβοκυττάρωσης^{3,5}. Στις γυναίκες εμφανίζεται μια δεύτερη κορύφωση της συχνότητας περί το 30^ο έτος της ηλικίας. Κάποιες μελέτες συσχετίζουν την παρουσία της μετάλλαξης *JAK2V617F* με μεγαλύτερη ηλικία νόσησης τόσο στην ΙΘ όσο και στην ΠΜ²⁹.

Η ΚΑΤΑΤΑΞΗ ΤΟΥ ΟΡΓΑΝΙΣΜΟΥ ΠΑΓΚΟΣΜΙΑΣ ΥΓΕΙΑΣ (WHO) ΤΟΥ 2008 ΓΙΑ ΤΙΣ ΜΥΕΛΟΪΠΕΡΠΛΑΣΤΙΚΕΣ ΝΕΟΠΛΑΣΙΕΣ
Χρονία μυελογενής λευχαιμία
Χρονία ουδετεροφιλική λευχαιμία
Αληθής πολυκυτταραιμία
Πρωτοπαθής μυελοϊνωση
Ιδιοπαθής θρομβοκυτταραιμία
Χρονία ηωσινοφιλική λευχαιμία, μη αλλιώς χαρακτηριζόμενη
Μαστοκυττάρωση
Μυελοϋπερπλαστική νεοπλασία, μη ταξινομούμενη

Πίνακας 2. Η κατάταξη του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας (World Health Organization) του 2008 για τις Μυελοϋπερπλαστικές Νεοπλασίες (Myeloproliferative Neoplasms). (Από Jeffery M. Klco, MD, PhD, Molecular Pathology of Myeloproliferative Neoplasms, Am J Clin Pathol 2010;133:602-615, DOI: 10.1309/AJCPPPZ1WFGNE4A).

1.3.2 Αιτιολογία-παθογένεια.

Η αιτιολογία της νόσου είναι άγνωστη. Παραδοσιακά θεωρείται ότι πάσχει ένα πολυδύναμο προγονικό κύτταρο της μεγακαρυοκυτταρικής σειράς που υφίσταται κλωνική επέκταση και εκτροπή. Από απόψεως παθογενετικού μηχανισμού η θρομβοκυττάρωση δεν οφείλεται σε αυξημένη επιβίωση των αιμοπεταλίων, αλλά σε υπερπλασία των πρόδρομων μορφών τους στο μυελό των οστών.

Ενοχοποιούνται τόσο γενετικοί όσο και κληρονομικοί παράγοντες. Η συμμετοχή κληρονομικών παραγόντων έχει αναγνωριστεί από μελέτη περιπτώσεων οικογενούς θρομβοκυτταραιμίας. Συγκεκριμένα, ανάλυση του *Swedish Cancer Registry* καταγράφει σχετικό κίνδυνο 7.4 σε άτομα με πάσχοντα συγγενή πρώτου βαθμού²¹. Ο προδιαθεσικός ρόλος του απλότυπου 46/1 επίσης ενισχύει τα σενάρια κληρονομικότητας, παρότι η σημασία της παρουσίας του στην παθογένεια της ΙΘ δεν έχει αποσαφηνιστεί πλήρως. Πιθανόν να ενισχύει την ενδογενή μεταλλαξιογόνο δυναμική του *JAK2*, μεταβάλλοντας ταυτόχρονα τη λειτουργικότητά του.

Η συμμετοχή γενετικών παραγόντων πιστοποιείται από την παρουσία καρυοτυπικών και μοριακών μεταβολών στο γενετικό υλικό των πασχόντων. Κυτταρογενετικές διαταραχές ανιχνεύονται περίπου στο 5-10% των ασθενών, χωρίς κάποια σταθερή ανωμαλία χαρακτηριστική της νόσου³. Πιο συχνά ανευρισκόμενες είναι ελλείψεις στο μακρύ σκέλος των χρωμοσωμάτων 5, 13 και 20 (*del 5q*, *del20q*, *del 13q22*), και η τρισωμία 8⁷⁶. Από τις μοριακές μεταβολές που χαρακτηρίζουν την ΙΘ συχνότερη είναι η σημειακή μετάλλαξη στο κωδικόνιο 617 του γονιδίου *JAK2*, παρούσας στο ήμισυ περίπου των ασθενών. Ακολουθούν μεταλλάξεις στο γονίδιο της καλρεκτουλίνης και σπανιότερες στην παραμεμβρανική περιοχή του *c-MPL*, στο 25% και 5% των ασθενών αντίστοιχα^{48,49}. Αυτές οι μοριακές βλάβες οδηγούν σε αυξημένη παραγωγή

αιμοπεταλίων μέσω συνεχούς ενεργοποίησης της σηματοδοτικής οδού JAK2-STAT, αν και για την καλρετικουλίνη υπάρχουν αντικρουόμενες μελέτες. Τέλος, μικρή ομάδα ασθενών παραμένει χωρίς ανευρισκόμενη γενετική βλάβη.

1.3.3 Κλινική εικόνα.

Δεν υπάρχουν σημεία ή συμπτώματα παθογνωμονικά για την ΙΘ. Τις περισσότερες φορές η διάγνωση γίνεται τυχαία, με την ανεύρεση υψηλού αριθμού αιμοπεταλίων σε εξέταση ρουτίνας ή σπανιότερα κατά τη διερεύνηση θρομβωτικού επεισοδίου σε ασθενείς με κατά τα άλλα ελεύθερο ιστορικό. Σε κάποιους από αυτούς, η ανασκόπηση παλαιότερων γενικών αίματος θα αποκαλύψει παρουσία της νόσου για άλλοτε άλλο χρονικό διάστημα.

Η κλινική εξέταση είναι χωρίς ιδιαίτερα ευρήματα πλην μετρίου βαθμού σπληνομεγαλίας ή/και ηπατομεγαλίας στο 50% και 20% των ασθενών αντίστοιχα^{74,75,76}. Η ανεύρεση εκσεσημασμένης σπληνομεγαλίας θα πρέπει να θέσει την υπόνοια για την ύπαρξη άλλου μυελοϋπερπλαστικού νοσήματος, συνήθως ΠΜ ή ΧΜΛ. Κάποιες μελέτες συσχετίζουν το μέγεθος της σπληνικής διόγκωσης με το φορτίο της μετάλλαξης *JAK2V617F*. Η κλινική πορεία της νόσου επιπλέκεται συχνά από θρομβοαιμορραγικά συμβάματα. Προεξάρχουν οι θρομβωτικές επιπλοκές, με τη μορφή μικροαγγειακής και μακροαγγειακής νόσου, που αποτελούν την κύρια αιτία νοσηρότητας και θνητότητας, και βασικό παράγοντα καθορισμού της αγωγής που θα ακολουθηθεί.⁷⁴

Η **μικροαγγειακή θρομβωτική νόσος** εμφανίζεται στο ένα τρίτο περίπου των ασθενών με τη μορφή παροδικών αγγειοκινητικών συμπτωμάτων όπως κεφαλαλγία, ίλιγγος, επεισόδια ημικρανίας, οπτικών διαταραχών, ακροπαραισθησιών, δικτυωτής πελίδωσης και ερυθρομεγαλγίας^{74,75,76}. Η τελευταία είναι μία φλεγμονώδης διόγκωση των άκρων με συνοδό θερμότητα, ερυθρότητα και έντονο καυστικό ή σφύζον άλγος της προσβεβλημένης περιοχής. Τα συμπτώματα επιδεινώνονται κατά τη βάδιση, την παρατεταμένη ορθοστασία και την αύξηση της θερμοκρασίας. Κατά την αντικειμενική εξέταση οι περιφερικές σφύξεις είναι ψηλαφητές, όμως αν αφεθεί χωρίς αντιμετώπιση μπορεί να εξελιχθεί σε ισχαιμική νέκρωση και γάγγραινα. Η συχνότητα της ερυθρομεγαλγίας δε συνδέεται άμεσα με τον αριθμό των αιμοπεταλίων και πιθανόν να οφείλεται σε ποιοτικές διαταραχές της λειτουργικότητάς τους⁷⁴. Αυτό υποστηρίζεται από το ότι δεν παρατηρείται σε καταστάσεις αντιδραστικής θρομβοκυττάρωσης, ενώ ανευρίσκεται σε αιματολογικές και μη διαταραχές με σχετικά φυσιολογικές τιμές αιμοπεταλίων. Η αντιμετώπιση των αγγειοκινητικών συμπτωμάτων και της ευθρομεγαλγίας, που αποτελεί τη χαρακτηριστικότερη εκδήλωσή τους, γίνεται επιτυχώς με τη χρήση ακετυλοσαλικυλικού οξέος⁷⁴.

Η **μακροαγγειακή θρομβωτική νόσος** είναι σπανιότερη από τις μικροαγγειακές επιπλοκές, αποτελεί όμως τη συχνότερη αιτία νοσηρότητας και θνητότητας. Αφορά

τόσο σε αρτηριακά όσο και φλεβικά στελέχη, με τις αρτηριακές θρομβώσεις να αντιπροσωπεύουν το 60% περίπου των συμβαμάτων. Αφορούν κυρίως στα αγγεία του εγκεφάλου και εκδηλώνονται με τη μορφή αγγειακού εγκεφαλικού ή παροδικών ισχαιμικών επεισοδίων. Ακολουθούν τα στεφανιαία αγγεία και οι αρτηρίες των άκρων, με την απόφραξή τους να οδηγούν σε στηθαγχικά επεισόδια και οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου ή περιφερική αρτηριακή νόσο, αντίστοιχα^{74,75}. Στα συμπτώματα της τελευταίας περιλαμβάνονται το άλγος, συνήθως με τη μορφή της διαλείπουσας χωλότητας, και οι παραισθησίες, ενώ σε βαριές περιπτώσεις μπορεί να συνοδεύεται από την εμφάνιση εξελκώσεων και γάγγραινας. Όσον αφορά στις φλεβικές θρομβώσεις, ασθενείς με ΙΘ τείνουν να εμφανίζουν μικρότερα ποσοστά εν τω βάθει φλεβικής θρόμβωσης και πνευμονικής εμβολής σε σύγκριση με την ΑΠ. Ιδιαίτερης σημασίας είναι η εμφάνιση αποφράξεων σε ασυνήθεις θέσεις, όπως τα ενδοκοιλιακά αγγεία και τα φλεβικά εγκεφαλικά κολποειδή, ειδικά σε νεότερους ασθενείς. Μεταξύ αυτών ξεχωρίζει η θρόμβωση των ηπατικών φλεβών, που οδηγεί σε σύνδρομο *Budd-Chiari*, αλλά και της πυλαίας, της σπληνικής, της νεφρικής ή της μεσεντερίου φλέβας. Υπολογίζεται ότι το 20% έως και 50% εκείνων με θρόμβωση σπλαχνικών στελεχών, νοσούν από κάποιο υποκείμενο μυελοϋπερπλαστικό νόσημα. Εξαιτίας της υψηλής συσχέτισης, ασθενείς με απόφραξη στις ασυνήθεις αυτές εντοπίσεις θα πρέπει να εκτιμώνται για ύπαρξη μυελοϋπερπλαστικού νοσήματος. Τέλος, στις γυναίκες αναπαραγωγικής ηλικίας, θρόμβωση των αγγείων του πλακούντα οδηγεί σε αυξημένη συχνότητα αυτόματων αποβολών κατά τη διάρκεια του πρώτου τριμήνου^{74,75}.

Οι **αιμορραγικές επιπλοκές**, όταν ο ασθενής δε λαμβάνει αντιαιμοπεταλιακή θεραπεία, είναι λιγότερο συχνές και συνήθως δεν έχουν ιδιαίτερες συνέπειες. Σχετίζονται με εκσεσημασμένη θρομβοκυττάρωση, της τάξης των 1500×10^9 κυττάρων ανά L, ως αποτέλεσμα προσρόφησης του παράγοντα *von Willebrand* στην επιφάνεια των αιμοπεταλίων^{74,75}. Εκδηλώνονται κυρίως από το δέρμα με τη μορφή εκχυμώσεων, τους βλεννογόνους του πεπτικού και ουρογεννητικού συστήματος, και εκείνους των ανώτερων αναπνευστικών οδών (επίσταξη ή αιμόπτυση). Οι αιμορραγίες μπορεί να είναι αυτόματες ή να προκαλούνται από ελάσσονες τραυματισμούς.

1.3.4 Εργαστηριακά ευρήματα.

Από τον εργαστηριακό έλεγχο το εύρημα που δεσπόζει είναι ο αυξημένος αριθμός αιμοπεταλίων στο περιφερικό αίμα, με τιμές που πολλές φορές υπερβαίνουν το $1.000 \times 10^9/L$. Η αναιμία είναι ασυνήθης, ενώ συχνά ανευρίσκεται ήπια ουδετερόφιλη λευκοκυττάρωση, σπανίως μεγαλύτερη των $30 \times 10^9/L$ ^{74,75,76}.

Κατά τη μικροσκοπική εξέταση του επιχρίσματος του περιφερικού αίματος μπορεί να διαπιστωθεί η ύπαρξη μορφολογικών διαταραχών των αιμοπεταλίων με κάποια να είναι πολύ μεγάλα, αλλά τα γιγάντια αιμοπετάλια με άκοκκο πρωτόπλασμα της ΠΜ απουσιάζουν. Ομοίως, η μορφολογία των ερυθρών είναι φυσιολογική. Επί υποχρωμίας

και μικροκυττάρωσης είναι απαραίτητο να αποκλειστεί υποκείμενη σιδηροπενία ενώ η παρουσία δακρυοκυττάρων και λευκοερυθροβλαστικής αντίδρασης είναι ενδεικτικά ΠΜ^{73,76}.

Ο μυελός των οστών εμφανίζει σημεία μυελοϋπερπλαστικού συνδρόμου με ήπια αύξηση της κυτταροβρίθειας για την ηλικία του ασθενούς λόγω υπερπλασίας της μεγακαρυοκυτταρικής σειράς. Τα μεγακαρυοκύτταρα είναι άφθονα, χωρίς τις έντονες ατυπίες που χαρακτηρίζουν την ΠΜ, με πυρήνα που μπορεί να εμφανίζει αυξημένη λόβωση. Σχηματίζουν αθροίσεις ή μπορεί να είναι διασκορπισμένα σε όλη την έκταση του μυελικού χώρου. Η ίνωση είναι ελάχιστη ή απουσιάζει. Σημαντική ίνωση από ρετικουλίνη ή εύρεση ινών κολλαγόνου οποιουδήποτε βαθμού αποκλείει τη διάγνωση⁷⁶. Ο σίδηρος του μυελού είναι φυσιολογικός στο 50-70% των ασθενών κατά τη διάγνωση. Κενές σιδηραποθήκες απαιτούν διελεύκανση, καθώς ο συνδυασμός τους με αυξημένη κυτταροβρίθεια είναι χαρακτηριστικό της ΑΠ. Επίσης, η σιδηροπενική αναιμία αυτή καθ'εαυτή μπορεί να προκαλέσει θρομβοκυττάρωση⁷³.

Από το βιοχημικό έλεγχο συχνά εργαστηριακά ευρήματα είναι η υπερουριχαιμία, η αύξηση της B_{12} λόγω αύξησης της τρανσκοβαλαμίνης II, και η υπερκαλιαιμία. Η τελευταία αποτελεί εργαστηριακό σφάλμα, εξαιτίας της μεγάλης μάζας των κυκλοφορούντων αιμοπεταλίων που απελευθερώνουν κάλιο κατά τη διαδικασία πήξης του αίματος και δε σχετίζεται με ηλεκτροκαρδιογραφικές αλλοιώσεις. Η αλκαλική φωσφατάση των λευκών είναι επίσης αυξημένη⁷⁴.

Οι χρόνοι προθρομβίνης και μερικής θρομβοπλαστίνης είναι φυσιολογικοί. Σε ιδιαίτερα αυξημένο αριθμό αιμοπεταλίων, λόγω της επίκτητη von Willebrand, παρατηρούνται διαταραχές της πρωτογενούς αιμόστασης. Συγκεκριμένα παρατηρείται παράταση του χρόνου ροής και άλλοτε άλλη παράταση του χρόνου μερικής θρομβοπλαστίνης ανάλογα με τα κυκλοφορούντα επίπεδα του παράγοντα von Willebrand^{74,75}.

1.3.5 Διάγνωση.

Η διάγνωση της ΙΘ γίνεται σύμφωνα με τα αναθεωρημένα κριτήρια του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας (World Health Organization, WHO) για το 2008 και απαιτεί την πλήρωση και των τεσσάρων κλινικοεργαστηριακών παραμέτρων που έχουν θεσπιστεί (βλ. πίνακα 3)⁷⁶. Συγκεκριμένα, στο περιφερικό αίμα απαιτείται εμμένουσα αύξηση του αριθμού των αιμοπεταλίων, μεγαλύτερη των 450×10^9 κυττάρων ανά L, καθ'όλη τη διάρκεια της διερεύνησης. Στο μυελό των οστών θα πρέπει να υπάρχει υπερπλασία κυρίως της μεγακαρυοκυτταρικής σειράς με παρουσία μεγάλων, ώριμων μεγακαρυοκυττάρων χωρίς σημαντική αύξηση της κοκκιώδους και της ερυθράς, και χωρίς σημαντική στροφή της κοκκιώδους προς τα αριστερά. Ταυτόχρονα δε θα πρέπει να πληρούνται τα κριτήρια της WHO για τη διάγνωση ΧΜΛ, ΑΠ, ΠΜ, μυελοδυσπλαστικού συνδρόμου ή άλλης μυελικής νεοπλασίας. Τέλος, απαιτείται η

ανάδειξη κλωνικότητας των αιμοπεταλίων ή, αν αυτή απουσιάζει, αποκλεισμός αντιδραστικών αιτιών θρομβοκυττάρωσης.

Είναι παραδοσιακά μία διάγνωση εξ αποκλεισμού που στηρίζεται στη συνεκτίμηση ιστορικού, κλινικών και εργαστηριακών παραμέτρων. Παρουσία αυξημένου αριθμού αιμοπεταλίων σε συγγενείς πρώτου βαθμού κάνουν πιθανή την κληρονομική θρομβοκυτταραιμία. Υποκείμενη κακοήθεια, σιδηροπενία, λοίμωξη, χρόνια φλεγμονή, σπληνεκτομή ή πρόσφατη χειρουργική επέμβαση είναι υπέρ αντιδραστικής θρομβοκυττάρωσης. Ο βαθμός της τιμής των αιμοπεταλίων δεν αποτελεί χρήσιμο διαγνωστικό εργαλείο για τη διάκριση ανάμεσα στις καλοήθειες και τις κλωνικές μορφές καθώς και στις δύο περιπτώσεις μπορεί να υπερβαίνει τα 1.000×10^9 κύτταρα ανά *L*. Η κλινική εξέταση σε συνδυασμό με απλές βιοχημικές παραμέτρους (σίδηρος ορού, ηλεκτροφόρηση λευκωμάτων, C-αντιδρώσα πρωτεΐνη, φερριτίνη) μπορεί να παραστούν ιδιαίτερα βοηθητικοί⁷³.

ΚΡΙΤΗΡΙΑ ΓΙΑ ΤΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ ΤΗΣ ΙΔΙΟΠΑΘΟΥΣ ΘΡΟΜΒΟΚΥΤΤΑΡΑΙΜΙΑΣ (WHO 2008)
Απαιτούνται τα κριτήρια A1-A4
A1: Παραμένουσα αύξηση του αριθμού των αιμοπεταλίων $> 450 \times 10^9/L$ κατά το χρονικό διάστημα που διαρκεί η διερεύνηση.
A2: Στη βιοψία μυελού υπερπλασία κυρίως της μεγακαρυοκυτταρικής σειράς, με αυξημένο αριθμό μεγάλων ώριμων μεγακαρυοκυττάρων χωρίς σημαντική αύξηση της κοκκιώδους ή της ερυθράς και χωρίς σημαντική στροφή της κοκκιώδους προς τα αριστερά.
A3: Αποκλεισμός αληθούς πολυκυτταραιμίας, χρονίας μυελογενούς λευχαιμίας, πρωτοπαθούς μυελοϊνώσης ή άλλου μυελικού νεοπλάσματος σύμφωνα με τα κριτήρια της WHO.
A4: Ανάδειξη της μετάλλαξης <i>JAK2V617F</i> ή άλλου δείκτη κλωνικότητας ή, απουσία της μετάλλαξης, αποκλεισμός δευτεροπαθούς θρομβοκυττάρωσης.

Πίνακας 3. Τα αναθεωρημένα κριτήρια του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας (WHO) του 2008 για την ΙΘ. Η διάγνωση προϋποθέτει την πλήρωση και των τεσσάρων κριτηρίων, δηλαδή (α) εμμένουσα αύξηση του αριθμού των αιμοπεταλίων πάνω από $450 \times 10^9/L$ (β) αυξημένο αριθμό ώριμων μεγακαρυοκυττάρων στο μυελό (γ) αποκλεισμό άλλου μυελικού νεοπλάσματος και (δ) παρουσία επίκτητης μετάλλαξης ή άλλου δείκτη κλωνικότητας, ή αλλιώς, αποκλεισμό αντιδραστικής αιτίας. (Από Philip A. Beer, How I treat Essential Thrombocythemia, doi:10.1182/blood-2010-08-270033).

Η ανακάλυψη, τα τελευταία δέκα χρόνια, των μοριακών βλαβών που χαρακτηρίζουν την ΙΘ διευκόλυνε ιδιαίτερα το κλινικό έργο, καθώς η παρουσία τους αποκλείει τις

αντιδραστικές θρομβοκυτταρώσεις, περιορίζοντας σημαντικά τη διαφορική διάγνωση. Παρόλα αυτά, δεν αποκλείει τα υπόλοιπα κλωνικά νοσήματα που μπορεί να συνοδεύονται από τις ίδιες μεταλλάξεις. Για να θεσπιστεί τελικά η διάγνωση είναι υποχρεωτικό να γίνει διενέργεια οστεομυελικής βιοψίας τα ευρήματα της οποίας θα ξεχωρίσουν την ΙΘ από τις λοιπές νεοπλασίες της μυελικής σειράς.

Η διάκριση από την ΑΠ δεν είναι πάντα εύκολη, ειδικά στην προερυθραιμική φάση της νόσου. Ο συνδυασμός φυσιολογικού αιματοκρίτη και σιδήρου στο μυελό είναι συνήθως αρκετός για να αποκλεισθεί η πολυκυτταραιμία. Η παρουσία μικροκυτταρικών υπόχρωμων ερυθρών σε ασθενή με φυσιολογικό αιματοκρίτη είναι περισσότερο ενδεικτική ΑΠ επιπλεγμένης με σιδηροπενική αναιμία. Ιδιαίτερη προσοχή χρειάζεται επί εκσεσημασμένης σπληνομεγαλίας καθώς ο αυξημένος όγκος πλάσματος του αίματος μπορεί να συγκαλύψει την ερυθροκυττάρωση. Σε κάθε περίπτωση, ανεύρεση στη βιοψία μυελού έστω και μικρής υπερπλασίας της ερυθράς και της κοκκιώδους σειράς, εκτός από την μεγακαρυοκυτταρική (πανμυέλωση), στρέφει τη διάγνωση προς την ΑΠ^{73,76}.

Απουσία εκσεσημασμένης σπληνομεγαλίας, λευκοερυθροβλαστικής αντίδρασης στο περιφερικό αίμα και σημαντικής ίνωσης στο μυελό των οστών, η διάκριση από την ΠΜ γίνεται συνήθως με ασφάλεια. Ιδιαίτερα δυσχερής είναι η διαφορική διάγνωση από την προΐνωτική φάση της ΠΜ στην οποία τα παραπάνω χαρακτηριστικά απουσιάζουν. Σε αυτό το στάδιο, εύρεση στην οστεομυελική βιοψία υπερπλασίας της κοκκιώδους σε συνδυασμό με έντονη ατυπία των μεγακαρυοκυττάρων και άθροισή τους στον περιαγγειακό ή παραδοκιδώδη χώρο, απομακρύνουν από το ενδεχόμενο ΙΘ⁷⁶. Παρ' όλα αυτά, δεν είναι ασύνηθες ασθενείς που έχουν αρχικά διαγνωσθεί με ΙΘ να εμφανίζουν στην πορεία ΑΠ ή να εξελίσσονται σε ΠΜ.

Η ΙΘ πρέπει επίσης να διαφοροδιαγνωσθεί από την κλινική οντότητα *RARS-T* (*Refractory anemia with ringed sideroblasts associated with marked thrombocytosis*) που επίσης συνοδεύεται από αυξημένο αριθμό αιμοπεταλίων, συνήθως μάλιστα με παρούσα τη μετάλλαξη στο κωδικόνιο 617. Όμως, η αναιμία, η δυσπλασία των έμμορφων στοιχείων του αίματος και οι δακτυλιοειδείς σιδηροβλάστες ξεχωρίζουν την πάθηση από την ΙΘ. Το μυελοδυσπλαστικό σύνδρομο 5q(-) χαρακτηρίζεται από θρομβοκυττάρωση και μονόλοβα μεγακαρυοκύτταρα μεσαίου μεγέθους στην οστεομυελική βιοψία. Συνοδεύεται επίσης από μακροκυτταρική αναιμία και από την χαρακτηριστική για τη νόσο κυτταρογενετική ανωμαλία, με την έλλειψη τμήματος του μακρού σκέλους του χρωμοσώματος 5. Και σε αυτή την περίπτωση η διάκριση από την ΙΘ δεν είναι δύσκολη^{73,76}.

Τέλος, η ΧΜΛ μπορεί σπανίως να συνοδεύεται από μεμονωμένη αύξηση των αιμοπεταλίων χωρίς αντίστοιχη αύξηση των λευκών. Στην οστεομυελική βιοψία παρατηρείται υπερπλασία της κοκκιώδους με αύξηση των άωρων μορφών και τα χαρακτηριστικά για τη νόσο μεγακαρυοκύτταρα νάνους (*dwarfs*). Παρά τα ιδιαίτερα αυτά ευρήματα, σε ασθενείς αρνητικούς για τη μετάλλαξη *JAK2V617F* ή κάποια άλλη μοριακή βλάβη, απαιτείται κυτταρογενετικός έλεγχος για τον αποκλεισμό ΧΜΛ.

Επειδή μάλιστα το παθογνωμονικό για τη νόσο χρωμόσωμα *Philadelphia* μπορεί να μην είναι ορατό με τις συμβατικές κυτταρογενετικές τεχνικές, συνιστάται έλεγχος με *FISH* (*Fluorescence in situ hybridization*) ή *RT-PCR* (*reverse transcriptase polymerase chain reaction*) για την αναζήτηση του χιμαιρικού μεταγράφου *bcr-abl1*, όταν ο καρυότυπος είναι φυσιολογικός⁷³.

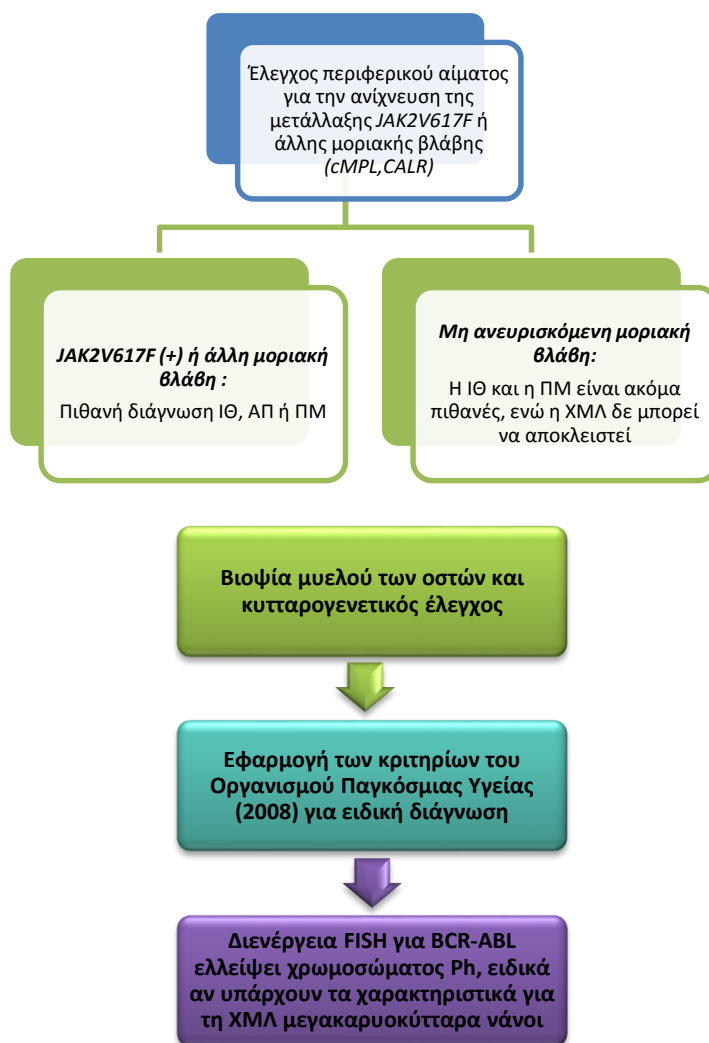
Συνοψίζοντας, το πρώτο βήμα στην αντιμετώπιση ασθενούς με αυξημένο αριθμό αιμοπεταλίων είναι η αναζήτηση αντιδραστικής αιτίας στην οποία να μπορεί να αποδοθεί με ασφάλεια η θρομβοκυττάρωση, αν και κάτι τέτοιο δεν αποκλείει την ταυτόχρονη παρουσία ενός δεύτερου, κλωνικού νοσήματος. Εφόσον το ιστορικό, η κλινική εξέταση και η αξιολόγηση των δεικτών φλεγμονής δεν αναδείξουν την αιτία της θρομβοκυττάρωσης, το επόμενο βήμα είναι ο έλεγχος του περιφερικού αίματος για κάποια από τις μεταλλάξεις σε *JAK2*, *cMPL*, *CALR*, και η διενέργεια οστεομυελικής βιοψίας και κυτταρογενετικού ελέγχου (**βλ. πίνακα 4**). Η παρουσία οποιασδήποτε από τις παραπάνω μοριακής βλάβης πρακτικά αποκλείει τη ΧΜΛ και τις αιτίες αντιδραστικής θρομβοκυττάρωσης, αφήνοντας στη διαγνωστική φαρέτρα τα υπόλοιπα μυελοϋπερπλαστικά νοσήματα. Μεγαλύτερη δυσκολία υπάρχει στις περιπτώσεις χωρίς ανευρισκόμενη μοριακή βλάβη. Εκεί, τα ευρήματα της οστεομυελικής βιοψίας και του κυτταρογενετικού ελέγχου θα θέσουν τελικά τη διάγνωση. Σε αυτούς τους ασθενείς, τονίζεται ξανά η σημασία αποκλεισμού δευτεροπαθών αιτιών και ΧΜΛ ακόμα και επί φυσιολογικού καρυότυπου, με τη διενέργεια *FISH* ή *RT-PCR*.

1.3.6 Επιπλοκές.

Είναι μία νόσος βραδείας εξέλιξης που επιτρέπει τη μακρά διαβίωση των πασχόντων με τη μέση επιβίωση να ξεπερνά τα 15 έτη από τη στιγμή της διάγνωσης^{74,75,76}. Αυτό σημαίνει ότι για τους ασθενείς μεγαλύτερης ηλικίας η επιβίωση είναι ίδια με εκείνη του γενικού πληθυσμού. Η πάθηση στην πορεία της μπορεί να επιπλακεί από θρομβοαιμορραγικές διαταραχές, που αποτελούν κύρια αιτία νοσηρότητας και θνητότητας, καθώς και από εκτροπή σε μυελοϊνωση ή οξεία μυελογενή λευχαιμία.

Ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας έχει θεσπίσει σαφή κριτήρια για τη διάγνωση της μετα-θρομβοκυτταραιμικής μυελοϊνωσης (*post-essential thrombocythemia myelofibrosis, post-ET MF*) (**βλ. πίνακα 5**)⁷⁶. Προαπαιτείται η εμφάνιση σημαντικού βαθμού ίνωσης σε ασθενή με προηγούμενη διάγνωση ΙΘ σε συνδυασμό με δύο από τα ακόλουθα πέντε κριτήρια: αναιμία ή πτώση της αιμοσφαιρίνης κατά 2g/dl από τις συνήθεις τιμές του ασθενούς, λευκοερυθροβλαστική αντίδραση στο περιφερικό αίμα, εμφάνιση σπληνομεγαλίας ή επιδείνωση ήδη υπάρχουσας, αύξηση των επιπέδων γαλακτικής αφυδρογονάσης και εμφάνιση συστηματικών συμπτωμάτων (απώλεια >10% του σωματικού βάρους εντός εξαμήνου, νυχτερινή εφίδρωση, ανεξήγητος πυρετός που υπερβαίνει τους 37,5 °C). Τα ποσοστά εμφάνισης ίνωσης είναι χαμηλά και αγγίζουν το 3-10% την πρώτη δεκαετία από τη διάγνωση και το 6-30% μετά εικοσαετή νόσηση. Ο κίνδυνος λευχαιμίας παρατηρείται σε ακόμα μικρότερο αριθμό

ασθενών, συγκεκριμένα στο 1-2,5% την πρώτη δεκαετία και στο 5-8% τη δεύτερη^{74,75}. Θεωρείται ότι είναι αυξανόμενος σε όσους έχουν λάβει θεραπεία με κυτταροστατικά. Η διάγνωση γίνεται επί ανεύρεσης βλαστών σε ποσοστό $\geq 20\%$ στο περιφερικό αίμα ή στο μυελό των οστών. Ενδιαφέρον παρουσιάζει ότι στις περιπτώσεις ασθενών θετικών για μοριακή βλάβη ο λευχαιμικός κλώνος μπορεί να μη φέρει την ανευρισκόμενη μετάλλαξη. Επί εμφάνισης οξείας λευχαιμίας η πρόγνωση γίνεται δυσμενέστατη, έχουσα πολύ πτωχή ανταπόκριση στη θεραπεία.



Πίνακας 4. Προτεινόμενος αλγόριθμος για τη διερεύνηση και τη διάγνωση της ΙΘ. (Από A Tefferi and J W Vardiman, Classification and diagnosis of myeloproliferative neoplasms: The 2008 World Health Organization criteria and point-of-care diagnostic algorithms, Leukemia 22, 14-22 (January 2008) | doi:10.1038/sj.leu.2404955)

1.3.7 Θεραπεία.

Η απόφαση για την εφαρμογή θεραπείας ή όχι θα εξαρτηθεί από το πόσο καλά ανεκτή γίνεται η νόσος και κυρίως από το σχετικό κίνδυνο θρομβωτικών επιπλοκών, που αποτελούν τη βασική αιτία νοσηρότητας και θνητότητας. Στόχος είναι η ανακούφιση από τα αγγειοκινητικά συμπτώματα και η ελαχιστοποίηση της πιθανότητας εμφάνισης θρομβοαιμορραγικών συμβαμάτων, χωρίς να αυξάνεται ο χαμηλός εγγενής κίνδυνος λευχαιμικής εκτροπής.

Φάρμακα που χρησιμοποιούνται για το σκοπό αυτό είναι είτε εκείνα που στρέφονται κατά της συγκόλλησης των αιμοπεταλίων, με κυριότερους εκπροσώπους την ασπιρίνη και τα νεότερα αντιαιμοπεταλιακά, δυπιριδαμόλη και κλοπιδογρέλη, είτε εκείνα που μειώνουν τον αριθμό των αιμοπεταλίων^{44,74,75}. Στην τελευταία κατηγορία των κυτταροστατικών φαρμάκων περιλαμβάνονται η υδροξουρία, το παράγωγο ιμιδαζοκιναζολίνης, αναγρελίδη, και η ιντερφερόνη *α*. Η αιμοπεταλιοαφαίρεση είναι ένα προσωρινό, μη αποτελεσματικό μέτρο που σπανίως χρησιμοποιείται. Η τροποποίηση των κλασσικών παραγόντων καρδιαγγειακού κινδύνου (υπέρταση, παχυσαρκία, σακχαρώδης διαβήτης, κάπνισμα, υπερχοληστερολαιμία), εφόσον υπάρχουν, θα πρέπει να γίνεται σε εξατομικευμένη βάση. Η χορήγηση αντιλιπιδαιμικών φαρμάκων, όπως οι στατίνες, παρότι έχουν αποδείξει την αποτελεσματικότητά τους στην πρόληψη της αθηροσκληρωτικής νόσου, δεν έχει καθιερωθεί ακόμα στην ΙΘ.

Τα αγγειοκινητικά συμπτώματα αντιδρούν ικανοποιητικά στη χορήγηση ακετυλοσαλικυλικού οξέος σε χαμηλές δόσεις ($81\text{mg}/\text{ημέρα}$). Ο ρόλος της ασπιρίνης στη μείωση των θρομβώσεων είναι αβέβαιος, ως εκ τούτου νεότεροι ασθενείς χαμηλού κινδύνου και ελεύθεροι συμπτωμάτων μπορούν να μείνουν χωρίς θεραπεία. Στους υπόλοιπους συνιστάται η χορήγηση ασπιρίνης ημερησίως, εφόσον δεν αντενδείκνυται, υιοθετώντας τα θετικά αποτελέσματα που ανέδειξε η μελέτη **ECLAP** (*European Collaboration on Low-dose Aspirin in Polycythemia Vera*), κατά τη χορήγησή της σε ασθενείς με ΑΠ έναντι λήψης placebo⁷⁷. Επί μεγάλης αύξησης του αριθμού των αιμοπεταλίων, συνήθως άνω του $1.000 \times 10^9/\text{L}$, όπου προεξάρχουν οι αιμορραγικές εκδηλώσεις, η χορήγηση αντιαιμοπεταλιακής αγωγής θα πρέπει να αποφεύγεται. Στις περιπτώσεις αυτές η αιμορραγία συνήθως ανταποκρίνεται στο ε-αμινοκαπροϊκό οξύ που μπορεί να δίνεται πριν και μετά τη διενέργεια εκλεκτικής χειρουργικής επέμβασης^{74,75}.

Η χορήγηση ή μη κυτταροστατικής αγωγής γίνεται έπειτα από εκτίμηση του θρομβωτικού κινδύνου κάθε ασθενούς. Στη διαστρωμάτωση κινδύνου λαμβάνονται υπόψιν η ηλικία και το ιστορικό προηγηθείσας θρόμβωσης. Εκτιμάται επίσης η εκσεσημασμένη θρομβοκυττάρωση, ($\geq 1.500 \times 10^9/\text{L}$), καθώς σχετίζεται με αιμορραγική διάθεση. Βάσει αυτών των παραμέτρων, σύμφωνα με τις ευρωπαϊκές κατευθυντήριες οδηγίες από το *European LeukemiaNet*, οι ασθενείς χωρίζονται σε κατηγορίες υψηλού και χαμηλού κινδύνου (**βλ. πίνακα 6**)⁶⁵. Στην πρώτη κατηγορία

ανήκουν όσοι έχουν υπερβεί το εξηκοστό έτος της ηλικίας, έχουν υποστεί θρομβωτικό επεισόδιο ή έχουν τιμές αιμοπεταλίων μεγαλύτερες των $1.500 \times 10^9/L$. Συνιστάται η χορήγηση κυτταροστατικής θεραπείας σε όλους τους ασθενείς υψηλού κινδύνου και ενδεχομένως στο μικρό ποσοστό ασθενών που τα αγγειοκινητικά τους συμπτώματα είναι ανθεκτικά στη χορήγηση ακετυλοσαλικυλικού οξέος. Στους ασθενείς χαμηλού κινδύνου η καθημερινή χορήγηση ασπιρίνης θεωρείται αρκετή. Στόχος της θεραπείας είναι η πλήρης ύφεση η οποία, σύμφωνα με τις κατευθυντήριες ευρωπαϊκές οδηγίες, ορίζεται με την πλήρωση και των τεσσάρων ακολούθων κριτηρίων: αιμοπετάλια $< 400 \times 10^9/L$ και λευκά αιμοσφαίρια $< 10 \times 10^9/L$ χωρίς λευκοερυθροβλαστική αντίδραση, απουσία θρομβοαιμορραγικών επιπλοκών, απουσία συμπτωμάτων σχετιζόμενων με τη νόσο συμπεριλαμβανομένης σπληνομεγαλίας, και ευρήματα στην οστεομυελική βιοψία συμβατά με ύφεση (εξαφάνιση της υπερπλασίας των μεγακαρυοκυττάρων, απουσία ινών ρετικουλίνης βαθμού >1)⁷⁰.

ΚΡΙΤΗΡΙΑ ΓΙΑ ΤΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ ΠΡΩΤΟΠΑΘΟΥΣ ΜΥΕΛΟΪ΄ΝΩΣΗΣ ΠΟΥ ΑΚΟΛΟΥΘΕΙ ΙΔΙΟΠΑΘΗ ΘΡΟΜΒΟΚΥΤΤΑΡΑΙΜΙΑ (POST-ET MF, WHO 2008)	
Απαραίτητα κριτήρια	
1: Προηγούμενη διάγνωση ΙΘ σύμφωνα με τα κριτήρια του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας.	
2: Ίνωση στο μυελό των οστών βαθμού 2-3 (σε κλίμακα 0-3) ή βαθμού 3-4 (σε κλίμακα 0-4)	
Επιπρόσθετα κριτήρια (απαιτούνται δύο)	
1: Αναιμία (σύμφωνα με την ηλικία, το φύλο και το υψόμετρο διαβίωσης) ή μείωση της αιμοσφαιρίνης κατά 2 g/dl από τα συνήθη επίπεδα αιμοσφαιρίνης του ασθενούς. 2: Λευκοερυθροβλαστική αντίδραση στο περιφερικό αίμα. 3: Αύξηση προϋπάρχουσας σπληνομεγαλίας (πέραν των 5 εκατοστών κάτωθεν του αριστερού πλευρικού τόξου) ή εμφάνιση νέας ψηλαφητής σπληνομεγαλίας. 4: Αυξημένα επίπεδα γαλακτικής αφυδρογονάσης (lactate dehydrogenase, LDH), πάνω από το ανώτερο όριο αναφοράς του εργαστηρίου. 5: Εμφάνιση περισσότερων του ενός από τα εξής τρία συστηματικά συμπτώματα: απώλεια σωματικού βάρους $>10\%$, νυχτερινή εφίδρωση, ανεξήγητος πυρετός ($>37,5^\circ C$).	

Πίνακας 5. Τα αναθεωρημένα κριτήρια του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας (WHO) του 2008 για τη μυελοϊνωση μετά ΙΘ. Η διάγνωση προϋποθέτει την πλήρωση τουλάχιστον τεσσάρων κριτηρίων, των δύο βασικών και δύο εκ των επιπρόσθετων. (WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues).

Από τα φάρμακα που χρησιμοποιούνται σήμερα για τη μείωση του αριθμού των αιμοπεταλίων, η υδροξυκαρβαμίδη ή υδροξυουρία είναι εκείνη που έχει βρεθεί ότι υπερτερεί στη μείωση των αρτηριακών θρομβωτικών επιπλοκών, και ως εκ τούτου αποτελεί τη θεραπεία πρώτης γραμμής στην πλειονότητα των ασθενών. Ανησυχίες υπάρχουν σχετικά με την πιθανή λευχαιμογόνο δράση της, χωρίς ωστόσο κάτι τέτοιο να έχει επιβεβαιωθεί από κλινικές μελέτες. Επιπλέον, δε φάνηκε να αυξάνει τον κίνδυνο για οξεία λευχαιμία κατά τη χορήγησή της σε ασθενείς με δρεπανοκυτταρική αναιμία. Παρ'όλα αυτά, σε ασθενείς κάτω των 40 ετών που πρέπει να λάβουν θεραπεία με κυτταροστατικά λόγω θρόμβωσης ή πολύ μεγάλης θρομβοκυττάρωσης θα μπορούσε να δοθεί εναλλακτικά αναγρελίδη, με την υδροξυουρία να παραμένει φάρμακο πρώτης εκλογής⁶⁵. Ασθενείς που δεν ανταποκρίνονται στην υδροξυουρία ή που δεν ανέχονται τη χορήγησή της, για παράδειγμα λόγω άτονων ελκών, μπορούν επίσης να λάβουν αναγρελίδη, που είναι η προτιμώμενη θεραπεία δεύτερης γραμμής. Η ιντερφερόνη α είναι μια τρίτη επιλογή ενώ ασθενείς μεγάλης ηλικίας, με μειωμένο προσδόκιμο ζωής, μπορούν να λάβουν πιποβρωμένη, βουσουλφάνη ή ραδιενεργό φώσφορο⁶⁵.

Ειδική μνεία πρέπει να γίνει στην αντιμετώπιση της ΙΘ κατά την κύηση. Η φυσική πορεία της νόσου δε φαίνεται να επηρεάζεται, αλλά στη διάρκεια του πρώτου τριμήνου το 25%-50% των κυήσεων καταλήγει σε απώλεια του εμβρύου^{44,65}. Άλλες παρατηρούμενες επιπλοκές είναι η καθυστέρηση της ενδομήτριας ανάπτυξης, η γέννηση νεκρού εμβρύου και τα ποσοστά προεκλαμψίας που είναι μεγαλύτερα σε εγκύους με ΙΘ. Αν και δεν είναι βέβαιο ότι η χορήγηση ασπιρίνης ή κυτταροστατικών μειώνει τον κίνδυνο επιπλοκών, συνιστάται η χορήγηση ασπιρίνης εφόσον δεν υπάρχουν αντενδείξεις, ενώ χορηγείται κυτταροστατική αγωγή σε όλες τις γυναίκες με ιστορικό θρόμβωσης. Ο παράγοντας πρώτης εκλογής στις περιπτώσεις αυτές είναι η ιντερφερόνη α, που έχει το ασφαλέστερο προφίλ χορήγησης στην κύηση. Ομοίως, άνδρες με ΙΘ που επιθυμούν τεκνοποίηση θα πρέπει να λαμβάνουν ιντερφερόνη την περίοδο πριν από τη σύλληψη⁶⁵. Επειδή ο αριθμός των αιμοπεταλίων κατά τη διάρκεια της κύησης τείνει να εμφανίσει μείωση, θρομβοκυτταρώσεις της τάξης των 1.500 κυττάρων $\times 10^9/L$ δεν αποτελούν απόλυτη ένδειξη κυτταροστατικής θεραπείας και η απόφαση χορήγησης ή όχι θα πρέπει να λαμβάνεται σε ατομική βάση.

Πρέπει, τέλος, να γίνει ειδική αναφορά στο χειρισμό ασθενών που πρόκειται να υποβληθούν σε χειρουργική επέμβαση. Ο κίνδυνος εμφάνισης θρομβοαιμορραγικών επιπλοκών, περιεγχειρητικά, φαίνεται να είναι αυξημένος στην ΙΘ. Είθισται να διακόπτεται η χορήγηση αντισταθμιστικών 7 με 10 ημέρες πριν από τη διενέργεια μείζονος χειρουργικής επέμβασης και η επαναχορήγηση να γίνεται μετά τη σταθεροποίηση της αιμόστασης, μαζί με αγωγή για θρομβοπροφύλαξη εφόσον κρίνεται ωφέλιμο. Στην περίπτωση εκλεκτικών επεμβάσεων η κυτταροστατική αγωγή συνήθως δε διακόπτεται. Συζητείται η προσωρινή της χορήγηση σε ασθενείς που κατά τα άλλα δε λαμβάνουν, εφόσον βρίσκονται σε αυξημένο κίνδυνο για την εμφάνιση θρόμβωσης. Κυτταροστατική αγωγή θα πρέπει να δίνεται πριν από τη διενέργεια σπληνεκτομής και σε κάθε ασθενή με μικρή έστω αύξηση των αιμοπεταλίων, για να

αποτραπεί η απότομη άνοδός τους μετεγχειρητικά.^{44,65} Δεν είναι ακόμα γνωστό αν η χρήση των νεότερων *JAK2* αναστολέων θα έχει ωφέλιμες συνέπειες για τους ασθενείς με ΙΘ. Λαμβάνοντας υπόψη τη σχετικά καλοήγη φύση της διαταραχής σε συνδυασμό με τις ανεπιθύμητες ενέργειες αυτών των φαρμάκων, η χορήγησή τους μετατίθεται μελλοντικά, όταν πια θα έχει αποδεδειγμένα σαφή πλεονεκτήματα.

ΔΙΑΣΤΡΩΜΑΤΩΣΗ ΚΙΝΔΥΝΟΥ ΑΣΘΕΝΩΝ ΜΕ ΙΔΙΟΠΑΘΗ ΘΡΟΜΒΟΚΥΤΤΑΡΑΙΜΙΑ		
	ΥΨΗΛΟΥ ΚΙΝΔΥΝΟΥ	ΧΑΜΗΛΟΥ ΚΙΝΔΥΝΟΥ
Ηλικία	> 60 ετών	< 60 ετών
Προηγθείσα θρόμβωση	ναι	όχι
Εκσεσημασμένη θρομβοκυτταραιμία >1500 × 10 ⁹ /L	ναι	όχι

Πίνακας 6. Διαστρωμάτωση κινδύνου των ασθενών με ΙΘ ανάλογα με την ηλικία και το ιστορικό προηγθείσας θρόμβωσης. (Από Philip A. Beer, How I treat Essential Thrombocythemia, doi:10.1182/blood-2010-08-270033).

1.4 Μοριακός χαρακτηρισμός της ιδιοπαθούς θρομβοκυτταραιμίας.

1.4.1 Η οδός μεταγωγής σήματος TPO-cMPL-JAK2.

Η θρομβοποιητίνη και ο υποδοχέας της cMPL.

Η κύρια ορμόνη που ελέγχει τη θρομβοποίηση, η θρομβοποιητίνη, είναι μία γλυκοπρωτεΐνη 95kDa αποτελούμενη από 332 αμινοξέα που παράγεται κυρίως από τα παρεγχυματικά κύτταρα του ήπατος και κατά δεύτερο λόγο από τους νεφρούς και το μυελό των οστών⁶. Ανακαλύφθηκε μόλις το 1994, αφού είχε γίνει γνωστή η δομή του συγγενικού της υποδοχέα *c-MPL*, βάσει της ομολογίας του με το ογκογονίδιο *v-MPL* (*myeloproliferative leukemia virus*) δύο χρόνια νωρίτερα⁶.

Οι βιολογικές της δράσεις ασκούνται μέσω του υποδοχέα της, *c-MPL*. Το υπεύθυνο γονίδιο αποτελείται από 12 εξόνια και κωδικοποιεί για μια πρωτεΐνη 635 αμινοξέων, που ανήκει στην ομάδα κυτταροκινών τάξης *I*, και συγκεκριμένα στην υποκατηγορία της μονής αλυσού (*single chain*). Σε αυτή υπάγονται μεταξύ άλλων οι υποδοχείς της ερυθροποιητίνης, του *G-CSF*, της προλακτίνης και της αυξητικής ορμόνης⁴. Αποτελείται από το εξωκυττάριο τμήμα, με τα τέσσερα συντηρημένα κατάλοιπα κυστεΐνης και το μοτίβο τρυπτοφάνης-σερίνης (*W-S*), τη διαμεμβρανική περιοχή και το ενδοκυττάριο τμήμα, όπου εντοπίζονται οι πλούσιες σε προλίνη αλληλουχίες *box-1* και *box-2* (βλ.εικ.2). Εκφράζεται κυρίως στα μεγακαρυοκύτταρα, τα αιμοπετάλια, τον αιμαγγειοβλάστη και το αρχέγονο αιμοποιητικό κύτταρο.

Οι γνώσεις πάνω στη φυσιολογία της θρομβοποιητίνης έχουν προέλθει από μελέτες σε κυτταρικές σειρές και πειραματικά ζωικά μοντέλα και είναι πλέον σαφές ότι αποτελεί το βασικό ρυθμιστή της θρομβοποίησης^{4,6,21}. Επώαση κυττάρων του μυελού των οστών με θρομβοποιητίνη προωθεί την επιβίωση και τον πολλαπλασιασμό των μεγακαρυοκυττάρων, μόνη ή σε συνδυασμό με άλλες κυτταροκίνες⁵⁰. *In vivo* διεγείρει την παραγωγή των αιμοπεταλίων χωρίς να επηρεάζει τον αριθμό των ερυθρών και των λευκών αιμοσφαιρίων στο περιφερικό αίμα. Επίσης, λόγω της δράσης της στο αρχέγονο αιμοποιητικό κύτταρο οι αριθμοί των προδρόμων κυττάρων της ερυθράς και μυελικής σειράς επίσης αυξάνονται, τόσο στο μυελό των οστών όσο και το σπλήνα⁵⁰.

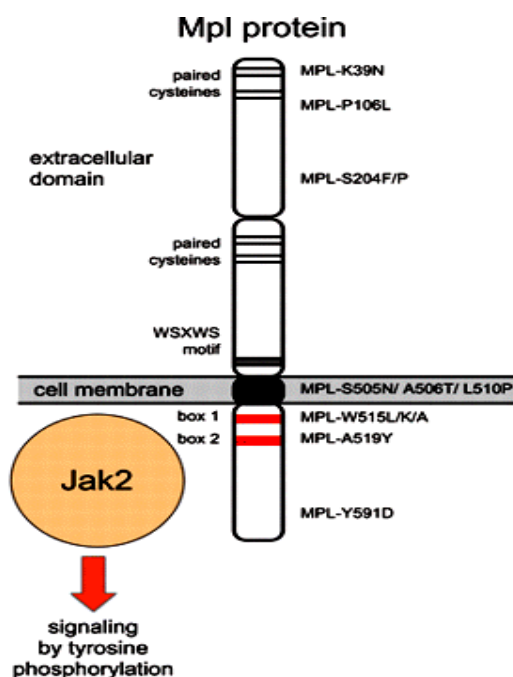
Επιπλέον, γενετική εξάλειψη είτε του γονιδίου της θρομβοποιητίνης είτε του υποδοχέα της, προκαλεί σοβαρή θρομβοπενία σε επίμυες οι οποίοι είναι μεν βιώσιμοι, αλλά με πολύ μεγάλη μείωση του αριθμού των μεγακαρυοκυττάρων και των αιμοπεταλίων, συγκεκριμένα περίπου στο 10% των φυσιολογικών τιμών⁶. Ταυτόχρονα, παρουσιάζουν μειωμένα επίπεδα αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων καθώς και των προγονικών μορφών όλων των σειρών στο μυελό των οστών. Κάτι ανάλογο συμβαίνει σε παιδιά με συγγενή αμεγακαρυοκυτταρική θρομβοπενία (*congenital amegakaryocytic thrombocythopenia, CAMT*), μια κληρονομική πάθηση που οφείλεται σε μειωμένη δραστηριότητα του c-MPL, λόγω ετερόζυγων ή ομόζυγων *nonsense* ή *missense* μεταλλάξεων. Οι πάσχοντες εμφανίζουν έκδηλη θρομβοπενία και μείωση του αριθμού των αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων, που συχνά εξελίσσεται σε μυελική απλασία⁴. Κατά αντίστοιχο τρόπο, μεταλλάξεις που αυξάνουν τη λειτουργικότητα της θρομβοποιητίνης ή του c-MPL σχετίζονται με περιπτώσεις οικογενούς ή κληρονομικής θρομβοκυτταραιμίας.

Η κινάση τυροσίνης JAK2 και η ενδοκυττάρια μεταβίβαση του σήματος.

Ο cMPL στερείται ενδογενούς ενζυμικής δραστηριότητας. Για την περαιτέρω μεταβίβαση της πληροφορίας στο εσωτερικό του κυττάρου στηρίζεται στη δημιουργία συμπλέγματος με την κυτταροπλασματική κινάση τυροσίνης JAK2 (*janus kinase 2*). Η τελευταία, ανήκει σε μια ευρύτερη κατηγορία κινασών, απαρτιζόμενη από τέσσερα συνολικά μέλη (JAK1, JAK2, JAK3 και TYK2).

Η δομή και των τεσσάρων μορίων είναι πανομοιότυπη, ενώ το μέγεθός τους κυμαίνεται από 120-140 Kd. Αποτελούνται από επτά ευδιάκριτες μεταξύ τους περιοχές από το καρβοξυτελικό προς το αμινοτελικό άκρο αντίστοιχα (*Janus Homology, JH1-7*)^{6,19,29} (βλ. **εικ.3**). Η πρώτη (*JH1*) έχει όλα τα χαρακτηριστικά μιας τυπικής ευκαρυωτικής κινάσης με διατήρηση συγκεκριμένων καταλοίπων τυροσίνης, απαραίτητων για την ενεργοποίηση του μορίου. Η περιοχή της ψευδοκινάσης (*JH2*) που ακολουθεί έχει παραπλήσια δομή είναι, όμως, ενζυμικά ανενεργή. Φαίνεται ότι ασκεί τροποποιητική ανασταλτική επίδραση επί της *JH1*, εύρημα σύμφωνο με το φαινότυπο που αποδίδεται σε μεταλλάξεις κρίσιμων καταλοίπων εντός αυτής. Η αντικατάσταση βαλίνης από φαινυλαλανίνη στο κωδικόνιο 617, που οδηγεί σε

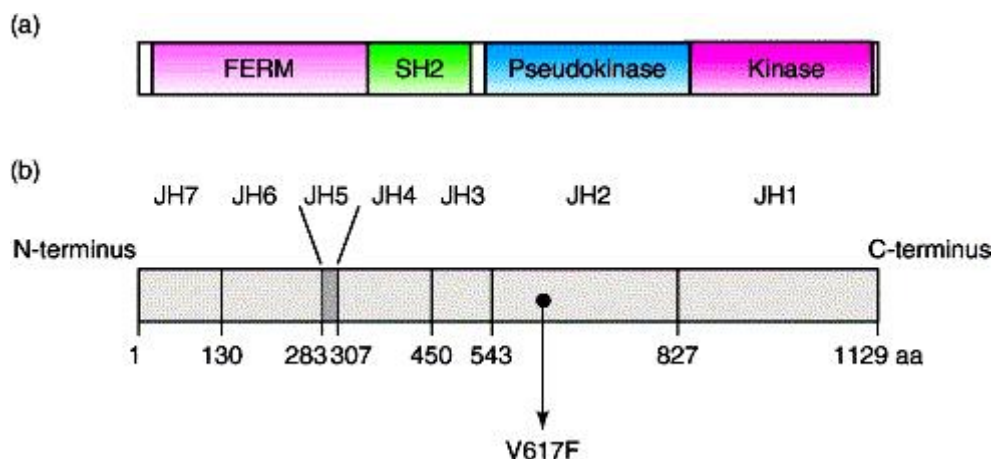
υπέρμετρη ενζυμική δραστηριότητα, αποδίδεται στην άρση της ανασταλτικής επίδρασης της ψευδοκινάσης. Τα τμήματα *JH3* έως *JH5* απαρτίζουν την *SH2* (*Src-homology 2*) περιοχή, που πήρε το όνομά της από τον ομόλογο τομέα της ογκοπρωτεΐνης *Src* και άλλων μορίων ενδοκυττάριας σηματοδότησης. Τέλος, στο αμινοτελικό άκρο οι *JH6* και *JH7* περιοχές σχηματίζουν από κοινού τον τομέα *FERM* (*band 4.1, ezrin, moezin, radixin*), απαραίτητο για την αλληλεπίδραση των κινασών *JAK* τόσο με τον μεμβρανικό υποδοχέα όσο και με άλλες κινάσες.



Εικόνα 2. Δομή του υποδοχέα της θρομβοποιητίνης, c-MPL. Διακρίνονται το εξωκυττάριο τμήμα, η διαμεμβρανική περιοχή και το ενδοκυττάριο τμήμα. Σημειώνεται η θέση των κυριότερων μεταλλάξεων και πολυμορφισμών που έχουν παρατηρηθεί σε περιπτώσεις θρομβοκυττάρωσης (Από Radek C. Skoda Thrombocytosis, doi: 10.1182/asheducation-2009.1.159 ASH Education Book January 1, 2009 vol. 2009 no. 1 159-167).

Πριν από τη σύνδεση της θρομβοποιητίνης, ο cMPL εκφράζεται ως ομοδιμερές στην κυτταρική επιφάνεια, με τα κυτταροπλασματικά άκρα των δύο παρακείμενων μορίων να βρίσκονται σε απόσταση 75Å. Η *Box1* περιοχή καθενός από αυτά αλληλεπιδρά με τον τομέα *FERM* του ανενεργού *JAK2*, σχηματίζοντας ένα σύμπλεγμα. Η σύνδεση της ορμόνης αλλάζει τη διαμόρφωση του συμπλέγματος, φέρνοντας τις κυτταροπλασματικές ουρές του υποδοχέα σε μεγαλύτερη εγγύτητα (39Å). Αυτό επιτρέπει σε δύο παρακείμενα μόρια *JAK2* να ενεργοποιηθούν το ένα το άλλο μέσω διαφωσφορυλίωσης (*transphosphorylation*)⁶. Καθεμία από τις ενεργοποιημένες κινάσες φωσφορυλιώνει στη συνέχεια τον εαυτό της και τον cMPL, δημιουργώντας θέσεις σύνδεσης για επιπρόσθετα μόρια μέσω των *SH2* περιοχών τους (βλ. εικ. 4). Ανάμεσα σε αυτά κυρίαρχο ρόλο παίζουν μέλη της οικογένειας των μεταγραφικών παραγόντων *STAT* (*signal transduction and activation of transcription*) και των

κινασών MAPK (*mitogen-activated protein kinase*) και PI3K (*Phosphoinositide 3-kinase*). Προσδένονται επίσης μόρια που ασκούν ανασταλτική επίδραση στην περαιτέρω ενεργοποίηση της οδού, μεταξύ των οποίων η LNK, η φωσφατάση SHP1 και οι πρωτεΐνες SOCS (*suppressor of cytokine signaling*)^{4,6,24}.

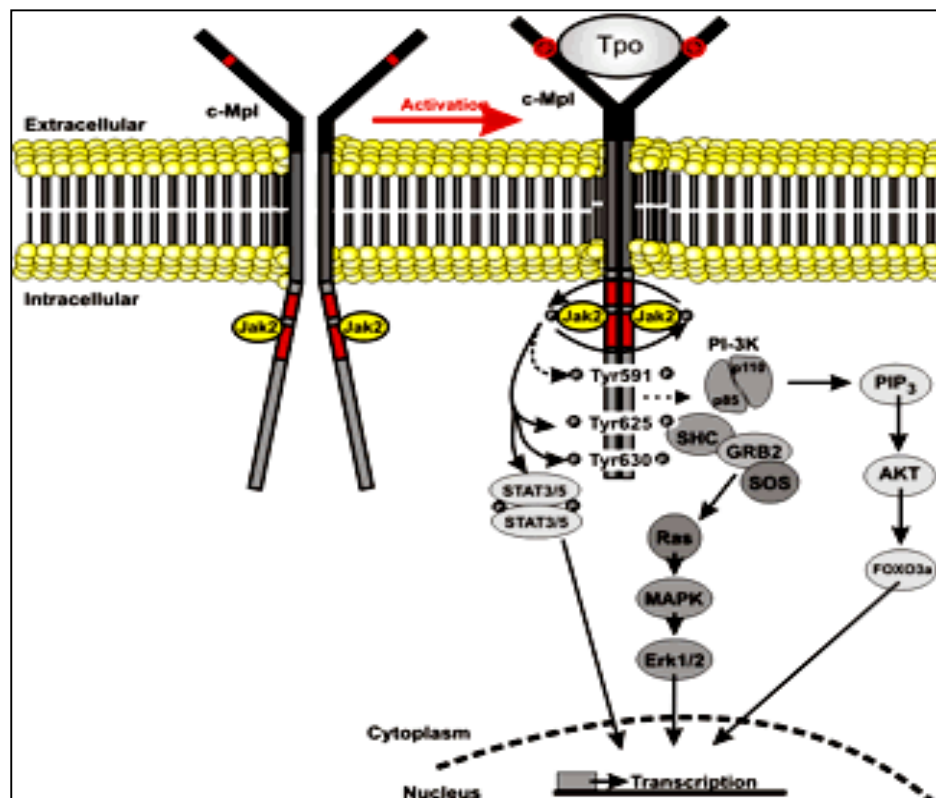


Εικόνα 3. Σχηματική απεικόνιση των λειτουργικών (a) και δομικών περιοχών (b) της κινάσης τυροσίνης JAK2. Σημειώνεται η θέση της μετάλλαξης V617F. (Από Chloe James A JAK2 mutation in myeloproliferative disorders: pathogenesis and therapeutic and scientific prospects, Trends in Molecular Medicine, vol 11, Dec 2005).

Άμεση συνέπεια της ενεργοποίησης του JAK2 από τη θρομβοποιητίνη είναι η φωσφορυλίωση, από το ίδιο το JAK2, των μεταγραφικών παραγόντων STAT3, STAT5a και STAT5b. Ακολούθως, τα ανωτέρω μόρια διμερίζονται και μεταναστεύουν στον πυρήνα, όπου προσδένονται σε ειδικές αλληλουχίες. Οι αλληλουχίες αυτές λειτουργούν ως ενισχυτές, προάγοντας την έκφραση των γονιδίων στόχων, μεταξύ των οποίων συγκαταλέγονται γονίδια που ρυθμίζουν τον κυτταρικό κύκλο και προάγουν την κυτταρική επιβίωση (*p21*, *c-myc*, *Bcl-x_i*, *Bcl-2*, *cyclin-D*, *pim1*)^{4,6,24}. Η σπουδαιότητα των STAT5a και STAT5b στη θρομβοποίηση αποδεικνύεται από το ότι γενετική τους εξάλειψη σε πειραματόζωα οδηγεί σε σοβαρή θρομβοπενία. Επίσης, διαγονιδιακοί επίμυες στων οποίων τα μεγακαρυοκύτταρα εκφράζεται εκλεκτικά το μόριο STAT3 με κυρίαρχα αρνητική δράση (*dominant negative*), παρουσιάζουν ελαττωμένη ανάκαμψη των αιμοπεταλίων μετά τη χορήγηση φθοριοουρακίλης 5⁵³.

Εκτός από την ενεργοποίηση των STAT, η δράση της θρομβοποιητίνης στα μεγακαρυοκύτταρα και τους προγόνους τους έχει ως αποτέλεσμα τη διασταυρούμενη συνομιλία (*cross-talk*) με τις οδούς σηματοδότησης των κινασών MAPK και PI3K. Ειδικότερα, στη φωσφορυλιωμένη τυροσίνη 112 του cMPL προσδένεται η πρωτεΐνη SHC και ακολούθως οι Grb2 και SOS. Η SOS ενεργοποιεί τη Ras, και τελικά τις κινάσες ERK1/2 (*extracellular-signal-regulated kinases*) και p38 MAPK. Η ενεργοποίηση της οδού των MAPK κινασών είναι απαραίτητη για την ωρίμανση και την πολυπλοειδία των μεγακαρυοκυττάρων⁵³. Επιπλέον, η θρομβοποιητίνη προάγει το σχηματισμό συμπλέγματος ανάμεσα στη ρυθμιστική υπομονάδα της PI3K, p85, την

πρωτεΐνη προσαρμογέα (*adaptor*) Gab και τη φωσφατάση SHP2. Ακολουθεί πρόσδεση της ενζυματικής υπομονάδας της PI3K (p110) και φωσφορυλίωση της διφωσφορικής ινοσιτόλης (*Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate*, PIP₂) σε τριφωσφορική (PIP₃). Η PIP₃ με τη σειρά της ενεργοποιεί και φωσφορυλιώνει την κινάση σερίνης/θρεονίνης Akt, που έχει αντιαποπτωτική δράση, καθώς αναστέλλει τους μεταγραφικούς παράγοντες της ομάδας FOXO3 (*Forkhead Box O3*), που επάγουν την απόπτωση^{4,6,24,53}. Η Akt ενεργοποιεί επίσης μια άλλη κινάση σερίνης/θρεονίνης, την mTOR, που ρυθμίζει μεταξύ άλλων τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό.



Εικόνα 4. Σχηματική αναπαράσταση της σηματοδότησης μέσω cMPL. Η πρόσδεση της θρομβοποιητίνης προκαλεί αλλαγή στη διαμόρφωση του υποδοχέα, φέρνοντας δύο παρακείμενα μόρια JAK2 σε μεγαλύτερη εγγύτητα ώστε να είναι δυνατή η διαφωσφορυλίωσή τους. Ακολουθεί φωσφορυλίωση και ενεργοποίηση των STAT και πολλαπλών καταλοίπων τυροσίνης επί του υποδοχέα, που χρησιμεύουν ως θέσεις πρόσδεσης δευτερευόντων σηματοδοτικών μορίων, απολήγοντας στην ενεργοποίηση των γονιδίων στόχων. (Ian Hitchcock Ph.D, Assistant Professor, Stony Brook University).

Αρνητική ρύθμιση της σηματοδότησης μέσω JAK2.

Η σηματοδότηση μέσω της οδού cMPL-JAK2 βρίσκεται υπό αυστηρό ρυθμιστικό έλεγχο ώστε να αποτραπεί υπέρμετρη ενεργοποίηση, που θα είχε επιβλαβείς συνέπειες στις κρίσιμες διαδικασίες του κυτταρικού κύκλου και της απόπτωσης. Οι σχετικοί

μηχανισμοί περιλαμβάνουν εσωτερικοποίηση και αποδόμηση του υποδοχέα, απομάκρυνση των μεταγραφικών παραγόντων STAT από τον πυρήνα και δράση ανταγωνιστικών μορίων.

Ένα πρώτο επίπεδο ρύθμισης αφορά στον c-MPL που μετά τη σύνδεση με τη θρομβοποιητίνη υποβάλλεται σε ενδοκύττωση μέσω κυστιδίων κλαθρίνης. Στη συνέχεια η ορμόνη προωθεί τη σήμανση με ουβικουιτίνη δύο καταλοίπων λυσίνης (K553 και K573) στο κυτταροπλασματικό τμήμα του υποδοχέα. Έτσι, σηματοδοτείται η αποδόμησή του, τόσο μέσω λυσοσώματος όσο και μέσω πρωτεασώματος^{24,35,36}. Εξάλλου, το ίδιο το JAK2 με μηχανισμό αρνητικής παλίνδρομης ρύθμισης ενεργοποιεί μόρια που ανταγωνίζονται τη δράση του, όπως η LNK και οι SOCS (*suppressor of cytokine signaling*)⁴. Η πρώτη είναι μια πρωτεΐνη προσαρμογέας που συνδέεται και αναστέλλει τόσο το φυσιολογικό JAK2 όσο και το μεταλλαγμένο. Η οικογένεια των SOCS αποτελείται από οκτώ πρωτεΐνες με πλειοτροπικό τρόπο δράσης. Ανταγωνίζονται το JAK2 ως προς την πρόσδεση στους παράγοντες STAT ή προσδένονται απευθείας στην κινάση προάγοντας την αποδόμησή της μέσω πρωτεασώματος. Υπάρχουν ενδείξεις ότι το μεταλλαγμένο JAK2V617F είναι ανθεκτικό στην κατασταλτική επίδραση της SOCS3. Τέλος, αυτοφωσφορύλιωση του JAK2 στην περιοχή *FERM*, προκαλεί απομάκρυνσή του από τον υποδοχέα και τερματισμό της δράσης του⁴.

Από τους υπόλοιπους ρυθμιστικούς μηχανισμούς, οι φωσφατάσες SHP1 και SHP2 σταματούν τη σηματοδότηση απομακρύνοντας φωσφορικές ομάδες από ενεργοποιημένα τυροσινικά κατάλοιπα. Γενετική εξάλειψη των μορίων αυτών σε πειραματόζωα έχει συνδεθεί με υπέρμετρο πολλαπλασιασμό κυττάρων της μυελικής σειράς, εξωμυελική αιμοποίηση και σπληνομεγαλία. Επίσης, υπομεθυλίωση του γονιδίου SHP1 είναι παρούσα σε μια σειρά μυελικών και λεμφικών νεοπλασιών⁴. Τα τέσσερα μέλη της οικογένειας των PIAS (*proteins inhibitors of activated STATs*) ανταγωνίζονται την πρόσδεση των παραγόντων STAT στο DNA ή στρατολογούν μεταγραφικούς καταστολείς, όπως αποακετυλάσες ιστονών. Επιπλέον, προωθούν την αποδόμηση των STAT μέσω SUMΟυλίωσης. Τέλος, οι πρωτεΐνες SLIM (*STAT interacting LIM*) προκαλούν τη σήμανση με ουβικουιτίνη, και στη συνέχεια την αποδόμηση, των μορίων STAT1 και STAT4⁴.

1.4.2 Ο απλότυπος 46/1.

Πρόκειται για μία περιοχή 280kb που εντοπίζεται στο βραχύ σκέλος του χρωμοσώματος 9 και προδιαθέτει στην εμφάνιση μυελοϋπερπλαστικού νοσήματος, αποτελώντας το 50% του αποδόσιμου πληθυσμιακού κινδύνου. Επιπλέον, απαντάται με αυξημένη συχνότητα μεταξύ ασθενών με οξεία μυελογενή λευχαιμία και φυσιολογικό καρυότυπο, ειδικά εκείνων με οξεία μυελομονοκυτταρική λευχαιμία στην ταξινόμηση κατά FAB (*French-American-British classification system*)¹¹. Με

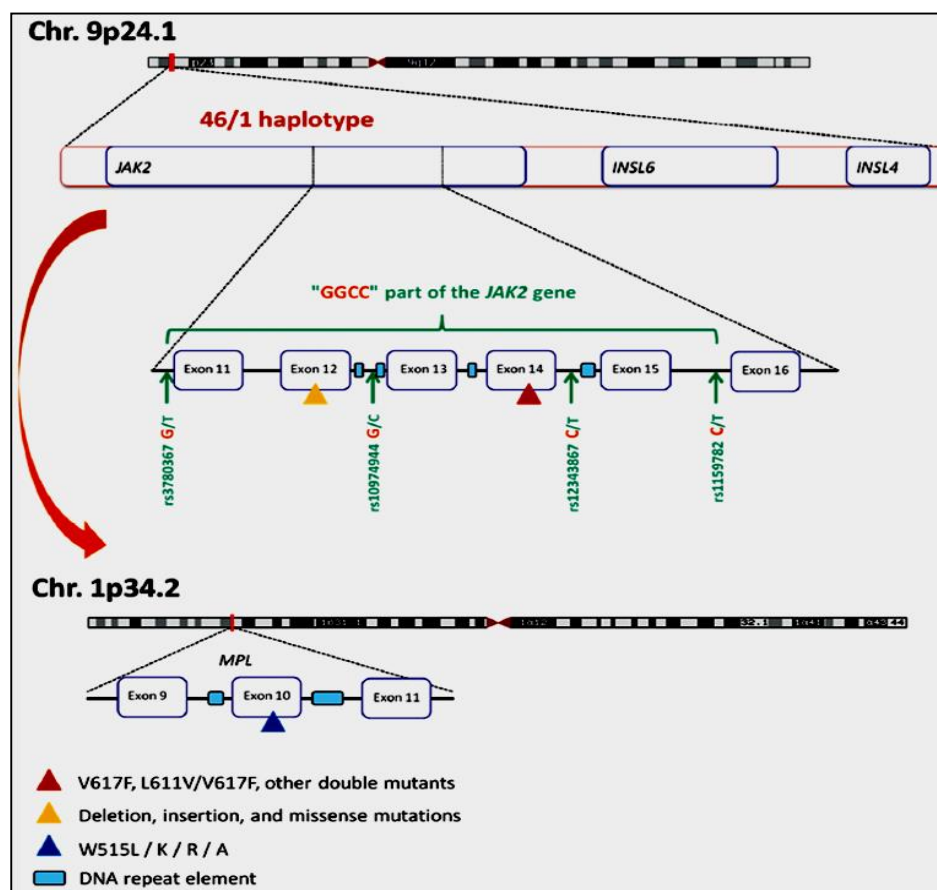
αυξημένη συχνότητα παρατηρείται και σε μη νεοπλασματικές παθήσεις, όπως η θρόμβωση σπλαγχνικής φλέβας και η νόσος του Crohn^{11,13}.

Περιέχει εξολοκλήρου τα γονίδια *JAK2*, *INSL6* (*insulin-like 6*) και *INSL4* (*insulin-like 4*) (βλ. **εικ.5**). Από αυτά μόνο το πρώτο εκφράζεται στα αιμοποιητικά κύτταρα, ενώ ο *INSL6* έχει βρεθεί ότι εκφράζεται στα κύτταρα του στρώματος του μυελού των οστών¹¹. Το επονομαζόμενο 'GGCC' τμήμα του απλότυπου ξεκινάει από το ιντρόνιο 10 και καταλήγει στο ιντρόνιο 15 του γονιδίου *JAK2*. Περιλαμβάνει τα εξόνια εκείνα που μεταλλάσσονται συχνότερα. Χαρακτηρίζεται από την παρουσία τεσσάρων απλών νουκλεοτιδικών πολυμορφισμών (*Single Nucleotide Polymorphism*, *SNP*) των *rs3780367*, *rs10974944*, *rs12343867* και *rs1159782*, στα ιντρόνια 10, 12, 14 και 15 αντίστοιχα. Οι τέσσερις πολυμορφισμοί βρίσκονται σε απόλυτη σύνδεση ανισορροπίας (*linkage disequilibrium*), ως εκ τούτου κληρονομούνται πάντα μαζί. Αφορούν στην αντικατάσταση τριών βάσεων θυμίνης (*T*) και μίας κυτοσίνης (*C*) από δύο γουανίνες (*G*) και δύο κυτοσίνες, εξού και η ονομασία 'GGCC'. Ο απλότυπος συσχετίζεται με τη μετάλλαξη στο κωδικόνιο 617, και με τις μεταλλάξεις στο εξόνιο 12 του *JAK2* και το εξόνιο 10 του *cMPL*, παρότι το γονίδιο του υποδοχέα της θρομβοποιητίνης εντοπίζεται σε διαφορετικό χρωμόσωμα (1p). Αντίθετα, σύμφωνα με τους Soler και Gau δε συσχετίζεται με μεταλλάξεις στο μόριο της καλρετικουλίνης^{54,55}. Επίσης, όσον αφορά στο *JAK2*, είναι χαρακτηριστικό ότι η πλειοψηφία των ετεροζυγωτών για τον απλότυπο φέρουν το μεταλλαγμένο *JAK2* αλληλόμορφο *in cis* με τον 46/1.

Οι μηχανισμοί που οδηγούν σε αυξημένη εμφάνιση μεταλλάξεων στα γονίδια *JAK2* και *cMPL*, και μεγαλύτερο κίνδυνο νόσησης από μυελοϋπερπλαστικό νόσημα παραμένουν άγνωστοι. Άγνωστη παραμένει και η ερμηνεία εμφάνισης της μετάλλαξης *JAK2V617F* κατά προτίμηση *in cis* με τον απλότυπο. Δύο θεωρίες προσπαθούν να ερμηνεύσουν τα παραπάνω ευρήματα, οι θεωρίες της **υπερμεταλλαξιμότητας (*hypermutability*)** και του **προσφόρου εδάφους (*fertile ground*)**. Σύμφωνα με την πρώτη, η παρουσία του απλότυπου οδηγεί σε γενετική αστάθεια και αυξημένο ρυθμό απόκτησης μεταλλάξεων, με εκείνες που τυχαία αποδίδουν εκλεκτικό πλεονέκτημα να κυριαρχούν τελικά ως κλωνική νόσος^{11,16}. Η θεωρία της υπερμεταλλαξιμότητας υποστηρίζεται έντονα από τη συσχέτιση του απλότυπου με διαφορετικές μοριακές βλάβες, και από την ταυτόχρονη εντόπιση του 46/1 και της *JAK2V617F* στο ίδιο αλλήλιο. Υποστηρίζεται επίσης από την ύπαρξη ασθενών με πολυκλωνική νόσο. Δε μπορεί όμως να εξηγήσει με ποιον ακριβώς μηχανισμό η παρουσία ενός κληρονομήσιμου γενετικού χαρακτηριστικού οδηγεί σε αυξημένη εμφάνιση μεταλλάξεων, ειδικά σε ένα απομακρυσμένο γονίδιο όπως εκείνο του *cMPL*.

Σύμφωνα με τη δεύτερη θεωρία, μεταλλάξεις αποκτούνται με την ίδια συχνότητα ανεξάρτητα της ύπαρξης του απλοτύπου ή όχι. Σε αυτή την περίπτωση, εκλεκτικό πλεονέκτημα προσφέρει η συνύπαρξη με τον 46/1 αυτή καθ'εαυτή. Η θεωρία του «προσφόρου εδάφους» αδυνατεί με τη σειρά της να εξηγήσει την πολλαπλή εμφάνιση μεταλλάξεων στον ίδιο ασθενή. Αδυνατεί επίσης να εξηγήσει τον τρόπο με τον οποίο ο απλότυπος προσφέρει εκλεκτικό πλεονέκτημα, ειδικά απουσία μελετών που να καταδεικνύουν διαφορές στα επίπεδα έκφρασης του *JAK2*. Παρ'όλα αυτά, κάποια

διαφορά στη λειτουργικότητα του μορίου πρέπει να υπάρχει καθώς ο 46/1 σχετίζεται με χαμηλότερο αριθμό αποικιών κυττάρων της μυελικής σειράς και παθολογική απάντηση των μυελομονοκυττάρων στα ερεθίσματα των κυτταροκινών, με αποτέλεσμα αυξημένο κίνδυνο φλεγμονής, μυελικών νεοπλασιών και μειωμένη άμυνα έναντι λοιμώξεων¹¹. Οι περισσότεροι μελετητές πάντως αδυνατούν να συσχετίσουν τον 46/1 με κλινικές ή αιματολογικές παραμέτρους, με την εξαίρεση του *Tefferi* που βρήκε ότι η παρουσία του σε ομοζυγωτία επηρεάζει αρνητικά την επιβίωση στην ΠΜ και ευνοεί την εμφάνιση μυελοϊνώσεως στην ΑΠ⁷⁸.



Εικόνα 5. Ο απλότυπος 46/1. Φαίνονται τα τρία γονίδια που περιέχει και η ακριβής θέση των τεσσάρων πολυμορφισμών που συνιστούν τον GGCC στα ιντρόνια 10, 12, 14 και 15. (Από Sylvie Hermouet και Mathias Vilaine, *haematologica*|2011;96(11)).

1.4.3 Ιδιοπαθής θρομβοκυτταραιμία που συνοδεύεται από τη μετάλλαξη *JAK2V617F*.

Πρόκειται για την κυρίαρχη και καλύτερα μελετημένη γενετική βλάβη ανάμεσα στους ασθενείς με ΙΘ καθώς παρατηρείται στο ήμισυ περίπου αυτών^{29,37}. Ανευρίσκεται σε παραπλήσια ποσοστά στην ΠΜ και στο σύνολο σχεδόν των ασθενών με ΑΠ, ενώ πολύ σπανιότερα σε περιπτώσεις μυελοδυσπλαστικού συνδρόμου, οξείας *de novo* μυελογενούς λευχαιμίας ή χρόνιας μυελομονοκυτταρικής λευχαιμίας. Ασθενείς με το

μυελοδυσπλαστικό σύνδρομο 5q και το μυελοϋπερπλαστικό/μυελοδυσπλαστικό σύνδρομο *RARS-T* επίσης εμφανίζουν τη μετάλλαξη σε αυξημένο ποσοστό³⁷. Το γεγονός ότι παρουσιάζει αποκλειστική συσχέτιση με νεοπλάσματα μυελικής προέλευσης, καθώς και το ότι δεν έχει ανευρεθεί ποτέ σε παθήσεις του λεμφικού ιστού ούτε σε ομάδες ελέγχου αποτελούμενες από υγιείς εθελοντές, συσχετίζουν σαφώς τη βλάβη με έλλειμμα κατά τη διαφοροποίηση ή/και των πολλαπλασιασμό ενός πρόδρομου μυελικού προγόνου³⁷. Δεν έχει μέχρι σήμερα ταυτοποιηθεί στα γαμετικά κύτταρα των ασθενών, ενώ επίμυες γενετικά τροποποιημένοι ώστε να μην εκφράζουν στα γαμετικά τους κύτταρα το γονίδιο πέθαναν ενδομητρίως λόγω βαριάς αναιμίας¹.

Η ανακάλυψη της μετάλλαξης από τέσσερις ξεχωριστές ερευνητικές ομάδες το 2005 ήταν καθοριστικό βήμα στην κατανόηση της παθογένειας όχι μόνο της ΙΘ αλλά και των υπόλοιπων *Ph*-αρνητικών μυελοϋπερπλαστικών νοσημάτων¹⁹. Προκύπτει από τη σημειακή αντικατάσταση γουανίνης από θυμίνη (*G*→*T*) στο εξόνιο 14 του αντίστοιχου γονιδίου, με αποτέλεσμα προσθήκη φαινυλαλανίνης αντί για βαλίνη στη θέση 1849 του κωδικονίου 617^{1,2,17,37}. Η βλάβη παρατηρείται εντός της περιοχής της ψευδοκινάσης που φέρεται να εμποδίζει τη συνεχή *JAK2* δραστηριότητα μέσω σύνδεσης με το ενεργό κέντρο της *JH1* περιοχής. Η αντικατάσταση της βαλίνης από ένα αμινοξύ μεγαλύτερου μεγέθους θεωρείται ότι παρεμποδίζει αυτή τη σύνδεση, άρωντας τον ανασταλτικό ρόλο της ψευδοκινάσης και επιτρέποντας τη διατήρηση του ενζύμου σε διαμόρφωση συνεχούς ενεργότητας, ανεξάρτητα από την πρόσδεση ή μη του συνδέτη.

Στους μηχανισμούς μέσω των οποίων το παθολογικό *JAK2* ασκεί την ογκογόνο δράση του προεξάρχοντα ρόλο παίζει η εκσεσημασμένη ενεργοποίηση των υποστρωμάτων του, συγκεκριμένα των μεταγραφικών παραγόντων *STAT* και των οδών σηματοδότησης *MAPK* και *PI3K*, των οποίων τα γονίδια στόχοι επάγουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και αναστέλλουν την απόπτωση. Η υπέρμετρη φωσφορυλίωσή τους από την κινάση επάγει αναστολή της απόπτωσης, αυτόνομο πολλαπλασιασμό και ευαισθησία στη θρομβοποιητίνη, χαρακτηριστικά τα μεγακαρυοκυττάρων της ΙΘ^{2,17}.

Εξάλλου, η παθολογική κινάση είναι πιθανό να χαρακτηρίζεται και από ποιοτικές μεταβολές της δράσης της, όπως η αντίσταση στη δράση των ανασταλτικών μορίων ή η φωσφορυλίωση στόχων που δεν ανήκουν στο σηματοδοτικό της μονοπάτι. Για παράδειγμα, υπάρχουν δεδομένα ότι η *SOCS3* αδυνατεί να καταστείλει το μεταλλαγμένο *JAK2*²⁷. Επίσης, νεότερες έρευνες συνδέουν τη *JAK2V617F* με αυξημένη μετάφραση της φωσφατάσης *CDC25A*, υπεύθυνης για τη μετάβαση από το *G1* στάδιο της μίτωσης και το διπλασιασμό του γενετικού υλικού, χωρίς σαφή συμμετοχή των μορίων *STAT*. Αντ'αυτού η παθολογική κινάση καταστέλλει τη φωσφορυλίωση του παράγοντα επιμήκυνσης *eIF2a* και παρατείνει τη δράση του, με αποτέλεσμα ευόδωση της μετάφρασης της *CDC25A*. Αυξημένα επίπεδα της φωσφατάσης έχουν ανευρεθεί σε ασθενείς με μυελοϋπερπλαστικά νοσήματα, ενώ φαρμακολογική αναστολή της αποφωσφορυλίωσης του *eIF2a* από τη *JAK2V617F* καταστέλλει τον πολλαπλασιασμό του νεοπλασματικού κλώνου. Επιπλέον, η

προσθήκη αναστολέα της CDC25A ήταν σε θέση να παρεμποδίσει την ανάπτυξη ενδογενών ερυθροκυτταρικών αποικιών (*endogenous erythroid colonies, EECs*)⁷¹.

Τέλος, η παθολογική κινάση θα μπορούσε να δρα σε επιγενετικό επίπεδο. Ένα σημαντικό βήμα έγινε με την ανακάλυψη από τον Zhao ότι το μεταλλαγμένο JAK2 παρεμποδίζει την απαμίδωση του προαποπτωτικού μορίου Bcl-XL⁷². Πρόκειται για τη μη ενζυματική αντικατάσταση ασπαραγίνης από ισοασπαρτικό οξύ που λαμβάνει χώρα σε καταστάσεις βλάβης του DNA, λειτουργώντας προστατευτικά καθώς επάγεται η απόπτωση. Επομένως, η παθολογική κινάση θα μπορούσε να ασκεί έμμεση μεταλλαξιγόνο δράση επιτρέποντας την επιβίωση κυττάρων που έχουν υποστεί γενετική βλάβη.

1.4.4 Ιδιοπαθής θρομβοκυτταραιμία που συνοδεύεται από μεταλλάξεις στον υποδοχέα της θρομβοποιητίνης c-MPL.

Παρά την ανακάλυψη της μετάλλαξης JAK2V617F μεγάλη κατηγορία ασθενών παρέμεινε χωρίς ανευρισκόμενη γενετική βλάβη. Αντίθετα με ότι συμβαίνει στην ΑΠ, όπου οι μη μεταλλαγμένοι ασθενείς σχεδόν πάντα φέρουν επιπρόσθετες μεταλλάξεις στο εξόνιο 12 του JAK2, κάτι τέτοιο δεν παρατηρείται στην ΙΘ¹. Η ανάγκη να μελετηθεί το γενετικό υπόβαθρο των ασθενών αυτών, οδήγησε στην αναζήτηση πιθανών βλαβών στους υποδοχείς κυτταροκίνης τύπου I, EPOR, c-MPL και GCSF, των οποίων η έκφραση είναι απαραίτητη για τη διαμεσολάβηση της δράσης του JAK2³⁷. Μελέτες ανάλυσης της αλληλουχίας των βάσεων στη διαμεμβρανική και παραμεμβρανική περιοχή των ανωτέρω μορίων σε JAK2-αρνητικούς ασθενείς με μυελοϋπερπλαστικά νοσήματα, οδήγησαν στην ανακάλυψη τριών σωματικών μεταλλάξεων στο κωδικόνιο 515 του cMPL. Το κωδικόνιο αυτό περιλαμβάνεται στο δομικό πρότυπο RWQFP, απαραίτητο για τη διατήρηση του υποδοχέα σε ανενεργό μορφή, απουσία του συνδέτη^{1,37}. Πρόκειται για σημειακές αντικαταστάσεις στο νουκλεοτίδιο 1544 του εξονίου 10 του αντίστοιχου γονιδίου, με αποτέλεσμα κυρίως την προσθήκη λευκίνης (W515L) και σπανιότερα λυσίνης (W515K) αντί για τρυπτοφάνη. Ακόμα λιγότερο συνήθης είναι η αντικατάσταση της τρυπτοφάνης από αλανίνη (W515A). Συνολικά, τα παθολογικά αλληλίου W515L/K ανευρίσκονται στα αιμοποιητικά κύτταρα μυελικής και λεμφικής προέλευσης του 7% των JAK2V617F-αρνητικών ασθενών με ΠΜ και του 5% περίπου εκείνων με ΙΘ. Χαρακτηριστικά, δεν έχουν περιγραφεί έως σήμερα περιπτώσεις ΑΠ ή άλλων μυελικών νεοπλασμάτων με σωματικές μεταλλάξεις στον υποδοχέα της θρομβοποιητίνης, με την εξαίρεση λίγων ασθενών με οξεία μεγακαρυοκυτταρική λευχαιμία. Επίσης, οι W515L/K θετικοί ασθενείς έχουν μεγαλύτερους αριθμούς αιμοπεταλίων από τους αντίστοιχους με τη μετάλλαξη στο κωδικόνιο 617, που χαρακτηρίζονται από εντονότερη ερυθροκυττάρωση^{1,17}.

Όπως και στην περίπτωση του JAK2V617F οι μεταλλάξεις στον cMPL θεωρείται ότι είναι ενεργοποιητικές, οδηγώντας σε συνεχή δραστηριότητα της οδού της θρομβοποιητίνης. Σε *in vitro* μελέτες, έκφραση του παθολογικού αλληλίου W515L σε

αιμοποιητικά κύτταρα, είχε την ικανότητα να επάγει τον πολλαπλασιασμό τους ανεξάρτητα από την παρουσία αυξητικού παράγοντα, ενεργοποιώντας συνεχώς υποκείμενα σηματοδοτικά μόρια μεταξύ των οποίων τα STAT3 και STAT5, και μέλη των οδών MAPK και PI3K/AKT^{1,37}. Επιπλέον, όταν η μετάλλαξη στον *cMPL* εκφράζεται σε μοντέλα επιμύων, οδηγεί σε νόσο με χαρακτηριστικά ΠΜ, δηλαδή εξωμυελική αιμοποίηση, υπερπλασία των μεγακαρυοκυττάρων, σπληνομεγαλία και έντονη θρομβοκυττάρωση. Ένας ακόμη πιθανός μηχανισμός δράσης του παθολογικού υποδοχέα θα μπορούσε να είναι τροποποιημένη απόκριση των μηχανισμών αρνητικής ανατροφοδότησης, όπως αλλαγή στα πρότυπα εσωτερικοποίησης και τελικά αποδόμησής του.

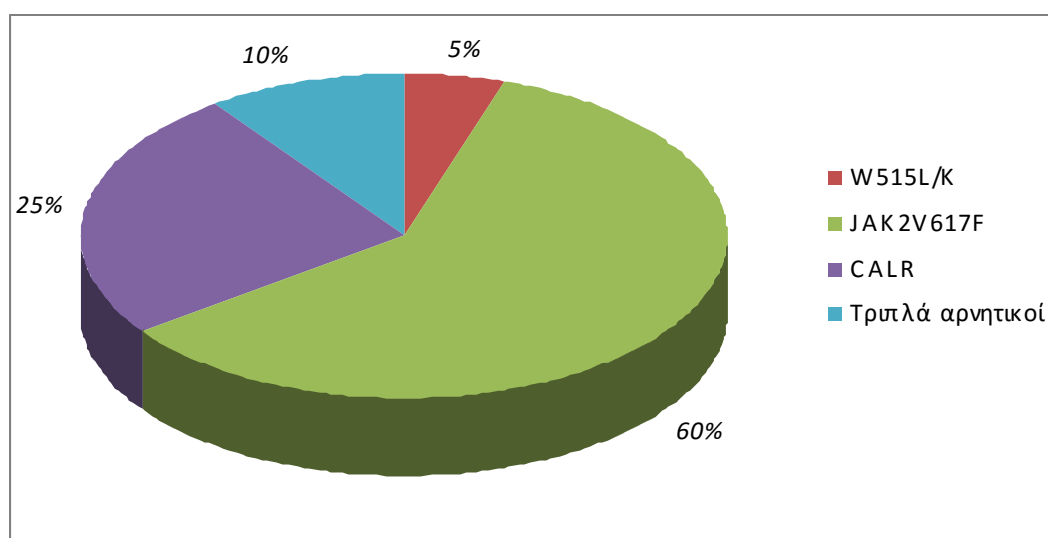
1.4.5 Ιδιοπαθής θρομβοκυτταραιμία που συνοδεύεται από μεταλλάξεις στο γονίδιο της καλρετικουλίνης.

Το γονίδιο της καλρετικουλίνης εδράζεται στο βραχύ σκέλος του χρωμοσώματος 19 και κωδικοποιεί για την αντίστοιχη πρωτεΐνη του ενδοπλασματικού δικτύου, υπεύθυνη για την ομοιοστάση του ασβεστίου και την εξασφάλιση της φυσιολογικής τεταρτοταγούς δομής των γλυκοπρωτεϊνών. Μπορεί επίσης να εντοπιστεί στο κυτταρόπλασμα, την κυτταρική μεμβράνη ή το εξωκυττάριο στρώμα, όπου σχετίζεται με διαδικασίες όπως ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός, η απόπτωση, η φαγοκυττάρωση και η ανοσολογική απόκριση. Μεταλλάξεις στο εξόνιο 9 του υπεύθυνου γονιδίου εντοπίζονται σε ποσοστό 70-85% των ασθενών με ΙΘ και ΠΜ που είναι αρνητικοί για *JAK2V617F* ή *MPLW515L/K*^{48,49} (βλ.εικόνα 7). Επίσης, οι ίδιες μεταλλάξεις εντοπίζονται σε μικρό αριθμό ασθενών με μυελοδυσπλαστικό σύνδρομο (8%) αλλά χαρακτηριστικά απουσιάζουν στην ΑΠ.

Η ανακάλυψη έγινε το 2013 από τις ομάδες των *Nangalia* και *Kampfl*. Οι βλάβες αφορούν σε 19 διαγραφές ή εισαγωγές γενετικού υλικού με αποτέλεσμα μετατόπιση του μεταγραφικού πλαισίου ανάγνωσης και αλλαγή του C-τελικού τμήματος της πρωτεΐνης. Συγκεκριμένα, από έντονα οξύφιλο γίνεται βασεόφιλο, ενώ ελλείπουν αρκετές θέσεις δέσμευσης ασβεστίου καθώς και η χαρακτηριστική αλληλουχία αμινοξέων KDEL, υπεύθυνη για την παραμονή στο ενδοπλασματικό δίκτυο. Παρόλα αυτά η μεταλλαγμένη καλρετικουλίνη εξακολουθεί να εντοπίζεται τόσο στο σύμπλεγμα *golgi* όσο και το ενδοπλασματικό δίκτυο. Δύο είναι οι βλάβες που κυριαρχούν στην πλειοψηφία των ασθενών, και συγκεκριμένα η έλλειψη 52 βάσεων, που αποτελεί τη μετάλλαξη τύπου *I*, και η προσθήκη 5 βάσεων που ονομάζεται μετάλλαξη τύπου *II*. Ο νεοπλασματικός τρόπος δράσης δεν είναι γνωστός, υπάρχουν όμως ενδείξεις ότι και η μεταλλαγμένη καλρετικουλίνη δρα στον άξονα JAK2-STAT, ενεργοποιώντας τον^{48,49}. Αντίθετα δεδομένα προέκυψαν από την παρατήρηση ότι η κυτταρική σειρά *MARIMO*, προερχόμενη από ασθενή με ΙΘ και μετάλλαξη στην καλρετικουλίνη, εμφανίζει χαμηλά επίπεδα ενεργοποιημένων και μη JAK2 και STAT5, και μικρή ευαισθησία σε JAK2 αναστολείς. Στη συνέχεια, ο *Rampal* και οι συνεργάτες

του εξέτασαν με τη βοήθεια μικροσυστοιχιών τη γονιδιακή έκφραση 93 ασθενών και 11 μαρτύρων, αντίστοιχης ηλικίας. Βρήκαν ότι τόσο εκείνοι με μετάλλαξη στο *JAK2* όσο και εκείνοι με *CALR* μεταλλάξεις μοιράζονταν ένα προφίλ αυξημένης ενεργότητας της οδού *JAK2-STAT*⁵⁷. Κλινικά, ασθενείς με μεταλλαγμένη *CALR* έχουν μικρότερο κίνδυνο θρομβώσεων και μεγαλύτερη επιβίωση, πιθανότατα λόγω των χαμηλότερων τιμών αιματοκρίτη και λευκών αιμοσφαιρίων σε σύγκριση με ασθενείς *JAK2V617F* θετικούς⁴⁹. Ο αριθμός των αιμοπεταλίων, αντιθέτως, είναι μεγαλύτερος⁴⁹.

Ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας εξετάζει την προσθήκη των μεταλλάξεων στο γονίδιο της καλρεκουλίνης στα κριτήρια διάγνωσης ΙΘ και ΠΜ. Η ανίχνευση των βλαβών αυτών θα μπορεί να χρησιμεύσει ως διαγνωστικός δείκτης επιτρέποντας τη διαφορική διάγνωση από αντιδραστικές αιτίες ανόδου των αιμοπεταλίων και μυελικής ίνωσης αντίστοιχα.



Εικόνα 7. Τα ποσοστά εμφάνισης των σημαντικότερων μεταλλάξεων στην ιδιοπαθή θρομβοκυτταραιμία. Ένα ποσοστό της τάξης του 10% παραμένει χωρίς ανευρισκόμενη μοριακή βλάβη. Οι σπάνιες μεταλλάξεις που παρατηρούνται σε σποραδικές περιπτώσεις ασθενών δεν αναγράφονται

1.4.6 Ιδιοπαθής θρομβοκυτταραιμία που δε συνοδεύεται από γνωστή μοριακή βλάβη.

Η κατηγορία αυτή καλύπτει το 10% των ασθενών με ΙΘ. Παρά το άγνωστο μοριακό υπόστρωμα και την πιθανή ετερογένεια, οι πάσχοντες εμφανίζουν εργαστηριακά χαρακτηριστικά παραπλήσια εκείνων με μεταλλαγμένη *CALR*. Δηλαδή, οι τιμές των λευκών αιμοσφαιρίων και του αιματοκρίτη είναι χαμηλότερες σε σχέση με τους ασθενείς που φέρουν μεταλλαγμένο *JAK2*, ενώ ο αριθμός των αιμοπεταλίων είναι μεγαλύτερος. Επίσης, η κλινική εικόνα είναι ηπιότερη, με χαμηλότερα ποσοστά θρομβώσεων^{61,62,67,68}.

Σε νοσούντες χωρίς καμιά υποκείμενη μοριακή βλάβη η παθογένεια της θρομβοκυτταραιμίας θα μπορούσε να αποδοθεί: **α)** σε άγνωστες μέχρι σήμερα μεταλλάξεις σε γονίδια εμπλεκόμενα τόσο στην οδό της θρομβοποιητίνης όσο και σε επιπρόσθετα σηματοδοτικά μόρια (*SDF-1*, *Myb/p300*) **β)** σε μεταβολή στα επίπεδα των *microRNA* που ενέχονται στην παραγωγή αιμοπεταλίων **γ)** σε επιγενετικούς μηχανισμούς που ευοώδουν τη διαδικασία της θρομβοποίησης χωρίς δυνητικά ανιχνεύσιμη αλλαγή στην αλληλουχία του γενετικού υλικού (αλλαγή στα πρότυπα μεθυλίωσης ή ακετυλίωσης και μεταμεταφραστικές τροποποιήσεις πρωτεϊνών) **δ)** στην παρουσία κάποιας άλλης αιτίας ανόδου της τιμής των αιμοπεταλίων, κλωνικής ή αντιδραστικής, που διαλάθει της κλινικής διάγνωσης.

Στα υποψήφια γονίδια που θα μπορούσαν να ενέχονται στην παθογένεια της νόσου ανήκουν όσα περιλαμβάνονται στις κυτταρογενετικές αλλαγές που παρατηρούνται στην ΙΘ. Ανάμεσα σε αυτές προεξάρχει η έλλειψη του μακρού σκέλους του χρωμοσώματος 20 (*del 20q*). Ένα μικρό τμήμα 2kb της περιοχής που ελλείπει, είναι κοινό στα περισσότερα μυελικής προέλευσης νεοπλάσματα και έχει πάρει την ονομασία *CDR* (*common deleted region*), δηλαδή κοινή διαγραφείσα περιοχή. Περιέχει 16 γονίδια, έξι εκ των οποίων εκφράζονται στο επίπεδο των *CD34+* κυττάρων. Μέχρι σήμερα δεν έχουν αναφερθεί μεταλλάξεις σε κανένα από αυτά, οπότε ίσως ο μυελοϋπερπλαστικός φαινότυπος είναι αποτέλεσμα απλοανεπάρκειας ογκοκατασταλτικού γονιδίου, τμήματος της συγκεκριμένης περιοχής ή τροποποίησης επιγενετικού μηχανισμού²⁷.

Επίσης, μελετάται η συμμετοχή σηματοδοτικών οδών που ρυθμίζουν τη μεγακαρυοποίηση, πέραν εκείνου της θρομβοποιητίνης. Η καταστολή της σηματοδότησης μέσω θρομβοποιητίνης δεν εξαλείφει εξολοκλήρου τους αριθμούς των αιμοπεταλίων, αφήνοντας ένα ποσοστό της τάξης του 10% από το οποίο διαφαίνεται η πιθανή δράση επιπρόσθετων μορίων⁶. Ανάμεσα στις υπό μελέτη κυτταροκίνες, ιδιαίτερο ρόλο φαίνεται να εξασκεί ο *SDF-1*, παραγόμενος από τα στρωματικά κύτταρα. Ο *SDF-1* είναι σε θέση να αυξήσει αποικίες μεγακαρυοκυττάρων σε καλλιέργειες χωρίς θρεπτικό υλικό δρώντας ξεχωριστά ή σε συνέργεια με τη θρομβοποιητίνη⁶. Επίσης, χορήγησή του μαζί με τον *FGF-4* σχεδόν αποκαθιστά τους αριθμούς των αιμοπεταλίων σε επίμυες που δεν εκφράζουν *c-MPL*, ή μετά την πρόκληση μυελοκαταστολής⁶. Δεν είναι γνωστό αν ο *SDF-1* διατηρεί την ανεξάρτητη δράση του υπό κανονικές συνθήκες ή αν η έκφρασή του απλώς αυξάνεται για να αντισταθμίσει την έλλειψη της θρομβοποιητίνης. Εκτός από τον *SDF-1*, οι μεταγραφικοί παράγοντες *cMyb/p300* φαίνεται ότι ρυθμίζουν αρνητικά τη θρομβοποίηση καθώς μεταλλάξεις που αναστέλλουν τη δράση τους προκαλούν άνοδο του αριθμού των αιμοπεταλίων και είναι σε θέση να διασώσουν το θρομβοπενικό φαινότυπο επιμύων με γενετική εξάλειψη του *cMPL*²¹. Επίσης, αδρανοποιητικές μεταλλάξεις του *cMyb* οδήγησαν στην εμφάνιση μυελοϋπερπλαστικού νοσήματος με υπερπλασία των μεγακαρυοκυττάρων και θρομβοκυττάρωση, χωρίς συμμετοχή της θρομβοποιητίνης. Αντίθετα, οι περισσότερες από τις κυτταροκίνες που θεωρείται ότι συμμετέχουν στη θρομβοποίηση σε συνέργεια με την ορμόνη, όπως η ιντερλευκίνη-3,

δεν έχουν μέχρι σήμερα επιδείξει σημαντική επίδραση στους αριθμούς των αιμοπεταλίων όταν εκείνη ελλείπει.

Λιγότερο καλά μελετημένη είναι η πιθανή συμμετοχή επιγενετικών μηχανισμών. Αν και υπάρχουν δεδομένα για το ρόλο τους σε ασθενείς με μυελοϋπερπλαστικά νοσήματα, δεν έχουν στοχοποιηθεί συγκεκριμένα γονίδια ή μεταβολές που να διασαφηνίζουν την παθογένεια της ΙΘ. Κάποιες αναφορές θέλουν τον υποκινητή της *SOCS3*, να έχει υποστεί υπερμεθυλίωση σε ασθενείς με μυελοϋπερπλαστικές παθήσεις²⁷. Στο επίπεδο της επιγενετικής ρύθμισης της μεταγραφής δρουν και τα *microRNA*. Συνιστούν φυλογενετικώς συντηρημένα, μη κωδικοποιούντα ολιγονουκλεοτίδια που ρυθμίζουν τη γονιδιακή έκφραση μέσω πρόσδεσης στις συμπληρωματικές βάσεις των *mRNA* στόχων. Η διερεύνηση της πιθανής συμβολής των μορίων αυτών στην παθογένεια της ΙΘ και των υπόλοιπων μυελοϋπερπλαστικών νοσημάτων είναι ακόμα στην αρχή, και συνίσταται σε συγκριτικές μελέτες της έκφρασής τους σε υγιείς δότες και πάσχοντες. Έχουν έτσι προκύψει αρκετά *microRNA* με διαφοροποιημένη έκφραση τόσο μεταξύ ασθενών και της ομάδας ελέγχου, όσο και μεταξύ *JAK2V617F* θετικών και αρνητικών περιπτώσεων.

Ανάμεσα σε αυτά ξεχωρίζει η μειωμένη έκφραση του *mir-150*, εύρημα όχι άνευ σημασίας, αν αναλογιστεί κανείς το ρόλο του συγκεκριμένου μορίου στη μεγακαρυοποίηση. Ειδικότερα, στο επίπεδο του MEP (*myeloid-erythroid progenitor*), ευνοεί τη διαφοροποίηση προς μεγακαρυοκύτταρο και όχι προγονικό κύτταρο της ερυθράς σειράς, καταστέλοντας τον *cMyb*. Άλλο ένα *microRNA* που έχει συνδεθεί με τα μυελοϋπερπλαστικά νοσήματα είναι το *mir-433*, η υπερέκφραση του οποίου στα *CD34* θετικά κύτταρα των ασθενών παρεμποδίζει τον πολλαπλασιασμό τους και την εξέλιξη προς ερυθροκύτταρα⁴⁰. Το *mir-28* είναι ένα τρίτο ρυθμιστικό *miRNA* που υπερεκφράζεται στα αιμοπετάλια μερικών ασθενών με ΙΘ, ιδιαίτερα απουσία της μετάλλαξης στο κωδικόνιο 617. Στόχος του είναι η 3' αμετάφραστη περιοχή (3'UTR) του γονιδίου του υποδοχέα της θρομβοποιητίνης, του οποίου και καταστέλλει τα επίπεδα. Η αυξημένη παρουσία του σε ασθενείς με προεξάρχουσα θρομβοκυττάρωση, όπως δηλαδή εκείνοι χωρίς τη μετάλλαξη *JAK2V617F*, τον καθιστά πιθανό δείκτη υπερπλασίας της μεγακαρυοκυτταρικής σειράς. Από μελέτες σε αρχέγονα αιμοποιητικά κύτταρα φαίνεται ότι το *mir-28* ασκεί ανασταλτική δράση στη διαφοροποίηση προς μεγακαρυοκύτταρα. Έτσι, τα αυξημένα επίπεδά του σε ασθενείς με ΙΘ ίσως αντιπροσωπεύουν έναν μηχανισμό αρνητικής ανατροφοδότησης στην προσπάθεια να κατασταλεί η υπέρμετρη υπερπλασία των μεγακαρυοκυττάρων²⁰.

Στο επιγενετικό επίπεδο, από μελέτες παρεμβολής RNA (*RNAi*) στη *Drosophila* έχουν προκύψει δεδομένα για έναν εναλλακτικό «μη κανονικό» (*non-canonical*) τρόπο σηματοδότησης, με την υπέρμετρη *JAK2* δραστηριότητα να επηρεάζει το σχηματισμό της ετεροχρωματίνης^{2,17,27,30}. Ο Dawson και οι συνεργάτες του, με αντίστοιχες μελέτες σε σειρές ανθρώπινων αιμοποιητικών κυττάρων, κατέδειξαν παρουσία του μορίου *JAK2* στον πυρήνα, με επακόλουθη φωσφορυλίωση της ιστόνης *H3* στην τυροσίνη 41, θέση πρόσδεσης της ογκοκατασταλτικής πρωτεΐνης *HP1a* (*heterochromatin protein 1a*)²⁷. Επί συνεχούς *JAK2* δραστηριότητας, η εμμένουσα εκτόπιση της *HP1a* από την

ετεροχρωματίνη θα μπορούσε να οδηγήσει σε ογκογένεση λόγω γενετικής αστάθειας και πιθανής αύξησης της μεταγραφής ογκογονιδίων^{2,17,27,30}. Να σημειωθεί ότι η δράση αυτή ήταν ανεξάρτητη της παρουσίας της μετάλλαξης στο κωδικόνιο 617.

1.4.7 Ιδιοπαθής θρομβοκυτταραιμία που συνοδεύεται από σπανιότερες μεταλλάξεις.

Υπάρχουν σωματικές μεταλλάξεις που έχουν ανευρεθεί σποραδικά σε πάσχοντες από ΙΘ χωρίς ωστόσο η παρουσία τους να μπορεί να εκτιμηθεί, ακριβώς λόγω της πολύ μικρής συχνότητας εμφάνισής τους. Επιπλέον, συνδέονται με τα υπόλοιπα μυελοϋπερπλαστικά νοσήματα, με μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα αλλά και με οξείες λευχαιμίες. Κάποια από τα εμπλεκόμενα μόρια ανήκουν στην οδό της θρομβοποιητίνης ενώ άλλα συμμετέχουν σε επιγενετικές διεργασίες όπως η μεθυλίωση του DNA, οι μεταμεταφραστικές τροποποιήσεις ιστονών και η συναρμογή (μάτισμα) του RNA. Η πρωτεΐνη LNK και η λιγάση ουβικουϊτίνης CBL αναστέλλουν τη σηματοδότηση μέσω θρομβοποιητίνης. Έλλειψη της πρώτης προδιαθέτει στην εμφάνιση μυελοϋπερπλαστικού νοσήματος^{25,38}. Επίσης, έχει περιγραφεί μετάλλαξη στη CBL σε ασθενή με ΙΘ στη φάση εκτροπής σε μυελοϊνώση¹⁷. Τα μόρια *TET2* (*ten to eleven translocation 2*), *IDH1/2* (*isocitrate dehydrogenase 1,2*) και *DNMT3A* (*DNA methyltransferase 3A*) συμμετέχουν στη μεθυλίωση του DNA. Μεταλλάξεις τους έχουν παρατηρηθεί σε όλες τις μυελικές νεοπλασίες, ιδιαίτερα κατά την εκτροπή σε οξεία λευχαιμία, πιθανόν λόγω υπερμεθυλίωσης γονιδίων που ρυθμίζουν την αιμοποίηση^{17,27,39,43}. Άλλα μόρια συχνά μεταλλαγμένα στη φάση εκτροπής σε οξεία λευχαιμία είναι τα *ASXL1* (*additional sex like combs 1*), *IKZF1* (*ikaros zinc finger 1*) και *EZH2* (*enhancer of zeste homolog 2*), όλα εμπλεκόμενα σε μεταμεταφραστικές τροποποιήσεις ιστονών^{17,27,39}. Τέλος, μεταλλάξεις στα μέλη των σωματίων συναρμογής (*spliceosomes*) *SF3B1*, *U2AF1*, *SRSF2* και *SRSR2*, έχουν βρεθεί σε πληθώρα μυελικών νεοπλασιών. Βέβαια, ισχυρή συσχέτιση φαίνεται να υπάρχει με τα μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα, ιδιαίτερα ανάμεσα στο *SF3B1* και την παρουσία δακτυλιοειδών σιδηροβλαστών⁴³.

Να σημειωθεί ότι οι παραπάνω μοριακές βλάβες συχνά συνυπάρχουν με εκείνες στα μόρια *JAK2*, *cMPL* και *CALR*. Μάλιστα, οι δύο ξεχωριστές μεταλλάξεις μπορεί να βρίσκονται στον ίδιο ή σε διαφορετικό κλώνο. Επίσης, η σειρά απόκτησης ποικίλλει, για παράδειγμα κάποιες φορές προηγείται το *JAK2* και άλλες το *TET2*. Η σημασία της πολυκλωνικής νόσου στην παθοφυσιολογία της ΙΘ είναι άγνωστη. Σε πρόσφατη δημοσίευση ο Anthony Green βρήκε ότι η σειρά απόκτησης των *JAK2* και *TET2* επηρεάζει το φαινότυπο. Συγκεκριμένα, ασθενείς με πρώτερη απόκτηση *TET2* θετικού κλώνου είχαν μεγαλύτερη πιθανότητα εμφάνισης ΙΘ παρά ΑΠ, όπως επίσης μικρότερο κίνδυνο θρόμβωσης και μειωμένη ευαισθησία των *JAK2* μεταλλαγμένων προγονικών κυττάρων τους στο *ruxolitinib* (*Effect of Mutation Order on Myeloproliferative Neoplasms*, *NEJM*, 2015)⁵⁶. Τα δεδομένα αυτά δεν έχουν ωστόσο επιβεβαιωθεί από

άλλους ερευνητές. Πάντως, στην ΙΘ η ανεύρεση επιπρόσθετων μεταλλάξεων γίνεται σαφώς συχνότερη στις φάσεις εκτροπής σε ίνωση ή οξεία λευχαιμία, γεγονός που πιθανότατα εμπλέκει τις μοριακές αυτές βλάβες με εξέλιξη της νόσου σε βαρύτερο κλινικό στάδιο.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2. ΒΑΣΙΚΕΣ ΑΡΧΕΣ ΤΩΝ ΜΟΡΙΑΚΩΝ ΤΕΧΝΙΚΩΝ ΠΟΥ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΗΘΗΚΑΝ ΣΤΗΝ ΠΑΡΟΥΣΑ ΜΕΛΕΤΗ.

2.1. Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR).

Πρόκειται για την πιο διαδεδομένη, και με τις περισσότερες εφαρμογές, τεχνική στον τομέα της μοριακής βιολογίας, μέσω της οποίας μπορεί να παραχθεί *in vitro* μεγάλος αριθμός αντιγράφων μιας συγκεκριμένης, ήδη γνωστής, νουκλεοτιδικής αλληλουχίας, χωρίς να είναι απαραίτητη η χρήση φορέων κλωνοποίησης. Ανακαλύφθηκε από τον *Kerry Mullis* το 1983, αν και πρωτοποριακή δουλειά είχε γίνει από τον *Gobind Khorana* το 1971, ο οποίος περιέγραψε τη βασική αρχή της αντιγραφής ενός μορίου DNA χρησιμοποιώντας δύο εκκινητές (*primers*) και την κατάλληλη πολυμεράση. Οι μέχρι τότε χρησιμοποιούμενες τεχνικές για την ενίσχυση τμημάτων ανασυνδυασμένου DNA ήταν ιδιαίτερα επίπονες και χρονοβόρες. Η PCR, αντιθέτως, αποτελεί μια απλή, ταχεία, επιλεκτική και ευαίσθητη μέθοδο μέσω της οποίας ακόμη και ένα μόριο DNA, από 50 μέχρι και πάνω από 2000 βάσεις, μπορεί να πολλαπλασιαστεί με ακρίβεια μέχρι και δισεκατομμύρια φορές μέσα σε πολύ σύντομο χρονικό διάστημα (2-4 ώρες). Έτσι, είναι επόμενο να θεωρείται μία από τις πιο επαναστατικές και σημαντικές ανακαλύψεις του 20^{ου} αιώνα, που έχει αλλάξει ριζικά την μελέτη του γενετικού υλικού συμβάλλοντας σημαντικά στην ευρεία εφαρμογή της μοριακής βιολογίας στην ιατρική έρευνα και διάγνωση.

Η αρχή της μεθόδου βασίζεται στη φυσική διαδικασία αντιγραφής του DNA που ακολουθείται σε κυτταρικό επίπεδο από ένζυμα του πυρήνα, προκειμένου να το διπλασιάσουν ή να το διορθώσουν. Η τοποθέτηση του μίγματος της αντίδρασης στο ίδιο σωληνάριο, είναι σε θέση να αναπαραγάγει *in vitro* την όλη διαδικασία. Αυτό αποτελείται από το γενωμικό DNA, που περιέχει την αλληλουχία στόχο, την πολυμεράση, ισομοριακό μείγμα των τεσσάρων τριφωσφορικών δεοξυριβονουκλεοτιδίων (dNTPs: dATP+dCTP+dGTP+dTTP), το ζεύγος των εκκινητών και ρυθμιστικό διάλυμα κατάλληλο για τη δράση του ενζύμου.

Βασική προϋπόθεση είναι να γνωρίζουμε τη νουκλεοτιδική αλληλουχία της περιοχής που θέλουμε να ενισχύσουμε, έτσι ώστε να είναι δυνατός ο σχεδιασμός των εκκινητών, μικρών δηλαδή συνθετικών ολιγονουκλεοτιδίων, μήκους 20-30 βάσεων περίπου, καθένας από τους οποίους είναι συμπληρωματικός με το 3' άκρο ενός από τους δύο κλώνους του DNA (dsDNA). Έτσι, το ζεύγος των εκκινητών οριοθετεί την περιοχή που θα πολλαπλασιαστεί εκθετικά, αφού κάθε εκκινητής υβριδοποιείται με μία μόνο από τις δύο αλυσίδες, λειτουργώντας ως υπόστρωμα για την DNA πολυμεράση, απολήγοντας στο σχηματισμό δύο συμπληρωματικών κλώνων, μέσω της διαδοχικής προσθήκης δεοξυριβονουκλεοτιδίων.

Το μίγμα της αντίδρασης τοποθετείται σε θερμικό κυκλοποιητή ο οποίος έχει την ιδιότητα να αυξομειώνει για συγκεκριμένα χρονικά διαστήματα τη θερμοκρασία. Κάθε PCR τυπικά περιλαμβάνει 20-40 επαναλαμβανόμενες τέτοιες διακυμάνσεις, που ονομάζονται *κύκλοι*, με κάθε κύκλο να αποτελεί μία διαδικασία τριών σταδίων (**βλ. εικ. 6**).

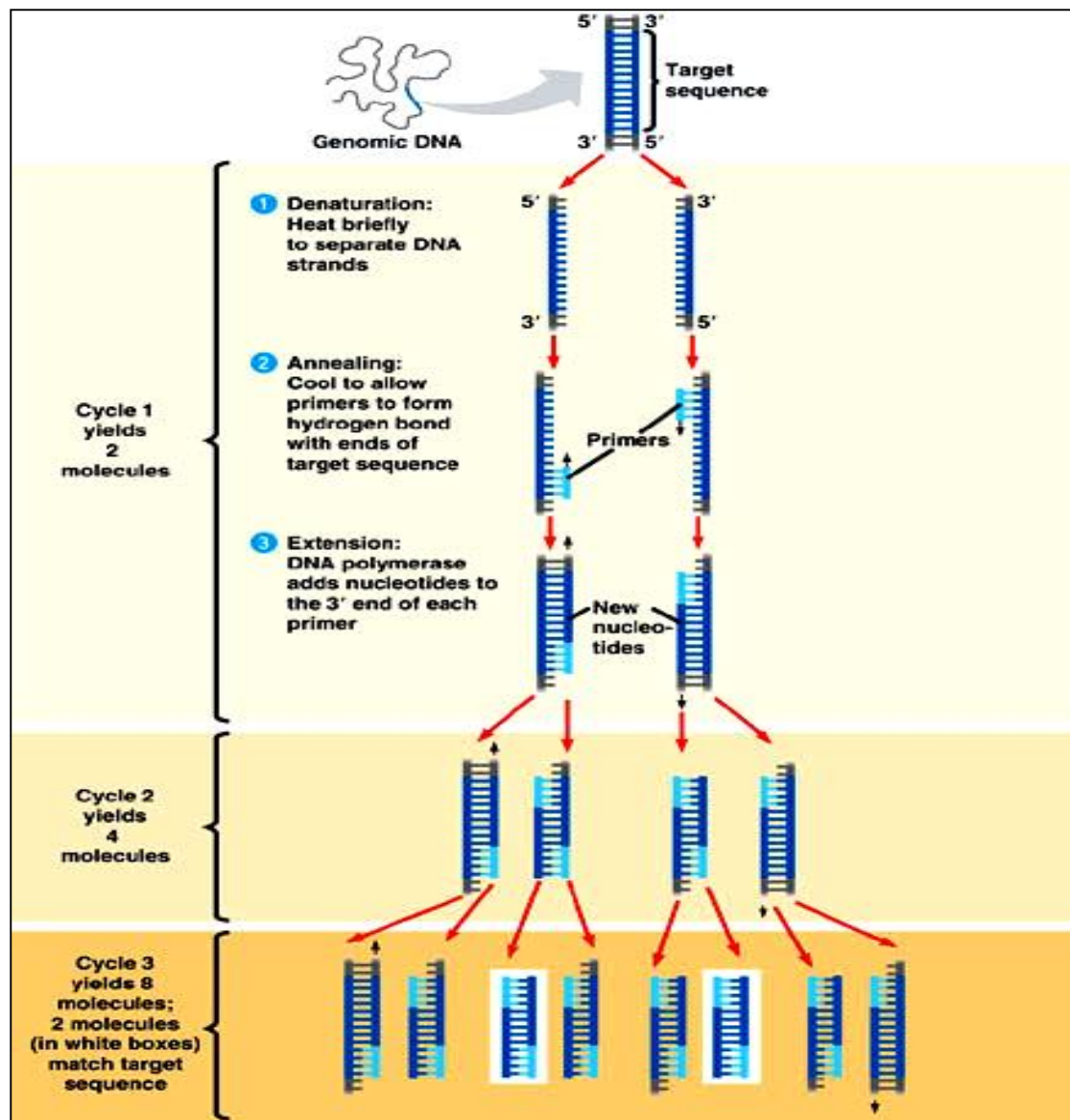
Στο **πρώτο στάδιο (denaturation)** το μίγμα της αντίδρασης υπόκειται σε θερμοκρασίες μεταξύ 92 και 96 °C, με αποτέλεσμα την αποδιάταξη της διπλής έλικας του DNA λόγω διάσπασης των δεσμών υδρογόνου που συγκρατούν τις συμπληρωματικές βάσεις, και τη δημιουργία μονόκλωνων αλυσίδων στις οποίες θα συνδεθούν οι εκκινητές.

Στο **δεύτερο στάδιο (annealing)** οι εκκινητές υβριδίζονται με τις συμπληρωματικές προς αυτούς αλληλουχίες. Η σύνδεση πραγματοποιείται σε θερμοκρασία μεταξύ 37 °C - 70 °C για 20'' - 60'', που ποικίλει ανάλογα με το μέγεθος του υπό μελέτη γονιδίου και τη σύσταση των εκκινητών. Συγκεκριμένα, είναι 5 °C μικρότερη από τη θερμοκρασία του σημείου τήξεως του ζεύγους των εκκινητών. Η θερμοκρασία τήξεως υπολογίζεται σύμφωνα με τον τύπο: $Tm = 4(G + C) + 2(A + T) ^\circ C$. Η ακρίβεια στο στάδιο αυτό είναι καθοριστική για την ειδικότητα της τελικής αντίδρασης.

Στο **τρίτο στάδιο (extension)** πραγματοποιείται επιμήκυνση των υβριδισμένων εκκινητών με προσθήκη νέων νουκλεοτιδίων με κατεύθυνση 5' → 3' στο μονόκλωνο DNA. Το στάδιο αυτό πραγματοποιείται σε θερμοκρασία 72 °C για 1m.

Στο τέλος του πρώτου κύκλου, το προϊόν επιμήκυνσης του κάθε εκκινητή αποτελεί εκμαγείο για τον άλλο εκκινητή στο δεύτερο κύκλο, που ξαναρχίζει με την αποδιάταξη του DNA και την επανάληψη των σταδίων 2 και 3 και έχει ως αποτέλεσμα το διπλασιασμό της ποσότητας του προεπιλεγμένου DNA. Τα τρία στάδια της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης μπορεί να επαναληφθούν αρκετές φορές ώστε να παραχθεί μεγάλη ποσότητα του επιθυμητού προϊόντος. Ο ιδανικός αριθμός κύκλων για μια επιτυχή αντίδραση PCR ποικίλλει ανάλογα με την ποσότητα του υποστρώματος και την απόδοση κάθε σταδίου. Συνήθως 25 έως 40 κύκλοι θεωρούνται αρκετοί. Το κύριο προϊόν της εκθετικής αυτής αντίδρασης είναι ένα δίκλωνο τμήμα DNA τα άκρα του οποίου ορίζονται από τα 5' άκρα των εκκινητών, ενώ το μήκος του είναι ίσο με την απόσταση μεταξύ των εκκινητών. Για παράδειγμα, 30 κύκλοι PCR δίνουν πολλαπλασιασμό της τάξης του εκατομμυρίου (20^{30}) αντιγράφων.

Στα πρώτα χρόνια από την ανακάλυψη της PCR υπήρχε το πρόβλημα ανανέωσης της DNA πολυμεράσης έπειτα από κάθε κύκλο, επειδή η λειτουργικότητά της επηρεαζόταν από τις αλλαγές της θερμοκρασίας. Η δυσκολία αυτή ξεπεράσθηκε το 1987 με την ανακάλυψη της θερμοευαίσθητης Taq πολυμεράσης, ενός ενζύμου που απομονώθηκε από το θερμοφιλό βακτήριο *Thermus aquaticus*, και χρησιμοποιείται έκτοτε.



Εικόνα 8. Τα τρία στάδια μιας αντίδρασης PCR. Διακρίνονται η αποδιάταξη (denaturation) των δύο κλώνων, η υβριδοποίηση (annealing) των εκκινητών και η προσθήκη (extension) νέων νουκλεοτιδίων. Στην εικόνα απεικονίζονται τρεις διαδοχικοί κύκλοι της αντίδρασης. (Από Richard Lawley, A REVOLUTION IN THE MICROBIOLOGY LABORATORY).

Η πιστότητα κάθε DNA πολυμεράσης, δηλαδή η σύνθεση DNA απόλυτα συμπληρωματικού προς το υπό μελέτη DNA, ποικίλλει ανάλογα με την αλληλουχία του DNA και τις συνθήκες. Έχει υπολογισθεί ότι η συχνότητα λάθους (αριθμός μεταλλαγών/νουκλεοτίδιο/κύκλος) για την Taq πολυμεράση κυμαίνεται μεταξύ 2×10^{-4} και 1×10^{-5} . Αυτό το ποσοστό λάθους είναι σχετικά αμελητέο και δεν επηρεάζει καθόλου τις βιοχημικές αναλύσεις (υβριδισμός νουκλεϊνικών οξέων, μελέτη της αλληλουχίας του DNA), εφόσον χρησιμοποιείται ολόκληρο το προϊόν DNA που προκύπτει από την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης.

Γενικά, η πιστότητα της Taq DNA πολυμεράσης εξαρτάται από τις παρακάτω *in vitro* παραμέτρους :

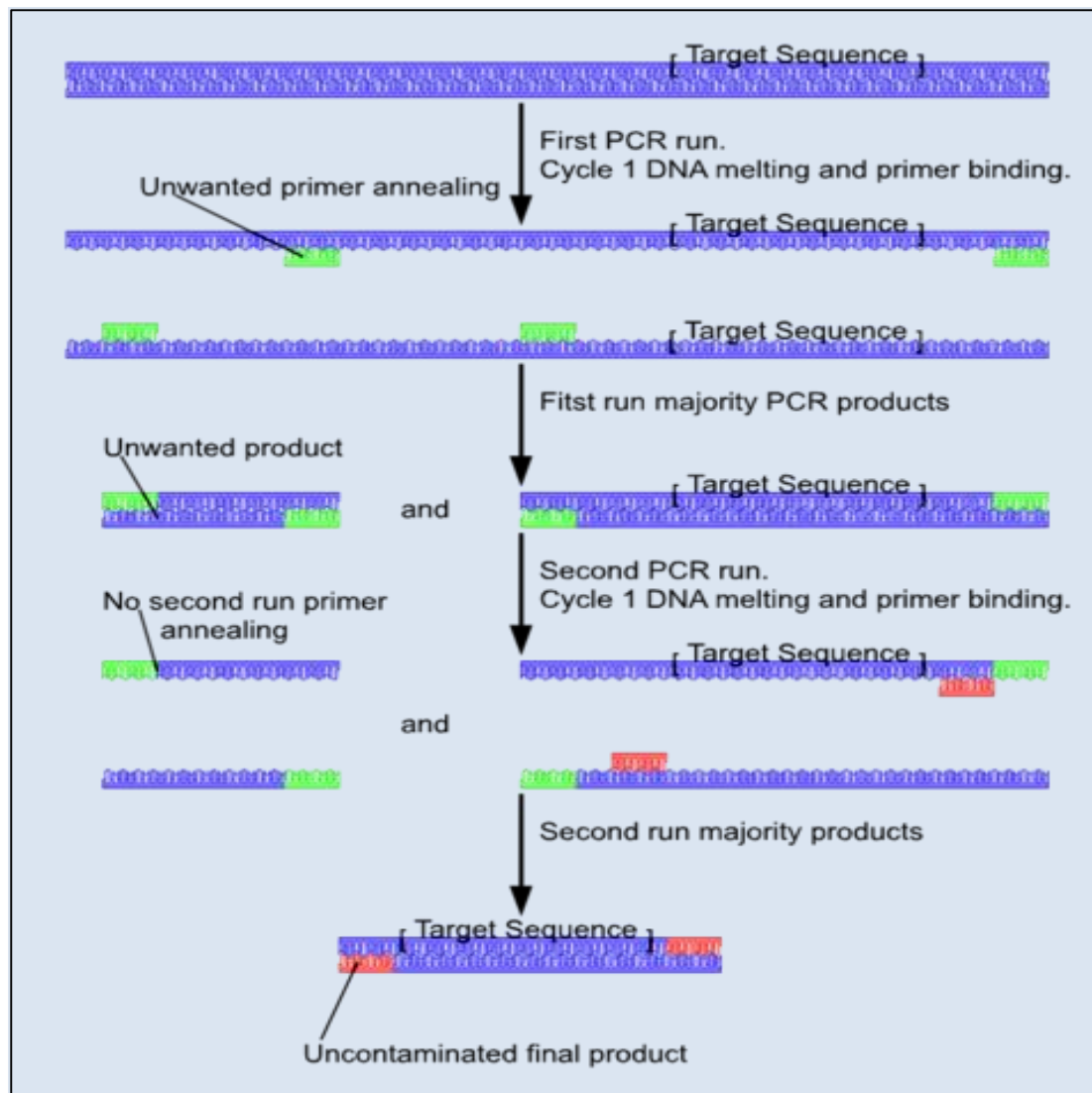
- *pH και συγκέντρωση ελεύθερων νουκλεοτιδίων (dNTPs)*. Έχει παρατηρηθεί ότι η πιστότητα της Taq DNA πολυμεράσης μειώνεται όταν αυξάνεται το pH και η συγκέντρωση των ελεύθερων νουκλεοτιδίων (dNTPs) ή όταν τα τέσσερα νουκλεοτίδια δεν έχουν ισομοριακή συγκέντρωση στο σωληνάριο της αντίδρασης.
- *Συγκέντρωση ιόντων μαγνησίου*. Ισομοριακή συγκέντρωση των ιόντων Mg^{2+} προς τα dNTPs, καθώς και διατήρηση του μαγνησίου σε χαμηλά επίπεδα αυξάνει την ειδικότητα.
- *Χρόνος και θερμοκρασία στα στάδια σύνδεσης εκκινητή και επιμήκυνσής του*. Αύξηση της θερμοκρασίας και μείωση του χρόνου αυξάνει την πιστότητα της PCR.
- *Αριθμός κύκλων*. Η ειδικότητα της Taq πολυμεράσης αυξάνεται αντιστρόφως ανάλογα με τον αριθμό των κύκλων της αντίδρασης.

Η ειδικότητα μιας αντίδρασης PCR μπορεί να αυξηθεί με την τεχνική της φωλιασμένης PCR (*nested PCR*) (**βλ.εικ.7**).

Η μέθοδος βασίζεται σε δύο διαδοχικές αντιδράσεις: Η πρώτη χρησιμοποιεί ένα εξωτερικό ζευγάρι εκκινητών (*outer primers*), ενώ η δεύτερη δύο εκκινητές που είναι εσωτερικοί στο πρώτο ζευγάρι (*inner primers*). Το προϊόν της πρώτης αντίδρασης PCR χρησιμοποιείται ως εκμαγείο για τη δεύτερη που παράγει προϊόν μικρότερου μήκους από την πρώτη αντίδραση. Η αύξηση της ειδικότητας της φωλιασμένης PCR στηρίζεται στη χρήση δύο ζευγών εκκινητών, ενώ η μεγαλύτερη ευαισθησία προκύπτει από τον αυξημένο αριθμό κύκλων σε σχέση με τη συμβατική PCR. Η ανάλυση του προϊόντος PCR μπορεί να γίνει

- Με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης ή ακρυλαμίδης
- Με επώαση του προϊόντος της PCR με περιοστική ενδονουκλεάση
- Με σήμανση του προϊόντος της PCR
- Με μεταφορά του προϊόντος σε νάιλον μεμβράνη και υβριδισμό με κατάλληλα αλληλόμορφα νουκλεοτίδια ανιχνευτές

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε η τεχνική της ηλεκτροφόρησης σε πηκτή αγαρόζης, οι βασικές αρχές της οποίας θα αναφερθούν στη συνέχεια.



Εικόνα 9. Η τεχνική της φωλιασμένης PCR (nested). Φαίνεται η διαδοχή δύο διαφορετικών αντιδράσεων, η δεύτερη από τις οποίες χρησιμοποιεί ως αρχικό υλικό μικροποσότητα από τον πρώτο γύρο αντιδράσεων. (Από Richard Wheeler).

2.2 Αντίστροφη μεταγραφή – Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Reverse Transcription PCR, RT-PCR).

Πρόκειται για παραλλαγή της κλασσικής PCR χρησιμοποιούμενη στη μοριακή βιολογία για την ποσοτική και ποιοτική ανίχνευση της mRNA έκφρασης. Η βασική αρχή της μεθόδου στηρίζεται στη δράση του ενζύμου αντίστροφη μεταγραφάση (*reverse transcriptase*), μίας RNA-εξαρτώμενης DNA πολυμεράσης προερχόμενης από ρετροϊούς, απαραίτητης για τη μετατροπή του RNA σε συμπληρωματικό DNA (*complementary DNA*, *copy DNA*, *cDNA*) που περιέχει μόνο τις κωδικοποιητικές αλληλουχίες των αντίστοιχων γονιδίων, χωρίς τα ιντρόνια.

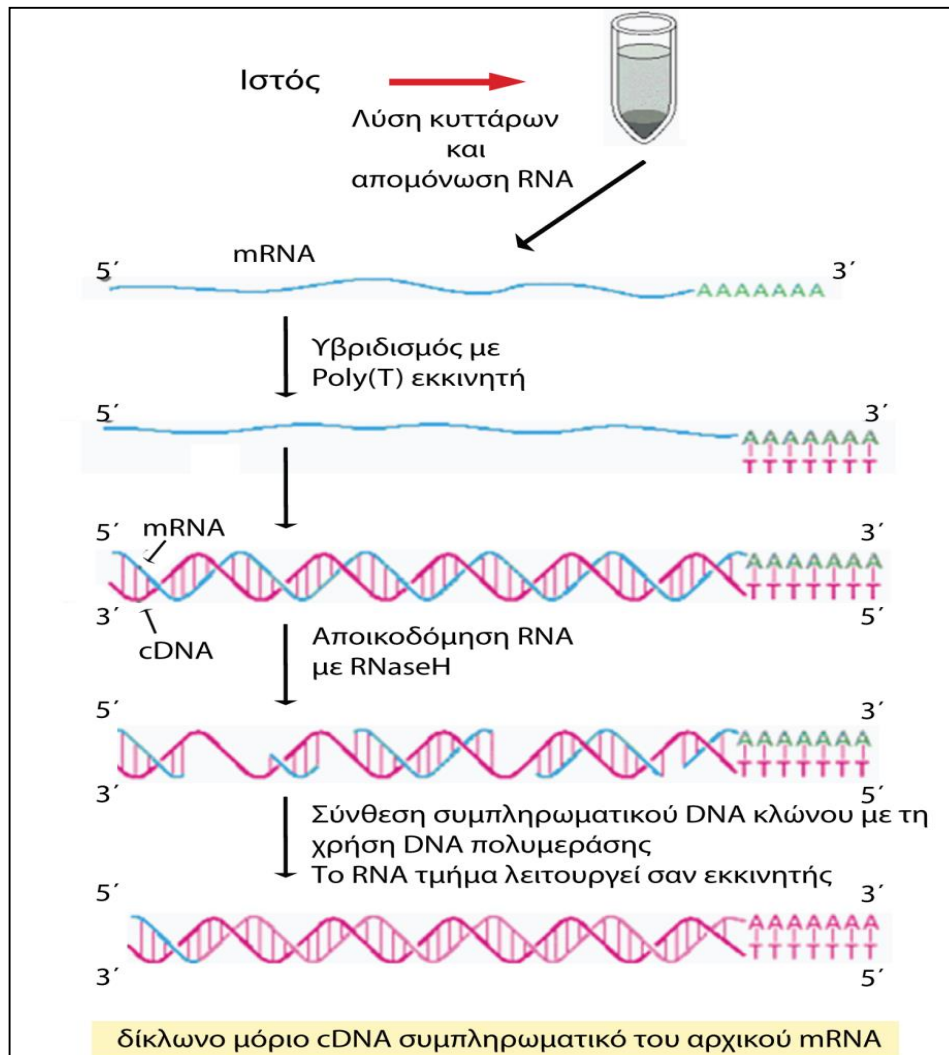
Για να δράσει η αντίστροφη μεταγραφάση είναι απαραίτητη η προσθήκη είτε πολυ-Τ νουκλεοτιδίων που θα υβριδιστούν με την πολυ-Α ουρά του RNA που έχει απομονωθεί είτε τυχαία εξαμερή των τεσσάρων νουκλεοτιδίων που επίσης θα λειτουργήσουν ως εκκινητές. Σχηματίζεται έτσι ένα δίκλωνο μόριο του οποίου ο ένας κλώνος αποτελείται από την αρχική ακολουθία ριβονουκλεοτιδίων και ο άλλος από τα συμπληρωματικά τους δεοξυνουκλεοτίδια. Ακολούθως, η προσθήκη RNAάσης Η αποδομεί τμήμα της RNA αλύσου, με το εναπομείνον RNA να λειτουργεί ως εκκινητής για το σχηματισμό τελικά δίκλωνου *cDNA*, αφού προστεθεί στο μίγμα της αντίδρασης μια DNA πολυμεράση. Αυτό το δίκλωνο *cDNA* χρησιμοποιείται στη συνέχεια ως εκμαγείο για εκθετική ενίσχυση μέσω μιας κλασσικής αντίδρασης PCR (**εικόνα 8**). Οι δύο διαδικασίες της σύνθεσης του *cDNA* και της εκθετικής του ενίσχυσης μπορούν να πραγματοποιηθούν στο ίδιο ή σε ξεχωριστά σωληνάρια, οπότε μιλάμε για RT-PCR ενός ή δύο σταδίων.

Μία από τις σημαντικότερες εφαρμογές της μεθόδου είναι η ανίχνευση χιμαιρικών μεταγράφων που προκύπτουν από αντιμεταθέσεις χρωμοσωμικών τμημάτων στο γενετικό υλικό, όπως επίσης η ανίχνευση της ελάχιστης υπολειματικής νόσου, πολύτιμη για τη σωστή και έγκαιρη θεραπεία των ασθενών με καρκίνο.

2.3 Ανάδειξη των προϊόντων της PCR με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης.

Η ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης είναι η τεχνική με την οποία καθορίζεται το μοριακό μέγεθος των προϊόντων της αντίδρασης. Ως ηλεκτροφόρηση καλείται η κίνηση οποιουδήποτε φορτισμένου σωματιδίου εντός ηλεκτρικού πεδίου, μετά την εφαρμογή διαφοράς δυναμικού. Σε αυτά τα πλαίσια, η αγαρόζη, ένας γραμμικός πολυσακχαρίτης ουδέτερου φορτίου, ο οποίος όταν μετατρέπεται σε πηκτή δημιουργεί ένα πλέγμα με σχετικά μεγάλους πόρους, παρέχει το υπόστρωμα για τη διαλογή τμημάτων DNA ποικίλου μεγέθους, μέσω μιας διαδικασίας «κοσκινίσματος» (*sieving*). Συγκεκριμένα, μόρια μικρότερου μεγέθους κινούνται γρηγορότερα, και ως εκ τούτου καλύπτουν μεγαλύτερη απόσταση εντός της πηκτής, ακριβώς επειδή διέρχονται πιο εύκολα διαμέσου των πόρων της αγαρόζης σε σχέση με τα μεγαλύτερα, τα οποία και συγκρατούνται.

Επομένως, η ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης χρησιμοποιείται για τον διαχωρισμό, την αναγνώριση και τον καθορισμό των τμημάτων του DNA με βάση το μέγεθος τους. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιείται ειδική συσκευή οριζόντιας ηλεκτροφόρησης όπου σε τράπεζα περιέχουσα ρυθμιστικό διάλυμα τοποθετείται η πηκτή, και κατόπιν εφαρμόζεται ηλεκτρικό πεδίο σταθερής τάσης και κατεύθυνσης.



Εικόνα 10. Σχηματική αναπαράσταση της αντίστροφης μεταγραφής. Η τεχνική αυτή βασίζεται στην ιδιότητα του ενζύμου αντίστροφη μεταγραφάση να συνθέτει DNA χρησιμοποιώντας ως εκμαγείο RNA. Αφού απομονωθεί το RNA από τον ιστό, τυχαία εξαμερή των τεσσάρων τριφωσφο-δεοξυριβονουκλεοτιδίων υβριδίζονται στο RNA κατευθύνοντας το ένζυμο για τη σύνθεση του νέου κλώνου.

Η ηλεκτοφορητική κινητικότητα του DNA στην πηκτή αгарόζης εξαρτάται από τους ακόλουθους παράγοντες

1. Μοριακό μέγεθος DNA. Η ταχύτητα μετακίνησης είναι αντιστρόφως ανάλογη του μεγέθους των κλασμάτων DNA
2. Συγκέντρωση της πηκτής αгарόζης. Η ταχύτητα μετακίνησης είναι αντιστρόφως ανάλογη της πυκνότητας της πηκτής.
3. Στερεοδιάταξη του DNA Η κλειστή κυκλική μορφή, η ανοιχτή κυκλική μορφή και το γραμμικό DNA του ίδιου μοριακού βάρους έχουν διαφορετική κινητικότητα σε πηκτή αгарόζης που κατά βάση εξαρτάται από το βαθμό υπερελίκωσης της κλειστής κυκλικής μορφής του DNA.
4. Τάση του ηλεκτρικού πεδίου. Η ταχύτητα με την οποία κινείται το DNA στο πήκτωμα κατά την ηλεκτροφόρηση είναι ανάλογη με την τάση που εφαρμόζεται και

επομένως ανάλογη με την ένταση του ηλεκτρικού ρεύματος, που διαπερνά το πήκτωμα. Η αύξηση της τάσης έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της ηλεκτροφορητικής κινητικότητας του κάθε τμήματος DNA με διαφορετικό συντελεστή, ο οποίος εξαρτάται από το μοριακό βάρος του τμήματος DNA (**βλ. πίνακα 7**). Για τον λόγο αυτό καθώς αυξάνεται η τάση μειώνεται η αξιοπιστία και η διαχωριστική ικανότητα των πηκτωμάτων αгарόζης.

Περιεκτικότητα αгарόζης (%w/v)	Απόδοση εύρους διαχωρισμού γραμμικών μορίων DNA (kb)
0.3	5-60
0.6	1-20
0.7	0.8-10
0.9	0.5-7
1.2	0.4-6
1.5	0.2-3
2	0.1-2

Πίνακας 7: Εύρος διαχωρισμού τμημάτων DNA σε πηκτώματα που περιέχουν διαφορετική συγκέντρωση αгарόζης [Lumpkin, 1989].

Μετά το διαχωρισμό τους, η ανάδειξη των κλασμάτων DNA γίνεται με χρώση της πηκτής με βρωμιούχο αιθίδιο (*ethidium bromide*), μιας αρωματικής ένωσης που εκτός του ότι παρεμβάλλεται στη διπλή έλικα, έχει και ικανότητα φθορισμού στην περιοχή του υπεριώδους. Με αυτόν τον τρόπο, έκθεση της πηκτής σε ειδικούς λαμπτήρες UV θα αποκαλείνει τελικά την παρουσία των κλωνοποιημένων τμημάτων DNA που στη συνέχεια διαχωρίστηκαν βάσει μεγέθους.

2.4 Amplification Refractory Mutation System-PCR (ARMS-PCR).

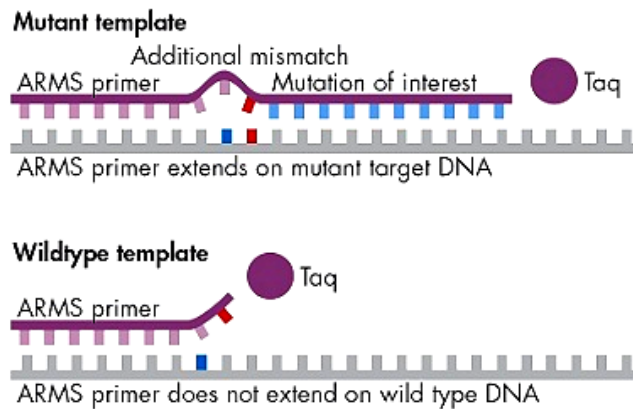
Το 1989, ορισμένες ερευνητικές ομάδες περιέγραψαν μια εφαρμογή της PCR για την ανάλυση γνωστών σημειακών μεταλλάξεων στο DNA και για την διάκριση μεταξύ φυσιολογικών, ετερόζυγων και ομόζυγων μεταλλαγμένων γονότυπων. Η μέθοδος αυτή

συνήθως αναφέρεται ως ARMS (Amplification Refractory Mutation System – Σύστημα ανίχνευσης μεταλλάξεων ανθεκτικών στην ενίσχυση).

Η ARMS-PCR βασίζεται στη διαπίστωση ότι η ενίσχυση DNA με PCR έχει μικρή απόδοση ή και αποτυγχάνει πλήρως εάν υπάρχει ασυμφωνία ζευγαρώματος ανάμεσα στο 3'-τελικό νουκλεοτίδιο του εκκινητή και της αντίστοιχης μήτρας. Ακριβώς επειδή η Taq πολυμεράση δεν έχει δράση 3'>5' εξωνουκλεάσης, δε μπορεί να επιδιορθώσει τυχόν ασυμφωνίες στο 3' άκρο του εκκινητή. Ως αποτέλεσμα, ο βαθμός συμπληρωματικότητας είναι καθοριστικός παράγοντας απόδοσης της αντίδρασης. Έτσι, η επιλογή ενός εκκινητή που είναι συμπληρωματικός με το φυσιολογικό αλληλόμορφο και εμφανίζει μια ασυμφωνία βάσεως στο 3' άκρο του με το μεταλλαγμένο, θα οδηγήσει σε επιλεκτική ενίσχυση του πρώτου. Κατά αντίστοιχο τρόπο, το μεταλλαγμένο αλληλόμορφο θα ενισχυθεί εάν το 3' άκρο του εκκινητή είναι συμπληρωματικό με το ίδιο και όχι με το φυσιολογικό. Η εισαγωγή μίας επιπλέον θέσης ασυμφωνίας κοντά στο 3' άκρο του εκκινητή μπορεί να ενισχύσει περαιτέρω την ειδικότητά του, δηλαδή την ικανότητα διάκρισης ανάμεσα σε φυσιολογικό και μεταλλαγμένο αλληλόμορφο. Οι εκκινητές σχεδιάζονται έτσι ώστε να ενισχύουν επιλεκτικά το μεταλλαγμένο αλληλόμορφο, ενώ δε θα δεσμεύονται στο φυσιολογικό, το οποίο θα ανθίσταται έτσι στην ενίσχυση (**βλ. εικ.11**). Για τον λόγο αυτό αξίζει να σημειωθεί ότι κατά τη διεξαγωγή της αντίδρασης ARMS, είναι απαραίτητο να πραγματοποιείται παράλληλα μια αντίδραση ελέγχου προκειμένου να επιβεβαιώνεται ότι η έλλειψη προϊόντος από το δεδομένο δείγμα οφείλεται στην απουσία της μετάλλαξης και όχι από την αποτυχία διεξαγωγής της PCR αντίδρασης.

Για την ανίχνευση πολυμορφισμών ή σημειακών μεταλλάξεων, όπου πρέπει να γίνει διάκριση ετερόζυγων από ομόζυγα άτομα (όπως στην περίπτωση της μετάλλαξης *JAK2V617F*), εφαρμόζεται η ARMS τετραπλών εκκινητών (*tetra primer ARMS*). Η μέθοδος χρησιμοποιεί δύο ζεύγη εκκινητών, δύο εξωτερικούς (*outer*), για την ενίσχυση της ζώνης θετικού ελέγχου, και δύο εσωτερικούς (*inner*). Οι τελευταίοι διαφέρουν μόνο κατά μια βάση στο 3' άκρο, για να ενισχυθούν ειδικά οι φυσιολογικές και οι μεταλλαγμένες αλληλουχίες, (**βλ.εικ.12**). Η τοποθέτηση των εξωτερικών εκκινητών σε διαφορετική απόσταση από το προς εξέταση νουκλεοτίδιο επιτρέπει την εύκολη διάκριση των παραγόμενων αμπλικονίων, καθότι διαφέρουν σε μέγεθος.

Η πιστότητα της ARMS-PCR εξαρτάται από τη συγκέντρωση των αλάτων χλωριούχου μαγνησίου (MgCl₂), και από τις συγκεντρώσεις των εκκινητών που θα πρέπει να ρυθμιστούν ώστε καθένα από τα αλληλόμορφα να ενισχύεται σε συγκεκριμένο βαθμό. Η ειδικότητα της ανάλυσης ARMS θα πρέπει στη συνέχεια να αξιολογηθεί με χρήση δειγμάτων από φυσιολογικούς μάρτυρες και από γνωστούς φορείς της μετάλλαξης.



Εικόνα 11. Βασική αρχή της μεθόδου ARMS. Η χρήση εκκινητή συμπληρωματικού ως προς το μεταλλαγμένο αλληλόμορφο έχει ως αποτέλεσμα την επιλεκτική ενίσχυσή του από την πολυμεράση, ενώ το φυσιολογικό δεν πολλαπλασιάζεται. (Από Long, You, L.Wang και Y. Wang).

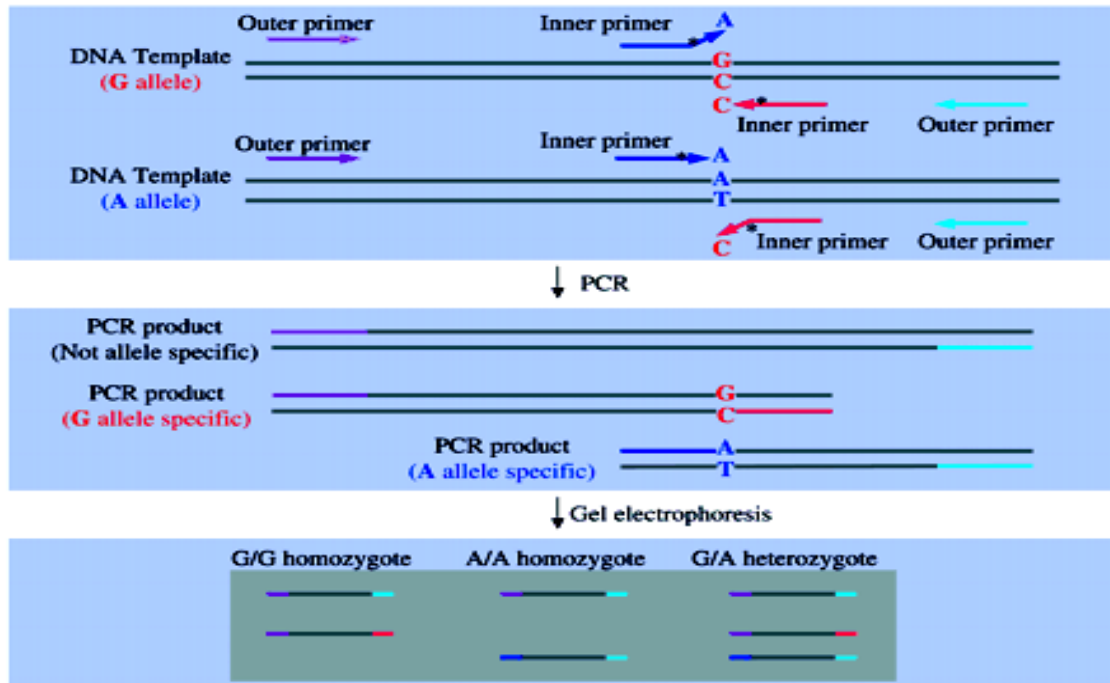
2.4 AS PCR (Allele Specific PCR).

Πρόκειται για παραλλαγή της ARMS βασιζόμενη στο σχεδιασμό εκκινητών των οποίων το 3' άκρο, είναι πλήρως συμπληρωματικό με το ένα αλληλίο (*specific allele*), φέρει όμως δυσαρμονία ενός νουκλεοτιδίου σε σχέση με το άλλο αλληλίο (*non-specific allele*) (βλ. *εικ.13*). Σε συνθήκες στις οποίες και τα δύο ολιγονουκλεοτίδια χρησιμοποιούνται στην ίδια αντίδραση σύνθεσης DNA, τότε αυτά θα ανταγωνίζονται για τη δέσμευση στην αλληλουχία στόχο της μήτρας. Κατά τον ανταγωνισμό αυτό, η δέσμευση του εκκινητή πλήρους συμφωνίας ευνοείται ισχυρά σε σύγκριση με τον εκκινητή που παρουσιάζει ασυμφωνία σε μία βάση. Χρησιμοποιείται επίσης ένας κοινός αντίστροφος (*reverse*) εκκινητής, που θα πρέπει να προέρχεται από την αλληλουχία του αντίθετου κλώνου από εκείνον του ζεύγους των ανταγωνιστικών εκκινητών. Για την καλύτερη διάκριση μεταξύ των δύο αλληλίων εισάγεται συχνά μια δεύτερη θέση μη συμπληρωματικότητας στο 3' άκρο των εκκινητών.

Τα προϊόντα της αντίδρασης χωρίζονται σε τρεις κατηγορίες, ανάλογα με το γονότυπο του DNA της μήτρας και με βάση το είδος του ανταγωνιστικού εκκινητή που έχει ενσωματωθεί στο ενισχυμένο DNA.

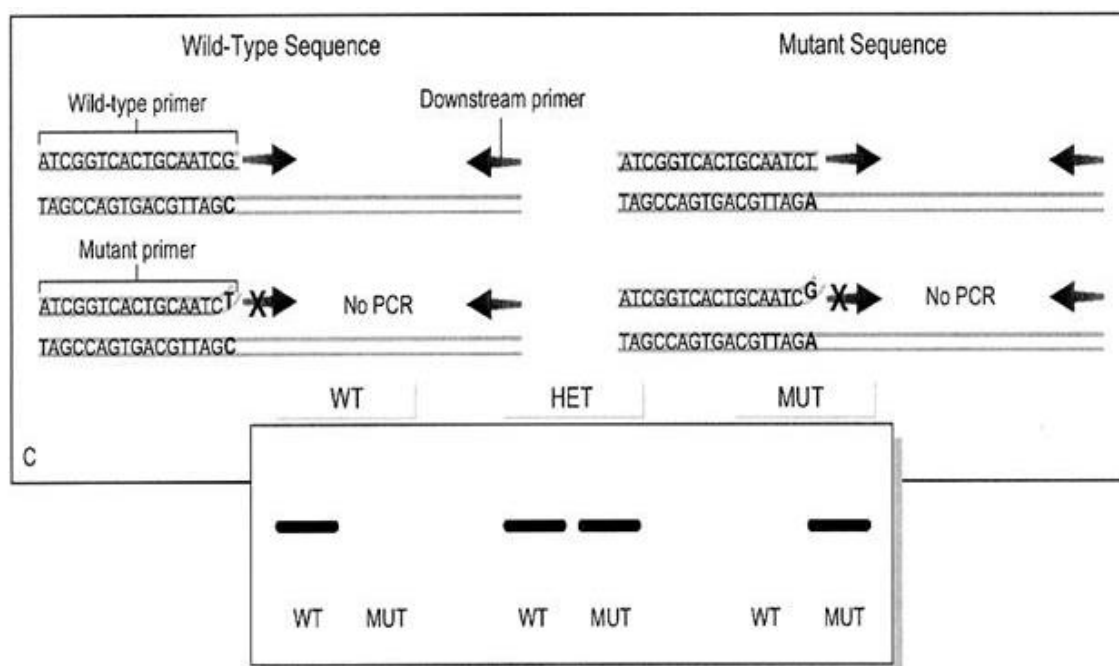
- Ενισχυμένο DNA που περιέχει μόνο (ή κυρίως) κανονικό εκκινητή (wt): υποδηλώνει ότι έχει χρησιμοποιηθεί ομόζυγη αγρίου τύπου μήτρα για τη μετάλλαξη υπό μελέτη.
- Ενισχυμένο DNA που περιέχει μόνο (ή κυρίως) μεταλλαγμένο εκκινητή (mt): υποδηλώνει ότι έχει χρησιμοποιηθεί μήτρα DNA ομόζυγη για τη μετάλλαξη υπό μελέτη.

- Ενισχυμένο DNA που περιέχει εκκινητές (m) και (wt) σε σχεδόν ίσες ποσότητες: υποδηλώνει ότι έχει χρησιμοποιηθεί μήτρα DNA ετερόζυγη για τη μετάλλαξη υπό μελέτη.



Εικόνα 12. Σχηματική αναπαράσταση της ARMS-PCR με τη χρήση διπλού ζεύγους εκκινητών. Έχει χρησιμοποιηθεί ως παράδειγμα η αντικατάσταση γουανίνης (G) από αδενίνη (A). Πραγματοποιείται αμφίδρομη ενίσχυση, με το κανονικό αλληλόμορφο να ενισχύεται χρησιμοποιώντας των έναν κλώνο ως μήτρα και το μεταλλαγμένο αλληλόμορφο να ενισχύεται με βάση το συμπληρωματικό κλώνο. Οι δύο εσωτερικοί εκκινητές (σημειώνονται με μπλε και κόκκινο χρώμα) αναγνωρίζουν το μεταλλαγμένο και το φυσιολογικό αλληλόμορφο αντίστοιχα. Το σύστημα διαθέτει ενσωματωμένο έλεγχο θετικής αντίδρασης, ο οποίος συνίσταται στην ενίσχυση της αλληλουχίας μεταξύ των εξωτερικών εκκινητών του κανονικού και του μεταλλαγμένου αμπλικονίου. (Από Shu Ye, An efficient procedure for genotyping single nucleotide polymorphisms, *Nucleic Acids Res.* 2001 September 1; 29(17): e88).

Είναι φανερό ότι εάν πιστοποιηθεί η ταυτότητα του ενσωματωμένου ανταγωνιστικού εκκινητή στο προϊόν της αντίστοιχης PCR, μπορούμε να γνωρίζουμε με βεβαιότητα τη σύσταση της μήτρας DNA στο σημείο της υπό μελέτη μετάλλαξης. Για το σκοπό αυτό είναι απαραίτητη η διαφορετική σήμανση των δύο εκκινητών, αφού το μέγεθος των παραγόμενων αμπλικονίων είναι πανομοιότυπο και στις τρεις περιπτώσεις. Μία από αυτές αφορά στην προσθήκη μιας «ουράς» διαφορετικού μεγέθους στο 5' άκρο κάθε εκκινητή, έτσι ώστε να είναι ικανή η διάκρισή τους αφενός λόγω μεγέθους, αφετέρου λόγω μεταβολής της T_m .



Εικόνα 13. Βασική αρχή της μεθόδου AS-PCR. Φαίνεται η χρήση τριών εκκινητών, ενός ειδικού για την προς ανίχνευση μετάλλαξη, ενός συμπληρωματικού με την αγρίου τύπου ακολουθία και ενός ανάστροφου, κοινού και για τα δύο αλληλόμορφα.

2.5 Ανάλυση πρωτοδιάταξης γονιδιώματος (DNA SEQUENCING).

Με τον όρο αλληλούχιση του DNA (*DNA sequencing*) εννοούμε τον προσδιορισμό της αλληλουχίας των νουκλεοτιδικών βάσεων (αδείνη, θυμίνη, γουανίνη και κυτοσίνη) ενός μορίου DNA.

Αν και η δομή του DNA με τη μορφή διπλής έλικας ήταν ήδη γνωστή από το 1953, χρειάστηκε να περάσουν αρκετά χρόνια πριν από την αξιόπιστη ανάλυση τμημάτων της νουκλεοτιδικής του αλληλουχίας. Οι πρώτες προσπάθειες για τον προσδιορισμό της πρωτοδιάταξης των νουκλεϊνικών οξέων πραγματοποιήθηκαν περί τις αρχές της δεκαετίας του 1970, με τις αρχικές τεχνικές να είναι περισσότερο εφαρμόσιμες σε κλάσματα RNA παρά DNA. Σημαντικό βήμα στο στάδιο αυτό αποτέλεσε ο πλήρης προσδιορισμός της ριβονουκλεοτιδικής αλληλουχίας του γονιδιώματος του βακτηριοφάγου MS2, από τον *Walter Fiers* και τους συνεργάτες του, στο βελγικό πανεπιστήμιο *Ghent*, μεταξύ 1972 και 1976.

Για τον προσδιορισμό της πρωτοδιάταξης μορίων DNA, το κύριο πρόβλημα ήταν το μεγάλο μέγεθος και η δυσκολία απομόνωσης ενός καθαρού κλάσματος DNA. Η λύση δόθηκε μέσω της κλωνοποίησης και της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης. Με την κλωνοποίηση ήταν εφικτή η απόκτηση καθαρών τμημάτων χρωμοσωμικού DNA, οπότε ξεκίνησε η ανάπτυξη αποτελεσματικών τεχνικών προσδιορισμού της αλληλουχίας του, που επέτρεψαν την ευρεία εφαρμογή της μεθόδου, ιδιαίτερα κατά την ανίχνευση μεταλλάξεων ή πολυμορφισμών.

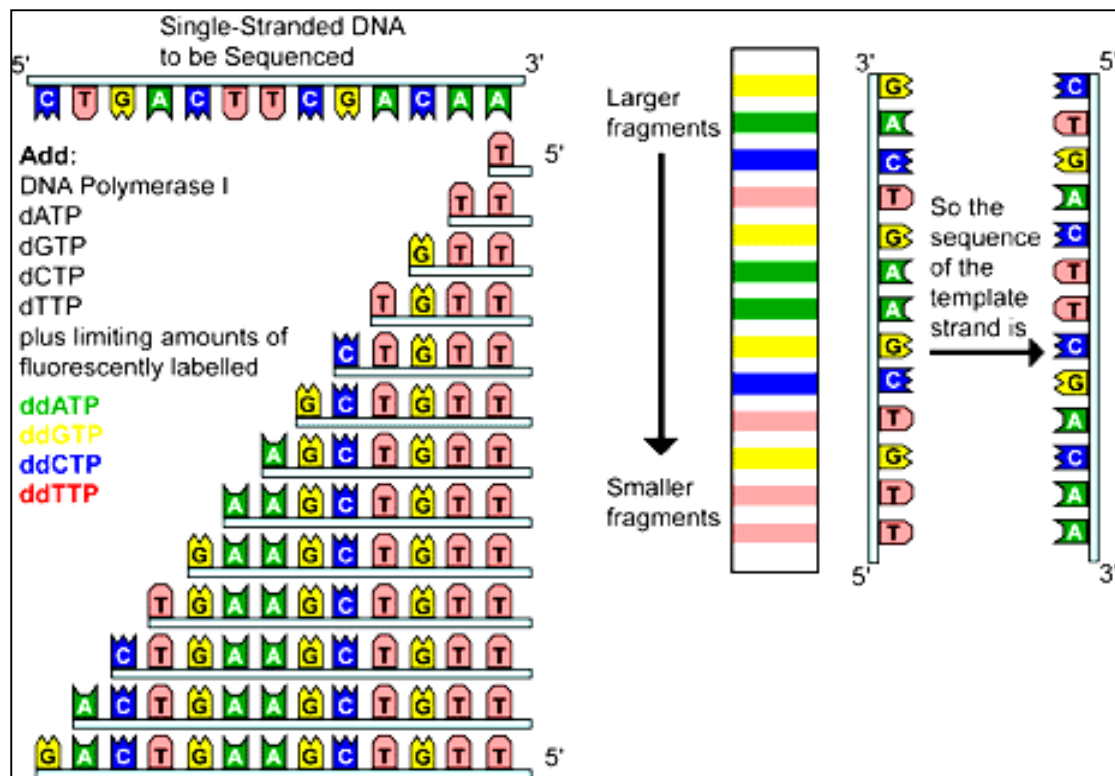
Οι δύο βασικότερες μέθοδοι είναι εκείνη της χημικής διάσπασης σε συγκεκριμένες βάσεις (*chemical sequencing*), που αναπτύχθηκε από τους A. Maxam και W. Gilbert το 1977, και η μέθοδος ελεγχόμενου τερματισμού της αντιγραφής με τη χρήση διδεοξυνουκλεοτιδικών αναλόγων (*chain-termination method*), που αναπτύχθηκε την ίδια χρονιά από τον F. Sanger, και η οποία είναι η πιο διαδεδομένη.

Η μέθοδος χημικής διάσπασης (μέθοδος Maxam-Gilbert) βασίζεται στην πέψη του μορίου DNA με τέσσερις ενδονουκλεάσες που αναγνωρίζουν ειδικά και συγκεκριμένα τις βάσεις: G, A+G, C και C+T. Αρχικά, το μόριο-στόχος ραδιοσημαίνεται στα άκρα του και η διαδικασία ξεκινάει με τέσσερα δείγματα DNA, καθένα από τα οποία υφίσταται τη δράση ενός εκ των τεσσάρων ενζύμων περιορισμού. Μετά την πέψη, τα αντίστοιχα δείγματα περιλαμβάνουν πλήθος θραυσμάτων που όλα έχουν στο ένα άκρο τους G για το πρώτο δείγμα, C για το δεύτερο, κ.ο.κ. Τα θραύσματα αυτά διαχωρίζονται ηλεκτροφορητικά και εμφανίζονται ως ζώνες με τη μέθοδο της αυτοραδιογραφίας.

Στη μέθοδο Sanger, που είναι και η πιο διαδεδομένη, σημείο κλειδί είναι η χρήση τριφωσφορικών διδεοξυνουκλεοτιδίων (ddNTPs), ως συστατικών τερματισμού της DNA αλυσίδας. Το δείγμα DNA χωρίζεται σε τέσσερις διαφορετικές αντιδράσεις που πραγματοποιούνται *in vitro*. Σε κάθε αντίδραση προστίθεται μόνο ένα από τα τέσσερα ddNTPs. Αυτά τα διδεοξυνουκλετίδια ευθύνονται για τον τερματισμό της αντίδρασης αφού έχουν έλλειψη της 3'-OH ομάδας, που απαιτείται για το σχηματισμό του φωσφορικού δεσμού μεταξύ δύο νουκλεοτιδίων κατά την επιμήκυνση της αλυσίδας του DNA. Ο τερματισμός αυτός έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή ενός πλήθους τμημάτων DNA που διαφέρουν μεταξύ τους σε μήκος κατά ένα μόνο νουκλεοτίδιο. Τα τμήματα μπορούν στη συνέχεια να διαχωριστούν με βάση το μήκος τους σε πηκτή ακρυλαμίδης, οπότε η ανάγνωσή τους επιτρέπει την αλληλούχιση του DNA-στόχου βάση προς βάση (βλ. εικ. 14).

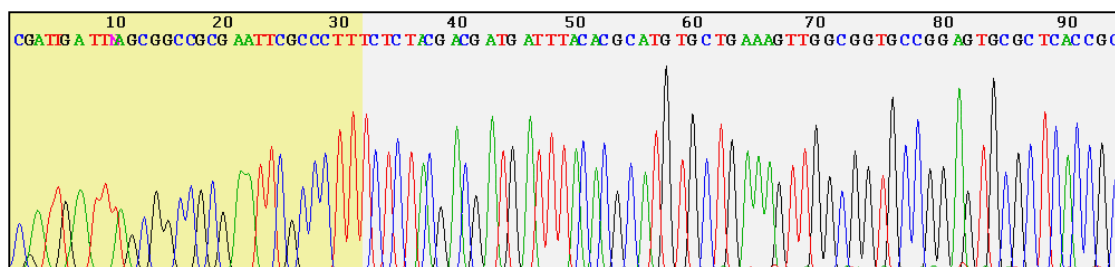
2.5.1 Αυτοματοποίηση του προσδιορισμού της πρωτοδιάταξης του DNA.

Σταθμός στην τεχνολογία ανάλυσης του DNA ήταν η ανάπτυξη, στις αρχές της δεκαετίας του 1990, αυτόματων αναλυτών αλληλουχίας, δηλαδή οργάνων που επιτρέπουν την αυτοματοποίηση της όλης διαδικασίας, και συγκεκριμένα (i) της ηλεκτροφόρησης, (ii) της ανίχνευσης του σήματος και (iii) της ανάλυσης του DNA. Η βασική αρχή της συγκεκριμένης τεχνολογίας στηρίζεται στη μέθοδο Sanger, με μόνη διαφορά την επισήμανση των νουκλεοτιδίων ή των εκκινητών με φθορίζοντα μόρια αντί για ραδιενεργά ισότοπα. Η χρήση φθορίζουσών χρωστικών στη θέση των ραδιενεργών παρουσιάζει σημαντικά πλεονεκτήματα, όπως μεγαλύτερη ασφάλεια, κατάργηση των ραδιενεργών αποβλήτων, παραγωγή δεδομένων που μπορούν να γίνουν αντικείμενο επεξεργασίας απευθείας στον υπολογιστή και μεγαλύτερη σταθερότητα



Εικόνα 14. Αρχή της ανάλυσης πρωτοδιάταξης γονιδιώματος με τη μέθοδο Sanger. Το DNA προς ανάλυση, υπό μορφή μονής αλυσίδας, επωάζεται με το μίγμα της αντίδρασης που περιέχει την πολυμεράση, τα τέσσερα δεοξυνουκλεοτίδια και περιορισμένη ποσότητα των τεσσάρων διδεοξυνουκλεοτιδίων, καθένα από τα οποία έχει σημειωθεί με διαφορετική φθορίζουσα χρωστική. Επειδή και τα τέσσερα δεοξυνουκλεοτίδια είναι παρόντα, η επιμήκυνση της αλυσίδας- κλώνου συνεχίζεται κανονικά, μέχρι την τυχαία εισαγωγή ενός διδεοξυνουκλεοτιδίου από την πολυμεράση, οπότε η αντιγραφή σταματά. Ως αποτέλεσμα παράγονται κλάσματα DNA διαφορετικού μήκους που μπορούν στη συνέχεια να διαχωριστούν σε πηκτή πολυακρυλαμίδης. Λόγω της διαφορετικής σήμανσης κάθε διδεοξυνουκλεοτιδίου καταγράφεται διαφορετικό χρώμα για κάθε νουκλεοτίδιο και η αλληλουχία τους μπορεί να διεξαχθεί εύκολα, με την ανάγνωση του παραγόμενου χρωματικού προτύπου. (Από National Human Genome Research Institute).

των αντιδραστηρίων. Κύριο μειονέκτημα αυτής της τεχνολογίας είναι το υψηλό κόστος του εξοπλισμού και των αντιδραστηρίων. Οι φθορίζουσες χρωστικές μπορεί να ενσωματώνονται τόσο στους εκκινητές όσο και στα dNTPs ή ddNTPs, και κατ'επέκταση στο DNA κατά τη διάρκεια της αντίδρασης σύνθεσης του κλώνου από την πολυμεράση. Τα επισημασμένα πολυνουκλεοτίδια που παράγονται τοποθετούνται χειροκίνητα και διαχωρίζονται με ηλεκτροφόρηση είτε σε πηκτή πολυακρυλαμίδης ή σε τριχοειδή ανάλογα με το σύστημα που χρησιμοποιείται. Όλα τα επόμενα βήματα ελέγχονται αυτόματα από τον αναλυτή. Τα φθορίζοντα τμήματα που προκύπτουν ανιχνεύονται με τη βοήθεια καταγραφικού συστήματος φθορισμού, που επιτρέπει διάκριση της αλληλουχίας των βάσεων, εφόσον κάθε μια αντιπροσωπεύεται από διαφορετική φθορίζουσα χρωστική. Στη συνέχεια τα δεδομένα αποθηκεύονται για να αναλυθούν με τα κατάλληλα προγράμματα (βλ. *εικ. 15*).



Εικόνα 15. Δείγμα της ανάγνωσης της αλληλουχίας των βάσεων από έναν αυτόματο αναλυτή. Λαμβάνεται ένα πολυκόρυφο χρωματογράφημα, με κάθε κορυφή να αντιπροσωπεύει τη βάση που έχει αναγνωρίσει το μηχάνημα στη συγκεκριμένη θέση. Κάθε βάση αντιπροσωπεύεται με διαφορετικό χρώμα. (Από BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit Protocol, Applied Biosystems 2002 (Part# 4337036A)).

2.5.2 Ανίχνευση σημειακών μεταλλάξεων.

Η τεχνολογία ανάλυσης του DNA αποτελεί τη μέθοδο εκλογής για την ανίχνευση σημειακών μεταλλάξεων και γενετικών πολυμορφισμών.

Μετά το πέρας της ανάλυσης μιας νουκλεοτιδικής αλληλουχίας στον αυτόματο αναλυτή, και επειδή το ανθρώπινο γενετικό υλικό είναι διπλοειδές, κάθε ετερόζυγος γενετικός τόπος θα αντιπροσωπεύεται από δύο κορυφές. Το ανομοιότυπο πρότυπο κατανομής των κορυφών καμιά φορά δυσχεραίνει τη μεταξύ τους διάκριση, ιδιαίτερα στην περίπτωση που η μία από τις δύο βάσεις είναι δυσανάλογα μικρότερη από την άλλη. Ευτυχώς, το πρότυπο κατανομής των κορυφών του χρωματογραφήματος μιας αλληλουχίας DNA μπορεί να αναπαραχθεί εύκολα, και καθορίζεται από την αλληλουχία των νουκλεοτιδίων. Με άλλα λόγια, αν ενισχυθεί το ίδιο τμήμα γενετικού υλικού από έναν αριθμό διαφορετικών ατόμων, η ανάλυση των προϊόντων της PCR θα καταλήξει στο ίδιο χρωματογράφημα, ανεξάρτητα από την προέλευση του δείγματος. Ως εκ τούτου, η σύγκριση των προτύπων κατανομής δύο διαφορετικών ατόμων μπορεί να κάνει εύκολα τη διάκριση ανάμεσα σε ετεροζυγότες και ομοζυγότες και εν συνεχεία, οι μεταλλάξεις ή οι πολυμορφισμοί ταυτοποιούνται σχετικά εύκολα. Οι σημειακές μεταλλάξεις διακρίνονται από την εμφάνιση δύο επικαλυπτόμενων κορυφών στο ίδιο σημείο, ενώ στην περίπτωση μεταλλάξεων που προκαλούν αλλαγή του πλαισίου ανάγνωσης (ελλείψεις ή προσθήκες) έχουμε την εμφάνιση διπλών ισοϋψών κορυφών από το σημείο που υπάρχει η μετάλλαξη μέχρι το τέλος του γραφήματος⁴².

Επιπρόσθετα, το σχετικό ύψος της κορυφής των πολυμορφικών βάσεων μπορεί έμμεσα να οδηγήσει στην εκτίμηση της συχνότητας κάθε αλληλίου, όταν δείγματα από τράπεζες γενετικού υλικού συγκρίνονται με μια αλληλουχία αναφοράς, και εφόσον η διαφορά της συχνότητας των δύο αλληλόμορφων είναι αρκετά σημαντική ($\geq 10\%$)⁴².

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3. ΣΚΟΠΟΣ.

Η ανακάλυψη το 2005 της σημειακής αντικατάστασης βαλίνης από φαινυλαλανίνη στο κωδικόνιο 617 της κινάσης JAK2 αποτέλεσε το πρώτο σημαντικό βήμα στο μοριακό χαρακτηρισμό της ΙΘ. Οι επακόλουθες ανακαλύψεις των μεταλλάξεων στο παραμεμβρανικό τμήμα του cMPL και κυρίως εκείνες στο μόριο της καλρετικουλίνης σχεδόν συμπλήρωσαν το μοριακό κενό, ώστε πλέον το ποσοστό που δεν εμπίπτει σε καμία από τις τρεις κατηγορίες να ανέρχεται στο 10%. Οι ασθενείς αυτοί αναφέρονται στη διεθνή βιβλιογραφία ως τριπλά αρνητικοί (*triple negative*). Ως αποτέλεσμα, οι πάσχοντες από ΙΘ ταξινομούνται σε τέσσερις κατηγορίες, σύμφωνα με το γενετικό τους προφίλ: σε εκείνους που εμφανίζουν κάθε μια από τις μεταλλάξεις σε JAK2, cMPL, CALR, και στους τριπλά αρνητικούς.

Ταυτόχρονα, τα αποτελέσματα πολλών ερευνών διευρύνουν τη μοριακή αυτή ταξινόμηση ώστε να συμπεριλάβει εργαστηριακά και κλινικά χαρακτηριστικά. Σκοπός της παρούσας μελέτης είναι να διερευνηθεί το γενετικό υπόστρωμα μιας ομάδας ασθενών με ΙΘ, που έχουν διαγνωσθεί σύμφωνα με τα κριτήρια του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας του 2008. Αρχικά, θα αναζητηθεί η παρουσία των μεταλλάξεων JAK2V617F, του υποδοχέα της θρομβοποιητίνης W515L και W515K, και εκείνων στο μόριο της καλρετικουλίνης. Ακολούθως, θα γίνει συσχέτιση της μοριακής ταυτότητας κάθε ασθενούς με κλινικά και εργαστηριακά ευρήματα. Συγκεκριμένα, θα μελετηθεί αν η κάθε μετάλλαξη επηρεάζει με διαφορετικό τρόπο τον αιματοκρίτη, τα αιμοπετάλια και τα λευκά αιμοσφαίρια, καθώς και αν επιδρά στο θρομβωτικό κίνδυνο κάθε ασθενούς. Τέλος, θα γίνει σύγκριση των αποτελεσμάτων με εκείνα της διεθνούς βιβλιογραφίας.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4. ΥΛΙΚΑ-ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ.

4.1 Αντιδραστήρια.

(i) Χημικά Αντιδραστήρια

DEPC (Diethyl pyrocarbonate)	[Sigma-Aldrich, AB]
dNTPs	[Invitrogen]
EDTA (αιθυλενο-διάμινο-τετραοξικό οξύ)	[Sigma-Aldrich]
SDS (n-Dodecylsulfate sodium salt)	[Sigma-Aldrich]
TRI Reagent	[Sigma-Aldrich]
Αγαρόζη	[Sigma-Aldrich]
Αιθανόλη 100%	[SERVA, analytical grade Prolabo]
Βορικό οξύ	[Sigma-Aldrich]
Βρωμιούχο αιθίδιο	[Invitrogen]
Βρωμοφαινόλη	[Sigma-Aldrich]
Δισκία PBS (Phosphate buffer Saline)	[Sigma-Aldrich]
Διττανθρακικό αμμώνιο	[Sigma-Aldrich]
Ισοπροπυλική αλκοόλη	[Sigma-Aldrich]
Κιτρικό Νάτριο	[Sigma-Aldrich]
Υδροχλωρικό οξύ	[Sigma-Aldrich, Analar]
Φαινόλη	[Sigma-Aldrich, Analar]
Φικόλη Histopaque	[Sigma-Aldrich]
Φωσφορικό οξύ	[Sigma-Aldrich]
Χλωριούχο Νάτριο	[Sigma-Aldrich]
Οξικό Νάτριο	[Sigma-Aldrich]
Χλωροφόρμιο	[Sigma-Aldrich, Analar]

(ii) Βιολογικά Αντιδραστήρια

Μοριακοί μάρτυρες DNA 100 bp ladder	[Fermentas]
Μοριακοί μάρτυρες DNA 123 ladder	[Invitrogen]
HotStart Taq DNA πολυμεράση	[Qiagen]
Αναστολέας ριβονουκλεασών RNase out	[Invitrogen]
Αντίστροφη μεταγραφάση SuperScript II	[Invitrogen]
Taq Recombinant DNA πολυμεράση	[Invitrogen]
Αντίστροφη μεταγραφάση ιού λευχαιμίας των ποντικών Moloney (M-MLV-RT)	[Invitrogen]
Πρωτεΐνάση K	[Sigma-Aldrich]

4.2 Κλινικό υλικό.

(i) Φυσιολογικοί μάρτυρες

Ως φυσιολογικοί μάρτυρες θεωρήθηκαν άτομα με φυσιολογικά επίπεδα λευκών αιμοσφαιρίων, αιμοπεταλίων, αιματοκρίτη και αιμοσφαιρίνης στο αίμα χωρίς καμία άλλη αιματολογική διαταραχή και χωρίς κανένα άλλο νόσημα ή θεραπεία.

(ii) Κλινικά δείγματα

Οι ασθενείς που μελετήθηκαν προέρχονται από το Αιματολογικό Τμήμα της Κλινικής Παθολογικής Φυσιολογίας του Πανεπιστημίου Αθηνών (Λαϊκό Γενικό Νοσοκομείο Αθηνών), την Αιματολογική Κλινική του Νοσοκομείου «Γ. Γεννηματάς», την Αιματολογική Κλινική του Νοσοκομείου «Ευαγγελισμός», την Αιματολογική Κλινική του Νοσοκομείου «Βενιζέλειο» Ηρακλείου, την Αιματολογική Κλινική του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ηρακλείου, την Αιματολογική Μονάδα της «Ευρωκλινικής» Αθηνών και την Αιματολογική Κλινική του Νοσοκομείου «Αττικών».

Μέχρι σήμερα έχει γίνει συλλογή και μελέτη **227** δειγμάτων περιφερικού αίματος ή/και μυελού των οστών, από ασθενείς που πληρούν τα παρακάτω κριτήρια κατά ΠΟΥ (2008) :

- Παραμένουσα αύξηση του αριθμού των αιμοπεταλίων $> 450 \times 10^9/L$
- Στη βιοψία μυελού υπερπλασία κυρίως της μεγακαρυοκυτταρικής σειράς με αυξημένο αριθμό μεγάλων ώριμων μεγακαρυοκυττάρων

- Αποκλεισμός αληθούς πολυκυτταραιμίας, χρόνιας μυελογενούς λευχαιμίας, πρωτοπαθούς μυελοϊνωσης ή άλλου μυελικού νεοπλάσματος
- Επίκτητη μετάλλαξη ή παρουσία κάποιου άλλου δείκτη κλωνικότητας ή αλλιώς, αποκλεισμός πιθανού αίτιου δευτεροπαθούς θρομβοκυττάρωσης.

4.3 Μέθοδοι.

4.3.1 Απομόνωση μονοπυρήνων κυττάρων περιφερικού αίματος ή μυελού των οστών.

Πραγματοποιείται με φυγοκέντρηση. Για τον σκοπό αυτό το εναιώρημα του αίματος ή του μυελού επιστοιβάζεται σε διάλυμα φικόλης, οπότε, μετά την φυγοκέντρηση, τα μονοπύρηνια συγκεντρώνονται ως χωριστή στοιβάδα μεταξύ πλάσματος-φικόλης και ερυθρών.

(i) Υλικά: Αντιδραστήρια – Διαλύματα

- Φικόλη (Separating solution)
- Διαλύμα PBS (Phosphate Buffered Saline)

(ii) Διαδικασία:

- Αραίωση 1:1 ολικού αίματος ή μυελού των οστών με διάλυμα PBS
- 5ml αραιωμένου αίματος ή μυελού των οστών επιστοιβάζονται σε 3ml φικόλης μέσα σε σωληνάριο πολυπροπυλενίου των 15 ml.
- Φυγοκέντρηση στις 1.900 rpm στους 4°C για 15 λεπτά.
- Αναρρόφηση της στοιβάδας των μονοκυττάρων με πιπέτα pasteur και μεταφορά της σε νέο σωληνάριο των 15 ml.
- Προσθήκη 8 ml διαλύματος PBS, ήπια ανακίνηση και φυγοκέντρηση σε 1.900rpm στους 4°C επί 30 λεπτά .
- Απόρριψη του υπερκειμένου, επανεναιώρηση σε 1ml διαλύματος PBS.

4.3.2 Απομόνωση γενωμικού DNA.

Η απομόνωση γενωμικού DNA μεγάλου μοριακού βάρους από εμπύρηνια κύτταρα περιφερικού αίματος ή μυελού των οστών πραγματοποιήθηκε με επώαση με πρωτεΐνάση K (με στόχο την αποδόμηση πρωτεϊνών), κατακρήμνιση των πρωτεϊνικών

υπολειμάτων και διαχωρισμό των νουκλεϊνικών οξέων με τη μέθοδο του χλωριούχου νατρίου (NaCl).

(i) Υλικά: Αντιδραστήρια – Διαλύματα

- Διάλυμα θραύσης κυτταρικών μεμβρανών, Lysis I (NH_4Cl 155mM, KHCO_3 10mM, EDTA 1mM, PH7,4)
- Διάλυμα θραύσης των πυρήνων, Lysis II (10mM Tris-HCL, 400mM NaCl/2mM EDTA, PH7,4)
- Διάλυμα 10% w/v SDS (n-Sodium Dodecylsulfate salt) (Sigma, USA)
- Διάλυμα πρωτεΐνάσης K του μύκητα *Tritirachium album* (10mg/mlSigma,USA)
- NaCL 6M(Sigma,USA)
- Απόλυτη αιθανόλη

(ii) Διαδικασία:

- Απομάκρυνση ερυθρών αιμοσφαιρίων.
- Αιμόλυση τους σε απιονισμένο d.d H_2O .
- Φυγοκέντρωση στις 4.000 rpm στους 4°C για 30 λεπτά.
- Αφαίρεση υπερκειμένου
- Προσθήκη 20mL διαλύματος Lysis I
- Λύση των κυττάρων
- Φυγοκέντρωση στις 4.000 rpm στους 4°C για 30λεπτά.
- Επανάληψη του σταδίου προσθέτοντας Lysis I και φυγοκέντρωση στις ίδιες συνθήκες.
- Αφαίρεση υπερκειμένου.
- Προσθήκη 6mL Lysis II.
- Προσθήκη 1mL SDS και 250μL πρωτεΐνάσης K.
- Επώση στους 37°C καθόλη τη διάρκεια της νύχτας ή στους 55°C για μία ώρα.
- Προσθήκη 2mL διάλυματος NaCl 6M. Ανάδευση.
- Φυγοκέντρωση στις 4.000 rpm στους 4°C για 30 λεπτά.

- Μεταφορά υπερκειμένου σε δοκιμαστικό σωλήνα των 50mL
- Προσθήκη διπλάσιου όγκου αιθανόλης 100%.
- Φυγοκέντρωση στις 4.000 rpm στους 4°C για 30 λεπτά.
- Έκπλυση του ιζήματος με διάλυμα αιθανόλης 100%. Στέγνωμα ιζήματος.
- Συλλογή του ιζήματος με πιπέτα pasteur και μεταφορά σε καθαρό σωληνάριο erpendorf των 2mL.
- Προσθήκη 1mL αιθανόλης 100%.
- Φυγοκέντρωση στις 12.000 rpm για 20 λεπτά.
- Έκπλυση του ιζήματος με διάλυμα αιθανόλης 100%. Στέγνωμα ιζήματος.
- Συλλογή του ιζήματος με πιπέτα pasteur και μεταφορά σε καθαρό σωληνάριο erpendorf των 2mL.
- Προσθήκη 1mL αιθανόλης 100%.
- Φυγοκέντρωση στις 12.000 rpm για 20 λεπτά.
- Αφαίρεση υπερκειμένου.
- Ξήρανση του ιζήματος υπό κενό για 10 λεπτά.
- Διάλυση του DNA σε d.d H₂O.
- Έλεγχος της ποιότητας του DNA με ηλεκτροφόρηση του σε πήκτωμα αγαρόζης 1,8%.

4.3.3 Απομόνωση RNA.

Η μέθοδος χρησιμοποιεί το ειδικό αντιδραστήριο Ισοθειοκυανικό γουανιδίνιο (Trizol).

(i) Υλικά: Αντιδραστήρια – Διαλύματα

- Διαλύμα Trizol-φαινόλη/ισοθειοκυανικό γουανιδίνιο
- Χλωροφόρμιο
- Ισοπροπυλική αλκοόλη-2-propanol
- Διαλύμα αιθανόλης 75%

(ii) Διαδικασία:

- Μεταφορά των κυττάρων (5×10^6) σε σωληνάριο τύπου erpendorf

- Προσθήκη 200 μ L διαλύματος Trizol/ 10^6 κύτταρα ως και χλωροφορμίου σε όγκο ίσο με το 1/10 του όγκου του Trizol.
- Ισχυρή ανακίνηση μέχρι πλήρους ομογενοποίησης και τοποθέτηση σε παγοτρίμματα επί 15.
- Φυγοκέντρηση στις 12.000rpm στους 4°C για 15 λεπτά.
- Λήψη της υδάτινης φάσης.
- Προσθήκη ίσου όγκου διαλύματος ισοπροπανόλης. Ανάδευση.
- Κατακρήμνιση του RNA και παραμονή του εναιωρήματος στους -20°C κατά τη νύκτα.
- Φυγοκέντρηση στις 12.000rpm στους 4°C για 15 λεπτά.
- Έκπλυση του RNA με διάλυμα αιθανόλης 75%.
- Φυγοκέντρηση στις 12000rpm στους 4°C για 15 λεπτά.
- Αποξήρανση του RNA σε κενό.
- Επαναδιάλυση του RNA σε d.d.H₂O.
- Αραίωση 1:100 του διαλύματος του RNA σε d.d.H₂O. Ποσοτικός προσδιορισμός του εμπεριεχομένου RNA με φωτομέτρηση σε κυψελίδες χαλαζίου σε μήκος κύματος 260/280nm.
- Έλεγχος της ποιότητας του RNA με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 1,8% σε τάση 100V. Η ανάδειξη των ζωνών γίνεται με προσθήκη στην πηκτή βρωμιούχου αιθιδίου (0,5 μ g/ml)
- Αποθήκευση του δείγματος στους -80°C.

4.3.4 Ποσοτικός προσδιορισμός DNA και RNA (φωτομετρικός προσδιορισμός) και ανάδειξη με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης.

Η συγκέντρωση DNA ή RNA σε διάλυμα προσδιορίζεται με μέτρηση της οπτικής πυκνότητας (OD) σε μήκος κύματος 260nm. Μια μονάδα OD₂₆₀ (OD=1) αντιστοιχεί σε 40mg /ml RNA ή μονόκλωνου DNA, σε 50mg /ml δίκλωνου DNA ή 30mg /ml ολιγονουκλεοτιδίων. Ο βαθμός καθαρότητας των νουκλεϊνικών οξέων δίδεται από το λόγο OD_{260nm}/ OD_{280nm}, του οποίου οι τιμές από 1.8 έως 2.0 υποδηλώνουν την παρουσία καθαρού RNA. Η ανάδειξη του RNA γίνεται με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 1,8% σε διάλυμα TBE, όπου αναδεικνύονται δυο ζώνες που αντιστοιχούν στα μεγέθη 28S και 18S (S:Svedberg). Ο έλεγχος της ακεραιότητας του DNA πραγματοποιείται με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 1,8%, 100V. Η ανάδειξη των ζωνών του DNA γίνεται με προσθήκη στην πηκτή βρωμιούχου αιθιδίου (0,5 μ g/ml). Το βρωμιούχο αιθίδιο έχει την ιδιότητα να δεσμεύεται στο DNA οπότε αναδεικνύεται κάτω από φως UV. Η ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης χρησιμοποιείται για τον διαχωρισμό και την αναγνώριση των τμημάτων του DNA με βάση το μέγεθος τους. Η κινητικότητα του DNA στην πηκτή αγαρόζης εξαρτάται από το μοριακό μέγεθος του DNA, την συγκέντρωση της πηκτής αγαρόζης και την στερεοδιάταξη του DNA(κλειστό κυκλικό, ανοιχτό κυκλικό και γραμμικό).

(i) Υλικά: Αντιδραστήρια – Διαλύματα

- Διάλυμα TBE (Tris-Boric acid-di-Na,EDTA)

- Αγαρόζη
- Βρωμιούχο αιθίδιο (Ethidium Bromide-10mg/ml)

(ii) Διαδικασία:

- 2,7gr αγαρόζης προστίθενται σε 150ml TBE.
- Προσθήκη βρωμιούχου αιθιδίου (3μL)
- Ανάμιξη του διαλύματος της αγαρόζης και μεταφορά σε οριζόντια πλατφόρμα ηλεκτροφόρησης, όπου μετατρέπεται σε πηκτή.

4.3.5 Αντίστροφη Μεταγραφή- Σύνθεση cDNA.

Η διαδικασία περιλαμβάνει την μετατροπή του μονόκλωνου RNA σε συμπληρωματικό δίκλωνο DNA (cDNA) και γίνεται με το ένζυμο αντίστροφη μεταγραφάση. Η αντίστροφη μεταγραφάση μπορεί να δημιουργήσει ένα συμπληρωματικό νουκλεϊνικό οξύ, όταν σε κατάλληλες αλληλουχίες του μονόκλωνου RNA συνδεθούν μικρές νουκλεοτιδικές αλληλουχίες που κατευθύνουν το ένζυμο (εκκινητές). Η μεταγραφή προχωρεί με κατεύθυνση 5'-3'.

Στην παρούσα εργασία εφαρμόζεται η μέθοδος της αντίστροφης μεταγραφής με το πρωτόκολλο των τυχαίων εξαμερών. Στο πρωτόκολλο αυτό, ως εκκινητές (*primers*) για τη σύνθεση συμπληρωματικού DNA (cDNA) από πολλαπλές θέσεις της μητρικής αλυσίδας RNA, χρησιμοποιούνται εξανουκλεοτίδια με τυχαία αλληλουχία. Την αντίδραση καταλύει το ένζυμο αντίστροφη μεταγραφάση του ρετροϊού Moloney που προκαλεί λευχαιμία σε ποντικούς (*Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase, M-MLV-RT*).

(i) Υλικά: Αντιδραστήρια – Διαλύματα

- RNA: 1μg
- Ένζυμο αντίστροφη μεταγραφάση του ιού λευχαιμίας των ποντικών του Moloney (M- MLV RT-:200units)
- Ρυθμιστικό διάλυμα 5× 4μl (Σύνθεση διαλύματος 5×: 50mM Tris-HCL pH8,3/375mM)
- KCL/15mM MgCL₂
- Ισομοριακό μείγμα ελεύθερων δεοξυριβονουκλεοτιδίων (dNTPs) με ολική συγκέντρωση 800mM:2 μl
- Εξαμερή ολιγονουκλεοτιδίων (Random primers 3μg/μl)

(ii) Διαδικασία:

Για κάθε αντίδραση αναμειγνύονται τα ακόλουθα:

- | | |
|---|-------|
| • 5x ρυθμιστικό διάλυμα. | 4 μl |
| • Εκκινητές | 1 μl |
| • Αντίστροφη μεταγραφάση | 1 μl |
| • Μείγμα ελεύθερων δεοξυριβονουκλεοτιδίων dNTPs | 2 μl |
| • Αποστειρωμένο νερό μέχρι τελικό όγκο | 20 μl |

Η διαδικασία πραγματοποιείται σε σωληνάρια eppendorf των 500μl μέσα σε πάγο και περιλαμβάνει τρεις φάσεις:

- Αποδιάταξη με επώαση στους 65°C επί 5 λεπτά
- Σύνθεση cDNA με επώαση στους 37°C επί 60 λεπτά
- Τελική αποδιάταξη με επώαση στους 94°C επί 2 λεπτά

4.3.6 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης.

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης επιτρέπει την επακριβή αναπαραγωγή επιλεγμένων αλληλουχιών DNA ενός δείγματος. Η αντίδραση ολοκληρώνεται σε 2-4 ώρες αποδίδοντας εκατομμύρια αντιγράφων. Το μήκος του DNA που μπορεί να πολλαπλασιαστεί κυμαίνεται από 50 ζεύγη μέχρι και πάνω από 2000 ζεύγη βάσεων. Προϋπόθεση για την εφαρμογή της μεθόδου PCR, είναι η γνώση ενός μέρους της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας του τμήματος DNA που θα πολλαπλασιασθεί. Η γνωστή αλληλουχία χρησιμοποιείται για το σχεδιασμό δύο συνθετικών ολιγονουκλεοτιδίων, ενός συμπληρωματικού προς το 3' άκρο της μιας αλυσίδας του τμήματος DNA (*Forward*) κι ενός συμπληρωματικού προς το 5' άκρο της άλλης αλυσίδας του τμήματος DNA (*Reverse*). Τα ολιγονουκλεοτίδια έχουν μέγεθος από 18 έως 25 βάσεις και η εσωτερική νουκλεοτιδική σύσταση τους πρέπει να περιλαμβάνει 40% έως 60% ζεύγη GC. Τα ολιγονουκλεοτίδια αυτά χρησιμεύουν ως εκκινητές (*primers*) για την *in vitro* σύνθεση DNA, που καταλύεται από μια DNA πολυμεράση.

Η PCR περιλαμβάνει την κυκλική επανάληψη (20-40 κύκλοι) τριών απλών αντιδράσεων, που εκτελούνται μέσα στο ίδιο μικρό σωληνάριο χρησιμοποιώντας θερμοανθεκτικά αντιδραστήρια. Κάθε σωληνάριο περιέχει το DNA-εκμαγείο, τα δύο μονόκλωνα ολιγονουκλεοτίδια-εκκινητές, τα τέσσερα τριφωσφορικά δεοξυριβονουκλεοτίδια (dNTPs αδενίνης, θυμίνης, γουανίνης και κυτοσίνης), ρυθμιστικό διάλυμα με μαγνήσιο, και τη θερμοανθεκτική Taq DNA πολυμεράση.

Για την εκτέλεση της αντίδρασης περίσσεια εκκινητών προστίθεται στο αποδιαταγμένο DNA σε θερμοκρασία 50-60 °C, οπότε οι εκκινητές αναγνωρίζουν τις κατάλληλες για αυτούς αλληλουχίες και συνδέονται (υβριδίζονται) με αυτές. Η προσθήκη του μείγματος δεοξυνουκλεοτιδίων και DNA πολυμεράσης σηματοδοτεί την έναρξη της αντιγραφής. Αυτή αρχίζει από το 3' άκρο των υβριδισμένων εκκινητών και προχωρεί με κατεύθυνση 5'-3'. Χρησιμοποιείται η Taq DNA πολυμεράση που είναι εξαιρετικά θερμοανθεκτική.

Η Taq DNA πολυμεράση μπορεί να επιμηκύνει τα πρωταρχικά τμήματα προσθέτοντας πολλές δεκάδες νουκλεοτιδίων για όσο γίνεται η επώαση στους 72°C. Έπειτα το δείγμα θερμαίνεται στους 95 βαθμούς ώστε να αποδιαταχθούν τα δίκλωνα μόρια που έχουν μόλις συντεθεί. Στο τέλος, με την μείωση της θερμοκρασίας και με την προϋπόθεση ότι υπάρχει περίσσεια δεοξυνουκλεοτιδίων αρχίζει μια νέα φάση σύνθεσης. Αυτός ο κύκλος σύνθεσης και αποδιάταξης μπορεί να επαναληφθεί πολλές φορές επιτρέποντας

τη σύνθεση μεγάλων ποσοτήτων της αλληλουχίας που μας ενδιαφέρει. Σε κάθε κύκλο ο αριθμός των αντιγράφων της αλληλουχίας, που αφορίζεται από τις θέσεις όπου υβριδίζονται οι εκκινητές, πολλαπλασιάζεται εκθετικά. Η ανάλυση του προϊόντος PCR μπορεί να γίνει:

- Με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης ή ακρυλαμίδης
- Με κατάτμηση του προϊόντος της PCR με περιοριστική ενδονουκλεάση
- Με σήμανση του προϊόντος της PCR
- Με μεταφορά του προϊόντος σε μεμβράνη νάιλον και υβριδισμό με κατάλληλα αλληλόμορφα νουκλεοτίδια ανιχνευτές

Ο έλεγχος της ποιότητας του cDNA γίνεται με την τεχνική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) χρησιμοποιώντας ως γονίδιο αναφοράς το γονίδιο *ABL*.

(i) Υλικά: Αντιδραστήρια – Διαλύματα

- Ρυθμιστικό διάλυμα 10x*
- Ισομοριακό μείγμα ελεύθερων δεοξυριβονουκλεοτιδίων (100mM dNTPs)
- Ένζυμο: Taq DNA Πολυμεράση (5U/μl)
- Εκκινητές

*Σύνθεση διαλύματος 10x: 10mM Tris-HCL pH8,3/50mM KCL/15mM MgCL₂, Invitrogen, USA)

(ii) Διαδικασία:

Για κάθε αντίδραση αναμειγνύονται τα ακόλουθα:

• Υπόστρωμα: cDNA	1 μl
• 10x ρυθμιστικό διάλυμα.	5 μl
• Διάλυμα MgCL ₂ , 50mM	2,5 μl
• Ισομοριακό μείγμα ελεύθερων δεοξυριβονουκλεοτιδίων dNTPs	1 μl
• Taq DNA πολυμεράση	0,2 μl
• Εκκινητές	2 μl
• Αποστειρωμένο νερό μέχρι τελικό όγκο	50 μl

Έπειτα το σωληνάριο επωάζεται κυκλικά στις ακόλουθες συνθήκες:

- Αρχική αποδιάταξη στους 95°C επί 5 λεπτά
- Αποδιάταξη στους 95°C επί 1 λεπτό
- Υβριδισμός εκκινητών στους 64°C επί 1 λεπτό
- Επιμήκυνση στους 72°C επί 1 λεπτό
- Τελική επιμήκυνση στους 72°C επί 10 λεπτά

Συνολικά γίνονται 40 κύκλοι PCR.

Οι εκκινητές, για τον έλεγχο της απόδοσης της PCR (γονίδιο *ABL*)

Εκκινητές	Αλληλουχία εκκινητών
A2N	5-CCCAACCTTTTCGTTGCACTGT
NA4	5-CGGCTCTCGGAGGAGACGTA

4.3.7. «Φωλιασμένη» (nested) PCR.

Όταν η αναζητούμενη αλληλουχία βρίσκεται σε μικρό αριθμό αντιγράφων η απλή τεχνική PCR μπορεί να αποδειχθεί ανεπαρκής για την ανίχνευσή της. Στην περίπτωση αυτή χρησιμοποιείται η τεχνική της «φωλιασμένης» PCR, η οποία έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της ευαισθησίας και της ειδικότητας της. Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιεί δύο διαδοχικές αντιδράσεις PCR. Η πρώτη αντίδραση χρησιμοποιεί ένα εξωτερικό ζευγάρι εκκινητών, ενώ η δεύτερη αντίδραση χρησιμοποιεί δύο εκκινητές οι οποίοι είναι εσωτερικοί στο πρώτο ζευγάρι. Το προϊόν της πρώτης αντίδρασης χρησιμοποιείται ως υπόστρωμα για την δεύτερη αντίδραση.

Στην παρούσα εργασία η «φωλιασμένη» PCR χρησιμοποιήθηκε για την ανίχνευση του χιμαιρικού μεταγράφου *BCR-ABL*. Χρησιμοποιούνται τα ίδια αντιδραστήρια και τεχνική. Διαφέρουν οι εκκινητές.

(i) **Υλικά:** Αντιδραστήρια – Διαλύματα για την πρώτη και την δεύτερη αντίδραση αντίστοιχα

- Προϊόν PCR 1μl
- Ρυθμιστικό διάλυμα 10x*
- Ισομοριακό μείγμα ελεύθερων δεοξυριβονουκλεοτιδίων (100mM dNTPs)
- Ένζυμο: Taq DNA Πολυμεράση (5U/μl)
- Εκκινητές
-

*Σύνθεση διαλύματος 10x: 10mM Tris-HCL pH8,3/50mM KCL/15mM MgCL₂, Invitrogen, USA)

(ii) Διαδικασία:

Για την πρώτη και δεύτερη αντίδραση αναμειγνύονται τα ακόλουθα:

•	Υπόστρωμα: Προϊόν PCR	1 μl
•	10x ρυθμιστικό διάλυμα	10 μl
•	Διάλυμα MgCL ₂ , 50mM	5 μl
•	Ισομοριακό μείγμα ελεύθερων δεοξυριβονουκλεοτιδίων dNTPs	2 μl
•	Taq DNA πολυμεράση	0,2μl
•	Εκκινητές	4 μl
•	Αποστειρωμένο νερό μέχρι τελικό όγκο	100 μl

Έπειτα το σωληνάριο επωάζεται κυκλικά στις ακόλουθες συνθήκες:

- Αρχική αποδιάταξη στους 94°C επί 3 λεπτά
- Αποδιάταξη στους 94°C επί 30 δευτερόλεπτα
- Υβριδισμός εκκινητών στους 65°C επί 1 λεπτό
- Επιμήκυνση στους 72°C επί 1 λεπτό
- Τελική επιμήκυνση στους 72°C επί 10 λεπτά

Συνολικά γίνονται 34 κύκλοι PCR.

Εκκινητές πρώτης αντίδρασης για την ανίχνευση του χιμαιρικού μεταγράφου *BCR-ABL*

Εκκινητές	Αλληλουχία εκκινητών
BCR-ABL A210	5-GAAGTGTTTCAGAAGCTTCT
BCR-ABL B210	5-GTTTGGGCTTCACACCATTCC

Εκκινητές δεύτερης αντίδρασης για την ανίχνευση του χιμαιρικού μεταγράφου *BCR-ABL*

Εκκινητές	Αλληλουχία εκκινητών
BCR-ABL C210	5-CAGATGCTGACCAACTCGTGT
BCR-ABL D210	5-TTCCCCATTGTGATTATAGCCTA

4.3.8 Ανίχνευση της μετάλλαξης *JAK2V617F* με την μέθοδο **ARMS PCR** (Amplification-Refractory Mutation System).

Η μέθοδος ARMS PCR (Amplification-Refractory Mutation System)-(Σύστημα ανίχνευσης μεταλλάξεων ανθεκτικών στην ενίσχυση) βασίζεται στο γεγονός ότι μια ασυμφωνία ζευγαρώματος ανάμεσα στο 3' νουκλεοτίδιο ενός εκκινητή PCR και της μήτρας μειώνει ή εμποδίζει την επιμήκυνση του εκκινητή από την Taq πολυμεράση. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι η Taq πολυμεράση δεν έχει δράση 3'>5' εξωνουκλεάσης, και συνεπώς δεν μπορεί να επιδιορθώσει τυχόν ασυμφωνίες ζευγαρώματος στο 3' άκρο του εκκινητή.

Έτσι η ενίσχυση του φυσιολογικού αλληλομόρφου επιτυγχάνεται με χρήση ενός εκκινητή, ο οποίος είναι απόλυτα συμπληρωματικός με το φυσιολογικό αλληλόμορφο ενώ το μεταλλαγμένο αλληλόμορφο που εμφανίζει ασυμφωνία ζευγαρώματος με το 3' νουκλεοτίδιο του εκκινητή δεν ανιχνεύεται. Αντίστροφα, όταν το 3' νουκλεοτίδιο του εκκινητή είναι συμπληρωματικό με το μεταλλαγμένο αλληλόμορφο και όχι με το φυσιολογικό ενισχύεται ειδικά το μεταλλαγμένο αλληλόμορφο. Η τεχνική ARMS PCR

είναι μέθοδος απλή και αξιόπιστη, δεν απαιτεί τη χρήση ραδιενέργειας ή πέψη με ένζυμα περιορισμού και επιτρέπει, με γρήγορο και άμεσο τρόπο, τον διαχωρισμό αλληλομόρφων που διαφέρουν ακόμη και ως προς ένα ζεύγος βάσεων.

Στην παρούσα εργασία μία παραλλαγή της ARMs PCR ή Tetra-primer ARMS PCR χρησιμοποιήθηκε για την ενίσχυση του γονιδίου *JAK2* και την ανίχνευση της μετάλλαξης *JAK2V617F* και, στην συνέχεια τον ποιοτικό προσδιορισμό του μεταλλαγμένου γονιδίου.

Χρησιμοποιούνται δύο ζεύγη εκκινητών που ενισχύουν ολόκληρη την περιοχή του γονιδίου *JAK2* ανεξάρτητα από την παρουσία ή όχι της μετάλλαξης (*Forward Outer-FO* και *Reverse Outer-RO*), ένας εκκινητής που υβριδίζεται στο 5' άκρο του γονιδίου και έχει φυσιολογική αλληλουχία *JAK2* (*Forward wild type specific-Fwt*) και ένας εκκινητής που υβριδίζεται στο 3' άκρο του γονιδίου και φέρει τη μεταλλαγμένη αλληλουχία που αντιστοιχεί στην *V617F* μετάλλαξη (*Reverse mutant specific-Rmt*).

Όταν το γονίδιο *JAK2* είναι φυσιολογικό, η ηλεκτροφόρηση κατά την εκτέλεση της PCR, του προϊόντος σε πηκτή αгарόζης αναδεικνύει δυο ζώνες: μία ζώνη 480bp (Ζώνη αναφοράς) που αντιστοιχεί στο προϊόν ενίσχυσης από τον Forward Outer μέχρι τον Reverse Outer, και άλλη μία ζώνη 224bp (Φυσιολογική ζώνη) όπου η PCR αρχίζει από τον Forward wild type specific και συνεχίζεται μέχρι τον Reverse Outer προσπερνώντας την επίμαχη μετάλλαξη. Αντίθετα η PCR που αρχίζει από τον Rmt δεν μπορεί να προχωρήσει γιατί το 3' του εκκινητή δεν αναγνωρίζει την φυσιολογική αλληλουχία του *JAK2*. Όταν το DNA που εξετάζεται φέρει την μετάλλαξη συμβαίνουν τα αντίθετα: η PCR FO/RO γίνεται κανονικά αποδίδοντας την ζώνη αναφοράς 480bp, η PCR Fwt-RO δεν εξελίσσεται γιατί το 3' του Fwt βρίσκει την 'ασύμφωνη ακολουθία', ενώ η PCR Rmt που υβριδίζεται κανονικά εξελίσσεται μέχρι τον FO, αποδίδοντας ένα προϊόν 279bp που είναι εμφανές στην ηλεκτροφόρηση.

Όταν η μετάλλαξη εντοπίζεται και στα δύο αλληλία (ομόζυγη μορφή) αναδεικνύονται δύο ζώνες. Η ζώνη αναφοράς με μέγεθος 480bp και η μεταλλαγμένη ζώνη με μέγεθος 279bp.

(i) Υλικά: Αντιδραστήρια – Διαλύματα

- Ρυθμιστικό διάλυμα 10x (15mM-MgCl₂)
- Διάλυμα MgCl₂ (25mM Qiagen)
- Ισομοριακό μείγμα ελεύθερων δεοξυριβονουκλεοτιδίων (100mM dNTPs)
- Ένζυμο: HotStart-Πολυμεράση (5U/μl)
- Εκκινητές

(ii) Διαδικασία:

Για την αντίδραση αναμειγνύονται τα ακόλουθα:

• Υπόστρωμα:DNA 25ng	1 μl
• 10x ρυθμιστικό διάλυμα.	10 μl
• MgCL ₂	4 μl
• Ισομοριακό μείγμα ελεύθερων δεοξυριβονουκλεοτιδίων dNTPs	2 μl
• Ένζυμο HotStat-Πολυμεράση	0,5 μl
• Εκκινητές (FO,RO-50mM) (Fwt,Rmt-25mM)	4 μl
• Αποστειρωμένο νερό μέχρι τελικό όγκο	100 μl

Έπειτα το σωληνάριο επωάζεται κυκλικά στις ακόλουθες συνθήκες:

- Αρχική αποδιάταξη στους 95°C επί 15 λεπτά
- Αποδιάταξη στους 94°C επί 1 λεπτό
- Υβριδισμός εκκινητών στους 60°C επί 1 λεπτό
- Επιμήκυνση στους 72°C επί 1 λεπτό
- Τελική επιμήκυνση στους 72°C επί 10 λεπτά

Συνολικά γίνονται 29 κύκλοι PCR.

Εκκινητές για την ανίχνευση της μετάλλαξης JAK2V617F

Εκκινητές	Αλληλουχία εκκινητών
FO	5-TCCTCAGAACGTTGATGGCAG
RO	5-ATTGCTTTCCTTTTTCACAAG
Fwt	5-GGATTTGGTTTTAAATTATG
Rmt	5-GTTTTACTTACTCTCGTCTCC

4.3.9 Allele specific PCR για την ανίχνευση μεταλλάξεων στον υποδοχέα της θρομβοποιητίνης c-MPL.

Η μέθοδος Allele specific PCR είναι μια μέθοδος αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης η οποία βασίζεται στον σχεδιασμό εκκινητών που αναγνωρίζουν με απόλυτα εξειδικευμένο τρόπο τις αλληλουχίες. Συγκεκριμένα η μέθοδος αυτή βασίζεται στην χρησιμοποίηση εκκινητών των οποίων το 3' άκρο υβριδίζεται και

επιτρέπει την εξέλιξη της αντίδρασης μόνον όταν είναι απόλυτα συμπληρωματικό προς την μετάλλαξη. Όλοι οι εκκινητές υβριδίζονται στο 3' του γονιδίου. Η επιτυχία της αντίδρασης εξασφαλίζεται με την δημιουργία ζώνης αναφοράς μεταξύ ενός ζεύγους εκκινητών που βρίσκεται 5' και 3' άκρο του γονιδίου και στον υβριδισμό των προϊόντων της PCR με ολιγονουκλεοτιδικούς εκκινητές ειδικούς του αλληλομόρφου που φέρει την μετάλλαξη.

Η μέθοδος μπορεί να εφαρμοστεί σε οποιαδήποτε γνωστή σημειακή μετάλλαξη ή μονονουκλεοτιδικό πολυμορφισμό, δεν χρησιμοποιεί ραδιενέργεια και δεν απαιτεί εξειδικευμένο εξοπλισμό για την ανίχνευση των αλληλομόρφων. Η ανίχνευση των μεταλλάξεων στον υποδοχέα της θρομβοποιητίνης cMPL γίνεται με τους εκκινητές: Forward outer (FO), Reverse Outer (RO) και Reverse mutant specific (Rmt) που είναι ειδικός για την κάθε μετάλλαξη.

(i) Υλικά: Αντιδραστήρια – Διαλύματα

- Ρυθμιστικό διάλυμα 10x (περιέχει 15mM-MgCl₂)
- MgCl₂ 25mM Qiagen
- Ισομοριακό μείγμα ελεύθερων δεοξυριβονουκλεοτιδίων (100mM dNTPs)
- Ένζυμο: HotStatTaq (5U/μl)
- Εκκινητές

(ii) Διαδικασία:

Για την αντίδραση αναμειγνύονται τα ακόλουθα:

- | | |
|--|------------|
| • Υπόστρωμα: DNA 50ng | 1 μl |
| • 10x ρυθμιστικό διάλυμα. | 5 μl |
| • Διάλυμα MgCl ₂ | 1 μl |
| • Ισομοριακό μείγμα ελεύθερων δεοξυριβονουκλεοτιδίων dNTPs | 1 μl |
| • Ένζυμο HotStart | 0,25 μl |
| • Εκκινητές (FO,RO) | 0,5μl/1 μl |
| • Ειδικοί εκκινητές (W515K/W515L-100mM) | _____ 1μl |
| • Αποστειρωμένο νερό μέχρι τελικό όγκο | 50 μl |

Έπειτα το σωληνάριο επωάζεται κυκλικά στις ακόλουθες συνθήκες:

- Αρχική αποδιάταξη στους 95°C επί 15 λεπτά
- Αποδιάταξη στους 94°C επί 1 λεπτό
- Υβριδοποίηση εκκινητή στους 66°C επί 1 λεπτό
- Επιμήκυνση στους 72°C επί 1 λεπτό
- Τελική επιμήκυνση στους 72°C επί 10 λεπτά

Συνολικά γίνονται 34 κύκλοι PCR.

Οι εκκινητές, για την ανίχνευση των μεταλλάξεων στον υποδοχέα της θρομβοποιητίνης *c-MPL*

Εκκινητές	Αλληλουχία εκκινητών
FO	5-TGGGCCGAAGTCTGACCCTT
RO	5-GAAGTGGCGAAGCCGTAGGT
As W515K	5-GGGCCTGCTGCTGCTGAGGC
As W515L	5-GGGCCTGCTGCTGCTGAGGC

4.3.10 Αυτοματος προσδιορισμός αλληλουχίας (Sequencing) για το γονίδιο του *cMPL*.

Η αυτοματοποιημένη αλληλούχιση βασίζεται στη μέθοδο *Sanger*. Αρχικά, το προϊόν της PCR καθαρίζεται από τα υλικά της αντίδρασης με τη βοήθεια εμπορικών kit (Qiagen PCR purification kit). Στη συνέχεια, ετοιμάζονται δύο ξεχωριστές αντιδράσεις PCR, μία για τον νοηματικό εκκινητή Fw και μία για τον αντινοηματικό εκκινητή Rev. Το μίγμα της κάθε αντίδρασης περιέχει 2 μ L του PCR προϊόντος, 1.75 μ L ρυθμιστικού διαλύματος 5xSequencing Buffer, 0.5 μ L BigDyeTerminator kit (Applied Biosystems) και συμπλήρωση με απεσταγμένο νερό μέχρι τα 10 μ L. Οι συνθήκες της PCR αναγράφονται παραπάνω.

Στη συνέχεια, το προϊόν της PCR καθαρίζεται από τα αντιδραστήρια ως εξής:

- κατακρήμνιση με την προσθήκη 40 μ L διαλύματος NaOAc/Eth (Για 2 mL διαλύματος: 75 μ L NaOAc 3M pH 4.4 και 1562,5 μ L EtOH 100%)
- Αναμονή για 30 min σε θερμοκρασία δωματίου
- Φυγοκέντρωση στις 3600 rpm επί 30 min
- Αφαίρεση το υπερκείμενου και προσθήκη 70 μ L 70% EtOH

- Φυγοκέντρωση στις 1400 rpm επί 3 min
- Ξήρανση ιζήματος και προσθήκη 10 μL φορμαμίδης

Τα δείγματα μεταφέρονται σε πλάκα μικροτιτλοποίησης 96 θέσεων και τοποθετούνται στον αυτόματο αναλυτή ABI3100 SDS (Applied Biosystems, USA), όπου ηλεκτροφορούνται σε τριχοειδή. Τα αποτελέσματα αποθηκεύονται αυτόματα στον υπολογιστή και αναλύονται με ειδικά προγράμματα επεξεργασίας αλληλουχιών. Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε το Chromas.

4.3.11 Ανίχνευση μεταλλάξεων στο γονίδιο της *CALR*.

Ενίσχυση της περιοχής ενδιαφέροντος του εξονίου 9 του γονιδίου της CALR με ποιοτική PCR.

Για την PCR 20ng DNA χρησιμοποιήθηκαν ως εκμαγείο. Στο μίγμα της αντίδρασης προστίθενται 5 μL 10x ρυθμιστικό διάλυμα, 2.5 μL MgCl_2 συγκέντρωσης 50mM, 1 μL dNTPs συγκέντρωσης 40mM, 1 μL από κάθε εκκινητή συγκέντρωσης 50mM, 0.25 μL ένζυμο HotStar Taq 2,5U και συμπλήρωση με απεσταγμένο νερό μέχρι τα 50 μL .

Πρωτόκολλο PCR για την ανίχνευση μεταλλάξεων στο εξόνιο 9 της CALR.

Για την αντίδραση αναμειγνύονται τα ακόλουθα:

• Υπόστρωμα	DNA 20ng
• 10x ρυθμιστικό διάλυμα.	5 μl
• Διάλυμα MgCl_2 (50mM)	2.5 μl
• dNTPs (40Mm)	1 μl
• Ένζυμο Taq Polymerase 5U/ μL	0,25 μl
• Εκκινητής I (50mM)	1 μl
• Εκκινητής II (50mM)	_____1 μl _____
• Αποστειρωμένο νερό μέχρι τελικό όγκο	50 μl

Οι συνθήκες της PCR είναι οι εξής:

	Θερμοκρασία	Διάρκεια	Αριθμός επαναλήψεων
Αρχική αποδιάταξη	95 °C	15 min	1
Αποδιάταξη	94 °C	30 sec	40
Υβριδοποίηση εκκινητών	67 °C	30 sec	
Επιμήκυνση	72°C	45 sec	

Οι εκκινητές για την ανίχνευση μεταλλάξεων στο γονίδιο *CALR*:

Εκκινητές

Αλληλουχία εκκινητών

FORWARD

5' AGAGAAACAAATGAAGGAC 3'

REVERSE

5' CTACAGCTCGTCCTTGGCCTG 3'

4.3.12 Προσδιορισμός αλληλουχίας (Sequencing) για το γονίδιο της καλρετικουλίνης.

Η αυτοματοποιημένη αλληλούχιση βασίζεται στη μέθοδο *Sanger*. Αρχικά, το προϊόν της PCR καθαρίζεται από τα υλικά της αντίδρασης με τη βοήθεια εμπορικών kit (Qiagen PCR purification kit). Στη συνέχεια, ετοιμάζονται δύο ξεχωριστές αντιδράσεις PCR, μία για τον νοηματικό εκκινητή CALFw και μία για τον αντινοηματικό εκκινητή CALRv. Το μίγμα της κάθε αντίδρασης περιέχει 2 μ L του PCR προϊόντος, 1.75 μ L ρυθμιστικού διαλύματος 5xSequencing Buffer, 0.5 μ L BigDyeTerminator kit (Applied Biosystems) και συμπλήρωση με απεσταγμένο νερό μέχρι τα 10 μ L. Οι συνθήκες της PCR αναγράφονται στον παραπάνω πίνακα.

Στη συνέχεια, το προϊόν της PCR καθαρίζεται από τα αντιδραστήρια ως εξής:

- κατακρήμνιση με την προσθήκη 40 μ L διαλύματος NaOAc/Eth (Για 2 mL διαλύματος: 75 μ L NaOAc 3M pH 4.4 και 1562,5 μ L EtOH 100%)
- Αναμονή για 30 min σε θερμοκρασία δωματίου
- Φυγοκέντρωση στις 3600 rpm επί 30 min

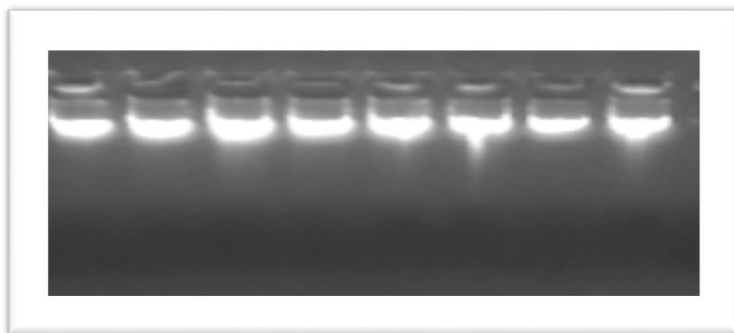
- Αφαίρεση το υπερκείμενου και προσθήκη 70 μL 70% EtOH
- Φυγοκέντρωση στις 1400 rpm επί 3 min
- Ξήρανση ιζήματος και προσθήκη 10 μL φορμαμίδης

Τα δείγματα μεταφέρονται σε πιάτο 96 θέσεων και τοποθετούνται στο μηχάνημα όπου ηλεκτροφορούνται σε τριχοειδή. Τα αποτελέσματα αποθηκεύονται αυτόματα στον υπολογιστή και αναλύονται σε ειδικά προγράμματα επεξεργασίας αλληλουχιών. Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε το Chromas.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

5.1 Ακεραιότητα του DNA.

Η *εικόνα 16* δείχνει την ακεραιότητα του DNA, όπου δεν φαίνονται πρόσθετες ζώνες.



Εικόνα 16: Έλεγχος της ακεραιότητας του DNA, με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 3%.

5.2 Ακεραιότητα του RNA.

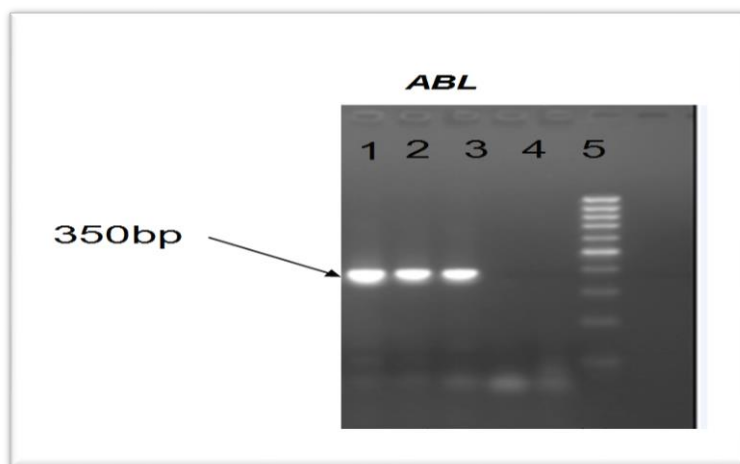
Η *εικόνα 17* δείχνει το RNA το οποίο είναι ακέραιο χωρίς την παρουσία επιπρόσθετων ζωνών. Συγκεκριμένα παρατηρούνται δύο ζώνες που αντιστοιχούν σε μοριακό βάρος 28S και 18S.



Εικόνα 17: Έλεγχος της ακεραιότητας του RNA με τις δυο ζώνες μοριακού βάρους 28S και 18S αντίστοιχα σε πηκτή αγαρόζης 1,8%.

5.3 Αντίστροφη μεταγραφή RNA για την σύνθεση cDNA και έλεγχος της ποιότητας του cDNA με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) χρησιμοποιώντας το ABL ως γονίδιο αναφοράς.

Η *εικόνα 18* δείχνει τα αποτελέσματα της PCR. Στις θέσεις 1, 2, 3 απεικονίζονται τα προϊόντα της PCR με μέγεθος 350 bp, ενώ στην θέση 4 το αρνητικό δείγμα. Στην θέση 5 αντιστοιχεί μία κλίμακα μεγέθους ανά 100 bp.



Εικόνα 18:

Έλεγχος της ποιότητας της μεταγραφής του RNA σε cDNA, χρησιμοποιώντας το γονίδιο *ABL* ως γονίδιο αναφοράς, με ηλεκτροφόρηση του προϊόντος σε πηκτή αгарόζης 1,8%.

Αποκλεισμός των χιμαιρικών μεταγράφων BCR-ABL (P210, P190).

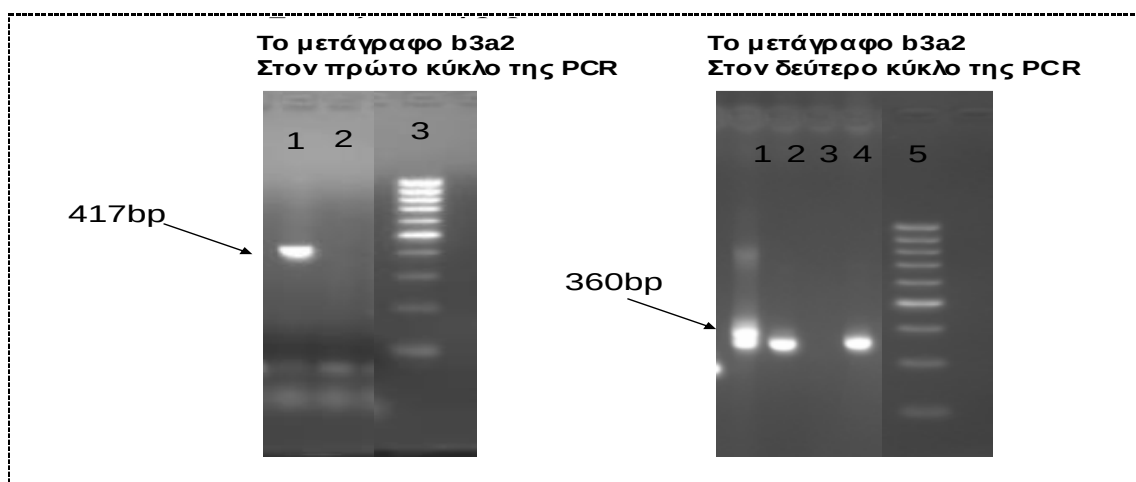
Ανάδειξη των χιμαιρικών μεταγράφων BCR-ABL (P210, P190) με την τεχνική της «φωλιασμένης» (nested) PCR.

Η **εικόνα 19Α** δείχνει το μετάγραφο b3a2, στον πρώτο κύκλο της αντίδρασης, που έχει μέγεθος 417 bp. Στην θέση 1 απεικονίζεται ένα θετικό δείγμα, ενώ στην θέση 2 ένα αρνητικό δείγμα. Στην θέση 3 υπάρχει μία κλίμακα μεγέθους ανά 100 bp.

Η **εικόνα 19Β** δείχνει το μετάγραφο b3a2, μετά τον δεύτερο κύκλο της αντίδρασης, που έχει μέγεθος 360 bp. Στις θέσεις 1, 2 και 4 απεικονίζονται 3 θετικά δείγματα ενώ στην θέση 3, απεικονίζεται ένα αρνητικό δείγμα. Στην θέση 5 υπάρχει μία κλίμακα μεγέθους ανά 100 bp.

A.

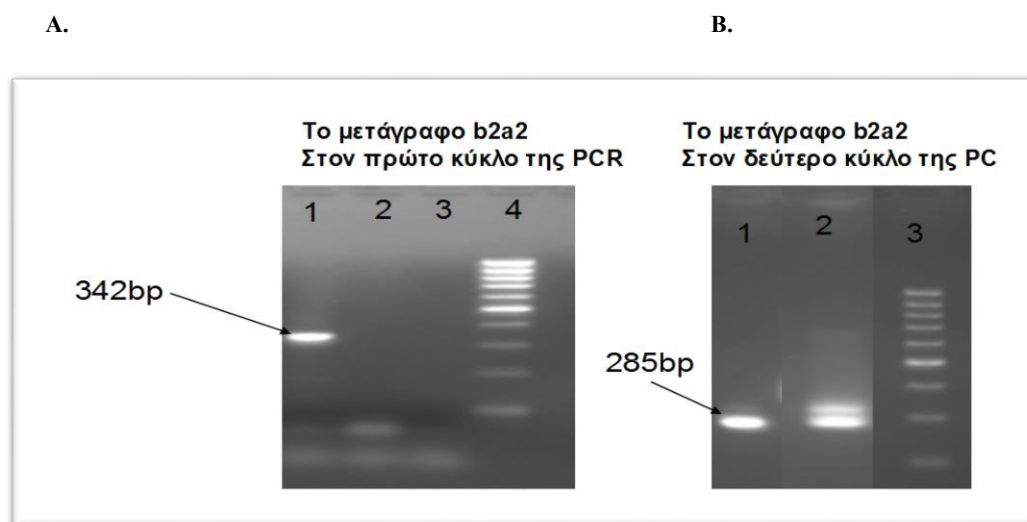
B.



Εικόνα 19: Απεικόνιση του χιμαιρικού μεταγράφου b3a2 του γονιδίου *BCR-ABL* μετά τον 1^ο και τον 2^ο κύκλο της αντίδρασης, με ηλεκτροφόρηση του προϊόντος σε πηκτή αгарόζης 1,8%

Η **εικόνα 20Α** δείχνει το μετάγραφο b2a2, στον πρώτο κύκλο της αντίδρασης, που έχει μέγεθος 342 bp. Στην θέση **1** απεικονίζεται ένα θετικό δείγμα, ενώ στις θέσεις **2** και **3** απεικονίζονται δυο αρνητικά δείγματα. Στην θέση **4** υπάρχει μία κλίμακα μεγέθους 100 bp.

Η **εικόνα 20Β** δείχνει το μετάγραφο b2a2, μετά τον δεύτερο κύκλο της αντίδρασης, που έχει μέγεθος 285 bp. Στην θέση **1** και **2** υπάρχουν δυο θετικά δείγματα. Στην θέση **3** υπάρχει μία κλίμακα μεγέθους ανά 100 bp.



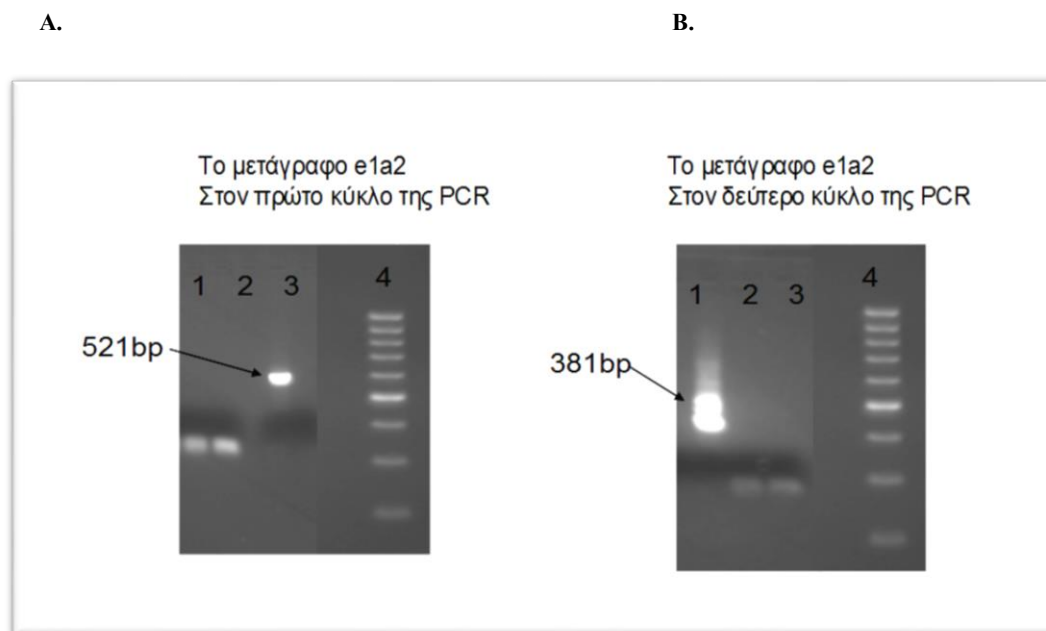
Εικόνα 20: Απεικόνιση του χιμαιρικού μεταγράφου b2a2 του γονιδίου *BCR-ABL* μετά τον 1^ο και τον 2^ο κύκλο της αντίδρασης, με ηλεκτροφόρηση του προϊόντος σε πηκτή αγαρόζης 1,8%.

Η **εικόνα 21Α** δείχνει το μετάγραφο e1a2, στον πρώτο κύκλο της αντίδρασης, που έχει μέγεθος 521 bp. Στις θέσεις **1** και **2** απεικονίζονται δυο αρνητικά δείγματα, ενώ στην θέση **3** απεικονίζεται ένα θετικό δείγμα. Στην θέση **4** υπάρχει μία κλίμακα μεγέθους ανά 100 bp.

Η **εικόνα 21Β** δείχνει το μετάγραφο e1a2, μετά τον δεύτερο κύκλο της αντίδρασης, που έχει μέγεθος 381 bp. Στην θέση **1** απεικονίζεται ένα θετικό δείγμα ενώ στις θέσεις **2** και **3** υπάρχουν δυο αρνητικά δείγματα. Στην θέση **4** υπάρχει μία κλίμακα μεγέθους ανά 100 bp.

5.4 Ανίχνευση της μετάλλαξης *JAK2V617F* με την μέθοδο ARMS PCR σε ασθενείς με ΙΘ.

Οι **εικόνες 22Α, 22Β, 22Γ** και **23** απεικονίζουν δείγματα DNA που φέρουν την μετάλλαξη *JAK2V617F*. Στα δείγματα αυτά αναγνωρίζονται τρεις ζώνες: μία που έχει



Εικόνα 21: Απεικόνιση του χιμαιρικού μεταγράφου e1a2 του γονιδίου *BCR-ABL* μετά τον 1^ο και τον 2^ο κύκλο της αντίδρασης, με ηλεκτροφόρηση του προϊόντος σε πηκτή αγαρόζης 1,8%.

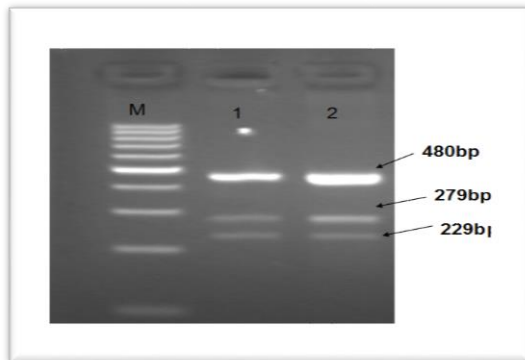
μέγεθος 480 bp (ζώνη θετικού ελέγχου), μία που έχει μέγεθος 229 bp (ζώνη φυσιολογικού αλληλομόρφου) και μία ζώνη μεταλλαγμένου αλληλομόρφου που έχει μέγεθος 279 bp. Συγκεκριμένα στις θέσεις 1 και 2 (**22A**) απεικονίζονται δύο δείγματα που φέρουν τη μετάλλαξη σε ένα από τα δύο αλληλόμορφα του γονιδίου (ετερόζυγη μορφή). Στα δείγματα αυτά αναγνωρίζονται τρεις ζώνες: η ζώνη θετικού ελέγχου που έχει μέγεθος 480 bp, η ζώνη του φυσιολογικού αλληλομόρφου που έχει μέγεθος 229 bp και η ζώνη του μεταλλαγμένου αλληλομόρφου που έχει μέγεθος 279 bp. Στην θέση 3 (**22B**) απεικονίζεται ένα δείγμα που δεν φέρει την μετάλλαξη *JAK2V617F*. Παρατηρούμε τη ζώνη θετικού ελέγχου με μέγεθος 480 bp και τη ζώνη του φυσιολογικού αλληλομόρφου με μέγεθος 229 bp. Στην θέση 4 (**22Γ**) απεικονίζεται ένα δείγμα που φέρει τη μετάλλαξη και στα δύο αλληλόμορφα (ομόζυγη μορφή). Στο δείγμα αυτό αναγνωρίζονται δύο ζώνες: η ζώνη θετικού ελέγχου που έχει μέγεθος 480 bp και η ζώνη του μεταλλαγμένου αλληλομόρφου που έχει μέγεθος 279 bp. Στην θέση *M* αντιστοιχεί κλίμακα μεγέθους με βαθμίδες των 100 bp.

5.5 Διερεύνηση μεταλλάξεων στο γονίδιο *MPL* σε ασθενείς με ΙΘ που είναι αρνητικοί για την μετάλλαξη *JAK2V617F*, με την μέθοδο *Allele specific PCR*.

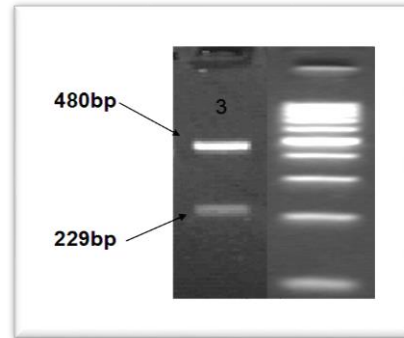
Η *εικόνα 24* απεικονίζει δείγματα DNA από ασθενείς με θρομβοκυττάρωση που ελέγχθησαν για τις μεταλλάξεις *W515K* (A) και *W515L* (B) στην ίδια αντίδραση PCR με τη μέθοδο *Allele specific*. Δείγματα θετικά για τις μεταλλάξεις εμφανίζουν δύο

ζώνες, τη ζώνη θετικού ελέγχου που έχει μέγεθος 263 bp και τη ζώνη του μεταλλαγμένου αλληλόμορφου που έχει μέγεθος 176 bp. Απεικονίζονται δύο δείγματα θετικά για την W515K, που αφορούν στον ίδιο ασθενή αλλά έχουν υποστεί διαφορετικού βαθμού αραίωση (τα **1** και **2**), και ένα δείγμα θετικό για την W515L (**6**). Στη θέση **L** αντιστοιχεί κλίμακα μεγέθους με βαθμίδες των 100 bp, ενώ σε κάθε θέση **Ng** δύο δείγματα αρνητικού ελέγχου.

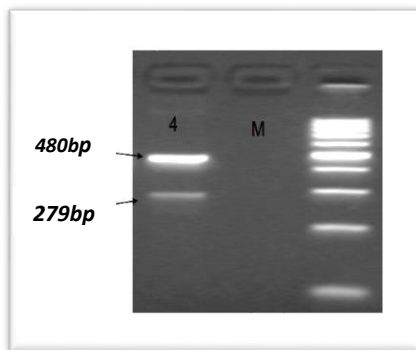
A.



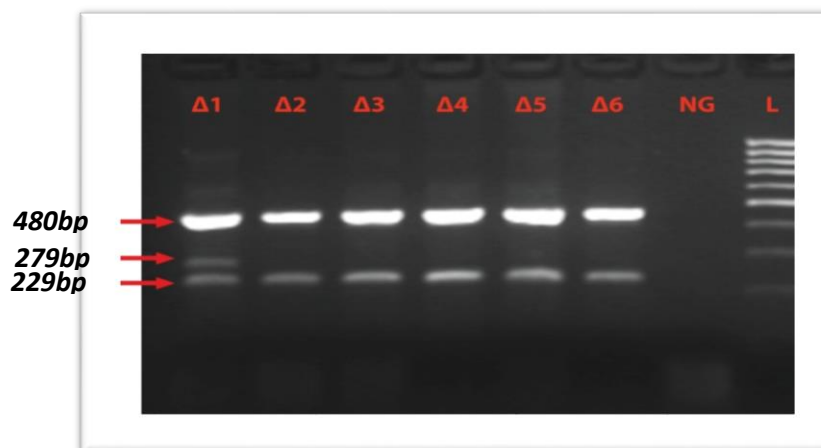
B.



Γ.



Εικόνα 22: Απεικόνιση δειγμάτων DNA θετικών για την μετάλλαξη *JAK2V617F* (ετερόζυγων, ομόζυγων) που αναγνωρίστηκαν με την τεχνική ARMS PCR, και ηλεκτροφόρηση του προϊόντος σε πηκτή αγαρόζης 3%.



Εικόνα 23: Πηκτή αγαρόζης πυκνότητας 3% w/v που απεικονίζει το αποτέλεσμα της PCR για τη σημειακή μετάλλαξη *JAK2V617F*. Δείγματα που φέρουν τη μετάλλαξη εμφανίζουν τρεις ζώνες (Δ1) ενώ δείγματα που δε φέρουν τη μετάλλαξη εμφανίζουν δύο ζώνες (Δ2-6). Δ: δείγμα, NG: αρνητικός μάρτυρας, L: μοριακός μάρτυρας DNA μεγέθους 100bp.



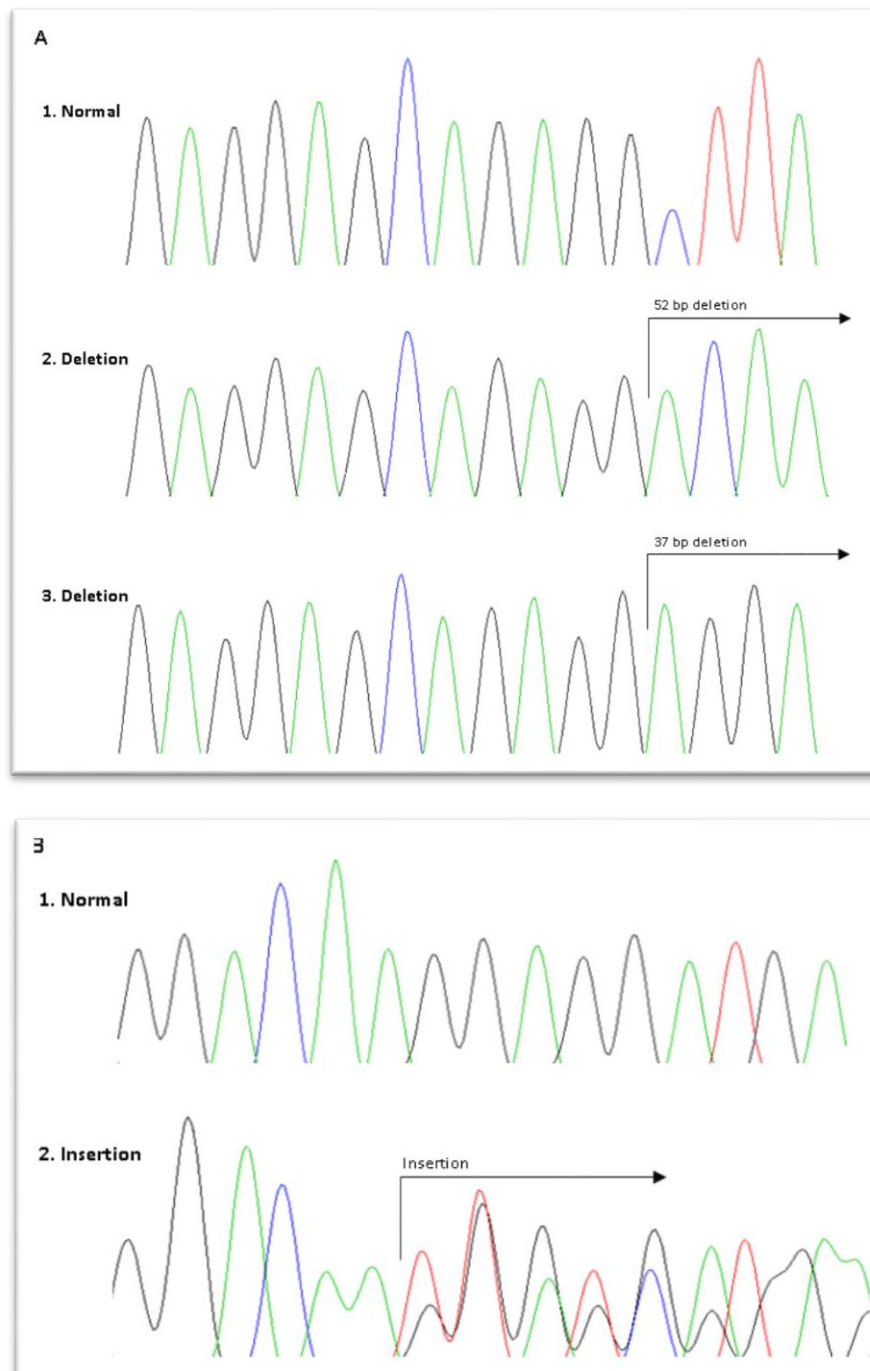
263bp
176bp

Στην **εικόνα 25** φαίνονται τα αποτελέσματα της ποιοτικής PCR για την ανάδειξη των μεταλλάξεων στο γονίδιο *CALR*. Οι θέσεις **1, 2** και **3** αντιστοιχούν σε ελλείψεις 61, 52 και 37 bp (τύπου I), η θέση **4** σε προσθήκη 5 νουκλεοτιδίων (τύπου II) ενώ η θέση **5** σε φυσιολογικό μάρτυρα. Στη θέση **6** (*NCT*) αντιστοιχεί δείγμα αρνητικού ελέγχου, ενώ στη θέση **7** (*L*) κλίμακα μεγέθους με βαθμίδες των 100 bp.



Εικόνα 25. Πηκτή αгарόζης 3% w/v που απεικονίζει το αποτέλεσμα της ποιοτικής PCR για την ενίσχυση του γονιδίου *CALR*, σε τρεις ασθενείς με ελλείψεις (deletions) 61,52 και 37 bp και σε ασθενή με προσθήκη (insertion) 5bp. Normal: φυσιολογικός μάρτυρας, NTC: αρνητικός μάρτυρας (negative control), L : μοριακά μάρτυρας DNA μεγέθους 100bp.

Στις **εικόνες 26A** και **26B** εμφανίζονται τα αποτελέσματα του προσδιορισμού της αλληλουχίας του εξονίου 9 του γονιδίου *CALR* όπως αποδίδονται από τον αυτόματο αναλυτή (μέθοδος κατά *Sanger*).



Εικόνα 26. Απόδοση της πρωτοδιάταξης του εξονίου 9 του γονιδίου *CALR* στην περίπτωση μεταλλάξεων τύπου I (26A) και τύπου II (26B). Απεικονίζονται οι δύο συχνότερες ελλείψεις των 52 και 37 bp και η προσθήκη 5bp σε σύγκριση με φυσιολογικούς μάρτυρες.

5.7 Αποτελέσματα της διερεύνησης του γενετικού υπόβαθρου των ασθενών με ΙΘ που συμμετείχαν στη μελέτη.

Στη μελέτη έλαβαν μέρος 227 ασθενείς με ΙΘ. Η μετάλλαξη *JAK2V617F* ανεδείχθη ως η συχνότερη μοριακή βλάβη ακολουθούμενη από εκείνες στην καλρετικουλίνη και τον υποδοχέα της θρομβοποιητίνης. Αναλυτικότερα, βάσει του γενετικού τους υποστρώματος, οι ασθενείς ταξινομήθηκαν στις ακόλουθες υποομάδες:

- *JAK2V617F* θετικοί (n=123 / **54,18%**)
- *CALR* θετικοί (n=48 / **21,15%**)
- *MPLW515L/K* θετικοί (n=12 / **5,29%**)
- Τριπλά αρνητικοί (triple negative) (n=44 / **19,38%**)

5.8 Στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων.

Όλες οι στατιστικές αναλύσεις έγιναν με το στατιστικό πακέτο *GraphPad Prism 4* (*GraphPad Prism v.4.00 for Windows XP, GraphPad Software, San Diego, California, USA*). Οι τιμές των συνεχών μεταβλητών εμφανίζονται ως μέσες τιμές $\pm$ το τυπικό σφάλμα του μέσου όρου (standard error mean, SEM).

Οι διαφορές στην κατανομή των συνεχών μεταβλητών μεταξύ των διαφόρων κατηγοριών που αναλύθηκαν, αξιολογήθηκαν με μη παραμετρικές δοκιμασίες· είτε με τη δοκιμασία Mann–Whitney, όταν επρόκειτο για σύγκριση των δύο ομάδων, ή με τη δοκιμασία Kruskal–Wallis, όταν επρόκειτο για σύγκριση τριών ή περισσότερων ομάδων. Οι ομάδες ασθενών με ονομαστικές μεταβλητές συγκρίθηκαν με τη μέθοδο χ^2 . Επίσης, ελέγχθηκε η πιθανή συσχέτιση μεταξύ του αριθμού των λευκών αιμοσφαιρίων, του αριθμού των αιμοπεταλίων, του αιματοκρίτη και/ή της ποσότητας αιμοσφαιρίνης με την πιθανότητα εκδήλωσης θρόμβωσης ανάμεσα στις διάφορες ομάδες ασθενών. Οι τιμές των μεταβλητών που μελετήθηκαν δεν είχαν κανονική κατανομή, και ως στατιστική μέθοδος ανάλυσης χρησιμοποιήθηκε η μη παραμετρική ανάλυση Spearman (Spearman rank, r).

Η σύγκριση μεταξύ των αιματολογικών παραμέτρων σε ασθενείς θετικούς ή αρνητικούς για την μετάλλαξη *JAK2V617F* και η συσχέτιση αυτών και με τις μεταλλάξεις στο εξόνιο 10 του γονιδίου *MPL* και με τις μεταλλάξεις στο γονίδιο της *CALR* αξιολογείται με τον δείκτη p-value. Το p-value είναι δείκτης αξιοπιστίας ενός αποτελέσματος και δείχνει την στατιστική σημαντικότητα του. Συγκεκριμένα αντιπροσωπεύει την πιθανότητα λάθους που περιλαμβάνεται στην αποδοχή του παρατηρηθέντος αποτελέσματος. Η τιμή p-value-0,05, είναι η διαχωριστική γραμμή

ως αποδεκτό ‘‘επίπεδο λάθους’’, με τιμές μικρότερες να δηλώνουν ότι το αποτέλεσμα είναι στατιστικά σημαντικό.

5.9 Επιδημιολογικά, εργαστηριακά και κλινικά χαρακτηριστικά των πασχόντων από ΙΘ, κατανεμημένων στις τέσσερις μοριακές υποομάδες.

Τα επιμέρους χαρακτηριστικά κάθε υποομάδας και η καταγραφή των θρομβωτικών επεισοδίων αποδίδονται αναλυτικότερα στους πίνακες 8 και 9 αντίστοιχα.

ΙΘ				
(n=227)				
	<i>JAK2V617F</i>	<i>CALR</i>	<i>MPLW515L/K</i>	<i>Triple Negative</i>
Ασθενείς n (%)	123 (54,18%)	48 (21,15%)	12 (5,29%)	44 (19,38%)
Γυναίκες n (%)	72(58,5%)	20 (41,67%)	6 (50%)	27 (61,36%)
Ανδρές n (%)	51 (41,5%)	28 (58,33%)	6 (50%)	17 (38,64%)
Ηλικία (έτη)	59,20 (±14,78)	52,94 (±18,34)	69,33(±9,604)	57,70 (±14,34)
Λευκά x10⁹/L	11,295 (±4,064)	8,995 (±1,419)	12,559 (±7,787)	8,604 (±1,297)
Αιματοκρίτης (%)	44,49 (±3,158)	40,77 (±1,938)	40,28 (±2,164)	41,19 (±2,082)
Αιμοπετάλια x10⁹/L	685,395(±180,993)	948,875 (±165,781)	788,5 (±304,655)	931,045(±138,831)

Πίνακας 8. Ταξινόμηση των 227 ασθενών ανά μοριακή βλάβη, επιδημιολογικά και εργαστηριακά χαρακτηριστικά.

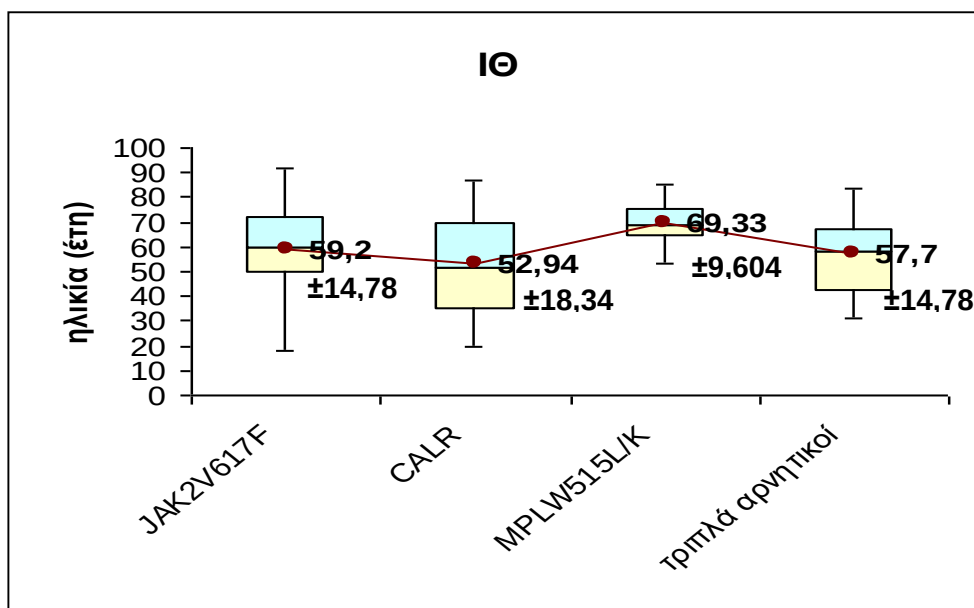
ΙΘ						
(n=227)						
	<i>JAK2V617F</i> ομόζυγοι (n=8)	<i>JAK2V617F</i> ετερόζυγοι (n=115)	<i>JAK2V617F</i> θετικοί (n=123)	<i>W55K/L</i> θετικοί (n=12)	<i>CALR</i> θετικοί (n=48)	<i>Triple Negative</i> (n=44)
Θρόμβωση	3 (37,5%)	23 (20%)	26 (21,15%)	2 (16,67%)	4(8,33%)	3 (6,81%)
Αρτηριακή	2 (25%)	19 (16,52%)	21 (17,07%)	2(16,67%)	2(4,16%)	2 (4,54%)
Φλεβική	1 (12,5%)	4 (3,48%)	5 (4,07%)	0 (0%)	2(4,16%)	1 (2,27%)
Όχι γνωστό συμπάν θρόμβωσης	5 (62,5%)	92 (80,00%)	97 (78,86%)	10 (83,33%)	44(91,67%)	41(93,18%)

Πίνακας 9. Καταγεγραμμένα επεισόδια θρόμβωσης (αρτηριακής-φλεβικής) ανά υποομάδα. Στους *JAK2V617F* θετικούς ασθενείς έχει γίνει διάκριση ομοζυγωτίας και ετεροζυγωτίας.

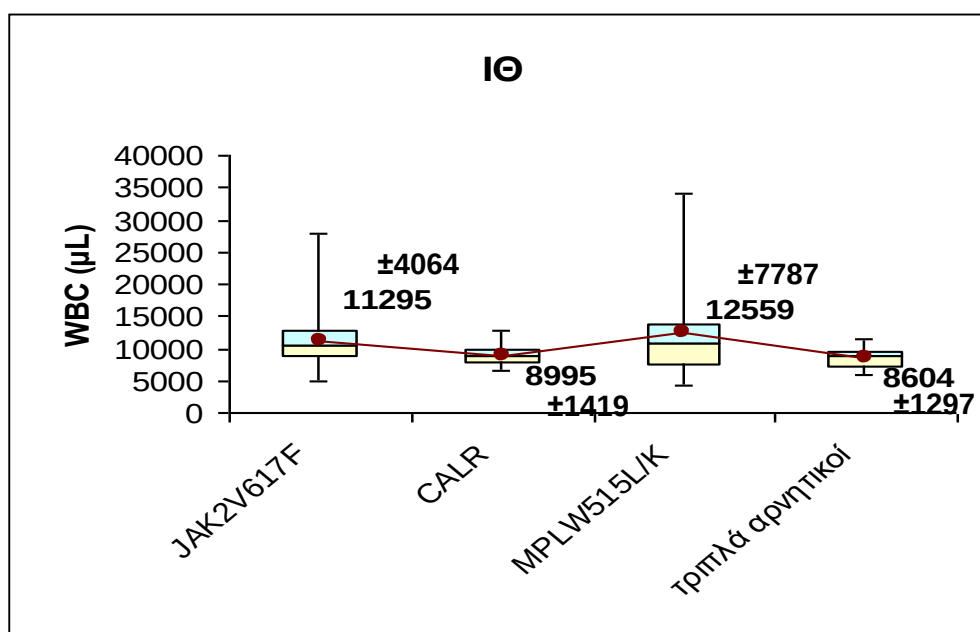
Από τα παραπάνω δεδομένα προκύπτουν κάποια αρχικά συμπεράσματα, έχοντας πάντα υπόψιν το χαμηλό αριθμό των *MPLW515L/K* θετικών ασθενών ($n=12$). Ειδικότερα, οι μεταλλάξεις *JAK2V617F* και *MPLW515L/K* σχετίζονται με μεγαλύτερη ηλικία εμφάνισης της νόσου σε σχέση με εκείνες στην καλρετικουλίνη και τους τριπλά αρνητικούς ασθενείς ($59,20 \pm 14,18$ και $69,33 \pm 9,604$ έτη έναντι $52,94 \pm 18,34$ και $57,70 \pm 14,34$ αντίστοιχα), μεγαλύτερο αριθμό λευκών αιμοσφαιρίων ($11,295 \pm 4,064$ και $12,559 \pm 7,787 \times 10^9/L$ έναντι $8,995 \pm 1,419$ και $8,604 \pm 1,297 \times 10^9/L$ αντίστοιχα) και μεγαλύτερο κίνδυνο θρομβώσεων ($21,15\%$ και $16,67\%$ έναντι $8,33\%$ και $6,81\%$ αντίστοιχα). Αντίθετα, οι ομάδες της καλρετικουλίνης και των τριπλά αρνητικών ασθενών χαρακτηρίζονται από εντονότερη θρομβοκυττάρωση σε σύγκριση με τους *JAK2V617F* και *MPLW515L/K* θετικούς ($948,875 \pm 165,781$ και $931,045 \pm 138,831 \times 10^9/L$ έναντι $685,395 \pm 180,993$ και $788,5 \pm 304,655 \times 10^{12}/L$ αντίστοιχα). Τέλος, οι τιμές του αιματοκρίτη ήταν μεγαλύτερες στους *JAK2V617F* θετικούς ασθενείς σε σύγκριση με όλες τις υπόλοιπες ομάδες ($44,49 \pm 3,158\%$ έναντι $40,77 \pm 1,938\%$ στους *CALR*, $40,28 \pm 2,164\%$ στους *MPLW515L/K* θετικούς και $41,19 \pm 2,082\%$ στους τριπλά αρνητικούς).

5.10 Ηλικία, αριθμός λευκών αιμοσφαιρίων, αιμοπεταλίων και τιμή αιματοκρίτη σε πάσχοντες από ΙΘ, ανάλογα με τη μοριακή βλάβη.

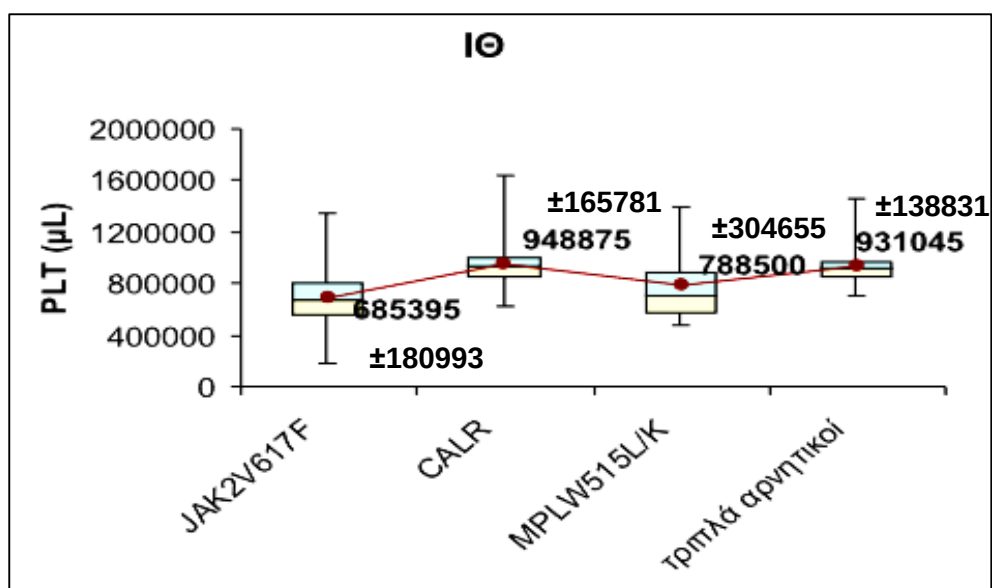
Η στατιστική ανάλυση της ηλικίας και των προαναφερόμενων εργαστηριακών παραμέτρων σε σχέση με το μοριακό προφίλ των ασθενών αποδίδεται στα διαγράμματα 1 έως 4. Αναλυτικότερα, όσον αφορά στην ηλικία, οι *MPLW515L/K* θετικοί ασθενείς ήταν μεγαλύτεροι σε σχέση τόσο με τους *JAK2V617F* θετικούς ($P=0,0185$) όσο και με τους *CALR* θετικούς ($P=0,0066$) και τους τριπλά αρνητικούς ($P=0,0118$) (διάγραμμα 1). Ο αριθμός των λευκών αιμοσφαιρίων ήταν μεγαλύτερος στις ομάδες των μεταλλαγμένων *JAK2V617F* και *MPLW515L/K*. Παρ'όλα αυτά, στατιστικά σημαντικές ήταν οι διαφορές μεταξύ *JAK2V617F* και *CALR* ($P=0,0001$), *JAK2V617F* και τριπλά αρνητικών ασθενών ($P<0,0001$) και *MPLW515L/K* και τριπλά αρνητικών ($P=0,0436$) (διάγραμμα 2). Τα αιμοπετάλια ήταν περισσότερα στην ομάδα των *CALR* θετικών ασθενών σε σχέση με τους *JAK2V617F* ($P<0,0001$) και τους *MPLW515L/K* θετικούς ($P=0,0036$) και περισσότερα στην ομάδα των τριπλά αρνητικών ασθενών σε σχέση με τους *JAK2V617F* θετικούς ($P<0,0001$) και τους *MPLW515L/K* θετικούς ($P=0,0046$). Μεταξύ *CALR* θετικών και τριπλά αρνητικών ασθενών δεν υπήρχε σαφές προβάδισμα ($P=0,5266$) (διάγραμμα 3). Τέλος, ο αιματοκρίτης ήταν μεγαλύτερος στους *JAK2V617F* θετικούς ασθενείς σε σχέση με τις υπόλοιπες ομάδες ($P<0,0001$) οι οποίες δεν εμφανίζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ τους (διάγραμμα 4).



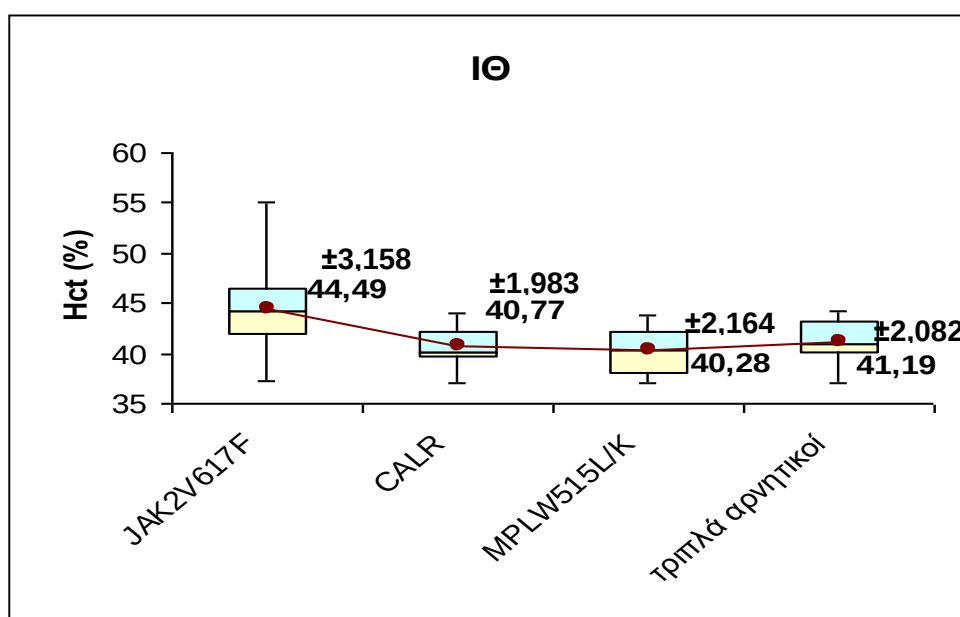
Διάγραμμα1. Το θηκόγραμμα (*box plot*) αποδίδει την ηλικιακή κατανομή στις τέσσερις γενετικά καθοριζόμενες ομάδες. Παρατηρείται η μεγαλύτερη ηλικία νόσησης των *MPLW515L/K* θετικών ασθενών, που ήταν στατιστικά σημαντική ($Pvalue=0,0106$)



Διάγραμμα 2. Είναι εμφανής η μεγαλύτερη λευκοκυττάρωση στην ομάδα των *JAK2V617F* και *MPLW515L/K* θετικών ασθενών σε σχέση με τις υπόλοιπες δύο ομάδες ($Pvalue <0,0001$).



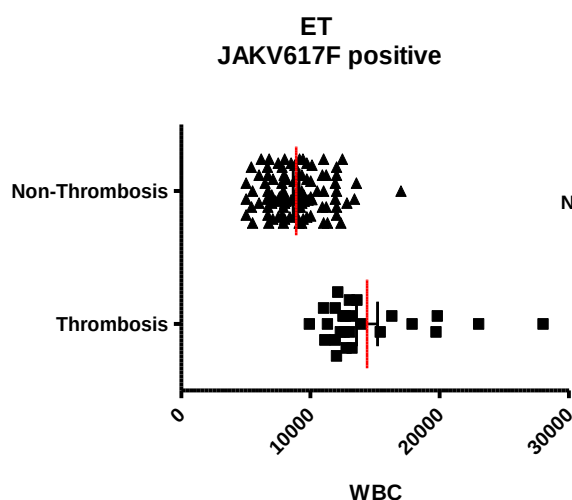
Διάγραμμα 3. Η θρομβοκυττάρωση είναι μεγαλύτερη παρουσία μεταλλάξεων στην καλρετικουλίνη, καθώς και στους τριπλά αρνητικούς ασθενείς (Pvalue <0,0001). Οι φυσιολογικές τιμές των αιμοπεταλίων έχουν αποδοθεί ανά μL.



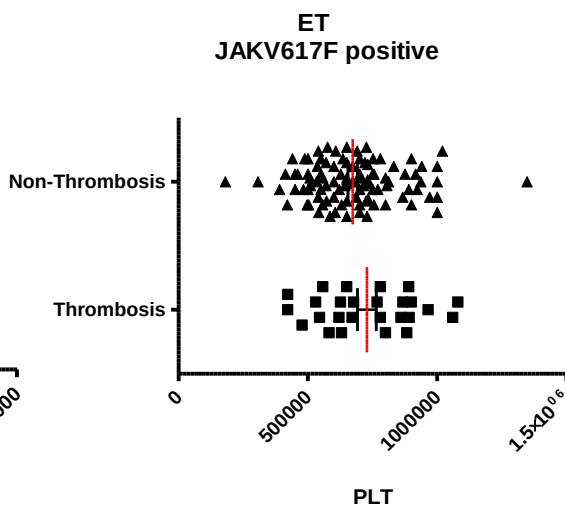
Διάγραμμα 4. Στους JAK2V617F θετικούς ασθενείς σημειώνονται οι μεγαλύτερες τιμές αιματοκρίτη σε σύγκριση με όλους τους υπόλοιπους (Pvalue <0,0001).

5.11 Η μετάλλαξη *JAK2V617F* και ο κίνδυνος θρομβωτικού επεισοδίου.

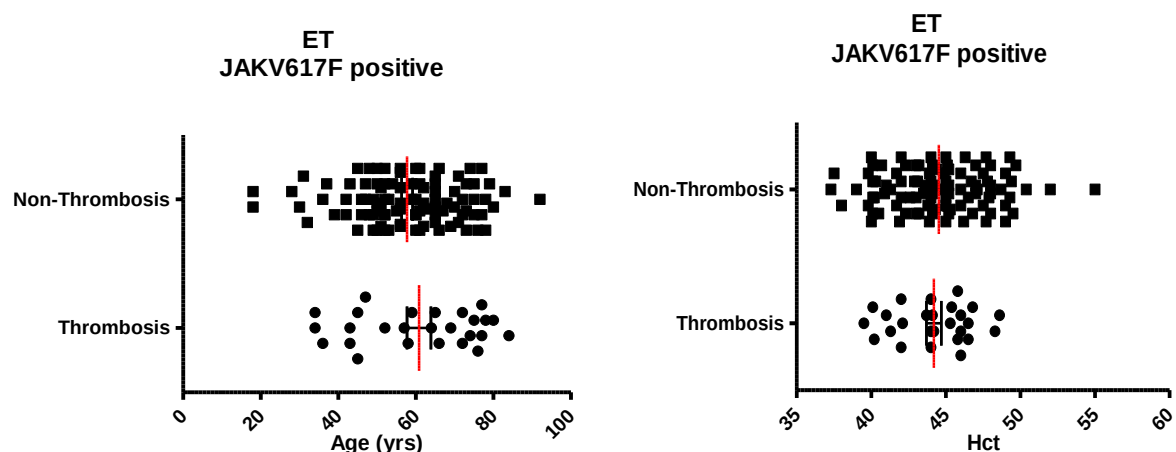
Σχετικά με τα επεισόδια θρόμβωσης, όπως φαίνεται από τον πίνακα 9 καταγράφηκαν 26 στην ομάδα των *JAK2V617F* θετικών ασθενών έναντι 2 στην ομάδα των *MPLW515K/L* θετικών, 4 στην ομάδα των *CALR* θετικών και 3 στους τριπλά αρνητικούς. Λαμβάνοντας υπόψιν το συνολικό αριθμό ασθενών σε κάθε ομάδα τα ποσοστά που διαμορφώνονται είναι **21,15%**, **16,67%**, **8,33%** και **6,81%** αντίστοιχα. Οι *JAK2V617F* θετικοί ασθενείς φέρονται να εμφανίζουν καθ'υπεροχήν αρτηριακές θρομβώσεις (17,07% έναντι 4,07% των φλεβικών). Οι ασθενείς αυτοί ταξινομήθηκαν και σύμφωνα με την κατάσταση ομοζυγωτίας ή ετεροζυγωτίας του παθολογικού αλληλίου, αλλά το μεγαλύτερο ποσοστό θρομβώσεων στους ομοζυγώτες (37,5% έναντι 20%) είναι δύσκολο να εκτιμηθεί λόγω του μικρού αριθμού τους ($n=8$). Στην ομάδα αυτή έγινε συσχέτιση του κινδύνου θρόμβωσης με τον αριθμό των λευκών, των αιμοπεταλίων, του αιματοκρίτη και της ηλικίας (**διαγράμματα 5-8**). Οι ασθενείς με ιστορικό θρόμβωσης είχαν μεγαλύτερο αριθμό λευκών αιμοσφαιρίων από εκείνους χωρίς θρόμβωση ($P<0,0001$) ενώ οι υπόλοιπες παράμετροι δεν ανέδειξαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των δύο υποσυνόλων.



Διάγραμμα 5. Στους *JAK2V617F* θετικούς ασθενείς, εκείνοι χωρίς θρομβωτικό επεισόδιο είχαν μικρότερο αριθμό λευκών αιμοσφαιρίων ($P\text{value} < 0,0001$).



Διάγραμμα 6. Στους *JAK2V617F* θετικούς ασθενείς οι τιμές των αιμοπεταλίων δεν εμφανίζουν στατιστικά σημαντική διαφορά σε σχέση με την παρουσία θρόμβωσης ή όχι ($P\text{value} = 0,2029$).



Διάγραμμα 7. Στους *JAK2V617F* θετικούς ασθενείς η ηλικία κατά τη διάγνωση δε συσχετίζεται με το ιστορικό θρόμβωσης (Pvalue= 0,3244).

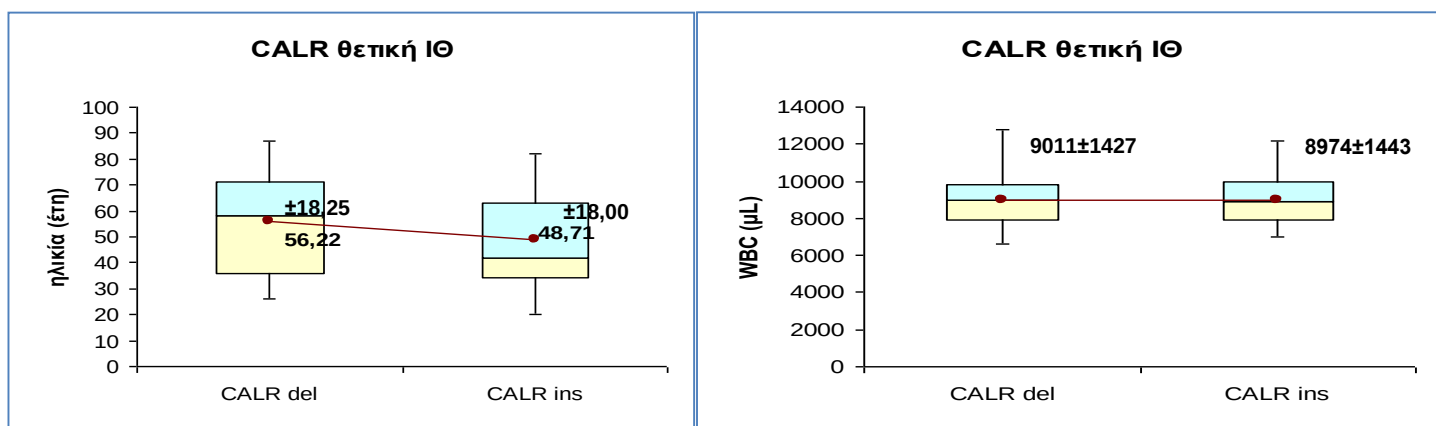
Διάγραμμα 8. Στους *JAK2V617F* θετικούς ασθενείς η τιμή του αιματοκρίτη δεν εμφανίζει στατιστικά σημαντική διαφορά σε σχέση με την παρουσία θρόμβωσης ή όχι (Pvalue= 0,7780).

5.12 *CALR* θετική ΙΘ: επιδημιολογικά, εργαστηριακά και κλινικά χαρακτηριστικά ανάλογα με τον τύπο της μετάλλαξης.

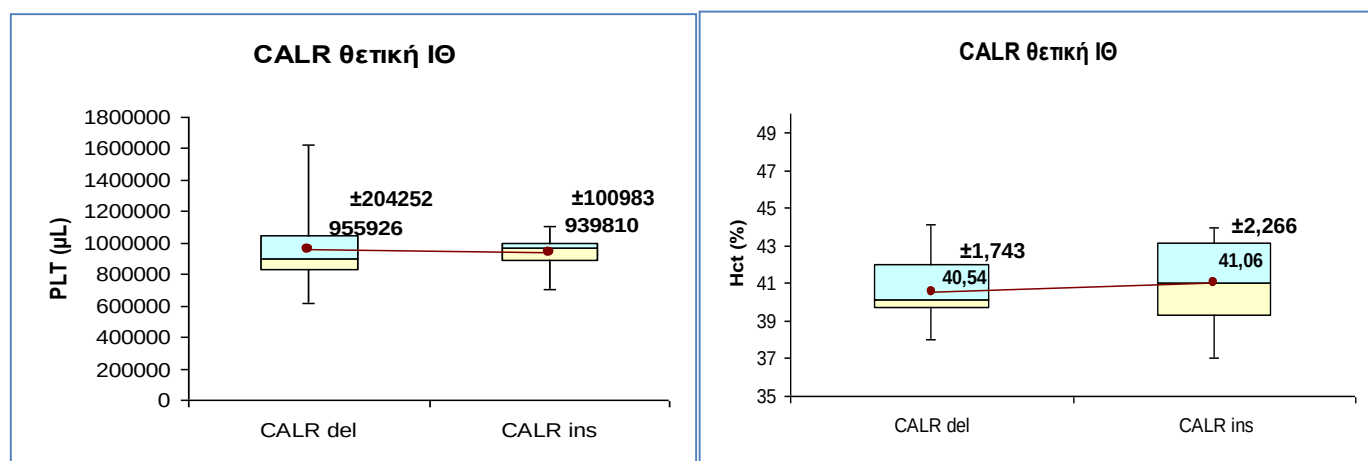
Τέλος, μελετήθηκαν εκτενέστερα τα χαρακτηριστικά των 48 *CALR* θετικών ασθενών, οι οποίοι ταξινομήθηκαν ανάλογα με τον τύπο της βλάβης σε *CALR del* και *CALR ins* (πίνακας 10). Η ηλικία εμφάνισης της νόσου, τα λευκά αιμοσφαίρια, τα αιμοπετάλια και ο αιματοκρίτης δεν εμφάνισαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των δύο συνόλων (διαγράμματα 9-12).

<i>CALR</i> θετική Ιδιοπαθής Θρομβοκυτταραιμία		
(n=48)		
	<i>CALR del</i>	<i>CALR ins</i>
Ασθενείς n (%)	27 (56,25%)	21 (43,75%)
Γυναίκες n (%)	10 (37,04%)	10 (47,62%)
Ανδρές n (%)	17 (62,96%)	11 (52,38%)
Ηλικία (έτη)	56,22 (±18,25)	48,71 (±18,00)
Λευκά x10 ⁹ /L	9,011 (±1,427)	8,974 (±1,443)
Αιματοκρίτης (%)	40,54 (±1,743)	41,06 (±2,266)
Αιμοπετάλια x10 ⁹ /L	955,926(±204,252)	939,810 (±100,983)

Πίνακας 10. *CALR* θετική ΙΘ. Επιδημιολογικά και εργαστηριακά χαρακτηριστικά των ασθενών ανάλογα με τον τύπο της μετάλλαξης (*CALR del*:βλάβες τύπου I, *CALR ins*:βλάβες τύπου II).



Διαγράμματα 9-10. Στην *CALR* θετική ΙΘ η ηλικία και ο αριθμός των λευκών δεν εμφανίζουν στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των δύο τύπων της βλάβης (Pvalue 0,1974, 0,9172 αντίστοιχα).



Διαγράμματα 11-12. Στην *CALR* θετική ΙΘ, οι τύποι της μετάλλαξης δεν εμφανίζουν στατιστικά σημαντική διαφορά όσον αφορά στον αριθμό των λευκών αιμοσφαιρίων και την τιμή του αιματοκρίτη (Pvalue 0,5535 και 0,3758 αντίστοιχα).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.

Στην παρούσα μελέτη αρχικά διερευνήθηκε το γενετικό υπόστρωμα 227 πασχόντων από ΙΘ και στη συνέχεια έγινε συσχέτιση του μοριακού τους προφίλ με εργαστηριακά χαρακτηριστικά, την ηλικία νόσησης και τον κίνδυνο θρομβωτικού επεισοδίου.

Συνοψίζοντας, η παρούσα μελέτη:

- Επιβεβαίωσε την υψηλή αντιπροσώπευση μεταλλάξεων στην καλρετικουλίνη ανάμεσα στους *JAK2V617F* και *W515K/L* αρνητικούς ασθενείς με ΙΘ (21,15% επί του συνόλου). Το ποσοστό αυτό ήταν παραπλήσιο με το αντίστοιχο της ομάδας των τριπλά αρνητικών ασθενών (19,38%).
- Επιβεβαίωσε ότι κάθε μετάλλαξη σχετίζεται με διαφορετική εργαστηριακή και κλινική εικόνα:
 - Οι μεταλλάξεις σε *JAK2* και *MPL* σχετίζονται με μεγαλύτερη ηλικία νόσησης σε σχέση με εκείνες στην καλρετικουλίνη και τους τριπλά αρνητικούς ασθενείς.
 - Η μετάλλαξη *JAK2V617F* συνοδεύεται από μεγαλύτερες τιμές αιματοκρίτη συγκριτικά με τις μεταλλάξεις σε *MPL*, *CALR* και την ομάδα των τριπλά αρνητικών ασθενών. Επίσης, οι ασθενείς αυτοί, μαζί με τους *W515K/L* θετικούς εμφανίζουν υψηλότερο αριθμό λευκών αιμοσφαιρίων.
 - Οι μεταλλάξεις στην καλρετικουλίνη χαρακτηρίζονται από μεγαλύτερο αριθμό αιμοπεταλίων σε σχέση με εκείνες σε *JAK2* και *MPL* και παραπλήσιο αριθμό αιμοπεταλίων με την ομάδα των τριπλά αρνητικών ασθενών.
 - Μεταξύ των ασθενών με μεταλλάξεις στην καλρετικουλίνη, ο τύπος της βλάβης (τύπου *I/del* ή τύπου *II/ins*) δε σχετίζεται με στατιστικά σημαντική διαφορά με την ηλικία διάγνωσης της νόσου ή τα εργαστηριακά χαρακτηριστικά.
 - Οι *CALR* θετικοί ασθενείς μοιάζουν με τους τριπλά αρνητικούς όσον αφορά στις τιμές αιματοκρίτη, λευκών αιμοσφαιρίων και αιμοπεταλίων, τη μικρή ηλικία κατά τη διάγνωση και τα χαμηλά ποσοστά θρομβώσεων. Αντίθετα, οι ασθενείς αυτοί ήταν καθ'υπεροχήν άνδρες (58,33%), ενώ στην ομάδα των τριπλά αρνητικών η πλειοψηφία των ασθενών ήταν γυναίκες (61,36%).
- Επιβεβαίωσε ότι τα θρομβωτικά επεισόδια είναι συχνότερα στους *JAK2V617F* θετικούς ασθενείς σε σχέση με όλες τις υπόλοιπες ομάδες. Στους ασθενείς

αυτούς, βρέθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση των θρομβώσεων μόνο με τον αριθμό των λευκών αιμοσφαιρίων και όχι με την ηλικία, την τιμή των αιμοπεταλίων ή του αιματοκρίτη.

6.1 Σύγκριση των αποτελεσμάτων με δεδομένα από τη διεθνή βιβλιογραφία.

Ο κλινικός αντίκτυπος του γενετικού υποστρώματος στην ΙΘ αποτελεί αντικείμενο μελέτης πολύ πριν από την ανακάλυψη των μεταλλάξεων στην *CALR*. Μια από τις πρώτες προοπτικές μελέτες έγινε από τον *Campbell* και τους συνεργάτες του και αφορούσε ένα σύνολο 776 ασθενών που είχαν ενσωματωθεί στη μελέτη *PT1*¹. Παρατηρήθηκε ότι η μετάλλαξη στο κωδικόνιο 617 προκαλεί φαινότυπο «αληθούς πολυκυτταραιμίας», με μεγαλύτερες τιμές αιματοκρίτη και λευκών αιμοσφαιρίων και χαμηλότερες τιμές αιμοπεταλίων σε σχέση με ασθενείς χωρίς ανευρισκόμενη μοριακή βλάβη^{1,17}. Ακόλουθες μελέτες επιβεβαίωσαν τα ίδια ευρήματα σε σύγκριση με τη μετάλλαξη στον *c-MPL*, η οποία επίσης συμπεριφερόταν όπως η ομάδα χωρίς μοριακή βλάβη, με χαμηλότερες τιμές αιματοκρίτη και μεγαλύτερες τιμές αιμοπεταλίων σε σύγκριση με τους *JAK2V617F* θετικούς ασθενείς (*Kittur, 2007, Vannucchi, 2008*). Επιπλέον, η *JAK2V617F* είχε συνδεθεί με αυξημένο κίνδυνο θρομβώσεων (*Martchetti, 2008, Lussana, 2009, De Stefano, 2010*) αν και σύμφωνα με άλλους ερευνητές ο κίνδυνος αυτός αποδόθηκε στη συνοδεύουσα λευκοκυττάρωση (*Carrobbio, 2007, Hexner, 2007, Iyayi 2011*). Η μεταγενέστερη ανακάλυψη των μεταλλάξεων στο γονίδιο της καλρετικουλίνης μετατόπισε τη σύγκριση κυρίως μεταξύ *JAK2* και *CALR* θετικών ασθενών, λόγω του χαμηλού ποσοστού των *c-MPL* θετικών.

Όσον αφορά στην καλρετικουλίνη, ήδη οι δύο πρωτοποριακές δημοσιεύσεις των *Nangalia* και *Kampfl* κάνουν λόγο για διαφορετικό φαινότυπο αυτών των ασθενών σε σχέση με τους *JAK2* θετικούς. Στη μελέτη του *Nangalia* έλαβαν μέρος 151 ασθενείς με μυελοϋπερπλαστικό νόσημα, εκ των οποίων οι 62 έπασχαν από ΙΘ. Από αυτούς, 35 ήταν θετικοί για τη μετάλλαξη στο *JAK2*, 5 θετικοί για μεταλλάξεις στον *cMPL* και 21 θετικοί για μεταλλάξεις στην καλρετικουλίνη. Η τελευταία ομάδα, συγκρινόμενη με τους *JAK2* θετικούς, βρέθηκε να εμφανίζει χαμηλότερες τιμές αιματοκρίτη ($P:0,02$), μεγαλύτερες τιμές αιμοπεταλίων ($P:0,0003$) και μεγαλύτερη πιθανότητα εκτροπής σε μυελοϊνωση ($P:0,03$). Παρ'όλα αυτά, μεταξύ των ασθενών με ΠΜ, οι *CALR* θετικοί είχαν πλεονέκτημα όσον αφορά στην επιβίωση ($P:0,02$)⁴⁸.

Η ομάδα του *Kampfl*, για να εξετάσει τη συσχέτιση των μοριακών βλαβών με το φαινότυπο, συμπεριέλαβε στη μελέτη της συνολικά 1215 ασθενείς με ΙΘ και ΠΜ. Από αυτούς, οι 814 έπασχαν από ΙΘ. Μεταλλάξεις στα μόρια *JAK2*, *cMPL* και *CALR* βρέθηκαν στους 581, 35 και 186 αντίστοιχα, ενώ οι υπόλοιποι 92 ήταν τριπλά αρνητικοί. Οι ασθενείς με μεταλλάξεις στην καλρετικουλίνη είχαν μικρότερο αιματοκρίτη, λιγότερα λευκά αιμοσφαίρια και μεγαλύτερο αριθμό αιμοπεταλίων σε

σχέση με τους *JAK2* θετικούς ($P < 0,001$ και για τις τρεις παραμέτρους). Να σημειωθεί ότι τα δύο τελευταία ευρήματα επιβεβαιώθηκαν και στην ΠΜ ($P = 0,03$ και $< 0,001$ αντίστοιχα). Μάλιστα, στη μυελοϊνωση η παρουσία *CALR* μεταλλάξεων συσχετίστηκε με μεγαλύτερη επιβίωση σε σύγκριση με εκείνες σε *JAK2* και *cMPL* ($P < 0,001$). Στους ασθενείς με ΙΘ αντίθετα η επιβίωση των *CALR* θετικών ασθενών εμφάνισε στατιστική σημασία ($P: 0,04$) μόνο συγκρινόμενη με την *JAK2V617F*. Επίσης, στην ομάδα αυτή ο κίνδυνος θρόμβωσης ήταν μικρότερος σε σχέση με τους *JAK2* θετικούς ($P = 0,003$)⁴⁹.

Τα ευρήματα αυτά έχουν επιβεβαιωθεί και από άλλους ερευνητές, εκτός από τον αυξημένο κίνδυνο εκτροπής σε μυελοϊνωση που ανέδειξε η ομάδα του *Nangalia* για τους *CALR* θετικούς ασθενείς με ΙΘ. Η ομάδα της *Rumi* συνέκρινε 466 *CALR* θετικούς και 176 *JAK2* θετικούς ασθενείς αντίστοιχα. Οι πρώτοι ήταν νεότεροι σε ηλικία ($P = 0,01$) και είχαν μικρότερες τιμές αιματοκρίτη και λευκών αιμοσφαιρίων, αλλά μεγαλύτερες τιμές αιμοπεταλίων και επιπέδων ερυθροποιητίνης ορού ($P = 0,01$). Αντίθετα, ο κίνδυνος θρόμβωσης ανάμεσα στις δύο ομάδες ήταν πανομοιότυπος ($P = 0,8$)⁵⁸.

Ο *Tefferi* και οι συνεργάτες του εξετάζοντας μια ομάδα 399 ασθενών με ΙΘ, επιβεβαίωσαν ότι οι *CALR* θετικοί (32%) ήταν νεότεροι σε ηλικία ($P = 0,002$), με επικράτηση του άρρενος φύλου ($P = 0,01$). Επίσης, παρουσίαζαν μεγαλύτερο αριθμό αιμοπεταλίων ($P = 0,0004$), χαμηλότερες τιμές αιμοσφαιρίνης ($P = 0,0004$) και λευκών ($P = 0,02$), και μικρότερο κίνδυνο επαναλαμβανόμενων θρομβώσεων ($P = 0,04$). Η ομάδα των τριπλά αρνητικών ασθενών είχε πανομοιότυπα χαρακτηριστικά όσον αφορά τη νεαρότερη ηλικία, τις τιμές αιμοσφαιρίνης, λευκών αιμοσφαιρίων και τον κίνδυνο θρόμβωσης. Ταυτόχρονα, η ομάδα αυτή είχε τη μεγαλύτερη επιβίωση, με τη μικρότερη να παρατηρείται στους *cMPL* θετικούς ασθενείς. Ο κίνδυνος λευχαιμικής και ινωτικής εκτροπής και η επιβίωση δε διέφερε μεταξύ των *CALR* και *JAK2* θετικών⁶⁰. Αντίθετα, στην ΠΜ η επιβίωση ήταν μεγαλύτερη στους *CALR* θετικούς και χειρότερη στους τριπλά αρνητικούς ασθενείς^{59,61}.

Η *Rotunno* και οι συνεργάτες της εξέτασαν 576 ασθενείς με ΙΘ καταλήγοντας στα ίδια συμπεράσματα όσον αφορά στη διαφορετική ηλικία, το φύλο και τις αιματολογικές παραμέτρους των ασθενών ανάλογα με την ανευρισκόμενη μοριακή βλάβη. Συγκεκριμένα, βρήκαν ότι η μετάλλαξη *JAK2V617F* συνδέεται με μεγαλύτερη ηλικία νόσησης σε σχέση με τις άλλες δύο βλάβες και τους τριπλά αρνητικούς ασθενείς. Όσοι εμφάνιζαν μεταλλάξεις στην καλρετικουλίνη ήταν κατεξοχήν άνδρες χωρίς κάτι τέτοιο να παρατηρείται στις υπόλοιπες ομάδες. Τα αιμοπετάλια ήταν περισσότερα στους *CALR* και *cMPL* θετικούς, ενώ τα λευκά αιμοσφαίρια, ο αιματοκρίτης και η αιμοσφαιρίνη παρουσίαζαν υψηλότερες τιμές στους *JAK2* θετικούς, χωρίς στατιστική διαφορά στις υπόλοιπες ομάδες, συμπεριλαμβανομένων των τριπλά αρνητικών. Η τελευταία αυτή κατηγορία είχε χαμηλότερα επίπεδα γαλακτικής αφυδρογονάσης ($P < 0,001$) και χαμηλότερα ποσοστά ψηλαφητής σπληνομεγαλίας σε σχέση με την ύπαρξη οποιασδήποτε μετάλλαξης ($P < 0,01$). Επίσης, οι τριπλά αρνητικοί ασθενείς καθώς και οι *CALR* θετικοί εμφάνιζαν τη μακρύτερη επιβίωση απουσία θρόμβωσης ($P = 0,008$). Η μελέτη αυτή επιβεβαίωσε και παλαιότερες έρευνες σύμφωνα με τις

οποίες μεταλλάξεις στον υποδοχέα της θρομβοποιητίνης σχετίζονται με μεγαλύτερη εμφάνιση μικροαγγειακών συμπτωμάτων ($P<0,01$)⁶².

Επίσης, ο **Chen** και οι συνεργάτες του τονίζουν το χαμηλότερο θρομβωτικό κίνδυνο των *CALR* θετικών ασθενών, που μαζί με τη νεαρή ηλικία (<65 ετών) και τον αριθμό αιμοπεταλίων ($<1.000 \times 10^9/L$) αποτελούν ανεξάρτητους παράγοντες για επιβίωση χωρίς θρόμβωση⁶³. Ο **Yang** επίσης συνέκρινε τα κλινικά χαρακτηριστικά ασθενών με ΙΘ και κατέληξε ότι οι *CALR* θετικοί ήταν καθ'υπεροχήν άνδρες ($P<0,001$) και είχαν μικρότερο θρομβωτικό κίνδυνο σε σχέση με τους *JAK2V617F* θετικούς ($P<0,001$). Δε βρέθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά όσον αφορά στα αιμορραγικά επεισόδια και το βαθμό της σπληνομεγαλίας. Επίσης, οι δύο ομάδες είχαν παραπλήσια ποσοστά ολικής επιβίωσης ($P=0,854$), παρά τη μεγαλύτερη ελεύθερη θρόμβωσης επιβίωση των *CALR* θετικών ($P=0,005$)⁶⁶.

Η **Palandri** και οι συνεργάτες της, σε μια ομάδα 217 νεαρών ασθενών (<40 ετών) με ΙΘ και προϋνωτική ΠΜ βρήκε ότι οι μεταλλάξεις στην καλρετικουλίνη συνδέονται με υψηλότερο αριθμό αιμοπεταλίων και χαμηλότερη αιμοσφαιρίνη σε σύγκριση με την *JAK2V617F*. Βρήκε επίσης ότι συνδέονται με χαμηλότερο θρομβωτικό κίνδυνο ($P=0,04$) και μεγαλύτερη επιβίωση ($P=0,05$)⁶⁷. Η **Andrikovics** επίσης επιβεβαίωσε τη συσχέτιση της καλρετικουλίνης με μικρότερη ηλικία νόσησης, υψηλότερο αριθμό αιμοπεταλίων και χαμηλότερο κίνδυνο θρόμβωσης. Η επιβίωση των ασθενών με ΙΘ δεν ήταν μεγαλύτερη, σε αντίθεση με ό,τι συμβαίνει στην ΠΜ όπου η παρουσία *CALR* μεταλλάξεων βελτιώνει την επιβίωση συγκρινόμενη με την *JAK2V617F* ($P=0,04$) και τους τριπλά αρνητικούς ασθενείς ($P=0,01$). Επίσης, σύμφωνα με την ίδια έρευνα οι μεταλλάξεις τύπου 2 ήταν συχνότερες στην ΙΘ παρά στην ΠΜ ($P=0,049$)⁶⁸.

Ο **Chun** μελετώντας 222 Κινέζους ασθενείς με ΙΘ βρήκε ότι εκείνοι που παρουσίαζαν μεταλλάξεις στην καλρετικουλίνη ήταν μικρότερης ηλικίας ($P=0,020$), με χαμηλότερο αριθμό λευκών αιμοσφαιρίων ($P<0,001$), χαμηλότερα επίπεδα αιμοσφαιρίνης ($P=0,002$) και περισσότερα αιμοπετάλια ($P<0,001$) από ότι οι *JAK2V617F* θετικοί. Δε βρήκε όμως στατιστικά σημαντική διαφορά όσον αφορά στο φύλο των πασχόντων και τον κίνδυνο θρόμβωσης⁶⁹. Τέλος, πρόσφατη δημοσίευση στο *British Journal of Haematology* (2015) της μελέτης μικρής ομάδας 141 Ρουμάνων ασθενών επιβεβαιώνει εκ νέου το διαφορετικό φαινότυπο των *CALR* θετικών. Οι τελευταίοι βρέθηκε να έχουν περισσότερα αιμοπετάλια ($P = 0,005$), λιγότερα λευκά αιμοσφαίρια ($P = 0,03$) και μικρότερο κίνδυνο θρομβώσεων ($P = 0,009$). Η μελέτη αυτή συνέκρινε και το βαθμό σπληνομεγαλίας που ήταν επίσης μικρότερος σε σχέση με τη μετάλλαξη στο *JAK2* ($P = 0,01$)⁶⁴.

Η παρούσα έρευνα και οι παραπάνω μελέτες παρά τις διαφορές τους καταλήγουν σε ορισμένα κοινά συμπεράσματα. Ειδικότερα, συναινούν στο ότι η *JAK2V617F* σχετίζεται με υψηλότερες τιμές αιματοκρίτη, υψηλότερες τιμές λευκών αιμοσφαιρίων και μεγαλύτερη ηλικία νόσησης σε σύγκριση με μεταλλάξεις στο γονίδιο *CALR*. Αντίθετα, οι τελευταίες συνοδεύονται από σημαντικότερη θρομβοκυττάρωση και μικρότερο κίνδυνο θρομβώσεων. Η απουσία μοριακής βλάβης συμπεριφέρεται όπως η

ομάδα των τριπλά αρνητικών ασθενών, όσον αφορά στις εργαστηριακές τιμές της γενικής αίματος, τη μικρότερη ηλικία κατά τη διάγνωση και το μικρότερο κίνδυνο θρομβώσεων. Επιπλέον, σύμφωνα με τον *Tefferi*, και αντίθετα σε ό,τι συμβαίνει στην ΠΜ, οι ασθενείς αυτοί είχαν καλύτερη πρόγνωση σε σχέση με οποιαδήποτε άλλη υποομάδα.

Η τάση της *JAK2V617F* να αυξάνει κατεξοχήν τον αιματοκρίτη και τα λευκά αιμοσφαίρια, και των μεταλλάξεων του γονιδίου *CALR* τα αιμοπετάλια, δεν είναι εύκολο να εξηγηθεί. Χωρίς ερμηνεία είναι επίσης η μικρότερη ηλικία στη διάγνωση των *CALR* θετικών ασθενών. Ιδιαίτερη βαρύτητα έχει δοθεί στην αξιολόγηση του θρομβωτικού κινδύνου, που αποτελεί τον κυριότερο παράγοντα νοσηρότητας και θνητότητας στην ΙΘ.

6.2 Η θρόμβωση στην ΙΘ: πιθανή ερμηνεία και νεότερα προγνωστικά μοντέλα.

Η παθολογική φυσιολογία της θρόμβωσης και ως εκ τούτου η ερμηνεία του θρομβωτικού κινδύνου στους πάσχοντες από ΙΘ δεν είναι εύκολη. Σύμφωνα με την τριάδα του *Virchow*, η θρόμβωση είναι αποτέλεσμα τριών πραγμάτων: 1) βλάβη του ενδοθηλίου 2) στάση του αίματος 3) αυξημένη γλοιότητα. Μια γενική θεώρηση είναι ότι σε ασθενείς μυελοϋπερπλαστικών νοσημάτων τα παθολογικά αιμοπετάλια ενεργοποιούνται ευκολότερα, και η συνοδεύουσα λευκοκυττάρωση συμμετέχει σε αυτό, με αποτέλεσμα να προάγεται βλάβη του ενδοθηλίου. Επίσης, θεωρητικά, οι υψηλές τιμές του αιματοκρίτη, των λευκών αιμοσφαιρίων και των αιμοπεταλίων θα μπορούσαν να δικαιολογήσουν την αυξημένη επίπτωση θρομβωτικών επεισοδίων, λόγω αύξησης της γλοιότητας. Παρά ταύτα, ούτε ο αιματοκρίτης ούτε η θρομβοκυττάρωση έχει συνδεθεί σε κάποια μελέτη με αύξηση του θρομβωτικού κινδύνου. Αντιθέτως, εκσεσημασμένη θρομβοκυττάρωση φαίνεται να δρα προστατευτικά, καθώς μέσω του επίκτητου *Von Willebrand* προδιαθέτει σε αιμορραγικά επεισόδια. Ο ρόλος του αριθμού των λευκών αιμοσφαιρίων έχει μελετηθεί εκτενώς στο πρόσφατο παρελθόν. Κάποιοι ερευνητές θεωρούν ότι συσχετίζεται με θρομβώσεις (*Carobbio, Caramazza*), άλλοι ότι δε συσχετίζεται (*Passamonti, Tefferi*) ενώ άλλοι βρήκαν σχέση μεταξύ θρόμβωσης και προϊούσας λευκοκυττάρωσης κατά τη διάρκεια της φυσικής ιστορίας της νόσου (*Passamonti, Rumi*).

Στο σημείο αυτό αξίζει να αναφερθούν τα προγνωστικά μοντέλα για την επιβίωση και το θρομβωτικό κίνδυνο στην ΙΘ που έχουν προταθεί από τη Διεθνή Ομάδα Μελέτης για την Έρευνα και Θεραπεία της Πρωτοπαθούς Μυελοϊνωσης στην οποία μεταξύ άλλων ανήκουν οι *Passamonti, Vannucchi, Barbui* και *Tefferi* (*International Working Group on Myelofibrosis Research and Treatment, IGW-MRT*). Η ομάδα αυτή, βασιζόμενη στη μελέτη 867 ασθενών, διαγνωσθέντων σύμφωνα με τα τελευταία κριτήρια της WHO, ανέπτυξε ένα προγνωστικό μοντέλο για την πρόβλεψη της ολικής

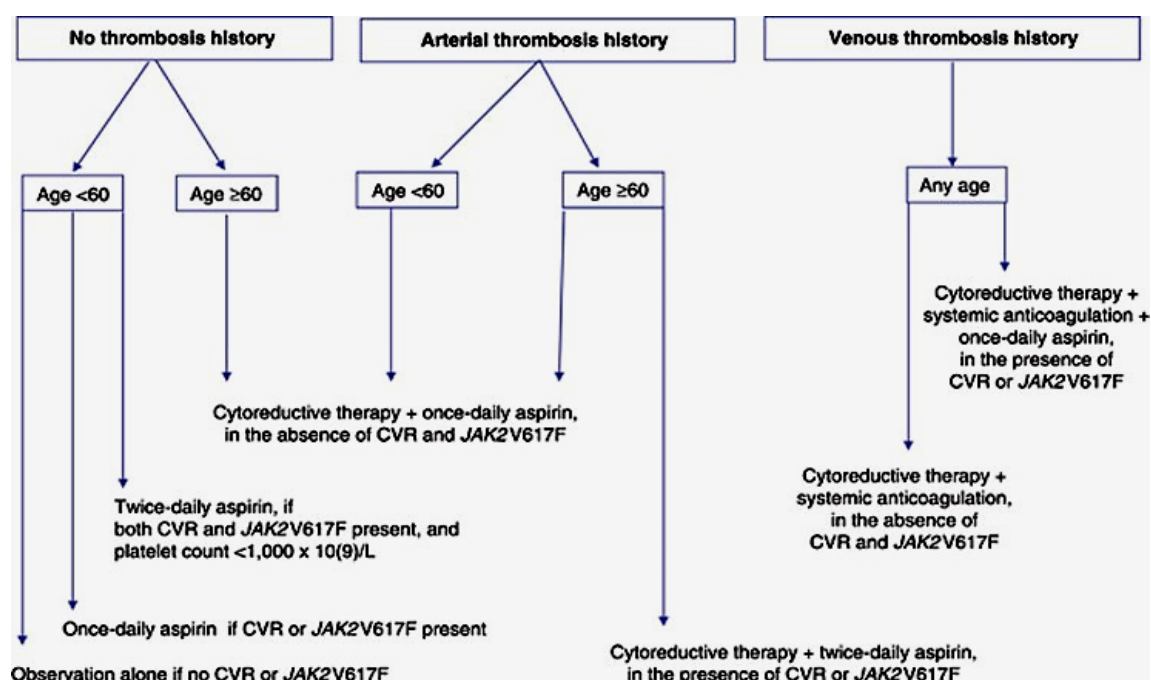
επιβίωσης κατά τη διάγνωση. Το μοντέλο αυτό ονομάστηκε **IPSET** (*International Prognostic Score for ET*) και περιλαμβάνει τρεις παραμέτρους: 1) ηλικία άνω των 60 (2 βαθμοί), 2) αριθμό λευκών αιμοσφαιρίων $\geq 11 \times 10^9/L$ (1 βαθμός) και 3) προηγούμενο ιστορικό θρόμβωσης (1 βαθμός). Βάσει των παραπάνω, οι ασθενείς διακρίνονται σε τρεις κατηγορίες με σημαντικά διαφορετική επιβίωση: χαμηλού κινδύνου (0 βαθμοί, επιβίωση παραπλήσια με του γενικού πληθυσμού), ενδιάμεσου κινδύνου (1-2 βαθμοί, μέση επιβίωση 24,5 έτη), υψηλού κινδύνου (3-4 βαθμοί, μέση επιβίωση 13,8 έτη)⁷².

Στη συνέχεια η ίδια ομάδα ανέπτυξε ένα αντίστοιχο μοντέλο για την πρόγνωση του κινδύνου θρόμβωσης (*IPSET-thrombosis*) λαμβάνοντας υπόψιν την ηλικία (>60, 1 βαθμός), το ιστορικό προηγούμενης θρόμβωσης (2 βαθμοί), την παρουσία καρδιαγγειακών παραγόντων κινδύνου (1 βαθμός) και την παρουσία της μετάλλαξης *JAK2V617F* (2 βαθμοί). Οι πάσχοντες χωρίστηκαν και πάλι σε τρεις κατηγορίες: χαμηλού κινδύνου (<2 βαθμοί, 1,03% αναμενόμενος κίνδυνος), ενδιάμεσου κινδύνου (2 βαθμοί, 2,35% αναμενόμενος κίνδυνος) και υψηλού κινδύνου (>2 βαθμοί, 3,56% αναμενόμενος κίνδυνος)⁷³. Σύμφωνα με τους συγγραφείς του άρθρου τα κριτήρια *IPSET-thrombosis* ήταν σε θέση να προβλέψουν με μεγαλύτερη ακρίβεια την πιθανότητα θρόμβωσης σε σχέση με τα κλασσικά κριτήρια διαστρωμάτωσης που ισχύουν μέχρι τώρα (ηλικία > 60, προηγούμενο ιστορικό θρόμβωσης). Αν και δεν έχουν υιοθετηθεί ακόμα από το *European LeukemiaNet*, η αναφορά τους έχει ιδιαίτερη σημασία γιατί στη διαστρωμάτωση ολικού κινδύνου λαμβάνεται υπόψιν για πρώτη φορά ο αριθμός των λευκών αιμοσφαιρίων. Ταυτόχρονα, στη διαστρωμάτωση του κινδύνου θρόμβωσης λαμβάνεται υπόψιν ένα μοριακό χαρακτηριστικό, η ύπαρξη της μετάλλαξης *JAK2V617F*. Μάλιστα η παρουσία της έχει ιδιαίτερη βαρύτητα, καθώς αποδίδει 2 βαθμούς στο υπολογιζόμενο score. Το γεγονός αυτό έρχεται να επιβεβαιώσει την πληθώρα προηγούμενων μελετών που συσχετίζουν τη συγκεκριμένη μετάλλαξη με αυξημένο κίνδυνο θρόμβωσης. Επίσης, σημαντικό είναι να παρατηρήσει κανείς ότι η λευκοκυττάρωση, ενώ θεωρείται ότι επηρεάζει δυσμενώς την ολική επιβίωση, δεν ανήκει στις υπολογιζόμενες παραμέτρους του *IPSET-thrombosis*. Αυτό έγινε επειδή, στην παραπάνω μελέτη, στατιστικά σημαντική σχέση βρέθηκε μόνο μεταξύ λευκοκυττάρωσης και αρτηριακών θρομβώσεων και δε θεωρήθηκε πρακτική η θέσπιση δύο διαφορετικών προγνωστικών μοντέλων για αρτηριακές και φλεβικές θρομβώσεις αντίστοιχα.

Στην παρούσα έρευνα η συσχέτιση του αριθμού των λευκών αιμοσφαιρίων με τη θρόμβωση ήταν στατιστικά σημαντική στην υποομάδα των *JAK2V617F* θετικών ασθενών. Επίσης, η πλειοψηφία των θρομβώσεων ήταν αρτηριακές (17,07% έναντι 4,07%), γεγονός που συνάδει με τα ευρήματα της μελέτης *IPSET*. Η ερμηνεία της εντονότερης θρομβωτικής διάθεσης αυτής της κατηγορίας σε σχέση με τους *CALR* θετικούς και τους τριπλά αρνητικούς ασθενείς θα μπορούσε επομένως να αποδοθεί στο μεγαλύτερο αριθμό λευκών αιμοσφαιρίων αλλά και σε εγγενή χαρακτηριστικά της μεταλλαγμένης κινάσης. Το τελευταίο υποστηρίζεται από το ότι η ομοζυγωτία φάνηκε να συνοδεύεται από ακόμα μεγαλύτερο ποσοστό θρομβωτικών επεισοδίων, αν και

όπως τονίστηκε, ο μικρός αριθμός αυτών των ασθενών δυσχεραίνει την αξιολόγηση των αποτελεσμάτων. Αν εφαρμόσουμε τα κριτήρια *IPSET-thrombosis*, οι *JAK2V617F* θετικοί ασθενείς έχουν *de facto* αυξημένο κίνδυνο θρόμβωσης λόγω του μοριακού τους προφίλ. Έχουν επίσης μεγαλύτερη ηλικία κατά τη διάγνωση σε σχέση με τους *CALR* θετικούς και τους τριπλά αρνητικούς. Στην δική μας μελέτη η ηλικία δε φάνηκε να επηρεάζει τον κίνδυνο θρόμβωσης, όταν εκτιμήθηκε στην υποομάδα ασθενών με μεταλλαγμένο *JAK2*. Παρ'όλα αυτά είναι ένας παράγοντας καθολικά αποδεκτός στην εκτίμηση θρομβωτικού κινδύνου, μαζί με το ιστορικό προηγούμενης θρόμβωσης.

Στο σημείο αυτό έχει ενδιαφέρον να αναφερθεί ο προτεινόμενος αλγόριθμος από τους *Tefferi* και *Barbui* για εξατομικευμένη αντιμετώπιση των ασθενών με ΙΘ. Η ρηξικέλυθη αυτή πρόταση, που δεν έχει ακόμα υιοθετηθεί από το *European LeukemiaNet*, ενσωματώνει τα νεότερα δεδομένα των μελετών *IPSET*. Η σημαντικότερη διαφορά είναι ότι αξιολογείται η παρουσία παραγόντων καρδιαγγειακού κινδύνου και της μετάλλαξης *JAK2V617F* και τροποποιείται αναλόγως η αγωγή⁷⁴ (βλ. *εικόνα 27*). Η παραπάνω θεραπευτική προσέγγιση αποτελεί παράδειγμα του πώς το μοριακό προφίλ του ασθενούς θα μπορούσε μελλοντικά να κατευθύνει την αγωγή του.



Εικόνα 27. Προτεινόμενος αλγόριθμος για την αντιμετώπιση των ασθενών με ΙΘ. Ασθενείς χωρίς τους κλασσικούς παράγοντες κινδύνου για την εμφάνιση θρόμβωσης στην ΙΘ (ηλικία<60, όχι ιστορικό θρόμβωσης) μπορούν να μη λάβουν προφυλακτική θεραπεία με ασπιρίνη εφόσον δεν έχουν καρδιαγγειακούς παράγοντες κινδύνου και δεν είναι θετικοί για τη μετάλλαξη *JAK2V617F*. Στους ασθενείς με ιστορικό θρόμβωσης, που φέρουν τη μετάλλαξη *JAK2V617F* ή έχουν γνωστούς παράγοντες καρδιαγγειακού κινδύνου, προτείνεται η λήψη ασπιρίνης, μία φορά ημερησίως στην περίπτωση των φλεβικών θρομβώσεων ή δύο φορές ημερησίως στην περίπτωση των αρτηριακών, σε συνδυασμό με την κυτταροστατική αγωγή. (Από *Personalized management of essential thrombocythemia-application of recent evidence to clinical practice*). CVR: cardiovascular risk factors (καρδιαγγειακοί παράγοντες κινδύνου).

Συμπερασματικά, η παρούσα μελέτη επιβεβαίωσε τη μοριακή ετερογένεια της ΙΘ και κατέδειξε ότι υπάρχει πράγματι συσχέτιση του γενετικού προφίλ των πασχόντων με κλινικοεργαστηριακά χαρακτηριστικά.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7. ΕΠΙΛΟΓΟΣ.

Οι επιστημονικές εξελίξεις της τελευταίας δεκαετίας στον τομέα της μοριακής βιολογίας της ΙΘ ήταν καθοριστικές. Οι ανακαλύψεις των μεταλλάξεων *JAK2V617F*, *W515K/L* και εσχάτως εκείνων στο μόριο της καλρετικουλίνης, διευκόλυναν τη διάγνωση σε ένα νόσημα στο οποίο, μέχρι πρόσφατα, τιθόταν εξ αποκλεισμού. Η σημασία της ταξινόμησης των ασθενών βάσει γενετικού υποστρώματος και η συσχέτιση με εργαστηριακά και κλινικά χαρακτηριστικά, δεν είναι θεωρητικού ενδιαφέροντος αλλά ζωτικής σημασίας. Οι ασθενείς με μεταλλαγμένο *JAK2* κινδυνεύουν περισσότερο από θρομβώσεις και πιθανότατα έχουν χειρότερη πρόγνωση σε σχέση με τις υπόλοιπες υποομάδες, λόγω του υψηλότερου αριθμού λευκών αιμοσφαιρίων. Στη δική μας μελέτη, ο μικρότερος αριθμός ασθενών, τα σπανιότατα περιστατικά ινωτικής και λευχαιμικής εκτροπής, και κυρίως η μικρή διάρκεια παρακολούθησης σε βάθος χρόνου δεν επέτρεψαν την εξαγωγή συμπερασμάτων όσον αφορά στην επιβίωση ανάλογα με την ανευρισκόμενη μοριακή βλάβη. Έχει ενδιαφέρον να δούμε, αν τα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά κάθε βλάβης και η αυξημένη επίπτωση θρόμβωσης των *JAK2V617F* θετικών ασθενών, θα οδηγήσουν μελλοντικά σε αναθεώρηση των επίσημων οδηγιών για τη διαστρωμάτωση κινδύνου και τη θεραπευτική αντιμετώπιση της ΙΘ. Στους μελλοντικούς ερευνητικούς στόχους ανήκει η πιθανή ανεύρεση μιας τέταρτης μετάλλαξης που θα τυποποιήσει γενετικά το 10-20% των τριπλά αρνητικών ασθενών. Ανήκει επίσης η διερεύνηση του μηχανισμού δράσης των εμπλεκόμενων μορίων, η κατανόηση της παθολογικής φυσιολογίας της θρόμβωσης στα μυελοϋπερπλαστικά νεοπλάσματα και του διαφανόμενου ρόλου του αριθμού των λευκών αιμοσφαιρίων. Απώτερος στόχος, η βελτίωση της ποιότητας ζωής των πασχόντων και, τελικά, η αναστροφή της φυσικής ιστορίας της νόσου.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ.

Η ιδιοπαθής θρομβοκυτταραιμία (ΙΘ) είναι κλωνική διαταραχή ενός πρόδρομου κυττάρου της μυελικής σειράς και σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (ΠΟΥ) ταξινομείται στις μυελοϋπερπλαστικές νεοπλασίες. Χαρακτηρίζεται από υπερπλασία των μεγακαρυοκυττάρων στο μυελό των οστών και θρομβοκυττάρωση στο περιφερικό αίμα. Οι πάσχοντες εμφανίζουν τάση για θρομβοαιμορραγικά συμβάματα και αυξημένη συχνότητα ίνωσης και εκτροπής σε οξεία μυελογενή λευχαιμία. Η νόσος παρουσιάζει μοριακή ετερογένεια. Η συχνότερη βλάβη είναι η σημειακή μετάλλαξη *JAK2V617F* (60% των πασχόντων), ακολουθούμενη από διαγραφή ή προσθήκη νουκλεοτιδίων στο γονίδιο της πρωτεΐνης *CALR* (25%). Μικρή ομάδα ασθενών (5%) εμφανίζει σημειακές μεταλλάξεις στο εξόνιο 10 του υποδοχέα της θρομβοποιητίνης *cMPL*, ενώ οι υπόλοιποι είναι αγρίου τύπου για τις ανωτέρω μεταλλάξεις και ονομάζονται τριπλά αρνητικοί (10%). Η παρούσα εργασία εξέτασε το γενετικό υπόστρωμα 227 ασθενών με ΙΘ, διαγνωσθέντων σύμφωνα με τα κριτήρια του 2008 του ΠΟΥ, και συνέκρινε τις μοριακές υποομάδες που προέκυψαν όσον αφορά σε επιδημιολογικά, κλινικά και εργαστηριακά χαρακτηριστικά. Συνολικά, από τους 227 ασθενείς **123 (54,18%)** ήταν θετικοί για τη μετάλλαξη *JAK2V617F*, **48 (21,15%)** για μεταλλάξεις στην *CALR*, **12 (5,29%)** για τις μεταλλάξεις *MPLW515L/K*, ενώ **44 (19,38%)** ταξινομήθηκαν ως τριπλά αρνητικοί. Οι *JAK2V617F* θετικοί ασθενείς είχαν μεγαλύτερες τιμές αιματοκρίτη και λευκών αιμοσφαιρίων ($P<0,0001$). Αντίθετα, οι *CALR* θετικοί ήταν νεότεροι σε ηλικία ($P=0,037$) και υπερτερούσαν στον αριθμό των αιμοπεταλίων ($P<0,0001$) σε σχέση με τους *JAK2V617F* θετικούς. Η ομάδα αυτή δεν παρουσίαζε στατιστικά σημαντικές διαφορές με τους τριπλά αρνητικούς ασθενείς σε καμία από τις παραμέτρους που εξετάστηκαν. Οι *MPLW515L/K* θετικοί ασθενείς είχαν τη μεγαλύτερη ηλικία κατά τη διάγνωση ($P=0,0066$ σε σχέση με τους *CALR* θετικούς, που είχαν τη μικρότερη), ενώ οι τιμές λευκών αιμοσφαιρίων και αιμοπεταλίων δεν παρουσίαζαν στατιστικά σημαντική διαφορά με εκείνη των *JAK2V617F* θετικών. Τα ποσοστά θρόμβωσης ήταν μεγαλύτερα στην ομάδα της *JAK2V617F* (21,15%), ακολουθούμενη από την *MPLW515L/K* (16,67%), τους *CALR* θετικούς (8,33%) και τους τριπλά αρνητικούς ασθενείς (6,81%). Οι *JAK2V617F* θετικοί, όταν ταξινομήθηκαν σύμφωνα με το ιστορικό προηγηθείσας θρόμβωσης ή όχι, βρέθηκε να έχουν στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ τους μόνο σε ότι αφορά στον αριθμό των λευκών αιμοσφαιρίων ($P<0,0001$). Ομοίως, οι *CALR* θετικοί ασθενείς, ταξινομούμενοι ανάλογα με τον τύπο της βλάβης (έλλειμμα ή προσθήκη νουκλεοτιδίων) δε διέφεραν σε βαθμό στατιστικά σημαντικό σε καμία από τις εξεταζόμενες παραμέτρους. Η μελέτη καταλήγει στο ότι κάθε μοριακή βλάβη χαρακτηρίζεται από διαφορετικά κλινικά και αιματολογικά ευρήματα και θέτει το ερώτημα αν το γενετικό υπόστρωμα πρέπει να λαμβάνεται υπόψιν στη διαστρωμάτωση κινδύνου και την αντιμετώπιση της νόσου.

Σημεία κλειδιά: *ιδιοπαθής θρομβοκυτταραιμία, JAK2V617F, W515L/K, CALR, τριπλά αρνητικοί ασθενείς*

SUMMARY.

Essential thrombocythemia (ET) is a clonal disorder of a haematopoietic progenitor. It is classified in the myeloproliferative neoplasms, according to the 2008 World Health Organization (WHO) classification. ET is characterized by megakaryocytic hyperplasia in the bone marrow and sustained thrombocytosis in peripheral blood. It has also been associated with a high incidence of thrombosis and bleeding events, which significantly contribute to disease-related morbidity and mortality, whilst there is also increased risk of development of bone marrow fibrosis and transformation to acute myeloid leukemia. The principal mutation found in patients with ET is *JAK2V617F* (60%), followed by nucleotide deletions or insertions at the *CALR* gene (25%). Amino acid substitutions at position 515 of the thrombopoietin receptor (*MPLW515L/K*) are detected to a lesser extent (5%), while the remainder 10% carry no mutation and are being referred as triple negative. We evaluated the molecular profile of 227 ET patients in order to assess if there is a correlation between clinicohematologic features and genetic abnormalities. Of the 227 patients enrolled in this study, **123 (54,18%)** carried the *JAK2V617F* mutation, **48 (21,15%)** *CALR* deletions or insertions, **12 (5,29%)** the *MPLW515L/K* mutation and **44 (19,38%)** were triple negative. *JAK2V617F* positive patients displayed higher hematocrit levels and white blood cells counts ($P<0,0001$). On the contrary, *CALR* positive patients were of younger age at the time of diagnosis ($P=0,036$) and had higher platelets values ($P<0,0001$) compared to the *JAK2V617F* positive. Notably, the *CALR* cohort did not display any statistically significant difference when compared with the triple negative group. *MPLW515L/K* positive patients were of the greatest age at the time of diagnosis ($P=0,0066$) compared to the *CALR* positive ones, which were the youngest, and had otherwise similar WBC and PLT count to the *JAK2V617F* positive group. Patients carrying the *JAK2V617F* mutation had the highest percentage of thrombotic events (21,15%), followed by the *MPLW515L/K* (16,67%), the *CALR* (8,33%) and the triple negative group (6,81%). In the cohort of *JAK2V617F* positive patients, those with a history of previous thrombotic event displayed higher leucocytes count than those that had not suffered any event ($P<0,0001$). On the other hand, in the cohort of *CALR* positive patients, mutational status did not seem to alter the age of disease onset or the haematological features. In conclusion, molecular identity is accompanied by clinical and haematological differences, raising the question of whether genetic profile must be taken into account when it comes to risk stratification and treatment.

Key words: *essential thrombocythemia, JAK2V617F, W515L/K, CALR, triple negative*

Βιβλιογραφία

1. Ross I. Levine, Mark Heaney New advances in the pathogenesis and therapy of essential thrombocythemia, Hematology Am Soc Hematol Educ Program. 2008:76-82.
2. Philip A. Beer The pathogenesis of essential thrombocythemia, Current Opinion in Hematology 2011, 18:323-329.
3. Γ.Χ.Μελέτης Από το αιματολογικό εύρημα στη διάγνωση (Εκδόσεις Νηρέας).
4. Amy E. Geddis Megakaryopoiesis Semin Hematol. 2010 July ; 47(3): 212–219.
5. Harrison's Principles Of Internal Medicine, 18th Edition.
6. Kenneth Kaushansky The molecular mechanisms that control thrombopoiesis J. Clin. Invest. 115:3339–3347.
7. Adam J. Mead Germline JAK2 Mutation in a Family with Hereditary Thrombocytosis, N ENGL J MED 366;10 MARCH 8, 2012.
8. Fabrizio Vianello Defining the Thrombotic Risk in Patients with Myeloproliferative Neoplasms TheScientificWorldJOURNAL (2011) 11, 1131-1137.
9. Alessandra Carobbio Risk factors for arterial and venous thrombosis in WHO-defined essential thrombocythemia: an international study of 891 patients, blood 2011 117:5857-5859.
10. Brady L. Stein Gender and Vascular Complications in the JAK2 V617F-Positive Myeloproliferative Neoplasms, Thrombosis Volume 2011 doi:10.1155/2011/874146.
11. Sylvie Hermouet and Mathias Vilaine The JAK2 46/1 haplotype: a marker of inappropriate myelomonocytic response to cytokine stimulation, leading to increased risk of inflammation, myeloid neoplasm, and impaired defense against infection, haematologica 2011.055392, doi:10.3324.
12. Raffaele Landolfi, Leonardo Di Gennaro Pathophysiology of thrombosis in myeloproliferative neoplasms, haematologica, 2010.038299, doi:10.3324.
13. Peter J Campbell Somatic and germline genetics at the JAK2 locus, NATURE GENETICS, VOLUME 41, NUMBER 4, APRIL 2009.
14. Robert Kralovics A common JAK2 haplotype confers susceptibility to myeloproliferative neoplasms, NATURE GENETICS 2009, doi:10.1038/ng.341.
15. Amy Jones JAK2 haplotype is a major risk factor for the development of myeloproliferative neoplasms, NATURE GENETICS 2009, doi:10.1038/ng.334.
16. Amy Jones, Peter J Campbell, Philip A. Beer The JAK2 haplotype predisposes to MPL mutated myeloproliferative neoplasms, doi:10.1182/blood-2009-08-236448.
17. A Tefferi Novel mutations and their functional and clinical relevance in myeloproliferative neoplasms: JAK2, MPL, TET2, ASXL1, CBL, IDH and IKZF1.
18. Luciana Teofili Endothelial progenitor cells are clonal and exhibit the JAK2^{V617F} mutation in a subset of thrombotic patients with Ph-negative myeloproliferative neoplasms.

19. Nelson ME, Steensma DP. JAK2 V617F in myeloid disorders: what do we know now, and where are we headed? *Leuk Lymphoma*. 2006 Feb;47(2):177-94.
20. Michael Girardot mir-28 is a thrombopoietin receptor targeting micro-RNA detected in a fraction of myeloproliferative neoplasm patient platelets, *blood*, 2010; DOI 10.1182/blood-2008-06-165985.
21. Radek C. Skoda Thrombocytosis, doi: 10.1182/asheducation-2009.1.159 *ASH Education Book* January 1, 2009 vol. 2009 no. 1 159-167.
22. Francis H. Grand Frequent CBL mutations associated with 11q acquired uniparental disomy in myeloproliferative neoplasms, doi:10.1182/blood-2008-12-194548.
23. Ying Zheng A CK2-dependent mechanism for activation of the JAK-STAT signaling pathway, *Blood*. 2011 July 7; 118(1): 156–166.
24. Carolyn A de Graaf Thrombopoietin and hematopoietic stem cells, *Cell Cycle*. 2011 May 15; 10(10): 1582–1589, doi: 10.4161/cc.10.10.15619.
25. Jing Jiang 14-3-3 regulates the LNK/JAK2 pathway in mouse hematopoietic stem and progenitor cells, *The Journal of Clinical Investigation*, Volume 122 Number 6 June 2012.
26. Kathleen Freson PACAP and it's receptor VPAC1 regulate megakaryocyte maturation: therapeutic implications, doi:10.1182/blood-2007-06-098558.
27. Srdan Verstovsek, Ayalew Tefferi Myeloproliferative Neoplasms: Biology and Therapy.
28. Karen Peeters Emerging treatments for thrombocytopenia: Increasing platelet production, *Drug Discovery Today*, Volume 13, Issues 17–18, September 2008, Pages 798–806.
29. Robert Kralovics A Gain-of-Function Mutation of JAK2 in Myeloproliferative Disorders, *N ENGL J MED* 352;17/April 2005.
30. Mark A. Dawson JAK2 phosphorylates histone H3Y41 and exludes HP1a from chromatin, *Vol 461*, 8 October 2009, doi:10.1038/nature08448.
31. J. S. Bleeker and W. J. Hogan Thrombocytosis: Diagnostic Evaluation, Thrombotic Risk Stratification, and Risk-Based Management Strategies, *Thrombosis*, Volume 2011, Article ID 536062, doi:10.1155/2011/536062.
32. Andrew I. Schafer Thrombocytosis, *N ENGL J MED*, 2004; 350:1211-1219 March 18, 2004 DOI: 10.1056/NEJMra035363.
33. Andrew I. Schafer Thrombocytosis: When is an incidental finding serious? *CLEVELAND CLINIC JOURNAL OF MEDICINE VOLUME 73 • NUMBER 8 AUGUST 2006*.
34. Philip A. Beer How I treat essential thrombocythemia, *blood*, 2011 117: 1472-1482, doi:10.1182/blood-2010-08-270033.
35. Sebastian J. Saur Ubiquitination and degradation of the thrombopoietin receptor c-Mpl, *blood* 2010 115: 1254-1263, doi:10.1182/blood-2009-06-227033.
36. Wei Tong A means to an end: ubiquitination of Mpl, *blood* 2010 115: 1111-1112, doi:10.1182/blood-2009-11-252569.
37. Ross Levine and Gerlinde Werning Role of JAK-STAT Signaling in the Pathogenesis of Myeloproliferative Disorders, *AMERICAN SOCIETY OF HEMATOLOGY*, 2006.

38. William Vainchenker, François Delhommeau, Stefan N. Constantinescu, Olivier A. Bernard New mutations and pathogenesis of myeloproliferative neoplasms, blood, August 18, 2011 vol. 118 no. 7 1723-1735.
39. Abdel-Wahab O ASXL1 mutations promote myeloid transformation through loss of PRC2-mediated gene repression, Cancer Cell, 2012 Aug 14;22(2):180-93. doi: 10.1016/j.ccr.2012.06.032.
40. J Mascarenhas Epigenetic abnormalities in myeloproliferative neoplasms: a target for novel therapeutic strategies, Clin Epigenetics. 2011 August; 2(2): 197–212.
41. Μοριακή διαγνωστική George P. Patrinos και Wilhelm Ansorge
42. Kwok and Duan, SNP Discovery by Direct DNA Sequencing, Methods in Molecular Biology, vol. 212: Single Nucleotide Polymorphisms: Methods and Protocol.
43. Omar Abdel-Wahab, Maria E. Figuero, Interpreting new molecular genetics in myelodysplastic syndromes, 54th ASH ANNUAL MEETING AND EXPOSITION, 2012.
44. Philip A. Beer and Anthony R. Green, Pathogenesis and management of essential thrombocythemia, ASH.
45. Chloé James, The JAK2 Mutation in Polycythemia Vera and Other Myeloproliferative Disorders: One Mutation for Three Diseases? ASH,2008.
46. Betty K. Hamilton, MD, Impact of Mutations in the Spliceosome Machinery and Ring Sideroblasts in Patients with Myeloid Malignancies Who Received Conventional Chemotherapy or Allogeneic Hematopoietic Cell Transplantation, 54th ASH ANNUAL MEETING AND EXPOSITION, 2012.
47. William Vainchenker, François Delhommeau, Stefan N. Constantinescu and Olivier A. Bernard, New mutations and pathogenesis of myeloproliferative neoplasms, doi:10.1182/blood-2011-02-292102.
48. J. Nangalia, Somatic CALR Mutations in Myeloproliferative Neoplasms with Nonmutated JAK2, N Engl J Med 2013;369:2391-405 doi: 10.1056/NEJMoa131,2542.
49. Thorsten Klampfl, Ph.D., Somatic Mutations of Calreticulin in Myeloproliferative Neoplasms, N Engl J Med 2013;369:2379-90.DOI: 10.1056/NEJMoa1311347.
50. Kenneth Kaushansky, Historical review: megakaryopoiesis and thrombopoiesis, DOI: 10.1182/blood-2007-05-088500.
51. Hoffman , Hematology, Basic Principles And Practice, 5th Edition
52. Tozawa, Megakaryopoiesis, 2014, Clin Exp Thromb Hemost, doi: 10.14345/ceth.14014
53. Kenneth Kaushansky, Molecular mechanisms of thrombopoietin signaling, Journal of Thrombosis and Haemostasis, 2009 Jul;7 Suppl 1:235-8. doi: 10.1111/j.1538-7836.2009.03419.x.
54. Soler G., The JAK2 46/1 haplotype does not predispose to CALR-mutated myeloproliferative neoplasms, Annals of Hematology, 2015 May;94(5):789-94. doi: 10.1007/s00277-014-2266-y. Epub 2014 Dec 9.

55. Jyh-Pyng Gau, The 46/1 Haplotype Frequency Is Not Increased in Patients of Essential Thrombocythemia with CALR Mutations, *blood* :124 (21), December 6, 2014.
56. C.A. Ortmann, Effect of Mutation Order on Myeloproliferative Neoplasms, *NEJM*, February 12, 2015, DOI: 10.1056/NEJMoa1412098.
57. W.Y. Lau, The JAK-STAT signaling pathway is differentially activated in CALR-positive compared with JAK2V617F-positive ET patients, *blood*, March 05, 2015, dx.doi.org/10.1182/blood-2014-12-618074.
58. Rumi, JAK2 or CALR mutation status defines subtypes of essential thrombocythemia with substantially different clinical course and outcomes, *blood*, 2014 Mar 6;123(10):1544-51. doi: 10.1182/blood-2013-11-539098. Epub 2013 Dec 23.
59. Tefferi, Long-term survival and blast transformation in molecularly annotated essential thrombocythemia, polycythemia vera, and myelofibrosis, *blood*, 2014 Oct 16;124(16):2507-13; quiz 2615. doi: 10.1182/blood-2014-05-579136. Epub 2014 Jul 18.
60. Tefferi, Calreticulin mutations and long-term survival in essential thrombocythemia, *Leukemia* (2014) 28, 2300–2303; doi:10.1038/leu.2014.148; published online 30 May 2014.
61. Tefferi, CALR vs JAK2 vs MPL-mutated or triple-negative myelofibrosis: clinical, cytogenetic and molecular comparisons, *Leukemia*, 2014 Jul;28(7):1472-7. doi: 10.1038/leu.2014.3. Epub 2014 Jan 9.
62. Rotunno, Impact of calreticulin mutations on clinical and hematological phenotype and outcome in essential thrombocythemia, *blood*, 2014 Mar 6;123(10):1552-5. doi: 10.1182/blood-2013-11-538983. Epub 2013 Dec 26.
63. Chen CC, Frequencies, clinical characteristics, and outcome of somatic CALR mutations in JAK2-unmutated essential thrombocythemia, *Annals of Hematology*, 2014 Dec;93(12):2029-36.
64. Trifa AP, CALR versus JAK2 mutated essential thrombocythaemia - a report on 141 patients, *BJH*, 2015 Jan;168(1):151-3. doi: 10.1111/bjh.13076. Epub 2014 Aug 8.
65. Barbui, Philadelphia-negative classical myeloproliferative neoplasms: critical concepts and management recommendations from European LeukemiaNet, *Journal of Clinical Oncology*, 2011 Feb 20;29(6):761-70. doi: 10.1200/JCO.2010.31.8436. Epub 2011 Jan 4.
66. Yang, A meta-analysis comparing clinical characteristics and outcomes in CALR-mutated and JAK2V617F essential thrombocythaemia, *Int J Hematol.*, 2015 Feb;101(2):165-72. doi: 10.1007/s12185-014-1724-6. Epub 2014 Dec 25.
67. Palandri F, Mutations and long-term outcome of 217 young patients with Essential thrombocythemia or early primary myelofibrosis, *Leukemia*, 2015 Mar 24. doi: 10.1038/leu.2015.87. [Epub ahead of print]
68. Andrikovics, Distinct clinical characteristics of myeloproliferative neoplasms with calreticulin mutations, *Haematologica* July 2014 99: 1184-1190; doi:10.3324/haematol.2014.107482.

69. Chun, Clinical importance of different calreticulin gene mutation types in wild-type JAK2 essential thrombocythemia and myelofibrosis patients, *Haematologica*. 2014 Oct; 99(10): e182–e184.doi: 10.3324/haematol.2014.109199PMCID: PMC4181265.
70. Barosi G, Revised response criteria for polycythemia vera and essential thrombocythemia: an ELN and IWG-MRT consensus project, *blood*, 2013 Jun 6;121(23):4778-81. doi: 10.1182/blood-2013-01-478891. Epub 2013 Apr 16.
71. Emilie-Fleur Gautier, The cell cycle regulator CDC25A is a target for JAK2V617F oncogene, <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2011-01-327742>.
72. Zhao, R, Inhibition of the Bcl-xL deamidation pathway in myeloproliferative disorders, *N Engl J Med*, 2008 Dec 25;359(26):2778-89. doi: 10.1056/NEJMoa0804953.
73. Tefferi and J W Vardiman, Classification and diagnosis of myeloproliferative neoplasms: The 2008 World Health Organization criteria and point-of-care diagnostic algorithms, *Leukemia* 22, 14-22 (January 2008) | doi:10.1038/sj.leu.2404955
74. Γεράσιμος Πάγκαλης, Αιματολογία στην κλινική πράξη, Ιατρικές Εκδόσεις Π.Χ. Πασχαλίδης, 2008.
75. John P Greer, John Foerster, George M Rodgers, Frixos Paraskevas, Bertil Glader, *Wintrobe's Clinical Hematology*, 12th edition, 2008.
76. The World Health Organization (WHO) Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues, 2008.
77. Landolfi R, Marchioli R, European Collaboration on Low-dose Aspirin in Polycythemia Vera (ECLAP): a randomized trial, *Semin Thromb Hemost.*, 1997;23(5):473-8.
78. Tefferi, JAK2 germline genetic variation affects disease susceptibility in primary myelofibrosis regardless of V617F mutational status: nullizygoty for the JAK2 46/1 haplotype is associated with inferior survival, 2010 Jan;24(1):105-9. doi: 10.1038/leu.2009.225. Epub 2009 Oct 22.