ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ

Εθνικόν και Καποδιστριακόν
Πανεπιστήμιον Αθηνών

ΙΔΡΥΘΕΝ ΤΟ 1837

ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗΣ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑΣ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

«Μοριακή και Εφαρμοσμένη Φυσιολογία»

Ειδίκευση «Βασικής Έρευνας (Basic Research)»

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

«Οι παραλλαγές της μετάθεσης του χρωμοσώματος Ph σε Έλληνες ασθενείς με Χρόνια Μυελογενή Λευχαιμία»

Αναστασία Σταματοπούλου

Επιβλέπων: **Μιχαήλ Κουτσιλιέρης,** Καθηγητής Πειραματικής Φυσιολογίας, Ιατρική Σχολή Πανεπιστημίου Αθηνών

Επιστημονικός Υπεύθυνος: **Κωνσταντίνα Σαμπάνη,** Ερευνήτρια Α’, ΙΠΡΕΤΕΑ, ΕΚΕΦΕ «Δημόκριτος»

ΑΘΗΝΑ

ΜΑΡΤΙΟΣ 2019

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

«Οι παραλλαγές της μετάθεσης του χρωμοσώματος Ph σε Έλληνες ασθενείς με Χρόνια Μυελογενή Λευχαιμία (ΧΜΛ)»

Αναστασία Σταματοπούλου

Α.Μ.: 20160450

Επιβλέπων: **Μιχαήλ Κουτσιλιέρης,** Καθηγητής Πειραματικής Φυσιολογίας, Ιατρική Σχολή Πανεπιστημίου Αθηνών

Επιστημονικός Υπεύθυνος: **Κωνσταντίνα Σαμπάνη,** Ερευνήτρια Α', ΙΠΡΕΤΕΑ, ΕΚΕΦΕ «Δημόκριτος»

ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ: **Μιχαήλ Κουτσιλιέρης,** Καθηγητής Πειραματικής Φυσιολογίας, Ιατρική Σχολή Πανεπιστημίου Αθηνών

Κωνσταντίνα Σαμπάνη, Ερευνήτρια Α', ΕΚΕΦΕ «Δημόκριτος»

Γεώργιος Βαϊόπουλος, Ομότιμος Καθηγητής, Ιατρική Σχολή Πανεπιστημίου Αθηνών

Μάρτιος 2019

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΡΟΛΟΓΟΣ 4
ΠΙΝΑΚΑΣ ΣΥΝΤΜΗΣΕΩΝ.....5
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....7
ABSTRACT.....8
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....9
1.1. Αιμοποίηση.....9
1.1.1. Πολυδύναμο αρχέγονο αιμοποιητικό κύτταρο.....9
1.1.2. Πολυδύναμο μυελοειδές αρχέγονο κύτταρο.....9
1.1.3. Το πολυδύναμο λεμφικό αρχέγονο κύτταρο.....10
1.1.4. Προγονικά και πρόδρομα κύτταρα.....10
1.2. Λευχαιμογένεση.....12
1.3. Κλασσική Κυτταρογενετική.....14
1.3.1. Ιστορική αναδρομή της κλασσικής κυτταρογενετικής.....14
1.3.2. Τα χρωμοσώματα του ανθρώπου.....16
1.3.3. Μελέτη των χρωμοσωμάτων.....16
1.3.3.1. Τεχνικές χρώσεων.....16
1.3.3.1.1. Χρώσεις χωρίς ζωνοποίηση.....17
1.3.3.1.2. Χρώσεις με ζωνοποίηση.....17
1.3.4. Ονοματολογία Κυτταρογενετικής.....18
1.3.5. Χρωμοσωματικές αλλοιώσεις.....20
1.4. Η συμβολή της κλασσικής κυτταρογενετικής στις αιματολογικές κακοήθειες.....21
1.5. Χρόνια Μυελογενής Λευχαιμία.....22
1.5.1. Επιδημιολογία- Κλινικά και μορφολογικά χαρακτηριστικά.....22
1.5.2. Κυτταρογενετικά ευρήματα στην ΧΜΛ.....23
1.5.2.1. Η ανακάλυψη και ο χαρακτηρισμός του χρωμοσώματος Ph.....23
1.5.2.2. Επιπρόσθετες χρωμοσωματικές αλλοιώσεις σε ασθενείς με ΧΜΛ, θετικούς ως προς το χρωμόσωμα Ph.....25
1.5.3. Παραλλαγές της αμοιβαίας μετάθεσης t (9;22).....27
1.6. **ΣΚΟΠΟΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ** 29
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ 30
2.1. Υλικά.....30
2.1.1 Οργανολογικός Εξοπλισμός.....30
2.1.2 Αντιδραστήρια και Διαλύματα.....30
2.1.3 Ταυτότητα Δειγμάτων.....32
2.2. Μέθοδοι.....32
2.2.1. Κλασσική Κυτταρογενετική – Καρυότυπος.....32
2.2.1.1. Παραλαβή και καλλιέργεια κυττάρων.....32
2.2.1.2. Συλλογή και μονιμοποίηση κυττάρων.....32
2.2.1.3. Προετοιμασία των χρωμοσωματικών παρασκευασμάτων για κυτταρογενετική ανάλυση 33
2.2.1.4. Ζωνοποίηση χρωμοσωμάτων: μέθοδος GTG.....33
2.2.1.5. Μικροσκοπική παρατήρηση και καρυοτυπική ανάλυση χρωμοσωματικών παρασκευασμάτων.....34
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....35
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....44
5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....46

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία έγινε στα πλαίσια του Μ.Δ.Ε. «Μοριακή και Εφαρμοσμένη Φυσιολογία» του Τμήματος Φυσιολογίας της Ιατρικής Σχολής του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών.

Η εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Υγειοφυσικής, Ραδιοβιολογίας & Κυτταρογενετικής (ΕΥΡΚ) του Ινστιτούτου Πυρηνικών & Ραδιοβιολογικών Επιστημών & Τεχνολογίας, Έρευνας & Ασφάλειας (ΙΠΡΕΤΕΑ), του Εθνικού Κέντρου Έρευνας Φυσικών Επιστημών (ΕΚΕΦΕ) «ΔΗΜΟΚΡΙΤΟΣ», με επιβλέπουσα τη Δρ Κωνσταντίνα Σαμπάνη. Το Εργαστήριο είναι διαπιστευμένο σύμφωνα με το διεθνές Πρότυπο ISO 15189:2012 για κυτταρογενετικές και μοριακές κυτταρογενετικές δοκιμές. Καθημερινά, παραλαμβάνονται δείγματα μυελού των οστών από τα νοσοκομεία όλης της χώρας, προκειμένου να πραγματοποιηθεί κυτταρογενετικός έλεγχος.

Επιθυμώ να εκφράσω ένα μεγάλο ευχαριστώ στον Διευθυντή και Επιστημονικό Υπεύθυνο του Π.Μ.Σ. Δρ Μ. Κουτσιλιέρη, Καθηγητή του τμήματος Πειραματικής Φυσιολογίας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Αθηνών (ΕΚΠΑ) για την αποδοχή επίβλεψης της διπλωματικής μου εργασίας. Ανάλογες ευχαριστίες επίσης εκφράζω και στον Δρ Γ. Βαϊόπουλο, Ομότιμο Καθηγητή του ΕΚΠΑ. Ευχαριστώ αμφότερους για την άψογη οργάνωση και λειτουργία του Προγράμματος, καθώς επίσης και για την εμπιστοσύνη και την ενθάρρυνση που δείχνουν στους νέους επιστήμονες.

Ευχαριστώ θερμά την Διευθύντρια του Εργαστηρίου ΕΥΡΚ Δρ Κωνσταντίνα Σαμπάνη, που μου έδωσε τη δυνατότητα να συμμετέχω στο συγκεκριμένο μεταπτυχιακό Πρόγραμμα, την εμπιστοσύνη που μου δείχνει όλα τα χρόνια της συνεργασίας μας, για την υπόδειξη του θέματος, την καθοδήγηση, την αρωγή, αλλά και για τη γενική της στήριξη, όχι μόνο ως συνεργάτης αλλά πάνω από όλα και ως άνθρωπος.

Θερμές ευχαριστίες απευθύνω στη συνάδελφο Μαρίνα Καλομοιράκη, MSc για την πολύτιμη συμβολή της στη στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων της εργασίας, στις εύστοχες παρατηρήσεις της και στην καταλυτική βοήθειά της για την διεξαγωγή του πειραματικού μέρους.

Θα ήταν παράλειψη να μην ευχαριστήσω την οικογένειά μου και ιδιαιτέρως τη μητέρα μου για την συμπαράστασή της, τόσο κατά τη διάρκεια των προπτυχιακών, όσο και των μεταπτυχιακών μου σπουδών.

ΠΙΝΑΚΑΣ ΣΥΝΤΜΗΣΕΩΝ

Σύντμηση	Αγγλικός Όρος	Ελληνικός Όρος
ALL	Acute Lymphoblastic Leukemia	Οξεία Λεμφοβλαστική Λευχαιμία, ΟΛΛ
AML	Acute Myeloid Leukemia	Οξεία Μυελογενής Λευχαιμία, ΟΜΛ
BM	Bone Marrow	Μυελός των οστών, BM
CFC	Colony Forming Cells	Αποικίες κυττάρων
CFU-S	Colony Forming UNITS	Μονάδες αποικίας κυττάρων
CGH	Comparative Genomic Hybridization	Γενομικός Συγκριτικός Υβριδισμός
CLL	Chronic Lymphoblastic Leukemia	Χρόνια Λεμφογενής Λευχαιμία, ΧΛΛ
CML	Chronic Myelogenous Leukemia	Χρόνια Μυελογενής Λευχαιμία, ΧΜΛ
del	deletion	Έλλειψη
DNA	Deoxyribonucleic acid	δε(σ)οξυριβο(ζο)νουκλεϊ(νι)κό οξύ
dup	duplication	Διπλασιασμός
FISH	Fluorescence In Situ Hybridization	Φθορίζων in situ υβριδισμός
GTG	G-banding-Trypsin-Giemsa	Μέθοδος ζωνοποίησης Giemsa/Θρυψίνης
HSC	Hematopoietic Stem Cell	Αιμοποιητικά βλαστικά κύτταρα
i	isochromosome	Ισοχρωμόσωμα
ins	insertion	Ένθεση
inv	inversion	Αναστροφή
ISCN	International System for Human Cytogenetic Nomenclature	Διεθνές Σύστημα Ονοματολογίας
MDS	Myelodysplastic Syndrome	Μυελοδυσπλαστικό Σύνδρομο, ΜΔΣ
MPS	Myeloproliferative Syndrome	Μυελοϋπερπλαστικό Σύνδρομο

PB	Peripheral blood	Περιφερικό αίμα, Π/Α
Ph	Philadelphia chromosome	Χρωμόσωμα Φιλαδέλφεια
SC	Stem Cells	Βλαστοκύτταρα
t	translocation	Μετάθεση
vPh	Variant Philadelphia chromosome	Παραλλαγή χρωμοσώματος Φιλαδέλφεια
WHO	World Health Organization	Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας, ΠΟΥ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η Χρόνια Μυελογενής Λευχαιμία (ΧΜΛ) χαρακτηρίζεται από την παρουσία του χρωμοσώματος Φιλαδέλφεια (Philadelphia chromosome, Ph) που προκύπτει από την αμοιβαία μετάθεση t(9;22)(q34;q11.2), με αποτέλεσμα τη δημιουργία του υβριδικού γονιδίου BCR-ABL1. Σε ποσοστό 5-10% των ασθενών με νεοδιαγνωσθείσα ΧΜΛ, η δημιουργία του υβριδικού γονιδίου είναι αποτέλεσμα παραλλαγής της μετάθεσης Ph, όπου εκτός από τις περιοχές 9q34 και 22q11 συμμετέχουν μια ή περισσότερες περιοχές άλλων χρωμοσωμάτων. Παρόλο που η παρουσία της παραλλαγής Ph δεν έχει συσχετιστεί με κάποιο ιδιαίτερο φαινότυπο της νόσου, η προγνωστική σημασία κάθε διαφορετικής παραλλαγής δεν έχει ακόμη διευκρινιστεί.

Σκοπός της μελέτης αυτής είναι i) να καθοριστούν το είδος και η παραλλαγή της μετάθεσης t(9;22)(q34;q11) στην Ελλάδα ii) η ανεύρεση παραλλαγών που δεν έχουν ακόμη αναφερθεί και η αναγνώριση νέων σημείων θραύσης και (iii) ο καθορισμός της συχνότητας συνύπαρξης επιπρόσθετων χρωμοσωματικών ανωμαλιών σε ασθενείς με παραλλαγή της μετάθεσης.

Η μελέτη περιελάμβανε 809 ασθενείς με νεοδιαγνωσθείσα ΧΜΛ, από τους οποίους 48 (31 άντρες και 17 γυναίκες) είχαν την παραλλαγή (απλή και σύνθετη) της μετάθεσης στον καρυότυπο (5.9%).

Απλή παραλλαγή διαπιστώθηκε σε 13 ασθενείς και πολύπλοκη σε 35 (συμμετοχή ενός επιπρόσθετου χρωμοσώματος σε 31, δύο χρωμοσωμάτων σε 3 και τριών σε ένα 1 ασθενή). Επιπρόσθετες χρωμοσωματικές ανωμαλίες παρουσίαζαν 12 ασθενείς: -Y (n=1), +Ph (n=1), i(17)(q10) (n=1), +21 (n=2), +22 (n=2) και άλλες δομικές σε 5 ασθενείς. Μεταξύ των 48 παραλλαγών Ph της παρούσας μελέτης, οι 14 δεν έχουν αναφερθεί. Από αυτές, οι 4 εμφανίζουν νέα σημεία θραύσης: 3p27 (n=1), 5q15 (n=1), 5q21-22 (n=1), 14p11 (n=1). Η συχνότερα εμφανιζόμενη παραλλαγή ήταν η t(17;22)(p13;q11) (n=2). Τα πιο συχνά συμμετέχοντα χρωμοσώματα στην παραλλαγή ήταν τα: 2 (6/48), 11 (5/48) και 17 (5/48), ενώ δεν συμμετείχαν καθόλου τα χρωμοσώματα Y, 13, 16, 18 και το ομόλογο 22.

Παραλλαγή της μετάθεσης t(9;22) ανιχνεύθηκε στο 5.9% των ασθενών με νεοδιαγνωσθείσα ΧΜΛ, συχνότερα με τον πολύπλοκο τύπο. Η κλασσική κυτταρογενετική ανάλυση είναι η μόνη ενδεδειγμένη μέθοδος για την ταυτοποίηση της παραλλαγής. Η ύπαρξη πολλών διαφορετικών σημείων θραύσης καθιστά αναγκαία την περαιτέρω βιολογική έρευνα και την αξιολόγηση μεγάλου αριθμού περιπτώσεων, ώστε να καταστεί δυνατή η εξαγωγή ασφαλών προγνωστικών συμπερασμάτων.

ABSTRACT

PHILADELPHIA VARIANT TRANSLOCATIONS IN GREEK PATIENTS WITH CHRONIC MYELOGENOUS LEUKEMIA

Introduction: Chronic Myelogenous Leukemia (CML) is defined by the Philadelphia chromosome (Ph) as a result of t(9;22)(q34;q11.2) and the generation of BCR-ABL1 fusion gene. Variant translocations are found in 5-10% of patients with newly diagnosed CML. They can be present either in a simple form, involving 22q11 and one additional breakpoint, or in a complex form, involving 22q11, 9q34 and at least one additional breakpoint. In variant translocations, the distribution of breakpoints exhibits a nonrandom pattern. Although the clinical and hematological features of these cases are not distinct from those seen in standard t(9;22), however, the prognostic role of each individual variant translocation and its additional chromosomal abnormalities has not been elucidated yet.

Purpose: The aim of this study is to determine the type and the frequency of variant Ph translocations, their additional chromosomal abnormalities and involvement of new breakpoints in a large Greek cohort of CML patients.

Material and Methods: The study included 809 newly diagnosed CML patients. Among them, 48 (31 males, 17 females) exhibited a variant translocation in their karyotype (5.9 %).

Results: A simple variant was found in 13 and a complex in 35. The most frequent variant was t(17;22)(p13;q11) (n=2). Additional chromosomal abnormalities were observed in 12 out of 48 patients: -Y (n=1), +Ph (n=1), i(17)(q10) (n=1), +21 (n=2), +22 (n=2) and other aberrations in 5 patients. Fourteen out of 48 variant translocations have not been reported previously and four of them exhibited involvement of new breakpoints: 3p27 (n=1), 5q15(n=1), 5q21-22 (n=1), 14p11 (n=1). The most common chromosomes participated in variant translocations were: 2 (6/48), 11 (5/48) and 17 (5/48). There was no participation of the chromosomes Y, 13, 16, 18 and the homologous 22.

Conclusions: Variant translocations were found in 5.9% of patients with newly diagnosed CML, more commonly with complex form. Four of variant translocations exhibited involvement of new breakpoints. The prognostic role of each individual variant translocation and its additional chromosomal abnormalities has not been elucidated yet. Conventional cytogenetic analysis is the only appropriate methodology for the identification of variant translocations in CML. Reviewing of cytogenetic data during each patient's course of the disease is expected to point out the role of certain variants and additional abnormalities in prognosis.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1. ΑΙΜΟΠΟΙΗΣΗ

Το αίμα αποτελείται από το πλάσμα και τα έμμορφα συστατικά, δηλαδή τα ερυθρά αιμοσφαίρια, τα λευκά αιμοσφαίρια και τα αιμοπετάλια. Η αιμοποίηση περιλαμβάνει όλες τις περίπλοκες διεργασίες που συμμετέχουν στην διαρκή αναπαραγωγή των έμμορφων συστατικών του αίματος (Stein et al,1998).

Όλοι οι τύποι των κυττάρων του αίματος προέρχονται από τα πολυδύναμα αρχέγονα αιμοποιητικά κύτταρα (Stem Cells, SC). Τα κύτταρα αυτά βρίσκονται σε πολύ μικρούς αριθμούς στις θέσεις παραγωγής των κυττάρων του αίματος και ακόμη λιγότερα βρίσκονται στο περιφερικό αίμα. Τα αρχέγονα κύτταρα αντιπροσωπεύουν περίπου το 0.05% του συνόλου των αιμοποιητικών κυττάρων (περίπου 10^6 έως 10^7 αρχέγονα κύτταρα) και ταυτοποιούνται με ανοσοϊστοχημικές τεχνικές, γιατί εκφράζουν χαρακτηριστικά κυτταρικά αντιγόνα επιφανείας (c-kit, Thy-1). Τα πολυδύναμα αρχέγονα κύτταρα είναι ικανά για αυτοανανέωση ώστε να διατηρείται πάντα μια σταθερή δεξαμενή αρχέγονων κυττάρων. Μερικά από τα θυγατρικά τους κύτταρα παραμένουν ως αρχέγονα πολυδύναμα αιμοποιητικά κύτταρα (παραμένουν κυρίως στη φάση G0 του κυτταρικού κύκλου) και άλλα θυγατρικά τους κύτταρα μπορούν να διαφοροποιηθούν και να σχηματίσουν δεσμευμένα προγονικά κύτταρα με πιο περιορισμένη δυνατότητα σχηματισμού σε διάφορους κυτταρικούς τύπους του αίματος (Morrison J. et al., 1994; Πάγκαλης, 2008).

Τα αιμοποιητικά κύτταρα είναι δυνατόν να διαιρεθούν σε τέσσερις ομάδες ανάλογα με την ικανότητά τους για αυτοανανέωση, κυτταρική διαίρεση και δυνατότητα σχηματισμού διαφόρων κυτταρικών τύπων:

- Τα πολυδύναμα αρχέγονα κύτταρα (πολυδύναμο αρχέγονο κύτταρο, μυελοειδές αρχέγονο κύτταρο, λεμφικό αρχέγονο κύτταρο)
- τα προγονικά δεσμευμένα κύτταρα
- τα πρόδρομα κύτταρα (βλάστες) και
- τα λειτουργικά ώριμα κύτταρα.

1.1.1. Πολυδύναμο αρχέγονο αιμοποιητικό κύτταρο

Το κύτταρο αυτό ονομάζεται πολυδύναμο αρχέγονο αιμοποιητικό κύτταρο, επειδή μπορεί να παράγει οποιοδήποτε κυτταρικό τύπο του αίματος. Τα κύτταρα αυτά έχουν την ικανότητα αυτοανανέωσης αλλά πολλαπλασιάζονται επίσης και διαφοροποιούνται σε δύο τύπους πολυδύναμων αρχέγονων κυττάρων.

1.1.2. Πολυδύναμο μυελοειδές αρχέγονο κύτταρο (CFU-S)

Τα κύτταρα αυτά αναγνωρίστηκαν αρχικά σε κυτταρικές καλλιέργειες στο σπλήνα (κύτταρα που σχηματίζουν αποικίες στο σπλήνα). Από το αρχέγονο αυτό κύτταρο προκύπτουν πέντε κατηγορίες προγονικών κυττάρων, τα οποία λόγω της ικανότητάς τους να σχηματίζουν αποικίες σε κυτταροκαλλιέργεια ονομάζονται

κύτταρα που σχηματίζουν αποικίες (colony forming cells-CFC) ή μονάδες σχηματισμού αποικιών (colony forming unit-CFU). Έτσι από τα μυελοειδή αρχέγονα κύτταρα σχηματίζονται CFCs για την παραγωγή:

1) των ερυθρών κυττάρων (E CFC),
2) των αιμοπεταλίων (Meg CFC),
3) των βασεόφιλων (B CFC),
4) των ηωσινόφιλων (Eo CFC) και
5) των μονοκυττάρων-ουδετερόφιλων (MG CFC)

1.1.3 Το πολυδύναμο λεμφικό αρχέγονο κύτταρο

300 Το αρχέγονο αυτό κύτταρο δίνει γένεση στους διάφορους τύπους των λεμφοκυττάρων (B και T λεμφοκύτταρα)

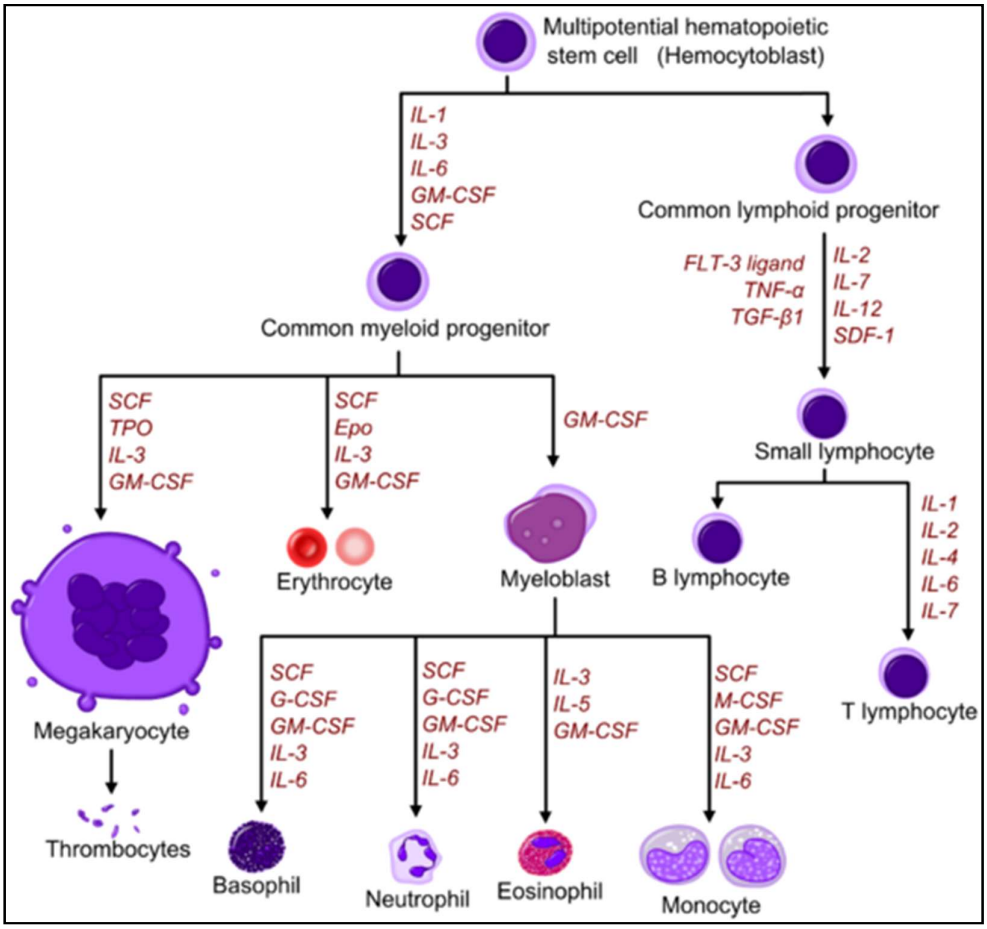
1.1.4. Προγονικά και πρόδρομα κύτταρα

Τα πολυδύναμα αρχέγονα λεμφικά και τα πολυδύναμα αρχέγονα μυελοειδή κύτταρα έχουν και αυτά την ικανότητα αυτοανανέωσης και είναι επίσης ικανά να διαφοροποιούνται σε δεσμευμένα προγονικά κύτταρα που σχηματίζουν μόνο 1 ή 2 κυτταρικούς τύπους. Έτσι τα κύτταρα που προκύπτουν ονομάζονται μονοδύναμα ή διδύναμα προγονικά κύτταρα με περιορισμένο εύρος δυνατότητας σχηματισμού σε διάφορους κυτταρικούς τύπους.

Τα μονοδύναμα ή διδύναμα προγονικά κύτταρα παράγουν πρόδρομα κύτταρα (βλάστες) των οποίων τα μορφολογικά χαρακτηριστικά είναι ευδιάκριτα και υποδηλώνουν τον ώριμο κυτταρικό τύπο στον οποίο θα διαφοροποιηθούν. Αντίθετα, τα αρχέγονα κύτταρα και τα προγονικά κύτταρα δεν είναι μορφολογικά αναγνωρίσιμα και είναι παρόμοια σε εμφάνιση με τα μεγάλα λεμφοκύτταρα. Τα αρχέγονα κύτταρα διαιρούνται με επαρκή ρυθμό, ώστε να διατηρείται πάντα ένας μικρός σχετικά πληθυσμός από αυτά. Ο ρυθμός της κυτταρικής διαίρεσης στα προγονικά και στα πρόδρομα κύτταρα παρουσιάζεται αυξημένος, με σκοπό την παραγωγή ενός μεγάλου αριθμού ώριμων κυττάρων (Stein et al.,1998; Πάγκαλης, 2008).

Το αιμοποιητικό όργανο αποτελείται από ένα τριδιάστατο πλέγμα από ινίδια, αγγεία και κύτταρα που συγκρατούνται μεταξύ τους με μια άμορφη πρωτεινούχα ουσία και σχηματίζουν τις αιμοποιητικές φωλεές (niches) στις οποίες πολλαπλασιάζονται διαφοροποιούνται και ωριμάζουν τα προγονικά κύτταρα των αιμοποιητικών κυττάρων.Η αιμοποιητική φωλεά αποτελεί την συνισταμένη όλων των παραγόντων κυτταρικών και μοριακών ,που μέσω αλληλοαντιδράσεων ρυθμίζει την πορεία κι εξέλιξη των αρχέγονων πολυδύναμων αιμοποιητικών κυττάρων (Morrison J. et al., 1994, 2006; Πάγκαλης Γ., 2008).

Οι παράγοντες αυτοί είτε διαδραματίζουν προαγωγικό ρόλο στην αιμοποίηση (όπως ειδικοί αυξητικοί παράγοντες και ιντερλευκίνες) (Εικόνα 1), είτε την αναστέλλουν (ιντερφερόνες, παράγοντες νέκρωσης όγκων).



ΕΙΚΟΝΑ 1. Αιμοποιητικοί αυξητικοί παράγοντες των κυτταρικών σειρών.
Πηγή:https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Hematopoietic_growth_factors.png

1.2. ΛΕΥΧΑΙΜΟΓΕΝΕΣΗ

Η λευχαιμογένεση ξεκινά από μια κακοήθη εξαλλαγή, είτε στα αρχέγονα πολυδύναμα, είτε στα προγονικά αιμοποιητικά κύτταρα της λεμφικής, ή της μυελικής σειράς. Αυτό οδηγεί στον άναρχο πολλαπλασιασμό των κυττάρων του συγκεκριμένου πληθυσμού, την υπερπλασία και τη διήθηση στο περιφερικό αίμα και σε άλλα όργανα. Στις οξείες λευχαιμίες κυριαρχούν τα άωρα κύτταρα του αιμοποιητικού ιστού ενώ στις χρόνιες τα πιο ώριμα κύτταρα, με πιο αργή εκδήλωση και εξέλιξη της νόσου.

1.2.1 Αιτιοπαθογένεια Λευχαιμιών

Πολυάριθμες μελέτες των αιματολογικών κακοηθειών επιβεβαιώνουν μια θεμελιώδη αρχή της βιολογίας: πίσω από οποιοδήποτε νεοπλασματική νόσο κρύβεται μια μετάλλαξη. Φυσικά περισσότερες από μια αλλεπάλληλες μεταλλάξεις οδηγούν στην λευχαιμογένεση, επηρεάζοντας βιοχημικές οδούς που ελέγχουν τον φυσιολογικό αιμοποιητικό μηχανισμό. Χρωμοσωματικές μετατοπίσεις επίσης που συναντώνται στα περισσότερα είδη των λευχαιμιών γίνονται κοντά σε ενδοκυττάρια πρωτοογκογονίδια με αποτέλεσμα την μεταβολή της δομής και της έντασης της έκφρασης τους. Και η υπερβολική έκφραση ενός πρωτοογκογονιδίου σχετίζεται με λευχαιμογένεση (Γαρυπίδου Β 1998; Goldman JM, Melo JV, 2008; Deininger MW, 2008).

Από τον τεράστιο όγκο των γονιδίων, τα οποία έχουν παρατηρηθεί στα καρκινικά κύτταρα, έχουν καταγραφεί μέχρι σήμερα περισσότερα από 350 γονίδια, των οποίων οι γενετικές βλάβες τεκμηριωμένα ενέχονται στην καρκινογένεση (Straton et al, 2009). Από τις διάφορες προσπάθειες συστηματοποίησης των γονιδίων που εντοπίζονται στα καρκινικά κύτταρα, δόκιμη κατηγοριοποίηση για την ογκολογική γενετική μελέτη είναι η παρακάτω, σύμφωνα με την οποία τα γονίδια ταξινομούνται σε τρεις κατηγορίες: i. Ογκογονίδια, ii. Ογκοκατασταλτικά γονίδια και iii. Γονίδια σταθερότητας

i.Ο*γκογονίδια* ονομάζονται τα γονίδια τα οποία υπό φυσιολογικές συνθήκες (σε συγκεκριμένο χρόνο και ιστό) είναι ανενεργά και οι γενετικές βλάβες τα καθιστούν συνεχώς ενεργά (απορρυθμισμένη ενεργοποίηση). Γενικά, η ενεργοποίηση μέσω σωματικής μετάλλαξης του ενός αλληλόμορφου των ογκογονιδίων είναι αρκετή για την επίτευξη της απορρύθμισης της φυσιολογικής λειτουργίας του κυττάρου.

ii. *Ογκοκατασταλτικά γονίδια* ονομάζονται τα γονίδια τα οποία υπό φυσιολογικές συνθήκες είναι ενεργά και οι γενετικές βλάβες τα καθιστούν ανενεργά ή παρεμποδίζουν τη φυσιολογική δράση τους (απενεργοποίηση). Στην περίπτωση των ογκοκατασταλτικών γονιδίων απαιτείται η παρουσία της μετάλλαξης και στα δύο αλληλόμορφα των γονιδίων για να έχουμε μεταβολή της φυσιολογικής τους δράσης. Ωστόσο, για μια σειρά ογκοκατασταλτικών γονιδίων έχει διατυπωθεί η άποψη πως η βλάβη και μόνο στο ένα αλληλόμορφο είναι ικανή να επιφέρει σημαντικές μεταβολές στη φυσιολογική λειτουργία των κυττάρων.

Αν και οι δύο αυτές κατηγορίες είναι διακριτές ως προς τη λειτουργία τους, τα ογκοκατασταλτικά γονίδια και τα ογκογονίδια επιδεικνύουν παρόμοιους μηχανισμούς δράσης. Οι γενετικές βλάβες στα ογκογονίδια και στα ογκοκατασταλτικά γονίδια επιδρούν με παρόμοιους τρόπους στη φυσιολογική λειτουργία των κυττάρων. Οι

μεταβολές αυτές, όπως έχουν περιγραφεί συνοπτικά από τους Hanahan και Weinberg, είναι οι εξής: «ανεξαρτησία» από αυξητικούς παράγοντες, έλλειψη-μείωση ανταπόκρισης σε αντιπολλαπλασιαστικά μηνύματα, διαφυγή από την πορεία της απόπτωσης, δυνατότητα ατελεύτητου πολλαπλασιασμού, προώθηση της αγγειογένεσης, διήθηση ιστών και μετάσταση. (Hanahan and Weinberg, 2001, 2011).

iii. *Γονίδια σταθερότητας* (stability genes) ονομάζεται μια τρίτη κατηγορία γονιδίων που η λειτουργία τους διατηρεί σε χαμηλά επίπεδα τον ρυθμό συσσώρευσης των γενετικών βλαβών, που επιφέρουν εξωκυτταρικοί ή ενδοκυτταρικοί παράγοντες (γι' αυτό ονομάζονται επίσης και γονίδια φρουροί). Η αναστολή ή μεταβολή της λειτουργίας τους έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση του ρυθμού συσσώρευσης μεταλλάξεων σε άλλα γονίδια, ανάμεσα σε αυτά και σε ογκογονίδια ή ογκοκατασταλτικά γονίδια (απώλεια λειτουργίας). Για την απώλεια της λειτουργίας τους, όπως και για τα ογκοκατασταλτικά γονίδια, απαιτείται η απενεργοποίηση και των δυο αλληλόμορφων του γονιδίου.

Στην κατηγορία αυτή ανήκουν γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες που συμμετέχουν σε μηχανισμούς, με σκοπό να διορθώνουν σφάλματα στη διάρκεια διπλασιασμού του γενετικού υλικού, καθώς και να επιδιορθώνουν μικρές βλάβες, τις οποίες επιφέρουν στο γενετικό υλικό μια σειρά μεταλλαξιογόνοι παράγοντες. Ανήκουν επίσης γονίδια που ελέγχουν τη σωστή εκτέλεση κυτταρικών λειτουργιών στις οποίες συμμετέχουν μεγάλα τμήματα χρωμοσωμάτων- μιτωτικός ανασυνδυασμός- ή ολόκληρα τα χρωμοσώματα-χρωμοσωματικός διαχωρισμός.

Φυσικοί και χημικοί γονοτοξικοί παράγοντες προάγουν μεταθέσεις και χρωμοσωμικές αναδιατάξεις. Πολυκυκλικοί αρωματικοί υδρογονάνθρακες, αρωματικές αμίνες (χρώματα ανιλίνης), αποτελούν τα πιο συνήθη χημικά καρκινογόνα. Φυσικοί παράγοντες όπως η υπεριώδης ακτινοβολία, η ραδιενέργεια προκαλούν μεταλλάξεις, χρωμοσωματικές θραύσεις και ανώμαλη διάταξη γονιδίων. Όλα τα είδη ιοντίζουσας ακτινοβολίας μπορούν να προκαλέσουν χρόνια ή οξεία λευχαιμία. Μελέτες επιζώντων από την έκρηξη ατομικής βόμβας που εκτέθηκαν σε ιοντίζουσα ακτινοβολία έδειξαν ιδιαίτερα αυξημένο κίνδυνο προσβολής από Χρόνια Μυελογενή Λευχαιμία (ΧΜΛ). Εν τούτοις, επιδημιολογικές μελέτες απέτυχαν στο να συνδέσουν τον τρόπο ζωής ή το είδος της εργασίας με την εμφάνιση ΧΜΛ.

Άλλοι παράγοντες υπεύθυνοι για την λευχαιμογένεση θεωρούνται ορισμένοι DNA ή RNA ιοί, όπου μέσω ενσωμάτωσης του γενετικού τους υλικού στο γονιδίωμα του ξενιστή τους μετασχηματίζουν τα κύτταρα σε λευχαιμικά (EBV, HTLV) (Gross L., 1954; Bessis M., 1974; Borhardkt A. et al, 2013). Επίσης, λευχαιμογένεση μπορούν να προκαλέσουν προδιαθεσικοί παράγοντες, όπως η κληρονομικότητα, οι συγγενείς χρωμοσωματικές ανωμαλίες, οι ανοσολογικές ανεπάρκειες (χυμικής ή/και κυτταρικής ανοσίας), καθώς και χρόνια δυσλειτουργία του μυελού (διαταραχή της ωρίμανσης, μη επαρκής αιμοποίηση, μυελοδυσπλασία) (Foucar K. et al., 1979; Ross J.A. et al., 2002; Faramarz N. et al., 2013).

1.3. ΚΛΑΣΣΙΚΗ ΚΥΤΤΑΡΟΓΕΝΕΤΙΚΗ

1.3.1. Ιστορική αναδρομή της κλασσικής κυτταρογενετικής

Η κύρια ενασχόληση της κυταρογενετικής του καρκίνου ήταν και παραμένει η περιγραφή και η κατανόηση των νεοπλασματικών διεργασιών σε χρωμοσωματικό επίπεδο. Η πρώτη συσχέτιση των γενετικών αλλαγών με την βιολογία του καρκίνου περιγράφηκε από τον David von Hansemann το 1890, ο οποίος μελέτησε καρκινικά επιθηλιακά κύτταρα. Παρατήρησε ασύμμετρες μιτωτικές διαιρέσεις και επεσήμανε πως αυτά τα φαινόμενα ήταν καθοριστικά για την προέλευση και ανάπτυξη μιας κακοήθειας (von Hansemann D., 1890; Leon P. Bignold, Brian L.D. Coghlan, Hubertus P.A. 2007). Περίπου 25 χρόνια αργότερα (1914) η θεωρία του Hansemann τεκμηριώθηκε άρτια από τον T. Boveri. Χρωμοσωματικές εκτροπές σε σωματικά κύτταρα δημιουργούν εκείνες τις λειτουργικές ιδιαιτερότητες στο γενετικό υλικό που προάγουν έναν κακοήθη πολλαπλασιασμό (Boveri T., 1914; Hardy P.A., Zacharias H., 2005).

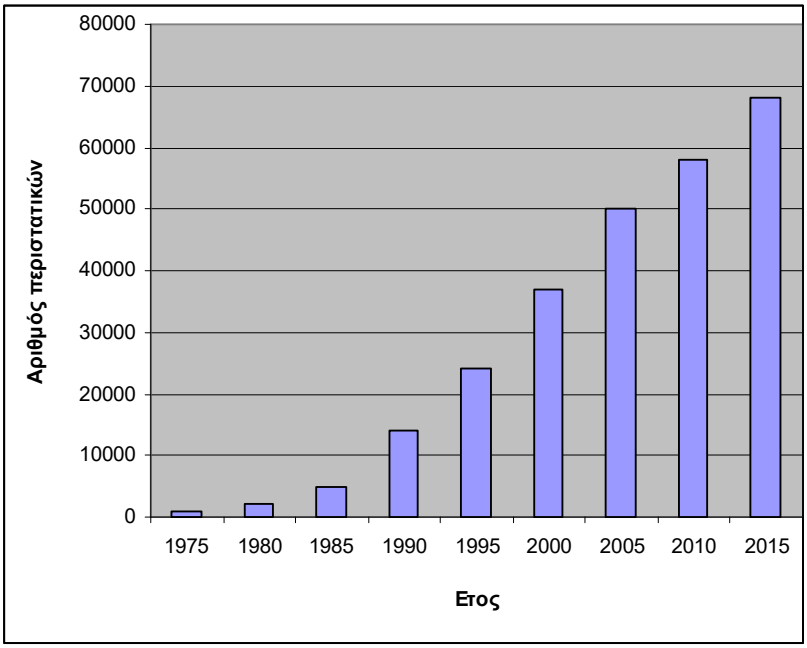
Για αρκετά χρόνια η πειραματική επαλήθευση της ιδέας περί γενετικής βάσης του καρκίνου χρειάστηκε αρκετό χρόνο για να τεκμηριωθεί. Σε αυτό βοήθησαν οι νέες ανακαλύψεις και μεθοδολογίες στο πρώτο μισό του 20ου αιώνα, οι οποίες έδωσαν αξιόπιστα στοιχεία πάνω στην δομή και την μορφολογία των χρωμοσωμάτων. Η ανάπτυξη των ιστοκαλλιεργειών in vitro, που προσέφερε σταθερή πηγή διαιρούμενων κυττάρων, η χρήση υπότονου διαλύματος, που συντέλεσε στην ελεγχόμενη διασπορά των χρωμοσωμάτων, καθώς και η ανακάλυψη και εφαρμογή της κολχικίνης, η οποία αναστέλει την κυτταρική διαίρεση στο επιθυμητό στάδιο της μετάφασης, καθιέρωσαν, δικαίως, την κυτταρογενετική ως κλινικοεργαστηριακή επιστήμη.

Κομβικό σημείο στην εξέλιξη της Κυτταρογενετικής αποτέλεσε η ανακάλυψη του ακριβούς αριθμού χρωμοσωμάτων σε ανθρώπινα μιτωτικά κύτταρα από τους Tjio και Levan (Harper P.S, 2006). Οι έρευνες αναβαθμίστηκαν ακόμη περισσότερο μέσα από την ανακάλυψη της φυτοαιμαγλουτινίνης (PHA) (Nowell, 1960), καθώς επίσης και από την ανάπτυξη μεθόδων για ταχείες καλλιέργειες κυττάρων του περιφερικού αίματος (Moorhead et al., 1960; Lancet, 1971).

Ιστορικός σταθμός στην κατανόηση της σχέσης των ειδικών χρωμοσωματικών αλλοιώσεων με διάφορες νεοπλασίες αποτέλεσε η θεαματική ανακάλυψη ενός μικρού καρυοτυπικού δείκτη σε ασθενείς με Χρόνια Μυελογενή Λευχαιμία. Ο δείκτης αυτός ονομάστηκε χρωμόσωμα Φιλαδέλφεια (Philadelphia, Ph) και πρόκειται για την πρώτη καρυοτυπική αλλοίωση που συνδέθηκε άμεσα με νεοπλασία (Nowell P.C., Hungerfold D.A., 1960).

Παρά το σπουδαίο εύρημα του Ph χρωμοσώματος η πλήρης επιβεβαίωση περί χρωμοσωματικών αλλοιώσεων και καρκινογένεσης δεν ήρθε ακόμη. Και αυτό επειδή πληθώρα αλλοιώσεων συνδέονταν με ποικίλους τύπους όγκων. Οι εργαστηριακές μέθοδοι της εποχής αδυνατούσαν να επαληθεύσουν πειραματικά τις αλλοιώσεις αυτές ως πρώιμους δείκτες παθογένεσης. Η εισαγωγή των τεχνικών ζωνοποίησης, όμως, το 1970 λύνει το πρόβλημα ταυτοποίησης των χρωμοσωμάτων. Κάθε ομόλογο ζεύγος χρωμοσωμάτων πλέον χαρακτηρίζεται από ένα μοναδικό πρότυπο ζώνωσης (Caspersson et al., 1970a). Έτσι άρχισαν να ταξινομούνται οι αλλοιώσεις σε σχέση με τα διάφορα είδη νεοπλασίας στον άνθρωπο.

Νέα κυταρογενετικά δεδομένα προέκυπταν διαρκώς μέσα από την χρήση των τεχνικών ζώνωσης και όλη αυτή η γνώση συλλέχτηκε, καταγράφηκε και εκδόθηκε (Mitelman, 2015) με αποτέλεσμα να ταξινομηθούν και να περιγραφούν σχεδόν 70.000 περιστατικά (Εικόνα 2).



Εικόνα 2. Κυτταρογενετικά δεδομένα νεοπλασιών ανά 5ετία.

Από την δεκαετία του 1980 και μετά η κλασσική κυταρογενετική επεκτείνει την δράση της μέσα από καινοτόμες τεχνολογίες και πρωτοποριακές μεθόδους της μοριακής πλέον έρευνας. Μέσα από αυτές τις τεχνικές διερευνώνται βαθύτερα τα γενεσιουργά αίτια των χρωμοσωμικών παρεκκλίσεων. Οι τεχνολογίες αυτές στηρίζονται στην αρχή συμπληρωματικότητας των βάσεων των νουκλεϊκών οξέων. Πρόκειται για την υβριδοποίηση φθορισμού in situ (FISH) και την συγκριτική γονιδιωματική υβριδοποίηση (CGH) (Le Beau et al.,1994; Popescu et al.,1997).

Στην μέθοδο FISH ανιχνευτής (probe) με συγκεκριμένη αλληλουχία νουκλεοτιδίων επισημαίνεται με φθορίζουσα χρωστική και βάσει της συμπληρωματικότητας των βάσεων δεσμεύεται στο αντίστοιχο τμήμα του DNA προς εξέταση (Cremer et al., 1988). Εφαρμόζεται ευρέως σε χρωμοσωματικές μετατοπίσεις, όπως π.χ. σε περιπτώσεις Χρόνιας Λεμφογενής Λευχαιμία (ΧΛΛ).

Στην μέθοδο του συγκριτικού γονιδιωματικού υβριδισμού (comparative genomic hybridization, CGH), τα δείγματα DNA σημαίνονται από διαφορετικά φθοριοχρώματα, αναμειγνύονται και αφήνονται να υβριδοποιηθούν ανταγωνιστικά με τις συμπληρωματικές περιοχές στόχους (Kallioniemi et al., 1992). Ανιχνεύονται μη ισοζυγισμένες αναδιατάξεις όπως ελλείμματα και διπλασιασμοί μικρού σχετικά μήκους (<1-2 MB). Το πλεονέκτημά της έναντι της FISH είναι ότι μπορεί να ανιχνεύσει ταυτόχρονα αλλαγές του DNA σε πολλαπλές θέσεις σε ένα γονιδίωμα, όμως δεν ανιχνεύει ισοζυγισμένες αναδιατάξεις, όπως σε περιπτώσεις ΧΜΛ και τη μετάθεση t(9;22)(q34;q11.2).

1.3.2. Τα χρωμοσώματα του ανθρώπου

Τα χρωμοσώματα αποτελούν δυναμικές δομές οι οποίες μεταβάλλουν τον βαθμό συσπείρωσής τους ανάλογα με την φάση του κυτταρικού κύκλου. Η ανώτερη μορφή οργάνωσης τους συμβαίνει στο στάδιο της μετάφασης. Εκεί, τα χρωμοσώματα αποκτούν την τεταρτοταγή δομή τους, είναι συμπυκνωμένα και κατάλληλα προς παρατήρηση στο οπτικό μικροσκόπιο. Αξίζει να τονίσουμε πως η δυναμική δομή και η ελαστική οργάνωση της χρωματίνης καθορίζουν την μεταγραφική ενεργότητα και άρα την γονιδιακή ρύθμιση.

Ομόλογα χρωμοσώματα είναι τα χρωμοσώματα που έχουν ίδιο σχήμα, ίδιο μέγεθος και τους ίδιους γενετικούς τόπους με την ίδια διάταξη.

Αλληλόμορφα γονίδια είναι τα γονίδια που καταλαμβάνουν μια συγκεκριμένη θέση πάνω στα ομόλογα χρωμοσώματα κι ελέγχουν πάντα το ίδιο γνώρισμα.

1.3.3. Μελέτη των χρωμοσωμάτων

Ο σωστός αριθμός των χρωμοσωμάτων του ανθρώπου, όπως προαναφέρθηκε, προσδιορίστηκε από τους Tjio και Levan (1956) και είναι 46. Όλα τα σωματικά κύτταρα του ανθρώπου εμπεριέχουν στον πυρήνα τους διπλοειδή αριθμό χρωμοσωμάτων (2n), ενώ τα γενετικά κύτταρα (γαμέτες) απλοειδή αριθμό (n).

Η κυταρογενετική ανάλυση εδραιώθηκε ως το κύριο εργαλείο στην βασική έρευνα και στην κλινική πρακτική κυρίως μετά το 1970 με τις τεχνικές ζωνοποίησης και τη δημιουργία ζωνώσεων στα χρωμοσώματα με τη χρήση της φθορίζουσας χρωστικής κινακρίνης (Caspersson et al., 1970). Κατά την παρατήρηση με υπεριώδες φως, τα χρωμοσώματα παρουσίαζαν φθορισμό στις θέσεις ενδιάμεσης ετεροχρωματίνης. Έτσι έγινε εφικτή η αξιόπιστη ταυτοποίηση κάθε μεταφασικού χρωμοσώματος μέσα από το ιδιαίτερο πρότυπο ζώνωσής του. Να σημειωθεί ότι τα χρωμοσώματα μελετώνται στο στάδιο της μετάφασης του κυτταρικού κύκλου, όταν η χρωματίνη είναι ιδιαίτερα συμπυκνωμένη και η μορφολογία χρωμοσωμάτων καλά καθορισμένη.

Το 1971 η Seabright ανακαλύπτει την Giemsa, χρωστική που αποτελείται από κυανό του μεθυλενίου ή οποιουδήποτε παραγώγου αυτού και ηωσίνη. Ζώνη (band) ορίζεται το τμήμα εκείνο του χρωμοσώματος που ξεχωρίζει από τα διπλανά του βάσει της σκοτεινότερης ή της φωτεινότερης έντασής του. Τα πρότυπα των ζωνώσεων απεικονίζονται στο ιδεόγραμμα (Εικόνα 5).

‘1.3.3.1. Τεχνικές χρώσεων

Οι βασικές χρωστικές χρωματίζουν κατά μήκος ομοιόμορφα τα χρωμοσώματα και έτσι διακρίνονται χαρακτηριστικά τους σημεία. Αυτά είναι οι πρωτογενείς περισφύξεις (κεντρομέρη ή κεντρομερίδια), οι δευτερογενείς περισφύξεις και οι δορυφόροι. Τα μεταφασικά χρωμοσώματα αποτελούνται από δύο αδελφές χρωματίδες που συγκρατούνται στο κεντρομερίδιο. Αυτό χωρίζει το χρωμόσωμα στο μικρό (p) και στο μεγάλο (q) βραχίονα. Ανάλογα με τη θέση του κεντρομεριδίου διακρίνονται 3 κατηγορίες χρωμοσωμάτων:

i) Μετακεντρικά, όπου το κεντρομερίδιο βρίσκεται περίπου στη μέση,

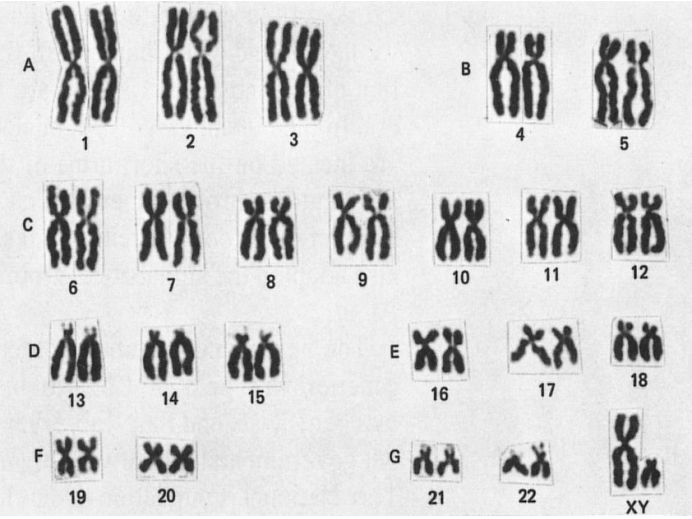
ii) Υπομετακεντρικά, όπου τα χρωμοσώματα αποτελούνται από δύο ανισομεγέθεις βραχίονες (το μικρό και το μεγάλο βραχίονα),

iii) Ακροκεντρικά, με το κεντρομερίδιο να βρίσκεται κοντά στο τελομερές.

1.3.3.2. Χρώσεις χωρίς ζωνοποίηση

Για την περιγραφή της μορφολογίας των χρωμοσωμάτων χωρίς ζωνώσεις χρησιμοποιούνται τρεις παράμετροι: α) το σχετικό μήκος, β) ο βραχιονικός δείκτης και γ) ο κεντρομερικός δείκτης.

Τα χρωμοσώματα αριθμούνται και τοποθετούνται σε επτά ομάδες (A έως G και στα φυλετικά) βάσει μεγέθους και βραχιονικού δείκτη όπως φαίνεται στην Εικόνα 3.



Εικόνα 3. Καρυότυπος άρρενος ατόμου με αριθμημένα χρωμοσώματα, χωρίς ζωνοποίηση, T.C Hsu (1952).

1.3.3.3. Χρώσεις με ζωνοποίηση

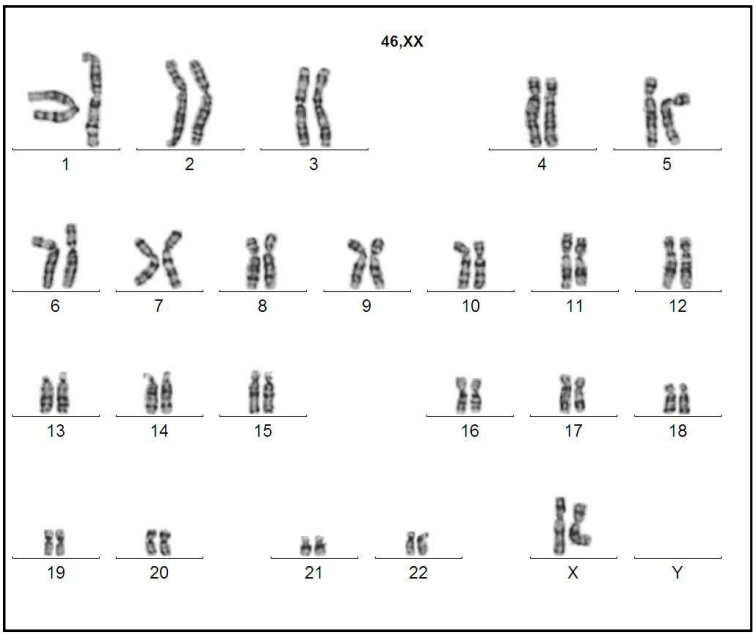
Οι τεχνικές χρώσης που χωρίζονται σε δύο ομάδες. Η πρώτη ομάδα περιλαμβάνει τις χρώσεις οι οποίες δίνουν ζώνες σε όλο το μήκος του χρωμοσώματος (ζώνες Q,G,R), και η δεύτερη τις χρώσεις που αλληλεπιδρούν με ορισμένες περιοχές (ζώνες C, NOR).

Θα επικεντρωθούμε στην G ζωνοποίηση μιας και η τεχνική αυτή χρησιμοποιείται ευρέως. Επάνω σε παρασκευάσματα μεταφασικών χρωμοσωμάτων επιδρούν πρωτεολυτικά ένζυμα και ακολουθεί χρώση με χρωστική Giemsa. Έτσι προκύπτουν σκοτεινά και φωτεινά τμήματα. Τα πρώτα περιέχουν λίγα γονίδια και αντιγράφονται αργά. Αντίθετα οι πιο ανοιχτόχρωμες περιοχές είναι πλούσιες σε CG, αντιγράφονται γρήγορα και περιέχουν πολλά γονίδια (Εικόνα 5).

1.3.4. Ονοματολογία Κυτταρογενετικής

Το ISCN (Intenational System for Human Cytogenetic Nomenclature) αποτελεί έναν καθημερινό εργαστηριακό οδηγό που περιγράφει κι ερμηνεύει αναλυτικά τα ανθρώπινα χρωμοσώματα και τις αλλοιώσεις τους. Καθορίζει τους όρους που χρησιμοποιούνται για να περιγράψουν έναν αλλοιωμένο καρυότυπο. Ανά τετραετία επικαιροποιείται από το International Committee on Human Cytogenetic Nomenclature. Περιλαμβάνει ονόματα ζωνώσεων, σύμβολα και συντομογραφημένους όρους. Αξίζει να σημειωθεί πως βάση της τελευταίας ονοματολογίας (ISCN 2016), γίνεται διάκριση στους όρους καρυόγραμμα, καρυότυπος και ιδεόγραμμα: Ο καρυότυπος απεικονίζει τα ομόλογα μεταφασικά χρωμοσώματα κατά φθίνον μέγεθος (Εικόνα 4). Το ιδεόγραμμα προβάλλει σχηματικά τον φυσιολογικό πρότυπο καρυοτύπου (Εικόνα 5), ενώ το καρυόγραμμα είναι ένα διάγραμμα ή φωτογραφία των χρωμοσωμάτων ενός κυττάρου σε συγκεκριμένο στάδιο επεξεργασίας, διατεταγμένων ανά ομόλογα ζεύγη και αριθμημένη σειρά που εκτός από το άτομο πιθανόν αναφέρονται και στο είδος.

600



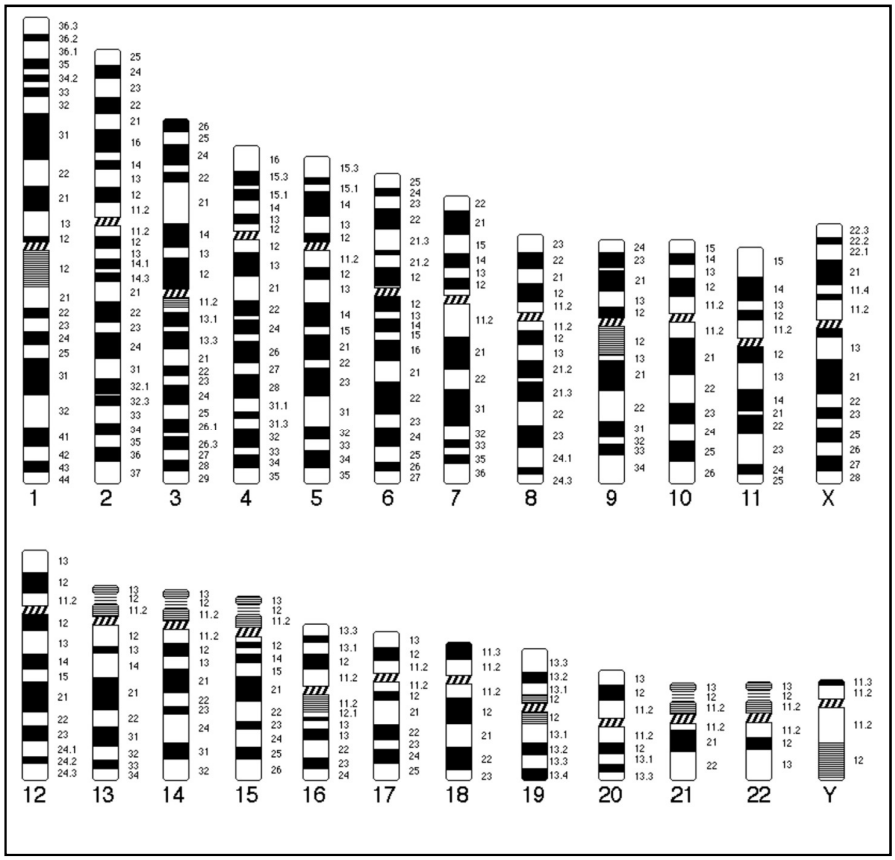
Εικόνα 4 . Φυσιολογικός καρυότυπος θήλεως με GTG- ζωνοποίηση.

Κάθε χρωμοσωματικός βραχίονας (p ο μικρός και q ο μεγάλος) περιέχει μια ή περισσότερες περιοχές (regions). Μέσα στις περιοχές κατανέμονται οι ζώνες κατά μήκος του χρωμοσώματος. Η κάθε περιοχή οριοθετείται από πάγια ορόσημα, απαραίτητα σημεία για την ταυτοποίηση των χρωμοσωμάτων. Αυτά είναι τα τελομερή (άκρα των χρωμοσωμάτων), τα κεντρομερίδια και συγκεκριμένες χαρακτηριστικές ζώνες. Άρα μια περιοχή μπορεί να εμπεριέχει μια ή παραπάνω ζώνες. Οι περιοχές και οι ζώνες αριθμούνται αρχίζοντας από το κεντρομερίδιο (αριθμός 1) και συνεχίζουν με αύξοντα αριθμό όσο προχωράμε προς το τελομέρος κατά μήκος του κάθε βραχίονα. Χαρακτηριστικές ζώνες παίρνουν επίσης τον αριθμό 1 της περιοχής όπου ανήκουν. Για τον ακριβή προσδιορισμό και την ταυτοποίηση μιας ζώνης πρέπει να

είναι γνωστά τα εξής: σε ποιο χρωμόσωμα αναφερόμαστε (αριθμός του χρωμοσώματος), σε ποιόν βραχίονα (p ή q), σε ποια περιοχή (region) και σε ποιόν αριθμό της ζώνης.

Η ακριβής περιγραφή ενός καρυοτύπου περιλαμβάνει τον συνολικό αριθμό των χρωμοσωμάτων, ακολουθεί ένα κόμμα, έπειτα ο αριθμός και ο τύπος των φυλετικών χρωμοσωμάτων. Έτσι ο φυσιολογικός καρυότυπος άρρενος είναι : 46,XY και θήλεος: 46,XX.

Σε καρυότυπο με αλλοίωση γράφονται μέσα σε παρένθεση τα χρωμοσώματα που συμμετέχουν κι έπειτα ακολουθεί το σύμβολο της αναδιάταξης με συντομογραφία. Εάν εμπλέκονται περισσότερα από δύο χρωμοσώματα,τότε τα διαχωρίζουμε με ελληνικό κόμμα. Αν συμμετέχει και φυλετικό χρωμόσωμα σε αλλοίωση,τότε αυτό αναφέρεται πρώτο. Επίσης ο ίδιος τρόπος αναφοράς ισχύει και για τα σημεία θραύσης.



Εικόνα 5. Διαγραμματική απεικόνιση της ζώνωσης G ανθρώπινων χρωμοσωμάτων, με 550 περίπου ζώνες ανά απλοειδή καρυότυπο. Τα χρωμοσώματα αναπαριστώνται ως μονοχρωματιδιακές δομές και όχι με δύο χρωματίδες όπως φαίνονται τα μιτωτικά χρωμοσώματα στο μικροσκόπιο. Τα κεντρομερίδια (πρωτογενείς περισφύξεις) υποδηλώνονται με τις στικτές περιοχές. Οι ανοιχτόχρωμες στικτές γκρι περιοχές δείχνουν τις ζώνες στικτής χρώσης και συχνά αντιστοιχούν σε θέσεις ετερομορφισμών.

1.3.5. Χρωμοσωματικές αλλοιώσεις

Διακρίνονται σε αριθμητικές και σε δομικές. Οι πρώτες περιλαμβάνουν οποιαδήποτε απόκλιση από τον φυσιολογικό αριθμό των χρωμοσωμάτων. Έτσι προκύπτει η ανευπλοειδία (2n+1) και η πολυπλοειδία (3n, 4n, ...). Παραδείγματα αριθμητικών ανωμαλιών είναι το σύνδρομο Down (τρισωμία 21), το σύνδρομο Turner (45,X), κ.ά.

Οι δομικές αλλοιώσεις αφορούν σε οποιαδήποτε μεταβολή της δομής σε σχέση με το φυσιολογικό πρότυπο. Χαρακτηρίζονται ως *ισοζυγισμένες* όταν δεν μεταβάλλουν το ισοζύγιο του γενετικού υλικού του κυττάρου, ενώ ως *μη ισοζυγισμένες* όταν το μεταβάλλουν.

Οι κυριότερες αναδιατάξεις (rearrangements) του γενετικού υλικού είναι:

α) Διπλασιασμός (duplication, dup). Η επανάληψη ενός χρωμοσωματικού τμήματος πάνω στο ίδιο ή σε άλλο μη ομόλογο χρωμόσωμα. Συχνά, παράγει περισσότερη πρωτεΐνη μιας και τα συγκεκριμένα γονίδια εκφράζονται εις διπλούν.

β) Έλλειψη (deletion, del). Η απώλεια ενός χρωμοσωματικού τμήματος Μία έλλειψη χαρακτηρίζεται τελική ή ενδιάμεση ανάλογα με τα σημεία θραύσης, επηρεάζοντας τα συγκεκριμένα αλληλόμορφα γονίδια του τμήματος που χάνεται. Οι μικροελλείψεις (microdeletions) ανιχνεύονται κυρίως με τη μεθοδολογία FISH και είναι υπεύθυνες για πολλά σύνδρομα.

γ) Μετάθεση (translocation, t). Ανταλλαγή χρωμοσωματικών τμημάτων μεταξύ δυο ή και περισσοτέρων χρωμοσωμάτων, με αποτέλεσμα τη δημιουργία υβριδικών γονίδιων στις περιοχές σύντηξης, εκφράζοντας μια πρωτεΐνη με άλλη διαφορετική λειτουργία. Η μεταθέσεις αυτές μπορεί και να μην είναι αμοιβαίες.

δ) Αναστροφή (inversion, inv). Είναι η περιστροφή 180° ενός χρωμοσωμικού τμήματος και υπάρχουν οι παρακεντρικές και οι μετακεντρικές αναστροφές.

ε) Ένθεση (insertion, ins). Είναι η κίνηση ενός χρωμοσωμικού τμήματος προς μια νέα, ενδιάμεση θέση στο ίδιο ή σε άλλο χρωμόσωμα. Το χρωμόσωμα, στο οποίο το τμήμα μετακινείται, διευκρινίζεται πάντα πρώτο.

στ) Ισοχρωμόσωμα (isochromosome, i). Είναι μια δομική αλλοίωση που προκύπτει από επανάληψη και έλλειψη γενετικού υλικού. Τα ισοχρωμοσώματα αποτελούνται από βραχίονες που αποτελούν κατοπτρικά είδωλα μεταξύ τους. Προκύπτουν από την εγκάρσια διαίρεση του κεντρομεριδίου.

1.4. Η συμβολή της κλασσικής κυτταρογενετικής στις αιματολογικές κακοήθειες

Η κυταρογενετική αποτελεί κλάδο των βιοεπιστημών που συνδέει τους μηχανισμούς της κληρονομικότητας με την κυτταρική λειτουργία. Προσδιορίζει τόσο τις χρωμοσωματικές αλλοιώσεις οι οποίες εμπλέκονται σε γενετικά κληρονομικά νοσήματα, όσο και τις επίκτητες χρωμοσωματικές αλλοιώσεις. Η ανίχνευση και ο χαρακτηρισμός των επίκτητων χρωμοσωματικών αλλοιώσεων συμβάλλει στην:

α) ακριβή διάγνωση,

β) προγνωστική αξιολόγηση της πορείας της νόσου,

γ) επιλογή του κατάλληλου θεραπευτικού πρωτοκόλλου,

δ) εκτίμηση του θεραπευτικού αποτελέσματος.

Δεν υπάρχει αμφιβολία ότι η ανάπτυξη εξελιγμένων τεχνικών όπως ο φθορίζων in situ υβριδισμός (FISH), ο πολύχρωμος φθορίζων in situ υβριδισμός (m-FISH) και σε κάποιο βαθμό ο βασιζόμενος σε μικροσυστοιχίες συγκριτικός γονιδιωματικός υβριδισμός (array CGH) έχει ενισχύσει τη γνώση των χρωμοσωμικών ανωμαλιών
700 στα αιματολογικά νεοπλάσματα (Wilkens L. et al., 1998; Zhang F.F. et al., 2000; Tirado C.A. et al., 2007). Αυτές οι τεχνικές έχουν συμβάλει σημαντικά στην ανακάλυψη σημαντικών κρυφών αναδιατάξεων καθώς και στην ανίχνευση τέτοιων αναδιατάξεων σε μη διαχωρισμένα κύτταρα διαφόρων παρασκευασμάτων ιστού. Η εφεύρεσή τους θεωρήθηκε ως δυνητικός ανταγωνιστής της κλασικής, συμβατικής κυτταρογενετικής λόγω της υψηλότερης ανάλυσης τους.

Παρ'όλα αυτά, αρκετά χρόνια μετά την εισαγωγή αυτών των εξελιγμένων τεχνολογιών, η συμβατική κυτταρογενετική ανάλυση εξακολουθεί να είναι η καλύτερη μέθοδος για τη διάγνωση των περισσότερων αιματολογικών νεοπλασμάτων, καθώς έχει το πλεονέκτημα μιας συνολικής εξέτασης όλων των χρωμοσωμάτων, σε σύγκριση με την πιο εστιασμένη ανίχνευση ανωμαλιών. Είναι αδιαμφισβήτητο το γεγονός ότι η ικανότητα των συμβατικών κυτταρογενετικών αναλύσεων να εντοπίζουν συγγενείς και ξεχωριστούς κλώνους πληθυσμούς, γεγονός το οποίο είναι δύσκολο για τη FISH και πρακτικά αδύνατο για την aCGH (Robak T. et al.,2003; Gargallo P et al., 2005), όπως π.χ. σε περιπτώσεις με παραλλαγή της μετάθεσης του χρωμοσώματος Ph στην ΧΜΛ.

1.5 ΧΡΟΝΙΑ ΜΥΕΛΟΓΕΝΗΣ ΛΕΥΧΑΙΜΙΑ

1.5.1. Επιδημιολογία- Κλινικά και μορφολογικά χαρακτηριστικά

Η Χρόνια Μυελογενής Λευχαιμία (ΧΜΛ) είναι μια κλωνική ασθένεια του μυελού των οστών με κύριο γνώρισμα την μεγακαρυοκυτταρική και κοκιοκυτταρική υπερπλασία. Στη δύση αριθμεί το 15 - 20 % όλων των περιπτώσεων λευχαιμιών. Εμφανίζεται στη μέση ηλικία - στα 55 έτη κατά μέσο όρο και με ελαφρώς αυξημένη προδιάθεση στους άρρενες. Περίπου το 2% των περιστατικών είναι παιδιά. Εμφανίζονται 1 - 2 νέα περιστατικά ΧΜΛ ανά 100.000 κατοίκους (2/100000) και ανά έτος (Garcia-Manero G. et al., 2003; Jamal A. et al., 2004; Redaeli A. et al., 2004).

Στο ένα τρίτο των περιπτώσεων εμφανίζεται μυελοΐνωση, ενώ δεν απουσιάζουν η ηωζινοφιλία και ειδικότερα η βασεοφιλία, καθώς και η μεγάλη σπληνομεγαλία. Η αιμοποιητική ωρίμανση εξελίσσεται με ένα φαινομενικά κανονικό ρυθμό στις διάφορες κυτταρικές σειρές, σε αντίθεση με την Οξεία Μυελογενή (ΟΜΛ) και την Οξεία Λεμφογενή (ΟΛΛ) λευχαιμία (Muechlek SD. et a.l, 1984; Jacknow G. et al., 1985; Cotta CV and Bueso Ramos CE., 2007).

Παράγοντες που προδιαθέτουν στην εκδήλωση της ΧΜΛ δεν έχουν βρεθεί. Παρόλλα αυτά κάποιες μελέτες έχουν δείξει τη συσχέτιση της εκδήλωσης της νόσου με την έκθεση σε ραδιενέργεια (Bizozzero O.Z, et al., 1966; Corso A. et al., 1995).

Η λευχαιμογένεση στην ΧΜΛ θεωρείται πως συμβαίνει στο επίπεδο του προγονικού πολυδύναμου αιμοποιητικού κυττάρου (HSC). Αυτό εξηγεί το γιατί οι πλείστες αιμοποιητικές γενιές (ουδετερόφιλα, ηωσινόφιλα, βασεόφιλα, ερυθροκύτταρα, πρόδρομα λεμφοκύτταρα, ΝΚ κύτταρα) εμπλέκονται στην πορεία της νόσου (Jacknow G. et al., 1985; Muechlek S.D. et a.l, 1984; Takahashi et al.,1998; Jiang et al.,2007; Cotta C.V. and Bueso Ramos C.E., 2007).

Το 20-40% περίπου των ασθενών με ΧΜΛ είναι ασυμπτωματικοί και ανακαλύπτονται μετά από έναν τυχαίο έλεγχο ρουτίνας και συνήθως η διάγνωση γίνεται στην χρόνια φάση της νόσου ή στην επιταχυνόμενη φάση (Savage D.G. et al., 1997; Garcia-Manero G. et al., 2003; Cotta C.V and Bueso Ramos C.E., 2007).

Η ΧΜΛ έχει τρία στάδια εξέλιξης:

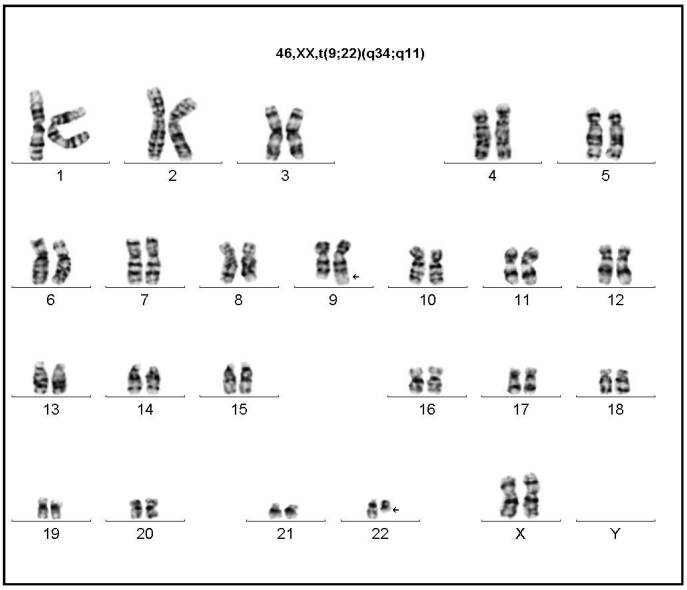
i) τη χρόνια φάση (Chronic Phase, CP), με σχετικά ήπια κλινική συμπτωματολογία, χωρίς σημαντική δυσπλασία και βλάστες στο μυελό (ΒΜ) ή/και στο περιφερικό αίμα (Π/Α), αλλά συχνά με βασεοφιλία. Ο μέσος όρος παραμονής των ασθενών στη φάση αυτή είναι τα 3 έτη (Spiers A.S. et al, 1977; Bennet J.M et al., 1994; Xu Y. et al., 2003).

ii) την επιταχυνόμενη φάση (Accelerated Phase, AP), η οποία είναι και πιο δυσδιάκριτη διότι τα όριά της επικαλύπτονται από τις άλλες δύο φάσεις, τόσο κλινικά όσο και μορφολογικά. Η προσπάθεια πολλών ερευνητών για διάκρισή της διαφέρει από έρευνα σε έρευνα (Kantarjian HM et al., 1988; Savage DG et al., 1997; Gratwohl A. et al., 1998; Buesche G. et al., 2003; Bacher U. et al., 2005; Cortes J.E. et al., 2006). Στην 3η έκδοση της WHO (WHO, 2017) προτείνεται η σταδιοποίηση σε αυτή τη φάση της ΧΜΛ όταν υπάρχει εμμένουσα λευκοκυττάρωση και θρομβοκυττάρωση, καθώς και επιπρόσθετες χρωμοσωματικές αλλοιώσεις πέραν του χρωμοσώματος Ph (Cortes J.E. et al., 2006).

iii) την βλαστική κρίση (Blast Crisis, BC). Η βλαστική κρίση χαρακτηρίζεται από αύξηση του αριθμού των ανώριμων κυττάρων στο μυελό και στο περιφερικό αίμα (βλάστες τουλάχιστον 20% στο Π/Α), με κλινικά ευρήματα προοδευτικής αναιμίας, θρομβοπενίας, εξωμυελικών συσσωρεύσεων βλαστοκυττάρων και από μειωμένη ανταπόκριση στην θεραπεία (Peterson LC. et al., 1976; Saikia T., et al., 1988; Nair C., et al., 1995; Khalidi HS. et al., 1998; Bacher U. et al., 2006; Patel B.B. et al., 2006).

1.5.2. Κυτταρογενετικά ευρήματα στην ΧΜΛ

Κύριο κυτταρογενετικό εύρημα της ΧΜΛ είναι η αμοιβαία μετάθεση τμημάτων μεταξύ των χρωμοσωμάτων 9 και 22 [t(9;22)(q34;q11.2)] (Εικόνα 6). Η μετάθεση αυτή έχει ως αποτέλεσμα την μεταφορά του ογκογονιδίου ABL1 από το χρωμόσωμα 9 στην περιοχή του χρωμοσώματος 22 που εμπεριέχει το γονίδιο BCR. Το μικρότερο χρωμόσωμα 22 που σχηματίζεται φέρει το υβριδικό γονίδιο BCR-ABL. Η σύνδεση αυτή ενισχύει σε υπερθετικό βαθμό την δράση της κινάσης της τυροσίνης που έχει η πρωτεΐνη ABL1. Έτσι προάγονται αλλεπάλληλες φωσφορυλιώσεις ενδοκυττάριων πρωτεϊνών ή και μορίων τυροσίνης, που κατόπιν διαδοχικών ενεργοποιήσεων εισέρχονται στον πυρήνα. Εκεί ενεργοποιούνται γονίδια που ευθύνονται για τον πολλαπλασιασμό ή αναστέλλουν την απόπτωση (μονοπάτια RAS, MEK1\2, STAT1-5, PI3). Αποτέλεσμα είναι ο ανεξέλεγκτος κυτταρικός πολλαπλασιασμός που οδηγεί στην ΧΜΛ.



Εικόνα 6. Καρυότυπος θήλεως με την κλασσική αμοιβαία μετάθεση t(9;22)(q34;q11.2).

800

1.5.2.1. Η ανακάλυψη και ο χαρακτηρισμός του χρωμοσώματος Philadelphia (Ph)

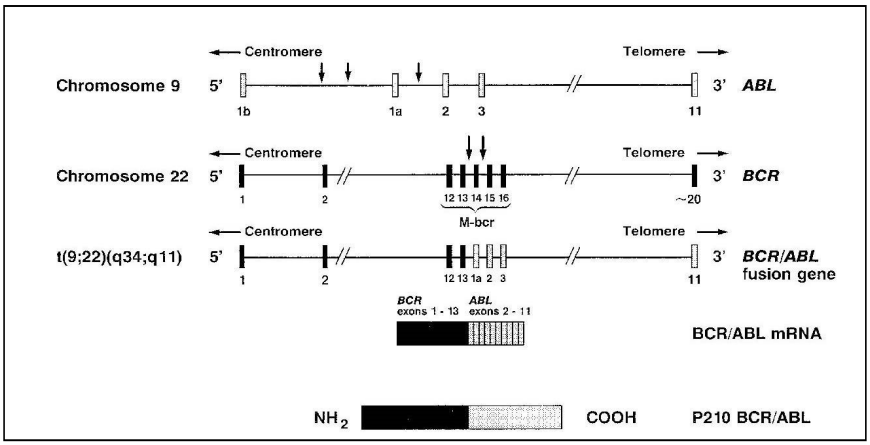
Όπως προαναφέρθηκε το 1960 οι Nowell και Hungerfold περιέγραψαν την πρώτη νεοπλασία στον άνθρωπο, η οποία σχετίζεται άμεσα με χρωμοσωματική ανωμαλία. Η ακριβής καταγωγή του χρωμοσώματος Ph διευκρινίστηκε με πλήρη σαφήνεια μέσα από την εφαρμογή των τεχνικών ζώνωσης σαν μια αναδιάταξη του 22ου χρωμοσώματος. Σύντομα η Rowely (1973) απέδειξε πως το χρωμόσωμα Ph

εμφανίστηκε κατόπιν όχι εξαιτίας μιας απλής εξάλειψης από το 22 χρωμόσωμα, μα εξαιτίας μιας μετατόπισης υλικού από το 22ο χρωμόσωμα στο τελικό άκρο του μεγάλου βραχίονα του 9ου χρωμοσώματος. Το προϊόν αυτής της μετάθεσης t(9;22) (q34:q11) είναι το παράγωγο (derivative) Ph χρωμόσωμα der(22) t (9;22).

Η αμοιβαία μετάθεση της t(9;22) επαληθεύτηκε από τους De Kleint et al: Ένα μικρό τμήμα του χρωμοσώματος 9 (εμπεριέχοντας μέρη του ογκογονιδίου ABL1) μεταφέρθηκε στο χρωμόσωμα 22 (De Kleint et al., 1982). Η αρχική αβεβαιότητα για το εάν το σημείο θραύσης (break point) στον μεγάλο βραχίονα του 22 χρωμοσώματος (22q) έπρεπε να χαρτογραφηθεί στην ζώνη 11, υποχώρησε με την εφαρμογή υψηλής ανάλυσης τεχνικών ζώνωσης (high resolution banding techniques) (Prakash O., Yunis J.J., 1984). Το σημείο θραύσης στο χρωμόσωμα 9 χαρτογραφήθηκε στην περιοχή q34 υποζώνη 1 (9q34.1) και το σημείο θραύσης στο χρωμόσωμα 22 χαρτογραφήθηκε στην περιοχή q11 υποζώνη 2 (22q11.2)

Μεταγενέστερες μοριακές έρευνες έδειξαν πως ένα χιμαιρικό θραύσμα DNA που απομονώθηκε από έναν ασθενή με ΧΜΛ, εκτός από το γονίδιο ABL1, περιείχε αλληλουχίες προερχόμενες και από το 22 χρωμόσωμα. (Heinsterkamp et al., 1983). Περαιτέρω έρευνα σε 17 ασθενείς με ΧΜΛ κατά την οποία απομονώθηκαν τμήματα του χρωμοσώματος 22 που μετείχαν στην μετατόπιση, έδειξε πως το σημείο θραύσης εντοπίστηκε μέσα σε μια περιορισμένη περιοχή 5.8 Kb, η οποία ονομάστηκε «break point cluster region» ή εν συντομία bcr (Groffen et al., 1984). Γρήγορα όμως φάνηκε πως το bcr ήταν μέρος ενός μεγαλύτερου γονιδίου, αναφερόμενο πλέον σαν BCR ή M-bcr (Major break point cluster region) την περιοχή δηλαδή στην οποία εντοπίζονται τα κύρια σημεία θραύσης (Heinsterkamp et al., 1985) (Εικόνα 7).

Η ανάλυση cDNA υβριδικών ακολουθιών BCR-ABL1 μερικού ή πλήρους μήκους, απέδειξε τελικά πως το παράγωγο χρωμόσωμα Ph εμπεριέχει το γονίδιο σύντηξης BCR-ABL1 (Mes-Masson et al.,1986). Η υπέρμετρη δράση της κινάσης της τυροσίνης ως έκφραση του γονιδίου σύντηξης BCR-ABL1 είναι η κύρια συμβολή στον λευχαιμικό μετασχηματισμό από την t(9;22) (Lugo et al., 1990). Επιδρά σε αρκετά ενδοκυττάρια μονοπάτια μεταγωγής σήματος, επηρεάζει την κυτταρική ανανέωση, τον πολλασπλασιασμό, την απόπτωση και την προσκόλληση λευχαιμικών κυττάρων (Ren, 2005; Cillioni and Saglio, 2012). Μέσα από αυτή την γνώση κι έρευνα ανακαλύφθηκαν τα πρώτα αντικαρκινικά φάρμακα με στοχευμένη δράση σε μοριακό στόχο. Η ανακάλυψη της ιματινίμπης (Glivec) στάθηκε από τις πιο θεαματικές θεραπευτικές προσεγγίσεις σε ασθενείς με ΧΜΛ (Druker et al., 1996).



Εικόνα 7. Το υβριδικό γονίδιο BCR/ABL1 που δημιουργείται από την αμοιβαία μετάθεση t(9;22)(q34;q11.2).

1.5.2.2. Επιπρόσθετες χρωμοσωματικές αλλοιώσεις σε ασθενείς με ΧΜΛ, θετικοί ως προς το χρωμόσωμα Ph

Καθ΄ όλη την διάρκεια της χρόνιας φάσης, σε ασθενείς με ΧΜΛ η t(9;22) παραμένει η κύρια αλλοίωση. Παρόλα αυτά με την πρόοδο της ασθένειας το 75-80% των περιπτώσεων αναπτύσσει επιπρόσθετες χρωμοσωματικές ανωμαλίες. Αυτές οι ανωμαλίες ανιχνεύονται αρκετό καιρό πριν εκδηλωθεί κλινικά ή/και αιματολογικά η υποτροπιάζουσα κακοήθεια, με αποτέλεσμα να χρησιμεύουν σαν αξιόλογοι προγνωστικοί δείκτες.

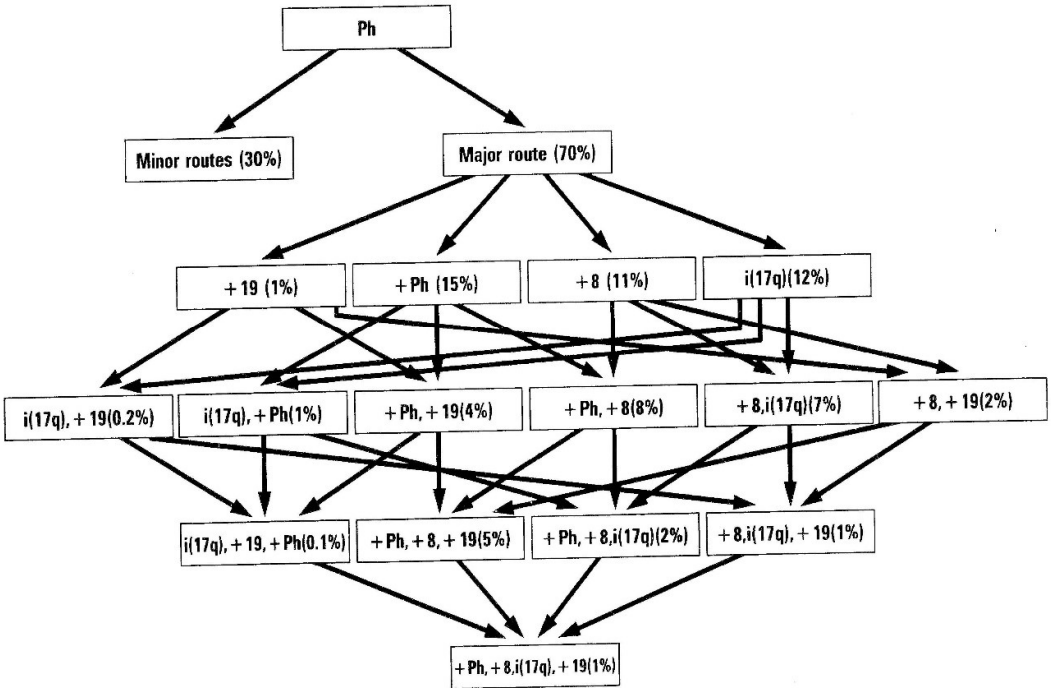
Από τις αρχικές ακόμη έρευνες υποδηλώνονταν ότι οι καρυοτυπικές εκτροπές που ανιχνεύονταν μαζί με το χρωμόσωμα Ph δεν ήταν τυχαίες, γεγονός που επιβεβαιώθηκε αργότερα με την εφαρμογή των τεχνικών ζωνοποίησης. Χρησιμοποιήθηκαν οι όροι *κύριες οδοί (major routes) και δευτερεύουσες οδοί (minor routes)* για τα μονοπάτια των χρωμοσωματικών αλλοιώσεων βάσει της συχνότητας εμφάνισης τους σε ασθενείς με ΧΜΛ.

Πολλές έρευνες κατέληξαν στο κοινό συμπέρασμα πως οι κυτταρογενετικές αλλοιώσεις που εμπλέκονται στην εξέλιξη της Χ.Μ.Λ σε βλαστική κρίση αφορούν τα χρωμοσώματα 8, 17 και 22, επειδή ανιχνεύονταν η τρισωμία 8 (+8), το ισοχρωμόσωμα i(17q) και ένα πρόσθετο χρωμόσωμα Ph σε μεγάλη συχνότητα (Kantarjian et al., 1987; Hashimoto et al., 1990); Kadam et al., 1991). Επίσης, παρόλο που η τρισωμία 19 (+19) ανιχνεύτηκε σε ποσοστό 15% των ασθενών που ήδη παρουσίαζαν πρόσθετες χρωμοσωμικές αλλοιώσεις, θεωρείται πως ανήκει στην κύρια οδό της κυτταρογενετικής εξέλιξης στην ΧΜΛ.

Όπως παρατηρούμε στην Εικόνα 8, σχεδόν σε κάθε βλαστική κρίση Χρόνιας Μυελογενούς Λευχαιμίας τα συχνότερα ευρήματα αφορούν αυτές τις τρεις αλλοιώσεις οι οποίες συναντώνται σε ποικίλους συνδυασμούς μεταξύ τους και ποικίλες συχνότητες. Παρατηρούμε πως μερικές φορές το πρόσθετο Ph αποκτάται διαμέσου του σχηματισμού ενός δικεντρικού χρωμοσώματος ή ενός ισοχρωμοσώματος.

Ένα επιπλέον χρωμόσωμα 19 εντοπίζεται μετέπειτα στη καρυοτυπική εξέλιξη, συχνά σε συνδυασμό +19, +Ph. Επιπλέον, εκεί όπου το i(17q) από μόνο του ή μαζί με το +8 αποτελεί ένα σύνηθες εύρημα, οι συνδυασμοί i(17q), +19; +8, i(17q), +19 και i(q17), +19, +Ph ανιχνεύονται σπάνια. Ο συνδυασμός +Ph, i(17q) είναι σπάνιος υποδηλώνοντας περαιτέρω τον προφανώς περιοριστικό ρόλο του ισοχρωμοσώματος i(17q) στην κυτταρογενετική εξέλιξη της ΧΜΛ, τουλάχιστον όταν δεν υπάρχει επιπλέον το χρωμόσωμα 8.

Υπάρχουν διαθέσιμα επαρκή δεδομένα για τον ποσοτικό προσδιορισμό των χρωμοσωμικών ανωμαλιών που υπάγονται στις δευτερεύουσες οδούς εξέλιξης κλώνων στην Χ.Μ.Λ. Ανιχνεύτηκαν 6 αλλοιώσεις οι 5 εκ των οποίων είναι αριθμητικές :(-Y,-7,-17,+17,+21) και μια δομική: t(3;21)(q26;q22). Οι συγκεκριμένες αλλοιώσεις συναντώνται σε ποσοστό >50% όλων των περιστατικών Χ.Μ.Λ των minor routes. Από αυτές η τρισωμία 21 (+21), που εντοπίζεται στο 7% δειγμάτων σε βλαστική κρίση αποτελεί το πιο σύνηθες εύρημα κυρίως όμως σε συνδυασμό με μια ή παραπάνω major route αλλοιώσεις. Ακολουθεί η έλλειψη του Y χρωμοσώματος (-Y) σε ποσοστό 5% δειγμάτων με πρόσθετες αλλοιώσεις. Η μονοσωμία 7 και 17, (-7, -17) εμφανίζονται σε ποσοστό 3% των περιπτώσεων με δευτερεύουσες χρωμοσωμικές εκτροπές. Η τρισωμία 17 (+17) βρίσκεται στο 1% των δειγμάτων που δεν διαθέτουν major route αλλοιώσεις.



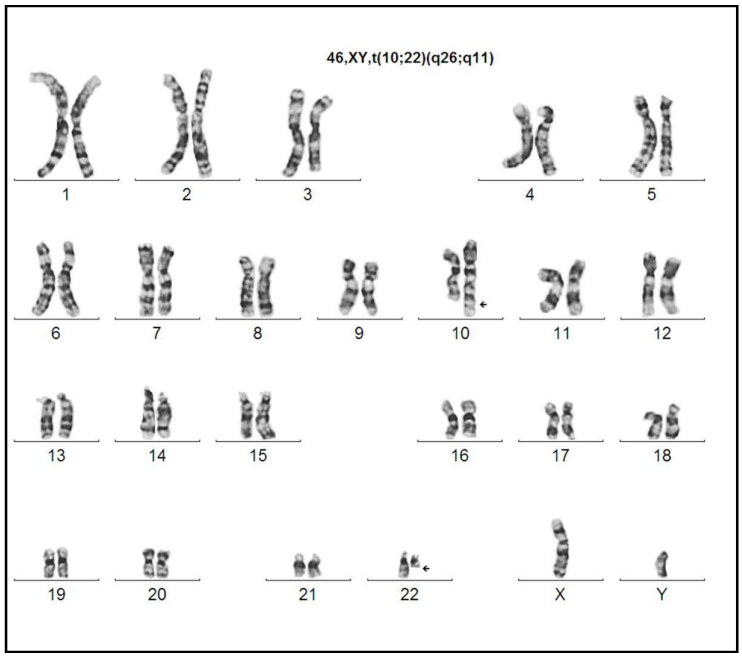
Εικόνα 8. ΧΜΛ: Μονοπάτια της κυτταρογενετικής εκτροπής

Η συχνή παρουσία επίσης του ισοχρωμοσώματος i(17q) έχει προκαλέσει το ερευνητικό ενδιαφέρον μίας και θεωρείται πως προάγει την λευχαιμική πορεία και την κλωνική εξέλιξη. Σε αυτό το εύρημα χάνεται ο μικρός βραχίονας (17p) και διπλασιάζεται ο μεγάλος βραχίονας (17q) του χρωμοσώματος 17. Πιθανό υποψήφιο
900 γονίδιο για τις παθογενετικές αλλοιώσεις του χρωμοσώματος 17 είναι το γονίδιο TP53. Μοριακές αναλύσεις έδειξαν πως οι ασθενείς Χ.Μ.Λ που εκφράζουν έλλειμμα στο 17p loci συχνά έχουν απενεργοποιημένο το αλληλόμορφο του μέσω σημειακής μετάλλαξης ή αναδιάταξης. Η απώλεια της λειτουργίας του TP53 συμβαίνει κατά την εξέλιξη της ΧΜΛ στο 1/4 όλων των περιπτώσεων (Ahuja et al., 1991; Feinstein et al.,1991).

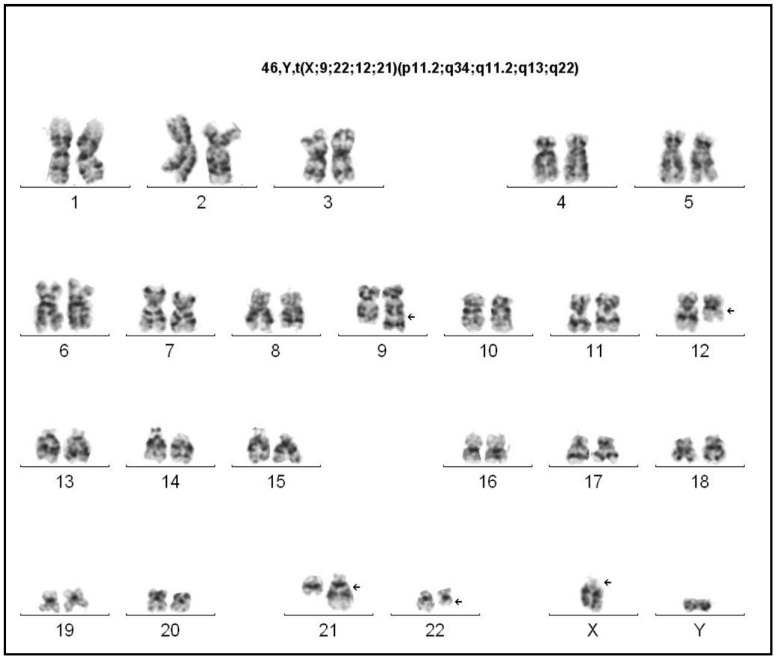
Η t(3;21)(q26;q22) σαν δομική αναδιάταξη ταυτοποιήθηκε κι εντάχθηκε στις minor route changes με συχνότητα 1% λίγο πριν την είσοδο σε βλαστική κρίση (Lafage-Pochitalof et al.,1989).Τα σημεία θραύσης χαρτογραφήθηκαν σε επίπεδο υποζωνών: 3q26.2 και 21q22.2. Κατόπιν ελέγχου γειτονικών περιοχών για πιθανές αναδιατάξεις βρέθηκε η δημιουργία ενός γονιδίου σύντηξης AML1/EVI1 που κωδικοποιεί έναν μεταγραφικό παράγοντα ο οποίος με άγνωστο τρόπο προωθεί την βλαστική κρίση (Russel et al, 1993). Πρόσφατα αποδείχτηκε πως λευχαιμικά κύτταρα που φέρουν την συγκεκριμένη μετατόπιση t(3;21)(q26;q22) εκφράζουν και ανασυνδιασμό ανάμεσα στο γονίδιο AML1 του 21q22 και στα γονίδια EAP και MDS1 του 3q26.

1.5.3. Παραλλαγές της αμοιβαίας μετάθεσης t (9;22)

Το χρωμόσωμα Ph δύναται να προέλθει και από άλλες αναδιατάξεις πέραν της κλασσικής t(9;22) σε ποσοστό 5-10% των περιστατικών Χ.Μ.Λ. Στις *απλές* παραλλαγές το τμήμα που χάνεται από τον μεγάλο βραχίονα του 22ου χρωμοσώματος μετατοπίζεται όχι στο 9 χρωμόσωμα αλλά σε κάποιο άλλο χρωμόσωμα (Εικόνα 9), ενώ στις *σύνθετες* παραλλαγές εμπλέκονται 3 ή περισσότερα χρωμοσώματα (Εικόνα 10).



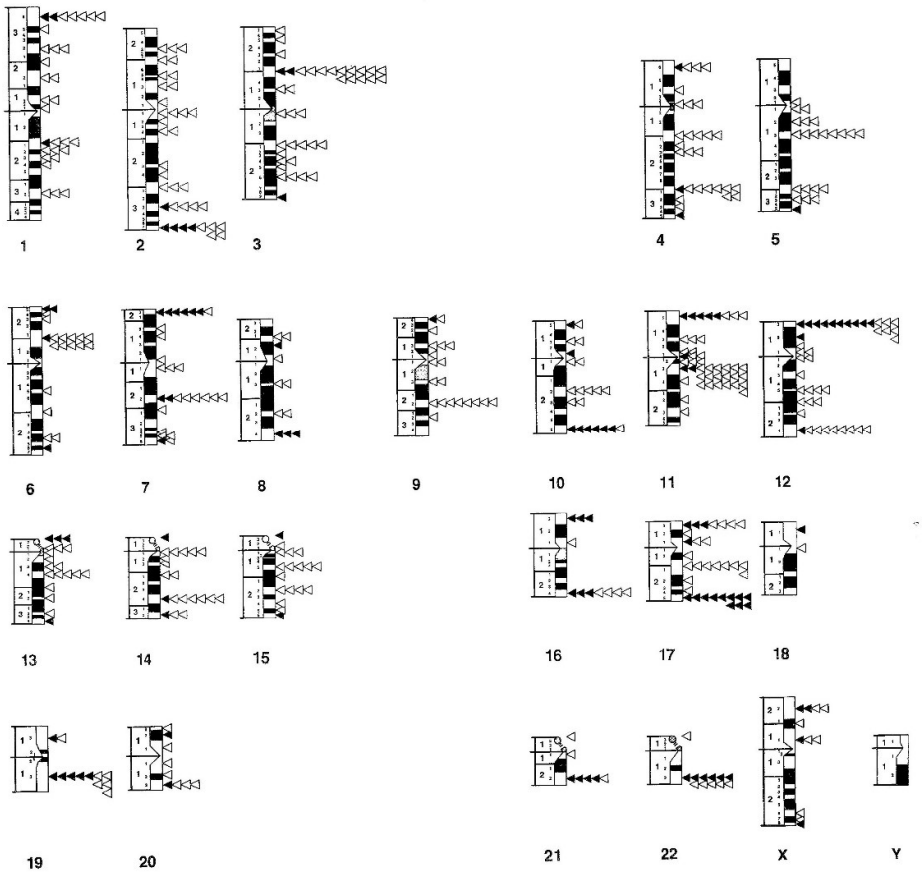
Εικόνα 9 . Απλή παραλλαγή της μετάθεσης του χρωμοσώματος Ph.



Εικόνα 10 . Σύνθετη παραλλαγή της μετάθεσης του χρωμοσώματος Ph.

Όλα τα χρωμοσώματα εμπλέκονται στις σύνθετες παραλλαγές μεταθέσεων με τα περισσότερα σημεία θραύσης να ανευρίσκονται στις εξής χρωμοσωματικές ζώνες: 1p36, 3p21, 5q13, 6p21, 9q22, 11q13, 12p13, 17p13, 17q21, 17q25, 19q13, 21q22, 22q12, και 22q13. Οι παραλλαγές αυτές, παρόλη την γενετική τους πολυπλοκότητα, δεν συμβάλουν σε συγκεκριμένο προγνωστικό ή φαινοτυπικό αντίκτυπο της νόσου σε σχέση με περιστατικά που φέρουν την κλασσική μετάθεση t(9;22)(q34;q11). Ως επί το πλείστον, η t(9;22), ή μια παραλλαγή της παραμένει ως βασική χρωμοσωματική αλλοίωση κατά την διάρκεια της χρόνιας φάσης της νόσου, ενώ επιπρόσθετες χρωμοσωματικές αλλοιώσεις δημιουργούνται κατά την εκτροπή σε βλαστική κρίση σε ποσοστό 60-80%.

Όλα τα χρωμοσώματα εμπλέκονται σε απλές ή σύνθετες παραλλαγές μετατοπίσεων στην ΧΜΛ. Τα μέχρι τώρα γνωστά σημεία θραύσης που ευθύνονται για τις ποικίλες αυτές μετατοπίσεις βάσει της συχνότητας εμφάνισής τους έχουν εντοπιστεί και διανεμηθεί κατά μήκος κάθε χρωμοσώματος (Εικόνα 11).



Εικόνα 11. Συχνότητα των χρωμοσωματικών βραχιόνων που εμπλέκονται σε παραλλαγή της μετάθεσης Ph στον καρυότυπο. Τα ανοιχτόχρωμα τρίγωνα αφορούν σύνθετες παραλλαγές και τα σκούρα, απλές.

1.6. ΣΚΟΠΟΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Η ΧΜΛ είναι μυελοϋπερπλαστική, νεοπλασματική νόσος του αιμοποιητικού συστήματος που προσβάλλει 1-2 στα 100.000 άτομα ετησίως και αποτελεί το 15-20% των ασθενών με νεοδιαγνωσμένη λευχαιμία στους ενηλίκους. Εμφανίζεται κυρίως σε άτομα μέσης ηλικίας (μέσος όρος 65 έτη). Στη διάγνωση, ο αριθμός των λευκών είναι υψηλός, ενώ η μορφολογία του μυελού των οστών χαρακτηρίζεται από μυελική και μεγακαρυωτική υπερπλασία.

Η νόσος επιβεβαιώνεται με την ανεύρεση του χρωμοσώματος Philadelphia (Ph) στον καρυότυπο, την πρώτη ειδική χρωμοσωματική αλλοίωση που περιγράφηκε σε νεοπλασία. Το χρωμόσωμα Ph είναι προϊόν της αμοιβαίας μετάθεσης t(9;22)(q34;q11) που έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία του υβριδικού γονιδίου BCR-ABL1 το οποίο εδράζεται στο παράγωγο χρωμόσωμα 22 (Ph). Η παραγόμενη υβριδική πρωτεΐνη είναι μία κινάση της τυροσίνης. Η ΧΜΛ είναι μία από τις πρώτες νεοπλασίες στις οποίες οι νέες θεραπείες (αναστολείς της κινάσης της τυροσίνης) στοχεύουν στη μοριακή αλλοίωση.

Σε ποσοστό 2-10% των ασθενών με ΧΜΛ η δημιουργία του υβριδικού γονιδίου είναι αποτέλεσμα παραλλαγής του χρωμοσώματος Ph, όπου εκτός από τις περιοχές 9q34 και 22q11 συμμετέχουν μια, ή περισσότερες περιοχές άλλων χρωμοσωμάτων. Η παρουσία της παραλλαγής του χρωμοσώματος Ph δεν έχει συσχετιστεί με ιδιαίτερο φαινότυπο της νόσου, παρόλα αυτά δεν έχει διευκρινιστεί η προγνωστική σημασία κάθε διαφορετικής παραλλαγής.

Ο σκοπός της παρούσης μελέτης έχει τις εξής επιδιώξεις: (i) τον καθορισμό της συχνότητας και του είδους της παραλλαγής της μετάθεσης t(9;22)(q34;q11) σε μεγάλο δείγμα Ελλήνων ασθενών, (ii) την ανεύρεση παραλλαγών που δεν έχουν αναφερθεί και την αναγνώριση νέων χρωμοσωματικών σημείων θραύσης, (iii) τον καθορισμό της συχνότητας συνύπαρξης επιπρόσθετων χρωμοσωματικών ανωμαλιών σε ασθενείς με παραλλαγή της μετάθεσης.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1. ΥΛΙΚΑ

2.1.1 Οργανολογικός Εξοπλισμός

Οι κύριες συσκευές και όργανα που χρησιμοποιήθηκαν για τη διεξαγωγή της πειραματικής πορείας είναι τα ακόλουθα:

1. Οπτικό μικροσκόπιο με ικανότητα μεγέθυνσης 100Χ – 1000Χ
2. Εστία στείρου χώρου κάθετης νηματικής ροής βιολογικής ασφαλείας
3. Επωαστικός Κλίβανος διοξειδίου του άνθρακα (37°C, 5% CO2).
4. Φυγόκεντρος.
5. Ηλεκτρονικός ζυγός ακριβείας τεσσάρων δεκαδικών ψηφίων.
6. Λογισμικό πρόγραμμα ανάλυσης εικόνας καρυοτύπου, Ikaros (Metasystems).

2.1.2 Αντιδραστήρια και Διαλύματα

Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για τη διεξαγωγή της πειραματικής πορείας είναι τα ακόλουθα:

1. Acetic Acid glacial (CH3COOH MW= 60,05g/mol), J.T. Baker.
2. Θρεπτικό υλικό McCoy's 5A modified medium (1x) για καλλιέργεια ανθρώπινων κυττάρων.
3. Εμβρυϊκός ορός μόσχου (Featal Calf Serum, FCS).
4. Διάλυμα αντιβιοτικών Penicillin/Streptomycin για την καλλιέργεια ανθρώπινων κυττάρων.
5. L-γλουταμίνη (20mM).
6. Διάλυμα κολσεμιδίου σε PBS συγκέντρωσης 10μg/ml.
7. Χλωριούχο Κάλιο (KCL) σε σκόνη (MW=74,56g/mol).

8. Μεθανόλη (CH_4O, MW= 32,44g/mol).

9. Ισοτονικό διάλυμα θρυψίνης σε PBS: Trypsin/EDTA 0.05%/0.02% σε PBS.

10. Διάλυμα χρώσης χρωμοσωματικών παρασκευασμάτων Giemsa (Giemsa Azur-Eosin-Methylene Blue Solution).

11. Ρυθμιστικό διάλυμα Sorensen (pH 6.8) σε ταμπλέτες.

12. Υλικό επικόλλησης καλυπτρίδων (Entellan).

13. Συνθετικό κεδρέλαιο για οπτικό μικροσκόπιο.

Τα διαλύματα που παρασκευάστηκαν για τη διεξαγωγή της πειραματικής πορείας είναι τα ακόλουθα:

1. <u>Πλήρες θρεπτικού υλικού για κυτταροκαλλιέργειες (500ml):</u>

   440ml McCoy's 5A

   50ml Εμβρυϊκός ορός μόσχου (FCS)

   5ml L-γλουταμίνη (200mM)

   5ml Διάλυμα αντιβιοτικών Penicillin/Streptomycin, 10000U/10000 μg/μl

2. <u>Υποτονικό διάλυμα KCL (75mM):</u>

   Διάλυση 0,56g Χλωριούχου Καλίου (KCL) σε 100mL απεσταγμένου νερού

3. <u>Διάλυμα Μονιμοποίησης Carnoy's (Μεθανόλη/Οξικό οξύ 3:1) (120ml):</u>

   90ml Μεθανόλη (Methanol CH_4O)

   30ml Οξικό Οξύ (Acetic Acid glacial, CH_3COOH)

4. <u>Διάλυμα χρώσης της Giemsa:</u>

   1 δισκίο Sorensen phosphate buffer διαλύεται σε 1L απεσταγμένο νερό (10x). Ακολουθεί μία δεκαδική αραίωση σε απεσταγμένο νερό (1x).

   Σε 70ml διαλύματος Sorensen 1x (pH=6.8) προστίθενται 2ml Giemsa ($C_{τελ}$=5%).

2.1.3 Ταυτότητα Δειγμάτων

1000 Το υλικό της μελέτης αποτέλεσαν 809 δείγματα μυελού των οστών από ενήλικες ασθενείς με νεοδιαγνωσθείσα ΧΜΛ ελληνικής καταγωγής, τα οποία παρελήφθησαν από το Εργαστήριο Υγειοφυσικής, Ραδιοβιολογίας & Κυτταρογενετικής του ΙΠΡΕΤΕΑ του ΕΚΕΦΕ «Δημόκριτος». (ΕΥΡΚ), προκειμένου να ελεγχθούν για την ύπαρξη κλωνικών δομικών ή/και αριθμητικών χρωμοσωματικών αλλοιώσεων, μετά από ενημέρωση και γραπτή συγκατάθεση των ασθενών ή σε περίπτωση που αυτό δεν ήταν εφικτό στενού συγγενικού προσώπου. Η διάγνωση των ασθενών με ΧΜΛ πραγματοποιήθηκε σε ελληνικά Νοσοκομεία. Ασθενείς με ιστορικό χημειοθεραπείας/ακτινοθεραπείας αποκλείστηκαν από τη μελέτη.

2.2. ΜΕΘΟΔΟΙ

2.2.1. Κλασσική Κυτταρογενετική – Καρυότυπος

Η μεθοδολογία της κλασσικής κυτταρογενετικής που ακολουθήθηκε περιλαμβάνει την παραλαβή και καλλιέργεια κυττάρων μυελού των οστών, τη συλλογή και μονιμοποίηση των κυττάρων, την προετοιμασία των χρωμοσωματικών παρασκευασμάτων για κυτταρογενετική ανάλυση, τη ζωνοποίηση των χρωμοσωμάτων με τη μέθοδο G-banding-Trypsin-Giemsa (GTG banding) και τέλος τη μικροσκοπική και καρυοτυπική ανάλυση των παρασκευασμάτων. Οι καρυότυποι περιγράφηκαν σύμφωνα με το διεθνές σύστημα ονοματολογίας για τη περιγραφή καρυοτύπων (ISCN 2016).

2.2.1.1. Παραλαβή και καλλιέργεια κυττάρων

Από κάθε ασθενή, συλλέγεται δείγμα μυελού των οστών 2-3mL υπό άσηπτες συνθήκες σε ηπαρινισμένο σωληνάριο και εν συνεχεία αποστέλλεται στο Εργαστήριο ΕΥΡΚ του ΕΚΕΦΕ «Δημόκριτος». Για κάθε δείγμα πραγματοποιούνται δύο ανεξάρτητες καλλιέργειες διάρκειας 24 και 48 ωρών.

Για κάθε καλλιέργεια, προστίθενται 0,2~0,4ml μυελού των οστών σε φλάσκα καλλιέργειας 25cm^2 με 5mL πλήρες θρεπτικό υλικό McCoy's. Οι καλλιέργειες μεταφέρονται σε επωαστικό κλίβανο στους 37°C (±0.2°C) και σε ατμόσφαιρα 5% (±0.1%) CO_2. Η θερμοκρασία των 37°C (±0.2°C) είναι απαραίτητη για την φυσιολογική αύξηση και τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων. Το ποσοστό 5% CO_2 (±0.1%) στον αέρα απαιτείται για την επίτευξη κατάλληλου pH (7.4-7.7) στις καλλιέργειες, διατηρώντας την συγκέντρωση διττανθρακικών ανιόντων και μερικής πίεσης CO_2 σε ισορροπία.

2.2.1.2. Συλλογή και μονιμοποίηση κυττάρων

1. Μία ώρα πριν τη λήξη της επώασης κάθε καλλιέργειας (24h ή 48h) προστίθενται 50μl κολσεμίδιο σε τελική συγκέντρωση 0.02μg/ml. Το κολσεμίδιο αναστέλλει την πρωτεϊνοσύνθεση των μικροσωληνίσκων της μιτωτικής ατράκτου και καθυστερεί τον αποχωρισμό των κεντρομεριδίων, με αποτέλεσμα να αυξάνεται το ποσοστό των κυττάρων που βρίσκονται στη φάση της μετάφασης.
2. Μετά το πέρας της επώασης, τα κύτταρα μεταφέρονται σε ειδικό σωληνάριο (Falcon 14mL) και φυγοκεντρούνται για 10min στις 1300rpm (στροφές/min).

Ακολουθεί απόχυση του υπερκείμενου και προσθήκη 8-10mL υποτονικού διαλύματος KCl (75mM), έτσι ώστε να επιτευχθεί η διόγκωση των κυττάρων, λόγω της διαφοράς στην οσμωτική πίεση μεταξύ ενδοκυττάριου και εξωκυττάριου χώρου.

3. Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 10 min στις 1000 rpm (στροφές/min) και απόχυση του υπερκείμενου, ενώ στη συνέχεια προστίθενται στάγδην 8-10ml διαλύματος Carnoy's (μεθανόλη/οξικό οξύ, 3/1) που επιτρέπει τη μονιμοποίηση των κυττάρων. Έπονται 1-2 ξεπλύματα με το μονιμοποιητή.

2.2.1.3. Προετοιμασία των χρωμοσωματικών παρασκευασμάτων για κυτταρογενετική ανάλυση

Η επίστρωση του χρωμοσωματικού υλικού γίνεται με 1-2 σταγόνες εναιωρήματος κυττάρων πάνω σε καθαρή και υγρή αντικειμενοφόρο πλάκα. Η ποιότητα των πλακακίων (πυκνότητα πυρήνων, ανάπτυξη μεταφάσεων) ελέγχεται με παρατήρηση σε οπτικό μικροσκόπιο αντίθετης φάσης. Οι πλάκες αφήνονται να στεγνώσουν σε θερμοκρασία δωματίου. Για κάθε δείγμα που προορίζεται για κυτταρογενετική ανάλυση επιστρώνονται τέσσερεις αντικειμενοφόροι πλάκες, δύο από κάθε καλλιέργεια. Για λόγους τήρησης του απορρήτου, τα δείγματα είναι κωδικοποιημένα και καθ'όλη τη διάρκεια της διαδικασίας παραμένουν αυστηρώς ανώνυμα. Σε κάθε πλακάκι αναγράφεται μόνο ο εργαστηριακός κωδικός, η ημερομηνία παραλαβής του δείγματος, η διάρκεια της καλλιέργειας και ο αύξων αριθμός του πλακακίου. Τέλος, τα πλακάκια επωάζονται στους 90°C για 1h σε ξηρό κλίβανο, προκειμένου να επιτευχθεί η παλαίωσή τους.

2.2.1.4. Ζωνοποίηση χρωμοσωμάτων: μέθοδος GTG

Για τον προσδιορισμό των χρωμοσωμάτων και την ανάλυση της δομής τους χρησιμοποιήθηκε η ζώνωση G ως μέθοδος χρώσης. Η ζώνωση G αποτελεί την πλέον διαδεδομένη μέθοδος χρώσης. Περιλαμβάνει κατεργασία των χρωμοσωμάτων με θρυψίνη για να μετουσιωθούν οι χρωμοσωματικές πρωτεΐνες, και χρώση με Giemsa (G-banding-Trypsin-Giemsa, GTG). Κάθε ζεύγος χρωμοσωμάτων χαρακτηρίζεται από μία συγκεκριμένη και σταθερή αλληλοδιαδοχή σκουρόχρωμων και ανοικτόχρωμων ζωνών (ζώνες G).

Τα στάδια της μεθόδου είναι τα εξής:

1. Τα κύτταρα επωάζονται σε ισοτονικό διάλυμα θρυψίνης 0.05% για 1min και κατόπιν το ένζυμο απομακρύνεται με απόπλυση σε φυσιολογικό ορό.
2. Ακολουθεί χρώση των παρασκευασμάτων σε διάλυμα Giemsa για 10-15 min (Seabright, 1971).
3. Στη συνέχεια πραγματοποιείται πλύση με νερό και τα πλακάκια αφήνονται να στεγνώσουν.
4. Ακολουθεί προσθήκη 2 σταγόνων Edellan σε κάθε αντικειμενοφόρο πλάκα και τοποθέτηση της καλυπτρίδας (24x50mm).

2.2.1.5. Μικροσκοπική παρατήρηση και καρυοτυπική ανάλυση χρωμοσωματικών παρασκευασμάτων

Τα χρωμοσωματικά παρασκευάσματα μελετώνται σε οπτικό μικροσκόπιο (Zeis-Axioscop 40) εφοδιασμένο με ψηφιακή κάμερα μικροσκοπίου και με λογισμικό σύστημα ψηφιακής εικόνας IKAROS, της εταιρίας Metasystems. Με τη χρήση του αντικειμενικού φακού 10x, σαρώνεται η αντικειμενοφόρος πλάκα και ανιχνεύονται οι περιοχές που φέρουν μεταφάσεις με σχετικά καλή μορφολογία και άπλωμα χρωμοσωμάτων καθώς και με μη απαγορευτικό για την ανάλυση αριθμό αλληλεπικαλυπτόμενων χρωμοσωμάτων. Με τη χρήση του καταδυτικού φακού 100x μεγεθύνουμε την εικόνα την οποία και αποθηκεύουμε σε ηλεκτρονική μορφή.

Για κάθε ασθενή με αιματολογική κακοήθεια, πλήρης καρυοτυπικός έλεγχος μυελού θεωρείται η ανάλυση 20 μεταφάσεων. Ο καρυότυπος περιγράφεται σύμφωνα με το ισχύον αναθεωρημένο σύστημα κυτταρογενετικής ονοματολογίας ανθρώπου ISCN 2016 (International System for Human Cytogenetic Nomenclature 2016). Για τη στοιχειοθέτηση κυτταρογενετικά αλλοιωμένου κλώνου απαιτείται η ανίχνευση τουλάχιστον δύο κυττάρων με την ίδια αλλοίωση, όταν πρόκειται για δομική, ενώ θα πρέπει να ανιχνευθούν τουλάχιστον τρία κύτταρα με την ίδια αλλοίωση όταν πρόκειται απώλεια χρωμοσώματος (μονοσωμία).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Στα πλαίσια της παρούσης μελέτης, αναλύθηκαν με κλασσικό καρυότυπο 809 δείγματα μυελού των οστών (Bone Marrow, BM) από ενήλικες ασθενείς με νεοδιαγνωσθείσα ΧΜΛ και μέσο όρο ηλικίας τα 56.5 έτη. Από αυτούς, 437 ήταν άνδρες (437/809, 54%), με μέσο όρο ηλικίας τα 55.5 έτη και 372 ήταν γυναίκες (372/809, 46%), με μέσο όρο ηλικίας τα 57.5 έτη (Διάγραμμα 1).

Όλα τα δεδομένα περιγράφονται με αναγωγή σε ποσοστά (%) και αξιολογούνται με το στατιστικό μη-παραμετρικό τεστ X^2 (chi-square test) (CI 95%), με διόρθωση κατά Yates (Yate's chi-square test).

Επιτυχής καρυοτυπική ανάλυση υπήρξε σε όλους τους ασθενείς (809/809, 100%). Ήταν όλοι θετικοί ως προς το χρωμόσωμα Ph, είτε στην κλασσική του μορφή [t(9;22)(q34;q11.2)] είτε σε παραλλαγή της μετάθεσης του χρωμοσώματος Ph.

Από το σύνολο των 809 ασθενών 761 είχαν την κλασσική μορφή του χρωμοσώματος Ph (761/809, 94.1%), ενώ 48 ασθενείς είχαν την παραλλαγή (απλή ή σύνθετη) της μετάθεσης Ph στον καρυότυπο (48/809, 5.9%). Στον Πίνακα 1 περιγράφονται τα χαρακτηριστικά και τα αποτελέσματα της καρυοτυπικής ανάλυσης των ασθενών με παραλλαγή του χρωμοσώματος Ph (απλή και σύνθετη).

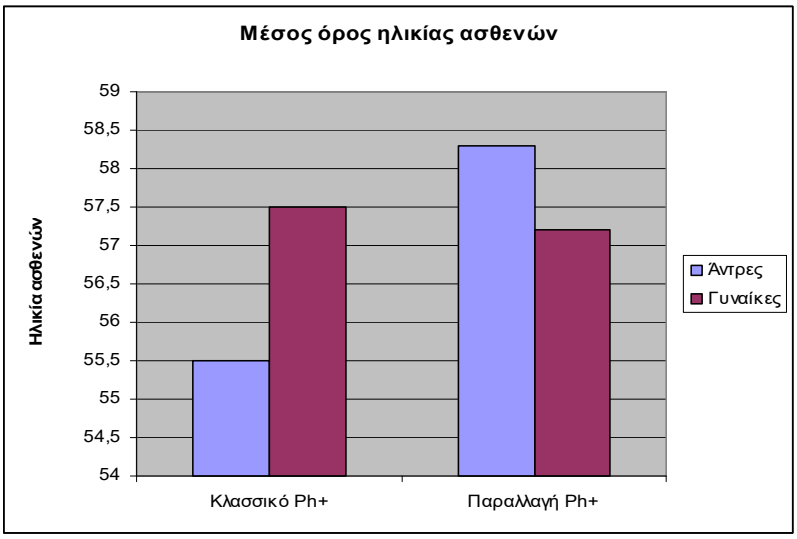
Πίνακας 1. Χαρακτηριστικά και αποτελέσματα της καρυοτυπικής ανάλυσης των ασθενών με απλή και σύνθετη παραλλαγή του χρωμοσώματος Ph.

Α/Α	ΦΥΛΟ	ΗΛΙΚΙΑ	ΚΑΡΥΟΤΥΠΟΣ
1	Α	74	46,XY,t(9;11;22)(q34;q13;q11)[20]
2	Θ	42	46,XX,-9,add(9)(q34),-17,der(22)t(?;22)(?;q11),+mar1,+mar2[4]
3	Α	57	46,XY,t(10;22)(q26;q11)[20]
4	Θ	65	46,XX[18]/46,XX,+der(17)t(17;22)(q22;q12),-22[2]
5	Θ	70	46,XX,t(6;9;22)(?q15;q34;q11)[4]
6	Α	71	46,XY,t(6;9;22;14)(p21;q34;q11;q32)[18]
7	Α	34	46,XY[3]/ 46,XY,t(17;22)(p13;q11)[17]
8	Θ	63	46,XX,t(5;9;22)(q21-22;q34;q11)[8]/ 46,XX,t(5;22)(q3?;q11),add(9)(q34),i(17)(q10)[5]
9	Α	57	46,XY[3]/ 46,XY,der(9)t(9;22)(q34;q11)[8]
10	Α	66	46,XY,t(15;9;22)(q15;q34;q11)[20]
11	Α	68	46,XY,t(14;9;22)(q24;q34;q11)[20]
12	Θ	57	46,XX,-9,-14,der(16)t(14q;16)(q11q;p11),+22, der(22)t(9q;22)(q34q;q11),+mar1[16]
13	Α	26	46,XY[1]/ 46,XY,t(2;9;22)(q13-21;q34;q11)[12]
14	Θ	44	46,XX[12]/46,XX,t(7;11;22)(q22;q25;q11)[8]
15	Α	45	46,XY[16]/ 46,XY,t(17;9;22)(q22;q34;q11)[2]
16	Θ	41	46,XX,t(3;9;22)(q21;q34;q11)[18]/ 92,XXXX,t(3;9;22)(q21;q34;q11)x2[2]
17	Θ	36	46,XX,t(9;15;22)(q34;q22;q11)[20]
18	Α	60	46,XY,inv(9)(p11q13)[15]/46,XY,der(5)t(5;9;22)(q15;q34;q11), der(9)inv(9)(p11q13)t(5;9;22),der(22)t(5;9;22)[5]
19	Θ	76	46,XX,t(17;22)(q25;q11)[10]
20	Θ	33	46,X,t(X;9;22)(p22;q34;q11),t(6;16)(p12;q22-24),del(20)(q12)[12]

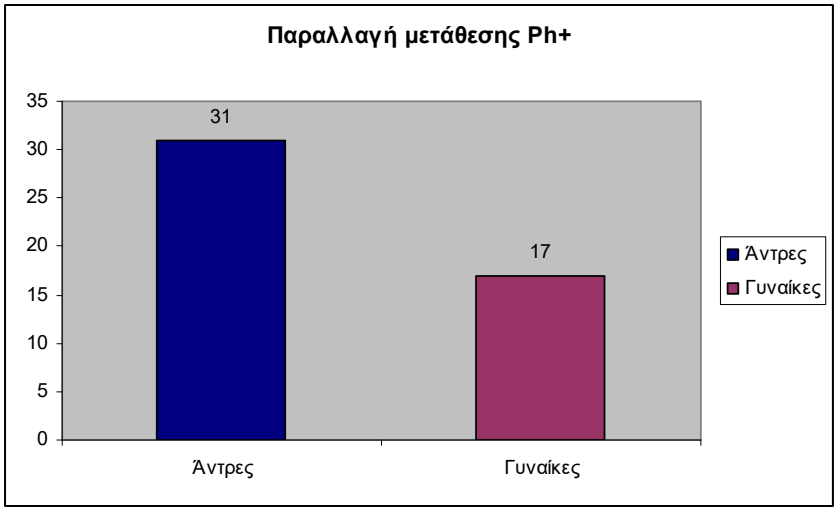
21	Α	66	46,XY,t(9;22;12)(q34;q11;p12)[20]
22	Α	73	46,XY,t(7;22)(p22;q11)[20]
23	Α	56	46,XY,t(3;11;9;22)(p27;q13;q34;q11)[20]
24	Θ	78	46,XX,t(8;9;22)(p11-12;q34;q11)[20]
25	Α	69	46,XY[2]/46,XY,t(17;22)(p13;q11)[18]
26	Α	37	46,XY[1]/46,XY,t(1;9;22)(p32;q34;q11.2)[19]
27	Θ	70	46,XX,t(9;22;10)(q34;q11.2;q22)[20]
28	Α	58	46,XY,t(2;10;22)(q21;q26;q11.2)[18]/ 47,XY,t(2;10;22)(q21;q26;q11.2),+22[2]
29	Θ	73	46,XX,t(20;22)(q13.3;q11.2)[20]
30	Α	49	45,X,-Y,t(2;9;22)(q21;q34;q11.2)[8]/ 45,X,-Y,t(2;9;22)(q21;q34;q11.2),der(6)(q21)[17]
31	Θ	75	46,XX[18]/47,XX,t(3;22)(q27;q11.2),del(6)(q13),+11,-19, +r(?19)[2]
32	Α	60	46,XY,t(14;22)(p11;q11.2)[19]
33	Θ	88	46,XX,t(9;22;15)(q34;q11.2;q15)[20]
34	Α	80	46,XY,t(9;22;19)(q34;q11.2;q13.2-13.3)[20]
35	Α	46	46,XY[11]/46,XY,t(12;22)(p13;q11~12)[11]
36	Α	75	46,XY,t(1;12)(p32;q24.?),t(5;9;22)(q31;q34;q11.2)[17]
37	Α	48	46,XY,t(6;22;15)(p21;q11.2;q22)[25]
38	Α	58	46,Y,t(X;9;22;12;21)(p11.2;q34;q11.2;q13;q22)[20]
39	Α	62	46,XY,t(11;22)(q23;q11.2)[20]
40	Θ	56	46,XX[2]/46,XX,t(2;9;22)(p21~23;q34;q11.2)[23]
41	Α	48	46,XY,t(2;22)(q37;q11.2)[22]
42	Α	51	46,XX,t(9;22;12)(q34;q11.2;q13)[25]
43	Α	47	46,XY[24]/46,XY,t(7;9;22)(q22;q34;q11.2)[2]
44	Α	56	46,XY,t(2;9;22)(p13;q34;q11.2)[25]
45	Α	72	46,XY,t(9;11;22)(q34;q12;q11.2)[16]
46	Α	41	46,XY,t(9;11;22)(q13;p11,2;q11.2)[25]
47	Θ	42	46,XX,t(1;9;22)(p36;q22;q11.2)[15]
48	Α	62	46,XY[1]/46,XY,t(9;22;10)(q34;q11.2;q11.2)[24]

Ο μέσος όρος ηλικίας των ασθενών με παραλλαγή της μετάθεσης Ph (απλή ή σύνθετη) ήταν τα 58.3 έτη, εκ των οποίων 31 ήταν άνδρες (31/48, 64.6%)) και 17 ήταν γυναίκες (17/48, 35.4%). Ο μέσος όρος ηλικίας των αντρών ήταν τα 57.2 έτη και των γυναικών τα 59.4 έτη. (Διάγραμμα 1 και 2).

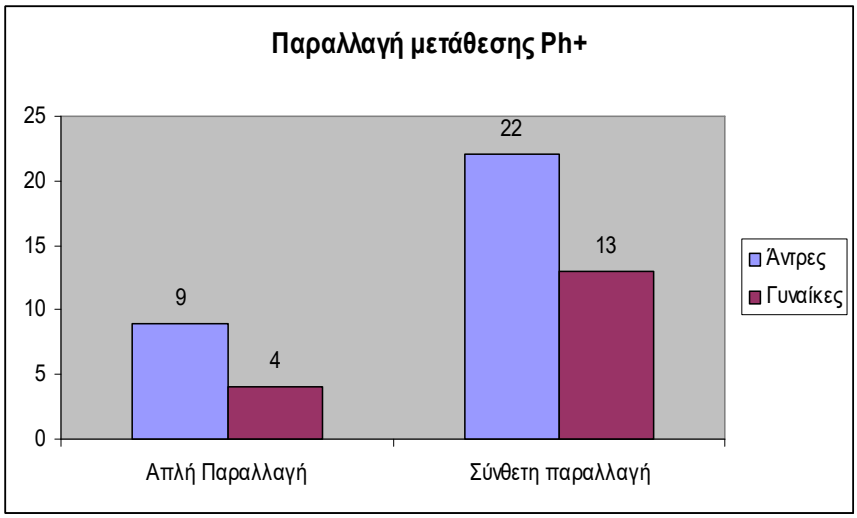
Διάγραμμα 1. Σύγκριση μέσου όρου ηλικίας των ασθενών μεταξύ της κλασσικής μετάθεσης Ph και της παραλλαγής Ph.



Διάγραμμα 2. Σύγκριση όλων των ασθενών με παραλλαγή της μετάθεσης Ph (απλή και σύνθετη) βάσει φύλου.



Διάγραμμα 3. Σύγκριση των ασθενών με παραλλαγή της μετάθεσης Ph (απλή και σύνθετη) βάσει φύλου.



Πίνακας 2. Σύγκριση μεταξύ κλασσικού Ph και παραλλαγής του, βάσει φύλου.

Φύλο	Κλασσικό Ph	Παραλλαγή Ph	Σύνολο Ασθενών
Άντρες	406 (411.07) [0.06]	31 (25.93) [0.99]	437
Γυναίκες	355 (349.93) [0.07]	17 (22.07) [1.17]	372
Σύνολο Ασθενών	761	48	809
x^2= 2.29, df= 1, p= 0.130			

Πίνακας 3. Συσχέτιση συχνότητας παραλλαγών Ph+ βάσει φύλου.

Φύλο	Απλή παραλλαγή Ph	Σύνθετη παραλλαγή Ph	Σύνολο Ασθενών
Άντρες	9 (8.4) [0.04]	22 (22.6) [0.02]	31
Γυναίκες	4 (4.6) [0.08]	13 (12.4) [0.03]	17
Σύνολο Ασθενών	13	35	48
x^2= 0.168, df= 1, p= 0.682			

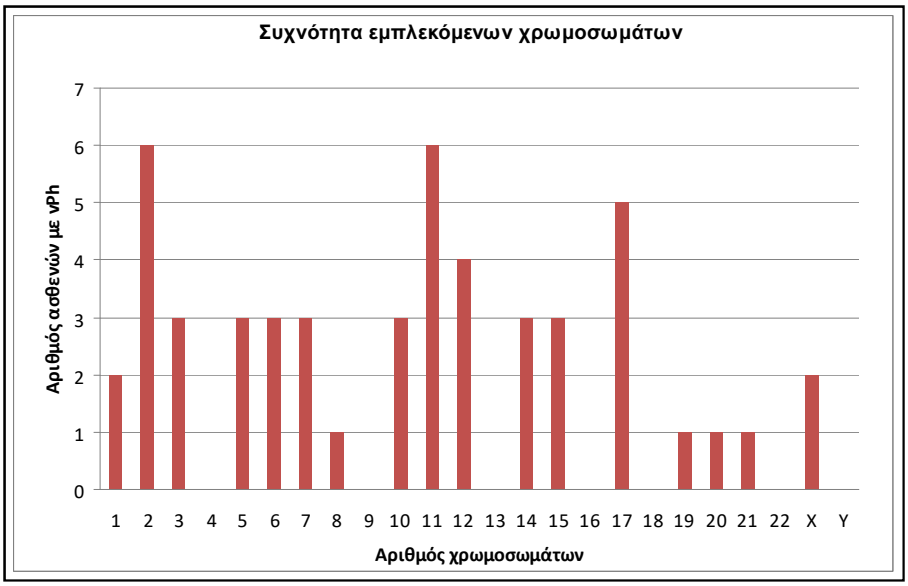
Απλή παραλλαγή διαπιστώθηκε σε 13 ασθενείς (13/48, 27.1%), άνδρες (9/31, 29%) και 4 γυναίκες (4/17, 23.5%), ενώ σύνθετη είχαν 35 ασθενείς (35/48, 72.9%) εκ των οποίων 22 ήταν άντρες (22/31, 71%) και 13 ήταν γυναίκες (13/17, 76.5%) (Διάγραμμα 3, Πίνακας 3).

Δεν βρέθηκε να υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ του κλασσικού Ph και της παραλλαγής του με βάση το φύλο (Πίνακας 2), καθώς και μεταξύ της απλής παραλλαγής και της σύνθετης βάσει φύλου (Πίνακας 3).

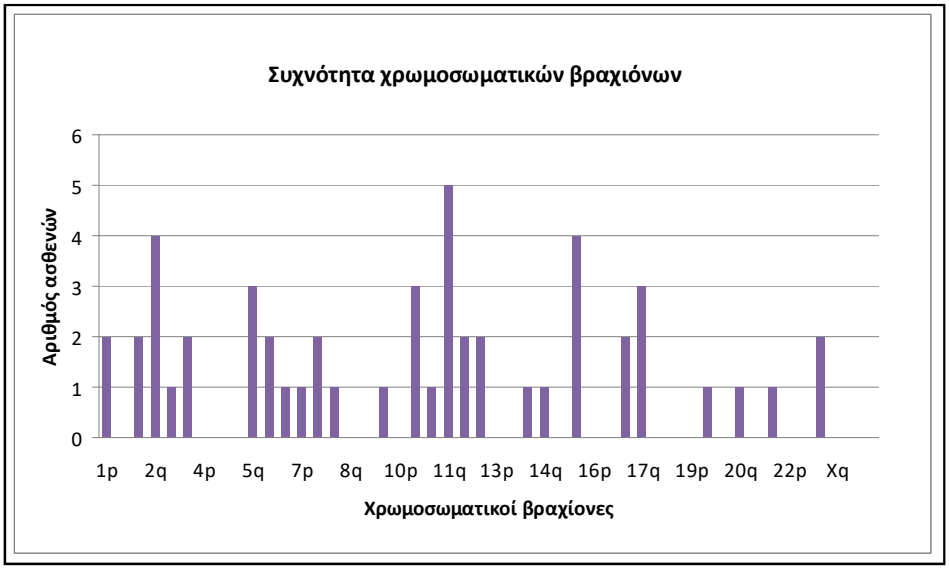
Τα πιο συχνά συμμετέχοντα χρωμοσώματα στην παραλλαγή (απλή και σύνθετη) ήταν τα: 2 (6/48, 1.25%), 11 (5/48, 1.04%), 17 (5/48, 1.04%), 12 (4/48, 0.83%) και 15 (4/48, 0.83%), ενώ δεν συμμετείχαν καθόλου τα χρωμοσώματα Y, 13, 16, 18 και το ομόλογο 2 (Διάγραμμα 4).

Όπως φαίνεται και παρακάτω, στο Διάγραμμα 5 οι συχνότεροι χρωμοσωματικοί βραχίονες που συμμετείχαν στην παραλλαγή ήταν οι: 11q (5/48, 10.4%), 2q (4/48, 8.3%), 5q (4/48, 8.3%) και 15q (4/48, 8.3%).

1200 **Διάγραμμα 4.** Συχνότητα εμπλεκόμενων χρωμοσωμάτων στην απλή και σύνθετη παραλλαγή της μετάθεσης Ph.



Διάγραμμα 5. Συχνότητα εμπλεκόμενων χρωμοσωματικών βραχιόνων στην απλή και σύνθετη παραλλαγή της μετάθεσης Ph.



Επιπρόσθετες χρωμοσωματικές ανωμαλίες παρουσίασαν 12 ασθενείς: -Y (n=1), +Ph (n=1), i(17)(q10) (n=1), +21 (n=2) +22 (n=2). Άλλες δομικές αλλοιώσεις παρουσίασαν 5 ασθενείς (Πίνακας 4).

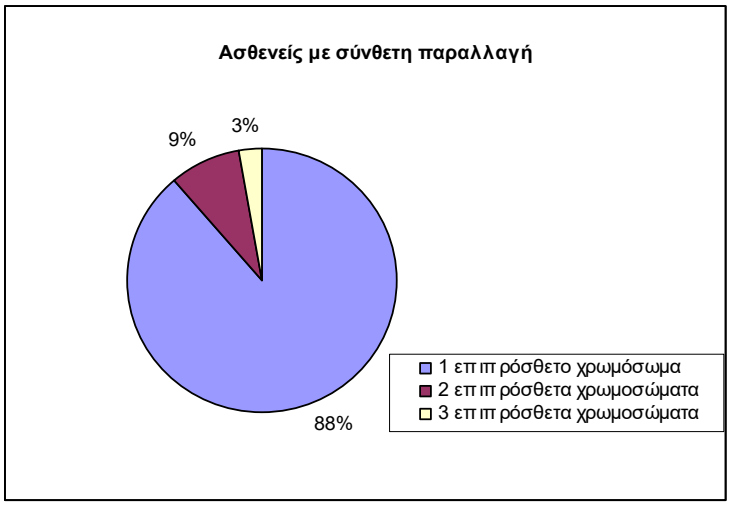
Πίνακας 4. Επιπρόσθετες χρωμοσωματικές ανωμαλίες σε ασθενείς με κλασσικό Ph και σε ασθενείς με παραλλαγή της μετάθεσης Ph.

Ασθενείς με κλασσικό Ph	
Επιπρόσθετες χρωμοσωματικές ανωμαλίες	**Αριθμός Ασθενών (%)**
-Y/-X	**25 (3.3)**
+8	**26 (3.4)**
del(7q)/-7	**11 (1.5)**
+Ph	**11 (1.5)**
i(17q)	**3 (0.4)**
+21	**3 (0.4)**
+22	**3 (0.4)**
Άλλες δομικές	**76 (10)**

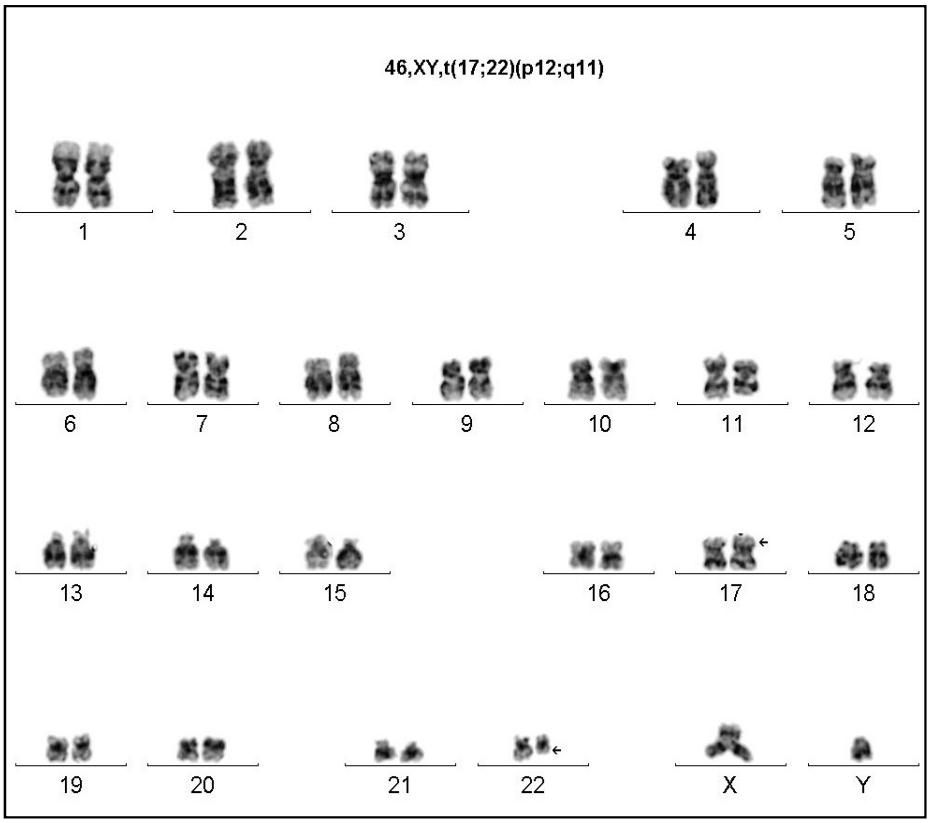
Ασθενείς με παραλλαγή της μετάθεσης Ph	
Επιπρόσθετες χρωμοσωματικές ανωμαλίες	**Αριθμός Ασθενών (%)**
-Y/-X	1 (2.1)
+Ph	1 (2.1)
i(17q)	1 (2.1)
+21	2 (4.2)
+22	2 (4.2)
Άλλες δομικές	5 (10.4)

Από τους 35 ασθενείς με σύνθετη παραλλαγή του χρωμοσώματος Ph υπήρχε συμμετοχή ενός επιπρόσθετου χρωμοσώματος σε 31 ασθενείς (31/35, 88%), δύο χρωμοσωμάτων σε 3 ασθενείς (3/35, 9%) και τριών σε ένα 1 ασθενή (1/35, 3%) (Διάγραμμα 6).

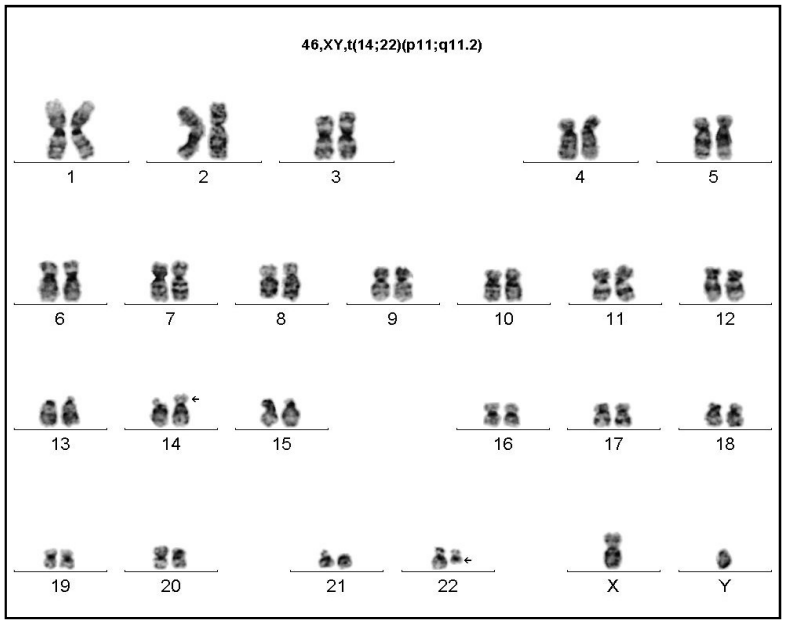
Διάγραμμα 6. Ποσοστό συμμετοχής των επιπρόσθετων χρωμοσωμάτων στους ασθενείς με σύνθετη παραλλαγή.



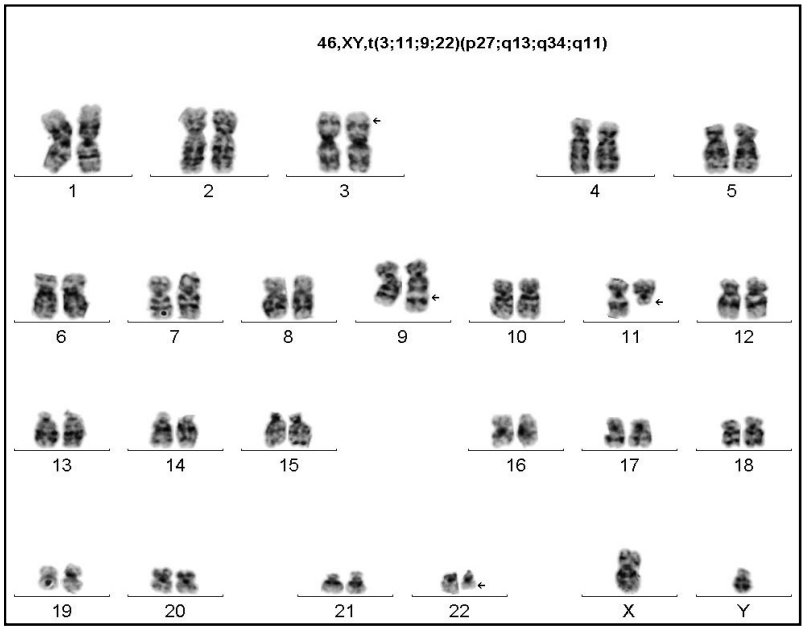
Στην παρούσα μελέτη, η συχνότερα εμφανιζόμενη παραλλαγή της μετάθεσης Ph ήταν η t(17;22)(p13;q11) (n=2) (Εικόνα 12).



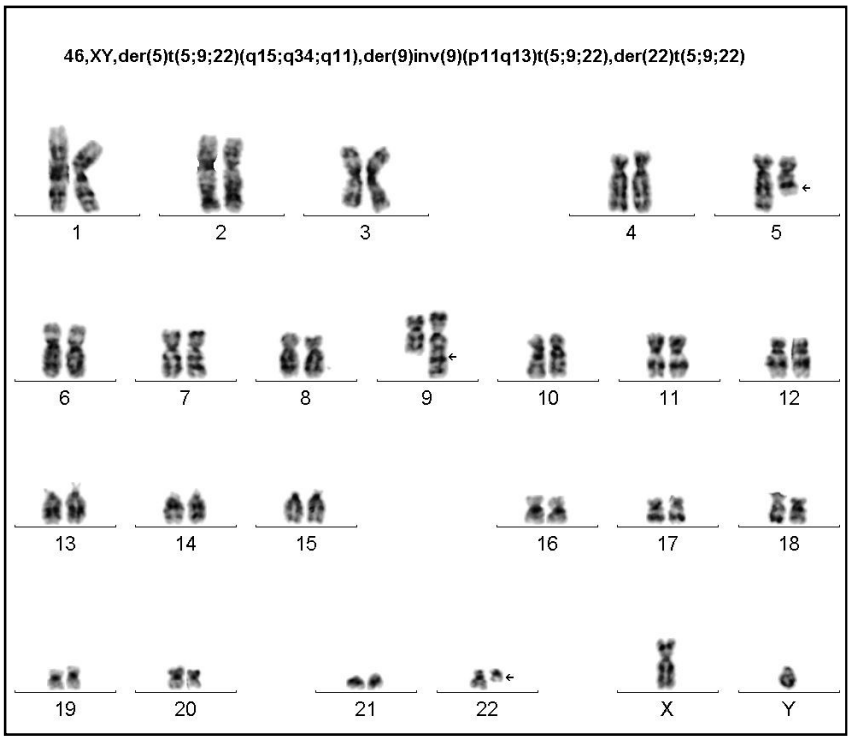
Εικόνα 12. Η συχνότερα εμφανιζόμενη παραλλαγή της μετάθεσης Ph: t(17;22)(p12;q11)



Εικόνα 13. Καρυότυπος άρρενος ασθενούς με την απλή παραλλαγή t(14;22) και με νέο σημείο θραύσης το 14p11.



Εικόνα 14. Καρυότυπος άρρενος με τη σύνθετη παραλλαγή t(3;11;9;22) και με νέο σημείο θραύσης το 3p27.



Εικόνα 14. Καρυότυπος άρρενος ασθενούς με τη σύνθετη παραλλαγή t(5;9;22) και με νέο σημείο θραύσης το 5q15.

Μεταξύ των 48 παραλλαγών Ph της παρούσας μελέτης, οι 14 δεν έχουν αναφερθεί (14/48, 29.2%). Από αυτές, οι τέσσερις (4) εμφανίζουν νέα σημεία θραύσης τα οποία δεν έχουν ξαναπεριγραφεί στη βιβλιογραφία. Αυτά είναι τα εξής: 3p27 (n=1), 5q15 (n=1), 5q21-22 (n=1), 14p11 (n=1).

Στις Εικόνες 13-15 φαίνονται τα νέα σημεία θραύσης. Το ένα σημείο θραύσης αφορά απλή παραλλαγή του χρωμοσώματος Ph (Εικόνα 13), ενώ τα υπόλοιπα αφορούν σύνθετες παραλλαγές.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η ΧΜΛ αποτελεί το πιο γνωστό παράδειγμα νεοπλασίας, στην οποία η επίκτητη γενετική ανωμαλία προκαλεί τη νόσο (Egan D and Radish J, 2016). Η ΧΜΛ χαρακτηρίζεται από μια σταθερή κυτταρογενετική αλλοίωση, το χρωμόσωμα Philadelphia (Ph), την πρώτη ειδική χρωμοσωματική αλλοίωση που περιγράφηκε σε νεοπλασία. Το χρωμόσωμα Ph είναι προϊόν της αμοιβαίας μετάθεσης t(9;22)(q34;q11) που έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία του υβριδικού γονιδίου BCR-ABL1, το οποίο εδράζεται στο παράγωγο χρωμόσωμα 22 (Ph). Η παραγόμενη υβριδική πρωτεΐνη είναι μία κινάση της τυροσίνης. Η ΧΜΛ είναι μία από τις πρώτες νεοπλασίες στις οποίες οι νέες θεραπείες (αναστολείς της κινάσης της τυροσίνης) στοχεύουν στη μοριακή αλλοίωση (Mughai TI et al, 2016).

Σε ποσοστό 5-10% των ασθενών με ΧΜΛ η δημιουργία του υβριδικού γονιδίου είναι αποτέλεσμα παραλλαγής του χρωμοσώματος Ph, όπου εκτός από τις περιοχές
1300 9q34 και 22q11 συμμετέχουν μια, ή περισσότερες περιοχές άλλων χρωμοσωμάτων (Mitelman et al, 2014). Η παρουσία της παραλλαγής του χρωμοσώματος Ph δεν έχει συσχετιστεί με ιδιαίτερο φαινότυπο της νόσου, παρόλα αυτά δεν έχει διευκρινιστεί η προγνωστική σημασία κάθε διαφορετικής παραλλαγής.

Πρωταρχικός σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν ο καθορισμός της συχνότητας και του είδους της παραλλαγής της μετάθεσης t(9;22)(q34;q11) σε μεγάλο δείγμα Ελλήνων ασθενών και η ταυτοποίηση παραλλαγών που δεν έχουν προαναφερθεί στη Βιβλιογραφία. Η μελέτη περιελάμβανε 809 Έλληνες ασθενείς με ΧΜΛ στη διάγνωση και χρωμόσωμα Ph . Από αυτούς οι 48 έδειξαν καρυότυπο μυελού οστών με απλή ή σύνθετη παραλλαγή του χρωμοσώματος Ph. Επομένως, σε ένα δείγμα αντιπροσωπευτικό της ΧΜΛ στη χώρα μας, το ποσοστό εμφάνισης παραλλαγής Ph είναι 5.9% (48/809) και είναι σε συμφωνία με τα βιβλιογραφικά δεδομένα (Mitelman et al, 2014).

Οι άνδρες ασθενείς έδειξαν αυξημένη συχνότητα εμφάνισης απλής και σύνθετης παραλλαγής Ph (Διάγραμμα 3), όμως η τάση αυτή δεν ήταν στατιστικά σημαντική (Πίνακες 2, 3). Μεταξύ των 48 παραλλαγών που ανιχνεύθηκαν, οι 14 δεν έχουν περιγραφεί. Από αυτές, οι 4 εμφανίζουν νέα σημεία θραύσης και συγκεκριμένα στις χρωμοσωματικές περιοχές 3p27, 5q15, 5q21-22 και 14p11. Οι συχνότερα εμπλεκόμενοι χρωμοσωματικοί βραχίονες στο σχηματισμό παραλλαγής ήταν οι: 11q (10.4%), 2q (8.3%), 5q (8.3%) και 15q (8.3%) (Διάγραμμα 5). Σε μεγάλη ανασκόπηση 600 περιπτώσεων ΧΜΛ με παραλλαγή, βρέθηκε ότι τα σημεία θραύσης παρουσιάζουν μη τυχαία κατανομή, με αξιοσημείωτη συσσώρευση σε συγκεκριμμένες χρωμοσωματικές περιοχές (Johansson B et al, 2002). Τα δεδομένα αυτά οδήγησαν στην υπόθεση ότι τα διαφορετικά σημεία θραύσης είναι πιθανό να υποδεικνύουν διαφορετικό φαινότυπο νόσου. Τελικά, στην εποχή της θεραπείας με αναστολείς της κινάσης της τυροσίνης, δείχθηκε ότι οι παραλλαγές παρουσιάζουν την ίδια κυτταρογενετική και μοριακή απόκριση, συγκρινόμενες με τις περιπτώσεις που έχουν την κλασική μετάθεση Ph (Fabarius A et al, 2011).

Ένας από τους στόχους της παρούσας μελέτης ήταν ο καθορισμός της συχνότητας συνύπαρξης πρόσθετων χρωμοσωματικών ανωμαλιών σε ασθενείς με την κλασική μετάθεση και με την παραλλαγή Philadelphia (Πίνακας 4). Δώδεκα από τους 48 ασθενείς με παραλλαγή εμφάνισαν στον καρυότυπο μυελού επιπρόσθετες

χρωμοσωματικές αλλοιώσεις. Η μετάθεση Ph συχνά εμφανίζεται με πρόσθετες χρωμοσωματικές ανωμαλίες, ιδιαίτερα στην επιταχυνόμενη φάση και στη βλαστική κρίση (Marktel S et al, 2003). Οι πρόσθετες αλλοιώσεις στη ΧΜΛ γενικά σχετίζονται με μειωμένη απόκριση στους αναστολείς της κινάσης της τυροσίνης, και συντομότερη επιβίωση. Παρόλο που οι πρόσθετες αλλαγές σχετίζονται με την εξέλιξη της νόσου, στην πράξη η προγνωστική σημασία της κάθε μιάς από αυτές παραμένει άγνωστη. Πράγματι, ενώ υπάρχουν συστήματα ταξινόμησης για την προγνωστική αξιολόγηση των αλλοιώσεων στα Μυελοσυσπλαστικά Σύνδρομα και την Οξεία Μυελογενή Λευχαιμία, απουσιάζουν στη ΧΜΛ (Baccarani M et al, 2013).

Πρόσφατα δεδομένα, εξετάζοντας μονήρεις πρόσθετες αλλοιώσεις του Ph σε μεγάλο δείγμα ασθενών με ΧΜΛ (n=2013) εισήγαγαν ένα νέο προγνωστικό σύστημα σε σχέση με την ανταπόκριση στη θεραπεία και την επιβίωση. Συγκεκριμένα, καλής πρόγνωσης αλλοιώσεις θεωρούνται η τρισωμία 8, η απώλεια Y και το έξτρα Ph, ενώ κακής πρόγνωσης είναι το ισοχρωμόσωμα 17q [i(17)(q10)], οι αλλοιώσεις του 7 [-7/del(7q)] και οι αλλοιώσεις στην περιοχή 3q26 (Wang W et al, 2016). Παρά ταύτα, σπανιότερες μονήρεις αλλοιώσεις, όπως μεταθέσεις, ή διπλές ή πολλαπλές αλλοιώσεις δεν έχουν ακόμα αξιολογηθεί ως προς την επίπτωσή τους στην προγνωστική αξιολόγηση των ασθενών.

Στο σημείο αυτό, αξίζει να υπογραμμιστεί η σπουδαιότητα της κλασσικής κυτταρογενετικής ανάλυσης που είναι η μόνη ενδεδειγμένη μέθοδος για την ταυτοποίηση των παραλλαγών Ph και των πρόσθετων καρυοτυπικών αλλοιώσεων κατά τη διάγνωση και την εξέλιξη της ΧΜΛ. Η ύπαρξη πολλών διαφορετικών χρωμοσωματικών σημείων θραύσης που εμπλέκονται στο σχηματισμό των παραλλαγών της μετάθεσης Ph, αλλά και στην εμφάνιση των πρόσθετων αλλοιώσεων καθιστά αναγκαία την περαιτέρω βιολογική έρευνα και την αξιολόγηση μεγάλου αριθμού περιπτώσεων, ώστε να καταστεί δυνατή η εξαγωγή ασφαλών προγνωστικών συμπερασμάτων.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

[1] Γαρυπίδου Β. (1998): Χρόνια Μυελογενής Λευχαιμία: Εσωτερική Παθολογία, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης, Τμήμα Ιατρικής - Τομέας Παθολογίας, Θεσσαλονίκη, University Studio Press, Τόμος Δεύτερος:1175.

[2] Πάγκαλης Α. Γ. (2008). Αιματολογία στην κλινική πράξη. Εκδόσεις Π.Χ Πασχαλίδης ΕΠΕ, Γ' Ανατύπωση.

[3] Alexandrescu S, Diaconescu A, Ionel Z, Zlate C, Grigorie R, Hrehoreţ D, Braşoveanu V, Dima S, Botea F, Ionescu M, Tomescu D, Droc G, Fota R, Croitoru A, Gramaticu I, Buica F, Iacob R, Gheorghe C, Herlea V, Grasu M, Dumitru R, Boroş M, Popescu I. (2013): Comparative Analysis between Simultaneous Resection and Staged Resection for Synchronous Colorectal Liver Metastases - A Single Center Experience on 300 Consecutive Patients. Chirurgia (Bucur) 112:278-88.

[4] Almouzni G, Cedar H (2016): Maintenance of Epigenetic information. Cold Spring Harb Perspect Biol. 2:8(5) pii: a019372

[5] Anastasi J, Feng J, Dickstein J, Le Beau MM, Rubin CM, Larson RA, Rowley JD, Vardiman JW (1996). Lineage involvement by BCR-ABL in Ph pos. lymphoblastic leukemias: chronic myelogenous leukemia presenting in lymphoid blast vs Ph pos. Acute lymphoblastic leukemia. Leukemia 10:795-802.

[6] Baccarani M, Deininger MW, Rosti G, Hochhaus A, Soverini S, Apperley JF, Cervantes F, Clark RE, Cortes JE, Guilhot F, Hjorth-Hansen H, Hughes TP, Kantarjian HM, Kim DW, Larson RA, Lipton JH, Mahon FX, Martinelli G, Mayer J, Müller MC, Niederwieser D, Pane F, Radich JP, Rousselot P, Saglio G, Saußele S, Schiffer C, Silver R, Simonsson B, Steegmann JL, Goldman JM, Hehlmann R. European LeukemiaNet recommendations for the management of chronic myeloid leukemia: 2013 (2013). Blood 122:872-84.

[7] Bacher U, Kem W, Schnitger S, Hiddemann W, Schoch C, Haferlach T. (2005). Blast count and cytogenetics correlate and are useful parameters for the evaluation of different phases in chronic myeloid leukemia. Leuk Lymphoma 46:357-366.

[8] Bartenhagen C, Fischer U., Korn K., Pfiste rM.S., Gombert M., Chen C., Okpany V., Hauer J., Rinaldi A., Bourquin JP, Eckert C., Hu J., Ensser A., Dugas M., Borkhardt A. (2017): Infection as a cause of childhood leukemia: virus detection employing whole genome sequencing. Haematologica 102: 179–83.

[9] Bennet J.M., Catovsky D, Daniel MT. Flandrin G. Galton DA. Granlick H. Sultan C. Coc C (1994). The chronic myeloid leukaemias guidelines for distinguishing chronic granulocytic, atypical chronic myeloid and chronic myelomonocytic leukaemia. Proposals by the French-American-British Cooperative Leukaemia Group. Br J Haematol 87:746-754.

[10] Bizozzero OZ, Jr Johnson KG, Ciocco A (1966). Radiation-related leukemia in Hiroshima and Nagasaki, 1946-1964. I. Distribution, incidence and appearance time. N Eng J Med 274:1095-1101.

[11] Boveri T. (1914): Zur Frage der Enstehung maligner Tumoren. Jena: Gustav Fisher.

[12] Buesche G, Hehlmann R, Hecker H, Heimpel H, Heinze B, Schmeil A, Pfirmann M, Gonez G, Tobler A, Hermann H, Kappler M, Hasford J, Kreipe H.H, Georfi A (2003). Marrow fibrosis, indication of therapy failure in chronic myeloid leukemia - prospective long term results from a randomized-controlled trial. Leukemia. 17:2444-2453.

[13] Cancer Cytogenetics: Chromosomal and Molecular Genetic Aberrations of Tumor Cells, Fourth Edition. Editors(s): Sverre Heim, Felix Mitelman. First published: 26 June 2015. ISBN: 9781118795538 Online ISBN: 9781118795569 DOI:10.1002/9781118795569. Copyright © 2015 John Wiley & Sons, Ltd

[14] Cancer Genome Atlas. Available at https://www.genome.gov

[15] Caspersson T., Zech L., Johansson C. (1970b): Identification of the Philadelphia chromosome as a number 22 by quinacrine mustard fluorescence analysis. Exp. Cell Res 63:238-240.

[16] Hardy PA, Zacharias H. Reappraisal of the Hansemann-Boveri hypothesis on the origin of tumors. Cell Biol Int 2005 Dec;29(12):983-92. Epub 2005 Nov 28.

[17] Corso A, Lazzarino M, Morra E, Merante S, Astori C, Bemasconi P, Boni M, Bemasconi C (1995). Chronic myelogenous leukemia and exposure to ionizing radiation - a retrospective study of 443 patients. Ann Hematol 70:79-82.

[18] Cortes JE, Talpaz M, Giles F, O Brien S, Rios MB, Shan J, Garcia Manero G, Faderi S, Thomas DA, Wierda W, Ferarragoli A, Jeha S, Kantarjian HM (2003). Prognostic significance of cytogenetic clone evolution in patients with chronic myelogenous leukemia on imatinib mesylate therapy. Blood 101:3794-3800.

[19] Cortes JE, Talpaz M, O´Brien S, Faderi S, Garcia Manero G, Feragoli A, Verstovsek S, Rios MB, Shan J, Kantarjian HM (2006). Staging of chronic myeloid leukemia in the imatinib era:an evaluation of the World Health Organization proposal. Cancer 106:1306-1315.

[20] Cosmic. Catalogue of somatic mutations in cancer. Available at http://cancersanger.ac.uk/cosmic

[21] Cotta CV, Bueso Ramos CE (2007). New insights into the pathology and treatment of chronic myelogenous leukemia. Ann Diagn Pathol 11:68-78.

[22] Cremer T, Lichter P, Borden J, Ward DC, Manuelidis L. (1988): Detection of chromosome aberrations in metaphase and interphase tumor cells by in situ hybridization using chromosome-specific library probes. Hum Genet. Nov;80(3):235-46.

[23] De Klein A., van Agthoven T, Groffen C, Heisterkamp N, Groffen J, Grosveld G. (1986): Molecular analysis of both translocation products of a Philadelphia-positive CML patient. Nucleic Acids Res. 14: 7071–7082.

[24] De Klein A., van Kessel A.G, Crosweld G, Bartram CR, Hagemeijer A, Bootsma D, et al. (1982): A cellular oncogene is translocated to the Philadelphia chromosome in chronic myelocytic Leukemia. Nature. Dec 23;300(5894):765-7

[25] Deininger MW (2008). Chronic Myeloid Leukemia: An HistoricalPerspective. Hematology, Jan; 2008: 227.

[26] Derderian PM, Kantarjan HM, Talpaz M, O¨Brien S, Cok A, Estey E, Pierce S, Keating M (1993). Chronic myelogenous leukemia in the lymphoid blastic phase: characteristics, treatment response and prognosis. Am J Med 94:69-74.

[27] Druker BJ (2008). Translation of the Philadelphia chromosome into therapy for CML. Blood 112: 4808-12.

[28] Egan D, Radich J (2016). Making the diagnosis, the tools, and risk stratification: More than just BCR-ABL. Best Pract Res Clin Haematol 29:252-63.

[29] Fabarius A1, Leitner A, Hochhaus A, Müller MC, Hanfstein B, Haferlach C, Göhring G, Schlegelberger B, Jotterand M, Reiter A, Jung-Munkwitz S, Proetel U, Schwaab J, Hofmann WK, Schubert J, Einsele H, Ho AD, Falge C, Kanz L, Neubauer A, Kneba M, Stegelmann F, Pfreundschuh M, Waller CF, Spiekermann K, Baerlocher GM, Lauseker M, Pfirrmann M, Hasford J, Saussele S, Hehlmann R; SAKK and the German CML Study Group (2011). Blood 118:6760-8.

[30] Impact of additional cytogenetic aberrations at diagnosis on prognosis of CML: long-term observation of 1151 patients from the randomized CML Study IV.

[31] Faramarz Naeim, P. Nagesh Rao, Sophie X. Song, Wayne W. Grody (2013): Atlas of Hematopathology Morphology, Immunophenotype, Cytogenetics, and Molecular Approaches, pages 219-226.

[32] Foucar K, McKenna RW, Bloomfield CD, Bowers TK, Brunning RD. (1979): Therapy-related leukemia. Cancer 43:1285-96.

[33] Garcia-Manero G, Faderl S, O'Brien S., Cortes J., Talpaz M., Kantarjian HM. (2003): Chronic myelogenous leukemia: a review and update of therapeutic strategies. Cancer 98:437-57.

[34] Gargallo P., Cacchione R., Chena C., et al. (2005): Chronic lymphocytic leukemia developing in a patient with chronic myeloid leukemia: evidence of distinct lineage-associated genomic events. Cancer Genet Cytogenet.161:74–7.

[35] Goldman JM, Melo JV. (2008): BCR-ABL in chronic myelogenous leukaemia. Acta Haematol 119: 212-7.

[36] Gratwohl A, Hermans J, Goldman JM, Arcese W, Carreras E, Devergie A, Frassoni F, Gahrton G, Koib HJ, Niederwieser D, Ruutu T, Venant JP, de Witte T, Apperley J (1998). Risk assessment for patients with chronic myeloid leukaemia before allogeneic blood or marrow transplantation. Chronic leukemia Working Party of the European Group for Blood and marrow transplantation. Lancet 352:1087-92.

[37] Grosveld G., T Verwoerd, T van Agthoven, A de Klein, K L Ramachandran, N Heisterkamp, K Stam, J Groffen. The chronic myelocytic cell line K562 contains a breakpoint in bcr and produces a chimeric bcr/c-abl transcript. Mol Cell Biol. 1986 Feb; 6(2): 607–16.

1500 [38] Hanahan D, Weindberg RA (2011): The hallmarks of cancer: the next generation. Cell 144:646-74.

[39] Harper PS. (2006): The discovery of the human chromosome number in Lund, 1955-1956. Hum Genet 119: 226-32.

[40] Heisterkamp N, Stephenson JR, Groffen J, Hansen PF, de Klein A, Bartram CR, et al. (1983). Localization of the c-abl Oncogene adjacement to a translocation break point in chronic myelocytic leukemia Nature 306:239-42.

[41] Heisterkamp N, Stam K, Groffen J, de Klein A, Grosveld G (1985). Structural organization of the bcr gene and its role in the Ph translocation. Nature 315: 758-61.

[42] Hsu TC. Human and Mammalian Cytogenetics. New York: Springer-Verlag; 1979.

[43] https://www.mun.ca/biology/scarr/Human_Karyotype.html

[44] Human Cytogenetics: A Practical Approach, Volume II: Malignancy and Acquired Abnormalities (second edition). Edited by D. E. Rooney and B. H. Czepulkowski. IRL Press at Oxford University Press 1992, ISBN 0199633134. ISBN 0199632901.

[45] Jacknow G. Frizzera Gail-Peczalska K, Banks PM, Arthur DC, McGlave PB, Hurd DD (1985). Extra medullary presentation of the blast crisis of chronic myelogenous leukemia. Br J Haematol 61:225-36.

[46] Jemal A, Tiwari RC, Murray T, Ghafoor A, Samuels A, Ward E, Feur EJ, Thun MJ (2004). Cancer Statistics, 2004. CA Cancer J Clin 54:8-29.

[47] Jiang X, Smith C, Eaves A, Eaves C (2007). The challengings of targeting chronic myeloid leukemia stem cells. Clin Lymphoma Myeloma Suppl 2:571-580.

[48] Johansson B, Fioretos T, Mitelman F (2002): Cytogenetic and molecular genetic evolution of chronic myeloid leukemia. Acta Haematol 107: 76–94.

[49] Kallioniemi A, Kallioniemi OP, Sudar D, Rutovitz D, Gray JW, Waldman F, Pinkel D. (1992): Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors. Science 258:818-21.

[50] Kang ZJ, Liu YF, Xu LZ, Long ZJ, Huang D1, Yang Y, Liu B, Feng J.X, Pan YJ, Yan JS., Liu Q (2016) The Philadelphia chromosome in leukemogenesis. Chin J Cancer 35:48.

[51] Kantarjian HM., Dixon D, Keating MJ, Talpaz M, Walters RS, McCredie KB, Freireich EJ (1988). Characteristics of accelarated disease in chronic myelogenous leulemia. Cancer 61: 1441-6.

[52] Khalidi HS, Brynes RK, Medeiros LJ, Chang KL, Slovak ML, Snyder DS, Arber DA (1998). The immunophenotype of blast transformation of chronic myelogenous leukemia: a high frequency of mixed lineage phenotype in lymphoid blasts and a comparison of morphologic, immunophenotypic and molecular findings. Mod. Pathol. 11:1211-21.

[53] Knudson A (2001): Two genetic hits (more or less) to cancer. Nat Rev Cancer 1:157-62.

[54] Kobayashi H, Montgomery KT, Bohlander SK, Adra CN, Lim BL, Kucherlapati RS, Donis-Keller H, Holt M.S, Le Beau MM, Rowley JD (1994). Fluorescence in situ hybridization mapping of translocations and deletions involving the short arm of human chromosome 12 in malignant hematologic diseases. Blood 84:3473-82.

[55] Le Beau LJ (1994). Health hazards in the biocommunications department. J Biol Photogr 62:123-30.

[56] Leon P. Bignold, Brian LD Coghlan, Hubertus PA Jersmann, David Paul von Hansemann: Contributions to Oncology: Context, Comments and Translations. Basel, Birkhäuser, 2007.

[57] Marktel S, Marin D, Foot N, et al (2003). Chronic myeloid leukemia in chronic phase responding to imatinib: the occurrence of additional cytogenetic abnormalities predicts disease progression. Haematologica 88:260-7.

[58] Mitelman F, Johansson B, Mertens F (2014). Mitelman database of chromosome aberrations and gene fusions in cancer.
Available at http://cgap.nci.nih.gov/Chromosomes/Mitelman.

[59] Mitelman F, Johansson B, Mertens F (2015). Mitelman database of chromosome aberrations in cancer.
Available at http://cgap.nci.nih.gov/Chromosomes/Mitelman.

[60] Mitelman F, Johansson B, Mertens F (2016). Mitelman database of chromosome aberrations in cancer.
Available at http://cgap.nci.nih.gov/Chromosomes/Mitelman.

[61] Muechlek SD, McKenna RW, Arthur DC, Parkin JL, Burnning RD (1984). Transformation of chronic myelogenous leukemia clinical, morphologic and cytogenetic features. Am J Clin Pathol 82:1-14.

[62] Mughal TI, Radich JP, Deininger MW, Apperley JF, Hughes TP, Harrison CJ, Gambacorti-Passerini C, Saglio G, Cortes J, Daley GQ (2016). Chronic myeloid leukemia: reminiscences and dreams. Haematologica 101:541-58.

[63] Nair C, Chopra H, Shinde S, Babbaya S, Kumar A, Dhond S, Yejamanam B, Sapre R, Chougle A, Advan S (1995). Immunophenotype and ultra structural studies in blast crisis of chronic myeloid leukemia. Leuk Lymphoma 19:309-13.

[64] Navin N, Krasnitz A, Rodgers L, Cook K, Meth J, Kendall J, Riggs M, Eberling Y, Troge J, Grubor V, Levy D, Lundin P, Månér S, Zetterberg A, Hicks J, Wigler M (2010). Inferring tumor progression from genomic heterogeneity. Genome Res 20:68-80.

[65] Nowell PC (1960). Phytohemagglutinin: An initiator of mitosis in cultures of normal leukocytes. Cancer Res. 20:462-6.

[66] Nowell PC, Hungerford DA (1960). A minute chromosome in human chronic granulocytic leukemia. Science 132: 1497.

[67] Pandis N, Bardi G, Heim S (1994). Interrelationship between methodological choices and conceptual models in solid tumor cytogenetics. Cancer Genet Cytogenet 76:77-84

[68] Patel BB, Mohamed MM, Schiffer C (2006). Acute myelogenous leukemia like translocations in CML blast crisis: two new cases of inversion (16)t(6;16) and a review of the literature. Leuk Res 30:225-32.

[69] Peterson LC, Bloomfield CD, Brunning RD (1976). Blast crisis as an initial or terminal manifestation of chronic myeloid leukemia. A study of 28 patients. Am J Med 60:209-20.

[70] Redaelli A., Bell C., Casagrande J., Stephens J., Botteman M., Laskin B., Pashos C., (2004). Clinical and epidemiologic burden of chronic myelogenous leukemia. Expert Rev. Anticancer Ther 4:85-96.

[71] Robak T, Urbańska-Ryś H, Smolewski P, et al. (2003): Chronic myelomonocytic leukemia coexisting with B-cell chronic lymphocytic leukemia. Leuk Lymphoma 44:2001-8.

[72] Ross JA, Kasum CM, Davies SM, Jacobs DR, Folsom AR, Potter JD (2002). Diet and risk of leukemia in the Iowa Women's Health Study. Cancer
1600 Epidemiol. Biomarkers Prev 11: 777–81.

[73] Rowley JD (1973): A new consistent chromosomal abnormality in chronic myeloid leukemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining. Nature 243; 290-3.

[74] Saikia T, Advani S, Dasgupta A, Ramakrishnan G, Nair C, Gladstone B, Koomar MS, Badrinath Y, Dhond S (1988). Characterization of blast cells during blastic phase of chronic myeloid leukaemia by immunophenotyping – experience in 60 patients. Leuk Res 12:499-506.

[75] Savage DG, Szydio RM, Goldman JM (1997). Clinical features at diagnosis in 430 patients with chronic myelogenous leukemia seen at a referal centre over a 16- year period. Br J Haematol 96:111-6.

[76] Seabright M. (1971). A rapid banding technique for human chromosomes. Lancet 7731:971-2.

[77] Spiers AS, Bain BJ, Turner JE (1977). The peripheral blood in chronic granulocytic leukaemia. Study of 50 untreated Philadephia - positive cases. Scand J Haematol 18:25-38.

[78] Stein H.J, Hutton J. John, Kohler O. Peter, O' Rourke A. Robert, Reynolds Y Herbert, Samuels A. Martin, Sande A. Merle, Trier S. Jerry, Zvaifler J. Nathan (1998). Παθολογία, Ιατρικές εκδόσεις Π.Χ.Πασχαλίδη.

[79] Straton ML, Cambel PJ, Futreal PA (2009). The cancer genome: Nature 458:719-24.

[80] Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, Thiele J, Vardiman JW, editors (2008): WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Lyon: IARC Press.

[81] Takahashi N, Miura I, Saitoh K, Miura AB (1998). Lineage involvement of stem cells bearing the Philadelphia chromosome in chronic myeloid leukemia as shown by a combination of fluorescence-activated cell sorting and fluorescence in situ hybridization. Blood 92:4758-63.

[82] Tirado CA, Meloni-Ehrig AM, Jahn JA, Edwards T, Scheerle J, Burks K, Repetti C, Christacos NC, Kelly JC, Greenberg J, Murphy C, Croft CD,

Heritage D, Mowrey PN (2007). Cryptic ins(4;11)(q21;q23q23) detected by fluorescence in situ hybridization: a variant of t(4;11)(q21;q23) in an infant with a precursor B-cell lymphoblastic leukemia. Report of a second case. Cancer Genet Cytogenet 174:166–9.

[83] Tjio JH, Levan A (1956). The chromosome number of man. Hereditas 42:1-6.

[84] van Steenis H (1966). Chromosomes and cancer. Nature 209:819-21.

[85] von Hansemann D (1890). Ueber asymetrische Zelltheilung in Epithelkrebsen und deren biologische Bedeutung. Virchows Arch Anat 119:299-326.

[86] Wang W, Cortes JE, Tang G, Khoury JD, Wang S, Bueso-Ramos CE, DiGiuseppe JA, Chen Z, Kantarjian HM, Medeiros LJ, Hu S (2016). Risk stratification of chromosomal abnormalities in chronic myelogenous leukemia in the era of tyrosine kinase inhibitor therapy. Blood 127:2742-50.

[87] Wilkens L, Tchinda J, Burkhardt D, Nolte M, Werner M, Georgii A (1998). Analysis of hematological diseases using conventional karyotyping, fluorescence in situ hybridization (FISH) and comparative genomic hybridization (CGH). Hum Pathol 29:833.

[88] World Health Organization (WHO)-Classification of tumors of Haematopoietic and Lympoid Tissues (2017) WHO Classification of Tumours, Revised 4th Edition, Volume 2, Edited by Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, Thiele J.

[89] Wu Y, Slovac ML, Snyder DS, Arber DA (2006). Coexistence of inversion 16 and the Philadelphia chromosome in acute and chronic myeloid leukemias: report of six cases and review of literature. Am J Clin Pathol 125:260-6.

[90] Wyngaarden JB, Smith LH, Bennett JC (1992). Cecil textbook of medicine, 19th edition, Philadelphia: WB Saunders Company.

[91] Xu Y, Dolan MM, Nguyen PL (2003). Diagnostic significance of detecting dysgranulopoiesis in chronic myeloid leukemia. Am J Clin Pathol 120:778-84.

[92] Zhang FF, Murata-Collins JL, Gaytan P (2000). Twenty-four-color spectral karyotyping reveals chromosome aberrations in cytogenetically normal and acute myeloid leukemia. Genes Chromosomes Cancer 28:318-28.