



ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ
Εθνικόν και Καποδιστριακόν
Πανεπιστήμιον Αθηνών
—ΙΔΡΥΘΕΝ ΤΟ 1837—

ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

**ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ**

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

«Ιατρική Γενετική: Κλινική και Εργαστηριακή Κατεύθυνση»

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**«Μοριακή Κυτταρογενετική Ανάλυση Μυελοδυσπλαστικών
Συνδρόμων (ΜΔΣ) με αλλοιώσεις στο χρωμόσωμα 7»**

Έλενα Ε. Μαυρίδου

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

ΑΘΗΝΑ

ΟΚΤΩΒΡΙΟΣ 2018

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

«Μοριακή Κυτταρογενετική Ανάλυση Μυελοδυσπλαστικών Συνδρόμων (ΜΔΣ) με αλλοιώσεις στο χρωμόσωμα 7»

Έλενα Ε. Μαυρίδου
A.M.: 20160650

ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ: **Κωνσταντίνα Σαμπάνη**, Ερευνήτρια Α', Ινστιτούτο Πυρηνικών & Ραδιολογικών Επιστημών & Τεχνολογίας, Ενέργειας & Ασφάλειας (Ι.Π.Ρ.Ε.Τ.Ε.Α.), ΕΚΕΦΕ «Δημόκριτος»

ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ **Κωνσταντίνα Σαμπάνη**, Ερευνήτρια Α', ΕΚΕΦΕ «Δημόκριτος»

ΕΠΙΤΡΟΠΗ: **Μαρία Τζέτη**, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Γενετικής, ΕΚΠΑ

Ιωάννα Treager-Συνοδινού, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Γενετικής, ΕΚΠΑ

Οκτώβριος 2018

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα Μυελοδυσπλαστικά Σύνδρομα (ΜΔΣ) είναι μια ετερογενής ομάδα κλωνικών διαταραχών του αρχέγονου αιμοποιητικού κυττάρου που χαρακτηρίζονται από αυξημένη απόπτωση στο μυελό των οστών, ανεπαρκή αιμοποίηση και αυξημένο κίνδυνο εξέλιξης σε οξεία μυελογενή λευχαιμία (ΟΜΛ). Η ετήσια συχνότητα εμφάνισης των ΜΔΣ είναι 0,02%, εμφανίζεται κυρίως σε άτομα ώριμης ηλικίας και ο συντελεστής αναλογίας μεταξύ άρρενος και θήλεος είναι 2:1. Τα ΜΔΣ χαρακτηρίζονται από μη τυχαίες, κυτταρογενετικές αλλοιώσεις που εμπλέκονται στην αιτιοπαθογένεια, καταδεικνύουν την κλωνικότητα, τεκμηριώνουν τη διάγνωση, καθορίζουν την πρόγνωση και την επιλογή της θεραπείας. Αποτελούν ένα κυτταρογενετικό μοντέλο λευχαιμογένεσης, κατά το οποίο ο ίδιος κλωνικός πληθυσμός μπορεί να εξελιχθεί από την ήπια φάση σε ΟΜΛ, με την απόκτηση δευτερογενών γενετικών αλλαγών. Στα ΜΔΣ ο καρυότυπος με την ανάλυση μεταφασικών κυττάρων αναδεικνύεται ως ο σπουδαιότερος προγνωστικός δείκτης. Οι συχνότερες καρυοτυπικές αλλαγές είναι μη ισοζυγισμένες, σε αντίθεση από την ΟΜΛ, στην οποία υπερτερούν οι αμοιβαίες μεταθέσεις με το σχηματισμό υβριδικών γονιδίων. Συγκεκριμένα, στα ΜΔΣ ανιχνεύονται ελλείψεις χρωμοσωματικών τμημάτων, μονοσωμίες (ολικές ελλείψεις χρωμοσωμάτων), τρισωμίες και μη ισοζυγισμένες μεταθέσεις, ενώ σπανιότερα ανευρίσκονται ισοζυγισμένες, αμοιβαίες μεταθέσεις. Η κλασική κυτταρογενετική με την αξιολόγηση μεταφάσεων αναδεικνύει χρωμοσωματικές αλλαγές στο 60% περίπου των ασθενών με πρωτοπαθές ΜΔΣ (primary, pMDS) και στο 90% των ασθενών με ΜΔΣ σχετιζόμενο με προηγούμενη (χημειο)θεραπεία (tMDS). Το πεδίο της Κυτταρογενετικής εξακολουθεί να εμπλουτίζεται με τη θεμελίωση και διεύρυνση της προγνωστικής της αξίας, όπως αυτή αναγνωρίζεται στο αναθεωρημένο διεθνές προγνωστικό σύστημα ταξινόμησης (IPSS-R), καθώς και με την ευρείας κλίμακας ανίχνευση γονιδιακών αλλαγών, μη ορατών στον καρυότυπο. Οι συνηθέστερες κυτταρογενετικές ανωμαλίες είναι οι del(5q), -7/del(7q) και η +8.

Η μονοσωμία 7 (-7) ή/και η έλλειψη του μακρού (q) βραχίονα (del(7q)) εμφανίζονται στο 10% των περιπτώσεων pMDS και 50% των tMDS, ενώ παρουσιάζονται ως μοναδική ανωμαλία στο ~5% των ενήλικων ασθενών με pMDS και ~55% με tMDS και χαρακτηρίζεται ως η πιο συχνή κυτταρογενετική ανωμαλία στις αναγνωρισμένες διαταραχές προδιάθεσης μυελογενών νεοπλασιών. Σύμφωνα με το IPSS-R, η del(7q) ανήκει στην ομάδα ενδιάμεσης πρόγνωσης, ενώ η μονοσωμία 7 στην ομάδα κακής πρόγνωσης. Περιχές του 7q που λείπουν συχνότερα, όπως οι 7q22 και 7q36, έχουν μείζονα σημασία στην εμφάνιση της νόσου αφού σε αυτές εδράζονται γονίδια των οποίων η λειτουργία, λόγω απλοανεπάρκειας, έχει συσχετιστεί με την παθογένεση.

Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η καρυοτυπική και μοριακή κυτταρογενετική ανάλυση μεγάλου δείγματος ασθενών με ΜΔΣ και μονήρεις αλλοιώσεις του χρωμοσώματος 7, η ανίχνευση τυχόν υποκλώνων μη ανιχνεύσιμων στον καρυότυπο και η διερεύνηση και αξιολόγηση πλεονεκτήματος πολλαπλασιασμού των κυττάρων που φέρουν τρισωμία 7, ή έλλειψη στο 7q.

Η μελέτη περιλαμβάνει 47 ασθενείς (30 άνδρες, 17 γυναίκες) με μέσο όρο ηλικίας τα 68 έτη, με ΜΔΣ στη διάγνωση και καρυότυπο μυελού με μονήρη αλλοίωση στο χρωμόσωμα 7 [-7, ή del(7q)]. Για την καρυοτυπική ανάλυση αξιολογήθηκαν 25 μεταφάσεις για κάθε ασθενή. Οι 36 εξ αυτών εμφάνισαν μονοσωμία 7 και οι 11 είχαν del(7q). Μοριακή κυτταρογενετική ανάλυση (μεσοφασικό FISH, iFISH) πραγματοποιήθηκε στα ίδια δείγματα που αναλύθηκαν για καρυότυπο, με τη χρήση του ιχνηθέτη XL 7q22/7q36 (MetaSystems) που υβριδίζεται στις περιοχές 7q22 και 7q36 και στο κεντρομερίδιο του 7. Για κάθε δείγμα αξιολογήθηκαν 200 πυρήνες.

Η ανάλυση iFISH έδειξε πως 10 ασθενείς με del(7q) παρουσιάζουν έλλειψη της περιοχής 7q22 ενώ 7 από αυτούς δεν παρουσίασε έλλειψη της 7q36 περιοχής. Η έλλειψη στην 7q22 περιοχής σε μεγάλο ποσοστό επιβεβαιώνει αποτελέσματα δημοσιευμένων μελετών και την καθιστά μια από της σημαντικότερες ελλείψεις που σχετίζονται με τη νόσο. Επιπλέον, η μη έλλειψη της 7q36 περιοχής στα περιστατικά με αποδεδειγμένη έλλειψη στην 7q22, αναδεικνύει τις χρωμοσωματικές ελλείψεις ως ενδιάμεσες και όχι τελικές.

Στους 23 από τους 36 ασθενείς με μονοσωμία 7 παρατηρήθηκε πλεονέκτημα πολλαπλασιασμού των κυττάρων με την αλλοίωση, ενώ αντίστοιχα ευρήματα είχαμε σε 9 από τους 11 ασθενείς με del(7q). Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι τα κύτταρα που φέρουν αλλοίωση στο 7 έχουν πλεονέκτημα πολλαπλασιασμού έναντι των καρυοτυπικά φυσιολογικών κυττάρων. Επιπλέον, παρατηρήθηκε μεγαλύτερο πλεονέκτημα πολλαπλασιασμού των κυττάρων με μονοσωμία 7 έναντι αυτών με del(7q). Η διαφορά αυτή παρατηρήθηκε διευρυμένη στα περιστατικά που έφεραν μεγάλο αλλοιωμένο κλώνο.

ΘΕΜΑΤΙΚΗ ΠΕΡΙΟΧΗ:

Καρυοτυπική και Μοριακή Κυτταρογενετική ανάλυση Μυελοδυσπλαστικών Συνδρόμων με αλλοιώσεις του χρωμοσώματος 7.

ΛΕΞΕΙΣ ΚΛΕΙΔΙΑ:

Μυελοδυσπλαστικό Σύνδρομο, Καρυότυπος, iFISH, χρωμόσωμα 7, Μονοσωμία, Χρωμοσωματική έλλειψη,

ABSTRACT

KARYOTYPIC AND MOLECULAR CYTOGENETIC ANALYSIS OF PATIENTS WITH MYELODYSPLASTIC SYNDROME AND CHROMOSOME 7 ABERRATION

Introduction: Myelodysplastic Syndromes (MDS) are a heterogeneous group of clonal diseases of the stem cells characterized by increased apoptosis in the bone marrow, insufficient hematopoiesis and an increased risk of progression to Acute Myeloid Leukemia (AML). The most frequent karyotypic aberrations are unbalanced. In MDS, the field of Cytogenetics is still being enriched by the foundation and expansion of its prognostic value as it is recognized in the Revised International Prognostic Scoring System (IPSS-R), as well as with the wide-scale detection of gene changes not visible in the karyotype. Chromosomal changes emerge as the most prominent prognostic markers. Some of the most common cytogenetic lesions are those of chromosome 7, which are monosomy and deletion of the long (q) arm of the chromosome. According to the IPSS-R, del(7q) belongs to the intermediate prognosis group, whereas, -7 in the poor prognosis group. Deleted regions of the q arm of chromosome 7, particularly those that include the 7q22 region are of major importance as they include genes whose function, due to haploinsufficiency, is associated with the pathogenesis of the disease.

Purpose: i) karyotypic and molecular cytogenetic analysis of a large series of MDS patients with isolated chromosome 7 aberrations, ii) the search for any subclones not detectable in the karyotype, iii) the detection and evaluation of proliferative advantage of the aberrant cells.

Material and Methods: The study includes 47 MDS patients at diagnosis, (30 men, 17 women) with an average age of 68 years. All of them exhibited either monosomy 7, or deletion of 7q as sole abnormalities in their bone marrow karyotype. For karyotypic analysis, 25 G-banded metaphases were evaluated of each patient. Among 47 patients, 36 exhibited monosomy 7 and 11 showed del(7q). Interphase molecular cytogenetic analysis (interphase FISH, iFISH) was performed on the same samples analyzed for karyotype, by the use of the XL 7q22/7q36 probe (MetaSystems) that detects deletions in 7q and hybridizes to 7q22 and 7q36 regions as well as the chromosome 7 centromere. For each sample, 200 nuclei were evaluated. For the evaluation of the results a statistical χ^2 test (CI 95%) was applied.

Results: iFISH analysis showed that 10/11 patients with del(7q) were missing the 7q22 region while 7/11 did not show deletion a 7q36. 23/36 patients with monosomy 7 in the karyotype had an aberrant clone $\geq 60\%$ and for them a higher percentage of aberrant cells in karyotype rather than in iFISH was observed. Correspondingly, 9/11 patients with del(7q) had an aberrant clone $\geq 20\%$ and for them also a higher percentage of aberrant cells was observed in the karyotype rather than in iFISH. Deviation of altered cell counts, between karyotype and iFISH was greater in monosomy 7 cases.

Conclusions: The deletion of the 7q22 region in 10/11 patients is consistent with the data suggested in the literature and underlines its importance in the pathogenesis of MDS. The presence of the 7q36 region in the del(7q) patients indicates that the deletions are interstitial and not terminal. The results indicate that the aberrant cells show a proliferative advantage as compared to karyotypically normal cells.

SUBJECT AREA: Myelodysplastic Syndromes and Chromosome 7 Aberrations

KEYWORDS: Myelodysplastic Syndrome, Karyotype, iFISH, Monosomy, Deletion

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	2
ABSTRACT	4
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ.....	7
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ.....	9
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	11
1.1 Αιμοποίηση.....	11
1.2 Λευχαιμογένεση.....	14
1.3 Μυελοδυσπλαστικά Σύνδρομα (ΜΔΣ)	16
1.3.1 Μορφολογικά χαρακτηριστικά – Επιδημιολογία	17
1.3.2 Κλινικά χαρακτηριστικά	18
1.3.3 Υπότυποι.....	19
1.3.4 Κυτταρογενετική διαγνωστική προσέγγιση	22
1.3.4.1 Κυτταρογενετικά ευρήματα.....	25
1.3.4.1.1 Φυσιολογικός καρυότυπος (46,XX/46,XY)	26
1.3.4.1.2 Απώλεια του φυλετικού χρωμοσώματος Y (-Y).....	26
1.3.4.1.3 Τρισωμία χρωμοσώματος 8 (+8).....	26
1.3.4.1.4 Έλλειψη του μακρύ βραχίονα (q) του χρωμοσώματος 5 [del(5q)]	27
1.3.4.1.5 Μονοσωμία 7 (-7) / Έλλειψη του μακρύ βραχίονα (q) του χρωμοσώματος 7 (del(7q))	28
1.3.4.1.6 Έλλειψη του κοντού βραχίονα του χρωμοσώματος 17 (17p)	28
1.3.4.1.7 Έλλειψη του μακρύ βραχίονα (q) του χρωμοσώματος 20 (del(20q)).....	29
1.3.4.1.8 Αλλοιώσεις του 3q.....	29
1.3.4.1.9 Σύνθετος καρυότυπος.....	30
1.3.4.1.10 Σπάνιες επαναλαμβανόμενες μετατοπίσεις.....	30
1.3.4.2 Εξέλιξη καρυότυπου.....	30
1.3.5 Μοριακή ανάλυση – Μεταλλάξεις	32
1.3.5.1 Έλλειψη του μακρύ βραχίονα (q) του χρωμοσώματος 5 [del(5q)]	32
1.3.5.2 Μονοσωμία 7 (-7) / Έλλειψη του μακρύ βραχίονα (q) του χρωμοσώματος 7 (del(7q)).....	32
1.3.5.3 Τρισωμία 8	33
1.3.6 Μοντέλα Μοριακής Παθογένεσης.....	34
1.3.6.1 RAS και CBL και ενεργοποίηση υποδοχέων αυξητικών παραγόντων.....	34
1.3.6.2 Ανωμαλίες των χρωμοσωμάτων 3 και 7 και κρύφιος αναδιατάξεις 21q/ μεταλλάξεις RUNX1 (AML1) κατά την πρόοδο σε ΜΔΣ.....	34
1.3.6.3 Απόκριση στις βλάβες του DNA και εξέλιξη ΜΔΣ.....	35
1.3.6.4 Ριβοσωματοπάθειες	35
1.3.6.5 TET2 και πρωτεΐνες του συμπλέγματος Polycomb	35
1.3.6.6 Ο ΡΟΛΟΣ ΤΟΥ P53	37
1.3.7 Μονογονεϊκή δισωμία (UPD)	37
1.3.8 Επιγενετικές μεταβολές	37
1.3.9 Σύγχρονες μοριακές μεθοδολογίες και νέα δεδομένα.....	40
1.3.10 Θεραπευτική προσέγγιση	41
1.3.11 Μυελογενή νεοπλασμάτα που έχουν συσχετιστεί με προηγηθείσα θεραπεία (treatment related myeloid neoplasms, tMNs).....	41
1.4 Σημασία της κλασικής κυτταρογενετικής στη διάγνωση και πρόγνωση αιματολογικών νεοπλασμάτων	43
1.4.1 Η ανίχνευση μη φυσιολογικών και φυσιολογικών κλώνων	43
1.5 Fluorescence In Situ Hybridization-FISH.....	44
1.5.1 Μικροελλείψεις & Μικροδιπλασιασμοί	45
1.5.2 Τύποι ιχνηθετών.....	45
2. ΣΚΟΠΟΣ	46

3. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	47
3.1 Κυτταρογενετική ανάλυση	47
3.2 Μοριακή κυτταρογενετική ανάλυση (iFISH)	48
3.3 Δείγματα πειραματικής διαδικασίας & πρωτόκολλα.....	51
3.3.1 Καλλιέργεια δειγμάτων	51
3.3.2 Διαδικασία χρώσης.....	52
3.3.3 Πρωτόκολλο interphase-FISH	53
4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	54
4.1 Καρυστυπική ανάλυση.....	55
4.2 Υπολογισμός ορίων cutoff	59
4.3 Μοριακή κυτταρογενετική ανάλυση – interphase FISH.....	60
4.4 Πλεονέκτημα πολλαπλασιασμού (Proliferative advantage) των αλλοιωμένων κυττάρων	64
5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	66
ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ – ΑΡΚΤΙΚΟΛΕΞΑ – ΑΚΡΩΝΥΜΙΑ	68
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ	70
ΑΝΑΦΟΡΕΣ	71

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

- Εικόνα 1.** Η διαδικασία της αιμοποίησης. Πηγή: wikipedia.org/wiki/Haematopoiesis.... 11
- Εικόνα 2.** Μοντέλα λευχαιμογένεσης βλαστικών κυττάρων. Η εικόνα απεικονίζει τρία πιθανά σενάρια για την εξέλιξη της AML (πάνελ a-c). Τα αιμοποιητικά βλαστοκύτταρα (HSC), οι μυελοειδείς προγονικές σειρές (MP) ή και οι δύο πληθυσμοί είναι δυνητικοί στόχοι για πρωτογενείς και δευτερογενείς μεταλλάξεις που οδηγούν σε οξεία νόσο. Τα κύτταρα που φέρουν μία μόνο μετάλλαξη ονομάζονται «προλευχαιμικά» και όταν υποβάλλονται σε μεταγενέστερη μεταλλαγή δημιουργούν λευχαιμικά βλαστοκύτταρα (LSC). Το LSC με τη σειρά του προκαλεί την πλειοψηφία των κακοηθών κυττάρων που εντοπίζονται στη πληθυσμιακή λευχαιμία (βλάστες). Τρία πιθανά θεραπευτικά αποτελέσματα απεικονίζονται με τα βέλη πάνω από το διάγραμμα. Το μήκος κάθε βέλους δείχνει το βαθμό στον οποίο ένα συγκεκριμένο θεραπευτικό σχήμα μπορεί να επηρεάσει τις λευχαιμικές βλάστες, τα κύτταρα βλαστοκυττάρων / προγονικών κυττάρων ή τους τύπους προλευχαιμικών κυττάρων. (Jordan CT and Guzman ML, 2004) 15
- Εικόνα 3.** Η μεθυλίωση του DNA σε υποκινητές γονιδίων οδηγεί σε μεταγραφική καταστολή. Σε ασθενείς με ΜΔΣ έχει περιγραφεί μεθυλίωση σε υποκινητές γονιδίων που εμπλέκονται στο φαινόμενο της προσκόλλησης, στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου, του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και της απόπτωσης αλλά και στη μεταφορά διαφόρων μηνυμάτων. 38
- Εικόνα 4.** Οι ιχνηθέτες XL 7q22/7q36 (αριστερά) και XL del(7)(q21.31) (δεξιά) σε αντιπαράθεση. Με τα χρώματα γαλάζιο, πορτοκαλί και πράσινο φαίνονται οι αντίστοιχες περιοχές aqua, red & green που εμφανίζονται στην ανάλυση με μικροσκόπιο φθορισμού και αντιπροσωπεύουν τις περιοχές που δηλώνει η εικόνα. Στα αριστερά κάθε επιμέρους χρωμοσώματος φαίνονται μερικά από τα πιο σημαντικά γονίδια που εδράζονται σε κάθε περιοχή. Πηγή: www.metasystems-probes.com 49
- Εικόνα 5.** Παράδειγμα καρυότυπου. Παρουσιάζεται μετάφραση θήλεος με φυσιολογικό καρυότυπο 52
- Εικόνα 6.** Καρυότυπος του άρρενος ασθενή #2 που εμφανίζει μονοσωμία 7. Επισημαίνεται η απώλεια ολόκληρου του χρωμοσώματος. 56
- Εικόνα 7.** Καρυότυπος του θήλεος ασθενή #7 που εμφανίζει έλλειψη στον βραχίονα q του χρωμοσώματος 7. Με βέλος επισημαίνεται η έλλειψη. Η έλλειψη στον καρυότυπο περιγράφεται ως τελική, όμως στον ασθενή αυτό η iFISH έδειξε ότι η 7q36 περιοχή βρέθηκε ότι υπάρχει στο ελλειπτικό χρωμόσωμα 7. 57
- Εικόνα 8.** Καρυότυπος του άρρενος ασθενή #1 που εμφανίζει έλλειψη στον βραχίονα q του χρωμοσώματος 7. Με βέλος επισημαίνεται η έλλειψη. Η έλλειψη στον καρυότυπο περιγράφεται ως ενδιάμεση. 57
- Εικόνα 9.** Καρυότυπος του θήλεος ασθενή #7 που εμφανίζει έλλειψη στον βραχίονα q του χρωμοσώματος 7. Με βέλος επισημαίνεται η έλλειψη. Η έλλειψη στον καρυότυπο περιγράφεται ως ενδιάμεση. Στον ασθενή αυτόν η iFISH έδειξε πως λείπει και 7q36 περιοχή. 58
- Εικόνα 10.** Πυρήνας κυττάρου με το αλλοιωμένο πρότυπο 2-1-2 (Έλλειψη της 7q22 αλλά όχι της 7q36). Με μπλε φαίνονται τα κεντρομερίδια του ζεύγους των χρωμοσωμάτων 7, με κόκκινο η περιοχή 7q22 και με πράσινο η 7q36 περιοχή. 62
- Εικόνα 11.** Πυρήνας με το αλλοιωμένο πρότυπο 2-1-1 (Έλλειψη που περιλαμβάνει και τις 2 περιοχές, 7q22 και 7q36). Με μπλε σημαίνονται τα κεντρομερίδια των 7 χρωμοσωμάτων, με κόκκινο η περιοχή 7q22 και με πράσινο η 7q36. 62

Εικόνα 12. Πυρήνας με το αλλοιωμένο πρότυπο υβριδισμού 2-2-1 (Έλλειψη που περιέχει την περιοχή 7q31). Με μπλε σημαίνονται τα κεντρομερίδια των 7 χρωμοσωμάτων, με κόκκινο η περιοχή 7q22 και με πράσινο η 7q31.....63

Εικόνα 13. Δεξιά: Πυρήνας με το φυσιολογικό πρότυπο υβριδισμού. Αριστερά: Πυρήνες με το αλλοιωμένο πρότυπο υβριδισμού 1-1-1 (Μονοσωμία 7). Με μπλε σημαίνονται τα κεντρομερίδια των 7 χρωμοσωμάτων, με κόκκινο η περιοχή 7q22 και με πράσινο η 7q36.63

Εικόνα 14. Διάγραμμα που παρουσιάζει το ποσοστό των αλλοιωμένων κυττάρων των 11 ασθενών με del(7q), από τον ασθενή με τον μικρότερο κλώνο στον καρυότυπο μέχρι τον ασθενή με τον μεγαλύτερο. Με μπλε είναι τα ποσοστά του κλώνου στον καρυότυπο και με κόκκινο τα ποσοστά των αλλοιωμένων κυττάρων στην iFISH. Τα σημεία δηλώνουν τον ασθενή. Παρατηρείται ότι στην πλειοψηφία των αποτελεσμάτων η γραμμή του καρυότυπου είναι πιο πάνω αυτής της iFISH. Το αντίθετο αποτέλεσμα παρατηρείται μόνο στους 2 ασθενείς με πολύ μικρό κλώνο.64

Εικόνα 15. Διάγραμμα που παρουσιάζει το ποσοστό των αλλοιωμένων κυττάρων των 36 ασθενών με -7, από τον ασθενή με τον μικρότερο κλώνο στον καρυότυπο μέχρι τον ασθενή με τον μεγαλύτερο. Με μπλε είναι τα ποσοστά του κλώνου στον καρυότυπο και με κόκκινο τα ποσοστά των αλλοιωμένων κυττάρων στην iFISH. Τα σημεία δηλώνουν τον ασθενή. Παρατηρείται ότι στην πλειοψηφία των αποτελεσμάτων η γραμμή του καρυότυπου είναι πιο πάνω αυτής της iFISH. Το αντίθετο αποτέλεσμα παρατηρείται όσο πιο μικρός είναι ο κλώνος.65

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1. Βιολογικά φαινόμενα που παρατηρούνται στα ΜΔΣ.(Parcharidou A. et al.,2011).....	18
Πίνακας 2. IPSS-R Κυτταρογενετικές ομάδες κινδύνου (Schanz J et al, J Clin Oncology 2012; Greenberg et al., 2012)..... Σφάλμα! Δεν έχει οριστεί σελιδοδείκτης.	
Πίνακας 3. IPSS-R Προγνωστικά σκορ. (Greenberg et al., 2012)	23
Πίνακας 4. IPSS-R προγνωστικές κατηγορίες κινδύνου με κλινικά αποτελέσματα. (Greenberg et al., 2012)	23
Πίνακας 5. Επανεμφανιζόμενες χρωμοσωματικές ανωμαλίες στα ΜΔΣ. (WHO 2017) .	25
Πίνακας 6. Γονίδια που έχουν βρεθεί μεθυλωμένα σε ασθενείς με ΜΔΣ και συσχέτιση της κατάστασης μεθυλίωσής τους με κλινικές παραμέτρους, (TSG: tumor suppressor gene). (Hatzimichael E et al., 2011)	39
Πίνακας 7. Αποτελέσματα της καρυοτυπικής ανάλυσης των ασθενών με ΜΔΣ και μονήρη μονοσωμία 7. Όλοι οι ασθενείς είχαν καρυότυπο κλώνο 45,XX(XY),-7.	55
Πίνακας 8. Αποτελέσματα της καρυοτυπικής ανάλυσης των ασθενών με ΜΔΣ και μονήρη έλλειψη του μακρύ βραχίονα (q) του χρωμοσώματος 7.....	56
Πίνακας 9. Αποτελέσματα ανάλυσης μαρτύρων και υπολογισμός ορίων cutoff	59
Πίνακας 10. Αποτελέσματα μοριακής κυτταρογενετικής (iFISH) ανάλυσης των ασθενών με ΜΔΣ και μονήρη έλλειψη του μακρύ βραχίονα (q) του χρωμοσώματος 7. Για την iFISH χρησιμοποιήθηκε ο ιχνηθέτης XL 7q22/7q36 της εταιρίας MetaSystems.	60
Πίνακας 11. Αποτελέσματα μοριακής κυτταρογενετικής (iFISH) ανάλυσης των ασθενών με ΜΔΣ και μονήρη έλλειψη του μακρύ βραχίονα (q) του χρωμοσώματος 7. Για την iFISH χρησιμοποιήθηκε ο ιχνηθέτης XL 7q22/7q36 της εταιρίας MetaSystems. Όλα τα δείγματα είχαν αλοιωμένο πρότυπο υβριδισμού 1A-1R-1G που σημαίνει ότι έλειπε όλο το χρωμόσωμα 7.	61

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα Διπλωματική Εργασία διεξήχθη στα πλαίσια του Μεταπτυχιακού Προγράμματος Σπουδών (ΠΜΣ) «Ιατρική Γενετική: Κλινική & Εργαστηριακή Κατεύθυνση» της Ιατρικής Σχολής του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών.

Το ΜΠΣ διεξήχθη κατά τα ακαδημαϊκά έτη 2016-2018 και το πειραματικό μέρος της διπλωματικής εργασίας πραγματοποιήθηκε κατά το διάστημα Ιανουαρίου-Αυγούστου 2018. Η εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Υγαιοφυσικής, Ραδιοβιολογίας & Κυτταρογενετικής (ΕΥΡΚ) του Ινστιτούτου Πυρηνικών & Ραδιοβιολογικών Επιστημών & Τεχνολογίας, Έρευνας & Ασφάλειας (ΙΠΡΕΤΕΑ), του Εθνικού Κέντρου Έρευνας Φυσικών Επιστημών (ΕΚΕΦΕ) «ΔΗΜΟΚΡΙΤΟΣ», με επιβλέπουσα την Δρ. Κωνσταντίνα Σαμπάνη. Το Εργαστήριο είναι διαπιστευμένο σύμφωνα με το διεθνές Πρότυπο ISO 15189: 2012 για κυτταρογενετικές και μοριακές κυτταρογενετικές δοκιμές. Το ΕΥΡΚ έχει οριστεί από την Ελληνική Αιματολογική Εταιρία ως «Εργαστήριο αναφοράς κυτταρογενετικού ελέγχου ασθενών με Μυελοδυσπλαστικό Σύνδρομο».

Θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα την Δρ. Σαμπάνη για την υπόδειξη του θέματος, την ανάθεση της εργασίας, και την αποδοχή στο εργαστήριο όπως και για την ευκαιρία που μου έδωσε να ασχοληθώ με την κλασική και μοριακή κυτταρογενετική και να γνωρίσω τις τεχνικές και μεθόδους. Θα ήθελα να την ευχαριστήσω για την βοήθεια, την καθοδήγησή της, την ενθάρρυνση και την εμπιστοσύνη που μου έδειξε, τον τρόπο της επιστημονικής σκέψης που μου παρουσίασε, τις πολύτιμες διορθώσεις της στο κείμενο, καθώς και για τη συνολική υποστήριξή της.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω θερμά τους ερευνητές και τεχνικούς στο ΕΥΡΚ του ΕΚΕΦΕ «Δ», για το χρόνο και την προθυμία τους να με βοηθήσουν και να με εκπαιδεύσουν σε ό, τι αφορούσε τόσο το εκάστοτε τρέχον πείραμα, όσο και τη λειτουργία του Εργαστηρίου συνολικά. Η βοήθεια τους υπήρξε πραγματικά πολύτιμη.

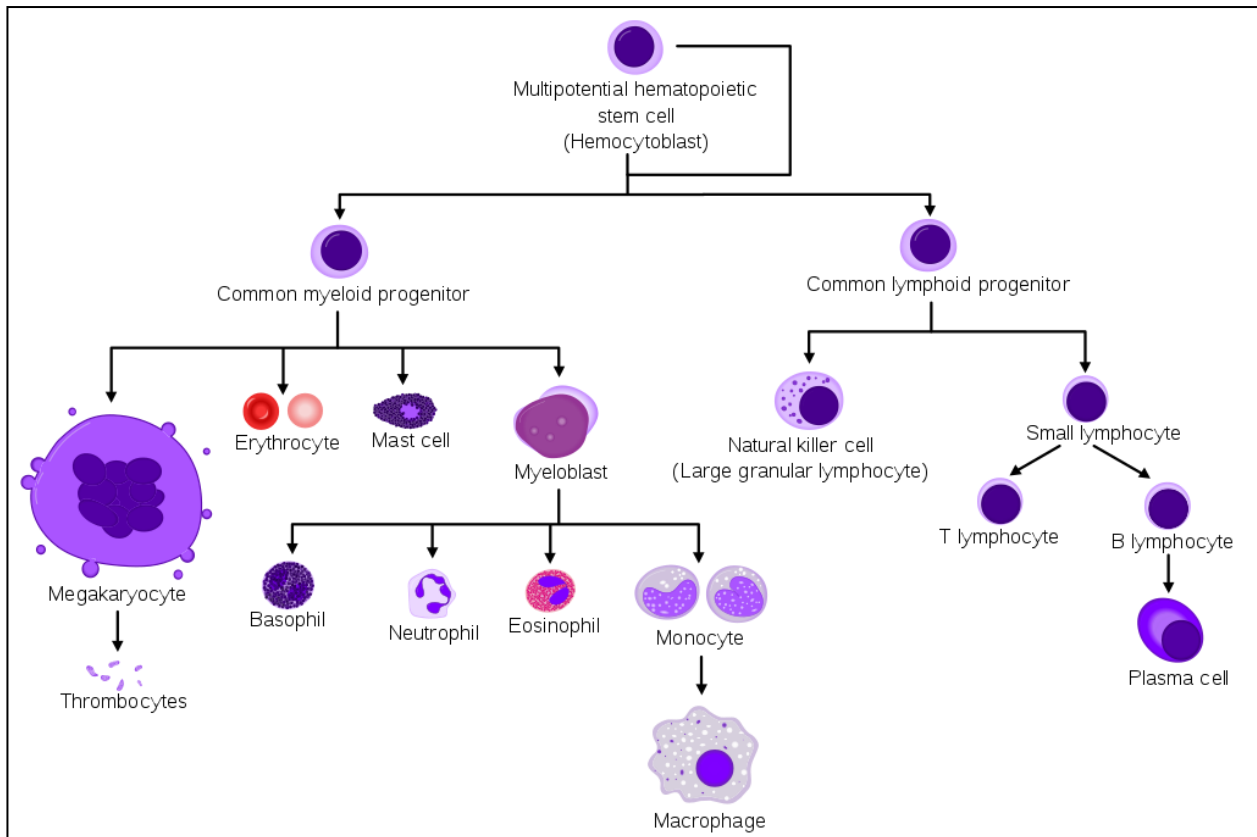
Εκφράζω τις θερμές ευχαριστίες μου στην Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Γενετικής του Εργαστηρίου Ιατρικής Γενετικής του Πανεπιστημίου Αθηνών Δρ. Μαρία Τζέτη, την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Γενετικής Δρ. Ιωάννα Treager- Συνοδινού που δέχτηκαν να είναι μέλη της εξεταστικής επιτροπής και για το γενικότερο ενδιαφέρον τους, καθώς και όλους τους Καθηγητές και Ερευνητές που συνέβαλαν στην εκπαίδευσή μας στα πλαίσια αυτού του Μεταπτυχιακού.

Τέλος, ένα μεγάλο ευχαριστώ στην οικογένεια και τους φίλους μου, που με στηρίζουν αυτά τα χρόνια των σπουδών μου. Τους είμαι ευγνώμων για όλα όσα μου έχουν προσφέρει με το να είναι δίπλα μου.

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Αιμοποίηση

Αιμοποίηση είναι η διαδικασία δημιουργίας των κυττάρων που απαρτίζουν το αίμα. Τα αιμοποιητικά βλαστοκύτταρα (πρόγονα αιμοποιητικά κύτταρα- Haematopoietic Stem Cells HSCs) παράγονται στον μυελό των οστών και έχουν την ικανότητα να παράγουν όλους τους διαφορετικούς τύπους των ώριμων αιμοποιητικών κυττάρων, ερυθρά και λευκά αιμοσφαίρια και αιμοπετάλια. (Birbrair A. et al., 2016)



Εικόνα 1. Η διαδικασία της αιμοποίησης. Πηγή: [wikipedia.org/wiki/Haematopoiesis](https://www.wikipedia.org/wiki/Haematopoiesis)

Τα HSCs είναι αυτό-ανανεώμενα κύτταρα, όταν διαφοροποιούνται, τουλάχιστον μερικά από τα θυγατρικά τους κύτταρα παραμένουν ως HSCs, έτσι ώστε η δεξαμενή των βλαστικών κυττάρων να μην εξαντλείται. Αυτό το φαινόμενο ονομάζεται ασύμμετρη διαίρεση. (Morrison J. et al., 2006) Τα άλλα θυγατρικά των HSC (μυελοειδή και λεμφοειδή προγονικά κύτταρα) μπορούν να ακολουθήσουν οποιαδήποτε από τις άλλες οδούς διαφοροποίησης που οδηγούν στην παραγωγή ενός ή περισσότερων συγκεκριμένων τύπων κυττάρων αίματος, αλλά δεν μπορούν να αυτό-ανανεωθούν. Η «δεξαμενή» των προγονικών κυττάρων είναι ετερογενής και μπορεί να χωριστεί σε δύο ομάδες, αυτήν της μακροπρόθεσμης αυτοανανέωσης HSCs και αυτή της μόνο προσωρινά αυτοανανέωσης HSCs, που ονομάζεται επίσης βραχυπρόθεσμη. (Morrison et al., 1994)

Τα κύτταρα του αίματος χωρίζονται σε 3 κυτταρικές σειρές:

- Τα ερυθρά αιμοσφαίρια, που ονομάζονται επίσης ερυθροκύτταρα και είναι τα κύτταρα που μεταφέρουν το οξυγόνο. Τα ερυθροκύτταρα είναι λειτουργικά και απελευθερώνονται στο αίμα. Ο αριθμός των δικτυοερυθροκυττάρων, πρώιμων ερυθροκυττάρων, δίνει μια εκτίμηση του ρυθμού ερυθροποίησης.
- Τα λεμφοκύτταρα αποτελούν τον ακρογωνιαίο λίθο του προσαρμοστικού ανοσοποιητικού συστήματος. Προέρχονται από κοινούς λεμφοειδείς προγόνους. Η λεμφοειδής γενεά αποτελείται από Τ-κύτταρα, Β-κύτταρα και φυσικά κύτταρα φονείς (Natural killer cells, NKcells). Αυτή είναι η λεμφοποίηση.
- Τα κύτταρα της μυελοειδούς γραμμής, τα οποία περιλαμβάνουν κοκκιοκύτταρα, μεγακαρυοκύτταρα και μακροφάγα, προέρχονται από κοινούς μυελογενείς προγόνους και εμπλέκονται σε πολλούς διαφορετικούς ρόλους όπως η έμφυτη ανοσία και η πήξη του αίματος. Αυτή είναι η μυελοποίηση.

Καθώς ένα βλαστοκύτταρο ωριμάζει, υφίσταται αλλαγές στην έκφραση των γονιδίων που περιορίζουν τους κυτταρικούς τύπους στους οποίους μπορεί να εξελιχθεί και το μετακινεί πλησιέστερα προς έναν συγκεκριμένο τύπο κυττάρου (κυτταρική διαφοροποίηση). Αυτές οι αλλαγές μπορούν συχνά να εντοπιστούν παρακολουθώντας την παρουσία πρωτεϊνών στην επιφάνεια του κυττάρου. Κάθε διαδοχική αλλαγή μετακινεί το κελί πιο κοντά στον τελικό τύπο κυττάρου και περαιτέρω περιορίζει τη δυνατότητα του να γίνει διαφορετικός τύπος κυττάρου.

Έχουν προταθεί δύο μοντέλα αιμοποίησης, ο ντετερμινισμός και η στοχαστική θεωρία. (Kimmel M., 2014)

Για τα βλαστοκύτταρα και άλλα αδιαφοροποίητα αιμοσφαίρια στον μυελό των οστών ο προσδιορισμός εξηγείται γενικά από την ντετερμινιστική θεωρία, λέγοντας ότι οι παράγοντες διέγερσης αποικίας και άλλοι παράγοντες του αιμοποιητικού μικροπεριβάλλοντος καθορίζουν τα κύτταρα ώστε να ακολουθούν μια συγκεκριμένη πορεία διαφοροποίησης των κυττάρων. (Birbrair A. et al., 2016) Αυτός είναι ο κλασικός τρόπος περιγραφής της αιμοποίησης.

Στη στοχαστική θεωρία, τα αδιαφοροποίητα κύτταρα του αίματος διαφοροποιούνται σε συγκεκριμένους κυτταρικούς τύπους με τυχαίο τρόπο. (Chang H. et al., 2008) Ένα άλλο επίπεδο στο οποίο η στοχαστικότητα μπορεί να είναι σημαντική είναι στη διαδικασία της απόπτωσης και της αυτοανάνεωσης. Σε αυτή την περίπτωση, το αιμοποιητικό μικροπεριβάλλον ορίζει σε μερικά από τα κύτταρα να επιβιώσουν και σε μερικά, από την άλλη πλευρά, να εκτελέσουν την βιολογική διαδικασία της απόπτωσης και να πεθάνουν. (Birbrair A. et al., 2016) Με τη ρύθμιση αυτής της ισορροπίας μεταξύ διαφορετικών τύπων κυττάρων, ο μυελός των οστών μπορεί να μεταβάλει την ποσότητα διαφορετικών κυττάρων που θα παραχθούν τελικά. (Alenzi FQ et al., 2009)

Εδώ και μερικά χρόνια αυξάνονται τα στοιχεία που δείχνουν ότι η ωρίμανση των HSCs ακολουθεί ένα μυελοειδές μοντέλο αντί για το «κλασικό» μοντέλο διχοτομίας που αναφέρθηκε. Στο κλασικό μοντέλο, τα HSCs παράγουν πρώτα έναν κοινό μυελοειδές-ερυθροειδές προγονικό κύτταρο (Common myeloid-erythroid progenitor, CMEP) και έναν κοινό λεμφικό (Common lymphoid progenitor, CLP). Ο CLP παράγει μόνο Τ ή Β λεμφοκύτταρα. Το μυελοειδές μοντέλο που προτείνεται, υποθέτει ότι τα HSCs αρχικά διαφοροποιούνται σε CMEP και σε έναν κοινό μυελο-λεμφοειδή πρόγονο (Common myelo-lymphoid progenitor, CMLP), ο οποίος δημιουργεί προγόνους Τ και Β κυττάρων μέσω ενός προγονικού μυελοειδούς Τ και ενός προγονικού μυελοειδούς Β σταδίου.

Η κύρια διαφορά είναι ότι σε αυτό το νέο μοντέλο, όλα τα ερυθροειδή, Τ και Β κύτταρα, διατηρούν τη δυνατότητα να παράγουν μυελοειδή κύτταρα (ακόμη και μετά τον διαχωρισμό των Τ και Β κυτταρικών γραμμών). Το μοντέλο προτείνει την ιδέα των ερυθροειδών, Τ και Β κυττάρων ως εξειδικευμένων τύπων ενός πρωτοτύπου μυελοειδούς HSC. (Kawamoto et al., 2010)

1.2 Λευχαιμογένεση

Οι λευχαιμίες είναι μονοκλωνικές ασθένειες, ένας τύπος καρκίνου του αίματος ή του μυελού των οστών, που χαρακτηρίζονται από τη μη φυσιολογική αύξηση ανώριμων και πρόδρομων μορφών των λευκών αιμοσφαιρίων, που ονομάζονται «βλάστες» και προκύπτουν από μεμονωμένα κύτταρα του αιμοποιητικού στελέχους και των προγονικών αιμοποιητικών κυττάρων, στο περιφερικό αίμα και στον μυελό των οστών. Τα κύτταρα αυτά συχνά εμφανίζουν μια εξέλιξη, από κύτταρα που παρουσιάζουν υπολείμματα κανονικής διαφοροποίησης ως και την προοδευτική απώλεια της ικανότητα ωρίμανσης και την ανάπτυξη ενός αδιαφοροποίητου επιθετικού φαινότυπου. Σύμφωνα με τα αναδυόμενα μοντέλα καρκινογένεσης, η λευχαιμογένεση είναι μια εξελικτική διαδικασία που περιλαμβάνει πολλαπλές ανεξάρτητες γενετικές και ορμονικές διαταραχές αλλά και επιγενετικά γεγονότα. (Foucar K. et al., 1979) Οι γενετικές αλλοιώσεις συχνά περιλαμβάνουν μεταλλάξεις ογκογονιδίων και / ή απώλεια γονιδίων καταστολέων όγκων. Τα συγκεκριμένα γενετικά γεγονότα στη διαδικασία της λευχαιμογένεσης δεν έχουν γίνει ακόμα απόλυτα κατανοητά, αν και έχει προταθεί ότι απαιτούνται τουλάχιστον δύο μεταλλάξεις: μία που οδηγεί σε πολλαπλασιαστικό πλεονέκτημα και μία άλλη που προκαλεί βλάβη στη διαδικασία ωρίμανσης (η υπόθεση του "διπλού χτυπήματος"). (Faramarz N. et al., 2013)

Κλινικά και παθολογικά, η λευχαιμία υποδιαιρείται σε διαφορετικές ομάδες μεγάλου εύρους. Ο πρώτος διαχωρισμός αφορά την οξεία και τη χρόνια. Επιπλέον, οι τύποι της ασθένειας υποδιαιρούνται σύμφωνα με ποιο είδος λευκού αιμοσφαιρίου επηρεάζεται. Έτσι διαχωρίζεται η λευχαιμία σε λεμφοβλαστική ή λεμφοκυτταρική λευχαιμία, και στη μυελοβλαστική ή μυελογενή λευχαιμία. Συνδυάζοντας αυτές τις 2 κατηγορίες προκύπτει ένα σύνολο από 4 κύριες κατηγορίες, Οξεία λεμφοκυτταρική λευχαιμία(ΟΛΛ), Χρόνια λεμφοκυτταρική λευχαιμία(ΧΛΛ), Οξεία μυελογενής λευχαιμία (ΟΜΛ) και Χρόνια μυελογενής λευχαιμία (ΧΜΛ). Η ΟΜΛ που μας ενδιαφέρει περισσότερο στα πλαίσια της παρούσας εργασίας, είναι καρκίνος των κυττάρων της λευκής σειράς, που χαρακτηρίζεται από ραγδαία ανάπτυξη των λευκών αιμοσφαιρίων που συσσωρεύονται στο μυελό των οστών και εμποδίζουν την αιμοποίηση. Τα συμπτώματα της ΟΜΛ προκαλούνται από την αντικατάσταση των φυσιολογικών κυττάρων του μυελού των οστών με λευχαιμικά κύτταρα, γεγονός που προκαλεί ελάττωση στον αριθμό των ερυθρών αιμοσφαιρίων, των αιμοπεταλίων και των φυσιολογικών λευκών αιμοσφαιρίων.

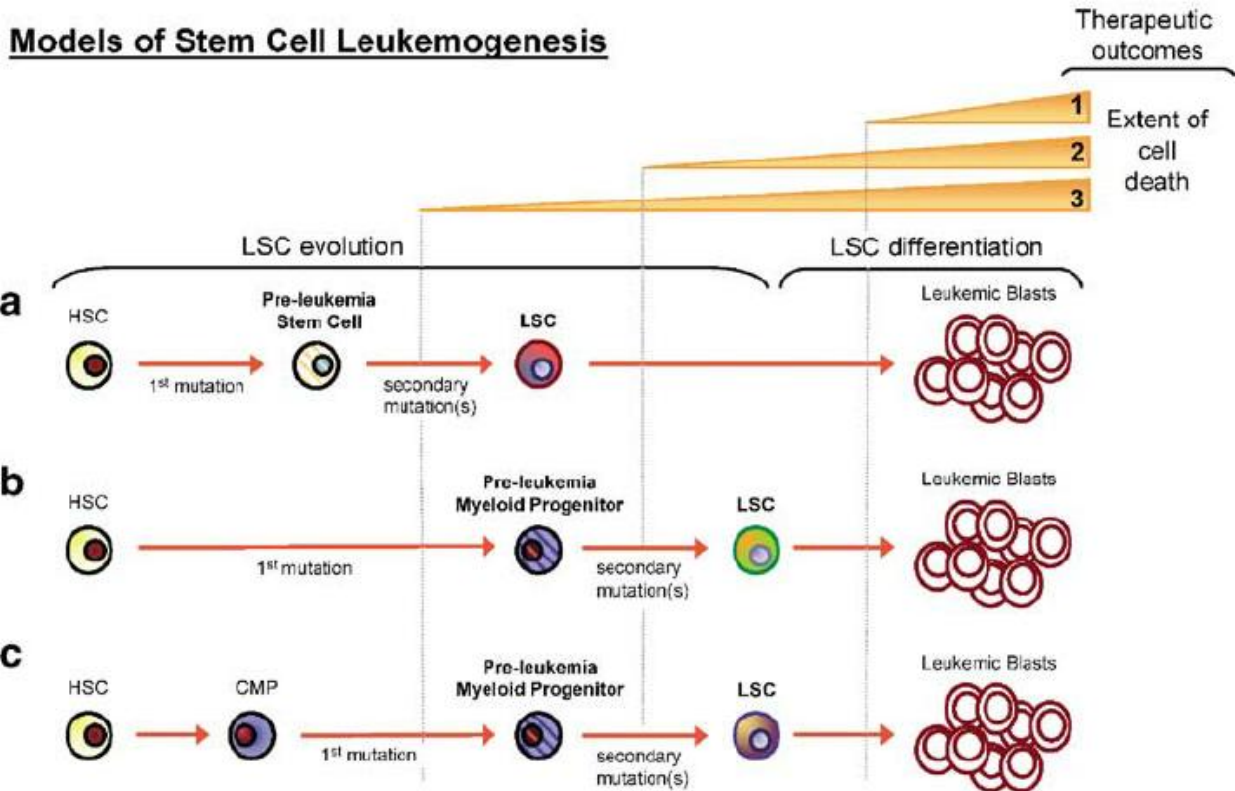
Δεν υπάρχει μία γνωστή αιτία για όλα τα είδη λευχαιμίας. Διαφορετικοί τύποι έχουν πιθανόν διαφορετικές αιτίες. Οι γνωστές αιτίες, παράγοντες που δεν βρίσκονται υπό τον έλεγχο του ανθρώπου, δίνουν πληροφορίες για σχετικά λίγες περιπτώσεις.(Ross JA. Et al., 2002)

Γενικά, η λευχαιμία, όπως και οι άλλες μορφές καρκίνου, προκύπτει από μεταλλάξεις στο DNA. Ορισμένες μεταλλάξεις μπορεί να προκαλέσουν λευχαιμία, όπως έχει αναφερθεί, με την ενεργοποίηση ογκογονιδίων ή με την απενεργοποίηση ογκοκατασταλτικών γονιδίων, διαταράσσοντας τη ρύθμιση του κυτταρικού θανάτου, τη διαφοροποίηση ή τη διάσπαση. Αυτές οι μεταλλάξεις μπορεί να συμβούν αυθόρμητα ή ως αποτέλεσμα της έκθεσης σε ακτινοβολία ή καρκινογόνες ουσίες.

Οι ιοί έχουν επίσης συνδεθεί με κάποιες μορφές λευχαιμίας.(Leonard B., 1998) Εκτός από αυτά τα θέματα γενετικής, τα άτομα με χρωμοσωματικές ανωμαλίες ή ορισμένες άλλες γενετικές παθήσεις έχουν επίσης μεγαλύτερο κίνδυνο λευχαιμίας. (Robinette M. et al., 2001)

Ο όρος προλευχαιμία αναφέρεται στην κατάσταση στην οποία ο φαινότυπος περιγράφει μια προγενέστερη κατάσταση αιματολογικών νεοπλασιών-λευχαιμιών έχει όμως ευρέως αντικατασταθεί από τη πιο λειτουργική, ταξινόμηση των μυελοδυσπλαστικών συνδρόμων (ΜΔΣ) (Bennett JM et al., 1982)

Διαφορές στην ανάπτυξη και διαφοροποίηση μεταξύ ΜΔΣ και ΟΜΛ βρίσκουν αναλογία στην εξέλιξη συμπαγών όγκων από μεταπλασία και δυσπλασία στο καρκίνωμα. Η παρατήρηση αυτή, μαζί με τη συχνή εξέλιξη δευτερευόντων ΜΔΣ (s-MDS) σε ΟΜΛ, οδηγεί στο αναπόφευκτο συμπέρασμα ότι τα ΜΔΣ και η ΟΜΛ θα πρέπει να θεωρούνται ως η συνέχεια μίας και μόνο ασθένειας όταν αντιμετωπίζονται στα πλαίσια χημικής λευχαιμογένεσης. (Richard D. et al., 1996)



Εικόνα 2. Μοντέλα λευχαιμογένεσης βλαστικών κυττάρων. Η εικόνα απεικονίζει τρία πιθανά σενάρια για την εξέλιξη της AML (πάνελ a-c). Τα αιμοποιητικά βλαστοκύτταρα (HSC), οι μυελοειδείς προγονικές σειρές (MP) ή και οι δύο πληθυσμοί είναι δυνητικοί στόχοι για πρωτογενείς και δευτερογενείς μεταλλάξεις που οδηγούν σε οξεία νόσο. Τα κύτταρα που φέρουν μία μόνο μετάλλαξη ονομάζονται «προλευχαιμικά» και όταν υποβάλλονται σε μεταγενέστερη μεταλλαγή δημιουργούν λευχαιμικά βλαστοκύτταρα (LSC). Το LSC με τη σειρά του προκαλεί την πλειοψηφία των κακοηθών κυττάρων που εντοπίζονται στη πληθυσμιακή λευχαιμία (βλάστες). Τρία πιθανά θεραπευτικά αποτελέσματα απεικονίζονται με τα βέλη πάνω από το διάγραμμα. Το μήκος κάθε βέλους δείχνει το βαθμό στον οποίο ένα συγκεκριμένο θεραπευτικό σχήμα μπορεί να επηρεάσει τις λευχαιμικές βλάστες, τα κύτταρα βλαστοκυττάρων / προγονικών κυττάρων ή τους τύπους προλευχαιμικών κυττάρων. (Jordan CT and Guzman ML, 2004)

1.3 Μυελοδυσπλαστικά Σύνδρομα (ΜΔΣ)

Τα Μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα (ΜΔΣ) είναι μια ομάδα κλωνικών ασθενειών αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων, που χαρακτηρίζονται από κυτταροπενία λόγω αυξημένου βαθμού απόπτωσης των αρχέγονων αυτών κυττάρων στο μυελό των οστών, δυσπλασία σε μία ή περισσότερες από τις σημαντικότερες μυελοειδείς καταβολές, αναποτελεσματική αιμοποίηση, επαναλαμβανόμενες γενετικές ανωμαλίες και αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης οξείας μυελογενούς λευχαιμίας (ΟΜΛ). (Vaediman, 2003; Cazzola and Malcovati, 2005)

Πρωτοπαθή (primary MDS, p-MDS) ή de novo, χαρακτηρίζονται τα ΜΔΣ που εμφανίζονται χωρίς γνωστό ιστορικό χημειοθεραπείας ή έκθεσης ακτινοβολίας. Περίπου το 10-15% των ΜΔΣ είναι επακόλουθο θεραπείας (t-MDS, treatment related MDS), όπως χημειοθεραπεία ή/και ακτινοβολία, τόσο για νεοπλασματικές, όσο και για καλοήθεις διαταραχές. (Valliersi et al., 1998; Godley and Larson, 2002)

Ενώ η αιτιολογική συσχέτιση της κυτταροτοξικής θεραπείας (χημειοθεραπεία /ακτινοθεραπεία) με την εκδήλωση ΜΔΣ έχει αναγνωριστεί, οι παράγοντες κινδύνου για την ανάπτυξη de novo ΜΔΣ, που αφορούν και την πλειονότητα των περιπτώσεων, δεν έχουν αποσαφηνιστεί. Οι πιθανές αιτιολογίες για πρωτοπαθές ΜΔΣ περιλαμβάνουν, έκθεση σε βενζένιο ή βενζόλιο, κάπνισμα (αποτελεί τη σημαντικότερη μη επαγγελματική πηγή έκθεσης σε βενζένιο), έκθεση σε γεωργικά χημικά ή διαλύτες και οικογενειακό ιστορικό αιματοποιητικών νεοπλασιών. Η κατανάλωση αλκοόλ έχει αμφιλεγόμενο ρόλο στα ΜΔΣ μιας και υπάρχουν μελέτες που δεν δείχνουν συσχέτιση σε αντίθεση με άλλες που δείχνουν ότι βάσει της ποσότητας και του είδους του ποτού το αλκοόλ μπορεί και να μειώνει τον κίνδυνο ανάπτυξης ΜΔΣ (Albin M. Et al., 2003). Το 1998 προτάθηκε ένα πιθανό μοντέλο ιογενούς προέλευσης των ΜΔΣ (Raza A. Et al., 1998), ωστόσο μέχρι σήμερα δεν υπάρχουν επαρκή δεδομένα που να ενισχύουν τη θεωρία της. Επίσης, οι βαφές των μαλλιών έχουν συσχετιστεί με την εκδήλωση ΜΔΣ σε γυναίκες, σε μια μικρή Ιαπωνική μελέτη, όμως σε ανασκόπηση σχετικών μελετών κάτι τέτοιο δεν επιβεβαιώθηκε. Τέλος, η διατροφή αν και έχει ενοχοποιηθεί για την ανάπτυξη διαφόρων τύπων καρκίνου, δεν έχει μελετηθεί σε σχέση με την ανάπτυξη ΜΔΣ. (Dalagama M. Et al., 2002)

Η κατηγορία των ΜΔΣ περιλαμβάνει διακριτούς υποτύπους, οι οποίοι ορίζονται από τον αριθμό των κυτταροπενιών κατά την παρουσίαση, τον αριθμό των μυελοειδών καταβολών που εκδηλώνουν δυσπλασία, την παρουσία των δαχτυλιοειδών σιδηροβλαστών και τα ποσοστά βλαστών στο αίμα και το μυελό των οστών.

Μόνο μία κυτταρογενετική ανωμαλία, del (5q), χρησιμοποιείται στον ορισμό ενός συγκεκριμένου υποτύπου ΜΔΣ. (World Health Organization, WHO 2017)

1.3.1 Μορφολογικά χαρακτηριστικά – Επιδημιολογία

Τα ΜΔΣ εμφανίζονται συνήθως σε ενήλικες μεγαλύτερης ηλικίας (μέση ηλικία ασθενούς: 70 έτη), με κυριαρχία του άρρενος φύλου. Η ετήσια συχνότητα εμφάνισης είναι 3-5 περιπτώσεις ανά 100000 στο γενικό πληθυσμό και είναι τουλάχιστον 20 περιπτώσεις ανά 100000 σε άτομα ηλικίας >70 ετών. Λόγω της ανεπαρκούς αναφοράς των ΜΔΣ στα περισσότερα μητρώα καρκίνου, η πραγματική ετήσια εμφάνιση σε ασθενείς ηλικίας >65 ετών μπορεί να είναι πλησιέστερη σε 75 περιπτώσεις ανά 100000. Περίπου 10000 νέα κρούσματα ΜΔΣ διαγιγνώσκονται ετησίως στις ΗΠΑ, σύμφωνα με τα στοιχεία του 2003- 2004 από το Πρόγραμμα Επιτήρησης, Επιδημιολογίας & Τελικών Αποτελεσμάτων -Surveillance, Epidemiology & End Result Program (SEER) και την Αμερικάνικη Ένωση Κεντρικών Μητρώων Καρκίνου – North American Association of Central Cancer Registries (NAACCR). Σε αντιπαράθεση, εκτιμήσεις που βασίζονται σε ιατρικές ανάγκες για την ίδια χρονική περίοδο δείχνουν περίπου 45.000 περιπτώσεις ετησίως που διαγνώστηκαν σε άτομα ηλικίας > 65 ετών.

Τα ΜΔΣ παιδικής ηλικίας είναι σπάνια και έχουν μοναδικά χαρακτηριστικά και διαγνωστικά κριτήρια που διαφέρουν από αυτά των ΜΔΣ στους ενήλικες.

Το μορφολογικό χαρακτηριστικό των ΜΔΣ είναι η δυσπλασία σε μία ή περισσότερες μυελοειδείς καταβολές. Η δυσπλασία μπορεί να συνοδεύεται από αύξηση των μυελοβλαστών στο περιφερικό αίμα ή/και στο μυελό των οστών, αλλά το ποσοστό των βλαστών είναι πάντοτε <20%, που είναι το απαιτούμενο όριο που συνιστάται για τη διάγνωση της Οξείας Μυελογενούς Λευχαιμίας (ΟΜΛ). Είναι σημαντικό να αναγνωριστεί ότι το όριο των βλαστών, 20%, που διακρίνει την ΟΜΛ από τα ΜΔΣ, δεν αντιπροσωπεύει τη θεραπευτική εντολή για τη αντιμετώπιση περιπτώσεων με βλάβες ≤20%, ως ΟΜΛ. Επανεμφανιζόμενες κυτταρογενετικές ανωμαλίες υπάρχουν στο 40-50% των περιπτώσεων, ενώ στη συντριπτική πλειοψηφία των περιπτώσεων, κατά τη διάγνωση, παρατηρούνται αποκτηθείσες σωματικές γονιδιακές μεταλλάξεις.

Στα ΜΔΣ, η αρχική βλάβη επισυμβαίνει στο επίπεδο του αρχέγονου αιμοποιητικού κυττάρου, το οποίο αποκτά «πλεονέκτημα ανάπτυξης» σε σχέση με τα υπόλοιπα κύτταρα, με αποτέλεσμα τη δημιουργία κλώνου παθολογικών κυττάρων και κλωνικής αιμοποίησης. Μελέτες κινητικής του κυτταρικού κύκλου σε προγονικά αιμοποιητικά κύτταρα ασθενών με ΜΔΣ έδειξαν αυξημένη δραστηριότητα πολλαπλασιασμού και μεγαλύτερο ποσοστό κυττάρων στην S-φάση, από ότι αντίστοιχα κύτταρα φυσιολογικών ατόμων. Η απόπτωση των αιμοποιητικών κυττάρων εντός του μυελικού περιβάλλοντος αποτελεί τη βασική ερμηνεία αυτής της παραδοξότητας και το κύριο βιολογικό χαρακτηριστικό, που συναντάται σε ποικίλο βαθμό στις διάφορες κατηγορίες των ΜΔΣ, ενώ παράλληλα οριοθετεί τα φυσιολογικά, δυσπλαστικά και λευχαιμικά κύτταρα, δίνοντας για πρώτη φορά μια ιδιαίτερη υπόσταση στα ΜΔΣ από βιολογική άποψη. Έτσι, η έναρξη της νόσου σχετίζεται με απορύθμιση διαφορετικών ενδοκυττάρων μεταβολικών οδών (pathways), ορισμένοι από τις οποίες ακόμα διερευνώνται ή παραμένουν άγνωστοι. Ως πιθανοί παθογενετικοί μηχανισμοί θεωρούνται μεταλλάξεις σε λειτουργικές περιοχές πρωτο-ογκογονιδίων, διαταραχές στη λειτουργία των μιτοχονδρίων και στο μικροπεριβάλλον του μυελού και απορρύθμιση του μηχανισμού της απόπτωσης (Corey SJ et al., 2007). Σε μοριακό επίπεδο πλήθος γονιδίων, όπως τα CDKN2B, TET2, EVI1, NRAS, TP53 και FLT3 παρουσιάζουν τροποποιημένη λειτουργία, λόγω μεταλλάξεων ή ελλείψεων στις δομικές τους περιοχές ή μεθυλίωσης του υποκινητή τους. Καθεμιά από τις παραπάνω μεταβολές στο ένα αλληλόμορφο μπορεί να συνοδεύεται από επιγενετική μεταβολή στο άλλο και έτσι να επηρεάζεται καθοριστικά η έκφραση ογκοκατασταλτικών γονιδίων (Kundson AG, 1996).

Ο πίνακας 1 συνοψίζει τα βιολογικά φαινόμενα που διαπιστώνονται στα ΜΔΣ. Έχει προταθεί ότι η γενεσιουργός βλάβη που συμβαίνει στο αρχέγονο κύτταρο, του προσδίδει πλεονέκτημα ανάπτυξης (Raza A et al., 1996). Συνοπτικά φαίνεται ότι αρχέγονα αιμοποιητικά κύτταρα του μυελού ασθενών με ΜΔΣ, αποκτούν για άγνωστο λόγο πλεονέκτημα ανάπτυξης, με αποτέλεσμα την κλωνική ανάπτυξη και επικράτηση. Θυγατρικά κύτταρα αυτού του κλώνου χαρακτηρίζονται από αυξημένη ευαισθησία στον κυτταρικό θάνατο υπό την επίδραση προ-φλεγμονωδών κυτταροκινών.

Πίνακας 1. Βιολογικά φαινόμενα που παρατηρούνται στα ΜΔΣ.(Parcharidou A. et al.,2011)

- Κλωνική αιμοποίηση
- Διαταραγμένος κυτταρικός πολλαπλασιασμός – Απόπτωση
- Διαταραχές της μιτοχονδριακής λειτουργίας
- Παθολογικοί ανοσολογικοί μηχανισμοί / ανοσολογικές διαταραχές
- Παθολογικό profile κυτταροκινών στον μυελό
- Διαταραχή της αγγειογένεσης του μυελού
- Ποικίλες γενετικές βλάβες
- Επιγενετικές βλάβες

1.3.2 Κλινικά χαρακτηριστικά

Η πλειοψηφία των ασθενών παρουσιάζει συμπτώματα που σχετίζονται με την κυτταροπενία. Οι περισσότεροι ασθενείς είναι αναιμικοί, ενώ η ουδετεροπενία ή/και η θρομβοπενία είναι λιγότερο συχνές. Περίπου το ένα τρίτο των ασθενών εξαρτώνται από τις μεταγγίσεις ερυθρών αιμοσφαιρίων κατά η διάγνωση.(Greenberg et al., 2012; Marinier DE et al., 2011) Σπάνια παρατηρείται οργανομεγαλία. Η μορφολογική ταξινόμηση των ΜΔΣ βασίζεται κυρίως στο ποσοστό των βλαστών στον μυελό των οστών και στο περιφερικό αίμα, στον τύπο και στον βαθμό της δυσπλασίας και στο ποσοστό των δαχτυλιοειδών σιδηροβλαστών. Οι μυελοειδείς καταβολές που επηρεάζονται από τις κυτταροπενίες δεν είναι πάντα και εκείνες που εκδηλώνουν δυσπλασία.(Germing U et al., 2012; Maassen A et al., 2013; Verburch E et al., 2007) Ο μυελός των οστών στα ΜΔΣ είναι συνήθως υπερκυτταρικός και λιγότερο συχνά νορμοκυτταρικός ή υποκυτταρικός για την ηλικία. Οι κυτταροπενίες προέρχονται από την αναποτελεσματική αιμοποίηση παρά την τυπικά αυξημένη κυτταρικότητα. Ανεξήγητη, επίμονη κυτταροπενία, απουσία δυσπλασίας, δεν θα πρέπει να ερμηνεύεται ως ΜΔΣ εκτός εάν υπάρχουν συγκεκριμένες κυτταρογενετικές ανωμαλίες.

1.3.3 Υπότυποι

Η γενική κατηγορία των ΜΔΣ περιλαμβάνει κάποιους ευδιάκριτους υπότυπους, οι οποίοι ορίζονται με βάση των αριθμό των κυτταροπενιών κατά την εμφάνιση, των αριθμό των μυελοειδών καταβολών που εμφανίζουν δυσπλασία, την παρουσία ή όχι δακτυλιοειδών σιδηροβλαστών και το ποσοστό των βλαστών στο περιφερικό αίμα ή στον μυελό. (WHO - WHO Classification-based Prognostic Scoring System (WPSS), 2017; Revised-International Prognostic Scoring System (IPSS-R), 2012)

ΜΔΣ με δυσπλασία μιας μυελοειδούς καταβολής (MDS-Single Lineage Dysplasia, MDS-SLD)

Η κατηγορία αυτή περιλαμβάνει τις περιπτώσεις ΜΔΣ που παρουσιάζουν ανεξήγητη κυτταροπενία ή δυ-κυτταροπενία, με $\geq 10\%$ δυσπλαστικά κύτταρα σε μία μυελοειδή καταβολή. Οι ανωμαλίες που γενικά συσχετίζονται με τα MDS-SLD περιλαμβάνουν το del(20q), το άνω του φυσιολογικού υλικού χρωμοσώματος 8 και τις ανωμαλίες του χρωμοσώματος 5 και 7.

ΜΔΣ με δυσπλασία πολλαπλών μυελοειδών καταβολών (MDS-Multiple Lineage Dysplasia, MDS-MLD)

Είναι τα ΜΔΣ που χαρακτηρίζονται από μία ή περισσότερες κυτταροπενίες και δυσπλαστικές μεταβολές σε δύο ή περισσότερες μυελοειδείς καταβολές (ερυθροειδής, κοκκιοκυτταρική και μεγακαρυοκυτταρική). Οι κλωνικές κυτταρογενετικές ανωμαλίες, συμπεριλαμβανομένης της τρισωμίας 8, της μονοσωμίας 7, της del(7q), της del(5q) ή της t(5q) και της del(20q), καθώς και των πολύπλοκων καρυότυπων εμφανίζονται σε ποσοστό 50% στα MDS-MLD.

ΜΔΣ με δακτυλιοειδείς σιδηροβλάστες (MDS-Ring Sideroblasts, MDS-RS)

Σ' αυτή τη κατηγορία είναι τα ΜΔΣ που χαρακτηρίζονται από κυτταροπενία, μορφολογική δυσπλασία και δακτυλιοειδείς σιδηροβλάστες που συνιστούν συνήθως $\geq 15\%$ των πρόδρομων ερυθροειδών του μυελού των οστών. Κυτταρογενετικές ανωμαλίες παρατηρούνται στις μισές περίπου περιπτώσεις MDS-RS-MLD και συχνότερα περιλαμβάνουν ανωμαλίες υψηλού κινδύνου όπως είναι η απώλεια χρωμοσώματος 7.

ΜΔΣ με περίσσεια βλαστών (MDS-Excess Blasts, MDS-EB)

Με αυτόν τον όρο περιγράφονται τα ΜΔΣ που χαρακτηρίζονται από 5-19% μυελοβλάστες στον μυελό των οστών ή 2-19% βλάστες στο περιφερικό αίμα (αλλά $<20\%$ βλάστες τόσο στο μυελό των οστών όσο και στο αίμα).

Τα MDS-EB έχουν δύο υποκατηγορίες, με διαφορές στην επιβίωση και την πιθανότητα εξέλιξης σε ΟΜΛ.

- Τα MDS-EB1, ορίζονται από 5-9% βλάστες στον μυελό των οστών ή 2-4% βλάστες στο περιφερικό αίμα (αλλά <10% βλάστες στον μυελό των οστών και <5% βλάστες στο αίμα), ενώ
- Τα MDS-EB2, ορίζονται από 10-19% βλάστες στον μυελό των οστών ή 5-19% βλάστες στο περιφερικό αίμα. Η παρουσία των ράβδων Auer σε βλάστες ορίζει οποιαδήποτε περίπτωση ΜΔΣ ως ΜΔΣ-EB2, ανεξάρτητα από το ποσοστό των βλαστών.

Ένα μεταβλητό ποσοστό (30-50%) των περιπτώσεων ΜΔΣ-EB έχει κλωνικές κυτταρογενετικές ανωμαλίες, συμπεριλαμβανομένης της εμφάνισης πλεονάζοντος χρωμοσώματος 8, del(5q) ή t(5q), απώλεια χρωμοσώματος 7, del(7q) καθώς και σε σύνθετους καρυότυπους σε ορισμένες περιπτώσεις.

ΜΔΣ με μεμονωμένο del(5q)

Είναι ο μόνος υπότυπος ΜΔΣ που ορίζεται από κυτταρογενετική ανωμαλία. Χαρακτηρίζονται από αναιμία (με ή χωρίς άλλες κυτταροπενίες ή/και θρομβοκυττάρωση) και στην οποία η κυτταρογενετική ανωμαλία εμφανίζεται είτε μεμονωμένα είτε με μία άλλη κυτταρογενετική ανωμαλία, εκτός της μονοσωμίας 7 ή της del(7q). Η οριοθετημένη κυτταρογενετική ανωμαλία συμπεριλαμβάνει μια ενδιάμεση έλλειψη και τα σημεία τομής ποικίλλουν, αλλά οι ζώνες q31-q33 διαγράφονται πάντοτε.

Μη ταξινομημένα ΜΔΣ (MDS-Unclassifiable, MDS-U)

Τα μη ταξινομημένα ΜΔΣ περιλαμβάνουν τις περιπτώσεις των ΜΔΣ που αρχικά δεν έχουν τα κατάλληλα ευρήματα για ταξινόμηση σε οποιαδήποτε άλλη κατηγορία ΜΔΣ.

ΜΔΣ παιδικής ηλικίας

Η εμφάνιση ΜΔΣ στην παιδική ηλικία είναι πολύ ασυνήθιστη, αντιπροσωπεύοντας <5% όλων των αιματοποιητικών νεοπλασμάτων σε ασθενείς ηλικίας μικρότερης των 14 ετών. Μερικές περιπτώσεις ΜΔΣ σε παιδιά είναι δευτεροπαθείς, μετά από κυτταροτοξική θεραπεία, κληρονομικές διαταραχές μυελού των οστών ή αποκτηθείσα σοβαρή απλαστική αναιμία. Ορισμένες περιπτώσεις δεν ταιριάζουν εύκολα στις τυπικές κατηγορίες ΜΔΣ χαμηλότερης βαθμίδας και αντιμετωπίζονται ως μία ανθεκτική μορφή κυτταροπενίας της παιδικής ηλικίας (Refractory Cytopenia of Childhood-RCC). Η μονοσωμία 7 είναι η συνηθέστερη κυτταρογενετική ανωμαλία στο RCC.

Υπότυποι που δεν περιλαμβάνονται στο IPSS-R και WPSS

Σημαντικός αριθμός ασθενών με ΜΔΣ εμφανίζει χαρακτηριστικά μυελοπαραγωγού νοσήματος, όπως άλλωστε αναγνωρίζεται και από την πρόσφατη WHO ταξινόμηση. Παρ' όλ' αυτά, τόσο το IPSS-R όσο και το WPSS δεν περιλαμβάνουν καμία από αυτές τις οντότητες, για τις οποίες δεν υπάρχουν δεδομένα επιβίωσης, με εξαίρεση την ανθεκτική αναιμία με δακτυλιοειδείς σιδηροβλάστες και θρομβοκυττάρωση (RARS-T) που έχει γενικά καλή πρόγνωση (Atallah E. Et al., 2008). Ένας ακόμη χαρακτηριστικός υπότυπος είναι το υποπλαστικό ΜΔΣ, μία οντότητα συχνά και όχι απολύτως αδικαιολόγητα συγγεόμενη με την ιδιοπαθή απλαστική αναιμία. Η πρόγνωση των ασθενών με υποπλαστικό ΜΔΣ είναι πιθανώς καλύτερη από αυτή των λοιπών ΜΔΣ χαμηλού κινδύνου κατά IPSS (Huang TC. et al., 2008). Τέλος, δύο ακόμη υπότυποι που δεν περιλαμβάνονται πλήρως στο IPSS-R και καθόλου στο WPSS, αλλά είναι συχνοί, αντιμετωπίζονται όπως τα άλλα ΜΔΣ και αποτελούν σοβαρό πρόβλημα στην κλινική πράξη, είναι τα δευτεροπαθή ΜΔΣ που αναφέρθηκαν ήδη και η ΧΜΜΛ, στην οποία η τρισωμία 8 φαίνεται να φέρει δυσμενή πρόγνωση, αντίθετα με τα λοιπά ΜΔΣ. (Such E et al., 2011)

Οι υπότυποι των ΜΔΣ μπορούν γενικά να ταξινομηθούν σε τρεις ομάδες κινδύνου βάσει το χρόνου επιβίωσης και την περίπτωση εξέλιξης σε ΟΜΛ.

- Η ομάδα χαμηλού κινδύνου περιέχει ΜΔΣ με δυσπλασία μιας μυελοειδούς καταβολής, ΜΔΣ με δακτυλιοειδείς σιδηροβλάστες και δυσπλασία μιας καταβολής και ΜΔΣ με μεμονωμένο del(5q).
- Η ενδιάμεση ομάδα κινδύνου περιέχει ΜΔΣ με δυσπλασία πολλαπλών μυελοειδών καταβολών και ΜΔΣ με δακτυλιοειδείς σιδηροβλάστες και δυσπλασία πολλαπλών καταβολών.
- Η ομάδα υψηλού κινδύνου αποτελείται από ΜΔΣ με περίσσεια βλαστών.

1.3.4 Κυτταρογενετική διαγνωστική προσέγγιση

Ο καρυότυπος με την κατάδειξη χρωμοσωμικών ανωμαλιών εισήχθη για πρώτη φορά σε προγνωστικό σύστημα το 1993 και από το 1997 αποτελεί ένα από τα τρία στοιχεία που συνθέτουν το διεθνές προγνωστικό σύστημα IPSS. (Greenberg P et al., 1997) Η προγνωστική βαρύτητα του καρυότυπου στα ΜΔΣ κατέστησε τη διενέργειά του απαραίτητη. Το σύστημα IPSS αναθεωρήθηκε πρόσφατα (IPSS-R), αναγνωρίζοντας μεγαλύτερη προγνωστική βαρύτητα στην κυτταρογενετική ανάλυση και δευτερευόντως στον αριθμό των βλαστών, ιδιαίτερα ως προς την εκτροπή σε ΟΜΛ. Επιπλέον, λαμβάνει υπόψη ευρύτερο φάσμα κυτταρογενετικών αλλοιώσεων, π.χ. τις διπλές αλλοιώσεις και τον αριθμό των αλλοιώσεων (<3 vs ≥3) στα πλαίσια σύνθετου καρυότυπου (Πίνακες 2 και 3).(Greenberg P et al., 2011)

Πίνακας 2. IPSS-R Κυτταρογενετικές ομάδες κινδύνου (Schanz J et al, J Clin Oncology 2012; Greenberg et al., 2012)

Κυτταρογενετικές προγνωστικές υποομάδες	Κυτταρογενετικές ανωμαλίες	Μέση επιβίωση (χρόνια)
Very good	-Y, del(11q)	5,4
Good	Normal, del(5q), del(12p), del(20q), double including del(5q)	4,8
Intermediate	del(7q) , +8, +19, i(17q), any other single or double independent clones	2,7
Poor	-7 , inv(3)/t(3q)/del(3q), double including -7/del(7q) , Complex: >3 abnormalities	1,5
Very poor	Complex: >3 abnormalities	0,7

Πίνακας 3. IPSS-R Προγνωστικά σκορ. (Greenberg et al., 2012)

Prognostic variable	0	0.5	1	1.5	2	3	4
Cytogenetics	Very Good		Good		Intermediate	Poor	Very Poor
BM Blast (%)	≤2		>2&<5		5-10	>10	
Hemoglobin	≥10		8&<10	<8			
Platelets	≥100	50-<100	<50				
ANC	≥0.8	<0.8					
<p>Βάσει των σκορ των παραπάνω παραμέτρων, έχουν περιγραφεί πέντε κατηγορίες επικινδυνότητας:</p> <p>Very low: ≤1.5 Low: >1.5 & <3 Intermediate: >3 & <4.5 High: >4.5 & <6 Very high: >6</p>							

Πίνακας 4. IPSS-R προγνωστικές κατηγορίες κινδύνου με κλινικά αποτελέσματα. (Greenberg et al., 2012)

	No. of patients	Very Low	Low	Intermediate	High	Very High
Patients (%)	7012	19%	38%	20%	13%	10%
Survival (years)		8.8	5.3	3.0	1.6	0.8

Οι κυτταρογενετικές αναλύσεις διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο την αξιολόγηση των ασθενών με ΜΔΣ σε σχέση με την πρόγνωση, τον προσδιορισμό της κλωνοποίησης και την αναγνώριση κυτταρογενετικών συσχετίσεων με μορφολογικά και κλινικά χαρακτηριστικά, την μέση επιβίωση αλλά και τον κίνδυνο εξέλιξης σε ΟΜΛ. Μεταξύ των λίγων ανεξάρτητων μεταβλητών που έχουν εντοπιστεί που προβλέπουν κλινική εξέλιξη σε ΜΔΣ, τα κυτταρογενετικά ευρήματα αποτελούν τον ακρογωνιαίο λίθο των επιτυχημένων προγνωστικών συστημάτων βαθμολόγησης. Κατά τη διάγνωση, ανακαλύπτονται χρωμοσωματικές ανωμαλίες σε 40-70% των ασθενών με πρωτογενή ΜΔΣ και σε 95% των ασθενών με t-MDS (WHO, 2017), επιβεβαιώνοντας την παρουσία νεοπλασματικής διαδικασίας. Επαναλαμβανόμενες κυτταρογενετικές ανωμαλίες που εντοπίζονται με συμβατικό καρυότυπο, υπάρχουν σε περίπου 50% των περιπτώσεων ΜΔΣ. Αυτά τα ευρήματα δεν είναι αποκλειστικά για τα ΜΔΣ καθώς μπορεί επίσης να εμφανιστούν και στην ΟΜΛ.

Οι περισσότερες επαναλαμβανόμενες κυτταρογενετικές ανωμαλίες που απαντώνται σε ΜΔΣ δεν είναι ισοζυγισμένες, συνηθέστερα ως το αποτέλεσμα της απώλειας ολόκληρου χρωμοσώματος ή έλλειψης ενός τμήματος ενός χρωμοσώματος. Μη ισορροπημένες μετατοπίσεις και πιο περίπλοκα παράγωγα - αναδιαμορφωμένα χρωμοσώματα είναι επίσης πιθανό να βρεθούν.

Οι πιο συνηθισμένες κυτταρογενετικές ανωμαλίες που απαντώνται στα ΜΔΣ είναι οι del(5q), -7 και +8, οι οποίες έχουν ενσωματωθεί στα πιο ισχυρά προγνωστικά συστήματα ταξινόμησης των ΜΔΣ. Οι κλώνοι με μη συγγενείς ανωμαλίες, ένας εκ των οποίων τυπικά έχει τρισωμία 8, εμφανίζονται με μεγαλύτερη συχνότητα (~5% έναντι ~1%) σε ασθενείς με ΜΔΣ σε σχέση με ΟΜΛ.

Η συχνότητά τους φαίνεται να παρουσιάζει εθνογεωγραφική ποικιλότητα. Στη χώρα μας η συχνότερη κυτταρογενετική αλλαγή στα ΜΔΣ φαίνεται να είναι η τρισωμία 8.(Stavroulou C et al., 2008)

Συγκεκριμένες κυτταρογενετικές ανωμαλίες, συμπεριλαμβανομένου του 5q-(Giagounidis et al., 2004), 17p- και idic(X) χρωμοσώματος (που σχετίζεται με MDS-RS), τυπικά σχετίζεται με μορφολογικά και κλινικά διακριτά υποσύνολα των ΜΔΣ. Σε σπάνιες περιπτώσεις έχουν αναφερθεί επαναλαμβανόμενες ισορροπημένες μετατοπίσεις. Ανωμαλίες χαρακτηριστικό της οξείας λευχαιμίας χωρίς προηγούμενη μυελοδυσπλαστική φάση, όπως t(15;17), inv(16) και t(8;21) είναι σπάνιες στα ΜΔΣ (Vardiman et al., 2009). Η t(9;22), διαγνωστική της χρόνιας μυελογενούς λευχαιμίας (ΧΜΛ) και ενός υποτύπου οξείας λεμφοβλαστικής λευχαιμίας (ΟΛΛ), είναι εξαιρετικά σπάνια στα ΜΔΣ.

Η σημασία των κυτταρογενετικών χαρακτηριστικών ως προγνωστικών δεικτών στα ΜΔΣ κωδικοποιήθηκε από το Διεθνές Εργαστήριο Ανάλυσης Κινδύνου ΜΔΣ (International MDS Risk Analysis Workshop) το 1997 και ενημερώθηκε το 2012. Το τρέχον Ολοκληρωμένο Κυτταρογενετικό Σύστημα Βαθμολόγησης (Comprehensive Cytogenetic Scoring System-CCSS) για τα ΜΔΣ περιέχει πέντε προγνωστικές υποομάδες.

Το αναθεωρημένο IPSS-R ενσωματώνει το ποσοστό των βλαστών μυελού των οστών, την ομάδα κυτταρογενετικού κινδύνου CCSS και τον βαθμό κυτταροπενίας σε κάθε σειρά για να προβλέψει την επιβίωση και τον κίνδυνο εξέλιξης σε ΟΜΛ.

Η συχνότητα των κυτταρογενετικών ανωμαλιών αυξάνεται με τη σοβαρότητα της νόσου, όπως και ο κίνδυνος του λευχαιμικού μετασχηματισμού. Οι ανωμαλίες των κλωνικών χρωμοσωμάτων μπορούν να ανιχνευθούν σε κύτταρα μυελού στο 25% των ασθενών με ΜΔΣ, 10% των ασθενών με MDS-RS, 50% των ασθενών με MDS-MLD, 50-70% των ασθενών με MDS-EB(1,2) και φυσικά 100% των ασθενών με ΜΔΣ με del(5q), σαν μοναδική αλλοίωση.

Η κυτταρογενετική ανάλυση είναι χρήσιμη για τον προσδιορισμό της κλωνικότητας των συνδρόμων αυτών καθώς και για την παροχή πληροφοριών για την παθοβιολογία τους.

1.3.4.1 Κυτταρογενετικά ευρήματα

Η παθογένεση και η εξέλιξη των ΜΔΣ οδηγούνται από πολλαπλές, συνεργαζόμενες, σωματικά αποκτημένες γενετικές ανωμαλίες που περιλαμβάνουν χρωμοσωματικές ανωμαλίες καθώς και γονιδιακές μεταλλάξεις, η ποικιλομορφία των οποίων οδηγεί στην κλινική και μορφολογική ετερογένεια που χαρακτηρίζει αυτή τη νόσο.

Πίνακας 5. Επανεμφανιζόμενες χρωμοσωματικές ανωμαλίες στα ΜΔΣ. (WHO 2017)

ΤΥΠΟΣ ΜΔΣ	ΧΡΩΜΟΣΩΜΙΚΗ ΑΝΩΜΑΛΙΑ	ΣΥΧΝΟΤΗΤΑ (%)	ΣΧΕΤΙΖΟΜΕΝΑ ΓΟΝΙΔΙΑ	ΕΠΙΠΤΩΣΕΙΣ
MDS	Unbalanced			
	+8	10		
	-7/del(7q)	10		
	del(5q)/t(5q)	10		
	del(20q)	5-8		
	-Y	5		
	i(17q)/t(17p)	3-5	TP53	Loss of function, DNA damage response
	-13/del(13q)	3		
	del(11q)	3		
	del(12p)/t(12p)	3		
del(9q)	1-2			
idic(X)(q13)	1-2			
Balanced				
t(1;3)(p36.3;q21.3)	1	MMEL1, RPN1	Deregulation of MMEL1-transcriptional activation.	
t(2;11)(p21 ;q23.3)/t(11q23.3)	1	KMT2A/MLL	KMT2A fusion protein-altered transcriptional regulation.	
inv(3)(q21.3;q26.2)/t(3;3)(q21.3;q26.2)	1	RPN1, MECOM/EV11	Increased expression and altered transcriptional regulation by MECOM.	
t(6;9)(p22.3;q34.1)	1	DEK, NUP214	Fusion protein-nuclear pore protein.	
t-MDS	-7/del(7q)	50		
	del(5q)/t(5q)	40-45		
	dic(5;17)(q11.1-13.3;p11.1-13)	5	TP53	Loss of function, DNA damage response
	der(1;7)(q10;p10)	3		
	t(3;21)(q26.2;q22.1)	3	MECOM, RUNX1	MECOM-RUNX1 fusion gene leading to loss of RUNX1 and overexpression of MECOM/ altered transcriptional regulation
Ως μοναδική κυτταρογενετική ανωμαλία, χωρίς μορφολογικά κριτήρια, οι τρισωμία 8, del(20q) και η έλλειψη του Y, δεν θεωρούνται απόλυτη απόδειξη ύπαρξης ΜΔΣ. Στην περίπτωση επίμονων κυτταροπενιών άγνωστης αιτίας οι υπόλοιπες ανωμαλίες που παρατίθενται μπορούν να θεωρηθούν πιθανές αποδείξεις ΜΔΣ ακόμα και με απουσία μορφολογικών χαρακτηριστικών που θα επιβεβαίωναν την διάγνωση.				

1.3.4.1.1 Φυσιολογικός καρυότυπος (46,XX/46,XY)

Ένα 50-60% των ασθενών με ΜΔΣ έχουν φυσιολογικό καρυότυπο. Αυτό το υποσύνολο είναι σχεδόν σίγουρα γενετικά ετερογενές, συμπεριλαμβανομένων πολλών περιπτώσεων όπου οι τεχνικοί παράγοντες απέκλεισαν την ανίχνευση χρωμοσωματικά ανώμαλων κυττάρων ή όπου οι λευχαιμικές αλλοιώσεις εμφανίστηκαν σε μοριακό επίπεδο και έτσι δεν ήταν ανιχνεύσιμες με πρότυπες κυτταρογενετικές μεθόδους. Για παράδειγμα, οι μεταλλάξεις TET2 είναι πιο συχνές σε ασθενείς με φυσιολογικό καρυότυπο. Παρά την ετερογένεια αυτή, οι συνήθεις περιπτώσεις αποτελούν πρότυπο αναφοράς για τη σύγκριση των αποτελεσμάτων και εμπίπτουν στην ομάδα χαμηλού κινδύνου IPSS-R. Η μέση επιβίωση για αυτούς τους ασθενείς σε 4,8 έτη και ο χρόνος έως την εξέλιξη σε ΟΜΛ του 25% αυτής της ομάδας ήταν 9,4 έτη. (Greenberg et al., 2012; Schanz et al., 2012)

1.3.4.1.2 Απώλεια του φυλετικού χρωμοσώματος Y (-Y)

Η κλινική και βιολογική σημασία της απώλειας του χρωμοσώματος Y(-Y), είναι άγνωστη. Η απώλεια του Y έχει παρατηρηθεί σε έναν αριθμό κακοήθων ασθενειών αλλά έχει επίσης αναφερθεί ότι σχετίζεται και με τη γήρανση.(Wong AK et al., 2008) Περιεκτικότερη ανάλυση αυτής της ανωμαλίας, έδειξε ότι η -Y θα μπορούσε να προσδιοριστεί στο 7,7% των ασθενών χωρίς αιματολογική κακοήθεια και στο 10,7% των ασθενών με ΜΔΣ και συνεπώς δεν ήταν αξιόπιστη στην τεκμηρίωση μιας κακοήθους διεργασίας (UK Cancer Cytogenetics Group-UKCCG, 1992). Ωστόσο, η απώλεια Y σε μεγάλο ποσοστό μεταφάσεων (>75%) φαίνεται να στοιχειοθετεί με ακρίβεια κακοήθη αιματολογική νόσο. Επιπλέον αποτελεί κλωνικό δείκτη, αφού το ποσοστό των κυττάρων με -Y μπορεί να μειωθεί ή να μηδενιστεί μετά από θεραπεία. (Wiktor A et al,2000) Αν και η απώλεια του χρωμοσώματος Y μπορεί να μην είναι διαγνωστική των ΜΔΣ, όταν η ασθένεια εντοπιστεί με κλινικά και παθολογικά μέσα, το IPSS-R διαπίστωσε ότι η -Y ως μοναδική ανωμαλία απέδωσε μια πολύ καλή πρόγνωση με μέση επιβίωση 5,4 ετών. (Greenberg et al., 2012)

1.3.4.1.3 Τρισωμία χρωμοσώματος 8 (+8)

Η συχνότητα της τρισωμίας 8 (+8) στα ΜΔΣ είναι 19% σε ασθενείς με χρωμοσωματικές ανωμαλίες και 6% στο σύνολο των ασθενών με ΜΔΣ, με τους μισούς ασθενείς να έχουν +8 ως μοναδική ανωμαλία. Πρόκειται για την πιο συχνή μονήρη ανωμαλία τόσο στα ΜΔΣ όσο και στην ΟΜΛ. Αυτή η ανωμαλία παρατηρείται σε όλες τις υποομάδες ΜΔΣ που ποικίλλουν ανάλογα με την ηλικία, το φύλο (η συχνότητά της είναι μεγαλύτερη στους άνδρες και φαίνεται να βαίνει αυξανόμενη με την ηλικία) και την προηγούμενη θεραπεία με κυτταροτοξικούς παράγοντες ή ακτινοβολία. (Schanz et al., 2012)

Παρά το ότι συνδέεται κυρίως με de novo MDS, το γεγονός ότι είναι η πιο συχνή δευτερογενής αλλοίωση κατά την εξέλιξη του κυτταρογενετικά αλλοιωμένου κλώνου, συνηγορεί υπέρ του δευτερογενούς χαρακτήρα της +8 στην ογκογένεση. Επιδημιολογικά δεδομένα που δείχνουν ποικιλότητα της συχνότητας της αλλοίωσης όσον αφορά το γένος, την ηλικία και την εθνογεωγραφία, υποδεικνύουν το ρόλο ενδογενών (γενετικών) και/ή εξωγενών (περιβαλλοντικών) παραγόντων στην προέλευση και το σχηματισμό της +8.(Paulsson K et al.,2001)

Η αξιολόγηση της σπουδαιότητας της τρισωμίας 8 έγινε πολύπλοκη μετά τη διαπίστωση ότι η +8 συχνά σχετίζεται με άλλες επαναλαμβανόμενες ανωμαλίες που είναι γνωστές ότι έχουν προγνωστική σημασία, για παράδειγμα $del(5q)$, $-7/del(7q)$, ή μπορεί να παρατηρηθεί μόνη της ως ξεχωριστός κλώνος που δεν σχετίζεται με τον πρωτεύοντα κλώνο σε ποσοστό έως 5% των περιπτώσεων. Συγκαταλέγεται στην ομάδα ενδιάμεσης πρόγνωσης σύμφωνα με την ταξινόμηση IPSS-R, αν και έχει δείχθει ότι ασθενείς με +8 ως μοναδική αλλοίωση έχουν χειρότερη κλινική πορεία απ' ό,τι αναμενόταν για μια ενδιάμεσου κινδύνου ομάδα ασθενών. (Solé F et al, 2005, Haase D et al., 2007) Το πλεόνασμα χρωμοσώματος 8 είναι ένα από τα λίγα παραδείγματα ενίσχυσης γονιδίου στα ΜΔΣ και οδηγεί σε υψηλότερα επίπεδα έκφρασης για πολλά γονίδια στο χρωμόσωμα 8, συμπεριλαμβανομένου του MYC και ορισμένων αντιαποπτωτικών γονιδίων.

1.3.4.1.4 Έλλειψη του μακρύ βραχίονα (q) του χρωμοσώματος 5 [$del(5q)$]

Το σύνδρομο 5q-, που αναγνωρίζεται ως μία διακριτή κλινική οντότητα από την αναθεωρημένη ταξινόμηση WHO (Tefferi A et al., 2009), αντιπροσωπεύει συγκεκριμένο αιματολογικό φαινότυπο και χαρακτηρίζεται από έλλειψη στο 5q ως μοναδική ανωμαλία στον καρυότυπο. Επομένως, τα ΜΔΣ με μεμονωμένο $del(5q)$, δηλαδή είτε με $del(5q)$ μόνο, είτε με μία επιπλέον ανωμαλία -εκτός από την απώλεια του χρωμοσώματος 7 ή $del(7q)$ -, αποτελούν έναν ειδικό υπότυπο ΜΔΣ.

Εμφανίζεται συχνότερα στις γυναίκες και χαρακτηρίζεται από μεγακαρυοκύτταρα με καθόλου ή λίγους λοβούς στους πυρήνες, μακροκυτταρική αναιμία, φυσιολογικό ή αυξημένο αριθμό αιμοπεταλίων και ευνοϊκή κλινική πορεία. (WHO, 2017) Στα ΜΔΣ ή στην ΟΜΛ που προκύπτουν de novo, παρατηρούνται αναδιατάξεις που οδηγούν σε απώλεια του μακρύ βραχίονα (q) του χρωμοσώματος 5 στο 10-20% των ασθενών, ενώ στα t-MDS εντοπίζεται στο 40% των ασθενών. (Smith et al., 2003) Στην τελευταία περίπτωση απαντώνται συνήθως σε συνδυασμό με άλλες χρωμοσωματικές ανωμαλίες στα πλαίσια ενός σύνθετου καρυοτύπου, οπότε υποδηλώνεται κακή πρόγνωση με ανθεκτικότητα στη θεραπεία και ταχεία εξέλιξη σε οξεία λευχαιμία. (Vallespi T et al., 1998) Παρόλο που μια ενδιάμεση έλλειψη, $del(5q)$, είναι πιο συνηθισμένη, συμβαίνουν και άλλες ανακατατάξεις, όπως μη ισοζυγισμένες μετατοπίσεις. Πρόσφατες μελέτες που χρησιμοποιούν μεθόδους FISH και συστοιχίες έχουν αποκαλύψει ότι δεν συμβαίνει στην πραγματικότητα -5, καθόσον έχουν εντοπίσει την παρουσία αλληλουχιών χρωμοσώματος 5 σε χρωμοσώματα δείκτες ή σε άλλα αναδιαταχθέντα χρωμοσώματα. Οι ελλείψεις στο 5q παρουσιάζουν ετερογένεια, με την συχνά ελλείπουσα περιοχή (Commonly Deleted Region, CDR) να τοποθετείται μεταξύ των περιοχών 5q31 και 5q33.1. (Boulwood J et al., 2002)

Περίπου 18% των ασθενών με κλασικό σύνδρομο 5q- φέρουν μεταλλάξεις του γονιδίου TP53 οι οποίες ανιχνεύονται σε πρώιμα στάδια της νόσου και συνδέονται με χειρότερη πρόγνωση και εκτροπή σε ΟΜΛ. (Jadersten M et al., 2011) Ένας ανοσοδιαμορφωτικός παράγοντας, η λεναλιδομίδη, έχει μεταμορφώσει την κλινική προσέγγιση σε 5q- ασθενείς που χρειάζονται μετάγγιση. Η θεραπεία με αυτό το φάρμακο έχει ως αποτέλεσμα δραματική αιματολογική βελτίωση και μείωση ή εξάλειψη του κακοήθους κλώνου. (List et al., 2006)

1.3.4.1.5 Μονοσωμία 7 (-7) / Έλλειψη του μακρύ βραχίονα (q) του χρωμοσώματος 7 (del(7q))

Η μονοσωμία 7 απαντάται σε όλους τους υποτύπους, είναι όμως συνηθέστερη σε υψηλού κινδύνου ΜΔΣ, και συνοδεύεται από παρουσία μικρο-μεγακαρυοκυττάρων, δυσλειτουργία των ουδετερόφιλων και δυσπλασία και των τριών κυτταρικών σειρών. (Kalra et al., Blood 1995)

Η -7/del(7q) παρατηρείται ως μοναδική ανωμαλία στο ~ 5% των ενήλικων ασθενών με de novo MDS (Schanz et al., 2012) αλλά στο ~ 50% των παιδιών με ΜΔΣ (Kardos et al., 2003) και ~ 55% των ασθενών με t-MDS. (Smith et al., 2003) Στις αναγνωρισμένες διαταραχές που συνδέονται με την προδιάθεση για μυελογενή νεοπλάσματα, συμπεριλαμβανομένης της αναιμίας Fanconi, της νευροϊνωμάτωσης τύπου I και της σοβαρής συγγενούς ουδετεροπενίας, η -7/del(7q) είναι η πιο συχνή κυτταρογενετική ανωμαλία μυελού των οστών που ανιχνεύεται. (Kalra R et al., Blood 1995)

Όπως και με το del(5q), η έκθεση σε μεταλλαξιόγόνους παράγοντες, είτε επαγγελματικής φύσεως (βενζόλιο), είτε περιβαλλοντική (κάπνισμα) ή θεραπευτική (κυτταροτοξική θεραπεία), έχει συσχετιστεί με -7/del(7q). (Smith et al., 2003; Irons and Kerzic, 2014) Επίσης, όπως και στις περιπτώσεις ελλείψεων στο 5q, οι ελλείψεις στο 7q είναι ετερογενείς, με την περιοχή 7q22 να είναι η συχνότερα εμπλεκόμενη.

Το IPSS-R θεωρεί την del(7q) ως μοναδική ανωμαλία να έχει μια ενδιάμεση πρόγνωση (μέση συνολική επιβίωση (OS) 2,7 έτη), ενώ τη -7 μόνο ή -7/del(7q) με μία επιπλέον ανωμαλία ή ως μέρος ενός πολύπλοκου καρυότυπου με τρεις ανωμαλίες να έχει κακή πρόγνωση (διάμεσος OS 1,5 ετών) και οι -7/del(7q) ως συστατικό ενός σύνθετου καρυότυπου με >3 ανωμαλίες, πολύ κακή πρόγνωση (διάμεσος OS 0,7 έτη) (Greenberg et al., 2012).

Το σύνδρομο «μονοσωμία 7» στα μικρά παιδιά χαρακτηρίζεται από υπεροχή αρρένων (~4:1), ηπατοσφαινομία, λευκοκυττάρωση, θρομβοπενία και κακή πρόγνωση (Hasle and Niemeyer, 2011). Η νεανική μυελομονοκυτταρική λευχαιμία (JMML), που ταξινομείται από τον WHO ως ασθένεια MDS/MPD, μοιράζεται πολλά χαρακτηριστικά με αυτή την οντότητα, με μονοσωμία 7 παρατηρούμενη είτε στη διάγνωση είτε ως νέο κυτταρογενετικό εύρημα που σχετίζεται με την επιτάχυνση της νόσου σε εξέταση μυελού (Low & Mullighan, 2012).

1.3.4.1.6 Έλλειψη του κοντού βραχίονα του χρωμοσώματος 17 (17p)

Η απώλεια του κοντού βραχίονα του χρωμοσώματος 17, (del(17p) / t(17p) / i(17q) /-17) έχει αναφερθεί σε ~5% των ασθενών με ΜΔΣ προχωρημένου σταδίου, κυρίως δευτεροπαθών, και συνήθως στα πλαίσια σύνθετου καρυότυπου. (Kelaidi & Sabani, Haema 2011)

Η απώλεια μπορεί να οφείλεται σε διάφορες ανωμαλίες, όπως απλές διαγραφές, μη ισοζυγισμένες μετατοπίσεις, δικεντρικές αναδιατάξεις (ιδιαίτερα με το χρωμόσωμα 5) ή λιγότερο συχνά μονοσωμία 17 ή σχηματισμό ισοχρωμοσωμάτων. Το dic(5;17)(q11.1-13.3;p11.1-13) είναι μια συχνά επαναλαμβανόμενη αναδιάταξη του 17p, και ~ 30% των ασθενών με αυτή την αλλαγή έχουν t-MDS (Wang et al. 1997; Merlat et al., 1999). Οι ασθενείς με απώλεια του 17p έχουν συνήθως πολύπλοκους καρυότυπους - οι πιο συχνές επιπρόσθετες αλλαγές είναι οι del(5q), del(7q), -7, +8 και -18/del(18q) σε φθίνουσα συχνότητα – και ανήκουν στις πολύ κακές ομάδες IPSS-R με μέση επιβίωση 1,5 και 0,7 χρόνια αντίστοιχα (Sanchez-Castro et al., 2013).

Στις περισσότερες από αυτές τις περιπτώσεις, το αποτέλεσμα είναι η απώλεια ενός αλληλομόρφου TP53, ενώ είναι συχνή η μετάλλαξη, ή η έλλειψη του εναπομείναντος αλληλομόρφου στο μορφολογικά φυσιολογικό 17, ιδιαίτερα κατά την εξέλιξη της νόσου.

Πολλές ομάδες έχουν προτείνει ότι το 17p- σύνδρομο είναι μια διακριτή οντότητα εντός των ΜΔΣ που σχετίζεται με μια χαρακτηριστική μορφή δυσγρανουλοποίησης που συνδυάζει ψευδο-Pelger-Huet υπολοβοποίηση και παρουσία μικρών κοκκίων σε κοκκιόκυτταρα (Merlat et al., 1999). Επειδή αυτά τα χαρακτηριστικά μπορούν να παρατηρηθούν και σε ΜΔΣ χωρίς απώλεια 17p, το σύνδρομο 17p- δεν αναγνωρίζεται ως ξεχωριστή οντότητα από τον WHO. (Vardiman et al., 2009).

1.3.4.1.7 Έλλειψη του μακρού βραχίονα (q) του χρωμοσώματος 20 (del(20q))

Έλλειψη του μακρού βραχίονα του χρωμοσώματος 20, del(20q), είναι μια συνήθης ανωμαλία στις κακοήθεις μυελοειδείς διαταραχές, που παρατηρήθηκε σε περίπου 5% των περιπτώσεων ΜΔΣ και 7% των t-MDS (Vallespi et al., 1998; Schanz et al., 2012).

Ανιχνεύεται κυρίως στην ανθεκτική αναιμία (RA, refractory anemia) και στην ανθεκτική αναιμία με δακτυλιοειδείς σιδηροβλάστες (RARS, refractory anemia with ring sideroblasts). Μορφολογικά, συνδέεται με δυσπλασία της ερυθράς και της μεγακαρυοκυτταρικής σειράς. Η πλειονότητα των ελλείψεων 20q είναι μεγάλες, με το μήκος της ελλείπουσας περιοχής να ποικίλει. Μελέτες φθορίζοντος in situ υβριδισμού έχουν ταυτοποιήσει την ενδιάμεση CDR (μεγέθους 4 Mb) στην χρωμοσωματική περιοχή 20q12. Παρά ταύτα, κανένα από τα 19 εδραζόμενα στην περιοχή γονίδια δεν φαίνεται να εμπλέκεται στην παθογένεια μυελογενούς νεοπλασίας. (Bench AJ et al., 2000)

Το del(20q) στα ΜΔΣ μπορεί να συσχετιστεί με ένα ευνοϊκό αποτέλεσμα όταν σημειωθεί ως μοναδική ανωμαλία αλλά με μια λιγότερο ευνοϊκή πρόγνωση στη περίπτωση ενός πολύπλοκου καρυότυπου, ένα φαινόμενο που είναι ανάλογο με αυτό που παρατηρείται για το del(5q) στα ΜΔΣ (Pan et al., 2014).

1.3.4.1.8 Αλλοιώσεις του 3q

Οι επαναλαμβανόμενες ανωμαλίες των 3q είναι σπάνιες στα ΜΔΣ. Μεταθέσεις και αναστροφές με εμπλοκή της χρωμοσωματικής περιοχής 3q26, t(3;3)(q21;q26) / inv(3)(q21q26), απαντώνται σε <2% των de novo και ~5% των δευτεροπαθών ΜΔΣ. Ανιχνεύονται επίσης σε ΟΜΛ και σε βλαστική κρίση ΧΜΛ. Στα ΜΔΣ, απαντώνται συχνότερα σε ασθενείς με ηλικία <55 έτη και κλινικά συνοδεύονται από θρομβοκυττάρωση, δυσπλασία των τριών κυτταρικών σειρών και κυρίως της μεγακαρυοκυτταρικής. (Porpe B et al., 2006)

Τα κοινά χαρακτηριστικά των μυελοειδών ασθενειών με ανωμαλίες του 3q είναι ένα προηγούμενο ιστορικό κυτταροτοξικής έκθεσης, εξέχουσα δυσπλασίας μυελού και κακή πρόγνωση. Συνοδεύονται συχνά από δευτερογενείς αλλοιώσεις, όπως -7/del(7q), del(5q) και +8. Στις περισσότερες όμως περιπτώσεις παρατηρούνται ανωμαλίες στο χρωμόσωμα 7, -7/del(7q). Αυτές οι ανωμαλίες καταλήγουν σε υπερέκφραση του γονιδίου MECOM / EVI1 στο 3q26.2, η οποία προβλεπόταν αρχικά (όχι πειραματικά επικυρωμένο) ότι προέκυπτε από την αντιπαράθεση με τον κρυπτικό ενισχυτή του γονιδίου που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη RPN1 που δεσμεύεται με ριβοσώματα (Martinelli et al., 2003).

1.3.4.1.9 Σύνθετος καρυότυπος

Οι σύνθετοι καρυότυποι είναι μεταβλητοί αλλά γενικά έχουν ≥ 3 χρωμοσωματικές ανωμαλίες. Η πλειοψηφία των περιπτώσεων με σύνθετους καρυότυπους περιλαμβάνει ανισορροπίες χρωμοσωμικών ανωμαλιών που οδηγούν σε απώλεια γενετικού υλικού. Πολύπλοκοι καρυότυποι παρατηρούνται στο 10% των ασθενών με πρωτογενή MDS και σε 90% των ασθενών με t-MDS (Smith et al., 2003, Schanz et al., 2012).

Συνήθως περιλαμβάνουν ανωμαλίες του χρωμοσώματος 5 ή/και 7, όπως del(5q) ή t(5q), απώλεια χρωμοσώματος 7 και del(7q). Οι ανωμαλίες που εμπλέκουν το χρωμόσωμα 5 εντοπίζονται στις περισσότερες περιπτώσεις με σύνθετους καρυότυπους, συχνά με την συνύπαρξη απώλειας 17p. Ένας πολύπλοκος καρυότυπος φέρει μια κακή πρόγνωση (μέση επιβίωση IPSS-R 1,5 έτη και 0,7 έτη για τις φτωχές και πολύ φτωχές ομάδες κινδύνου, αντίστοιχα). (Malcovati et al., 2007, Greenberg et al., 2012)

1.3.4.1.10 Σπάνιες επαναλαμβανόμενες μετατοπίσεις

Οι μετατοπίσεις έχουν εντοπιστεί σε ~ 4% των ασθενών με ΜΔΣ, σημαντικά χαμηλότερη συχνότητα από ότι στην ΟΜΛ (Costa et al., 2013). Η συνέπεια των επαναλαμβανόμενων μετατοπίσεων είναι η απορρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης με αυξημένη παραγωγή ενός φυσιολογικού πρωτεϊνικού προϊόντος κοινό σε λεμφοειδή νεοπλασμάτα ή η δημιουργία ενός νέου γονιδίου σύντηξης και η παραγωγή μίας πρωτεΐνης σύντηξης κοινή σε μυελογενή νεοπλασμάτα.

1.3.4.2 Εξέλιξη καρυότυπου

Αν και οι μεμονωμένες περιπτώσεις ΜΔΣ ή ΟΜΛ μπορεί να είναι εξαιρετικά πολύπλοκες, ο γονικός κλώνος (αρχικός κλώνος) ή ο κύριος παράγων και οι παράγωγοί του υποκλώνοι, μοιράζονται ένα σύνολο χρωμοσωμικών ανωμαλιών, ενώ οι μοναδικοί υποκλώνοι έχουν αποκτήσει επιπλέον αλλοιώσεις μετά την έναρξη της νόσου, αλλοιώσεις που μπορεί να συμβάλλουν και στην εξέλιξη. Η κυτταρογενετική εξέλιξη μπορεί να λάβει διάφορες μορφές. Μπορεί να περιλαμβάνει την εμφάνιση ενός μη φυσιολογικού κλώνου σε περιπτώσεις όπου έχουν παρατηρηθεί μόνο φυσιολογικά κύτταρα, την απόκτηση επιπρόσθετων ανωμαλιών σε έναν ή περισσότερους κλώνους ή την εξέλιξη από την παρουσία ενός μόνο κλώνου (συχνά με απλό καρυότυπο) σε πολλαπλούς συναφείς ή, περιστασιακά, άσχετους μη φυσιολογικούς κλώνους. Ο εντοπισμός νέων ανωμαλιών στον καρυότυπο συμπίπτει συχνά με μια αλλαγή στη συμπεριφορά της νόσου, συνήθως σε μια πιο επιθετική πορεία, και μπορεί να σηματοδοτήσει την αρχή λευχαιμίας. Ως εκ τούτου, οι σειριακές αξιολογήσεις μπορούν να είναι ενημερωτικές, ιδιαίτερα όταν υπάρχει αλλαγή στα κλινικά χαρακτηριστικά ενός ασθενούς.

Το φυσικό ιστορικό των ΜΔΣ χαρακτηρίζεται γενικά από ένα από τρία κλινικά σενάρια. Το πρώτο, περιγράφει τη βαθμιαία επιδείνωση της πανκυτταροπενίας, όπου η μέτρηση των βλαστών στον μυελό φαίνεται να αυξάνεται. Σε αυτό το σενάριο, ο καρυότυπος τυπικά παραμένει σταθερός και η πρόοδος προς τη λευχαιμία βασίζεται στο σχετικά αυθαίρετο εύρημα περισσότερων από 20% βλαστών στον μυελό, κάνοντας τη μετάβαση σε ΟΜΛ ένα καθοριστικό γεγονός για τη νόσο. Στο δεύτερο σενάριο παρουσιάζεται μια σχετικά σταθερή κλινική πορεία ακολουθούμενη από μια απότομη αλλαγή με έναν σαφή λευχαιμικό μετασχηματισμό.

Σε αυτή την περίπτωση, είναι χαρακτηριστική η αλλαγή του καρυότυπου με την εμφάνιση υποκλώνων ή αυξημένη καρυοτυπική πολυπλοκότητα. Στο τρίτο σενάριο, τόσο ο καρυότυπος όσο και η ασθένεια τείνουν να παραμένουν σταθεροί, δείχνοντας μια σταθερή πορεία επί πολλά χρόνια χωρίς σημαντική μεταβολή στον αριθμό των βλαστών όταν επαναξιολογούνται.

Πρόσφατες μελέτες δειγμάτων ΜΔΣ και ΟΜΛ που εξελίσσονται από προηγμένη ΜΔΣ (secondary AML, sAML) δείχνουν ότι σχεδόν όλα τα κύτταρα στον μυελό (~ 85%) σε ασθενείς με ΜΔΣ και sAML προέρχονται από κλώνο. Επιπλέον, οι περισσότερες περιπτώσεις έχουν κλώνο ιδρυτή και παράγωγο υποκλώνο ≥ 1 , με μέσο όρο 2,4 κλώνους σε ΜΔΣ και 3,1 κλώνους σε ΟΜΛ. Η Γενωμική εξέλιξη στα ΜΔΣ αποδείχθηκε δυναμική διαδικασία που σχηματίζεται από πολλαπλούς κύκλους μετάλλαξης που ακολουθούνται από κλωνική επιλογή (Walter et al., 2012) .

1.3.5 Μοριακή ανάλυση – Μεταλλάξεις

Οι μοριακές μεταλλάξεις μπορούν να εντοπιστούν σε μέχρι 70% των μη ειδικά επιλεγμένων σθενών με ΜΔΣ - η συχνότητα μπορεί να είναι υψηλότερη σε εκείνους τους ασθενείς με φυσιολογικό καρυότυπο - και δείχνει αυξήσεις από χαμηλού κινδύνου σε ΜΔΣ υψηλού κινδύνου ή ΟΜΛ που εξελίσσεται από ΜΔΣ.

1.3.5.1 Έλλειψη του μακρύ βραχίονα (q) του χρωμοσώματος 5 [del(5q)]

Το σύνδρομο 5q- αποτελεί μοντέλο απλοτυπικής ανεπάρκειας. Η στοχευμένη εξουδετέρωση καθενός από τα 40 εκφραζόμενα γονίδια της περιοχής αυτής έδειξε ότι η απλοανεπάρκεια της ριβοσωματικής πρωτεΐνης RPS14 ευθύνεται για τη δυσπλασία και απόπτωση της ερυθράς σειράς, καθώς η ριβοσωματική δυσλειτουργία ενεργοποιεί την οδό TP53 επιλεκτικά στην ερυθρά σειρά. (Ebert BL et al., 2011)

Εντός και εκτός της CDR, έχουν χαρακτηριστεί ως εμπλεκόμενα στη φυσιοπαθολογία του συνδρόμου 5q- τα μικρο-ριβονουκλεϊκά οξέα miR-145 και miR-146a και τα γονίδια που κωδικοποιούν τις ακόλουθες πρωτεΐνες: α-κατενίνη και EGR1 (early growth response protein 1), των οποίων η επιγενετική αποσιώπηση συνδέεται με την πρόοδο της νόσου, SPARC [secreted protein, acidic cysteine-rich (osteonectin)] η οποία πιθανόν ορίζει τη σχέση των κυττάρων που φέρουν την εν λόγω κυτταρογενετική ανωμαλία με το μυελικό-μεσεγχυματικό μικρο-περιβάλλον, CDC25 και PP2A α , φωσφατάσες ελέγχου του κυτταρικού κύκλου, τις οποίες αναστέλλει με ιδιαίτερη επιτυχία η λεναλιδομίδη, και NPM1 της οποίας η απλοανεπάρκεια συνδέεται με επιπρόσθετες της del(5q) κυτταρογενετικές ανωμαλίες και επομένως με ΜΔΣ υψηλού κινδύνου. (Starczynowski DT et al., 2010)

Η στοχευμένη δράση της λεναλιδομίδης στην del(5q) φαίνεται να οφείλεται στην αναστολή της CDC25, με τόσο ειδική αποτελεσματικότητα σαν να επρόκειτο για σχεδιασμένο αναστολέα CDC25, που διευκολύνεται περαιτέρω από την απλοανεπάρκεια του γονιδίου CDC25 στα ΜΔΣ με 5q-, γεγονός που εξηγεί την εξειδίκευση της λεναλιδομίδης σε αυτή την ένδειξη. (Wei S et al., 2009)

1.3.5.2 Μονοσωμία 7 (-7) / Έλλειψη του μακρύ βραχίονα (q) του χρωμοσώματος 7 (del(7q))

Τα παρόμοια κλινικά και βιολογικά χαρακτηριστικά των μυελοειδών διαταραχών που σχετίζονται με το -7/del(7q) υποδεικνύουν ότι το ίδιο γονίδιο/α μεταβάλλεται σε κάθε ένα από αυτά τα πλαίσια.

Οι μοριακές μεταλλάξεις πίσω από την ανάπτυξη ΜΔΣ και ΟΜΛ με del(7q) μόλις πρόσφατα ξεκίνησαν να διερευνώνται, με πολλαπλές μελέτες να έχουν αναγνωρίσει ένα CDR μέσα στο 7q22. Κάθε ένα από τα υποψήφια γονίδια εντός του CDR στο 7q22 έχει αξιολογηθεί για μεταλλάξεις. Ωστόσο, δεν εντοπίστηκαν μεταλλάξεις αδρανοποίησης στο εναπομείναν αλληλόμορφο (Wong et al., 2010, Jerez et al., 2012b). Πειράματα σε ποντίκια έδειξαν πως τα ποντίκια με ετερόζυγη έλλειψη υπό όρους αυτής της περιοχής σε HSCs ποντικού δεν είχαν εμφανείς αλλοιώσεις αιμοποίησης. Ωστόσο, τα HSCs είχαν ένα λειτουργικό ελάττωμα στην αυτοανανέωση, υποδηλώνοντας ότι απαιτούνται μεταλλάξεις σε συνεργαζόμενα γονίδια (Wong et al., 2010; Wong and Shannon, unpublished results). Οι Dohner και συνεργάτες (2006) ταυτοποίησαν ένα ~2Mb διαγραμμένο τμήμα στο εγγύς q22 που επικαλύπτεται με το εγγύς τμήμα του CDR 2,52 Mb, που περιέχει τους γενετικούς τόπους των γονιδίων LRCC17 και SRPK2, που είχε οριστεί από τους Le Beau και συνεργάτες (1996), αλλά εκτείνεται πιο κοντά, και περιλαμβάνει τα γονίδια CUX1, RASA4, EPO και FBXL13 στο 7q22.1.

Ομοίως, οι Jerez και συνεργάτες (2012b) χρησιμοποίησε συστοιχίες SNP για τον εντοπισμό αρκετών CDS στο 7q, συμπεριλαμβανομένου ενός στο 7q22, που περιλαμβάνει το CUX1. Χρησιμοποιώντας ανάλυση αλληλουχίας μεταγραφικών αλληλουχιών και ανάλυση συστοιχίας SNP των t-MDS / t-AML και AML de novo, οι McNerney et al. (2013) εντόπισαν ένα CDR 2,15 Mb στο 7q22.1 που περιείχε το γονίδιο που κωδικοποιεί το CUX1, έναν παράγοντα μεταγραφής homeodomain πρωτεΐνης. Επιπλέον, σε μία εκ των περιπτώσεων, το CUX1 διασπάστηκε από μια μετατόπιση, με αποτέλεσμα ένα mRNA σύντηξης απώλειας λειτουργίας, και οι μεταγραφικοί παράγοντες του CUX1 και η πρωτεΐνη να εκφραστούν σε απλό-ανεπαρκή επίπεδα σε μυελογενείς νόσους με -7/del(7q). Η λύση του διατηρούμενου ομόλογου στην ανάπτυξη σε πειράματα με *Drosophila*, οδήγησε σε μελατονικούς όγκους (το ισοδύναμο της OMA). Παρόμοιες λύσεις σε ανθρώπινα HSCs οδήγησαν σε πλεονέκτημα μεταμόσχευσης στα ξενομοσχεύματα ποντικού NSG, υποδηλώνοντας ότι το CUX1 είναι απλό-ανεπαρκές TSG.

Η αναγνώριση των μεταλλάξεων στο EZH2 (7q36.1) είναι ενδιαφέρουσα. Εντούτοις, τα μυελοειδή νεοπλασμάτα με μεταλλάξεις EZH2 τυπικά δεν έχουν -7/del(7q) και το del(7q) δεν έχει πάντα ως αποτέλεσμα την απώλεια ενός αλληλόμορφου EZH2 (Ernst et al., 2010; Nikoloski et al.2010)

1.3.5.3 Τρισωμία 8

Μελέτες φθορίζοντος *in situ* υβριδισμού και μονογονεϊκής δισωμίας δεν έχουν αναδείξει κρύφιες αλλοιώσεις στα τρία αντίγραφα του χρωμοσώματος 8, ούτε μεταλλάξεις, διπλασιασμούς και αναδιατάξεις στα -σχετιζόμενα με τη λευχαιμία και εδραζόμενα στο χρωμόσωμα 8- γονίδια FGFR1, MYST3, RUNX1T1 (ETO) και MYC. (Paulsson K et al., 2007) Η τρισωμία 8 στα ΜΔΣ έχει συσχετιστεί με γονιδιακή ενίσχυση και οδηγεί σε αυξημένα επίπεδα μετάφρασης των γονιδίων όπως το MYC και αρκετών αποπτωτικών γονιδίων.

1.3.6 Μοντέλα Μοριακής Παθογένεσης

Η ανάλυση μεταφάσεων είναι ο «χρυσός κανόνας» της κυτταρογενετικής ανάλυσης στην Αιματολογία. Η εκρηκτική πρόοδος της μοριακής γενετικής ανάλυσης, με την ενσωμάτωση νέων κυτταρογενετικών εργαλείων και τη διεξοδική μελέτη αλληλουχίας γονιδιώματος, έχει οδηγήσει στην ανάδειξη αυξημένων χρωμοσωματικών αλλαγών.(Gondek LP et al., 2008) Τα νέα καρυστοτυπικά εργαλεία υψηλής ανάλυσης αποτελούν ο φθορίζων *in situ* υβριδισμός (FISH) και οι εφαρμογές του, ο βασιζόμενος σε μικροσυστοιχίες συγκριτικός γονιδιωματικός υβριδισμός (aCGH) και οι μικροσυστοιχίες πολυμορφισμού νουκλεοτιδίων (SNP-arrays), έχουν συμβάλει στην ανακάλυψη γονιδίων και μηχανισμών διαταραγμένης γονιδιακής έκφρασης. Με βάση τα νεότερα δεδομένα, τα ακόλουθα μοντέλα μοριακής παθογένειας έχουν αρχίσει να διαμορφώνονται:

1.3.6.1 RAS και CBL και ενεργοποίηση υποδοχέων αυξητικών παραγόντων.

Οι μεταλλάξεις της οδού RAS δηλαδή είτε των NRAS/KRAS είτε των φωσφατασών, που φυσιολογικά καταστέλλουν την ενεργοποίησή της (PTPN11, NF1) προσδίδουν υπερευαισθησία στον αυξητικό παράγοντα GM-CSF. Αρχέτυπο μοντέλο αυτής της ενεργοποίησης σε συγγενή μορφή είναι η νεανική μυελομονοκυτταρική λευχαιμία (JMML), με ή χωρίς ανωμαλίες συστημάτων, πλην του αιμοποιητικού (σύνδρομο Noonan, κ.ά.). Ασθενείς με JMML χωρίς μεταλλάξεις της οδού RAS, φέρουν συχνά κληρονομικές μεταλλάξεις της CBL (Casitas B-lymphomaligase), μέλος της οικογένειας E3 ubiquitin ligase, που κανονικά απενεργοποιεί τη σηματοδότηση κινασών της τυροσίνης.(Niemeyer CM et al., 2010) Οι μεταλλάξεις της CBL αίρουν την ανασταλτική αυτή ιδιότητα, με αποτέλεσμα, όπως και στην περίπτωση των μεταλλάξεων της οδού RAS, την υπερενεργοποίηση της σηματοδότησης υποδοχέων αυξητικών παραγόντων. Σε υπόστρωμα JMML μπορεί να εμφανιστεί δευτερογενώς μονοσωμία 7.

1.3.6.2 Ανωμαλίες των χρωμοσωμάτων 3 και 7 και κρύφια αναδιατάξεις 21q/ μεταλλάξεις RUNX1 (AML1) κατά την πρόοδο σε ΜΔΣ

Κατά την εξέλιξη της αναιμίας Fanconi από το στάδιο της μυελικής υποπλασίας/απλαστικής αναιμίας σε ΜΔΣ/OMΛ, εμφανίζονται αλλοιώσεις στο 3q, -7/7q- και κρύφια αναδιατάξεις του γονιδίου RUNX1.(Quentin S et al., 2011) Μεταλλάξεις του RUNX1 ανευρίσκονται γενικά σε υψηλού κινδύνου ΜΔΣ, καθώς και σε OMΛ, προσδίδοντας κακή πρόγνωση και στις δύο περιπτώσεις. Στο χρωμόσωμα 3q εδράζεται το γονίδιο EVI1. Η ενθετική ενεργοποίηση του EVI1 σε ασθενείς που υπεβλήθησαν σε γονιδιακή θεραπεία με το γονίδιο της NADPH για χρόνια κοκκιωματώδη νόσο, είχε ως αποτέλεσμα την εμφάνιση ΜΔΣ με μονοσωμία 7 και γονιδιακή αστάθεια.(Stein S et al., 2010) Διαπιστώνεται ότι η μονοσωμία 7 είναι κοινό φαινόμενο της παθογένειας και της εξέλιξης των ΜΔΣ, είτε ως αποτέλεσμα γονοτοξικότητας (ΜΔΣ μετά από χημειο/ακτινοθεραπεία), είτε κατά την πρόοδο συγγενών νοσημάτων της αιμοποίησης (JMML, αναιμία Fanconi).

1.3.6.3 Απόκριση στις βλάβες του DNA και εξέλιξη ΜΔΣ

Η απενεργοποίηση του μηχανισμού απόκρισης στις βλάβες του DNA (DNA damage response, DDR) φαίνεται να συνοδεύει την εξέλιξη σε ΜΔΣ υψηλού κινδύνου ή/και ΟΜΛ . Οι δείκτες DDR δεν ανιχνεύονται σε ΜΔΣ χαμηλού κινδύνου. Παρουσιάζονται σταδιακά και σχετίζονται άμεσα με την κατηγορία κινδύνου κατά την πρόοδο της νόσου, ενώ παύουν να ανιχνεύονται κατά την εκτροπή σε ΟΜΛ .(Boehrer S et al., 2009) Η DDR είναι επομένως ένα φράγμα κατά της ογκογένεσης, που προτάσσεται ως φυσιολογικός αμυντικός μηχανισμός έναντι γονιδιακών βλαβών, εξασφαλίζοντας την απόπτωση, η οποία παύει κατά την εκτροπή σε επιθετική κακοήθεια. Αρχικά το μοντέλο αυτό είχε περιγραφεί κατά την σταδιακή καρκινογένεση συμπαγών όγκων, όπως ο καρκίνος του εντέρου. Στην αναιμία Fanconi που είναι σύνδρομο γονιδιωματικής αστάθειας, η ενεργοποίηση της DDR σταματά τον κυτταρικό κύκλο με αποτέλεσμα τη μυελική ανεπάρκεια.(Ceccaldi R et al., 2011) Ο μηχανισμός όμως αυτός παρακάμπτεται σε ορισμένους ασθενείς, οι οποίοι έχουν μεν βελτιωμένο φαινότυπο ως προς τη μυελική ανεπάρκεια, εμφανίζουν όμως υψηλό κίνδυνο ανάπτυξης ΜΔΣ/ΟΜΛ .

1.3.6.4 Ριβωσωματοπάθειες

Στο σύνδρομο 5q-, η απλοτυπική ανεπάρκεια, ως αποτέλεσμα της απώλειας του ενός εκ των δύο αλληλομόρφων της ριβωσωματικής πρωτεΐνης RPS14, προκαλεί υποπλασία της ερυθράς σειράς, κατ' αναλογία με τον φαινότυπο του συγγενούς συνδρόμου αμιγούς απλασίας της ερυθράς σειράς της αναιμίας Diamond-Blackfan, στην παθογένεια της οποίας ενέχονται σε μεγάλο αριθμό περιπτώσεων μεταλλάξεις της ριβωσωματικής πρωτεΐνης RPS19.16 Στο πλαίσιο της διαταραγμένης ριβωσωματογένεσης σε ΜΔΣ μπορούν να ενταχθούν και οι κυτταρογενετικές αλλοιώσεις της νουκλεοφωσμίνης και του NUP98 (t(3;5) και t(2;11), αντίστοιχα). Η διαταραγμένη ριβωσωματογένεση προκαλεί συσσώρευση της P53 και απόπτωση με αποτέλεσμα τη δημιουργία φαινοτύπου απρόσφορης αιμοποίησης τόσο σε χαμηλού κινδύνου ΜΔΣ, όσο και σε συγγενή σύνδρομο μυελικής ανεπάρκειας της ερυθράς σειράς (αναιμία Diamond-Blackfan, RPS19), αλλά και άλλων σειρών όπως η ουδετεροπενία στο σύνδρομο Schwachman-Bodian-Diamond (μεταλλάξεις της ριβωσωματικής πρωτεΐνης SBDS). (Narla A et al., 2010)

1.3.6.5 TET2 και πρωτεΐνες του συμπλέγματος Polycomb

Έχει διατυπωθεί η υπόθεση ότι η αρχική βλάβη που οδηγεί σε κλωνική αιμοποίηση, πιθανόν να είναι κοινή στις μυελικές νεοπλασίες, περιλαμβανομένων των ΜΔΣ, των μυελουπερπλαστικών συνδρόμων και της ΟΜΛ. Μεταλλάξεις του γονιδίου TET2 ανευρίσκονται στο 15% των ασθενών με μυελικές νεοπλασίες (19% στα ΜΔΣ, 12% στα Μυελουπερπλαστικά Νεοπλάσματα (MYN) και 24% σε ΟΜΛ).(Barlow JL et al., 2010; Jankowska AM et al., 2009) Το γονίδιο έχει εντοπιστεί στην περιοχή 4q και ο βιολογικός του ρόλος δεν έχει διευκρινισθεί. Το μη μεταλλαγμένο γονίδιο TET2 εμπλέκεται στη λεπτή ισορροπία μεταξύ απόπτωσης, επιβίωσης και διαφοροποίησης του κυττάρου στη φυσιολογική αιμοποίηση. Μεταλλάξεις ή διαταραχές στη δομή του γονιδίου βρέθηκαν σε ποσοστό 23% των ασθενών με ΜΔΣ και μολονότι οι ασθενείς με μεταλλαγμένο TET2 δεν διέφεραν στην κλινική ή την αιματολογική εικόνα, από αυτούς με μη μεταλλαγμένο TET2, η πενταετής επιβίωση των ασθενών με τη μεταλλαγμένη μορφή άγγιζε το 77%, έναντι 18% των ασθενών που έφεραν τη μη μεταλλαγμένη μορφή του γονιδίου. Η παρατήρηση αυτή οδήγησε στο συμπέρασμα ότι οι μεταλλάξεις του TET2 συνδέονται με καλή πρόγνωση.

Πιθανόν οι ασθενείς που φέρουν τη μετάλλαξη, να μη εξελίσσονται σε ΟΜΛ με τον ίδιο ρυθμό, γεγονός που αποτελεί πλεονέκτημα επιβίωσης για αυτούς. Σε πολυπαραγοντική ανάλυση, η παρουσία μεταλλαγμένου TET2, συνιστά ανεξάρτητο παράγοντα ευνοϊκής πρόγνωσης, αφού η απουσία της μετάλλαξης συνδέεται με πέντε φορές υψηλότερο κίνδυνο θανάτου. (Langemeijer SM et al., 2009) Η παρουσία μεταλλαγμένου TET2 μπορεί να αποτελέσει μια ισχυρή παράμετρο σε ένα νέο σύστημα προγνωστικής ταξινόμησης των ΜΔΣ.

Η πρωτεΐνη TET2 υδροξυλιώνει μεθυλιωμένα νησίδα CpG μετατρέποντάς τα σε υδροξυμεθυλιωμένα CpG. Η ενζυματική της δράση απαιτεί ακετογλουταρικό οξύ. Η παρουσία υδροξυμεθυλιωμένων CpG φαίνεται να αποτελεί ενδιάμεσο στάδιο απομεθυλίωσης των αντίστοιχων τόπων και γονιδίων. (Tahiliani M et al., 2009) Η TET2 φέρεται λοιπόν να συμμετέχει στη γενική επιγενετική ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης και η μείωση της λειτουργικότητάς της συνδέεται, αφενός με ελάττωση των υδροξυμεθυλιωμένων CpG, αφετέρου με συνολική υπομεθυλίωση του γονιδιώματος. (Ko M et al., 2010) Επιπλέον, είναι απαραίτητη για τη φυσιολογική ωρίμανση της μυελομονοκυτταρικής σειράς. Αναδιατάξεις της πρωτεΐνης TET2 (μεταλλάξεις και ελλείψεις) ανιχνεύονται με συχνότητα 20% σε ΜΔΣ, 30% στη χρόνια μυελομονοκυτταρική λευχαιμία, σε ΟΜΛ και Ph(-) μυελοϋπερπλαστικά νοσήματα, στο σύνολο δηλαδή των μυελογενών κακοηθειών. (Delhommeau F et al., 2009) Αποτελούν πιθανώς πρώιμο παθογενετικό γεγονός. Στα ΜΔΣ, συνδέονται με φυσιολογικό καρυότυπο και η προγνωστική τους σημασία δεν είναι ακόμη ξεκάθαρη.

Οι πρωτεΐνες μεθυλίωσης των ιστονών παίζουν επίσης κεντρικό ρόλο στην επιγενετική ρύθμιση, με κυριότερες τις πρωτεΐνες του συμπλέγματος polycomb (polycomb repressive complex, PRC1/2). (Sauvageau M et al., 2010) Πρόκειται για πρωτεΐνες που κρατούν σε καταστολή ομοιωτικούς και άλλους τόπους κατά την εμβρυογένεση αλλά και στα πλαίσια της ομοιόστασης των στελεχιαίων αιμοποιητικών κυττάρων. Η EZH2 (enhancer of zeste homolog 2), μέλος PRC2 και μεθυλιωτής ιστονών σε θέσεις λυσίνης, και η ASXL1 (additional sex comb-like 1), μέλος PRC1, είναι δύο τέτοιες πρωτεΐνες, των οποίων μεταλλάξεις απαντώνται σε ΜΔΣ. (Grossmann V et al., 2011; Makishima H et al., 2010) Μεταλλάξεις EZH2 συνδέονται εξάλλου με μονογονεϊκή δισωμία (Uniparental Disomy, UPD) και μικροσκοπικές ελλείψεις περιοχών του 7q. Οι μεταλλάξεις ASXL1 και EZH2 συνδέονται με χειρότερη πρόγνωση. (Gelsi-Boyer V et al., 2010; Bejar R et al., 2010) Επιγενετικές βλάβες όπως οι μεταλλάξεις TET2 και EZH2 φαίνεται ότι προσδίδουν μεγαλύτερη ευαισθησία στους υπομεθυλιωτικούς παράγοντες, όπως η αζακυτιδίνη. (Kulasekararaj AG et al., 2010; Itzykson R et al., 2011) Ασθενείς με μετάλλαξη TET2 απαντούν σε αζακυτιδίνη σε ποσοστό 65% έναντι 30% των ασθενών με μή μεταλλαγμένο γονίδιο TET2 (P=0.01). Αντίστοιχα, οι πρώτες μελέτες δείχνουν μεγαλύτερο ποσοστό απάντησης στην αζακυτιδίνη ασθενών με μεταλλάξεις EZH2, κατ' αναλογία με τη μεμονωμένη μονοσωμία 7, καθώς, όπως αναφέρθηκε, οι μεταλλάξεις EZH2 συνδέονται με UPD και μικροελλείψεις στο 7q.

1.3.6.6 Ο ΡΟΛΟΣ ΤΟΥ P53

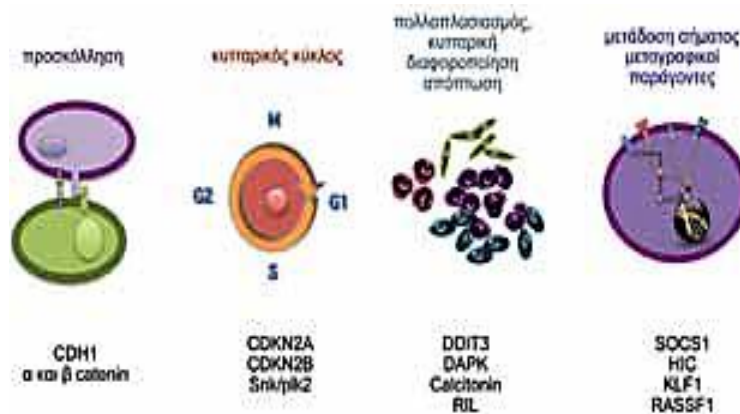
Το ογκοκατασταλτικό γονίδιο p53 έχει μελετηθεί αρκετά στο παρελθόν σε σχέση με τον ρόλο του στον κυτταρικό κύκλο, τον πολλαπλασιασμό και την απόπτωση. Πρόσφατες μελέτες διαπίστωσαν αυξημένη έκφραση του p53 στα ΜΔΣ, ως απάντηση στο ριβωσωματικό stress (Austin KM et al., 2005; McGowan KA et al., 2008). Μελέτες αναφέρουν βρήκαν αυξημένα επίπεδα p53, αυξημένη απόπτωση και μορφολογικά στοιχεία δυσπλασίας στην ερυθρά σειρά, σε ποντίκια από τα οποία απουσιάζει το γονίδιο RPS14 και όλη η περιοχή 5q24 (Barlow JL et al., 2010). Θα μπορούσε λοιπόν να υποθεθεί ότι οι κυτταροπενίες στα ΜΔΣ είναι το αποτέλεσμα διαταραχής του σχηματισμού των ριβωσωμάτων, που οδηγεί σε ενεργοποίηση του p53 και αυτή με τη σειρά της σε αυξημένη απόπτωση. (Vousden KH et al., 2009; Pellagatti A et al., 2010)

1.3.7 Μονογονεϊκή δισωμία (UPD)

Αφ' ότου έγινε δυνατό με ανάλυση υψηλής ευκρίνειας να μελετηθούν οι πολυμορφισμοί μονήρους νουκλεοτιδίου με συστοιχίες (SNP arrays), οι ερευνητές κατόρθωσαν να απομονώσουν και να μελετήσουν μικρές γενετικές βλάβες του τύπου της μονογονεϊκής δισωμίας. Όταν μελετήθηκαν ασθενείς με ΜΔΣ βρέθηκε ότι ένα ποσοστό 15% εξ αυτών που είχαν φυσιολογικό καρυότυπο διέθεταν ολόκληρες περιοχές του DNA, οι οποίες προέρχονταν από τον ένα γονέα μόνον. Αυτό το φαινόμενο χαρακτηρίστηκε και ορίστηκε ως μονογονεϊκή δισωμία. (Kosmider O et al., 2009; Gondek LP et al., 2008; Mohamedali A et al., 2007) Επιπλέον ήταν δυνατόν να ανιχνευθούν μικρές γενετικές βλάβες, όπως ενισχύσεις ή ελλείψεις τμημάτων γονιδίων, οι οποίες δεν ήταν τεχνικά δυνατόν να ανιχνευθούν με κλασσική κυτταρογενετική ή με FISH. Το ότι οι περιοχές UPD αποτελούν συστατικές περιοχές του DNA και δεν περιορίζονται μόνον στα προερχόμενα από τον κλώνο κύτταρα, οδήγησε στο συμπέρασμα ότι οι ενισχύσεις ή απώλειες του γενετικού υλικού αποτελούν επίκτητο γεγονός. Τα ευρήματα αυτά βοήθησαν περισσότερο την ερμηνεία αυτών των δεδομένων, δηλαδή ότι οι ασθενείς με συστατικό UPD είναι προδιατεθειμένοι σε γενετική αστάθεια και άρα εμφάνιση ΜΔΣ. Για άλλη μια φορά, διαταραχές της βιολογικής συμπεριφοράς βρέθηκε να αφορούν τόσο τους χαμηλού όσο και τους υψηλού κινδύνου ασθενείς με ΜΔΣ. (Parcharidou A et al., 2011)

1.3.8 Επιγενετικές μεταβολές

Δεν είναι μόνον οι γενετικές βλάβες που μπορεί να οδηγήσουν ένα κύτταρο σε κακοήγη εξαλλαγή, αλλά και οι επιγενετικές μεταβολές του γενετικού υλικού συμβάλλουν στην εμφάνιση νεοπλασματικού φαινοτύπου (Heinrichs S et al., 2009; Garcia-Manero G et al., 2007). Τα ΜΔΣ όπως προαναφέρθηκε απαντώνται κυρίως σε ηλικιωμένους ασθενείς και το αρχέγονο αιμοποιητικό κύτταρο σε αυτούς πιθανόν να έχει συσσωρεύσει επιγενετικές μεταβολές στο DNA, καθιστώντας τελικά το κύτταρο ευάλωτο σε όλα τα αίτια που μπορούν να οδηγήσουν σε νεοπλασματική εξαλλαγή. (Garcia-Manero G. Et al., 2007)



Εικόνα 3. Η μεθυλίωση του DNA σε υποκινητές γονιδίων οδηγεί σε μεταγραφική καταστολή. Σε ασθενείς με ΜΔΣ έχει περιγραφεί μεθυλίωση σε υποκινητές γονιδίων που εμπλέκονται στο φαινόμενο της προσκόλλησης, στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου, του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και της απόπτωσης αλλά και στη μεταφορά διαφόρων μηνυμάτων.

Έχει αναγνωριστεί εδώ και πολλά χρόνια ότι η καρκινογένεση είναι μία διαδικασία που περιλαμβάνει πολλαπλές γενετικές διαταραχές, όπως γονιδιωματικές μεταλλάξεις, ελλείψεις και μεταθέσεις, οι οποίες συμβάλλουν στον προοδευτικό μετασχηματισμό φυσιολογικών κυττάρων προς νεοπλασματικό φαινότυπο (Hanahan D et al., 2000). Οι γενετικές διαταραχές δεν μπόρεσαν ωστόσο να εξηγήσουν την εκτεταμένη φαινοτυπική πολυπλοκότητα σε δεδομένο κυτταρικό πληθυσμό, ούτε και τη διαφορετική προδιαθέση σε λοιμώξεις ή καρκίνους που παρουσιάζουν κλωνοποιημένοι οργανισμοί ή μονοζυγωτικά δίδυμα, που έχουν πανομοιότυπη αλληλουχία DNA (Esteller M et al., 2008; Baylin SB et al., 2000). Μερική εξήγηση στα βιολογικά αυτά φαινόμενα έχει δώσει τα τελευταία χρόνια η επιγενετική.

Το κατά πόσο τα ΜΔΣ αντιπροσωπεύουν επιγενετικά νοσήματα είναι ακόμα υπό διερεύνηση. Οι επιγενετικές τροποποιήσεις της χρωματίνης καθορίζουν ωστόσο σημαντικά τη μεταγραφική δραστηριότητα των κυττάρων και μελέτες έχουν δείξει ότι σε ασθενείς με ΜΔΣ, αποτελούν πιο συχνές διαταραχές στα αιμοποιητικά μυελικά κυττάρα, σε αντιπαράθεση με γενετικές ελλείψεις ή μεταλλάξεις (Jiang Y et al., 2009). Οι πιο πολλές μελέτες επιγενετικής στα ΜΔΣ έχουν μέχρι στιγμής επικεντρωθεί κυρίως στη μεθυλίωση του DNA.

Ένα νέο μοντέλο στα ΜΔΣ είναι η υψηλή συχνότητα μεταλλάξεων στα γονίδια που εμπλέκονται στη ρύθμιση της μεταγραφής μέσω τροποποιήσεων της χρωματίνης, συγκεκριμένα της μεθυλίωσης του DNA (DNMT3A) και της μεθυλίωσης ιστονών (IDH1 / 2, TET2, EZH2, ASXL1), και της παρατήρησης ότι οι μεταλλάξεις συχνά εμφανίζονται σε περισσότερα από ένα γονίδια αυτής της τάξης στον ίδιο ασθενή, υποδηλώνοντας τη λειτουργική τους συνεργασία (σημειώνεται ότι οι μεταλλάξεις των IDH1/2 και TET2 είναι αμοιβαία αποκλειόμενες.) Ως εκ τούτου, μεταλλάξεις σε επιγενετικούς ρυθμιστές φαίνεται να έχουν τη δυνατότητα να προκαλέσουν εκτεταμένες και επίμονες αλλοιώσεις στα μεταγραφικά μονοπάτια .

Πίνακας 6. Γονίδια που έχουν βρεθεί μεθυλωμένα σε ασθενείς με ΜΔΣ και συσχέτιση της κατάστασης μεθυλίωσής τους με κλινικές παραμέτρους, (TSG: tumor suppressor gene). (Hatzimichael E et al., 2011)

Γονίδιο	Συχνότητα(%)	Λειτουργία	Σημειώσεις
Snk/plk2	85	ρύθμιση κυτταρικού κύκλου	τάση συσχέτισης με πρόγνωση
CDKN2B (p15)	23-80	αναστολή κυκλινών, ρύθμιση κυτταρικού κύκλου	TSG, συσχέτιση με πτωχή πρόγνωση, μη απόκριση σε ΧΜΘ εφόδου
DAPK1	15-62	προαποπτωτική κινάση	συσχέτιση με κυτταρογενετικές ανωμαλίες
calcitonin	50	διαφοροποίηση	καμία συσχέτιση με κλινικές παραμέτρους
FHIT	47	μεταβολισμός πουρινών	συσχέτιση με πτωχή πρόγνωση
RIL	36	προαποπτωτική πρωτεΐνη	συσχέτιση με πτωχή πρόγνωση και εξέλιξη σε ΟΜΛ
SNRPN	35	αποτυπωμένο γονίδιο	καμία συσχέτιση με κλινικές παραμέτρους
MEG3	35	αποτυπωμένο γονίδιο	καμία συσχέτιση με κλινικές παραμέτρους
CTNNA1 (alpha catenin)	10	σύνδεση σε cadherins, προσκόλληση, κυτταρική διαφοροποίηση	σε ασθενείς υψηλού ρίσκου κατά IPSS-R
DDIT3	32	μέλος της οικογένειας C/EBP	καμία συσχέτιση με κλινικές παραμέτρους
HIC	32	καταστολή μεταγραφής	TSG, μη απόκριση σε ΧΜΘ εφόδου ⁴⁶ , πτωχή πρόγνωση
CDH1 (e cadherin)	29	προσκόλληση	συσχέτιση με πτωχή πρόγνωση, μη απόκριση σε ΧΜΘ εφόδου
SOCS1	11-47	αναστολέας του σηματοδοτικού μονοπατιού STAT	TSG, συσχέτιση με Nras μετάλλαξη και αυξημένο κίνδυνο μετάπτωσης σε οξεία λευχαιμία
Estrogen R	19	ενεργοποίηση μεταγραφής	συσχέτιση με πτωχή πρόγνωση
KLF5, KLF11	7-15	μεταγραφικοί παράγοντες	καμία συσχέτιση με κλινικές παραμέτρους
RASSF1	9	αρνητικός ρυθμιστής του σηματοδοτικού μονοπατιού RAS	TSG
CDKN2A (p16)	8	αναστολή κυκλινών, ρύθμιση κυτταρικού κύκλου	TSG

1.3.9 Σύγχρονες μοριακές μεθοδολογίες και νέα δεδομένα

Στα ΜΔΣ η έναρξη της νόσου δεν συνδέεται μόνο με διαταραχές του μηχανισμού της απόπτωσης, αλλά και με απορύθμιση ποικίλων μοριακών-βιοχημικών οδών, ορισμένοι από τους οποίους παραμένουν άγνωστοι μέχρι σήμερα. Πρόσφατες μελέτες προτείνουν τη συμμετοχή των sRNAs (μικρά RNA χωρίς δυνατότητα μετάφρασης σε πρωτεΐνη), και κυρίως των mi-RNAs, στην παθογένεια και εξέλιξη των ΜΔΣ. (Granbaek K et al., 2007; Starczynowski DT et al., 2010) Ανάλυση των mi-RNAs από προγονικά κύτταρα μυελού ασθενών με ΜΔΣ με την τεχνική next generation sequencing (ανάγνωση μικρής νουκλεοτιδικής αλληλουχίας από δέκα έως πολλά εκατομμύρια φορές σε μια μόνο αντίδραση, που αποδίδει ολοκληρωμένη εικόνα της δομής και λειτουργίας του γονιδιώματος) και με χρήση εξειδικευμένων αλγορίθμων, που χαρτογραφούσαν κάθε mi-RNA στην αντίστοιχη θέση του στο ανθρώπινο γονιδίωμα, και μελέτη των διαφορετικών ειδών RNA και της σχετικής τους θέσης σε γνωστά εξόνια, έδειξαν ότι 70% των RNAs, αντιστοιχούσαν σε θέσεις του γονιδιώματος, 21% δεν είχε καμιά αντιστοίχιση και περίπου 10% είχε περισσότερες από 25 πιθανές θέσεις. Επιπλέον έδειξαν ότι τα mi-RNAs ρυθμίζουν τις μοριακές διεργασίες και τις βιοχημικές οδούς που προσδιορίζουν το πρώιμο ή προχωρημένο στάδιο της νόσου και τη γονιδιακή έκφραση κάθε σταδίου. Ακόμη ότι η ρύθμιση του υποκινητή της DNA-πολυμεράσης II, σε κάθε στάδιο της νόσου γίνεται από mi-RNAs και μεταγραφικούς παράγοντες, και τέλος ότι υπάρχει ένα πιθανό μοντέλο ανατροφοδότησης, που πιθανά συμβάλει στην ελαττωμένη έκφραση των mi-RNAs, σε υψηλού κινδύνου ΜΔΣ. (Gaken J et al., 2009) Στη συνέχεια έγινε σύγκριση των mi-RNAs, αναλύοντας 13.000.000 αναγνώσεις μικροαλληλουχιών ανά δείγμα, μεταξύ ασθενών με RA και RAEB-2. Στα χαμηλού κινδύνου ΜΔΣ τα mi-RNAs αντιπροσώπευαν το 35% του συνολικού RNA, ενώ στα υψηλού κινδύνου μόλις το 14%. Αναλύοντας και τα άλλα είδη RNA, έγινε φανερό ότι το ποσοστό tRNA (που μετατρέπονται σε rRNA) είναι πολύ υψηλότερο σε ασθενείς με RAEB-2. Δεδομένου ότι τα tRNAs είναι απαραίτητα στην πρωτεϊνοσύνθεση κατά τη διάρκεια της μετάφρασης, και ότι σε καρκινικά κύτταρα τα επίπεδα tRNA ανιχνεύονται μέχρι και κατά 20 φορές αυξημένα, σε σύγκριση με φυσιολογικά (Beck D et al., 2011) και τέλος ότι τα tRNAs αναστέλλουν την απόπτωση που ενεργοποιείται από το κυτόχρωμα c, (Gaken J et al., 2009) είναι πιθανό η υψηλή περιεκτικότητα σε tRNAs να συμβάλει στη δημιουργία των δύο βασικών χαρακτηριστικών των υψηλού κινδύνου ΜΔΣ, δηλαδή στη μειωμένη απόπτωση και στο υψηλό ποσοστό εκτροπής σε ΟΜΛ. (Pavon-Eternod M et al., 2009) Ανιχνεύεται επίσης για πρώτη φορά έκφραση piRNA (νέα κατηγορία RNA που δεν έχει τη δυνατότητα κωδικοποίησης πρωτεϊνών) στα κύτταρα του μυελού κυρίως στους χαμηλού κινδύνου ασθενείς, χωρίς να υπάρχουν άλλα στοιχεία για τον πιθανό ρόλο τους στην παθογένεια των ΜΔΣ.

1.3.10 Θεραπευτική προσέγγιση

Οι θεραπευτικές επιλογές στους ασθενείς με ΜΔΣ αυξάνονται, καθώς περισσότεροι φορείς είναι πλέον εγκεκριμένοι για τη φροντίδα τους από διάφορους ρυθμιστικούς οργανισμούς. Παρόλο που η κυτταρογενετική ανάλυση χρησιμοποιείται ανέκαθεν για την πρόγνωση, η οποία περιελάμβανε θεραπευτικές αποφάσεις με μια γενική έννοια (υποστηρικτική περίθαλψη εναντίον κυτταροτοξικής χημειοθεραπείας), ξεκίνησε μια νέα εποχή στοχευόμενης θεραπείας. Έναυσμα αυτού ήταν η αναγνώριση της ευαισθησίας των ΜΔΣ, με μετατοπίσεις του παράγοντα ανάπτυξης αιμοπεταλίων υποδοχέα β (PDGFRB) με τον ανασταλτικό παράγοντα της κινάσης τυοσίνης, imatinib mesylate και των θετικών σε del(5q) περιστατικών, στο ανοσοτροποποιητικό φάρμακο λεναλιδομίδη. Με περαιτέρω μοριακή κατανόηση των υποκείμενων ανωμαλιών, η θεραπεία των ασθενών θα εξατομικευθεί ιδανικά με τις συγκεκριμένες χρωμοσωματικές ανωμαλίες που υποκρύπτουν τη διαδικασία της νόσου σε κάθε ασθενή και επί του παρόντος αναπτύσσονται νέες θεραπείες προς αυτή την κατεύθυνση. (Arperley et al., 2002)

1.3.11 Μυελογενή νεοπλάσματα που έχουν συσχετιστεί με προηγηθείσα θεραπεία (treatment related myeloid neoplasms, tMNs)

Τα μυελοειδή νεοπλάσματα που σχετίζονται με τη θεραπεία (t-MNs) περιλαμβάνουν περιστατικά οξείας μυελογενούς λευχαιμίας (t-AML), μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα (t-MDS) και μυελοδυσπλαστικά / μυελοπολλαπλασιαστικά νεοπλάσματα (t-MDS/MPN) ως επακόλουθο κυτταροτοξικής χημειοθεραπείας και/ή ακτινοθεραπείας που χορηγήθηκε για μια προηγούμενη νεοπλασματική ή μη νεοπλασματική διαταραχή. Παρότι οι περιπτώσεις μπορεί να διαγνωσθούν μορφολογικά ως t-MDS, t-MDS / MPN ή t-AML ανάλογα με τον αριθμό των βλαστών στο αίμα και / ή στον μυελό των οστών, αυτά τα t-MNs θεωρούνται καλύτερα σαν ένα μοναδικό κλινικό σύνδρομο που χαρακτηρίζεται από προηγούμενη ιατρογενή έκθεση σε μεταλλαξιογόνους παράγοντες. Εξαιρούνται από την κατηγορία αυτή η πρόοδος των μυελοπολλαπλασιαστικών νεοπλασμάτων (MPN) και η εμφάνιση πρωτογενούς ΜΔΣ ή δευτεροπαθούς ΟΜΛ έπειτα από πρωτογενές MDS/MPN. Σε κάθε μία από αυτές τις τελευταίες περιπτώσεις η εξέλιξη σε ΟΜΛ είναι μέρος του φυσικού ιστορικού της πρωτοπαθούς νόσου και μπορεί να είναι αδύνατο να γίνει διάκριση μεταξύ της φυσικής εξέλιξης και των μεταβολών που προκαλούνται από τη θεραπεία.

Τα νεοπλάσματα που σχετίζονται με τη θεραπεία πιστεύεται ότι είναι η συνέπεια συμβάντων μετάλλαξης ή άλλων μεταβολών στα αιμοποιητικά βλαστοκύτταρα ή / και στο μικροπεριβάλλον του μυελού των οστών που προκαλείται από κυτταροτοξική θεραπεία ή μέσω της επιλογής ενός μυελοειδούς κλώνου με ένα φαινότυπο μεταλλαξιογόνου που έχει αξιοσημείωτα αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης. Το γεγονός ότι μόνο ένα μικρό ποσοστό των ασθενών που έλαβαν θεραπεία με ταυτόσημα πρωτόκολλα αναπτύσσουν t-MN υποδεικνύουν ότι μερικά άτομα μπορεί να έχουν μία κληρονομήσιμη προδιάθεση λόγω μεταλλάξεων σε γονίδια υπεύθυνα για την αντίληψη βλαβών ή για την επισκευή του DNA (π.χ. BRCA1/2 ή TP53) ή πολυμορφισμών σε γονίδια που επηρεάζουν το μεταβολισμό των φαρμάκων, τη μεταφορά φαρμάκων ή τους μηχανισμούς επιδιόρθωσης DNA. Ωστόσο, στις περισσότερες περιπτώσεις η υποκείμενη παθογένεση παραμένει αβέβαιη.

Δύο υποσύνολα των t-MNs αναγνωρίζονται γενικά κλινικά. Το πιο συχνό παρατηρείται 5-10 χρόνια μετά την έκθεση σε αλκυλιωτικούς παράγοντες και/ή ιονίζουσα ακτινοβολία. Αυτές οι περιπτώσεις εμφανίζονται συχνά με ΜΔΣ με βλάβη στον μυελό και μία ή περισσότερες κυτταροπενίες, αν και μια μειονότητα εμφανίζεται με t-MDS/MPN ή εμφανές t-AML. Αυτό το υποσύνολο συσχετίζεται συνήθως με μη ισοζυγισμένη απώλεια γενετικού υλικού, που συχνά περιλαμβάνει τα χρωμοσώματα 5 και/ή 7, καθώς και σύνθετους καρυότυπους και μεταλλάξεις ή απώλεια TP53. Το δεύτερο υποσύνολο t-MN αντιπροσωπεύει το 20-30% των περιπτώσεων, έχει μικρότερη λανθάνουσα περίοδο (1-5 έτη) και ακολουθεί θεραπεία με παράγοντες που αλληλεπιδρούν με την DNA τοποϊσομεράση II (αναστολείς τοποϊσομεράσης II).

Μελέτη έδειξε ότι τα λευχαιμικά κύτταρα σε >90% ενός συνόλου ασθενών με t-MN παρουσιάζουν έναν μη φυσιολογικό καρυότυπο. Οι κυτταρογενετικές ανωμαλίες συσχετίζονται συχνά με την λανθάνουσα περίοδο μεταξύ της αρχικής θεραπείας και της έναρξης της λευχαιμικής διαταραχής, καθώς και με συγκεκριμένους κυτταροτοξικούς παράγοντες. Περίπου το 70% των ασθενών παρουσιάζουν μη ισοζυγισμένες χρωμοσωματικές ανωμαλίες, συνηθέστερα del(5q) ή t(5q), απώλεια χρωμοσώματος 7 ή del(7q). Η έλλειψη του 5q συσχετίζεται συχνά με μία ή περισσότερες επιπρόσθετες χρωμοσωματικές ανωμαλίες σε ένα σύνθετο καρυότυπο, όπως del(13q), del(20q), del(11q), del(3p), έλλειψη 17p ή μονοσωμία 17, μονοσωμία 18 ή 21 ή τρισωμία 8. Το 80% των ασθενών με del(5q) έχουν μεταλλάξεις ή απώλεια της TP53 ως αποτέλεσμα ανωμαλιών 17p. (WHO, 2017)

1.4 Σημασία της κλασικής κυτταρογενετικής στη διάγνωση και πρόγνωση αιματολογικών νεοπλασμάτων

Δεν υπάρχει αμφιβολία ότι η ανάπτυξη εξελιγμένων τεχνικών όπως ο φθορίζον *in situ* υβριδισμός (FISH), ο πολύχρωμος φθορίζον *in situ* υβριδισμός (m-FISH) και σε κάποιο βαθμό ο βασιζόμενος σε μικροσυστοιχίες συγκριτικός γονιδιωματικός υβριδισμός (arrayCGH) έχει ενισχύσει τη γνώση των χρωμοσωμικών ανωμαλιών στα αιματολογικά νεοπλασμάτα (Tirado CA et al., 2007; Zhang FF et al., 2000; Wilkens L et al., 1998). 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 συμβατικής κυτταρογενετικής λόγω της υψηλότερης ανάλυσης τους. Παρ' ολ' 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 άλλες μοριακές γενετικές μεθόδους. 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 τη aCGH (Gargallo P et al., 2005; Robak T et al., 2003). Επιπλέον, η παρουσία ανωμαλιών που αποκτήθηκαν κατά την εξέλιξη των κλώνων, ένας σημαντικός δείκτης εξέλιξης της νόσου, θα μπορούσε να μην παρατηρηθεί και αξιολογηθεί σωστά κατά τη διάρκεια μιας στοχευμένης ανάλυσης FISH (Kelly MJ et al., 2009; Shanafelt TD et al., 2006; Hoglund M et al., 2004).

1.4.1 Η ανίχνευση μη φυσιολογικών και φυσιολογικών κλώνων

Ο στόχος της κυτταρογενετικής διερεύνησης κακοηθειών και σχετικών διαταραχών είναι η ανίχνευση οποιασδήποτε ορατής χρωμοσωματικής ανωμαλίας που μπορεί να έχει εμφανιστεί ειδικά στα νεοπλασματικά κύτταρα. Αυτά τα νεοπλασματικά κύτταρα συχνά συνυπάρχουν με τα φυσιολογικά κύτταρα. Έτσι, οι περισσότερες μη φυσιολογικές περιπτώσεις παρουσιάζουν επίσης κανονικές μεταφάσεις αν εξεταστούν επαρκή κύτταρα. Αν και η παρουσία ή η οριστική απουσία καρυότυπων κανονικών κυττάρων μπορεί να είναι προγνωστικής σημασίας, η αναλογία των φυσιολογικών προς τα ανώμαλα κύτταρα υπόκειται τόσο στις επιδράσεις των συνθηκών καλλιέργειας όσο και στο σημαντικό σφάλμα δειγματοληψίας. Πρέπει να δίνεται προσοχή εάν η αναλογία των φυσιολογικών κυττάρων χρησιμοποιείται για την εκτίμηση της κλωνικής ανάπτυξης και της παλινδρόμησης. Ωστόσο, δεν ανιχνεύονται ανωμαλίες χρωμοσωμάτων σε όλα τα κακοήθη κύτταρα. Σε ορισμένες περιπτώσεις, οι μελέτες DNA δείχνουν ότι έχουν παρουσιασθεί γενετικές αλλαγές αλλά μόνο σε μοριακό επίπεδο και έτσι δεν μπορούν να ανιχνευθούν με μικροσκοπία φωτός. Εν ολίγοις, η ανίχνευση ενός φαινομενικά φυσιολογικού καρυότυπου δεν σημαίνει απαραίτητα ότι η κυτταρική γραμμή από την οποία προέρχεται είναι φυσιολογική. Αυτό περιπλέκεται περαιτέρω από το γεγονός ότι ο πολλαπλασιασμός των φυσιολογικών κυττάρων μπορεί να ευνοηθεί από συγκεκριμένα καθεστώτα καλλιέργειας ή καθυστερήσεις στη μεταφορά του δείγματος. Ο τελικός παράγοντας που επηρεάζει το αποτέλεσμα είναι η προσέγγιση της ανάλυσης. Η επίδραση της ανάλυσης στην ανίχνευση της χρωμοσωματικής ανωμαλίας στα νεοπλασματικά κύτταρα εξαρτάται από τρεις παράγοντες, την ποιότητα των μεταβολών της μεταφάσης, τον αριθμό της εξάπλωσης που αναλύεται και την εμπειρία του κυτταρογενετικού.

1.5 Fluorescence In Situ Hybridization-FISH

Σε αντίθεση με την ανάλυση της κλασσικής ανάλυσης χρωμοσωμάτων, ο φθορίζον *in situ* υβριδισμός (FISH) μπορεί να αξιολογήσει ταυτόχρονα και μεσοφασικά κύτταρα με γρήγορο και αποτελεσματικό τρόπο (Gozzetti and Le Beau, 2000). Το κύριο πλεονέκτημα του FISH είναι η απλοποιημένη ανάλυση που επιτρέπει την αξιολόγηση ενός μεγαλύτερου αριθμού κυττάρων, αυξάνοντας έτσι σημαντικά την ευαισθησία. Μπορεί επίσης να εφαρμοστεί σε ιστολογικά χρωματισμένα κύτταρα, επιτρέποντας μια άμεση συσχέτιση της κατάστασης του γενετικού στόχου μέσα σε μορφολογικά χαρακτηρισμένα κύτταρα. Ωστόσο, η τεχνική αξιολογεί συγκεκριμένες μεταβολές με βάση την επιλογή των ιχνηθετών, και όχι ολόκληρο το χρωμοσωματικό συμπλήρωμα. Οι ιχνηθέτες κατάλληλοι για κλινική χρήση δεν είναι διαθέσιμοι για όλες τις γνωστές επαναλαμβανόμενες ανωμαλίες και η μεταβολή στις κυτταρογενετικές ανωμαλίες (είτε με πολύπλοκες αναδιατάξεις είτε με διαφορές στα σημεία θραύσης) μπορεί να μην ανιχνεύεται με τους συμβατικούς ιχνηθέτες. Εμπορικοί διαθέσιμοι ιχνηθέτες έχουν αναπτυχθεί για την ανίχνευση μεταβολών σχετικών με ΜΔΣ όπως 11q23.3 μετατοπίσεις που εμπλέκουν KMT2A/MLL, -Y, del(5q), -7/del(7q), + 8, del(11q)(13p), -17/del(17p) και del(20q).

Ένα σημαντικό πλεονέκτημα της FISH είναι η ικανότητά της να ανιχνεύει και να χαρακτηρίζει τις χρωμοσωματικές ανωμαλίες που δεν στοιχειοθετούνται συνήθως με άλλες μεθόδους. Αυτή η τεχνολογία επιτρέπει την ανίχνευση μικρών ελλείψεων ή επαναλήψεων, την ταυτοποίηση χρωμοσωμάτων-δεικτών και τον χαρακτηρισμό άλλων χρωμοσωματικών αναδιατάξεων. Επιπλέον, η FISH χρησιμοποιείται για την απεικόνιση των ανωμαλιών που ανιχνεύονται με αναλύσεις μικροσυστοιχιών του αριθμού αντιγράφων και για την αξιολόγηση των γονικών δειγμάτων για την αλλαγή του αριθμού αντιγράφων και/ή τον ορισμό μιας ισοζυγισμένης αναδιάταξης.

Η FISH μπορεί να εφαρμοστεί σε μια ποικιλία τύπων δειγμάτων ανάλογα με τη μελέτη ενδιαφέροντος, όπως παρασκευάσματα μεταφάσεων από καλλιεργημένα κύτταρα (αμνιοκύτταρα, χοριονικά κύτταρα, λεμφοκύτταρα, κύτταρα από αναρροφήσεις μυελού των οστών ή συμπαγείς όγκους, ινοβλάστες). Η FISH σε κύτταρα μετάφασης θεωρείται το "χρυσό πρότυπο" επειδή τα χρωμοσώματα και η ακριβής θέση των σημάτων μπορούν να απεικονιστούν άμεσα. Ωστόσο, ένα σημαντικό πλεονέκτημα της FISH είναι ότι μπορεί επίσης να εφαρμοστεί σε μεσοφασικά κύτταρα. Επιπλέον, σε μη καλλιεργημένα κύτταρα, μπορεί επίσης να πραγματοποιηθεί ανάλυση μεσόφασης σε αντικειμενοφόρες πλάκες που έχουν παρασκευαστεί για καρυοτυπική ανάλυση χρωμοσωμάτων, τομές ιστών από μπλοκ παραφίνης, απομονωμένα κύτταρα από μπλοκ παραφίνης και παρασκευάσματα αποτυπώματος κυττάρων από λεμφαδένες ή συμπαγείς όγκους.

Για περιπτώσεις όπου τα μεταφασικά χρωμοσώματα είναι χαμηλής ποιότητας ή μη διαθέσιμα, η FISH παρέχει ένα μέσο αξιολόγησης. Η ανάλυση των μεσοφασικών κυττάρων επιτρέπει επίσης την ταχεία εκτίμηση ενός μεγάλου αριθμού κυττάρων. Δεδομένου ότι οι μεσοφασικές μελέτες δεν μπορούν να εξακριβωθούν με οπτικοποίηση σε *in situ* χρωμοσώματα, η ερμηνεία μπορεί να υπονομευθεί από την αναποτελεσματικότητα του υβριδισμού και η διασφάλιση της ποιότητας είναι υψίστης σημασίας.

1.5.1 Μικροελλείψεις & Μικροδιπλασιασμοί

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, μικρο-αλλαγές ή σύνδρομα συνεχούς γονιδίου προκαλούνται από τη έλλειψη ή την επανάληψη γενετικού υλικού, που συνήθως περιλαμβάνει πολλαπλά συνεχή γονίδια σε ένα χρωμόσωμα. Τα ελλείμματα συμβαίνουν συχνά σε σταθερές θέσεις και μεσολαβούνται από επαναλήψεις μικρών αντιγράφων που επιτρέπουν τον μη-αλληλόμορφο ομόλογο ανασυνδυασμό. Αυτά τα σύνδρομα γειτονικών γονιδίων, τα οποία συχνά περιλαμβάνουν ελλείψεις ή αλληλεπικαλύψεις που είναι 2Mb ή λιγότερο σε μέγεθος, δεν μπορούν να ταυτιστούν με συνήθεις μελέτες χρωμοσωμάτων. Επομένως, η ανάλυση FISH παρέχει μια οριστική διαγνωστική εξέταση για αυτές τις διαταραχές.

Ένας σημαντικός κλάδος που έχει εξελιχθεί πολύ από την ανάλυση FISH είναι η μελέτη χρωμοσωμικών ανωμαλιών που σχετίζονται με τον καρκίνο. Έχουν αναπτυχθεί ιχνηθέτες για την πλειοψηφία των επαναλαμβανόμενων τμημάτων που εντοπίζονται σε αιματολογικές κακοήθειες και υπάρχουν πολλοί ιχνηθέτες για τη γενετική μελέτη στερεών όγκων.

1.5.2 Τύποι ιχνηθετών

Δεδομένης της αφθονίας των δεδομένων αλληλουχίας που είναι διαθέσιμα από το Πρόγραμμα Ανθρώπινου Γονιδιώματος, μπορούν να παραχθούν ιχνηθέτες για διαδικασίες FISH για τη μελέτη σχεδόν οποιουδήποτε ανθρώπινου χρωμοσωμικού σημείου. Ωστόσο, η πλειονότητα των ιχνηθετών που χρησιμοποιούνται για κλινικούς σκοπούς παρασκευάζονται και πωλούνται στο εμπόριο ως αντιδραστήρια ειδικά για κάθε αναλύτη και πρέπει να επικυρώνονται από κάθε εργαστήριο. Οι περισσότεροι ιχνηθέτες FISH εμπίπτουν σε μία από τις τρεις κατηγορίες: επαναλαμβανόμενη αλληλουχία, ολόκληρο χρωμόσωμα ή μοναδική ακολουθία.

Ο πιο ευρέως χρησιμοποιούμενος τύπος ιχνηθέτη είναι αυτός που ανιχνεύει μοναδικό DNA αλληλουχίας. Αυτοί οι ιχνηθέτες παράγονται από περιοχές του γονιδιώματος που είτε κλωνοποιούνται σε διάφορους φορείς (π.χ. κοσμίδια, τεχνητά χρωμοσωματίδια ζυμομυκήτων, βακτηριδιακά τεχνητά χρωμοσώματα ή κατασκευάζονται με PCR χρησιμοποιώντας εκκινητές ειδικούς για την αλληλουχία. Άλλοι ιχνηθέτες, ονομαζόμενοι ιχνηθέτες ενός αντιγράφου, σχεδιάζονται και αναπτύσσονται με βάση γονιδιωματικές αλληλουχίες που στερούνται επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών. Οι μοναδικοί ιχνηθέτες αλληλουχίας, που κυμαίνονται σε μέγεθος από περίπου 1Kb έως > 1 Mb, μπορούν να χρησιμοποιηθούν για να εξετάσουν μια συγκεκριμένη περιοχή αντιγραφής τον αριθμό ή τη θέση. Αυτοί οι ιχνηθέτες είναι επίσης χρήσιμοι για τον καθορισμό των χρωμοσωμικών σημείων διακοπής και για την αποδοχή της απεικόνισης των αλλαγών του αριθμού αντιγράφων που ανιχνεύονται από την arrayCGH.

2. ΣΚΟΠΟΣ

Τα Μυελοδυσπλαστικά Σύνδρομα (ΜΔΣ) αποτελούν μία ετερογενή ομάδα επίκτητων κλωνικών νοσημάτων των αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων που χαρακτηρίζονται από μη αποτελεσματική αιμοποίηση και αυξημένο κίνδυνο εξέλιξης σε οξεία μυελογενή λευχαιμία (ΟΜΛ). Εμφανίζονται κυρίως σε άτομα προχωρημένης ηλικίας με ετήσια συχνότητα εμφάνισης 0,02% στις ηλικίες αυτές. Η επίπτωση της νόσου είναι αυξημένη στους άνδρες συγκριτικά με τις γυναίκες (1,8:1). Η αιτιολογία ανάπτυξης των ΜΔΣ δεν είναι σαφής, όμως φαίνεται να εμπλέκονται τόσο γενετικοί όσο και επιγενετικοί και περιβαλλοντικοί παράγοντες. Η κυτταρογενετική ανάλυση είναι χρήσιμη για τον προσδιορισμό της κλωνικότητας των συνδρόμων αυτών καθώς και για την ανάδειξη μηχανισμών που σχετίζονται με την παθοβιολογία τους. Η προγνωστική αξία της κυτταρογενετικής ανάλυσης έχει θεμελιωθεί από το Αναθεωρημένο Διεθνές Προγνωστικό Σύστημα Ταξινόμησης (IPSS-R), το οποίο αναγνωρίζει μεγαλύτερη προγνωστική βαρύτητα στην κυτταρογενετική ανάλυση και δευτερευόντως σε άλλες προγνωστικές παραμέτρους όπως ο αριθμός βλαστών και τα επίπεδα αιμοσφαιρίνης.

Χρωμοσωματικές ανωμαλίες παρουσιάζονται στο 40%-70% των ασθενών με πρωτογενή ΜΔΣ (primary de novo MDS, pMDS) και στο 95% των ΜΔΣ που προκύπτουν μετά προηγούμενη χημειοθεραπεία (treatment related MDS, tMDS). Οι συνηθέστερες κυτταρογενετικές ανωμαλίες που απαντώνται στα ΜΔΣ είναι οι ελλείψεις του μακρού βραχίονα του χρωμοσώματος 5 [~~5q~~], η μονοσωμία 7 (-7) ή/και ελλείψεις στο μακρύ βραχίονα του 7 [~~7q~~] και η τρισωμία 8 (+8). Σύμφωνα με το IPSS-R, η μονήρης ~~7q~~ σχετίζεται με ενδιάμεση πρόγνωση, ενώ η -7, ή η -7/~~7q~~ με μία επιπλέον ανωμαλία, ή ως μέρος ενός σύνθετου καρυοτύπου έχει κακή πρόγνωση. Στην περιοχή 7q22, η οποία έχει χαρακτηριστεί ως η συχνά ελλείπουσα περιοχή (Commonly Deleted Region, CDR), εδράζονται γονίδια όπως τα KMT2E και CUX1 των οποίων η λειτουργία σε απλοανεπάρκεια έχει συσχετιστεί με την παθογένεια των ΜΔΣ. Άλλη μια CDR μεγάλης σημασίας είναι η 7q31 με γονίδια όπως το MET αλλά και η 7q36 με γονίδια όπως το EZH2 και CUL1.

Η ταχεία εξέλιξη της κυτταρογενετικής ανάλυσης στις αιματολογικές νεοπλασίες, με την ενσωμάτωση μοριακών γενετικών μεθοδολογιών συμβάλει στην εξατομικευμένη διαγνωστική και προγνωστική αξιολόγηση κάθε ασθενούς. Ιδιαίτερα, τα ΜΔΣ αποτελούν ένα κυτταρογενετικό μοντέλο λευχαιμογένεσης, κατά το οποίο ο ίδιος κλωνικός πληθυσμός μπορεί να εξελιχθεί από την ήπια φάση σε οξεία λευχαιμία, με την απόκτηση δευτερογενών γενετικών αλλαγών. Οι αλλοιώσεις του χρωμοσώματος 7 στα ΜΔΣ είναι δυνατό να συσχετισθούν με ενδιάμεση ή κακή πρόγνωση ανάλογα με τη φύση της αλλοίωσης και την ύπαρξη ή όχι συνοδών χρωμοσωματικών αλλαγών. Η διαφορική προγνωστική αξιολόγηση κατά τη διάγνωση αλλά και κατά την εξέλιξη της νόσου επιφέρει συγκεκριμένες θεραπευτικές επιλογές.

Σκοπός της μελέτης αυτής αποτέλεσε η καρυοτυπική και μοριακή κυτταρογενετική ανάλυση μεγάλου δείγματος ασθενών με ΜΔΣ και αλλοιώσεις του χρωμοσώματος 7 για την ανίχνευση τυχόν υποκλώνων μη ανιχνεύσιμων στον καρυότυπο, τη διερεύνηση και αξιολόγηση πλεονεκτήματος πολλαπλασιασμού των κυττάρων που φέρουν αλλοίωση του 7, τη διερεύνηση και αξιολόγηση διαφορών μεταξύ των αλλοιωμένων προτύπων.

3. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

3.1 Κυτταρογενετική ανάλυση

Η κυτταρογενετική ανάλυση απαιτεί την παρουσία ζωντανών κυττάρων ή τουλάχιστον άθικτων πυρήνων (FISH). Αν και είναι κατανοητό ότι τα ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα διαιρούνται αυθόρμητα και ότι η καλλιέργεια μπορεί να μην είναι ένα αναγκαίο βήμα, είναι επίσης γεγονός ότι τα νεοπλασματικά κύτταρα ρυθμίζονται από διαφορετικούς κύκλους ανάπτυξης και επομένως μεγαλύτερους χρόνους στην καλλιέργεια καθώς και διέγερση μιτογόνων (σε κάθε περίπτωση η κυτταρογενετική ξεκινά με σωστή επιλογή δειγμάτων, η οποία στην περίπτωση των αιματολογικών νεοπλασμάτων περιλαμβάνει αναρρόφηση μυελού των οστών, περιφερικό αίμα, καθώς και διάφορα σωματικά υγρά και στερεούς ιστούς στους οποίους η διήθηση από τα νεοπλασματικά αιματολογικά κύτταρα έχουν εμφανιστεί. (Meloni-Ehrig A et al., 2009)

Η συλλογή των δειγμάτων πρέπει να πραγματοποιείται ασηπτικά και στην περίπτωση των στερεών ιστών, τα δείγματα πρέπει να τοποθετούνται σε μέσο θερμοκρασίας δωματίου, κατά προτίμηση εμπλουτισμένο με αυξητικούς παράγοντες και αντιβιοτικά. Οι μεγαλύτεροι χρόνοι διέλευσης (> 48 ώρες) ενδέχεται να επηρεάσουν τη βιωσιμότητα των νεοπλασματικών κυττάρων και θα πρέπει να αποφεύγονται όταν είναι δυνατόν. (Meloni-Ehrig A et al., 2009) Αναλύσιμα παρασκευάσματα χρωμοσωμάτων λαμβάνονται με την πρώτη έκθεση των κυττάρων σε μιτωτικούς αναστολείς και στη συνέχεια την επεξεργασία τους με υποτονικό διάλυμα και μονιμοποίηση. (Spurbeck J et al., 1996) Τα παρασκευάσματα χρωμοσωμάτων υποβάλλονται στη συνέχεια σε ζωνοποίηση. Η πλέον διαδεδομένη μέθοδος ζωνοποίησης είναι αυτή της τρυψίνης-Giemsa. (Rowley J et al., 1976)

Οι μυελογενείς κακοήθειες γενικά παράγουν καλά παρασκευάσματα χρωμοσωμάτων τα οποία έχουν επιτρέψει την ακριβή ταυτοποίηση ειδικών ανωμαλιών που περιλαμβάνουν λεπτές αναδιατάξεις. Σε ορισμένες περιπτώσεις, συγκεκριμένοι συνδυασμοί ανωμαλιών υποδηλώνουν τη μυελική φύση της νόσου. Αυτά τα πρότυπα αντιπροσωπεύουν πιθανώς τη συσσώρευση χαρακτηριστικών δευτερογενών αλλαγών καθώς αναπτύσσεται η κακοήθεια.

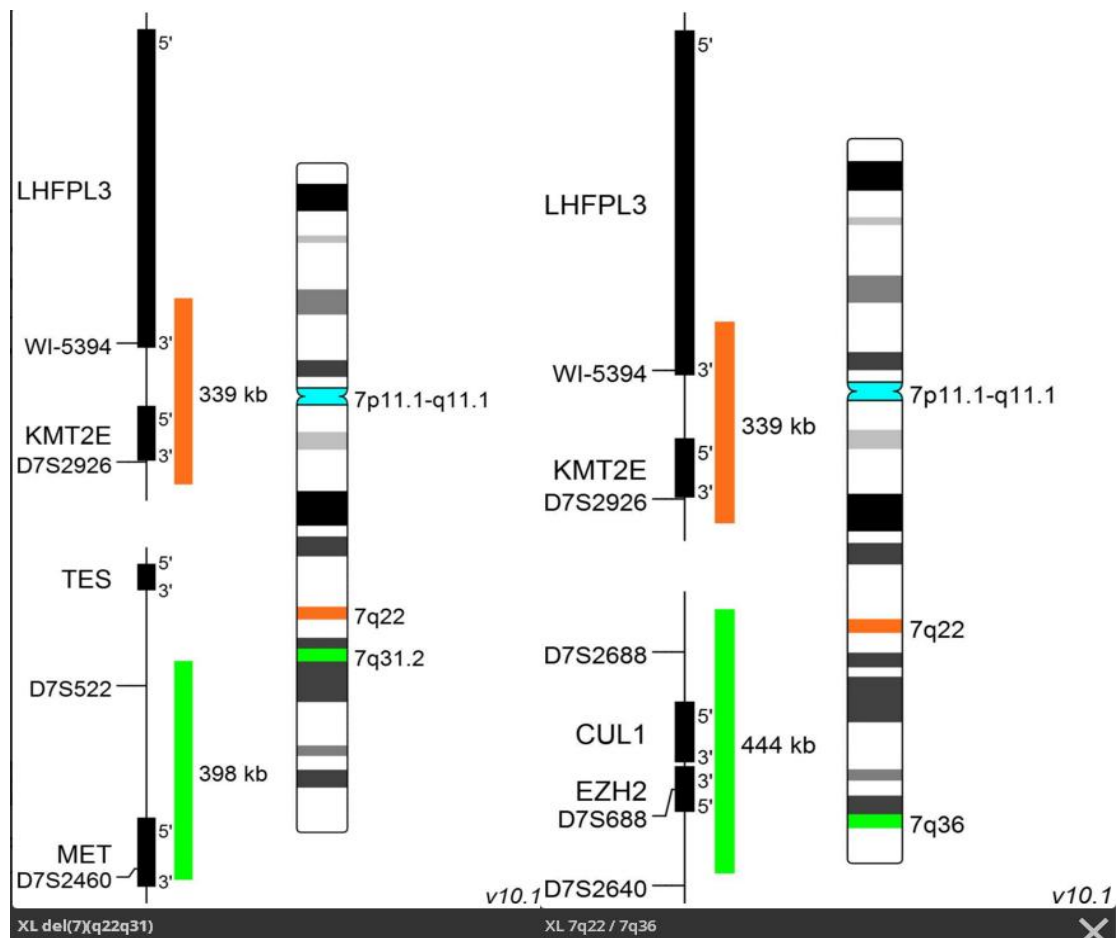
3.2 Μοριακή κυτταρογενετική ανάλυση (iFISH)

Η μέθοδος FISH που χρησιμοποιείται ευρέως σε κλινικά εργαστήρια περιλαμβάνει τον υβριδισμό ενός σημασμένου ιχνηθέτη DNA σε έναν *in situ* χρωμοσωματικό στόχο. Ο DNA ιχνηθέτης και στόχος μετουσιώνεται χρησιμοποιώντας επώαση σε υψηλή θερμοκρασία σε διάλυμα φορμαμιδίου/άλατος. Ο ιχνηθέτης εφαρμόζεται σε περίσσεια, εξασφαλίζοντας ότι ανασυνδέεται στο συγκεκριμένο DNA στόχο. Η ανίχνευση του σημασμένου ιχνηθέτη επιτυγχάνεται με υπεριώδη (UV)-διέγερση φθορισμού.

Οι ιχνηθέτες που χρησιμοποιήσαμε στα πλαίσια της παρούσας εργασίας είναι ειδικοί ως προς τόπο και χρησιμοποιήθηκαν για την ανίχνευση της μονοσωμίας 7 και των ελλειψουσών περιοχών του q βραχίονα του χρωμοσώματος 7. Ειδικότερα χρησιμοποιήσαμε τους ακόλουθους ιχνηθέτες της εταιρίας MetaSystems:

1) Ο ειδικός για τον τόπο XL 7q22/7q36 ιχνηθέτης ανιχνεύει ελλείψεις στον μακρύ βραχίονα του χρωμοσώματος 7. Ο πορτοκαλί επισημασμένος ιχνηθέτης υβριδοποιείται σε μια συγκεκριμένη περιοχή στο 7q22 συμπεριλαμβανομένου του γονιδίου KMT2E (πρώην MLL5). Ο πράσινος επισημασμένος ιχνηθέτης υβριδοποιείται ειδικά με 7q36 και περιλαμβάνει το γονίδιο EZH2. Ο μπλε (aqua) σημασμένος ιχνηθέτης ο οποίος υβριδοποιείται με το κεντρομερίδιο του χρωμοσώματος 7 λειτουργεί ως ιχνηθέτης αναφοράς. Ο ιχνηθέτης αυτός αποτέλεσε τον κύριο ιχνηθέτη των πειραμάτων καθώς όπως αναφέρθηκε θέλαμε να ελέγξουμε ελλείμματα περιοχών όσο πιο κοντά στο τελομεριδιακό άκρο.

2) Ο ειδικός ιχνηθέτης θέσης XL del(7)(q22q31) ανιχνεύει ελλείψεις στο μακρύ βραχίονα του χρωμοσώματος 7. Ο πορτοκαλί επισημασμένος ιχνηθέτης υβριδοποιείται σε μια συγκεκριμένη περιοχή στο 7q22 συμπεριλαμβανομένου του γονιδίου KMT2E (πρώην MLL5). Ο πράσινος ιχνηθέτης υβριδοποιείται ειδικά με 7q31 και περιλαμβάνει το πρωτο-ογκογονίδιο MET. Ο μπλε (aqua) ιχνηθέτης ο οποίος υβριδοποιείται με το κεντρομερίδιο του χρωμοσώματος 7 λειτουργεί ως ιχνηθέτης αναφοράς.



Εικόνα 4. Οι ιχνηθέτες XL 7q22/7q36 (αριστερά) και XL del(7)(q21.31) (δεξιά) σε αντιπαράθεση. Με τα χρώματα γαλάζιο, πορτοκαλί και πράσινο φαίνονται οι αντίστοιχες περιοχές aqua, red & green που εμφανίζονται στην ανάλυση με μικροσκόπιο φθορισμού και αντιπροσωπεύουν τις περιοχές που δηλώνει η εικόνα. Στα αριστερά κάθε επιμέρους χρωμοσώματος φαίνονται μερικά από τα πιο σημαντικά γονίδια που εδράζονται σε κάθε περιοχή. Πηγή: www.metasystems-probes.com

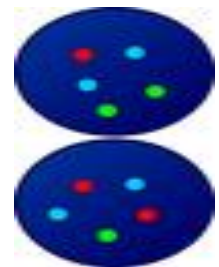
Αναμενόμενα πρότυπα:



Φυσιολογικό πρότυπο υβριδισμού: Δύο πράσινα (2G) και δύο πορτοκαλί (2O) και δύο μπλε (2B) σήματα.

Αλλοιωμένο πρότυπο (τυπικά αποτελέσματα):

Δύο πράσινα (2G), ένα πορτοκαλί (1O) και δύο μπλε (2B) σήματα που υποδεικνύουν την έλλειψη ενός τόπου 7q22 ή ενός πράσινου (1G), δύο πορτοκαλί (2O) και δύο μπλε (2B) ενός τόπου 7q36/7q31.

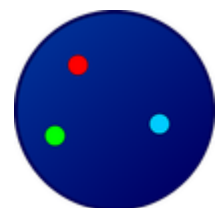


Αλλοιωμένο πρότυπο (τυπικά αποτελέσματα):

Συνηθισμένα κύτταρα (τυπικά αποτελέσματα): Ένα πράσινο (1G), ένα πορτοκαλί (1O) και δύο μπλε (2B) σήματα που δείχνουν την έλλειψη ενός τόπου 7q22 και ενός τόπου 7q36/7q31.

Αλλοιωμένο πρότυπο (τυπικά αποτελέσματα):

Ένα πράσινο (1G), ένα πορτοκαλί (1O) και ένα μπλε (1B) σήμα που δείχνει μονοσωμία 7.



3.3 Δείγματα πειραματικής διαδικασίας & πρωτόκολλα

Για την διεξαγωγή της παρούσας μελέτης χρησιμοποιήθηκαν δείγματα ασθενών που είχαν προσέλθει για χρωμοσωματική ανάλυση στο εργαστήριο κυτταρογενετικής του ΕΚΕΦΕ «Δημόκριτος» και σε αυτούς είχε προηγηθεί διάγνωση ΜΔΣ. Τα δείγματα που επελέγησαν να αναλυθούν είναι αυτά που έφεραν κλώνο με μονοσωμία 7 ή del(7q), σαν μοναδική αλλοίωση.

Μελετήθηκαν συνολικά 47 ενήλικες ασθενείς με μέσο όρο ηλικίας πρώτης διάγνωσης τα 68 έτη. Στο σύνολο τους ήταν 17 γυναίκες και 30 άνδρες.

Del(7q) παρατηρήθηκε στους 11 από τους 47 ασθενείς, 4 γυναίκες και 7 άνδρες και μέση ηλικία τα 68,5 έτη, ενώ -7 παρατηρήθηκε σε 36 ασθενείς, 13 γυναίκες και 23 άνδρες με μέση ηλικία τα 68 έτη.

3.3.1 Καλλιέργεια δειγμάτων

Για την μελέτη των δειγμάτων έγινε χρωμοσωματική κυτταρογενετική ανάλυση ζωνοποιημένων χρωμοσωμάτων η οποία ακολουθήθηκε από ανάλυση interphase-FISH. Οι συνθήκες - θερμοκρασία, υγρασία - ελέγχονταν καθημερινά και κάθε διαδικασία έγινε σε θάλαμο νηματικής ροής.

Για την κλασική ανάλυση ζώνωσης ακολουθήθηκε η ακόλουθη διαδικασία καλλιέργειας:

1. Σε κατάλληλες φλάσκες μεταφέρθηκαν 0,3-0,5 ml δείγματος μυελού (σε ηπαρίνη).
2. Προστέθηκαν 6ml θρεπτικό υλικό – 20% ορός, 1% πενικιλίνη, 1% γλουταμίνη.
3. Οι καλλιέργειες (2 καλλιέργειες/δείγμα) τοποθετήθηκαν σε κλίβανο, 37°C, 5% CO₂, για 24 και 48 ώρες αντίστοιχα.
4. Τα κύτταρα σταματούν στην μίτωση με τη προσθήκη 50μl διαλύματος κολχικίνης και επανατοποθέτηση στον κλίβανο για 1 ώρα.
5. Το υλικό με το πέρας της μίας ώρας μεταφέρθηκε σε σωληνάρια και φυγοκεντρήθηκε στα 1300rpm για 10 λεπτά.
6. Για την διόγκωση των χρωμοσωμάτων χρησιμοποιήθηκε υπότονο διάλυμα KCl 75mM από το οποίο προστέθηκαν 8-10ml σε κάθε σωληνάριο αφού προηγουμένως είχε αφαιρεθεί προσεκτικά το υπερκείμενο μετά τη φυγοκέντριση.
7. Για ακόμη μία φορά τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν στα 1300rpm για 10 λεπτά και το υπερκείμενο απορρίφθηκε.
8. Για τη μονιμοποίηση προστέθηκαν 8-10ml fixative solution (3:1- Μεθανόλη:Οξικό οξύ).
9. Ακολούθησε μία ακόμα φυγοκέντριση (1300rpm, 10 λεπτά) αφού αφαιρέθηκε το υπερκείμενο.
10. Προστέθηκε ξανά fixative solution (8-10ml) και τα δείγματα έμειναν στο ψυγείο overnight.

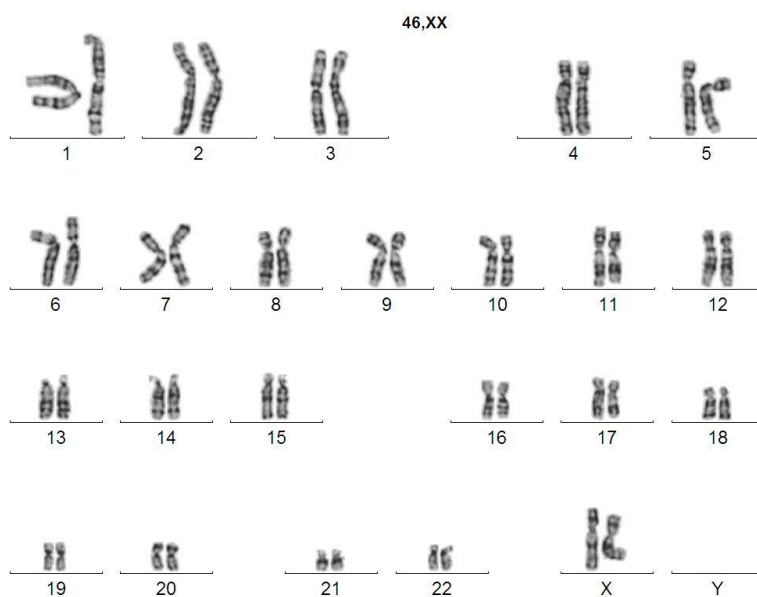
Η διαδικασία αυτή μας δίνει έτοιμα μονιμοποιημένα κύτταρα τα οποία στην συνέχεια θα περάσουν την διαδικασία της χρώσης για να γίνει η καρυστυπική ανάλυση. Από αυτά τα κύτταρα πήραμε και τα δείγματα για να ακολουθήσουμε το πρωτόκολλο για την interphase-FISH. Και οι δύο διαδικασίες περιγράφονται στη συνέχεια.

3.3.2 Διαδικασία χρώσης

Για τη διαδικασία της χρώσης ακολουθήθηκε η εξής διαδικασία:

1. Τα δείγματα από το ψυγείο όπου φυλάσσονταν, φυγοκεντρήθηκαν στα 1300rpm για 10 λεπτά και το υπερκείμενό τους απομακρύνθηκε.
2. Σε κάθε σωληνάριο προστέθηκε φρέσκο μονιμοποιητικό υλικό ανάλογα με την πυκνότητα του δείγματος ώστε να έχουμε την επιθυμητή πυκνότητα κυττάρων.
3. Από κάθε καλλιέργεια επιστρώθηκε υλικό σε δύο αντικειμενοφόρους πλάκες με αποτέλεσμα να έχουμε 4 συνολικά δείγματα προς ανάλυση για κάθε ασθενή (2x24ώρες & 2x48ώρες). Κάθε πλάκα ήταν ελαφρώς βρεγμένη με απεσταγμένο νερό για το καλύτερο άπλωμα του υλικού.
4. Για το στρώσιμο χρησιμοποιήθηκαν 2x15μl δείγματος (2 σταγόνες) για κάθε αντικειμενοφόρο.
5. Τα δείγματα στην συνέχεια επωάστηκαν στους 90°C, για 50λεπτά.
6. Η χρώση για τη ζώνωση έγινε με χρήση Giemsa. Πριν τοποθετηθούν στη χρωστική όμως έγινε επίδραση σε κάθε δείγμα με θρυψίνη, για 25 δευτερόλεπτα, που απλώθηκαν σε όλο το μήκος της κάθε αντικειμενοφόρου.
7. Αμέσως τα δείγματα ξεπλύθηκαν για 1-2 δευτερόλεπτα σε ισότονο NaCl.
8. Στη συνέχεια τοποθετήθηκαν στα δοχεία χρώσης για 10 λεπτά.
9. Με το πέρας των 10 λεπτών κάθε αντικειμενοφόρος ξεπλύθηκε σε νερό βρύσης και αφέθηκε να στεγνώσει.
10. Στο τελικό στάδιο σε κάθε πλάκα προστέθηκε μία σταγόνα κόλλας (Entellan) και τοποθετήθηκε επικαλυπτρίδα. Τα δείγματα έμειναν να στεγνώσουν σε συνθήκες δωματίου για τουλάχιστον 15 λεπτά και στη συνέχεια μελετήθηκαν.

Κάθε δείγμα αναλύθηκε σε οπτικό μικροσκόπιο με τη χρήση του λειτουργικού προγράμματος Ikaros της εταιρίας Metasystems και αξιολογήθηκε ο καρυότυπος που προέκυψε από τη διαδικασία για κάθε ασθενή.



Εικόνα 5. Παράδειγμα καρυότυπου. Παρουσιάζεται μετάφαση θήλεος με φυσιολογικό καρυότυπο

3.3.3 Πρωτόκολλο interphase-FISH

Όπως αναφέρθηκε για τη διαδικασία αυτή χρησιμοποιήσαμε τα μονιμοποιημένα κύτταρα από το στάδιο της καλλιέργειας. Επειδή η κυτταρογενετική ανάλυση των χρωμοσωμάτων με τη ζώνωση έγινε πρώτη, πριν ξεκινήσει το πρωτόκολλο έγινε ένας τυπικός καθαρισμός των δειγμάτων με φυγοκέντριση στα 1400rpm για 10 λεπτά, αφαίρεση υπερκειμένου και προσθήκη εκ νέου φρέσκο μονιμοποιητικό υλικό. Η διαδικασία αυτή έγινε 3-4 φορές για κάθε δείγμα και τελικά προστέθηκε τόσο φρέσκο μονιμοποιητικό υλικό όσο θεωρήθηκε απαραίτητο για τη σωστή πυκνότητα κάθε δείγματος. Όλες οι διεργασίες για την FISH έγιναν σε σκοτεινό δωμάτιο.

Με τα δείγματα έτοιμα για στρώσιμο η διαδικασία συνεχίστηκε ως εξής:

1. Σε αντικειμενοφόρο ελαφρώς βρεγμένη με απεσταγμένο νερό, στρώθηκαν 15μl δείγματος, μία σταγόνα δείγματος αυτή τη φορά. Κάθε αντικειμενοφόρος ελέγχθηκε σε μικροσκόπιο ως προς την πυκνότητα. Στην περίπτωση που θεωρήθηκε ότι η πυκνότητα εμποδίζει την ανάλυση, στρώθηκε καινούργια αντικειμενοφόρος πλάκα.
2. Όπως έχει αναφερθεί για τον υβριδισμό χρησιμοποιήθηκαν οι probes της εταιρίας MetaSystems, XL 7q22/7q36 (lot.19453/2020-11) και XL del(7)(q22.q31) (lot.19321, 2020-08). Σε κάθε σταγόνα δείγματος προστέθηκαν 5μl από τον probe που επιλέχθηκε να χρησιμοποιηθεί. Η πλειοψηφία των δειγμάτων έγινε με τον XL 7q22/7q36. Ο δεύτερος probe χρησιμοποιήθηκε μόνο στις περιπτώσεις που η περιοχή που έλειπε δεν ήταν ξεκάθαρα αντιληπτή, ως επιβεβαίωση του αποτελέσματος.
3. Με προσοχή τοποθετήθηκε επικαλυπτρίδα 18x18 και στις άκρες αυτής κόλλα (Fixogun) ώστε να μείνει ο probe στην περιοχή της καλυπτρίδας και να μην κινείται το υλικό.
4. Κάθε επικαλυπτρίδα τοποθετήθηκε στο ειδικό μηχάνημα ρύθμισης θερμοκρασίας (ThermoBrite), με συνθήκες, 75°C για 2λεπτά και 37°C overnight.
5. Την επόμενη μέρα τα πλακάκια απομακρύνθηκαν από το μηχάνημα και αφαιρέθηκε η κόλλα και η επικαλυπτρίδες.
6. Στη συνέχεια οι αντικειμενοφόροι τοποθετήθηκαν σε διάλυμα 0,4xSSC το οποίο βρίσκεται σε υδατόλουτρο και σε θερμοκρασία 72°C. Τα δείγματα έμειναν στο διάλυμα για 2λεπτά σύμφωνα με τις προδιαγραφές του παρασκευαστή.
7. Αμέσως μετά τοποθετήθηκαν σε διάλυμα 2xSSC+Tween20 (0.05%), για 30δευτερόλεπτα.
8. Με το πέρας των χρόνων αυτών τα δείγματα ξεπλύθηκαν με απεσταγμένο νερό και αφέθηκαν να στεγνώσουν σε συνθήκες δωματίου αλλά κάτω από φελιζολένιο κουτί για την αποφυγή επίδρασης φωτός.
9. Τελικό στάδιο πριν την ανάλυση, σε κάθε δείγμα προστέθηκαν 10μl διαλύματος DAPI (0.02%) (DAPI+Vectashield) καλύφθηκαν με επικαλυπτρίδα 22x22.

Τα δείγματα αποθηκεύτηκαν στο ψυγείο πριν την ανάλυση. Η ανάλυση έγινε με μικροσκόπιο φθορισμού και τη βοήθεια του λειτουργικού συστήματος ISIS της εταιρίας MetaSystems.

4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

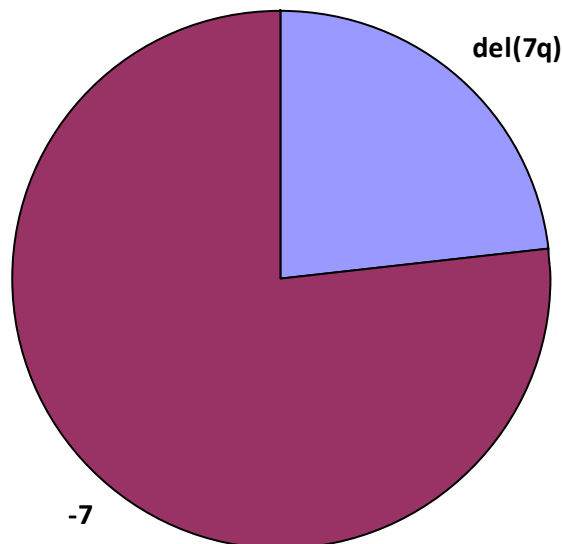
Τα αποτελέσματα των πειραματικών διεργασιών παρατίθενται στη συνέχεια. Το συνολικό δείγμα ήταν 47 ασθενείς (30 άνδρες και 17 γυναίκες) με μονήρεις αλλοιώσεις του 7, δηλαδή μονοσωμία ή έλλειψη του μακρύ βραχίονα. Από τους ασθενείς αυτούς συλλέχτηκε δείγμα μυελού των οστών σε δειγματικό σωλήνα με ηπαρίνη. Για κάθε χρωμοσωματική ανάλυση αξιολογήθηκαν 25 μεταφάσεις ενώ για κάθε ανάλυση i-FISH 200 πυρήνες κυττάρων. Όλα τα δεδομένα περιγράφονται και με αναγωγή σε ποσοστά (%) και αξιολογούνται στατιστικά με τη διαδικασία χ^2 (CI 95%).

Στους ασθενείς με del(7q) και στην περίπτωση που η έλλειψη στον καρυότυπο δεν ήταν ξεκάθαρη και η iFISH με τον βασικό probe (XL 7q22/7q36) δεν ήταν επαρκής για ένα ασφαλές αποτέλεσμα, η διαδικασία επαναλήφθηκε με τον probe XL del(7)(q22.q31). Συγκεκριμένα, 8 από τους 11 ασθενείς με del(7q) ελέγχθηκαν με τον βασικό ιχνηθέτη XL 7q22/7q36 ενώ σε 3 ασθενείς τα αποτελέσματα δεν ήταν ακριβή και χρησιμοποιήθηκε και ο ιχνηθέτης XL del(7)(q22.q31) .

Η πλειοψηφία των δειγμάτων εμφάνισε μονοσωμία 7 στον καρυότυπο (36/47 ασθενείς) και τα αποτελέσματα επιβεβαιώθηκαν με την i-FISH αφού σε αυτούς παρατηρήθηκε το αλλοιωμένο πρότυπο υβριδισμού 1A-1R-1G που δηλώνει τη μονοσωμία.

Οι περιπτώσεις με del(7q) για το συγκεκριμένο δείγμα ήταν λιγότερες με 11 στους 47 ασθενείς να παρουσιάζουν ελλείψεις στον μακρύ βραχίονα του χρωμοσώματος. Οι περιοχές έλλειψης προσδιορίστηκαν με μεγαλύτερη ακρίβεια με την ανάλυση iFISH.

ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ ΜΔΣ ΚΑΙ ΜΟΝΗΡΕΙΣ ΑΛΛΟΙΩΣΕΙΣ ΤΟΥ 7



4.1 Καρυοτυπική ανάλυση

Η καρυοτυπική ανάλυση των δειγμάτων έκανε εφικτή την αρχική επιλογή των ασθενών. Όπως αναφέρθηκε επελέγησαν οι ασθενείς με μονήρεις αλλοιώσεις στο 7. Επίσης ο καρυότυπος στις περιπτώσεις ελλείψεων έδειξε σε πρώτη φάση την ελλείπουσα σε κάθε περίπτωση περιοχή. Τα αποτελέσματα αυτά επιβεβαιώθηκαν ή διευκρινίστηκαν περαιτέρω με την ανάλυση iFISH. Οι πίνακες 7 και 8 παραθέτουν τα αποτελέσματα των καρυοτυπικών αναλύσεων των δειγμάτων. Στις εικόνες που τους ακολουθούν παρουσιάζονται παραδείγματα καρυότυπων των κλώνων που παρατηρήθηκαν.

Πίνακας 7. Αποτελέσματα της καρυοτυπικής ανάλυσης των ασθενών με ΜΔΣ και μονήρη μονοσωμία 7. Όλοι οι ασθενείς είχαν καρυότυπο κλώνο 45,ΧΧ(ΧΥ),-7.

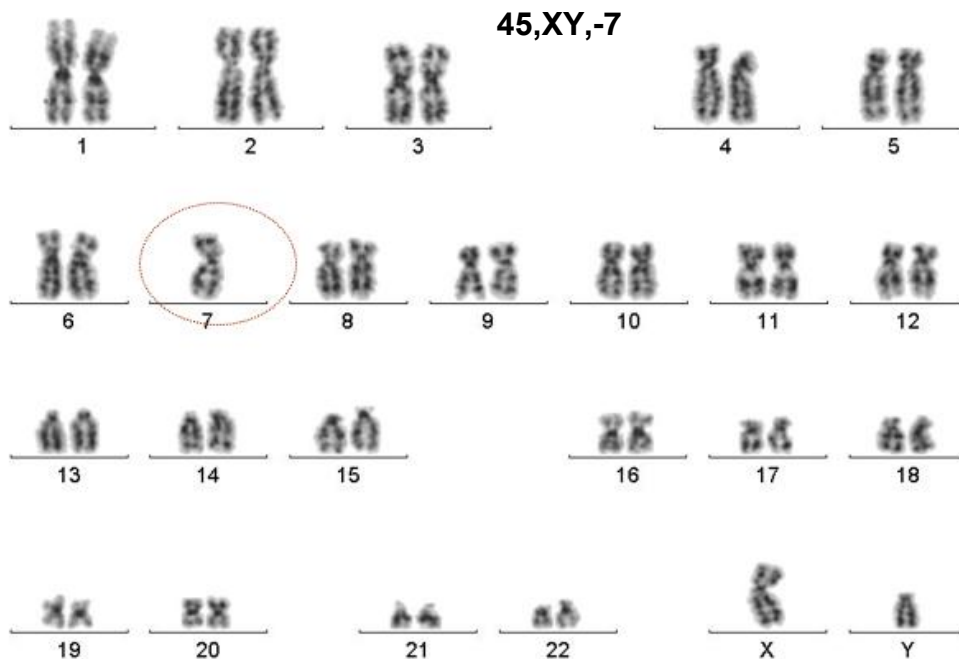
ΑΡΙΘΜΟΣ ΑΣΘΕΝΟΥΣ	ΠΟΣΟΣΤΟ ΚΛΩΝΟΥ %	ΜΕΓΕΘΟΣ ΚΛΩΝΟΥ (ΜΕΤΑΦΑΣΕΙΣ)	ΑΡΙΘΜΟΣ ΑΣΘΕΝΟΥΣ	ΠΟΣΟΣΤΟ ΚΛΩΝΟΥ %	ΜΕΓΕΘΟΣ ΚΛΩΝΟΥ (ΜΕΤΑΦΑΣΕΙΣ)
2	100%	[25/25]	23	72%	[18/25]
3	100%	[25/25]	24	6%	[2/35]
4	83%	[5/6]	25	100%	[25/25]
5	20%	[5/25]	28	100%	[25/25]
6	48%	[12/25]	29	32%	[8/25]
8	96%	[24/25]	33	60%	[15/25]
9	60%	[15/25]	34	50%	[8/16]
10	40%	[10/25]	35	94%	[15/16]
11	96%	[24/25]	36	100%	[25/25]
12	100%	[25/25]	37	100%	[25/25]
14	56%	[14/25]	39	100%	[25/25]
15	52%	[13/25]	40	90%	[18/20]
16	92%	[23/25]	41	100%	[25/25]
18	82%	[9/11]	42	84%	[15/18]
19	100%	[25/25]	44	100%	[25/25]
20	76%	[19/25]	45	85%	[17/20]
21	100%	[25/25]	46	25%	[5/20]
22	24%	[6/25]	48	75%	[3/4]

Σημείωση: Το σύνολο των ασθενών με μονοσωμία 7 είναι 36. Από αυτούς 23 ήταν άνδρες και 13 γυναίκες. Για κάθε δείγμα ακολουθήθηκε το πρωτόκολλο ανάλυσης 25 μεταφάσεων. Σε όσα δείγματα αυτό δεν ήταν εφικτό, μετρήθηκε ο μέγιστος διαθέσιμος αριθμός μεταφάσεων.

Πίνακας 8. Αποτελέσματα της καρυοτυπικής ανάλυσης των ασθενών με ΜΔΣ και μονήρη έλλειψη του μακρύ βραχίονα (q) του χρωμοσώματος 7.

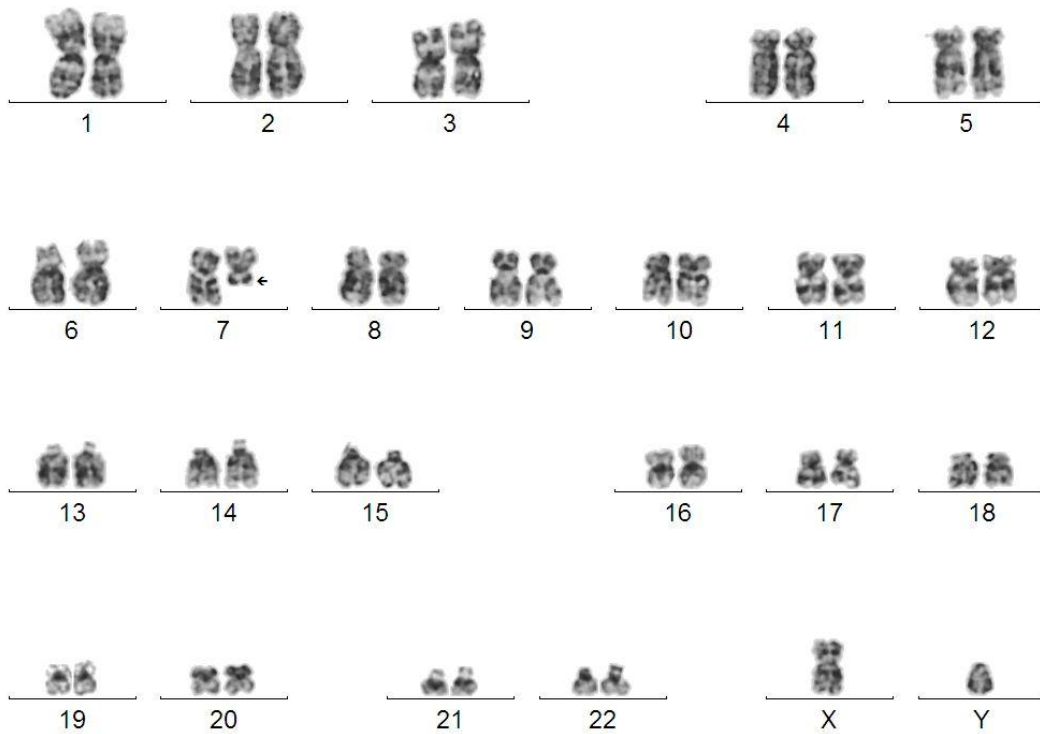
ΑΡΙΘΜΟΣ ΑΣΘΕΝΟΥ Σ	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑ ΚΑΡΥΟΤΥΠΙΚΗΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ	ΜΕΓΕΘΟΣ ΚΛΩΝΟΥ (ΜΕΤΑΦΑΣΕΙΣ)	ΠΟΣΟΣΤΟ ΚΛΩΝΟΥ %
1	46,XY,del(7)(q22q32)	[2/35]	6%
7	46,XY,del(7)(q22)	[25/25]	100%
13	46,XY,del(7)(q22)	[25/25]	100%
17	46,XX,del(7)(q22q32)	[13/25]	52%
26	46,XX,del(7)(q22)	[9/12]	75%
27	46,XX,del(7)(q22q32)	[23/25]	92%
30	46,XY,del(7)(q22q32)	[6/25]	24%
31	46,XY,del(7)(q11.2q32)	[6/20]	30%
32	46,XY,del(7)(q22q33)	[25/25]	100%
38	46,XY,del(7)(q22q32)	[5/25]	20%
43	46,XX,del(7)(q22)	[25/25]	100%

Σημείωση: Το σύνολο των ασθενών με μονοσωμία del(7q) είναι 11. Από αυτούς 7 ήταν άνδρες και 4 γυναίκες. Για κάθε δείγμα ακολουθήθηκε το πρωτόκολλο ανάλυσης 25 μεταφάσεων. Σε όσα δείγματα αυτό δεν ήταν εφικτό, μετρήθηκε ο μέγιστος διαθέσιμος αριθμός μεταφάσεων.



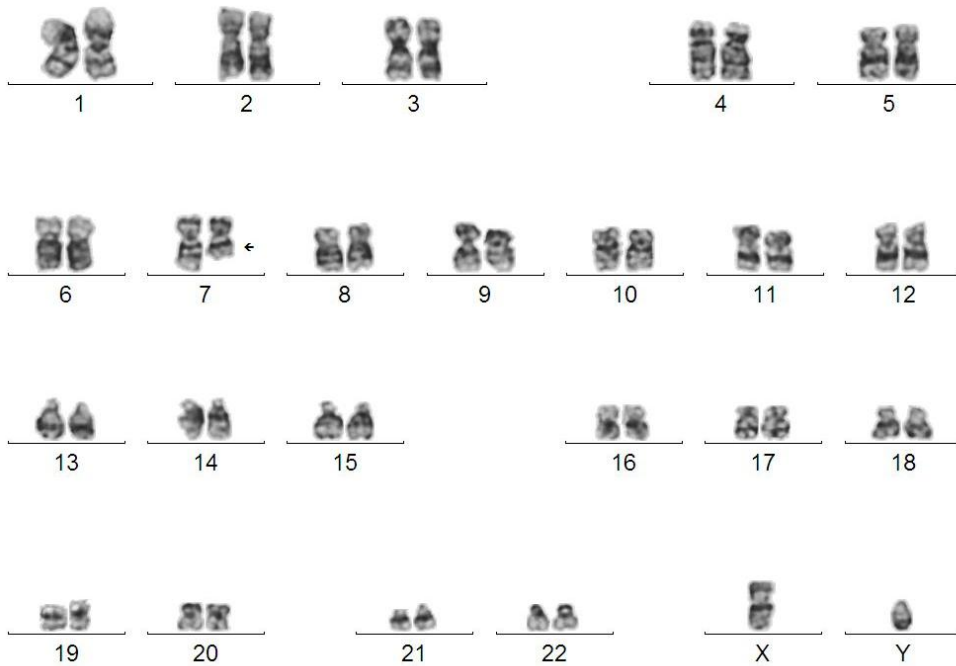
Εικόνα 6. Καρυότυπος του άρρενος ασθενή #2 που εμφανίζει μονοσωμία 7. Επισημαίνεται η απώλεια ολόκληρου του χρωμοσώματος.

46,XY,del(7)(q22)

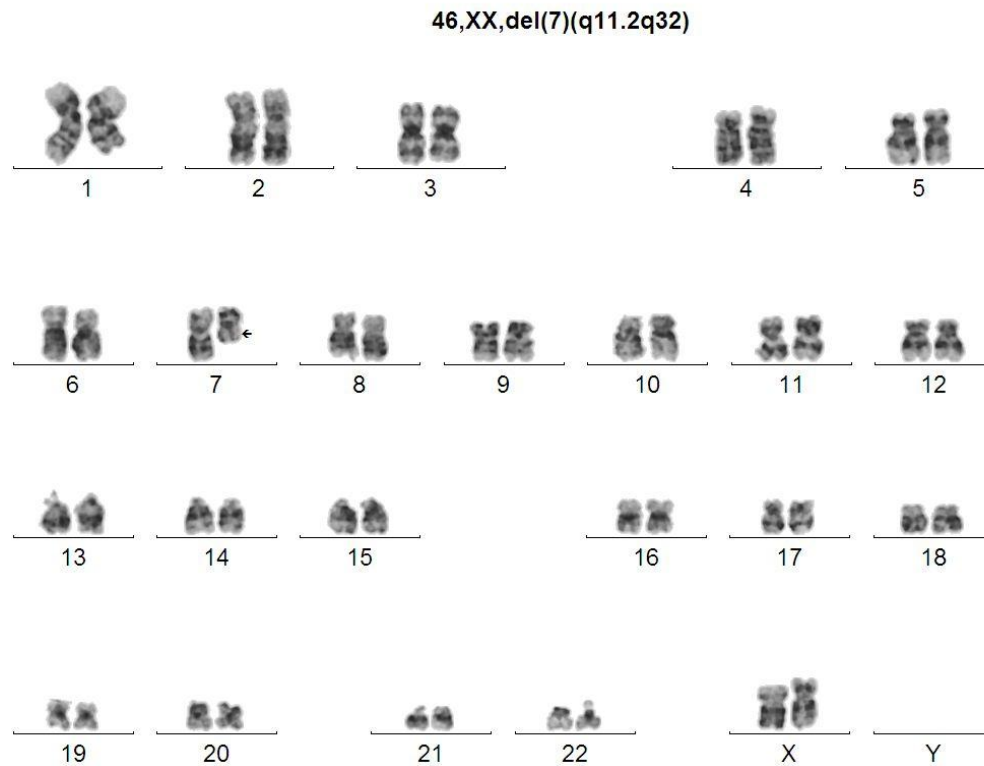


Εικόνα 7. Καρυότυπος του θήλεος ασθενή #7 που εμφανίζει έλλειψη στον βραχίονα q του χρωμοσώματος 7. Με βέλος επισημαίνεται η έλλειψη. Η έλλειψη στον καρυότυπο περιγράφεται ως τελική, όμως στον ασθενή αυτό η iFISH έδειξε ότι η 7q36 περιοχή βρέθηκε ότι υπάρχει στο ελλειπτικό χρωμόσωμα 7.

46,XY,del(7)(q22q32)



Εικόνα 8. Καρυότυπος του άρρενος ασθενή #1 που εμφανίζει έλλειψη στον βραχίονα q του χρωμοσώματος 7. Με βέλος επισημαίνεται η έλλειψη. Η έλλειψη στον καρυότυπο περιγράφεται ως ενδιάμεση.



Εικόνα 9. Καρυότυπος του θήλεος ασθενή #7 που εμφανίζει έλλειψη στον βραχίονα q του χρωμοσώματος 7. Με βέλος επισημαίνεται η έλλειψη. Η έλλειψη στον καρυότυπο περιγράφεται ως ενδιάμεση. Στον ασθενή αυτόν η iFISH έδειξε πως λείπει και 7q36 περιοχή.

4.2 Υπολογισμός ορίων cutoff

Για την σωστή αξιολόγηση των αποτελεσμάτων της μοριακής κυτταρογενετικής ανάλυσης (iFISH) που ακολούθησε της καρυοτυπικής, ήταν προηγουμένως απαραίτητος ο υπολογισμός των ορίων cutoff, των τιμών δηλαδή κάτω των οποίων τα αποτελέσματα θεωρούνται στατιστικά λάθη, εσφαλμένα θετικά, και δεν υπολογίζονται.

Επομένως, για τους primers XL 7q22/7q36 & XL del(7)(q22q31) της εταιρίας Metasystems που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία, υπολογίστηκαν τα όρια cutoff των μετρήσεων πυρήνων για την i-FISH (interphase FISH) στις ίδιες συνθήκες που εφαρμόστηκαν για την ανάλυση των δειγμάτων.

Χρησιμοποιήθηκαν 10 υγιείς μάρτυρες, 7 γυναίκες και 3 άντρες, με μέσο όρο ηλικίας τα 35 έτη. Οι στατιστικοί τύποι που χρησιμοποιήθηκαν είναι ο $\bar{x}+3SD$ επί % (όπου SD η τυπική απόκλιση και \bar{x} η μέγιστη τιμή των αλλοιωμένων πυρήνων των μαρτύρων) και ο τύπος της συνάρτησης β-inverse (υπολογισμός μέσω του υπολογιστικού φύλλου excel). Σε κάθε περίπτωση η τιμή «μηδέν πυρήνες» υπολογίστηκε με τον ελάχιστο αριθμό πυρήνων (1), όπως φαίνεται στην περίπτωση του αλλοιωμένου προτύπου «1A-1R-1G». Οι δύο αυτοί τρόποι υπολογισμού των τιμών cutoff, δεν παρουσίασαν μεγάλες αποκλίσεις όμως επιλέχτηκε ο πρώτος τύπος ως μέτρο αναφοράς. Τα αποτελέσματα των αναλύσεων και οι υπολογισμοί παρουσιάζονται στον πίνακα που ακολουθεί. Στον πίνακα αυτό παρουσιάζονται τα κυριότερα αλλοιωμένα πρότυπα υβριδισμού τα οποία δείχνουν μονοσωμία 7 ή del(7), τα οποία είναι και τα μόνα που παρατηρήθηκαν στους μάρτυρες. Οποιοδήποτε άλλο πρότυπο θεωρείται ότι έχει τιμή μηδέν στους μάρτυρες και ακολουθεί το πρότυπο της περίπτωσης «1A-1R-1G».

Πίνακας 9. Αποτελέσματα ανάλυσης μαρτύρων και υπολογισμός ορίων cutoff

ΚΑΡΥΟΤΥΠΟΣ	FISH (probe: XL 7q22/7q36 , Metasystems) Cep7(Aqua)/7q22(Red)/7q36(Green)						
	Φυσιολογικό πρότυπο (πυρήνες) 2A-2R-2G	Αλλοιωμένα πρότυπα υβριδισμού (πυρήνες)					
		1A-1R-1G	2A-2R-1G	2A-1R-1G	1A-2R-2G	1A-1R-2G	2A-1R-2G
46,XX	99% (198/200)	0	0	0.5% (1/200)	0.5% (1/200)	0	0
46,XY	99% (198/200)	0	0	0	1% (2/200)	0	0
46,XX	100% (200/200)	0	0	0	0	0	0
46,XX	100% (200/200)	0	0	0	0.5% (1/200)	0	0
46,XX	96% (192/200)	0	0,5% (1/200)	1% (2/200)	0	0	2,5% (5/200)
46,XY	98% (196/200)	0	0,5% (1/200)	1% (2/200)	0	0	0,5% (1/200)
46,XX	99% (198/200)	0	0	0	0	0	1,5% (3/200)
46,XY	96% (192/200)	0	0,5% (1/200)	0	1,5% (3/200)	2% (4/200)	0,5% (1/200)
46,XX	100% (200/200)	0	0	0	0	0	0
46,XX	100% (200/200)	0	0	0,5% (1/200)	0	0	0
<i>Μέγιστος αριθμός αλλοιωμένου προτύπου που παρατηρήθηκε:</i>		0	1	2	3	4	5
<i>Cutoff (beta inverse function):</i>		1.5% (3/200)	2.5% (5/200)	3% (6/200)	4% (8/200)	4,5% (9/200)	5% (10/200)
Cutoff ($\bar{x}+3SD$):		2% (4/200)	2% (4/200)	3% (6/200)	4% (8/200)	5% (10/200)	6% (12/200)

4.3 Μοριακή κυτταρογενετική ανάλυση – interphase FISH

Στα ίδια δείγματα που αναλύθηκαν καρυοτυπικά, ακολούθησε μοριακή κυτταρογενετική ανάλυση με μεσοφασικό φθορίζον *in situ* υβριδισμό (iFISH). Οι 36 ασθενείς με μονοσωμία 7 εμφάνισαν το αλλοιωμένο πρότυπο υβριδισμού 1A-1R-1G που σημαίνει ότι παρατηρήθηκε ένα μόνο χρωμόσωμα 7. Ο ιχνηθέτης που χρησιμοποιήθηκε σημαίνει με μπλε (Aqua,A) το κεντρομερίδιο του 7, με κόκκινο (Red,R) την 7q22 περιοχή και με πράσινο (Green,G) την 7q36 ή την 7q31, ανάλογα με τον ιχνηθέτη.

Στους ασθενείς με έλλειψη στον μακρύ βραχίονα του 7 παρατηρήθηκαν 3 διαφορετικά πρότυπα χρωμοσωματικών αλλοιώσεων. Για τους 6/11 ασθενείς η έλλειψη φάνηκε να περιλαμβάνει την 7q22 περιοχή ενώ η 7q36 παραμένει στο χρωμόσωμα, για 4/11 η έλλειψη περιελάμβανε τόσο τη 7q22 όσο και τη 7q36 και τέλος μόνο ένας ασθενής είχε έλλειψη ενδιάμεσα και των 2 αυτών περιοχών με την 7q36 αλλά και την 7q22 παρούσες. Στην τελευταία αυτή περίπτωση το αποτέλεσμα επιβεβαιώθηκε με τον *del(7)(q22.q31)* με τον οποίο βρέθηκε έλλειψη της 7q31 περιοχής. Όλες οι ελλείψεις ήταν ενδιάμεσες.

Οι πίνακες 10 και 11 παραθέτουν τα αποτελέσματα των αναλύσεων iFISH των δειγμάτων. Στις εικόνες που τους ακολουθούν παρουσιάζονται παραδείγματα πυρήνων που παρατηρήθηκαν με τα αλλοιωμένα πρότυπα υβριδισμού.

Πίνακας 10. Αποτελέσματα μοριακής κυτταρογενετικής (iFISH) ανάλυσης των ασθενών με ΜΔΣ και μονήρη έλλειψη του μακρύ βραχίονα (q) του χρωμοσώματος 7. Για την iFISH χρησιμοποιήθηκε ο ιχνηθέτης XL 7q22/7q36 της εταιρίας MetaSystems.

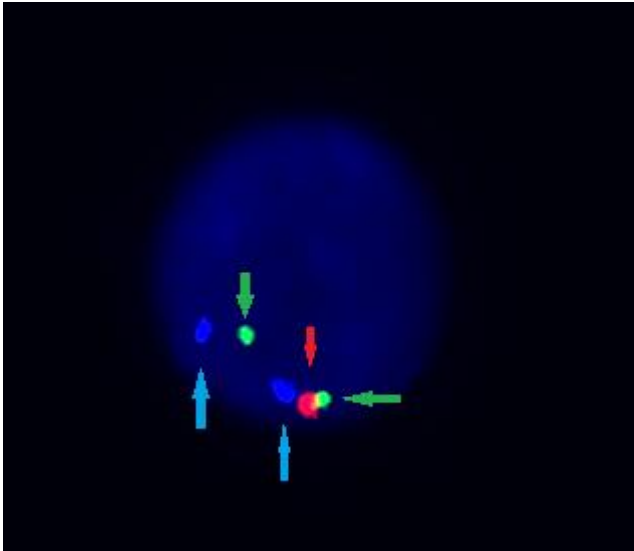
ΑΡΙΘΜΟΣ ΑΣΘΕΝΟΥΣ	ΑΛΛΟΙΩΜΕΝΟ ΠΡΟΤΥΠΟ ΥΒΡΙΔΙΣΜΟΥ (A-R-G)*	ΠΥΡΗΝΕΣ ΜΕ ΑΛΛΟΙΩΜΕΝΟ ΠΡΟΤΥΠΟ ΥΒΡΙΔΙΣΜΟΥ	ΕΛΛΕΙΨΗ 7q22 ΠΕΡΙΟΧΗΣ	ΕΛΛΕΙΨΗ 7q36 ΠΕΡΙΟΧΗΣ	ΠΟΣΟΣΤΟ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΜΕ ΑΛΛΟΙΩΜΕΝΟ ΠΡΟΤΥΠΟ ΥΒΡΙΔΙΣΜΟΥ %
1	2-1-2	[20/200]	ΝΑΙ	ΟΧΙ	10%
7	2-1-1	[180/200]	ΝΑΙ	ΝΑΙ	90%
13	2-1-1	[186/200]	ΝΑΙ	ΝΑΙ	93%
17	2-1-2	[50/200]	ΝΑΙ	ΟΧΙ	25%
26**	2-1-1	[134/200]	ΝΑΙ	ΟΧΙ	67%
27**	2-2-1	[150/200]	ΟΧΙ	ΟΧΙ	75%
30	2-1-2	[22/200]	ΝΑΙ	ΟΧΙ	11%
31**	2-1-1	[26/200]	ΝΑΙ	ΝΑΙ	13%
32	2-1-2	[188/200]	ΝΑΙ	ΟΧΙ	94%
38	2-1-2	[46/200]	ΝΑΙ	ΟΧΙ	23%
43	2-1-1	[184/200]	ΝΑΙ	ΝΑΙ	92%

* A-R-G: Μπλε (Aqua,A), Κόκκινο (Red,R), Πράσινο (Green,G). Είναι τα σήματα όπως φαίνονται και καταγράφονται στην ανάλυση iFISH με αυτούς τους ιχνηθέτες.

**Οι ασθενείς 26,27 & 31 ελέγχθηκαν με τον ιχνηθέτη XL *del(7)(q22.q31)* επομένως το αλλοιωμένο πρότυπο υβριδισμού αναφέρεται στις περιοχές 7q22 και 7q31.

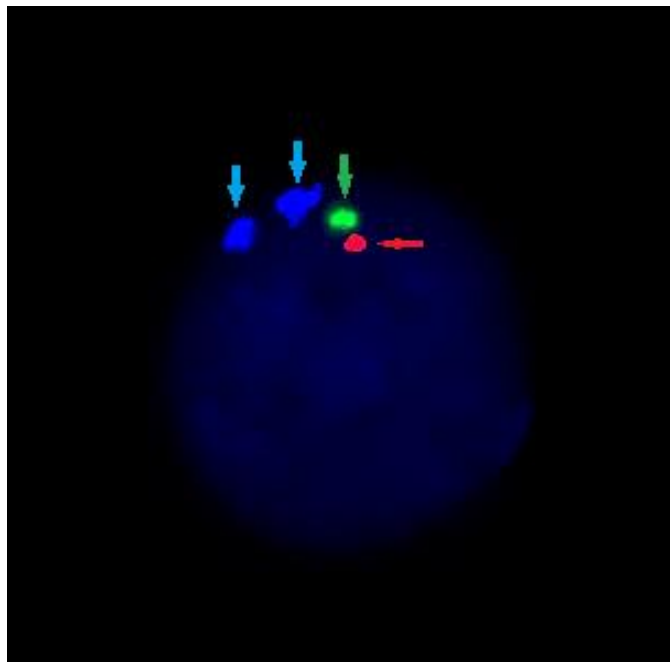
Πίνακας 11. Αποτελέσματα μοριακής κυτταρογενετικής (iFISH) ανάλυσης των ασθενών με ΜΔΣ και μονήρη έλλειψη του μακρύ βραχίονα (q) του χρωμοσώματος 7. Για την iFISH χρησιμοποιήθηκε ο ιχνηθέτης XL 7q22/7q36 της εταιρίας MetaSystems. Όλα τα δείγματα είχαν αλοιωμένο πρότυπο υβριδισμού 1A-1R-1G που σημαίνει ότι έλειπε όλο το χρωμόσωμα 7.

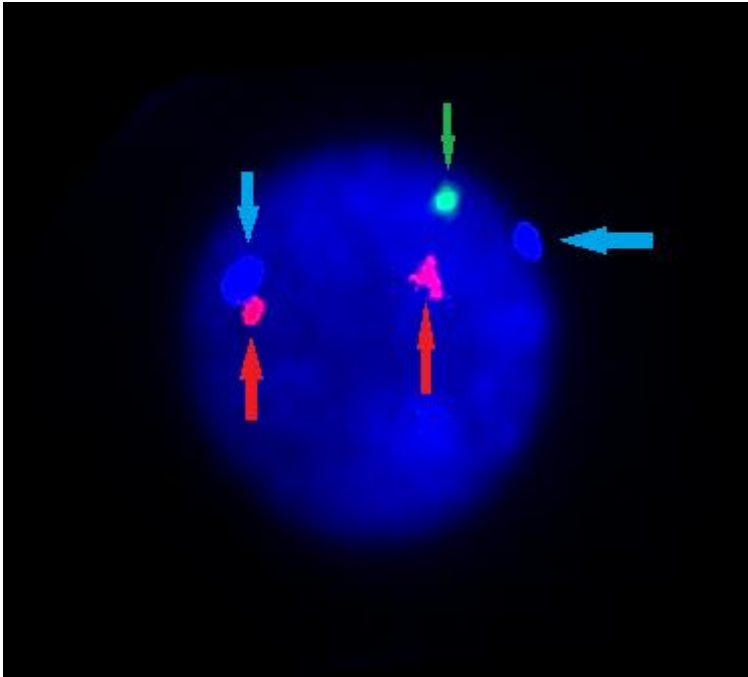
ΑΡΙΘΜΟΣ ΑΣΘΕΝΟΥΣ	ΠΟΣΟΣΤΟ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΜΕ ΑΛΛΟΙΩΜΕΝΟ ΠΡΟΤΥΠΟ ΥΒΡΙΔΙΣΜΟΥ %	ΠΥΡΗΝΕΣ ΜΕ ΑΛΛΟΙΩΜΕΝΟ ΠΡΟΤΥΠΟ ΥΒΡΙΔΙΣΜΟΥ	ΑΡΙΘΜΟΣ ΑΣΘΕΝΟΥΣ	ΠΟΣΟΣΤΟ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΜΕ ΑΛΛΟΙΩΜΕΝΟ ΠΡΟΤΥΠΟ ΥΒΡΙΔΙΣΜΟΥ %	ΠΥΡΗΝΕΣ ΜΕ ΑΛΛΟΙΩΜΕΝΟ ΠΡΟΤΥΠΟ ΥΒΡΙΔΙΣΜΟΥ
2	64%	[128/200]	23	72%	[144/200]
3	86%	[172/200]	24	24%	[48/200]
4	38%	[76/200]	25	94%	[188/200]
5	70%	[140/200]	28	77%	[154/200]
6	60%	[120/200]	29	42%	[84/200]
8	78%	[156/200]	33	53%	[106/200]
9	22%	[44/200]	34	50%	[100/200]
10	40%	[80/200]	35	63%	[126/200]
11	90%	[180/200]	36	81%	[162/200]
12	84%	[168/200]	37	76%	[152/200]
14	60%	[120/200]	39	40%	[80/200]
15	67%	[134/200]	40	44%	[88/200]
16	90%	[180/200]	41	72%	[144/200]
18	61%	[122/200]	42	67%	[134/200]
19	51%	[102/200]	44	88%	[176/200]
20	85%	[170/200]	45	55%	[110/200]
21	74%	[148/200]	46	75%	[150/200]
22	39%	[78/200]	48	43%	[86/200]



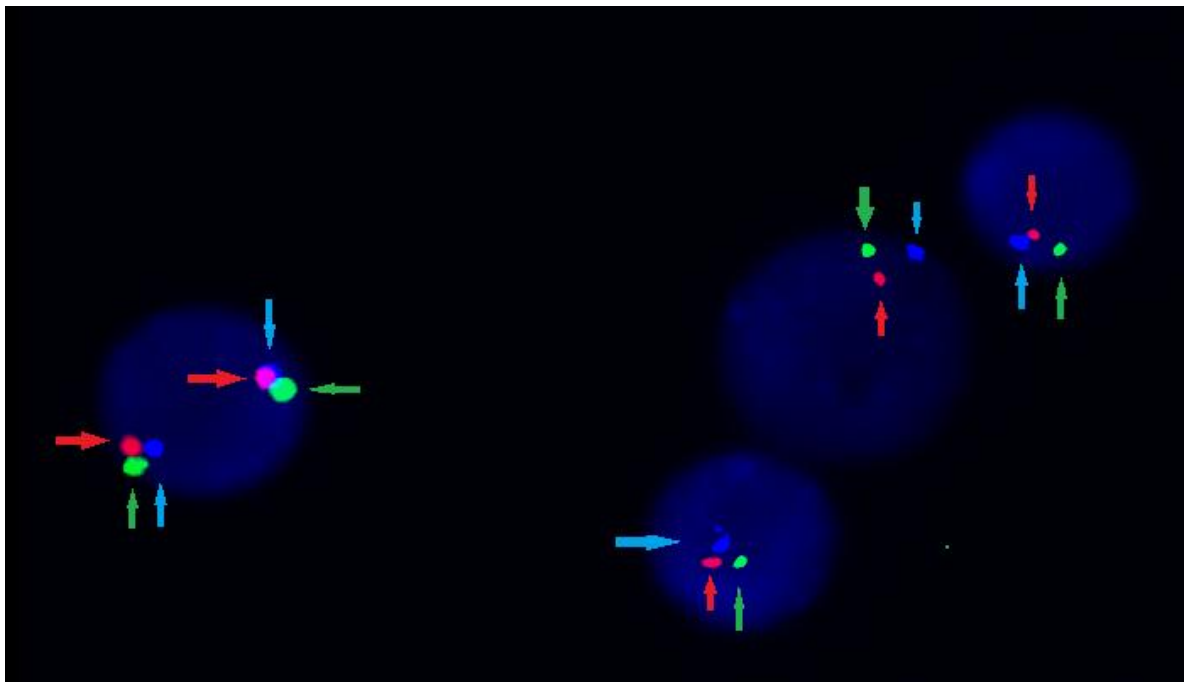
Εικόνα 10. Πυρήνας κυτάρου με το αλλοιωμένο πρότυπο 2-1-2 (Έλλειψη της 7q22 αλλά όχι της 7q36). Με μπλε φαίνονται τα κεντρομερίδια του ζεύγους των χρωμοσωμάτων 7, με κόκκινο η περιοχή 7q22 και με πράσινο η 7q36 περιοχή.

Εικόνα 11. Πυρήνας με το αλλοιωμένο πρότυπο 2-1-1 (Έλλειψη που περιλαμβάνει και τις 2 περιοχές, 7q22 και 7q36). Με μπλε σημαίνονται τα κεντρομερίδια των 7 χρωμοσωμάτων, με κόκκινο η περιοχή 7q22 και με πράσινο η 7q36.





Εικόνα 12. Πυρήνας με το αλλοιωμένο πρότυπο υβριδισμού 2-2-1 (Έλλειψη που περιέχει την περιοχή 7q31). Με μπλε σημαίνονται τα κεντρομερίδια των 7 χρωμοσωμάτων, με κόκκινο η περιοχή 7q22 και με πράσινο η 7q31.



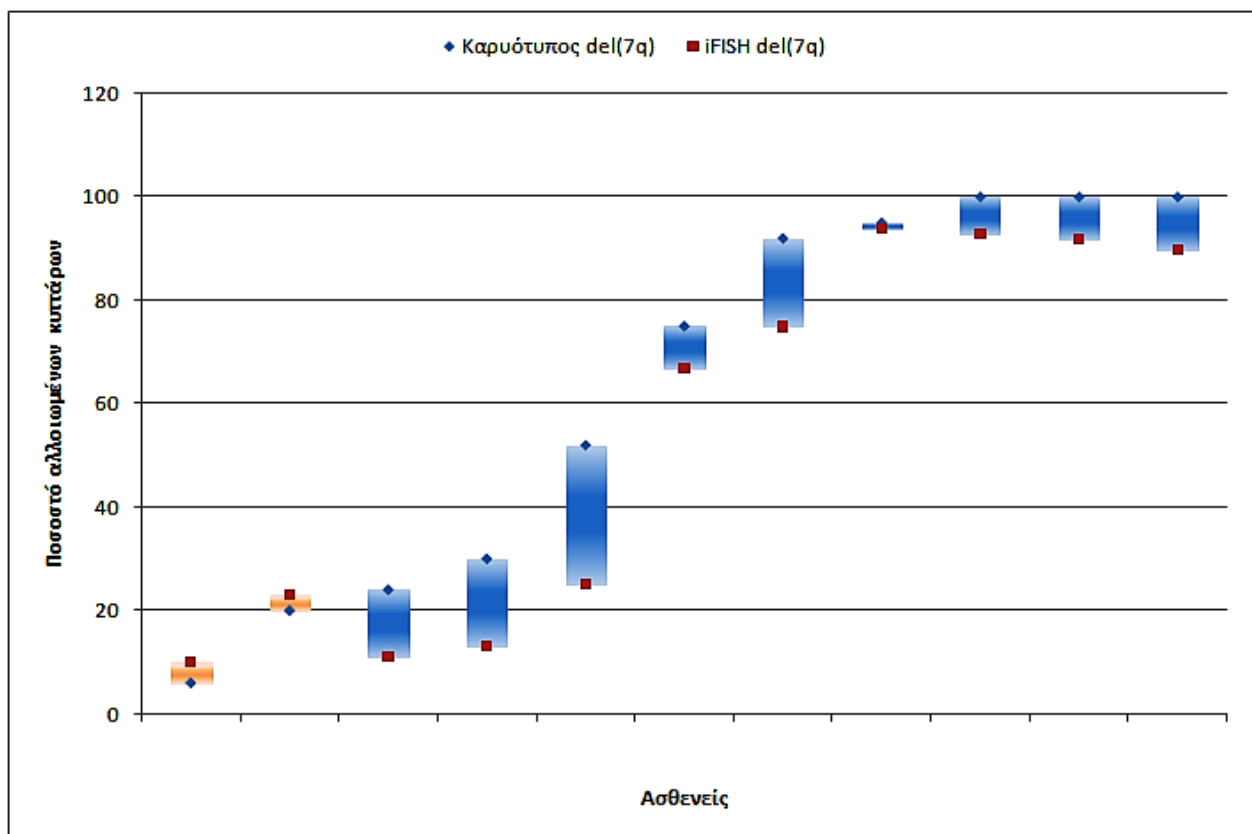
Εικόνα 13. Δεξιά: Πυρήνας με το φυσιολογικό πρότυπο υβριδισμού. Αριστερά: Πυρήνες με το αλλοιωμένο πρότυπο υβριδισμού 1-1-1 (Μονοσωμία 7). Με μπλε σημαίνονται τα κεντρομερίδια των 7 χρωμοσωμάτων, με κόκκινο η περιοχή 7q22 και με πράσινο η 7q36.

4.4 Πλεονέκτημα πολλαπλασιασμού (Proliferative advantage) των αλλοιωμένων κυττάρων

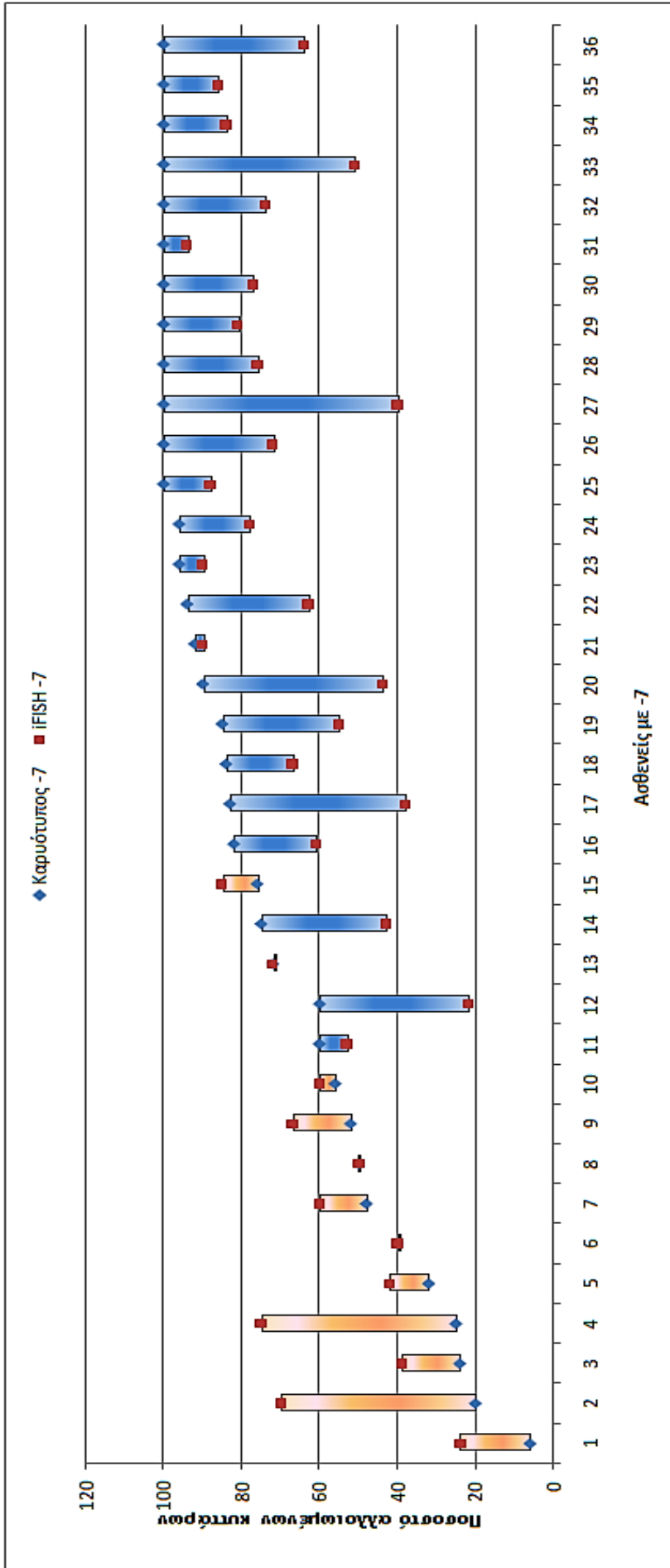
Τα αποτελέσματα των αναλύσεων μας οδήγησαν στο συμπέρασμα ότι τα κύτταρα που φέρουν την αλλοίωση τόσο στην περίπτωση των μονοσωμιών όσο και των ελλείψεων παρουσιάζουν πλεονέκτημα πολλαπλασιασμού. Μάλιστα όσο μεγαλύτερος ήταν ο κλώνος τόσο πιο εμφανές ήταν το πλεονέκτημα. Να σημειωθεί ότι από τα αποτελέσματα φαίνεται επίσης ότι το πλεονέκτημα πολλαπλασιασμού είναι μεγαλύτερο στην μονοσωμία συγκριτικά με τις περιπτώσεις έλλειψης. Η παρατήρηση αυτή έρχεται σε συμφωνία με την άποψη ότι η μονοσωμία υποδεικνύει χειρότερη πρόγνωση έναντι της έλλειψης και ταχύτερη εξέλιξη σε οξεία μυελογενή λευχαιμία.

Στις εικόνες 14 και 15 παρουσιάζονται τα ποσοστά των αλλοιωμένων κυττάρων που παρατηρήθηκαν σε κάθε ανάλυση και η διαφορά των γραμμών που αντιστοιχεί σε κάθε ανάλυση, με αυτήν που αντιπροσωπεύει τον καρυότυπο να είναι μεγαλύτερη αυτής της iFISH. Τα σημεία που αυτό δεν συμβαίνει δηλώνουν ασθενείς με μικρό κλώνο στον καρυότυπο γεγονός που κάνει λιγότερο εμφανές το πλεονέκτημα πολλαπλασιασμού.

Στην παρούσα μελέτη διερευνήθηκε και η ύπαρξη υποκλώνων που να δηλώνουν την εξέλιξη της νόσου από την ομάδα μεσαίας πρόγνωσης που φέρει την αλλοίωση del(7q) στην κακής πρόγνωσης με την αλλοίωση 7, όπως προτείνεται για την αλλοίωση del(5q). Στο δείγμα μας δεν παρατηρήθηκαν ανάλογα ευρήματα που να υποστηρίζουν αυτή την πρόταση.



Εικόνα 14. Διάγραμμα που παρουσιάζει το ποσοστό των αλλοιωμένων κυττάρων των 11 ασθενών με del(7q), από τον ασθενή με τον μικρότερο κλώνο στον καρυότυπο μέχρι τον ασθενή με τον μεγαλύτερο. Κάθε σημείο δηλώνει έναν ασθενή. Με μπλε είναι τα ποσοστά του κλώνου στον καρυότυπο και με κόκκινο τα ποσοστά των αλλοιωμένων κυττάρων στην iFISH. Παρατηρείται ότι στην πλειοψηφία των αποτελεσμάτων το μπλε υπερτερεί του κόκκινου και δείχνει ότι το ποσοστό του κλώνου στον καρυότυπο είναι μεγαλύτερο του κλώνου που αξιολογήθηκε από την iFISH, κάνοντας εμφανές το πλεονέκτημα πολλαπλασιασμού. Να σημειωθεί ότι οι μπλε ράβδοι (πλεονέκτημα πολλαπλασιασμού) δεν παρατηρούνται σε μικρό κλώνο στον καρυότυπο (<30%)



Εικόνα 15. Διάγραμμα που παρουσιάζει το ποσοστό των αλλοιωμένων κυττάρων των 36 ασθενών με -7, από τον ασθενή με τον μικρότερο κλώνο στον καρυότυπο μέχρι τον ασθενή με τον μεγαλύτερο. Κάθε σημείο δηλώνει έναν ασθενή. Με μπλε είναι τα ποσοστά του κλώνου στον καρυότυπο και με κόκκινο τα ποσοστά των αλλοιωμένων κυττάρων στην iFISH. Παρατηρείται ότι στην πλειοψηφία των αποτελεσμάτων το μπλε υπερτερεί του κόκκινου και δείχνει ότι το ποσοστό του κλώνου στον καρυότυπο είναι μεγαλύτερο του κλώνου που αξιολογήθηκε από την iFISH, κάνοντας εμφανές το πλεονέκτημα πολλαπλασιασμού. Να σημειωθεί ότι οι μπλε ράβδοι (πλεονέκτημα πολλαπλασιασμού) παρατηρούνται στις περιπτώσεις με μεγάλο κλώνο στον καρυότυπο >55%)

5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Οι κυτταρογενετικές αλλοιώσεις στα Μυελοδυσπλαστικά Σύνδρομα μεταβάλλουν την αιμοποιητική διαφοροποίηση, το πλήθος των αιμοποιητικών κυττάρων, το ποσοστό των βλαστών στον μυελό, την εξέλιξη σε οξεία λευχαιμία και τον μέσο όρο επιβίωσης. (Ebert BL, 2011)

Η ταχεία εξέλιξη της κυτταρογενετικής ανάλυσης στις αιματολογικές νεοπλασίες, με την ενσωμάτωση μοριακών γενετικών μεθοδολογιών συμβάλει στην εξατομικευμένη διαγνωστική και προγνωστική αξιολόγηση κάθε ασθενούς. Ιδιαίτερα, τα ΜΔΣ αποτελούν ένα κυτταρογενετικό μοντέλο λευχαιμογένεσης, κατά το οποίο ο ίδιος κλωνικός πληθυσμός μπορεί να εξελιχθεί από την ήπια, χρόνια φάση σε οξεία λευχαιμία, με την απόκτηση δευτερογενών γενετικών αλλαγών. Οι αλλοιώσεις του χρωμοσώματος 7 στα ΜΔΣ σχετίζονται με ενδιάμεση, ή κακή πρόγνωση, ανάλογα με τη φύση της αλλοίωσης και την ύπαρξη ή όχι συνοδών χρωμοσωματικών αλλαγών. Σύμφωνα με το προγνωστικό σύστημα IPSS-R, ασθενείς με μονήρη έλλειψη στο μακρύ βραχίονα του χρωμοσώματος έχουν καλύτερη πρόγνωση από αυτούς με μονήρη μονοσωμία. Η διαφορική προγνωστική αξιολόγηση κατά τη διάγνωση αλλά και κατά την εξέλιξη της νόσου επιφέρει συγκεκριμένες θεραπευτικές επιλογές.

Σκοπός της παρούσας μελέτης αποτέλεσε η καρυοτυπική και μοριακή κυτταρογενετική ανάλυση μεγάλου δείγματος ασθενών με ΜΔΣ και αλλοιώσεις του χρωμοσώματος 7 που θεωρείται από τις πιο συχνές αλλοιώσεις στα ΜΔΣ, μαζί με την $del(5q)$, για την ανίχνευση τυχόν υποκλώνων μη ανιχνεύσιμων στον καρυότυπο, τη διερεύνηση και αξιολόγηση πλεονεκτήματος πολλαπλασιασμού των κυττάρων που φέρουν αλλοίωση, τη διερεύνηση και αξιολόγηση διαφορών μεταξύ των αλλοιωμένων προτύπων.

Η παθογένεση των ΜΔΣ είναι πολυσταδιακή και περιλαμβάνει μεταλλάξεις στα αρχέγονα αιμοποιητικά κύτταρα, μεταβολές στην λειτουργία των οποίων οδηγούν αρχικά στην εμφάνιση ενός προ-κακοήθη κλώνου. Ο κλώνος αυτός παρουσιάζει πλεονέκτημα πολλαπλασιασμού και γονιδιωματική αστάθεια. (Mufti GJ, 2004) Οι Coelho PS και οι συνεργάτες του σε μελέτη τους (2017) συμπληρώνουν τον Mufti επισημαίνοντας τη γενετική εξέλιξη στα ΜΔΣ. Αναφέρουν ότι υπάρχουν δύο μοτίβα εξέλιξης. Το πρώτο μοτίβο, η γραμμική εξέλιξη, χαρακτηρίζεται από την εμφάνιση ενός κύριου κλώνου που επικρατεί ενός αρχικού μετά την εμφάνιση επιπρόσθετων μεταλλάξεων. Το δεύτερο μοτίβο, η εξέλιξη διακλάδωσης, χαρακτηρίζεται από την εμφάνιση διαφορετικών υποκλώνων προερχόμενων από έναν κοινό μητρικό. Το 2012, οι Cordoba και συνεργάτες έδειξαν ότι στους ασθενείς με $del(7q)$ ως μοναδική αλλοίωση, τα ποσοστά βλαστών στον μυελό είναι χαμηλότερα απ' ό,τι σε ασθενείς με άλλες αλλοιώσεις του 7. Οι ασθενείς με $del(7q)$ παρουσίασαν χαμηλότερο ποσοστό εξέλιξης σε οξεία μυελογενή λευχαιμία, γεγονός που δείχνει ότι αυτοί οι ασθενείς βρίσκονται σε λιγότερο προχωρημένο στάδιο νόσου απ' ό,τι οι ασθενείς με μονοσωμία 7.

Πλεονέκτημα πολλαπλασιασμού παρουσιάζουν τα κύτταρα τα οποία επιτελούν κυτταρικό κύκλο και έχουν ικανότητα πολλαπλασιασμού σε σχέση με άλλους, συνυπάρχοντες κυτταρικούς πληθυσμούς. Το πλεονέκτημα πολλαπλασιασμού ενός κυτταρικού πληθυσμού φαίνεται όταν παρατηρείται αυξημένος αριθμός κυττάρων στη φάση M του κυτταρικού κύκλου (μίτωση). Στην πράξη αυτό αναδεικνύεται συγκρίνοντας το μέγεθος του αλλοιωμένου κλώνου, μετρώντας μεταφάσεις και μεσοφασικούς πυρήνες και συγκρίνοντας το αποτέλεσμα με το αντίστοιχο των φυσιολογικών κυττάρων. Στην περίπτωση του πλεονεκτήματος πολλαπλασιασμού ανάμεσα σε δύο πληθυσμούς, το ποσοστό των μεταφάσεων θα είναι μεγαλύτερο από αυτό των μεσοφασικών πυρήνων.

Οι Tang G και συνεργάτες (2015) μελετώντας χαρακτηριστικά των αλλοιώσεων του χρωμοσώματος 5 έδειξαν ότι η μονοσωμία 5 σχετίζεται συχνά με σύνθετο καρυότυπο, ενώ η έλλειψη του 5q απαντάται κατά κύριο λόγο ως μονήρης αλλοίωση. Μικρός κλώνος της αλλοίωσης del(5q) θεωρείται αυτός με 10%-30% αλλοιωμένων μεταφάσεων στον καρυότυπο και μεγάλος αυτός με 55%-100%. Οι περιπτώσεις με del(5q) και μικρό κλώνο είχαν μικρότερο ποσοστό αλλοιωμένων μεσοφασικών πυρήνων (4-11%) απ' ότι αυτές με μεγάλο κλώνο (26-88%). Η μελέτη αυτή έδειξε ότι το μέγεθος του κλώνου προσδιορίζεται από την iFISH είναι ανάλογο αλλά γενικά μικρότερο από αυτό που προσδιορίζεται από την καρυοτυπική ανάλυση. Αυτό δείχνει το πλεονέκτημα πολλαπλασιασμού του αλλοιωμένου κλώνου σε σχέση με τα φυσιολογικά κύτταρα. Επιπλέον, οι περιπτώσεις με μικρό κλώνο δεν εξελίχθηκαν σε πιο επιθετικές μορφές νεοπλασίας σε αντίθεση με τις περιπτώσεις που έφεραν μεγάλους κλώνους. Το μέγεθος του κλώνου φάνηκε να είναι ανάλογο της πιθανότητας κακοήθους εξέλιξης της νόσου. Οι ασθενείς με μικρό κλώνο σε μετέπειτα ανάλυση έδειξαν μείωση ή και εξάλειψη του κλώνου. Αντίθετα, οι ασθενείς με μεγάλο κλώνο διατήρησαν την αλλοίωση και σε μεγάλο ποσοστό εμφάνισαν εξέλιξη του κλώνου (Tang G et al., 2014).

Τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας έδειξαν ότι οι αλλοιωμένοι κυτταρικοί πληθυσμοί έχουν πλεονέκτημα πολλαπλασιασμού, αφού οι αλλοιωμένες μεταφάσεις στον καρυότυπο εμφανίζονται σε στατιστικά σημαντικό μεγαλύτερο ποσοστό έναντι των αλλοιωμένων πυρήνων στην iFISH. Παρατηρήθηκε ότι το μικρό μέγεθος κλώνου, όπως αναφέρει και ο Tang G και συνεργάτες (2015), εμφανίζει μικρότερα ποσοστά μεσοφασικών πυρήνων με αλλοίωση και μάλιστα σε βαθμό που να μην κάνει πάντα εμφανές το πλεονέκτημα πολλαπλασιασμού. Η μονοσωμία 7 φαίνεται να παρουσιάζει μεγαλύτερο πλεονέκτημα πολλαπλασιασμού, εύρημα που συνάδει με τον πιο κακοήθη χαρακτήρα της αλλοίωσης σε σχέση με την έλλειψη del(7q), αυξανόμενου δε του μεγέθους του κλώνου, το πλεονέκτημα πολλαπλασιασμού γίνεται πιο εμφανές.

Η έλλειψη της 7q22 περιοχής σε 10/11 ασθενείς συμφωνεί με τα δεδομένα της βιβλιογραφίας, υπογραμμίζοντας τη σημασία της συγκεκριμένης περιοχής στην παθογένεση. Επιπλέον, το εύρημα ότι η 7q36 περιοχή παραμένει στο γονιδίωμα στα περιστατικά με έλλειψη στο 7q, αποδεικνύει ότι οι χρωμοσωματικές ελλείψεις είναι ενδιάμεσες και όχι τελικές.

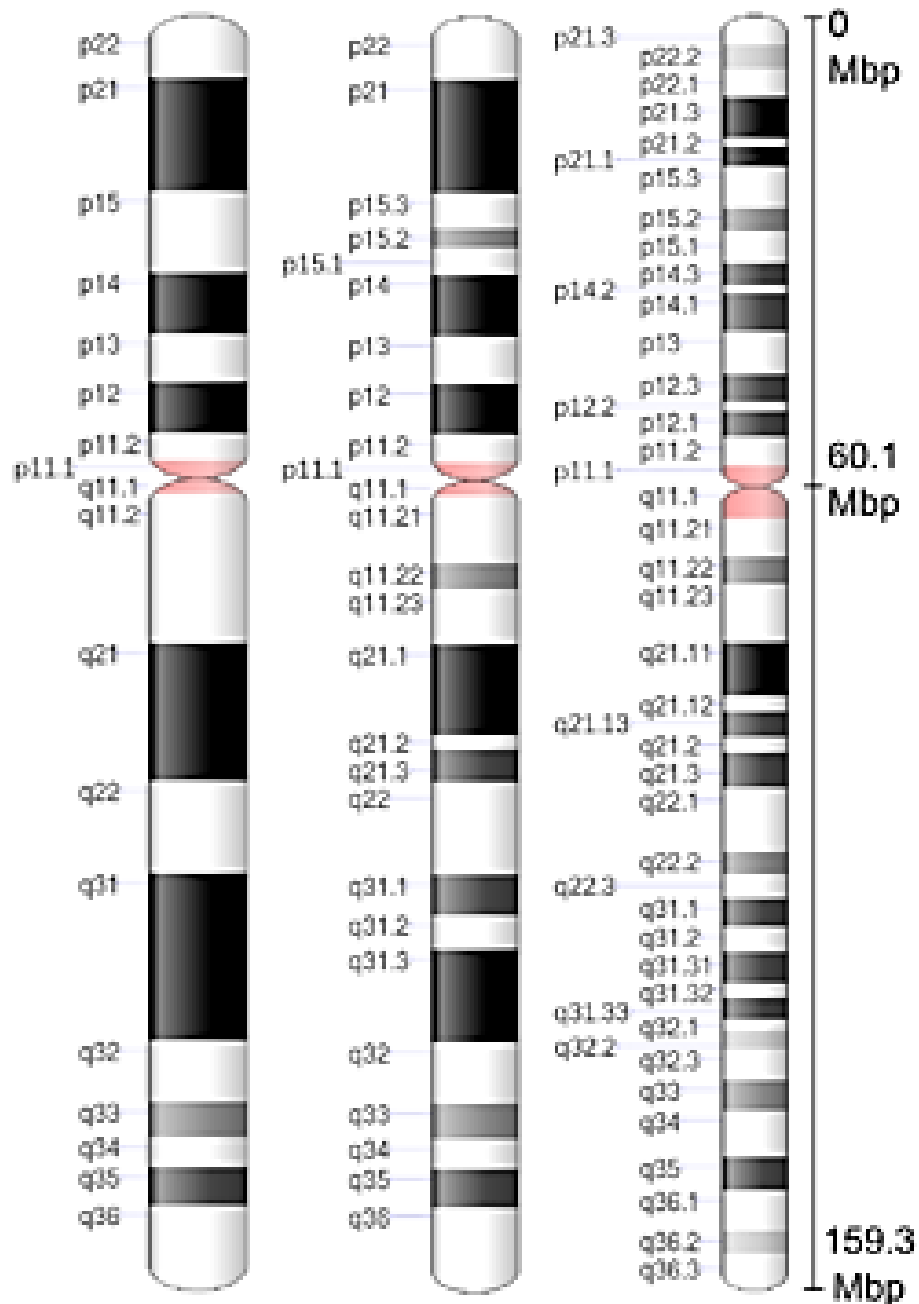
Η μελέτη των αλλοιώσεων του 7, αλλά και άλλων ειδικών χρωμοσωματικών ανωμαλιών με προγνωστική σημασία απαιτεί την μοριακή γενετική ανάλυση μεγάλων σειρών ασθενών τόσο κατά τη διάγνωση, όσο και κατά την πορεία της νόσου. Η χρήση καρυοτυπικών εργαλείων υψηλής ανάλυσης που βασίζονται σε μικροσυστοιχίες αναμένεται να δώσει απαντήσεις σχετικά με τον παθογενετικό ρόλο της απλοανεπάρκειας στις περιπτώσεις χρωμοσωματικών ελλείψεων και την ανάδειξη άγνωστων έως τώρα μεταλλάξεων. Η ανάδειξη του ρόλου των μεταλλάξεων στα ΜΔΣ με αλλοιώσεις του χρωμοσώματος 7 θα δώσει πληροφορίες για την εξελικτική πορεία των αλλοιωμένων κλώνων και κατ' επέκταση της νόσου και θα οδηγήσει σε νέους εξατομικευμένους θεραπευτικούς χειρισμούς.

ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ – ΑΡΚΤΙΚΟΛΕΞΑ – ΑΚΡΩΝΥΜΙΑ

Ελληνικός Όρος	Ξενογλωσσος όρος
Αγγελιοφόρο RNA	Messenger RNA, mRNA
Αιμοπετάλια - Θρομβοκύτταρα.	Platelets – Thrombocytes
Αλληλούχιση νέας γενιάς	Next generation sequencing, NGS
Αμερικάνικη Ένωση Κεντρικών Μητρώων Καρκίνου	North American Association of Central Cancer Registries, NAACCR
Αναθεωρημένο Διεθνές Προγνωστικό Σύστημα Βαθμολόγησης	Revised-International Prognostic Scoring System, IPSS-R
Αναστροφή τμήματος χρωμοσώματος	Inversion, inv
Ανθεκτική αναιμία	Refractory anemia, RA
Ανθεκτική αναιμία με δακτυλιοειδείς σιδηροβλάστες	Refractory anemia with ring sideroblasts, RARS
Ανθεκτική αναιμία με δακτυλιοειδείς σιδηροβλάστες και Θρομβοκυττάρωση	Refractory anemia with ring sideroblasts & Thrombocytosis, RARS-T
Ανθεκτική μορφή κυτταροπενίας της παιδικής ηλικίας	Refractory cytopenia of childhood, RCC
Ανοσοανεπαρκή εργαστηριακά ποντίκια	NOD Scid Gamma Mice-immunodeficient laboratory mice, NSG mice
Αρχέγονο κύτταρο	Progenitor cell
Βακτηριακό μικρό RNA	Bacterial small RNA, sRNA
Βασιζόμενος σε μικροσυστοιχίες συγκριτικός γονιδιωματικός υβριδισμός	Array comparative genomic hybridization, array(a)CGH
Βλαστοκύτταρο	Stem cell
Γονίδιο καταστολέα όγκου	Tumor supresor gene, TSG
Δευτεροπαθές ΜΔΣ	Secondary MDS, s-MDS
Διεθνές Εργαστήριο Ανάλυσης Κινδύνου ΜΔΣ	International MDS Risk Analysis Workshop
Διεθνές Προγνωστικό Σύστημα Βαθμολόγησης	International Prognostic Scoring System, IPSS
Δικεντρικό χρωμόσωμα	Dicentric chromosome, dic
Έλλειψη τμήματος χρωμοσώματος	Deletion, del
Ισοδικεντρικό χρωμόσωμα	Isodicentric, idic
Ισοζυγισμένη μετατόπιση	Balanced translocation, t
Κοινό λεμφικό	Comon lymphoid progenitor, CLP
Κοινό μυελοειδές-ερυθροειδές προγονικό κύτταρο	Comon myeloid-erythroid progenitor, CMEP
Κοινό μυελο-λεμφοειδή πρόγονο	Comon myelo-lymphoid progenitor, CMLP
ΜΔΣ με δακτυλιοειδείς σιδηροβλάστες	MDS-Ring Sideroblasts, MDS-RS
ΜΔΣ με δυσπλασία μιας μυελοειδούς καταβολής	MDS-Single Lineage Dysplasia, MDS-SLD
ΜΔΣ με δυσπλασία πολλαπλών μυελοειδών καταβολών	MDS-Multiple Lineage Dysplasia, MDS-MLD
ΜΔΣ με περίσσεια βλαστών	MDS-Excess Blasts, MDS-EB
Μεγακαρυοκύτταρο	Megakaryocyte.
Μεσοφασικός φθορίζων in situ υβριδισμός	Interphase Fluorescent in situ hybridization, ifish
Μεταφορικό RNA	Transfer RNA, tRNA
Μη ταξινομημένα ΜΔΣ	MDS-Unclassifiable, MDS-U
Μηχανισμός απόκρισης στις βλάβες του DNA	DNA damage response, DDR
Μικρό-RNA	Micro RNA, mi-RNA
Μικροσυστοιχίες πολυμορφισμών ενός νουκλεοτιδίων	Single Nucleotide Polymorphisms, SNP-arrays
Μονογονεϊκή δισωμία	Uniparental Disomy, UPD
Μυελογενή νεοπλάσματα, MN	Myeloid neoplasms, MN
Μυελογενής καταβολή	Myeloid lineage
Μυελοδυσπλαστικά Σύνδρομα, ΜΔΣ	Myelodysplastic syndromes, MDS
Μυελοπολλαπλασιαστικά νεοπλάσματα	Myeloproliferative neoplasms, MPN
Μυελοπολλαπλασιαστική νόσος	Myeloproliferative disease, MPD
Νεανική μυελομονοκυτταρική λευχαιμία	Juvenile myelomonocytic leukemia, JMML
Ολοκληρωμένο Σύστημα Κυτταρογενετικής Βαθμολόγησης	Comprehensive Cytogenetic Scoring System, CCSS
ΟΜΛ που εξελίσσονται από προηγθέν ΜΔΣ	Secondary AML,saml
Οξεία λεμφοκυτταρική λευχαιμία, ΟΛΛ	Acute lymphocytic leukemia, ALL
Οξεία μυελογενής λευχαιμία, ΟΜΛ	Acute myeloid leukemia, AML

Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας, Π.Ο.Υ	World Health Organization, WHO
Πλεονέκτημα πολλαπλασιασμού	Proliferative advantage
Πολύχρωμος φθορίζων in situ υβριδισμός	Multicolor-FISH, mFISH
Προγνωστικό Σύστημα Βαθμολόγησης βασισμένο στον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας	WHO Classification-based Prognostic Scoring System, WPSS
Πρόγονα αιμοποιητικά κύτταρα	Haematopoietic stem cells, hscs
Πρόγραμμα Επιτήρησης, Επιδημιολογίας & Τελικών Αποτελεσμάτων	Surveillance, Epidemiology & End Result Program, SEER
Ριβοσωμικό RNA	Ribosomal RNA, rRNA
Σύλλογος κυτταρογενετικής καρκίνου του Ηνωμένου Βασιλείου	UK Cancer Cytogenetics Group, UKCCG
Συχνά ελλείπουσα περιοχή	Commonly Deleted Region, CDR
Σχετιζόμενα με προηγούμενη θεραπεία μυελογενή νεοπλασμάτα	Therapy-Related myeloid neoplasms, tMN
Σχετιζόμενα με προηγούμενη θεραπεία Μυελοδυσπλαστικά Σύνδρομα	Therapy-Related Myelodysplastic Syndromes, tmds
Τρέχον Συγκεντρωτικό Κυτταρογενετικό Σύστημα Βαθμολόγησης	Comprehensive Cytogenetic Scoring System, CCSS
Υποπλαστικό Μυελοδυσπλαστικό Σύνδρομο, υμδς	Hypoplastic Myelodysplastic Syndrome, hmds
Φθορίζων in situ υβριδισμός	Fluorescent in situ hybridization, FISH
Φυσικά κύτταρα φονείς	Natural killer cells, nkcells
Χίλιες βάσεις (νουκλεοτιδικές)	Kilo Bases (Kb) – (Mb→Million bases)
Χρόνια λεμφοκυτταρική λευχαιμία, ΧΛΛ	Chronic lymphocytic leukemia, CLL
Χρόνια μυελογενής λευχαιμία, ΧΜΛ	Chronic myeloid leukemia, CML
Χρόνια μυελομονοκυτταρική λευχαιμία, ΧΜΜΛ	Chronic myelomonocytic leukemia, CMML

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ



400 bphs 550 bphs 850 bphs

Human chromosome 7

ΑΝΑΦΟΡΕΣ

- [1] Albin M, Bjork J, Welinder H et al. Cytogenetic and morphologic subgroups of myelodysplastic syndromes in relation to occupational and hobby exposures. *Scand J Work Environ Health*. 2003; 29:378-387
- [2] Alenzi, FQ; Alenazi, BQ; Ahmad, SY; Salem, ML; Al-Jabri, AA; Wyse, RK (Mar 2009). "The haemopoietic stem cell: between apoptosis and self renewal". *The Yale Journal of Biology and Medicine*. 82 (1): 7–18
- [3] Apperley JF, Gardembas M, Melo JV, Russell-Jones R, Bain BJ, Baxter EJ, Chase A, et al. (2002): Response to imatinib mesylate in patients with chronic myeloproliferative diseases with rearrangements of the platelet-derived growth factor receptor beta. *N Engl J Med* 347: 481-487
- [4] Atallah E, Nussenzweig R, Yin CC, et al. Prognostic interaction between thrombocytosis and JAK2 V617F mutation in the WHO subcategories of myelodysplastic/myeloproliferative disease-unclassifiable and refractory anemia with ringed sideroblasts and marked thrombocytosis. *Leukemia*. 2008;22:1295-1298
- [5] Austin KM, Leary RJ, Shimamura A. The ShwachmanDiamond SBDS protein localizes to the nucleolus. *Blood* 2005; 106:1253-1258
- [6] Barlow JL, Drynan LF, Hewett DR, et al. A p53-dependent mechanism underlies macrocytic anemia in a mouse model of human 5q- syndrome. *Nat Med* 2010; 16:59-66.
- [7] Baylin SB, Herman JG. DNA hypermethylation in tumorigenesis: epigenetics joins genetics. *Trends Genet*. 2000;16:168-174.
- [8] Beck D, Ayers S, Wen J, et al. Integrative analysis of next generation sequencing for small non-coding RNAs and transcriptional regulation in Myelodysplastic Syndromes. *BMC Medical Genomics*. 2011; 4:1-16.
- [9] Bejar R, Stevenson K, Abdel-Wahab O, et al. Point mutations in myelodysplastic syndromes are associated with clinical features and are independent predictors of overall survival. *Blood*. 2010; 116:136a
- [10] Bench AJ, Nacheva EP, Hood TL, et al. Chromosome 20 deletions in myeloid malignancies: Reduction of the common deleted region, generation of a PAC/BAC contig and identification of candidate genes. UK Cancer Cytogenetics Group (UKCCG). *Oncogene*. 2000; 19:3902-3913
- [11] Benjamin L. Ebert: Molecular dissection of the 5q deletion in Myelodysplastic syndrome. *Semin Oncol*. 2011 October; 38(5):621-626
- [12] Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DAG, Gralnick HR, Sultan C. Proposals for the classification of the myelodysplastic syndromes. *Br J Haematol* 51:189-199, 1982
- [13] Birbrair, Alexander; Frenette, Paul S. (2016-03-01). "Niche heterogeneity in the bone marrow". *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1370: 82–96
- [14] Boehrer S, Adès L, Tajeddine N, et al. Suppression of the DNA damage response in acute myeloid leukemia versus myelodysplastic syndrome. *Oncogene*. 2009; 28:2205-2218
- [15] Boulwood J, Fidler C, Strickson AJ, Watkins F, Gama S, Kearney L, et al. (2002): Narrowing and genomic annotation of the commonly deleted region of the 5q- syndrome. *Blood* 99: 4638-4641
- [16] *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.
- [17] Cazzola M, Malcovati I. (2005): Myelodysplastic syndromes-coping with ineffective hematopoiesis. *N Eng J Med* 352:536-538
- [18] Ceccaldi R, Briot D, Larghero J, et al. Spontaneous abrogation of the G2 DNA damage checkpoint has clinical benefits but promotes leukemogenesis in Fanconi anemia patients. *J Clin Invest*. 2011; 121:184-194
- [19] Chang, Hannah H.; Hemberg, Martin; Barahona, Mauricio; Ingber, Donald E.; Huang, Sui. (2008) "Transcriptome-wide noise controls lineage choice in mammalian progenitor cells". *Nature*. 453 (7194): 544–547
- [20] Corey SJ, Minden DL, Barber LD, Kantarjian H, Wang Y, Schimmer AD: Myelodysplastic syndromes: the complexity of stem-cell diseases. *Nature Rev. Cancer*. 2007; 7:118-129.
- [21] Costa D, Munoz C, Carrio A, Nomdedeu M, Calvo X, Sole F, et al. (2013): Reciprocal translocations in Myelodysplastic syndromes and chronic myelomonocytic leukemias:review of 5654 patients with an evaluable karyotype. *Genes Chromosomes Cancer* 52:753-763
- [22] Dalamaga M, Petridou E, Cook, F, Trichopoulos D. Risk factors for myelodysplastic syndromes: A case-control study in Greece. *Cancer Causes Control*. 2002; 13:603-608
- [23] Delhommeau F, Dupont S, Della Valle V, et al. Mutation in TET2 in myeloid cancers. *N Engl J Med*. 2009; 360:2289- 2301
- [24] Dohner K, Habdank M, Rucker FG, Miller S, Frohling S, Scherer SW, et al. (2006): Molecular characterization of distinct hot spot regions on chromosome 7q in myeloid leukemias. *Blood* 108:2349

- [25] Ebert BL, Pretz J, Bosco J, et al. Identification of RPS14 as a 5q- syndrome gene by RNA interference screen. *Nature*. 2008; 451:335-339; Dutt S, Narla A, Lin K, et al. Haploinsufficiency for ribosomal protein genes causes selective activation of p53 in human erythroid progenitor cells. *Blood*. 2011; 117:2567-2576
- [26] Ernst T, Chase AJ, Score J, Hidalgo-Curtis CE, Bryant C, Jones AV, et al. (2010): Inactivating mutations of the histone methyltransferase gene EZH2 in myeloid disorders. *Nat Genet* 42: 722-726
- [27] Esteller M. Epigenetics in cancer. *N Engl J Med*. 2008;358:1148-1159
- [28] Faramarz Naeim, P. Nagesh Rao, Sophie X. Song, Wayne W. Grody: Atlas of Hematopathology Morphology, Immunophenotype, Cytogenetics, and Molecular Approaches, 2013., pages 219-226
- [29] Foucar K, McKenna RW, Bloomfield CD, Bowers TK, Brunning RD. Therapy-related leukemia. *Cancer* 43:1285-1296 (1979)
- [30] Gabriela Kardos, Irith Baumann, S.Jane Passmore, Franco Locatelli, Henrik Hasle, Kirk R. Schultz, Jan Starý, Annette Schmitt-Graeff, Alexandra Fischer, Jochen Harbott, Judith M. Chessells, Ian Hann, Susanna Fenu, Angelo Cantú Rajnoldi, Gitte Kerndrup, Elisabeth van Wering, Tim Rogge, Peter Nöllke and Charlotte M. Niemeyer: Refractory anemia in childhood: a retrospective analysis of 67 patients with particular reference to monosomy 7. *Blood* 2003 102:1997-2003
- [31] Gaken J Mohamedali A, Mufti G. P054 MicroRNA expression profiling of high and low risk MDS. *Leukemia Res*. 2009; 33: 590.
- [32] Garcia-Manero G. Modifying the epigenome as a therapeutic strategy in myelodysplasia. *Hematology Am Soc Hematol Educational Program* 2007: 405-411.
- [33] Gargallo P, Cacchione R, Chena C, et al. Chronic lymphocytic leukemia developing in a patient with chronic myeloid leukemia: evidence of distinct lineage-associated genomic events. *Cancer Genet Cytogenet*. 2005;161:74–7.
- [34] Gelsi-Boyer V, Trouplin V, Roquain J, et al. ASXL1 mutation is associated with poor prognosis and acute transformation in chronic myelomonocytic leukaemia. *Br J Haematol*. 2010; 151:365-375
- [35] Germing U, Strupp C, Giagounidis A, et al. (2012): Evaluation of dysplasia through detailed cytomorphology in 3156 patients from the Dusseldorf Registry on Myelodysplastic syndromes. *Leuk Res*. 36:727-34. PMID:22421409
- [36] Giagounidis AA, Germing U, Haase S, et al. Clinical, morphological, cytogenetic, and prognostic features of patients with myelodysplastic syndromes and del(5q) including band q31. *Leukemia*. 2004; 18:113-119
- [37] Godley LA, Larson R (2002): The syndrome of therapy-related myelodysplasia and myeloid leukemia. In the *Myelodysplastic Syndromes: Pathobiology and Clinical Management*. (Ed: JM Bennett). New York, Marcel Dekker Inc, 136-176
- [38] Gondek LP, Tiu R, O'Keefe CL, et al. Chromosomal lesions and uniparental disomy detected by SNP arrays in MDS, MDS/MPD, and MDS-derived AML. *Blood*. 2008; 111:1534-1542
- [39] Gondek LP, Tiu R, O'Keefe CL, et al. Chromosomal lesions and uniparental disomy detected by SNP arrays in MDS, MDS/MPD, and MDS-derived AML. *Blood*. 2008; 111:1534-1542.
- [40] Granbaek K, Hother C, Jones PA. Epigenetic changes in cancer. *APMIS* 2007; 115:1039-1059.
- [41] Greenberg P, Cox C, LeBeau MM, et al. International scoring system for evaluating prognosis in myelodysplastic syndromes. *Blood*. 1997; 89:2079–2088
- [42] Greenberg P, Tuechler H, Schanz J, et al. Revised International Prognostic Scoring System (IPSS-R), developed by the international Prognostic Working Group for Prognosis in MDS (IWG-PM). 11th International Symposium on Myelodysplastic Syndromes, Edinburgh 18-21 May, 2011. *Leuk Res*. 2011; 35S1: S6
- [43] Grossmann V, Kohlmann A, Eder C, et al. Molecular profiling of chronic myelomonocytic leukemia reveals diverse mutations in >80% of patients with TET2 and EZH2 being of high prognostic relevance. *Leukemia*. 2011; 25:877-879
- [44] Guilin Tang, MD, PhD, Rashmi Shivani Goswami, MD, Cynthia S. Liang, Carlos E. Bueso-Ramos, MD, Shimin Hu, MD, PhD, Courtney DiNardo, MD, and L. Jeffrey Medeiros, MD: Isolated del(5q) in Patients Following Therapies for Various Malignancies May Not All Be Clinically Significant. *Am J Clin Pathol* July 2015;144:78-86
- [45] Haase D, Germing U, Schanz J, et al. New insights into the prognostic impact of the karyotype in MDS and correlation with subtypes: evidence from a core dataset of 2124 patients. *Blood*. 2007; 110:4385-4395
- [46] Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell*. 2000;100(1):57-70.
- [47] Hasle H, Niemeyer CM (2011): Advances in the prognostication and management of advanced MDS in children. *Br J Haematol* 154:185-195
- [48] Hatzimichael E, Dasoula A, Benetatos L, et al. The absence of CDKN1C (p57KIP2) promoter methylation in myeloid malignancies also characterizes plasma cell neoplasms. *Br J Haematol*. 2008;141:557-558

- [49] Heinrichs S, Kulkarni RV, Bueso-Ramos CE, et al. Accurate detection of uniparental disomy and microdeletions by SNP array analysis in myelodysplastic syndromes with normal cytogenetics. *Leukemia*. 2009; 23:1605-1613.
- [50] Hoglund M, Sehn L, Connors JM, et al. Identification of cytogenetic subgroups and karyotypic pathways of clonal evolution in follicular lymphomas. *Genes Chromosomes Cancer*. 2004;39:195.
- [51] Huang TC, Ko BS, Tang JL, et al. Comparison of hypoplastic myelodysplastic syndrome (MDS) with normo-/hypercellular MDS by International Prognostic Scoring System, cytogenetic and genetic studies. *Leukemia*. 2008;22:544-550
- [52] 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.
- [53] Human Cytogenetics: Malignancy and Acquired Abnormalities, Oxford University Press; 3rd edition (July 15, 2001) (A Practical Approach) (The Practical Approach Series) by D. E. Rooney. ISBN-13: 978-0199638413 ISBN-10: 0199638411
- [54] Iris Cordoba, MD; Jose´ R. Gonz´alez-Porras, MD; Benet Nomdedeu, MD; Elisa Lunˆo, MD; Raquel de Paz, MD; Esperanza Such, MD; Mar Tormo, MD; Teresa Vallespi, MD; Rosa Collado, MD; Blanca Xicoy, MD; Rafael Andreu, MD; Juan A. Munˆoz, MD; Francesc Sol´e, MD; Jose Cervera, MD; Consuelo del Canˆizo, MD; and On behalf of the Spanish Myelodysplastic Syndrome Registry: Better Prognosis for Patients With Del(7q) Than for Patients With Monosomy 7 in Myelodysplastic Syndrome. *Cancer* January 1, 2012
- [55] Irons RD, Kerzic PJ. Cytogenetics in benzene-associated myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemia: new insights into a disease continuum. *Ann N Y Acad Sci*. 2014 Mar;1310:84-8. doi: 10.1111/nyas.12336. Epub 2014 Feb 12.
- [56] Itzykson R, Kosmider O, Cluzeau T, et al. Impact of TET2 mutations on response rate to azacitidine in myelodysplastic syndromes and low blast count acute myeloid leukemias. *Leukemia*. 2011; 25:1147-1152
- [57] Jadersten M, Saft L, Smith A, Kulasekararaj A, Pomplun S, Gohring G, et al. (2011): TP53 mutations in low-risk Myelodysplastic syndromes with del(5q) predict disease progression. *J Clin Oncol* 29: 1971-1979
- [58] Jankowska AM, Szpurka H, Tiu RV, et al. Loss of heterozygosity 4q24 and TET2 mutations associated with myelodysplastic/myeloproliferative neoplasms. *Blood*. 2009; 113:6403-6410
- [59] Jerez A, Sugimoto Y, Makishima H, Verma A, Jankowska AM, Przychodzen B, et al. (2012b): Loss of heterozygosity in 7q myeloid disorders: clinical associations and genomic pathogenesis. *Blood* 119: 6109-6117
- [60] Jiang Y, Dunbar A, Gondek LP, et al. Aberrant DNA methylation is a dominant mechanism in MDS progression to AML. *Blood*. 2009;113:1315-1325
- [61] Jordan, CT and Guzman, ML. Mechanisms controlling pathogenesis and survival of leukemic stem cells. *Oncogene* 23: 7178-7187, *Oncogene* 23(43):7178-87 · October 2004
- [62] Kawamoto, Wada, Katsura. A revised scheme for developmental pathways of haematopoietic cells: the myeloid-based model. *International Immunology* 2010
- [63] Kelaidi Charikleia, Sabani Constantina. Cytogenetic abnormalities in myelodysplastic syndromes: Clinical and prognostic impact, *Haema* 2011
- [64] Kelly MJ, Meloni-Ehrig AM, Manley PE, Altura RA. Poor outcome in a pediatric patient with acute myeloid leukemia associated with a variant t(8;21) and trisomy 6. *Cancer Genet Cytogenet*. 2009;189(1):48–52.
- [65] Kimmel, Marek (2014-01-01). "Stochasticity and determinism in models of hematopoiesis". *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 844: 119–152
- [66] Ko M, Huang Y, Jankowska AM, et al. Impaired hydroxylation of 5-methylcytosine in myeloid cancers with mutant TET2. *Nature*. 2010; 468:839-843
- [67] Kosmider O, Gelsi-Boyer V, Cheok M, et al. TET2 mutation is an independent favorable prognostic factor in myelodysplastic syndromes (MDSs). *Blood*. 2009; 114:3285-3291.
- [68] Kulasekararaj AG, Mohamedali AM, Smith AE, et al. Polycomb Complex Group gene mutations and their prognostic relevance in 5-Azacitidine treated myelodysplastic syndrome patients. *Blood*. 2010; 116:61a
- [69] Kundson AG. Hereditary cancer: two hits revisited. *J Cancer Res. Clin. Oncol*. 1996; 122:135-140.
- [70] Langemeijer SM, Kuiper RP, Berends M, et al. Acquired mutations in TET2 are common in myelodysplastic syndromes. *Nat Genet* 2009; 41:838-842
- [71] Le Beau MM, Espinosa R, 3rd, Davis EM, Eisenbart JD, Larson RA, Green ED (1996): Cytogenetic and molecular delineation of a region of chromosome 7 commonly deleted in malignant myeloid diseases. *Blood* 88: 1930-1935
- [72] Leonard, Barry (1998). *Leukemia: A Research Report*. DIANE Publishing, p.14

- [73] List A, Dewald G, Bennett J, Giagounidis A, Raza A, Feldman E, et al. (2006): Lenalidomide in the myelodysplastic syndrome with chromosome 5q deletion. *N Engl J Med* 355: 1456-1465
- [74] Loh ML, Mullighan CG (2012): Advances in the genetics of high-risk childhood B-progenitor acute lymphoblastic leukemia and juvenile myelomonocytic leukemia: implications for therapy. *Clin Cancer Res* 18:2754-2767
- [75] Maassen A, Strupp C, Giagounidis A, Kuendgen A, Nachtkamp K, Hildebrandt B, Gattermann N, Aul C, Haas R, Germing U: Validation and proposals for a refinement of the WHO 2008 classification of myelodysplastic syndromes without excess of blasts. *Leuk Res.* 2013 Jan;37(1):64-70. doi: 10.1016/j.leukres.2012.09.021. Epub 2012 Oct 31.
- [76] Makishima H, Jankowska AM, Tiu RV, et al. Novel homo- and hemizygous mutations in EZH2 in myeloid malignancies. *Leukemia.* 2010; 24:1799-1804
- [77] Malcovati L, Germing U, Kuendgen A, Della Porta MG, Pascutto C, Invernizzi R, et al. (2007): Time-dependent prognostic scoring system for predicting survival and leukemic evolution in Myelodysplastic syndromes. *J Clin Oncol* 25: 3503-3510
- [78] Marinier DE, Mesa H, Rawal A, et al.(2010): Refractory cytopenias with unilineage dysplasia: a retrospective analysis of refractory neutropenia and refractory thrombocytopenia. *Leuk Lymphoma.* 51:1923-6. PMID:20919862
- [79] Martinelli G, Ottaviani E, Buonamici S, Isidori A, Borsaru G, Visani G, et al. (2003): Association of 3q21q26 syndrome with different RPN1/EV11 fusion transcripts. *Haematologica* 88: 1221-1228
- [80] McGowan KA, Li JZ, Park CY, et al. Ribosomal mutations cause p53-mediated dark skin and pleiotropic effects. *Nat Genet* 2008; 40:963-970
- [81] Mcnerney ME, Brown CD, Wang X, Bartom ET, Karmakar S, Bandlamudi C, et al. (2013): CUX1 is a haploinsufficient tumor suppressor gene on chromosome 7 frequently inactivated in acute myeloid leukemia. *Blood* 121: 975-983
- [82] Meloni-Ehrig A. Cytogenetic analysis. In: *Body fluid analysis for cellular composition; approved guideline (H56A)*. Wayne: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2006.
- [83] Merlat A, Lai JL, Sterkers Y, et al. Therapy-related Myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukemia with 17p deletion. A report on 25 cases. *Leukemia.* 1999; 13:250-257
- [84] Mohamedali A, Gaken J, Twine NA, et al. Prevalence and prognostic significance of allelic imbalance by single-nucleotide polymorphism analysis in low-risk myelodysplastic syndromes. *Blood.* 2007; 110:3365-3373.
- [85] Morrison, J.; Judith Kimble (2006). "Asymmetric and symmetric stem-cell divisions in development and cancer". *Nature.* 441(7097): 1068–74
- [86] Morrison, SJ; Weissman, IL (Nov 1994). "The long-term repopulating subset of hematopoietic stem cells is deterministic and isolable by phenotype". *Immunity.* 1 (8): 661–73
- [87] Narla A, Ebert BL. Ribosomopathies: human disorders of ribosome dysfunction. *Blood.* 2010; 115:3196-3205
- [88] Niemeyer CM, Kang MW, Shin DH, et al. Germline CBL mutations cause developmental abnormalities and predispose to juvenile myelomonocytic leukemia. *Nat Genet.* 2010; 42:794-800
- [89] Nikoloski G, nLangemeijer SM, Kuiper RP, Knops R, Massop M, Tonnissen ER, et al. (2010): Somatic mutations of the histone methyltransferase gene EZH2 in myeloid disorders. *Nat Genet* 42:665-667
- [90] Pan J, Wu C, Xue Y, Qiu H, Chen S, Zhang J, et al. (2014): The characteristics and prognostic analysis in 213 myeloid malignancy patients with del(20q): a report of a single-center case series. *Cancer Genet* 207:51-56
- [91] Parcharidou A, Tsoplou P, Symeonidis : Pathogenetic aspects of MDS: the role of apoptosis 3rd Dept of Internal Medicine, Korgialeneio-Benakeio Hospital of Athens, BIOIATRICKI Laboratories, Dept of Human Genetics, Athens, Hematology Division, Dept of Internal Medicine, University of Patras Medical School, Patras, *Haema* 2011; 2(2): 153-161
- [92] Paulsson K, Johansson B. Trisomy 8 as the sole chromosomal aberration in acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndromes. *Pathol Biol (Paris).* 2007; 55:37-48
- [93] Paulsson K, Säll T, Fioretos T, et al. The incidence of trisomy 8 as a sole chromosomal aberration in myeloid malignancies varies in relation to gender, age, prior iatrogenic genotoxic exposure, and morphology. *Cancer Genet Cytogenet.* 2001; 130:160-165
- [94] Pavon-Eternod M, Gomes S, Geslain R, Dai Q, Rosner MR, Pan T. tRNA over-expression in breast cancer and functional consequences. *Nuclein Acids Res.* 2009; 37:7268-7280
- [95] Pedro da Silva-Coelho, Leonie I. Kroeze, Kenichi Yoshida, Theresia N. Koorenhof-Scheele, Ruth Knops, Louis T. van de Locht, Aniek O. de Graaf, Marion Massop, Sarah Sandmann, Martin Dugas, Marian J. Stevens-Kroef, Jaroslav Cermak, Yuichi Shiraiishi, Kenichi Chiba, Hiroko Tanaka, Satoru Miyano, Theo de Witte, Nicole M.A. Blijlevens, Petra Muus, Gerwin Huls, Bert A. van der Reijden, Seishi Ogawa & Joop H. Jansen: Clonal evolution in myelodysplastic syndromes. *Nature Communications* 8:15099, 2017

- [96] Pellagatti A, Marafioti T, Paterson JC, et al. Induction of p53 and up-regulation of the p53 pathway in the human 5q- syndrome. *Blood* 2010; 115:2721-2723.
- [97] Peter L. Greenberg, Heinz Tuechler, Julie Schanz, Guillermo Sanz, Guillermo Garcia-Manero, Francesc Solé, John M. Bennett, David Bowen, Pierre Fenaux, Francois Dreyfus, Hagop Kantarjian, Andrea Kuendgen, Alessandro Levis, Luca Malcovati, Mario Cazzola, Jaroslav Cermak, Christa Fonatsch, Michelle M. Le Beau, Marilyn L. Slovak, Otto Krieger, Michael Luebbert, Jaroslaw Maciejewski, Silvia M. M. Magalhaes, Yasushi Miyazaki, Michael Pfeilstöcker, Mikkael Sekeres, Wolfgang R. Sperr, Reinhard Stauder, Sudhir Tauro, Peter Valent, Teresa Vallespi, Arjan A. van de Loosdrecht, Ulrich Germing, and Detlef Haase. Revised International Prognostic Scoring System for Myelodysplastic Syndromes: *Blood*. 2012 Sep 20; 120(12): 2454–2465. Prepublished online 2012 Jun 27. doi: 10.1182/blood-2012-03-420489
- [98] Poppe B, Dastugue N, Vandesompele J, et al. EVI1 is consistently expressed as principal transcript in common and rare recurrent 3q26 rearrangements. *Genes Chromosom Cancer*. 2006; 45:349–356
- [99] Quentin S, Cuccuini W, Ceccaldi R, et al. Myelodysplasia and leukemia of Fanconi anemia are associated with a specific pattern of genomic abnormalities that includes cryptic RUNX1/AML1 lesions. *Blood*. 2011; 117:e161-170
- [100] R Kalra, D Dale, M Freedman, MA Bonilla, M Weinblatt, A Ganser, P Bowman, S Abish, J Priest and RS Oseas: Monosomy 7 and activating RAS mutations accompany malignant transformation in patients with congenital neutropenia *Blood* 1995 86:4579-4586
- [101] Raza A, Gregory SA, Preisler HD. The myelodysplastic syndromes in 1996: Complex stem cell disorders confounded by dual actions of cytokines. *Leuk Res* 1996; 20:881-890
- [102] Raza A. Hypothesis: myelodysplastic syndromes may have a viral etiology. *Int J Hematol*. 1998; 68:245-256.
- [103] Robak T, Urbańska-Ryś H, Smolewski P, et al. Chronic myelomonocytic leukemia coexisting with B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Lymphoma*. 2003;44(11):2001–8.
- [104] Robinette, Martin S.; Cotter, Susan; Van de Water (2001). Quick Look Series in Veterinary Medicine: Hematology. Teton NewMedia, p.105
- [105] Ross JA, Kasum CM, Davies SM, Jacobs DR, Folsom AR, Potter JD (August 2002). «Diet and risk of leukemia in the Iowa Women's Health Study», *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev*. 11 (8): 777–81
- [106] Rowley J, Potter D. Chromosomal banding patterns in acute nonlymphocytic leukemia. *Blood*. 1976;47:705.
- [107] Sanchez-Castro J, Marco-betes V, Gomez-Arbones X, Arenillas L, Valcarcel D, Vallepsi T, et al. (2013): Characterization and prognostic implication of 17 chromosome abnormalities in Myelodysplastic syndrome. *Leuk Res* 37:769776
- [108] Sauvageau M, Sauvageau G. Polycomb group proteins: multi-faceted regulators of somatic stem cells and cancer. *Cell Stem Cell*. 2010; 7:299-313
- [109] Schanz J, Tüchler H, Solé F, Mallo M, Luño E, Cervera J, Granada I, Hildebrandt B, Slovak ML, Ohyashiki K, Steidl C, Fonatsch C, Pfeilstöcker M, Nösslinger T, Valent P, Giagounidis A, Aul C, Lübbert M, Stauder R, Krieger O, Garcia-Manero G, Faderl S, Pierce S, Le Beau MM, Bennett JM, Greenberg P, Germing U, Haase D., : New comprehensive cytogenetic scoring system for primary myelodysplastic syndromes (MDS) and oligoblastic acute myeloid leukemia after MDS derived from an international database merge. *J Clin Oncol*. 2012 Mar 10;30(8):820-9. doi: 10.1200/JCO.2011.35.6394. Epub 2012 Feb 13.
- [110] Shanafelt TD, Witzig TE, Fink SR, et al. Prospective evaluation of clonal evolution during long-term follow-up of patients with untreated early-stage chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol*. 2006;24:4634.
- [111] Smith SM, Le Beau MM, Huo D, Karrison T, Sobecks RM, Anastasi J, et al. (2003): Clinical-cytogenetic associations in 306 patients with therapy-related myelodysplasia and myeloid leukemia: the University of Chicago series. *Blood* 102: 43-52
- [112] Solé F, Luño E, Sanzo C, et al. Identification of novel cytogenetic markers with prognostic significance in a series of 968 patients with primary myelodysplastic syndromes. *Haematologica*. 2005; 90:1168-1178
- [113] Spurbeck J, Zinsmeister A, Meyer K, et al. Dynamics of chromosome spreading. *Am J Med Genet*. 1996;61:387.
- [114] Starczynowski DT, Kuchenbauer F, Argiropoulos B, et al. Identification of miR-145 and miR-146a as mediators of the 5q- syndrome phenotype. *Nat Med*. 2010; 16:49-58; Boulwood J, Pellagatti A, McKenzie AN, Wainscoat JS. Advances in the 5q- syndrome. *Blood*. 2010; 116:5803-5811; La Starza R, Matteucci C, Gorello P, et al. NPM1 deletion is associated with gross chromosomal rearrangements in leukemia. *PLoS One*. 2010; 5:e12855
- [115] Starczynowski DT, Kuchenbauer F, Argiropoulos B, et al. Identification of miR-145 and miR-146a as mediators of the 5q- syndrome phenotype. *Nat Med*. 2010; 16:49-84.

- [116] Stavropoulou C, Sambani C, Rigana H, et al. the Hellenic MDS Study Group. Low frequency of the glutathioneS-transferase T1-null genotype in patients with primary myelodysplastic syndrome and 5q deletion. *Leukemia*. 2008; 22:1643-1646
- [117] Stein S, Ott MG, Schultze-Strasser S, et al. Genomic instability and myelodysplasia with monosomy 7 consequent to EVI1 activation after gene therapy for chronic granulomatous disease. *Nat Med*. 2010; 16:198-204
- [118] Such E, Cervera J, Costa D, et al. Cytogenetic risk stratification in chronic myelomonocytic leukemia. *Haematologica* 2011;96:375-3832
- [119] Tahiliani M, Koh KP, Shen Y, et al. Conversion of 5-methylcytosine to 5-hydroxymethylcytosine in mammalian DNA by MLL partner TET1. *Science*. 2009; 324:930-935
- [120] Tang G, Wang SA, Lu V, et al. Clinically silent clonal cytogenetic abnormalities arising in patients treated for lymphoid neoplasms. *Leuk Res*. 2014;38:896-900
- [121] Tefferi A, Vardiman JW. Myelodysplastic syndromes. *N Engl J Med*. 2009; 361:1872-1885
- [122] The Principles of Clinical Cytogenetics Editors: Gersen, Steven L., Keagle, Martha B. (Eds.) Publisher: Springer; 3rd ed. 2013 edition (April 2, 2015) I SBN 978-1-4419-1688-4
- [123] The Process of Leukemogenesis Richard D. Irons^{1,2} and Wayne S. Stillman¹ ¹School of Pharmacy; ²Cancer Center, University of Colorado Health Sciences Center, Denver, Colorado, *Environ Health Perspect* 104(Suppl 6):1239-1 246 (1996)
- [124] 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. 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*. 2007;174:166–9.
- [125] Vallepsi T, Imbert M, Mecucci C, Preudhomme C, Fenaux P (1998): Diagnosis, classification and cytogenetics of Myelodysplastic syndromes, *Haematologica* 83:258-275
- [126] Vardiman JW (2003): Myelodysplastic syndromes, chronic myeloproliferative diseases, and Myelodysplastic/myeloproliferative diseases. *Semin Diagn Pathol* 20:154-179
- [127] Vardiman JW, Thiele J, Arber DA, et al. The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: Rationale and important changes. *Blood*. 2009; 114:937–951
- [128] Verburch E, Achten R, Louw VJ, Brusselmans C, Delforge M, Boogaerts M, Hagemeyer A, Vandenberghe P, Verhoef G.: A new disease categorization of low-grade myelodysplastic syndromes based on the expression of cytopenia and dysplasia in one versus more than one lineage improves on the WHO classification. *Leukemia*. 2007 Apr;21(4):668-77. Epub 2007 Feb 15.
- [129] Vousden KH, Prives C. Blinded by the light: The growing complexity of p53. *Cell* 2009; 137:413-431
- [130] Walter MJ, Shen D, Ding L, Shao J, Koboldt DC, Chen K, et al. (2012): Clonal architecture of secondary acute myeloid leukemia. *N Engl J Med* 366:1090-1098
- [131] Wang P, Spielberger RT, Thangavelu M, et al. dic(5;17): a recurring abnormality in malignant myeloid disorders associated with mutations of TP53. *Genes Chromosom Cancer*. 1997; 20:282-291
- [132] Wei S, Chen X, Rocha K, et al. A critical role for phosphatase haplodeficiency in the selective suppression of deletion 5q MDS by lenalidomide. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106:12974-12979
- [133] Wiktor A, Rybicki BA, Piao ZS, et al. Clinical significance of Y chromosome loss in hematologic diseases. *Genes Chromosom Cancer*. 2000; 27:11-16
- [134] Wilkens L, Tchinda J, Burkhardt D, et al. Analysis of hematological diseases using conventional karyotyping, fluorescence in situ hybridization (FISH) and comparative genomic hybridization (CGH). *Hum Pathol*. 1998;29:833.
- [135] Wong AK, Fang B, Zhang L, et al. Loss of the Y chromosome: An age-related or clonal phenomenon in acute myelogenous leukemia/myelodysplastic syndrome? *Arch Pathol Lab Med*. 2008; 132:1329–1332
- [136] Wong JC, Zhang Y, Lieu KH, et al. Use of chromosome engineering to model a segmental deletion of chromosome band 7q22 found in myeloid malignancies. *Blood*. 2010; 115:4524-4532
- [137] World Health Organization (WHO)-Classification of tumors of Haematopoietic and Lymphoid 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
- [138] Zhang FF, Murata-Collins JL, Gaytan P, et al. Twenty-four-color spectral karyotyping reveals chromosome aberrations in cytogenetically normal and acute myeloid leukemia. *Genes Chromosomes Cancer*. 2000;28:318.