



ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

**« ΝΕΟΠΛΑΣΜΑΤΙΚΗ ΝΟΣΟΣ ΣΤΟΝ ΑΝΘΡΩΠΟ:
ΕΡΕΥΝΑ ΚΑΙ ΚΛΙΝΙΚΟΠΑΘΟΛΟΓΟΑΝΑΤΟΜΙΚΗ ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΗ
ΣΤΑ ΠΛΑΙΣΙΑ ΤΗΣ ΕΞΑΤΟΜΙΚΕΥΜΕΝΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ
(ΔΙΑΓΝΩΣΗ ΚΑΙ ΣΤΟΧΕΥΜΕΝΗ ΘΕΡΑΠΕΙΑ) »**

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Αθανάσιος-Δημήτριος Μπακάσης

Ελευθερία Λακιωτάκη, Επίκουρη Καθηγήτρια

ΑΘΗΝΑ
ΝΟΕΜΒΡΙΟΣ 2022



ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

**«ΝΕΟΠΛΑΣΜΑΤΙΚΗ ΝΟΣΟΣ ΣΤΟΝ ΑΝΘΡΩΠΟ:
ΕΡΕΥΝΑ ΚΑΙ ΚΛΙΝΙΚΟΠΑΘΟΛΟΓΟΑΝΑΤΟΜΙΚΗ ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΗ ΣΤΑ ΠΛΑΙΣΙΑ ΤΗΣ
ΕΞΑΤΟΜΙΚΕΥΜΕΝΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ (ΔΙΑΓΝΩΣΗ ΚΑΙ ΣΤΟΧΕΥΜΕΝΗ ΘΕΡΑΠΕΙΑ)»**

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**«Μελέτη του σηματοδοτικού μονοπατιού PI3K/AKT στο
μυελό των ασθενών με μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα
υψηλού και χαμηλού κινδύνου»**

Αθανάσιος-Δημήτριος Μπακάσης

Ελευθερία Λακιωτάκη, Επίκουρη Καθηγήτρια

ΑΘΗΝΑ
ΝΟΕΜΒΡΙΟΣ 2022

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**«Μελέτη του σηματοδοτικού μονοπατιού ΡΙ3Κ/ΑΚΤ στο μυελό των ασθενών με
μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα υψηλού και χαμηλού κινδύνου»**

ΑΘΑΝΑΣΙΟΣ Δ. ΜΠΑΚΑΣΗΣ

A.M: 20190637

ΕΠΙΒΛΕΠΟΝ ΜΕΛΟΣ ΔΕΠ ΚΑΙ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

ΥΠΟΓΡΑΦΗ

Επίκουρη Καθηγήτρια
ΕΛΕΥΘΕΡΙΑ ΛΑΚΙΩΤΑΚΗ

.....

Καθηγήτρια
ΠΗΝΕΛΟΠΗ ΚΟΡΚΟΛΟΠΟΥΛΟΥ

.....

Καθηγήτρια
ΜΑΡΙΑ ΑΓΓΕΛΟΠΟΥΛΟΥ

.....

ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΕΞΕΤΑΣΗΣ:

ΠΕΡΙΛΗΨΗ:

Εισαγωγή: Η οδός PI3K/AKT/mTOR κατέχει ρόλο κλειδί στη ρύθμιση της κυτταρικής ανάπτυξης, της διαφοροποίησης και του πολλαπλασιασμού των κυττάρων σε πληθώρα νοσημάτων και νεοπλασιών, συμπεριλαμβανομένων και των αιματολογικών κακοηθειών. Ο M Nyakern και οι συνεργάτες έδειξαν ότι τα επίπεδα φωσφορυλίωσης (ενεργοποίησης) της Akt στη Ser473 (pAkt_s) είναι υψηλότερα σε PBMCs ή BMMCs ασθενών MDS υψηλού κινδύνου, ενώ BMMCs από μη νοσούντα ΜΟ ή από ασθενείς με MDS χαμηλού κινδύνου παρουσιάζουν απουσία ή περιορισμένη χρώση για pAkt_s. Τα ευρήματα αυτά μας ώθησαν στο ερευνητικό και κλινικό ερώτημα εάν η παρατηρούμενη διαφορά στην ενεργοποίηση (φωσφορυλίωση) της AKT θα ήταν εξίσου εμφανής και παρούσα κατά την ημιποσοτική μικροσκοπική εκτίμηση οστεομελικών βιοψιών (BMB) από αντίστοιχους ασθενείς με MDS.

Υλικά και Μέθοδοι: Το μόριο AKT καθώς και τα φωσφορυλιωμένα (p) Akt στη threonine-308 και στη serine-473 καθώς και PRAS40 μελετήθηκαν με τη μέθοδο της ανοσοϊστοχημείας σε δείγματα BMB από 10 περιστατικά MDS και 4 μάρτυρες. Επίσης, έγινε προσπάθεια συσχέτισης με τα κλινικο-παθολογοανατομικά χαρακτηριστικά των ασθενών.

Αποτελέσματα: Όλα τα περιστατικά, ασθενείς και μάρτυρες, ήταν θετικά για την AKT, pAkt_T, pAkt_s και pPRAS40. Αναλυτικότερα, η έκφραση της ολικής AKT αλλά και των pAkt_T, pAkt_s αφορούσε πρωτίστως την κοκκιώδη σειρά όχι μόνο στους ασθενείς αλλά και στους μάρτυρες, και ήταν κυρίως κυτταροπλασματική με εν μέρει λίγες περιπτώσεις πυρηνικής έκφρασης. Δεν παρατηρήθηκε διαφορά στην ένταση των επιμέρους χρώσεων αφενός μεταξύ ασθενών και μαρτύρων και αφετέρου μεταξύ διακριτών υποομάδων ασθενών, όπως ασθενείς με MDS-SLD και MDS-MLD με χαμηλό ποσοστό βλαστών (n=5) έναντι ασθενών με περίσσεια βλαστών (EB 1 ή/και 2) (n=5) αλλά και ασθενείς χαμηλού κινδύνου (n=5) έναντι μέτριου ή υψηλού κινδύνου βάση το IPSS-R (n=5) για κανένα από τα μελετώμενα μόρια. Τέλος, η ανοσοϊστοχημική έκφραση την ενεργοποιημένης (φωσφορυλιωμένης) μορφής του PRAS40, προσδέτη της AKT, ήταν εντόνως θετική σε όλα τα μελετώμενα δείγματα BM, ασθενών (n=10) και μαρτύρων (n=4), αφορούσε όλες τις κυτταρικές σειρές και ήταν κυρίως πυρηνική χρώση και εν μέρη κυτταροπλασματική.

Συμπεράσματα: Η αδυναμία ανάδειξης διαφοράς στην ενεργοποίηση-φωσφορυλίωση των μελετώμενων μορίων σε BMB μεταξύ ασθενών με MDS υψηλού κινδύνου και ασθενών με MDS χαμηλού κινδύνου ή μάρτυρες δίχως MDS στην παρούσα εργασία επιτάσσει την περαιτέρω μελέτη της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης των μελετώμενων μορίων σε μεγαλύτερο αριθμό ασθενών με ακριβείς μεθόδους ποσοτικοποίησης των αποτελεσμάτων καθώς και παράλληλες επιβεβαιωτικές τεχνικές.

Επιστημονική Περιοχή: ΑΙΜΑΤΟΛΟΓΙΑ-ΑΙΜΟΠΑΘΟΛΟΓΟΑΝΑΤΟΜΙΑ

Λέξεις Κλειδιά: ΜΥΕΛΟΔΥΣΠΛΑΣΤΙΚΟ ΣΥΝΔΡΟΜΟ, ΛΕΥΧΑΙΜΙΑ, AKT, MDS, PRAS40

ABSTRACT:

Introduction: The PI3K/Akt/mTOR pathway plays a key role in regulating cell growth, differentiation and proliferation in a variety of diseases and neoplasms, including hematological malignancies. It has been known in the available literature from the studies by M Nyakern et al. since 2006 that the phosphorylation (activation) levels of Akt in Ser473 (pAKTs) is higher in BMMCs of high-risk myelodysplastic syndrome (MDS) patients, while BMMCs from non-neoplastic BM or patients with low-risk MDS present absence or low intensity staining for pAKTs. These findings prompted us to study whether the observed difference in the activation-phosphorylation of Akt between BMMCs from patients with high-risk MDS compared to those with low risk MDS would be also detectable in a semi-quantitative manner during microscopic assessment of bone marrow biopsies (BMB) from MDS patients.

Material and Methods: The Akt molecule, as well as the phosphorylated (p) Akt in threonine-308 and serine-473 and PRAS40 were studied immunohistochemically in BMB samples from 10 cases of MDS patients and 4 controls and assessment of any associations between the staining intensity and the clinicopathological-anatomical characteristics of patients was attempted.

Results: All cases, both patients and controls, were positive for Akt, pAKT_T, pAKT_S and pPRAS40. Specifically, the expression of total Akt but also that of pAKT_T and pAKT_S primarily concerned the granulocytic lineage in both patient and control groups and was mainly cytoplasmic with only a few cases of partial nuclear expression. No differences were observed in any of the molecules studied between patients and controls, but also among distinct subgroups of patients, such as patients with SLD and MLD with a low percentage of blasts (n=5) versus patients with excess blasts (EB 1 and/or 2) (n=5) but also low-risk patients (n=5) versus moderate or high-risk IPSS-R (n=5). Finally, the immunohistochemical expression of the activated (phosphorylated) form of PRAS40, a substrate of AKT, was strongly positive in all studied specimens, the 10 patients (n=10) and 4 controls, concerned all cell lineages and displayed primarily a nuclear staining pattern and partly cytoplasmic one.

Conclusions: Our findings did not detect differences in the activation-phosphorylation pattern of the studied molecules in BMB specimens between patients with high-risk MDS and low-risk MDS patients or controls without MDS in the current study. Nevertheless, considering the importance of PI3K/AKT pathway in human oncogenesis, further studies on the immunohistochemical expression of these molecules in a larger study group with more precise quantification methods and concomitant confirmatory techniques are warranted.

Scientific field: HEMATOLOGY-HEMOPATHOLOGY

Keywords: MYELODYSPLASTIC SYNDROME, LEUKEMIA, MDS, AKT, PRAS40

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο Α' Εργαστήριο Παθολογικής Ανατομικής καθώς και στο Εργαστήριο της Παθολογικής Φυσιολογίας της Ιατρικής Σχολής του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών.

Ευχαριστώ από καρδιάς την Επίκουρη Καθηγήτρια του Α' Εργαστηρίου Παθολογικής Ανατομικής και επιβλέπουσα της παρούσας διπλωματικής εργασίας, κα Ελευθερία Λακιωτάκη, για την καθοριστική της συμβολή στο σχεδιασμό της μελέτης, την ερμηνεία των ερευνητικών αποτελεσμάτων και τη διαμόρφωση της παρούσας διπλωματικής εργασίας. Με τη σειρά τους θα ήθελα να εκφράσω τις θερμές ευχαριστίες μου στις Καθηγήτριες κα Π. Κορκολοπούλου και Μ. Αγγελοπούλου, μέλη της τριμελούς επιτροπής, για την πολύτιμη και ουσιαστική συμβολή τους στην εκπαίδευση μου στην Αιματολογία και Παθολογική Ανατομική στα πλαίσια του προγράμματος μεταπτυχιακών σπουδών, στην στροφή του ενδιαφέροντος μου στην Αιμοπαθολογοανατομία, την εμπιστοσύνη και υποστήριξη τους για την εκπόνηση της παρούσας διπλωματικής εργασίας καθώς και για τα πολύτιμα επιστημονικά σχόλια και παρατηρήσεις τους για την διαμόρφωση της παρούσας διπλωματικής εργασίας στην τελική της μορφή.

Επίσης, θέλω να εκφράσω ιδιαίτερες ευχαριστίες και τη μεγάλη ευγνωμοσύνη μου στον μέντορα μου, Καθηγητή Χαράλαμπο Μ. Μουτσόπουλο, για την καθημερινή μου ιατρική εκπαίδευση και την αγάπη που μου μεταλαμπάδευσαν για την ιατρική έρευνα.

Θερμά ευχαριστώ στην αιματολόγο, κα Ιωάννα Στεργίου, για τη συλλογή και τη διάθεση των περιστατικών και των κλινικών στοιχείων, καθώς και τον Καθηγητή Παθολογίας-Αιματολογίας, κ Μιχαήλ Βουλγαρέλη, για το ενδιαφέρον του, την καθοδήγηση και την πολύτιμη βοήθειά του.

Ακόμη, ιδιαίτερα ευχαριστώ την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Ανοσολογίας στο Εργαστήριο της Παθολογικής Φυσιολογίας, κα Ευσταθία Καψογεώργου, για την ανιδιωτελή προσφορά της στην εκπαίδευση μου στην ανοσοϊστοχημεία και τη σημαντική της συμβολή στην πειραματική διαδικασία.

Τέλος, ευχαριστώ πολύ και το λοιπό εκπαιδευτικό και διοικητικό προσωπικό του παρόντος προγράμματος μεταπτυχιακών σπουδών για την παροχή υψηλού επιπέδου εκπαίδευσης και σπουδών.

“Avaunt! And quit my sight! Let the earth hide thee!

Thy bone is marrowless. Thy blood is cold;

thou hast no speculation in those eyes which thou dost glare with.”

Shakespeare's Macbeth

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ Ι: ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	10
1. Ο ΜΥΕΛΟΣ ΤΩΝ ΟΣΤΩΝ	10
1.1 Αιμοποιητικά όργανα	10
1.2 Αιμοποίηση	13
1.2.1. Προγονικά αιμοποιητικά κύτταρα	16
1.2.2. Ερυθροποίηση	17
1.2.3. Κοκκιοποίηση και ανάπτυξη / διαφοροποίηση προς τη μονοκυτταρική σειρά.....	19
1.2.4. Μεγακαρυοποίηση	21
1.2.5. Λεμφοποίηση	23
1.3 Οστεομυελική βιοψία	23
2. ΜΥΕΛΟΔΥΣΠΛΑΣΤΙΚΑ ΣΥΝΔΡΟΜΑ	25
2.1 Ορισμός.....	25
2.2 Επιδημιολογία	26
2.3 Πιθανοί αιτιοπαθογενετικοί παράγοντες σχετιζόμενοι με την ανάπτυξη MDS	27
2.4 Κλινικά χαρακτηριστικά	28
2.5 Μικροσκοπική μελέτη	28
2.6 Γενετικό προφίλ.....	29
2.7 Πρόγνωση και Προγνωστικοί παράγοντες	31
2.8 Θεραπεία.....	32
3. Η ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΙΚΗ ΟΔΟΣ PI3K / Akt	33
3.1 Οι Πρωτεΐνες PI3K, AKT – Ενεργοποίηση / Φωσφορυλίωση της AKT	33
3.2 Η Πρωτεΐνη mTOR, το Σύμπλοκο mTORC1, το Σύμπλοκο mTORC2	35
3.3 Ο ρόλος της οδού στις αιματολογικές παθήσεις (συμπεριλαμβανομένων και των μυελοδυσπλαστικών συνδρόμων	36

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΙΙ: ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	39
4. ΣΚΟΠΟΣ	39
5. ΜΕΘΟΔΟΙ	40
5.1 Πληθυσμός της μελέτης	41
5.2 Πειραματικό Σκέλος – Ανοσοϊστοχημική Ανάλυση	43
5.3 Εκτίμηση των ανοσοϊστοχημικών χρώσεων.....	45
6. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	46
7. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	52
8. ΠΙΝΑΚΑΣ ΣΥΝΤΜΗΣΕΩΝ – ΑΡΤΙΚΟΛΕΞΩΝ	55
9. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	56

ΚΕΦΑΛΑΙΟ Ι: ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

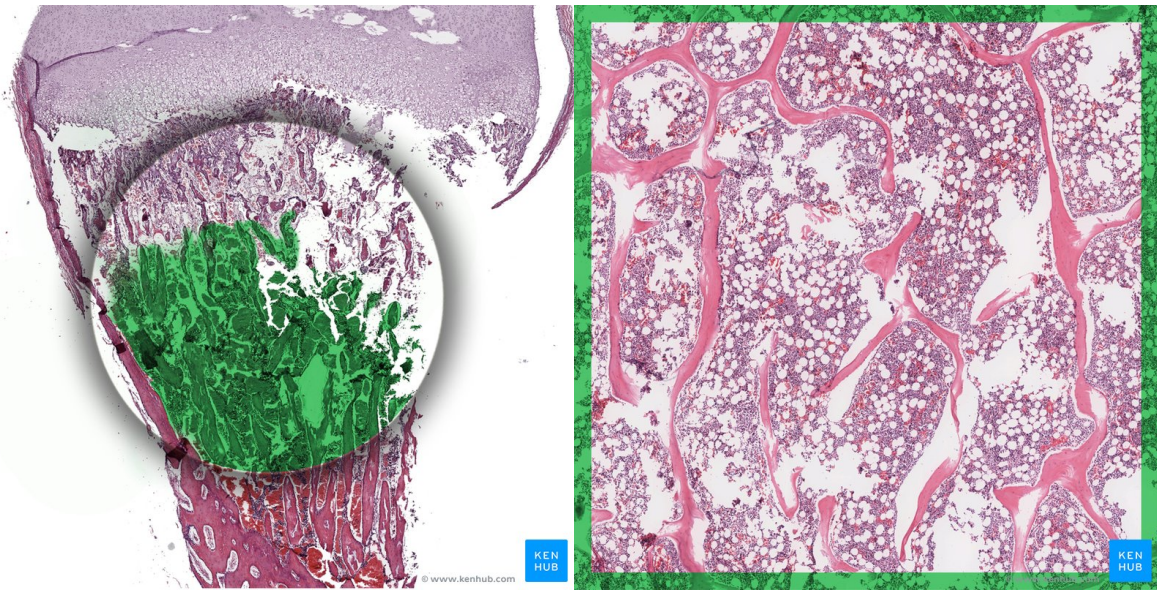
1. Ο ΜΥΕΛΟΣ ΤΩΝ ΟΣΤΩΝ

1.1. Αιμοποιητικά όργανα

Από τον πολλαπλασιασμό, τη διαφοροποίηση και την ωρίμανση της αιμοκυττοβλάστης αναπτύσσονται στον ανθρώπινο οργανισμό από την εμβρυική ζωή δύο ειδών αιμοποιητικοί ιστοί, ο μυελικός και ο λεμφικός (Weinberg and Hasserjian, 2019). Μυελικός ιστός ονομάζεται ο ιστός που παράγει ερυθροκύτταρα, κοκκιοκύτταρα, αιμοπετάλια και κύτταρα της μονοκυτταρικής σειράς. Λεμφικός ιστός ονομάζεται ο ιστός που παράγει λεμφοκύτταρα. Υπό φυσιολογικές συνθήκες, παραγωγή και διαφοροποίηση μυελικών σειρών υπάρχει μόνο στο μυελό των οστών, ενώ ο λεμφικός ιστός βρίσκεται σε πολλά μέρη του σώματος, ήτοι στα πρωτογενή, τα δευτερογενή και τα τριτογενή λεμφικά όργανα. Τα πρωτογενή λεμφικά όργανα απαρτίζουν ο μυελός των οστών (BM) και ο θύμος αδένας και κύριος ρόλος τους είναι η παραγωγή και η διαφοροποίηση Β λεμφοκυττάρων (BM) και Τ λεμφοκυττάρων (BM και θύμος) ανεξάρτητων από αντιγόνα. Τα δευτερογενή λεμφικά όργανα απαρτίζουν οι λεμφαδένες, ο σπλήνας, οι αμυγδαλές και ο λεμφοεπιθηλιακός ιστός, τα οποία είναι υπεύθυνα για την παραγωγή μνημονικών κυττάρων και αποτελεσματικών ανοσοπαραγωγών κυττάρων. Τέλος, τα τριτογενή λεμφικά όργανα απαρτίζονται από τον επίκτητο λεμφοεπιθηλιακό ιστό, ο οποίος αντιδρά σε αντιγόνα σε εξωλεμφοαδενικές περιοχές χωρίς γηγενή λεμφικό ιστό (Cesta, 2006).

Ο BM περικλείεται μέσα στις οστικές κοιλότητες που επενδύονται εσωτερικά από ένα παχύ στρώμα συνδετικό-λιπώδους ιστού (**Εικόνα 1**). Ο ωχρός- και ο ερυθρός μυελός που περιγραφόταν στα παλαιότερα συγγράμματα δεν είναι παρά από το συνδετικό-λιπώδες στρώμα και το BM, αντίστοιχα. Κύρια εντόπιση είναι οι σπόνδυλοι και τα πλατέα οστά του κρανίου, της λεκάνης, των πλευρών καθώς και οι επιφύσεις των μακρών οστών. Το βάρος του εκτιμάται συνολικά περίπου ίσο με το βάρος του ήπατος. Από ιστολογικής απόψεως, θα μπορούσε κανείς να φανταστεί το BM ως ένα τρισδιάστατο πλέγμα ινιδίων, αγγείων και κυττάρων που συνδέονται μεταξύ τους με μία πρωτεϊνούχα ουσία, την εξωκυττάρια ουσία, σχηματίζοντας έτσι βροχίδες, τις αιμοποιητικές φωλιές (Travlos, 2006).

Μελέτη του σηματοδοτικού μονοπατιού PI3K/AKT στο μυελό των ασθενών με
μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα υψηλού και χαμηλού κινδύνου



Εικόνα 1. Μυελός των οστών σε ιστολογική τομή διάφυσης μακρού οστού.

Με τον όρο αιμοποιητικό μικροπεριβάλλον υποδηλώνεται το ιστολογικά ιδιόμορφο εριστικό υπόστρωμα του ΒΜ που συγκρατεί και συνδέει τα έμμορφα στοιχεία, επάγει και προάγει τον πολλαπλασιασμό, τη διαφοροποίηση και την ωρίμανση αυτών, εξασφαλίζει την έξοδο των ώριμων κυττάρων στην κυκλοφορία και προάγει τη λειτουργία και δραστηριότητα ορισμένων από αυτά τα κύτταρα (Morrison and Scadden, 2014). Στον **Πίνακα 1** παρατίθενται αναλυτικά τα στοιχεία του αιμοποιητικού μικροπεριβάλλοντος.

Ο ΒΜ δέχεται διπλή αιμάτωση, ήτοι από τροφοφόρες αρτηρίες και το περιοστικό δίκτυο τριχοειδών αγγείων. Αφενός, η τροφοφόρος αρτηρία αρχικά αιματώνει τις οστεοδοκίδες και ακολούθως διακλαδώνεται εντός της κοιλότητας του αιμοποιητικού μυελού σε μικρότατους κλάδους, σχηματίζοντας το δίκτυο κολποειδών τριχοειδών που είναι απαραίτητο για την αιμοποίηση. Αφετέρου, το περιοστικό δίκτυο τριχοειδών διεισδύει στους σωλήνες του Harves και στη συνέχεια εφοδιάζει με αρτηριακό αίμα το ΒΜ.

Η βασική δομική μονάδα του ΒΜ είναι το κολποειδές τριχοειδές. Λεπτομερέστερα, τα ενδοθηλιακά κύτταρα επενδύουν εσωτερικά τη βασική μεμβράνη και αυτή με τη σειρά της περικλύεται από στρωματικά κύτταρα ποικίλων ειδών που προσκολλώνται στην εξωτερική επιφάνεια του κολποειδούς τριχοειδούς, σχηματίζοντας-οριοθετώντας έτσι το τοίχωμα του κολποειδούς τριχοειδούς. Τα στρωματικά κύτταρα είναι υπεύθυνα για το σχηματισμό αφενός της στρωματικής κοίτης του κολποειδούς και αφετέρου το διακολποειδικού εξωκυττάριου στρώματος (**Εικόνα 2**), το οποίο αποτελείται από

Μελέτη του σηματοδοτικού μονοπατιού PI3K/AKT στο μυελό των ασθενών με
μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα υψηλού και χαμηλού κινδύνου

πολυάριθμα μόρια με ποικίλες ιδιότητες όπως αυτών των αυξητικών παραγόντων, της προσκόλλησης και για την προσέλκυση και τη διέγερση πρόδρομων αιμοποιητικών κυττάρων προς αιμοποίηση. Τα πρωτεϊνικά αυτά μόρια υποστηρίζονται από δίκτυο δικτυωτών ινών (**Πίνακας 1**).

Πίνακας 1. Στοιχεία του αιμοποιητικού μικροπεριβάλλοντος.

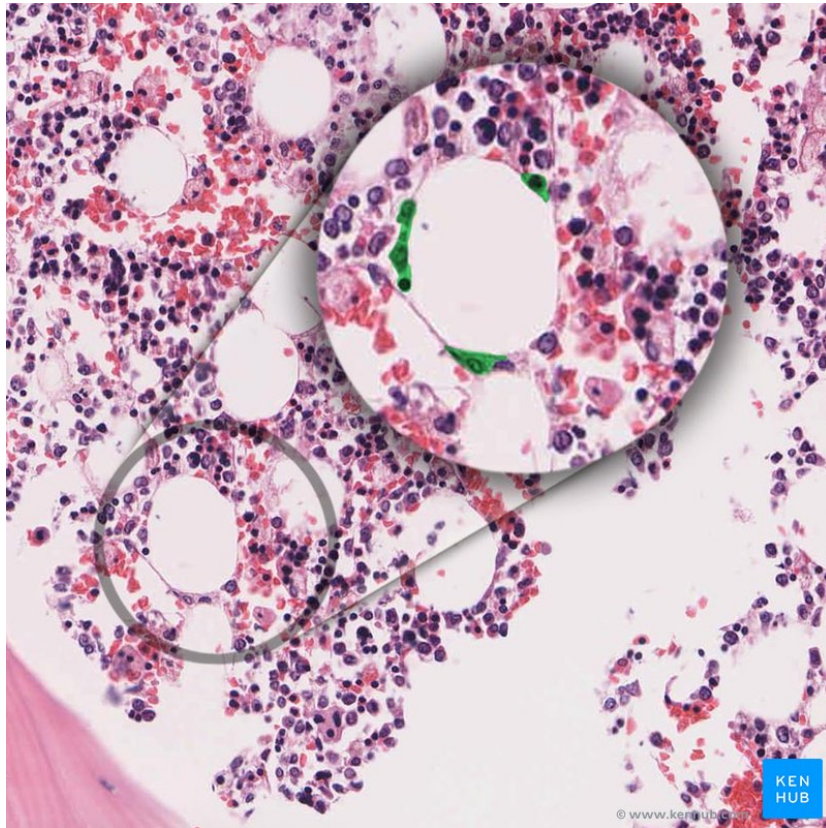
<p><u>Ινίδια:</u> Συνδετικές ίνες Δικτυωτές ίνες Ίνες κολλαγόνου</p>	<p><u>Αγγεία:</u> Αρτηρίες και αρτηρίδια Τριχοειδή Φλέβες</p>
<p><u>Κύτταρα:</u> <u>Αυτόχθονα</u> Ινοβλάστες Λιποκύτταρα Ενδοθήλια Μακροφάγα <u>Ετερόχθονα</u> Λεμφοκύτταρα Μονοκύτταρα</p>	<p><u>Άμορφη ουσία:</u> Κολλαγόνο Γλυκοζαμινογλυκάνες Λαμινίνη Αιμονεκτίνη Φυμπρονεκτίνη</p>

Αξίζει να σημειωθεί ότι η πιθανότερη συνθήκη για τη μεταφορά των ώριμων κυττάρων του αίματος, ειδικότερα των ερυθρών και των λευκών αιμοσφαιρίων, είναι να επιτυγχάνεται διαμέσου του κυτταροπλάσματος των ενδοθηλιακών κυττάρων, και όχι διαμέσου των διακυττάρων χώρων. Αντίθετα, τα μεγακαρυοκύτταρα τοποθετούνται πλησίον των κολποειδών τριχοειδών και προσεκβάλλουν κυτταροπλασματικά ψευδοπόδια τα οποία φθάνουν έως τους αυλούς των κολποειδών τριχοειδών. Μετά από κατάτμηση αυτών των ψευδοποδίων, τα θραύσματα αυτών, δηλαδή τα αποκαλούμενα αιμοπετάλια, διοχετεύονται στην κυκλοφορία του αίματος. Για ορισμένους κυτταρικούς τύπους, όπως τα πλέον ώριμα πλασματοκύτταρα από την περιφέρεια, παρατηρείται και η αντίθετη κατεύθυνση διέλευσης, με τη μετανάστευσή τους από την κυκλοφορία του αίματος προς τον ΒΜ μέσω του τοιχώματος των κολποειδών τριχοειδών.

Τα κολποειδή τριχοειδή συνενώνονται σε φλεβίδια και τελικά σε φλέβες οι οποίες οδηγούν τα νεοπαραχθέντα κύτταρα του αίματος στην κυκλοφορία. Η νεύρωση του ΒΜ συνίσταται σε νεύρα, τα οποία πορεύονται στην κοιλότητα του ΒΜ, σε σχετική γεινίαση

Μελέτη του σηματοδοτικού μονοπατιού PI3K/AKT στο μυελό των ασθενών με μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα υψηλού και χαμηλού κινδύνου

με τα αρτηρίδια και τα φλεβίδια, και τελικώς απελευθερώνουν νευροπεπτίδια που ρυθμίζουν την αιμοποίηση. Ο ΜΟ δεν διαθέτει λεμφαγγεία.



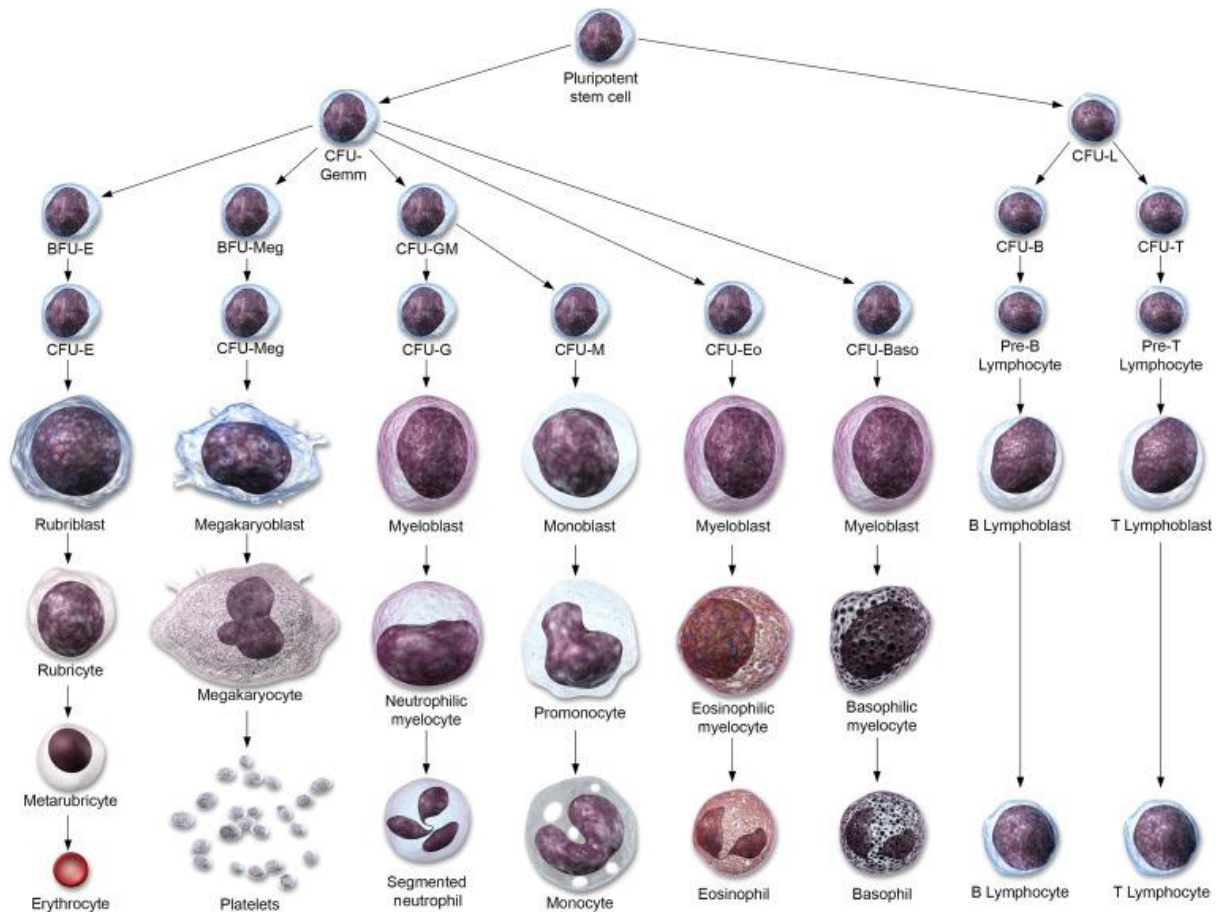
Εικόνα 2. Δικτυοκύτταρα (μεσεγχυματογενή κύτταρα ομοιάζοντα ινοβλάστες) υπεύθυνα για την παραγωγή ρετικουλίνης (είδος κολλαγόνου τύπου III) σε ιστολογική τομή μυελού των οστών.

1.2. Αιμοποίηση

Τα έμμορφα συστατικά του αίματος έχουν περιορισμένο χρόνο ζωής και επομένως η διατήρηση του σταθερού αριθμού τους στην κυκλοφορία εξασφαλίζεται μονάχα με την είσοδο νεοπαραγόμενων κυττάρων στην περιφέρεια από τα αιμοποιητικά όργανα σε αριθμό ίσο με τον αριθμό εκείνον που πεθαίνουν/καταναλώνονται (Elmore, 2006). Ονομάζουμε αιμοποιητικές κυτταρικές σειρές τις μορφολογικά ή/και ανοσοϊστοχημικά πανομοιότυπες κατηγορίες προγονικών κυττάρων στα αιμοποιητικά όργανα που δίνουν γένεση στις επιμέρους κατηγορίες των έμμορφων συστατικών του αίματος. Τα μητρικά

Μελέτη του σηματοδοτικού μονοπατιού PI3K/AKT στο μυελό των ασθενών με
μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα υψηλού και χαμηλού κινδύνου

αυτά κύτταρα αποτελούν τα πολυδύναμα προγονικά κύτταρα και διακρίνονται σε μυελικά και λεμφικά (Travlos, 2006) (Εικόνα 3).



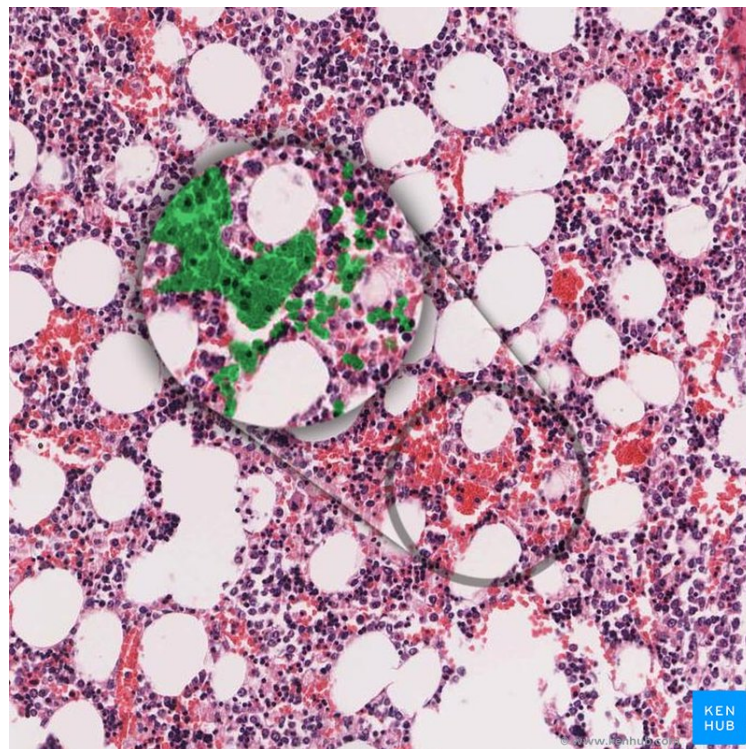
Εικόνα 3. Αναπαράσταση της ωρίμανσης των διαφόρων κυτταρικών σειρών του μυελού των οστών. CFU = colony forming unit; E = erythroid; Meg = megakaryocyte; Gemm = granulocytic, erythroid, monocyte-macrophage, and megakaryocytic; GM = granulocyte/monocyte; G = granulocyte; M = monocyte; Eo = eosinophil; Baso = basophil; L = lymphocyte.

Στις μυελικές αιμοποιητικές σειρές εντάσσονται η ερυθρά, η κοκκιώδης, συμπεριλαμβανομένης της μονοκυτταρικής/μακροφαγικής, καθώς και η μεγακαρυοκυτταρική. Η αναγνώριση των σειρών αυτών στηρίζεται στο μορφολογικό φαινότυπο των κυττάρων αυτών όταν χρωματίζονται με May-Grunwald-Giemsa μυελικά επιχρίσματα (Travlos, 2006). Οι μορφολογικές διαφορές που καθορίζουν και τα στάδια διαφοροποίησης και ωρίμανσης διέπονται από δύο κανόνες: α) η ωρίμανση των κυττάρων συνοδεύεται από προοδευτική μείωση του όγκου του πυρήνα με ταυτόχρονη

Μελέτη του σηματοδοτικού μονοπατιού PI3K/AKT στο μυελό των ασθενών με μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα υψηλού και χαμηλού κινδύνου

αύξηση του όγκου του κυτταροπλάσματος και β) με την ωρίμανση των κυττάρων όπου μεταβάλλεται το χρώμα του κυτταροπλάσματος από βασεόφιλο κυανό (αωρότερες μορφές) σε ολοένα και περισσότερο οξύφιλο πορτοκαλλόχρουν (ωριμότερες μορφές).

Με τον όρο ερυθρά σειρά φέρεται μία ομάδα προγονικών κυττάρων στο ΒΜ που με τον πολλαπλασιασμό, τη διαφοροποίηση και την ωρίμανσή τους δίνουν γένεση στα ερυθροκύτταρα-ερυθρά αιμοσφαίρια (**Εικόνα 4**) (Barminko et al., 2016). Ως κοκκιώδης ή κοκκιοκυτταρική σειρά φέρεται ένα σύνολο κυττάρων στο ΒΜ που με τον πολλαπλασιασμό, τη διαφοροποίηση και την ωρίμανσή τους δίνουν γέννηση στα ουδετερόφιλα πολυμορφοπύρρηνα, τα ηωσινόφιλα και τα βασεόφιλα κύτταρα τα οποία διαφέρουν από τα ηωσινόφιλα πρωτίστως στον τύπο των κυτταροπλασματικών κοκκίων. Η μονοκυτταρική/μακροφαγική σειρά είναι ένα σύνολο πρόδρομων μητρικών κυττάρων που με τον πολλαπλασιασμό, τη διαφοροποίηση και την ωρίμανσή τους δίνουν γέννηση στα μονοκύτταρα του περιφερικού αίματος και τα μακροφάγα των ιστών. Η μεγακαρυοκυτταρική σειρά είναι και αυτή ένα σύνολο μεγάλου μεγέθους κυττάρων που με τον πολλαπλασιασμό, τη διαφοροποίηση και την ωρίμανσή τους δίνουν γέννηση στα αιμοπετάλια (Naeim et al., 2018a) (**Εικόνα 3**).



Εικόνα 4. Ερυθροκύτταρα-ερυθρά αιμοσφαίρια σε ιστολογική τομή μυελού των οστών.

1.2.1. Προγονικά αιμοποιητικά κύτταρα

Προγονικά αιμοποιητικά κύτταρα ονομάζονται τα μορφολογικά μη αναγνωρίσιμα μητρικά κύτταρα των έμμορφων συστατικών του αίματος. Πρόκειται για κύτταρα με μικρή μόνο αναλογία στο BM που ομοιάζουν μορφολογικά με ένα μέσου μεγέθους λεμφικό κύτταρο ούτως ώστε η διάκρισή της από τα άλλα κύτταρα να είναι ουσιαστικά αδύνατη (Naeim et al., 2018a).

Τα αρχέγονα πολυδύναμα προγονικά μητρικά αιμοποιητικά κύτταρα (pluripotent hematopoietic stem cells, P-HSC) είναι οι πλησιέστεροι απόγονοι της αιμοκυττοβλάστης κατά τη διάρκεια της μετα-εμβρυϊκής ζωής, αποτελούν τα πρώτα κύτταρα στην ιεραρχία της αιμοποίησης, ενώ ο αριθμός τους υπολογίζεται σε 0,01 έως 0,05% επί του συνόλου των εμπύρηνων κυττάρων του BM (Lim et al., 2013). Χαρακτηριστικό των κυττάρων αυτών είναι η ικανότητα αυτοσυντήρησης ούτως ώστε ο συνολικός αριθμός τους να παραμένει σταθερός. Υπό φυσιολογικές συνθήκες το 95% εξ αυτών βρίσκεται σε φάση G0 του κυτταρικού κύκλου.

Μόνο το 5% των P-HSC του BM βρίσκονται σε φάση διαίρεσης σε μία δεδομένη στιγμή σε έναν ενήλικα, και η κυτταρική αυτή κατάσταση εγκαθίσταται 4 εβδομάδες μετά τη γέννηση. Εκτιμάται ότι κάθε P-HSC διαιρείται κάθε 145 ημέρες ή και περισσότερες. Τα παραπάνω οδηγούν στο συμπέρασμα ότι στο BM υπάρχει μία αποθήκη (‘‘ρεζερβουάρ’’) P-HSC η οποία ενεργοποιείται σε περίπτωση αυξημένων αναγκών λόγω stress. Ο ταχύς ρυθμός καταστροφής των κυτταρικών στοιχείων της κυκλοφορίας και η μακροβιότητα των P-HSC καθιστούν απαραίτητο τα P-HSC αφενός να αποφεύγουν τη γήρανση και αφετέρου να διατηρήσουν τον κατάλληλο μεταβολικό ρυθμό. Επομένως, τα P-HSC εμφανίζουν αυξημένη δραστηριότητα της τελομεράσης συγκριτικά με τα διαφοροποιούμενα πρόδρομα κύτταρα και τα ώριμα κύτταρα.

Τα υπόλοιπα κύτταρα είτε πολλαπλασιάζονται για να διατηρηθεί ο συνολικός τους αριθμός σταθερός είτε διαφοροποιούνται προς δύο τουλάχιστον κατευθύνσεις: α) το πολυδύναμο μυελικό προγονικό αιμοποιητικό κύτταρο (μυελικό HSC) και β) το διδύναμο λεμφικό προγονικό αιμοποιητικό κύτταρο (λεμφικό HSC).

Όπως προαναφέρθηκε τα HSC δεν αναγνωρίζονται εύκολα μορφολογικά δεδομένου της μικρής αναλογίας τους ανάμεσα στα υπόλοιπα εμπύρηννα κύτταρα και αφετέρου λόγω

Μελέτη του σηματοδοτικού μονοπατιού PI3K/AKT στο μυελό των ασθενών με μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα υψηλού και χαμηλού κινδύνου

του ότι στερούνται ιδιαίτερων μορφολογικών χαρακτηριστικών. Ο έλεγχος των μεμβρανικών αντιγόνων των προγονικών αιμοποιητικών κυττάρων γίνεται σήμερα με ανοσοφθορισμό με κυτταρομετρία ροής χρησιμοποιώντας ειδικά σημασμένα μονοκλωνικά αντισώματα ή με τη μέθοδο της ανοσοϊστοχημείας. Τα P-HSC φέρουν στη μεμβράνη τους αντιγόνα HLA-A, B, C, DR και τα αντιγόνα CD34 (gp115) και CD117 (c-kit, gp145), το τελευταίο αποτελώντας μία μεμβρανική γλυκοπρωτεΐνη ως υποδοχέα του αυξητικού παράγοντα των P-HSC (Naeim et al., 2018b).

1.2.2. Ερυθροποίηση

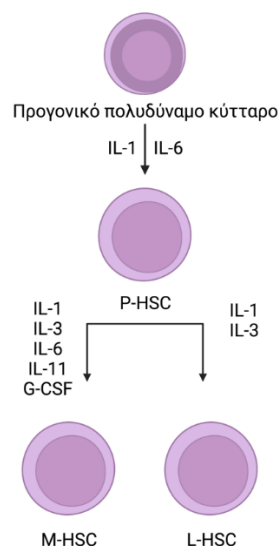
Ο ανθρώπινος ΒΜ έχει την ικανότητα να παράγει περίπου 2 εκατομμύρια νέα ερυθρά αιμοσφαίρια ανά δευτερόλεπτο. Τα ερυθρά αιμοσφαίρια, με μεγέθους 6-8 μm, έχουν ένα ιδιαίτερο κοίλο σχήμα και κυκλοφορούν στο περιφερικό αίμα με χρόνο ημίσειας ζωής περί τις 120 ημέρες με σκοπό την μεταφορά οξυγόνου στους ιστούς δεσμευμένο στην αιμοσφαιρίνη.

Από τη στιγμή που τα πρόδρομα κύτταρα προσλαμβάνουν την κατεύθυνση για διαφοροποίηση προς την ερυθρά σειρά, η ωρίμανση συνοδεύεται από συμπύκνωση του πυρήνα, μείωση του συνολικού μεγέθους του κυττάρου και από αποβολή του πυρήνα. Οι προερυθροβλάστες υφίστανται πολυάριθμους κύκλους διαιρέσεων και αυξημένη συνάθροιση των ριβοσωμάτων. Η βασεόφιλη ερυθροβλάστη, η πολυχρωματόφιλη ερυθροβλάστη και η ορθοχρωματική ερυθροβλάστη είναι τα επόμενα στάδια ανάπτυξης, έχουν πάρει το όνομά τους από την εμφάνισή τους κατά τη χρώση Wright-Giemsa, και αντιστοιχούν σε αυξημένη συμπύκνωση της πυρηνικής χρωματίνης και μείωση του μεγέθους του κυττάρου. Τα τελευταία στάδια χαρακτηρίζονται από πιο οξεόφιλο κυτταρόπλασμα, συμπυκνωμένη χρωματίνη, και εξωκύττωση του πυκνωτικού πυρήνα. Στη συνέχεια ο πυρήνας φαγοκυτταρώνεται από μακροφάγα που βρίσκονται πλησίον των πρόδρομων κυττάρων των ερυθρών. Το άωρο ερυθρό ή αλλιώς δικτυοερυθροκύτταρο παραμένει στο ΒΜ για διάστημα ημερών προτού μεταναστεύσει στην περιφέρεια και ωριμάσει πλήρως.

Όπως και στις υπόλοιπες αιμοποιητικές σειρές, οι κυτταροκίνες κατέχουν κύριο ρόλο στη ρύθμιση του πολλαπλασιασμού και της επιβίωσης των πρόδρομων κυττάρων των ερυθρών. Όπως φαίνεται στην **Εικόνα 5** η διαφοροποίηση των M-HSC σε πρώιμες

Μελέτη του σηματοδοτικού μονοπατιού PI3K/AKT στο μυελό των ασθενών με μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα υψηλού και χαμηλού κινδύνου

αποικίες ευθροκυττάρων (BFUe) προάγεται με την παρέμβαση τριών κυρίως παραγόντων, της ιντερλευκίνης 3 (IL-3), του Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) και της ιντερλευκίνης 9 (IL-9), ενώ για την διαφοροποίηση του BFUe στις ωριμότερες αποικίες (CFUe) χρειάζεται η παρέμβαση των IL3, GM-CSF και ερυθροποιητίνης EPO (Alexander, 1998). Για την περαιτέρω διαφοροποίηση των CFUe, την ανάπτυξη της μορφολογικά αναγνωρίσιμης ερυθράς σειράς και την ωρίμανση και έξοδο των δικτυοερυθροκυττάρων από το BM στην κυκλοφορία αρκεί η παρουσία μόνο της ερυθροποιητίνης (EPO) (Naeim et al., 2018b). Η EPO, η οποία συντίθεται από τα περισωληναριακά κύτταρα του νεφρού, επιτελεί τον ομοιοστατικό έλεγχο του όγκου των ερυθροκυττάρων στο MO, αφού η υποξία, όπως γίνεται αντιληπτή από το νεφρό μέσω της σηματοδότησης από τους επαγόμενους από την υποξία παράγοντες (hypoxia-inducible-factors, HIFs), οδηγεί στην έκκριση της EPO, η οποία οδηγεί σε περαιτέρω παραγωγή αίματος. Η διέγερση των πρώιμων πρόδρομων κυττάρων των ερυθρών από την EPO και τον υποδοχέα της (EPOR) ενεργοποιεί τη σηματοδοτική οδό JAK/STAT, και σε συνδυασμό με τις υπόλοιπες κυτταροκίνες ενεργοποιούν τη σηματοδότηση μέσω της οδού PI3K για τον επακόλουθο πολλαπλασιασμό των πρόδρομων κυττάρων της ερυθράς σειράς.



Athanasios-Dimitrios Bakasis via BioRender

Εικόνα 5. Αυξητικοί αιμοποιητικοί παράγοντες και ιντερλευκίνες που υπεισέρχονται στον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση του προγονικού πολυδύναμου κυττάρου και του

Μελέτη του σηματοδοτικού μονοπατιού PI3K/AKT στο μυελό των ασθενών με
μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα υψηλού και χαμηλού κινδύνου

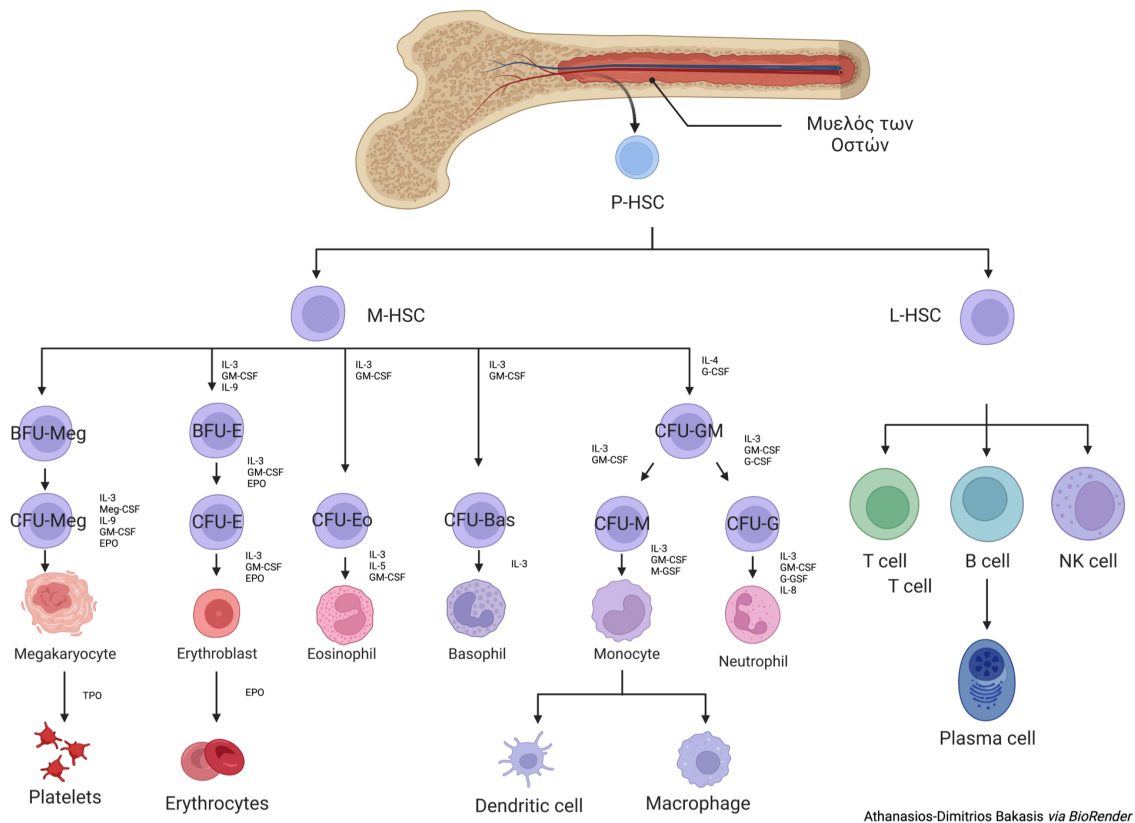
P-HSC (Εικόνα βασισμένη στην εικόνα του βιβλίου του Γ. Ηλιόπουλου 1997 και επαναζωγραφισμένη με το πρόγραμμα BioRender)

1.2.3. Κοκκιοποίηση και ανάπτυξη / διαφοροποίηση προς τη μονοκυτταρική σειρά

Η κοκκιοποίηση, όπως προαναφέρθηκε, διακρίνεται στην ανάπτυξη των ουδετερόφιλων, των ηωσινόφιλων και των βασεόφιλων. Η ανάπτυξη των ουδετερόφιλων έχει κοινή διαδρομή με την ανάπτυξη-διαφοροποίηση προς τη μονοκυτταρική σειρά μέχρις ενός σημείου [colony forming unit granulocyte/monocyte (CFU-GM)], ενώ η ανάπτυξη των ηωσινόφιλων και των βασεόφιλων ακολουθούν ανεξάρτητες εξελίξεις (Naeim et al., 2018b).

Τα ουδετερόφιλα κοκκιοκύτταρα και τα μονοκύτταρα έχουν κοινό μητρικό πρόγονο το CFU-GM που προέρχεται από ολιγοδύναμα M-HSC. Η διαφοροποίηση του M-HSC προς την κατεύθυνση του CFU-GM προάγεται από την παρέμβαση της IL-4 και του G-CSF. Η διαφοροποίηση του CFU-GM προς την μονοκυτταρική/μακροφαγική κυτταρική σειρά προάγεται παρουσία των IL-3 και GM-CSF. Για τα ουδετερόφιλα φαίνεται ότι απαιτούνται οι IL-3, GM-CSF και G-CSF. Τα παραγόμενα μονοκύτταρα διαφοροποιούνται στην συνέχεια σε ιστικά μακροφάγα παρουσία των παραγόντων M-CSF και GM-CSF, ενώ τα προγονικά κύτταρα των ουδετερόφιλων κοκκιοκυττάρων πολλαπλασιάζονται και διαφοροποιούνται σε ουδετερόφιλα πολυμορφοπύρρηνα παρουσία IL-3, GM-CSF και G-CSF. Επιπλέον καθοριστική σημασία έχει και η επίδραση της IL-8 η οποία συμβάλλει στην πλαστικότητα των κυττάρων αυτών για το πέρασμα τους από το BM στην κυκλοφορία (**Εικόνα 6**). Η εκτροπή της διαφοροποίησης του CFU-GM προς την κοκκιοκυτταρική ή την μονοκυτταρική/μακροφαγική σειρά είναι κυρίως θέμα τοπικών παραγόντων του μικροπεριβάλλοντος του BM και των συγκεντρώσεων των GM-CSF και G-CSF. Επί παρουσίας μεγάλων συγκεντρώσεων των παραγόντων αυτών η διαφοροποίηση στρέφεται προς την παραγωγή ουδετερόφιλων, ενώ παρουσία μικρών συγκεντρώσεων στρέφεται προς την παραγωγή μονοκυτταρικής/μακροφαγικής σειράς (Naeim et al., 2018b, Travlos, 2006).

Μελέτη του σηματοδοτικού μονοπατιού PI3K/AKT στο μυελό των ασθενών με μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα υψηλού και χαμηλού κινδύνου



Εικόνα 6. Αυξητικοί αιμοποιητικοί παράγοντες και ιντερλευκίνες που υπεισέρχονται στον διαδικασία της αιμοποίησης της μυελικής σειράς και των Παραγώγων της (Εικόνα βασισμένη στην εικόνα του David Sabio in Williams Hematology, 6th edition; Copyright McGraw-Hill. τροποποιημένη και επαναζωγραφισμένη με το πρόγραμμα BioRender)

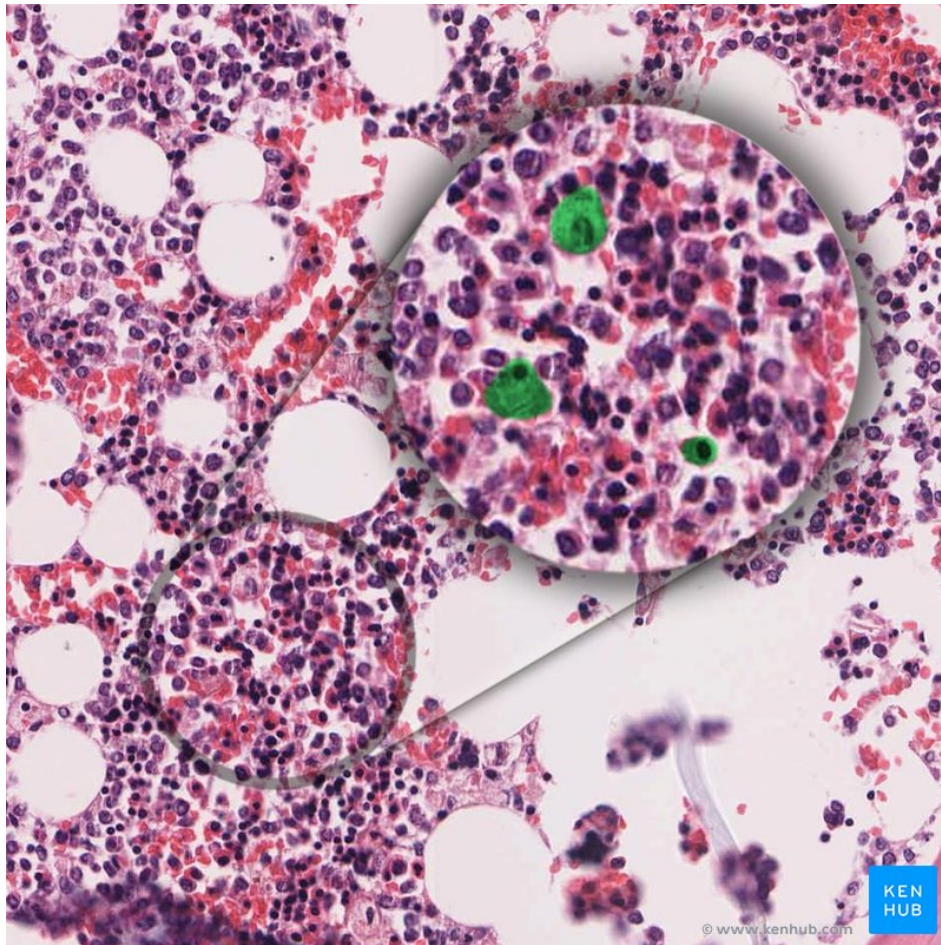
Τα ηωσινόφιλα έχουν ως προγονικό κύτταρο το CFU-Eo που είναι απόγονος του M-HSC υπό την επίδραση της IL-3 και του GM-CSF. Για την περαιτέρω διαφοροποίηση, πολλαπλασιασμό και ωρίμανση απαιτείται επιπλέον η IL-5. Τα βασεόφιλα κύτταρα του αίματος και τα μαστοκύτταρα των ιστών έχουν ως μητρικό προγονικό κύτταρο το CFU-Bas που και αυτό είναι απόγονος του M-HSC. Φαίνεται ότι για τον πολλαπλασιασμό, την διαφοροποίηση και την ωρίμανση των προγονικών κυττάρων της βασεόφιλης σειράς αρκεί η παρουσία μόνο της IL-3 (Naeim et al., 2018b, Travlos, 2006).

1.2.4 Μεγακαρυοποίηση

Το προγονικό κύτταρο των μεγακαρυοκυττάρων είναι το CFU-Meg ή BFU-Meg που προέρχεται και αυτό από το M-HSC. Η διαφοροποίηση και ωρίμανση του M-HSC είναι αποτέλεσμα μιας πολύπλοκης επίδρασης των IL-3, GM-CSF, EPO, Meg-CSF και IL-9 και της θρομβοποιητίνης (TPO) σε μεταγενέστερη φάση (Travlos, 2006). Η μεγακαρυοβλάστη, μέσω πυρηνικής διαίρεσης χωρίς διαίρεση του κυτταροπλάσματος (ενδομίτωση), μετατρέπεται σε μεγακαρυοκύτταρο, το οποίο είναι το κύτταρο του BM με τη μεγαλύτερη μορφολογική ποικιλία. Η διαδικασία αυτή κρατά από 6 έως 10 ημέρες. Στα πρώιμα στάδια, οι μεγακαρυοβλάστες έχουν μέγεθος 15 μm και είναι τετραπλοειδικοί όσον αφορά την ποσότητα DNA που περιέχουν. Στο τελικό στάδιο, πριν την παραγωγή των αιμοπεταλίων, τα μεγακαρυοκύτταρα έχουν μέγεθος 150 μm και μπορεί να περιέχουν έως και 64 αντίγραφα DNA. Τα τελικώς διαφοροποιημένα μεγακαρυοκύτταρα χαρακτηρίζονται από αυξημένη πυρηνική πτύχωση, σημαντικά αυξημένο μέγεθος, άφθονο βασεόφιλο κυτταρόπλασμα και την παρουσία λοβωτών προεκβολών (**Εικόνα 7**).

Τα θρομβοκύτταρα (αιμοπετάλια) προκύπτουν μέσω απόσπασης θραυσμάτων του κυτταροπλάσματος. Οι γυμνοί πυρήνες των μεγακαρυοκυττάρων που παραμένουν υφίστανται φαγοκυττάρωση. Μέσα στο BM τα μεγακαρυοκύτταρα ανευρίσκονται πλησίον των κολποειδών. Από εκεί, μέσω των προσεκβολών τους οι οποίες φθάνουν μέχρι τα ενδοθήλια, τα μεγακαρυοκύτταρα "ρίχνουν" απευθείας στην κυκλοφορία αιμοπετάλια με διάρκεια ζωής έως και 9 ημέρες. Τα αιμοπετάλια επιζούν περίπου 8-11 ημέρες και αποδομούνται κυρίως μέσω φαγοκυττάρωσης στο σπλήνα.

Μελέτη του σηματοδοτικού μονοπατιού PI3K/AKT στο μυελό των ασθενών με
μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα υψηλού και χαμηλού κινδύνου



Εικόνα 7. Μεγακαρυοκύτταρα σε ιστολογική τομή μυελού των οστών.

Αν και τα μεγακαρυοκύτταρα αποτελούν ένα μικρό ποσοστό των κυττάρων του ΜΟ, παράγουν 106 αιμοπετάλια/δευτερόλεπτο, και ένα μεγακαρυοκύτταρο είναι ικανό να παράξει $1-3 \times 10^3$ αιμοπετάλια. Τα παραπάνω έχουν ως αποτέλεσμα να υπάρχουν 1×10^{12} αιμοπετάλια στην κυκλοφορία κάθε στιγμή. Εκτός της βασικής τους λειτουργίας ως τα κυτταρικά συστατικά του θρόμβου, τα αιμοπετάλια έχουν επιπλέον ρόλους στο εγγενές και το επίκτητο ανοσιακό σύστημα. Για παράδειγμα, τα αιμοπετάλια εκφράζουν την P-selectin και συνδιεγερτικούς υποδοχείς όπως τους CD40L και TLR, οι οποίοι συμμετέχουν στην προσέλκυση των λευκών αιμοσφαιρίων σε περιοχές τραυματισμού των ιστών και προωθούν τη φλεγμονώδη απάντηση του οργανισμού.

1.3.5. Λεμφοποίηση

Στις λεμφικές αιμοποιητικές σειρές εντάσσονται η B- και T-λεμφοκυτταρική σειρά καθώς και η ύπαρξη μιας τρίτης σειράς, της κυτταρικής σειράς των κυττάρων φυσικών φονέων (NK). Αν και η ακριβής γένεση των πρόδρομων κυττάρων των λεμφοκυττάρων και ο προσδιορισμός της έκφρασης συγκεκριμένων δεικτών από αυτά είναι αμφιλεγόμενες, τα επόμενα βήματα στη λεμφοποίηση έχουν καθοριστεί καλύτερα. Τα B- και T-ώριμα λεμφοκύτταρα έχουν την προοπτική για μακρά διάρκεια ζωής όταν διατηρούνται σε ανενεργή κατάσταση, όπως τα αρχέγονα αιμοποιητικά κύτταρα. Αυτά τα φαινομενικά αδρανή κύτταρα μπορούν να πολλαπλασιαστούν ταχέως μετά από διέγερση από τους υποδοχείς του ανοσιακού συστήματος που ρυθμίζουν τη λειτουργία τους. Μια λεπτομερής ανάλυση της διαφοροποίησης και ωρίμανσης των λεμφοκυττάρων ξεφεύγει από τα πλαίσια της παρούσας εργασίας.

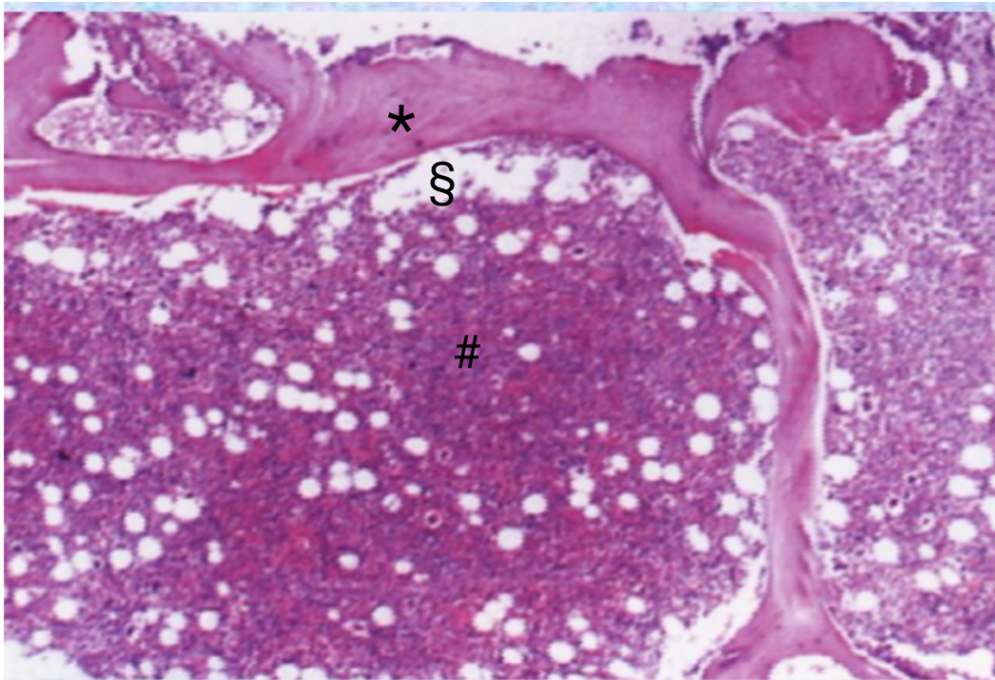
Τα δεσμευμένα για τη B- και T- λεμφοκυτταρική σειρά προγονικά μητρικά κύτταρα είναι τα BL-HSC και TL-HSC, αντίστοιχα. Και τα δύο αυτά κύτταρα προέρχονται από ένα κοινό πρόγονο το διδύναμο L-HSC που προαναφέραμε που έλκει την καταγωγή από το P-HSC. Στη διαφοροποίηση προς τη λεμφική κατεύθυνση, είτε της B- ή της T-, υπεισέρχονται η IL-1 και η IL-3 όπως φαίνεται στην **Εικόνα 6**. Η διαφορά έγκειται ότι για την T-λεμφοκυτταρική σειρά από τα TL-HSC υπεισέρχεται και η IL-2 και αυτό γίνεται αποκλειστικά στο θύμο αδένα (Naeim et al., 2018a, Travlos, 2006, Kumar et al., 2018).

1.3. Οστεομυελική βιοψία

Η οστεομυελική βιοψία ή βιοψία του BM (BMB) παρουσιάζει σημαντικά πλεονεκτήματα έναντι του μυελογράμματος (Bain, 2001): 1) παρέχει μία σαφέστερη εικόνα της κυτταροβρίθειας του BM και δίνει τη δυνατότητα περιγραφής αυτής αναλογικά σε σχέση με τα λιποκύτταρα (λιπώδης ιστός), 2) παρέχει σαφή εικόνα της αντιπροσώπευσης και της ωρίμανσης των αιμοποιητικών σειρών, καθώς τα στάδια ωρίμανσης αξιολογούνται καλύτερα στα επιχρίσματα, 3) δίνει την δυνατότητα τοπογραφικής εντόπισης των κυτταρικών ομάδων αλλά και δύναται να αξιολογήσει μη αναμενόμενα κυτταρικά στοιχεία όπως αθροίσεις ιστοκυττάρων, κοκκιώματα, ίνωση, ορώδη ατροφία και νεοπλασματικά κύτταρα, 4) παρέχει τη δυνατότητα ελέγχου και εκτίμησης του βαθμού ίνωσης του BM και

Μελέτη του σηματοδοτικού μονοπατιού PI3K/AKT στο μυελό των ασθενών με
μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα υψηλού και χαμηλού κινδύνου

τέλος εκτιμώνται οι οστεοδοκίδες, τα αγγεία και η εναποθέσεις αμυλοειδούς. Αντιθέτως, η BMB κατέχει και δύο αξιοσημείωτα μειονεκτήματα: 1) χρονοβόρα διαδικασία καθώς το ιστοτεμάχιο πρέπει να υποστεί αφαλάτωση και ειδική επεξεργασία και 2) δεν επιτρέπει τη μελέτη λεπτομερών μορφολογικών χαρακτηριστικών δεδομένου ότι τα κύτταρα μελετώνται σε τομές και όχι ολόκληρα (2018d).



Εικόνα 8. Εικόνα μικροσκοπίου από τομή οστεομυελικής βιοψίας που απεικονίζει σε χαμηλή μεγέθυνση τις βασικές συνιστώσες του οστού και του μυελού των οστών. * Οστεοδοκίδες, § Λιποκύτταρα, # Μυελοκύτταρα

2. ΜΥΕΛΟΔΥΣΠΛΑΣΤΙΚΑ ΣΥΝΔΡΟΜΑ

2.1. Ορισμός

Τα μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα (MDS) αποτελούν μια ετερογενή ομάδα κλωνικών διαταραχών του αρχέγονου αιμοποιητικού κυττάρου που χαρακτηρίζονται από επαναλαμβανόμενες γενετικές βλάβες, αυξημένη απόπτωση στα προγονικά κύτταρα του BM και δυσπλασία σε μία ή περισσότερες σειρές του BM με αποτέλεσμα τη μη αποδοτική αιμοποίηση στο BM, κυτταροπενίες και αυξημένο κίνδυνο εξέλιξης σε οξεία μυελογενή λευχαιμία (AML) (2018c, Arber et al., 2016)

Κλινικοεργαστηριακά, η κυτταροπενία σε τουλάχιστον μία από τις αιμοποιητικές σειρές είναι απαραίτητη προϋπόθεση για τη διάγνωση του MDS. Τα προτεινόμενα όρια για τις κυτταροπενίες σύμφωνα με την WHO 2022 είναι ως εξής: αιμοσφαιρίνη <13g/dL για άνδρες και <12g/dL για γυναίκες, αιμοπετάλια <5x10⁹/L ή απόλυτος αριθμός ουδετερόφιλων <1,8x10⁹/L, τα όρια αυτά χρησιμοποιούνται σήμερα για να ορίσουν τις κυτταροπενίες για την διάγνωση των MDS και η πλειοψηφία των ασθενών με MDS θα εμφανίσουν τουλάχιστον μία πενία εξ αυτών με τιμές κάτω από τα όρια που προαναφέρθηκαν (Khoury et al., 2022). Το μορφολογικό κατώφλι της δυσπλασίας είναι 10% για όλες τις αιμοποιητικές σειρές κατά τη WHO 2022 (Khoury et al., 2022).

Από αιμοπαθολογοανατομική σκοπιά, το μορφολογικό χαρακτηριστικό του MDS είναι η δυσπλασία σε μια ή περισσότερες σειρές του BM. Η δυσπλασία μπορεί να συνοδεύεται από αύξηση των μυελοβλαστών στο περιφερικό αίμα ή/και στο BM, αλλά το ποσοστό των βλαστών είναι πάντα <20%, τιμή η οποία αποτελεί και το ανώτερο όριο πάνω από το οποίο τίθεται η διάγνωση της AML. Επαναλαμβανόμενες κυτταρογενετικές ανωμαλίες ανευρίσκονται σε 40-50% των περιπτώσεων, ενώ επίκτητες σωματικές μεταλλάξεις γονιδίων αναγνωρίζονται στην πλειονότητα των MDS κατά τη διάγνωσή τους (2019).

Η νοσολογική οντότητα των MDS περιλαμβάνει αρκετούς διακριτούς υποτύπους, που ορίζονται από το είδος των κυτταροπενιών στο περιφερικό αίμα κατά τη διάγνωση, τον αριθμό των κυτταρικών σειρών του BM που παρουσιάζουν δυσπλασία, την παρουσία δακτυλιοειδών σιδηροβλαστών και, τέλος, το ποσοστό των βλαστών στο περιφερικό αίμα

Μελέτη του σηματοδοτικού μονοπατιού PI3K/AKT στο μυελό των ασθενών με μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα υψηλού και χαμηλού κινδύνου

και το BM. Κατά την πιο πρόσφατη ταξινόμηση των MDS (WHO 2022), τα μυελοδυσπλαστικά νεοπλάσματα με καθορισμένες γενετικές ανωμαλίες ομαδοποιούνται και περιλαμβάνουν: MDS με χαμηλό ποσοστό βλαστών και μεμονωμένη διαγραφή/απαλοιφή του μακρού σκέλους του χρωμοσώματος 5 (MDS-5q), MDS με χαμηλό ποσοστό βλαστών και μετάλλαξη SF3B1 (MDS-SF3B1), and MDS με διαλληλική απενεργοποίηση του TP53 (MDS-biTP53).

Παρότι η εξέλιξη σε AML αποτελεί φυσική πορεία της νόσου σε αρκετές περιπτώσεις, το ποσοστό των ασθενών με πρόοδο νόσου ποικίλλει σημαντικά ανάλογα με τον υπότυπο του MDS και πιο συγκεκριμένα ο υψηλότερος κίνδυνος εμφάνισης AML αφορά τους υπότυπους με αυξημένο ποσοστό βλαστών (Malcovati et al., 2005). Αν και οι περισσότεροι υπότυποι χαρακτηρίζονται από προοδευτική ανεπάρκεια του BM και πολλοί ασθενείς γίνονται μεταγγισιοεξαρτώμενοι, η βιολογική πορεία ορισμένων υποτύπων είναι μακρά, καλοήθης και με χαμηλή επίπτωση εξέλιξης σε AML.

2.2. Επιδημιολογία

Τα MDS εκδηλώνονται κυρίως σε ηλικιωμένους (μέση ηλικία ασθενών: 70 έτη) και μάλιστα με επικράτηση του ανδρικού φύλου. Η ετήσια επίπτωση είναι 3-5 νέες περιπτώσεις ανά 100.000 άτομα στο γενικό πληθυσμού (χωρίς διόρθωση για την ηλικία) και 20 περιπτώσεις ανά 100.000 άτομα ηλικίας >70 ετών. Εάν συνυπολογιστεί η ανεπαρκής καταγραφή των MDS στις βάσεις καταγραφής κακοηθειών, αιματολογικών νοσημάτων ή/και χρόνιων παθήσεων, η πραγματική ετήσια επίπτωση σε ασθενείς >65 ετών μπορεί να φτάνει και τις 75 περιπτώσεις ανά 100.000 πληθυσμού (Zeidan et al., 2019). Περί τις 10.000 νέες περιπτώσεις MDS διαγιγνώσκονται ετησίως στις Ηνωμένες Πολιτείες της Αμερικής (ΗΠΑ), σύμφωνα με το πρόγραμμα SEER (Surveillance, Epidemiology, and End Results) και το NAACCR (North American Association of Central Cancer Registries). Άλλες εκτιμήσεις, βασιζόμενες στο ασφαλιστικό σύστημα Medicare των ΗΠΑ, η επίπτωση για την ίδια χρονική περίοδο ανέρχεται σε έως και 45.000 περιπτώσεις MDS σε άτομα >65 ετών ετησίως (Rollison et al., 2008).

Απαραίτητη προϋπόθεση για τη διάγνωση MDS αποτελεί η κλινικοεργαστηριακή συνεκτίμηση του λοιπού ατομικού ιατρικού ιστορικού και της φαρμακευτικής αγωγής, δηλαδή κανένας ασθενής δεν πρέπει να διαγιγνώσκεται με MDS χωρίς να είναι γνωστό

Μελέτη του σηματοδοτικού μονοπατιού PI3K/AKT στο μυελό των ασθενών με μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα υψηλού και χαμηλού κινδύνου

το κλινικό και το φαρμακευτικό ιστορικό του και να έχουν αποκλειστεί άλλες αιτίες δυσαιμοποίησης. Ορισμένα φάρμακα, λοιμώξεις, μεταβολικές ανεπάρκειες και διαταραχές του ανοσοποιητικού συστήματος μπορεί να προκαλούν τόσο κυτταροπενίες όσο και μορφολογική δυσπλασία.

Ακόμη, καμία περίπτωση MDS δεν πρέπει να επαναταξινομείται αφότου ο ασθενής λάβει οποιαδήποτε θεραπεία με αυξητικούς παράγοντες, συμπεριλαμβανομένης και της ερυθροποιητίνης.

Η ανεξήγητη, εμμένουσα κυτταροπενία οποιασδήποτε σειράς, απουσία δυσπλασίας δεν πρέπει να αποδίδεται σε MDS, εκτός αν υπάρχει συγκεκριμένη κυτταρογενετική ανωμαλία. Η εμμένουσα κυτταροπενία χωρίς δυσπλασία και χωρίς ειδική κυτταρογενετική ανωμαλία οφείλει να διαγιγνώσκεται ως ιδιοπαθής κυτταροπενία απροσδιόριστης σημασίας (Idiopathic Cytopenia of Undetermined Significance – ICUS), ενώ η στενή παρακολούθηση του ασθενή κρίνεται απαραίτητη (Valent et al., 2012). Ασθενείς με κλωνικές μεταλλάξεις γονιδίων σχετιζόμενων με MDS, χωρίς όμως δυσπλασία κατά την εξέταση του BM, δεν πρέπει να διαγιγνώσκονται λανθασμένα ως πάσχοντες από MDS αλλά να κατατάσσονται στην λεγόμενη κλωνική αιμοποίηση απροσδιόριστου δυναμικού (Clonal Hematopoiesis of Indeterminate Potential - CHIP) (Steensma et al., 2015).

2.3. Πιθανοί αιτιοπαθογενετικοί παράγοντες σχετιζόμενοι με την ανάπτυξη MDS

Τα πρωτοπαθή ή de novo MDS αναπτύσσονται χωρίς κάποιο γνωστό ιστορικό έκθεσης σε χημειοθεραπεία ή ακτινοβολία. Πιθανοί αιτιοπαθογενετικοί παράγοντες μπορεί να είναι η έκθεση σε βενζόλιο (σε επίπεδα βέβαια αρκετά υψηλότερα από τα μέγιστα επιτρεπτά όρια ανά τα κράτη), το κάπνισμα (εξηγείται μερικώς λόγω της ύπαρξης βενζολίου στον καπνό των τσιγάρων), έκθεση σε γεωργικά χημικά ή διαλύτες και οικογενειακό ιστορικό αιματολογικών νεοπλασιών. Ακόμη, υπάρχουν και κληρονομικά σύνδρομα μυελικής ανεπάρκειας, όπως η αναιμία Fanconi, το σύνδρομο Shwachman-Diamond και η συγγενής δυσκεράτωση που προδιαθέτουν στην ανάπτυξη MDS (συχνά σε νεαρή ηλικία) (Brierley and Steensma, 2020).

2.4. Κλινικά χαρακτηριστικά

Οι περισσότεροι ασθενείς παρουσιάζουν συμπτώματα σχετιζόμενα με τις κυτταροπενίες. Στην πλειονότητά τους οι ασθενείς εμφανίζουν αναιμία και προσέρχονται με αντίστοιχη συμπτωματολογία, όπως αυξημένη κόπωση και ωχρότητα. Η ουδετεροπενία ή/και η θρομβοπενία, με συμπτώματα όπως υποτροπιάζοντα εμπύρετα ή αιμορραγική διάθεση και πετέχειες, εμφανίζονται πιο σπάνια. Περίπου το ένα τρίτο των ασθενών εξαρτώνται από μεταγγίσεις ερυθρών αιμοσφαιρίων κατά τη διάγνωση. Σπανιότατα μπορεί να παρατηρηθεί οργανομεγαλία (Garcia-Manero et al., 2020).

2.5. Μικροσκοπική μελέτη

Η μορφολογική ταξινόμηση των MDS βασίζεται πρωτίστως (1) στο ποσοστό των βλαστών στο BM και το περιφερικό αίμα, (2) στον τύπο και στο βαθμό της δυσπλασίας και στην εκπροσώπηση των κυτταρικών σειρών του BM καθώς και (3) στο ποσοστό των δακτυλιοειδών σιδηροβλαστών. Οι κυτταρικές σειρές που παρουσιάζουν πενίες δεν είναι απαραίτητα αυτές που εμφανίζουν και δυσπλασία (Nishino and Chang, 2005).

Οι περιπτώσεις των MDS χωρίς παρουσία αυξημένου ποσοστού βλαστών αναγνωρίζονται με την εκδήλωση δυσπλασίας σε μία σειρά (Single Lineage Dysplasia - SLD) ή σε πολλαπλές σειρές (Multilineage Dysplasia – MLD). Στις περισσότερες περιπτώσεις MDS - SLD, η δυσπλασία αφορά την ερυθρά σειρά (2018b). Δυσπλασία μιας σειράς και αφορώσα την κοκκιοκυτταρική ή τη μεγακαρυοκυτταρική σειρά συμβαίνει, αλλά είναι σημαντικά πιο σπάνιο εύρημα από τη μεμονωμένη δυσπλασία της ερυθράς σειράς όπως προαναφέρθηκε. Στα MDS-MLD, δυσπλαστικά χαρακτηριστικά αναγνωρίζονται σε δύο ή και περισσότερες σειρές (2018a).

Το μορφολογικό κατώφλι της δυσπλασίας είναι 10% για όλες τις αιμοποιητικές σειρές κατά τη WHO 2022 (Khoury et al., 2022). Μορφολογικά, η δυσερυθροποίηση εκδηλώνεται κυρίως ως μεταβολή των μορφολογικών χαρακτηριστικών του πυρήνα των ερυθροβλαστών (πυρηνικές προσεκβολές, διαπυρηνικές γέφυρες, καρυορρηξία, παρουσία πολλαπλών πυρήνων). Οι μεγαλοβλαστοειδείς μεταβολές είναι συχνά παρούσες στα MDS, αλλά η μεμονωμένη παρουσία τους δεν επαρκεί για να τεκμηριώσει

Μελέτη του σηματοδοτικού μονοπατιού PI3K/AKT στο μυελό των ασθενών με μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα υψηλού και χαμηλού κινδύνου

την παρουσία δυσερυθροποίησης. Τα κυτταροπλασματικά χαρακτηριστικά περιλαμβάνουν την ύπαρξη σιδηροβλαστών με περιπυρηνικό δακτύλιο εκ μιτοχονδρίων πλήρη σιδήρου (δακτυλιοειδείς σιδηροβλάστες), την κενοτοπιώδη εκφύλιση και την εκσεσημασμένη θετικότητα για χρώση PAS (Periodic acid-Schiff). Η δυσκοκκιοποίηση χαρακτηρίζεται κυρίως από υπολόβωση του πυρήνα (ψευδο-Pelger-Huët ανωμαλία) ή υπερλόβωση του πυρήνα, υποκοκκίωση του κυτταροπλάσματος, το ψευδο-Chediak-Higashi κοκκία και το μικρό μέγεθος (Goasguen et al., 2014). Η μεγακαρυοκυτταρική δυσπλασία χαρακτηρίζεται από παρουσία μικρομεγακαρυοκυττάρων, μη λοβιωμένους πυρήνες και πολλαπλώς κατετμημένους πυρήνες. Τα μικρομεγακαρυοκύτταρα και τα πολυπύρηννα μεγακαρυοκύτταρα με πολυκατάτμητους πυρήνες αποτελούν τα πιο αξιόπιστα ευρήματα δυσπλασίας της μεγακαρυοκυτταρικής σειράς (Della Porta et al., 2015). Η παρουσία ραβδίων Auer θεωρείται ένδειξη MDS με περίσσεια βλαστών ανεξάρτητα από το ποσοστό των βλαστών.

2.6. Γενετικό προφίλ

Οι κυτταρογενετικές μελέτες κατέχουν σημαντικό ρόλο στην καθ'ημέρα κλινική πρακτική καθώς συμβάλλουν στην εκτίμηση των ασθενών με MDS όσον αφορά την πρόγνωση και τον καθορισμό κλινικότητας, ενώ μπορεί να αναδεικνύουν και συσχετίσεις με ορισμένα μορφολογικά και κλινικά χαρακτηριστικά. Παραδειγματικά, το MDS με χαμηλό ποσοστό βλαστών και del(5q) αποτελεί έναν ξεχωριστό υπότυπο MDS στην ταξινόμηση κατά WHO 2022 και χαρακτηρίζεται είτε από μεμονωμένη απώλεια του 5q, ή συνδυασμό με κάποια άλλη ανωμαλία πλην της μεμονωμένης απώλειας του χρωμοσώματος 7 ή μονοσωμίας 7. Παρουσιάζεται συχνότερα σε γυναίκες (μέση ηλικία 67 έτη) και χαρακτηρίζεται από μεγακαρυοκύτταρα με υπολοβωμένους πυρήνες ή πυρήνες χωρίς λόβωση, υποπλασία της ερυθράς σειράς, φυσιολογικά ή αυξημένα αιμοπετάλια και ευνοϊκή κλινική πορεία.

Η απώλεια του 17p σχετίζεται με MDS ή AML με ψευδο-Pelger-Huët ανωμαλίες, μικρά ουδετερόφιλα με κενοτόπια, μετάλλαξη του TP53 και δυσμενή κλινική πρόγνωση (Lai et al., 1995). Οι σύνθετοι καρυότυποι (≥ 3 ανωμαλίες) τυπικά περιλαμβάνουν βλάβες των χρωμοσωμάτων 5 ή/και 7 και σχετίζονται με κακή πρόγνωση. Αρκετά άλλα κυτταρογενετικά ευρήματα φαίνεται να σχετίζονται με χαρακτηριστικές μορφολογικές ανωμαλίες, όπως για παράδειγμα η μεμονωμένη del(20q) συνδυάζεται με δυσμεγακαρυοποίηση και θρομβοπενία και η inv(3)(q21.3q26.2) σχετίζεται με

Μελέτη του σηματοδοτικού μονοπατιού PI3K/AKT στο μυελό των ασθενών με
μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα υψηλού και χαμηλού κινδύνου

παθολογικά μεγακαρυοκύτταρα και μπορεί να συνοδεύεται από θρομβοκυττάρωση (Braun et al., 2011, Rogers et al., 2014).

Εκτός από τις επαναλαμβανόμενες κυτταρογενετικές ανωμαλίες που ανιχνεύονται με τη μελέτη του καρυότυπου και οι οποίες ανιχνεύονται σε περίπου 40-50% των περιπτώσεων MDS, επαναλαμβανόμενες σωματικές μεταλλάξεις σε πάνω από 50 γονίδια έχουν ανιχνευθεί στο 80-50% των ασθενών με MDS. Τα συχνότερα γονίδια στα οποία ανευρίσκονται μεταλλάξεις κωδικοποιούν πρωτεΐνες που ελέγχουν το μάτισμα του RNA (SF3B1, SRSF2, U2AF1 και ZRSR2 συνολικά μεταλλαγμένα σε >50% των περιπτώσεων) ή την επιγενετική ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης μέσω μεθυλίωσης του DNA (TET2, DNMT3A, IDH1, IDH2) ή της τροποποίησης των ιστονών (ASXL1, EZH2). Άλλα γονίδια που ανιχνεύονται συχνά να φέρουν μεταλλάξεις είναι εκείνα μεταγραφικών παραγόντων (RUNX1, NRAS, BCOR), πρωτεϊνών σηματοδότησης (CBL), το ογκοκατασταλτικό γονίδιο p53 (TP53) και το σύμπλεγμα της κονεξίνης (STAG2), το οποίο ελέγχει τη σύνδεση των αδελφών χρωματίδων. Όπως και με τις κυτταρογενετικές ανωμαλίες, συγκεκριμένες μεταλλάξεις έχουν συσχετιστεί με συγκεκριμένα μορφολογικά χαρακτηριστικά στα MDS. Για παράδειγμα, η μετάλλαξη του SF3B1 σχετίζεται με την παρουσία δακτυλιοειδών σιδηροβλαστών και οι μεταλλάξεις των ASXL1, RUNX1, TP53 και SRSF2 σχετίζονται με δυσπλασία των κοκκιοκυττάρων (Chiereghin et al., 2021).

Το τοπίο των μεταλλάξεων στα MDS είναι σύνθετο και δυναμικό. Πολλαπλές μεταλλάξεις μπορεί να είναι παρούσες, διακριτά προφίλ μεταλλάξεων μπορεί να ανιχνεύονται σε δύο ή περισσότερους υποκλώνους, ενώ η σχετική αναλογία των υποκλώνων αυτών μπορεί να μεταβάλλεται με τη θεραπεία και την πρόοδο της νόσου. Οι επίκτητες κλωνικές μεταλλάξεις που ανευρίσκονται στα MDS μπορεί επίσης να υπάρχουν και σε αιμοποιητικά κύτταρα υγιών μεγαλύτερης ηλικίας ενηλίκων χωρίς MDS. Έτσι, μόνο η ανεύρεση σχετιζόμενων με τα MDS σωματικών μεταλλάξεων δε θεωρείται διαγνωστική MDS, ακόμη και σε ασθενείς με κυτταροπενία που δεν μπορεί να εξηγηθεί.

2.7. Πρόγνωση και Προγνωστικοί παράγοντες

Παρότι η πρόσφατη ταξινόμηση των MDS κατά WHO 2022 επέφερε ριζικές αλλαγές σε ορισμένες κατηγοριοποιήσεις των MDS, αξίζει να αναφερθεί η παλαιότερη ταξινόμηση σύμφωνα με την οποία ακόμη ταξινομούνται ασθενείς σε κλινικό επίπεδο και βάση αυτής έχουν σχεδιαστεί οι μελέτες στην υπάρχουσα βιβλιογραφία. Οι υπότυποι των MDS που περιλαμβάνονται στην ταξινόμηση του WHO 2017 μπορούν να διακριθούν γενικά σε τρεις κατηγορίες κινδύνου με βάση την επιβίωση και την επίπτωση της εξέλιξης σε AML. Η ομάδα χαμηλού κινδύνου περιλαμβάνει τα MDS με δυσπλασία μιας σειράς (SLD), τα MDS με δακτυλιοειδείς σιδηροβλάστες και δυσπλασία μιας σειράς και τα MDS με μεμονωμένη del(5q). Η ομάδα ενδιάμεσου κινδύνου περιλαμβάνει τα MDS με δυσπλασία πολλαπλών κυτταρικών σειρών (MLD) και τα MDS με δακτυλιοειδείς σιδηροβλάστες και δυσπλασία πολλαπλών κυτταρικών σειρών. Η ομάδα υψηλού κινδύνου αφορά στα MDS με περίσσεια βλαστών.

Η σημασία των κυτταρογενετικών χαρακτηριστικών ως δεικτών πρόγνωσης στα MDS κωδικοποιήθηκε από την ομάδα εργασίας για την ανάλυση κινδύνου των MDS το 1997 και αυτή η κατηγοριοποίηση του κυτταρογενετικού κινδύνου επικαιροποιήθηκε το 2012 (Neukirchen et al., 2014). Το αναθεωρημένο διεθνές προγνωστικό σύστημα βαθμονόμησης (Revised International Prognostic Scoring System – R-IPSS) περιλαμβάνει:

- το ποσοστό των βλαστών του μυελού,
- την ομάδα κυτταρογενετικού κινδύνου με βάση το CCSS (Comprehensive Cytogenetic Scoring System) και
- το βαθμό της κυτταροπενίας σε κάθε σειρά για να προβλέψει την επιβίωση και τον κίνδυνο εξέλιξης σε AML.

Προκύπτουν έτσι πέντε ομάδες κινδύνου με βάσει το IPSS-R: πολύ χαμηλού, χαμηλού, ενδιάμεσου, υψηλού και πολύ υψηλού κινδύνου.

Ένα άλλο προγνωστικό σύστημα για την πρόβλεψη της έκβασης των MDS είναι το βασισμένο στην ταξινόμηση κατά WHO προγνωστικό σύστημα βαθμονόμησης (WHO-classification based Prognostic Scoring System -WPSS), το οποίο ενσωματώνει επιλέον μεταβλητές όπως (α) οι ανάγκες για μεταγγίσεις και (β) η μορφολογική δυσπλασία (μιας

Μελέτη του σηματοδοτικού μονοπατιού PI3K/AKT στο μυελό των ασθενών με μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα υψηλού και χαμηλού κινδύνου

ή και πολλαπλών σειρών), οι οποίες δε συμπεριλαμβάνονται στο IPSS-R. Το WPSS μπορεί είναι εξαιρετικά χρήσιμο όταν εφαρμόζεται για περιπτώσεις χαμηλότερου κινδύνου και σε επαναλαμβανόμενα χρονικά σημεία μετά τη διάγνωση (Malcovati et al., 2007).

2.8. Θεραπεία

Η θεραπευτική προσέγγιση και αντιμετώπιση των ασθενών με MDS εξαρτάται από τη βαρύτητα της νόσου. Για τα MDS χαμηλού κινδύνου, η υποστηρικτική αντιμετώπιση αποτελεί την κύρια θεραπευτική επιλογή και συμπεριλαμβάνει την χρήση αυξητικών παραγόντων όπως η ερυθροποιητίνη, μεταγγίσεις παράγωγων αίματος και συμπτωματική αντιμετώπιση των λοιμώξεων με αντιβιοτική αγωγή. Έχουν αναφερθεί επίσης περιπτώσεις MDS χαμηλού κινδύνου όπου έχει δοκιμαστεί η χρήση ανοσοτροποποιητικών παραγόντων (λεναλιδομίδη) με ικανοποιητικά αποτελέσματα. Για τα MDS υψηλού κινδύνου, οι καθιερωμένες θεραπευτικές επιλογές περιλαμβάνουν υπομεθυλιωτικούς παράγοντες (5-αζακυτιδίνη, δεσιταβίνη), εντατικά χημειοθεραπευτικά σχήματα και ακόλουθη αλλογενή μεταμόσχευση μυελού των οστών. Νεότερες θεραπευτικές προσεγγίσεις αφορούν σε αναστολείς των IDH1 (ivosidenib) και IDH2 (enasidenib), αναστολείς του TGFβ (luspatercept), αναστολείς του PD-1 (nivolumab) και του CTLA-4 (ipilimumab), αναστολείς του bcl-2 (venetoclax), αναστολείς των κυτταρικών μονοπατιών της PI3K και PLK (rigosertib) (Garcia-Manero et al., 2020, Fenaux et al., 2021).

3. Η ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΙΚΗ ΟΔΟΣ PI3K/Akt

Το μόριο Akt είναι μια εξαρτώμενη από φωσφοϊνοσιτόλη κινάση σερίνης/θρεονίνης που ρυθμίζει διάφορες φυσιολογικές διεργασίες, όπως την εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου, τον πολλαπλασιασμό και την απόπτωση, ως απόκριση σε εξωκυτάρια σήματα από αυξητικούς παράγοντες, κυτταροκίνες, και άλλα ερεθίσματα. Η δέσμευση τέτοιων ερεθισμάτων στους υποδοχείς τυροσινικής κινάσης (RTKs) και η επακόλουθη ενεργοποίηση της κινάσης της φωσφατιδυλινοσιτόλης-3 (PI3K), έχει ως αποτέλεσμα τη μεταφορά της τρίτης κατά σειρά φωσφορικής ομάδας του ATP στη θέση D3 των φωσφοϊνοσιτιδίων, τα οποία αποτελούν διαμεμβρανικά λιπίδια με ρόλο δεύτερου αγγελιοφόρου. Ο μεμβρανικός εντοπισμός της PI3K διεγείρει τη δημιουργία τριφωσφορικής φωσφατιδυλινοσιτόλης [PtdIns(3,4,5)P₃], που ενεργοποιεί έναν αριθμό σημαντικών υποστρωμάτων (Manning and Toker, 2017, Sarbassov et al., 2005).

3.1. Οι Πρωτεΐνες PI3K, AKT, Ενεργοποίηση/Φωσφορυλίωση της AKT

Η κινάση σερίνης/θρεονίνης Akt (επίσης γνωστή ως πρωτεϊνική κινάση B) είναι ένας καλά χαρακτηρισμένος στόχος της PI3K και ενεργοποιείται μέσω ενός μηχανισμού διπλής φωσφορυλίωσης. Η δραστηριότητα της Akt ρυθμίζεται σε μεγάλο βαθμό σε μετα-μεταφραστικό επίπεδο. Η πρόσδεση του PtdIns(3,4,5)P₃ στην ομόλογη περιοχή της πλεκστρίνης οδηγεί στη μετατόπιση της Akt στην κυτταρική μεμβράνη με αποτέλεσμα τη φωσφορυλίωση εντός του καταλυτικού βρόχου του στο τμήμα Thr308 και στο καρβοξυλικό άκρο στη Ser473. Το πρώτο στάδιο φωσφορυλίωσης πραγματοποιείται από την εξαρτώμενη από φωσφοϊνοσιτίδο κινάση 1 (PDK1) η οποία έλκεται στην κυτταρική μεμβράνη από το PtdIns(3,4,5)P₃, ενώ το δεύτερο στάδιο πραγματοποιείται από ένα σύμπλοκο στα θηλαστικά που αποτελεί στόχο της ραπαμυκίνης (mTOR)-2 (mTORC2). Η φωσφορυλίωση αυτών των δύο κατάλοιπων είναι απαραίτητη για την πλήρη ενεργοποίηση της Akt. Έτσι, η ενεργοποίηση της Akt είναι περίπλοκη αφού ενεργοποιείται επιπλέον από ένα μόριο το οποίο βρίσκεται σε καταρροϊκή θέση σε σχέση με αυτή. Άλλοι τρόποι ενεργοποίησης περιλαμβάνουν τα επίπεδα των φωσφοϊνοσιτιδίων, την κινάση PI3K αλλά και το PTEN (Manning and Toker, 2017, Sarbassov et al., 2005).

Μελέτη του σηματοδοτικού μονοπατιού PI3K/AKT στο μυελό των ασθενών με μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα υψηλού και χαμηλού κινδύνου

Αν και η ενεργοποιημένη Akt ήταν γνωστό ότι λειτουργεί ως βασικός παράγοντας επιβίωσης *in vitro*, η πλήρως ενεργοποιημένη Akt φωσφορυλιώνει μια ποικιλία υποστρωμάτων που εμπλέκονται στη μεταγραφή, τη μετάφραση και τη σύνθεση πρωτεϊνών, τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων, την επιβίωση και την απόπτωση, την κυτταροσκελετική αναδιαμόρφωση και την κυτταρική μετανάστευση, την αυτοφαγία, τον μεταβολισμό καθώς και τις ανοσοαποκρίσεις. Μόλις ενεργοποιηθεί η Akt αποσπάται από την κυτταρική μεμβράνη και μπορεί να εισέλθει στον πυρήνα όπου επηρεάζει τη δράση πολυάριθμων μεταγραφικών παραγόντων. Οι προσδέτες της Akt περιλαμβάνουν τον πλούσιο σε προλίνη προσδέτη της Akt των 40 kDa (PRAS40), το οποίο είναι συστατικό του συμπλέγματος mTOR-1 (mTORC1), τους μεταγραφικούς παράγοντες FoxO, τον αναστολέα κινάσης που εξαρτάται από την κυκλίνη p21, την κασπάση 9, τον πυρηνικό παράγοντα μεταγραφής-κΒ (NF-κΒ), κ.λπ (Manning and Toker, 2017, Sarbassov et al., 2005).

Οι αντιαποπτωτικές δράσεις της Akt επιτυγχάνονται με τη φωσφορυλίωση των προαποπτωτικών παραγόντων BAD, Bim και κασπάσης 9, NF-κΒ και μελών της οικογένειας FoxO των μεταγραφικών παραγόντων. Η φωσφορυλίωση του BAD αποτρέπει την αλληλεπίδρασή του με τα μόρια Bcl-2 και Bcl-XL, επιτρέποντας την εμφάνιση των αντιαποπτωτικών τους δράσεων στη μιτοχονδριακή μεμβράνη. Η φωσφορυλίωση των μελών της οικογένειας FoxO αναστέλλει τη μετατόπιση τους στον πυρήνα και τη μεταγραφή προαποπτωτικών γονιδίων, όπως το FasL (Risso et al., 2015). Ένας θεμελιώδης αρνητικός ρυθμιστής της οδού PI3K είναι η λιπιδική φωσφατάση και το ομόλογο τενσίνης (PTEN). Το PTEN αφαιρεί το 3-φωσφορικό άκρο από το PtdIns(3,4,5)P3 για να παράγει PtdIns(4,5)P2. Η απώλεια της λειτουργίας του PTEN έχει ως αποτέλεσμα τη συσσώρευση PtdIns(3,4,5)P3 και την αυξημένη σηματοδότηση μέσω της οδού PI3K, με συνέπεια την ενισχυμένη ενεργοποίηση της Akt. Η απορρύθμιση του PTEN συνδέεται συχνά με κακοήγη εκτροπή, όπου το γονίδιο αυτό βρίσκεται συχνά μεταλλαγμένο ή διεγγραμμένο σε πολυάριθμους ανθρώπινους όγκους. Το PTEN θεωρείται επομένως ογκοκατασταλτικό γονίδιο.

3.2. Η Πρωτεΐνη mTOR, το Σύμπλοκο mTORC1, το Σύμπλοκο mTORC2

Επιπλέον, ένας από τους στόχους της Akt αποτελεί η mTOR, μια εξαιρετικά συντηρημένη πρωτεϊνική κινάση σερίνης/θρεονίνης, απαραίτητη για τη ρύθμιση της κυτταρικής ανάπτυξης και του πολλαπλασιασμού. Πράγματι, η mTOR είναι ικανή να ρυθμίζει τη σύνθεση βασικών πρωτεϊνών, όπως η πρωτεΐνη ρετινοβλαστώματος, η p27Kip1, η κυκλίνη D1, η c-myc ή ο μετατροπέας σήματος και ο ενεργοποιητής της μεταγραφής 3. Επίσης, πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι η mTOR εμπλέκεται και στον κυτταρικό θάνατο, με αποτέλεσμα μια απορρύθμιση αυτής της κινάσης θα μπορούσε να οδηγήσει στην ενεργοποίηση των αντιαποπτωτικών μηχανισμών (Dibble and Cantley, 2015).

Η ρύθμιση της δραστηριότητας της mTOR μέσω της Akt είναι ένα σύνθετο φαινόμενο πολλαπλών βημάτων. Η Akt αναστέλλει τη λειτουργία της tuberous sclerosis 2 (TSC2 ή hamartin) μέσω άμεσης φωσφορυλίωσης. Η TSC2 είναι μια πρωτεΐνη που ενεργοποιεί την GTPase (GAP) η οποία λειτουργεί σε συνδυασμό με την υποτιθέμενη tuberous sclerosis 1 (TSC1 ή tuberin), αδρανοποιώντας το μικρό ομόλογο G-protein Ras (Rheb). Η φωσφορυλίωση της TSC2 από την Akt καταστέλλει τη δραστηριότητα GAP του συμπλόκου TSC1/TSC2, επιτρέποντας στο μοριο Ras homolog enriched in brain (Rheb) να συσσωρευτεί σε κατάσταση δεσμευμένη στο GTP. Στη συνέχεια, το σύμπλοκο Rheb-GTP ενεργοποιεί, μέσω ενός μηχανισμού που δεν έχει πλήρως διευκρινιστεί, τη δραστηριότητα της πρωτεϊνικής κινάσης της mTOR όταν συμπλέκεται με τη ρυθμιστική πρωτεΐνη της πρωτεΐνης προσαρμογέα της mTOR (Raptor) και το mLST8 (επίσης γνωστό ως GhL), μια πρωτεΐνη ομόλογη με τις h ετεροτριμερείς υπομονάδες των G-πρωτεϊνών. Το σύμπλεγμα mTOR/Raptor/mLST8 (αναφέρεται επίσης ως mTORC1) είναι ευαίσθητο στη ραπαμυκίνη και, σε ορισμένες περιπτώσεις αναστέλλει την Akt μέσω ενός βρόχου αρνητικής ανάδρασης, ο οποίος περιλαμβάνει, τουλάχιστον εν μέρει, τη ριβοσωμική κινάση S6 p70 (p70S6K). Η σχέση μεταξύ Akt και mTOR περιπλέκεται περαιτέρω από την ύπαρξη του συμπλέγματος mTOR/mLST8 που δεν είναι ευαίσθητο στη ραπαμυκίνη (αναφέρεται επίσης ως mTORC2). Επιπλέον, η Akt φωσφορυλιώνει απευθείας την mTOR στο Ser2448 και το ενεργοποιεί.

Καταρροϊκά σε σχέση με την mTOR υπάρχουν δύο καλά χαρακτηρισμένοι προσδέτες: η πρωτεΐνη 1 που δεσμεύει το 4E (4E-BP1) και το p70S6K. Από τη μία πλευρά, η φωσφορυλίωση του 4E-BP1 από την mTOR καταστέλλει την ικανότητά του να δεσμεύει

Μελέτη του σηματοδοτικού μονοπατιού PI3K/AKT στο μυελό των ασθενών με μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα υψηλού και χαμηλού κινδύνου

τον παράγοντα έναρξης μετάφρασης 4E, μια πρωτεΐνη που στρατολογείται στο σύμπλεγμα έναρξης μετάφρασης για τη ρύθμιση της πρωτεϊνοσύνθεσης και την έναρξη της μετάφρασης μεταγραφών που κωδικοποιούν γονίδια εμπλεκόμενα στον έλεγχο του κυτταρικού κύκλου. Από την άλλη πλευρά, η mTOR διαμεσολαβεί επίσης στη φωσφορυλίωση και στην επακόλουθη ενεργοποίηση του p70S6K, η οποία φωσφορυλιώνει τη ριβοσωμική πρωτεΐνη S6 40S, με στόχο την έναρξη της μετάφρασης ενός mRNA 5' άκρου που κωδικοποιεί συστατικά της μηχανής σύνθεσης πρωτεϊνών.

3.3. Ο ρόλος της σηματοδοτικής οδού PI3K/AKT στις αιματολογικές νόσους (συμπεριλαμβανομένων και των μυελοδυσπλαστικών συνδρόμων)

Η σηματοδοτική οδός PI3K/Akt/mTOR με βάση όσα προαναφέρθηκαν συμμετέχει ενεργά στη ρύθμιση του μεταβολισμού, την κυτταρική ανάπτυξη, τον πολλαπλασιασμό και την επιβίωση, και έχει συσχετιστεί με την παθοφυσιολογία πλήθους νεοπλασιών. Η ενεργοποίηση της οδού μπορεί να προκύψει: 1) από μεταλλάξεις των γονιδίων PI3K και Akt, 2) την απώλεια του γονιδίου PTEN και 3) την εγγενή ενεργοποίηση ρυθμιστικών ακολουθιών αναρροϊκά όπως οι τυροσινικές κινάσες μετά από σύνδεση στους διαμεμβρανικούς υποδοχείς. Με δεδομένο τον ογκογόνο ρόλο της, η οδός αυτή έχει γίνει αντικείμενο στόχευσης για την ανάπτυξη αναστολέων (Blachly and Baiocchi, 2014).

Πολλά γενετικά μοντέλα έχουν υπονοήσει ένα ρόλο κλειδί του άξονα PI3K/AKT/mTOR στη ρύθμιση της ενήλικης αιμοποίησης είτε μέσω απώλειας λειτουργίας αλληλίων του *Pten* ή του *Tsc1* ή μέσω μεταλλάξεων αύξησης της δράσης της *Akt*, που όλα οδηγούν σε αυξημένο πολλαπλασιασμό των HSC και στην εξάλειψή τους (Yilmaz et al., 2006, Chen et al., 2008). Αντίθετα η διαγραφή του *Akt1/2* προωθεί την αυξημένη ηρεμία των HSCs. Αρκετά πρόσφατα ευρήματα υποδηλώνουν ότι αυτό ισχύει και για αιματολογικές κακοήθειες, όπως η οξεία μυελογενής λευχαιμία (AML). Πρόσφατα αποδείχθηκε ότι η αξιολόγηση της κατάστασης φωσφορυλίωσης του Akt και της έκφρασης PI3K p110d σε βλάστες AML μπορεί να λειτουργήσουν ως προγνωστικοί δείκτες για την εξέλιξη της AML (Nepstad et al., 2020).

Το 2006, οι M Nyakern et al. ανέφεραν μια συνεχή ενεργοποίηση της Ser473 p-Akt σε μονοπύρηνα κύτταρα μυελού των οστών και περιφερικού αίματος (BMMCs και PBMCs)

Μελέτη του σηματοδοτικού μονοπατιού PI3K/AKT στο μυελό των ασθενών με
μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα υψηλού και χαμηλού κινδύνου

από ασθενείς MDS υψηλού κινδύνου. Αντίθετα, μονοπύρηννα κύτταρα από φυσιολογικό BM και ασθενείς με MDS χαμηλού κινδύνου εμφάνισαν χαμηλά επίπεδα ή απουσία χρώσης για p-Akt. Επιπλέον, η αξιολόγηση της έκφρασης μιας ισομορφής της PI3K, της p110d, σε κύτταρα MDS έδειξε ότι η υψηλή έκφραση Ser473 p-Akt συνοδεύτηκε από αυξημένη έκφραση της ισομορφής PI3K p110d. Οι ερευνητές παρατήρησαν επίσης ότι οι ασθενείς με MDS υψηλού κινδύνου είχαν γενικά μειωμένη έκφραση του PTEN σε σύγκριση με υγιείς μάρτυρες και ασθενείς με MDS χαμηλού κινδύνου (Nyåkern et al., 2006).

Το 2007, η ίδια ερευνητική ομάδα μελέτησε ορισμένους από τους καταρροϊκούς στόχους της Akt, συμπεριλαμβανομένων των mTOR, p70S6K και 4E-BP1. Οι ερευνητές έδειξαν ότι τα mTOR, p70S6K και 4E-BP1 ήταν φωσφορυλιωμένα σε ασθενείς με MDS υψηλού κινδύνου (αλλά όχι σε χαμηλού κινδύνου) και αυτό συσχετίστηκε με την ενεργοποίηση της Akt. Επιπλέον, έδειξαν ότι η ραπαμυκίνη (ένας φαρμακολογικός αναστολέας mTOR) μείωσε την επιβίωση των CD33+ κυττάρων από ασθενείς με MDS υψηλού κινδύνου και επηρέασε αρνητικά την κλωνογονική ικανότητα των προδρόμων CD34+ κυττάρων στο MDS υψηλού κινδύνου. Συνολικά, αυτά τα ευρήματα έδειξαν έναν κρίσιμο ρόλο για την ενεργοποιημένη mTOR και τους κάτωθεν στόχους της, ως παράγοντες επιβίωσης σε ασθενείς με διάγνωση MDS υψηλού κινδύνου. Ως εκ τούτου, η οδός Akt/mTOR θα μπορούσε να γίνει ένας σημαντικός στόχος για καινοτόμες θεραπευτικές στρατηγικές στη θεραπεία του MDS υψηλού κινδύνου (Follo et al., 2007).

Επιπλέον, οι Falconi G. et al το 2016 μελέτησαν την έκφραση 84 γονιδίων που ανήκουν στα μονοπάτια σηματοδότησης PI3K/Akt σε MSCs που απομονώθηκαν από ασθενείς με MDS, AML και μυελικά νεοπλασμάτα που σχετίζονται με τη θεραπεία, χρησιμοποιώντας ως ομάδα ελέγχου MSCs που απομονώθηκαν από ασθενείς με λέμφωμα πρώιμου σταδίου χωρίς θεραπεία και χωρίς συμμετοχή του BM. Από την ανάλυση διαπιστώθηκε απορρύθμιση των γονιδίων που εμπλέκονται στις οδούς σηματοδότησης PI3K/Akt και WNT και δείχθηκε ότι αυτές μπορεί να συμβάλλουν στις φαινοτυπικές ανωμαλίες των MDS (Falconi et al., 2016).

Προς αυτήν την κατεύθυνση, η στόχευση διαφόρων οδών μεταγωγής σήματος που εμπλέκονται σε αιματολογικές κακοήθειες, συμπεριλαμβανομένης της οδού σηματοδότησης PI3K/Akt, φαινόταν να είναι μια λογική προσέγγιση για τη θεραπεία των

Μελέτη του σηματοδοτικού μονοπατιού PI3K/AKT στο μυελό των ασθενών με
μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα υψηλού και χαμηλού κινδύνου

MDS. Ο Sakakibara K. και οι συνεργάτες του, προσπαθώντας να αναπτύξουν την πιθανή αντι-λευχαιμική δράση του binimetinib, ενός αναστολέα MEK, σε 10 ανθρώπινες κυτταρικές σειρές μυελογενούς / λεμφογενούς λευχαιμίας διαπίστωσαν ότι η επίδραση του binimetinib δεν προβλέπεται από την παρουσία/απουσία μετάλλαξης του N-RAS, αλλά μάλλον από την κατάσταση φωσφορυλίωσης της Akt (Sakakibara et al., 2019). Μια άλλη μελέτη των Charuis et al. έδειξε ότι το Foxo-3a είναι ανενεργό σε κύτταρα AML και εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα. Η θεραπεία της AML με αναστολείς MEK και PI3K/Akt δεν είχε ως αποτέλεσμα την πυρηνική μετατόπιση του FoxO-3a όπου θα μπορούσε δυνητικά να προκαλέσει τη μεταγραφή ανασταλτικών και αποπτωτικών γονιδίων του κυτταρικού κύκλου (Charuis et al., 2010). Στη μελέτη των Halilovic et al., ανιχνεύθηκαν αυξημένα επίπεδα ενεργοποιημένης Akt στις ανθεκτικές σε αναστολείς MEK κυτταρικές σειρές απουσία μεταλλάξεων PIK3CA και PTEN, υποδηλώνοντας ότι η Akt ενεργοποιήθηκε από έναν ανεξάρτητο από την PI3K/PTEN οδό μηχανισμό (Halilovic et al., 2010).

Η χορήγηση θεραπείας αναστολής μορίων με δράση πολυκινάσης [rigosertib (ON 01910.Na)] που μελετήθηκε από τους Xu feng et al. σε πειράματα in vitro, έδειξε ότι το rigosertib προκάλεσε απόπτωση, εμπόδισε τον κυτταρικό κύκλο στη φάση G2/M και στη συνέχεια ανέστειλε τον πολλαπλασιασμό των CD34+ κυττάρων στο MDS, ενώ επηρέασε ελάχιστα τα CD34+ μη νεοπλασματικά κύτταρα. Η βιοπληροφορική ανάλυση με βάση το προφίλ γονιδιακής έκφρασης και η ανάλυση κυτταρομετρίας ροής αποκάλυψε την ανώμαλη ενεργοποίηση των μονοπατιών Akt-PI3K, Jak-STAT και Wnt σε MDS υψηλού κινδύνου και ότι το rigosertib θα μπορούσε να αναστείλει σημαντικά την ενεργοποίηση των οδών Akt-PI3K και Wnt. Επιπλέον, σε μια κλινική δοκιμή φάσης I/II, 13 ασθενείς με MDS υψηλού κινδύνου εξαρτώμενοι από μεταγγίσεις, οι οποίοι δεν ανταποκρίθηκαν στη θεραπεία υπομεθυλίωσης, υποβλήθηκαν σε θεραπεία με τον αναστολέα πολυκινάσης ON 01910.Na. (rigosertib). Σε ένα υποσύνολο ασθενών που ανταποκρίθηκαν στη θεραπεία φάνηκε σημαντικά μειωμένη φωσφορυλίωση της Akt2 σε CD34+ κύτταρα του BM σε αντίθεση με τα κύτταρα ασθενών με MDS, όπου δεν τεκμηριώθηκε ανταπόκριση (Seetharam et al., 2012).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ II: ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

4. ΣΚΟΠΟΣ

Υποκινούμενοι από αυτά τα ευρήματα, επιδιώξαμε να μελετήσουμε την έκφραση και την ενεργοποίηση της οδού PI3K/AKT, μέσω ανοσοϊστοχημικής ανίχνευσης της ολικής αλλά και της φωσφορυλιωμένης (ενεργοποιημένης) μορφής της πρωτεϊνικής κινάσης Akt (T308 + S473) και ενός από τους προσδέτες της, τον παράγοντα PRAS40 σε BMB από ασθενείς με MDS. Λεπτομερώς, θα αξιολογήσουμε εάν οι φωσφορυλιωμένες μορφές Akt και ο προσδέτης της, PRAS40, εμφανίζουν διάφορη έκφραση σε BMB από διακριτούς υποτύπους MDS, όπως έχει βρεθεί προηγουμένως από άλλους ερευνητές σε μονοκύτταρα είτε από το περιφερικό επίχρισμα είτε από το επίχρισμα του BM από ασθενείς με MDS, αλλά όχι σε αντίστοιχα δείγματα BMB. Μια τέτοια προσέγγιση θα αποτελούσε έναυσμα για την περαιτέρω μελέτη του ρόλου της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης των πρωτεϊνών αυτών για την σταδιοποίηση, την ανταπόκριση στη θεραπεία και την πρόγνωση ασθενών με MDS.

5. ΜΕΘΟΔΟΙ

5.1. Πληθυσμός της μελέτης

Δείγματα από BMB εγκιβωτισμένα σε κύβο παραφίνης μετά από διαδικασία αφαλάττωσης ανευρέθηκαν και συλλέχθηκαν αναδρομικά από 10 ασθενείς με πρωτοδιάγνωση MDS από την Κλινική της Παθολογικής Φυσιολογίας του Λαϊκού Νοσοκομείου και του Α' Εργαστηρίου Παθολογικής Ανατομικής της Ιατρικής Σχολής Αθηνών, στους οποίους δεν είχε χορηγηθεί θεραπεία, και από 4 μάρτυρες χωρίς διήθηση του μυελού των οστών από κακοήγη αιματολογική διαταραχή. Η αναγνώριση των περιστατικών, η συλλογή των κλινικών στοιχείων και η ανάλυση των BMB έγινε αναδρομικά με απόλυτα ανώνυμο τρόπο για την διασφάλιση των προσωπικών δεδομένων των ασθενών στα πλαίσια ερευνητικού πρωτοκόλλου μελέτης των MDS το οποίο έχει λάβει έγκριση από την αρμόδια Επιτροπή Βιοηθικής. Οι υπότυποι των MDS ταξινομήθηκαν βάσει της κατηγοριοποίησης WHO 2016 (Arber) (Weinberg and Hasserjian, 2019, Arber et al., 2016). Συγκεκριμένα, η μελέτη περιέλαβε: 2 ασθενείς με MDS με δυσπλασία μιας κυτταρικής σειράς (single lineage dysplasia -SLD), 3 ασθενείς με MDS με δυσπλασία πολλαπλών κυτταρικών σειρών (multilineage dysplasia – MLD), 3 ασθενείς με MDS με περίσσεια βλαστών 1 (excess blasts 1- EB1), 2 ασθενείς με MDS με περίσσεια βλαστών 1-2 (excess blasts 1-2- EB1/2). Στην ομάδα των ασθενών με MDS συμπεριλήφθηκαν 3 γυναίκες και 7 άνδρες με εύρος ηλικιών από 66 έως 98 έτη. Συμπεριλήφθηκαν επιπλέον BMB από 4 ασθενείς που οι οστεομυελικές βιοψίες πραγματοποιήθηκαν για διαγνωστικούς λόγους ρουτίνας και δεν ανευρέθηκε αιματολογικό νόσημα και αυτές λειτούργησαν ως μάρτυρες (2 γυναίκες και 2 άνδρες με εύρος ηλικιών από 70 έως 83 έτη). Τα βασικά χαρακτηριστικά των ασθενών με MDS συνοψίζονται στον **Πίνακα 2**.

Μελέτη του σηματοδοτικού μονοπατιού PI3K/AKT στο μυελό των ασθενών με μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα υψηλού και χαμηλού κινδύνου

Πίνακας 2. Χαρακτηριστικά ασθενών με MDS

Κωδικός Ασθενή	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Ηλικία (έτη)	73	66	86	67	77	98	75	82	89	77
Φύλο	Άρρεν	Άρρεν	Άρρεν	Θήλυ	Θήλυ	Θήλυ	Άρρεν	Άρρεν	Άρρεν	Άρρεν
Τύπος MDS	SLD	SLD	MLD	MLD	MLD	EB1	EB1	EB1/2	EB1	EB1/2
Εκπροσώπηση των τριών σειρών /αναλογία κοκκιδώδους :ερυθράς	Ναι/1:1	Ναι/4:1	Ναι/1:1.5	Ναι/1:1	Ναι/1:3	Ναι/1:1.5	Ναι/6:1	Ναι/1:2	Ναι/3:1	Ναι/1:1
Βλάστες* (%των εμπύρηνων κυττάρων)	2-3%	3%	3-4%	4%	1-2%	6%	6-7%	10%	6%	10%
Λιποκύτταρα	50%	70%	10%	30%	95%	5%	10%	90%	10%	15%
IPSS-R	2 (χαμηλό)	2 (χαμηλό)	3 (χαμηλό)	3.5 (μεσαίο)	4.5 (μεσαίο)	3 (χαμηλό)	4.5 (μεσαίο)	3.5 (μεσαίο)	3 (χαμηλό)	8.5 (πολύ υψηλό)
Αιμοσφαιρίνη (g/dl)	11.2	12.6	4.1	11.3	7.8	8.1	7.6	8	7.8	9.3
Λευκά αιμοσφαίρια (Κ/μl)	5140	4970	3280	2820	2290	7200	9160	3450	3360	6700
Ουδετερόφιλα πολυμορφοπύρηνα (Κ/μl)	3200	1700	2400	760	1200	4200	4500	1300	1600	1900

Μελέτη του σηματοδοτικού μονοπατιού PI3K/AKT στο μυελό των ασθενών με μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα υψηλού και χαμηλού κινδύνου

Αιμοπετάλια (Κ/μl)	144000	236000	99000	49000	10000	112000	34000	55000	216000	16000
Κυτταρογενεϊκή μελέτη ΒΜ	46 XY	46 XY	46 XY (Del 20Q12)	46 XX	46 XX	46 XX	46 XY	46 XY	46 XY	44,XY, -5, -7, der(1;12)(q10;q10), der(13;17)(q10;q10), -18, add(21)(q22), +mar1, +mar2
Εξάρτηση από μεταγγίσεις	Όχι	Όχι	Ναι	Όχι	Ναι	Ναι	Ναι	Ναι	Ναι	Ναι
Χρήση αυξητικών παραγόντων μετά τη διάγνωση	Όχι	Όχι	Ναι	Όχι	Ναι	Ναι	Όχι	Όχι	Όχι	Όχι

IPSS-R: Revised International Prognostic Scoring System, SLD: single lineage dysplasia, MLD: multilineage dysplasia, EB: excess blasts, * εκτιμήθηκε σε οστεομυελική βιοψία

Μελέτη του σηματοδοτικού μονοπατιού PI3K/AKT στο μυελό των ασθενών με
μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα υψηλού και χαμηλού κινδύνου

5.2. Πειραματικό Σκέλος – Ανοσοϊστοχημική Ανάλυση

Το πρωτόκολλο της ανοσοϊστοχημείας διεξήχθη σε τομές 4μm προερχόμενες από ιστό BMB εγκλεισμένο σε παραφίνη, μετά από αφαλάτωση (3-5% HCl) και μονιμοποίηση σε φορμόλη (10% Neutral Buffered Formalin) με την τεχνική των δύο βημάτων peroxidase conjugated polymer technique (DAKO Envision kit, DAKO, Carpinteria, CA) σε 2 ημέρες. Τα αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν περιλαμβάνονται στον **Πίνακα 3**.

Πίνακας 3. Χαρακτηριστικά των αντισωμάτων στην ανοσοϊστοχημική ανάλυση.

Πρωτεΐνη	Κλώνος	Εταιρεία	Εμπορικό νούμερο καταλόγου	Αναπτυχθέν σε	Διάλυση και χρόνος επώασης
Akt	μονοκλωνικό	Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA)	9272S	rabbit	30 λεπτά
pAkt _T	μονοκλωνικό	OriGene (Rockville, MD, USA)	TA319561	mouse	30 λεπτά
pAKT _S	μονοκλωνικό	Abcam (Cambridge, UK)	ab278559	rabbit	30 λεπτά
pPRAS40	πολυκλωνικό	Abcam (Cambridge, UK)	ab151719	rabbit	30 λεπτά
Cytokeratin	μονοκλωνικό	Dako (Glostrup, Denmark)	MNF116	mouse	30 λεπτά

Μελέτη του σηματοδοτικού μονοπατιού PI3K/AKT στο μυελό των ασθενών με
μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα υψηλού και χαμηλού κινδύνου

1η ημέρα:

- Τοποθέτηση των αντικειμενοφόρων πλακών με τις τομές στους 60°C για 40 λεπτά με σκοπό να λιώσει η παραφίνη
- Εμβάπτιση των αντικειμενοφόρων πλακών στα ακόλουθα διαλύματα για τη διαδικασία της αποπαραφίνωσης και ενυδάτωσης. Παραμονή των τομών σε κάθε διάλυμα για συγκεκριμένο χρονικό διάστημα όπως αναφέρεται παρακάτω:
 - Ξυλόλη 1 (4 λεπτά) → αποπαραφίνωση
 - Ξυλόλη 2 (4 λεπτά) → αποπαραφίνωση
 - Ξυλόλη 3 (4 λεπτά) → αποπαραφίνωση
 - Αλκοόλη 100% 1 (2 λεπτά) → ενυδάτωση
 - Αλκοόλη 100% 2 (2 λεπτά) → ενυδάτωση
- Επώαση των τομών με 0,5% H₂O₂ (1ml 30% H₂O₂ + 59ml μεθανόλη) για 20 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου για αναστολή της ενδογενούς δράσης της υπεροξειδάσης
- Εμβάπτιση των αντικειμενοφόρων πλακών στα ακόλουθα διαλύματα για τη διαδικασία της αποπαραφίνωσης και ενυδάτωσης. Παραμονή των τομών σε κάθε διάλυμα για συγκεκριμένο χρονικό διάστημα όπως αναφέρεται παρακάτω:
 - Αλκοόλη 100% 1 (2 λεπτά) → ενυδάτωση
 - Αλκοόλη 100% 2 (2 λεπτά) → ενυδάτωση
 - Αλκοόλη 95% (2 λεπτά) → ενυδάτωση
 - Αλκοόλη 70% (2 λεπτά) → ενυδάτωση
 - Αλκοόλη 50% (2 λεπτά) → ενυδάτωση
 - Νερό βρύσης (5 λεπτά) → ενυδάτωση
- Ανάδειξη αντιγονικών επιτόπων των τομών σε διάλυμα Tris-EDTA, pH 9, στο φούρνο μικροκυμάτων για 15 λεπτά από την στιγμή που το διάλυμα έρχεται σε κατάσταση βρασμού.
- Πλύσιμο των τομών 2 φορές σε διάλυμα TBS 1x (10 λεπτά).
- Επώαση των τομών σε διάλυμα ορού βοδινού (αραιωμένο 1X σε TBS 1x, 200 μλ/τομή), σε θερμοκρασία δωματίου (15 λεπτά) → αναστολή
- Επώαση των τομών σε διάλυμα πρώτου αντισώματος σε διαφορετικές συγκεντρώσεις (αραιωμένο σε TBS 1x 200 μλ/τομή), σε υγρό δοχείο, στους 4°C Ο/Ν.

Μελέτη του σηματοδοτικού μονοπατιού PI3K/AKT στο μυελό των ασθενών με
μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα υψηλού και χαμηλού κινδύνου

2η ημέρα:

- Πλύσιμο των τομών 2 φορές σε διάλυμα TBS 1X (10 λεπτά)
- Επώαση των τομών σε διάλυμα ορού βοδινού (αραιωμένο 1X σε TBS 1x, 200 μλ/τομή), σε θερμοκρασία δωματίου (15 λεπτά) → αναστολή
- Επώαση των τομών σε διάλυμα δεύτερου αντισώματος Mouse/Rabbit-HRP, DAKO (Cat. No: K5007) (αραιωμένο σε TBS 1x 200 μλ/τομή), σε θερμοκρασία δωματίου (30 λεπτά)
- Πλύσιμο των τομών 2 φορές σε διάλυμα TBS 1x (10 λεπτά)
- Επώαση των τομών σε DAB διάλυμα (20 μλ χρωμογόνο DAB σε 1 ml διάλυμα DAB), σε θερμοκρασία δωματίου, σε σκοτεινό δοχείο (5 λεπτά)
- Διακοπή της αντίδρασης του DAB με τοποθέτηση των τομών σε νερό βρύσης
- Χρωματισμός των τομών σε αιματοξυλίνη
- Εμβάπτιση των αντικειμενοφόρων πλακών στα ακόλουθα διαλύματα για τη διαδικασία της αφυδάτωσης. Παραμονή των τομών σε κάθε διάλυμα για συγκεκριμένο χρονικό διάστημα όπως αναφέρεται παρακάτω:
 - Αλκοόλη 50% (2 λεπτά) → αφυδάτωση
 - Αλκοόλη 70% (2 λεπτά) → αφυδάτωση
 - Αλκοόλη 95% (2 λεπτά) → αφυδάτωση
 - Αλκοόλη 100% 1 (2 λεπτά) → αφυδάτωση
 - Αλκοόλη 100% 2 (2 λεπτά) → αφυδάτωση
 - Ξυλόλη 1 (2 λεπτά) → αφυδάτωση
 - Ξυλόλη 2 (2 λεπτά) → αφυδάτωση
- Επικάλυψη των τομών με διάλυμα D.P.X. (BDH, Cat No:36029) και καλυπτρίδες

5.3. Εκτίμηση των ανοσοϊστοχημικών χρώσεων

Η εκτίμηση του βαθμού των ανοσοϊστοχημικών χρώσεων έγινε τυφλά από έμπειρη αιμοπαθολογοανατόμο με ημιποσοτική εκτίμηση του βαθμού χρώσης των κυττάρων της μυελικής και κοκκιώδους σειράς σε μια κλίμακα από το 0-3 (0: απουσία χρώσης, 1+: ελάχιστη χρώση, 2+: μέτρια χρώση, 3+: έντονη χρώση).

6. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Ο βαθμός ανοσοϊστοχημικής χρώσης των μελετώμενων αντισωμάτων παρουσιάζεται αναλυτικά στον **Πίνακα 4**. Αναλυτικότερα, η έκφραση της ολικής Akt αφορούσε πρωτίστως την κοκκιώδη σειρά στους ασθενείς και στους μάρτυρες και ήταν κυρίως κυτταροπλασματική με λίγες περιπτώσεις εν μέρει πυρηνικής έκφρασης. Διαφορά στην ένταση της χρώσης δεν παρατηρήθηκε αφενός μεταξύ ασθενών και μαρτύρων [διάμεση τιμή (εύρος): 1.5 (1-2.5) vs 2 (2-2), p-value=0.11] και αφετέρου μεταξύ διακριτών υποομάδων ασθενών, όπως ασθενείς με MDS-SLD και MDS-MLD με χαμηλό ποσοστό βλαστών έναντι ασθενών με περίσσεια βλαστών (EB 1 ή/και 2) [1.25 (1-2.5) vs 1.75 (1-2), p-value=0.77] αλλά και ασθενείς με MDS χαμηλού κινδύνου έναντι MDS μέτριου ή υψηλού κινδύνου βάση το IPSS-R [1 (1-2) vs 2 (1-2.5), p-value=0.27].

Παρόμοια ήταν και τα αποτελέσματα αναφορικά με τις φωσφορυλιωμένες (ενεργοποιημένες) μορφές της AKT, την μερική (pAkt_T στη threonine-308) και την πλήρη (pAkt_S στη serine- 473), καθώς δεν ανευρέθηκαν σημαντικές διαφορές στην έκταση ή την ένταση των χρώσεων. Η έκφραση και στα δύο μόρια ήταν πρωτίστως κυτταροπλασματική και αφορούσε την κοκκιώδη έναντι της ερυθράς σειράς. Η έκφραση της pAkt_T μεταξύ ασθενών και μαρτύρων ήταν 2.5 (2-3) vs 2.5 (1-3), αντίστοιχα (p-value=0.63), ασθενών με MDS-SLD και MDS-MLD με χαμηλό ποσοστό βλαστών έναντι ασθενών με MDS με περίσσεια βλαστών (EB 1 ή/και 2) ήταν 2.75 (2-3) vs 2.5 (2-3), αντίστοιχα (p-value=0.99), αλλά και μεταξύ ασθενών με MDS χαμηλού κινδύνου έναντι MDS μέτριου ή υψηλού κινδύνου βάση το IPSS-R ήταν 2.5 (2-3) vs 2.75 (2-3), αντίστοιχα (p-value=0.99). Η έκφραση της pAkt_S μεταξύ ασθενών και μαρτύρων ήταν 2 (1-3) vs 2 (0-2), αντίστοιχα (p-value=0.23), ασθενών με MDS-SLD και MDS-MLD με χαμηλό ποσοστό βλαστών έναντι ασθενών με MDS με περίσσεια βλαστών (EB 1 ή/και 2) ήταν 2 (1-2) vs 2.5 (2-3), αντίστοιχα (p-value=0.11), αλλά και μεταξύ ασθενών χαμηλού κινδύνου έναντι μέτριου ή υψηλού κινδύνου βάση το IPSS-R ήταν 2 (2-2) vs 2.5 (1-3), αντίστοιχα (p-value=0.16).

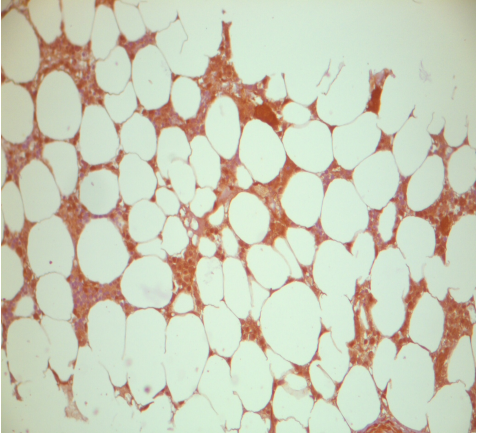
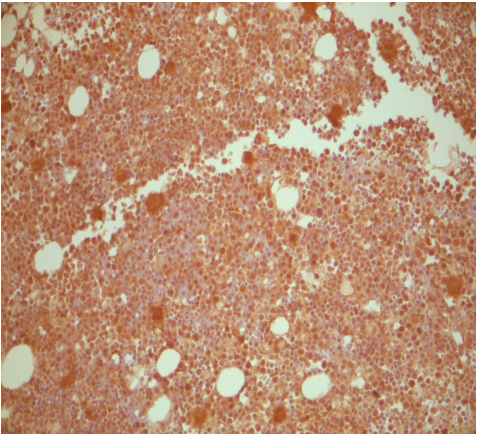
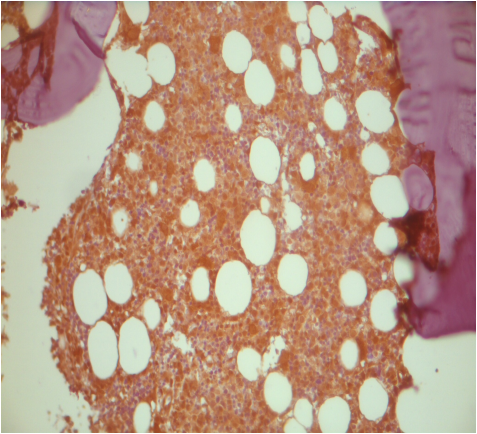
Τέλος, η ανοσοϊστοχημική έκφραση της ενεργοποιημένης (φωσφορυλιωμένης) μορφής του PRAS40, προσδέτη της AKT, ήταν εντόνως θετική σε όλα τα μελετώμενα δείγματα BM, ασθενών και μαρτύρων, αφορούσε όλες τις κυτταρικές σειρές και ήταν κυρίως πυρηνική και εν μέρει κυτταροπλασματική έκφραση.

Μελέτη του σηματοδοτικού μονοπατιού PI3K/AKT στο μυελό των ασθενών με
μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα υψηλού και χαμηλού κινδύνου

Πίνακας 4. Βαθμός ανοσοϊστοχημικής έκφρασης των κυττάρων της κοκκιδώδους σειράς των διαφόρων αντισωμάτων σε ασθενείς με MDS και μάρτυρες χωρίς MDS

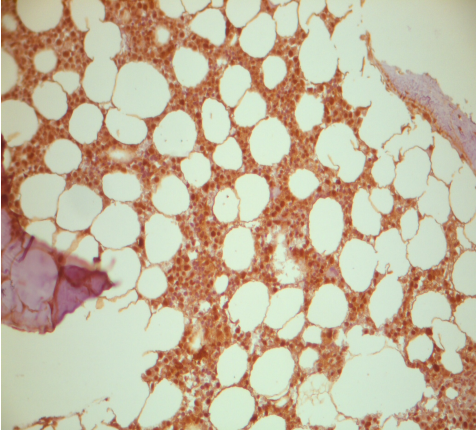
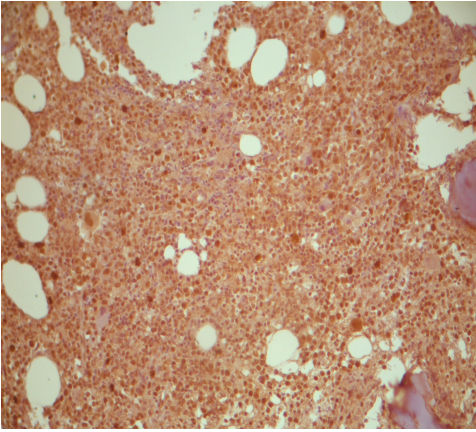
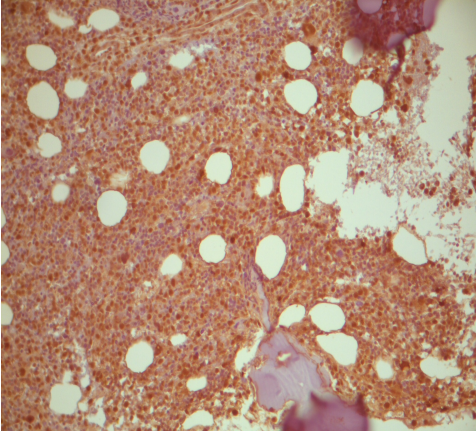
Κωδικός Ασθενή	AKT	pAkt _s	pAkt _T	pPRAS40
Ασθενής 1	1	2	2.5	3
Ασθενής 2	1.5	2	3	3
Ασθενής 3	1	2	2	3
Ασθενής 4	2.5	1	2	3
Ασθενής 5	1	2	3	3
Ασθενής 6	2	2	3	3
Ασθενής 7	2	2.5	2	3
Ασθενής 8	2	3	3	3
Ασθενής 9	1	2	2.5	3
Ασθενής 10	1.5	2.5	2.5	2.5
Μάρτυρας 1	2	0	2	2
Μάρτυρας 2	2	2	2.5	3
Μάρτυρας 3	2	2	2.5	3
Μάρτυρας 4	2	2	2.5	3

Μελέτη του σηματοδοτικού μονοπατιού PI3K/AKT στο μυελό των ασθενών με
μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα υψηλού και χαμηλού κινδύνου

Κωδικός ασθενή	AKT
Μάρτυρας 3	
Ασθενής 3 (χαμηλού κινδύνου)	
Ασθενής 10 (υψηλού κινδύνου)	

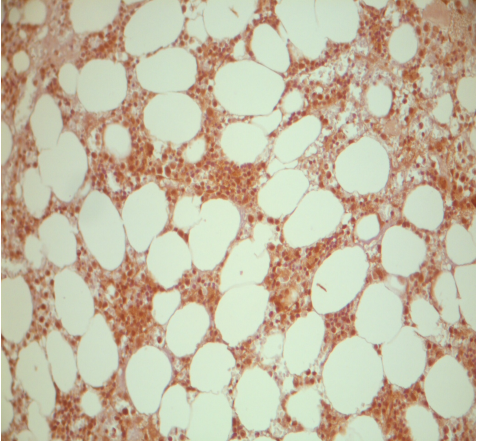
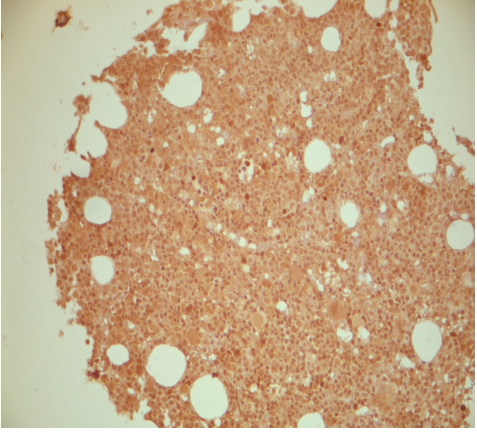
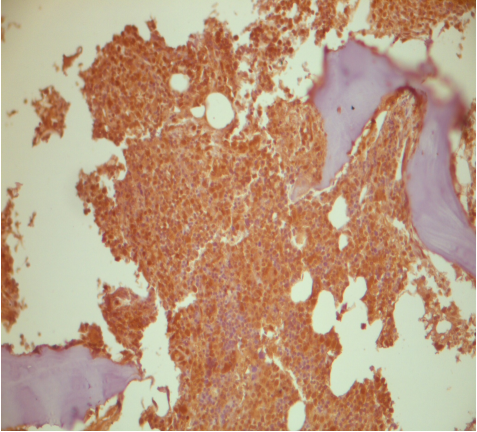
Εικόνα 8. Εικόνες μικροσκοπίου από τομές οστεομυελικής βιοψίας που απεικονίζεται σε μεσαία μεγέθυνση (40x) η ανοσοϊστοχημική χρώση για την πρωτεΐνη AKT σε αντιπροσωπευτικά δείγματα.

Μελέτη του σηματοδοτικού μονοπατιού PI3K/AKT στο μυελό των ασθενών με
μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα υψηλού και χαμηλού κινδύνου

Κωδικός ασθενή	pAKT τ
Μάρτυρας 3	
Ασθενής 3 (χαμηλού κινδύνου)	
Ασθενής 10 (υψηλού κινδύνου)	

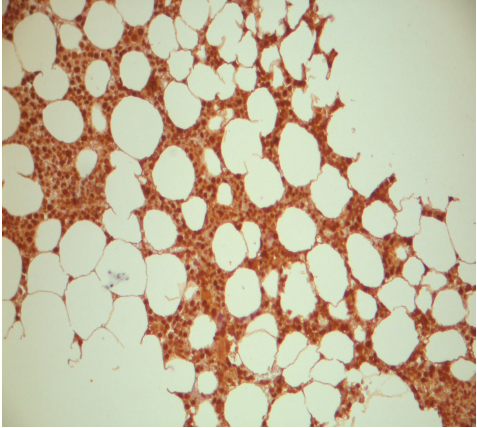
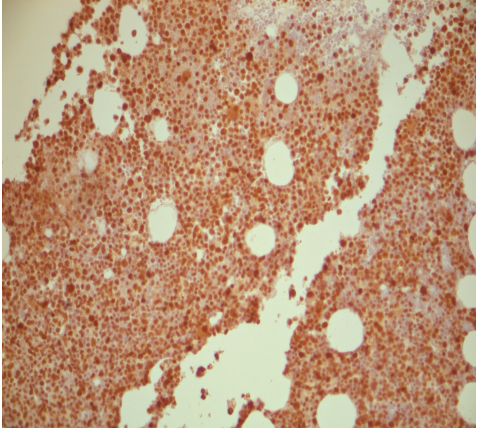
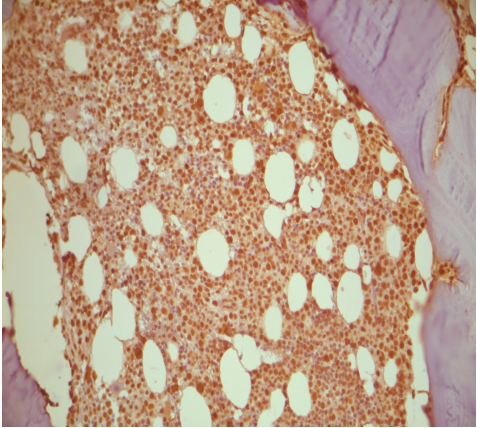
Εικόνα 9. Εικόνες μικροσκοπίου από τομές οστεομυελικής βιοψίας που απεικονίζεται σε μεσαία μεγέθυνση (40x) η ανοσοϊστοχημική χρώση για την πρωτεΐνη pAKT τ σε αντιπροσωπευτικά δείγματα.

Μελέτη του σηματοδοτικού μονοπατιού PI3K/AKT στο μυελό των ασθενών με
μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα υψηλού και χαμηλού κινδύνου

Κωδικός ασθενή	pAKTs
Μάρτυρας 3	
Ασθενής 3 (χαμηλού κινδύνου)	
Ασθενής 10 (υψηλού κινδύνου)	

Εικόνα 10. Εικόνες μικροσκοπίου από τομές οστεομυελικής βιοψίας που απεικονίζεται σε μεσαία μεγέθυνση (40x) η ανοσοϊστοχημική χρώση για την πρωτεΐνη pAKTs σε αντιπροσωπευτικά δείγματα.

Μελέτη του σηματοδοτικού μονοπατιού PI3K/AKT στο μυελό των ασθενών με
μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα υψηλού και χαμηλού κινδύνου

Κωδικός ασθενή	pPRAS40
Μάρτυρας 3	
Ασθενής 3 (χαμηλού κινδύνου)	
Ασθενής 10 (υψηλού κινδύνου)	

Εικόνα 11. Εικόνες μικροσκοπίου από τομές οστεομυελικής βιοψίας που απεικονίζεται σε μεσαία μεγέθυνση (40x) η ανοσοϊστοχημική χρώση για την πρωτεΐνη pPRAS40 σε αντιπροσωπευτικά δείγματα.

7. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η οδός σηματοδότησης PI3K/Akt θεωρείται μία από τις θεμελιώδεις οδούς σηματοδότησης στη ρύθμιση της εξέλιξης του κυτταρικού κύκλου, του πολλαπλασιασμού, της απόπτωσης και της λευχαιμογένεσης (Manning and Toker, 2017, Blachly and Baiocchi, 2014).

Το 2006, οι M Nyakern et al. εξέτασαν τα επίπεδα φωσφορυλίωσης της Akt, με ανοσοκυτταροχημική ανάλυση και κυτταρομετρία ροής, σε PBMCs και BMMCs από ασθενείς με MDS υψηλού και χαμηλού κινδύνου, χρησιμοποιώντας φυσιολογικά PBMCs ή BMMCs ως μάρτυρες για τη σύγκριση της έντασης της χρώσης. Οι ερευνητές παρατήρησαν υψηλά επίπεδα χρώσης φωσφορυλιωμένης Akt στη Ser473 στο 90% των περιπτώσεων MDS υψηλού κινδύνου, ενώ BMMCs από φυσιολογικό ΜΟ ή ασθενείς με MDS χαμηλού κινδύνου παρουσίαζαν απουσία ή χαμηλής έντασης χρώση για pAktS (Nyakern et al., 2006).

Τα ευρήματα αυτά μας ώθησαν στο ερευνητικό και κλινικό ερώτημα εάν η παρατηρούμενη διαφορά στην ενεργοποίηση (φωσφορυλίωση) της AKT μεταξύ μονοπύρηνων κυττάρων ΒΜ από ασθενείς με MDS υψηλού κινδύνου συγκριτικά με αυτών με MDS χαμηλού κινδύνου θα ήταν εξίσου εμφανής κατά την ημιποσοτική μικροσκοπική εκτίμηση ΒΜΒ από αντίστοιχους ασθενείς με MDS.

Για τον σκοπό αυτό εντοπίστηκαν αναδρομικά περιστατικά ασθενών της Παθολογικής Φυσιολογίας που έλαβαν διάγνωση MDS κατά την περίοδο 2020-2021 σύμφωνα με τα αναθεωρημένα κριτήρια της WHO 2016 (Arber et al., 2016). Κατά το χρονικό διάστημα αυτό αναγνωρίστηκαν 10 περιστατικά ασθενών που: (1) έλαβαν πρωτοδιάγνωση MDS με την υπό εξέταση ΒΜΒ και χωρίς να έχουν λάβει οποιαδήποτε θεραπεία και (2) δίχως άλλα συμπαρομαρτούντα νοσήματα, όπως νεοπλασία ή σακχαρώδη διαβήτη, που είναι γνωστό ότι εμπλέκονται στο μελετώμενο σηματοδοτικό μονοπάτι. Ως μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν, κατά αντίστοιχο τρόπο, 4 δείγματα ασθενών (παρόμοιας ηλικίας και φύλου με τους ασθενείς με MDS) που υποβλήθηκαν σε ΒΜΒ στα πλαίσια κλινικής διερεύνησης αναιμίας, λευκοπενίας ή/και θρομβοπενίας αλλά τελικώς δεν πληρούσαν τα κριτήρια διάγνωσης MDS και έλαβαν διαφορετική διάγνωση (π.χ. συστηματική λοίμωξη, φαρμακευτική αγωγή, κ.α).

Μελέτη του σηματοδοτικού μονοπατιού PI3K/AKT στο μυελό των ασθενών με μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα υψηλού και χαμηλού κινδύνου

Σύμφωνα με τα ευρήματα μας η ενεργοποίηση-φωσφορυλίωση της Akt αλλά και του καταρροϊκού στόχου της, PRAS40, ήταν καθολικά παρούσα χωρίς μεταβολές στην ένταση των χρώσεων σε όλα τα δείγματα ανεξαρτήτως διάγνωσης MDS ή/και υποομάδας σταδιοποίησης.

Τα ευρήματα μας είναι αντίθετα με την μοναδική ερευνητική εργασία στην υπάρχουσα βιβλιογραφία σύμφωνα με την οποία υπάρχει συνεχής ενεργοποίηση της pAkt_s σε ασθενείς με MDS υψηλού κινδύνου αλλά όχι σε ασθενείς με MDS χαμηλού κινδύνου ή υγιείς μάρτυρες. Η διαφορά αυτή στα ευρήματα θα μπορούσε να αποδοθεί σε πολλές αιτίες. Πρώτον, η απουσία διαφοράς μεταξύ ασθενών και μαρτύρων θα μπορούσε να αποδοθεί στο γεγονός ότι η ομάδα των μαρτύρων της παρούσας μελέτης δεν αποτελούσε μέρος του υγιή γενικού πληθυσμού [όπως στην μελέτη των (Nyåkern et al., 2006) αλλά έπασχαν από κάποιο άλλο συστηματικό νόσημα κατά τη διάρκεια της λήψης BMB και το οποίο, αν και όχι μέχρι τώρα γνωστό, θα μπορούσε να επιδράσει στα επίπεδα ενεργοποίησης του μονοπατιού PI3K/Akt. Δεύτερον, το δείγμα ασθενών της παρούσας μελέτης (n=10) ήταν πολύ μικρό και η υποκατηγοριοποίηση των ασθενών σε υψηλού-χαμηλού κινδύνου βάση του IPSS-R ήταν οριακή (διάμεση τιμή IPSS-R στην ομάδα χαμηλού κινδύνου έναντι μέτριο και υψηλού κινδύνου ήταν 3 και 4.5, αντίστοιχα. Τρίτον, η παθολογοανατομική εκτίμηση, σύμφωνα με τον σχεδιασμό της παρούσας μελέτης, βασίστηκε σε ημιποσοτική μέτρηση της έντασης του ανοσοϊστοχημικού σήματος (4βάθμια κλίμακα: 0: απουσία χρώσης, 1+: ελάχιστη χρώση, 2+: μέτρια χρώση, 3+: έντονη χρώση), ώστε σε περίπτωση θετικών αποτελεσμάτων να αποτελούσε μια σχετικά εύκολη ευρέως εφαρμόσιμη και επαναλαμβανόμενη μέθοδο εκτίμησης των BMB ασθενών με MDS. Δεδομένων των παραπάνω περιορισμών, δεν παρατηρήθηκε σημαντική διαφορά μεταξύ των συγκρινόμενων ομάδων και η στατιστική σύγκριση μεταξύ των εκάστοτε υποομάδων ασθενών και μαρτύρων (μικρός αριθμός) δεν επιτρέπει την εξαγωγή ασφαλών συμπερασμάτων.

Τέταρτον, στην παρούσα αναδρομική μελέτη, δεν υπήρχε η δυνατότητα συνεκτίμησης και επιβεβαίωσης των αποτελεσμάτων με ταυτόχρονες εναλλακτικές μεθόδους για την ανίχνευση και ανάλυση των ίδιων πρωτεϊνών, όπως με την τεχνική ηλεκτροφόρησης σε γέλη (Western blot) σε υλικό αναρροφήματος BM ή με την τεχνική της κυτταρομετρίας ροής, που θα μπορούσαν να διακρίνουν και να ποσοτικοποιήσουν ενδεχόμενες διαφορές με πιο ακριβή τρόπο.

Μελέτη του σηματοδοτικού μονοπατιού PI3K/AKT στο μυελό των ασθενών με μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα υψηλού και χαμηλού κινδύνου

Αναφορικά με την τεχνική της ανοσοϊστοχημικής τεχνικής στην παρούσα μελέτη, η καθολική παρουσία της Akt σε όλες τις ΒΜΒ και στην πλειοψηφία των κυττάρων με υπεροχή της κυτταροπλασματικής εντόπισης έναντι της πυρηνικής συνάδει με την αντίστοιχη βιβλιογραφία στον ATLAS of GENETICS and CYTOGENETICS in ONCOLOGY and HAEMATOLOGY από περιπτώσεις ΒΜ αλλά και μελέτες από άλλα συστήματα και παθήσεις, υποδεικνύοντας ένα σωστό πειραματικό σκέλος από τον σχεδιασμό, στην προτυποποίηση των τεχνικών και την τελική εφαρμογή.

Η έκφραση των μελετώμενων πρωτεϊνών με τα κλινικοπαθολογοανατομικά χαρακτηριστικά και την επιβίωση των ασθενών επιχειρήθηκε παρά τον μικρό αριθμό των μελετώμενων ασθενών. Πιο λεπτομερώς, η ανοσοϊστοχημική έκφραση της ενεργοποιημένης μορφής της Akt δεν συσχετίστηκε με τις τιμές της αιμοσφαιρίνης, ολικών λευκών αιμοσφαιρίων, ουδετερόφιλων λευκοκυττάρων ή/και αιμοπεταλίων. Ακόμη, ίσος αριθμός ασθενών (n=1) παρουσίασε εξέλιξη σε AML κατά την 2ετή κλινική παρακολούθηση μεταξύ ασθενών χαμηλού κινδύνου (n=5) έναντι αυτών με μέτριο και υψηλό κίνδυνο (n=5) και επομένως το ποσοστό φωσφορυλίωσης της Akt δεν κατέχει καμία προβλεπτική αξία στη μικρή ομάδα αυτών των ασθενών.

Καταληκτικά, με την διεκπεραίωση της παρούσας διπλωματικής εργασίας και την αξιολόγηση των αποτελεσμάτων και των συμπερασμάτων που εξήχθησαν, κρίνεται αναγκαίος ο σχεδιασμός και η εκτέλεση περαιτέρω μελετών στο συγκεκριμένο επιστημονικό πεδίο. Σε πρώτο επίπεδο, η παρουσία μίας πιο εμπλουτισμένης βιβλιοθήκης δειγμάτων, τόσο σε ποσοτικό επίπεδο με μεγαλύτερο αριθμό ασθενών κατά τη διάγνωση αλλά και η συνεκτίμηση διαδοχικών δειγμάτων μετά τη θεραπεία ή την εκτροπή σε AML, θα κρίνονταν εξαιρετικά χρήσιμη. Άκρως ενδιαφέρουσα κρίνεται επίσης η ταξινόμηση των ασθενών βάση του νεότερου συστήματος ταξινόμησης των MDS κατά WHO 2022, η οποία θα οδηγούσε ενδεχομένως σε νέες συσχετίσεις. Τέλος, η μελέτη των μορίων ενδιαφέροντος με την ταυτόχρονη χρήση πολλαπλών τεχνικών (ανοσοϊστοχημεία, Western blot, κυτταρομετρία ροής) σε πολλαπλούς ιστούς (ΒΜ, περιφερικό αίμα) τόσο σε δείγματα κύβων παραφίνης όσο και σε νωπό υλικό (αναρρόφημα, επίχρισμα), όπου προβλέπεται, θα βοηθούσε στην προσέγγιση ακριβέστερων ερευνητικών αποτελεσμάτων.

8. ΠΙΝΑΚΑΣ ΣΥΝΤΜΗΣΕΩΝ – ΑΡΚΤΙΚΟΛΕΞΩΝ

ATP	Adenosine triphosphate
AML	Acute myeloid leukemia
BFUe	Burst forming unit–erythroid
BM	Bone marrow
BMB:	Bone marrow biopsy
BMMCs:	Bone marrow mononuclear cells
BL-HSC:	B-cell lymphoid hematopoietic stem cell
CCSS:	Comprehensive Cytogenetic Scoring System
CFU:	Colony forming unit
CHIP:	Clonal hematopoiesis of indeterminate potential
CTLA-4:	Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen
EB:	Excess blasts
EPO:	Erythropoietin
GM:	Granulocyte-monocytes
GM-CSF:	Granulocyte Macrophage-Colony Stimulating Factor
HSC:	Hematopoietic stem cell
HSC-P:	Hematopoietic stem cell-progenitor
ICUS:	Idiopathic cytopenia of undetermined significance
IL:	Interleukin
IPSS-R:	Revised International Prognostic Scoring System
MDS:	Myelodysplastic syndrome
MLD:	Multilineage dysplasia
MSC:	Bone marrow mesenchymal stem cells
mTOR:	Mammalian target of rapamycin
mTORC:	Mammalian target of rapamycin complex
NAACCR:	North American Association of Central Cancer Registries
NF-κB:	Nuclear factor kappa B
PBMCs:	Peripheral blood mononuclear cells
PI3K	Phosphatidylinositol-3 kinase
PDK1	3-Phosphoinositide-dependent kinase 1
PtdIns (3,4,5) P3	Phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate
PTEN	Phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10
SEER:	Surveillance, Epidemiology, and End Results
SF3B1:	Splicing factor 3B subunit 1
SLD:	Single lineage dysplasia
TBS:	Tris buffer saline
TL-HSC:	T-cell lymphoid hematopoietic stem cell
TSC:	Tuberous sclerosis complex
WHO:	World health organization
WPSS:	WHO-classification based Prognostic Scoring System

9. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- 2018a. Myelodysplastic Syndrome With Multilineage Dysplasia. *In: FOUCAR, K., CHABOT-RICHARDS, D., CZUCHLEWSKI, D. R., KARNER, K. H., REICHARD, K. K., VASEF, M. A., WILSON, C. S., ZHANG, Q.-Y. & CULBREATH, K. (eds.) Diagnostic Pathology: Blood and Bone Marrow (Second Edition)*. Elsevier.
- 2018b. Myelodysplastic Syndrome With Single Lineage Dysplasia. *In: FOUCAR, K., CHABOT-RICHARDS, D., CZUCHLEWSKI, D. R., KARNER, K. H., REICHARD, K. K., VASEF, M. A., WILSON, C. S., ZHANG, Q.-Y. & CULBREATH, K. (eds.) Diagnostic Pathology: Blood and Bone Marrow (Second Edition)*. Elsevier.
- 2018c. Overview and Classification of Myelodysplastic Syndromes. *In: FOUCAR, K., CHABOT-RICHARDS, D., CZUCHLEWSKI, D. R., KARNER, K. H., REICHARD, K. K., VASEF, M. A., WILSON, C. S., ZHANG, Q.-Y. & CULBREATH, K. (eds.) Diagnostic Pathology: Blood and Bone Marrow (Second Edition)*. Elsevier.
- 2018d. Synoptic Bone Marrow Reporting. *In: FOUCAR, K., CHABOT-RICHARDS, D., CZUCHLEWSKI, D. R., KARNER, K. H., REICHARD, K. K., VASEF, M. A., WILSON, C. S., ZHANG, Q.-Y. & CULBREATH, K. (eds.) Diagnostic Pathology: Blood and Bone Marrow (Second Edition)*. Elsevier.
2019. ACUTE MYELOID LEUKAEMIA, MIXED PHENOTYPE ACUTE LEUKAEMIA, THE MYELODYSPLASTIC SYNDROMES AND HISTIOCYTIC NEOPLASMS. *Bone Marrow Pathology*.
- ALEXANDER, W. S. 1998. Cytokines in hematopoiesis. *Int Rev Immunol*, 16, 651-82.
- ARBER, D. A., ORAZI, A., HASSERJIAN, R., THIELE, J., BOROWITZ, M. J., LE BEAU, M. M., BLOOMFIELD, C. D., CAZZOLA, M. & VARDIMAN, J. W. 2016. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood*, 127, 2391-405.
- BAIN, B. J. 2001. Bone marrow aspiration. *J Clin Pathol*, 54, 657-63.
- BARMINKO, J., REINHOLT, B. & BARON, M. H. 2016. Development and differentiation of the erythroid lineage in mammals. *Dev Comp Immunol*, 58, 18-29.
- BLACHLY, J. S. & BAIOCCHI, R. A. 2014. Targeting PI3-kinase (PI3K), AKT and mTOR axis in lymphoma. *Br J Haematol*, 167, 19-32.
- BRAUN, T., DE BOTTON, S., TAKSIN, A. L., PARK, S., BEYNE-RAUZY, O., COITEUX, V., SAPENA, R., LAZARETH, A., LEROUX, G., GUENDA, K., CASSINAT, B., FONTENAY, M., VEY, N., GUERCI, A., DREYFUS, F., BORDESSOULE, D., STAMATOULLAS, A., CASTAIGNE, S., TERRÉ, C., ECLACHE, V., FENAUX, P. & ADÈS, L. 2011. Characteristics and outcome of myelodysplastic syndromes (MDS) with isolated 20q deletion: a report on 62 cases. *Leuk Res*, 35, 863-7.
- BRIERLEY, C. K. & STEENSMA, D. P. 2020. C22.3.2 Myelodysplastic syndromes. *In: HATTON, C., HAY, D., FIRTH, J., CONLON, C. & COX, T. (eds.) Oxford Textbook of Medicine*. Oxford University Press.
- CESTA, M. F. 2006. Normal structure, function, and histology of mucosa-associated lymphoid tissue. *Toxicol Pathol*, 34, 599-608.
- CHAPUIS, N., PARK, S., LEOTOING, L., TAMBURINI, J., VERDIER, F., BARDET, V., GREEN, A. S., WILLEMS, L., AGOU, F., IFRAH, N., DREYFUS, F., BISMUTH, G., BAUD, V., LACOMBE, C., MAYEUX, P. & BOUSCARY, D. 2010. IκB kinase overcomes PI3K/Akt and ERK/MAPK to control FOXO3a activity in acute myeloid leukemia. *Blood*, 116, 4240-50.

Μελέτη του σηματοδοτικού μονοπατιού PI3K/AKT στο μυελό των ασθενών με
μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα υψηλού και χαμηλού κινδύνου

- CHEN, C., LIU, Y., LIU, R., IKENOUE, T., GUAN, K. L., LIU, Y. & ZHENG, P. 2008. TSC-mTOR maintains quiescence and function of hematopoietic stem cells by repressing mitochondrial biogenesis and reactive oxygen species. *J Exp Med*, 205, 2397-408.
- CHIEREGHIN, C., TRAVAGLINO, E., ZAMPINI, M., SABA, E., SAITTA, C., RIVA, E., BERSANELLI, M. & DELLA PORTA, M. G. 2021. The Genetics of Myelodysplastic Syndromes: Clinical Relevance. *Genes (Basel)*, 12.
- DELLA PORTA, M. G., TRAVAGLINO, E., BOVERI, E., PONZONI, M., MALCOVATI, L., PAPAEMMANUIL, E., RIGOLIN, G. M., PASCUTTO, C., CROCI, G., GIANELLI, U., MILANI, R., AMBAGLIO, I., ELENA, C., UBEZIO, M., DA VIA, M. C., BONO, E., PIETRA, D., QUAGLIA, F., BASTIA, R., FERRETTI, V., CUNEO, A., MORRA, E., CAMPBELL, P. J., ORAZI, A., INVERNIZZI, R. & CAZZOLA, M. 2015. Minimal morphological criteria for defining bone marrow dysplasia: a basis for clinical implementation of WHO classification of myelodysplastic syndromes. *Leukemia*, 29, 66-75.
- DIBBLE, C. C. & CANTLEY, L. C. 2015. Regulation of mTORC1 by PI3K signaling. *Trends Cell Biol*, 25, 545-55.
- ELMORE, S. A. 2006. Enhanced histopathology of the bone marrow. *Toxicol Pathol*, 34, 666-86.
- FALCONI, G., FABIANI, E., FIANCHI, L., CRISCUOLO, M., RAFFAELLI, C. S., BELLESI, S., HOHAUS, S., VOSO, M. T., D'ALÒ, F. & LEONE, G. 2016. Impairment of PI3K/AKT and WNT/ β -catenin pathways in bone marrow mesenchymal stem cells isolated from patients with myelodysplastic syndromes. *Exp Hematol*, 44, 75-83.e1-4.
- FENAUX, P., HAASE, D., SANTINI, V., SANZ, G. F., PLATZBECKER, U. & MEY, U. 2021. Myelodysplastic syndromes: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up(†☆). *Ann Oncol*, 32, 142-156.
- FOLLO, M. Y., MONGIORGI, S., BOSI, C., CAPPELLINI, A., FINELLI, C., CHIARINI, F., PAPA, V., LIBRA, M., MARTINELLI, G., COCCO, L. & MARTELLI, A. M. 2007. The Akt/mammalian target of rapamycin signal transduction pathway is activated in high-risk myelodysplastic syndromes and influences cell survival and proliferation. *Cancer Res*, 67, 4287-94.
- GARCIA-MANERO, G., CHIEN, K. S. & MONTALBAN-BRAVO, G. 2020. Myelodysplastic syndromes: 2021 update on diagnosis, risk stratification and management. *Am J Hematol*, 95, 1399-1420.
- GOASGUEN, J. E., BENNETT, J. M., BAIN, B. J., BRUNNING, R., VALLESPI, M. T., TOMONAGA, M., ZINI, G. & RENAULT, A. 2014. Proposal for refining the definition of dysgranulopoiesis in acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndromes. *Leuk Res*, 38, 447-53.
- GREENBERG, P., COX, C., LEBEAU, M. M., FENAUX, P., MOREL, P., SANZ, G., SANZ, M., VALLESPI, T., HAMBLIN, T., OSCIER, D., OHYASHIKI, K., TOYAMA, K., AUL, C., MUFTI, G. & BENNETT, J. 1997. International scoring system for evaluating prognosis in myelodysplastic syndromes. *Blood*, 89, 2079-88.
- GREENBERG, P. L., TUECHLER, H., SCHANZ, J., SANZ, G., GARCIA-MANERO, G., SOLÉ, F., BENNETT, J. M., BOWEN, D., FENAUX, P., DREYFUS, F., KANTARJIAN, H., KUENDGEN, A., LEVIS, A., MALCOVATI, L., CAZZOLA, M., CERMAK, J., FONATSCH, C., LE BEAU, M. M., SLOVAK, M. L., KRIEGER, O., LUEBBERT, M., MACIEJEWSKI, J., MAGALHAES, S. M., MIYAZAKI, Y., PFEILSTÖCKER, M., SEKERES, M., SPERR, W. R., STAUDER, R., TAURO, S., VALENT, P., VALLESPI, T., VAN DE LOOSDRECHT, A. A., GERMING, U. &

Μελέτη του σηματοδοτικού μονοπατιού PI3K/AKT στο μυελό των ασθενών με
μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα υψηλού και χαμηλού κινδύνου

- HAASE, D. 2016. Cytopenia levels for aiding establishment of the diagnosis of myelodysplastic syndromes. *Blood*, 128, 2096-2097.
- HALILOVIC, E., SHE, Q. B., YE, Q., PAGLIARINI, R., SELLERS, W. R., SOLIT, D. B. & ROSEN, N. 2010. PIK3CA mutation uncouples tumor growth and cyclin D1 regulation from MEK/ERK and mutant KRAS signaling. *Cancer Res*, 70, 6804-14.
- KUMAR, B. V., CONNORS, T. J. & FARBER, D. L. 2018. Human T Cell Development, Localization, and Function throughout Life. *Immunity*, 48, 202-213.
- KHOURY, J. D., SOLARY, E. & ABLA, O. . The 5th edition of the World Health Organization Classification of Haematolymphoid Tumours: Myeloid and Histiocytic/Dendritic Neoplasms. *Leukemia*, 36, 1703-1719.
- LAI, J. L., PREUDHOMME, C., ZANDECKI, M., FLACTIF, M., VANRUMBEKE, M., LEPELLEY, P., WATTEL, E. & FENAUX, P. 1995. Myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemia with 17p deletion. An entity characterized by specific dysgranulopoïesis and a high incidence of P53 mutations. *Leukemia*, 9, 370-81.
- LIM, W. F., INOUE-YOKOO, T., TAN, K. S., LAI, M. I. & SUGIYAMA, D. 2013. Hematopoietic cell differentiation from embryonic and induced pluripotent stem cells. *Stem Cell Research & Therapy*, 4, 71.
- MALCOVATI, L., GERMING, U., KUENDGEN, A., DELLA PORTA, M. G., PASCUTTO, C., INVERNIZZI, R., GIAGOUNIDIS, A., HILDEBRANDT, B., BERNASCONI, P., KNIPP, S., STRUPP, C., LAZZARINO, M., AUL, C. & CAZZOLA, M. 2007. Time-dependent prognostic scoring system for predicting survival and leukemic evolution in myelodysplastic syndromes. *J Clin Oncol*, 25, 3503-10.
- MALCOVATI, L., PORTA, M. G., PASCUTTO, C., INVERNIZZI, R., BONI, M., TRAVAGLINO, E., PASSAMONTI, F., ARCAINI, L., MAFFIOLI, M., BERNASCONI, P., LAZZARINO, M. & CAZZOLA, M. 2005. Prognostic factors and life expectancy in myelodysplastic syndromes classified according to WHO criteria: a basis for clinical decision making. *J Clin Oncol*, 23, 7594-603.
- MANNING, B. D. & TOKER, A. 2017. AKT/PKB Signaling: Navigating the Network. *Cell*, 169, 381-405.
- MORRISON, S. J. & SCADDEN, D. T. 2014. The bone marrow niche for haematopoietic stem cells. *Nature*, 505, 327-34.
- NAEIM, F., NAGESH RAO, P., SONG, S. X. & PHAN, R. T. 2018a. Chapter 1 - Structure of Normal Hematopoietic Tissues. In: NAEIM, F., NAGESH RAO, P., SONG, S. X. & PHAN, R. T. (eds.) *Atlas of Hematopathology (Second Edition)*. Academic Press.
- NAEIM, F., NAGESH RAO, P., SONG, S. X. & PHAN, R. T. 2018b. Chapter 2 - Principles of Immunophenotyping. In: NAEIM, F., NAGESH RAO, P., SONG, S. X. & PHAN, R. T. (eds.) *Atlas of Hematopathology (Second Edition)*. Academic Press.
- NEPSTAD, I., HATFIELD, K. J., GRØNNINGSÆTER, I. S. & REIKVAM, H. 2020. The PI3K-Akt-mTOR Signaling Pathway in Human Acute Myeloid Leukemia (AML) Cells. *Int J Mol Sci*, 21.
- NEUKIRCHEN, J., LAUSEKER, M., BLUM, S., GIAGOUNIDIS, A., LÜBBERT, M., MARTINO, S., SIRAGUSA, S., SCHLENK, R. F., PLATZBECKER, U., HOFMANN, W. K., GÖTZE, K., PALUMBO, G. A., MAGRIN, S., KÜNDGEN, A., AUL, C., HILDEBRANDT, B., HASFORD, J., KOBBE, G., HAAS, R. & GERMING, U. 2014. Validation of the revised international prognostic scoring system (IPSS-R) in patients with myelodysplastic syndrome: a multicenter study. *Leuk Res*, 38, 57-64.

Μελέτη του σηματοδοτικού μονοπατιού PI3K/AKT στο μυελό των ασθενών με
μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα υψηλού και χαμηλού κινδύνου

- NISHINO, H. T. & CHANG, C. C. 2005. Myelodysplastic syndromes: clinicopathologic features, pathobiology, and molecular pathogenesis. *Arch Pathol Lab Med*, 129, 1299-310.
- NYÁKERN, M., TAZZARI, P. L., FINELLI, C., BOSI, C., FOLLO, M. Y., GRAFONE, T., PICCALUGA, P. P., MARTINELLI, G., COCCO, L. & MARTELLI, A. M. 2006. Frequent elevation of Akt kinase phosphorylation in blood marrow and peripheral blood mononuclear cells from high-risk myelodysplastic syndrome patients. *Leukemia*, 20, 230-8.
- ORKIN, S. H. 1995. Hematopoiesis: how does it happen? *Curr Opin Cell Biol*, 7, 870-7.
- RISSO, G., BLAUSTEIN, M., POZZI, B., MAMMI, P. & SREBROW, A. 2015. Akt/PKB: one kinase, many modifications. *Biochem J*, 468, 203-14.
- ROGERS, H. J., VARDIMAN, J. W., ANASTASI, J., RACA, G., SAVAGE, N. M., CHERRY, A. M., ARBER, D., MOORE, E., MORRISSETTE, J. J., BAGG, A., LIU, Y. C., MATHEW, S., ORAZI, A., LIN, P., WANG, S. A., BUESO-RAMOS, C. E., FOUCAR, K., HASSERJIAN, R. P., TIU, R. V., KARAFI, M. & HSI, E. D. 2014. Complex or monosomal karyotype and not blast percentage is associated with poor survival in acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome patients with inv(3)(q21q26.2)/t(3;3)(q21;q26.2): a Bone Marrow Pathology Group study. *Haematologica*, 99, 821-9.
- ROLLISON, D. E., HOWLADER, N., SMITH, M. T., STROM, S. S., MERRITT, W. D., RIES, L. A., EDWARDS, B. K. & LIST, A. F. 2008. Epidemiology of myelodysplastic syndromes and chronic myeloproliferative disorders in the United States, 2001-2004, using data from the NAACCR and SEER programs. *Blood*, 112, 45-52.
- SAKAKIBARA, K., TSUJIOKA, T., KIDA, J. I., KUROZUMI, N., NAKAHARA, T., SUEMORI, S. I., KITANAKA, A., ARAO, Y. & TOHYAMA, K. 2019. Binimetinib, a novel MEK1/2 inhibitor, exerts anti-leukemic effects under inactive status of PI3Kinase/Akt pathway. *Int J Hematol*, 110, 213-227.
- SARBASSOV, D. D., GUERTIN, D. A., ALI, S. M. & SABATINI, D. M. 2005. Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science*, 307, 1098-101.
- SEETHARAM, M., FAN, A. C., TRAN, M., XU, L., RENSCHLER, J. P., FELSHER, D. W., SRIDHAR, K., WILHELM, F. & GREENBERG, P. L. 2012. Treatment of higher risk myelodysplastic syndrome patients unresponsive to hypomethylating agents with ON 01910.Na. *Leuk Res*, 36, 98-103.
- STEENSMA, D. P., BEJAR, R., JAISWAL, S., LINDSLEY, R. C., SEKERES, M. A., HASSERJIAN, R. P. & EBERT, B. L. 2015. Clonal hematopoiesis of indeterminate potential and its distinction from myelodysplastic syndromes. *Blood*, 126, 9-16.
- TRAVLOS, G. S. 2006. Normal structure, function, and histology of the bone marrow. *Toxicol Pathol*, 34, 548-65.
- VALENT, P., BAIN, B. J., BENNETT, J. M., WIMAZAL, F., SPERR, W. R., MUFTI, G. & HORN, H. P. 2012. Idiopathic cytopenia of undetermined significance (ICUS) and idiopathic dysplasia of uncertain significance (IDUS), and their distinction from low risk MDS. *Leuk Res*, 36, 1-5.
- WEINBERG, O. K. & HASSERJIAN, R. P. 2019. The current approach to the diagnosis of myelodysplastic syndromes(☆). *Semin Hematol*, 56, 15-21.
- YILMAZ, O. H., VALDEZ, R., THEISEN, B. K., GUO, W., FERGUSON, D. O., WU, H. & MORRISON, S. J. 2006. Pten dependence distinguishes haematopoietic stem cells from leukaemia-initiating cells. *Nature*, 441, 475-82.

Μελέτη του σηματοδοτικού μονοπατιού PI3K/AKT στο μυελό των ασθενών με
μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα υψηλού και χαμηλού κινδύνου

ZEIDAN, A. M., SHALLIS, R. M., WANG, R., DAVIDOFF, A. & MA, X. 2019. Epidemiology of myelodysplastic syndromes: Why characterizing the beast is a prerequisite to taming it. *Blood Rev*, 34, 1-15.