



Σχολή Επιστημών Υγείας και Πρόνοιας
Τμήμα Βιοϊατρικών Επιστημών
ΜΠΣ Βιοϊατρικές μέθοδοι και τεχνολογία στη διάγνωση

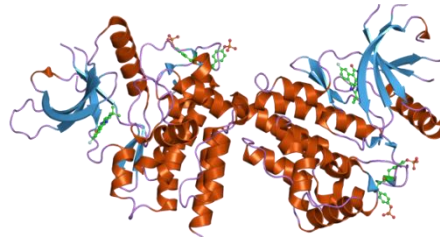


ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Μεταλλαγές JAK2 και μυελοϋπερπλαστικές νεοπλασίες

POST GRADUATE THESIS

JAK2 mutations and myeloproliferative neoplasms



ΟΝΟΜΑ ΦΟΙΤΗΤΗ(ΤΩΝ)/NAME OF STUDENTS

Λυδία Πλαβούκου
Lydia Plavoukou

ΟΝΟΜΑ ΕΙΣΗΓΗΤΗ/NAME OF THE SUPERVISOR

Αναστάσιος Κριεμπάρδης
Anastasios Kriembardis

ΑΙΓΑΛΕΩ/ΑΙΓΑΛΕΟ 2021



Faculty of Health and Caring Professions
Department of Biomedical Sciences
Postgraduate program:
Biomedical methods and technology in diagnosis



POST GRADUATE THESIS

JAK2 mutations and myeloproliferative neoplasms

LYDIA PLAVOUKOU

19011

lydia73plavoukou@gmail.com

FIRST SUPERVISOR

ANASTASIOS KRIEMBARDIS

SECOND SUPERVISOR

CHARA GEORGATZAKOU

THIRD SUPERVISOR

EFSTATHIA PAPAGEORGIU

AIGALEO 2021

Δήλωση συγγραφέα μεταπτυχιακής εργασίας

Ο/η κάτωθι υπογεγραμμένη **ΛΥΔΙΑ ΠΛΑΒΟΥΚΟΥ** του **ΔΗΜΗΤΡΙΟΥ**, με αριθμό μητρώου **19011** φοιτήτρια του Προγράμματος Μεταπτυχιακών Σπουδών Βοϊατρικές μέθοδοι και Τεχνολογία στη Διάγνωση του Τμήματος Βιοϊατρικών Επιστημών της Σχολής Επιστημών Υγείας και Πρόνοιας του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής, δηλώνω ότι:

«Είμαι συγγραφέας αυτής της μεταπτυχιακής εργασίας και ότι κάθε βοήθεια την οποία είχα για την προετοιμασία της, είναι πλήρως αναγνωρισμένη και αναφέρεται στην εργασία. Επίσης, οι όποιες πηγές από τις οποίες έκανα χρήση δεδομένων, ιδεών ή λέξεων, είτε ακριβώς είτε παραφρασμένες, αναφέρονται στο σύνολό τους, με πλήρη αναφορά στους συγγραφείς, τον εκδοτικό οίκο ή το περιοδικό, συμπεριλαμβανομένων και των πηγών που ενδεχομένως χρησιμοποιήθηκαν από το διαδίκτυο. Επίσης, βεβαιώνω ότι αυτή η εργασία έχει συγγραφεί από μένα αποκλειστικά και αποτελεί προϊόν πνευματικής ιδιοκτησίας τόσο δικής μου, όσο και του Ιδρύματος. Παράβαση της ανωτέρω ακαδημαϊκής μου ευθύνης αποτελεί ουσιώδη λόγο για την ανάκληση του πτυχίου μου».

Επιθυμώ την απαγόρευση πρόσβασης στο πλήρες κείμενο της εργασίας μου μέχρι 31/12/2021 και έπειτα από αίτηση μου στη Βιβλιοθήκη και έγκριση του επιβλέποντα καθηγητή.

Η Δηλούσα

Λυδία Πλαβούκου

Ευχαριστίες

Με την ολοκλήρωση της μεταπτυχιακής διπλωματικής εργασίας, θα ήθελα να εκφράσω τις θερμές μου ευχαριστίες σε όλους όσους συνέβαλλαν στην εκπόνησή της.

Ευχαριστώ θερμά τον επιβλέποντα καθηγητή μου, κύριο Αναστάσιο Κριεμπάρδη, για την επιστημονική του καθοδήγηση, τις πολύτιμες συμβουλές, τις εύστοχες παρατηρήσεις και υποδείξεις και το αμείωτο ενδιαφέρον του.

Επίσης ευχαριστώ το Πανεπιστημιακό Αιματολογικό Εργαστήριο του Ιπποκράτειου Νοσοκομείου Αθηνών, ιδιαίτερα την διευθύντρια Αιματολόγο κ. Φλώρα Κοντοπίδου, την Αιματολόγο κ. Αντιγόνη Σκεπετάρη καθώς και τη Βιολόγο κ. Αναστασία Σπυροπούλου, για την πολύτιμη βοήθειά τους στη συλλογή των δεδομένων που αποτέλεσαν και δομικά στοιχεία αυτής της εργασίας.

Ευχαριστώ την προϊσταμένη μου, Τεχνολόγο κ. Έφη Παύλου για το ενδιαφέρον της, την επιμονή της και την ουσιαστική βοήθεια της.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες θα ήθελα να απευθύνω στο σύζυγό μου επίσης Τεχνολόγο, κ. Φώτη Βάκο για τη συνεχή υποστήριξή του καθώς και για την έμπρακτη βοήθειά του στην ολοκλήρωση αυτής της συγγραφής.

Τέλος θα ήθελα να εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου στην οικογένεια μου για τη στήριξη, συμπαράσταση και κατανόησή τους καθ' όλη τη διάρκεια των μεταπτυχιακών σπουδών μου.

Αφιερώσεις

Στην οικογένειά μου

Περίληψη

Εισαγωγή: Οι μεταλλάξεις στο γονίδιο JAK2 οδηγούν στην εμφάνιση Μυελοϋπερπλαστικών Νεοπλασιών. Επίσης μεταλλάξεις και σε άλλα γονίδια (MPL, CALR) αποτελούν πρωταρχικό γεγονός σε σημαντικό ποσοστό ασθενών με Ιδιοπαθή Θρομβοκυτταραιμία και Πρωτοπαθή Μυελοϊνωση, οι οποίοι δε φέρουν μεταλλάξεις JAK2. Οι ίδιες μεταλλάξεις είναι βαρύνουσας σημασίας, τόσο για την πρόγνωση αλλά και στη διαστρωμάτωση των αιματολογικών κακοηθειών. Διαφορετικές μελέτες έχουν δείξει επίσης μεταβλητά αποτελέσματα σχετικά με την προγνωστική σημασία της επιβάρυνσης της μετάλλαξης JAK2V617F στα μυελοϋπερπλαστικά νεοπλάσματα, παρά τα αρκετά αποδεικτικά στοιχεία ιδίως για ασθενείς με αληθή πολυκυτταραιμία. Φαίνεται ότι στο 95% των περιπτώσεων αληθούς πολυκυτταραιμίας αναγνωρίζονται μεταλλάξεις του γονιδίου JAK2, οι οποίες οδηγούν σε μεταβολή της πρωτοταγούς δομής της αντίστοιχης πρωτεΐνης και σήμερα αποτελούν το κύριο διαγνωστικό κριτήριο της νόσου. Ένα μεγάλο ποσοστό ασθενών με ιδιοπαθή θρομβοκυτταραιμία, περίπου το 50%, χαρακτηρίζεται από την παρουσία της μεταλλαγμένης πρωτεΐνης JAK2V617F. Το ίδιο ισχύει και για τις πρωτοπαθείς μυελοϊνώσεις.

Σκοπός: Η σύγκριση και αξιολόγηση εργαστηριακών δεδομένων ασθενών με κλασικές μυελοϋπερπλαστικές νεοπλασίες (αληθή πολυκυτταραιμία, ιδιοπαθή θρομβοκυτταραιμία και πρωτοπαθή μυελοϊνωση) με δεδομένα από τη διεθνή βιβλιογραφία.

Μέθοδος: Αναδρομική μελέτη εργαστηριακών δεδομένων (ως προς την ανίχνευση μετάλλαξης JAK2 και γενικής αίματος διάγνωσης και τελευταίου έτους) ασθενών με κλασικές μυελοϋπερπλαστικές νεοπλασίες της Β' Πανεπιστημιακής Παθολογικής Κλινικής του Ιπποκράτειου Γενικού Νοσοκομείου Αθηνών, από το 2011 μέχρι και το 2020 (10 έτη).

Αποτελέσματα: Τα ποσοστά θετικότητας των ασθενών ως προς τη μετάλλαξη JAK2V617F κινούνται προς την κατεύθυνση της διεθνούς βιβλιογραφίας. Δεν παρατηρήθηκε ιδιαίτερη διαφοροποίηση σχετικά με την παράμετρο του φύλου στην εμφάνιση των MYN αλλά και της μετάλλαξης JAK2V617F, εκτός από μια μικρή υπεροχή στις γυναίκες (55%) με ΙΘ. Οι διάμεσες ηλικίες των ασθενών είναι παρόμοιες με αυτές που των διεθνών αναφορών. Το ποσοστό θετικότητας της μετάλλαξης του γονιδίου CALR (10%) στους ασθενείς με ΙΘ είναι μικρότερο από αυτό που αναφέρεται στις διεθνείς αναφορές (15-20%). Από τις συγκρίσεις των τιμών αιμοσφαιρίνης και αιματοκρίτη δεν παρατηρείται κάτι το ιδιαίτερο ανάμεσα σε JAK2 θετικούς και αρνητικούς ασθενείς, αντίθετα παρατηρείται μια διαφοροποίηση στην τιμή των PLT στους ασθενείς με ΙΘ. Από τις συγκρίσεις των τιμών λευκών αιμοσφαιρίων

θα μπορούσαμε να πούμε ότι οι JAK2 θετικοί ασθενείς ανταποκρίνονται καλύτερα στη θεραπεία τους.

Κλειδιά: JAK2, JAK2V617F, μυελοϋπερπλαστικές νεοπλασίες, αληθή πολυκυτταραιμία, ιδιοπαθή θρομβοκυτταραιμία, πρωτοπαθή μυελοϊνώση.

Abstract

Introduction: Mutations in the JAK2 gene lead to the appearance of Myeloproliferative Neoplasms. Mutations in other genes (MPL, CALR) are also a primary event in a significant proportion of patients with Idiopathic Thrombocythemia and Primary Myelofibrosis, who do not carry JAK2 mutations. The same mutations matter greatly to both prognosis and classification of hematological malignancies. Different studies have also shown variable results on the predictive significance of the of JAK2V617F mutation burden on myeloproliferative neoplasms, notwithstanding the line of evidence particularly for patients with true polycythemia. It seems that mutations in JAK2 gene are identified in 95% of cases of true polycythemia, which lead to a change in the primary structure of the corresponding protein and are currently the main diagnostic criterion of the disease. A large proportion of patients with idiopathic thrombocythemia, about 50%, are characterized by the presence of the mutated protein JAK2V617F. The same applies for primary myelofibrosis.

Purpose: Comparison and evaluation of laboratory data of patients with classical myeloproliferative neoplasms (true polycythemia, idiopathic thrombocythemia and primary myelofibrosis) with data from the international references.

Method: Retrospective study of laboratory data (over detection of the JAK2 mutation and general blood diagnosis and last year) of patients with classical myeloproliferative neoplasms of the 2nd University Pathological Clinic of the of the General Hospital of Athens "IPPOKRATEIO", from 2011 until 2020 (10 years).

Results: Patients' positivity rates regarding to the JAK2V617F mutation are moving in the direction of references. No particular distinction was observed regarding the gender parameter in the occurrence of MPNs and the JAK2V617F mutation, except for a slight predominance in women (55%) with ET. The median ages of patients are similar to those of international reports. The positivity rate of CALR mutant patients with ET is less than that mentioned in international reports (15-20%). Comparison of hemoglobin and hematocrit levels do not show anything special between JAK2 positive and negative patients, however, there is a difference in the PLT levels in patients with ET. Finally, after comparing the white blood cells levels we could say that JAK2 positive patients respond better to their treatment.

Keywords: JAK2, JAK2V617F, myeloproliferative neoplasms, polycythemia vera, essential thrombocythemia, primary myelofibrosis.

Περιεχόμενα

Δήλωση συγγραφέα μεταπτυχιακής εργασίας.....	iv
Ευχαριστίες	v
Αφιερώσεις	vii
Περίληψη	ix
Abstract	xii
Περιεχόμενα.....	xiv
Συνομογραφίες.....	xvi
Πρόλογος.....	1
Κεφάλαιο 1. Εισαγωγή	3
1.1 Γενικά	3
1.2 Ερυθροποίηση – JAK2	4
1.3 Μεταλλάξεις JAK2	8
1.4 Άλλες μεταλλάξεις γονιδίων και μυελοϋπερπλαστικές νεοπλασίες	9
1.4.1 Το γονίδιο MPL - μεταλλάξεις	11
1.4.2 Το γονίδιο CALR – μεταλλάξεις	12
1.4.3 Μικρότερης συχνότητας μεταλλάξεις γονιδίων	13
1.5 Μυελοϋπερπλαστικές Νεοπλασίες (MPN)	16
1.5.1 Ορισμός.....	16
1.5.2 Ταξινόμηση.....	16
1.5.3 Αληθής Πολυκυτταραιμία (ΑΠ).....	18
1.5.4 Ιδιοπαθής Θρομβοκυτταραιμία (ΙΘ).....	19
1.5.5 Πρωτοπαθής Μυελοϊνωση (ΠΜΙ)	20
1.6 Βασικές μοριακές τεχνικές ανίχνευσης μεταλλάξεων JAK2	22
1.6.1 Σύστημα Ανίχνευσης Μεταλλάξεων Ανθεκτικών στην Ενίσχυση (Amplification Refractory Mutation System Polymerase Chain Reaction, ARMS-PCR).....	22
1.6.2 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (Real Time PCR).....	24
Κεφάλαιο 2. Αποτελέσματα ανάλυσης δεδομένων	27
2.1 Γενικά	27
2.2 Μέθοδος	27
2.2.1 Δείγμα	27
2.2.2 Μεθοδολογία	29
2.3 Αποτελέσματα.....	31
2.4 Παρατηρήσεις – Σχόλια.....	38
2.5 Συμπεράσματα.....	42
Αναφορές	44

Πηγές Εικόνων.....	53
Ευρετήριο Πινάκων.....	54
Ευρετήριο Γραφημάτων.....	54

Συντομογραφίες

	Αγγλική ορολογία	Ελληνική ορολογία
ARMS-PCR	Amplification Refractory Mutation System Polymerase Chain Reaction	Σύστημα Ανίχνευσης Μεταλλάξεων Ανθεκτικών στην Ενίσχυση
CALR	Calreticulin	Καλρετικουλίνη
CFU	Colony Forming Unit-Erythroid	Προερυθροβλάστης
Epo-R	Epo-Receptor	Υποδοχέας Ερυθροποιητίνης
ET (ΙΘ)	Essential Thrombocythemia	Ιδιοπαθή Θρομβοκυτταραιμία
IGF	Insulin Growth Factor	Αυξητικός παράγοντας ινσουλίνης
JAK	Janus Kinase	Κινάση του Ιανού
LOH	Loss Of Heterozygosity	Απώλεια ετεροζυγωτίας
MPL	Myeloproliferative Leukemia oncogene	Ογκογονίδιο μυελοϋπερπλαστικής λευχαιμίας
MPNs (ΜΥΝ)	Myeloproliferative neoplasms	Μυελοϋπερπλαστικές νεοπλασίες.
PMF (ΠΜΙ)	Primary Myelofibrosis	Πρωτοπαθής Μυελοϊνώση
PV(ΑΠ)	Polycythemia Vera	Αληθής Πολυκυτταραιμία
SCF	Stem Cell Factor	
STAT	Signal Transducer and Activators of Transcription	Μετατροπέας σημάτων και ενεργοποιητές της μεταγραφής
TPO	Thrombopoietin	Θρομβοποιητίνη
EPO	Erythropoietin	Ερυθροποιητίνη
ΧΜΛ	Chronic Myelogenous Leukemia	Χρόνια Μυελογενής Λευχαιμία

Πρόλογος

Η παρούσα Διπλωματική Εργασία εκπονήθηκε κατά το ακαδημαϊκό έτος 2020-21 στα πλαίσια του ΜΠΣ, «Βιοϊατρικές Μέθοδοι και Τεχνολογία στη Διάγνωση» του τμήματος Βιοϊατρικών Επιστημών του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής.

Αντικείμενο της είναι οι μεταλλαγές της Janus Kinase 2 (JAK2)⁽¹⁾ και οι επιπτώσεις της σε αιματολογικά νοσήματα και συγκεκριμένα στις μυελοϋπερπλαστικές νεοπλασίες (MYN). Η πρωτεΐνη JAK2 διαβιβάζει προς τον πυρήνα των ερυθροειδικών κυττάρων το μήνυμα ότι ο μεμβρανικός υποδοχέας ερυθροποιητίνης στην επιφάνειά τους έχει συνδεθεί με ερυθροποιητίνη και επάγει τον ελεγχόμενο πολλαπλασιασμό τους.⁽²⁾ Το 2005 από πολλές ομάδες ερευνητών αναφέρθηκε η μετάλλαξη της πρωτεΐνης JAK2 που συνίσταται σε αντικατάσταση της βαλίνης με αριθμό 617 από ένα μόριο φαινυλαλανίνης (JAK2617V>F).⁽³⁾ Η παρουσία της μετάλλαξης αποκλείει τη δευτερογενή πολυκυτταραιμία, τη θρομβοκυτταραιμία ή την μυελοϊνώση από άλλες αιτίες. Η ανάλυση της μετάλλαξης JAK2 αναφέρεται ως μείζον κριτήριο για τη διάγνωση των MYN όπως και οι τιμές αιμοσφαιρίνης ή αιματοκρίτη για την αληθή πολυκυτταραιμία (ΑΠ) ή ο αριθμός των αιμοπεταλίων για την ιδιοπαθή θρομβοκυτταραιμία (ΙΘ) που από το 2016 έχει ορισθεί να είναι $\geq 450 \times 10^9/L$ ⁽⁴⁾⁽⁵⁾⁽⁶⁾⁽⁷⁾

Διαφορετικές μελέτες έχουν δείξει επίσης μεταβλητά αποτελέσματα σχετικά με την προγνωστική σημασία της επιβάρυνσης της μετάλλαξης JAK2V617F στα μυελοϋπερπλαστικά νεοπλασματα, παρά τα αρκετά αποδεικτικά στοιχεία ιδίως για ασθενείς με ΑΠ.⁽⁸⁾ Ο εργαστηριακός προσδιορισμός της μετάλλαξης JAK2V617F είναι ιδιαίτερα ευαίσθητος (97%) και σχεδόν 100% ειδικός στη διάκριση της ΑΠ από άλλες αιτίες αυξημένου αιματοκρίτη.⁽⁷⁾ Φαίνεται ότι στο 95% των περιπτώσεων ΑΠ αναγνωρίζονται μεταλλάξεις του γονιδίου JAK2, οι οποίες οδηγούν σε μεταβολή της πρωτοταγούς δομής της αντίστοιχης πρωτεΐνης και σήμερα αποτελούν το κύριο διαγνωστικό κριτήριο της νόσου. Ένα μεγάλο επίσης ποσοστό ασθενών με ΙΘ (περίπου 50%) χαρακτηρίζεται από την παρουσία της μεταλλαγμένης πρωτεΐνης JAK2V617F που η τελική κατηγοριοποίηση τους είναι οι «θετικές» και οι «αρνητικές» περιπτώσεις JAK2.⁽⁹⁾ Η πιθανότητα ψευδώς θετικών ή ψευδώς αρνητικών αποτελεσμάτων του εργαστηριακού ελέγχου JAK2 αντιμετωπίζεται με την ταυτόχρονη μέτρηση του επιπέδου ερυθροποιητίνης ορού (Epo), η οποία αναμένεται να είναι κάτω του φυσιολογικού σε περισσότερο από το 85% των ασθενών με ΑΠ.⁽¹⁰⁾ Ωστόσο ορισμένοι ασθενείς με θρομβοκυτταραιμία μπορεί επίσης να εμφανίζουν τιμές Epo μικρότερες του φυσιολογικού και οι ασθενείς αυτοί είναι πιο επιρρεπείς στο να αναπτύξουν ΑΠ κατά τη διάρκεια της κλινικής τους πορείας, και ήταν πιο πιθανό να έχουν μεταλλάξεις JAK2.⁽¹¹⁾ Θα πρέπει βέβαια να σημειωθεί ότι και ο αριθμός των μεταλλαγμένων γονιδίων μπορεί να αποτελέσει προγνωστικό δείκτη για τη συνολική επιβίωση και τον κίνδυνο μετασχηματισμού των ασθενών με MYN προς Οξείες Μυελογενείς Λευχαιμίες (ΟΜΛ)⁽¹²⁾.

Τα πιο πάνω στοιχεία οδήγησαν σ' αυτή την εργασία όπου θα αναλυθούν περιστατικά ασθενών με MYN της Β' Πανεπιστημιακής Παθολογικής κλινικής του Γενικού Νοσοκομείου Αθηνών «Ιπποκράτειο». Ιδιαίτερα θα αναλυθούν εργαστηριακά δεδομένα, ως προς την ανίχνευση της μετάλλαξης JAK2617V>F, όσο και αποτελέσματα γενικής αίματος. Εύχομαι τα συμπεράσματα αυτής της προσπάθειας επιβεβαίωσης να αποτελέσουν και χρηστικό εργαλείο για όσους τύχουν της ανάγνωσή της.

Κεφάλαιο 1. Εισαγωγή

1.1 Γενικά

Η παθογένεια των νεοπλασιών οφείλεται στη δημιουργία και επικράτηση κλωνικών κυτταρικών πληθυσμών που ξεφεύγουν από τους μηχανισμούς ελέγχου του φυσιολογικού τους πολλαπλασιασμού, μέσω απόκτησης μεταλλάξεων που οδηγούν σε διαφορετικά γονιδιακά μεταγράφα, τα οποία μετατρέπουν τη λειτουργία αυτή σε αυτόνομη και ανεξέλεγκτη.

Αυτά γενικά κατανέμονται σε δύο μεγάλες κατηγορίες μεταλλάξεων:

- I. Μεγάλης κλίμακας, όπου είτε έχουμε προσθήκες/διαγραφές ολόκληρων χρωμοσωμάτων είτε έχουμε αναδιατάξεις χρωμοσωμικού υλικού¹.
- II. Μικρής κλίμακας όπου περιλαμβάνονται σημειακές αντικαταστάσεις μοναδικών βάσεων (γονίδια JAK2, MPL), είτε προσθήκες/διαγραφές λίγων νουκλεοτιδίων (CALR)

Ειδικότερα για τους ασθενείς με μυελοϋπερπλαστικές νεοπλασίες αυτές οι μεταλλάξεις μπορούν να ταξινομηθούν σε δύο άλλες (ανεξάρτητα από τις προηγούμενες) κατηγορίες⁽¹³⁾:

- i) Στις κύριες ή φαινοτυπικές (driver mutations), εντοπίζονται στα γονίδια JAK2, MPL και CALR και στις
- ii) Δευτερεύουσες ή συνοδές μεταλλάξεις² (passenger mutations)

Τα δεδομένα που υπάρχουν μέχρι σήμερα, για το είδος των μεταλλάξεων και κυρίως για τις μεταβολές που αυτές επιφέρουν, είναι περιορισμένα. Η μελέτη τους αποτελεί επίκεντρο ερευνητικού ενδιαφέροντος και βρίσκει ήδη εφαρμογή στην κλινική πράξη ως προγνωστική παράμετρος.

Εδώ και πολλά χρόνια η παθογένεια των διαφόρων μορφών πολυκυτταραιμίας αποτελεί αντικείμενο έντονης και ενδιαφέρουσας διερεύνησης. Έδωσε πολλές πληροφορίες για τη φυσιολογική ερυθροποίηση και τις διαταραχές της. Η ερυθροποίηση είναι το αθροιστικό αποτέλεσμα περίπλοκα ρυθμισμένων οδών σηματοδότησης μέσα από κυτοκίνες και τους υποδοχείς τους.

Ιστορικά οι πρώτες ενδείξεις ότι το αίτιο βρίσκεται στα ερυθροειδικά κύτταρα έγιναν με μελέτη ότι οι ερυθροειδικές καλλιέργειες από ασθενείς με ΑΠ μπορούσαν να αναπτυχθούν χωρίς

¹ Παρατηρείται η γεινίαση και αλληλεπίδραση ισχυρών υποκινητών, με γονίδια που προάγουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, όπως στην περίπτωση της ΧΜΛ

² Διαμορφώνουν και τροποποιούν το φαινότυπο των ΜΥΝ και ενδεχόμενα οδηγούν σε εξέλιξη της νόσου και σε εκτροπή σε Οξεία Μυελογενή Λευχαιμία.

την προσθήκη ερυθροποιητίνης (EPO) και ο μηχανισμός του υποδοχέα της ερυθροποιητίνης (Epo Receptor, Epo-R) λειτουργούσε κανονικά στα κύτταρα αυτά και πάλι σε απουσία ερυθροποιητίνης.⁽¹⁴⁾

Οι παρατηρήσεις αυτές συνδυάστηκαν με την ανακάλυψη ότι ένα μεγάλο ποσοστό ασθενών με ΑΠ εμφάνιζαν Loss of heterozygosity, (LOH), «απώλεια ετεροζυγωτίας» στο μικρό σκέλος του χρωμοσώματος 9 και ότι η ανωμαλία αυτή οφειλόταν σε μιτωτικό ανασυνδυασμό και όχι σε επίκτητη απώλεια.⁽¹⁵⁾ Επίσης και άλλες ομάδες ερευνητών επισήμαναν σε ασθενείς με ΑΠ υψηλή συχνότητα γενετικών ανωμαλιών και συγκεκριμένα προσθήκη υλικού στο χρωμόσωμα 9. Το 2005 οι Kralovics, James, Baxter, Levine και άλλοι ερευνητές και οι ομάδες τους με διάφορες μελέτες⁽¹⁶⁾⁽¹⁷⁾⁽³⁾⁽¹⁸⁾ απεκάλυψαν την παρουσία ενός μεταλλαγμένου τύπου του JAK2, την νουκλεοτιδική αλληλουχία του γονιδίου καθώς και το μηχανισμό φωσφορυλίωσης των μορίων του.

Όπως θα δούμε συνοπτικά παρακάτω η μεταλλαγμένη πρωτεΐνη JAK2 μπορεί να επιφέρει την φωσφορυλίωση του Epo-R χωρίς αυτός να συνδεθεί με την EPO στο εξωμεμβρανικό άκρο του κυριεύοντας την ερυθροποίηση οδηγώντας στην ανάπτυξη της αληθούς πολυκυτταραιμίας.

Στην παρούσα εργασία θα γίνει αναφορά μόνο για την τη μετάλλαξη V617F και για τις γενετικές ανωμαλίες που προκαλούν μόνο μυελοϋπερπλαστικές νεοπλασίες.

1.2 Ερυθροποίηση – JAK2

Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, διάφορες μελέτες έχουν αποκαλύψει ότι η σηματοδότηση των υποδοχέων γίνεται από μια οικογένεια κινασών τυροσίνης που ονομάζεται Janus kinases (JAKs) και τους παράγοντες μεταγραφής τους, που ονομάζονται Signal Transducer and Activators of Transcription - μετατροπείς σήματος και ενεργοποιητές της μεταγραφής (STATs)⁽¹⁹⁾.

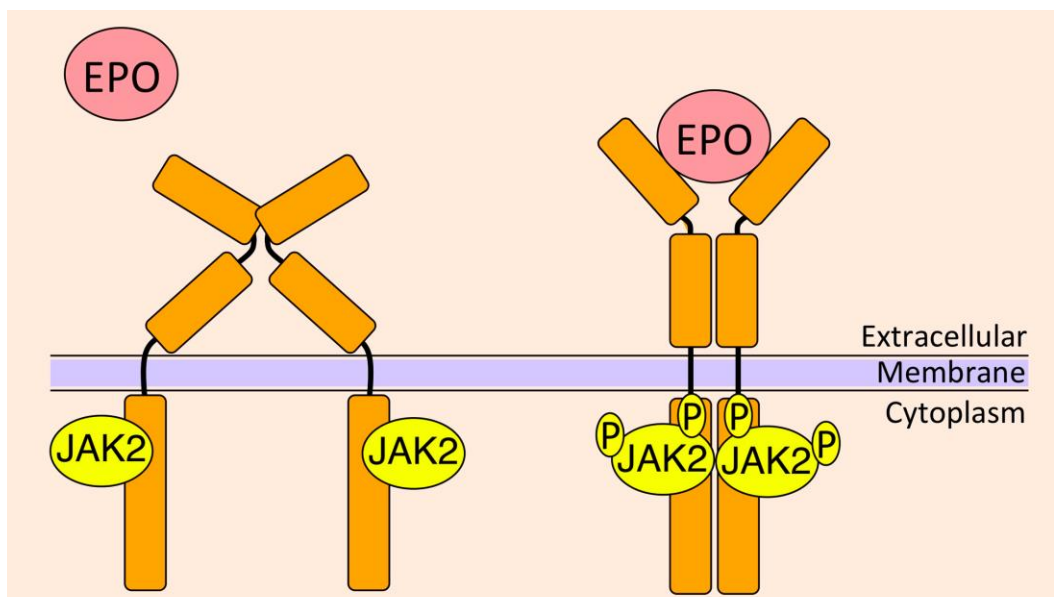
Οι εκτροπές σε αυτές τις οδούς, όπως αυτές που προκαλούνται από την προσδιορισμένη μετάλλαξη JAK2V617F καθώς και από άλλες μεταποπίσεις του γονιδίου JAK2, είναι υποκείμενες αιτίες λευχαιμιών και άλλων μυελοπροπλασσιαστικών διαταραχών.

Ο οργανισμός έχει την ικανότητα να ρυθμίζει τον ρυθμό ερυθροποίησης ανάλογα με τις ανάγκες του. Η ερυθροποίηση αρχίζει από τα πολυδύναμα στελεχιαία κύτταρα του μυελού. Η εξέλιξη των προγονικών και στη συνέχεια των πολυδύναμων κυττάρων επικουρείται από τους κατάλληλους ειδικούς μεταγραφικούς παράγοντες, το μυελό που συγκρατεί και διατρέφει τα εξελισσόμενα ερυθροειδικά κύτταρα, τον αυξητικό παράγοντα ινσουλίνης (Insulin Growth Factor), τα στεροειδή και τα ανδρογόνα, και πολλές κυτταροκίνες. Από τις τελευταίες, τελείως απαραίτητος είναι ο παράγων Stem Cell Factor (SCF) που έχει ως υποδοχέα την πρωτεΐνη c-Kit. Η αλληλεπίδραση των παραπάνω παραγόντων προάγει τον πολλαπλασιασμό και διαφοροποίηση των δεσμευμένων προς την ερυθροειδική σειρά κυττάρων μέχρι το στάδιο του προερυθροβλάστη. Από το σημείο

αυτό την προαγωγή και ρύθμιση της ερυθροποίησης αναλαμβάνει μια άλλη ειδική για τον σκοπό αυτό ορμόνη, η Epo.

Η κύρια λειτουργία της Epo είναι να προασπίζει τους προερυθροβλάστες (CFU-E) από την απόπτωση.⁽²⁰⁾ Παράλληλα, προάγει τον πολλαπλασιασμό και διαφοροποίηση των κυττάρων της ερυθράς σειράς και ευνοεί την σύνθεση αιμοσφαιρίνης σε αυτά. Η παρέμβαση της Epo στις παραπάνω λειτουργίες επιτελείται μέσω της σύνδεσής της με τον αντίστοιχο υποδοχέα που βρίσκεται στην επιφάνεια των ερυθροειδικών κυττάρων (Epo-R)⁽²¹⁾

Ο Epo-R είναι διαμεμβρανική πρωτεΐνη, αποτελείται από 225 αμινοξέα και βρίσκεται στη μεμβράνη των προερυθροβλαστών και πολυχρωματόφιλων ερυθροβλαστών. Το γονίδιο του βρίσκεται στο χρωμόσωμα 19p και αποτελείται από τρεις περιοχές: (βλ. **Σφάλμα! Το αρχείο προέλευσης της αναφοράς δεν βρέθηκε.** Εικόνα 1) την εξωτερική, τη διαμεμβρανική, και την εσωτερική, το άκρο της οποίας βρίσκεται μέσα στο κυτταρόπλασμα, χωρίς να έχει καμία δραστηριότητα. Στο άκρο αυτό βρίσκεται προσκολλημένη μία κυτταροπλασματική πρωτεΐνη, ο παράγοντας JAK2 και αυτός χωρίς καμία δραστηριότητα.

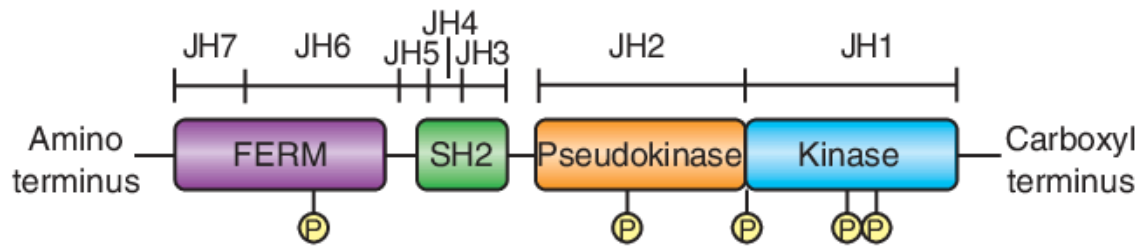


Εικόνα 1: Σχηματική απεικόνιση ενεργοποίησης EPO/EpoR. Ο ομοδιμερικός EpoR συνδέεται με την Janus Kinase 2 (JAK2) στην κυτταροπλασματική περιοχή και είναι έτοιμη για τη διέγερση της EPO.⁽²²⁾

Η πρωτεΐνη JAK2, παίρνει το όνομά της από τον διπρόσωπο θεό των Ρωμαίων Ιανό (Janus) αφού άλλοτε απαντά ενεργοποιημένη και άλλοτε αδρανής, είναι προϊόν του αντίστοιχου γονιδίου και βρίσκεται σε αφθονία στο κυτταρόπλασμα.

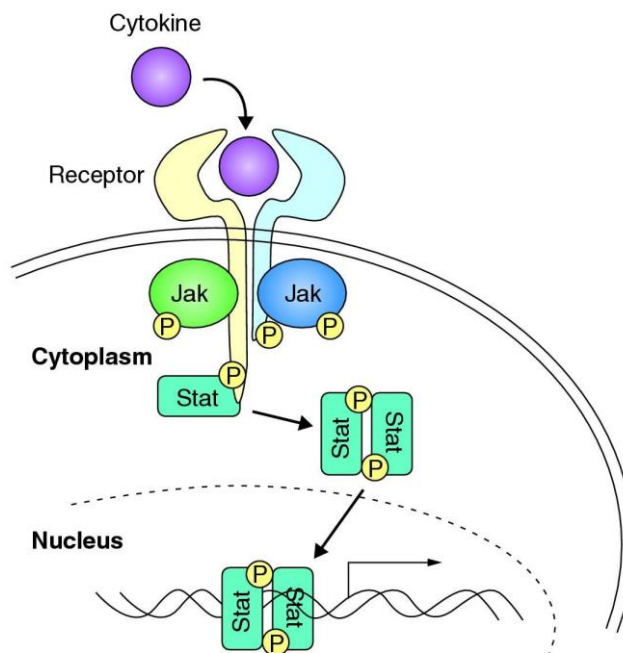
Το γονίδιο JAK2 εδράζεται στο χρωμόσωμα 9p24.1 και περιλαμβάνει 25 εξόνια και η πρωτεΐνη JAK2 αποτελείται από 1132 αμινοξέα. Ανήκει στις κινάσες της τυροσίνης, δηλαδή λειτουργεί με ενεργοποίηση των μορίων τυροσίνης που διαθέτει και αποτελείται από 7 ομόλογες περιοχές (βλ. Εικόνα 2). Από αυτές ιδιαίτερο ενδιαφέρον έχουν η C- τελική περιοχή (JH1) που ενεργοποιείται

στην προκείμενη περίπτωση και η αμέσως προσκείμενη περιοχή ψευδοκινάσης (JH2), που θεωρείται ότι “αναστέλλει”, με άλλα λόγια “ρυθμίζει” την δραστικότητα της κινάσης.



Εικόνα 2: Σχηματική απεικόνιση της κατασκευής των Janus κινασών. Αποτελούνται από περιοχές FERM, SH2, ψευδοκινάσης και κινάσης. Η περιοχή FERM μεσολαβεί στη σύνδεση των υποδοχέων κυτοκινών. Οι περιοχές FERM και ψευδοκινάσης ρυθμίζουν την καταλυτική δραστηριότητα και φαίνεται να αλληλεπιδρούν με την περιοχή της κινάσης. Σε πολλές περιοχές γίνεται αυτοφωσφορυλίωση (P), συμπεριλαμβανομένων δύο στον βρόγχο ενεργοποίησης της κινάσης.⁽²³⁾

Η οικογένεια των Janus κινασών περιλαμβάνει τις JAK1, JAK2 και TYK2 κινάσες που εκφράζονται σε όλα τα κύτταρα των θηλαστικών και την JAK3 η έκφραση της οποίας περιορίζεται στα αιμοποιητικά κύτταρα. Η ενεργοποίηση υποδοχέων κυτταροκινών (αυξητικής ορμόνης, ερυθροποιητίνης, προλακτίνης, λεπτίνης, GM-CSF, θρομβοποιητίνης, πολλών ιντερλευκινών) οδηγεί στην ενεργοποίηση της οδού JAK-STAT για τη μετάδοση-μεταφορά του ενδοκυττάριου σήματος. (βλ. Εικόνα 3)

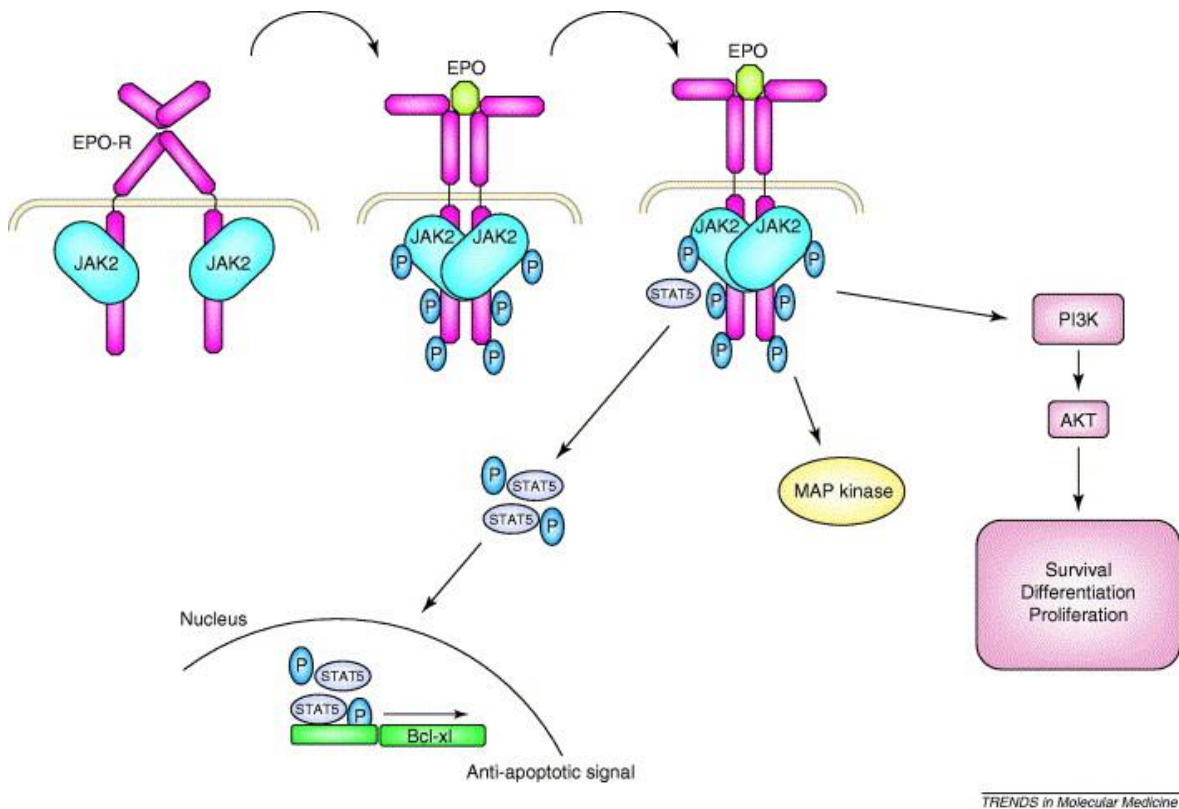


Εικόνα 3: Σχηματική απεικόνιση της μετάδοσης-μεταφοράς του ενδοκυττάριου σήματος από τις κυτταροκίνες μέσω της οδού JAK-STAT. Οι κυτοκίνες συνδέονται με ομοδιμερείς ή ετεροδιμερείς υποδοχείς, οι οποίοι είναι ουσιαστικά συνδεδεμένοι με Jaks. Τα Jaks ενεργοποιούνται από μια διαμορφωτική αλλαγή στον υποδοχέα που επιτρέπει τη δια- ή/και αυτό-φωσφορυλίωση των δύο δεσμευμένων Jaks. Αυτά με τη σειρά τους φωσφορολιώνουν τους υποδοχείς των κυτταροκινών. Οι πρωτεΐνες Stat δεσμεύουν τις φωσφορυλιωμένες αλυσίδες των υποδοχέων επιτρέποντας στα Jaks να τις φωσφορυλιώσουν και να σχηματίσουν διμερή που μετατοπίζονται και συσσωρεύονται στον πυρήνα, όπου ρυθμίζουν και την έκφραση του γονιδίου. ⁽²³⁾

Η οδός JAK-STAT είναι σημαντική σε σημαντικές κυτταρικές λειτουργίες όπως κυτταρικός πολλαπλασιασμός, επιβίωση και φυσιολογική λειτουργία αιμοποιητικών, καρδιακών και άλλων κυττάρων.⁽²⁴⁾⁽²⁵⁾

Η πρώτη και σημαντικότερη λειτουργία είναι η σύνδεση της Epo στον υποδοχέα της που επιφέρει φωσφορυλίωση 8 μορίων τυροσίνης που βρίσκονται στην ουρά του Epo-R δημιουργώντας συνθήκες και θέσεις προσκόλλησης και περαιτέρω φωσφορυλίωσης του παράγοντα STAT5. Μέσω αυτών γίνεται η ενεργοποίηση τριών κύριων οδών μεταγωγής του σήματος προς το πυρήνα⁽²⁶⁾⁽¹⁷⁾(βλ. Εικόνα 4)

- i) την οδό των παραγόντων STAT5 και Bcl-xl,
- ii) την οδό Ras-Mitogen Activated Protein (MAP) Kinase, και
- iii) της φωσφατιδυλο-ινοσιτόλης-3 (PI3K)/AKT



Εικόνα 4: Σχηματική απεικόνιση της οδού JAK-STAT (κύριες οδοί μεταγωγής του σήματος προς τον πυρήνα). Πριν τη δέσμευση της EPO, η EPO-R είναι στην επιφάνεια του κυττάρου ως προσχηματισμένο ομοδιμερές. Το JAK2 συνδέεται από την κυτταροπλασματική περιοχή, σε ανενεργή κατάσταση. Μετά της δέσμευση της EPO, η διαμόρφωσή του αλλάζει σε φωσφορυλιωμένο. Έτσι το ενεργοποιημένο JAK2 επιφέρει φωσφορυλίωση στα μόρια τυροσίνης της ουράς του EPO-R που γίνονται θέσεις προσκόλλησης για τις πολυάριθμες πρωτεΐνες. Έτσι ενεργοποιούνται οι οδοί της κινάσης STAT5, Mitogen -Activated Protein (MAP) και φωσφατιδυλο-ινοσιτόλης 3 – κινάσης – AKT, ξεκινώντας σήματα επιβίωσης, πολλαπλασιασμού και διαφοροποίησης των προγονικών ερυθροβλαστών.⁽¹⁷⁾

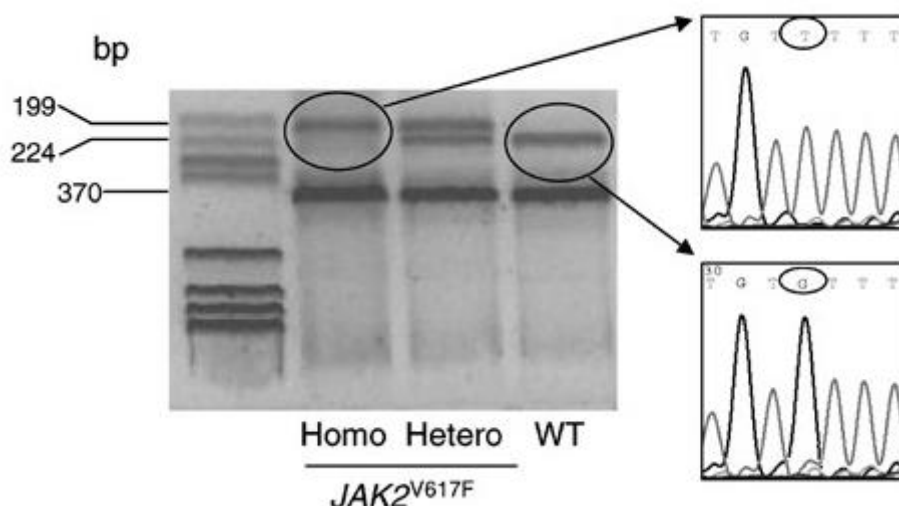
Οι σχετικές αλληλεπιδράσεις έχουν ακόμη πολλά κενά και δεν μπορούν να αναλυθούν περισσότερο εδώ.

1.3 Μεταλλάξεις JAK2

Το 2005 εμφανίστηκαν οι πρώτες αναφορές για τη συσχέτιση της σημειακής μετάλλαξης, JAK2V617F με τα μυελοϋπερπλαστικά νεοπλάσματα.

Η JAK2V617F προέρχεται από την αντικατάσταση Γουανίνης από Θυμίνη (Εικόνα 5), στη θέση 1849, στο εξόνιο 14 του γονιδίου και η οποία έχει σαν αποτέλεσμα την αντικατάσταση της Βαλίνης από Φαινυλαλανίνη στο κωδικόνιο 617 της ώριμης πρωτεΐνης.

Η μετάλλαξη επηρεάζει τη μη-καταλυτική περιοχή ψευδοκινάσης (JH2) της πρωτεΐνης, εκτρέπει τον ρυθμιστικό ρόλο που έχει στη δραστηριότητα της JAK2 κινάσης και οδηγεί σε συνεχή ενεργοποίηση της οδού STAT3/5, με συνέπεια να ενεργοποιούνται αδιάκοπα τα υποκείμενα μονοπάτια σηματοδότησης, οδηγώντας τελικά σε ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό των αιμοποιητικών κυττάρων.



Εικόνα 5: Ηλεκτροφόρηση γέλης κανονικό άτομο (wild type, WT) και σε αντιπροσωπευτικούς ασθενείς με ετερόζυγη (Hetero) ή ομόζυγη (Homo) JAK2V617F μετάλλαξη. Η σωστή ακολουθία, που αντιστοιχεί στο WT και το μεταλλαγμένο JAK2, αντίστοιχα, εμφανίζεται στα ένθετα στα δεξιά.⁽²⁷⁾

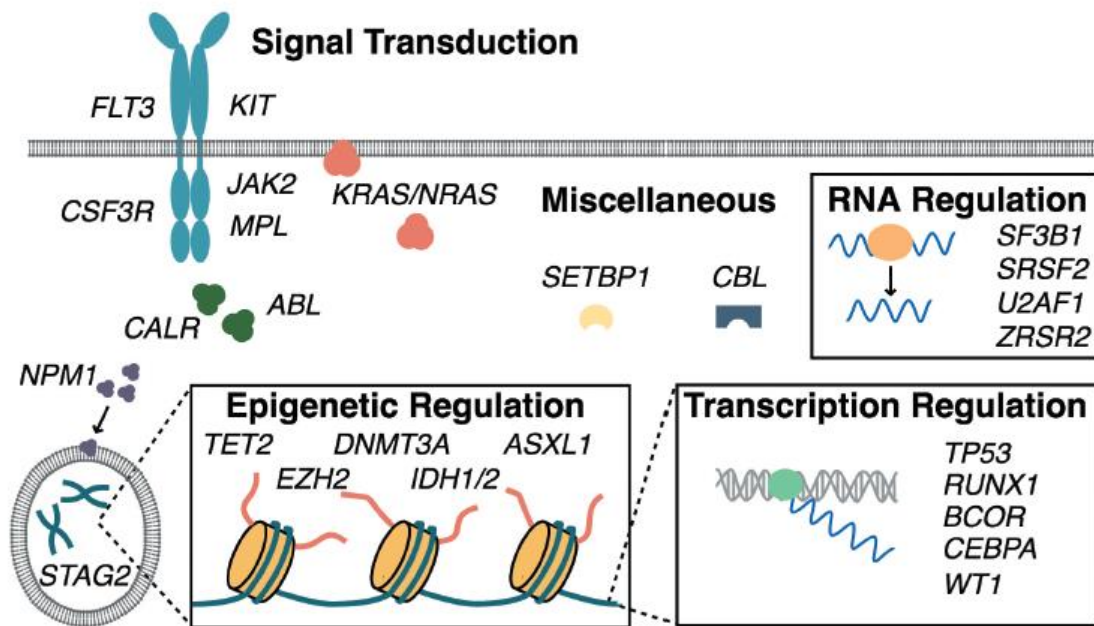
Στις περισσότερες περιπτώσεις ασθενών με ΑΠ και στην ΠΜΙ (στην ΙΘ το ποσοστό είναι μικρό), η μετάλλαξη βρίσκεται σε ομόζυγη κατάσταση μέσω μιτωτικής αναδιάταξης.⁽²⁸⁾ Το υψηλότερο φορτίο μεταλλαγμένου αλληλίου JAK2³ βρίσκεται κατά φθίνουσα σειρά σε ασθενείς με ΑΠ, με ΠΜΙ και τέλος στους ασθενείς με ΙΘ.⁽²⁹⁾ Η διαφορά στο φορτίο του μεταλλαγμένου γονιδίου δεν

³ Η αναλογία δηλαδή μεταλλαγμένου προς αμετάλλακτο γονίδιο JAK2

αποτελεί από μόνη της κριτήριο διάκρισης μεταξύ των νεοπλασιών ούτε εξηγεί τη διαφορετικότητα στους φαινοτύπους της μετάλλαξης. Τέλος όπως έχουν δείξει αρκετές μελέτες και μόνο η απλή παρουσία της μετάλλαξης JAK2V617F ή το αυξημένο φορτίο μεταλλαγμένου αλληλίου δεν επηρεάζει την επιβίωση των ασθενών ή τη λευχαιμική μετατροπή τους.⁽³⁰⁾⁽³¹⁾ Αντίθετα υπάρχει συσχέτιση μειωμένης επιβίωσης και χαμηλού φορτίου μεταλλαγμένου αλληλίου στην ΠΜΙ.⁽³²⁾ Να σημειωθεί ότι το φορτίο του JAK2V617F αλληλίου αυξάνεται στο πέρασμα το χρόνου στην ΑΠ και στην ΠΜΙ όχι όμως στην ΙΘ.

1.4 Άλλες μεταλλάξεις γονιδίων και μυελοϋπερπλαστικές νεοπλασίες

Αν και δεν αποτελεί αντικείμενο της παρούσας εργασίας θα πρέπει να γίνει μια σύντομη αναφορά και σε άλλες βασικές μεταλλάξεις που σχετίζονται με τις μυελοϋπερπλαστικές νεοπλασίες. Τα γονίδια στα οποία παρατηρούνται συνοδές μεταλλάξεις είναι πολλά και σχηματικά απεικονίζονται στην εικόνα που ακολουθεί (Εικόνα 6)⁽³³⁾



Εικόνα 6: Γονίδια που επαναλαμβανόμενα μεταλλάσσονται στις κακοήθειες του μυελού και επηρεάζουν κυτταρικές λειτουργίες, *signal transduction* (μεταγωγή), *RNA regulation* (ωρίμανση του RNA), *epigenetic regulation* (επιγενετικός μηχανισμός), *transcription regulation* (ρύθμιση της μεταγραφής)⁽³³⁾

Η JAK2V617F είναι η πιο συχνή μετάλλαξη στις Μυελοϋπερπλαστικές Νεοπλασίες (ΜΥΝ), δεν είναι όμως η μόνη (Εικόνα 7). Οι μεταλλάξεις του εξονίου 12 του JAK2 γονιδίου είναι σχετικά ειδικές ιδιαίτερα στην ΑΠ και περιεγράφηκε αργότερα το 2007⁽³⁴⁾.

	Mutation*	Exon	Frequency	Nucleotide position [†]
→	V617F	14	~96% PV, ~55% ET, ~65% PMF	c.1849G>T
	V617F,C618R	14	<1% PV	c.1849G>T, c.1851C>T, c.1852T>C
	V617F,C618F	14	<1% ET	c.1849G>T, c.1853G>T
	V617F,D620E	14	<1% PV	c.1849G>T, c.1860C>A
	L611V,V617F	14	<1% PV	c.1831T>G, c.1849G>T
	C616C,V617F	14	<1% ET	c.1848T>C, c.1849G>T
	D620E	14	<1% MPN	c.1860C>A
	V536_I546dup	12	<1% V617F-negative PV	c.1606_1638dup33
	V536_F547dup	12	<1% V617F-negative PV	NA
	F537I,K539I	12	<1% V617F-negative PV	c.1609T>A, c.1616A>T
(α)	F537_K539delinsL	12	~10% V617F-negative PV	c.1609_1616delins
	F537_I546dup10,F547L	12	<1% V617F-negative PV	c.1608_1640dup33
	F537_547dup	12	<1% V617F-negative PV	c.1609_1641dup33
	H538Q,K539L	12	<1% V617F-negative PV	c.1614C>A, c.1615A>T, c.1616A>T
(β)	H538D,K539L,I540S	12	<1% V617F-negative PV	NA
	H538_K539del	12	<1% V617F-negative PV	NA
	H538_K539delinsF	12	<1% V617F-negative PV	c.1612_1617delins
	H538_K539delinsI	12	<1% V617F-negative PV	c.1612_1616delins
(γ)	H538_K539delinsL	12	~5% V617F-negative PV	c.1612_1617delins
	K539L	12	~10% V617F-negative PV	c.1615A>T or A>C, c.1616A>T
	K539L,L545V	12	<1% V617F-negative PV	c.1615A>T, c.1633T>G
	I540T	12	<1% V617F-negative PV	c.1619T>C
	I540_N542delinsS	12	<1% V617F-negative PV	NA
	I540_E543delinsMK	12	~5% V617F-negative PV	c.1620_1627delins
	I540_E543delinsKK	12	<1% V617F-negative PV	c.1619_1627delins
	R541_E543delinsK	12	~10% V617F-negative PV	c.1622_1627delins
	R541K,A542_G543del	12	<1% V617F-negative PV	c.1622G>A, c.1624_1629del
(δ)	R541_E543delinsK	12	<1% V617F-negative PV	c.1622_1627delins
	N542_E543del	12	~40% V617F-negative PV	c.1624_1629del
	E543_D544del	12	~10% V617F-negative PV	c.1627_1632del
	D544G	12	<1% V617F-negative PV	c.1631A>G
	D544_L545del	12	<1% V617F-negative PV	c.1630_1635del
	F547_K549delinsL	12	<1% V617F-negative PV	NA
	547insL,I540_F547dup8	12	<1% V617F-negative PV	c.1642_1644ins, c.1645_1668dup

*Mutation descriptors are not translated into the standard HGVS nomenclature, to avoid misinterpretation.

Εικόνα 7: Μεταλλάξεις JAK2 σε μυελοϋπερπλαστικές νεοπλασίες⁽³⁵⁾. Πιο συχνές: α) η αντικατάσταση των αμινοξέων 537, 538 και 539 με ένα μόνο μόριο λευκίνης (F537-K539delinsL), β) οι αντικαταστάσεις της ιστιδίνης 538 από γλουταμίνη και της λυσίνης 539 από λυσίνη (H538QHJ539L), γ) η υποκατάσταση της λυσίνης 539 με λευκίνη (K539L) και κυρίως δ) η απαλοιφή των αμινοξέων 542 (ασπαραγίνη) και 543 (γλουταμινικό οξύ) (N542-E543del

Οι μεταλλάξεις στο εξόνιο 12 περιλαμβάνουν απαλείψεις, διπλασιασμούς και σημειακές μεταλλάξεις που δε διασπούν το πλαίσιο ανάγνωσης και κυρίως αφορούν σε μια περιοχή 7 αμινοξέων (F537–E543).

Είναι αξιοσημείωτο, ότι όλες οι μεταλλάξεις εντοπίζονται στο εξόνιο 12 και μάλιστα στην συντηρητική περιοχή μεταξύ των αμινοξέων K (λυσίνη) 537 και E (γλουταμινικό οξύ) 543.

Πρόκειται συνήθως για:

- α) την αντικατάσταση των αμινοξέων 537, 538 και 539 με ένα μόνο μόριο λευκίνης (F537-K539delinsL)⁽³⁴⁾,
- β) τις αντικαταστάσεις της ιστιδίνης 538 από γλουταμίνη και της λυσίνης 539 από λυσίνη (H538QHJ539L)⁽³⁶⁾⁽³⁷⁾,
- γ) την υποκατάσταση της λυσίνης 539 με λευκίνη (K539L)⁽³⁴⁾⁽³⁷⁾ και κυρίως για
- δ) την απαλοιφή των αμινοξέων 542 (ασπαραγίνη) και 543 (γλουταμινικό οξύ) (N542-E543del)⁽³⁴⁾

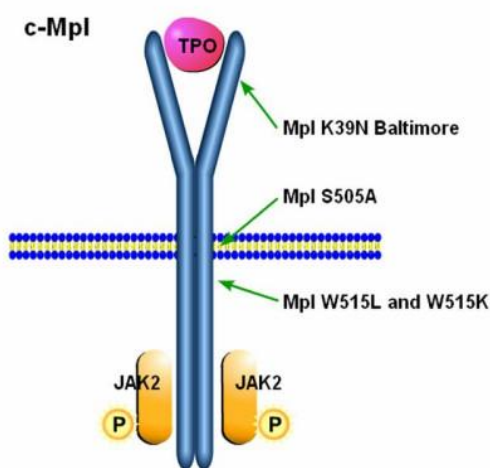
Η πιο συχνή ανάμεσα στις αρκετές, όπως φαίνεται και στον πίνακα (βλ. Εικόνα 7), μεταλλάξεις του εξονίου 12 είναι η μετάλλαξη N542-E543del.

Καμία από τις παραπάνω περιπτώσεις δεν έφερε την μετάλλαξη σε ομόζυγη μορφή και ότι αυτό επιβεβαιώθηκε στις αντίστοιχες καλλιέργειες. Επίσης ενδιαφέρον είναι οι περισσότεροι ασθενείς με μεταλλάξεις του εξονίου 12 έχουν φαινότυπο «ιδιοπαθούς ερυθροκυττάρωσης» (υψηλός αιματοκρίτης αλλά σχεδόν φυσιολογικά λευκά και αιμοπετάλια)⁽³⁸⁾.

Να σημειωθεί βέβαια ότι το ερώτημα στο αν η μετάλλαξη JAK2V617F αποτελεί την πρωταρχική βλάβη που οδηγεί στην ανεξέλεγκτη, αναίτια και άσκοπη ερυθροειδική υπερπλασία δεν έχει απαντηθεί και αυτό έρχονται να το επιβεβαιώσουν διάφορα ευρήματα από μελέτες που έχουν γίνει κατά καιρούς όπως: α) Οι λευχαιμίες που αναπτύσσονται σε ασθενείς με θετική ΑΠ δεν είναι πάντοτε JAK2V617F θετικές⁽³⁹⁾, β) οικογενείς περιπτώσεις μυελοϋπερπλαστικών νεοπλασιών⁽⁴⁰⁾, γ) διάφοροι πολυμορφισμοί του γονιδίου που ενδεχόμενα προδιαθέτουν στην εμφάνιση της μετάλλαξης και την εμφάνιση μυελοϋπερπλαστικών νεοπλασιών⁽⁴¹⁾ κ.ά.

1.4.1 Το γονίδιο MPL - μεταλλάξεις

Το γονίδιο MPL (myeloproliferative leukemia virus oncogene homolog), εδράζεται στο χρωμόσωμα 1p34.2, περιλαμβάνει 12 εξόνια και κωδικοποιεί τον υποδοχέα θρομβοποιητίνης (635–680 αμινοξέα)⁽⁴²⁾. Μεταλλάξεις σε γενετικό παρουσιάζουν φαινότυπο μυελοϋπερπλαστικού νοσήματος. Η πρόσδεση θρομβοποιητίνης (TPO) στον υποδοχέα της, επιφέρει το διμερισμό της και ακολουθεί η ενεργοποίηση του JAK2 (βλ. Εικόνα 8), μέσω διαδοχικών φωσφορυλίσεων να δραστηριοποιούνται τα σημαντικά σηματοδοτικά μονοπάτια, όπως περιεγράφηκαν συνοπτικά παραπάνω⁽⁴³⁾.



Εικόνα 8: Πολυμορφισμός και μεταλλάξεις του υποδοχέα θρομβοποιητίνης c-Mpl. Δύο πολυμορφισμοί c-Mpl K39N και S505A, οδηγούν σε συστατική δράση της c-Mpl και σε θρομβοκυττάρωση. Σωματικές μεταλλάξεις στην διαμεμβρανική περιοχή του c-Mpl οδηγούν επίσης σε συστατική δράση και έχουν βρεθεί σε ασθενείς με ΙΘ και ΠΜΙ⁽⁴⁴⁾.

Η αντικατάσταση του αμινοξέος τρυπτοφάνη (W), από ένα μόριο λευκίνης (L) ή λυσίνης (K), στη θέση 515 (W515L/K) της διαμεμβρανικής περιοχής του υποδοχέα TPOR, οδηγεί σε απρόσκοπτη ενεργοποίηση των σηματοδοτικών μονοπατιών JAK/STAT, PI3K/AKT/mTOR, RAS/MAPK, δίχως να είναι απαραίτητη η πρόσδεση TPO στον υποδοχέα, με συνέπεια την ανεξέλεγκτη, μη φυσιολογική, αύξηση των μεγακαρυοκυττάρων. Κάποιοι ασθενείς με ΙΘ ή ΠΜΙ έχουν πάνω από μια μεταλλάξεις στο γονίδιο MPL ενώ άλλοι έχουν μικρό φορτίο JAK2V617F θετικού κλώνου και ταυτόχρονα μεγαλύτερο φορτίο μεταλλαγμένου MPL κλώνου⁽⁴⁵⁾. Στην ΙΘ με μεταλλαγμένο MPL σχετίζεται με μεγαλύτερη ηλικία, μικρότερη τιμή αιμοσφαιρίνης, υψηλότερο αριθμό αιμοπεταλίων και υψηλότερο κίνδυνο αρτηριακών θρομβώσεων⁽⁸⁾. Επίσης ΠΜΙ με μεταλλαγμένο MPL σχετίζεται με γυναικείο φύλο, μεγαλύτερη ηλικία και μικρότερη τιμή αιμοσφαιρίνης⁽⁴⁶⁾. Επομένως ο φαινότυπος των ασθενών με μετάλλαξη MPL είναι διαφορετικός από αυτόν με μεταλλάξεις JAK2.

1.4.2 Το γονίδιο CALR – μεταλλάξεις

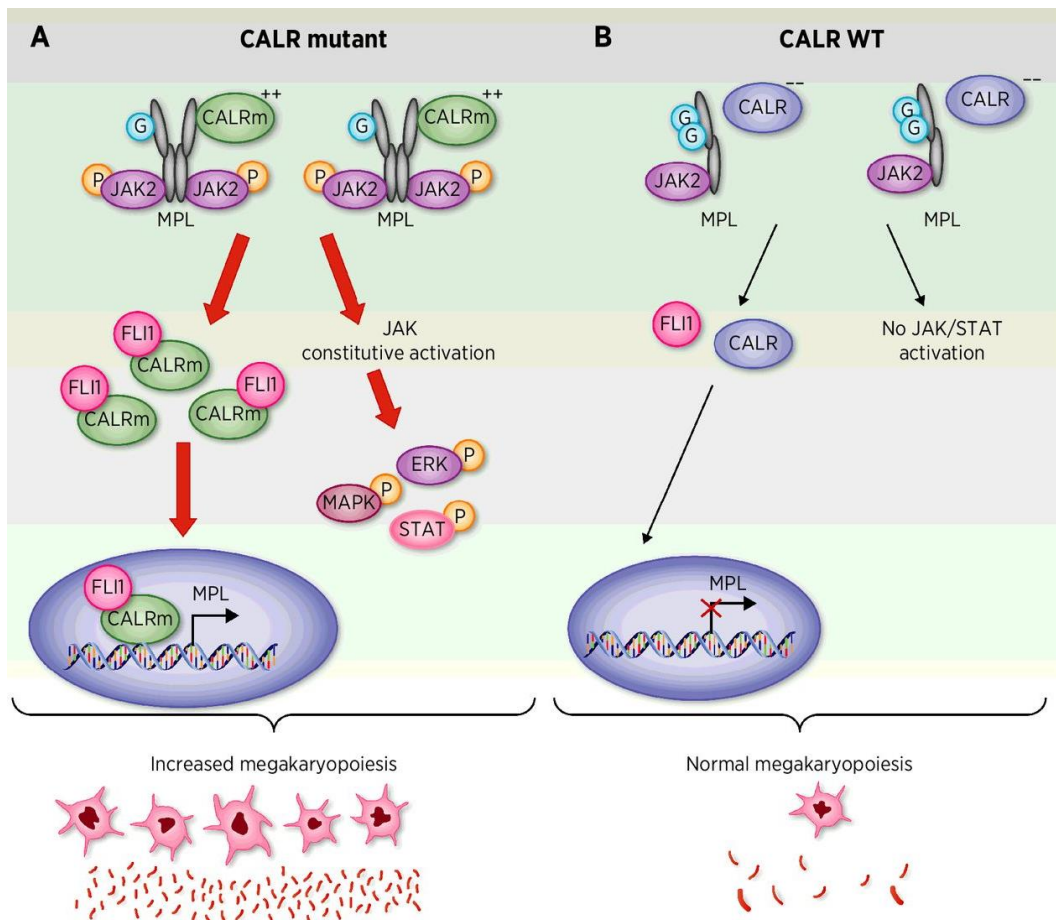
Το γονίδιο καλρετικουλίνη (Calreticulin, CALR) εντοπίζεται στη χρωμοσωμική περιοχή 19p13.13 και απαρτίζεται από 9 εξόνια. Κωδικοποιεί την ομώνυμη πρωτεΐνη και φυσιολογικά δρα ως μοριακός συνοδός (chaperon).⁴ Από δύο ανεξάρτητες ομάδες το 2013 δημοσιεύθηκε η παρουσία συχνών μεταλλάξεων στο εξόνιο 9 κυρίως σε ασθενείς με MYN⁽⁴⁷⁾⁽⁴⁸⁾. Έχουν ανιχνευθεί πάνω από 50 διαφορετικές μεταλλάξεις έλλειψη ή προσθήκης βάσεων που οδηγούν σε μετατόπιση του ανοικτού πλαισίου ανάγνωσης (Open Reading Frame, ORF). Το 80% των περιπτώσεων είναι οι μετάλλαξεις τύπου 1 και 2 και έχουν ως αποτέλεσμα την απώλεια του μοτίβου πρόσδεσης στο ενδοπλασματικό δίκτυο, κάτι που φαίνεται να διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στο πολλαπλασιασμό των κυττάρων που φέρουν τέτοιες μεταλλάξεις⁽⁴⁹⁾.

Η θετικά φορτισμένη μεταλλαγμένη CALR αλληλοεπιδρά με τον υποδοχέα της θρομβοποιητίνης και τον συνοδεύει στην πλασματική μεμβράνη, όπου εκεί διμερίζεται απουσία προσδέτη (βλ.Εικόνα 9). Αυτό συντελεί σε διαρκή ενεργοποίηση, τόσο του ίδιου του υποδοχέα, όσο και των υποκείμενων σηματοδοτικών μονοπατιών και τα οποία οδηγούν σε μη φυσιολογικό πολλαπλασιασμό των κυττάρων⁽⁵⁰⁾⁽⁵¹⁾

Οι μεταλλάξεις αυτές ανιχνεύονται σχεδόν αποκλειστικά σε ασθενείς με ΙΘ (15-25%), ΠΜΙ (20-25%)⁽⁵²⁾. Αυτό αντιστοιχεί σε ποσοστό 70-85% των ασθενών με ΙΘ και ΠΜΙ, που ελέγχονται

⁴ Συμμετέχει στη σωστή αναδίπλωση πρωτεϊνών, στην ομοίωση της συγκέντρωσης του Ca²⁺, ενώ παράλληλα αλληλοεπιδρά με ορμονικούς υποδοχείς του πυρήνα⁽¹¹⁷⁾

αρνητικοί για μεταλλάξεις στα γονίδια JAK2 και MPL. Οι ίδιες μεταλλάξεις εντοπίζονται σε μικρό αριθμό ασθενών με ΜΔΣ (8%), αλλά χαρακτηριστικά όχι στην ΑΠ⁽⁴⁸⁾⁽⁴⁷⁾



© 2019 American Association for Cancer Research

Εικόνα 9: Ο ρόλος των μεταλλάξεων CALR στην ανάπτυξη MYN. Οι μεταλλάξεις του γονιδίου παράγουν μεταλλαγμένη πρωτεΐνη καλρετικουλίνης (A) με θετικά φορτισμένη C-τερματική περιοχή (++) , η οποία είναι σε θέση να προκαλέσει συστατική ενεργοποίηση της σηματοδότησης JAK/STAT μέσω φωσφορυλίωσης (P) μέσω δέσμευσης, τροποποιημένης γλυκοζυλίωσης (G) και επακόλουθης ενεργοποίησης του υποδοχέα θρομβοποιητίνης MPL. Επιπλέον, οι μεταλλάξεις CALR είναι σε θέση να αυξήσουν τη μεταγραφή MPL μέσω αυξημένης έκφρασης και εντοπισμού ενός γνωστού παράγοντα μεταγραφής MPL: FLI1 στον πυρήνα. Συνολικά, αυτές οι διαδικασίες αυξάνουν τη παραγωγή μεγακαρυοκυττάρων και προκαλούν ανάπτυξη MYN. Αντίθετα, η έκφραση άγριου τύπου CALR (WT) (B), που περιέχει αρνητικό τομέα C (--), σχετίζεται με σημαντικά χαμηλότερη ενεργοποίηση JAK/STAT, έκφραση FLI1 και παραγωγή μεγακαρυοκυττάρων.⁽⁵³⁾

Οι ασθενείς με ΙΘ και μεταλλάξεις στο γονίδιο CALR, εμφανίζουν ιδιαίτερα αυξημένα επίπεδα αιμοπεταλίων, ταυτόχρονα όμως παρουσιάζουν μειωμένο κίνδυνο εκδήλωσης θρομβώσεων και καλύτερη επιβίωση, πιθανότατα λόγω των χαμηλότερων τιμών αιματοκρίτη και λευκών αιμοσφαιρίων συγκριτικά με ασθενείς που ελέγχονται θετικοί για τη μετάλλαξη JAK2V617F⁽⁴⁷⁾

1.4.3 Μικρότερης συχνότητας μεταλλάξεις γονιδίων

1.4.3.1 Το γονίδιο TET2

Το γονίδιο TET2 (Ten-Eleven Translocation 2), εδράζει στο χρωμόσωμα 4q24 και ανήκει στην οικογένεια γονιδίων TET. Συμμετέχουν σε επιπρόσθετες ενζυμικές αντιδράσεις, με τελικό

στόχο την απομεθυλίωση του DNA⁽⁵⁴⁾⁽⁵⁵⁾. Οι μεταλλάξεις του είναι συχνές σε αταξινόμητα ΜΔΣ/ΜΥΝ σε ποσοστό 30%.⁽⁵⁶⁾⁽⁵⁷⁾ Πιο σπάνια τις βρίσκουμε σε ασθενείς με ΠΜΙ (14%) ή σε δευτεροπαθείς μυελοϊνώσεις που έχουν εξελιχθεί από ΑΠ (15%) ή από ΙΘ (21%)⁽⁵⁸⁾. Οι μεταλλάξεις στο γονίδιο TET2 με αυτές του επόμενου γονιδίου (DNMT3A) αποκλείονται αμοιβαία⁽⁵⁹⁾⁽⁶⁰⁾⁽⁶¹⁾.

1.4.3.2 Το γονίδιο DNMT3A

Το γονίδιο DNMT3A (DNA (cytosine-5)-methyltransferase 3A) εδράζει στο χρωμόσωμα 2p23.3 και ανήκει στην οικογένεια των γονιδίων DNMT. Οι DNA μεθυλτρανσφεράσες (DNMT) αποτελούν οικογένεια ενζύμων υπεύθυνων για τη συντήρηση της DNA μεθυλίωσης στα κύτταρα των θηλαστικών και χωρίς αυτές εκφράζονται γονίδια που υπό φυσιολογικές συνθήκες δεν θα γινόταν⁽⁶²⁾⁽⁵⁵⁾. Εδώ οι περισσότερες μεταλλάξεις είναι με λάθος νόημα (missense mutations), συντελούν σε απώλεια συγκεκριμένων λειτουργιών και παράλληλα οδηγούν σε απόκτηση νέων⁽⁶³⁾. Συνήθως τις βρίσκουμε σε λευχαιμίες ή μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα αλλά σπανιότερα και σε ασθενείς με ΠΜΙ, είτε αυτή είναι πρωτοπαθής (5%) είτε ως εξέλιξη της ΑΠ(8%)⁽⁵⁸⁾. Είναι μεταλλάξεις με δυσμενή πρόγνωση ιδιαίτερα αν συνυπάρχουν με μεταλλάξεις και σε άλλα γονίδια⁽⁶³⁾.

1.4.3.3 Τα γονίδια IDH1/2

Τα γονίδια IDH1 και IDH2 (Isocitrate Dehydrogenase, IDH) απαρτίζονται από 12 εξόνια (το κάθε ένα) και εδράζουν στις χρωμοσωμικές περιοχές 2q34 και 15q26.1, αντίστοιχα. Μετά από εναλλακτική ωρίμανση προκύπτουν διαφορετικοί συνδυασμοί εξονίων, οι οποίοι δίνουν και ισομορφές ώριμων προϊόντων mRNA. Οι μεταλλάξεις στα γονίδια αυτά ανιχνεύονται, εκτός από την ΟΜΛ και σε όλες τις κατηγορίες μυελικών νεοπλασιών όπως ΜΔΣ, ΜΥΝ σε διαφορετικές συχνότητες σε ετερόζυγη κατάσταση. Οι μεταλλάξεις τους είναι αμοιβαία αποκλειόμενες με τις μεταλλάξεις του γονιδίου TET2.⁽⁶⁴⁾⁽⁶⁵⁾

1.4.3.4 Το γονίδιο ASXL1

Το γονίδιο ASXL1 (Additional sex combs-like 1) ανήκει στην οικογένεια γονιδίων ASXL (ASXL1, ASXL2 ASXL3), στον άνθρωπο εδράζει στη χρωμοσωμική περιοχή 20q11.21 και απαρτίζεται από 18 εξόνια. Ο μηχανισμός δράσης των μεταλλαγμένων προϊόντων του γονιδίου ASXL1, οδηγεί σε νέες θεραπευτικές προσεγγίσεις, όπως οι αναστολείς BET (Bromodomain and Extra-Terminal motif inhibitors).⁽⁶⁶⁾⁽⁶⁷⁾ Τις μεταλλάξεις του γονιδίου ASXL1 τις βρίσκουμε σε υψηλά ποσοστά, τόσο σε ασθενείς με πρωτοπαθείς (28%) και δευτεροπαθείς μυελοϊνώσεις ως εξέλιξη από ΑΠ (31%) ή ΙΘ (14%), όσο και άλλες μυελικές νεοπλασίες σε ποσοστά που διαφέρουν σύμφωνα με διάφορες αναφορές.⁽⁶⁸⁾⁽⁶⁹⁾⁽⁵⁸⁾⁽⁵⁷⁾ Πρόσφατες μελέτες καταδεικνύουν πως οι μεταλλάξεις αυτού του γονιδίου σχετίζονται με πολύ κακή πρόγνωση και αναπτύσσονται προγνωστικά μοντέλα για τους ασθενείς που φέρουν αυτές τις μεταλλάξεις σε συνδυασμό και με την παρουσία ή όχι μεταλλάξεων του γονιδίου CALR.⁽⁷⁰⁾⁽⁷¹⁾⁽⁷²⁾⁽⁷³⁾

1.4.3.5 Το γονίδιο EZH2

Το γονίδιο EZH2 (Enhancer of zeste homolog 2) εντοπίζεται στη χρωμοσωμική περιοχή 7q36.1 και απαρτίζεται από 25 εξόνια. Όπως συμβαίνει και στα γονίδια IDH μετά από εναλλακτική ωρίμανση προκύπτουν διαφορετικοί συνδυασμοί εξονίων, οι οποίοι δίνουν και ισομορφές ώριμων προϊόντων mRNA. Τις μεταλλάξεις του τις βρίσκουμε τόσο σε ασθενείς με ΜΔΣ/ΜΥΝ (10-13%), όσο και σε ασθενείς με μυελοϊνώσεις (8%) και η έκβασή τους χαρακτηρίζεται ως δυσμενής, γιατί υπάρχει χαμηλή επιβίωση και μειωμένος χρόνος ανάπτυξης της νόσου.⁽⁵⁶⁾⁽⁵⁸⁾

1.4.3.6 Το γονίδιο SF3B1

Το γονίδιο SF3B1 (Splicing factor 3B subunit 1) εντοπίζεται στη χρωμοσωμική περιοχή 2q33.1 και απαρτίζεται από 27 εξόνια. Μετά από εναλλακτική ωρίμανση προκύπτουν διαφορετικοί συνδυασμοί εξονίων που αποδίδουν διάφορες ισομορφές ώριμων προϊόντων mRNA. Μεταλλάξεις στο γονίδιο SF3B1 έχουν αναφερθεί σε με ΠΜΙ (5%) ή δευτεροπαθή μυελοϊνώση από ΙΘ (8%)⁽⁷⁴⁾. Πιο συχνά τις μεταλλάξεις αυτού του γονιδίου τις βρίσκουμε σε ασθενείς με άλλα αιματολογικά νοσήματα. Η παράλληλη ανίχνευση της JAK2V617F με τις μεταλλάξεις αυτού του γονιδίου και συνήθως της μετάλλαξης K700E φθάνει το 64% των περιπτώσεων.⁽⁷⁵⁾⁽⁷⁶⁾

1.4.3.7 Το γονίδιο SRSF2

Το γονίδιο SRSF2 (Serine/arginine-rich splicing factor 2) εντοπίζεται στη χρωμοσωμική περιοχή 17q25.1 και απαρτίζεται από 4 εξόνια. Δύο λειτουργικά μετάγραφα του έχουν βρεθεί μέχρι τώρα καθώς και ένα που δεν κωδικοποιεί πρωτεϊνικό προϊόν (non-coding mRNA). Μεταλλάξεις στο γονίδιο SRSF2 έχουν αναφερθεί σε ασθενείς με ΠΜΙ (10-18%), βρίσκονται σχεδόν πάντα σε ετερόζυγη κατάσταση έχοντας κακή πρόγνωση.⁽⁷⁷⁾ Συνυπάρχουν συχνά με μεταλλάξεις άλλων γονιδίων (IDH1 και RUNX1).⁽⁶⁰⁾

1.4.3.8 Το γονίδιο U2AF1

Το γονίδιο U2AF1 (Small Nuclear RNA Auxiliary Factor 1) εντοπίζεται στη χρωμοσωμική περιοχή 21q22.3 και απαρτίζεται από 11 εξόνια. Διαφορετικοί συνδυασμοί εξονίων, μετά από εναλλακτική ωρίμανση, δίνουν διάφορες ισομορφές ώριμων προϊόντων mRNA. Οι μεταλλάξεις σε αυτό το γονίδιο U2AF1 εντοπίζονται κυρίως σε άλλα αιματολογικά νοσήματα και σπανιότερα σε ΜΥΝ, σχετίζονται όμως με δυσμενή πρόγνωση και πιθανότητα εκτροπής σε ΟΜΛ⁽⁷⁸⁾⁽⁷⁹⁾. Συνήθως οι μεταλλάξεις του εμφανίζονται σε ετεροζυγωτία και δεν έχουμε συνδυασμούς με άλλες μεταλλάξεις γονιδίων, πιθανόν γιατί αυτό οδηγεί σε κυτταρικό θάνατο⁽⁸⁰⁾.

1.4.3.9 Το γονίδιο ZRSR2

Το γονίδιο ZRSR2 (Zinc finger CCCH-type, RNA binding motif and serine/arginine rich 2) εντοπίζεται στο χρωμόσωμα X και συγκεκριμένα στη θέση p22.2 και απαρτίζεται από 14 εξόνια. Οι μεταλλάξεις του ανιχνεύονται σε όλη την έκταση της κωδικής περιοχής, χωρίς νόημα και οδηγούν σε απώλεια λειτουργίας (LOF mutations).⁽⁸¹⁾⁽⁸²⁾

Πίνακας 1: Συγκεντρωτικά στοιχεία μεταλλάξεων γονιδίων εμπλεκόμενων σε MYN. Αναφέρονται ποσοστά ανίχνευσης των συχνότερων μεταλλάξεων σε ασθενείς με κλασικά MYN, καθώς και η πρόγνωση τους.⁽⁴⁷⁾⁽⁴⁸⁾⁽⁸³⁾⁽⁸⁴⁾⁽⁸⁵⁾⁽⁵⁶⁾⁽⁸⁶⁾⁽⁸¹⁾⁽⁸⁷⁾

ΓΟΝΙΔΙΟ	ΕΞΟΝΙΑ	ΠΡΟΓΝΩΣΗ	Συχνότητα εμφάνισης (%)		
			ΑΠ	ΙΘ	ΠΜΙ
JAK2	14	Δυσμενής	95	50-60	50-60
JAK2	12	Δυσμενής	2-5	-	-
MPL	10	Δυσμενής	-	5-10	5-10
CALR	9	Δυσμενής		15-20	20-25
TET2	Όλα	Ευνοϊκή			15-20
DNMT3A	Όλα	Δυσμενής			5-8
IDH1/2	4	Δυσμενής/Ουδέτερη			5
ASXL1	12	Ιδιαίτερα Δυσμενής			15-36
EZH2	Όλα	Δυσμενής			8
SF3B1	14-16	Ευνοϊκή		3	5-8
SRSF2	1	Δυσμενής			10-18
U2AF1	2+6	Δυσμενής			5-16
ZRSR2	Όλα	Ασαφής			6-11

1.5 Μυελοϋπερπλαστικές Νεοπλασίες (MYN)

1.5.1 Ορισμός

Οι MYN είναι μια ομάδα αιματολογικών παθήσεων με κοινό χαρακτηριστικό κλωνικές διαταραχές του αρχέγονου αιμοποιητικού κυττάρου, χαρακτηρίζονται από άμετρο και άσκοπο πολλαπλασιασμό ενός ή περισσότερων προγονικών κυττάρων της μυελικής σειράς, τα οποία, ωστόσο, διατηρούν σχετικά φυσιολογική ωρίμανση. Ο ανεξέλεγκτος αυτός πολλαπλασιασμός, που αρχίζει από ένα μόνο αρχέγονο κύτταρο, οδηγεί σε αυξημένο αριθμό κοκκιοκυττάρων, ερυθροκυττάρων ή αιμοπεταλίων στο περιφερικό αίμα.

Επικράτησε ο όρος νεοπλασίες (παλιότερα αναφέρονταν ως μυελοϋπερπλαστικά σύνδρομα, ΜΥΣ) γιατί πρόκειται για κλωνικές διαταραχές.

1.5.2 Ταξινόμηση

Στην αρχική τους ταξινόμηση ως σύνδρομα εντάσσονταν η Αληθής Πολυκυτταραιμία (ΑΠ), η Ιδιοπαθής Θρομβοκυτταραιμία (ΙΘ), η Πρωτοπαθής Μυελοϊνώσης (ΠΜΙ) και η Χρόνια Μυελογενής Λευχαιμία (ΧΜΛ). Υπήρχε η πεποίθηση ότι είχαν κοινό αδιευκρίνιστο ερέθισμα που οδηγούσε στον ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό των κυττάρων του μυελού των οστών⁽⁸⁸⁾.

Το 2001 ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας (Π.Ο.Υ.) (World Health Organization, WHO) κατέταξε τα ΜΥΣ σε μία ευρύτερη κατηγορία νοσημάτων, γνωστή ως Χρόνιες Μυελοϋπερπλασικές Διαταραχές (ΧΜΥΔ) (Chronic Myeloproliferative Diseases, CMPDs). Προστέθηκαν και άλλες διαταραχές ενώ κοινό χαρακτηριστικό αυτής της ετερογενούς ομάδας νοσημάτων αποτελούσε η κλωνική υπερπλασία της μυελικής σειράς, η οποία στο περιφερικό αίμα ανιχνεύεται ως αύξηση των κοκκιοκυττάρων, των ερυθροκυττάρων ή/και των αιμοπεταλίων, χωρίς όμως να συνοδεύεται από δυσερυθροποίηση, δυσπλασία της κοκκιώδους σειράς ή μονοκυττάρωση.

Το 2008 ο Π.Ο.Υ προχώρησε σε αναθεώρηση της κατάταξης στηριζόμενος στην προηγούμενη κατάταξή του αλλά περιέλαβε και νεότερα κλινικά, γενετικά και μοριακά δεδομένα. Ενσωματώθηκαν ως διαγνωστικά κριτήρια ορισμένοι μοριακοί δείκτες (σημιακές μεταλλάξεις στα εξόνια 12 και 14 του γονιδίου JAK2 και στο εξόνιο 10 του γονιδίου MPL), περισσότερο ειδικοί των ΜΥΝ. Εντάσσεται και η ανίχνευση του χρωμοσώματος Φιλαδέλφεια (Ph1, μη-φυσιολογικό χρωμόσωμα 22), που χαρακτηριστικά οδηγεί στη διάγνωση της ΧΜΛ. Τέλος, ο όρος νεοπλασίες αντικαθιστά τον όρο «διαταραχές»⁽⁸⁹⁾.

Το 2016 συμπληρώθηκε με η ταξινόμηση του 2008 με πρόσφατα δεδομένα που προέκυψαν από τον προσδιορισμό της αλληλουχίας του DNA πολλών ασθενών με ΜΥΝ, με τεχνολογίες αλληλούχισης δεύτερης γενιάς (Next Generation Sequencing, NGS). Βασικά σημεία της αναθεώρησης είναι η εύρεση συχνών μεταλλάξεων στο εξόνιο 9 του γονιδίου CALR σε μεγάλο ποσοστό ασθενών με ΜΥΝ, η διάκριση της ΠΜΙ σε δύο υποκατηγορίες, η ένταξη της μαστοκυττάρωσης σε χωριστή κατηγορία και ο χαρακτηρισμός της ανθεκτικής αναιμίας με δακτυλιωτούς σιδηροβλάστες ως αλληλεπικαλυπτόμενο νόσημα⁽⁴⁾⁽⁵⁾ (βλ. Εικόνα 10).

Τα κλασικά ΜΥΝ διακρίνονται σε δύο ευρείες κατηγορίες ανάλογα με την παρουσία ή απουσία του χρωμοσώματος Φιλαδέλφεια που παρατηρείται σε ασθενείς με Χρόνια Μυελογενή Λευχαιμία (ΧΜΛ) και αποτελεί μοριακό δείκτη διάγνωσης της νόσου το οποίο όμως δεν αποτελεί αντικείμενο της παρούσας εργασίας. Τα υπόλοιπα κλασικά ΜΥΝ (ΑΠ, ΙΘ, ΠΜΙ) χαρακτηρίζονται από άλλου είδους μοριακές βλάβες για τα οποία γίνεται συνοπτική αναφορά παρακάτω.

WHO myeloid neoplasm and acute leukemia classification	
Myeloproliferative neoplasms (MPN)	
	Chronic myeloid leukemia (CML), <i>BCR-ABL1</i> ⁺
	Chronic neutrophilic leukemia (CNL)
→	Polycythemia vera (PV) Αληθής Πολυκυτταραιμία (ΑΠ)
→	Primary myelofibrosis (PMF) Πρωτοπαθής Μυελοϊνωση (ΠΜΙ)
	PMF, prefibrotic/early stage
	PMF, overt fibrotic stage
→	Essential thrombocythemia (ET) Ιδιοπαθής Θρομβοκυτταραιμία (ΙΘ)
	Chronic eosinophilic leukemia, not otherwise specified (NOS)
	MPN, unclassifiable
	Mastocytosis

Εικόνα 10: Απόσπασμα από τον πίνακα κατάταξης MYN από τον Π.Ο.Υ το 2016, σημαίνονται τα κλασσικά MYN ⁽⁴⁾

1.5.3 Αληθής Πολυκυτταραιμία (ΑΠ)

Παρά το ότι ο όρος πολυκυτταραιμία υποδηλώνει αύξηση όλων των κυτταρικών σειρών, χρησιμοποιείται στις καταστάσεις που έχουμε αύξηση των ερυθρών αιμοσφαιρίων. Συνοδεύεται από αυξημένες τιμές αιμοσφαιρίνης και αιματοκρίτη σε συνδυασμό με παράλληλη αύξηση των λευκοκυττάρων και των αιμοπεταλίων. Παρά το ότι υπάρχει και η σχετική πολυκυτταραιμία (μείωση του όγκου του πλάσματος) εδώ αναφερόμαστε στην πραγματική μεταβολή του απόλυτου αριθμού των ερυθρών και λευκών αιμοσφαιρίων καθώς και των αιμοπεταλίων ανάλογα με την υποκείμενη αιτία παθογένειας. Σπληνομεγαλία, θρόμβωση, αιμορραγία, μικροκυκλοφορικά συμπτώματα και κνησμός συγκαταλέγονται μεταξύ άλλων σε χαρακτηριστικά της νόσου.

Στην ΑΠ (ονομάζεται και νόσος Osler ή Vasquez) η ενδογενής μοριακή βλάβη οδηγεί σε υπέρμετρο αυτόνομο κυτταρικό πολλαπλασιασμό, ανεξάρτητα από τη ρυθμιστική δράση της EPO και οφείλεται σχεδόν καθολικά (97%) σε μεταλλάξεις στα εξόνια 14 και 12 του γονιδίου της πρωτεΐνης JAK2.⁽⁷⁾

Όπως έχει ήδη αναφερθεί (1.3), η JAK2V617F δε φαίνεται να είναι το αρχικό γενετικό γεγονός πρόκλησης της νόσου, πιθανώς αντιπροσωπεύει έναν υπο-κλώνο που δεν σχετίζεται με τη λευχαιμική μετατροπή⁽⁹⁰⁾.

Η ΑΠ είναι σπάνιο νόσημα (2-3 περιπτώσεις ανά 100.000 ανθρώπους κάθε χρόνο), συνήθως σε ηλικίες άνω των 60 ετών και λίγο περισσότερο στους άνδρες. Η εξέλιξη της είναι ήπια, οι επιπλοκές της όμως αποτελούν αιτία αναπηριών ή και θανάτου. Συνήθως ένα ποσοστό 15-20% μετά από πολλά χρόνια εξελίσσεται σε μυελοϊνωση. Πιο σπάνια μπορεί να εμφανισθεί αναίμια (εξ' αιτίας της κόπωσης του μυελού) και πολύ σπάνια (1-3%) σε ΟΜΛ⁽⁹⁾.

Πίνακας 2: Κριτήρια διάγνωσης Αληθούς Πολυκυτταραιμίας (ΑΠ) κατά τον WHO, 2016 ⁽⁴⁾

Αληθής Πολυκυτταραιμία (ΑΠ)	
Μείζονα κριτήρια (WHO)	
1	Αιμοσφαιρίνη > 16,5 g/dl ή Αιματοκρίτης > 49% στους άνδρες Αιμοσφαιρίνη > 16,0 g/dl ή Αιματοκρίτης > 48% στις γυναίκες ή αυξημένη μάζα ερυθρών (RCM > 25% της αναμενόμενης τιμής)
2	Οστεομυελική Βιοψία (OMB) που να δείχνει μυελό κυτταροβριθή για την ηλικία του ασθενή με αύξηση σε απόλυτη τιμή όλων των κυτταρικών σειρών (ερυθροειδική, κοκκιοκυτταρική, μεγακαρυοκυτταρική) και μεγακαρυοκύτταρα με πλειομορφικά χαρακτηριστικά, ώριμα μεγακαρυοκύτταρα (διαφορές στο μέγεθος)
3	Ανίχνευση της μετάλλαξης JAK2V617F ή άλλης στο εξόνιο 12 του JAK2
Ελάχισονα κριτήρια (WHO)	
1	Μειωμένα επίπεδα ερυθροποιητίνης ορού
<i>Για τη διάγνωση της ΑΠ απαιτούνται τα τρία μείζονα κριτήρια, ή δύο από τα μείζονα κριτήρια και το μοναδικό ελάχισον κριτήριο</i>	

1.5.4 Ιδιοπαθής Θρομβοκυτταραιμία (ΙΘ)

Θρομβοκυττάρωση χαρακτηρίζεται η αύξηση της τιμής των αιμοπεταλίων στο περιφερικό αίμα.

Η Ιδιοπαθής (Πρωτοπαθής) Θρομβοκυτταραιμία (ΙΘ) αποτελεί κλινική διαταραχή του αρχέγονου αιμοποιητικού κυττάρου, όπως και τα υπόλοιπα MYN. Χαρακτηριστικό της είναι ο αυξημένος αριθμός αιμοπεταλίων στο περιφερικό αίμα, σε επίπεδα άνω των $450 \times 10^9/L$ ως επακόλουθο της υπερπλασίας των μεγακαρυοκυττάρων. Η ανάπτυξη των μεγακαρυοκυττάρων είναι ενδογενής και ανεξάρτητη των επιπέδων EPO ή θρομβοποιητίνης (TPO)⁵.

Το χρωμόσωμα Φιλαδέλφεια, χαρακτηριστικό γνώρισμα της ΧΜΛ δεν ανιχνεύεται ενώ ο αιματοκρίτης των ασθενών είναι συνήθως φυσιολογικός. Στην ΙΘ ανιχνεύονται συχνά μεταλλάξεις στα γονίδια JAK2, MPL ή CALR, οι οποίες, εκτός σπάνιων περιπτώσεων αποκλείουν η μία την άλλη. Το 50% περίπου των ασθενών ασθενείς φέρουν τη μετάλλαξη JAK2V617F. Η τελική κατηγοριοποίηση των ΙΘ είναι οι «θετικές» και οι «αρνητικές» περιπτώσεις. Εμφανίζουν υψηλότερες τιμές αιμοσφαιρίνης και λευκοκυττάρων, όπως και πιο έντονη σπληνομεγαλία, καταστάσεις που

⁵ Για αυτό χαρακτηρίζεται ως πρωτοπαθές νόσημα και διαχωρίζεται από τις δευτεροπαθείς θρομβοκυτταρώσεις, οι οποίες εκδηλώνονται αντιδραστικά σε διάφορες παθολογικές ή άλλες καταστάσεις (χρόνιες φλεγμονές, νεοπλάσματα, σιδηροπενική αναιμία, σπληνεκτομή, τραυματισμοί, αιμορραγίες).

προσομοιάζουν με ΑΠ. Ένα μεγάλο ποσοστό ασθενών με ιδιαίτερα αυξημένες τιμές αιμοπεταλίων έχουν φυσιολογική πρωτεΐνη JAK2 αλλά φέρει μεταλλάξεις στο γονίδιο CALR (67-88%)⁽⁴⁷⁾⁽⁴⁸⁾, ενώ σχετικά περιορισμένες είναι οι περιπτώσεις που παρουσιάζουν μεταλλάξεις στον υποδοχέα της θρομβοποιητίνης (c-MPL ή TPO-R)⁽⁴⁾

Πίνακας 3: Κριτήρια διάγνωσης Ιδιοπαθούς Θρομβοκυτταραιμίας (ΙΘ) κατά τον WHO, 2016 ⁽⁴⁾

Ιδιοπαθής Θρομβοκυτταραιμία (ΙΘ)	
Μείζονα κριτήρια (WHO)	
1	Αριθμός αιμοπεταλίων >450x10 ⁹ /L
2	Οστεομυελική Βιοψία (OMB) που να δείχνει αυξημένος αριθμός ευμεγέθων μεγακαρυοκυττάρων με πολύλοβο πυρήνα, μικρή αύξηση ή αριστερή στροφή στον πληθυσμό των ουδετερόφιλων και ερυθρών κυττάρων και αμελητέα παρουσία ίνωσης του μυελού (βαθμού 1)
3	Απουσία ενδείξεων υποκείμενης BCR-ABL 1 ⁶ ΧΜΛ, ΑΠ, ΠΜΙ, , ΜΔΣ ή άλλης μυελικής νεοπλασίας
4	Παρουσία μετάλλαξης στα γονίδια JAK2, CALR ή MPL
Ελάχισονα κριτήρια (WHO)	
1	Παρουσία άλλου κλωνικού δείκτη, ή απουσία αντιδραστικής θρομβοκυττάρωσης
<i>Για τη διάγνωση της ΙΘ απαιτούνται και τα 4 μείζονα κριτήρια, ή τρία από τα μείζονα κριτήρια και το μοναδικό ελάχισον κριτήριο</i>	

Η ΙΘ είναι σχετικά σπάνιο νόσημα (1-2 ανά 100.000 άτομα) χωρίς επιλογή φύλου συνήθως στη μέση ηλικία. Εξελίσσεται ήπια για πολλά χρόνια. Οι επιπλοκές της όμως απολήγουν σε σοβαρές αναπηρίες ή ακόμη και τον θάνατο. Ένα 10% εξελίσσεται σε μυελοϊνωση, ενώ μικρό ποσοστό (1-2%) σε πολυκυτταραιμία και σπάνια σε οξεία λευχαιμία⁽⁹⁾.

1.5.5 Πρωτοπαθής Μυελοϊνωση (ΠΜΙ)

Στο παρελθόν είχε περιγραφεί ως μυελοσκήρυνση, μυελοειδής μεταπλασία του σπληνός κ.ά, σήμερα αναφέρεται μόνο ως πρωτοπαθής μυελοϊνωση. Αποτελεί χρόνια παθολογική κατάσταση και χαρακτηρίζεται από την ανάπτυξη ίνωσης στον μυελό των οστών.

Η ανάπτυξή της είναι ή de novo ή ως πρόοδος είτε της ΑΠ (post-PV MF) είτε της ΙΘ (post ET MF. Ξεκινά από την ανεξέλεγκτη υπερπλασία των μεγακαρυοκυττάρων που προάγουν την ανάπτυξη ινοβλαστών (από την έκκριση των κυτταροκινών) και αυτό έχει ως συνέπεια τη δημιουργία ινών κολλαγόνου στο μυελό των οστών. Από τη εξελισσόμενη ίνωση οι νησίδες του μυελού που

⁶ Φιλαδέλφεια 1 θετικής ΧΜΛ

πραγματοποιείται η αιμοποίηση συρρικνώνονται και τη διαδικασία αναλαμβάνουν (ανεπαρκώς) δευτερογενή αιμοποιητικά όργανα (ήπαρ, σπλήνας) τα οποία αυξάνονται σε μέγεθος.

Είναι σπάνιο κλωνικό νεόπλασμα (0.5-1.5 νέες περιπτώσεις ανά 100.000 άτομα κάθε χρόνο) και προσβάλλει κυρίως μεγαλύτερες ηλικιακές ομάδες. Οι μεταλλάξεις που ανιχνεύονται είναι οι κοινές για τα κλασσικά MYN (JAK2, MPL, CALR), αλλά επιπρόσθετα έχουμε μεταλλάξεις και σε άλλα γονίδια (βλ. Πίνακας 1).

Πίνακας 4: Κριτήρια διάγνωσης πρώιμης Πρωτοπαθούς Μυελοϊνώσεως κατά τον WHO, 2016 ⁽⁴⁾

Πρώιμη ΠΜΙ (prePMF)	
Μείζονα κριτήρια (WHO)	
1	Μυελός των οστών με: αυξημένο πολλαπλασιασμό μεγακαρυοκυττάρων, χωρίς ταυτόχρονη παρουσία ιδιαίτερα έντονης ίνωσης (βαθμού 0 ή 1), αυξημένη κυτταροβρίθεια, κυρίως λόγω υπέρμετρου πολλαπλασιασμού των κοκκιοκυττάρων, η οποία συνοδεύεται από μειωμένη ερυθροποίηση
2	Απουσία ενδείξεων υποκείμενης ΑΠ, ΙΘ, Ph1 θετικής ΧΜΛ, ΜΔΣ ή άλλης μυελικής νεοπλασίας
3	Παρουσία μετάλλαξης στα γονίδια JAK2, CALR ή MPL, ή σε άλλον δείκτη κλωνικότητας ⁷ , όταν δεν διαπιστώνονται μεταλλάξεις στα παραπάνω γονίδια, ή απουσία αντιδραστικής ίνωσης του μυελού των οστών ⁸ (βαθμού 0 ή 1)
Ελάσσονα κριτήρια (WHO)	
1	Παρουσία ενός από τα ακόλουθα σε δύο συνεχόμενους προσδιορισμούς <ul style="list-style-type: none"> α) Αναιμία που δεν οφείλεται σε συνοδό νόσημα β) Λευκοκυττάρωση: $\geq 11 \times 10^9/L$ γ) Ψηλαφητή σπληνομεγαλία δ) Αυξημένα επίπεδα LDH
<i>Για τη διάγνωση της πρώιμης ΠΜΙ απαιτούνται και τα 3 μείζονα κριτήρια και τουλάχιστον ένα ελάσσον κριτήριο</i>	

Έχουν προταθεί κατά καιρούς διάφορα διαγνωστικά και προγνωστικά μοντέλα, τόσο για την αρχική διάγνωση, όσο και για τη διαχείριση της νόσου και αυτό γιατί πολλά συμπτώματα και ευρήματα είναι κοινά σε όλα τα MYN, ενώ συχνά όπως έχει ήδη αναφερθεί η μία κατάσταση

⁷ Συνοδές τροποποιητικές μεταλλάξεις, που διαμορφώνουν και τροποποιούν τη νόσο έχουν ανιχνευθεί σε γονίδια όπως τα ASXL1, EZH2, TET2, IDH1/IDH2, SRSF2, SF3B1 και άλλα. Παρόλο που οι μεταλλάξεις αυτές εμφανίζονται λιγότερο συχνά πρέπει να διερευνώνται όταν υπάρχει δυνατότητα

⁸ Η αντιδραστική ίνωση μπορεί να οφείλεται σε λοιμώξεις, αυτοάνοσα νοσήματα, διάφορες φλεγμονώδεις καταστάσεις, λευχαιμία τριχτών κυττάρων ή άλλου τύπου νεοπλασία της λεμφικής κυτταρικής σειράς, διάφορες μεταστατικές νεοπλασίες, ή ακόμη σε χρόνιες μυελοπάθειες

μεταπίπτει στην άλλη και δημιουργεί δυσκολίες στην επακριβή κατάταξή τους. Από το 2016 (όπως φαίνεται και στους πίνακες που ακολουθούν η ΠΜΙ διακρίνεται σε δύο υποκατηγορίες. Η πρώτη αφορά στα πρώιμα στάδια της νόσου (βλ. Πίνακας 4), ενώ η δεύτερη αναφέρεται σε μεταγενέστερα, όψιμα στάδια (**Σφάλμα! Το αρχείο προέλευσης της αναφοράς δεν βρέθηκε.**).

Πίνακας 5: Κριτήρια διάγνωσης όψιμης Πρωτοπαθούς Μυελοϊνώσεως κατά τον WHO, 2016 ⁽⁴⁾

Όψιμη ΠΜΙ (overt PMF)	
Μείζονα κριτήρια (WHO)	
1	Μυελός των οστών με: αυξημένο πολλαπλασιασμό μεγακαρυοκυττάρων, με ταυτόχρονη παρουσία ιδιαίτερα έντονης ίνωσης (βαθμού 2 ή 3)
2	Απουσία ενδείξεων υποκείμενης ΑΠ, ΙΘ, Ph1 θετικής ΧΜΛ, ΜΔΣ ή άλλης μυελικής νεοπλασίας
3	Παρουσία μετάλλαξης στα γονίδια JAK2, CALR ή MPL, ή σε άλλον δείκτη κλωνικότητας, όταν δεν διαπιστώνονται μεταλλάξεις στα παραπάνω γονίδια, ή απουσία αντιδραστικής ίνωσης του μυελού των οστών (βαθμού 0 ή 1)
Ελάσσονα κριτήρια (WHO)	
1	Παρουσία ενός από τα ακόλουθα σε δύο συνεχόμενους προσδιορισμούς α) Αναιμία που δεν οφείλεται σε συνοδό νόσημα β) Λευκοκυττάρωση: $\geq 11 \times 10^9/L$ γ) Ψηλαφητή σπληνομεγαλία δ) Αυξημένα επίπεδα LDH ε) Λευκοερυθροβλάστωση
<i>Για τη διάγνωση της όψιμης ΠΜΙ απαιτούνται και τα 3 μείζονα κριτήρια και τουλάχιστον ένα ελάσσον κριτήριο</i>	

Η νόσος εξελίσσεται ήπια και οι θρομβώσεις, η διόγκωση του σπλήνα, η αναιμία, η αιμορραγική διάθεση καθώς και η φθορά και η κόπωση των ασθενών είναι οι κύριες επιπλοκές της. Πολλές φορές εξελίσσεται σε οξεία λευχαιμία.

1.6 Βασικές μοριακές τεχνικές ανίχνευσης μεταλλάξεων JAK2

Ακολουθεί μια σύντομη αναφορά στις μοριακές τεχνικές που χρησιμοποιήθηκαν από τα εργαστήρια για την ανίχνευση των μεταλλάξεων JAK2 στους ασθενείς της εργασίας.

1.6.1 Σύστημα Ανίχνευσης Μεταλλάξεων Ανθεκτικών στην Ενίσχυση (Amplification Refractory Mutation System Polymerase Chain Reaction, ARMS-PCR)

Είναι μια σχετικά εύκολη και απλή τεχνική PCR για την ανάλυση γνωστών σημειακών μεταλλάξεων στο DNA και για τη διάκριση μεταξύ φυσιολογικών, ετεροζυγωτών και ομοζυγωτών μεταλλαγμένων γονότυπων. Προτάθηκε το 1989 από τον Newton και τους συνεργάτες του.⁽⁹¹⁾

Η μέθοδος αναφέρεται ως σύστημα ανίχνευσης μεταλλάξεων ανθεκτικών στην ενίσχυση

(Amplification Refractory Mutation System, ARMS-PCR)⁹ και εμπλέκονται δύο ζεύγη εκκινητών. Οι δύο εξωτερικοί μη-ειδικοί εκκινητές (outer primers) ενισχύουν μία ευρύτερη ζώνη θετικού ελέγχου, ενώ οι δύο εσωτερικοί αλληλοειδικοί εκκινητές (inner primers), οι οποίοι καταλήγουν στο ίδιο υπό διερεύνηση νουκλεοτίδιο.

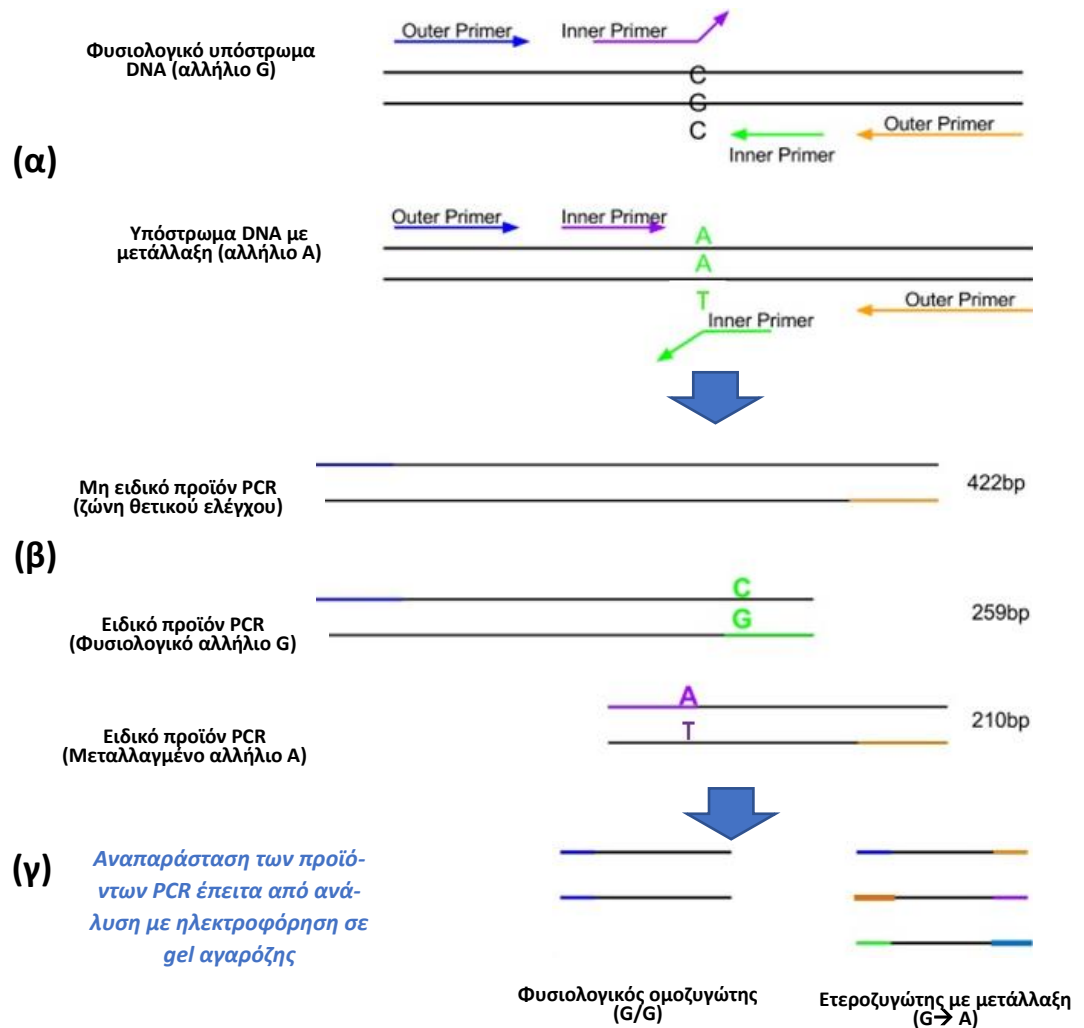
Η επιλογή ενός εσωτερικού φυσιολογικού εκκινητή, ο οποίος είναι συμπληρωματικός με το φυσιολογικό αλληλόμορφο, ενώ ταυτόχρονα εμφανίζει ασυμφωνία βάσεως στο 3' άκρο του, με το αντίστοιχο μεταλλαγμένο αλληλόμορφο, θα οδηγήσει σε επιλεκτική ενίσχυση του πρώτου, σε συνδυασμό πάντα με τον αντιπαράλληλο εξωτερικό μη-ειδικό εκκινητή.

Ο μεταλλαγμένος εσωτερικός εκκινητής θα ενισχύσει μόνο το μεταλλαγμένο αλληλόμορφο, με το οποίο παρουσιάζει συμπληρωματικότητα στο 3' άκρο του, σε συνδυασμό με τον αντιπαράλληλο εξωτερικό μη-ειδικό εκκινητή.

Ο ευδιάκριτος διαχωρισμός των συντιθέμενων προϊόντων κατά την ανάδειξη τους σε πηκτική αγαρόζης επειδή διαφέρουν σε μέγεθος (Εικόνα 5), έγινε με την τοποθέτηση των εξωτερικών μη-ειδικών εκκινητών σε διαφορετική απόσταση από το προς διερεύνηση νουκλεοτίδιο⁽⁹²⁾⁽⁹³⁾

Σε μια σχηματική απεικόνιση της τεχνικής βλέπουμε τους δύο εξωτερικούς (outers) και τους δύο εσωτερικούς (inners) εκκινητήρες (primers) να χρησιμοποιούνται σε συνδυασμούς για να δώσουν τρία πιθανά προϊόντα PCR. Τους εκκινητές να πλαισιώνουν το εξόνιο 14 του γονιδίου JAK2, με αποτέλεσμα μια ζώνη 422bp που ελέγχει την ποιότητα και την ποσότητα του DNA, και να ενισχύουν ένα φυσιολογικό αλληλόμορφο, δημιουργώντας μια ζώνη 259bp και μια ζώνη 210bp από το μεταλλαγμένο αλληλόμορφο και τελικά τα προϊόντα PCR όπως εμφανίζονται μετά από ανάλυση με ηλεκτροφόρηση σε gel αγαρόζης,⁽¹³⁾ (βλ. Εικόνα 11)

⁹ Η διαπίστωση ότι η ενίσχυση των νουκλεϊκών οξέων με PCR έχει μικρή απόδοση ή και αποτυγχάνει πλήρως εάν υπάρχει ασυμφωνία ζευγαρώματος ανάμεσα στο 3' τελικό νουκλεοτίδιο του εκκινητή και της αντίστοιχης μήτρας οδήγησε στην ανάπτυξη αυτής της τεχνικής.



Εικόνα 11: Σχηματική απεικόνιση ARMS-PCR (χρήση διπλού ζεύγους εκκινητών). (α) οι δύο εξωτερικοί (outers) και οι δύο εσωτερικοί (inners) εκκινητήρες (primers) χρησιμοποιούνται σε συνδυασμούς για να δώσουν τρία πιθανά προϊόντα PCR. (β) Οι εκκινητές πλαισιώνουν το εξόνιο 14 του γονιδίου JAK2, με αποτέλεσμα μια ζώνη 422bp να ελέγχει για την ποιότητα και την ποσότητα του DNA, ενισχύουν ένα φυσιολογικό αλληλόμορφο, δημιουργώντας μια ζώνη 259bp και μια ζώνη 210bp από το μεταλλαγμένο αλληλόμορφο. (γ) Εμφάνιση των προϊόντων PCR μετά από ανάλυση με ηλεκτροφόρηση σε gel αγαρόζης.

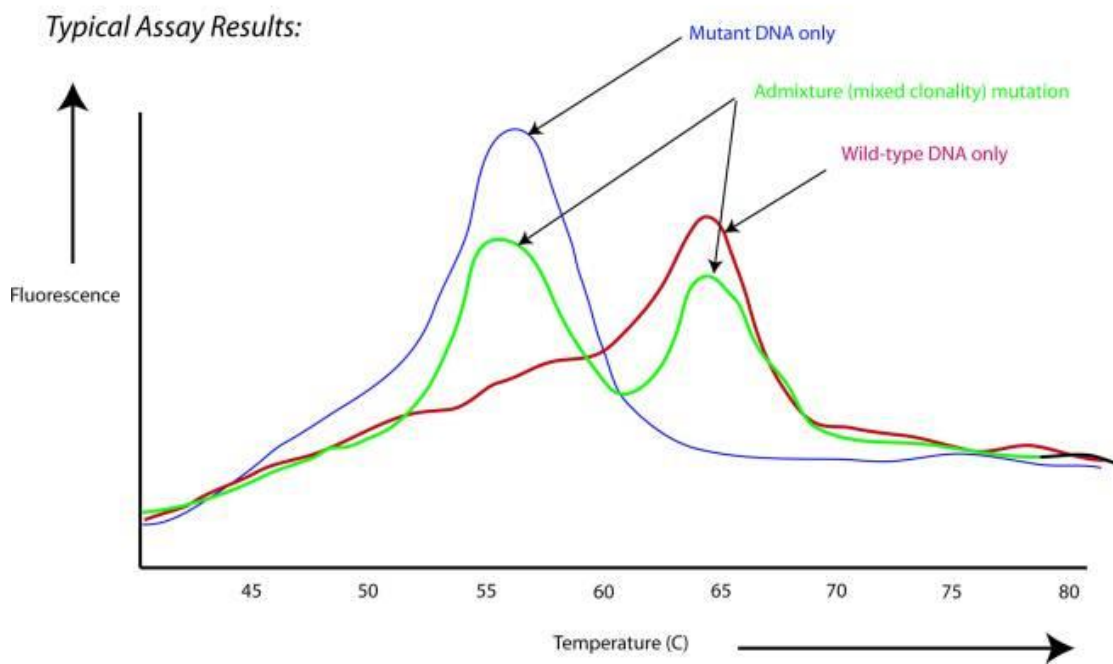
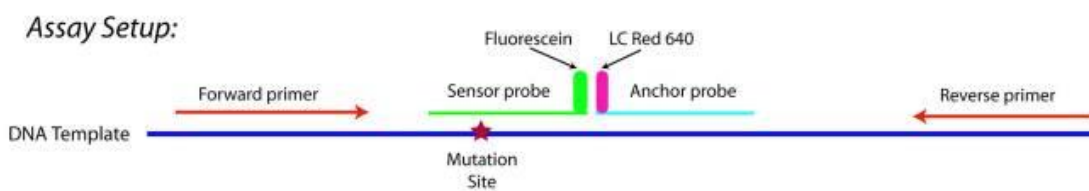
1.6.2 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (Real Time PCR)

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (Real Time PCR), αποτελεί παραλλαγή της PCR τελικού σταδίου. Βέβαια οι δύο τεχνικές παρουσιάζουν ουσιαστικές διαφορές όπως:

Στον τρόπο με τον οποίο παραλαμβάνονται και αναλύονται τα δεδομένα. Η PCR τελικού σταδίου απαιτεί περαιτέρω χειρισμούς, όπως η ανάδειξη των προϊόντων σε πηκτή αγαρόζης, ενώ παράλληλα, στηρίζεται σε οπτικά μέσα για την ανάλυση και αξιολόγηση των αποτελεσμάτων. Αντίθετα, στη Real Time PCR, το σύστημα είναι κλειστό, από τη στιγμή που ξεκινά η αντίδραση και μέχρι την ολοκλήρωσή αυτής. Η επέκταση των προϊόντων βασίζεται σε φθοριοχρώματα τα οποία προσδένονται στα δίκλινα προϊόντα της αντίδρασης που σωρεύονται σταδιακά. Η διαδικασία αυτή παρακολουθείται σε όλη τη διάρκεια της αντίδρασης, μέσω υπολογιστικού συστήματος. Ακολουθεί επεξεργασία των δεδομένων με κατάλληλα λογισμικά προγράμματα, ανάλογα με το

πρωτόκολλο που έχει εφαρμοσθεί και το σκοπό που εξυπηρετεί η εκάστοτε πειραματική διαδικασία. Οι φθορίζουσες χρωστικές διεγείρονται μέσω ακτινοβολήσης και εκπέμπουν φθορίζοντα σωματίδια διαφορετικού μήκους κύματος, τα οποία γίνονται αντιληπτά από μία κάμερα υψηλής ανάλυσης που καταγράφει τη σταδιακή αύξηση του σήματος που προκύπτει. Στην εικόνα που ακολουθεί βλέπουμε πως αποτυπώνονται με αυτή τη μέθοδο τυπικά αποτελέσματα μετάλλαξης JAK2, άγριου τύπου (wild type), μικτής κλωνικότητας καθώς και αποκλειστικά μεταλλαγμένα δείγματα, (Εικόνα 12 ⁽⁹⁴⁾⁽⁹⁵⁾).

Η ουσιαστική όμως διαφορά των δύο τεχνολογιών είναι στην ανάλυση την οποία μπορεί να πετύχει η καθεμιά εξ αυτών. Η PCR τελικού σταδίου μπορεί να ανιχνεύσει, σχετικά εύκολα, συγκεκριμένες πολυμορφικές θέσεις, μικρές διαγραφές ή προσθήκες νουκλεοτιδίων, καθώς και μεγάλες χρωμοσωμικές αναδιατάξεις, εφαρμόζοντας το κατάλληλο πρωτόκολλο. Ενώ η PCR πραγματικού χρόνου αναγνωρίζει τα παραπάνω συμβάματα, πιο σύντομα και με μεγαλύτερη ακρίβεια και ευαισθησία, με λιγότερους χειρισμούς και μικρότερη ποσότητα υποστρώματος. Επίσης μπορεί να χρησιμοποιηθεί για επιπρόσθετους αναλυτικούς σκοπούς, μέσω απόλυτης ποσοτικής ανάλυσης (absolute quantification) χημικών μεταγραφών, ή μέσω σχετικής ποσοτικής ανάλυσης (relative quantification), να γίνει ο έλεγχος των επιπέδων έκφρασης συγκεκριμένων γονιδίων-στόχων, καθώς και άλλες αναλύσεις ⁽⁹⁶⁾⁽⁹²⁾



Εικόνα 12: Ανάλυση καμπύλης τήξης για την ανίχνευση της μετάλλαξης JAK2 c. 1849 G>T. Η ρύθμιση pcr-probe εμφανίζεται από πάνω και αποτελέσματα άγριου τύπου (κόκκινη καμπύλη), μικτής κλωνικότητας (πράσινη καμπύλη) καθώς και αποκλειστικά μεταλλαγμένα δείγματα (μπλε καμπύλη) στο κάτω μέρος. Οι φθορίζουσες ουσίες (fluorescein and LC Red 640) συνδέονται στο πρότυπο DNA επιτρέποντας τη μεταφορά ηλεκτρονίων φθορισμού που αργότερα διαταράσσεται από την τήξη του DNA, διευκολύνοντας την ανίχνευση του προϊόντος.

Κεφάλαιο 2. Αποτελέσματα ανάλυσης δεδομένων

2.1 Γενικά

Είναι γνωστό εδώ και αρκετά χρόνια, πως μεταλλάξεις στο γονίδιο JAK2 (όπως και στο γονίδιο MPL) οδηγούν στην εμφάνιση MYN. Επίσης και μεταλλάξεις στο γονίδιο της CALR αποτελούν πρωταρχικό γεγονός σε σημαντικό ποσοστό ασθενών με ΙΘ και ΠΜΙ, οι οποίοι δε φέρουν μεταλλάξεις JAK2 και MPL. Οι ίδιες μεταλλάξεις και πολλές άλλες σε αρκετά γονίδια όπως αναφέρθηκαν και στην εισαγωγή ανιχνεύονται επίσης σε σημαντικό ποσοστό ασθενών με ΜΔΣ/MYN και είναι βαρύνουσας σημασίας, τόσο για την πρόγνωση αλλά και στη διαστρωμάτωση των αιματολογικών κακοθειών.

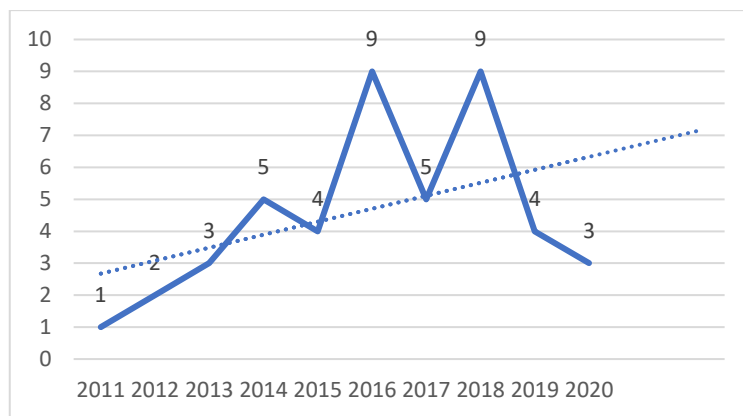
Θα επιχειρηθεί μια σύγκριση και αξιολόγηση των εργαστηριακών δεδομένων των ασθενών με κλασικές μυελοϋπερπλαστικές νεοπλασίες (αληθή πολυκυτταραιμία, ιδιοπαθή θρομβοκυτταραιμία και πρωτοπαθή μυελοϊνώση) με δεδομένα από τη διεθνή βιβλιογραφία. Σκοπός της εργασίας είναι να γίνει, σε επίπεδο εργαστηρίου νοσοκομειακής μονάδας, μια βασική ανάλυση των στοιχείων αυτών με στόχο την περεταίρω εκτίμηση της κατάστασης των ασθενών (ως προς τη διάγνωση) σύμφωνα με τα νέα δεδομένα.

2.2 Μέθοδος

2.2.1 Δείγμα

Εργαστηριακά δεδομένα ασθενών με κλασικές μυελοϋπερπλαστικές νεοπλασίες της Β' Πανεπιστημιακής Παθολογικής Κλινικής του Ιπποκράτειου Γενικού Νοσοκομείου Αθηνών, από το 2011 μέχρι και το 2020 (10 έτη). Να σημειωθεί ότι επελέγησαν περιστατικά με σαφή αρχική διάγνωση νόσου καθώς και με παρακολούθηση αυτής (εργαστηριακό αποτέλεσμα) εντός του 2020. (βλ. Γράφημα 1). Ίση διασπορά ασθενών στη δεκαετία (F ratio = 0.574 και Significance level, $p = 0.809 > 0.05$)¹⁰.

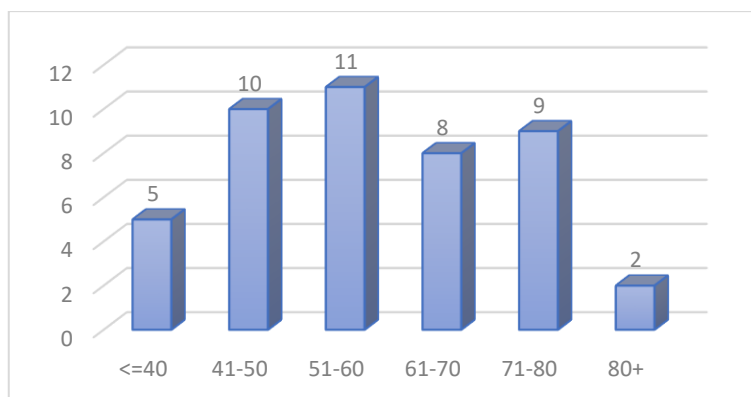
¹⁰ Οι έλεγχοι διασποράς έγιναν με εφαρμογή του ANOVA test (Medcalc)



Γράφημα 1: Κατανομή αριθμού ασθενών ανά έτος διάγνωσης της νόσου¹¹.
(Η διακοπτόμενη γραμμή σημειώνει την τάση)

Μελετήθηκαν εργαστηριακά αποτελέσματα 45 ασθενών, $n = 22$ (49%) άνδρες και $n = 23$ (51%) γυναίκες.

Η διάμεση ηλικία (κατά τη διάγνωσή τους) = 58 έτη και εύρος από 26 έως 86 ετών και ($\bar{x} = 58$), (βλ. Γράφημα 2 & Πίνακας 6). Αναμενόμενα δεν υπήρχε ίση διασπορά στις ηλικίες διάγνωσης των ασθενών (F ratio = 1.246 > 1 και Significance level, $p = 0.347 > 0.05$).

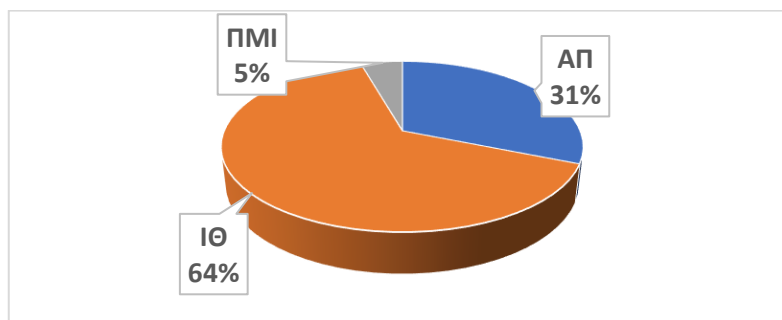


Γράφημα 2: Κατανομή ηλικίας ασθενών δείγματος

Από τους $n = 45$ ασθενείς οι 14 (31%) ήταν με διάγνωση ΑΠ, οι 29 ασθενείς (64%) με διάγνωση ΙΘ και 2 ασθενείς (5%) με ΠΜΙ, με ίση διασπορά στις διαγνώσεις (F ratio = 0.875 και Significance level, $p = 0.424 > 0.05$), με ίση διασπορά στις ηλικίες των ασθενών (F ratio = 0.240 και Significance level, $p = 0.788 > 0.05$) καθώς και στο έτος ελέγχου (F ratio = 0.136 και Significance level, $p = 0.873 > 0.05$)

¹¹ Έγινε αποδοχή κανονικότητας με τεστ D'Agostino-Pearson ($p=0,4178$) και με τεστ Shapiro-Wilk test ($p=0,1297$) που θεωρούνται ασφαλέστερα για μικρά δείγματα.

Να σημειωθεί επίσης ότι ένα περιστατικό με αρχική διάγνωση ΑΠ έχει εξελιχθεί σε ΠΜΙ. (Γράφημα 3).



Γράφημα 3: Κατανομή ασθενών δείγματος σύμφωνα με τη διάγνωσή τους

2.2.2 Μεθοδολογία

Ο εργαστηριακός έλεγχος για τις μεταλλάξεις $n = 26$ ασθενών (58%) έγινε σε εργαστήρια δημόσιων νοσοκομείων¹², ενώ για $n = 19$ ασθενείς (42%) ο έλεγχος αυτός πραγματοποιήθηκε σε εργαστήρια του ιδιωτικού τομέα¹³. Ο υπόλοιπος εργαστηριακός έλεγχος, γενική αίματος¹⁴ και άλλες εξετάσεις¹⁵ πραγματοποιήθηκαν στο αιματολογικό εργαστήριο της Β' Πανεπιστημιακής Παθολογικής κλινικής του Ιπποκράτειου Γενικού Νοσοκομείου Αθηνών.

Οι μοριακές τεχνικές που χρησιμοποιήθηκαν για την ανίχνευση των μεταλλάξεων είναι: α) Με σύστημα ανίχνευσης μεταλλάξεων ανθεκτικών στην ενίσχυση (Amplification Refractory Mutation System Polymerase Chain Reaction, ARMS-PCR (βλ.1.6) και β) με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου, Real Time PCR. (βλ. 1.6.2).

Η ανάλυση των δεδομένων καθώς και η επεξεργασία τους έγινε με το πρόγραμμα Excel 2019. Η στατιστική επεξεργασία πραγματοποιήθηκε με το πρόγραμμα Excel 2019 και με το πρόγραμμα MedCalc 14.8.1. Για την αποδοχή κανονικότητας σε ορισμένες παραμέτρους χρησιμοποιήθηκαν τα D'Agostino-Pearson test και Shapiro-Wilk test, ως τα πιο αποδεκτά για μικρά δείγματα.

¹² Ιπποκράτειο Γενικό Νοσοκομείο Αθηνών, Γενικό Νοσοκομείο Λαϊκό- Πανεπιστήμιο Αθηνών, Γενικό Νοσοκομείο Νίκαιας «Άγιος Παντελεήμων», Γενικό Νοσοκομείο Πατησίων

¹³ Genotypos, Ιατρόπολις, Life Code

¹⁴ Οι μετρήσεις έγιναν σε αιματολογικό αναλυτή ADVIA 2120i της εταιρείας SIEMENS

¹⁵ Να σημειωθεί ότι στον αρχικό σχεδιασμό ήταν και η συγκέντρωση εργαστηριακών δεδομένων από τις μετρήσεις της ερυθροποιητίνης αλλά αυτό δεν έγινε εφικτό για όλους τους ασθενείς και εξαιρέθηκε από την στατιστική ανάλυση.

Η μέτρηση δείγματος της εργασίας και η ισχύς αυτού έγινε εκτός των άλλων και με εργαλεία από την ηλεκτρονική σελίδα του διαδικτύου, <http://powerandsamplesize.com>

2.3 Αποτελέσματα

Συγκεντρωτικά αποτελέσματα της εργασίας εμφανίζονται στον πίνακα Πίνακας 1 που ακολουθεί:

Πίνακας 6: Συγκεντρωτικά χαρακτηριστικά ασθενών με MYN
Αιματολογικού Εργαστηρίου, Β' Πανεπιστημιακής Παθολογικής Κλινικής ΙΓΝΑ

	Όλοι οι ασθενείς n (%)	Ασθενείς με ΑΠ n (%)	Ασθενείς με ΙΘ n(%)	Ασθενείς με ΠΜΙ n (%)	p ¹	p ²
	N= 45	N=14 (31%)	N=29 (64%)	N=2 (4%)	-	-
Άνδρες	22 (49)	7 (50)	13 (45)	2 (100)	<0.0001	
Γυναίκες	23 (51)	7 (50)	16 (55)	0 (0)	<0.0001	
Ηλικία (διάμεση)	58	59	58	62	0,48	0,22
Εύρος	26-85	26-83	33-85	46-78	-	-
Ηλικία >60	19 (42)	6 (43)	12 (41)	1 (50)	0,67	0,68
Ηλικία <60	26 (58)	8 (57)	17 (59)	1 (50)	0,16	0,42
JAK2V627F θετικοί	35 (78)	12 (86)	21 (72)	2	-	-
JAK2V627F αρνητικοί	7 (16)	2 (14)	5 (17)	0	-	-
CALR	3 (7)	0	3 (10)	0	-	-
Άλλες μεταλλάξεις	-	-	-	-	-	-
WBC* διάμεση, (εύρος) Χ10 ⁹ /L	8,14 (4,17 – 28,10)	11,27 (5,46 – 25,01)	7,75 (4,17 – 28,10)	9,10 (8,07 – 10,13)		
Hb* διάμεση, (εύρος) gr/dl	13,9 (8,0 – 20,6)	16,8 (14,2 – 20,6)	13,2 (9,1 – 18,1)	11,3 (8,0 – 14,5)	0,83 (0,48) ³	0,81 (0,48) ³
Hct* διάμεση, (εύρος) %	43,8 (25,5 – 60,6)	51,1 (45,4 – 60,4)	40,3 (28,7 – 60,6)	38,0 (25,5 – 50,4)	0,50 (0,18) ³	0,84 (0,41) ³
PLT* διάμεση, (εύρος) Χ10 ⁹ /L	590 (120 – 1500)	451 (160 – 1319)	700 (360 – 1500)	246 (120 – 372)		
WBC** διάμεση, (εύρος) Χ10 ⁹ /L	6,62 (3,51 – 28,10)	7,30 (3,56 – 12,34)	6,09 (3,51 – 28,10)	6,46 (4,30 – 8,61)		
Hb** διάμεση, (εύρος) gr/dl	13,3 (8,6 – 16,7)	14,5 (8,9 – 16,7)	12,0 (9,1 – 16,0)	12,0 (8,6 – 15,3)	0,34 (0,47) ³	0,42 (0,47) ³
Hct** διάμεση, (εύρος) %	40,4 (24,3 – 52,2)	44,5 (30,8 – 52,2)	37,4 (28,7 – 50,3)	36,5 (24,3 – 48,7)	0,89 (0,81) ³	0,78 (0,45) ³
PLT** διάμεση, (εύρος) Χ10 ⁹ /L	400 (27 – 1700)	333 (27 – 480)	480 (170 – 1700)	93 (66 – 120)		

¹Shapiro-Wilk test (στα κενά πεδία δεν υπάρχει αποδεκτή κανονικότητα λόγω του μικρού μεγέθους του δείγματος)
²D'Agostino-Pearson (στα κενά πεδία δεν υπάρχει αποδεκτή κανονικότητα λόγω του μικρού μεγέθους του δείγματος)
³ Εφαρμογή σε ασθενείς με ΑΠ (κριτήριο διάγνωσης της νόσου)
*Εργαστηριακά δεδομένα κατά τη διάγνωση της νόσου
**Εργαστηριακά δεδομένα τελευταίου εργαστηριακού ελέγχου (2020)

- I. Από τους 45 ασθενείς της μελέτης, θετικοί στην μετάλλαξη JAK2V617F βρέθηκαν οι 35, ποσοστό **78%**. Η θετικότητα της μετάλλαξης είχε με ίση διασπορά ανά έτος ελέγχου (F ratio = 0.00741 και Significance level, p = 0.932 > 0.05).

Ειδικότερα, τα ποσοστά θετικότητας ανά διάγνωση MYN ήταν: (βλ. Γράφημα 14, σελ.38)

- Αληθής Πολυκυτταραιμία, n = 12 ασθενείς, ποσοστό θετικότητας **86%**. Προφανώς άμεση σχέση της μετάλλαξης με τη νόσο, αφού αποτελεί και κριτήριο διάγνωσης, (F ratio = 27.633 >1 και Significance level, p = 0.001)

- Ιδιοπαθής Θρομβοκυτταραιμία, n = 21 ασθενείς, ποσοστό θετικότητας **72%**. Επίσης αναμενόμενη σχέση της μετάλλαξης με τη νόσο, (F ratio = 20.280 >1 και Significance level, p = 0.001) και τέλος
- Πρωτοπαθής Μυελοϊνωση, n =2 ασθενείς, ποσοστό θετικότητας **100%**. Δεν μπορεί να αξιολογηθεί η σχέση. (2 ασθενείς).

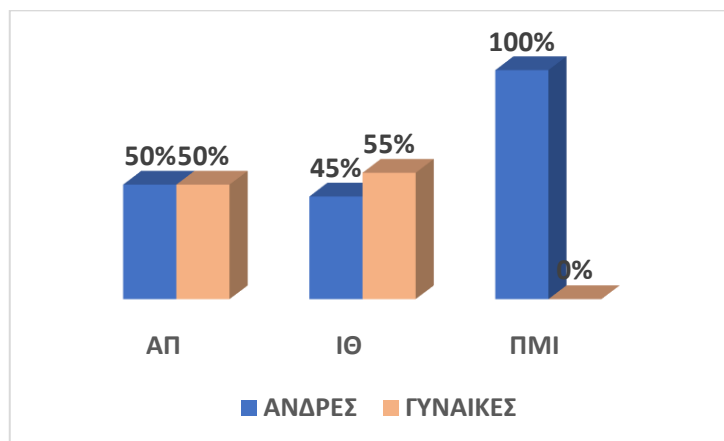
Πίνακας 7: Στατιστικά στοιχεία από τη σύγκριση εργαστηριακών δεδομένων πρώτης και τελευταίας γενικής αίματος των ασθενών με βάση τη θετικότητά τους στη μετάλλαξη JAK2V617F.

Παράμετρος	Θετικοί στην μετάλλαξη JAK2V617F (n =35)				Αρνητικοί στην μετάλλαξη JAK2V617F (n =10)			
	WBC x 10 ⁹ /L	Hb gr/dl	Hct %	PLT x 10 ⁹ /L	WBC x 10 ⁹ /L	Hb gr/dl	Hct %	PLT x 10 ⁹ /L
Μέση Διαφορά	-2.7	-1.4	-4.9	-194	-0.3	-0.6	-1.26	-79
SD	5.1	2.6	7.9	271	1.3	0.7	2.1	354
SE	0.8	0.4	1.3	45	0.4	0.2	0.6	112
t*	-3.101	-3.175	-3.633	-4.237	-0.793	-2.697	-1.855	-0.705
p	0.0039	0.0032	0.0008	0.0002	0.4482	0.0245	0.0966	0.4989
r**	0.4726	0.4349	0.4507	0.5879	0.8931	0.9579	0.9365	0.5801
p (Sig)	0.0041	0.0090	0.0066	0.0002	0.0005	<0.0001	0.0001	0.0787

* paired samples t – test
** r= γραμμικός συντελεστής συσχέτισης Pearson

II. Με βάση το φύλο των ασθενών, υπήρχε ίση διασπορά (F ratio = 0.000504 και Significance level, p = 0.982 > 0.05), η κατανομή τους (βλ. Γράφημα 4) βάση νοσήματος ήταν:

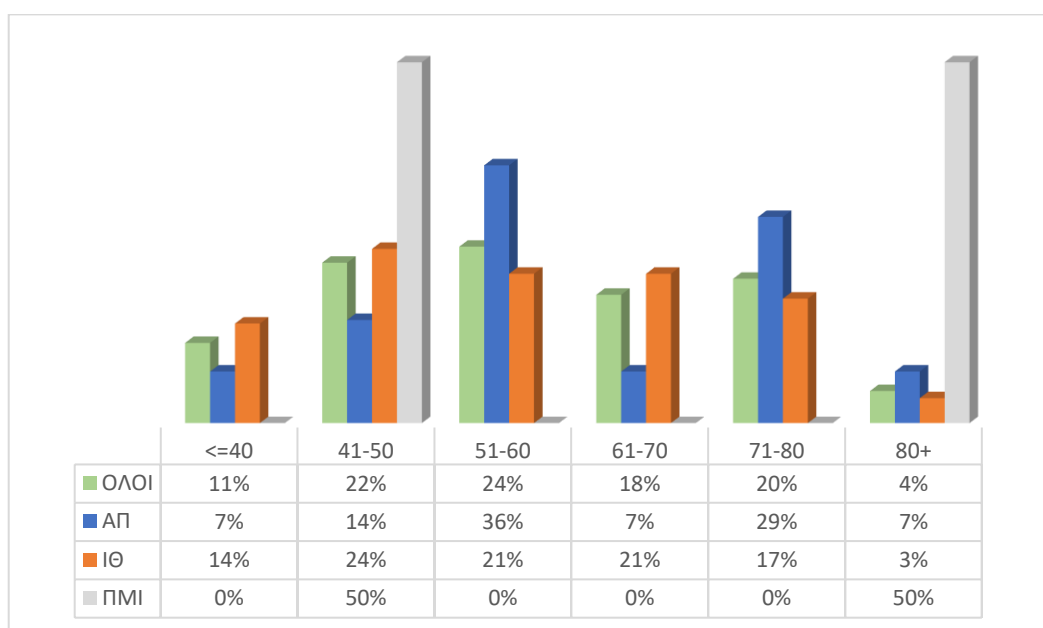
- Αληθής Πολυκυτταραιμία, άνδρες, n = 7 (50%), γυναίκες n = 7 (50%)
- Ιδιοπαθής Θρομβοκυτταραιμία, άνδρες, n = 13 (45%), γυναίκες n = 16 (55%) και τέλος
- Πρωτοπαθής Μυελοϊνωση, άνδρες, n = 2 (100%), γυναίκες n = 0 (0%).



Γράφημα 4: Κατανομή φύλου/διάγνωσης ασθενών δείγματος εργασίας.

Η κατανομή των JAK2 θετικών ασθενών (n = 35), ως προς το φύλο ήταν: άνδρες, n = 17 (49%), γυναίκες n = 18 (51%).

- III. Από τους 29 ασθενείς με ΙΘ, θετικοί στην μετάλλαξη του γονιδίου CALR, ήταν τρεις, n = 3, ποσοστό 10%. Δεν υπήρξε καταγραφή μετάλλαξης άλλου γονιδίου στους ασθενείς της μελέτης. Να σημειωθεί ότι σε κανένα ασθενή δεν είχαμε συνύπαρξη μεταλλάξεων (JAK2, CALR, MPL). Στους συγκεκριμένους ασθενείς καταγράφηκαν αυξημένα επίπεδα αιμοπεταλίων, καθώς και χαμηλότερες τιμές αιματοκρίτη και λευκών αιμοσφαιρίων συγκριτικά με τους ασθενείς που βρέθηκαν θετικοί για τη μετάλλαξη JAK2V617F.
- IV. Από τους 45 ασθενείς της μελέτης οι 39, ποσοστό 87%, πληρούσαν τα εργαστηριακά κριτήρια διάγνωσης (γενική αίματος, ανίχνευση μετάλλαξης JAK2 ή άλλου γονιδίου σύμφωνα με τον Π.Ο.Υ⁽⁴⁾⁽⁵⁾ (βλ.1.5.3-1.5.5,σελ. 19-22).
- V. Βάση της κατανομής της ηλικίας των ασθενών (κατά τη διάγνωση) που έγινε στο δείγμα της μελέτης (βλ. Γράφημα 2) τα αποτελέσματα συνολικά, αλλά και σε σχέση με τη νόσο τους απεικονίζονται στο Γράφημα 5.



Γράφημα 5: Κατανομή ηλικίας/νόσου ασθενών

- VI. Μόνο σε έναν ασθενή η νόσος του εξελίχθηκε σε κάποιο άλλο νόσημα και συγκεκριμένα από πρωτοπαθή πολυκυτταραιμία σε πρωτοπαθή μυελοϊνώση. Αναλυτικά από τους 14 ασθενείς με ΑΠ, είχαμε εξέλιξη της νόσου σε ΠΜΙ σε έναν, n=1, (7%) ενώ σε κανέναν από τους 29 ασθενείς με ΙΘ, δεν παρατηρήθηκε κάτι τέτοιο (στο συγκεκριμένο διάστημα των 10 ετών).
- VII. Στατιστικά στοιχεία των εργαστηριακών δεδομένων (αριθμός λευκών αιμοσφαιρίων, τιμή αιμοσφαιρίνης, τιμή αιματοκρίτη και αριθμός αιμοπεταλίων) της γενικής αίματος (διάγνωσης και τελευταίας μέτρησης) εμφανίζονται στους πίνακες που ακολουθούν (Πίνακας 8 & Πίνακας 9).

Πίνακας 8: Στατιστικά στοιχεία εργαστηριακών δεδομένων ασθενών με ΑΠ

ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΣ	ΟΛΟΙ ΟΙ ΑΣΘΕΝΕΙΣ (n =14)		ΑΝΔΡΕΣ (n =7)		ΓΥΝΑΙΚΕΣ (n =7)		r	p
	M.T	± SD	M.T	± SD	M.T	± SD		
Hb 1ης (g/dL)	16,9	1,7	16,9	1,5	16,9	1,9	0,2292	0,4305
Hb τελ. (g/dL)	14,1	2,0	14,9	0,7	13,3	2,5		
Hct 1ης (%)	52,0	4,8	52,1	4,9	51,9	4,7	0,3365	0,2394
Hct τελ. (%)	43,4	5,6	45,50	2,3	41,3	7,0		
ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΣ	ΔΙΑΜΕΣΗ	ΕΥΡΟΣ	ΔΙΑΜΕΣΗ	ΕΥΡΟΣ	ΔΙΑΜΕΣΗ	ΕΥΡΟΣ		
WBC 1ης (× 10 ⁹ /L)	11,27	5,46 - 25,01	8,5	5,46 - 13,37	12,36	7,98 - 25,01	0,1808	0,5363
WBC τελ. (× 10 ⁹ /L)	7,30	3,56 - 12,34	6,51	3,56 - 9,27	7,85	3,83 - 12,34		
PLT 1ης (× 10 ⁹ /L)	451	160 - 1319	432	160 - 880	457	250 - 1319	0,4354	0,1197
PLT τελ. (× 10 ⁹ /L)	333	27 - 480	320	100 - 460	346	27 - 480		
Θρομβοκυττάρωση 1ης (≥450 × 10 ⁹ /L), n (%)	7 (50)		3(42)		4(57)			
Θρομβοκυττάρωση τελ. (≥450 × 10 ⁹ /L), n (%)	2(28)		1(14)		1(14)			

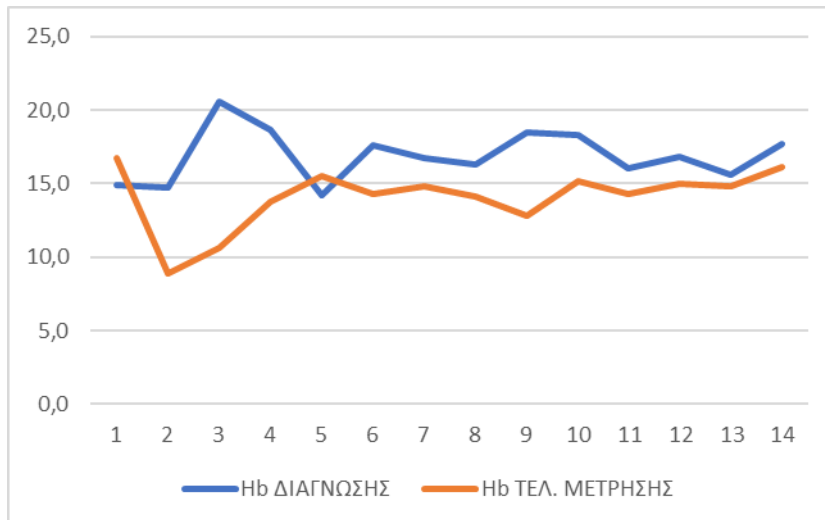
r= γραμμικός συντελεστής συσχέτισης Pearson

Πίνακας 9: Στατιστικά στοιχεία εργαστηριακών δεδομένων ασθενών με ΙΘ

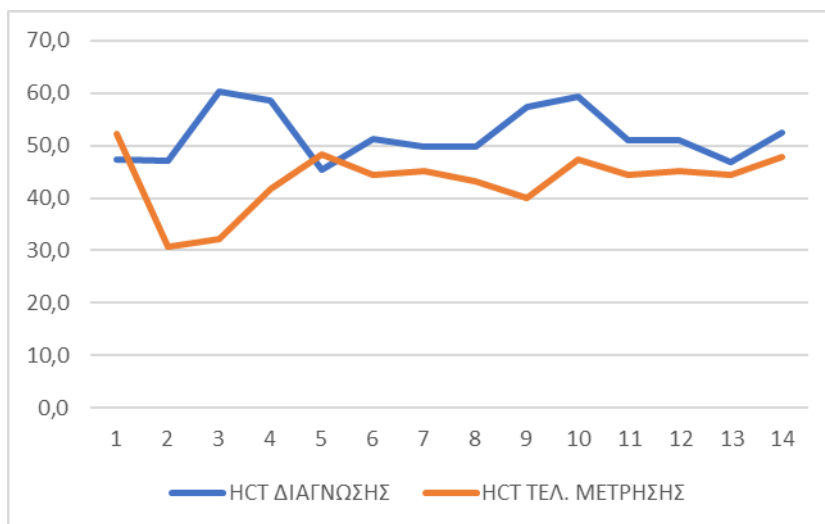
ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΣ	ΟΛΟΙ ΟΙ ΑΣΘΕΝΕΙΣ (n =29)		ΑΝΔΡΕΣ (n =13)		ΓΥΝΑΙΚΕΣ (n =16)		r	p
	M.T	± SD	M.T	± SD	M.T	± SD		
Hb 1ης (g/dL)	13,0	1,7	12,6	1,5	13,4	1,9	0,6257	0,0003
Hb τελ. (g/dL)	12,5	1,6	12,4	1,6	12,4	1,6		
Hct 1ης (%)	40,7	5,9	39	4,2	42,1	7,1	0,4963	0,0062
Hct τελ. (%)	38,6	4,8	38,39	4,53	38,5	5,3		
ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΣ	ΔΙΑΜΕΣΗ	ΕΥΡΟΣ	ΔΙΑΜΕΣΗ	ΕΥΡΟΣ	ΔΙΑΜΕΣΗ	ΕΥΡΟΣ		
WBC 1ης (× 10 ⁹ /L)	7,75	4,17 - 28,10	8,13	4,17 - 28,10	7,66	5,82 - 20,61	0,6253	0,0003
WBC τελ. (× 10 ⁹ /L)	6,09	3,51 - 28,10	7,01	3,51 - 28,10	5,71	3,79 - 14,71		
PLT 1ης (× 10 ⁹ /L)	700	360 - 1500	653	360 - 1500	740	520 - 1000	0,5477	0,0021
PLT τελ. (× 10 ⁹ /L)	480	170 - 1700	466	170 - 1700	576	260 - 1100		
Θρομβοκυττάρωση 1ης (≥450 × 10 ⁹ /L), n (%)	24(83)		8(62)		16(100)			
Θρομβοκυττάρωση τελ. (≥450 × 10 ⁹ /L), n (%)	18(62)		8(62)		10(63)			

r= γραμμικός συντελεστής συσχέτισης Pearson

(α) Έγινε σύγκριση των τιμών της αιμοσφαιρίνης (Hb) και του αιματοκρίτη (Hct), στους ασθενείς με ΑΠ (n = 14), που αποτελεί και κριτήριο διάγνωσης της συγκεκριμένης νόσου. Στα γραφήματα που ακολουθούν απεικονίζονται οι μετρήσεις τους (βλ. Γράφημα 6 & Γράφημα 7).

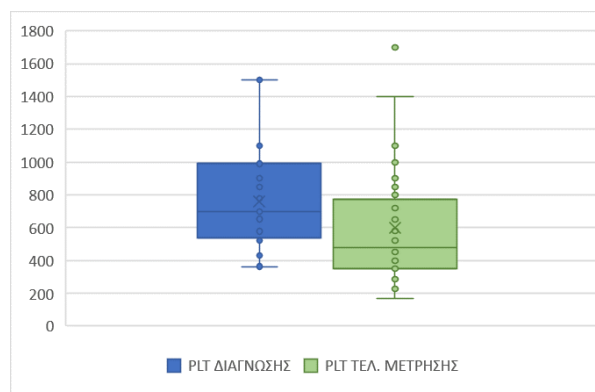


Γράφημα 6: Τιμές αιμοσφαιρίνης ασθενών με ΑΠ (διάγνωσης και τελευταίας μέτρησης)



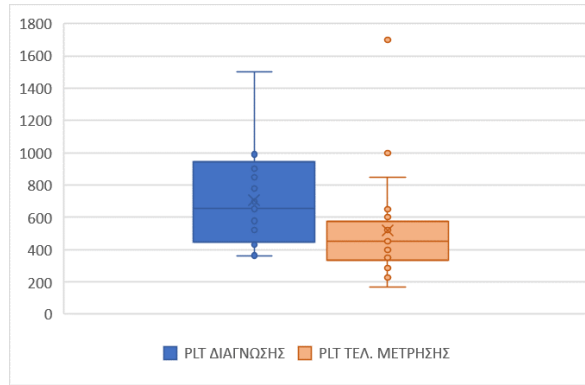
Γράφημα 7: Τιμές αιματοκρίτη ασθενών με ΑΠ (διάγνωσης και τελευταίας μέτρησης)

(β) Έγινε σύγκριση του αριθμού των αιμοπεταλίων (PLT) στους ασθενείς με ΙΘ (n = 29), που αποτελεί και κριτήριο διάγνωσης της συγκεκριμένης νόσου. Στο γράφημα που ακολουθεί απεικονίζονται οι μετρήσεις (βλ. Γράφημα 8).

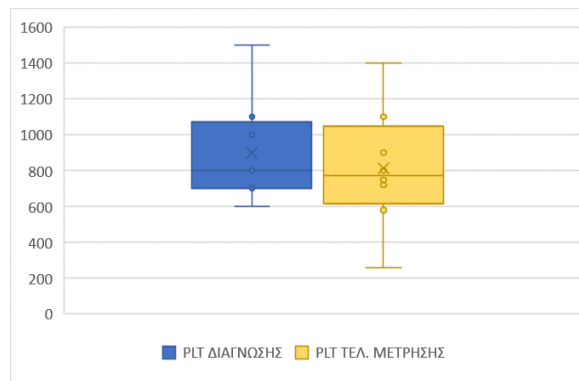


Γράφημα 8: Τάση και απολήξεις αριθμού αιμοπεταλίων στους ασθενείς με ΙΘ

(γ) Ειδικότερα έγινε και σύγκριση του αριθμού των αιμοπεταλίων (PLT) για τους ασθενείς με ΙΘ που ήταν JAK2 θετικοί (n = 21), καθώς και για τους ασθενείς με ΙΘ που ήταν JAK2 αρνητικοί (n=8). Τα αποτελέσματα απεικονίζονται στα γραφήματα που ακολουθούν (βλ. Γράφημα 9 & Γράφημα 10)

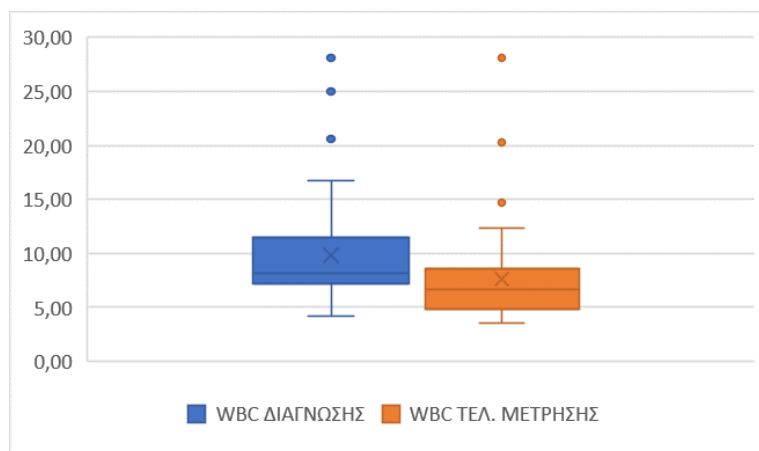


Γράφημα 9: Τάση και απολήξεις αριθμού αιμοπεταλίων στους ασθενείς με ΙΘ με θετική μετάλλαξη JAK2

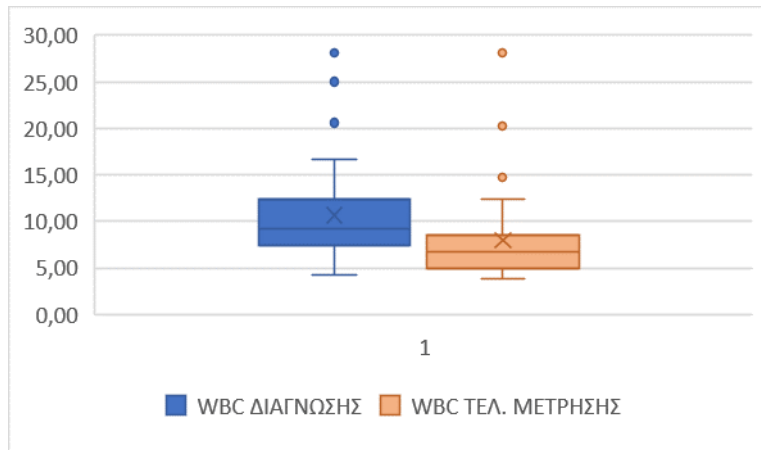


Γράφημα 10: Τάση και απολήξεις αριθμού αιμοπεταλίων στους ασθενείς με ΙΘ και αρνητικούς στη μετάλλαξη JAK2

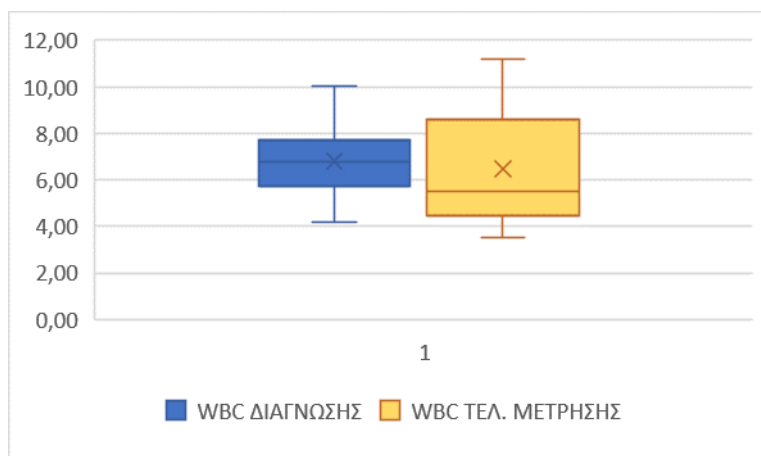
(δ) Έγινε σύγκριση της τιμής των λευκών αιμοσφαιρίων (WBC) σε όλους τους ασθενείς του δείγματος. Στο γράφημα που ακολουθεί απεικονίζονται οι μετρήσεις (βλ. Γράφημα 11).



Γράφημα 11: Τάση και απολήξεις αριθμού λευκών αιμοσφαιρίων ασθενών δείγματος (διάγνωσης και τελευταίας μέτρησης)



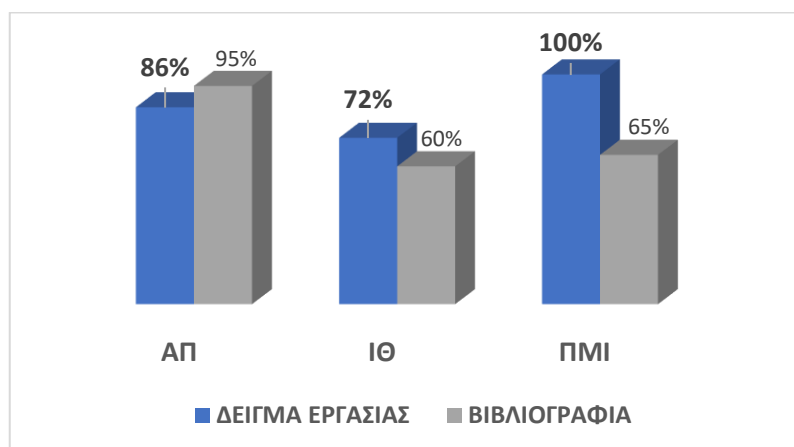
Γράφημα 12: Τάση και απολήξεις αριθμού λευκών αιμοσφαιρίων ασθενών θετικών στη μετάλλαξη JAK2



Γράφημα 13: Τάση και απολήξεις αριθμού λευκών αιμοσφαιρίων ασθενών αρνητικών στη μετάλλαξη JAK2

2.4 Παρατηρήσεις – Σχόλια

- Ι. Παρατηρούμε ότι τα ποσοστά θετικότητας των ασθενών με κλασσικά MYN ως προς τη μετάλλαξη JAK2V617F, με ορισμένες αποκλίσεις, κινούνται προς την κατεύθυνση της διεθνούς βιβλιογραφίας όπως απεικονίζεται συνοπτικά και στο γράφημα που ακολουθεί (βλ. Γράφημα 14):



Γράφημα 14: Ποσοστά θετικότητας μετάλλαξης JAK2V617F στους 45 ασθενείς με κλασσικά MYN. Παράθεση για σύγκριση ποσοστά από τη διεθνή βιβλιογραφία.

- (α) Στους ασθενείς με ΑΠ, το ποσοστό θετικότητας ως προς τη μετάλλαξη JAK2V617F, που αποτελεί και ειδικότητα διάκρισης της από άλλες αιτίες αυξημένου αιματοκρίτη, είναι μικρότερο (86%) από αυτά που αναφέρονται στη διεθνή βιβλιογραφία (~95%). Ο Tefferi et al το 2020, αναφέρει ότι όλοι σχεδόν οι ασθενείς με ΑΠ έχουν μετάλλαξη JAK2, περίπου 96% στο εξόνιο 14 και 3% στο εξόνιο 12.⁽⁷⁾ Ένα ποσοστό που παραμένει ίδιο, από τις παλιότερες ακόμα συγκεντρωτικές εργασίες, από τα πρώτα χρόνια μελέτης της συγκεκριμένης μετάλλαξης, όπως αυτές του Vannucchi et al, το 2008⁽⁸⁾, ή του Pardanani et al, το 2007.⁽⁹⁷⁾ Συγκεντρωτικά ποσοστά από τις πρώτες μελέτες της μετάλλαξης και τη θετικότητα της στα MYN εμφανίζονται στον πίνακα που ακολουθεί (βλ. Πίνακας 10)

Πίνακας 10: Ποσοστά θετικότητας μετάλλαξης JAK2 σε ασθενείς με MYN από τις αρχικές σχετικές αναφορές (2005)

Αναφορά	ΑΠ (%)		ΙΘ (%)		ΠΜΙ (%)	
James et al ⁽¹⁷⁾	40/45	89	9/21	43	3/7	43
Levine et al ⁽¹⁸⁾	121/164	74	37/115	32	16/46	35
Baxter et al ⁽³⁾	71/73	97	29/51	57	8/16	50
Kralovics et al ⁽¹⁶⁾	83/128	65	21/93	23	13/23	57
Jones et al ⁽²⁸⁾	58/72	81	24/59	41	18/35	43

- (β) Στους ασθενείς με ΙΘ το ποσοστό θετικότητας ως προς τη μετάλλαξη JAK2V617F, που αποτελεί και ειδικότητα διάκρισης της από άλλες αιτίες αυξημένου αριθμού

αιμοπεταλίων, εμφανίζεται υψηλότερο (72%) από αυτά που αναφέρονται στη διεθνή βιβλιογραφία (50-60%). Ο Tefferi et al το 2020, αναφέρει ποσοστό 55%⁽⁷⁾, το ίδιο περίπου (57%) και παλιότερα (2005) ο Antonioli et al⁽⁹⁸⁾, υπάρχει βέβαια και αναφορά το 2006 από τον Lippert et al, για ποσοστό θετικότητας 75%⁽⁹⁹⁾. Όπως παρατηρούμε από τις αρχικές σχετικές αναφορές, τα ποσοστά θετικότητας της μετάλλαξης για την ΙΘ ήταν πιο χαμηλά. (βλ. Πίνακας 10)

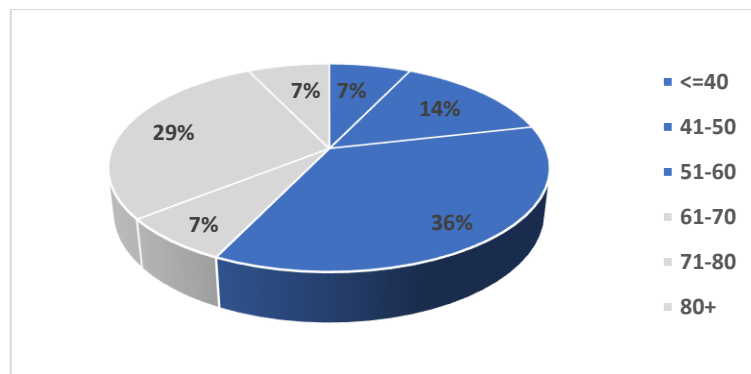
(γ) Για τους ασθενείς με ΠΜΙ, η πρόσφατη βιβλιογραφία (Tefferi et al το 2020) αναφέρει ένα ποσοστό της τάξεως του 65%,⁽⁷⁾ αλλά και σε παλαιότερες εργασίες (Larsen et al το 2007) αναφέρεται περίπου ίδιο ποσοστό (67%)⁽¹⁰⁰⁾. Δεν μπορεί όμως να γίνει σύγκριση με το ποσοστό (100%) της παρούσας εργασίας γιατί υπήρχαν μόνο δύο περιστατικά στο δείγμα μας.

- II. Σχετικά με την παράμετρο του φύλου στην εμφάνιση των MYN αλλά και της μετάλλαξης JAK2V617F, στο δείγμα της παρούσας εργασίας δεν παρατηρήθηκε ιδιαίτερη διαφοροποίηση, εκτός από μια μικρή υπεροχή στις γυναίκες (55%) με ΙΘ (βλ. Γράφημα 4). Σε μια μεγάλη επιδημιολογική μελέτη στις Ηνωμένες Πολιτείες (2001 έως 2012), ο Srouf et al, το 2016 μεταξύ άλλων αναφέρουν ότι εκτός από την ΙΘ, τα συνολικά ποσοστά επίπτωσης (incidence rates, IRs) στα MYN είναι υψηλότερα στους άνδρες.⁽¹⁰¹⁾ Ο Stein et al, το 2010 επίσης αναφέρουν μεταξύ άλλων, ότι οι γυναίκες έχουν σημαντικά χαμηλότερα φορτία αλληλίων JAK2V617F από τους άνδρες και ότι το φύλο είναι ένας ανεξάρτητος παράγοντας στον υπολογισμό της νόσου γιατί μπορεί να επηρεάσει το γονότυπο ή/και την έκφραση του κλώνου.⁽¹⁰²⁾ Να σημειωθεί ότι δεν μπορεί να γίνει ιδιαίτερη αξιολόγηση για τους ασθενείς με ΠΜΙ γιατί είναι μόνο 2 περιστατικά.
- III. Το ποσοστό θετικότητας της μετάλλαξης του γονιδίου CALR (10%) στους ασθενείς με ΙΘ είναι μικρότερο από αυτό που αναφέρεται στις διεθνείς αναφορές (15-20%, βλ. Πίνακας 1). Οι Cazzola & Kralovics το 2014, αναφέρουν ακόμα μεγαλύτερο ποσοστό (20-25%) και υποδεικνύουν ότι το CALR αποτελεί το δεύτερο πιο συχνό μεταλλαγμένο γονίδιο στις MYN⁽⁴⁹⁾. Το ίδιο ποσοστό (22,5%) αναφέρει και ο Chen et al (2014),⁽¹⁰³⁾ αλλά και ο Palandri et al (2015)⁽¹⁰⁴⁾ σε μια αναφορά του για νέους ασθενείς με ΙΘ αναφέρει ποσοστό 24%. Αυτή η διαφορά βέβαια είναι απόλυτα δικαιολογημένη γιατί ο συγκεκριμένος έλεγχος δεν είχε καθιερωθεί από την αρχή της δεκαετίας ελέγχου του δείγματος της εργασίας. Η μη συνύπαρξη μεταλλάξεων δεν μπορεί να αξιολογηθεί περεταίρω, θα πρέπει όμως να αναφερθεί ότι πολυκεντρικές μελέτες υποδεικνύουν πως η συσσώρευση μεταλλάξεων (≥ 2 μεταλλάξεις) σε συγκεκριμένα γονίδια συσχετίζεται σημαντικά με πτωχή πρόγνωση και χαμηλότερα ποσοστά επιβίωσης σε σχέση με ασθενείς που φέρουν μία ή καμία μετάλλαξη⁽⁴⁸⁾⁽¹⁰⁵⁾. Επίσης είναι γνωστό, πώς οι ασθενείς με μεταλλάξεις JAK2, όπως επίσης και οι τριπλά αρνητικοί ασθενείς (JAK2, MPL, CALR) έχουν

χειρότερη επιβίωση συγκριτικά με τους CALR θετικούς ασθενείς⁽¹⁰⁶⁾. Τέλος η καταγραφή των αυξημένων επιπέδων στις τιμές των αιμοπεταλίων, καθώς και οι χαμηλότερες τιμές αιματοκρίτη και λευκών αιμοσφαιρίων συγκριτικά με τους ασθενείς που ήταν θετικοί για τη μετάλλαξη JAK2V617F δεν μπορούν να αξιολογηθούν γιατί ο συγκεκριμένος αριθμός ασθενών ήταν μικρός (n=3).

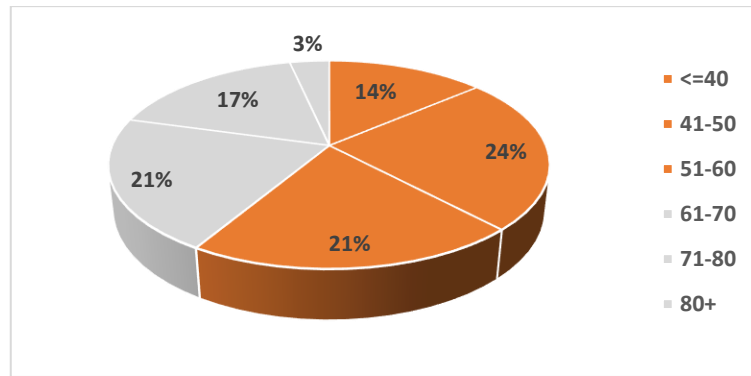
- IV. Σχετικά με το πόσοι ασθενείς του δείγματος πληρούσαν τα εργαστηριακά κριτήρια (ποσοστό 87%) θα πρέπει να σημειωθεί ότι ο συγκεκριμένος έλεγχος έγινε με τα κριτήρια του Π.Ο.Υ του 2016 ενώ το δείγμα εργασίας είναι από το 2011. Επίσης η διάγνωση θα μπορούσε να είχε τεθεί και με διαφορετικά κριτήρια όπως για παράδειγμα αυτά της Βρετανικής Επιτροπής Πρότυπωσης⁽¹⁰⁷⁾⁽¹⁰⁸⁾⁽¹⁰⁹⁾
- V. Παρατηρώντας την κατανομή της ηλικίας των ασθενών κατά τη διάγνωση της νόσου αξίζει να αναφερθεί ότι:

(α) Η διάμεση ηλικία των ασθενών με ΑΠ είναι τα 59 έτη (26-83), στοιχείο παρόμοιο με αυτά των διεθνών αναφορών, ο Tefferi et al, το 2013 αναφέρει τα 61 έτη.⁽¹¹⁰⁾ Κάνοντας την υπόθεση ότι έχουμε ίσες διασπορές και εφαρμόζοντας t-test βρίσκουμε επίπεδο σημαντικότητας $p = 0.7338 > 0.05$, άρα οι μέσες τιμές δεν έχουν διαφορά. Από τους 14 ασθενείς με ΑΠ όμως οι n= 8, (57%) ήταν ηλικίας <60 ετών όταν έγινε η αρχική διάγνωση της νόσου. (βλ.Γράφημα 15), παρατηρούμε αντίθετη τάση από τις διεθνείς αναφορές, ότι η διάγνωση δηλαδή της ΑΠ γίνεται συνήθως σε άτομα άνω των 60 ετών⁽⁹⁾.



Γράφημα 15: Κατανομή ασθενών με ΑΠ σύμφωνα με τη ηλικία τους κατά τη διάγνωση.

(β) Η διάμεση ηλικία των ασθενών με ΙΘ είναι τα 58 έτη (33-85). Το ίδιο αναφέρει μεταξύ άλλων και ο Tefferi et al (2017)⁽¹¹¹⁾ Υποθέτοντας επίσης ίσες διασπορές και εφαρμόζοντας t-test βρίσκουμε επίπεδο σημαντικότητας $p = 0.6533 > 0.05$, άρα οι μέσες τιμές δεν έχουν διαφορά. Παρατηρούμε επίσης ότι από τους 29 ασθενείς με ΙΘ οι n=17, (59%) ήταν άτομα <60 ετών (βλ. Γράφημα 16), όταν έγινε η αρχική διάγνωση, ποσοστό που βρίσκουμε και στις διεθνείς αναφορές⁽¹¹²⁾.



Γράφημα 16: : Κατανομή ασθενών με Ιθ σύμφωνα με τη ηλικία τους κατά τη διάγνωση

- VI. Σχετικά με την εξέλιξη των νοσημάτων παρατηρήθηκαν ποσοστά λίγο μικρότερα από αυτά των διεθνών αναφορών. Για την ΑΠ είδαμε ποσοστό 7% των ασθενών να εξελίσσεται σε ΠΜΙ ενώ ο Tefferi et al (2013) αναφέρει ποσοστό 9% σε μελέτη 1545 ασθενών.⁽¹¹⁰⁾ Βέβαια ο Passamonti et al (2004) σε παλαιότερη συγκεντρωτική μελέτη ετών αναφέρει ένα ποσοστό 7,8%⁽¹¹³⁾. Για την Ιθ τα ποσοστά των διεθνών αναφορών είναι μικρότερα για παράδειγμα στη ίδια αναφορά του Passamonti et al (2004) καταγράφεται ποσοστό 3,4%⁽¹¹³⁾. Η Wolanskyj A et al (2006) επίσης σε μελέτη ετών αναφέρει ποσοστό 9,1%⁽¹¹⁴⁾. Να σημειωθεί ότι οι αναφορές είναι για την πρώτη δεκαετία της νόσου, γιατί στη δεύτερη ή στην τρίτη δεκαετία τα ποσοστά μπορεί να αυξηθούν αρκετά.
- VII. Από τα εργαστηριακά δεδομένα των γενικών αίματος (διάγνωσης και τελευταίας) καταγράφηκε:
- (α) Από τις συγκρίσεις των τιμών των λευκών αιμοσφαιρίων σε όλους τους ασθενείς βρέθηκε διαφορά μεταξύ της πρώτης και της τελευταίας γενικής, $WBC = -2,18 \times 10^9/L$ (SE 0.70) με $p = 0.0032$. Ειδικότερα για τους JAK2 θετικούς ασθενείς είχαμε πτώση της τιμής, $WBC = -2,72 \times 10^9/L$ (SE 0.88) με $p = 0.0039$, ενώ για τους JAK2 αρνητικούς ασθενείς είχαμε πτώση της τιμής, $WBC = -0,34 \times 10^9/L$ (SE 0.42) με $p = 0.4482 > 0.05$ (βλ. Πίνακας 7). Θα μπορούσαμε να πούμε ότι οι JAK2 θετικοί ασθενείς ανταποκρίνονται καλύτερα στη θεραπεία τους (σε σχέση με τη τιμή των λευκών αιμοσφαιρίων), παρά το ότι η μετάλλαξη JAK2V617F μπορεί να ενισχύσει την αλληλεπίδρασή τους με το ενδοθήλιο, ιδιαίτερα σε σημεία φλεγμονής ή τραυματισμού, αυξάνοντας έτσι τον κίνδυνο θρόμβωσης.⁽⁸³⁾⁽⁸⁵⁾
- (β) Από τις συγκρίσεις των τιμών αιμοσφαιρίνης και αιματοκρίτη δεν παρατηρείται κάτι το ιδιαίτερο ανάμεσα σε JAK2 θετικούς και αρνητικούς ασθενείς. Αντίθετα παρατηρείται μια διαφοροποίηση στην τιμή των αιμοπεταλίων που εντοπίστηκε περισσότερο στους ασθενείς με Ιθ και γίνεται ιδιαίτερο σχολιασμός παρακάτω (ε).
- (γ) Στους ασθενείς με ΑΠ, πτώση της τιμής της αιμοσφαιρίνης (βλ. Γράφημα 6). Εφαρμόζοντας t-test είχαμε αναμενόμενη διαφορά στην τιμή της Hb = $-2,8 \text{ gr/dl}$ (SE 0,81), με

- ανταπόκριση στη θεραπεία ($p = 0.0041$). Αντίστοιχα είχαμε και πτώση της τιμής του αιματοκρίτη (βλ. Γράφημα 7/Γράφημα 6). Εφαρμόζοντας t-test είχαμε αναμενόμενη διαφορά στην τιμή του Hct = $-8,6\%$ (SE 2,34), με ανταπόκριση στη θεραπεία τους ($p = 0.0028$).
- (δ) Στους ασθενείς με ΙΘ, πτώση της τιμής των αιμοπεταλίων (βλ. Γράφημα 8). Εφαρμόζοντας t-test είχαμε αναμενόμενη διαφορά στην τιμή των PLT = $-160 \times 10^9/L$ (SE 58), με ανταπόκριση στη θεραπεία ($p = 0.0106$).
- (ε) Από τη σύγκριση των τιμών των αιμοπεταλίων στους JAK2 θετικούς ασθενείς με ΙΘ ($n=21$) με αυτές των JAK2 αρνητικών ασθενών με ΙΘ ($n=8$), βρέθηκε ότι ενώ και οι δύο ομάδες είχαν την αναμενόμενη πτώση οι JAK2 θετικοί ασθενείς ανταποκρίνονται καλύτερα στη θεραπεία τους (σε σχέση με τη τιμή των αιμοπεταλίων). Ειδικότερα εφαρμόζοντας t-test στην πρώτη ομάδα (JAK2 θετικοί) η διαφορά ήταν PLT = $-188 \times 10^9/L$ (SE 61) με $p = 0.0061$, ενώ στη δεύτερη ομάδα (JAK2 αρνητικοί) η διαφορά ήταν PLT = $-86 \times 10^9/L$ (SE 142) με $p = 0.5628 > 0.05$. Βέβαια από διεθνείς αναφορές δεν έχει σημειωθεί άμεση συσχέτιση του αριθμού των αιμοπεταλίων ή της τιμής της αιμοσφαιρίνης και της θετικότητας της μετάλλαξης JAK2V617F στους ασθενείς με ΙΘ⁽¹¹⁵⁾. Αυτό που έχει αναφερθεί για τους συγκεκριμένους ασθενείς είναι η αύξηση της σελεκτίνης P που οδηγεί σε συσσώρευση αιμοπεταλίων – ουδετερόφιλων συμβάλλοντας σε υψηλότερο κίνδυνο θρόμβωσης⁽¹¹⁶⁾. Ένα άλλο στοιχείο που χρήζει προσοχής είναι ότι όσοι ασθενείς διαγνώστηκαν με ΙΘ και δεν είχαν θρομβοκυττάρωση ($\geq 450 \times 10^9/L$) ήταν όλοι άνδρες.

2.5 Συμπεράσματα

Οι MYN αποτελούν ετερογενείς κατηγορίες κλινικών διαταραχών της αιμοποίησης και μέχρι πρόσφατα η διάγνωση και η πρόγνυσή τους βασίζονταν σε κυτταρολογικά χαρακτηριστικά, αναλύσεις καρυότυπου και ανιχνεύσεις μοριακών βλαβών στο γονίδιο JAK2.

Το δείγμα της εργασίας ήταν αντιπροσωπευτικό των νοσημάτων διερεύνησης, αν και η προέλευσή του ήταν αποκλειστικά από το εργαστήριο μιας αιματολογικής κλινικής.

Τα αποτελέσματα έδειξαν παρεμφερή στοιχεία με αυτά πολλών διεθνών συγκεντρωτικών αναφορών τόσο στη διάγνωση αλλά και στη εξέλιξη των συγκεκριμένων νοσημάτων. Σίγουρα το μέγεθος και το είδος της εργασίας δεν μπορεί να καταδείξει εξειδικευμένα στοιχεία για τη διάγνωση ή την εξέλιξη των συγκεκριμένων νοσημάτων.

Με δεδομένο ότι σήμερα τα κλινικοδιαγνωστικά εργαστήρια ανιχνεύουν ταυτόχρονα μεταλλάξεις σε πληθώρα γονιδίων, οι διαφοροποιήσεις που καταγράφηκαν στην παρούσα εργασία σε σχέση με την ειδικότητα διάκρισης, ιδιαίτερα της ΙΘ σε σχέση με την θετικότητα της

μετάλλαξης JAK2, επιβεβαιώνουν την ανάγκη ανίχνευσης μεταλλάξεων και σε άλλα στα γονίδια (ASXL1, DNMT3A, IDH1 και IDH2).

Αυτό το στοιχείο συνιστά και την δυνητική ενσωμάτωσή της ανίχνευσης μεταλλάξεων και άλλων γονιδίων στο διαγνωστικό αλγόριθμο της μυελοϊνωσης, ή και σε αυτόν άλλων νεοπλασιών της μυελικής σειράς (ΜΔΣ, ΜΔΣ/ΜΥΝ, ΟΜΛ), αφού μάλιστα παρέχει σημαντικές πληροφορίες σχετικά με την πρόγνωση και εξέλιξη αυτών των νοσημάτων.

Αναφορές

1. Lucet IS, Fantino E, Styles M, Bamert R, Patel O, Broughton SE, et al. The structural basis of Janus kinase 2 inhibition by a potent and specific pan-Janus kinase inhibitor. 2006; Available from: <http://ashpublications.org/blood/article-pdf/107/1/176/1279716/zh800106000176.pdf>
2. Neubauer H, Cumano A, Müller M, Wu H, Huffstadt U, Pfeffer K. Jak2 deficiency defines an essential developmental checkpoint in definitive hematopoiesis. *Cell*. 1998;93(3):397–409.
3. Baxter EJ, Scott LM, Campbell PJ, East C, Fourouclas N, Swanton S, et al. Acquired mutation of the tyrosine kinase JAK2 in human myeloproliferative disorders. *Lancet*. 2005 Mar 19;365(9464):1054–61.
4. Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, Thiele J, Borowitz MJ, Le Beau MM, et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood*. 2016;127(20):2391–405.
5. Arber DA, Orazi A, Hasserjian R. Errata: The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia (*Blood* (2016) 127, 20 (2391-2405)). *Blood*. 2016.
6. Guglielmelli P, Vannucchi AM. Current management strategies for polycythemia vera and essential thrombocythemia. Vol. 42, *Blood Reviews*. Churchill Livingstone; 2020.
7. Tefferi A, Barbui T. Polycythemia vera and essential thrombocythemia: 2021 update on diagnosis, risk-stratification and management. *Am J Hematol*. 2020 Dec 1;95(12):1599–613.
8. Vannucchi AM, Antonioli E, Guglielmelli P, Pardanani A, Tefferi A. Clinical correlates of JAK2V617F presence or allele burden in myeloproliferative neoplasms: A critical reappraisal. Vol. 22, *Leukemia*. Nature Publishing Group; 2008. p. 1299–307.
9. Λουκόπουλος Δ, Πολίτη Μ. ΜΑΘΗΜΑΤΑ ΑΙΜΑΤΟΛΟΓΙΑΣ Βοήθημα για το κεφάλαιο της Αιματολογίας στην Παθολογία, και τα μαθήματα επιλογής Αιματολογία-Αιμόσταση-Ιατρική των Μεταγγίσεων [Internet]. 2015. Available from: www.kallipos.gr
10. Mossuz P, Girodon F, Donnard M, Latger-Cannard V, Dobo I, Boiret N, et al. Diagnostic value of serum erythropoietin level in patients with absolute erythrocytosis. *Haematologica*. 2004 Oct;89(10).
11. Szuber N, Lavu S, Mudireddy M, Nicolosi M, Penna D, Vallapureddy RR, et al. Serum erythropoietin levels in essential thrombocythemia: phenotypic and prognostic correlates. *Blood Cancer Journal*. 2018.
12. Lundberg P, Karow A, Nienhold R, Looser R, Hao-Shen H, Nissen I, et al. Clonal evolution and clinical correlates of somatic mutations in myeloproliferative neoplasms. *Blood*. 2014;
13. Γιαννόπουλος Α. Μελέτη των μοριακών διαταραχών του επιγενετικού μηχανισμού ρύθμισης των κυττάρων στην παθογένεια των μυελοϋπερπλαστικών νεοπλασιών.

ЕКПА; 2019.

14. Prchal JT. Classification and molecular biology of polycythemia (erythrocytoses) and thrombocytosis. *Hematology/Oncology Clinics of North America*. 2003.
15. Kralovics R, Guan Y, Prchal JT. Acquired uniparental disomy of chromosome 9p is a frequent stem cell defect in polycythemia vera. *Exp Hematol*. 2002;
16. Kralovics R, Passamonti F, Buser AS, Teo S-S, Tiedt R, Passweg JR, et al. A Gain-of-Function Mutation of JAK2 in Myeloproliferative Disorders. *N Engl J Med*. 2005;
17. James C, Ugo V, Casadevall N, Constantinescu SN, Vainchenker W. A JAK2 mutation in myeloproliferative disorders: Pathogenesis and therapeutic and scientific prospects. *Trends in Molecular Medicine*. 2005.
18. Levine RL, Wadleigh M, Cools J, Ebert BL, Wernig G, Huntly BJP, et al. Activating mutation in the tyrosine kinase JAK2 in polycythemia vera, essential thrombocythemia, and myeloid metaplasia with myelofibrosis. *Cancer Cell*. 2005;
19. Jatiani SS, Baker SJ, Silverman LR, Premkumar Reddy E. JAK/STAT pathways in cytokine signaling and myeloproliferative disorders: Approaches for targeted therapies. *Genes and Cancer*. 2010;1(10):979–93.
20. Fisher JW. Erythropoietin: Physiology and pharmacology update. *Experimental Biology and Medicine*. 2003.
21. Girodon F, Lippert E, Mossuz P, Dobo I, Boiret-Dupré N, Lesesve JF, et al. JAK2V617F detection and dosage of serum erythropoietin: First steps of the diagnostic work-up for patients consulting for elevated hematocrit. *Haematologica*. 2007;
22. Zhang Y, Wang L, Dey S, Alnaeeli M, Suresh S, Rogers H, et al. Erythropoietin action in stress response, tissue maintenance and metabolism. *Int J Mol Sci*. 2014;15(6):10296–333.
23. Yamaoka K, Saharinen P, Pesu M, Et V, Iii H, Silvennoinen O, et al. Protein family review The Janus kinases (Jaks). 2004;
24. Ghoreschi K, Laurence A, O’Shea JJ. Janus kinases in immune cell signaling. *Immunol Rev*. 2009;
25. Murray PJ. The JAK-STAT Signaling Pathway: Input and Output Integration. *J Immunol*. 2007;
26. Lavens D, Montoye T, Piessevaux J, Zabeau L, Vandekerchove J, Gevaert K, et al. A complex interaction pattern of CIS and SOCS2 with the leptin receptor. *J Cell Sci*. 2006 Jun 1;119(11):2214–24.
27. Vannucchi AM, Pancrazzi A, Bogani C, Antonioli E, Guglielmelli P. A quantitative assay for JAK2V617F mutation in myeloproliferative disorders by ARMS-PCR and capillary electrophoresis. *Leukemia*. 2006;20(6):1055–60.
28. Jones A V., Kreil S, Zoi K, Waghorn K, Curtis C, Zhang L, et al. Widespread occurrence of the JAK2 V617F mutation in chronic myeloproliferative disorders. *Blood*. 2005;
29. Antonioli et al. Influence of JAK2V617F allele burden on phenotype in essential

- thrombocythemia. *Haematologica*. 2008;
30. Kittur J, Knudson RA, Lasho TL, Finke CM, Gangat N, Wolanskyj AP, et al. Clinical correlates of JAK2V617F allele burden in essential thrombocythemia. *Cancer*. 2007;
 31. Campbell PJ, Scott LM, Buck G, Wheatley K, East CL, Marsden JT, et al. Definition of subtypes of essential thrombocythaemia and relation to polycythaemia vera based on JAK2 V617F mutation status: A prospective study. *Lancet*. 2005;
 32. Barosi G, Bergamaschi G, Marchetti M, Vannucchi AM, Guglielmelli P, Antonioli E, et al. JAK2 V617F mutational status predicts progression to large splenomegaly and leukemic transformation in primary myelofibrosis. *Blood*. 2007;
 33. Tremblay D, Sokol K, Bhalla S, Rampal R, Mascarenhas JO. Implications of mutation profiling in myeloid malignancies: Part 1: Myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemia. *Oncol (United States)*. 2018;
 34. Scott LM, Tong W, Levine RL, Scott MA, Beer PA, Stratton MR, et al. JAK2 Exon 12 Mutations in Polycythemia Vera and Idiopathic Erythrocytosis. *N Engl J Med*. 2007;
 35. Gong JZ, Cook JR, Greiner TC, Hedvat C, Hill CE, Lim MS, et al. Laboratory practice guidelines for detecting and reporting JAK2 and MPL mutations in myeloproliferative neoplasms: A report of the association for molecular pathology. *J Mol Diagnostics [Internet]*. 2013;15(6):733–44. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jmoldx.2013.07.002>
 36. Williams DM, Kim AH, Rogers O, Spivak JL, Moliterno AR. Phenotypic variations and new mutations in JAK2 V617F-negative polycythemia vera, erythrocytosis, and idiopathic myelofibrosis. *Exp Hematol*. 2007;
 37. Martínez-Avilés L, Besses C, Álvarez-Larrán A, Cervantes F, Hernández-Boluda JC, Bellosillo B. JAK2 exon 12 mutations in polycythemia vera or idiopathic erythrocytosis. *Haematologica*. 2007;
 38. Scott LM. The JAK2 exon 12 mutations: A comprehensive review. *American Journal of Hematology*. 2011.
 39. Boissinot M, Lippert E, Girodon F, Dobo I, Fouassier M, Masliah C, et al. Latent myeloproliferative disorder revealed by the JAK2-V617F mutation and endogenous megakaryocytic colonies in patients with splanchnic vein thrombosis [1]. *Blood*. 2006.
 40. Bellanné-Chantelot C, Chaumarel I, Labopin M, Bellanger F, Barbu V, De Toma C, et al. Genetic and clinical implications of the Val617Phe JAK2 mutation in 72 families with myeloproliferative disorders. *Blood*. 2006;
 41. Vainchenker W, Delhommeau F, Constantinescu SN, Bernard OA. New mutations and pathogenesis of myeloproliferative neoplasms. *Blood*. 2011.
 42. Souyri M, Vigon I, Penciolelli JF, Heard JM, Tambourin P, Wendling F. A putative truncated cytokine receptor gene transduced by the myeloproliferative leukemia virus immortalizes hematopoietic progenitors. *Cell*. 1990;
 43. He X, Chen Z, Jiang Y, Qiu X, Zhao X. Different mutations of the human c-mpl gene indicate distinct haematopoietic diseases. *Journal of Hematology and Oncology*. 2013.

44. Bennett M, Stroncek DF. Recent advances in the bcr-abl negative chronic myeloproliferative diseases. *Journal of Translational Medicine*. 2006.
45. Pardanani AD, Levine RL, Lasho T, Pikman Y, Mesa RA, Wadleigh M, et al. MPL515 mutations in myeloproliferative and other myeloid disorders: A study of 1182 patients. *Blood*. 2006;
46. Guglielmelli P, Pancrazzi A, Bergamaschi G, Rosti V, Villani L, Antonioli E, et al. Anaemia characterises patients with myelofibrosis harbouring Mpl W515L/K mutation. *Br J Haematol*. 2007;
47. Klampfl T, Gisslinger H, Harutyunyan AS, Nivarthi H, Rumi E, Milosevic JD, et al. Somatic Mutations of Calreticulin in Myeloproliferative Neoplasms. *N Engl J Med*. 2013;
48. Nangalia J, Massie CE, Baxter EJ, Nice FL, Gundem G, Wedge DC, et al. Somatic CALR Mutations in Myeloproliferative Neoplasms with Nonmutated JAK2 . *N Engl J Med*. 2013;
49. Cazzola M, Kralovics R. From Janus kinase 2 to calreticulin: The clinically relevant genomic landscape of myeloproliferative neoplasms. *Blood*. 2014;
50. Araki M, Yang Y, Masubuchi N, Hironaka Y, Takei H, Morishita S, et al. Activation of the thrombopoietin receptor by mutant calreticulin in CALR-mutant myeloproliferative neoplasms. *Blood*. 2016;
51. Cazzola M. Mutant calreticulin: When a chaperone becomes intrusive. *Blood*. 2016.
52. Patnaik MM, Tefferi A. Cytogenetic and molecular abnormalities in chronic myelomonocytic leukemia. *Blood Cancer Journal*. 2016.
53. Merlinsky TR, Levine RL, Pronier E. Unfolding the role of calreticulin in myeloproliferative neoplasm pathogenesis. *Clinical Cancer Research*. 2019.
54. Tahiliani M, Koh KP, Shen Y, Pastor WA, Bandukwala H, Brudno Y, et al. Conversion of 5-methylcytosine to 5-hydroxymethylcytosine in mammalian DNA by MLL partner TET1. *Science (80-)*. 2009;
55. Cross NCP. Genetic and epigenetic complexity in myeloproliferative neoplasms. *Hematology / the Education Program of the American Society of Hematology*. American Society of Hematology. Education Program. 2011.
56. Zoi K, Cross NCP. Molecular pathogenesis of atypical CML, CMML and MDS/MPN-unclassifiable. *Int J Hematol*. 2015;101(3):229–42.
57. Maxson JE, Tyner JW. Genomics of chronic neutrophilic leukemia. *Blood*. 2017.
58. Brecqueville M, Rey J, Devillier R, Guille A, Gillet R, Adélaïde J, et al. Array comparative genomic hybridization and sequencing of 23 genes in 80 patients with myelofibrosis at chronic or acute phase. *Haematologica*. 2014;
59. Soucie E, Hanssens K, Mercher T, Georgin-Lavialle S, Damaj G, Livideanu C, et al. In aggressive forms of mastocytosis, TET2 loss cooperates with c-KITD816V to transform mast cells. *Blood*. 2012;
60. Larsson CA, Cote G, Quintás-Cardama A. The changing mutational landscape of acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome. *Molecular Cancer*

Research. 2013.

61. Solary E, Bernard OA, Tefferi A, Fuks F, Vainchenker W. The Ten-Eleven Translocation-2 (TET2) gene in hematopoiesis and hematopoietic diseases. *Leukemia*. 2014.
62. Walter MJ, Ding L, Shen D, Shao J, Grillot M, McLellan M, et al. Recurrent DNMT3A mutations in patients with myelodysplastic syndromes. *Leukemia*. 2011;
63. Koya J, Kataoka K, Sato T, Bando M, Kato Y, Tsuruta-Kishino T, et al. DNMT3A R882 mutants interact with polycomb proteins to block haematopoietic stem and leukaemic cell differentiation. *Nat Commun*. 2016;
64. Ward PS, Patel J, Wise DR, Abdel-Wahab O, Bennett BD, Collier HA, et al. The Common Feature of Leukemia-Associated IDH1 and IDH2 Mutations Is a Neomorphic Enzyme Activity Converting α -Ketoglutarate to 2-Hydroxyglutarate. *Cancer Cell*. 2010;
65. Gaidzik VI, Paschka P, Späth D, Habdank M, Köhne CH, Germing U, et al. TET2 mutations in Acute Myeloid Leukemia (AML): Results from a comprehensive genetic and clinical analysis of the AML study group. *J Clin Oncol*. 2012;30(12):1350–7.
66. Yang H, Kurtenbach S, Guo Y, Lohse I, Durante MA, Li J, et al. Gain of function of ASXL1 truncating protein in the pathogenesis of myeloid malignancies. *Blood*. 2018;
67. Kitamura T. ASXL1 mutations gain a function. *Blood*. 2018.
68. Gelsi-Boyer V, Trouplin V, Adélaïde J, Bonansea J, Cervera N, Carbuccioni N, et al. Mutations of polycomb-associated gene ASXL1 in myelodysplastic syndromes and chronic myelomonocytic leukaemia. *Br J Haematol*. 2009;
69. Boultonwood J, Perry J, Pellagatti A, Fernandez-Mercado M, Fernandez-Santamaria C, Calasanz MJ, et al. Frequent mutation of the polycomb-associated gene ASXL1 in the myelodysplastic syndromes and in acute myeloid leukemia. *Leukemia*. 2010.
70. Guglielmelli P, Biamonte F, Score J, Hidalgo-Curtis C, Cervantes F, Maffioli M, et al. EZH2 mutational status predicts poor survival in myelofibrosis. *Blood*. 2011;
71. Vannucchi AM, Lasho TL, Guglielmelli P, Biamonte F, Pardanani A, Pereira A, et al. Mutations and prognosis in primary myelofibrosis. *Leukemia*. 2013;
72. Elliott MA, Pardanani A, Hanson CA, Lasho TL, Finke CM, Belachew AA, et al. ASXL1 mutations are frequent and prognostically detrimental in CSF3R-mutated chronic neutrophilic leukemia. *Am J Hematol*. 2015;
73. Tefferi A, Wassie EA, Lasho TL, Finke C, Belachew AA, Ketterling RP, et al. Calreticulin mutations and long-term survival in essential thrombocythemia. *Leukemia*. 2014;
74. Papaemmanuil E, Cazzola M, Boultonwood J, Malcovati L, Vyas P, Bowen D, et al. Somatic SF3B1 Mutation in Myelodysplasia with Ring Sideroblasts. *N Engl J Med*. 2011;
75. Broséus J, Alpermann T, Wulfert M, Florensa Brichs L, Jeromin S, Lippert E, et al.

- Age, JAK2 V617F and SF3B1 mutations are the main predicting factors for survival in refractory anaemia with ring sideroblasts and marked thrombocytosis. *Leukemia*. 2013;
76. Jeromin S, Haferlach T, Grossmann V, Alpermann T, Kowarsch A, Haferlach C, et al. High frequencies of SF3B1 and JAK2 mutations in refractory anemia with ring sideroblasts associated with marked thrombocytosis strengthen the assignment to the category of myelodysplastic/myeloproliferative neoplasms. *Haematologica*. 2013.
 77. Kim E, Ilagan JO, Liang Y, Daubner GM, Lee SCW, Ramakrishnan A, et al. SRSF2 Mutations Contribute to Myelodysplasia by Mutant-Specific Effects on Exon Recognition. *Cancer Cell*. 2015;
 78. Graubert TA, Shen D, Ding L, Okeyo-Owuor T, Lunn CL, Shao J, et al. Recurrent mutations in the U2AF1 splicing factor in myelodysplastic syndromes. *Nat Genet*. 2012;
 79. Przychodzen B, Jerez A, Guinta K, Sekeres MA, Padgett R, Maciejewski JP, et al. Patterns of missplicing due to somatic U2AF1 mutations in myeloid neoplasms. *Blood*. 2013;
 80. Makishima H, Visconte V, Sakaguchi H, Jankowska AM, Kar SA, Jerez A, et al. Mutations in the spliceosome machinery, a novel and ubiquitous pathway in leukemogenesis. *Blood*. 2012;
 81. Saez B, Walter MJ, Graubert TA. Splicing factor gene mutations in hematologic malignancies. *Blood*. 2017.
 82. Hong JY, Seo JY, Kim SH, Jung HA, Park S, Kim K, et al. Mutations in the spliceosomal machinery genes SRSF2, U2AF1, and ZRSR2 and response to decitabine in myelodysplastic syndrome. *Anticancer Res*. 2015;
 83. Meggendorfer M, Haferlach T, Alpermann T, Jeromin S, Haferlach C, Kern W, et al. Specific molecular mutation patterns delineate chronic neutrophilic leukemia, atypical chronic myeloid leukemia, and chronic myelomonocytic leukemia. *Haematologica*. 2014.
 84. Langabeer SE, Andrikovics H, Asp J, Bellosillo B, Carillo S, Haslam K, et al. Molecular diagnostics of myeloproliferative neoplasms. *European Journal of Haematology*. 2015.
 85. Padron E. Surveying the landscape of MDS/MPN research: Overlap among the overlap syndromes? *Hematol (United States)*. 2015;2015(1):349–54.
 86. Clara JA, Sallman DA, Padron E. Clinical management of myelodysplastic syndrome/myeloproliferative neoplasm overlap syndromes. *Cancer Biol Med*. 2016;13(3):360–72.
 87. Tefferi A, Finke CM, Lasho TL, Hanson CA, Ketterling RP, Gangat N, et al. U2AF1 mutation types in primary myelofibrosis: phenotypic and prognostic distinctions. *Leukemia*. 2018;
 88. DAMESHEK W. Some speculations on the myeloproliferative syndromes. *Blood*. 1951;

89. Tefferi A, Vardiman JW. Classification and diagnosis of myeloproliferative neoplasms: The 2008 World Health Organization criteria and point-of-care diagnostic algorithms. *Leukemia*. 2008.
90. Jamal R, Bélisle C, Lessard MC, Hébert J, Roy DC, Levine R, et al. Evidence suggesting the presence of a stem cell clone anteceding the acquisition of the JAK2-V617F mutation. *Leukemia*. 2008.
91. Newton CR, Graham A, Heptinstall LE, Powell SJ, Summers C, Kalsheker N, et al. Analysis of any point mutation in DNA. The amplification refractory mutation system (ARMS). *Nucleic Acids Res*. 1989;
92. Hu PC, Hegde MR, Lennon PA. Modern clinical molecular techniques. *Modern Clinical Molecular Techniques*. 2013.
93. Landsverk ML, Wong LJC. Clinical molecular diagnostic techniques: A brief review. In: *Next Generation Sequencing: Translation to Clinical Diagnostics*. 2013.
94. Steensma DP. JAK2 V617F in myeloid disorders: Molecular diagnostic techniques and their clinical utility: A paper from the 2005 William Beaumont Hospital Symposium on Molecular Pathology. *Journal of Molecular Diagnostics*. 2006.
95. McClure R, Mai M, Lasho T. Validation of two clinically useful assays for evaluation of JAK2 V617F mutation in chronic myeloproliferative disorders [16]. *Leukemia*. 2006.
96. Zipper H, Brunner H, Bernhagen J, Vitzthum F. Investigations on DNA intercalation and surface binding by SYBR Green I, its structure determination and methodological implications. *Nucleic Acids Res*. 2004;
97. Pardanani A, Lasho TL, Finke C, Hanson CA, Tefferi A. Prevalence and clinicopathologic correlates of JAK2 exon 12 mutations in JAK2V617F-negative polycythemia vera. *Leukemia*. 2007;
98. Antonioli E, Guglielmelli P, Pancrazzi A, Bogani C, Verrucci M, Ponziani V, et al. Clinical implications of the JAK2 V617F mutation in essential thrombocythemia [7]. *Leukemia*. 2005.
99. Lippert E, Boissinot M, Kralovics R, Girodon F, Dobo I, Praloran V, et al. The JAK2-V617F mutation is frequently present at diagnosis in patients with essential thrombocythemia and polycythemia vera. *Blood*. 2006;
100. Larsen TS, Pallisgaard N, Møller MB, Hasselbalch HC. The JAK2 V617F allele burden in essential thrombocythemia, polycythemia vera and primary myelofibrosis - Impact on disease phenotype. *Eur J Haematol*. 2007;
101. Srour SA, Devesa SS, Morton LM, Check DP, Curtis RE, Linet MS, et al. Incidence and patient survival of myeloproliferative neoplasms and myelodysplastic/myeloproliferative neoplasms in the United States, 2001–12. *Br J Haematol*. 2016;
102. Stein BL, Williams DM, Wang NY, Rogers O, Isaacs MA, Pemmaraju N, et al. Sex differences in the JAK2V617F allele burden in chronic myeloproliferative disorders. *Haematologica*. 2010;
103. Chen CC, Gau JP, Chou HJ, You JY, Huang CE, Chen YY, et al. Frequencies, clinical

- characteristics, and outcome of somatic CALR mutations in JAK2-unmutated essential thrombocythemia. *Ann Hematol.* 2014;
104. Palandri F, Latagliata R, Polverelli N, Tieghi A, Crugnola M, Martino B, et al. Mutations and long-term outcome of 217 young patients with essential thrombocythemia or early primary myelofibrosis. *Leukemia.* 2015;
 105. Ganguly BB, Kadam NN. Mutations of myelodysplastic syndromes (MDS): An update. *Mutation Research - Reviews in Mutation Research.* 2016.
 106. Bartels S, Lehmann U, Büsche G, Schlue J, Mozer M, Stadler J, et al. SRSF2 and U2AF1 mutations in primary myelofibrosis are associated with JAK2 and MPL but not calreticulin mutation and may independently reoccur after allogeneic stem cell transplantation. *Leukemia.* 2015.
 107. McMullin MF, Harrison CN, Ali S, Cargo C, Chen F, Ewing J, et al. A guideline for the diagnosis and management of polycythaemia vera. A British Society for Haematology Guideline. *Br J Haematol.* 2019;
 108. Harrison CN, Butt N, Campbell P, Conneally E, Drummond M, Green AR, et al. Modification of British committee for standards in haematology diagnostic criteria for essential thrombocythaemia. *British Journal of Haematology.* 2014.
 109. Reilly JT, McMullin MF, Beer PA, Butt N, Conneally E, Duncombe AS, et al. Use of JAK inhibitors in the management of myelofibrosis: A revision of the British Committee for Standards in Haematology Guidelines for Investigation and Management of Myelofibrosis 2012. *British Journal of Haematology.* 2014.
 110. Tefferi A, Rumi E, Finazzi G, Gisslinger H, Vannucchi AM, Rodeghiero F, et al. Survival and prognosis among 1545 patients with contemporary polycythemia vera: An international study. *Leukemia.* 2013;
 111. Tefferi A, Betti S, Barraco D, Mudireddy M, Shah S, Hanson CA, et al. Gender and survival in essential thrombocythemia: A two-center study of 1,494 patients. *Am J Hematol.* 2017;
 112. Tefferi A, Guglielmelli P, Larson DR, Finke C, Wassie EA, Pieri L, et al. Long-term survival and blast transformation in molecularly annotated essential thrombocythemia, polycythemia vera, and myelofibrosis. *Blood.* 2014;
 113. Passamonti F, Rumi E, Pungolino E, Malabarba L, Bertazzoni P, Valentini M, et al. Life expectancy and prognostic factors for survival in patients with polycythemia vera and essential thrombocythemia. *Am J Med.* 2004;
 114. Wolanskyj AP, Schwager SM, McClure RF, Larson DR, Tefferi A. Essential thrombocythemia beyond the first decade: Life expectancy, long-term complication rates, and prognostic factors. *Mayo Clin Proc.* 2006;
 115. Dahabreh IJ, Zoi K, Giannouli S, Zoi C, Loukopoulos D, Voulgarelis M. Is JAK2 V617F mutation more than a diagnostic index?. A meta-analysis of clinical outcomes in essential thrombocythemia. *Leuk Res.* 2009;
 116. Falanga A, Marchetti M, Vignoli A, Balducci D, Russo L, Guerini V, et al. V617F JAK-2 mutation in patients with essential thrombocythemia: relation to platelet, granulocyte, and plasma hemostatic and inflammatory molecules. *Exp Hematol.*

2007;

117. Heuser M, Panagiota V, Koenecke C, Fehse B, Alchalby H, Badbaran A, et al. Low frequency of calreticulin mutations in MDS patients. *Leukemia*. 2014.

Πηγές Εικόνων

Εικόνα εξώφυλλου: <https://www.rcsb.org/structure/2B7A>

Εικόνα 1: Σχηματική απεικόνιση ενεργοποίησης EPO/ΕροR.....	5
Εικόνα 2: Σχηματική απεικόνιση της κατασκευής των Janus κινασών.....	6
Εικόνα 3: Σχηματική απεικόνιση της μετάδοσης-μεταφοράς του ενδοκυττάριου σήματος από τις κυτταροκίνες μέσω της οδού JAK-STAT.....	6
Εικόνα 4: Σχηματική απεικόνιση της οδού JAK-STAT (κύριες οδοί μεταγωγής του σήματος προς τον πυρήνα).....	7
Εικόνα 5: Ηλεκτροφόρηση γέλης κανονικό άτομο (wild type, WT) και σε αντιπροσωπευτικούς ασθενείς με ετερόζυγη (Hetero) ή ομόζυγη (Homo) JAK2V617F μετάλλαξη.....	8
Εικόνα 6: Γονίδια που επαναλαμβανόμενα μεταλλάσσονται στις κακοήθειες του μυελού και επηρεάζουν κυτταρικές λειτουργίες.....	9
Εικόνα 7: Μεταλλάξεις JAK2 σε μυελοϋπερπλαστικές νεοπλασίες ⁽³⁵⁾	10
Εικόνα 8:.....	11
Εικόνα 9: Ο ρόλος των μεταλλάξεων CALR στην ανάπτυξη MYN.....	13
Εικόνα 10: Απόσπασμα από τον πίνακα κατάταξης MYN από τον Π.Ο.Υ το 2016, σημαίνονται τα κλασσικά MYN ⁽⁴⁾	18
Εικόνα 11: Σχηματική απεικόνιση ARMS -PCR (χρήση διπλού ζεύγους εκκινητών).	24
Εικόνα 12: Ανάλυση καμπύλης τήξης για την ανίχνευση της μετάλλαξης JAK2 c. 1849 G>T.	26

Ευρετήριο Πινάκων

Πίνακας 1: Συγκεντρωτικά στοιχεία μεταλλάξεων γονιδίων εμπλεκόμενων σε MYN.	16
Πίνακας 2: Κριτήρια διάγνωσης Αληθούς Πολυκυτταραιμίας (ΑΠ) κατά τον WHO, 2016 ⁽⁴⁾	19
Πίνακας 3: Κριτήρια διάγνωσης Ιδιοπαθούς Θρομβοκυτταραιμίας (ΙΘ) κατά τον WHO, 2016 ⁽⁴⁾ ..	20
Πίνακας 4: Κριτήρια διάγνωσης πρώιμης Πρωτοπαθούς Μυελοϊνώσεως κατά τον WHO, 2016 ⁽⁴⁾ .	21
Πίνακας 5: Κριτήρια διάγνωσης όψιμης Πρωτοπαθούς Μυελοϊνώσεως κατά τον WHO, 2016 ⁽⁴⁾ ...	22
Πίνακας 6: Συγκεντρωτικά χαρακτηριστικά ασθενών με MYN Αιματολογικού Εργαστηρίου, Β' Πανεπιστημιακής Παθολογικής Κλινικής ΙΓΝΑ	31
Πίνακας 7: Στατιστικά στοιχεία από τη σύγκριση εργαστηριακών δεδομένων πρώτης και τελευταίας γενικής αίματος των ασθενών με βάση τη θετικότητα τους στη μετάλλαξη JAK2V617F.	32
Πίνακας 8: Στατιστικά στοιχεία εργαστηριακών δεδομένων ασθενών με ΑΠ.....	34
Πίνακας 9: Στατιστικά στοιχεία εργαστηριακών δεδομένων ασθενών με ΙΘ	34
Πίνακας 10: Ποσοστά θετικότητας μετάλλαξης JAK2 σε ασθενείς με MYN από τις αρχικές σχετικές αναφορές (2005).....	38

Ευρετήριο Γραφημάτων

Γράφημα 1: Κατανομή αριθμού ασθενών ανά έτος διάγνωσης της νόσου.	28
Γράφημα 2: Κατανομή ηλικίας ασθενών δείγματος.....	28
Γράφημα 3: Κατανομή ασθενών δείγματος σύμφωνα με τη διάγνωσή τους.....	29
Γράφημα 4: Κατανομή φύλου/διάγνωσης ασθενών δείγματος εργασίας.	32
Γράφημα 5: Κατανομή ηλικίας/νόσου ασθενών	33
Γράφημα 6: Τιμές αιμοσφαιρίνης ασθενών με ΑΠ (διάγνωσης και τελευταίας μέτρησης)	35
Γράφημα 7: Τιμές αιματοκρίτη ασθενών με ΑΠ (διάγνωσης και τελευταίας μέτρησης)	35
Γράφημα 8: Τάση και απολήξεις αριθμού αιμοπεταλίων στους ασθενείς με ΙΘ	35
Γράφημα 9: Τάση και απολήξεις αριθμού αιμοπεταλίων στους ασθενείς με ΙΘ με θετική μετάλλαξη JAK2.....	36
Γράφημα 10: Τάση και απολήξεις αριθμού αιμοπεταλίων στους ασθενείς με ΙΘ και αρνητικούς στη μετάλλαξη JAK2	36
Γράφημα 11: Τάση και απολήξεις αριθμού λευκών αιμοσφαιρίων ασθενών δείγματος (διάγνωσης και τελευταίας μέτρησης)	36
Γράφημα 12: Τάση και απολήξεις αριθμού λευκών αιμοσφαιρίων ασθενών θετικών στη μετάλλαξη JAK2.....	37
Γράφημα 13: Τάση και απολήξεις αριθμού λευκών αιμοσφαιρίων ασθενών αρνητικών στη μετάλλαξη JAK2.....	37
Γράφημα 14: Ποσοστά θετικότητας μετάλλαξης JAK2V617F στους 45 ασθενείς με κλασικά MYN. Παράθεση για σύγκριση ποσοστά από τη διεθνή βιβλιογραφία.....	38
Γράφημα 15: Κατανομή ασθενών με ΑΠ σύμφωνα με τη ηλικία τους κατά τη διάγνωση.	40
Γράφημα 16: : Κατανομή ασθενών με ΙΘ σύμφωνα με τη ηλικία τους κατά τη διάγνωση	41