



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ**

**ΧΕΙΡΟΥΡΓΙΚΟΣ ΤΟΜΕΑΣ
ΜΑΙΕΥΤΙΚΗ - ΓΥΝΑΙΚΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ**

**ΜΟΡΙΑΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΩΝ ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΩΝ ΤΩΝ
ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΥΠΟΔΟΧΕΑ ΤΗΣ ΕΡΥΘΡΟΠΟΙΗΤΙΝΗΣ ΚΑΙ
ΤΗΣ JAK2 ΚΙΝΑΣΗΣ ΣΕ ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ ΟΙΚΟΓΕΝΗ
ΠΟΛΥΕΡΥΘΡΑΙΜΙΑ ΚΑΙ ΜΥΕΛΟΪΠΕΡΠΛΑΣΤΙΚΑ
ΣΥΝΔΡΟΜΑ**

ΛΑΜΠΡΟΣ Κ. ΜΠΟΥΡΑΝΤΑΣ

Ιατρός

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2008



<<Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από την Ιατρική Σχολή του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνώμων του συγγραφέα Ν. 5343/32, άρθρο 202, παράγραφος 2 (νομική κατοχύρωση του Ιατρικού Τμήματος)>>



Ημερομηνία αίτησης του κ. Μπουραντά Λάμπρου: 6-9-2004

Ημερομηνία ορισμού Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής: 539^α/23-11-2004

Μέλη Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:

Επιβλέπων

Γεωργίου Ιωάννης Αναπληρωτής Καθηγητής Ιατρικής Γενετικής και Υποβοηθούμενης Αναπαραγωγής της Μαιευτικής -Γυναικολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Μέλη •

Μπάη Μαρία Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Τσιάρα Σταυρούλα Επίκουρη Καθηγήτρια Παθολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Ημερομηνία ορισμού θέματος: 2-12-2004

«Μοριακή Ανάλυση των μεταλλάξεων των γονιδίων του υποδοχέα της ερυθροποιητίνης και της JAK-2 κινάσης σε ασθενείς με Οικογενή Πολυερυθραιμία και Μυελοϋπερπλαστικά Σύνδρομα»

ΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΕΠΤΑΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ : 638^α/3-6-2008

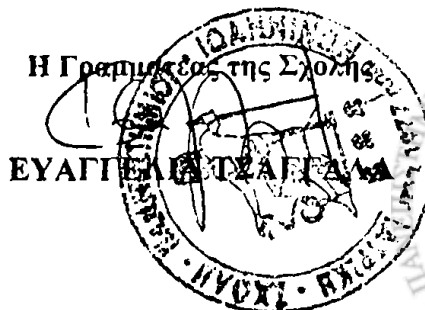
| | |
|-------------------------|---|
| Κωνσταντόπουλος Σταύρος | Καθηγητής Παθολογίας -Πνευμονολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων |
| Μαυρίδης Ανέστης | Καθηγητής Μικροβιολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων |
| Μπερής Αλέξανδρος | Καθηγητής Ορθοπαιδικής Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων |
| Παρασκευαΐδης Ευάγγελος | Καθηγητής Μαιευτικής -Γυναικολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων |
| Γεωργίου Ιωάννης | Αναπληρωτής Καθηγητής Ιατρικής Γενετικής και Υποβοηθούμενης Αναπαραγωγής της Μαιευτικής - Γυναικολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων |
| Μπάη Μαρία | Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων |
| Τσιάρα Σταυρούλα | Επίκουρη Καθηγήτρια Παθολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων |

Έγκριση Διδακτορικής Διατριβής με βαθμό «ΑΡΙΣΤΑ» στις 24-6-2008

ΠΡΟΕΔΡΟΣ ΤΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΣΧΟΛΗΣ

Ιωάννης Γουδέβενος

Καθηγητής Παθολογίας-Καρδιολογίας



**Στην Οικογένειά μου
για τη συνεχή αγάπη και στήριξη**

**Στους Αιματολογικούς Ασθενείς
γιατί μας εμπνέουν την επιστημονική πρόοδο
και την ανθρωπιά**

**Στις Γυναίκες και την Τέχνη
γιατί είναι το άλας στη ζωή**



Πρόλογος-Ευχαριστίες

Η εποχή μας χαρακτηρίζεται, στον τομέα της ιατρικής και των βιοεπιστημών, από τις εκπληκτικές προόδους πάνω στη μελέτη του γονιδιώματος του γενετικού υλικού, στην συνεχή ανακάλυψη μεταλλάξεων που προκαλούν πλήθος θανατηφόρων ασθενειών, καθώς και στην προσπάθειά μας να επέμβουμε θεραπευτικά σ' αυτές με καινούριες θεραπείες. Προς την κατεύθυνση αυτή, η Αιματολογία ως κλινικοεργαστηριακή ειδικότητα, βρίσκεται στην πρωτοπορία των ερευνών.

Τα Μυελούπερπλαστικά Σύνδρομα (ΜΥΣ) αποτελούν κλωνικές νόσους του αρχέγονου αιμοποιητικού κυττάρου. Προκαλούν αρκετές και σοβαρές επιλοκές στους ασθενείς, ενώ μπορούν να μεταπέσουν σε οξεία λευχαιμία. Ενώ για τη Χρόνια Μυελογενή Λευχαιμία η παθογένεια είναι γνωστή εδώ και 40 περίπου χρόνια, για τα υπόλοιπα τρία ΜΥΣ, την Αληθή Πολυερυθραιμία, την Ιδιοπαθή Θρομβοκυττάρωση και την Ιδιοπαθή Μυελοίνωση μόλις το 2005 μπορέσαμε, με τη μετάλλαξη της JAK 2 κινάσης, να έχουμε μία εικόνα των μοριακών διαταραχών.

Από την άλλη μεριά, η οικογενής πολυερυθραιμία είναι συγγενής νόσος που κληρονομείται με τον αυτοσωμικό χαρακτήρα και προκαλεί αύξηση του αιματοκρίτη. Έχουν ανευρεθεί μεταλλάξεις του υποδοχέα της ερυθροποιητίνης, οι περισσότερες από τις οποίες σχετίζονται με τη νόσο.

Σκοπός της παρούσας διατριβής ήταν να ανιχνεύσουμε και να μελετήσουμε μοριακά τις μεταλλάξεις αυτές και στις δύο ομάδες ασθενών. Οι ασθενείς παρακολουθούνταν στα εξωτερικά ιατρεία της Αιματολογικής Κλινικής του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ιωαννίνων. Η μελέτη των μεταλλάξεων έγινε στα εργαστήρια Γενετικής της Γυναικολογικής του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ιωαννίνων.

Στο σημείο αυτό θα ήθελα να ευχαριστήσω καταρχήν τον καθηγητή Παθολογίας-Αιματολογίας κο Κων/νο Μπουραντά, που πάντα βοηθώντας τους νέους επιστήμονες, μου έδωσε τη δυνατότητα να προετοιμάσω τη διατριβή. Τον καθηγητή κο Ιωάννη Γεωργίου, επιβλέποντα καθηγητή της διατριβής που με κατέθυνε στο δύσκολο πεδίο της γονιδιακής έρευνας και στην καλύτερη οργάνωση της εργασίας. Την επίκουρο καθηγήτρια κα Σταυρούλα Τσιάρα και την αναπληρώτρια καθηγήτρια κα Μαρία Μπάη για τις πολύτιμες συμβουλές όσον αφορά στην αρτιότερη δομή και παρουσίαση του κειμένου. Την μαθηματικό κα Αφροδίτη Κατσαράκη για τη στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων. Τις βιολόγους Ανθή Χατζηκυριακίδου και



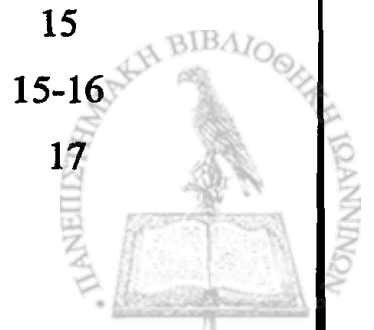
Αγγελική Δασούλα για το σχεδιασμό και την πραγματοποίηση των πειραμάτων, όπως και την ορθή αξιολόγηση των αποτελεσμάτων τους. Επιπλέον, το σύνολο των ιατρών της Αιματολογικής κλινικής για τη βοήθεια πάνω στο ιστορικό και την πορεία των υπό μελέτη ασθενών, όπως και την κα Λαμπρινή Κεφάλια για τη συλλογή των δειγμάτων των ασθενών.

Η απουσία ανίχνευσης της μετάλλαξης του γονιδίου του υποδοχέα της ερυθροποιητίνης στην οικογενή πολυερυθραιμία δείχνει ότι η παθογένεια της νόσου στους ασθενείς θα πρέπει να αναζητηθεί σε άλλες μεταλλάξεις. Η μελέτη της μετάλλαξης V617F της JAK 2 κινάσης σε ασθενείς με Ph(-) ΜΥΣ επιβεβαιώνει τη διεθνή βιβλιογραφία, αλλά και σχετίζεται με αρκετά κλινικά και εργαστηριακά ευρήματα. Επιπρόσθετα, έχει πλέον τεθεί στη ρουτίνα των εξετάσεων των ασθενών αυτών και μας δίνει τη βάση για τον έλεγχο της αποτελεσματικότητας των θεραπευτικών σκευασμάτων, όπως και τη χορήγηση νέων ελπιδοφόρων θεραπειών.

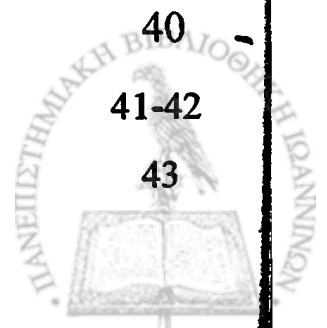


ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

| | Σελίδα |
|--|--------|
| A. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ | 1 |
| A.1.Πρωτοπαθής Οικογενής και Συγγενής Πολυερυθραιμία (Primary familiar and congenital polycythemia) | 2 |
| Εισαγωγή | 2-3 |
| Παθογένεια | 3 |
| Κλινικά-Εργαστηριακά Ευρήματα | 3 |
| Διάγνωση-Θεραπεία | 4 |
| A.2.Μυελοϋπερπλαστικά Σύνδρομα | 5 |
| Εισαγωγή | 5 |
| Επιδημιολογία | 5-6 |
| Παθογένεια | 6-7 |
| Κλινικοεργαστηριακά Ευρήματα | 7 |
| Διάγνωση | 8 |
| A.2.Ι.Αληθής Πολυερυθραιμία (Polycythemia Vera/Polycythemia Rubra Vera) | 9 |
| Επιδημιολογία | 9 |
| Μοριακή Παθογένεια | 9-10 |
| Κλινικά-εργαστηριακά Ευρήματα | 10-12 |
| Διάγνωση | 12-13 |
| Παράγοντες κινδύνου-Θεραπεία | 13-14 |
| A.2.ΙΙ.Ιδιοπαθής Θρομβοκυττάρωση (Essential Thrombocythemia) | 15 |
| Επιδημιολογία | 15 |
| Μοριακή Παθογένεια | 15-16 |
| Κλινική Εικόνα | 17 |



| | |
|---|-------|
| Διάγνωση | 17-18 |
| Παράγοντες κινδύνου-Θεραπεία | 19-20 |
| A.2.III.Ιδιοπαθής Μυελοϊνώση | 21 |
| (Idiopathic Myelofibrosis) | |
| Επιδημιολογία | 21 |
| Μοριακή Παθογένεση | 21-22 |
| Κλινικά-Εργαστηριακά | 22-24 |
| Διάγνωση-Σταδιοποίηση | 24-25 |
| Θεραπεία | 25-26 |
| A.3.Υποδοχείς Ερυθροποιητίνης | 27 |
| (Epo receptors/Epo-R) | |
| Εισαγωγή | 27 |
| Δομή Epo-R | 27-28 |
| Σύνθεση και εκφύλιση του Epo-R | 28-29 |
| Δράση του Epo-R | 29-31 |
| Γονίδιο του υποδοχέα της ερυθροποιητίνης | 31-32 |
| Μεταλλάξεις του γονιδίου του υποδοχέα της ερυθροποιητίνης | 33 |
| A.4.JAK-2 κινάση | 34 |
| Δομή και λειτουργία της JAK2 | 34-35 |
| Μετάλλαξη V617F του γονιδίου της JAK2 | 35-36 |
| Ομοζυγωτία JAK V617F | 36 |
| Άλλες αιματολογικές κακοήθειες του JAK V617F | 37 |
| Παρουσία της JAK2 V617F στα αρχέγονα αιμοποιητικά κύτταρα | 37 |
| Μηχανισμός δράσης JAK2 V617F | 37-38 |
| Mpl και JAK2 V617F | 38-39 |
| B. ΕΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ | 40 |
| B.1.Σκοπός της μελέτης | 41-42 |
| B.2. Υλικό της μελέτης | 43 |



| | |
|---|-------|
| B.2.I. Ασθενείς με Οικογενή Πολυερυθραιμία | 43 |
| B.2.II. Ασθενείς με ΜΥΣ | 43-45 |
| B.3. Ανίχνευση μεταλλάξεων | 45 |
| του υποδοχέα της Ερυθροποιητίνης | |
| B.3.I Μέθοδοι πειράματος | 45 |
| Εξαγωγή DNA από περιφερικό αίμα | 45-46 |
| Έλεγχος των προϊόντων PCR σε πήκτωμα αγαρόζης | 46-47 |
| Πέψεις των ενισχυμένων τμημάτων των τριών γονιδίων | 47 |
| με ένζυμα περιορισμού | |
| Έλεγχος των προϊόντων της πέψης | 47-48 |
| ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ | 49 |
| B.3.II. Αποτελέσματα | 49-50 |
| B.4. Ανίχνευση της μετάλλαξης της JAK2 V617F | 50 |
| B.4.1. Μέθοδος | 50-51 |
| B.4.II. Αποτελέσματα | 51-52 |
| Συχνότητα της JAK2 V617F μετάλλαξης | 51-52 |
| Ομοζυγωτία στη μετάλλαξη V617F | 52 |
| Συσχέτιση της μετάλλαξης V617F με τα κλινικά και | 52-55 |
| εργαστηριακά δεδομένα των ασθενών με ΑΠ, ΙΘ και ΙΜ | |
| B.4.III. Στατιστική ανάλυση | 56-57 |
| ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ | 58 |
| B.4.IV. Συμπεράσματα-συζήτηση της ανίχνευσης | 58-59 |
| της JAK2 V617F | |
| ΠΕΡΙΛΗΨΗ | 60-61 |
| SUMMARY | 62-64 |
| Νέα διαγνωστικά κριτήρια για τα ΜΥΣ (MPD) | 65-66 |
| ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ | 67-76 |



ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ



Α.ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Α.1.Πρωτοπαθής Οικογενής και Συγγενής Πολυερυθραιμία

(Primary familiar and congenital polycythemia)

Εισαγωγή

Η οικογενής πολυερυθραιμία (ΟΠ) μπορεί να είναι πρωτοπαθής ή δευτεροπαθής. Η πρώτη προέχεται από κληρονομικές ανωμαλίες στην ανταπόκριση έναντι της υποξίας, ή από κληρονομούμενες μεταβολές στα προγονικά κύτταρα της ερυθράς σειράς που προκαλούν αυξημένη ανταπόκριση στην ερυθροποιητίνη (Epo) (Primary familiar and congenital polycythemia). Η δευτερογενής οικογενής πολυερυθραιμία οφείλεται σε κληρονομούμενες αλλαγές που οδηγούν σε αυξημένα επίπεδα Epo (1). Ο πίνακας 1 δείχνει την κατάταξη της οικογενούς πολυερυθραιμίας (2).

Πίνακας 1. Ταξινόμηση της οικογενούς πολυερυθραιμίας.

| Οικογενής Πολυερυθραιμία | |
|---|---|
| Πρωτοπαθής ΟΠ | Δευτεροπαθής ΟΠ |
| 1. Πρωτοπαθής οικογενής και συγγενής πολυερυθραιμία -μεταλλάξεις του υποδοχέα της Epo -μη ανιχνεύσιμες μεταλλάξεις 2. Οικογενείς πολυερυθραιμίες λόγω μεταβολών στην ευαισθησία έναντι της υποξίας - Chuvash πολυερυθραιμία-ομόζυγη VHL* μετάλλαξη -άλλες VHL μεταλλάξεις -μη αναγνωρίσιμες μεταλλάξεις | 1. Διαταραχές συγγένειας της αιμοσφαιρίνης προς το O ₂ - Hb με αυξημένη συγγένεια προς το O ₂ -Ελλειψη 2,3 διφωσφορογλυκερικό οξύ -Μεθαιμοσφαιριναιμία 2. Συγγενής κυανωτική καρδιακή νόσος |

*Von Hippel-Lindau

Η Πρωτοπαθής Οικογενής και Συγγενής Πολυερυθραιμία είναι μία σπάνια, κληρονομούμενη με τον επικρατούντα χαρακτήρα, νόσος που μαζί με την Αληθή Πολυερυθραιμία αποτελούν τις Πρωτοπαθείς (Ιδιοπαθείς) Πολυερυθραιμίες. Παρόλο που διαφέρουν κλινικά και παθολογοανατομικά μεταξύ τους, έχουν πολλά κοινά γνωρίσματα, ανάμεσα στα οποία είναι τα χαμηλά επίπεδα Epo (2).



Παθογένεια

Η νόσος κληρονομείται με τον αυτοσωμικό επικρατούμενο τρόπο. Προέρχεται από οικογενείς ανωμαλίες στον πολλαπλασιασμό των προγονικών κυττάρων της ερυθράς σειράς. Στην ανίχνευση των μοριακών αλλαγών που προκαλούν τη νόσο, μελετήθηκαν μεταλλάξεις των γονιδίων της Epo και του υποδοχέα της, του Epo-receptor (Epo-R) (2). Πρώτα μελετήθηκαν και αποκλείστηκαν μεταλλάξεις του γονιδίου της Epo (2). Στη συνέχεια, με την κλωνοποίηση του γονιδίου του Epo-R (3), έγινε δυνατή η ανάλυσή του για μεταλλάξεις. Υπάρχουν πλέον σαφή συμπεράσματα ότι η νόσος, τουλάχιστον σε πολλές περιπτώσεις, οφείλεται σε μεταλλάξεις του υποδοχέα της Epo. Μέχρι στιγμής έχουν περιγραφεί 13 διαφορετικές μεταλλάξεις του γονιδίου. Από αυτές, οι 10 συντελούν στην αλλαγή της δομής του κυτταροπλασματικού καρβοξυλικού άκρου στο μόριο του Epo-R, και είναι μεταλλάξεις που σίγουρα σχετίζονται με τη νόσο (3).

Κλινικά-εργαστηριακά ευρήματα

Η ερυθροκυττάρωση στην Πρωτοπαθή Οικογενή και Συγγενή Πολυερυθραιμία μπορεί να είναι πολύ σημαντική με τιμές αιμοσφαιρίνης συχνά μεγαλύτερες από 20 g/dl. Η ερυθροκυττάρωση δεν επιπλέκεται με σπληνομεγαλία, εμφάνιση οξείας λευχαιμίας ή άλλων μυελοϋπερπλαστικών νοσημάτων (1,4). Στις κλινικές εκδηλώσεις συμπεριλαμβάνονται η κεφαλαλγία, η υπέρταση, η ζάλη, η ρινορραγία και ο κνησμός μετά το λουτρό (1,4). Υπάρχει, επίσης, αυξημένος κίνδυνος αιμορραγικών και θρομβωτικών επεισοδίων, και ιδιαίτερα καρδιαγγειακών συμβαμάτων (1,5).

Χαρακτηριστική είναι η αποκλειστικά και μόνο υπερπλασία της ερυθράς σειράς, και η εμφάνιση αποκλειστικά ερυθροκυττάρωσης. Τα εργαστηριακά ευρήματα περιλαμβάνουν την αύξηση της μάζας των ερυθρών αιμοσφαιρίων, χωρίς αύξηση των λευκών αιμοσφαιρίων και των αιμοπεταλίων. Τα επίπεδα Epo είναι φυσιολογικά ή χαμηλά, ενώ φυσιολογικές είναι και οι τιμές της μερικής πίεσης O_2 του αρτηριακού αίματος και του P_{50} . Οι τιμές της βιταμίνης B_{12} είναι φυσιολογικές, ενώ δεν υπάρχει διαταραχή στη χημική συγγένεια αιμοσφαιρίνης-οξυγόνου ($Hb-O_2$). Σε καλλιέργειες κυττάρων, *in vitro*, έχουμε υπερευαισθησία των προγονικών κυττάρων της ερυθράς σειράς στην Epo (5,6).



Διάγνωση

Η διάγνωση τίθεται από το οικογενειακό ιστορικό καθώς και από τα κλινικά και εργαστηριακά ευρήματα. Για να επιβεβαιώσουμε με ακρίβεια τη διάγνωση, είναι πολλές φορές απαραίτητη η καλλιέργεια των προγονικών κυττάρων της ερυθράς σειράς, όπου σε περίπτωση παρουσίας της νόσου, τα κύτταρα της ερυθράς σειράς είναι υπερευαίσθητα και αναπτύσσονται σε χαμηλές συγκεντρώσεις ή ακόμα και σε απουσία Ερo. Η ανίχνευση των μεταλλάξεων του υποδοχέα της Ερo δεν μας δίνει πάντα θετική απάντηση, καθώς υπάρχουν προφανώς και μη ανιχνεύσιμες μεταλλάξεις.

Θεραπεία

Στόχος της θεραπείας είναι η μείωση του αιματοκρίτη και η αντιμετώπιση των επιπλοκών της νόσου. Η αφαιμάξη είναι η κύρια θεραπεία. Ο αιματοκρίτης μειώνεται κοντά στα φυσιολογικά όρια, με την αφαίρεση 450-500 ml αίματος σε μεσοδιάστημα 2 με 4 ημέρες για μέσου όγκου ασθενείς (7).



A.2. Μυελοϋπερπλαστικά Σύνδρομα

Εισαγωγή

Τα Μυελοϋπερπλαστικά Σύνδρομα (ΜΥΣ) αποτελούν μία ετερογενή ομάδα κακοηθειών του αιμοποιητικού συστήματος, που προέρχονται από κλωνική βλάβη του αρχέγονου πολυδύναμου μητρικού κυττάρου (stem cell) (8). Το 1951, ο William Dameshek (1900-1961) ταξινόμησε τέσσερα νοσήματα που εμφάνιζαν πολλά κοινά κλινικά και εργαστηριακά ευρήματα, καθώς και παθοφυσιολογικά στοιχεία (9): την Αληθή Πολυερυθραιμία (ΑΠ)-Polycythemia Vera, την Ιδιοπαθή Θρομβοκυττάρωση (ΙΘ)-Essential Thrombocythemia, την Ιδιοπαθή Μυελοϊνωση (ΙΜ)-Primary Myelofibrosis και τη Χρόνια Μυελογενή Λευχαιμία (ΧΜΛ)-Chronic Myeloid Leukemia (8,9). Σύμφωνα με την ταξινόμηση της Παγκόσμιας Οργάνωσης Υγείας (World Health Organization-WHO), στα ΜΥΣ κατατάσσονται και άτυπες νόσοι όπως η Χρόνια Μυελομονοκυτταρική Λευχαιμία-Chronic Myelomonocytic Leukemia, η Νεανική Μυελομονοκυτταρική Λευχαιμία-Juvenile Myelomonocytic Leukemia, η Χρόνια Ουδετεροφιλική Λευχαιμία-Chronic Neutrophilic Leukemia, η Χρόνια Ηωσινοφιλική Λευχαιμία-Chronic Eosinophilic Leukemia, το Υπερηωσινοφιλικό Σύνδρομο-Hypereosinophilia Syndrome, η Χρόνια Βασεοφιλική Λευχαιμία-Chronic Basophilic Leukemia, η Συστηματική Μαστοκυττάρωση-Systemic Mastocytosis και μη ταξινομούμενα ΜΥΣ (10). Όλες αυτές οι οντότητες είναι κλωνικές νόσοι του μυελού των οστών που χαρακτηρίζονται από αυξημένη αιμοποίηση και υπερπαραγωγή ώριμων, λειτουργικών κυττάρων του αίματος, καθώς και από χρονιότητα (11). Ο πίνακας 2 δείχνει την ταξινόμηση των ΜΥΣ.

Επιδημιολογία

Τα ΜΥΣ εμφανίζονται κυρίως σε ενήλικα άτομα. Η υψηλότερη συχνότητα εμφάνισης αφορά στην πέμπτη, έκτη και έβδομη δεκαετία της ζωής. Ο επιπολασμός όλων των ΜΥΣ στο σύνολό τους είναι περίπου 6-9/100.000 πληθυσμού ετησίως. Όσον αφορά στη ΧΜΛ δεν φαίνεται να υπάρχουν διαφορές όσον αφορά τη γεωγραφική κατανομή της νόσου. Για τα υπόλοιπα ΜΥΣ δεν υπάρχουν αρκετά τεκμηριωμένα στοιχεία (12).



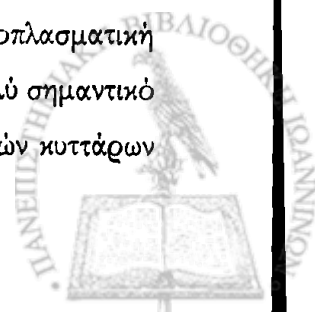
Πίνακας 2. Κατάταξη των ΜΥΣ

| Μυελοϋπερπλαστικά Σύνδρομα (ΜΥΣ) | | |
|----------------------------------|--|---|
| Κλασσικά ΜΥΣ | 1. Bcr/abl θετικά | Χρόνια Μυελογενής Λευχαιμία |
| | 2. Bcr/abl αρνητικά | A. Αληθής Πολυερυθραιμία B. Ιδιοπαθής Θρομβοκυττάρωση Γ. Ιδιοπαθής Μυελοϊνωση |
| Άτυπα ΜΥΣ | 1. Χρόνια Μυελομονοκυτταρική Λευχαιμία 2. Νεανική Μυελομονοκυτταρική Λευχαιμία 3. Χρόνια Ουδετεροφιλική Λευχαιμία 4. Χρόνια Ηωσινοφιλική 5. Χρόνια Βασεοφιλική Λευχαιμία 6. Υπερηωσινοφιλικό Σύνδρομο 7. Συστηματική Μαστοκυττάρωση 8. Μη ταξινομούμενα ΜΥΣ | |

Παθογένεια

Η παθογένεια των ΜΥΣ ξεκινάει από την μετάλλαξη και τον κλωνικό πολλαπλασιασμό του αρχέγονου αιμοποιητικού κυττάρου (stem cell) ή ενός άμεσα διαφοροποιημένου επιγόνου του (8). Η μοριακή αιτιολογία για τη ΧΜΛ είναι γνωστή από το 1960. Η διάγνωση της νόσου γίνεται με την ανίχνευση του χρωμοσώματος της Φιλαδέλφεια. Το χρωμόσωμα της Φιλαδέλφεια προέρχεται από τη μετάλλαξη (αμοιβαία μετάθεση) $t(9;22)$ και τη δημιουργία του χμαιρικού γονιδίου BCR-ABL(13). Το φυσιολογικό ABL γονίδιο κωδικοποιεί μία τυροσινική κινάση που παίζει ρόλο στη μεταβίβαση των ενδοκυττάρων μηνυμάτων και στην ρύθμιση της κυτταρικής ανάπτυξης (12).

Αντιθέτως, μοριακοί δείκτες για τα υπόλοιπα ΜΥΣ δεν υπήρχαν μέχρι πολύ πρόσφατα, ούτως ώστε η παθογένεια και η ακριβή διάγνωσή τους να είναι μία πραγματική επιστημονική πρόκληση. Τα προγονικά αιμοποιητικά κύτταρα σε ασθενείς με ΜΥΣ είναι πολύ ευαίσθητα στον πολλαπλασιασμό και την ανάπτυξη από αυξητικούς παράγοντες (κυταροκίνες) όπως η ερυθροποιητίνη και η θρομβοποιητίνη (Tpo) (12). Αυτό οδήγησε τις έρευνες στη μελέτη της μετάδοσης του μηνύματος των κυταροκινών αυτών. Πρόσφατα ανακοινώθηκε η ανακάλυψη της επίκτητης σωματικής μετάλλαξης V617F του γονιδίου της JAK 2 κινάσης. Η κινάση JAK 2 συνδέεται στην κυταροπλασματική περιοχή της ερυθροποιητίνης, της θρομβοποιητίνης και άλλων κυταροκινών και παίζει πολύ σημαντικό ρόλο στη μετάδοση του μηνύματος των κυταροκινών αυτών στον πυρήνα των προγονικών κυττάρων



του αίματος (10). Η μετάλλαξη V617F ανιχνεύεται στη συντριπτική πλειοψηφία των ασθενών με ΑΠ και περίπου στους μισούς ασθενείς με ΙΘ και ΙΜ (14).

Κλινικοεργαστηριακά ευρήματα

Σε κάθε ένα από τα ΜΥΣ επικρατεί μία ή περισσότερες, κάθε φορά, σειρές προγονικών αιμοποιητικών κυττάρων (8,9,15). Επομένως, στη ΧΜΛ παρατηρείται υπερπλασία της κοκκιώδους σειράς, με περισσότερα άωρα κύτταρα της κοκκιώδους σειράς να εμφανίζονται στην περιφέρεια (9). Στην ΑΠ υπερπαράγονται κυρίως τα κύτταρα της ερυθράς, αλλά και της κοκκιώδους και της μεγακαρουκυτταρικής σειράς. Στην ΙΘ υπερπαράγονται τα κύτταρα της μεγακαρουκυτταρικής σειράς (16,17). Στην ΙΜ παρατηρούμε μεγάλη αύξηση των ινοβλαστών. Συνήθως δεν υπάρχουν διαταραχές στην ωρίμανση των κυττάρων του αίματος, ιδίως στην ΑΠ και την ΙΘ (18). Στις κοινές κλινικές εκδηλώσεις συμπεριλαμβάνονται ο υπερπλαστικός κυτταροβριθής μυελός, η εξωμυελική αιμοποίηση στο σπλήνα και το ήπαρ, η τάση για μετάπτωση σε οξεία λευχαιμία (πιο συχνή στη ΧΜΛ και λιγότερο στα bcr/abl αρνητικά ΜΥΣ), η ανάπτυξη ίνωσης του μυελού των οστών και η μεγάλη πιθανότητα εκδήλωσης αιμορραγικών και θρομβωτικών επεισοδίων, ιδιαίτερα στην ΑΠ και την ΙΘ (18,19). Επιπλέον, αιμοποιητικά προγονικά κύτταρα από τον μυελό ή το περιφερικό αίμα εμφανίζουν διαφορετικές ιδιότητες καθώς μπορούν να αναπτυχθούν σε καλλιέργειες κυττάρων απουσία αιμοποιητικών αυξητικών παραγόντων (20). Τα κοινά κλινικά και εργαστηριακά ευρήματα των ΜΥΣ παρουσιάζονται στον πίνακα 3 (20).

Πίνακας 3. Κοινά κλινικά και εργαστηριακά ευρήματα στα Μυελούπερπλαστικά Σύνδρομα

| Κοινά ευρήματα στα Μυελούπερπλαστικά Σύνδρομα | |
|--|---|
| 1. | Διαταραχή του αρχέγονου πολυδύναμου αιμοποιητικού κυττάρου |
| 2. | Επικράτηση του παθολογικού κλώνου σε βάρος των φυσιολογικών |
| 3. | Ανωμαλίες στα χρωμοσώματα 1, 8, 9, 13 και 20 |
| 4. | Υπερπλασία του μυελού και δυσπλασία των μεγακαρουκυττάρων |
| 5. | Σχηματισμός αποικιών ανεξάρτητες από αυξητικούς παράγοντες |
| 6. | Υπερπαραγωγή μίας ή περισσότερων αιμοποιητικών σειρών |
| 7. | Θρομβωτικά και αιμορραγικά επεισόδια |
| 8. | Ίνωση του μυελού |
| 9. | Εξωμυελική αιμοποίηση |
| 10. | Μετάπτωση σε οξεία λευχαιμία |



Διάγνωση

Συνήθως η διάγνωση των ΜΥΣ γίνεται σε τυχαία εξέταση αίματος. Η ανεύρεση θρομβοκυττάρωσης, λευκοκυττάρωσης, ερυθροκυττάρωσης ή ηωσινοφιλίας θέτει την υπόνοια ενός από τα νοσήματα. Ακόμα, ασθενείς με ιστορικό θρομβώσεων ή αιμορραγικών φαινομένων, είτε ακόμα και σε ασθενείς με αιματολογικές επιπλοκές, μπορεί να υποκρύπτουν κάποιο ΜΥΣ. Για την επιβεβαίωση και την ακριβή ταυτοποίηση της διάγνωσης είναι απαραίτητο να γίνει μυελόγραμμα και οστεομελική βιοψία, όπως και κυτταρογενετική ανάλυση για την ανίχνευση του bcr/abl χρωμοσώματος, που είναι ειδικό για τη ΧΜΛ, ή άλλων κυτταρογενετικών ανωμαλιών (8).



Α.2.1. Αληθής Πολυερυθραιμία (Polycythemia Vera/ Polycythemia Rubra Vera)

Η Αληθής Πολυερυθραιμία (ΑΠ) περιγράφηκε για πρώτη φορά από τον Vasquez το 1892 (21). Το 1903 ο Osler ταξινόμησε την ΑΠ ως ξεχωριστή νοσηρή οντότητα (22). Το 1974, μία σημαντική μελέτη έδειξε ότι τα προγονικά κύτταρα της ερυθράς σειράς του μυελού των οστών σε ασθενείς με ΑΠ μπορούν *in vitro* να αναπτύσσονται χωρίς την παρουσία της ερυθροποιητίνης (23). Η νόσος προέρχεται από κλωνική διαταραχή του αρχέγονου αιμοποιητικού κυττάρου που προκαλεί κυρίως αυξημένη παραγωγή των ερυθρών αιμοσφαιρίων, αλλά και αύξηση των λευκών αιμοσφαιρίων και των αιμοπεταλίων (11). Η ερυθροκυττάρωση αυτή είναι ανεξάρτητη από μηχανισμούς που φυσιολογικά ρυθμίζουν τη διαδικασία της ερυθροποίησης. Ιδιαίτερο χαρακτηριστικό της νόσου αποτελεί το ότι σε καλλιέργειες κυττάρων μυελού της ερυθράς σειράς η ερυθροποίηση γίνεται απουσία εξωγενούς προσθήκης της ερυθροποιητίνης (Epo) (12).

Επιδημιολογία

Η συχνότητα εμφάνισης της νόσου ποικίλει γεωγραφικά κυμαινόμενη από περίπου 2 ασθενείς/10⁶ πληθυσμού ανά έτος στην Ιαπωνία, ενώ είναι αυξημένη, μέχρι 13/10⁶ πληθυσμού στην Αυστραλία. Στην Ευρώπη και τη Βόρεια Αμερική η συχνότητα διάγνωσης είναι περίπου ίδια και κυμαίνεται στις 8-10 ασθενείς/10⁶ πληθυσμού ανά έτος (24). Όσον αφορά στο φύλο, οι περισσότερες αναφορές δείχνουν ότι η επίπτωση της νόσου είναι ελαφρώς υψηλότερη στους άνδρες. Η αναλογία είναι 1-2 προς 1 σε σχέση με τις γυναίκες (24). Η μέση ηλικία εμφάνισης είναι τα 60 έτη, ενώ πολύ σπάνια διαγιγνώσκονται πάσχοντες ηλικίας κάτω των 20 ετών (25). Έχει αναφερθεί ότι υπάρχει γενετική προδιάθεση σε ορισμένες οικογένειες, ενώ η ιονίζουσα ακτινοβολία, η έκθεση σε τοξίνες και διάφοροι ιοί έχουν συσχετιστεί με την αιτιοπαθογένεια της νόσου (25).

Μοριακή παθογένεια

Οι κυτταρογενετικές ανωμαλίες στην ΑΠ δεν είναι ειδικές για τη νόσο και συμβαίνουν σε λιγότερο από το ένα τέταρτο των ασθενών (26). Οι πιο συχνές καρουτυπικές διαταραχές είναι η έλλειψη των μακρών σκελών των χρωμοσωμάτων 20 (del20q) και 13 (del13q) και οι τρισωμίες των χρωμοσωμάτων 8 και 9 (27). Η έλλειψη του μακρού σκέλους του χρωμοσώματος 20 αποτελεί μία από τις πιο συχνές χρωμοσωμικές ανωμαλίες που συσχετίζονται με αιματολογικές κακοήθειες. Παρατηρείται σε ποσοστό 10% των ασθενών με ΑΠ ή ΙΜ. Από την άλλη μεριά, οι τρισωμίες 9 παρατηρούνται σε ποσοστό 6.6% στην ΑΠ (28).



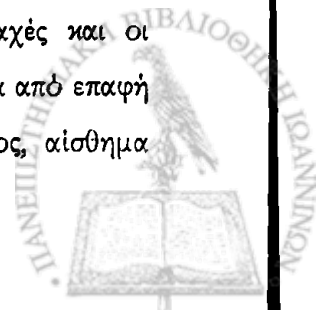
Πρόσφατα, μελετήθηκαν διάφοροι βιολογικοί παράγοντες, οι οποίοι πιθανώς έχουν σχέση με την παθογένεια της νόσου. Ένας από αυτούς ο είναι polycythemia rubra vera-1 (PRV-1), ένα μέλος της οικογένειας των υποδοχέων του πλασμινογόνου (urokinase-type plasminogen activator reseptor family, uPAR). Έχει περιγραφεί υπερέκφραση του PRV-1 στα κοκκιοκύτταρα του περιφερικού αίματος σε 19 από τους 19 ασθενείς με ΑΠ. Επίσης, οι μέθοδοι fluorescence-in-situ hybridisation (FISH) και comparative genomic hybridisation (CGH) έχουν δείξει συχνές ανωμαλίες του χρωμοσώματος 9p, όπως για παράδειγμα τρισωμία του χρωμοσώματος 9, και απώλεια της ετεροζυγωτίας (loss of heterozygosity) (29).

Το χρωμόσωμα 9p24 περιέχει το γονίδιο της JAK 2 κινάσης. Σ' αυτό το γονίδιο έχουν βρεθεί πρόσφατα σημειακές μεταλλάξεις, με προεξάρχουσα την σωματική μετάλλαξη V617F στο εξόνιο 14 στην πλειοψηφία των ασθενών με ΑΠ, όπως και σε πολλούς ασθενείς με ΙΘ και ΙΜ (30,31,32,33), ενώ δεν υπάρχει στη ΧΜΛ. Στις τέσσερις αυτές μελέτες, που έγιναν το 2005, το ποσοστό των ασθενών που εμφάνιζαν τη μετάλλαξη ήταν αντίστοιχα 97% (31), 89% (30), 74% (33) και 65% (32). Ομοζυγωτία υπάρχει για το μεταλλαγμένο αλληλίο, η οποία και βρέθηκε σε περίπου 30% των ασθενών. Αυτό συμβαίνει δευτερογενώς μετά από μιτωτικό ανασυνδυασμό του DNA (29,32). Η μετάλλαξη V617F και στις τέσσερις μελέτες δεν ανιχνεύτηκε σε κανέναν από τους μάρτυρες, ούτε και σε ασθενείς με δευτεροπαθείς ερυθροκυτταρώσεις (30-33).

Κλινικά-εργαστηριακά ευρήματα

Τα κυριότερα συμπτώματα της ΑΠ σχετίζονται με την υπέρταση ή με αγγειακές ανωμαλίες, και προκαλούνται από την αυξημένη μάζα των ερυθρών αιμοσφαιρίων. Τα θρομβωτικά και αιμορραγικά επεισόδια είναι οι πιο σοβαρές επιπλοκές της ασθένειας. Στο 25% των ασθενών, η πρώτη εκδήλωση της νόσου είναι ένα επεισόδιο αρτηριακής ή φλεβικής θρόμβωσης. Τα πιο συχνά απαντώμενα θρομβοεμβολικά επεισόδια είναι η θρομβοφλεβίτιδα, η ισχαιμία του μυοκαρδίου και το αγγειακό εγκεφαλικό επεισόδιο (34). Η θρόμβωση των μεσεντερικών φλεβών, της πυλαίας ή της σπληνικής φλέβας πολύ πιθανό να οφείλεται σε ΑΠ, ή ακόμα και να προηγείται της εμφάνισής της (35). Σε ασθενείς με σύνδρομο Budd-Chiari και φυσιολογικό αιματοκρίτη, ο προσδιορισμός της μάζας των ερυθρών αιμοσφαιρίων είναι δυνατό να αποκλείσει την πιθανή ερυθροκυττάρωση, που προκαλείται από την αύξηση του πλάσματος (36). Όχι σπάνια ασθενείς με ΑΠ εμφανίζουν αιμορραγικές εκδηλώσεις, όπως για παράδειγμα, αιμορραγίες από το πεπτικό (37).

Συχνές επιπλοκές της νόσου είναι η κεφαλαλγία, η ζάλη, οι οπτικές διαταραχές και οι πάραισθησίες. Είναι επίσης δυνατό να εμφανιστούν κνησμός του δέρματος, ιδιαίτερα μετά από επαφή με νερό, ερυθρομελαλγία, στην οποία παρατηρείται αυξημένη θερμοκρασία δέρματος, αίσθημα



καύσου και άλγους και ερυθρότητα, που υποχωρεί με τη χορήγηση ασπιρίνης, και ουρική αρθρίτιδα. Στα ευρήματα από τη φυσική εξέταση συγκαταλέγονται το πληθωρικό πρόσωπο σε ποσοστό 70% (συμφόρηση και κυάνωση στο πρόσωπο, κυρίως στη μύτη, τα αυτιά και τους βλενογόνους), σπληνομεγαλία στο 70% των ασθενών και ηπατομεγαλία στο 40% των ασθενών (34, 35, 36, 37). Η πνευμονική υπέρταση είναι μία σπάνια επιπλοκή της νόσου που μπορεί να οφείλεται στη χρόνια λευκόσταση, στη πνευμονική εξωμυελική αιμοποίηση ή στο αυξημένο φορτίο αιμοσφαιρίνης (20).

Οι κλινικές εκδηλώσεις και η πορεία της νόσου φαίνονται σχηματικά στον πίνακα 4.

Πίνακας 4. Κλινικές εκδηλώσεις και πορεία της Αληθούς Πολυερυθραιμίας (20).

| Κλινικές εκδηλώσεις-Επιπλοκές | Αίτια |
|--|---|
| • Θρομβώσεις, αιμορραγίες, υπέρταση | • Αυξημένη μάζα ερυθρών αιμοσφαιρίων, ελλατωμένα πολυμερη του παράγοντα von Willebrand, θρομβοξάνη, προσταγλανδίνες |
| • Οργανομεγαλία | • Εξωμυελική αιμοποίηση, αυξημένη μάζα ερυθρών και λευκών αιμοσφαιρίων |
| • Κνησμός, γαστρίτιδα | • Φλεγμονώδεις παράγοντες-έκκριση ισταμίνης |
| • Ερυθρομέλαια | • Θρομβοκυττάρωση |
| • Υπερουριχαιμία, ουρική αρθρίτιδα, νεφρολιθίαση | • Αυξημένη καταστροφή των κυττάρων |
| • Μυελοϊνωση | • Αντίδραση στο νεοπλασματικό κλώνο |
| • Οξεία λευχαιμία | • Απότοκή της θεραπείας ή της έξαρσης του κλώνου (σύνδρομο Richter) |

Όσον αφορά στα εργαστηριακά ευρήματα, η προέλευση της νόσου από το αρχικό πολυδύναμο κύτταρο έχει ως αποτέλεσμα την υπερπλασία της ερυθράς, της λευκής και της μεγακαρουκυτταρικής σειράς (11,38). Η λευκοκυττάρωση είναι συνήθως μέτριου βαθμού και δεν χρειάζεται ειδική θεραπεία. Πολύ μεγάλη αύξηση των λευκοκυττάρων συνήθως συσχετίζεται με την σημαντική σπληνομεγαλία και αντανάκλα το βαθμό της εξωμυελικής αιμοποίησης (38).

Η ερυθροκυττάρωση είναι το πλέον χαρακτηριστικό εύρημα της ΑΠ και η αιτία των περισσότερων κλινικών επιπλοκών της νόσου και αποτελεί την πιο σημαντική διαφορά της ΑΠ από την ΙΘ και την ΙΜ. Επιπλέον, τα προγονικά κύτταρα της ερυθράς σειράς εμφανίζουν ευαισθησία στη δράση και άλλων κυτταροκινών, εκτός από την EPO, όπως ο GM-CSF (granulocyte-macrophage colony stimulation factor), ο IGF-1 (insulin-like growth factor-1), η ιντερλευκίνη-3 και ο SCF (stem cell factor). Είναι πιθανό αυτές οι διαταραχές να είναι αποτέλεσμα της αυξημένης δράσης της τυροσινικής κινάσης και ενισχύθηκε από το γεγονός ότι μία σειρά αναστολέων των κινάσων είναι

δυνατό να εμποδίζει την *in vitro* ανάπτυξη των ανεξάρτητων από την ΕΡΟ προγονικών κυττάρων της ερυθράς σειράς (20).

Διάγνωση

Πολύ σημαντικό στοιχείο για τη διάγνωση της ΑΠ είναι ότι ο αυξημένος αιματοκρίτης αντιστοιχεί και σε αντίστοιχη αύξηση της μάζας των ερυθρών αιμοσφαιρίων. Αν σε ασθενείς με αυξημένο αιματοκρίτη δεν ανευρέθει αυξημένη μάζα ερυθρών, τίθεται η διάγνωση δευτεροπαθούς πολυερυθραιμίας (38). Επιπλέον, στις δευτεροπαθείς πολυερυθραιμίες η τιμή της Ερο στον ορό είναι πάντα αυξημένη, ενώ στην ΑΠ είναι φυσιολογική ή ελαττωμένη (40). Υποψία της ΑΠ τίθεται από την εμφάνιση θρόμβωσης μεγάλων αγγείων (αρτηριών και φλεβών) κοιλίας και κάτω άκρων, τον κνησμό μετά από επαφή με θερμό νερό, την ερυθρομελαλγία ή την σπληνομεγαλία. Επιπλέον, η ανάπτυξη των προγονικών κυττάρων της ερυθράς σειράς σε απουσία της Ερο, *in vitro*, είναι ένα στοιχείο που χρησιμοποιείται στη διάγνωση της ΑΠ, αν και δεν είναι ειδικό της νόσου (20). Τα κριτήρια της WHO για τη διάγνωση της ΑΠ φαίνονται στον πίνακα 5.

Πίνακας 5. Τα κριτήρια της WHO για τη διάγνωση της Αληθούς Πολυερυθραιμίας (20).

Κριτήρια Α

1. Αυξημένη μάζα ερυθροκυττάρων >25% άνω του μέσου όρου, ή τιμή αιμοσφαιρίνης >18.5 g/ml στους άνδρες και >16.5 g/ml στις γυναίκες, ή >99^η εκατοστιαία θέση στις εξειδικευμένες μετρήσεις αναφοράς για το φύλο, την ηλικία και το ύψος στον πληθυσμό αναφοράς.
2. Απουσία αιτιών δευτεροπαθούς πολυερυθραιμίας όπως:
 - α. Απουσία οικογενούς πολυερυθραιμίας
 - β. Αυξημένα επίπεδα ερυθροποιητίνης στον ορό λόγω:
 - i. Υποξίας (αρτηριακό PO₂ <92%)
 - ii. Αυξημένη χημική συγγένεια του οξυγόνου με την αιμοσφαιρίνη
 - iii. Δομικές αλλαγές του υποδοχέα της ερυθροποιητίνης
 - iv. Αυξημένη έκκριση ερυθροποιητίνης στον ορό λόγω κακοήθειας (ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα, υπερνέφρωμα, καρκίνο παραθυρεοειδούς), ή μη κακοηθών καταστάσεων (πολυκυστικοί νόσοι νεφρών, φαιοχρωμοκύττωμα)
3. Σπληνομεγαλία
4. Κλωνική γενετική ανωμαλία, με απουσία του χρωμοσώματος της Φιλαδέλφειας ή του BCR/ABL χιμαιρικού γονιδίου στα μυελικά κύτταρα



5. Δημιουργία αποικιών της ερυθράς σειράς *in vitro* χωρίς την παρουσία Ερο

Κριτήρια Β

1. Θρομβοκυττάρωση $>400 \times 10^9/L$
2. Λευκοκυττάρωση $>12 \times 10^9/L$
3. Η βιοψία του μυελού των οστών δείχνει παμμυέλωση με ιδιαίτερη ανάπτυξη της ερυθράς και μεγακαρυοκυτταρικής σειράς
4. Χαμηλά επίπεδα ερυθροποιητίνης στον ορό

Σημείωση: Η διάγνωση της ΑΠ απαιτεί την ταυτόχρονη παρουσία των δύο πρώτων κριτηρίων Α μαζί με ένα ακόμα κριτήριο Α ή δύο κριτήρια Β.

Παράγοντες κινδύνου-Θεραπεία

Κύριος στόχος της θεραπευτικής αγωγής είναι η βελτίωση της κλινικής εικόνας και η μείωση, στο ελάχιστο, των θρομβωτικών και αιμορραγικών επεισοδίων, χωρίς να αυξάνεται, παράλληλα, η πιθανότητα πρόκλησης λευχαιμίας ή άλλου νεοπλάσματος. Σε εργαστηριακό επίπεδο πρέπει να μειωθεί ο αιματοκρίτης κάτω από 50%, με ιδανικό σημείο τα επίπεδα του 45% για τους άνδρες και 42% για τις γυναίκες (20). Οι ασθενείς θα πρέπει να κατατάσσονται ανάλογα με τον κίνδυνο εμφάνισης θρομβωτικών ή αιμορραγικών επεισοδίων σε χαμηλού, ενδιάμεσου ή υψηλού κινδύνου, όπως φαίνεται στον πίνακα 6.

Πίνακας 6. Κατάταξη των ασθενών με ΑΠ με βάση τον κίνδυνο εμφάνισης θρομβωτικών ή αιμορραγικών επεισοδίων (20).

| | |
|---------------------|--|
| Χαμηλού κινδύνου | Ηλικία <60 έτη Απουσία ιστορικού θρομβώσεων Αριθμός αιμοπεταλίων $<1.500 \times 10^9/L$ και Παράγοντες κινδύνου καρδιαγγειακής νόσου (κάπνισμα, υπέρταση, υπερχοληστερολαιμία, σακχαρώδης διαβήτης) |
| Ενδιάμεσου κινδύνου | Μη χαμηλού, μη υψηλού κινδύνου |
| Υψηλού κινδύνου | Ηλικία >60 έτη ή προηγούμενο ιστορικό θρόμβωσης |

Θεραπεία πρώτης γραμμής για όλους ανεξαιρέτως τους ασθενείς, ανεξαρτήτως κατάταξης, αποτελεί η αφαιμάξη. Η χορήγηση χαμηλών δόσεων ασπιρίνης, 75-100 mg/μέρα (39) ή 40-325 mg/μέρα (20) έχει αποδειχθεί ότι μειώνει σημαντικά τον κίνδυνο καρδιαγγειακού θανάτου, μη θανατηφόρου εμφράγματος του μυοκαρδίου (ΟΕΜ), μη θανατηφόρου αγγειακού εγκεφαλικού

επεισοδίου (ΑΕΕ) και σοβαρού θρομβοεμβολικού επεισοδίου. Η χορήγηση ασπιρίνης οδήγησε σε μικρή αύξηση των αιμορραγικών επεισοδίων (39). Περιορισμούς στη χορήγηση ασπιρίνης αποτελούν το ιστορικό σημαντικής αιμορραγίας, η δυσανεξία και η αλλεργία στην ασπιρίνη. Επιπλέον, θα πρέπει να αποκλεισθεί η παρουσία της επίκτητης νόσου του von Willebrant (20,40).

Η υδροξυουρία (HU), ένας αντιμεταβολίτης που εμποδίζει τη σύνθεση του DNA επειδή αναστέλλει το ένζυμο ριβονουκλεοσιδική ρεδουκτάση, είναι το φάρμακο εκλογής σε ασθενείς που, προσέρχονται είτε με ιστορικό θρόμβωσης, είτε είναι άνω των 60 ετών (υψηλού κινδύνου ΑΠ). Η αρχική δόση μπορεί να είναι 500mg δύο ή τρεις φορές τη μέρα (20). Όσον αφορά στον κίνδυνο πρόκλησης λευχαιμίας μετά από χορήγηση HU, μία πρόσφατη μεγάλη μελέτη που περιλάμβανε περισσότερους από 1.680 ασθενείς με ΑΠ, δεν έδειξε στατιστικά θετική συσχέτιση (41).

Η ιντερφερόνη-α (IFN-α) αποτελεί τη θεραπεία εκλογής σε ασθενείς με δυσανεξία στην HU, γυναίκες αναπαραγωγικής ηλικίας, ειδικά κατά την κύηση, ή σε πολύ νέους ασθενείς (20). Πρόσφατα, έχουν χρησιμοποιηθεί για τη θεραπεία των ΜΥΣ ημισυνθετικές μορφές της IFN-α (peg-IFN-α). Σε μερικές μελέτες έχουν φαίνεται ότι υπερτερούν έναντι των μη πεγκυλιωμένων INF (42). Σε μία μελέτη η χορήγηση της peg-IFN-α σε ασθενείς με ΑΠ μείωσε το ποσοστό της JAK 2 V617F μετάλλαξης σε 24 από τους 27 ασθενείς από τη μέση τιμή 49% στη μέση τιμή 27%. Μάλιστα σε έναν από αυτούς τους ασθενείς η μετάλλαξη μετά από 12 μήνες δεν ήταν πλέον ανιχνεύσιμη (43). Σε άλλες μελέτες έχουν αναφερθεί, μικρότερα ποσοστά μείωσης της μετάλλαξης JAK 2 V617F μετά από χρήση IFN-α (44,45). Χρειάζονται βεβαίως και άλλες μελέτες για να αποδειχθεί ότι πράγματι ότι η IFN έχει επίδραση στη V617F JAK 2 μετάλλαξη.



A.2.II. Ιδιοπαθής Θρομβοκυττάρωση (Essential Thrombocythemia)

Η Ιδιοπαθής Θρομβοκυττάρωση (ΙΘ) είναι μία χρόνια μυελοϋπερπλαστική νόσος που προσβάλλει κυρίως την μεγακαρουκυτταρική σειρά του μυελού των οστών. Χαρακτηρίζεται από θρομβοκυττάρωση στο περιφερικό αίμα (αριθμός αιμοπεταλίων μεγαλύτερος από 450.000/κ.χιλ.) και αυξημένο αριθμό μεγάλων και ώριμων μεγακαρουκυττάρων στο μυελό των οστών. Κλινικά μπορεί να εμφανιστούν θρομβωτικά αλλά και σπανιότερα βέβαια, αιμορραγικά επεισόδια (12).

Επιδημιολογία

Υπολογίζεται ότι η ετήσια επίπτωση της νόσου είναι 1-2.5/100.000 άτομα ανά έτος (46). Η συνήθης ηλικία εμφάνισης της νόσου είναι η πέμπτη και έκτη δεκαετία της ζωής. Η νόσος εμφανίζεται με την ίδια συχνότητα και στα δύο φύλα. Η ΙΘ εμφανίζεται, αν και σπάνια, ακόμα και στην παιδική ηλικία, καθώς και σε άτομα στην τρίτη δεκαετία της ζωής οπότε και η νόσος είναι συχνότερη στις γυναίκες (46,47,48).

Μοριακή παθογένεια

Η ΙΘ θεωρείται ότι προκύπτει από μεταλλάξεις του αρχέγονου αιμοποιητικού κυττάρου. Η θεωρία αυτή διατυπώθηκε προ περίπου 25ετίας όταν αποδείχθηκε η κλωνικότητα στην απενεργοποίηση του X χρωμοσώματος σε πολλές γενεές της μυελικής, αλλά όχι της λεμφικής σειράς (17). Στους μισούς ασθενείς με ΙΘ βρέθηκαν αυξημένα επίπεδα m-RNA του PRV-1 στα κοκκιοκύτταρα (49). Επιπλέον, 30% των ασθενών με ΙΘ έχουν ελαττωμένα επίπεδα ερυθροποιητίνης και πιθανό αυξημένο κίνδυνο για θρομβωτικά επεισόδια (50). Η εικόνα 1. δείχνει τη φυσιολογική και παθολογική παραγωγή αιμοπεταλίων.

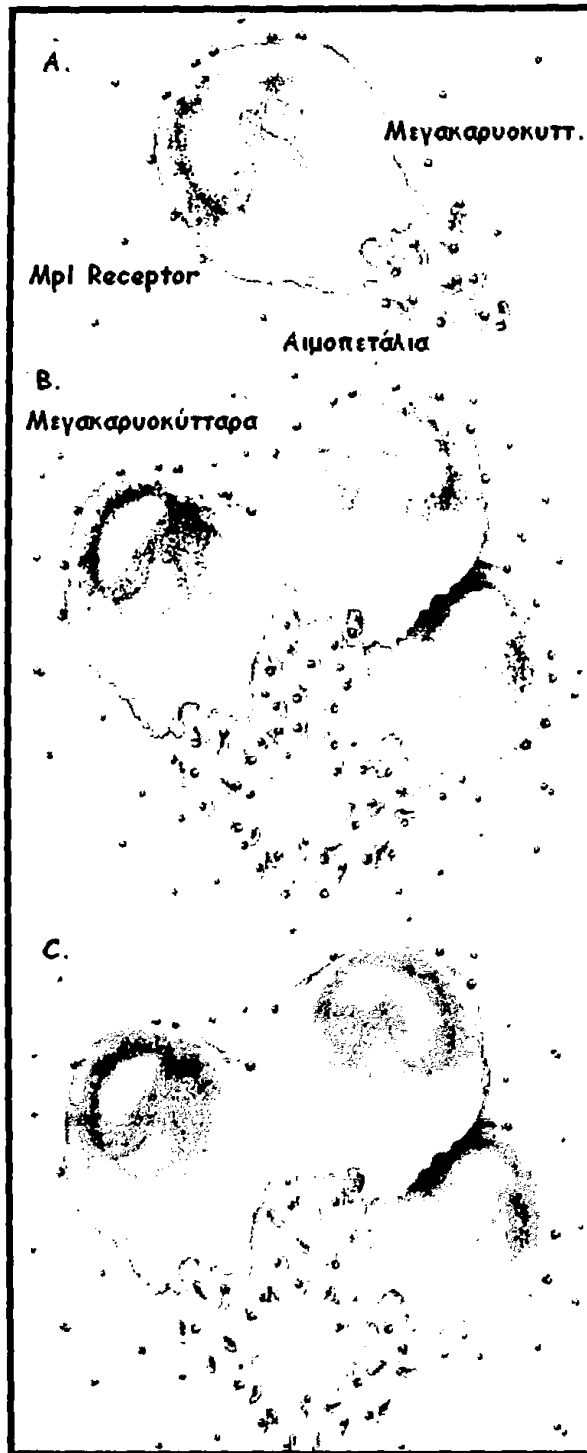
Το έτος 2005 ήταν σημαντικό για την κατανόηση της μοριακής παθογένειας της Ιδιοπαθούς Θρομβοκυττάρωσης, όπως και των άλλων bcr/abl αρνητικών ΜΥΣ. Η ενεργός σωματική μετάλλαξη V617F της JAK 2 κινάσης παρατηρείται και σε ασθενείς με ΙΘ σε ποσοστό 23-57% (51). Η ύπαρξη της ίδιας μετάλλαξης στην ΙΘ, την ΑΠ και την ΙΜ μπορεί πιθανότατα να εξηγήσει την, ανεξάρτητη από αυξητικούς παράγοντες, ανάπτυξη των προγονικών κυττάρων της ερυθράς σειράς και των μεγακαρουκυττάρων σε in-vitro πειράματα (52).



κ. 1. Υπό φυσιολογικές συνθήκες (Σχ. Α) η ρύθμιση της σύνθεσης των αιμοπεταλίων από τα μεγακαρυοκύτταρα περιλαμβάνει τη δέσμευση της θρομβοποιητίνης στην επιφάνεια των μεγακαρυοκυττάρων. Έτσι, οδηγούμαστε στην παραγωγή των αιμοπεταλίων.

Η δευτεροπαθή (αντιδραστική) θρομβοκυττάρωση, η ογκοειμένη νόσος επάγει την σύνθεση αυξημένου αριθμού υποδοχέων θρομβοποιητίνης (πολύ πιθανό να άλλων κυτταροκινών όπως η IL-6), που οδηγεί σε αυξημένη παραγωγή μεγακαρυοκυττάρων και αιμοπεταλίων (Σχ. Β).

Η κλωνική θρομβοκυττάρωση (Σχ. C), η αυξημένη έκκριση της θρομβοποιητίνης στα παθολογικά αιμοπετάλια και μεγακαρυοκύτταρα, αυξάνει τα επίπεδα ελεύθερης θρομβοποιητίνης στο πλάσμα. Παρά την αύξηση των υποδοχέων θρομβοποιητίνης, τα μεγακαρυοκύτταρα είναι ευαίσθητα στη δράση της θρομβοποιητίνης, κατάσταση που οδηγεί σε αυξημένη παραγωγή μεγακαρυο-κυττάρων και αιμοπεταλίων.



Κλινική εικόνα

Περισσότεροι από τους μισούς ασθενείς είναι ασυμπτωματικοί. Η νόσος διαγιγνώσκεται όταν, σε τυχαίο αιματολογικό έλεγχο, ανευρίσκεται αυξημένος αριθμός αιμοπεταλίων. Αντιθέτως, στο 20-50% των ασθενών εμφανίζονται θρομβοεμβολικά επεισόδια ή αιμορραγίες κατά τη διάγνωση (53). Οι πιο συχνές μορφές θρομβωτικών επεισοδίων είναι τα αγγειακά εγκεφαλικά επεισόδια, τα παροδικά ισχαιμικά επεισόδια, τα οξέα εμφράγματα του μυοκαρδίου, οι θρομβώσεις περιφερικών αρτηριών και οι εν τω βάθει φλεβικές θρομβώσεις, οι οποίες εμφανίζονται σε ασυνήθεις θέσεις όπως είναι οι ηπατικές φλέβες (σύνδρομο Budd-Chiari), η πυλαία φλέβα και οι μεσεντέριες φλέβες (54).

Επιπλέον, οι ασθενείς μπορεί να εμφανίζουν διαταραχές της μικροαγγειακής κυκλοφορίας. Οι πιο χαρακτηριστικές από αυτές είναι η ερυθρομελαλγία, η οποία υποχωρεί με τη χορήγηση ασπιρίνης και η ισχαιμία των δακτύλων των άκρων που οδηγεί σε παραισθησίες και γάγγραινα (54,55). Αιμορραγικά φαινόμενα έχουμε από τους βλενογόνους του γαστρεντερικού σωλήνα, του ανώτερου αναπνευστικού και το ουροποιητικού συστήματος (54, 55). Σπληνομεγαλία εμφανίζει το 50% περίπου των ασθενών. Στους υπόλοιπους μπορεί να γίνει αυτοσπληνεκτομή από έμφρακτα στο σπλήνα, ενώ σε 15-20% των ασθενών απαντάται ηπατομεγαλία (56).

Διάγνωση

Δεν υπάρχει παθογνωμονικό κλινικό ή εργαστηριακό εύρημα στο οποίο να βασίζεται η διάγνωση της ΙΘ. Η κλινική εξέταση, τα εργαστηριακά ευρήματα, το μυελόγραμμα και η οστεομυελική βιοψία μας βοηθούν πολύ προς αυτή την κατεύθυνση. Συνεπώς, η διάγνωση τίθεται με τον αποκλεισμό των άλλων μυελοϊπερπλαστικών συνδρόμων, και κυρίως της ΧΜΛ με την εξέταση του Ph χρωμοσώματος, των μυελοδυσπλαστικών συνδρόμων. Απαραίτητος επίσης είναι και ο αποκλεισμός καταστάσεων που προκαλούν δευτεροπαθώς θρομβοκυττάρωση. Τα κριτήρια WHO για την ΙΘ φαίνονται στον πίνακα 7.



Πίνακας 7. Κριτήρια WHO για την Ιδιοπαθή Θρομβοκυττάρωση (12).

Θετικά κριτήρια

1. Αριθμός αιμοπεταλίων $>600 \times 10^9/L$
2. Βιοψία του μυελού των οστών ενδεικτική πολλαπλασιασμού της μεγακαρουκυτταρικής κυρίως σειράς με αυξημένο αριθμό μεγάλων και ώριμων αιμοπεταλίων

Κριτήρια αποκλεισμού

1. Αποκλεισμός Αληθούς Πολυερυθραιμίας
 - Μάζα ερυθρών αιμοσφαιρίων φυσιολογική ή $Hb < 18.5g/dl$ στους άνδρες, $16.6g/dl$ στις γυναίκες
 - Αποκλεισμός σιδηροπενίας στο μυελό των οστών, φυσιολογικές τιμές φερριτίνης ή/και φυσιολογικό MCV
 - Σε περίπτωση που δεν συναντήσουμε την προηγούμενη κατάσταση, η χορήγηση σιδήρου να μην αυξήσει τη μάζα των ερυθρών αιμοσφαιρίων ή την τιμή του αιματοκρίτη σε επίπεδα Αληθούς Πολυερυθραιμίας
2. Αποκλεισμός ΧΜΛ
 - Απουσία του χρωμοσώματος της Φιλαδέλφειας και του BCR/ABL χημειοκινικού γονιδίου
3. Αποκλεισμός Ιδιοπαθούς Μυελοϊνώσεως
 - Απουσία ίνωσης από κολλαγόνο στο μυελό των οστών
 - Ελάχιστη ή μηδαμινή δικτυωτή ίνωση
4. Αποκλεισμός Μυελοδυσπλαστικού Συνδρόμου
 - Απουσία $del(5q)$, $t(3;3)(q21;q26)$, $inv(3)(q21q26)$
 - Απουσία σημαντικής δυσπλασίας των κοκκιοκυττάρων, ελάχιστα ή καθόλου μικρομεγακαρουκύτταρα
5. Απουσία δευτεροπαθούς θρομβοκυττάρωσης όπως :
 - Υποκείμενη λοίμωξη ή φλεγμονή
 - Υποκείμενο νεοπλασμα
 - Σπληνεκτομή
 - Σιδηροπενία
 - Αγγειίτιδα



Παράγοντες κινδύνου-Θεραπεία

Η πλειοψηφία των ασθενών με ΙΘ εμφανίζουν φυσιολογικό προσδόκιμο επιβίωσης και έχουν σχετικά φυσιολογική ζωή τα πρώτα 15 χρόνια της ασθένειας (57). Σε μερικούς ασθενείς 15 έτη μετά από τη διάγνωση παρατηρείται αυξημένη συχνότητα μετάπτωσης σε οξεία μυελογενή λευχαιμία. Ο κίνδυνος της μετάπτωσης σε οξεία λευχαιμία αυξάνει προοδευτικά από 5% σε 20% αντίστοιχα στην πρώτη και δεύτερη δεκαετία της νόσου (58).

Κατά τη διάγνωση, και προτού αρχίσει η θεραπεία, οι ασθενείς θα πρέπει να ελέγχονται για τυχόν ιστορικό θρομβωτικών ή αιμορραγικών επεισοδίων όπως και για παράγοντες κινδύνου εμφάνισης καρδιαγγειακής νόσου. Ο πίνακας 8 δείχνει την κατάταξη της ΙΘ με βάση τον κίνδυνο εμφάνισης θρομβωτικών και αιμορραγικών επεισοδίων.55

Πίνακας 8. Κατάταξη της ΙΘ με βάση τον κίνδυνο εμφάνισης θρομβωτικών και αιμορραγικών επεισοδίων (59).

| |
|---|
| <p>Χαμηλού κινδύνου</p> <p>Ηλικία <60 έτη και αρνητικό ιστορικό θρομβώσεων και αριθμός αιμοπεταλίων <1.500 x10⁹/L</p> |
| <p>Ενδιάμεσου κινδύνου</p> <p>Ηλικία 40-60 έτη και παράγοντες κινδύνου καρδιαγγειακής νόσου (κάπνισμα, υπέρταση, υπερχοληστερολαιμία, σακχαρώδης διαβήτης) ή οικογενής θρομβοφιλική διάθεση και αριθμός αιμοπεταλίων <1.500 x10⁹/L</p> |
| <p>Υψηλού κινδύνου</p> <p>Ηλικία >60 έτη ή ιστορικό θρόμβωσης ή μεγάλης αιμορραγίας ή αριθμός αιμοπεταλίων >1.500 x10⁹/L</p> |

Σημείωση: Η διόρθωση των καρδιαγγειακών παραγόντων κινδύνου συστήνεται σε όλους τους ασθενείς. Η παρουσία τους ή όχι έχει μεγάλη σημασία για την κατάταξη της νόσου με βάση τον κίνδυνο θρομβωτικών και αιμορραγικών επεισοδίων.

Χαμηλού κινδύνου ασθενείς

Η θνητότητα από θρομβωτικά επεισόδια στους χαμηλού κινδύνου ασθενείς είναι μικρή και δεν υπάρχουν μελέτες που να δείχνουν ότι η χημειοθεραπεία μπορεί να τους μειώσει. Έτσι, η απλή παρακολούθηση των μικρής ηλικίας, μη συμπτωματικών ασθενών που έχουν αριθμό αιμοπεταλίων κάτω από 1.500 x10⁹/L είναι η καλύτερη επιλογή (8, 20). Η χορήγηση ασπιρίνης σε διάφορες δόσεις (30-500mg/dl) έχει βρεθεί ότι μπορεί να ελέγξει τα συμπτώματα της διαταραχής της

μικροκυκλοφορίας, όπως είναι η ερυθρομελαλγία, τα παροδικά ισχαιμικά αγγειακά εγκεφαλικά επεισόδια και οι οφθαλμικές διαταραχές (54). Η ασπιρίνη σε χαμηλές δόσεις είναι αποτελεσματική στην πρόληψη των θρομβωτικών επεισοδίων, αλλά ο κίνδυνος αιμορραγίας είναι υπαρκτός (8). Με βάση τα δεδομένα αυτά, η ασπιρίνη είναι μια καλή θεραπευτική επιλογή για όλους τους ασθενείς.

Ενδιάμεσου κινδύνου ασθενείς

Σε πρόσφατη μελέτη (40) προτείνεται να θεραπεύονται μόνο με ασπιρίνη οι ασθενείς ενδιάμεσου κινδύνου. Φυσικά, θα πρέπει να γίνεται ταυτόχρονα και αντιμετώπιση των υπαρχόντων παραγόντων κινδύνου εμφάνισης καρδιαγγειακής νόσου.

Υψηλού κινδύνου ασθενείς

Η μείωση του αριθμού των αιμοπεταλίων συνιστάται σε όλους τους ασθενείς (20). Η υδροξυουρία είναι το φάρμακο εκλογής και χορηγείται σε δόσεις 0.5-2g ημερησίως από το στόμα. Η IFN-α έχει επίσης χρησιμοποιηθεί με αμφιλεγόμενα όμως αποτελέσματα. Η χρήση της ενδείνεται κυρίως σε γυναίκες στην κύηση λόγω της μη τερατογόνου δράσης της (8). Η αναγρελίδη είναι ένα νέο φάρμακο με ισχυρή αντιθρομβωτική δράση που μειώνει την παραγωγή των αιμοπεταλίων από το μυελό των οστών, χωρίς όμως συνήθως να επηρεάζει τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων των υπολοίπων σειρών (8). Ο ακριβής μηχανισμός δράσης της δεν είναι πλήρως κατανοητός, όμως επικεντρώνεται στην αλληλαπίδραση θρομβοποιητίνης και του υποδοχέα της (c-mpl) (59). Η χρήση της επιφέρει τον έλεγχο στον αριθμό των αιμοπεταλίων στο 90% των ασθενών. Μειονέκτημα είναι οι συχνές παρενέργειες από το νευρικό και το πεπτικό σύστημα, όπως και από την καρδιά, ενώ μερικές φορές προκαλεί και ανθεκτική αναιμία (8).



A.2.III. Ιδιοπαθής Μυελοϊνώση (Idiopathic Myelofibrosis)

Η Ιδιοπαθής Μυελοϊνώση (IM) ή Μυελοσλήρυνση ή Μυελοϊνώση με Μυελοειδή Μεταπλασία είναι μία χρόνια μυελοϊπερπλαστική νόσος που χαρακτηρίζεται κυρίως από πολλαπλασιασμό των μεγακαρουκυττάρων και των κοκκιοκυττάρων στο μυελό των οστών, συνοδευόμενο από αντιδραστική εναπόθεση συνδετικού ιστού και εξωμυελική αιμοποίηση (60). Η νόσος περιγράφηκε για πρώτη φορά το 1879 (61) και το 1951 εντάχθηκε στα ΜΥΣ (9). Από το 1978 η IM θεωρείται ως κλωνική μυελοϊπερπλαστική νόσος προερχόμενη από το αρχέγονο πολυδύναμο κύτταρο, που εμφανίζει δευτερογενή μυελοϊνώση (62).

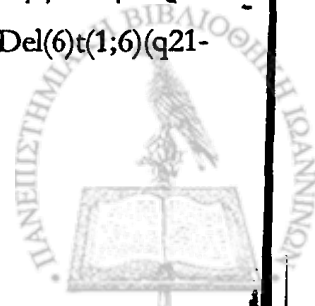
Επιδημιολογία

Η IM είναι μία σχετικά σπάνια νόσος. Η συχνότητα εμφάνισης που κυμαίνεται από 0.4 σε 1.5/100,000 πληθυσμού ετησίως (46). Εμφανίζεται πιο συχνά στην έβδομη δεκαετία της ζωής, ενώ η αναλογία προσβολής των δύο φύλων, άνδρες προς γυναίκες είναι 1.2 με 1.6 προς 1. Ασθενείς κάτω των 30 ετών συναντούμε σε ποσοστό λιγότερο από 3%, ενώ πολύ σπάνια η νόσος απαντάται στην παιδική ηλικία, όπου και εμφανίζεται σε πιο ελαφρά μορφή (63,64). Τα αίτια της νόσου είναι άγνωστα. Η έκθεση σε βενζίνη και ιονίζουσα ακτινοβολία έχει ενοχοποιηθεί σε ορισμένες περιπτώσεις. Επιπλέον έχουν αναφερθεί και ορισμένα περιστατικά οικογενούς μυελοϊνώσης (65,66).

Μοριακή παθογένεση

Εδώ και 30 χρόνια (1977) αποδείχθηκε σε μία Αφρο-Αμερικανή ασθενή με IM, ετερόζυγη για τα ισοένζυμα της γλυκοζο-6-φωσφορικής-δεϋδρογονάσης, ότι τα κυκλοφορούντα αιμοποιητικά κύτταρα προέρχονται από κοινό αρχέγονο αιμοποιητικό κύτταρο (stem cell) και ότι οι ινοβλάστες του μυελού των οστών είχαν μη κλωνική προέλευση (62). Η επιβεβαίωση της κλωνικότητας της αιμοποίησης στην IM έγινε με τη χρήση γονιδίων του χρωμοσώματος X (67). Πιο πρόσφατα αποδείχθηκε ότι τα κύτταρα της ιδιοπαθούς μυελοϊνώσης προέρχονται από τη φάση των CD34+ αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων του μυελού (68).

Παθολογικός καρυότυπος απαντάται στους μισούς περίπου ασθενείς (68). Οι πιο συχνές καρυοτυπικές ανωμαλίες, με την καθεμία να βρίσκεται σε ποσοστά 10-25% είναι η del(20)(q11;q13), η del(13)(q12q22), η τρισωμία 8, η τρισωμία 9, del(12)(p11;p13), η μονοσωμία ή έλλειψη του μακρού σκέλους του χρωμοσώματος 7 και μερική τρισωμία του 1q (66). Η μετάλλαξη Del(6)t(1;6)(q21-23;p21-23) βρέθηκε πρόσφατα να είναι ειδική στην IM (69).



Η σημειακή μετάλλαξη JAK 2 V617F ανευρίσκεται σε ποσοστό 35-57% των ασθενών με IM, σύμφωνα με τις μέχρι τώρα μελέτες (45). Ομοζυγωτία για το μεταλλαγμένο αλληλίο υπάρχει σε ποσοστό 9-29% των ασθενών και έχει βρεθεί ότι είναι αποτέλεσμα περισσότερο του μιτωτικού ανασυνδιασμού παρά της απώλειας της ετεροζυγωτίας (loss of heterozygosity) (30). Με τη χρήση του συγκριτικού γονιδιακού υβριδισμού (comparative genomic hybridization), βρέθηκε ότι αλλαγές στο χρωμόσωμα 9p, που είναι η περιοχή της V617F μετάλλαξης, συμβαίνουν σε ποσοστό 50% των ασθενών με IM (70). In vitro, η V617F μετάλλαξη προκαλεί μεγάλη ενεργοποίηση του άξονα JAK-STAT και υπερευαισθησία σε κυτταροκίνες, στοιχεία τα οποία είναι χαρακτηριστικά στα προγονικά κύτταρα των ΜΥΣ. In vivo, η μετάλλαξη οδηγεί σε αυξημένη ερυθροποίηση στα ποντίκια (30-36).

Η JAK 2 V617F μετάλλαξη συνοδεύεται από υπερέκφραση του FKBP51 στα μεγακαρουκύτταρα, ο οποίος μέσω της ενεργοποίησης του πυρηνικού παράγοντα κB (NF-κB), ρυθμίζει τη σύνθεση του TGF-β (71). Επιπλέον, έχει βρεθεί ότι 5% των ασθενών με IM παρουσιάζουν τη μετάλλαξη W515L ή W515K του c-mpl μορίου, που είναι ο υποδοχέας της θρομβοποιητίνης (72). Ορισμένοι από αυτούς εμφανίζουν ταυτόχρονα την V617F και την MPL515 μετάλλαξη. Από τη μελέτη αυτή φαίνεται ότι οι μεταλλάξεις αυτές είναι πρώιμα γεγονότα στην IM και πιθανώς να παίζουν ρόλο στη δημιουργία της φαινοτυπικής ποικιλίας των ΜΥΣ (73).

Σε μελέτες που έγιναν σε ποντίκια, ο φαινότυπος της IM επιτεύχθηκε είτε με την υπερέκφραση της θρομβοποιητίνης (TPO^{high} mice), είτε με την περιορισμένη υποέκφραση του μετεγγραφικού παράγοντα GATA-1 μεγακαρουκυττάρων (GATA-1^{low} mice). Και στις δύο περιπτώσεις τα μεγακαρουκύτταρα διανέμουν μη φυσιολογικά το προσκολλητικό μόριο της P-selectin, γεγονός που κινητοποιεί μία παθολογική αλληλεπίδραση μεταξύ των μεγακαρουκυττάρων και των ουδετεροφίλων (74). Αυτό οδηγεί σε απελευθέρωση ινογενετικών και αγγειογενετικών κυτταροκινών μεταξύ των οποίων ο TGF-β, ο παραγόμενος από τα αιμοπετάλια αυξητικός παράγων (PDGF), ο βασικός αυξητικός παράγων των ινοβλαστών (bFGF), ο αυξητικός παράγοντας των ενδοθηλίων των αγγείων (VEGF), ιστικοί αναστολείς των μεταλλοπρωτεϊνών και η ελαστάση η παραγόμενη από τα ουδετερόφιλα. (75).

Κλινικά-εργαστηριακά ευρήματα

Περισσότεροι από 30% των ασθενών είναι ασυμπτωματικοί κατά τη διάγνωση. Η διάγνωση γίνεται τυχαία με αφορμή την ανεύρεση σπληνομεγαλίας, κατά τη διάρκεια της κλινικής εξέτασης. Επίσης σε εργαστηριακό έλεγχο ρουτίνας είναι δυνατό να ανευρεθεί παθολογική γενική αίματος, όπως για παράδειγμα αναιμία, θρομβοκυττάρωση, ή θρομβοπενία (8,75,76). Σε προχωρημένα στάδια ο ασθενής μπορεί να εκδηλώσει συμπτώματα από τη σπληνομεγαλία, την αναιμία και τη θρομβοκυττάρωση ή τη θρομβοπενία (8,75). Η σπληνομεγαλία οφείλεται στην εξωμυελική

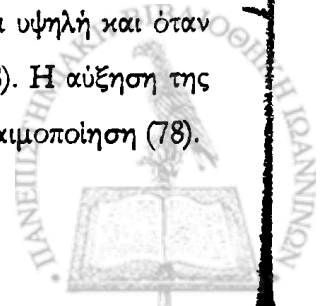


αιμοποίηση, είναι το χαρακτηριστικό εύρημα της ΙΜ και παρουσιάζεται περίπου στο 100% των ασθενών. Είναι εκσεσημασμένη ακόμα και κατά την τυχαία ανεύρεση, ενώ η διόγκωση του σπλήνα μπορεί να φτάνει μέχρι την ηβική σύμφυση. Επιπλέον, το 50% των ασθενών παρουσιάζει και ηπατομεγαλία. Εξαιτίας της οργανομεγαλίας μπορεί οι ασθενείς να παραπονιούνται για πρώιμο αίσθημα κορεσμού, διάρροια και περιφερικό οίδημα (77). Οι αιμορραγικές εκδηλώσεις δεν είναι σπάνιες, ιδιαίτερα στα προχωρημένα στάδια της νόσου και οφείλονται στη θρομβοπενία (8). Άλλα συστηματικά συμπτώματα είναι η καχεξία, που εκδηλώνεται με καταβολή δυνάμεων, απώλεια βάρους, νυκτερινούς ιδρώτες και πυρετό έως και 38°C. Η παραπάνω συμπτωματολογία πιθανώς οφείλεται στην εξάπλωση του όγκου και στην υπερκαταβολική κατάσταση, λόγω της αυξημένης καταστροφής των κυττάρων (78). Τέλος, οι ασθενείς εμφανίζουν και αυτοάνοσα φαινόμενα που έχουν σχέση με τη διαταραχή του αιμοποιητικού συστήματος (8).

Κατά τη διάγνωση, αναιμία παρατηρείται στο 50% των ασθενών. Τελικά όμως, όλοι οι ασθενείς θα αναπτύξουν αναιμία κατά τη διαδρομή της νόσου (8). Η αναιμία στα αρχικά στάδια οφείλεται σε καταστροφή των ερυθροκυττάρων στο μυελό των οστών. Στα προχωρημένα στάδια της νόσου, η αναιμία προκαλείται από την κατακράτηση και καταστροφή των ερυθρών στο σπλήνα (φαινόμενο pooling), από την ανεπάρκεια φυλλικού οξέος, από την αύξηση του όγκου του πλάσματος, από την αντικατάσταση του φυσιολογικού αιμοποιητικού ιστού από ίνες κολλαγόνου και, σπανιότερα, από την ανάπτυξη αυτοάνοσης αιμολυτικής αναιμίας (8,78).

Στο επίχρισμα του περιφερικού αίματος η μορφολογία των ερυθρών αιμοσφαιρίων εμφανίζει ορισμένα χαρακτηριστικά παθολογικά ευρήματα. Έχουμε ερυθροκύτταρα ορθόχρωμα και υπόχρωμα (δίμορφη εικόνα), παρουσία δακρυοκυττάρων, ποικιλοκυττάρωση και μακροκυττάρωση (8,79). Εμπύρηννα ερυθρά ανευρίσκονται στους περισσότερους ασθενείς και αποτελούν περίπου το 2% του συνόλου των εμπύρηνων κυττάρων (79). Τα λευκά αιμοσφαίρια είναι άλλοτε μέτρια αυξημένα ή μειωμένα στο 25% των περιπτώσεων. Σε ποσοστό 10-20% βρίσκουμε άωρες μορφές λευκοκυττάρων στην περιφέρεια, όπως μυελοκύτταρα, μεταμυελοκύτταρα, αλλά και προμυελοκύτταρα και μυελοβλάστες. Η ταυτόχρονη παρουσία στο περιφερικό αίμα άωρων μορφών των λευκών αιμοσφαιρίων και εμπύρηνων ερυθρών ονομάζεται λευκοερυθροβλαστική αντίδραση και παρατηρείται στο 96% των ασθενών (8). Τα αιμοπετάλια, τέλος, μπορεί να είναι μειωμένα. Στο 40% των ασθενών ανευρίσκονται αυξημένα (80), ενώ σπάνια μπορεί να βρεθούν και πολύ αυξημένα, μέχρι $4 \times 10^6 / \mu\text{L}$ (8).

Σε αρκετούς ασθενείς με ΙΜ ανευρίσκεται υπερουριχαιμία, που μπορεί να προκαλέσει ουρική αρθρίτιδα, όπως και υπερχολερυθριναιμία. Η αλκαλική φωσφατάση των λευκών είναι υψηλή και όταν απουσιάζει το χρωμόσωμα της Φιλαδέλφειας, αποκλείεται η διάγνωση της ΧΜΛ (8). Η αύξηση της γαλακτικής δεϋδρογενάσης (LDH), είναι συχνό εύρημα, και αποδίδεται στην ελλιπή αιμοποίηση (78).



Η αναρρόφηση του μυελού των οστών με στερνική παρακέντηση είναι ανεπιτυχής λόγω της σκληρότητας του οστού (dry tap). Μετά από επίμονη προσπάθεια μπορεί να αναρροφηθεί λίγο υλικό, που αποτελείται κυρίως από αίμα και λίγα μυελικά κύτταρα. Η βιοψία του οστού αναδεικνύει εικόνα έκδηλης ίνωσης και οδηγεί στην τελική διάγνωση. Η αύξηση της σκληρότητας των οστών μπορεί να διαπιστωθεί ακτινολογικά στο 50% των ασθενών, και απαντάται κυρίως στα σώματα των σπονδύλων και τα μακρά οστά (8).

Διάγνωση-Σταδιοποίηση

Τα εργαστηριακά ευρήματα στην IM είναι χαρακτηριστικά και η διάγνωση τις περισσότερες φορές τίθεται εύκολα. Η βιοψία του οστού μας δείχνει αυξημένη ίνωση, που εμφανίζεται συχνά με το dry tap φαινόμενο. Η λευκοερυθροβλαστική αντίδραση και η παρουσία δακρυοκυττάρων στο επιχρίσμα του περιφερικού αίματος είναι στοιχεία συνηγορητικά για τη διάγνωση (8). Ο πίνακας 9 παρουσιάζει την κατάταξη της IM σύμφωνα με τον Π.Ο.Υ., καθώς και τα Ευρωπαϊκά κλινικά, μοριακά και παθολογοανατομικά κριτήρια για τη διάγνωση και τη σταδιοποίηση της IM.

Πίνακας 9. Οι κατά W.H.O. μορφές του μυελού των οστών και τα Ευρωπαϊκά κλινικά, μοριακά και παθολογοανατομικά (ECMP) κριτήρια για τη διάγνωση και σταδιοποίηση της IM.

Κλινικά και μοριακά κριτήρια

C1. Σχετιζόμενη με θρομβοκυτταραιμία ή να προηγείται θρομβοκυτταραιμίας και να μην είναι μετάπτωση Ιδιοπαθούς Θρομβοκυττάρωσης, Αληθούς Πολυερυθραιμίας, Χρόνιας Μυελογενούς Λευχαιμίας, Χρόνιας Μυελομονοκυτταρικής Λευχαιμίας ή Μυελοδυσπλαστικού Συνδρόμου. Απουσία Χρωμοσώματος της Φιλαδέλφεια. Παρουσία των μεταλλάξεων JAK 2 V617F ή MPL515

Κλινική σταδιοποίηση (ECMP)

- Πρώιμο κλινικό στάδιο

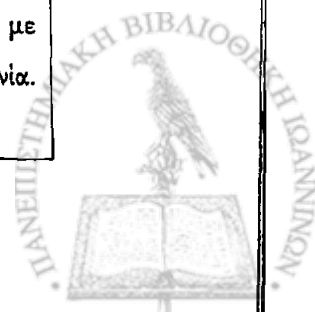
Αριθμός αιμοπεταλίων $>400 \times 10^9/L$, συνήθως περίπου $1000 \times 10^9/L$. Απουσία λευκοερυθροβλαστικής αντίδρασης και αναιμίας. Απουσία ή μικρή σπληνομεγαλία σε υπερηχογράφημα. Στάδιο IM-0 ή IM-1

- Ενδιάμεσο κλινικό στάδιο

• Παρουσία λευκοερυθροβλαστικής αντίδρασης. Αναιμία σταδίου 1: Hb μεταξύ 10-12g/dl ή 6.25-7.5mmol/L. Σπληνομεγαλία κατά την ψηλάφηση. Στάδιο IM-1 και IM-2

- Προχωρημένο κλινικό στάδιο

Σαφής λευκοερυθροβλαστική αντίδραση. Αναιμία σταδίου 2: Hb $<10g/dl$ ή Hb $>10g/dl$ με παρουσία δυσμενών συμπτωμάτων*. Σαφής σπληνομεγαλία. Λευκοκυττάρωση ή λευκοπενία. Φυσιολογικός ή μειωμένος αριθμός αιμοπεταλίων. IM-2 και IM-3



Παθολογοανατομικά κριτήρια

P1. Αυξημένη κυτταροβρίθεια του μυελού (αναλογικά με την ηλικία), λόγω χρόνιου πολλαπλασιασμού της μεγακαρουκυτταρικής και κοκκιοκυτταρικής σειράς και σχετική μείωση των προγονικών κυττάρων της ερυθράς σειράς

P2. Πυκνή συστάδα και αύξηση των ανώριμων, μεσαίου προς μεγάλου μεγέθους μεγακαρουκυττάρων, που περιέχουν υπερχρωματικούς, εν είδει νέφους πυρήνες και σαφείς ανωμαλίες ωρίμανσης

Ιστολογική διαβάθμιση μυελοϊνώσης (MF)

MF0: Προ-ινωτικό στάδιο IM-0: διάσπαρτες γραμμοειδείς δικτυωτές ίνες μη τεμνόμενες που αντιστοιχούν στο φυσιολογικό μυελό.

MF1: πρώιμο ινωτικό στάδιο IM-1: χαλαρό δίκτυο δικτυωτών ινών, ιδιαίτερα στις περιφερικές περιοχές του μυελού, μη κολλαγονοποιημένο.

MF2: ινωτικό στάδιο IM-2: διάχυτη και πυκνή ανάπτυξη τεμνόμενων δικτυωτών ινών με εστιακή ανάπτυξη δεσμίδων κολλαγόνου ή/και εστιακή οστεοσκλήρυνση

MF3: κλασσικό στάδιο IM-3: διάχυτη και πυκνή ανάπτυξη τεμνόμενων δικτυωτών ινών με φαρυδιές ταινίες κολλαγόνου ιστού, συχνά συνοδός σημαντικού βαθμού οστεοσκλήρυνσης

MF>3: τελικού σταδίου υποκυτταρικός μυελός με εκτεταμένη οστεοσκλήρυνση

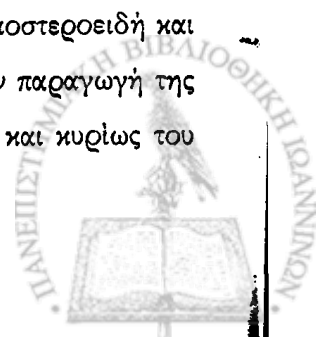
*Δυσμενή συμπτώματα: ηλικία >70 έτη, μυελοβλάστες και ερυθρο-νορμοβλάστες στο περιφερικό αίμα >2%, λευκοκυττάρωση >20 x 10⁹/L, θρομβοπενία <100 x 10⁹/L, σοβαρά γενικά συμπτώματα, μεγάλη σπληνομεγαλία, κυτταρογενετικές ανωμαλίες, αναιμία.

Θεραπεία

Η θεραπεία, με τα μέχρι τώρα χρησιμοποιούμενα φάρμακα, δεν έχει αποδειχθεί ότι επιμηκύνει την επιβίωση των ασθενών (83). Πολλοί μάλιστα ασθενείς δεν τη χρειάζονται (8). Η θεραπεία μπορεί να βοηθήσει στην βελτίωση της κυτταροπενίας, κυρίως της αναιμίας, στον έλεγχο της ηπατοσπληνομεγαλίας και την άμβλυνση των συστηματικών συμπτωμάτων (83).

Θεραπεία της αναιμίας

Η αναιμία σοβαρού βαθμού είναι η συχνότερη ένδειξη για την εφαρμογή θεραπευτικής αγωγής (8). Η αντιμετώπιση ξεκινά από τον καθορισμό των επιπέδων της Ερο στον ορό. Σε περίπτωση που τα επίπεδα είναι χαμηλότερα από 125 IU/L, τότε συνιστάται αντιμετώπιση με υποδόρια χορήγηση Ερο (84). Σε ασθενείς που έχουν είτε υψηλές τιμές Ερο, είτε ανθεκτικότητα στην χορήγηση Ερο, μπορούν να χορηγηθούν φυλλικό οξύ, σίδηρος, συνθετικά ανδρογόνα (πχ. Νταναζόλη), κορτικοστεροειδή και θαλιδομιδη, με την προσθήκη ή όχι πρεδνιζόνης (8,83). Τα ανδρογόνα αυξάνουν την παραγωγή της Ερο, αλλά πρέπει να χορηγούνται με προσοχή, λόγω των ανεπιθύμητων ενεργειών, και κυρίως του



κινδύνου ανάπτυξης καρκίνου του προστάτη στους άνδρες (8). Σε ορισμένες περιπτώσεις που δεν επιτυγχάνεται διόρθωση της αναιμίας, χορηγούνται υποστηρικτικά μεταγγίσεις αίματος (8,81).

Θεραπεία της εξωμυελικής αιμοποίησης και της υπερπλασίας του μυελού των οστών

Η λευκοκυττάρωση, η θρομβοκυττάρωση, η εξωμυελική αιμοποίηση και η εκσεσημασμένη σπληνομεγαλία αποτελούν τις κύριες ενδείξεις για τη χορήγηση χημειοθεραπευτικών φαρμάκων (83). Η υδροξουρία, η βουσουλφάνη, η ιντερφερόνη-α και η μελφαλάνη, σε χαμηλές δόσεις, έχουν αποδειχθεί σχετικά αποτελεσματικές (8,83). Η υδροξουρία, σε δόση 0.5-1g την ημέρα, συνιστά τη θεραπεία εκλογής και έχει βρεθεί ότι μπορεί να προκαλέσει σημαντική μείωση της ίνωσης στο μυελό (84). Η ιντερφερόνη-α (INF-α) είναι αποτελεσματική κυρίως σε σοβαρή θρομβοκυττάρωση, αλλά και κατά την αρχική φάση της νόσου, στη μυελούπερπλαστική φάση. Η εμπειρία από τη χρήση της INF-α μέχρι στιγμής είναι περιορισμένη (8). Η ιματινίπη (Glivec) έχει επίσης χρησιμοποιηθεί με θετικά αποτελέσματα σε ορισμένους ασθενείς, όσον αφορά στη βελτίωση των τιμών της γενικής αίματος, στη σπληνομεγαλία και στην ίνωση του μυελού (85).

Η χρήση αυξητικών παραγόντων όπως η Epo και ο GM-CSF έχει καλά αποτελέσματα, όπως και οι χαμηλές δόσεις κορτικοστεροειδών, που βελτιώνουν την αναιμία, πιθανότατα μέσω της ανοσοκατασταλτικής τους δράσης (8). Η σπληνεκτομή, τέλος δεν αυξάνει την επιβίωση, μπορεί όμως να βελτιώσει σημαντικά την ποιότητα ζωής των ασθενών. Η επιλογή αυτή μπορεί να λάβει χώρα σε περιπτώσεις ανθεκτικότητας στην υδροξουρία, σε αυτοάνοση αιμολυτική αναιμία, σε επώδυνα σπληνικά έμφρακτα και σε πυλαία υπέρταση, καθώς και σε εκσεσημασμένη διόγκωση του σπλήνα που προκαλεί έντονα συμπτώματα δυσανεξίας (8,78).



A.3. Υποδοχείς Ερυθροποιητίνης (Epo receptors/ Epo-R)

Εισαγωγή

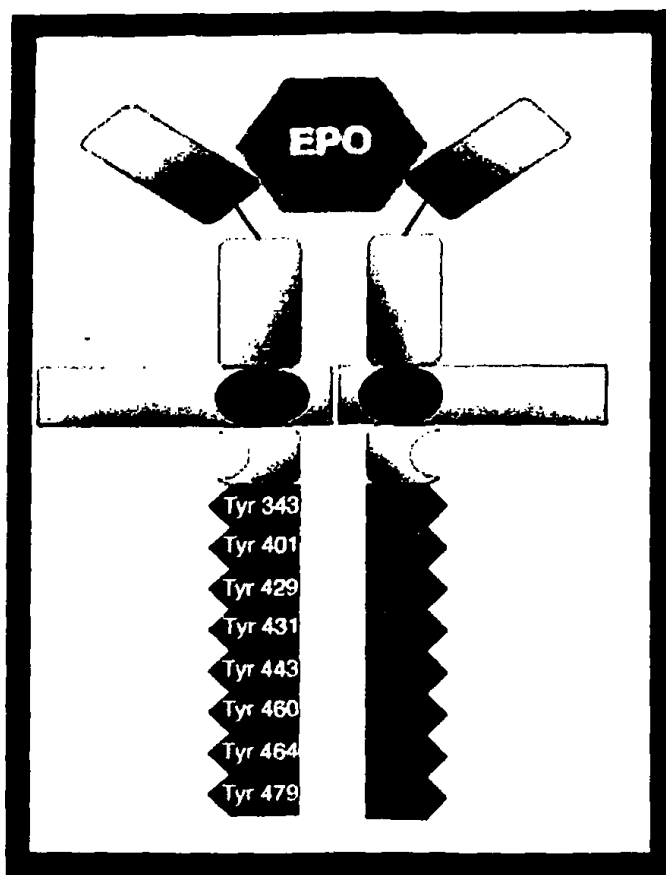
Η ερυθροποίηση είναι η διαδικασία παραγωγής ώριμων ερυθρών αιμοσφαιρίων από το αρχικό πολυδύναμο κύτταρο (stem cell) του αιμοποιητικού συστήματος (86). Ο ενήλικας άνθρωπος παράγει κάθε δευτερόλεπτο 2.3×10^6 , ή κάθε λεπτό 138×10^6 ερυθρά αιμοσφαίρια (87). Ο αυξητικός παράγοντας που ρυθμίζει την ερυθροποίηση είναι η ερυθροποιητίνη (Epo). Η Epo έχει τέσσερις κύριες δράσεις στα προγονικά κύτταρα της ερυθράς σειράς: (8) Στηρίζει την επιβίωση τους, με την αντιαποπτωτική της δράση, (9) προάγει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, (3) αυξάνει τη σύνθεση της αιμοσφαιρίνης και (11) επάγει την μορφολογική ωρίμανσή τους (86). Παράγεται στους νεφρούς και με την κυκλοφορία του αίματος φθάνει στο μυελό των οστών, όπου και συνδέεται στην επιφάνεια των προγονικών ερυθροκυττάρων μέσω του υποδοχέα της (87). Έχει βρεθεί ότι καμία άλλη κυτταροκίνη ή υποδοχέας της δεν μπορούν να αντικαταστήσουν την Epo ή τον Epo-R, καθώς σε πειράματα που έγιναν σε ποντίκια ομόζυγα ως προς την έλλειψη του γονιδίου της Epo ή του Epo-R πέθαναν την 12^η εμβρυϊκή ημέρα, λόγω μεγάλης αναιμίας (88).

Δομή του υποδοχέα της ερυθροποιητίνης

Ο υποδοχέας της ερυθροποιητίνης (Epo-receptor, Epo-R) βρίσκεται στην εξωτερική επιφάνεια των κυττάρων της ερυθράς σειράς και στον Homo Sapiens αποτελείται από 507 αμινοξέα, μεγέθους 55kDa που με τις τροποποιήσεις του μορίου από γλυκοζυλιώσεις και φωσφορυλιώσεις φτάνει στα 7-78kDa (86). Δύο μόρια του υποδοχέα συνδέονται μεταξύ τους, σχηματίζοντας ένα ομοδιμερές, για να μπορέσει να προσδεθεί σ' αυτό το μόριο της Epo (Εικ. 1). Ο Epo-R ανήκει στον τύπο I των αιμοποιητικών υποδοχέων των κυτταροκινών. Παρόμοια δομή έχουν και οι υποδοχείς της αυξητικής ορμόνης, της προλακτίνης, του παράγοντα κινητοποίησης των αποικιών των κοκκιοκυττάρων (granulocyte-colony stimulating factor/G-CSF) και της θρομβοποιητίνης (c-mpl) (90).

Το μόριο του υποδοχέα αποτελείται από τρεις διαφορετικές περιοχές: μία εξωκυττάρια, μία μονή υδρόφοβη διαμεμβρανική και μία ενδοκυττάρια περιοχή (87). Το εξωκυττάρια τμήμα, μεγέθους περίπου 230 αμινοξέων, αποτελείται από δύο τμήματα, το D1 και το D2, τα οποία και σχηματίζουν μεταξύ τους γωνία 90° (88). Περιλαμβάνει τέσσερα μόρια κυστεΐνης που δημιουργούν δύο δισουλφιδικούς δεσμούς και έναν σχηματισμό τρυπτοφάνης-σερίνης-X-τρυπτοφάνης-σερίνης κοντά στην κυτταρική μεμβράνη (86).



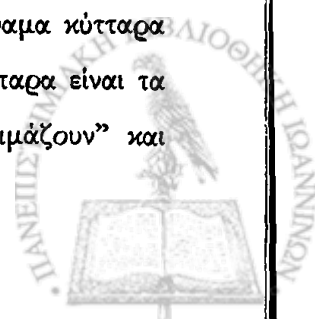


Εικόνα 2. Η ερυθροποιητίνη συνδέεται με τον λειτουργικό υποδοχέα της, που είναι ένα ομοδιμερές, αποτελείται δηλαδή από δύο μόρια υποδοχέα. Στο ενδοκυττάριο τμήμα του υποδοχέα φαίνεται με κίτρινο χρώμα η περιοχή σύνδεσης της JAK κινάσης και με το κόκκινο τα τμήματα τυροσίνης (87).

Το ενδοκυττάριο τμήμα του υποδοχέα διαιρείται σε δύο λειτουργικές περιοχές. Η εγγύς στην κυτταρική μεμβράνη περιοχή έχει με τη σειρά της τρία τμήματα, τα box-1, box-2 και το τμήμα μεταξύ των box-1 και box-2. Η περιοχή αυτή είναι απαραίτητη για την επαγόμενη, από την EPO, μιτογένεση, την διαφοροποίηση και την έναρξη του καταρράκτη της μετάδοσης μηνυμάτων. Το τμήμα μάλιστα μεταξύ των box-1 και box-2 περιέχει τη θέση σύνδεσης της JAK 2 κινάσης με τον υποδοχέα (W282). Το άπω στην κυτταρική μεμβράνη τμήμα δεν είναι εντελώς απαραίτητο στη μετάδοση των μηνυμάτων, αλλά έχει αναγνωρισθεί ως περιοχή με αρνητική ρυθμιστική δράση (91). Τα τμήματα τυροσίνης (Y) στην περιοχή αυτή φωσφορυλιώνονται μετά τη δράση της EPO και δρουν ως θέσεις σύνδεσης με διάφορα μόρια μεταβίβασης μηνυμάτων (86).

Σύνθεση και εκφύλιση του EPO-R.

Στο εμβρυικό ήπαρ και στο μυελό των οστών των ενηλίκων τα αρχικά πολυδύναμα κύτταρα δίνουν γένεση στα προγονικά κύτταρα της ερυθράς σειράς. Ως πιο πρώιμα τέτοια κύτταρα είναι τα burst-forming unit-erythroid (BFU-E), τα οποία με τη δράση κυτταροκινών “ωριμάζουν” και

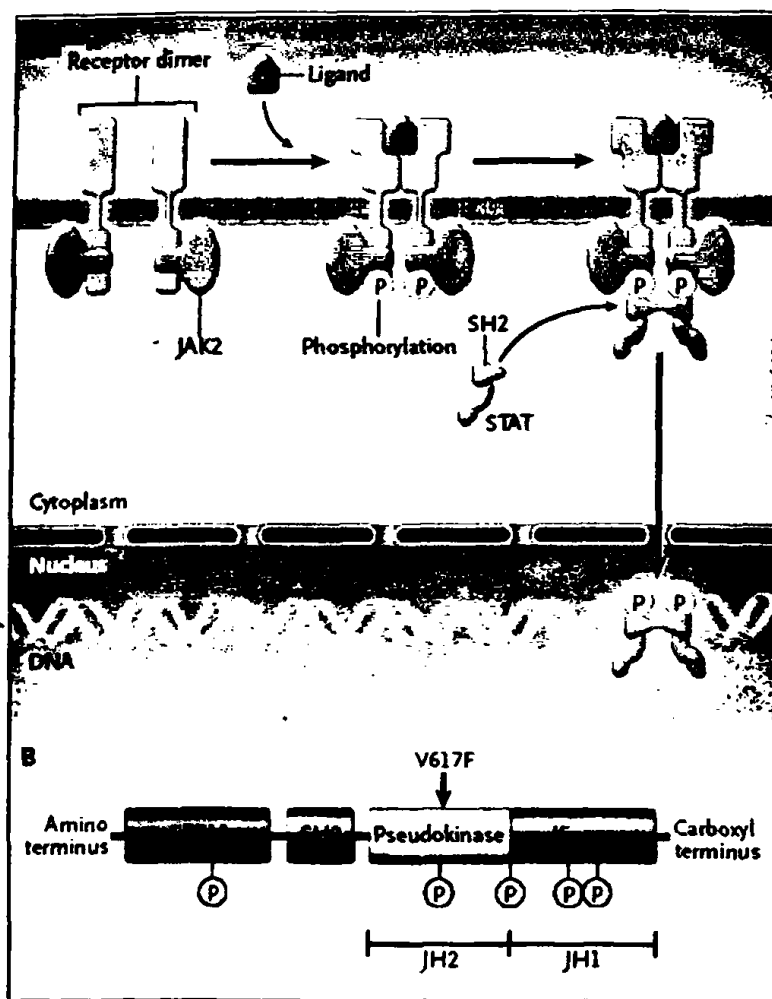


εκφράζουν στην επιφάνειά τους υποδοχείς, που έχουν μικρή ανταπόκριση στην Epo (89). Στη συνέχεια, δημιουργούνται οι προερυθροβλάστες ή colony-forming units-erythroid (CFU-E), οι οποίοι είναι πολύ πιο ευαίσθητοι στην Epo, καθώς έχουν στην επιφάνειά τους πολύ περισσότερους υποδοχείς σε σχέση με τα BFU-E κύτταρα (87). Σε καλλιέργειες κυττάρων, τα CFU-E κύτταρα εμφανίζουν περίπου 300 με 1000 υποδοχείς Epo (89). Στη συνέχεια, ο αριθμός των υποδοχέων ελαττώνεται και τα προγονικά κύτταρα της ερυθράς σειράς ανταποκρίνονται στην Epo μέχρι το επίπεδο της πολυχρωματόφιλης ερυθροβλάστης (86).

Δράση του υποδοχέα της ερυθροποιητίνης

Ο Epo-R δεν έχει από μόνος του ενζυματική δραστηριότητα. Παρόλα αυτά, ο ίδιος ο υποδοχέας και ένας μεγάλος αριθμός πρωτεϊνών μετάδοσης σήματος φωσφορυλιώνονται λόγω της δράσης της Epo (92). Η JAK 2 είναι η σημαντικότερη κινάση υπεύθυνη για τη φωσφορυλίωση του Epo-R (93). Ένα μόριο της JAK 2 συνδέεται με χαλαρό δεσμό με κάθε ένα από τα δύο μονομερή που απαρτίζουν τον Epo-R. Όταν η Epo συζευχθεί με τον υποδοχέα της, αυτό έχει σαν αποτέλεσμα τα μόρια του Epo-R και της πρωτεϊνικής κινάσης JAK 2 να έρθουν σε στενή σύνδεση. Η ένωση αυτή ισχυροποιείται με φωσφορυλίωση. Το πόσο σημαντική είναι η δράση της JAK 2 φαίνεται από το γεγονός ότι σε περίπτωση που λιγότερο ενεργός κινάση ενωθεί με τον υποδοχέα, τα κύτταρα της ερυθράς σειράς αδυνατούν να πολλαπλασιαστούν, να διαφοροποιηθούν και τελικά να επιβιώσουν μετά από τη δράση της Epo (94). Η JAK 2 φωσφορυλιώνει τις τυροσινικές περιοχές του Epo-R, που λειτουργούν ως υπόστρωμα για πολλές ενδοκυτταρικές πρωτείνες σημάτων. Μια από αυτές είναι η STAT 5 (single transducer and activator of transcription 5). Ο Epo-R έχει δύο θέσεις τυροσίνης στο κυτταροπλασματικό του τμήμα, τις F7Y343 και F7Y401, που βρίσκονται σε γεινίαση με τη θέση σύνδεσης της JAK 2 και προκαλούν πλήρη ενεργοποίηση της STAT 5 (88). Με τη φωσφορυλίωσή της από τη JAK, η STAT 5 διμεριζείται, αποκόπτεται από τον Epo-R και εισέρχεται στον πυρήνα του κυττάρου, όπου και ενεργοποιεί πολλά γονίδια-στόχους (Eικ 2). Ένα από αυτά είναι και ο αναστολέας της απόπτωσης Bcl-x, που ανήκει στην οικογένεια Bcl-2 (95). Έχει αποδειχθεί ότι η Bcl-x πρωτεΐνη εκφράζεται κυρίως στα στάδια της φυσιολογικής ερυθροποίησης που εξαρτώνται από την Epo. Οι ώριμοι ερυθροβλάστες εκφράζουν ελάχιστα έως καθόλου την Bcl-x, ενώ ανώριμοι ερυθροβλάστες (προερυθροβλάστες και βασεόφιλοι ερυθροβλάστες) είναι θετικοί στην Bcl-x (96). Έχει αποδειχθεί ότι η αναστολή της απόπτωσης μέσω του μηχανισμού Epo-R/JAK 2/STAT 5/Bcl-x είναι πολύ σημαντική για την επιβίωση και την διαφοροποίηση των κυττάρων της ερυθράς σειράς.

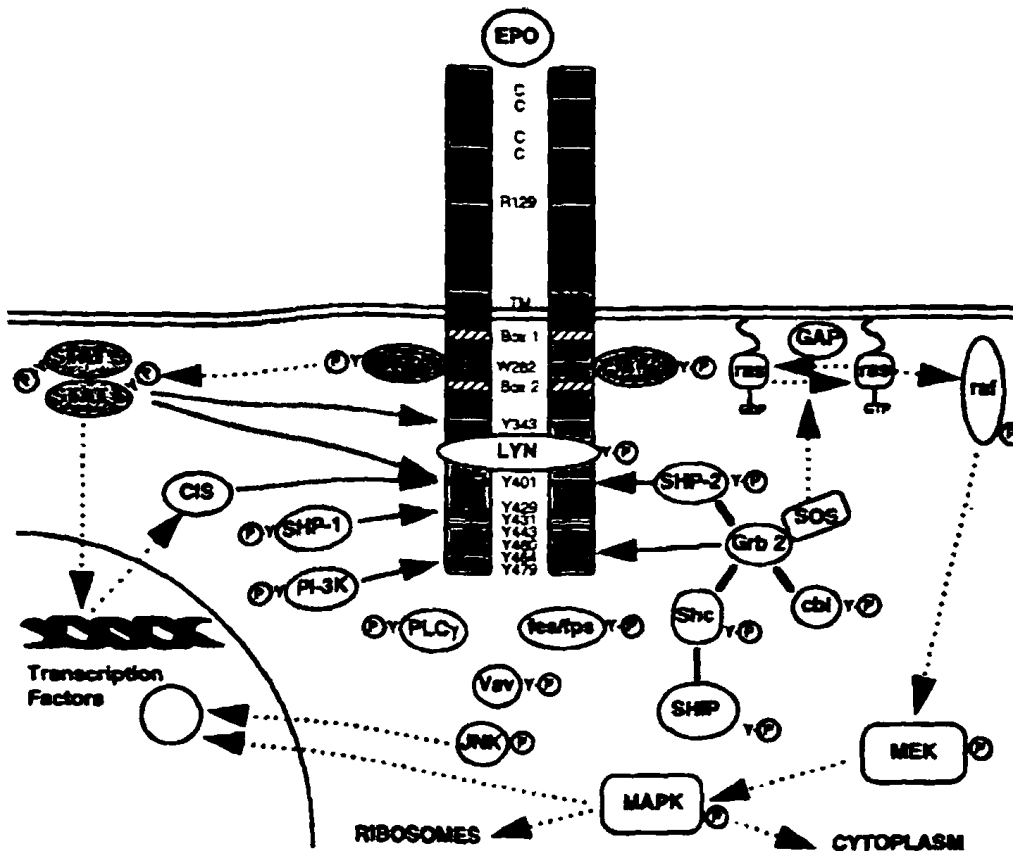




Εικ 3. Α. Ο υποδοχέας της Epo (πράσινο χρώμα), συνδέεται χαλαρά με ένα μόριο JAK 2 κινάσης (γαλάζιο χρώμα). Η Epo (κόκκινο χρώμα) συνδέεται με δύο μόρια υποδοχέων, τα οποία σχηματίζουν τον λειτουργικό υποδοχέα. Η σύνδεση αυτή έχει ως αποτέλεσμα τα μόρια του Epo-R και της JAK 2 να έρθουν σε στενότερη επαφή. Η διαδικασία αυτή ενισχύεται με φωσφορυλίωση. Η JAK 2 φωσφορυλιώνει τις τυροσινικές περιοχές του Epo-R, που λειτουργούν ως υπόστρωμα για πολλές ενδοκυττάρειες πρωτεΐνες σημάτων. Μια από αυτές είναι η STAT. Με τη φωσφορυλίωσή της από τη JAK, η STAT 5 διμερίζεται, αποκόπτεται από τον Epo-R και εισέρχεται στον πυρήνα του κυττάρου, όπου και ενεργοποιεί πολλά γονίδια-στόχους. Ένα από αυτά είναι και ο αναστολέας της απόπτωσης Bcl-x, που ανήκει στην οικογένεια Bcl-2.

Β. Φαίνεται το μόριο της JAK 2 με τις δύο ομόλογες περιοχές, την περιοχή της κινάσης JH1 και την περιοχή της ψευδοκινάσης, την JH2. Στην JH2 περιοχή, στο κωδικόνιο 617 έχουμε αντικατάσταση της της βαλίνης από τη φαινυλαλανίνη.

Epo signalling pathways



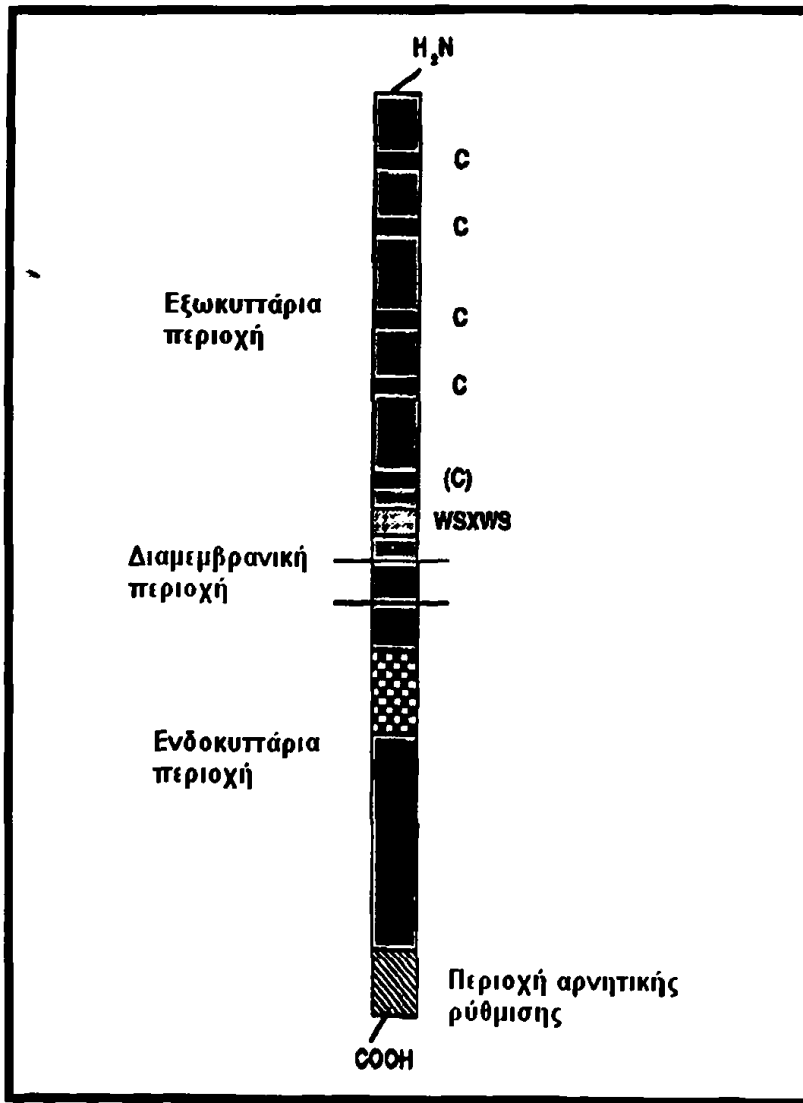
Εικ 4. Ένα προτυπο μοντέλο της κυτταρικής οδού σήμανσης αρχόμενο από τη σύνδεση της Epo με τον υποδοχέα της. Τα ενιαία βέλη δείχνουν τις θέσεις σύνδεσης των μορίων στις περιοχές τυροσίνης του υποδοχέα, ενώ τα στικτά βέλη δείχνουν τη δραστηριοποίηση ή φωσφορυλίωση μετά τη διέγερση του υποδοχέα της Epo.

Γονίδιο του υποδοχέα της ερυθροποιητίνης

Το γονίδιο του Epo-R βρίσκεται στο χρωμόσωμα 19. Περιέχει 8 εξόνια, από τα οποία τα εξόνια I έως V κωδικοποιούν την εξωκυττάρια περιοχή του υποδοχέα, το VI την διαμεμβρανική περιοχή και τα VII και VIII την ενδοκυττάρια. Τα δύο τελευταία εξόνια έχουν σημαντική θετική και αρνητική δράση στη λειτουργία του υποδοχέα (97). Η κυτταροπλασματική περιοχή περιέχει το καρβοξυλικό (-COOH) άκρο του υποδοχέα στο οποίο βρίσκεται μία περιοχή με αρνητική ρυθμιστική δράση. Ελλειψη του αρνητικού ρυθμιστή στον Epo-R οδηγεί από τη μία πλευρά σε μείωση του ρυθμού απόπτωσης, και από την άλλη, σε αυξημένο πολλαπλασιασμό των κυττάρων που φέρουν αυτούς τους υποδοχείς (98). Πρόσφατες έρευνες έχουν δείξει ότι η περιοχή αυτή περιέχει την θέση σύνδεσης με την SHP-1 φωσφατάση. Η φωσφατάση αυτή είναι ο αρνητικός ρυθμιστής των σημάτων του Epo-R: η



SHP-1 συνδέεται στη θέση γ^{430} του Epo-R, αποφωσφορυλιώνει την JAK 2 κινάση και τελικά οδηγεί σε τερματισμό του σήματος πολλαπλασιασμού του κυττάρου (99). Ο υψηλός αριθμός ερυθροκυττάρων, λόγω έλλειψης του καρβοξυλικού άκρου του Epo-R, αποδείχθηκε ευεργετικός σε έναν αθλητή, ο οποίος κατέκτησε το χρυσό μετάλλιο στους χειμερινούς Ολυμπιακούς Αγώνες, στο σκι ανωμάλου δρόμου (100).



Εικ 5. Το μόριο του υποδοχέα, όπου φαίνεται η εξωκυττάρια περιοχή (πορτοκαλί χρώμα), η διαμεμβρανική (γαλάζιο) και η ενδοκυττάρια (πράσινο), με το σημείο αρνητικής ρυθμιστικής δράσης στο καρβοξυλικό του άκρο.

Μεταλλάξεις του γονιδίου του υποδοχέα της ερυθροποιητίνης

Υπάρχει η υπόθεση ότι ανωμαλίες του Epo-R γονιδίου είναι υπεύθυνες για την παθογένεση της Πρωτοπαθούς Συγγενούς Ερυθροκυττάρωσης. Έχουν βρεθεί δεκατρείς διαφορετικές μεταλλάξεις σε οικογένειες με τη νόσο (Πιν. 10). Δέκα από αυτές έχουν σαν αποτέλεσμα την έλλειψη του -COOH άκρου του Epo-R και φαίνεται ότι έχουν άμεση και αιτιώδη σχέση με τη νόσο. Στους ελλειματικούς αυτούς υποδοχείς Epo που έχουν απωλέσει το καρβοξυλικό άκρο, πιστεύεται ότι η δράση της Epo είναι αυξημένη. Κατά συνέπεια το ενισχυμένο σήμα της Epo οδηγεί σε αυξημένο πολλαπλασιασμό των προγονικών κυττάρων της ερυθράς σειράς, που εκδηλώνεται με την εμφάνιση της πολυερυθραιμίας στους πάσχοντες (98). Οι υπόλοιπες τρεις μεταλλάξεις δεν έχουν συνδεθεί άμεσα με τη νόσο, ούτε με κάποια άλλη παθολογική κατάσταση.

Πιν. 10. Οι μεταλλάξεις του γονιδίου του υποδοχέα της ερυθροποιητίνης.

| Μελέτη | Μετάλλαξη | Δομική αλλαγή | Συσχέτιση με Οικογενή Πολ/μία |
|--------------------------------|---------------------|------------------|-------------------------------|
| Arcasoy (101), Kralovics (102) | Del 5985-5991 | Έλλειψη 7bp | Ναι |
| Watowish (103) | Διπλ/σμός 5968-5975 | Έλλειψη 8bp | Ναι |
| De la Chapel (104) | G6002 | Tyr439 τ.κ. | Ναι |
| Furukawa (105) | 5986 C σε T | Cln435 τ.κ. | Ναι |
| Kralovics (106) | 5964 C σε G | Tyr426 τ.κ. | Ναι |
| Arcasoy (107) | 5881 C σε T | Glu399 τ.κ. | Ναι |
| Kralovics (108) | 5959 G σε T | Glu425 τ.κ. | Ναι |
| Sokol (109) | 5974 insG | Έλλειψη τ.κ. | Ναι |
| Kralovics (110) | 5967 insT | Έλλειψη τ.κ. | Ναι |
| Sokol (111) | 6148 C σε T | Pro488 σε Ser | Όχι |
| Le Couedic (112) | 6146 A σε G | Asn487 σε Ser | Όχι |
| Kralovics (108) | 2706 A σε T | Άγνωστη | Όχι |
| Rives | 6003 G σε A | Tyr439 > ter; tr | Ναι |



A.4. JAK 2 κινάση

Η JAK 2 κινάση ανήκει στην οικογένεια των JAK κινασών που επιπλέον περιλαμβάνει και τις JAK 1, JAK 3 και TYK 2 κινάσες. Τα ένζυμα αυτά αποτελούνται από πάνω από 1000 αμινοξέα και το μοριακό τους βάρος κυμαίνεται από 120 μέχρι 130 kDa (113). Η JAK κινάση κλωνοποιήθηκε για πρώτη φορά το 1989 και το όνομα της αρχικά προερχόταν από τα αρχικά "Just Another Kinase", καθώς όταν πρωτοανακαλύφθηκαν, θεωρήθηκαν απλά κάποιες καινούριες κινάσες με περιοχές ομόλογες με αυτές άλλων κινασών (14). Η μεγάλη όμως λειτουργική σημασία του μορίου αυτού στη μετάδοση του σήματος των κυτταροκινών και των αυξητικών παραγόντων, όπως και η ανακάλυψη ότι στη δομή του υπάρχουν δύο ομόλογες περιοχές, μία με δράση κινάσης και μία άλλη περιοχή ψευδοκινάσης, οδήγησε στην αλλαγή του ονόματος (14, 114). Εμπνευσμένοι από τη θεότητα της αρχαίας Ρώμης Ιανό, το θεό για τις πύλες και τα μονοπάτια ο οποίος στις απεικονίσεις εμφανίζεται με διπλή όψη, να κοιτά ταυτόχρονα σε δύο κατευθύνσεις, οι επιστήμονες ονόμασαν πλέον, την κινάση αυτή σε Janus Activated Kinase (114).



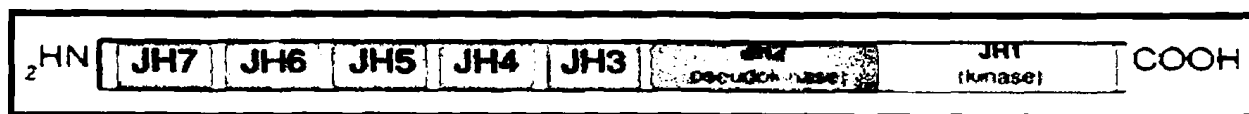
Εικ. 6. Ο Ιανός (Janus), θεότητα της αρχαίας Ρώμης.

Δομή και λειτουργία της JAK 2

Η JAK 2 κινάση εκφράζεται σε όλα τα κύτταρα του ανθρώπινου σώματος (115). Η μελέτη του μορίου της έδειξε ότι αποτελείται από επτά (7) περιοχές με υψηλή ομολογία, τις JAK homology ή JH περιοχές, JH1 έως JH7. Η JH1 είναι η περιοχή της κυρίως κινάσης ενώ η JH2 αντιπροσωπεύει μία περιοχή ψευδοκινάσης η οποία είναι απαραίτητη για την καταλυτική δράση της JH1 και έχει αρνητική



ρυθμιστική δράση (113). Οι περιοχές JH3 έως JH7 είναι μοναδικές για την οικογένεια των JAK κινασών και περιλαμβάνουν την περιοχή σύνδεσης με τους υποδοχείς κυταροκινών (113). Η εικόνα 6 δείχνει τη δομή του μορίου της JAK 2 κινάσης.



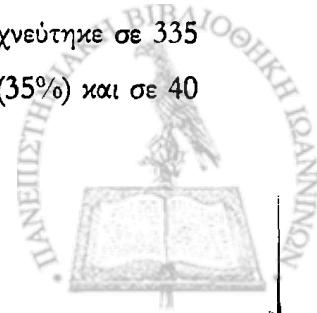
Εικ. 6. Δομή της JAK 2 κινάσης.

Η JH1 εκφράζει όλα τα χαρακτηριστικά της τυροσινικής κινάσης. Σ' αυτά περιλαμβάνεται η κατάλυση της σύνδεσης του μορίου της JAK 2 με τις τυροσίνες των υποδοχέων των κυτταροκινών, η οποία γίνεται με φωσφορυλίωση. Η φωσφορυλίωση οδηγεί στην ενεργοποίηση του μορίου της JAK 2. Η φωσφορυλίωση των τυροσινών αυτών οδηγεί σε δομικές αλλαγές της JAK 2 που διευκολύνουν τη σύνδεση σε αυτή μορίων, όπως η STAT (115). Η STAT 5 διμερίζεται, αποκόπτεται στη συνέχεια από τον Epo-R και εισέρχεται στον πυρήνα του κυττάρου, όπου και ενεργοποιεί πολλά γονιδιαστόχους. Ένα από αυτά είναι και ο αναστολέας της απόπτωσης Bcl-x.

Η σημασία της JAK 2 κινάσης φαίνεται από το γεγονός ότι σε ποντίκια με πλήρη έλλειψή της αυτά δεν μπορούν να παράγουν καθόλου ερυθροκύτταρα και δεν επιβιώνουν πέρα της 13ης με 15ης ημέρας. Κάτι ανάλογο συμβαίνει και σε πλήρη έλλειψη της Epo ή του Epo-R (116).

Μετάλλαξη V617F του γονιδίου της JAK 2

Στα ΜΥΣ, τα προγονικά αιμοποιητικά κύτταρα εμφανίζουν υπερευαισθησία σε αυξητικούς παράγοντες και άλλες κυταροκίνες, στοιχείο που δείχνει ότι στα κύτταρα αυτά υπάρχουν ανωμαλίες σε πρωτεϊνικές-τυροσινικές κινάσες και φωσφατάσες. Αυτή η διαπίστωση οδήγησε στη μελέτη των οδών μετάδοσης μηνυμάτων στα κύτταρα, μία από τις οποίες είναι αυτή των JAK-STAT. Το υπεύθυνο για την JAK 2 κινάση γονίδιο βρίσκεται στο βραχύ σκέλος του χρωμοσώματος 9 και συγκεκριμένα στη θέση 9p24. Στην περιοχή του cDNA που κωδικοποιεί την ψευδοκινάση (JH2 περιοχή) και συγκεκριμένα στη θέση 1849 περιγράφηκε αντικατάσταση της γουανίνης (G) από τη θυμίνη (T). Αυτή η αλλαγή οδηγεί σε αντικατάσταση του αμινοξέος βαλίνη από τη φαινυλαλανίνη (Val617Phe, V617F), και της μετάλλαξης V617F στο μόριο της JAK 2 (Εικόνα 2, σελ.31). Η σύνδεση της μετάλλαξης αυτής με τα ΜΥΣ έγινε για πρώτη φορά το 2005, με σχεδόν ταυτόχρονες δημοσιεύσεις από πέντε διαφορετικές ομάδες μελέτης (30-34). Από τις μελέτες φαίνεται ότι η V617F είναι επίκτητη και δεν εμφανίζεται στα γαμετικά κύτταρα (30,32). Επιπλέον, η συγκεκριμένη μετάλλαξη ανιχνεύθηκε σε 335 από τους 434 ασθενείς με ΛΠ (ποσοστό 77%), σε 96 από τους 280 ασθενείς με ΙΘ (35%) και σε 40



από τους 92 ασθενείς με IM (43%). Περαιτέρω μελέτες που έγιναν με τη χρήση πιο ευαίσθητων τεχνικών ανίχνευσης της μετάλλαξης, έδειξαν ότι το 99% των ασθενών με ΑΠ ήταν θετικοί στη JAK 2 V617F, όπως και περίπου το 50% των ασθενών με I \ominus και IM (117). Τα αποτελέσματα των διαφόρων ομάδων μελέτης φαίνονται στον πίνακα 11.

Πίνακας 11. Συχνότητα της μετάλλαξης JAK 2 V617F σε ασθενείς με Μυελοϋπερπλαστικά Σύνδρομα.

| Μελέτες | ΑΠ | I \ominus | IM |
|------------------------|---------------|-------------|--------------|
| James και συν (23) | 40/45 (89%) | 3/7 (43%) | 9/21 (43%) |
| Baxter και συν (24) | 71/73 (97%) | 8/16 (50%) | 29/51 (57%) |
| Levine και συν (25) | 121/164 (74%) | 16/46 (35%) | 37/115 (32%) |
| Kralovics και συν (26) | 83/128 (65%) | 13/23 (57%) | 21/93 (23%) |
| Jones και συν (118) | 58/81 (81%) | 15/35 (43%) | 24/59(41%) |

Ομοζυγωτία JAK V617F

Περαιτέρω μελέτες έδειξαν ότι ένας αριθμός ασθενών με ΑΠ και IM είναι ομόζυγοι για τη μετάλλαξη. Η ομοζυγωτία είναι αποτέλεσμα του μιτωτικού ανασυνδιασμού και του διπλασιασμού του μεταλλαγμένου αλληλίου που επιδρούν στο χρωμόσωμα 9p, μεταξύ της περιοχής της JAK 2 και του κεντρομεριδίου. Στην ΑΠ, η επικράτηση των κυττάρων που είναι ομόζυγα στην V617F μετάλλαξη αυξάνει με την πάροδο του χρόνου πιθανώς λόγω της μεγαλύτερης δυνατότητας επιβίωσης ή πολλαπλασιασμού τους ανάμεσα στα μεταλλαγμένα κύτταρα (120). Η ομοζυγωτία οδηγεί σε μεγαλύτερη έκφραση των γονιδίων-στόχων από ότι η ετεροζυγωτία της V617F. Αυτό το φαινόμενο προφανώς οφείλεται στην διπλάσια ποσότητα του μεταλλαγμένου γονιδίου στην ομοζυγωτία, όπως και στην έλλειψη μερικής αναστολής της δράσης του, λόγω απουσίας του μη μεταλλαγμένου, άγριου γονιδίου (30, 119). Κοκκιοκύτταρα ομόζυγα ως προς την V617F ανευρίσκονται σε ποσοστό 30% στην ΑΠ (30, 31) ενώ πολύ σπάνια ανιχνεύονται στην I \ominus (120). Τα ευρήματα αυτά δείχνουν ότι το φορτίο της μετάλλαξης επηρεάζει μερικώς το φαινότυπο των νοσημάτων, κυρίως στην Αληθή Πολυερυθραιμία.



Άλλες αιματολογικές κακοήθειες και JAK V617F

Η μετάλλαξη βρέθηκε επίσης σε μικρό αριθμό ασθενών με άτυπα ΜΥΣ, και συγκεκριμένα σε Χρόνια Μυελομονοκυτταρική Λευχαιμία, σε Χρόνια Ουδετεροφιλική Λευχαιμία και σε Υπερρωσινοφιλικό Σύνδρομο, στα Μυελοδυσπλαστικά Σύνδρομα, στην Οξεία Μυελογενή Λευχαιμία και σε σπάνιες περιπτώσεις bcr/abl αρνητικών Χρόνιων Μυελογενών Λευχαιμιών (118, 212, 122). Οι περισσότεροι ασθενείς με ΟΜΛ, θετικοί στη V617F μετάλλαξη είτε ήταν ήδη διαγνωσμένοι με ΑΠ, ΙΘ ή ΙΜ, είτε πολύ πιθανόν να είχαν ένα αδιάγνωστο προηγθέν ΜΥΣ (121, 122). Η μετάλλαξη βρέθηκε ακόμα σε περισσότερο από το 50% ασθενών με σύνδρομο Budd-Chiari, το οποίο δείχνει ότι πιθανώς οι ασθενείς αυτοί να υποκρύπτουν κάποιο μυελοϋπερπλαστικό νόσημα (11).

Παρουσία της JAK 2 V617F στα αρχέγονα αιμοποιητικά κύτταρα

Η μετάλλαξη V617F έχει βρεθεί σε δείγματα μυελού των οστών, σε ερυθροβλάστες, σε κοκκιοκύτταρα, σε αιμοπετάλια, όπως και σε αποικίες μακροφάγων (granulocyte-macrophage colonies) και σε αποικίες ερυθρών που αναπτύσσονται χωρίς ερυθροποιητίνη (EPO-independent erythroid colonies) στην ΑΠ, ενώ δεν ανιχνεύεται σε Τ-λεμφοκύτταρα, σε επιθηλιακά κύτταρα της στοματικής κοιλότητας και γενικά σε μη αιματολογικούς καρκίνους (14).

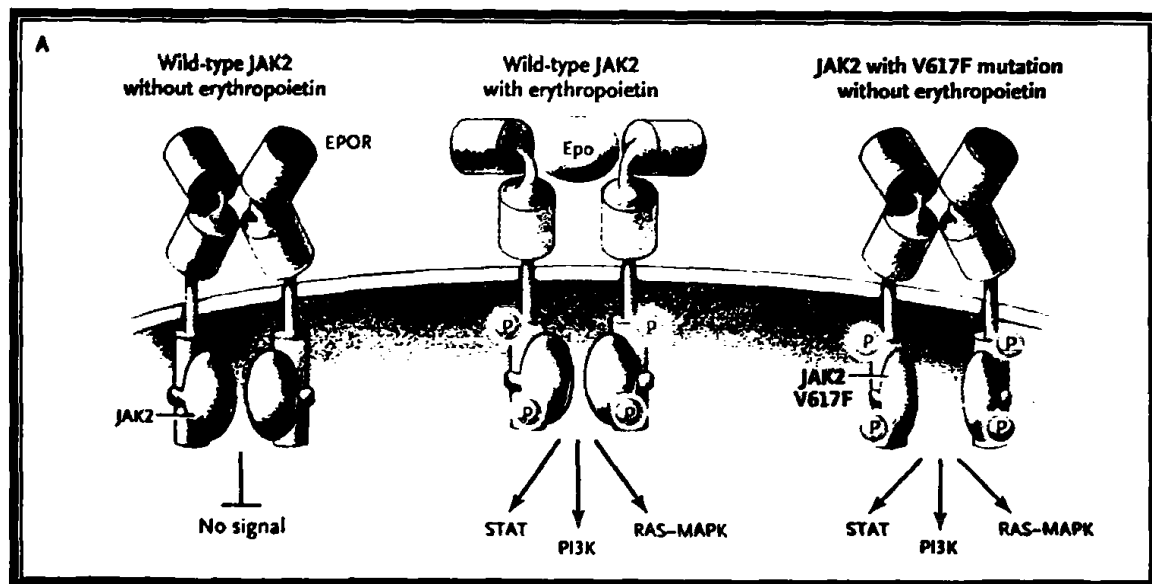
Με τη βοήθεια της κυτταρομετρίας ροής, οι ερευνητές κατόρθωσαν να απομονώσουν αρχέγονα αιμοποιητικά κύτταρα (hematopoietic stem cells), κοινά προγονικά κύτταρα της μυελικής σειράς (common myeloid progenitors), κοκκιώδη/μακροφάγα προγονικά κύτταρα (granulocyte/macrophage progenitors), προγονικά κύτταρα της ερυθράς και της μεγακαρυοκυτικής σειράς από ασθενείς με ΑΠ. Στη συνέχεια, έγινε ανάλυση για ανίχνευση της μετάλλαξης JAK 2 V617F. Η μετάλλαξη ανιχνεύθηκε σε όλες τις σειρές των κυττάρων (30). Η παρουσία της μετάλλαξης σε αποικίες προγονικών αιμοποιητικών κυττάρων (που αναπτύσσονται in vitro) μας δείχνει ότι η Αληθής Πολυερυθραιμία και τα υπόλοιπα ΜΥΣ ξεκινούν από ένα αρχέγονο πολυδύναμο προγονικό κύτταρο (stem cell) ή από όψιμα στάδια διαφοροποίησης της ερυθράς, της κοκκιοματώδους ή της μεγακαρυοκυτικής σειράς (31).

Μηχανισμός δράσης JAK 2 V617F

Ο ακριβής μηχανισμός με τον οποίο η μετάλλαξη V617F προκαλεί βλάβη στα κύτταρα του αίματος δεν είναι ακόμη γνωστός, αλλά η ίδια η μετάλλαξη θα μπορούσε να φανεί ένας χρήσιμος διαγνωστικός και προγνωστικός δείκτης, που θα μας βοηθήσει στην παθοφυσιολογία, την κατηγοριοποίηση, τη διάγνωση και στην πιθανή θεραπεία των νοσημάτων αυτών (11). Σε έλλειψη της JH2 περιοχής έχουμε αύξηση της δραστηριότητας της JAK 2 (114). Αυτό δείχνει ότι η περιοχή αυτή

παίζει σημαντικό αυτοανασταλτικό ρόλο στη δράση της JAK 2. Με την αντικατάσταση της βαλίνης από τη φαινυλαλανίνη έχουμε απώλεια της αυτοανασταλτικής ικανότητας της JH2 περιοχής στο μόριο της JAK 2. Υπάρχουν ενδείξεις βιοχημικών ερευνών ότι η μεταλλαγμένη JAK 2 V617F κινάση είναι από μόνη της ενεργή. Αυτό σημαίνει ότι αυτοφωσφορυλιώνεται σε μεγάλο βαθμό χωρίς την παρουσία του υποδοχέα κυτταροκινών, ο οποίος είναι απαραίτητος στην μη μεταλλαγμένη JAK 2 κινάση, για να μπορέσει να φωσφορυλιωθεί και να γίνει έτσι ενεργή (31,32).

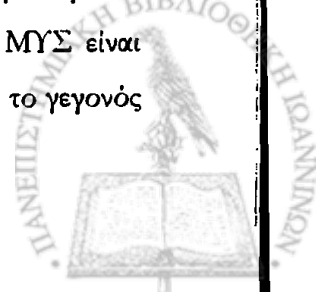
Η JAK2 V617F μετάλλαξη ενεργοποιεί πολλές ενδοκυττάρειες οδούς μετάδοσης σήματος που επιδρούν πάνω στην έκφραση των γονιδίων, στην απόπτωση, στον κυτταρικό κύκλο και στην διαφοροποίηση των προγονικών αιμοποιητικών κυττάρων. Βιοχημικές μελέτες έδειξαν ότι η V617F μετάλλαξη προκαλεί, μία, ανεξάρτητη από τη δράση των κυτταροκινών, ενεργοποίηση των οδών JAK-STAT, PI3K και AKT (που είναι γνωστή και ως πρωτεϊνική κινάση B), όπως και την μιτογόνο πρωτεϊνική κινάση (mitogen-activated protein kinase), την MAPK και την ρυθμιζόμενη από εξωκυττάρια σήματα κινάση (extracellular signal-regulated kinase), την ERK. Όλα τα παραπάνω μόρια εμπλέκονται στην οδό σήμανσης του υποδοχέα της Ερυθροποιητίνης (123,124) και η αυξημένη δράση τους οδηγεί σε μείωση της κυτταρικής απόπτωσης (11).



Εικ. 7. Μηχανισμός δράσης της μετάλλαξης JAK 2 V617F.

Mpl και JAK 2 V617F

Ο υποδοχέας της θρομβοποιητίνης (thrombopoietin receptor-mpl) έχει βρεθεί ότι υπόκειται σε μετάλλαξη, την mpl515, η οποία μπορεί να είναι είτε η W515, είτε η W515K. Η μετάλλαξη αυτή είναι λιγότερο συχνή από την JAK V617F, αλλά περισσότερο ειδική. Η συχνότητά της στα ΜΥΣ είναι περίπου 5% για την IM, 1% για την ΙΘ και 0% για την ΑΠ (125). Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός



ότι και οι δύο μεταλλάξεις μπορεί να συνυπάρχουν στο DNA που έχει ληφθεί από κοκκιοκύτταρα ασθενών με IM ή IΘ. Σύμφωνα με πρόσφατη δημοσίευση (126) υποστηρίζεται η άποψη ότι στους ασθενείς που συνυπάρχουν οι δύο μεταλλάξεις, τα JAK 2 V617F κύτταρα αποτελούν υποκλώνο των κυττάρων με την mp1515 μετάλλαξη ή οι δύο μεταλλάξεις να είναι δύο διαφορετικοί κλώνοι που προέρχονται από έναν κοινό προγονικό κλώνο που μέχρι τώρα δεν έχει ταυτοποιηθεί μοριακά. Επιπλέον, η συνύπαρξη των δύο μεταλλάξεων είναι πολύ πιθανό να προκαλεί βαρύτερη κλινική εικόνα, αν υπολογίσουμε και το γεγονός ότι η JAK 2 συνδέεται φυσιολογικά με τον υποδοχέα mp1 (11).



ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ



ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. Σκοπός της μελέτης

Η Epo αποτελεί απαραίτητη κυταροκίνη που εμποδίζει την απόπτωση της ερυθράς σειράς και σφραγίζει την απρόσκοπτη παραγωγή των ερυθρών αιμοσφαιρίων. Απαραίτητοι για τη δράση της είναι οι υποδοχείς της που παίζουν επίσης σημαντικό ρόλο στην ερυθροποίηση. Η ανίχνευση μεταλλάξεων στον υποδοχέα της Epo αποτέλεσε πεδίο έρευνας για να δοθεί εξήγηση στην υπέρμετρη παραγωγή ερυθρών αιμοσφαιρίων στους ασθενείς με Συγγενή Πολυερυθραιμία και, αλλά και σε ασθενείς με ΜΥΣ.

Μέχρι σήμερα έχουν βρεθεί ορισμένες μεταλλάξεις του γονιδίου του υποδοχέα της ερυθροποιητίνης σε ασθενείς με ΣΠ αλλά όχι σε ασθενείς με ΜΥΣ. Ένας από τους σκοπούς της μελέτης μας ήταν η αναζήτηση της ύπαρξης μεταλλάξεων του υποδοχέα Epo με σκοπό την ανεύρεση της αιτίας της νόσου, τη συσχέτιση με τα κλινικά και εργαστηριακά ευρήματα, όπως και τη δυνατότητα θεραπευτική παρέμβαση.

Πρόσφατα έχει γίνει μεγάλη και σοβαρή έρευνα σχετικά με τις κινάσες και τον κύκλο ζωής των πλάσμων του αίματος. Η προσπάθεια ανεύρεσης της μοριακής βιολογίας και των διαταραχών των c/abl αρνητικών ΜΥΣ οδήγησαν στη μελέτη της JAK 2 κινάσης. Το 2005 υπήρξαν πέντε ανακοινώσεις περίπου ταυτόχρονα από ισάριθμα ερευνητικά κέντρα στις οποίες αποκαλύφθηκε η παρουσία μιας σημειακής μετάλλαξης στην JAK 2 κινάση. Η μετάλλαξη αυτή συνίσταται στην αντικατάσταση του αμινοξέος βαλίνη από τη φαινυλαλανίνη και τη δημιουργία της παθολογικής κινάσης JAK2V617F. Η μετάλλαξη έχει βρεθεί σε ασθενείς με τυπικά ΜΥΣ όπως ΑΠ, ΙΘ και ΙΜ, καθώς και σε ασυμπτωτικές περιπτώσεις, σε άτυπα ΜΥΣ και θεωρείται ότι παίζει σημαντικό ρόλο στην παθογένεια της νόσου.

Στην εργασία μας προσπαθήσαμε να επιβεβαιώσουμε τα παραπάνω ευρήματα αλλά και να τα διασφαλίσουμε με τους υποδοχείς ερυθροποιητίνης, καθώς και τα δύο μόρια αποτελούν μέρος της αλυσίδας δράσης του μορίου της ερυθροποιητίνης. Προς την κατεύθυνση αυτή έγινε συσχέτιση με τα κλινικά και εργαστηριακά ευρήματα των ασθενών, όπως και με άλλους μοριακούς παραγόντες, για παράδειγμα με τις διαταραχές στην αγγειογένεση.

Η ανίχνευση των μεταλλάξεων του υποδοχέα της ερυθροποιητίνης και της JAK 2 κινάσης, μέσα στο πλαίσιο των μέχρι τώρα ερευνών, αλλά και η προοπτική να βρούμε συσχέτιση με τη διάγνωση, την



κλινική και εργαστηριακή εικόνα των ασθενών, όπως και η διαφαινόμενη σημασία τους στην πρόγνωση και τις μελλοντικές θεραπευτικές προσεγγίσεις άλλαξαν ολοκληρωτικά τον τρόπο που πληροποιούμε τα ΜΥΣ. Γνωρίζοντας πλέον το μοριακό υπόβαθρο των ασθενειών αυτών, μεταλλάξεις αυτές αποτελούν μία πραγματική πρόκληση για την διάγνωση και αντιμετώπιση των Μ



2. Υλικό της μελέτης

2. I. Ασθενείς με Οικογενή Πολυερυθραιμία

Μελετήθηκαν 8 οικογένειες με οικογενή πολυερυθραιμία. Τα μέλη των οικογενειών που πάσχουν από τη νόσο παρακολουθούνται στα Εξωτερικά Ιατρεία της Αιματολογικής Κλινικής του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ιωαννίνων. Εξετάστηκαν ακόμα και συγγενείς πρώτου βαθμού των ασθενών (γονείς, αδέρφια και παιδιά), που δεν είχαν συμπτώματα πολυερυθραιμίας. Ολες οι οικογένειες έχουν καταγωγή από τη Βορειοδυτική Ελλάδα. Ο πίνακας 12 δείχνει τα κλινικά και εργαστηριακά δεδομένα των ασθενών με Οικογενή Πολυερυθραιμία.

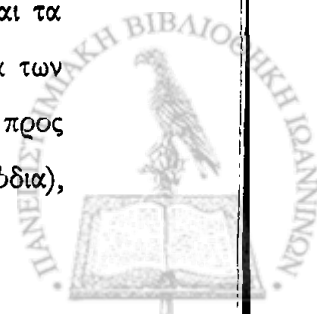
Πίνακας 12. Κλινικά και εργαστηριακά δεδομένα των ασθενών με Οικογενή Πολυερυθραιμία.

| Οικογενής Πολυερυθραιμία | |
|--|---------|
| Μέση ηλικία κατά τη διάγνωση (έτη) | 16-58 |
| Μέση ηλικία κατά τη διάγνωση (έτη) | 25.6 |
| Μέση τιμή αιματοκρίτη (Ht) κατά τη διάγνωση | 53% |
| Μέση τιμή λευκών αιμοσφαιρίων ($\times 10^9/L$) κατά τη διάγνωση | 10,150 |
| Μέση τιμή αιμοπεταλίων ($\times 10^9/L$) κατά τη διάγνωση | 256,000 |

2. II. Ασθενείς με MDS

Μελετήθηκαν συνολικά 112 ασθενείς με Μυελοϋπερπλαστικά Σύνδρομα, bcr/abl αρνητικά. Οι ασθενείς ήταν όλοι ελληνικής καταγωγής και προέρχονταν από τη Βορειοδυτική Ελλάδα (Ηπειρο, Θεσσαλία, Λευκάδα, Δυτική Μακεδονία) και είχαν τακτική παρακολούθηση στα Εξωτερικά Ιατρεία της Αιματολογικής Κλινικής του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ιωαννίνων.

Από τους 112 ασθενείς, οι 106 είχαν ένα από τα κλασικά BCR/ABL αρνητικά MYΣ (29 είχαν κληρονομηθεί Πολυερυθραιμία, οι 67 Ιδιοπαθή Θρομβοκυττάρωση και 10 Ιδιοπαθή Μυελοϊνώση), ενώ οι υπόλοιποι 6 ασθενείς έπασχαν από Χρόνια Μυελομονοκυτταρική Λευχαιμία. Οι διαγνώσεις έγιναν σύμφωνα με την κλινική εικόνα των ασθενών, τα αποτελέσματα των οστεομυελικών βιοψιών και τα κριτήρια του WHO. Ο πίνακας 13 δείχνει τα κλινικά και εργαστηριακά στοιχεία των ασθενών. Υπολογίστηκε η μέση ηλικία των ασθενών κατά τη διάγνωση, η αναλογία των ανδρών προς τις γυναίκες, η μέση διάρκεια της νόσου, η εμφάνιση επιπλοκών (αιμορραγικά/θρομβωτικά επεισόδια),



η ύπαρξη ή όχι σπληνομεγαλίας. Επιπλέον, οι μέσες τιμές του αιματοκρίτη, των λευκών αιμοσφαιρίων, των αιμοπεταλίων, της φερριτίνης, της ερυθροποιητίνης, της βιταμίνης B₁₂, του φυλλικού οξέος, γαλακτικής δεϋδρογενάσης (LDH), της β₂ μικροσφαιρίνης και της α₂σφαιρίνης.

Πίνακας 13. Κλινικοεργαστηριακά στοιχεία των ασθενών με ΜΥΣ.

| | | ΑΠ | ΙΘ | ΙΜ | ΧΜΜ |
|--|-------|----------------------------------|------------------------------------|----------------------------------|-------------------------------|
| Αριθμός ασθενών | | 29 | 67 | 10 | 6 |
| Μέση ηλικία κατά τη διάγνωση (έτη) | | 68,25 | 70.3 | 76.75 | 74.5 |
| Αναλογία Άνδρες/Γυναίκες | | 20/9 | 28/39 | 2/8 | 4/2 |
| Μέση διάρκεια νόσου (έτη) | | 6.2 | 5.2 | 11.25 | 2 |
| Εμφάνιση επιπλοκών (αιμορραγικά/θρομβωτικά επεισόδια) | Ναι | 22 | 22 | 4 | 3 |
| | Όχι | 45 | 45 | 6 | 3 |
| Σπληνομεγαλία | <12cm | 17 | 17 | 4 | 2 |
| | >12cm | 44 | 44 | 6 | 4 |
| Μέση τιμή, ακραίες τιμές Ht (%) κατά τη διάγνωση | | 55.6 (48.2-72) | 42.1 (24.6-51.1) | 40.46 (25.3-51.1) | 29.9 (25.6-37) |
| Μέση τιμή, ακραίες τιμές λευκών αιμο- σφαιρίων (x10 ⁹ /L) κατά τη διάγνωση | | 9,724 (5,500- 34,000) | 8,332 (4,670-34,830) | 9,419 (4,820-19,000) | 26,620 (18,300 34,940) |
| Μέση τιμή, ακραίες τιμές αιμοπεταλίων (x10 ⁹ /L) κατά τη διάγνωση | | 374,300 (117,000- 846,000) | 757,500 (460,000- 1,440,000) | 433,600 (145,000- 801,000) | 91,700 (22,000 159,000) |
| Μέση τιμή φερριτίνης (mg/dl) | | 76.4 | 90.5 | 79 | 162 |
| Μέση τιμή Ερυθροποιητίνης | | 8 | 28.25 | 28.18 | 200 |
| Μέση τιμή B ₁₂ | | 581.3 | 662.7 | 784 | 642.5 |
| Μέση τιμή Φυλλικού οξέος | | 6.5 | 6.85 | 10.64 | 9.85 |
| Μέση τιμή LDH | | 431.8 | 460.05 | 814.75 | 378 |
| Μέση τιμή β ₂ μικροσφαιρίνης | | 2076 | 2135.9 | 3815.3 | 4263 |
| Μέση τιμή α ₂ -σφαιρίνης | | | 12.45 | | 13.3 |

Ο πίνακας 14 δείχνει τη χορήγηση χημειοθεραπείας και είδος αυτής στους ασθενείς με ΜΥΣ.

| | | ΑΠ | ΙΘ | ΙΜ |
|-----------------------------|-----|----|----|----|
| Χορήγηση χημειοθεραπείας | Ναι | 20 | 53 | 8 |
| | Όχι | 9 | 14 | 2 |
| Υδροξουρία | | 15 | 37 | 5 |

| | | | |
|-----------|---|----|---|
| Περφερόνη | 5 | 4 | 1 |
| Αργερίδη | 0 | 12 | 2 |

3. Ανίχνευση μεταλλάξεων του υποδοχέα της Ερυθροποιητίνης

Στη μελέτη αυτή, ανιχνεύσαμε τις πιθανές μεταλλάξεις του εξονίου VIII του γονιδίου του Ερο. Στο εξόνιο αυτό βρίσκεται η περιοχή που ελέγχει γενετικά το καρβοξυλικό άκρο του υποδοχέα της Ερο, που έχει και την αρνητική ρυθμιστική δράση στην ερυθροποιητίνη (106).

3.1. Μέθοδοι πειράματος

ΕΞΑΓΩΓΗ DNA ΑΠΟ ΠΕΡΙΦΕΡΙΚΟ ΑΙΜΑ

Σε 700 μl περιφερικού ολικού αίματος προστέθηκαν 700 μl διαλύματος TKM (10 mM Tris-HCl pH 7,6, 10 mM KCl, 4 mM MgCl₂ και 2 mM EDTA pH 8) και 25 μl NP-40 (Nonphenoxy Polyethoxy Ethanol-40). Το μίγμα αυτών των διαλυμάτων προκαλεί λύση των ερυθροκυττάρων. Αναδεύτηκε και φυγοκεντρήθηκε στις 10.000 στροφές για 3 min. Το ίζημα των λευκοκυττάρων πλύθηκε με 0,5 ml διαλύματος TKM 4-5 φορές μέχρι να απομακρυνθεί όλη η ερυθρότητα των ερυθροκυττάρων, το οποίο φαίνεται μακροσκοπικά από την λευκή/υποκίτρινη χροιά του ιζήματος. Σε αυτές τις πλύσεις του ιζήματος η φυγοκέντρωση πραγματοποιήθηκε στις 10.000 στροφές για 1 sec. Στο καθαρό ίζημα των λευκοκυττάρων προστέθηκαν 200 μl TKM και 15 μl διαλύματος SDS 10% (Sodium dodecyl sulfate) και έγινε θέρμανση για 5 min στους 55°C. Σκοπός αυτού του σταδίου είναι η λύση των λευκοκυττάρων, των πυρήνων τους και ο κατακερματισμός των πρωτεϊνών που είναι προσκολλημένες στο DNA. Στη συνέχεια προστέθηκαν 75 μl διαλύματος NaCl και ακολούθησε φυγοκέντρωση στις 12.000 στροφές για 3 min. Το αποτέλεσμα αυτού του σταδίου είναι ο κατακερματισμός των πρωτεϊνών. Το υπερκείμενο μεταφέρθηκε προσεκτικά σε νέο erpendorf και έγινε προσθήκη 750 μl απόλυτης αιθανόλης -20°C. Η αιθανόλη αφυδατώνει το DNA, το οποίο μπορεί στη συνέχεια να συλλεχθεί εύκολα και κατόπιν να διαλυθεί σε 50 μl διαλύματος TE (10 mM Tris-HCl pH 7,8, 1 mM EDTA pH 8). Το DNA που απομονώθηκε διατηρήθηκε στους 4°C.

PCR

Κάθε αντίδραση PCR είχε τελικό όγκο 25 μl και προστίθεντο τα ακόλουθα αντιδραστήρια σε σωλήνα erpendorf' για την πραγματοποίησή της:

- ✓ *100 ng DNA
- ✓ 50 pmols έκαστου εκκινητή
(F: 5'-GAC/GAC/CCA/CCT/GCT/TCC-3')



(R: 5'-CAA/AGC/TGG/CAG/CAG/AGG-3')

- ✓ 200 μ M έκαστου dNTP (A, T, G, C)
- ✓ 2,5 μ l ρυθμιστικού διαλύματος 10x PCR buffer, απουσία Mg^{++}
- ✓ 1 mM $MgCl_2$
- ✓ 2,5 U Taq DNA πολυμεράσης
- ✓ Συμπληρώναμε με dd H_2O σε τελικό όγκο 25 μ l

EPOR3

Κάθε αντίδραση PCR είχε τελικό όγκο 25 μ l και προστίθεντο τα ακόλουθα αντιδραστήρια σε σωλή “eppeдорf” για την πραγματοποίησή της:

- ✓ 100 ng DNA
- ✓ 50 pmols έκαστου εκκινητή
(F: 5'-TCC/TGC/TCA/TCT/GCT/TTG/G-3')
(R: 5'-CAT/CTG/CAG/CCT/GGT/GTC/C-3')
- ✓ 200 μ M έκαστου dNTP (A, T, G, C)
- ✓ 2,5 μ l ρυθμιστικού διαλύματος 10x PCR buffer, απουσία Mg^{++}
- ✓ 1 mM $MgCl_2$
- ✓ 2,5 U Taq DNA πολυμεράσης
- ✓ Συμπληρώναμε με dd H_2O σε τελικό όγκο 25 μ l

Το θερμοκρασιακό πρόγραμμα για την πραγματοποίηση της αντίδρασης PCR ήταν το εξής:

1. Αρχική αποδιάταξη στους 95°C για 10 min
2. Αποδιάταξη στους 95°C για 30 sec
3. Υβριδοποίηση των εκκινητών στους 55°C για 30 sec
4. Επιμήκυνση των θυγατρικών κλώνων στους 72°C για 1 min και 30 sec
5. Επανάληψη των σταδίων 2-4 για 30 κύκλους
6. Τελική επιμήκυνση στους 72°C για 10 min

ΕΛΕΓΧΟΣ ΤΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ PCR ΣΕ ΠΗΚΤΩΜΑ ΑΓΑΡΟΖΗΣ

Ο έλεγχος της ενίσχυσης της επιθυμητής αλληλουχίας των δειγμάτων γινόταν μετά το πέρας της PCR σε πηκτή αγαρόζης 2%. Συγκεκριμένα, διαλύονταν 2 gr αγαρόζης σε 100 ml διαλύματα 1xTBE (89mM Tris-base, 89 mM βορικό οξύ, 0,01M EDTA pH=8) κατόπιν θέρμανσης και ακολούθως προστίθετο βρωμιούχο αιθίδιο σε τελική συγκέντρωση 5×10^{-5} w/v. Το βρωμιούχο αιθίδιο

κει την ικανότητα να δεσμεύεται μεταξύ των βάσεων του DNA κατά τη διάρκεια της ηλεκτροφόρησης και κάνει ορατά τα μόρια DNA από τα οποία έχει δεσμευθεί όταν η πηκτική αγαρόζης εκτεθεί στο υπεριώδες φως. Το διάλυμα φόρτωσης (κυανούν της βρωμοφαινόλης 2% w/v, κυανούν του ξυλενίου 2% w/v, γλυκερόλη 50% w/v) αντιπροσώπευε το 1/10 του τελικού όγκου του δείγματος που λέγγονταν. Το μέσο της ηλεκτροφόρησης ήταν επίσης το διάλυμα 1xTBE. Ως μάρτυρας χρησιμοποιείτο ο "100bp ladder" και η ηλεκτροφόρηση γινόταν με εφαρμογή τάσης 100-150V για 30 min.

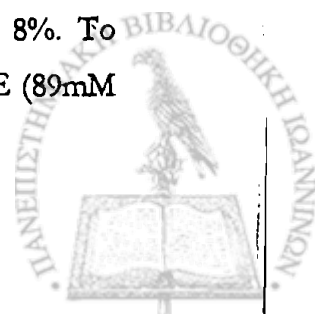
ΠΕΨΕΙΣ ΤΩΝ ΕΝΙΣΧΥΜΕΝΩΝ ΤΜΗΜΑΤΩΝ ΤΩΝ ΤΡΙΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΜΕ ΕΝΖΥΜΑ ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΥ.

Οι πέψεις γίνονταν σύμφωνα με τα πρωτόκολλα της κατασκευάστριας εταιρείας New England Biolabs. Ο τελικός όγκος της αντίδρασης της πέψης ήταν 6 μλ. Σε αυτό προσθέτονταν 2,5 U ενζύμου, κατάλληλη ποσότητα ρυθμιστικού διαλύματος κάθε ενζύμου και το υπόλοιπο συμπληρωνόταν μέχρι τελικού όγκου 6 μλ με το προϊόν της εκάστοτε PCR. Τα ένζυμα που χρησιμοποιήθηκαν στην πέψη των προϊόντων PCR δίνονται στον ακόλουθο πίνακα.

| Προϊόν PCR | Περιοριστική ενδονουκλεάση | Συνθήκες πέψης |
|------------|----------------------------|------------------------------|
| JAK | BsaX I | overnight επώαση στους 37 °C |
| EPOR2 | Ava II | overnight επώαση στους 37 °C |
| | Ban II | overnight επώαση στους 37 °C |
| | Sph I | overnight επώαση στους 37 °C |
| EPOR3 | Ava II | overnight επώαση στους 37 °C |
| | Hae III | overnight επώαση στους 37 °C |
| | Hinf I | overnight επώαση στους 37 °C |
| | Rsa I | overnight επώαση στους 37 °C |
| | BstNI | overnight επώαση στους 60 °C |

ΕΛΕΓΧΟΣ ΤΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ ΤΗΣ ΠΕΨΗΣ

Τα προϊόντα των πέψεων, αφού σε αυτά προσθέτονταν διάλυμα φόρτωσης όπως στον έλεγχο των προϊόντων της PCR, ελέγχονταν σε πήκτωμα ακρυλαμίδης/ bis-ακρυλαμίδης (29:1) 8%. Το πήκτωμα είχε διαστάσεις 20x20x0,1 cm³ και το μέσο της ηλεκτροφόρησης περιείχε 1x-TBE (89mM



Tris-base, 89 mM βορικό οξύ, 0,01M EDTA pH=8). Εφαρμόζοταν σταθερή τάση 100 Volts σε θερμοκρασία δωματίου για 5 h και ακολουθούσε χρώση του με τη μέθοδο του νιτρικού αργύρου.

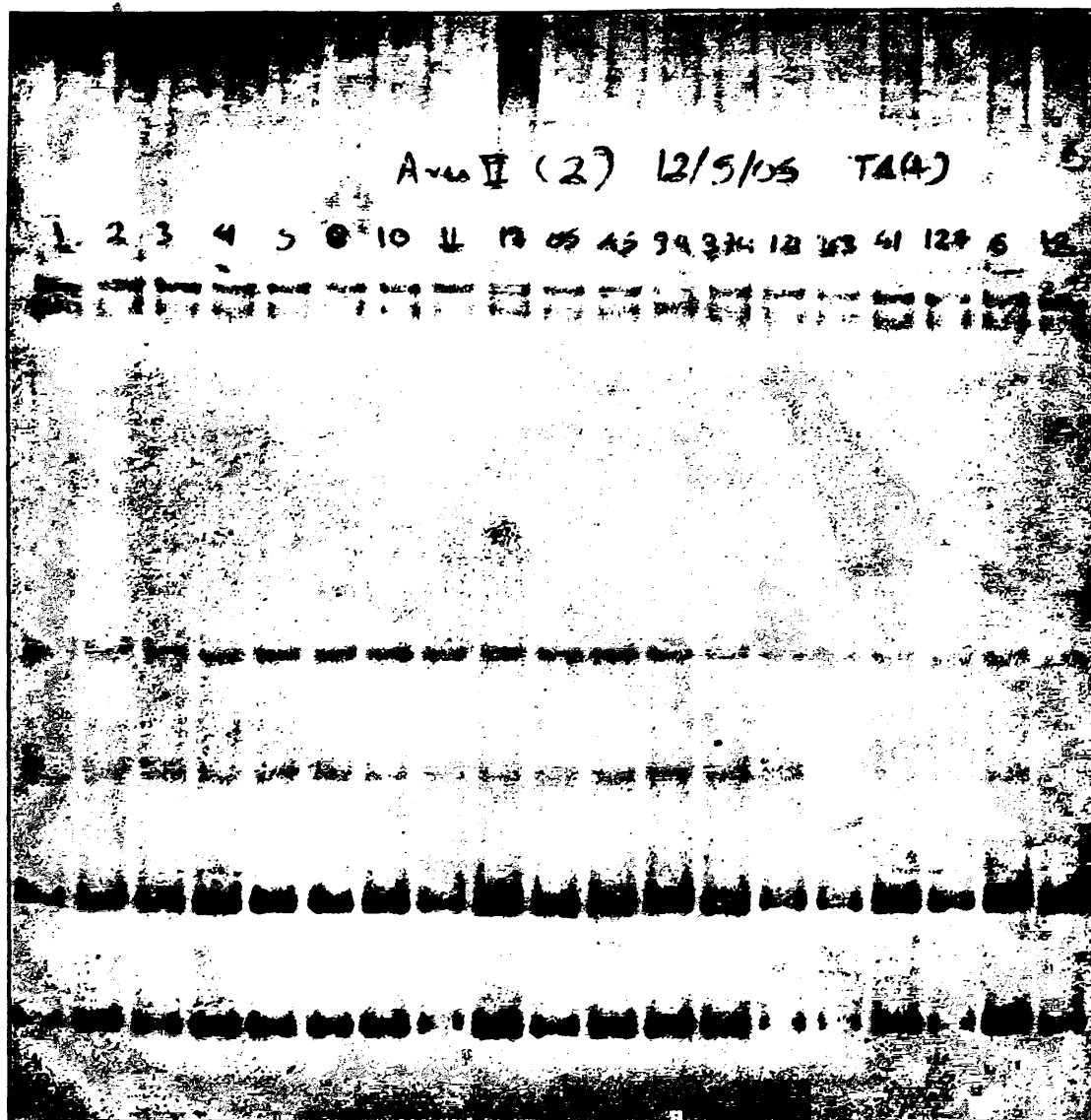
Μόνο ο έλεγχος των προϊόντων της πέψης με την περιοριστική ενδονουκλεάση BsaX I γινόταν σε πήκτωμα αγαρόζης 3%, το οποίο παρασκευάζονταν όπως περιγράφεται στην παρασκευή του πηκτώματος αγαρόζης για τον έλεγχο των προϊόντων της εκάστοτε PCR αντίδρασης. Το διάλυμα φόρτωσης αντιπροσώπευε το 1/10 του τελικού όγκου του δείγματος που ελέγχονταν. Το μέσο της ηλεκτροφόρησης ήταν επίσης το διάλυμα 1xTBE. Ως μάρτυρας χρησιμοποιείτο ο "100bp ladder" και η ηλεκτροφόρηση γινόταν με εφαρμογή τάσης 100-150V για 1 ώρα.

Πολυμορφισμός μήκους περιορισμένων θραυσμάτων (single-strand conformational polymorphism-SSCP)

Η SSCP ανάλυση έγινε για να ανιχνεύσουμε μεταλλάξεις του εξονίου VIII του γονιδίου του Ερ R. Έγινε πέψη των προϊόντων της PCR με περιοριστικά ένζυμα ούτως ώστε να πάρουμε τμήμα DNA μήκους περίπου 150-200 bp. Στο μέγεθος αυτό η SSCP μέθοδος έχει μεγαλύτερη ικανότητα ανίχνευσης (128). Το 303-bp προϊόν της PCR που ελήφθη από τη θέση 5' του εξονίου VIII επωάστηκε με τα περιοριστικά ένζυμα Ava II, Ban II και SphI. Το 333-bp προϊόν της PCR από την 3' θέση του εξονίου VIII επωάστηκε με τα περιοριστικά ένζυμα Ava II, HaeIII, HinfI, RsaI και BstNI.



Το SSCP screening των προϊόντων της PCR έδειξε το ίδιο σήμα στους ασθενείς και τους ερωτηρούμενους. Η ανάλυση της ακολουθίας έδειξε τον μη μεταλλαγμένο, άγριο τύπο γονιδίου σε όλους τους ασθενείς. Η εικόνα 5. δείχνει ότι για το εξόνιο VIII του EPO-R δεν υπήρξε ανιχνεύσιμη μετάλλαξη στις συγκεκριμένες οικογένειες που μελετήθηκαν.



Εικ. 8. Η SSCP ανάλυση των δειγμάτων σε ασθενείς με Πρωτοπαθή Οικογενή και Συγγενή Ερυθροκυττάρωση. Όλοι οι ασθενείς εμφανίζουν τον μη μεταλλαγμένο (άγριο ή παρθένο) τύπο του γονιδίου του υποδοχέα της Ερο.

B.3.III. Συμπεράσματα

Τα αποτελέσματα του πειράματος οδηγούν στη διαπίστωση ότι η μοριακή παθογένεια της οικογενούς πολυερυθραιμίας στις οικογένειες ελληνικής καταγωγής που εξετάστηκαν δεν μπορεί να αποδειχθεί στη συγκεκριμένη μελέτη. Πρέπει να σημειωθεί ότι οι μεταλλάξεις του γονιδίου του Epo-R ανιχνεύονται μόνο στο 10-20% των οικογενών πολυερυθραιμιών (129-130). Για πολλές οικογένειες με ερυθροκυττάρωση οι γενετικές αλλαγές που προκαλούν τη νόσο παραμένουν άγνωστες (129). Από τη άλλη πλευρά, σε μία οικογένεια με πολυερυθραιμία βρέθηκε ως πιθανή αιτία της νόσου μία γονιδιακή μετάλλαξη στη χρωμοσωμική θέση 7q22.1-7q22.2, η οποία μπορεί να προκαλεί και τη διαταραχή (130). Αυτή η διαπίστωση δείχνει ότι στην παθογένεια της νόσου μπορεί να συμμετέχουν πολλά γονίδια από διαφορετικά χρωμοσώματα. Τέλος, μέχρι και τις τελευταίες μελέτες δεν έχει ενοχοποιηθεί μετάλλαξη του ίδιου του γονιδίου της Epo ως παράγοντας που συνδέεται με την οικογενή πολυερυθραιμία (131).

B.4. Ανίχνευση της μετάλλαξης JAK 2 V617F

B.4.1. Μεθοδος

Έγινε λήψη περιφερικού αίματος από τους ασθενείς και διατήρησή του στους σε θερμοκρασία 70°C και ακολούθησε απομόνωση κοκκιοκυττάρων και λεμφοκυττάρων και εξαγωγή DNA από αυτά σύμφωνα με προαναφερθείσες μεθόδους (127). Από το DNA ελήφθησαν 80ng και πραγματοποιήθηκε αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (polymerase-chain reaction-PCR), σε μέση θερμοκρασία 58°C. Χρησιμοποιήσαμε 1μmol/L του κοινού αντιστροφου εκκινητή (primer) και 0.5μmol/L των δύο πρόσθιων εκκινητών για την JAK 2 κινάση (Πίν. 15).

ΕΝΙΣΧΥΣΗ ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ PCR

JAK

Κάθε αντίδραση PCR είχε τελικό όγκο 25 μl και προστίθεντο τα ακόλουθα αντιδραστήρια σε σωλήνα "eredorf" για την πραγματοποίησή της:

- ✓ 100 ng DNA
- ✓ 50 pmols έκαστου εκκινητή



(F: 5'-TGC/TGA/AAG/TAG/GAG/AAA/GTG/CAT-3')

(R: 5'-TCC/TAC/AGT/GTT/TTC/AGT/TTC/AA-3')

- ✓ 200 μ M έκαστου dNTP (A, T, G, C)
- ✓ 2,5 μ l ρυθμιστικού διαλύματος 10x PCR buffer, απουσία Mg^{++}
- ✓ 1 mM $MgCl_2$
- ✓ 2,5 U Taq DNA πολυμεράσης
- ✓ Συμπληρώναμε με dd H_2O σε τελικό όγκο 25 μ l

ο θερμοκρασιακό πρόγραμμα για την πραγματοποίηση της αντίδρασης PCR ήταν το εξής:

7. Αρχική αποδιάταξη στους 95°C για 10 min
 8. Αποδιάταξη στους 95°C για 30 sec
 9. Υβριδοποίηση των εκκινητών στους 50°C για 30 sec
 10. Επιμήκυνση των θυγατρικών κλώνων στους 72°C για 1 min και 30 sec
 11. Επανάληψη των σταδίων 2-4 για 30 κύκλους
- Τελική επιμήκυνση στους 72°C για 10 min

3.4.II. Αποτελέσματα

Συχνότητα της JAK 2 V617F μετάλλαξης

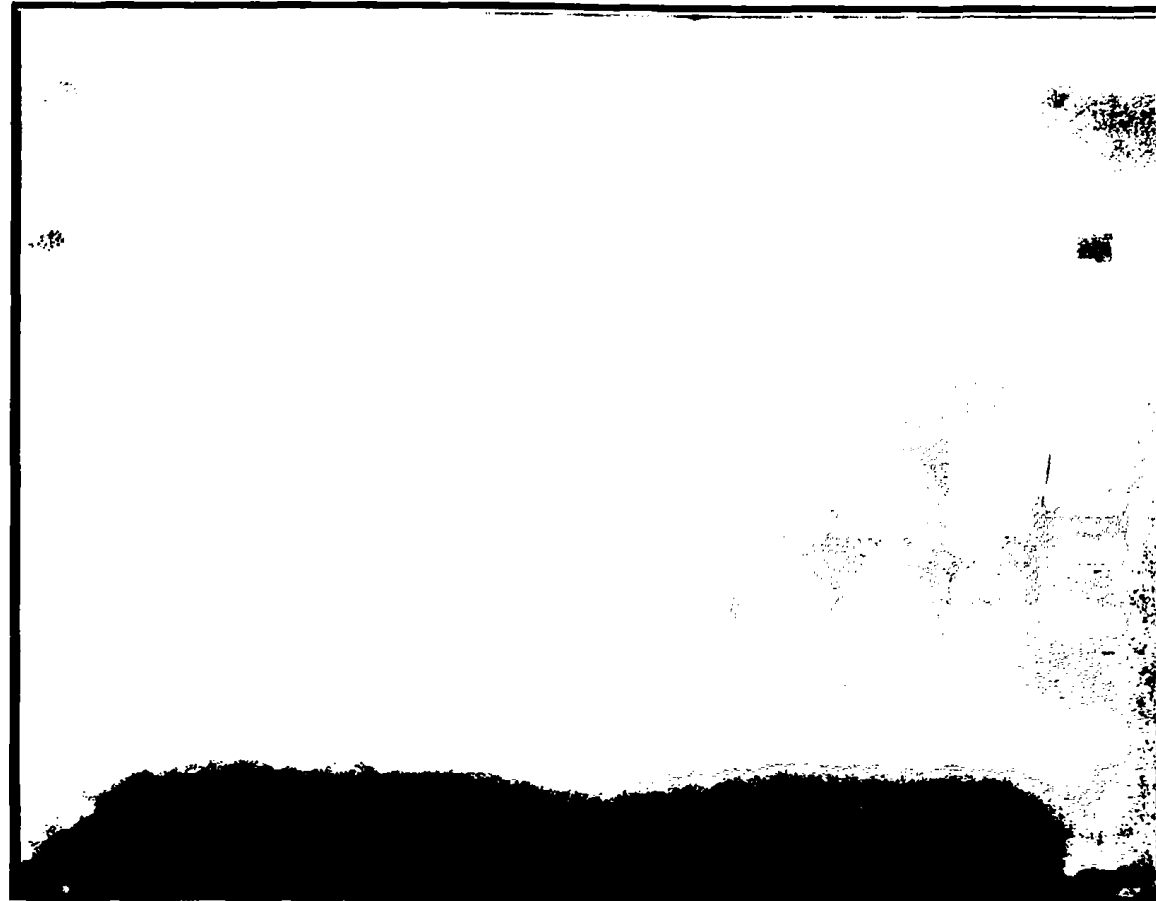
Συνολικά σε 54 από τους 106 ασθενείς με κλασικά ΜΥΣ ανιχνεύθηκε η μετάλλαξη JAK 2 V617F. Αναλυτικά, η μετάλλαξη βρέθηκε στους 18 από τους 29 ασθενείς με ΑΠ (ποσοστό 62%), στους 30 από τους 67 ασθενείς με ΙΘ (ποσοστό 45%) και στους 6 από τους 10 ασθενείς με ΙΜ (ποσοστό 60%). Δεν ανιχνεύθηκε η V617F κανέναν από τους 6 ασθενείς με ΧΜΜΛ που μελετήθηκαν. Επιπλέον, τα μέλη και των 8 οικογενειών με οικογενή πολυερυθραιμία εμφάνισαν τον μη μεταλλαγμένο τύπο της JAK 2. Τα αποτελέσματα φαίνονται στον πίνακα 16.

Πίνακας 16. Συχνότητα της μετάλλαξης JAK 2 V617F σε ασθενείς με ΜΥΣ και Οικογενή Πολυερυθραιμία.

| | JAK 2 V617F | JAK 2 μη μεταλλαγμένη |
|--------------------------|-------------|-----------------------|
| Διληθής Πολυερυθραιμία | 18 (62%) | 11 (38%) |
| διοπαθής Θρομβοκυττάρωση | 30 (45%) | 37 (55%) |
| διοπαθής Μυελοινωση | 6 (60%) | 4 (40%) |



| | | |
|------------------------------|---|----------------------|
| Χρόνια Μυελομον/κή Λευχαιμία | 0 | 6 (100%) |
| Οικογενής Πολυερυθραιμία | 0 | 8 οικογένειες (100%) |



Εικ. 9. Μετάλλαξη της JAK 2 V617F.

Ομοζυγωτία στη μετάλλαξη V617F

Από την ανάλυση των αποτελεσμάτων βρέθηκε ότι από τους 18 ασθενείς με ΑΠ, που ήταν θετικοί για τη V617F, οι 4 ήταν ομόζυγοι για τη μετάλλαξη (ποσοστό 22%). Οι υπόλοιποι 16 ασθενείς ήταν ετερόζυγοι για την μετάλλαξη (ποσοστό 78%). Όλοι οι ασθενείς με ΙΘ και ΙΜ που ήταν θετικοί για τη V617F, εμφανίζονταν ετερόζυγοι για τη μετάλλαξη. Δεν ανιχνεύθηκε δηλαδή ομοζυγωτία στη μετάλλαξη.

Συσχέτιση της μετάλλαξης V617F με τα κλινικά και εργαστηριακά δεδομένα των ασθενών με ΑΠ, ΙΘ και ΙΜ

Στη συνέχεια της μελέτης θέλαμε να συσχετίσουμε τη μετάλλαξη V617F με τα κλινικά και εργαστηριακά δεδομένα των ασθενών και στα τρία νοσήματα. Μελετήθηκαν η μέση ηλικία κατά τη

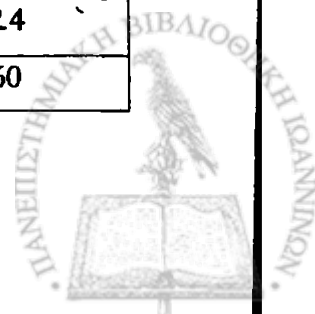


διάγνωση, η αναλογία άνδρες προς γυναίκες, η μέση διάρκεια της νόσου και η εμφάνιση αιμορραγικών και θρομβωτικών επεισοδίων. Στα θρομβωτικά επεισόδια εντάχθηκαν αρτηριακές θρομβώσεις όπως τα παροδικά ισχαιμικά επεισόδια, τα αγγειακά θρομβωτικά επεισόδια, η ασταθής στηθάγχη, το οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου και τα θρομβοεμβολικά επεισόδια περιφερικών αρτηριών. Επιπλέον, υπάρχουν οι φλεβικές θρομβώσεις, όπως οι εν τω βάθει φλεβικές θρομβώσεις των άκρων, η θρόμβωση των μεσεντερικών φλεβών, της πυλαίας ή της σπληνικής φλέβας.

Οι παρακάτω πίνακες μας δείχνουν τη σύγκριση των κλινικών και εργαστηριακών δεδομένων στους ασθενείς με ΑΠ, ΙΘ και ΙΜ, που εμφάνιζαν τη μετάλλαξη JAK 2 V617F και σε εκείνους που είχαν τον μη μεταλλαγμένο τύπο. Εγινε στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων.

Πίνακας 17. Συσχέτιση κλινικοεργαστηριακών δεδομένων στους ασθενείς με ΑΠ.

| | | Σύνολο ασθενών με ΑΠ (n=29) | JAK 2 V617F (n=18) | JAK 2 wild type (n=11) |
|--|-----|--------------------------------|--------------------------|---------------------------|
| Μέση ηλικία κατά τη διάγνωση (έτη) | | 68.25 | 72.2 | 63.7 |
| Αναλογία Άνδρες/Γυναίκες | | 20/9 | 10/8 | 10/1 |
| Μέση διάρκεια νόσησης (έτη) | | 6.2 | 5.625 | 6.36 |
| Εμφάνιση επιπλοκών αιμορραγικά/θρομβωτικά επεισόδια) | Ναι | 13 | 11 | 2 |
| | Όχι | 16 | 7 | 9 |
| Εμφάνιση σπληνομεγαλίας | Ναι | 8 | 5 | 3 |
| | Όχι | 21 | 13 | 8 |
| Μέση τιμή Ht (%) κατά τη διάγνωση | | 55.6 (48.2-72) | 56.86 (48.2-72) | 54 (48.7-59.5) |
| Μέση τιμή λευκών αιμοσφαιρίων ($10^9/L$) κατά τη διάγνωση | | 9,724 (5,500-34,000) | 10,300 (8,210-17,000) | 6,473 (3,700-13,100) |
| Μέση τιμή αιμοπεταλίων ($\times 10^9/L$) κατά τη διάγνωση | | 374,300 (117,000-846,000) | 470,000 (131-524,000) | 248,500 (130-524,000) |
| Μέση τιμή φερριτίνης | | 76.4 | 47.5 | 139 |
| Μέση τιμή Ερυθροποιητίνης | | 8 | 5.67 | 12.3 |
| Μέση τιμή B 12 | | 581.3 | 712,9 | 322.5 |
| Μέση τιμή Φολλικού οξέος | | 6.5 | 7.4 | 5.9 |
| Μέση τιμή LDH | | 431.8 | 462.5 | 402.4 |
| Μέση τιμή B2-μικροσφαιρίνης | | 2076 | 2573,8 | 1660 |



Από τον πίνακα φαίνεται ότι από τους συνολικά 13 ασθενείς με ΑΠ που εμφάνισαν αιμορραγικά ή θρομβωτικά επεισόδια οι 11 ήταν θετικοί στη V617F (ποσοστό 85%). Επιπλέον, από τους 11 ασθενείς που δεν είχαν τη μετάλλαξη, οι 9 δεν είχαν και κάποιο αιμορραγικό ή θρομβωτικό επεισόδιο (ποσοστό 82%). Οι τιμές του αιματοκρίτη, των λευκών και των αιμοπεταλίων κατά τη διάγνωση ήταν υψηλότερες στους ασθενείς με τη μετάλλαξη παρά στους μη μεταλλαγμένους. Αντίθετα, οι τιμές της φερριτίνης και της ερυθροποιητίνης για τους μη μεταλλαγμένους ήταν περίπου διπλάσιες σε σχέση με αυτές στους μεταλλαγμένους.

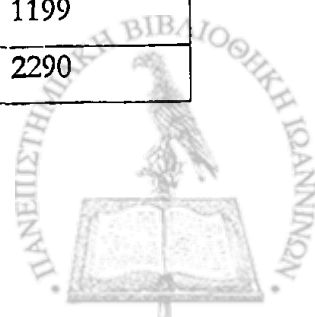
Πίνακας 18. Συσχέτιση της μετάλλαξης JAK 2 V617F με τα κλινικά και εργαστηριακά δεδομένα στους ασθενείς με Ιδιοπαθή Θρομβοκυττάρωση.

| | | Σύνολο ασθενών με IΘ (n=67) | JAK 2 V617F (n=30) | JAK 2 wild type (n=37) |
|--|-----|--------------------------------|----------------------------|----------------------------|
| Μέση ηλικία κατά τη διάγνωση (έτη) | | 70.3 | 71.6 | 69.3 |
| Αναλογία Άνδρες/Γυναίκες | | 28/39 | 16/14 | 12/25 |
| Μέση διάρκεια νόσησης (έτη) | | 5.2 | 4.3 | 6.2 |
| Εμφάνιση επιπλοκών (αιμορραγικά/θρομβωτικά επεισόδια) | Ναι | 22 | 13 | 9 |
| | Όχι | 45 | 17 | 28 |
| Εμφάνιση σπληνομεγαλίας | Ναι | 17 | 12 | 5 |
| | Όχι | 44 | 18 | 32 |
| Μέση τιμή Ht (%) κατά τη διάγνωση | | 42.1 (24.6-51.1) | 41.6 (27.5-50.7) | 40.1 (24.6-51.1) |
| Μέση τιμή λευκών αιμοσφαιρίων ($\times 10^3$ /ml) κατά τη διάγνωση | | 8,332 (4,670-34,830) | 7,534 (4,670-15,000) | 9,130 - (4,700-34,830) |
| Μέση τιμή αιμοπεταλίων ($\times 10^3$ /ml) κατά τη διάγνωση | | 757,500 (452-1.640,000) | 779,000 (460-1,250,000) | 736,100 (452-1,640,000) |
| Μέση τιμή φερριτίνης | | 90.5 | 83.4 | 96.7 |
| Μέση τιμή Ερυθροποιητίνης | | 28.25 | 34.2 | 22.3 |
| Μέση τιμή B 12 | | 662.7 | 470.2 | 855.2 |
| Μέση τιμή Φυλλικού οξέος | | 6.85 | 7.2 | 6.5 |
| Μέση τιμή LDH | | 460.05 | 395.4 | 524.7 |
| Μέση τιμή B2-μικροσφαιρίνης | | 2135.9 | 2155.2 | 2116.6 |
| Μέση τιμή $\alpha 2$ -σφαιρίνης | | 12.45 | 12.3 | 12.7 |

Από τον πίνακα 18 συμπεραίνουμε ότι η μέση ηλικία εμφάνισης της νόσου στους JAK 2 V617F θετικούς και αρνητικούς ασθενείς με ΙΘ είναι περίπου ίδιος, 71,6 και 69,3 χρόνια αντίστοιχα. Στους V617F θετικούς ασθενείς ο αριθμός ανδρών και γυναικών είναι περίπου ίδιος, ενώ στους μη μεταλλαγμένους οι γυναίκες είναι διπλάσιες από τους άνδρες. Επιπλέον, ο αριθμός των μη μεταλλαγμένων ασθενών που δεν εμφανίζουν αιμορραγικά ή θρομβωτικά επεισόδια είναι τριπλάσιος σε σχέση με αυτούς που εμφάνισαν. Αντίθετα, στους V617F θετικούς ασθενείς υπάρχει σχετική ισορροπία στη συχνότητα ή όχι εμφάνισης αιμορραγικών ή θρομβωτικών επεισοδίων. Η εμφάνιση σπληνομεγαλίας στους μη μεταλλαγμένους ασθενείς είναι πιο σπάνια σε σχέση με τους μη μεταλλαγμένους. Η μέση τιμή των αιμοπεταλίων κατά τη διάγνωση φαίνεται ότι στους V617F θετικούς είναι υψηλότερη, όπως και η μέση τιμή της Ερο. Από την άλλη μεριά, οι μη μεταλλαγμένοι ασθενείς είχαν υψηλότερες μέσες τιμές της B12 και της LDH.

Πίνακας 18. Συσχέτιση της μετάλλαξης JAK 2 V617F με τα κλινικά και εργαστηριακά δεδομένα στους ασθενείς με Ιδιοπαθή Μυελόινωση

| | | Σύνολο ασθενών με IM (n=10) | JAK 2 V617F (n=6) | JAK 2 wild type (n=4) |
|---|-----|--------------------------------|------------------------------|-----------------------------|
| Μέση ηλικία κατά τη διάγνωση (τη) | | 76.75 | 76.3 | 78 |
| Αναλογία Ανδρες/Γυναίκες | | 2/8 | 1/5 | 1/3 |
| Μέση διάρκεια νόσησης (έτη) | | 11.25 | 10.3 | 14 |
| Εμφάνιση επιπλοκών αιμορραγικά/θρομβωτικά επεισόδια | Ναι | 4 | 3 | 1 |
| | Όχι | 6 | 3 | 3 |
| Εμφάνιση σπληνομεγαλίας | Ναι | 4 | 2 | 2 |
| | Όχι | 6 | 4 | 2 |
| Μέση τιμή Ht (%) κατά τη διάγνωση | | 40.46 (25.3-51.1) | 42.4 (30.2-51.1) | 29 (25.3-32.7) |
| Μέση τιμή λευκών αιμοσφαιρίων (x10 ³ /ml) κατά τη διάγνωση | | 9,419 (4,820-19,000) | 9,800 (4,820-19,000) | 6,000 (5,540-6.460) |
| Μέση τιμή αιμοπεταλίων (x10 ³ /ml) κατά τη διάγνωση | | 433,600 (145,000-801,000) | 449,800 (200,000-801,000) | 241,000 (145,00-337,000) |
| Μέση τιμή φερριτίνης | | 79 | 82 | 67 |
| Μέση τιμή Ερυθροποιητίνης | | 28.18 | 18.2 | 58 |
| Μέση τιμή B 12 | | 784 | 975 | 210 |
| Μέση τιμή Φυλλικού οξέος | | 10.64 | 12.1 | 4.8 |
| Μέση τιμή LDH | | 814.75 | 395.4 | 1199 |
| Μέση τιμή B2-μικροσφαιρίνης | | 3815.3 | 4578 | 2290 |



B.4.III. Στατιστική ανάλυση

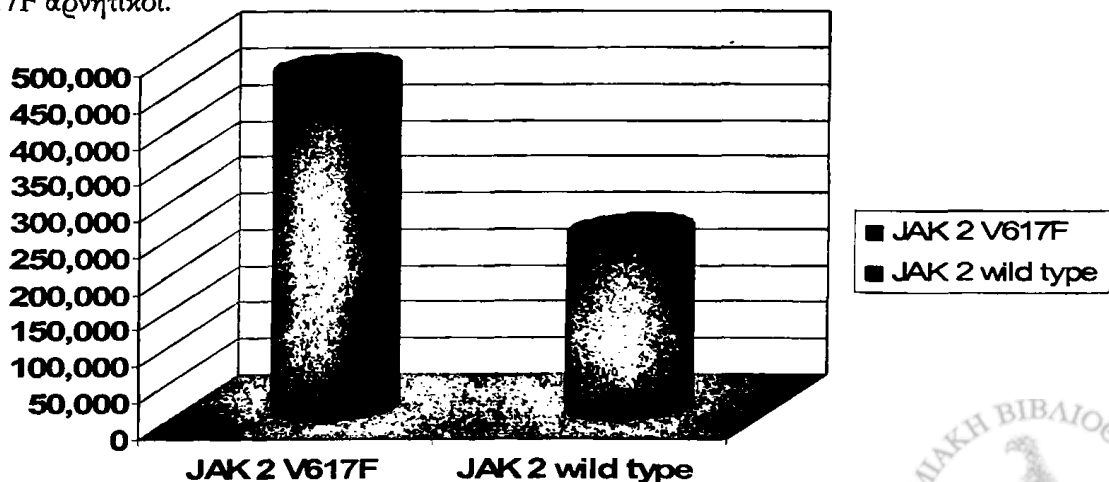
Η στατιστική ανάλυση έγινε με τη βοήθεια του p σημαντικού και του χ^2 . η στατιστική συσχέτιση των τιμών της μέσης ηλικίας κατά τη διάγνωση, της μέσης διάρκειας νόσησης, των τιμών του αιματοκρίτη, των λευκών αιμοσφαιρίων, των αιμοπεταλίων, της φερριτίνης, της ερυθροποιητίνης, της βιταμίνης B12, του φυλικού οξέος, της LDH και της $\beta 2$ -μικροσφαιρίνης μεταξύ των θετικών και αρνητικών ως προς τη μετάλλαξη JAK2 V617F ασθενών έγινε με τη μέθοδο του p στατιστικά σημαντικού.

Όσον αφορά στους ασθενείς με Αληθή Πολυερυθραιμία, η ανάλυση έδειξε διαφορά στατιστικά σημαντική μεταξύ των ασθενών V617F θετικών και αρνητικών ως προς την τιμή των αιμοπεταλίων με $p=0.007$. Οι ασθενείς που είναι θετικοί ως προς τη μετάλλαξη έχουν στατιστικά μεγαλύτερο αριθμό αιμοπεταλίων σε σχέση με τους ασθενείς που δεν την εμφανίζουν.

Για τις αντίστοιχες τιμές στους ασθενείς με Ιδιοπαθή Θρομβοκυττάρωση και Ιδιοπαθή Μυελοϊνώση η στατιστική ανάλυση δεν έδειξε κάποια στατιστικώς σημαντική διαφορά των κλινικοεργαστηριακών δεδομένων μεταξύ των θετικών και αρνητικών για τη JAK2 V617F μετάλλαξη ασθενών.

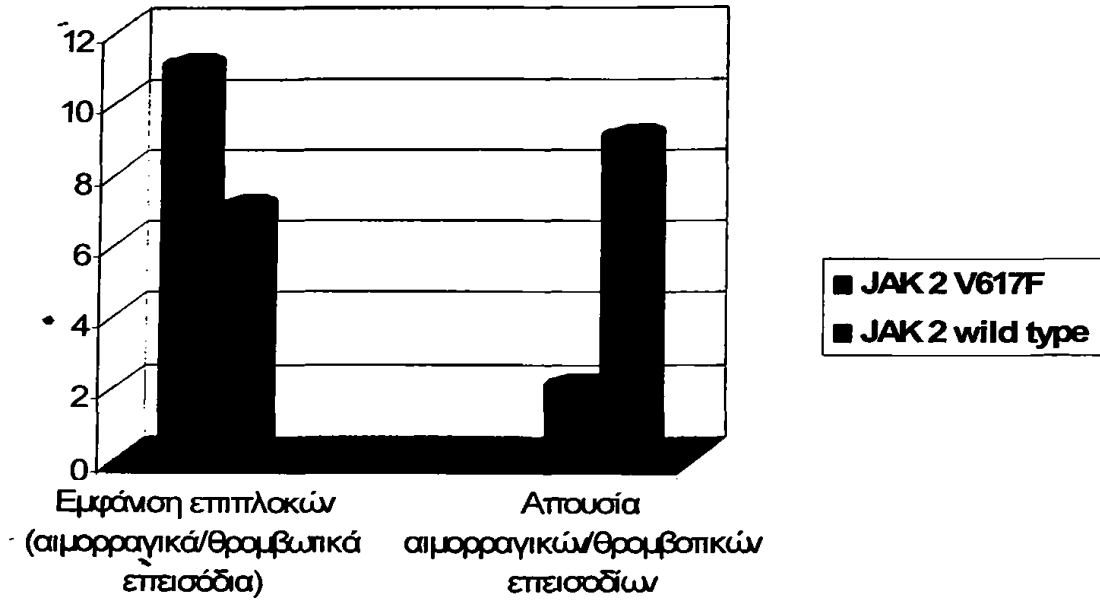
Τα δεδομένα της αναλογίας άνδρες προς γυναίκες καθώς, της εμφάνισης ή όχι αιμορραγικών/θρομβωτικών επεισοδίων και της παρουσίας ή όχι σπληνομεγαλίας εξετάστηκαν με τη μέθοδο του χ^2 . Στους ασθενείς με ΑΠ, μεταξύ των αυτών με θετική και αυτών με αρνητική την JAK2 V617F μετάλλαξη, στατιστικά σημαντική διαφορά και μάλιστα οριακή, με $p=0.052$, βρέθηκε ως προς την εμφάνιση αιμορραγικών και θρομβωτικών επεισοδίων. Οι JAK2 V617F θετικοί ασθενείς έχουν πιο μεγάλη συχνότητα εμφάνισης των επιπλοκών αυτών.

Από την άλλη μεριά, η μελέτη των ασθενών με ΙΘ έδειξε ότι οι ασθενείς θετικοί στη μετάλλαξη V617F εμφανίζουν πιο συχνά σπληνομεγαλία σε βαθμό στατιστικά σημαντικό σε σχέση με αυτούς που είναι V617F αρνητικοί.

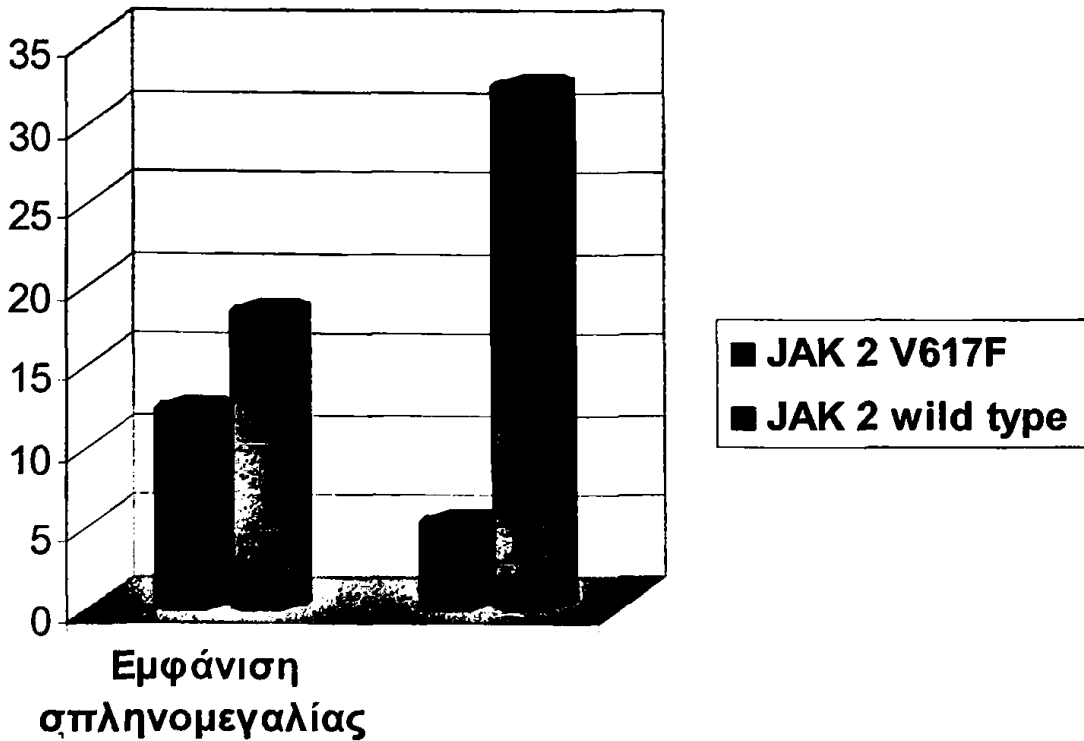


Εικ. 11. Αριθμός αιμοπεταλίων σε ασθενείς με Α.Π..





ικ. 12. Εμφάνιση επιπλοκών (αιμορραγικά και θρομβωτικά επεισόδια) σε ασθενείς με Α.Π.



ικ. 13. Εμφάνιση ή όχι σπληνομεγαλίας σε ασθενείς με Ι.Θ.

B.4.IV. Συμπεράσματα-συζήτηση της ανίχνευσης της JAK 2 V617F

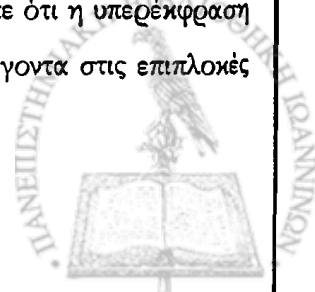
Τα αποτελέσματα των πειραμάτων μας επιβεβαίωσαν την ύπαρξη της σημειακής μετάλλαξης V617F στο γονίδιο της JAK 2 κινάσης σε Έλληνες ασθενείς με ΜΥΣ. Σε 54 από τους 106 ασθενείς με κλασσικά, bcr/abl αρνητικά ΜΥΣ ανιχνεύθηκε η μετάλλαξη JAK 2 V617F. Αναλυτικά, η μετάλλαξη βρέθηκε στους 18 από τους 29 ασθενείς με ΑΠ (ποσοστό 62%), στους 30 από τους 67 ασθενείς με ΙΘ (ποσοστό 45%) και στους 6 από τους 10 ασθενείς με ΙΜ (ποσοστό 60%). Δεν ανιχνεύθηκε η V617F κανέναν από τους 6 ασθενείς με ΧΜΜΛ που μελετήθηκαν. Τα ποσοστά εμφάνισης της μετάλλαξης στην ΑΠ, στην ΙΘ και την ΙΜ είναι παρόμοια με αυτά της διεθνούς βιβλιογραφίας.

Η μελέτη επίσης έδειξε την απουσία της μετάλλαξης σε άτομα ή συγγενείς τους με οικογενή πολυερυθραιμία.

Ποσοστό 22% των ασθενών με ΑΠ βρέθηκε να είναι ομοζύγοι ως προς την V617F μετάλλαξη, στοιχείο που επιβεβαιώνεται από τις τρέχουσες δημοσιεύσεις. Αντίθετα, σε ασθενείς με ΙΘ και ΙΜ δεν ανιχνεύθηκε ομοζυγωτία για τη μετάλλαξη.

Η παρουσία της μετάλλαξης παίζει πολύ σημαντικό ρόλο στην εργαστηριακή εικόνα και στον φαινότυπο των ασθενών. Στους ασθενείς με ΑΠ, η JAK 2 V617F οδηγεί σε στατιστικά σημαντικό βαθμό θρομβοκυττάρωσης σε σύγκριση με τους μη μεταλλαγμένους ασθενείς. Η εμφάνιση μεγαλύτερου αριθμού αιμοπεταλίων στους JAK 2 V617F θετικούς ασθενείς με ΑΠ δείχνει ότι η μετάλλαξη κινητοποιεί όλες τις προγονικές σειρές των κυττάρων του αίματος, με αποτέλεσμα την πιο διαταραγμένη εργαστηριακή εικόνα. Η επιβάρυνση αυτή αντικατοπτρίζεται και σε κλινικό επίπεδο, καθώς στους ασθενείς αυτούς η συχνότητα εμφάνισης θρομβωτικών και αιμορραγικών επεισοδίων είναι μεγαλύτερη σε σύγκριση με τους αρνητικούς για τη μετάλλαξη ασθενείς, σε βαθμό στατιστικά σημαντικό.

Τα θρομβωτικά επεισόδια αποτελούν το κύριο σύμπτωμα των νοσημάτων, και ανευρίσκονται σε ποσοστό 12-39% των ασθενών που στη συνέχεια διαγιγνώσκονται ότι πάσχουν από ΑΠ και ΙΘ. Ακόμα μεγαλύτερο ποσοστό ασθενών παρουσιάζουν μία επιπλοκή θρόμβωσης μετά τη διάγνωση (20). Τα θρομβωτικά επεισόδια μαζί με τη μετάπτωση σε οξεία λευχαιμία είναι οι κυριότεροι παράγοντες θνησιμότητας και θνητότητας στους ασθενείς αυτούς (31,32). Μία πρόσφατη μελέτη έδειξε ότι η συνολική έκφραση της JAK 2 κινάσης, είτε ο άγριος-μη μεταλλαγμένο τύπος της, είτε ο μεταλλαγμένος V617F, ήταν αυξημένος σε όλους τους ασθενείς με κοιλιακή φλεβική θρόμβωση. Αυτό δείχνει είτε ότι η JAK 2 υπερεκφράζεται στις κοιλιακές φλεβικές θρομβώσεις, είτε ότι η υπερέκφραση της JAK 2 μπορεί να παίζει έναν ανεξάρτητο και σημαντικό αιτιολογικό παράγοντα στις επιπλοκές αυτές (132).



Η παρουσία της σπληνομεγαλίας σε μεγαλύτερη συχνότητα σε ασθενείς με I^Θ που είναι θετικοί στη μετάλλαξη JAK 2 V617F δείχνει ότι η διαταραχή αυτή συνδέεται με βαρύτερη κλινική εικόνα στους ασθενείς αυτούς.

Θεραπευτικά, παρατηρήσαμε ότι σε έναν ασθενή με ΑΠ η χορήγηση ιντερφερόνης προκάλεσε την μετατροπή του φορτίου της V617F από ομόζυγο σε ετερόζυγο, με την επανεμφάνιση του μη μεταλλαγμένου, άγριου τύπου της JAK 2.



ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η ερυθροποιητίνη είναι μία κυτταροκίνη που παίζει σημαντικό ρόλο στην παραγωγή και απόπτωση των ερυθρών αιμοσφαιρίων. Η Epo δρα μέσω των υποδοχέων της που εκφράζονται κυρίως στα πρόδρομα κύτταρα της ερυθράς σειράς CFU-E, αλλά και σε κύτταρα του ΚΝΣ και της καρδιάς.

Η δράση της Epo και του Epo-R γίνεται μέσω της οδού JAK-STAT κατά την οποία το μήνυμα φτάνει τελικά στον πυρήνα του κυττάρου. Εκεί επιδρά στο γονίδιο bcl-x, που επηρεάζει την απόπτωση των κυττάρων της ερυθράς σειράς.

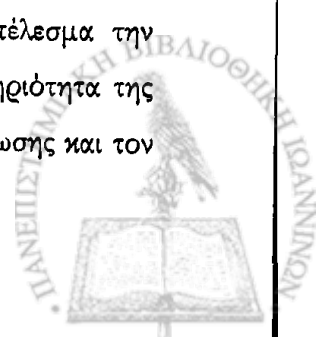
Σήμερα γνωρίζουμε ότι στην παθογένεια των ΜΥΣ που είναι αρνητικά στο bcr/abl, η ΑΠ, η ΙΘ και η ΙΜ, όπως και η οικογενής πολυερυθραιμία παίζει σημαντικό ρόλο η επίδραση της Epo, του Epo-R και της JAK 2 κινάσης.

Η οικογενής πολυερυθραιμία αποτελεί μία μορφή πρωτοπαθούς πολυερυθραιμίας. Διαφέρει από την ΑΠ τόσο μοριακά, όσο και εργαστηριακά και κλινικά. Θεωρείται ότι η παθογένειά της οφείλεται κατά μεγάλο μέρος στις μεταλλάξεις του Epo-R. Αυτές οδηγούν σε υπέρμετρη παραγωγή της ερυθράς σειράς και με την αντίστοιχη κλινική συμπτωματολογία.

Μέχρι σήμερα έχουν αναφερθεί 13 μεταλλάξεις του Epo-R, από τις οποίες οι 10 σχετίζονται άμεσα με την οικογενή πολυερυθραιμία. Εμείς προσπαθήσαμε να ανιχνεύσουμε μεταλλάξεις του Epo-R σε μέλη και συγγενείς οικογενειών με διαγνωστικά κριτήρια οικογενούς πολυερυθραιμίας, χωρίς όμως να έχουμε κάποιο θετικό αποτέλεσμα.

Η μοριακή δράση της Epo γίνεται μέσω του Epo-R και της JAK 2 κινάσης και προς την κατεύθυνση αυτή, και με βάση τη διεθνή βιβλιογραφία, ερευνήσαμε τους ασθενείς μας που έπασχαν από οικογενή πολυερυθραιμία και ΜΥΣ ως προς την μετάλλαξη JAK 2V617F. Η μετάλλαξη αυτή είναι προϊόν έρευνας των τριών τελευταίων ετών και φαίνεται ότι ρίχνει αρκετό φως στην παθογένεια των bcr/abl αρνητικών ΜΥΣ.

Η V617F συμβαίνει στην περιοχή του cDNA που κωδικοποιεί την ψευδοκινάση (JH2 περιοχή) και συγκεκριμένα στη θέση 1849 έχουμε αντικατάσταση του νουκλεοτιδίου της γουανίνης (G) από τη θυμίνη (T). Αυτή η αλλαγή οδηγεί σε αντικατάσταση του αμινοξέος βαλίνη από τη φαινυλαλανίνη (Val617Phe, V617F), στο JH2 τμήμα του μορίου της JAK 2. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα την αναστολή της δράσης της JAK 2 από το JH2 τμήμα, που οδηγεί σε αυξημένη δραστηριότητα της κινάσης, ακόμα και σε απουσία της Epo, με τελικό αποτέλεσμα την αναστολή της απόπτωσης και τον



αυξημένο πολλαπλασιασμό των πρόδρομων κυττάρων του αίματος. Κάτι αντίστοιχο, δηλαδή με τη βλάβη στη ΧΜΛ, μέσω του γονιδίου *bcr/abl*.

Σήμερα η μετάλλαξη V617F ανευρίσκεται σε ποσοστό μεγαλύτερο του 95% στην ΑΠ, και σε ποσοστό περίπου 50% στην ΙΘ και την ΙΜ. Πιθανολογείται ότι η παρουσία της μετάλλαξης στα ΜΥΣ επηρεάζει την κλινική εικόνα της ΑΠ και της ΙΘ, κυρίως όσον αφορά στα επεισόδια θρομβώσεων και αιμορραγιών, όπως και την μετάπτωση σε ΙΜ και οξεία Λευχαιμία.

Στην παρούσα εργασία δεν ανιχνεύθηκε η JAK 2 V617F στην οικογενή πολυερυθραιμία. Στα ΜΥΣ βρέθηκε μετάλλαξη σε ποσοστά 62% για την ΑΠ, 45% για την ΙΘ και 60% για την ΙΜ. Επιπλέον, βρέθηκε στατιστικά σημαντική θετική συσχέτιση του αριθμού των αιμοπεταλίων και της παρουσίας της V617F στους ασθενείς με ΑΠ. Στους ίδιους ασθενείς με την εμφάνιση θρομβωτικών και αιμορραγικών επεισοδίων βρέθηκε θετική συσχέτιση με την μετάλλαξη.

Η διαπίστωση ότι οι ασθενείς με ΑΠ βρέθηκε να είναι ομοζύγοι ως προς την V617F ποσοστό 22% για τη μετάλλαξη, στοιχείο που επιβεβαιώνεται από τις τρέχουσες δημοσιεύσεις, δείχνει τη δράση του μιτωτικού ανασυνδιασμού του DNA και την ύπαρξη υποκλώνων μεταλλαγμένων κυττάρων. Αντίθετα, σε ασθενείς με ΙΘ και ΙΜ δεν ανιχνεύθηκε ομοζυγωτία για τη μετάλλαξη.

Η μετατροπή της ομόζυγης μορφής V617F μετάλλαξης σε ετερόζυγη, σε ασθενή με ΑΠ, μετά από χορήγηση ιντερφερόνης, δείχνει τη σημαντική δράση του φαρμάκου στα ΜΥΣ, αλλά και τη δυνατότητα που υπάρχει για θεραπευτική προσέγγιση της νόσου. Σήμερα γίνεται προσπάθεια θεραπείας των ΜΥΣ μέσω αναστολής της δράσης της JAK 2 κινάσης αλλά ακόμα η έρευνα βρίσκεται σε αρχικά στάδια.

Τελικά φαίνεται ότι η JAK 2 κινάση ανοίγει νέους δρόμους όσον αφορά στην κατανόηση της παθογένειας των ΜΥΣ, την διάγνωση, την ταξινόμηση, την πρόγνωση και την ανταπόκριση στη θεραπεία με τα υπάρχοντα φάρμακα αλλά και τη δημιουργία νέων σκευασμάτων, που στόχο θα έχουν την αναστολή της δράσης της JAK 2 κινάσης, την καλύτερη πρόγνωση και φυσική πορεία των νοσημάτων αυτών και, ίσως, μελλοντικά την πλήρη ίασή τους.



SUMMARY

Erythropoietin is a cytokine that plays a crucial role in the production and apoptosis of the red cell lineage. Erythropoietin acts through the erythropoietin receptors which are mainly sited at the CFU-E red cell progenitors, as well as at the BFU-E red cell progenitors, the CNS cells and the cardiac cells.

After the connection of Epo with Epo-R, Epo's message is transduced through the JAK 2 kinase and STAT 5 molecules. The signal is transmitted into the nuclear, and affects the activity of the bcl-x gene, an inhibitor of apoptosis of the red cell series.

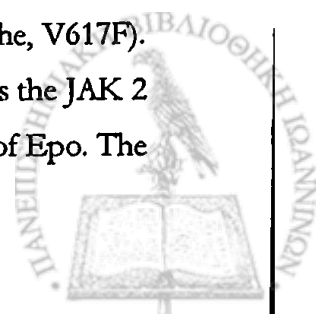
Today, it is widely known that Polycythemia Vera, Idiopathic Thrombocytosis and Idiopathic Myelofibrosis, which are the bcr/abl negative MDS, is seriously influenced by Epo, Epo-R and JAK 2 kinase.

Familial and Congenital Polycythemia is one of the types of Primary Erythrocytosis. It has several different molecular, laboratory and clinical parameter in comparison with Polycythemia Vera. We know that the pathogenesis of the disease is caused partly by the mutations on the Epo-R. It is thought that these mutations lead to elevated proliferation of the red cell progenitors and to the characteristic clinical presentation.

Until today, 13 mutations of the Epo-R have been described, from which, 10 are directly connected with the pathogenesis of Familial Polycythemia. In this study, we tried to trace any of Epo-R mutations in Greek members with diagnostic criteria for the disease and their first degree relatives. Unfortunately we did not succeed in discovering any of those mutations.

As the Epo's molecular activity is performed through the Epo-R and the JAK 2 kinase, and guided by the international literature, we investigated our patients suffering from both MDS and Familial Polycythemia, in terms of the presentation of the JAK 2 V617F mutation. In 2005 this mutation was detected in the majority of patients with PV and in half patients with IT and IM and seems to be the key for the pathogenesis of the bcr/abl negative MPDs.

The V617F mutation takes place in the in the cDNA area that codes the pseudokinase (JH2 homologue domain) of the JAK 2 molecule. In the 1849 position there is a substitution of the nucleoside guanine (G) to thymine (T). This change leads to the substitution of the amino acid valine to phenylalanine in the position 617 in JH2 domain of JAK 2 molecule (Val617Phe, V617F). This mutation leads to downregulation of action of JH2 domain, which normally inhibits the JAK 2 kinase activity. In such a case, increased kinase activity is observed even in the absence of Epo. The



final result is the inhibition of apoptosis and the proliferation of the blood cell precursors, more or less the same disorder that happens in CML, by the action of bcr/abl.

Today, the JAK 2 V617F mutation is detected in more than 95% of the PV patients and in almost half of the IT and IM patients. It is widely suspected that the presence of the mutation affects the clinical manifestations of the PV and IT, mainly expressed by the high incidence of thrombotic and hemorrhagic episodes, as well as the transition to IM and acute Leukemia.

In this study we did not detect any mutation of JAK 2 V617F in the familial polycythemia patients. Besides, the mutation was found in 62% of PV patients, in 45% of IT patients and in 60% for IM patients. Furthermore, we noticed a significant positive statistical connection between the number of platelets and the presence of V617F in PV patients. The same patients expressed positive correlation in the coincidence of thrombotic and hemorrhagic episodes and the presence of V617F mutation.

The finding of homozygosity of JAK 2 V617F in 22% of PV patients, which is conformed by multiple references, reveals the activity of the mitotic recombination of DNA and the presence of mutant subclones. On the other hand, there were no homozygous IT and IM patients.

The transformation of homozygous form of V617F into heterozygous, in a single PV patient, after the use of interferon, reveals the therapeutic action of this molecule in the MDS and the possibility of high molecular and clinical response after treatment. There are some attempts of management of MPDs, through the inhibition of JAK 2 kinase activity, but we are still at beginning of our efforts.

Finally, it is sure that JAK 2 kinase is probably the key molecule in discovering and understanding the molecular pathogenesis of MPDs. It is more than helpful in achieving diagnosis, prognosis and therapeutic response of MPDs. Now we have the opportunity to reach a therapeutic management of the diseases using the current therapies, or discovering new regimens that change the natural history and prognosis of MPDs.



Polycythemia vera

Essential thrombocythemia

Current (must meet 2 "A" criteria plus either one "B" or 2 "C")

- A. Elevated red cell mass or 25% above normal predicted value
- B. Hemoglobin > 18.5 g/dL in men > 16.5 g/dL in women
- C. Hematocrit > 54% in men > 51% in women

Proposed (first major; 2 minor or 2 major/3 minor)

- Major criteria:
 - Hb > 18.5 g/dL (men)
 - Hb > 16.5 g/dL (women)
 - Presence of JAK2V617F or other MPD JAK2 mutation
- Minor criteria:
 - PF bone marrow changes
 - Low serum erythropoietin level
 - Essential thrombocythemia colony formation in vitro

Current (both positive, or negative)

- Sustained PLS > 450 x 10⁹/L
- ET bone marrow changes

Proposed (must meet all criteria)

- Sustained PLS > 450 x 10⁹/L
- ET bone marrow changes
- Clonal marker: JAK2V617F
- Other clonal marker

Not consistent with myeloproliferative neoplasia

- A. Splenomegaly
- B. Clonal aberrations - non BCR-ABL
- C. Endogenous erythropoietin colony formation in vitro
- D. Thrombocytosis > 400 x 10⁹/L
- E. Leukocytosis > 12 x 10⁹/L
- F. PV bone marrow changes
- G. Sustained erythropoietin level

Not consistent with myeloproliferative neoplasia

- A. Evidence of reactive erythrocytosis
- B. Evidence of reactive thrombocytosis
- C. High degree of clonal heterogeneity
- D. Truncated erythropoietin receptor
- E. Inappropriate erythropoietin production by tumor

Current (all major; 2 minor)

- Major criteria:
 - PMF bone marrow changes
 - Clonal marker: JAK2V617F, MPL, MPLW515L
 - Other clonal marker
- Minor criteria:
 - Leukocytosis
 - Thrombocytosis > 400 x 10⁹/L
 - Aplasia
 - Splenomegaly

Proposed (all major; 2 minor)

- Major criteria:
 - PMF bone marrow changes
 - Clonal marker: JAK2V617F, MPL, MPLW515L
 - Other clonal marker
- Minor criteria:
 - Leukocytosis
 - Thrombocytosis > 400 x 10⁹/L
 - Aplasia
 - Splenomegaly

Current (all major; 2 minor)

- Major criteria:
 - PMF bone marrow changes
 - Clonal marker: JAK2V617F, MPL, MPLW515L
 - Other clonal marker
- Minor criteria:
 - Leukocytosis
 - Thrombocytosis > 400 x 10⁹/L
 - Aplasia
 - Splenomegaly

Proposed (all major; 2 minor)

- Major criteria:
 - PMF bone marrow changes
 - Clonal marker: JAK2V617F, MPL, MPLW515L
 - Other clonal marker
- Minor criteria:
 - Leukocytosis
 - Thrombocytosis > 400 x 10⁹/L
 - Aplasia
 - Splenomegaly

Primary myelofibrosis

Current (all major; 2 minor)

- Major criteria:
 - PMF bone marrow changes
 - Clonal marker: JAK2V617F, MPL, MPLW515L
 - Other clonal marker
- Minor criteria:
 - Leukocytosis
 - Thrombocytosis > 400 x 10⁹/L
 - Aplasia
 - Splenomegaly

Proposed (all major; 2 minor)

- Major criteria:
 - PMF bone marrow changes
 - Clonal marker: JAK2V617F, MPL, MPLW515L
 - Other clonal marker
- Minor criteria:
 - Leukocytosis
 - Thrombocytosis > 400 x 10⁹/L
 - Aplasia
 - Splenomegaly

Current (all major; 2 minor)

- Major criteria:
 - PMF bone marrow changes
 - Clonal marker: JAK2V617F, MPL, MPLW515L
 - Other clonal marker
- Minor criteria:
 - Leukocytosis
 - Thrombocytosis > 400 x 10⁹/L
 - Aplasia
 - Splenomegaly

Proposed (all major; 2 minor)

- Major criteria:
 - PMF bone marrow changes
 - Clonal marker: JAK2V617F, MPL, MPLW515L
 - Other clonal marker
- Minor criteria:
 - Leukocytosis
 - Thrombocytosis > 400 x 10⁹/L
 - Aplasia
 - Splenomegaly

Current (all major; 2 minor)

- Major criteria:
 - PMF bone marrow changes
 - Clonal marker: JAK2V617F, MPL, MPLW515L
 - Other clonal marker
- Minor criteria:
 - Leukocytosis
 - Thrombocytosis > 400 x 10⁹/L
 - Aplasia
 - Splenomegaly

Proposed (all major; 2 minor)

- Major criteria:
 - PMF bone marrow changes
 - Clonal marker: JAK2V617F, MPL, MPLW515L
 - Other clonal marker
- Minor criteria:
 - Leukocytosis
 - Thrombocytosis > 400 x 10⁹/L
 - Aplasia
 - Splenomegaly

are current [9] and proposed [10] World Health Organization (WHO) diagnostic criteria for the myeloproliferative disorders of polycythemia vera (PV), essential thrombocythemia (ET), and primary myelofibrosis (PMF). CML, chronic myeloid leukemia; ET, essential thrombocythemia; Hb, hemoglobin; JAK, Janus kinase; LDH, lactate dehydrogenase; MDS, myelodysplastic syndrome; MPD, myeloproliferative disorder; pO₂, partial pressure of oxygen.



Νέα διαγνωστικά κριτήρια για τα ΜΥΣ

Αληθής Πολυερυθραιμία

Το πρώτο κύριο και δύο ελάχισσα κριτήρια ή τα δύο κύρια και ένα ελάχισσα κριτήριο

Μείζονα κριτήρια

- Hb > 18,5 g/dl (άνδρες)
- Hb > 16,5% (γυναίκες)
ή αυξημένη μάζα ερυθρών
- Παρουσία της μετάλλαξης JAK 2 V617F ή άλλης μετάλλαξης της JAK 2

Ελάχισσα κριτήρια

- Εικόνα Αληθούς Πολυερυθραιμίας στο Μυελό
- Χαμηλά επίπεδα Epo στον ορό
- Ενδογενής ανάπτυξη κυττάρων της ερυθράς σειράς in vitro

Ιδιοπαθής Θρομβοκυττάρωση

Παρουσία όλων των κριτηρίων

- Αιμοπετάλια $> 450 \times 10^9/l$
- Εικόνα Ιδιοπαθούς Θρομβοκυττάρωσης στο Μυελό
- Παρουσία της μετάλλαξης JAK 2 V617F ή άλλης μετάλλαξης της JAK

Κριτήρια αποκλεισμού

- Αποκλεισμός κριτηρίων WHO για:
ΑΠ
ΠΜ
ΧΜΛ
ΜΔΣ
- Σε απουσία της μετάλλαξης JAK 2 V617F, να μην υπάρχει ένδειξη αντιδραστικής θρομβοκυττάρωσης



Ιδιοπαθής Μυελοϊνωση

Όλα τα μείζονα, δύο ελάσσονα

Μείζονα κριτήρια

- Εικόνα Ιδιοπαθούς Μυελοϊνωσης στο Μυελό
- Παρουσία μεταλλάξεων
JAK 2 V617F
MPL W515L/K
Άλλες μεταλλάξεις

Ελάσσονα κριτήρια

- Παρουσία λευκοερυθροβλάστωσης
- Αυξημένη LDH
- Αναιμία
- Σπληνομεγαλία
- Απουσία κριτηρίων WHO για:
ΑΠ
ΙΘ
ΜΔΣ
Άλλα ΜΥΣ
- Σε απουσία JAK 2 V617F ή άλλης μετάλλαξης, να μην υπάρχει ένδειξη αντιδραστικής μυελοϊνωσης

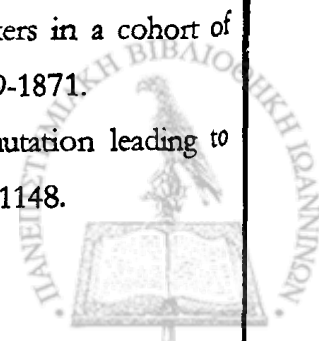


Βιβλιογραφία

1. Gordeuk Victor R, Stockton David W, Prchal Josef T, et al: Congenital polycythemias/erythrocytosis. *Haematologica* 2005, 90: 109-116.
2. Emanuel PD, Eaves CJ, Broudy VC, et al: Familiar and congenital polycythemia in three unrelated families. *Blood* 1992, 79: 3019-3030.
3. Prchal JT: Pathogenetic mechanisms of polycythemia vera and congenital polycythemia disorders. *Semin Hematol.* 2001, 38: 10-20.
4. Cario H: Childhood polycythemias/erythrocytosis: classification, diagnosis, clinical presentation and treatment. *Ann Hematol.* 2005, 84: 137-145.
5. K. Borson Petersen, P. Hockland: Erythropoietin receptor defect: a cause of primary polycythemia. *Brit. J. Haem.* 2004, 125: 537-539.
6. Prchal JT, Crist WM, Goldwasser E, et al: Autosomal dominant polycythemia. *Blood* 1985, 66: 1208-1214.
7. Juvonen E, Ikkala E, Fyhrquist F, et al: Autosomal dominant erythrocytosis causes by increased sensitivity to erythropoietin. *Blood* 1991, 78: 3066-3069.
8. Μπουραντάς Κων. Α: Μαθήματα Αιματολογίας, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων, Ιατρική Σχολή, Ιωάννινα, 2006.
9. Dameshek, W: Some speculations on the myeloproliferative syndrome. *Blood* 1951, 6: 372-375.
10. Nelson M and Steensma D. JAK2 V617F in myeloid disorders: what do we know now, and where are we headed? *Leuk Lymph.* 2006, 47; 2: 177-194.
11. Campell PJ, Green AR: The Myeloproliferative Disorders, Review Article, Mechanisms of Disease, *N. Engl. J. Med* 2006, 355; 23: 2452-2466.
12. Tumors of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. World Health Organisation Classification of Tumors. Lyon, 2001.
13. Goldman JM, Melo JV: Chronic myeloid leukemia – advances in biology and new approaches to treatment. *N. Engl. J. Med.* 2003, 349: 1451-64.
14. Kaushansky K: On the molecular basis of the chronic myeloproliferative disorders: it all makes sense. *Blood* 2005, 105: 4187-4190.
15. Fialkow PJ, Singer JW, Sacher RAW, et al: Philadelphia chromosome (Ph 1)-negative chronic myelogenous leukaemia (CML): is a clonal disease with origin in a multipotent stem cell. *Blood* 1980, 56: 70-73.



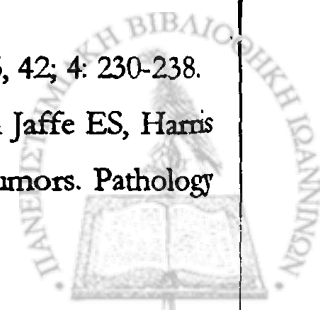
16. Adamson JW, Fialkow PJ, Murphy, SE, et al: Polycythemia vera: stem-cell and probable clonal origin of the disease. *N. Engl. J. Med.* 1976, 295: 913-916.
17. Fialkow PJ, Faguet GB, Jacobson RJ, et al: Evidence that essential thrombocythemia is a clonal disorder with origin in a multipotent stem cell. *Blood*, 1981, 58: 916-919.
18. James C, Ugo V, Casadevall N, et al: A JAK 2 mutation in myeloproliferative disorders: pathogenesis and therapeutic and scientific prospects. *Tr. in Mol. Med.* 2005, 11; 12: 546-554.
19. Marchioli et al: Vascular and neoplastic risk in a large cohort of patients with polycythemia vera. *J. Clin. Oncol.* 2005, 139: 470-475.
20. Tefferi A, Spivak JL: Polycythemia Vera: Scientific advantages and current practice. *Sem Hematol.* 2005, 42; 4: 206-220.
21. Vasquez MH: Su rone forme speciale de cyanose s' acompagnant d' hyperglobulie excessive et persistante. *CR Soc Biol (Paris).* 1892, 44: 384-388.
22. Osler W: Chronic cyanosis, with polycythemia and enlarged spleen: A new clinical entity. *Am J Med Sci.* 1903, 126: 187-201.
23. Prchal JF, Axelrad AA: Bone marrow responses in polycythemia vera. *N Engl J Med.* 1974, 352: 1779-1790.
24. Silverstein MN, Lanier AP: Polycythemia vera, 1935-1969: an epidemiologic survey in Rochester, Minnesota. *Mayo Clin Proc.* 1971, 46: 751-753.
25. Najean Y, Mugnier P, Dresch C, et al: Polycythemia vera in young people: an analysis of 58 cases diagnosed before 40 years. 1987, 67: 285-291.
26. Najfeld V, Montella L, Scalise A, et al: Exploring polycythemia vera with fluorescence in situ hybridization: Additional cryptic 9p is the most frequent abnormality detected. *Br J Haematol.* 2002, 119: 558-566.
27. Gribble SM, Reid AG, Bench AJ: Molecular cytogenesis of polycythemia vera: Lack of occult rearrangements detectable by 20qLSP screening, CGH and M-FISH. *Leukemia.* 2003, 17: 1419-1421.
28. Bench AJ, Cross NC, Huntly BJ, et al: Myeloproliferative disorders. *Bailliers Best Pract Clin Haematol.* 2001, 14: 531-551.
29. Kralovics R, Buser AS, Teo SS, et al: Comparison of molecular markers in a cohort of patients with chronic myeloproliferative disorders. *Blood* 2005, 102: 1869-1871.
30. James C, Ugo JC, Le Couedic JP, et al: A unique clonal JAK 2 mutation leading to constitutive signaling causes polycythemia vera. *Nature.* 2005, 434: 1144-1148.



31. Baxter EJ, Scott LM, Campbell PJ, et al: Acquired mutation of the tyrosine kinase JAK2 in human myeloproliferative disorders. *Lancet* 2005, 365:1054-61.
32. Levine RL, Wadleigh M, Coombs J, et al: Activating mutation in the tyrosine kinase JAK2 in polycythemia vera, essential thrombocythemia, and myeloid metaplasia with myelofibrosis. *Cancer Cell* 2005, 7:387-97.
33. Kralovics R, Passamonti F, Buser AS, et al: A gain-of- JAK2 in myeloproliferative disorders. *N Engl J Med* 2005, 352:1779-90.
34. Bilgrami S, Greenberg BR: Polycythemia rubra vera. *Semin Oncol.* 1995, 22; 307-326.
35. Valla D, Casadevall N, Huisse MG, et al: Etiology of portal vein thrombosis in adults. A prospective evaluation of primary myeloproliferative disorders. *Gastroenterology.* 1998, 94: 1063-1069.
36. Lamy T, Devilles A, Bernard M: Inapparent polycythemia vera- An unrecognized diagnosis. *Am J Med.* 1997, 102: 14-20.
37. Orlandi E, Castelli G, Brusamolino E, et al: Hemorrhagic and thrombotic complications in polycythemia vera. A clinical study. *Haematologica.* 1989, 74: 45-49.
38. Tefferi A: The diagnosis of polycythemia vera: new tests and old dictums. *Best Pract Res Clin Haematol* 2006, 19: 455-469.
39. Barbui T, Finazzi G: Evidence-based management of polycythemia vera. *Best Pract Res Clin Haematol.* 2006, 19: 483-493.
40. Elliot MA, Tefferi A: Thrombosis and haemorrhage in polycythemia vera and essential thrombocythemia. *Br J Haematol.* 2005, 52: 285-288.
41. Tefferi A: Hydroxyurea vindicated: lack of drug leukemogenicity in polycythemia vera. *Curr Hematol Rep.* 2005, 4: 211-212.
42. Quintas-Cardama A, Kantarjian HM, Giles F, et al: Pegylated interferon therapy for patients with Philadelphia chromosome-negative myeloproliferative disorders. *Semin Throm Hemost.* 2006, 32: 409-416.
43. Kiladjian JJ, Cassinat B, Turlure P, et al: High molecular response rate of polycythemia vera patients treated with pegylated interferon alpha-2a. *Blood* 2006, 108: 2037-2040.
44. Jones AV, Silver RT, Waghon K, et al: Minimal molecular response in polycythemia vera patients treated with imatinib or with interferon alpha. *Blood* 2006, 107: 3339-3341.
45. Samuelson J, Mutschler M, Birgegard G, et al: Limited effects on JAK 2 mutational status after pegylated interferon a-2b in polycythemia vera and essential thrombocythemia. *Haematologica* 2006, 91: 1281-1282.



46. Mesa RA, Silverstein MN, Jacobsen SJ, et al: Population-based incidence and survival figures in essential thrombocythemia and angiogenic myeloid metaplasia: an Olmsted County Study, 1976-1995. *Am J Hematol.* 1999, 61; 10-15.
47. McIntyre KJ, Hoagland HC, Silverstein MN, et al: Essential thrombocythemia in young adults. *Mayo Clin Proc.* 1991, 66; 149-154.
48. Randi ML, Putti MC, Fabris F, et al: Features of essential thrombocythemia in childhood: a study of five children. *Br J Hematol.* 2000, 108: 86-89.
49. Temerinac S, Kippel S, Strunck E, et al: Cloning of PRV-1 a novel member of the uPAR reseptor superfamily, which is overexpressed in polycythemia rubra vera. *Blood* 2000, 95: 2569-2576.
50. Messinezy M, Westwood NB, El-Hemaidi I: Serum erythropoietin values in erythrocytes and in primary thrombocythemia. *Br J Hematol.* 2002, 117: 47-53.
51. Tefferi A, Guilliland DG: The JAK2V617F tyrosine kinase mutation in myeloproliferative disorders: status report and immediate implications for disease classification and diagnosis. *Mayo Clin Proc.* 2005, 80: 947-958.
52. Kralovics R, Teo SS, Buser AS: Altered gene expression in myeloproliferative disorders correlate with activation of signaling by the V617F mutation of JAK 2. *Blood* 2005, 106; 3374-3376.
53. Murphy S, Iland H, Rosenthal D, et al: Essential thrombocythemia: an interim report from the Polycythemia vera Study Group. *Semin Hematol.* 1986, 23: 177-182.
54. Van Genderen PJ, Michiels JJ: Erythromelalgic, thrombotic and hemorrhagic manifestations of thrombocythemia. *Presse Med.* 1994, 23: 73-77.
55. Peterson TC: Primary thrombocythemia: diagnosis and management. *Br J Haematol.* 1991, 145-148.
56. Wolf BC, Neiman RS: Essential thrombocythemia in: Disorders of the spleen. W.B. Saunders Company. Philadelphia 1989, pp. 173-174.
57. Rozman C, Giralt M, Feliu E, et al: Life expectancy of patients with chronic nonleukemic myeloproliferative disorders. *Cancer* 1991, 67: 2658-2663.
58. Wolanskyj AP, Segovis CM, Schwager SM, et al: Essential thrombocythemia: beyond the first decade. *Blood* 2003, 102: 920.
59. Finazzi G, Harrison C: Essential Thrombocythemia. *Semin Hematol.* 2005, 42; 4: 230-238.
60. Thiele J, Pierre R, Imbert M, et al: Chronic idiopathic myelofibrosis, in Jaffe ES, Harris NL, Stein H et al (eds). *World Health Organisation Classification of Tumors. Pathology*

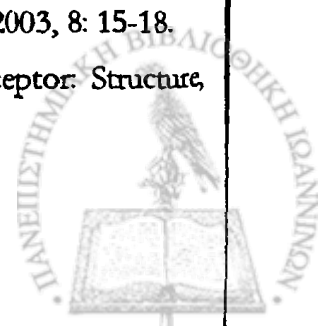


and Genetics of Tumors of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Lyon, France. IARC Press 2001 pp35-38.

61. Heuck G: Two cases of leukemia with peculiar blood and bone marrow findings, respectively [in German]. *Arch Pathol Anat Physiol Virchows* 1879, 78: 475-496.
62. Jacobson RJ, Salo A, Fialkow PJ: Angogenic myeloid metaplasia: a clonal proliferation of hematopoietic stem cells with secondary myelofibrosis. *Blood* 1978, 51: 189-194.
63. Cervantes F, Barosi G, Hernades-Boluda JC. et al: Myelofibrosis with myeloid metaplasia in adult individuals 30 years old or younger: presenting features, evolution and survival. *Eur J Haematol.* 2001, 109: 459-462.
64. Altura RA, Head DR, Wang WC: Long-term survival of infants with idiopathic myelofibrosis. *Br J Haematol.* 2000, 109: 459-462.
65. Anderson RE, Hoshino T, Yamamoto T: Myelofibrosis with myeloid metaplasia in survivors of the atomic bomb in Hiroshima. *Ann Inter Med.* 1964, 1: 1-17.
66. Hu H: Benzene-associated myelofibrosis. *Ann Inter Med.* 1987, 106: 171-172.
67. Lucas GS, Padua RA, Masters GS, et al: The application of X-chromosome gene probes to the diagnosis of myeloproliferative disease. *Br J Haematol.* 1989, 72: 530-533.
68. Tefferi A, Mesa RA, Schroeder G, et al: Cytogenetic findings and their clinical relevance in myelofibrosis with myeloid metaplasia. *Br J Haematol.* 2001, 113: 763-771.
69. Dingli D, Grand FH, Mahaffey V, et al: Der(6)t(1;6)(q21-23;p21-23): a specific cytogenetic abnormality in myelofibrosis with myeloid metaplasia. *Br J Haematol.* 2005, 130: 229-232.
70. Al-Assar O, Ul-Hassan A, Brown R, et al: Gains on 9p are common genomic aberrations in idiopathic myelofibrosis: A comparative genomic hybridisation study. *Br J Haematol.* 2005, 129: 66-71.
71. Komura E, Tonetti C, Penard-Lacronique V, et al: Role for the nuclear factor kappa B pathway in transforming growth factor-beta 1 production in idiopathic myelofibrosis; possible relationship with FK506 binding protein 51 overexpression. *Cancer Res.* 2005, 65: 3281-3289.
72. Pardanani AD, Levine RL, Lasho T, et al: MPL515 mutations in myeloproliferative and other disorders: a study of 1182 patients. *Blood* 2006.
73. Lasho T, Pardanani A, McClure R, et al: Concurrent MPL515 and JAK2V617F mutations in myelofibrosis: chronology of clonal emergence and changes in mutant allele burden over time. *Br J Haematol.* 2006, 135: 683-987.



74. Schmitt A, Jouault H, Guichard J, et al: Pathologic interaction between megakaryocytes and polymorphonuclear leukocytes in myelofibrosis. *Blood* 2000, 96: 1342-1347.
75. Xu M, Bruno E, Chao J, et al: Constitutive mobilization of CD34+ cells into the peripheral blood in idiopathic myelofibrosis may be due to the action of a number of proteases. *Blood* 2005, 105; 4508-4515.
76. Cervantes F, Pereira A, Esteve J, et al: The changing profile of idiopathic myelofibrosis: a comparison of the presenting features of patients diagnosed in two different decades. *Eur J Haematol.* 1998, 60: 101-105.
77. Dickstein JI, Vardiman JW: Hematopathologic findings in the myeloproliferative disorders. *Semin Oncol.* 1995, 22: 355-373.
78. Tefferi A: Myelofibrosis with myeloid metaplasia. Review article. *N Engl J Med.* 2000, 342: 17: 1255-1265.
79. Barosi G, Gazzoli M, Frassoni F: Erythropoiesis in myelofibrosis with myeloid metaplasia: Recognition of different classes of patients by erythrokinetics. *Br J Haematol.* 1981, 48: 263.
80. Thiele J, Kvasnicka HM, Werden C: Idiopathic primary osteomyelofibrosis. *Leuk Lymphoma.* 1996, 22: 303-308.
81. Tefferi A: New insights into the pathogenesis and rug treatment of myelofibrosis. *Curr Opin Hematol.* 2006, 13: 87-92.
82. Cervantes F, Alvarez-Larran A, Hernandez-Boluda JC: Erythropoietin treatment of the anaemia of myelofibrosis with myeloid metaplasia: results in 20 patients and review of the literature. *Br J Haematol.* 2004, 127:399-403.
83. Barosi G, Hoffman R: Idiopathic myelofibrosis. *Sem Hematol.* 2005, 42; 4: 248-258.
84. Lofvenberg E, Wahlin A, Ross G, Ost A: Reversal of myelofibrosis by hydroxyurea. *Eur J Haematol.* 1991, 77: 883-889.
85. Hasselbach HC, Bjerrum OW, Jensen BA, et al: Imatinib mesylate in idiopathic and postpolycythemic myelofibrosis. *Am J Haematol.* 2003, 74: 238-242.
86. Tibbrook P, Klinken SP: The erythropoietin receptor. *Inter J Biochem Cell Biol.* 1999 31: 1001-1005.
87. Lappin T: The Cellular Biology of Erythropoietin Receptors. *The Oncol.* 2003, 8: 15-18.
88. Constantinescu SN, Ghaffari S and Lodish H: The Erythropoietin Receptor: Structure, Activation and Intracellular Signal Transduction. *TEM.* 1999, 1; 10: 18-23.



89. Youssoufian H, Longmore G, Neumann D, et al: Structure, function, and activation of the Erythropoietin Receptor. *Blood* 1993, 81; 9: 2223-2236.
90. Kaushansky K: Signal transduction pathways. Lichtman MA, Beutler E, Kipps TJ, Seligsohn U, Kaushansky K and Prchal JT. *Williams Hematology*. Seventh edition. McGraw-Hill Medical. 2006, pp 173-183.
91. D'Andrea AD, Yoshimura A, Youssoufian H, et al: The cytoplasmic receptor contains non-overlapping positive and negative growth-regulatory domains. *Mol. Cell. Biol.* 1991, 11: 1980-1987.
92. Tilbrook P, Bittorf T, Callus B, et al: Regulation of the erythropoietin receptor and involvement of JAK 2 in differentiation of J2E erythroid cells. *Cell Growth Differ.* 1996, 7: 175-181.
93. Witthuhn BA, Quelle FW, Silvennoinen O, Yi T, et al: JAK 2 associates with the erythropoietin receptor and is tyrosine phosphorylated and activated following stimulation with erythropoietin. *Cell.* 1993, 74; 227-236.
94. Chappel D, Tilbrook PA, Bittorf T: Prevention of apoptosis in J2E erythroid cells by erythropoietin: involvement of JAK 2 but not MAP kinases. *Cell Death Differ.* 1996, 4: 105-113.
95. Silva M, Benito A, Sanz C: Erythropoietin can induce the expression of Bcl-x_L through Stat 5 in erythropoietin-dependent progenitor cell lines. *J Biol Chem.* 1999, 274; 22: 22165-22169.
96. Silva M, Richard C, Benito A, et al: Expression of Bcl-x in erythroid precursors from patients with polycythemia vera. *N Engl J Med.* 1998, 338: 564-571.
97. Kralovics R, Prchal J.T: Congenital heterogeneity of primary familial and congenital polycythemia. *Amer. J. Hem.* 2001, 68: 115-121.
98. D' Andrea AD, Yoshimura A, Youssoufian H: The cytoplasmic region of the erythropoietin receptor contains nonoverlapping positive and negative growth regulatory domains. *Mol Cell Biol.* 1991, 11: 1980-1987.
99. Klingmuller U, Lorenz U, Cantley LC: Specific recruitment of SH-PTP1 to the erythropoietin receptor causes inactivation of JAK 2 and termination of proliferative signals. *Cell* 1995, 80; 729-738.
100. Juvonen E, Ikkala E, Fyhrquist F, et al: Autosomal dominant erythrocytosis caused by increased sensitivity to erythropoietin. *Blood* 1991, 78: 3066-3069.



101. Arcasoy MO, Degar BA, Harris KW, et al: Familial erythrocytosis associated with a short deletion in the erythropoietin receptor gene. *Blood* 1997, 89: 4628-4633.
102. Kralovics R, Indrak K, Stopka T: Two new Epo receptor mutations: Truncated Epo receptors are most frequently associated with primary familial and congenital polycythemia. *Blood* 1997, 90: 2057-2060.
103. Watowish SS, Xie X, Klingmuller U: Erythropoietin receptor mutations associated with familial erythrocytosis cause hypersensitivity to erythropoietin in the heterozygous state. *Blood* 1999, 94: 2530-2536.
104. De la Chapel A, Traskelin AL, Juvonen E: Truncated erythropoietin receptor causes dominantly inherited benign human erythrocytosis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1993, 90: 4495-4450.
105. Furukawa T, Narita M, Sakaue M: Primary familial polycythemia associated with a novel point mutation in the erythropoietin receptor. *Br J Haematol*. 1997, 99: 222-235.
106. Kralovics R, Sokol L, Prchal JT: Absence of polycythemia in a child with a unique erythropoietin receptor mutation in a family with autosomal dominant polycythemia. *J Clin Invest*. 1998, 102: 124-130.
107. Arcasoy MO, Harris KW, Forget BG: A human erythropoietin receptor gene mutant causing familial erythrocytosis is associated with deregulation of the rates of JAK 2 and STAT 5 inactivation. *Exp Hematol*. 1999, 27: 63-71.
108. Kralovics R, Prchal JT: Genetic heterogeneity of primary familial and congenital polycythemia. *Am J Hematol*. 2001, 68: 115-123.
109. Sokol L, Luhovy M, Guan Y: Primary familial polycythemia: A frameshift mutation in the erythropoietin receptor gene and increased sensitivity of erythroid progenitors to erythropoietin. *Blood* 1995, 15-22.
110. Kralovics R, Sokol L, Broxson EH, Jr, et al: The erythropoietin receptor gene is not linked with the polycythemia phenotype in a family with autosomal dominant primary polycythemia. *Proc Assoc Am Physicians* 1997, 109: 580-587.
111. Sokol L, Pchal JF, D' Andrea: Mutation in the negative regulatory element of the erythropoietin receptor gene in a case of sporadic primary polycythemia. *Exp Hematol*. 1994, 22: 557-456.
112. Le Couedic JP, Mitjavila MT, Villeval JL: Missense mutation of the erythropoietin receptor is a rare event in human erythroid malignancies. *Blood* 1996, 87: 502-514.



13. Kisseleva T, Bhattacharya S, Braustein J, et al: Signaling through the JAK/STAT pathway, recent advances and future challenges. Review. *Gene* 2002, 285: 1-24.
14. Goldman J: A unifying mutation in chronic myeloproliferative disorders. *N Engl J Med*. 2005, 352; 17: 1744-1746.
15. Leonard W, O'Shea JJ: JAKs and STATs: Biological implications. *Annu Rev Immunol*. 1998, 16: 293-322.
16. Wu H, Liu X, Jaenisch R, Lodish HF: Generation of committed erythroid BFU-E and CFU-E progenitors does not require erythropoietin or the erythropoietin receptor. *Cell* 83: 59-67.
117. Levine RL, Belisle C, Wadleigh M, et al: X-inactivation-based clonality analysis and quantitative JAK 2 V617F assessment reveal a strong association between clonality and JAK 2 V617F in PV but not in ET/MMM, and identifies a subset of JAK 2 V617F-negative ET and MMM patients with clonal hematopoiesis. *Blood* 2006, 107: 4139-4141.
118. Jones AV, Kreil S, Zoi K, et al: Widespread occurrence of the JAK 2 V617F mutation in chronic myeloproliferative disorders. *Blood* 2005, 106; 6: 2162-2180.
119. Kralovics R, Teo SS, Buser AS, et al: Altered gene expression in myeloproliferative disorders correlates with activation of signaling by the V617F mutation of JAK 2. *Blood* 2005, 106: 3374-3376.
120. Scott LM, Scott MA, Campbell PJ, et al: Progenitors homozygous for the V617F JAK 2 mutation occur in most patients with polycythemia vera but not essential thrombocythemia. *Blood* 2006, 108: 2435-2437.
121. Levine RL, Loriaux M, Huntly BJ et al: The JAK 2V617F activating mutation occurs in the chronic myelomonocytic leukemia and acute myeloid leukemia, but not in acute lymphoblastic leukemia or chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2005, 106: 3377-3379.
122. Steensma DP, Dewald GW, Lasho TL, et al: The JAK 2 V617F activating tyrosine kinase mutation is an infrequent event in both "atypical" myeloproliferative disorders and myelodysplastic syndromes. *Blood* 2005, 106: 1207-1209.
123. Ugo V, Marzac C, Teyssandier I, et al: Multiple signaling pathways are involved in erythropoietin-independent differentiation of erythroid progenitors in polycythemia vera. *Exp Hematol*. 2004, 32: 179-187.
124. Witthuh BA, Quelle FW, Silvennoinen O, et al: JAK 2 associates with the erythropoietin receptor and is tyrosine phosphorylated and activated following stimulation with erythropoietin. *Cell* 1993, 74: 227-236.



125. Pardanani AD, Levine RL, Lasho T, et al: Blood 2006.
126. Lasho TR, Pardanani AD, McClure RF, et al: Concurrent MPL515 and JAK2V617F mutations in myelofibrosis: chronology of clonal emergence and changes in mutant allele burden over time. *Brit J Haematol.* 2006, 135: 683-687.
127. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T: *Molecular cloning: a laboratory manual.* 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989.
128. Sheffield VC, Beck JS, Kwitek AE, Sandstrom DV, et al: The sensitivity of single-strand conformational polymorphism analysis of single base substitutions. *Genomics* 1993, 16: 325-332.
129. Kralovics R, Skoda C: Molecular pathogenesis of Philadelphia chromosome negative myeloproliferative disorders. *Blood Rev.* 2005, 19: 1-3.
130. Jedlickova K, Stockton D, Prchal J T: Possible primary familial and congenital polycythemia locus at 7q22.1-7q22.2. *Blood cells, Mol. Dis.* 2003, 31; 327-331.
131. Bench AJ, Nacheva EP, Hood TL: Chromosome 20 deletions in myeloid malignancies: reduction of the common deleted region, generation of a PAC/BAC contig and identification of candidate genes. *Oncogene* 2000, 19: 3902-3913.
132. Boissinot M, Lippert E, Girodon F, et al: Latent myeloproliferative disorder revealed by the JAK 2 V617F mutation and endogenous megakaryocytic colonies in patients with splanchnic vein thrombosis. *Blood* 2006, 108; 3223-3224.
133. Hexner E.O: JAK 2 V617F: implications for thrombosis in myeloproliferative diseases. *Curr. Opin. Hematol.* 2007, 14; 450-454.

