

mgr inż. Joanna Czerwińska-Rybak

**Ocena występowania aberracji chromosomowych i wariantów sekwencji
DNA wybranych genów u chorych z zespołem mielodysplastycznym.**

Rozprawa na stopień naukowy doktora nauk medycznych i nauk o zdrowiu
w dyscyplinie nauki medyczne

Promotor: dr hab. Małgorzata Jarmuż-Szymczak, prof. IGCz PAN



Kolegium Nauk Medycznych
Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

Poznań, 2022

*Pani Promotor **dr hab. Małgorzacie Jarmuż-Szymczak, prof. IGCz PAN**
za ogromną życzliwość, cierpliwość i cenne wskazówki podczas redagowania tej rozprawy...*

***Pani prof. dr hab. Lidii Gil** oraz **Panu prof. dr hab. Krzysztofowi Lewandowskiemu**
za umożliwienie mi wykonania pracy doktorskiej w Katedrze i Klinice Hematologii i Transplantacji
Szpiku Uniwersytetu Medycznego oraz cenne wskazówki podczas jej redagowania...*

***mgr inż. Ewelinie Kowal-Wiśniewskiej**
za nieocenioną pomoc, wiedzę i poświęcony czas...*

***Pracownikom Laboratorium Diagnostyki Hematologicznej,**
w szczególności Ani, Błażewi oraz Iwonie,
oraz pracownikom Katedry i Kliniki Hematologii i Transplantacji Szpiku za miłą atmosferę pracy...*

*Moim kochanym **Rodzicom** za wiarę w moje możliwości
i wsparcie, bez którego nie byłoby mnie w tym miejscu...*

*Mojemu **mężowi Michałowi** i moim synom **Franciszkowi** i **Tymoteuszowi**
za wsparcie, wiarę w moje możliwości i motywowanie mnie do ciągłego rozwoju...*

*Moim przyjaciółkom **Kasi** i **Lucynie**, za to, że nigdy we mnie nie zwątpiły...*

Bardzo dziękuję

Spis treści

I.	WSTĘP	7
1.	Hematopoeza.....	7
1.1	Erytropoeza	8
1.2	Granulocytopoeza.....	8
1.3	Monocytopoeza	9
1.4	Megakariopoeza	10
1.5	Limfocytopoeza.....	10
1.6	Badania laboratoryjne w hematologii.....	11
2.	Zespoły mielodysplastyczne	12
2.1	Definicja zespołu mielodysplastycznego.....	12
2.2	Epidemiologia	12
2.3	Etiologia i patogenez zespołu mielodysplastycznego.....	13
2.4	Objawy zespołu mielodysplastycznego, badania laboratoryjne krwi obwodowej i szpiku kostnego	13
2.5	Klasyfikacja zespołów mielodysplastycznych	14
2.6	Kryteria rozpoznania zespołu mielodysplastycznego oraz stratyfikacja ryzyka	18
2.7	Leczenie zespołów mielodysplastycznych	23
3.	Genetyka zespołów mielodysplastycznych	24
3.1	Cytogenetyka zespołów mielodysplastycznych	24
3.2	Zmiany molekularne w zespołach mielodysplastycznych.....	28
3.2.1	Gen <i>ASXL1</i>	30
3.2.2	Gen <i>RUNX1</i>	31
3.2.3	Gen <i>SF3B1</i>	32
II.	CEL PRACY	34
III.	MATERIAŁY I METODY	35
1.	Charakterystyka grupy badanej	35
2.	Materiał do badań.....	36
3.	Pobieranie materiału	36
4.	Zakładanie i hodowla pobranego materiału.....	36
5.	Kończenie hodowli komórkowej.....	38
5.1	Przygotowanie roztworu chlorku potasu i utrwalacza Carnoy'a	38
5.2	Przebieg procedury.....	38
6.	Metody badań	39
6.1	Cytogenetyka klasyczna	39
6.1.1	Przygotowanie preparatów.....	39
6.1.2	Przygotowanie buforów, przeprowadzenie trawienia i barwienia preparatów cytogenetycznych.....	40
6.1.3	Analiza preparatów barwionych metodą GTG.....	41
6.2	Biologia molekularna	42
6.2.1	Izolacja genomowego DNA.....	43
6.2.2	Zmiany molekularne analizowane w niniejszej w pracy	44
6.2.3	Projektowanie starterów.....	46
6.2.4	Pirosekwencjonowanie.....	46
6.2.4.1	Przygotowanie produktów do pirosekwencjonowania	48
6.2.4.2	Przygotowanie programu do pirosekwencjonowania.....	49
6.2.4.3	Optymalizacja metody pirosekwencjonowania	49

6.2.4.4	Przeprowadzenie pirosekwencjonowania.....	49
IV.	WYNIKI	51
1.	Analiza cytogenetyczna.....	51
1.1	Częstość występowania aberracji cytogenetycznych w grupach pacjentów z nieprawidłowym kariotypem (korelacja wieku, płci i ryzyka cytogenetycznego)	60
1.1.1	Pacjenci z nieprawidłowym kariotypem w dwóch badaniach (GRUPA 1).....	60
1.1.2	Pacjenci z nieprawidłowym kariotypem tylko w pierwszym badaniu (GRUPA 2)	62
1.1.3	Pacjenci z nieprawidłowym kariotypem tylko w drugim badaniu (GRUPA 3)	64
1.1.4	Pacjenci z prawidłowym kariotypem w dwóch badaniach (GRUPA 4)	65
1.1.5	Ogólna częstość występowania aberracji cytogenetycznych w grupach pacjentów z nieprawidłowym kariotypem.....	67
1.2	Ryzyko cytogenetyczne w poszczególnych grupach pacjentów wg CCSS a wiek i płeć pacjentów	67
2.	Analiza molekularna.....	71
2.1	Analiza ilościowa i jakościowa wyizolowanego DNA	71
2.2	Sekwencje starterów.....	75
2.3	Rozdział elektroforetyczny produktów amplifikacji	75
2.3.1	Wariant c.1945G>T genu <i>ASXL1</i>	75
2.3.2	Wariant c.509-2A>C genu <i>RUNX1</i>	76
2.3.3	Wariant c.1874G>T genu <i>SF3B1</i>	76
2.4	Analiza wyników pirosekwencjonowania	77
2.4.1	Wariant c.1945G>T genu <i>ASXL1</i>	77
2.4.2	Wariant c.509-2A>C genu <i>RUNX1</i>	82
2.4.3	Wariant c.1874G>T genu <i>SF3B1</i>	85
2.4.4	Podsumowanie analizy molekularnej w grupie badanej	89
3.	Podsumowanie – analiza cytogenetyczna i molekularna a wiek i płeć pacjentów	90
4.	Wybrane parametry kliniczne pacjentów poddanych analizie GTG i pirosekwencjonowaniu	90
5.	Analiza statystyczna	96
V.	DYSKUSJA	97
VI.	PODSUMOWANIE	112
VII.	WNIOSKI	113
VIII.	STRESZCZENIE	114
IX.	SUMMARY	116
X.	BIBLIOGRAFIA	118

INDEKS STOSOWANYCH SKRÓTÓW

A	adenina
add	addycja
AML	ostra białaczka szpikowa, <i>ang. Acute Myeloid Leukemia</i>
ASXL1	gen należący do rodziny genów ASXL, <i>ang. Additional sex combs like 1</i>
ATP	adenozyno- 5'-fosforan
ATP	trifosforan adeniny
biot	znakowanie biotyną
BRAF	gen należący do rodziny kinaz RAF, <i>ang. B-Raf protooncogene</i>
C	cytozyna
CBL	protoonkogen kodujący domenę E3 ligazy ubikwityny,
CCSS	Kompleksowy System Punktacji Cytogenetycznej, <i>ang. Comprehensive Cytogenetic Scoring System</i>
CCUS	klonalna cytopenia o nieokreślonym pochodzeniu, <i>ang. clonal cytopenia of undetermined significance</i>
CFU-Baso	komórki macierzyste prekursorów bazofili, <i>ang. colony forming unit - granulocyte/macrophage</i>
CFU-Eos	komórki macierzyste prekursorów eozynofili, <i>ang. colony forming unit - granulocyte/macrophage</i>
CFU-GEMM	mielomonocytoza komórka wspólna pnia
CFU-GM	komórki macierzyste prekursorów granulocytów/makrofagów, <i>ang. colony forming unit - granulocyte/macrophage</i>
CFU-GM)	komórki macierzyste prekursorów monocytów i makrofagów, <i>ang. colony forming unit - granulocyte/macrophage</i>
CFU-M	komórki macierzyste prekursorów makrofagów, <i>ang. colony - forming units macrophages</i>
CHIP	klonalna hematopoeza o nieokreślonym potencjale, <i>ang. clonal hematopoiesis of undetermined potential</i>
COSMIC	Katalog Mutacji Somaticznych w Nowotworach, <i>ang. Catalogue of Somatic Mutations in Cancer</i>
CSF-1	czynnik wzrostu pierwszy, <i>ang. colony - stimulating factor - 1</i>
CSF-G	czynnik wzrostu komórek prekursorowych granulocytów, <i>ang. colony - stimulating factor - granulocyte</i>
CSF-GM	czynnik wzrostu granulocytów i makrofagów, <i>ang. colony - stimulating factor - granulocyte/macrophage</i>
CSNK1A1	gen kodujący kinazę alfa, <i>ang. Casein Kinase 1 Alpha 1</i>
CTP	trifosforan cytozyny
CUX1	gen kodujący białko CUX, <i>ang. Cut Like Homeobox 1</i>
del	delecja
der	chromosom pochodny, <i>ang. derivated</i>
DNA	kwas deoksyrybonukleinowy, <i>ang. deoxyribonucleic acid</i>
DNMT3A	gen należący do rodziny modyfikatorów epigenetycznych, <i>ang. DNA Methyltransferase 3 Alpha</i>
EGR1	supresor nowotworowy, wpływający na podziały komórkowe i apoptozę, <i>ang. Early Growth Response 1</i>
ETV6	gen z rodziny czynników transkrypcyjnych ETS, <i>ang. ETS Variant Transcription Factor 6</i>
EZH2	gen kodujący metylotransferazę, <i>ang. Enhancer Of Zeste 2 Polycomb Repressive Complex 2 Subunit</i>
F	starter jednej z nici DNA, <i>ang. forward</i>
FATHMM	model predykcyjny, <i>ang. Functional Analysis through Hidden Markov Models</i>
G	guanina
GATA2	gen z rodziny czynników transkrypcyjnych, <i>ang. GATA-BINDING PROTEIN 2</i>
G-CSF	czynnik wzrostu granulocytów, <i>ang. granulocyte colony stimulating factor</i>

GM-CSF	czynnik wzrostu komórek prekursorowych granulocytów i monocytów
GTG	metoda barwienia preparatów z wykorzystaniem barwnika Giemzy
GTP	trifosforan guaniny
HGVS	Międzynarodowy System Nomenklatury Wariantów Genetycznych, <i>ang. Human Genome Variation Society</i>
HSC	hematopoetyczne komórki macierzyste, <i>ang. hematopoietic stem cell</i>
ICUS	idiopatyczna cytopenia o nieokreślonym pochodzeniu, <i>ang. idiopathic cytopenia of undetermined significance</i>
IDH1/2	geny kodujące dehydrogenazę izocytrynianową, <i>ang. Isocitrate dehydrogenase 1 and 2</i>
IDUS	idiopatyczna dysplazja o nieokreślonym znaczeniu, <i>ang. Idiopathic dysplasia of undetermined significance</i>
inv	inwersja
IPSS	Międzynarodowy System Prognostyczny, <i>ang. Internatonal Prognostic Scoring System</i>
IPSS-R,	Zrewidowany Międzynarodowy System Prognostyczny, <i>ang. Revised Internatonal Prognostic Scoring System</i>
ISCN	Międzynarodowy System Nomenklatury Cytogenetycznej, <i>ang. An International System For Human Cytogenetic Nomenclature</i>
JAK2	gen z rodziny kinaz tyrozynowych, <i>ang. Janus kinase 2</i>
KKCz	Koncentrat krwinek czerwonych
MDS	Zespół mielodysplastyczny, <i>ang. myelodysplastic syndrome</i>
MEP	progenitorowe komórki linii erytroidalnej, <i>ang. megakaryocyte-erythroid progenitor cell</i>
MLL3	gen metylotransferazy histonowej H3K4, <i>ang. lysine methyltransferase 2C</i>
NGS,	Sekwencjonowanie następnej generacji, <i>ang. Next Genetarion Sequencing</i>
NRAS	gen z rodziny kodujących GTPazy o niskiej masie cząsteczkowej, <i>ang. retrowirus - associated DNA sequences</i>
PALG	Polska Grupa ds. Leczenia Białaczek u Dorosłych, <i>ang. Polish Adult Leukemia Group</i>
PCR	Reakcja łańcuchowa polimerazy, <i>ang. polymerase chain reaction</i>
PTPN11	gen kodujący białka fosfatazy tyrozynowej 11, <i>ang. protein tyrosine phosphatase, non receptor type 11</i>
pż	Par zasad
R	Starter jednej z nici DNA, <i>ang. reverse</i>
RNA	Kwas rybonukleinowy
RPS14	gen kodujący rybosomalną podjednostkę 40S, <i>ang. Ribosomal Protein S14</i>
RUNX1	RUNX, <i>ang. runt - related transcription factor 1</i>
S	starter sekwencyjny
secAML	Wtórna ostra białaczka szpikowa, <i>ang. secondary acute myeloid leukemia</i>
SF3B1	gen kodujący podjednostkę 1 kompleksu białkowego czynnika splicingowego 3b, <i>ang. Splicing factor 3b subunit 1</i>
SRSF2	gen kodujący białka splicingowe, <i>ang. Serine And Arginine Rich Splicing Factor 2</i>
t	translokacja
T	tymina
TET2	gen z rodziny katalizujących modyfikację DNA, <i>ang. Tet Methylcytosine Dioxygenase 2</i>
TGFB1	gen kodujący cytokinę TGFB, <i>ang. Transforming Growth Factor Beta 1</i>
TP53	gen supresorowy, <i>ang. tumor protein 53</i>
TTP	trifosforan tyminy
U2AF1	gen kodujący białko uczestniczące w splicingu mRNA, <i>ang. U2 Small Nuclear RNA Auxiliary Factor 1</i>
VAF	częstość występowania allelu, <i>ang. variant allele frequency</i>
WBC	białe krwinki, <i>ang. white blood cells</i>

I. Wstęp

1. Hematopoeza

Hematopoeza czyli krwiotworzenie to złożony proces prowadzący do powstania wszystkich elementów morfotycznych krwi oraz do utrzymania homeostazy ustroju, rozpoczynający się w życiu płodowym w pęcherzyku żółtkowym [1]. Z czasem funkcje krwiotwórcze przejmuje wątroba i śledziona, a następnie szpik kostny. W wieku dziecięcym krwiotworzenie zachodzi we wszystkich kościach, które zawierają szpik czerwony. W dorosłym życiu, gdy część szpiku czerwonego zostaje zastąpiona nieaktywnym szpikiem żółtym, proces ten przebiega w kręgach, żebrach, mostku, kościach płaskich i długich [1,2].

Podstawą trwałości krwiotworzenia są hematopoetyczne komórki macierzyste (HSC, *hematopoietic stem cell*), które mają zdolność do samoodnawiania, różnicowania i dojrzewania. Dzięki możliwości samoodnowy powstają identyczne komórki potomne dające początek poszczególnym liniom: mieloidalnej oraz limfoidalnej. Natomiast fakt, że mogą one się dzielić w różnych mechanizmach pozwala na jednoczesne wytwarzanie komórek potomnych zachowujących cechy komórki macierzystej oraz komórek progenitorowych podlegających dojrzewaniu i różnicowaniu. Taki sposób powstawania komórek sprawia, że system pozostaje stabilny poprzez zachowanie stałej liczby komórek macierzystych i wystarczającej ilości dojrzałych komórek morfotycznych krwi [1,2].

Zjawisko hematopoezy pozwala również na lepsze zrozumienie procesów zachodzących w przypadku chorób związanych z nieprawidłowościami w różnicowaniu komórek z poszczególnych linii krwiotwórczych, natomiast same hematopoetyczne komórki macierzyste stanowią model pomagający w poznaniu poszczególnych funkcji komórek i ich roli w procesach starzenia organizmu oraz onkogenezy [2].

Proces powstawania dojrzałych komórek morfotycznych krwi obwodowej odbywa się w szpiku kostnym i można go podzielić na dwa typy:

- mielopoeza, do której zaliczamy procesy erytropoezy, granulocytopenozy, monocytopenozy i megakariopenozy,
- limfopoeza prowadząca do wytworzenia limfocytów [1].

1.1 Erytropoeza

Proces erytropoezy inicjuje powstanie progenitorowych komórek tej linii określanych jako MEP (*megakaryocyte-erythroid progenitor cell*). Stymulowany jest on poprzez działanie określonych czynników, do których zaliczyć możemy: czynnik wzrostu komórek prekursorowych granulocytów i monocytów (GM-CSF), erytropoetynę czy interleukiny (IL): IL-3, IL-9, IL-11 [1,4]. Dzięki temu w kolejnych etapach z progenitorów powstają odpowiednio [1]:

- I. proerytroblast
- II. erytroblast zasadochłonny (posiada właściwości proliferacyjne, retikulum endoplazmatyczne oraz dużą ilość kwasu rybonukleinowego, zachodzi w nim ekspresja genów związanych z syntezą łańcuchów polipeptydowych globiny),
- III. erytroblast polichromatofilny,
- IV. erytroblast kwasochłonny (traci jądro komórkowe, które fagocytowane jest przez komórki siateczki endoplazmatycznej, w momencie przedostawania się komórek przez miąższ szpiku do zatok szpikowych),
- V. retikulocyt (stanowiący pulę rezerwy szpikowej),
- VI. erytrocyt.

W czasie trwania całego procesu erytropoezy zmienia ulega wielkość komórek i ich struktura, zagęszcza się i zmniejsza jądro komórkowe, przy jednocześnie zachowanych podziałach komórkowych. Stopniowy zanik jądra komórkowego następuje w momencie zgromadzenia w komórkach erytroblastów więcej niż 20% hemoglobiny [3,4].

1.2 Granulocytopoeza

Granulocytopoeza szpiku kostnego, która prowadzi do powstania granulocytów zasadochłonnych (bazofili), kwasochłonnych (eozynofili) oraz obojętnochłonnych (neutrofilii) inicjowana jest poprzez powstanie mielomonocytowej komórki wspólnej pnia (CFU-GEMM), która w kolejnym etapie różnicowania tworzy odpowiednio komórki macierzyste CFU-GM (*colony forming unit - granulocyte/macrophage*), a następnie różnicuje się do neutrofilów, eozynofilów (CFU-Eos) oraz bazofilów (CFU-Baso) [2].

Stadiami pośrednimi dla linii granulocytarnej są [1,3,4]:

- I. mieloblast,
- II. promielocyt i mielocyt, które mają zdolność do podziałów mitotycznych oraz różnicowania się do form bardziej dojrzałych,
- III. metamielocyt,
- IV. granulocyt pałeczkowaty,
- V. granulocyt segmentowany (obojętnochłonny, zasadochłonny lub kwasochłonny stanowiące jednocześnie pulę komórek dojrzewających i rezerwowych szpiku kostnego).

Dojrzałe granulocyty wykazują na swojej powierzchni ekspresję cząsteczek adhezji komórkowej, która pozwala na przyleganie do śródbłónka i zapobiega migracji komórek do tkanek obwodowych. Procesy podziałów i dojrzewania poszczególnych linii granulocytarnych zależne są od obecności substancji takich jak: czynnik wzrostu komórek prekursorowych granulocytów (CSF-G, *colony-stimulating factor-granulocyte*), czynnik wzrostu pierwszy (CSF-1, *colony - stimulating factor-1*), czynnik wzrostu granulocytów i makrofagów (CSF-GM, *colony-stimulating factor-granulocyte/macrophage*). Cały proces stymulowany jest poprzez oddziaływanie interleukin (IL): IL-1, IL-3, IL-6 [3,4].

1.3 Monocytopoeza

Monocyty powstają podobnie jak granulocyty ze wspólnej komórki macierzystej CFU-GM (*colony forming unit – granulocyte/macrophage*), która daje początek zarówno komórkom prekursorowym monocyty jak i makrofagów CFU-M (*colony-forming units macrophages*). Ich proliferacja prowadząca przebiega poprzez następujące stadia komórkowe [1]:

- I. monoblast,
- II. promonocyt,
- III. monocyt,
- IV. makrofag.

Stymulatorami tego procesu są: czynnik wzrostu granulocytów i makrofagów (CSF-GM, *colony-stimulating factor-granulocyte/macrophage*) działający wspólnie z czynnikiem wzrostu pierwszym (CSF-1, *colony-stimulating factor-1*) oraz interleukiną 6 (IL-6) [3,4]. Specyficzną właściwością monocytów jest możliwość

przemieszczania się do tkanek przy udziale adhezyjnych komórek naczyniowych (VCAM-1) i komórek adhezyjnych śródbłonkowych leukocytarnych (ELAM-1). Ich ekspresja zachodzi w momencie pojawienia się ogniska zapalnego [4]. Przemieszczenie się monocytów do tkanki aktywuje ich transformację do makrofagów pełniących funkcje żerne.

1.4 Megakariopoeza

Megakariopoeza czyli proces tworzenia trombocytów (płytek krwi) inicjuje pojawienie się komórki macierzystej CFU-GM (*colony forming unit-granulocyte/macrophage*), która dzieląc się tworzy komórki MEP (*megakaryocyte-erythroid progenitor cell*). Powstanie płytek krwi poprzez ich odłączenie się od cytoplazmy megakariocytów poprzedzone jest powstaniem następujących komórek [1,2]:

- I. megakarioblast,
- II. promegakariocyt,
- III. megakariocyt,
- IV. płytka krwi.

Procesy megakariopoezy stymulowane są głównie poprzez trombopoetynę (TPO) [1,2].

1.5 Limfocytopoeza

Limfocyty stanowią grupę komórek układu hematopoetycznego o właściwościach odpornościowych. Różnicują się w trzy grupy limfocytów: B (szpikozależne, *bone marrow dependent*), T (grasiczozależne, *thymus dependent*) oraz NK (*natural killers cells*) [3]. Każda z nich powstaje z limfoidalnej komórki progenitorowej, która daje początek komórkom progenitorowym odpowiednio z linii B oraz T/NK. Proces limfocytopoezy zachodzi w tkankach limfatycznych centralnych (głównie szpik kostny), a następnie powstałe komórki wtórnie zasiedlają tkanki obwodowe o właściwościach limfopoetycznych takie jak: węzły chłonne, migdałki czy śledziona [1,5].

W procesy proliferacji i różnicowania limfocytów B z multipotencjalnej komórki pnia szpiku, poprzez komórkę pnia ukierunkowaną, komórkę limfoidalną B progenitorową do limfocytu B zaangażowane są cząsteczki różnicujące takie jak: CD10, CD34, a niekiedy również CD19, CD22, CD38, CD40 [3,4] oraz interleukiny: IL2, IL4, IL7 oraz IL15 [5].

1.6 Badania laboratoryjne w hematologii

Podstawowym badaniem w hematologii jest morfologia krwi obwodowej. Analizowane w niej parametry takie jak liczba erytrocytów, krwinek białych, stężenie hemoglobiny czy liczba płytek krwi pozwala na wstępną ocenę stanu pacjenta [6]. Odchylenia w poszczególnych parametrach morfologii mogą skłonić do poszerzenia diagnostyki o badania szpiku kostnego, takie jak:

- biopsja aspiracyjna umożliwiająca pozyskanie materiału do badania cytologicznego, dzięki któremu można ocenić komórkowość szpiku, odsetek komórek z poszczególnych linii oraz poszerzyć diagnostykę o barwienia różnicujące [4,6],
- trepanobiopsja dla potrzeb badania histologicznego, gdzie oprócz komórkowości szpiku można ocenić jego architekturę oraz struktury kostne [4, 6].

Ideą badań szpiku kostnego jest przede wszystkim ocena odsetka poszczególnych komórek szpiku i stworzenie mielogramu na podstawie minimum 500 analizowanych i liczonych komórek [6]. W poniższej Tabeli nr 1 przedstawiono prawidłowy mielogram szpiku kostnego [4,6].

Tab. 1. Prawidłowy mielogram szpiku kostnego [4,6].

Linia komórkowa/rodzaj komórki	Odsetek poszczególnych linii komórkowych/komórek (%)
linia erytropoetyczna	10–40%
proerytroblasty	0–1,5%
erytroblasty bazofilne	0,2–8%
erytroblasty polichromatofilne	5–15%
erytroblasty eozynofilne (ortochromatofilne)	5–15%
linia mielopoetyczna	40–70%
mieloblasty	0–3%
promielocyty	0–5%
mielocyty obojętnochłonne	5–20%
mielocyty eozynofilne	0,2–3%
mielocyty bazofilne	0–1,0%
metamielocyty obojętnochłonne	8–20%
metamielocyty eozynofilne	0–2%
metamielocyty bazofilne	0–1%
pałczkowate	10–20%
granulocyty segmentowane obojętnochłonne (neutrofile)	10–30%
granulocyty segmentowane eozynofilne (eozynofile)	0,5–3%
granulocyty segmentowane bazofilne (bazofile)	0–0,5%
linia limfopoetyczna	8–20%
limfocyty	3–18%
plazmocyty	0,5–4%
komórki limfoidalne	0–3%
monocyty	0,5–3%
makrofagi	0,1–2%

Linia komórkowa/rodzaj komórki	Odsetek poszczególnych linii komórkowych/komórek (%)
linia megakariopoetyczna (megakariocyty)	0,1–0,5%
stosunek M:E	2,5–4:1

Ocena mielogramu, stanowi podstawę badania szpiku kostnego i w większości chorób hematologicznych pozwala na postawienie wstępnej diagnozy.

2. Zespoły mielodysplastyczne

2.1 Definicja zespołu mielodysplastycznego

Zespoły mielodysplastyczne (*MDS, ang. myelodysplastic syndrome*) są bardzo heterogenną grupą nabytych chorób układu krwiotwórczego o charakterze klonalnym i nowotworowym [7]. Klon komórek nowotworowych wywodzi się w wielopotencjalnej komórki macierzystej, która charakteryzuje się nieprawidłowościami w dojrzewaniu, różnicowaniu oraz apoptozie [7]. Nieefektywna hematopoeza prowadzi do nieprawidłowości w funkcjonowaniu komórek szpiku kostnego pod postacią niedokrwistości, neutropenii oraz trombocytopenii o różnym nasileniu [6, 7]. Wspomniane nieprawidłowości dotyczące różnicowania poszczególnych komórek z różnych linii krwiotwórczych sprawiają, że w przypadku zespołów mielodysplastycznych mamy do czynienia z bogatokomórkowym szpikiem kostnym i jednoczesną cytopenią krwi obwodowej wyrażoną w bardzo zróżnicowanej formie [7].

U około 30% pacjentów z rozpoznaniem zespołu mielodysplastycznego następuje progresja do ostrej białaczki szpikowej (AML, *acute myeloid leukemia*; wtórna AML secondary *acute myeloid leukemia*) [8].

2.2 Epidemiologia

Według rejestru Polskiej Grupy ds. Leczenia Białaczek u Dorosłych (PALG, *ang. Polish Adult Leukemia Group*) zapadalność, czyli liczba nowo rejestrowanych przypadków, na zespoły mielodysplastyczne wynosi w Polsce 3.8 na 100 tysięcy mieszkańców. Natomiast chorobowość czyli liczba osób chorych w danym momencie na MDS (rozpoznanych i już chorujących) zgodnie z danymi zbieranymi w latach 2009-2015 wynosi 11.5 na 100 tysięcy mieszkańców. Zarówno zapadalność, jak i chorobowość zwiększają się z wiekiem. Ponadto częściej na zespoły mielodysplastyczne zapadają mężczyźni (2,35 versus 1,47 na 100 000 osób) natomiast najczęściej diagnozowanym podtypem MDS jest oporna na leczenie cytopenią

z wieloliniową dysplazją (RCMD, *refractory cytopenia with multilineage dysplasia*), która stanowi 30,3% wszystkich nowo zdiagnozowanych przypadków [8].

2.3 Etiologia i patogeneza zespołu mielodysplastycznego.

Etiologia zespołów mielodysplastycznych w dalszym ciągu jest niejasna. W literaturze opisano wiele czynników mających wpływ na występowanie tej jednostki chorobowej. Należą do nich między innymi narażenie na zawarte w dymie tytoniowym policykliczne hydroksywęgłany (uzależnienie od papierosów), nadużywanie alkoholu, promieniowanie jonizujące, infekcje wirusowe czy narażenie na działanie środków chemicznych takich jak pestycydy [6].

U przeważającej większości pacjentów (około 70-80%) MDS występuje *de novo*. Określany jest więc mianem pierwotnego MDS (p-MDS, *ang. primary MDS*), a jego rozwój jest procesem wieloetapowym prowadzącym do powstania dysplazji poszczególnych linii komórek krwiotwórczych. Powstanie patologicznych komórek najprawdopodobniej związane jest z apoptozą komórek progenitorowych, co prowadzi do wspomnianej wcześniej upośledzonej hematopoezy [6].

W przypadku pozostałej grupy około 20-30% chorych zespół mielodysplastyczny ma charakter wtórny (t-MDS, *ang. therapy related MDS*) i najczęściej związany z przebytym już leczeniem przeciwnowotworowym. Ponadto zespoły mielodysplastyczne mogą ewoluować do ostrej białaczki szpikowej. Do transformacji dochodzi w 20% przypadków p-MDS oraz u 70% chorych z t-MDS.

2.4 Objawy zespołu mielodysplastycznego, badania laboratoryjne krwi obwodowej i szpiku kostnego

Objawy zespołu mielodysplastycznego, ze względu na patogenezę jego powstania, związane są z nieprawidłowościami w funkcjonowaniu układu wytwórczego szpiku kostnego. Pacjenci zatem najczęściej zgłaszają osłabienie, błądliwość skóry, męczliwość, częstsze krwawienia, infekcje czy łatwość siniaczenia [6]. Wyżej wymienione objawy są skutkiem zaburzeń parametrów krwi obwodowej i szpiku kostnego, które stanowią kryterium klasyfikacji pacjenta do określonego podtypu zespołu mielodysplastycznego. Wśród nieprawidłowości dotyczących parametrów krwi obwodowej najczęściej występują [6,9]:

- niedokrwistość,
- cytopenia, duocytopenia lub pancytopenia,

- brak komórek blastycznych lub ich obecność w odsetku nieprzekraczającej 19% (zależnie od podtypu MDS poniżej 1%, 5% lub 19%),
- brak lub obecność Pałeczek Auera,
- prawidłowa lub zwiększona liczba trombocytów.

Natomiast nieprawidłowości dotyczące morfologii szpiku kostnego to między innymi:

- jedno lub wieloliniowa dysplazja komórek linii mieloidalnej,
- obecność komórek blastycznych w odsetku nieprzekraczającym 19% (zależnie od podtypu MDS poniżej 5%, 9% lub 19%),
- brak lub obecność Pałeczek Auera,
- obecność pierścieniowych syderoblastów w odsetku równym bądź mniejszym niż 15%,
- prawidłowa lub podwyższona liczba megakariocytów z hipolobularnym jądrem.

Reasumując rozpoznanie zespołu mielodysplastycznego mogą sugerować badania podstawowe tj. morfologia krwi obwodowej, natomiast biopsja oraz trepanobiopsja szpiku kostnego są badaniami niezbędnymi do postawienia rozpoznania zespołu mielodysplastycznego [6,9].

2.5 Klasyfikacja zespołów mielodysplastycznych

Pierwsze wzmianki dotyczące zespołu mielodysplastycznego pojawiły się w 1907 roku i dotyczyły przypadku pacjenta z przewlekłą anemią i nieprawidłowościami w linii erytroidalnej [10]. W roku 1938 w czasopiśmie JAMA ukazała się analiza 100 przypadków pacjentów z anemią, wtedy pierwszy raz wprowadzono określenie odpornej anemii (*Refractory Anemia*) [11]. Dopiero w 1976 roku stworzono pierwszą klasyfikację zespołów mielodysplastycznych, która swój ostateczny kształt otrzymała w roku 1982. Stanowiła ona wypracowany przez grupę badaczy z Francji, Stanów Zjednoczonych Ameryki Północnej i Wielkiej Brytanii model, który uwzględnił morfologię komórek krwi obwodowej i szpiku kostnego, odsetek komórek blastycznych z linii mieloidalnej, odsetek pierścieniowych syderoblastów, obecność pałeczek Auera oraz monocytosę krwi obwodowej. Na tej podstawie wyodrębniono pięć typów MDS [12]:

- RA (niedokrwistość oporna na leczenie);
- RARS (niedokrwistość oporna na leczenie z obecnością pierścieniowych syderoblastów);
- RAEB (niedokrwistość oporna na leczenie z nadmiarem blastów).
- CMML (przewlekła białaczka mielomonocytowa).

- RAEB-t (niedokrwistość oporna na leczenie z nadmiarem blastów w fazie transformacji).

Podtypy zespołów mielodysplastycznych oraz kryteria diagnostyczne wg. FAB przedstawiono w Tabeli nr 2 i nr 3 poniżej.

Tab. 2. Podtypy zespołów mielodysplastycznych i kryteria diagnostyczne wg klasyfikacji FAB (krew obwodowa) [12]

Podtyp MDS	Odsetek blastów (%)	Liczba monocytów	Obecność cytopenii
RA	<1%		tak
RARS	<1%		tak
RAEB	<5%		tak
CMML	<5%	> 1x10 ^{9/l}	tak
RAEB-t	<5%		tak

Tab. 3. Podtypy zespołów mielodysplastycznych i kryteria diagnostyczne wg klasyfikacji FAB (szpik kostny) [12]

Podtyp MDS	Odsetek blastów	Obecność dysplazji	Odsetek pierścieniowych syderoblastów	Obecność pałeczek Auera
RA	<5%	tak	<15%	brak
RARS	<5%	tak	>15%	brak
RAEB	15-20%	tak	brak	brak
CMML	0-20%	tak	brak	brak
RAEB-t	21-30%	tak	brak	obecne

W 2001 roku prace nad stworzeniem klasyfikacji zespołów mielodysplastycznych rozpoczęła Światowa Organizacja Zdrowia (WHO, *World Health Organization*). Istotnymi zmianami w stosunku do klasyfikacji FAB było zmniejszenie wymaganego odsetka blastów z 30% do 20% przy rozpoznaniu ostrej białaczki szpikowej, wykreślenie podtypu RAEB-t (niedokrwistość oporna na leczenie z nadmiarem blastów w fazie transformacji), dodanie podtypu zespół 5q-, wprowadzenie pojęcia wieloliniowej dysplazji oraz sklasyfikowanie typu CMML jako zespołu mielodysplastycznego/mieloproliferacyjnego (MDS/MNP) [13]. Kolejne zmiany wprowadzono w roku 2008 wyraźnie zaznaczając podtypy zespołu mielodysplastycznego bez nadmiaru blastów tj. [14]:

- RCUD (oporna na leczenie cytopenia z jednoliniową dysplazją).
 - RA (niedokrwistość oporna na leczenie)
 - RN (oporna na leczenie neutropenia)

- RT (oporna na leczenie trombocytopenia)
- RARS (niedokrwistość oporna na leczenie z obecnością pierścieniowych syderoblastów).
- RCMD (oporna na leczenie cytopenia z wieloliniową dysplazją).
- MDS-U (zespół mielodysplastyczny niesklasyfikowany).
- MDS z izolowaną delecją 5q-

oraz z nadmiarem blastów:

- RAEB-1 (niedokrwistość oporna na leczenie z nadmiarem blastów typu pierwszego).
- RAEB-2 (niedokrwistość oporna na leczenie z nadmiarem blastów typu drugiego).

Ostatecznie w 2016 roku stworzono zestawienie, które obowiązuje do tej pory i wyróżnia następujące podtypy zespołów mielodysplastycznych [15,16]:

- MDS z jednoliniową dysplazją (MDS – SLD),
- MDS z wieloliniową dysplazją (MDS –MLD),
- MDS z obecnością pierścieniowych syderoblastów (MDS – RS), w tym:
 - MDS –RS z jednoliniową dysplazją (MDS – RS – SLD),
 - MDS –RS z wieloliniową dysplazją (MDS – RS – MLD),
- MDS z izolowaną delecją 5q,
- MDS z nadmiarem blastów (MDS – EB) – dwa podtypy: MDS – EB -1 oraz MDS – EB – 2,
- MDS niesklasyfikowany (MDS – U) – trzy podtypy: z 1% komórek blastycznych, z jednoliniową dysplazją (SLD) oraz pancytopenią, z aberracjami cytogenetycznymi;
- oporna na leczenie cytopenia u dzieci (ang. Refractory Cytopenia of Childhood, RC).

Podtypy zespołów mielodysplastycznych oraz kryteria diagnostyczne wg WHO przedstawiono poniżej w Tabeli nr 4.

Tab. 4. Podtypy zespołów mielodysplastycznych i kryteria diagnostyczne wg klasyfikacji WHO 2016 [16]

Podtyp MDS	Obecność dysplazji *	Obecność cytopenii	odsetek blastów (szpik kostny)	odsetek blastów (krew obwodowa)	Odsetek pierścieniowych syderoblastów	Aberracje cytogenetyczne
MDS-SLD	1	1 lub 2	<5%	<1%	<15%/<5%**	każde możliwe****
MDS-MLD	2 lub 3	1 do 3	<5%	<1%	<15%/<5%**	każde możliwe****
MDS-RS-SLD	1	1 do 2	<5%	<1%	≥15%/≥5%**	każde możliwe****
MDS-RS-MLD	2 lub 3	1 do 3	<5%	<1%	≥15%/≥5%**	każde możliwe****
MDS z del(5q)	1 do 3	1 do 2	<5%	<1%	brak	Delecja 5q izolowana lub z inną jedną aberracją*****
MDS EB 1	0 do 3	1 do 3	5-9%	2-4%	brak	każde możliwe
MDS EB 2	0 do 3	1 do 3	10-19%	5-19%	brak	każde możliwe
MDS u z 1% komórek blastycznych	1 do 3	1 do 3	<5%	1% ***	brak	każde możliwe
MDS u z jednoliniową dysplazją (SLD) oraz pancytopenią	1	3	<5%	<1%	brak	każde możliwe
MDS u z aberracjami cytogenetycznymi	0	1 do 3	<5%<1%	<1%	<15%	obecne
RCC - Oporna na leczenie cytopenia u dzieci	1 do 3	1 do 3	<5%	<2%	brak	każde możliwe

* liczba dysplastycznych linii od 1-3; ** gdy stwierdzona jest mutacja w genie *SF3B1*; *** 1% komórek musi zostać stwierdzony w co najmniej dwóch badaniach; **** chyba że spełniają kryterium MDS z del5q; ***** wykluczając monosomię 7 lub delecję 7q;

2.6 Kryteria rozpoznania zespołu mielodysplastycznego oraz stratyfikacja ryzyka

Diagnostyka zespołów mielodysplastycznych jest bardzo trudna i początkowo w dużej mierze opiera się na podstawowych badaniach laboratoryjnych. Morfologia krwi obwodowej może wskazać dalszą drogę diagnostyczną, ale również okazać się niewystarczająca w przypadku pacjentów we wczesnym stadium choroby. Szacuje się, że u około 20% pacjentów dochodzi do rozbieżności w diagnozie na wczesnym etapie choroby, co przekłada się na podejmowane decyzje terapeutyczne [17,18]. W związku z tym u pacjentów bez cech dysplazji szpiku kostnego należy poszukiwać innego podłoża anemii, trombocytopenii czy toczącego się stanu zapalnego. Po ich wykluczeniu rekomendowane jest wdrożenie dodatkowych narzędzi diagnostycznych w postaci badań cytometrii przepływowej, cytogenetyki czy sekwencjonowania DNA w celu różnicowania MDS z innymi idiopatycznymi lub klonalnymi cytopeniami takimi jak [17,18]:

- idiopatyczna cytopenia o nieokreślonym pochodzeniu (*ICUS, idiopathic cytopenia of undetermined significance*),
- klonalna cytopenia o nieokreślonym pochodzeniu (*CCUS, clonal cytopenia of undetermined significance*),
- klonalna hematopoeza o nieokreślonym potencjale (*CHIP, clonal hematopoiesis of undetermined potential*),
- idiopatyczna dysplazja o nieokreślonym znaczeniu (*IDUS, Idiopathic dysplasia of undetermined significance*).

Kryteria różnicowania zespołów mielodysplastycznych z innymi cytopeniami przedstawiono w Tabeli nr 5.

Tab. 5. Kryteria różnicowania zespołów mielodysplastycznych z idiopatycznymi lub klonalnymi cytopeniami. [18]

Cecha	MDS	ICUS	CCUS	CHIP	IDUS
cytopenia	Tak (w 1 lub więcej liniach)	Tak (w 1 lub więcej liniach)	Tak (w 1 lub więcej liniach)	Nie	Nie
dysplazja	Tak (>10% komórek szpiku w co najmniej 1 linii komórkowej)	Nie lub minimalna niepozwalająca na kwalifikację jako MDS	Nie lub minimalna niepozwalająca na kwalifikację jako MDS	Nie	Tak (<10% komórek szpiku)
ryzyko progresji	Nie dotyczy	10% pacjentów w ciągu 5 lat	80% pacjentów w ciągu 5 lat	Niskie (<1%)	nieznane

Stosując przedstawione kryteria rozpoznania zespołu mielodysplastycznego w korelacji z innymi badaniami możliwe jest postawienie właściwego rozpoznania, a co za tym idzie stratyfikacja pacjentów do określonej grupy ryzyka, która jest bardzo ważnym elementem w procesie wyboru odpowiedniej ścieżki terapeutycznej.

W przypadku MDS pierwszy system stratyfikacji pacjentów do określonej grupy ryzyka wprowadzono w 1997 roku i był to Międzynarodowy System Prognostyczny (IPSS, *International Prognostic Scoring System*). Uwzględniał on liczbę cytopenii, odsetek komórek blastycznych oraz wynik badania cytogenetycznego [19, 20, 21]. Jego zaletą była łatwość stosowania ale deprecjonował on wartość badania cytogenetycznego i nie był precyzyjny w przypadku pacjentów klasyfikowanych do grupy niskiego ryzyka. W związku z pewnymi ograniczeniami trwały prace nad jego modyfikacją. W 2012 roku opracowano i opublikowano nowszy model stratyfikacji Zrewidowany Międzynarodowy System Prognostyczny (IPSS-R, *Revised International Prognostic Scoring System*) [22]. Niezależnie od nich powstał również opracowany przez Światową Organizację Zdrowia system oparty o IPSS, klasyfikację zespołów mielodysplastycznych wg WHO oraz stężenie hemoglobiny [23]. W poniższej Tabeli nr 6 przedstawiono kryteria każdego z systemów.

Tab. 6. Porównanie systemów stratyfikacji pacjentów z rozpoznaniem MDS na podstawie www.lls.org [24]

Rodzaj klasyfikacji Analizowany parametr	IPSS		IPSS-R		WPSS	
Klasyfikacja MDS wg WHO	-		-		MDS-SLD, MDS-RS, MDS z izolowaną del(5q)	0 pkt
					MDS-MLD	1,0 pkt
					MDS-EB-1	1,5 pkt
					MDS-EB-2	2,0 pkt
Odsetek komórek blastycznych w szpiku kostnym (%)	>5%	0 pkt	<2%	0 pkt	-	
	5-10%	1,0 pkt	2-5%	1,0 pkt		
	11-20%	1,5 pkt	5-10%	2,0 pkt		
	21-30%	2,0 pkt	>10%	3,0 pkt		
cytogenetyka	Prawidłowy kariotyp, del(5q), del(20q)	0 pkt	-Y, del(11q)	0 pkt	Prawidłowy kariotyp, izolowana del(5q), izolowana del(20q), izolowana utrata chromosomu płci Y	0 pkt
	> 3 aberracje lub aberracje dotyczące chromosomu pary 7	1,0 pkt	Prawidłowy kariotyp, del(5q), del(12p), del(20q), dwie aberracje cytogenetyczne, w których jedna to del(5q)	1,0 pkt	Inne aberracje	1,0 pkt

Rodzaj klasyfikacji Analizowany parametr	IPSS		IPSS-R		WPSS	
	Inne wyżej nie wymienione aberracje		0,5 pkt		del(7q), +8, +19, i(17q), każda inna aberracja (jeden lub dwa niezależne klony)	
			-7, inv(3)/t(3q)/del(3q), dwie aberracje cytogenetyczne, w których jedna to – 7/del(7q), Kariotyp złożony = 3 aberracje		3,0 pkt	
			Kariotyp złożony > 3 aberracje		4.0 pkt	
Liczba cytopenii (anemia, trombocytopenia, neutropenia)	0-1	0 pkt	-	-	-	
	2-3	0,5 pkt				
Stężenie hemoglobiny (g/dL)	-		>10 g/dL		0 pkt	Obecne 1,0pkt nieobecne 0 pkt
			8-10 g/dL		1,0 pkt	
			<8 g/dL		1,5 pkt	
Liczba płytek krwi (x10 ⁹ /L)	-		>100 x10 ⁹ /L		0 pkt	-
			50-100 x10 ⁹ /L		0,5 pkt	
			<50 x10 ⁹ /L		1,0 pkt	
Liczba neutrofilii ([ANC]x10 ⁹ /L	-		>0,8 x10 ⁹ /L		0 pkt	-
			<0,8 x10 ⁹ /L		0,5 pkt	

Na podstawie powyższych kryteriów, którym przyporządkowano odpowiednią ilość punktów, możliwe stało się zakwalifikowanie pacjenta do określonej grupy ryzyka (Tabela nr 7) i wybór najlepszej dla niego terapii.

Tab. 7. Sposób obliczania ryzyka dla pacjentów wg trzech systemów stratyfikacji na podstawie www.lls.org [24]

IPSS		IPSS-R		WPSS	
Niskie	0 pkt	Bardzo niskie	<1,5 pkt	Bardzo niskie	0 pkt
pośrednie 1	0,5 -1,0 pkt	niskie	2,0 – 3,0 pkt	niskie	1,0 pkt
pośrednie 2	1,5 – 2,0 pkt	pośrednie	3,5 – 4,5 pkt	pośrednie	2,0 pkt
wysokie	>2,5 pkt	wysokie	5,0 – 6,0 pkt	wysokie	3,0-4,0 pkt
		Bardzo wysokie	>6,5 pkt	Bardzo wysokie	5,0-6,0 pkt

Obecnie jednym z podstawowych systemów rokowniczych jest IPSS-R, w którym analizie poddawane są następujące parametry: stężenie hemoglobiny, liczba trombocytów, liczba neutrofili oraz zaburzenia cytogenetyczne obserwowane u pacjentów z zespołem mielodysplastycznym [18]. Jego integralną częścią pozwalającą na określenie ryzyka cytogenetycznego jest Kompleksowy System Punktacji Cytogenetycznej (CCSS, ang. *Comprehensive Cytogenetic Scoring System*), w którym wyróżnia się pięć grup przedstawionych w Tabeli nr 8, znajdującej się poniżej.

Tab. 8. Grupy ryzyka cytogenetycznego wg CCSS [18]

Ryzyko cytogenetyczne	Aberracje cytogenetyczne
BARDZO DOBRE	-Y, del(11q)
DOBRE	Prawidłowy kariotyp, del(5q), del(12p), del(20q), dwie aberracje cytogenetyczne, w których jedna to del(5q)
POŚREDNIE	del(7q), +8, +19, i(17q), każda inna aberracja (jeden lub dwa niezależne klony)
ZŁE	-7, inv(3)/t(3q)/del(3q), dwie aberracje cytogenetyczne, w których jedna to – 7/del(7q), Kariotyp złożony = 3 aberracje
BARDZO ZŁE	Kariotyp złożony > 3 aberracje

Należy jednak pamiętać, że powyższe modele najlepiej sprawdzają się dla pacjentów z pierwotnym zespołem mielodysplastycznym. Zdecydowanie trudniej oszacować to ryzyko dla chorych z wtórną postacią MDS. W związku z tym cały czas trwają prace mające na celu modyfikację powyższych kryteriów [18].

2.7 Leczenie zespołów mielodysplastycznych

Zespoły mielodysplastyczne stanowią grupę chorób charakteryzującą się dużym spektrum objawów. Dotyczą one cech morfologicznych, klinicznych oraz genetycznych. W związku z tym ze względu na różny przebieg choroby, stosowanych jest wiele opcji terapeutycznych, począwszy od obserwacji pacjenta, aż do allogenicznej transplantacji komórek krwiotwórczych [18, 25]. Sposób leczenia i wybór optymalnej terapii zależy od grupy ryzyka, do której chory został zakwalifikowany na podstawie IPSS, IPSS-R lub WPSS. Pacjenci, u których stwierdza się łagodną cytopenię najczęściej nie wymagają leczenia pod warunkiem okresowej kontroli podstawowych parametrów morfologii krwi. U pacjentów z grupy niskiego ryzyka dostępne są następujące opcje terapeutyczne [25]:

- leki/substancje stymulujące erytropoezę, które korzystnie wpływają na przeżycie i poprawiają jego jakość poprzez uniezależnienie chorych od przetoczeń koncentratów krwinek czerwonych (KKCz); stosowane w przypadku chorych z niedokrwistością gdzie priorytetem jest leczenie anemii;
- agoniści receptora trombopoetyny u chorych z trombopenią; niestety ze względu na większe ryzyko transformacji MDS do ostrej białaczki szpikowej tego typu leczenie wymaga dłuższej mediany obserwacji;
- substancje immunomodulujące takie jak lenalidomid (zwłaszcza dla pacjentów z izolowaną delecją 5q) czy talidomid, których głównym zadaniem jest uniezależnienie pacjentów od przetoczeń oraz doprowadzenie do uzyskania dłuższej remisji cytogenetycznej;
- leki hypometylujące tj. azacytydyna czy decytabina;
- transplantacja allogenicznych komórek krwiotwórczych (dla pacjentów z zespołem mielodysplastycznym niskiego ryzyka wg IPSS i opornością na powyższe leczenie).

W przypadku pacjentów z grupy wysokiego ryzyka dostępne są następujące opcje terapeutyczne [25]:

- transplantacja allogenicznych komórek krwiotwórczych, która nadal pozostaje najskuteczniejszą metodą leczenia MDS wysokiego ryzyka. Powinna być rozważana u chorych, u których ryzyko transformacji do ostrej białaczki szpikowej jest wysokie. Należy jednak pamiętać, że zastosowanie tej metody

terapeutycznej i jej powodzenie zależy od wielu czynników m.in. sposobu przygotowania chorego do procedury (rodzaj zastosowanego kondycjonowania);

- leki hypometylujące, podobnie jak w MDS niskiego ryzyka, czyli azacytydyna i decytabina;
- intensywna chemioterapia oparta na protokołach stosowanych w przypadku leczenia ostrej białaczki szpikowej;
- leczenie wspomagające takie jak przetaczanie koncentratów krwinek czerwonych i objawowe leczenie zakażeń bakteryjnych i grzybiczych.

3. Genetyka zespołów mielodysplastycznych

3.1 Cytogenetyka zespołów mielodysplastycznych

Pierwsze badania dotyczące genetyki zespołów mielodysplastycznych dotyczyły zmian cytogenetycznych wykrywanych metodami cytogenetyki klasycznej. Na ich podstawie do dziś stratyfikuje pacjentów do określonej grupy ryzyka oraz determinuje opcje terapeutyczne. Wiadomo, że aberracje cytogenetyczne występują u około 40-50% chorych ze zdiagnozowanym pierwotnym zespołem mielodysplastycznym oraz u 80% pacjentów z wtórną postacią MDS [26]. Charakteryzują się dużą różnorodnością, a więc nie ma jednej zmiany będącej swoistym markerem w przypadku MDS [27].

Wiele badań na dużych grupach pacjentów przede wszystkim dowiodło, że w przypadku zespołów mielodysplastycznych w przeważającej większości dominują zmiany nie zrównoważone, duże delecje fragmentów lub całych chromosomów, natomiast niewielki odsetek stanowią translokacje zrównoważone, zdecydowanie częściej obserwowane w AML [27].

Aberracje chromosomowe nie zrównoważone oraz zrównoważone występujące w zespołach mielodysplastycznych wraz z częstością ich występowania (od najczęstszych do najrzadszych) przedstawiono poniżej, w Tabeli nr 9 oraz Tabeli nr 10.

Tab. 9. Najczęściej obserwowane aberracje nie zrównoważone w MDS [26, 29, 30, 35]

Aberracja	MDS (ogólnie)
del(5q)	10-20% (wtórny MDS 40%)
-7/del(7q)	10% (wtórny MDS 50%)
+8	10% (wtórny MDS 40%)
del(20q)	2-8%
-Y	5%
del(17p)	3-5% (wtórny MDS 25-30%)

Aberracja	MDS (ogólnie)
del(13q)	3%
del(12p)	3%
del (11q)	3%
del (9q)	1-2%
idic(X)(q13)	1-2%

Tab. 10. Najczęściej obserwowane aberracje zrównoważone w MDS [29, 30, 35]

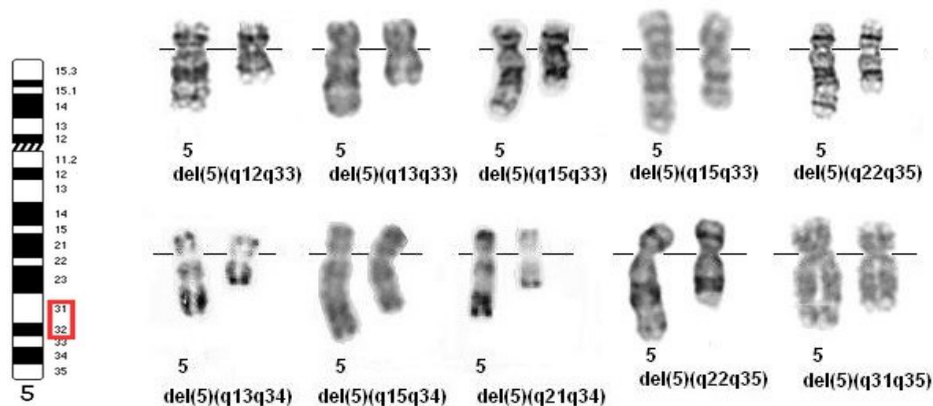
Aberracja	MDS (ogólnie)
t(1;3)(p36.3;q21.2)	1%
t(2;11)(p21;q23.3)	1%
inv(3)/t(3;3)	1%
t(6;9)(p23;q34.1)	1%
t(11;16)(q23.3;p13.3)	- / wtórny MDS 3%
t(3;21)(q26.2;q22.1)	- / wtórny MDS 2%

Aberracje chromosomowe występujące z najwyższą częstością w zespołach mielodysplastycznych to:

- **Delecja fragmentu długiego ramienia chromosomu pary 5**

Po raz pierwszy opisana została przez Van der Berghe’a w 1974 roku [31] i ma charakter interstycjalny (rzadziej dystalny). Występuje w około 10-20% przypadków, częściej u kobiet z rozpoznaną niedokrwistością oporną na leczenie, zmniejszoną ilością prekursorów erytroidalnych w szpiku, prawidłową liczbą płytek lub nadpłytkowością, obecnością megakariocytów z nieposegmentowanym jądrem [26, 31]. Obejmuje region chromosomu pary 5 od prążka q31 do q35 gdzie zlokalizowane są geny supresji np. *EGR1* (*Early Growth Response 1*, supresor nowotworowy, wpływający na podziały komórkowe i apoptozę, kontrolujący ekspresję genów *TGFBI* oraz *TP53*) oraz gen *RPS14* (kodujący rybosomalną podjednostkę 40S) czy *CSNK1A1* (kodujący kinazę serynowo-treoninową) (Ryc. 1) [26, 31, 35]. Aberracja ta może występować formie izolowanej, wtedy określana jest mianem „zespołu 5q-” lub współwystępować z innymi aberracjami. Należy jednak pamiętać, że występowanie tej delecji wraz jedną inną aberracją cytogenetyczną, nie dotyczącą chromosomu pary 7, również umożliwia postawienie rozpoznania „zespołu 5q-”. Pacjenci z w/w zmianą leczenia są lenalidomidem i jeżeli nie występuje u nich

mutacja¹ (inaczej wariant sekwencji DNA o charakterze patogennym) w genie supresji nowotworowej (*TP53*) odpowiedź na leczenie jest bardzo dobra, a ryzyko transformacji do ostrej białaczki szpikowej nie przekracza 10% [26, 31, 35]. U niewielkiego odsetka pacjentów (około 7%) można zaobserwować monosomię chromosomu pary 5, która wiąże się z niekorzystnym rokowaniem i częściej występuje we wtórnej postaci MDS [32].



Ryc. 1. Kariogram chromosomu pary 5 (kolorem czerwonym zaznaczono prążki zazwyczaj ulegające delecji) oraz przykłady delecji długiego ramienia chromosomu pary 5; <http://atlasgeneticsoncology.org> [33]

- **Delecja fragmentu długiego ramienia chromosomu pary 7**

Aberracje w obrębie chromosomu pary 7 są drugą, co do częstości występowania, nieprawidłowością charakteryzującą zespół mielodysplastyczny. Występują one u około 10% pacjentów z pierwotnym zespołem mielodysplastycznym oraz u około 50% chorych we wtórnej postaci MDS. Defekt ten często obserwowany jest również w przypadku odpornej na leczenie cytopenii u dzieci (RCC) [26, 29, 30].

Podobnie jak w przypadku aberracji dotyczących chromosomu pary 5, także tutaj występują minimum dwa regiony chromosomu pary 7 podlegające delecji. Ich identyfikacji dokonano już z początkiem lat 2000 i są to prążki: q22, q31-32 oraz q36 (Ryc. 2) [34]. Dowiedziono ponadto, że fragmenty chromosomu pary 7 mogą ulegać delecji również wskutek translokacji o charakterze niezrównoważonym, co może świadczyć o wysokiej niestabilności materiału genetycznego budującego ramię q

¹ Zgodnie z wytycznymi HGVS z 2016 zaleca się używać sformułowania patogenny wariant sekwencji. w pracy zamiennie używano nazewnictwa mutacja lub patogenny wariant sekwencji [den Dunnen J.T. i wsp., 2016].

chromosomu pary 7 [34, 35]. Nierzadko dochodzi też do utraty całej kopii chromosomu pary 7 [35].

Badania molekularne dotyczące regionów długiego ramienia chromosomu pary 7 cały czas trwają. Do tej pory udało się określić zależność pomiędzy delecją ramienia q chromosomu pary 7 a mutacjami w genach *EZH2*, *MLL3* czy *CUX1* na nim zlokalizowanych [35].

Bez względu na wielkość delecji (brak fragmentu lub całego chromosomu pary 7) aberracja ta zawsze koresponduje ze złym rokowaniem dla pacjenta [35].



Ryc. 2. Kariogram chromosomu pary 7 (kolorem czerwonym zaznaczono prążki najczęściej ulegające delecji) oraz przykład delecji długiego ramienia chromosomu pary 7; <http://atlasgeneticsoncology.org> [33] oraz <https://www.leukemia-cell.org/atlas/index.php?pg=images--myelodysplastic-syndromes--mds-eb--excess-blasts-2> [37]

• Inne aberracje

Oprócz opisanych powyżej delecji fragmentu długiego ramienia chromosomu pary 5 czy 7 należy również wymienić inne rzadziej występujące aberracje (Tabela nr 9 i Tabela nr 10). Należą do nich między innymi obecność dodatkowej kopii chromosomu pary 8, delecja fragmentu krótkiego ramienia chromosomu pary 20 czy delecja fragmentu krótkiego ramienia chromosomu pary 17 (locus genu *TP53*). Nie bez znaczenia również jest występowanie kariotypu złożonego definiowanego jako występowanie trzech lub więcej aberracji w jednym klonie komórkowym oraz kariotypu monosomalnego, który charakteryzuje się występowaniem dwóch monosomii chromosomów autosomalnych lub jednej monosomii autosomów skojarzonej z minimum jedną aberracją strukturalną [35, 36]. Obecność kariotypu złożonego raportowana jest w około 20% przypadków, natomiast obecność kariotypu monosomalnego u 16% pacjentów [36]. Należy jednak pamiętać, że kariotyp monosomalny może również spełniać kryteria

kariotypu złożonego i odwrotnie [36], a oba są zawsze niekorzystnym czynnikiem rokowniczym [36]. Trzeba również podkreślić, że występowanie kariotypu złożonego u pacjentów często koreluje z delecją genu *TP53* [35].

Coraz lepsza znajomość cytogenetyki zespołów mielodysplastycznych i badania prowadzone na dużych grupach chorych pozwalają na korelacje aberracji chromosomowych z podtypem MDS wg WHO. Szczegóły przedstawiono poniżej, w Tabeli nr 11.

Tab. 11. Korelacja aberracji cytogenetycznych i podtypu MDS wg WHO 2016 [29]

Aberracja	podtyp MDS wg WHO 2016
aberracje chromosomu pary 5, 7, dodatkowa 8, del(20q)	MDS z jednoliniową dysplazją (MDS – SLD) MDS z wieloliniową dysplazją (MDS –MLD) MDS z nadmiarem blastów (MDS – EB)
aberracje częściej z grupy niekorzystnego rokowania zwłaszcza dotyczące chromosomu pary 7	MDS z obecnością pierścieniowych syderoblastów (MDS – RS) , często obecność mutacji w genie <i>SF3B1</i>
izolowana delecja długiego ramienia chromosomu pary 5 oraz del(5q) + inna współistniejąca aberracja niedotycząca chromosomu pary 7)	zespół „5q-”
Aberracja	podtyp MDS wg WHO 2016
izolowana delecja długiego ramienia chromosomu pary 5 oraz del(5q) + inna współistniejąca aberracja niedotycząca chromosomu pary 7)	zespół „5q-”
monosomia 7	MDS dziecięcy: manifestacja jako RCC (dziecięca cytopenia oporna na leczenie)
Wszystkie aberracje niesklasyfikowane wyżej	MDS niesklasyfikowany (MDS – U)

3.2 Zmiany molekularne w zespołach mielodysplastycznych

Badania dotyczące występowania wariantów sekwencji DNA o charakterze patogennym pojawiły się w przypadku zespołów mielodysplastycznych z początkiem lat 2000, czyli stosunkowo późno w porównaniu do badań molekularnych prowadzonych w ostrej białaczce szpikowej. Prawdziwym przełomem okazała się technika SNP (*single-nucleotide polymorphism*), metody klasycznej porównawczej hybrydyzacji genomowej

lub z wykorzystaniem mikromacierzy (CGH, *comparative genomic hybridization*, aCGH, *array comparative genomic hybridization*) oraz sekwencjonowanie [22]. Pozwoliły one na wykrycie zmian genetycznych dodatkowo u około 30% chorych z prawidłowym kariotypem [22, 27]. Dzięki nim wytypowano również po raz pierwszy geny, w których z największą częstością dochodziło do patogennych zmian sekwencji (mutacji), takie jak: *NRAS*, *TP53*, *ATRX* oraz *RUNX1* [27, 28]. Dalszy rozwój metod biologii molekularnej, zwłaszcza sekwencjonowania następnej generacji (NGS, *Next Generation Sequencing*), umożliwił poszerzenie obszaru badań. W ten sposób do bazy genów zaangażowanych w rozwój MDS dołączyły również *NPM1*, *TET2*, *EZH2*, *FLT3*, *KRAS*, *MPL*, *ASXL1*, *PTPN11*, *KIT* czy *CBL* [38, 39, 40, 41]. Dowiedziono ponadto, że u 65% pacjentów zmiany patogenne dotyczą genów splicingu RNA takich jak *SF3B1*, *SRSF2*, *U2AF1*, *ZRSR2*, 47% chorych jest nosicielami zmian w sekwencji DNA genów metylacji, takich jak *DNMT3A*, *IDH1/2*, *TET2*, a w 28% przypadków zmiany zaobserwowano w genach modyfikujących histony, m. in. *ASXL1*, *BCOR*, *EZH2* [42]. Natomiast warianty patogenne genów *DDX41*, *RUNX1*, *GATA2*, czy *TP53* mogą mieć charakter germinalny (dziedziczny) i predysponować do wystąpienia zespołu mielodysplastycznego czy ostrej białaczki szpikowej u ich nosicieli. Obecnie szacuje się, że patogenne warianty sekwencji DNA występują aż u 80% pacjentów z MDS [38, 40, 42]. Geny ulegające mutacjom w zespołach mielodysplastycznych przedstawiono w Tabeli nr 12.

Tab. 12. Geny ulegające mutacjom w MDS [18]

Nazwa genu	Lokalizacja chromosomowa	Częstość występowania [%]	Korelacja
Geny splicingowe			
<i>SF3B1</i>	2q33	20-30	najczęściej w typie MDS-RARS
<i>SRSF2</i>	17q25	10-15	częściej w CMML
<i>U2AF1</i>	21q22	5-12	Współistniejąca z del(20q)
Modyfikatory epigenetyczne			
<i>TET2</i>	4q24	20-30	częściej w CMML, współtowarzyszy mutacji <i>IDH2</i>
<i>DNMT3A</i>	2p23	8-13	
<i>ASXL1</i>	20q11	10-20	częściej w CMML
<i>EZH2</i>	7q36	<5	częściej w CMML, współistniejąca z del(7q)
<i>IDH1/2</i>	2q33/15q26	rzadkie	Częściej w AML
Czynniki transkrypcyjne			
<i>RUNX1</i>	21q22	10-15	Somatyczna lub germinalna
<i>TP53</i>	17p13	10-12	Częściej gdy kariotyp złożony
<i>ETV6</i>	12p13	<5	Somatyczna lub germinalna
<i>GATA2</i>	3q21	rzadko	Częściej germinalna
Kinazy i receptory			
<i>NRAS</i>	1p13	5-10	Częściej w progresji do AML
<i>JAK2</i>	9p24	<5	najczęściej w typie MDS-RARS-T
<i>CBL</i>	11q23	<5	Częściej w JMML (młodzieńczej białaczce mielomonocytovej)

Nazwa genu	Lokalizacja chromosomowa	Częstość występowania [%]	Korelacja
<i>PTPN11</i>	12q24	<5	Częściej w JMML (młodzieńczej białaczkę mielomonocytovej)
<i>BRAF</i>	7q34	rzadko	

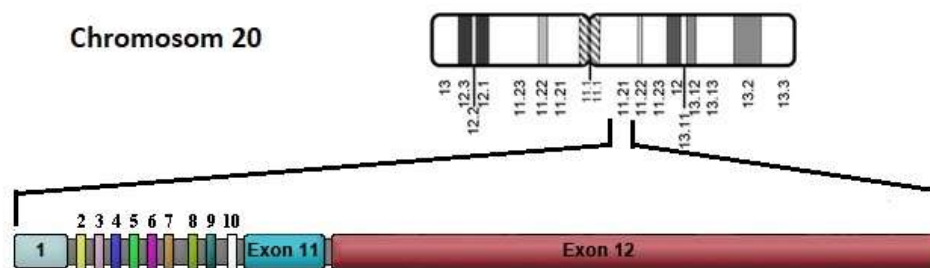
Należy jednak pamiętać, że do tej pory nie udało się wytypować genów, których patogenne warianty sekwencji ściśle korelowałyby z zespołem mielodysplastycznym. W wielu przypadkach ich występowanie związane jest z rozpoznaniem innych zespołów mieloproliferacyjnych czy idiopatycznej cytopenii o nieokreślonym pochodzeniu (ICUS), klonalnej cytopenii o nieokreślonym pochodzeniu (CCUS), klonalnej hematopoezie o nieokreślonym potencjale (CHIP) lub idiopatycznej dysplazji o nieokreślonym znaczeniu (IDUS) [18].

W związku z powyższym występowanie tylko mutacji w badanych genach nie może stanowić podstawy do rozpoznania zespołu mielodysplastycznego [18].

3.2.1 Gen *ASXL1*

Gen *ASXL1* (*Additional sex combs like 1*) podobnie jak *ASXL2* oraz *ASXL3* należy do rodziny genów *ASXL* homologicznych do genu *ASX* u *Drosophila*. U człowieka zlokalizowany jest na chromosomie pary 20 (20q11) i zbudowany jest z 12 eksonów. Białko będące produktem ekspresji *ASXL1* należy do grupy białek Polycomb, których funkcją jest między innymi zdolność do remodelowania struktury chromatyny oraz udział w epigenetycznej regulacji ekspresji genów [43, 44]. Mutacje w genie *ASXL1* występują z częstością od 10-29% wszystkich zespołów mielodysplastycznych, w 40% przypadków przewlekłej białaczki mielomonocytovej (CMML, ang. *Chronic myelomonocytic leukemia*) oraz 17% przypadków ostrej białaczki szpikowej i stanowią niekorzystny czynnik rokowniczy [35, 43].

Mechanizmy prowadzące do wystąpienia mutacji genu *ASXL1* w MDS nie są jasne. Dowiedziono jednak, że dotyczą one C-terminalnego końca białka będącego produktem jego ekspresji. W wyniku mutacji, prowadzącej do zmiany ramki odczytu bądź przedwczesnego pojawienia się kodonu STOP, zmodyfikowana struktura białka prowadzi do nieregulowanej aktywacji transkrypcji [45]. Zauważono również, że mutacje genu *ASXL1* częściej współistnieją z mutacjami w genach *RUNX1* oraz *TET2*, a z mniejszą częstotliwością z genami *DNMT3A* czy *JAK2* [35, 43, 44]. Budowę genu *ASXL1* przedstawiono na Rycinie nr 3.

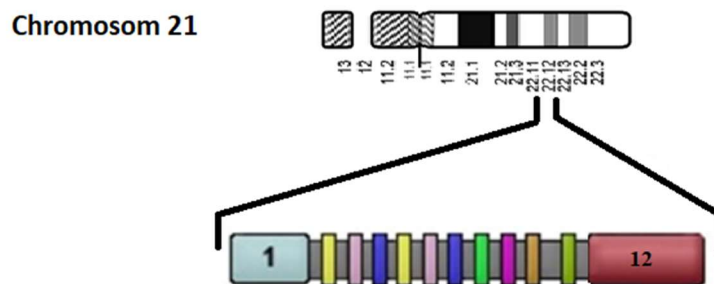


Ryc. 3. Budowa genu *ASXL1*

[źródło: <http://atlasgeneticsoncology.org/Genes/ASXL1ID44553ch20q11.html> z modyfikacjami]

3.2.2 Gen *RUNX1*

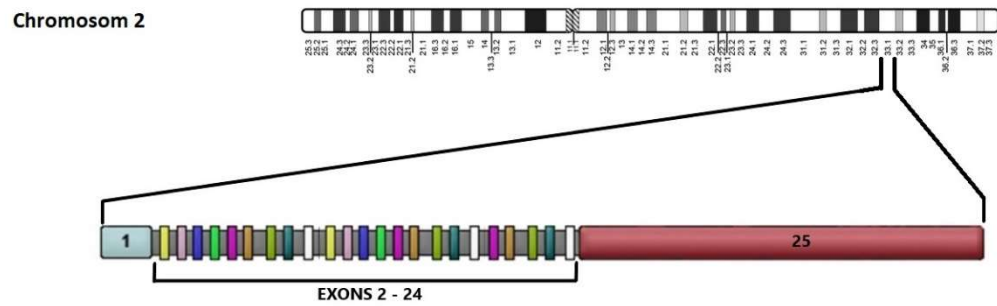
Gen *RUNX1* (*Runx Family Transcription Factor 1*) należy do rodziny czynników transkrypcyjnych, tworzących kompleks z kofaktorem *CBFB*. U człowieka zlokalizowany jest na chromosomie pary 21 (21q22) i zbudowany jest z 12 eksonów. Kompleks ten zapewnia stabilność białku *RUNX1*, które bierze udział w wytwarzaniu krwiotwórczych komórek macierzystych i ich różnicowaniu w linie mieloidalne i limfoidalne [35]. Gen *RUNX1* pierwotnie został zidentyfikowany jako partner biorący udział w translokacji t(8;21), charakterystycznej dla ostrej białaczki szpikowej oraz w translokacji t(12;21) u chorych z ostrą białaczką limfoblastyczną [35]. Dopiero później zauważono, że jego mutacje również zaangażowane są w rozwój MDS. Do tej pory dowiedziono, że u pacjentów z zespołem mielodysplastycznym mutacje w genie *RUNX1* najczęściej dotyczą przesunięcia ramki odczytu, co skutkuje zmianą w budowie białka będącego jego produktem i utratą jego funkcji lub zmianą budowy C-terminalnego końca domeny białkowej [35]. Niezależnie od rodzaju mutacji jej obecność jest niekorzystnym czynnikiem prognostycznym w MDS [35]. Budowę genu *RUNX1* przedstawiono na Rycinie nr 4.



Ryc. 4. Budowa genu *RUNX1* [<http://atlasgeneticsoncology.org>, <https://iscn.karger.com/ISCN/ISCN2020/chapter2#fig05>]

3.2.3 Gen *SF3B1*

Gen *SF3B1* (*Splicing factor 3b subunit 1*) to gen kodujący podjednostkę 1 kompleksu białkowego czynnika splicingowego 3b. Należy do rodziny genów *U2 snRNP* i zlokalizowany jest na długim ramieniu chromosomu pary 2 (2q11). Czynn timer splicingowy 3b, wraz z czynnikiem splicingowym 3a i jednostką 12S RNA, tworzą kompleks małych rybonukleoprotein jądrowych U2 (*U2 snRNP*). Mutacje *SF3B1* opisano w kilku jednostkach chorobowych. W zespołach mielodysplastycznych występują one z częstością około 20-30% oraz silnie korelują z podtypem MDS charakteryzującym się obecnością pierścieniowych syderoblastów. Obecność mutacji w genie *SF3B1* stanowi dobry czynnik rokowniczy i pozwala na postawienie diagnozy zespołu mielodysplastycznego u pacjentów z niskim odsetkiem blastów (<5%) i słabo wyrażonymi innymi objawami [42]. Budowę genu *SF3B1* przedstawiono na Rycinie nr 5.



Ryc. 5. Budowa genu *SF3B1*

[https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/gdv/browser/genome/?id=GCF_000001405.39,

<https://iscn.karger.com/ISCN/ISCN2020/chapter2#fig05>]

II. Cel pracy

Głównym celem niniejszej pracy była charakterystyka aberracji chromosomowych u chorych z rozpoznaniem zespołu mielodysplastycznego, jak również ocena częstości występowania dwóch wybranych wariantów sekwencji DNA genów: *ASXL1* i *RUNX1* (nieopisanych wcześniej w zespołach mielodysplastycznych, a wykrytych z wykorzystaniem metody NGS) oraz znanego wariantu sekwencji genu *SF3B1* (raportowanego wcześniej w literaturze).

Cel główny zrealizowano poprzez cele szczegółowe takie jak:

1. charakterystyka aberracji chromosomowych w przebiegu zespołu mielodysplastycznego,
2. analiza częstości występowania wariantu sekwencji DNA c.1945G>T genu *ASXL1*, c.1874G>T genu *SF3B1* oraz c.502-2A>C genu *RUNX1* z zastosowaniem metody pirosekwencjonowania,
3. porównanie występowania badanych wariantów sekwencji w grupie pacjentów z kariotypem prawidłowym i w grupie pacjentów z aberracjami chromosomowymi w kariotypie w przebiegu zespołu mielodysplastycznego,
4. ocena przydatności metody pirosekwencjonowania w diagnostyce genetycznej zespołów mielodysplastycznych.

III. Materiały i metody

1. Charakterystyka grupy badanej

Grupę badaną stanowili pacjenci z rozpoznaniem zespołu mielodysplastycznego skierowani na badanie cytogenetyczne do Pracowni Cytogenetyki Laboratorium Diagnostyki Hematologicznej.

W czasie prowadzenia badania w latach 2008 – 2020 do Pracowni Cytogenetyki skierowano na badanie 452 pacjentów z rozpoznaniem zespołu mielodysplastycznego.

Kryterium włączenia pacjenta do badania było:

- potwierdzenie rozpoznania zespołu mielodysplastycznego,
- uzyskanie wyniku badania cytogenetycznego w dwóch punktach czasowych, przy czym czas pomiędzy kolejnymi badaniami nie mógł być krótszy niż 180 dni (czas na weryfikację wstępnego rozpoznania, wykonanie dodatkowych badań potwierdzających rozpoznanie, wykluczenie pacjentów transformujących do AML),
- dostępność materiału genetycznego do badań metodami biologii molekularnej.

Zgodnie z założonymi kryteriami z 452 pacjentów z podejrzeniem zespołu mielodysplastycznego 95 skierowano na badanie metodami cytogenetyki klasycznej w dwóch punktach czasowych (potwierdzono wstępne rozpoznanie MDS). U dwóch pacjentów nie uzyskano metafaz w jednym z punktów czasowych. Kariotyp uzyskano u 93 pacjentów, przy czym u 80 z nich zachowane zostało kryterium co najmniej 180 dni pomiędzy pierwszym i drugim badaniem cytogenetycznym. Zabezpieczony po hodowli materiał biologiczny pozwolił na uzyskanie całogenomowego DNA u 59 z 80 pacjentów. Reasumując analizę cytogenetyczną wykonano u 80 pacjentów, natomiast analizę wariantów sekwencji wybranych genów u 59 pacjentów.

W związku ze zmniejszeniem się grupy badanej z 80 do 59 chorych poddanych analizie metodami biologii molekularnej w toku prowadzonych badań podjęto decyzję o powiększeniu badanej grupy o 41 chorych z rozpoznaniem zespołu mielodysplastycznego, u których takie same analizy wykonano w jednym punkcie czasowym.

Pozwoliło to na dokładniejsze określenie częstości występowania wytypowanych wariantów w sekwencji DNA u pacjentów z zespołem mielodysplastycznym.

2. Materiał do badań

Materiałem do badań był szpik kostny pobierany od pacjentów z rozpoznanym zespołem mielodysplastycznym w dwóch punktach czasowych. W miarę możliwości dokonywano pobrania w momencie rozpoznania i w toku leczenia/obserwacji pacjenta w związku z rozpoznaniem zespołu mielodysplastycznego - wykonanie drugiego badania cytogenetycznego u pacjenta zależało od jego stanu klinicznego i decyzji lekarza prowadzącego.

Badania wykonano po uzyskaniu zgody Komisji Bioetycznej przy Uniwersytecie Medycznym im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu (Nr Uchwały 194/19 z dnia 7. lutego 2019 roku).

3. Pobieranie materiału

Materiał pobierany był przez wykwalifikowany personel lekarski i pielęgniarski Katedry i Kliniki Hematologii i Transplantacji Szpiku Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu, Oddziału Hematologii Szpitala MSWiA w Poznaniu, Poradni Hematologicznej ARS MEDICAL w Pile, Warmińsko-Mazurskiego Centrum Onkologii w Olsztynie, Pleszewskiego Centrum Onkologii w Pleszewie oraz Kliniki Onkologii i Hematologii Pediatrycznej Szpitala Klinicznego im. K. Jonschera w Poznaniu. Pobranie materiału do badania cytogenetycznego odbywało się metodą aspiracji cienkoigłowej szpiku kostnego z talerza kości biodrowej lub mostka. Materiał kolekcjonowany był do sterylnych probówek zawierających antykoagulant w postaci litowej heparyny. Objętość pobranego szpiku kostnego wynosiła minimum 4 ml.

4. Zakładanie i hodowla pobranego materiału

Pobrany materiał był dostarczany do Pracowni Cytogenetyki, Laboratorium Diagnostyki Hematologicznej Szpitala Klinicznego Przemienienia Pańskiego w Poznaniu w dniu pobrania w przypadku jednostek kierujących z województwa wielkopolskiego (Poznań, Piła, Pleszew) lub w ciągu 24 h od pobrania materiału w przypadku pacjentów diagnozowanych i leczonych w jednostce w Olsztynie.

Transport materiału odbywał się zgodnie z zaleceniami, w odpowiedniej temperaturze i z zachowaniem warunków transportu materiału biologicznego. Procedura analizy cytogenetycznej rozpoczynała się w momencie założenia hodowli komórkowych. W ich skład wchodziło odpowiednie medium do hodowli, w postaci podłoża hodowlanego RPMI 1640 (stanowiącego 75% całej zawiesiny tj. około 7,5 ml), surowicy płodowej bydlęcej (FBS) (stanowiącego 15% całej zawiesiny tj. około 1,5 ml) oraz zawiesiny komórek szpiku kostnego pobranej od pacjentów (10% czyli około 1 ml). Założenie hodowli komórkowej poprzedzone było wykonaniem badania parametrów morfologii z wykorzystaniem analizatora hematologicznego (Yumizen H500, 5 diff, Horriba). Na podstawie otrzymanego wyniku wartości WBC (białe krwinki ang. *white blood cells*) dokonywano obliczenia objętości szpiku, który należało wykorzystać w każdej hodowli komórkowej. W celu uzyskania najwyższego indeksu mitotycznego, przygotowywano zawiesiny hodowli komórkowej, w których obecny był milion komórek jądrzastych na 1 ml hodowli komórkowej. Jeżeli objętość zużytego do założenia hodowli komórkowej szpiku kostnego była mniejsza niż 1 ml, odpowiednio modyfikowano ilość medium według zasady 75%-15%-10%. Hodowlę prowadzono w naczyniach hodowlanych typu t-flask o pojemności 25 cm² (używane były rutynowo do 2016 roku) lub probówkach Bioreaktor o pojemności 15 ml (wprowadzono do użytku w 2017 roku), wyposażonych w korki z filtrem, opisanych danymi pacjenta, nadanym numerem oraz czasem hodowli. Dla każdego pacjenta przeprowadzano dwie lub cztery hodowle 24-godzinne i 48-godzinne. Dwie hodowle (jedna krótsza i jedna dłuższa) wzbogacone zostały stymulatorem wzrostu linii mieloidalnej. W przypadku zespołów mielodysplastycznych standardowo stosowano G-CSF (*granulocyte colony stimulating factor*), preparat leczniczy, zawierający w swoim składzie substancję czynną filgrastym (rekombinowany ludzki czynnik pobudzający wzrost kolonii granulocytów) w ilości 7,5 µg na 10 ml całej hodowli. Procedurę założenia hodowli komórkowej przeprowadzano się w warunkach sterylnych, które zapewniała komora o przepływie laminarnym. Następnie butelki hodowlane umieszczano w inkubatorze i prowadzono hodowlę w systemie otwartym, w temperaturze 37°C, w atmosferze 5% dwutlenku węgla (CO₂).

5. Kończenie hodowli komórkowej

Celem tej procedury było uzyskanie metafaz do późniejszej analizy GTG. Standardowe etapy procedury zostały przedstawione poniżej.

5.1 Przygotowanie roztworu chlorku potasu i utrwalacza Carnoy'a

Wykorzystywany podczas procedury kończenia hodowli roztwór chlorku potasu o stężeniu 0,075 M otrzymywano poprzez rozpuszczenie 2,8 g chlorku potasu cz.d.a. w 500 ml wody destylowanej. Objętość podana do każdej hodowli komórkowej to około 10 ml.

Utrwalacz Carnoy'a czyli roztwór metanolu i stężonego kwasu octowego w stosunku 3:1 przygotowywany był przed rozpoczęciem procedury kończenia hodowli i schłodzony do temperatury -20°C. Objętość podawana do każdej hodowli komórkowej to około 7 ml. Czynność powtarzana była minimum 3 razy.

5.2 Przebieg procedury

Procedura kończenia hodowli rozpoczynała na pół godziny przed planowanym czasem zakończenia hodowli. W pierwszym etapie do hodowli komórkowej podana była N-diacetylo-N-metylokolchicyna, pochodna kolchicyny o stężeniu 0,010 mg/1 ml, w ilości 10 µl na 1 ml zawiesiny hodowlanej, w postaci preparatu handlowego Colcemid® (KaryoMax®, Gibco). Jego zadaniem było zatrzymanie podziałów komórkowych w stadium metafazy podziału mitotycznego poprzez wykorzystanie właściwości depolimeryzujących mikrotubule w dzielących się komórkach. Pozwalało to na uwidocznienie struktury chromosomów w momencie gdy chromatyna wraz z DNA jądrowym jest najsilniej skondensowana.

Etap ten zakończony był przeniesieniem zawiesiny komórek z naczyń hodowlanych do odpowiednio opisanych probówek stożkowych o pojemności 15 ml (jeśli hodowla prowadzona była w probówkach typu bioreaktor etap przeniesienia z naczynia hodowlanego był pomijany). W ten sposób przygotowane hodowle umieszczane były w wirówce, w celu usunięcia medium hodowlanego poprzez wirowanie zawiesiny przez 10 minut przy prędkości obrotowej 600 g w temperaturze 4°C lub przez 10 minut w temperaturze pokojowej przy prędkości obrotowej 450 g. Drugim etapem było usunięcie supernatantu przy użyciu pompki ciśnieniowej lub jałowej pipety

pasterowskiej, tak aby nie naruszyć uzyskanego osadu. W celu wywołania szoku osmotycznego dodano 0,075 M roztworu KCl. Ilości dodawanego roztworu była zależna od objętości pierwotnej hodowli oraz wielkości uzyskanego osadu jednak było to nie mniej niż 10 ml do każdej odwirowanej zawiesiny komórek. Aby uzyskać możliwie najlepszy efekt roztwór podawano kroplami jednocześnie mieszając zawiesinę komórek z wykorzystaniem wytrząsarki typu vortex. Przygotowane w ten sposób osady komórkowe zawieszone w KCl poddawano inkubacji przez 20 minut w inkubatorze w temperaturze 37°C, w którym wcześniej prowadzono hodowlę komórkową. Etap ten również kończył się wirowaniem zawiesiny przez 10 minut w temperaturze pokojowej przy prędkości obrotowej 450 g. Ostatnim etapem procedury kończenia hodowli komórkowej było zlanie supernatantu i podanie roztworu Carnoy'a. Pełniący rolę utrwalcza dla hodowanych komórek szpiku kostnego roztwór utrwalcza dodawało się w ilości co najmniej 7 ml, kroplami jednocześnie mieszając zawiesinę komórek z wykorzystaniem wytrząsarki typu vortex. Czynność ta powtarzana była minimum trzykrotnie. Po każdym podaniu roztworu Carnoy'a zawiesinę komórek wirowano w temperaturze 4°C i przy prędkości obrotowej 600 g. Utrwalona w ten sposób zawiesina komórek przechowywana była w zamrażarce w temperaturze -20° C.

6. Metody badań

6.1 Cytogenetyka klasyczna

Klasyczne badanie cytogenetyczne polega na analizie chromosomów, znajdujących się w stadium metafazy podziału mitotycznego. W diagnostyce stosuje się technikę barwienia różnicującego określaną jako barwienie prążkowe lub techniki prążkowe. Najczęściej stosowane są metody barwienia, pozwalające na zidentyfikowanie chromosomów homologicznych poprzez otrzymanie wzoru prążków G [45].

6.1.1 Przygotowanie preparatów

Preparaty do analizy cytogenetycznej przygotowywane były według procedury rutynowo stosowanej w Pracowni Cytogenetyki.

Szkiełka podstawowe moczoło przez 24 godziny w kwasie solnym, a następnie przemywano wodą destylowaną i 96% alkoholem etylowym. Po tym czasie odpowiednio opisane numerem pacjenta i rodzajem hodowli komórkowej umieszczane były nad łożnią

wodną nagrzaną do około 90°C. Wcześniej zakończone hodowle komórkowe przygotowywano poprzez rozcieńczanie lub zagęszczanie za pomocą utrwalacza Carnoy'a w celu uzyskania zawiesiny o odpowiedniej gęstości (dobieranej doświadczalnie). Na rozgrzane szkiełka podstawowe nakrapiano przygotowany materiał za pomocą jałowej pipetki pasterowskiej, rozprowadzając jednocześnie zawiesinę na całej powierzchni szkiełka. Przygotowane szkiełka pozostawano nad łaźnią wodną przez około 4 minuty. Zastosowanie wysokiej temperatury i odpowiedniej wilgotności umożliwiało otrzymanie preparatów mikroskopowych o parametrach pozwalających na analizę płytek metafazowych o wysokiej jakości.

Natomiast umieszczenie preparatów w piecu nagrzanym do temperatury 80°C na 60 minut pozwalało na przyspieszenie procedury utrwalenia materiału na szkiełkach oraz odpowiedniego przygotowania do barwienia barwnikiem Giemzy.

6.1.2 Przygotowanie buforów, przeprowadzenie trawienia i barwienia preparatów cytogenetycznych.

Procedura barwienia preparatów i uzyskania prążków G przeprowadzana była według następującego schematu:

- Trawienie preparatów w temperaturze 37°C w łaźni wodnej w roztworze trypsyny
- Płukanie preparatów w szeregu buforów
- Barwienie w 4% roztworze Giemzy

Przeprowadzenie procedury wymagało przygotowania poszczególnych buforów. Bufor do „trypsynowania” wykorzystywany był w celu rozpuszczenia enzymu proteolitycznego – trypsyny. W skład buforu wchodziły bufony fosforanowe Söerensena tj. KH_2PO_4 o stężeniu 0,07 mol (roztwór A) otrzymywany w wyniku rozpuszczenia 9,07 g KH_2PO_4 w 1 litrze wody destylowanej oraz $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12 \text{ H}_2\text{O}$ o stężeniu 0,07 mol (roztwór B) otrzymywany w wyniku rozpuszczenia 23,87 g Na_2HPO_4 w 1 litrze wody destylowanej.

Wyżej wymienione bufony fosforanowe mieszane były stosunku 1:1. W związku z tym w celu przygotowania 100 ml roztworu roboczego stosowano 50 ml roztworu A i 50 ml roztworu B, który w kominku typu Coplin lub Hellendahl, umieszczany był w łaźni wodnej ogrzanej do temperatury 37°C. Do tak przygotowanego i ogrzanego roztworu roboczego dodawano enzymu trypsyny o stężeniu 0,023% na 10 ml buforu

A+B. Czas trypsynowania dobierany był indywidualnie dla każdego pacjenta. Najczęściej jednak wynosił 10 sekund. Czas ten pozwalał na uzyskanie odpowiedniej jakości wzoru prążkowego.

W celu zatrzymania reakcji trawienia preparatu trypsyną dokonywano przepłukania preparatów w szeregu trzech buforów w następującej kolejności: bufor A i B (stosunek 1:1), płyn Hanks'a, bufor A i B (stosunek 1:1). W trakcie prowadzenia badań procedura barwienia preparatów uległa modyfikacji - dla pacjentów włączonych do badania po 2018 roku stosowano gotowy bufor A i B w postaci tabletek do rozpuszczenia w wodzie destylowanej. Skład i stężenie buforu pozostało bez zmian, natomiast procedura przygotowania w/w buforów uległa uproszczeniu. Ostatnim etapem było barwienie szkiełek w roztworze Giemzy, który otrzymywano poprzez zmieszanie w stosunku 1:1 buforów fosforanowych Söerensena A i B i barwnika Giemzy. Do analizy GTG wykorzystywano 76 ml w/w buforu (38 ml roztworu A i 38 ml roztworu B) oraz 4 ml barwnika Giemzy. Zastosowanie powyżej opisanej procedury prowadziło do otrzymania preparatów barwionych metodą określaną jako GTG (G - prążki G, T - trypsyna, G - barwnik Giemza).

W celu pozbycia się ewentualnych zanieczyszczeń, mogących niekorzystnie wpłynąć na jakość wybarwianych preparatów otrzymany roztwór Giemzy filtrowano trzykrotnie przy użyciu bibuły Watmana 3MM. Po zmianie procedury i rozpoczęciu stosowania gotowego buforu A i B odstąpiono od procedury filtracji.

6.1.3 Analiza preparatów barwionych metodą GTG

Opisana wyżej procedura miała na celu uwidocznienie prążków G. Zastosowana technika trawienia preparatów roztworem zawierającym w swoim składzie enzym proteolityczny - trypsynę, pozwalała na uzyskanie charakterystycznego wzoru prążkowego poprzez naruszenie struktury białek histonowych. Efektem tego było upośledzenie zdolności wiązania się roztworu Giemzy do specyficznych regionów kwasu deoksyrybonukleinowego chromosomów (brak powinowactwa do barwnika kationowego, jakim jest błękit metylenowy obecny w roztworze Giemzy), czego wynikiem była możliwość obserwacji charakterystycznego wzoru - jasnych i ciemnych prążków. Regiony chromosomowe, które uległy zabarwieniu określane były mianem prążków pozytywnych (bogatszych w zasady azotowe adeninę i tyminę, uboższych

w sekwencji kodujące), natomiast te nie ulegające barwieniu to prążki negatywne (bogatsze w zasady azotowe cytozynę i guaninę) [45, 46].

Po zakończeniu procesu barwienia szkiełek z materiałem pacjentów dokonywano wyszukiwania obrazów płytek metafazowych z zastosowaniem systemu do automatycznego wyszukiwania metafaz w przygotowanych preparatach mikroskopowych. W tym celu wykorzystano mikroskop AXIO Imager Z.2 firmy Zeiss wyposażony w stolik do automatycznego wyszukiwania płytek metafazowych i oprogramowanie Metafer firmy Metasystems®. System ten pozwalał na wykonanie zdjęć z każdego z analizowanych preparatów i skatalogowanie ich wraz z automatycznym zapisaniem współrzędnych każdego zdjęcia, a następnie transfer zdjęć wybranych płytek metafazowych do kompatybilnego programu Ikaros i zapisanie ich w folderze odpowiadającemu numerowi pacjenta nadanym na początku całej procedury. Dzięki zastosowanemu oprogramowaniu można było poddać analizie minimum 20 metafaz. Natomiast w przypadku pacjentów, u których obserwowano mniejszą liczbę metafaz, ze względu na niski indeks mitotyczny, przeprowadzano analizę minimum 10 metafaz. Ostateczny wynik badania cytogenetycznego zapisywany był zgodnie z wprowadzonym po raz pierwszy w 1963 roku i zaktualizowanym w roku 2020, uniwersalnym systemem nomenklatury cytogenetycznej *ISCN (An International System For Human Cytogenetic Nomenclature)* rekomendowanym przez International Standing Committee on Human Cytogenetic Nomenclature [47].

6.2 Biologia molekularna

Z badanej grupy pacjentów, u których materiał do badania metodą cytogenetyki klasycznej pobrany był dwukrotnie w różnych punktach czasowych, po wykonaniu analizy GTG i określeniu kariotypu, wytypowano 80 pacjentów, u których z zabezpieczonego peletu komórkowego wyizolowano DNA wg opisanego w pracy protokołu izolacji na aparacie MagCore.

Po izolacji oceniono stężenie i jakość uzyskanego DNA z wykorzystaniem metody spektrofotometrycznej i wybrano ostateczną grupę 59 pacjentów, u których wykonano analizę wariantów sekwencji trzech wybranych genów: *ASXL1*, *SF3B1*, *RUNX1* metodą pirosekwencjonowania.

Następnie powyższa grupa została powiększona o 42 pacjentów z rozpoznaniem zespołu mielodysplastycznego oraz 11 pacjentów z wtórną ostrą białaczką szpikową, u których wykonano analizę w jednym punkcie czasowym.

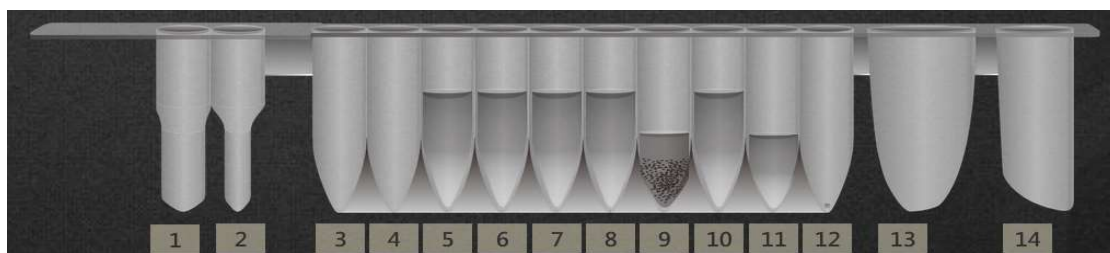
6.2.1 Izolacja genomowego DNA

Z zabezpieczonych hodowli komórkowych, pobierano do nowej probówki typu Eppendorf opisanej numerem pacjenta całość zawiesiny komórkowej. Przygotowanie komórek do izolacji za pomocą systemu MagCore® odbywało się w następujących etapach:

1. Pobrana zawiesina wirowana była w wirówce MiniSpin przez 5 minut przy prędkości obrotowej 1200 g, w temperaturze 4°C.
2. Usuwano supernatant przy użyciu pipety automatycznej i zawieszano komórki w 500 µl schłodzonego 70% alkoholu etylowego, całość mieszano poprzez delikatne pipetowanie zawiesiny. Etap ten powtarzano dwukrotnie każdorazowo wirując zawiesinę w wirówce MiniSpin przez 5 minut przy prędkości obrotowej 1200 g, w temperaturze 4°C.
3. Przygotowany w ten sposób pelet komórkowy zawieszany był w 200 µl buforowanego roztworu soli fizjologicznej bez jonów magnezu i sodu i umieszczany w aparacie do automatycznej izolacji kwasów nukleinowych.

Izolację wykonywano z wykorzystaniem procedury dedykowanej dla stosowanego kitu nr 101 - MagCore® Genomic DNA Whole Blood Kit (Speedy Installation) zawierającego kartridż oraz probówki do elucji i kompatybilne sterylne tipsy do przeprowadzenia izolacji w systemie zamkniętym. W skład kartridża wchodziły odczynniki oraz puste dołki, przedstawione graficznie na Rycinie nr 6, zapewniające odpowiednie warunki izolacji i oczyszczenia końcowego produktu jakim było DNA pacjenta.

Każda izolacja zakończona była określeniem stężenia oraz sprawdzenia jakości wyizolowanego DNA za pomocą spektrofotometru Nanodrop ND-1000.



Ryc. 6. Schemat kartridża z buforami do izolacji DNA metodą automatyczną MagCore® Genomic DNA Whole Blood Kit (Speedy Installation) firmy RBC; 1 – pusty dołek; 2 – 3 blok do podgrzania izolowanego materiału biologicznego poddawanego izolacji, 4 – 5 puste dolki, 6 – bufor elucyjny, 7 – ddH₂O (podwójnie dejonizowana woda), 8 – 9 bufory myjące, 10 – mieszanina kulek magnetycznych, 11 – bufor wiążący, 12 – bufor lizujący, 13 – proteinaza K, 14 – miejsce separacji produktów izolacji z użyciem kulek magnetycznych [48]

6.2.2. Zmiany molekularne analizowane w niniejszej w pracy

Zastosowanie metody pirosekwencjonowania oraz wybór określonych zmian w sekwencji DNA, które zostały poddane analizie w niniejszej pracy nie był przypadkowy. Wcześniej prowadzone badania zespołu naukowców z Katedry i Kliniki Hematologii i Transplantacji Szpiku oraz Zakładu Genetyki Nowotworów Instytutu Genetyki Człowieka PAN w Poznaniu pozwoliło na wytypowanie mutacji występujących z większą częstością (*hot-spot*) u pacjentów z rozpoznaniem MDS.

Wyżej wymienione badania opierały się o sekwencjonowanie następnej generacji (NGS) z wykorzystaniem platformy MiSeq firmy Illumina dla 9 genów (67 eksonów, 91 amplikonów) (Tabela nr 13) u 15 pacjentów z rozpoznaniem zespołu mielodysplastycznego. Materiałem do badań był szpik kostny. Wybór genów oparty został natomiast o opublikowane w międzynarodowych czasopismach aktualne doniesienia zespołów badawczych zajmujących się tematyką MDS [49, 50, 51]. Wyniki badań NGS zostały poddane analizie bioinformatycznej oraz potwierdzone dwoma metodami: sekwencjonowaniem Sangera oraz pirosekwencjonowaniem.

Tab. 13. Zmiany molekularne analizowane w przy pomocy NGS

Nazwa genu	Analizowane eksony
<i>ASXL1</i>	12
<i>RUNX1</i>	3 – 8
<i>SF3B1</i>	12 – 16
<i>U2AF 1</i>	2 oraz 6
<i>SRSF 2</i>	1
<i>ZRSR 2</i>	Cały region kodujący
<i>TET2</i>	3 – 11
<i>DNMT3A</i>	2 – 23
<i>TP53</i>	2 – 11

Na tej podstawie potwierdzono przydatność metody pirosekwencjonowania w przypadku poszukiwania wariantów sekwencji DNA poszczególnych genów o udowodnionym związku z występowaniem zespołów mielodysplastycznych oraz wytypowano warianty sekwencji DNA, spośród których trzy dotyczące genów *ASXL1*, *SF3B1* oraz *RUNX1* analizowane są w niniejszej pracy (Tabela nr 14) (pełne wyniki sekwencjonowania NGS, na podstawie których wytypowano mutacje do analizy w tej pracy znajdują się w Zakładzie Genetyki Nowotworów, IGCz PAN).

Tab. 14. Zmiany molekularne analizowane w pracy

Nazwa genu	Analizowana zmiana	Typ zmiany	Lokalizacja (zgodnie z GRCh37/hg19)	Predyktor FATHMM
<i>ASXL1</i>	c.1945G>T	Nonsens (kodon stop)	chr20:31022460	0,92
<i>RUNX1</i>	c.509-2A>C	Wariant splicingowy	chr21:36231877	0,94
<i>SF3B1</i>	c.1874G>T	Missens (zamiana aminokwasu argininy na leucynę)	chr2:198267483	0,99

Wszystkie trzy zmiany analizowane w pracy miały charakter patogeny (z wynikiem na poziomie 0,92-0,99 wyznaczonym z użyciem narzędzia predykcyjnego FATHMM, *Functional Analysis through Hidden Markov Models*) i były zareportowane w bazie COSMIC (*Catalogue of Somatic Mutations in Cancer*). Dwa z nich: wariant c.1945G>T genu *ASXL1* oraz c.509-2A>C genu *RUNX1* były zmianami wcześniej nieopisanymi w zespołach mielodysplastycznych.

Wariant c.1945G>T genu *ASXL1* to substytucja nukleotydu guaniny na tyminę w pozycji 1945 sekwencji kodującej. Zmiana indukowana tą substytucją ma charakter nonsens, a więc skutkuje pojawieniem się w sekwencji aminokwasowej kodowanego przez ten gen białka aminokwasu glicyny i powstaniem kodonu stop. Utworzone w ten

sposób białko ma skróconą sekwencję aminokwasów a tym samym upośledzone funkcje. Zmiana ta do tej pory raportowana była u pacjentów z ostrą białaczką szpikową.

Wariant c.509-2A>C genu *RUNX1* to substytucja nukleotydu adenozyiny na cytozynę w pozycji 509-2, czyli przed początkiem eksonu (miejsce łączenia sekwencji intron/ekson), co określane jest mianem wariantu splicingowego. Zmiana ta ma wpływ na przebieg procesu splicingu czyli przygotowania matrycy RNA do translacji (procesu powstania białka kodowanego przez ten gen). Sposób przebiegu splicingu wynikający z pierwotnej sekwencji DNA na matrycy, którego powstało RNA ma wpływ na strukturę i funkcje powstałego białka. Zmiana ta również do tej pory raportowana była u pacjentów z ostrą białaczką szpikową.

Natomiast wariant c.1874G>T w genie *SF3B1* to substytucja nukleotydu guaniny na tyminę w pozycji 1874 sekwencji kodującej, która ma charakter missens i powoduje zmianę aminokwasu argininy na leucynę, co skutkuje zmienioną strukturą białka. Zmiana ta była już raportowana u pacjentów z zespołem mielodysplastycznym.

Ponadto w toku prowadzonych badań na podstawie powyższego badania NGS poszerzono grupę badaną w niniejszej pracy o 41 chorych z rozpoznanym zespołem mielodysplastycznym (badanie wykonano tylko w jednym punkcie czasowym), u których również wykonano analizę patogennego wariantu sekwencji DNA c.1945G>T genu *ASXL1*, c.1874G>T genu *SF3B1* oraz c.502-2A>C genu *RUNX1*.

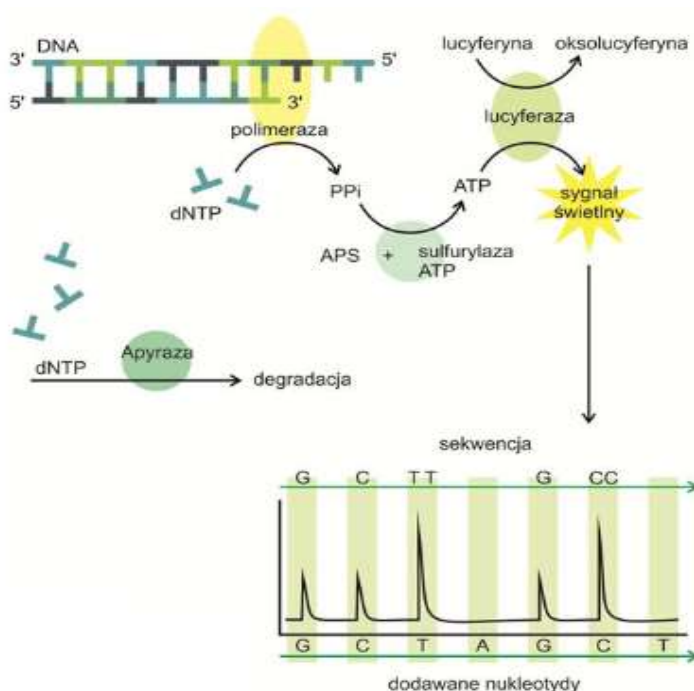
6.2.3 Projektowanie starterów

Startery użyte do reakcji PCR zaprojektowano za pomocą programu Primer3Plus (<https://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>). Natomiast startery wykorzystane w reakcji pirosekwencjonowania zostały zaprojektowane w programie Pyro Mark Assay Design 2.0. Specyficzność starterów sprawdzono za pomocą darmowego narzędzia internetowego Primer-BLAST.

6.2.4 Pirosekwencjonowanie

Pirosekwencjonowanie to metoda sekwencjonowania DNA w czasie rzeczywistym [48], w której wykorzystuje się jednoniciowe fragmenty DNA amplifikowane w reakcji PCR ze starterami, z których jeden znakowany był biotyną. Uzyskanie wyznakowanej jednoniciowej sekwencji jest możliwe dzięki związaniu produktów reakcji PCR ze złożem opłaszczonym streptawidyną, a następnie

przeprowadzenie denaturacji i odpłukanie sekwencji niewyznakowanej [52]. Do przygotowanej w ten sposób matrycy dodawany był starter sekwencyjny, który umieszczano w sekwenatorze wraz z enzymami biorącymi udział w reakcji tj.: polimerazą DNA, sulfurylazą, lucyferazą oraz apyrazą i ich substratami: adenozyno-5'-fosfosiarczanem i lucyferyną w odpowiednich proporcjach. Do tej mieszaniny w trakcie sekwencjonowania podawane były trifosforany deoksyrybonukleotydów, które na zasadzie komplementarności łączyły się z matrycą. Połączenie trifosforanu deoksyrybonukleotydu możliwe było dzięki obecności polimerazy DNA, która podczas reakcji uwalnia pirofosforan. Obecna w mieszaninie sulfurylaza przekształca pirofosforan do ATP z wykorzystaniem adenozyno-5'-fosfosiarczanu. Natomiast ATP pozwalało na przekształcenie lucyferyny w oksylucyferynę z wykorzystaniem enzymu lucyferazy. Kaskada tych reakcji enzymatycznych prowadziła do emisji sygnału świetlnego. Jego intensywność była wprost proporcjonalna do ilości nukleotydów wbudowanych do matrycy DNA [52]. Sygnał świetlny rejestrowany był przez fotodetektor i zapisywany przez oprogramowanie sekwenatora [52]. Zasadę metody pirosekwencjonowania przedstawiono graficznie na Rycinie nr 7.



Ryc. 7. Zasada metody pirosekwencjonowania (<https://www.ire.pw.edu.pl/~trubel/inge/files/INGE4.pdf>)

6.2.4.1 Przygotowanie produktów do pirosekwencjonowania

Pierwszym etapem poprzedzającym pirosekwencjonowanie była reakcja PCR mająca na celu amplifikację fragmentów DNA, które zostaną poddane dalszej analizie. Reakcję prowadzono w standardowej objętości 25 μ l. Jeden ze starterów wyznakowano biotyną na końcu 5'. W Tabeli nr 15 przedstawiono skład mieszaniny reakcyjnej natomiast w Tabeli nr 16 warunki reakcji.

Tab. 15. Skład mieszaniny reakcyjnej

Składniki	Objętość	Stężenie wyjściowe	Ilość
PyroMarkBuffer	12,5 μ l	2x	1x
Starter Forward	0,5 μ l	20 μ M	0,4 μ M
Starter Reverse	0,5 μ l	20 μ M	0,4 μ M
Woda	8,0 μ l	-	-
CoralLoad	2,5 μ l	10x	1x
DNA	1,0 μ l	50 ng/ μ l*	50 ng*
Objętość reakcji	25 μ l		

* w przypadku pacjentów, u których nie udało się uzyskać DNA o stężeniu 50 ng/ μ l wykorzystywano DNA o niższym stężeniu (minimum 10 ng/ μ l).

Tab. 16. Warunki reakcji PCR

Denaturacja wstępna	95° C, 15 minut
Denaturacja	94° C, 30 sekund
Przylączenie starterów	61° C, 30 sekund
Elongacja	72° C, 30 sekund
Elongacja końcowa	72° C, 10 minut

Reakcja PCR prowadzona była przez 45 cykli. Wszystkie użyte w reakcji odczynniki pochodziły z firmy Qiagen.

Produkty reakcji PCR sprawdzono podczas rozdziału elektroforetycznego w 1% żelu agarozowym z barwnikiem fluorescencyjnym emitującym zielone światło o długości fali 515 nm, widoczne w transiluminatorze (Simpysafe, EurX). Jako marker wielkości wykorzystano GeneRuler 100bp DNA Ladder (ThermoFisher Scientific). Rozdział prowadzono przy napięciu 130V, w buforze 1xTBE przez 60 minut. Wykorzystanie w reakcji PCR barwnika CoralLoad, pozwoliło na bezpośrednie sprawdzenie produktów reakcji PCR w żelu agarowym.

6.2.4.2 Przygotowanie programu do pirosekwencjonowania

Przeprowadzenie pirosekwencjonowania z zastosowaniem aparatu PyroMark Q48 Autoprep możliwe było dzięki zaprojektowaniu testu do genotypowania – *AQ-Assay* w programie PyroMark dedykowanym do używanego sekwencjatora.

6.2.4.3 Optymalizacja metody pirosekwencjonowania

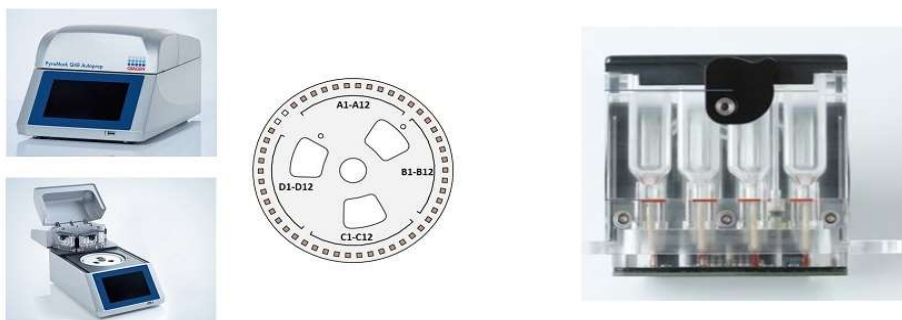
W celu optymalizacji zastosowanej metody pirosekwencjonowania badanie przeprowadzono również dla pięciu próbek DNA wyizolowanego z krwi obwodowej zdrowych osób. Założono, że analizowane w pracy zmiany c.1945G>T w genie *ASXL1*, c.509-2A>C w genie *RUNX1* oraz c.1874G>T w genie *SF3B1* nie występują w badanych próbkach i na tej podstawie określono próg detekcji. Przyjęto, że aby dana zmiana została uznana za mutację, a nie błąd metody procentowa zawartość allelu nieprawidłowego powinna być co najmniej dwukrotnie wyższa niż ta wynikająca z błędu metody.

6.2.4.4 Przeprowadzenie pirosekwencjonowania

Pirosekwencjonowanie przeprowadzono z zastosowaniem platformy PyroMark Q48 Advance firmy Qiagen i dedykowanych mu odczynników. Jednocześnie w aparacie możliwe było przeprowadzenie sekwencjonowania 48 próbek pacjentów dla jednej analizowanej zmiany.

Platforma posiadała trzy kartridże, w których umieszczano kolejno trifosforany deoksyrybonukleotydów (ATP, GTP, CTP, TTP – każdy do osobnej oznaczonej kolumny), startery dla reakcji oraz enzymy (PyroMark Enzyme Mixture, Qiagen) i substraty reakcji (PyroMark Substrate Mixture, Qiagen). Objętość dodawanych odczynników zależna była od długości sekwencji poddawanej analizie, zawartości par GC oraz liczby analizowanych próbek. Natomiast na jednorazowy dysk umieszczany w aparacie nakładano bufor zawierający w swoim składzie streptawidynę (PyroMark Magnetic Beads) w objętości 5 µl oraz produkty reakcji PCR w objętości 5 µl.

Przed rozpoczęciem pierwszego sekwencjonowania w serii aparat należało przemyć postępując wg instrukcji producenta. Analiza sekwencji wykonywana była z wykorzystaniem dedykowanego do aparatu programu PyroMark Q24, Qiagen. Aparat do pirosekwencjonowania przedstawiono na Rycinie nr 8, natomiast przykładową płytke i program do pirosekwencjonowania na Rycinie nr 9.



Ryc. 8. Aparat do pirosekwencjonowania, kartridż oraz dysk, na który nakładano próbki pacjentów do pirosekwencjonowania, www.qiagen.com)

Assay Setup

Run Name: ASXL1_2430_2431_22.12.2021 cz1

Protocol: Standard

Disc ID: [Click here to enter the Disc ID](#)

Barcode: [Click here to enter the Barcode](#)

Reagent Lot Number: [Click here to enter the Reagent Lot Number](#)

Run Note

Run Setup

Power Loading: ☐ Manual ☒ Automatic

Assay: ASXL1 chr20_31022460

Injector: P2

Well Information

D12

Type: AG

Assay: ASXL1 chr20_31022460_2430_2431

Sample ID: ntc

Sequence to Analyze: GGTGAAGGTGGCGCGG

Dispensation Order: CCTGAGGTGGCGG

Disc Setup

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	ASXL1 chr20_31022460_2430_2 MDS 1.1	ASXL1 chr20_31022460_2430_2 MDS 1.2	ASXL1 chr20_31022460_2430_2 MDS 3.1	ASXL1 chr20_31022460_2430_2 MDS 3.2	ASXL1 chr20_31022460_2430_2 MDS 6.1	ASXL1 chr20_31022460_2430_2 MDS 6.2	ASXL1 chr20_31022460_2430_2 MDS 7.1	ASXL1 chr20_31022460_2430_2 MDS 7.2	ASXL1 chr20_31022460_2430_2 MDS 9.1	ASXL1 chr20_31022460_2430_2 MDS 9.2	ASXL1 chr20_31022460_2430_2 MDS 11.1	ASXL1 chr20_31022460_2430_2 MDS 11.2
B	ASXL1 chr20_31022460_2430_2 MDS 12.1	ASXL1 chr20_31022460_2430_2 MDS 12.2	ASXL1 chr20_31022460_2430_2 MDS 14.1	ASXL1 chr20_31022460_2430_2 MDS 14.2	ASXL1 chr20_31022460_2430_2 MDS 15.1	ASXL1 chr20_31022460_2430_2 MDS 15.2	ASXL1 chr20_31022460_2430_2 MDS 16.1	ASXL1 chr20_31022460_2430_2 MDS 16.2	ASXL1 chr20_31022460_2430_2 MDS 17.1	ASXL1 chr20_31022460_2430_2 MDS 17.2	ASXL1 chr20_31022460_2430_2 MDS 20.1	ASXL1 chr20_31022460_2430_2 MDS 20.2
C	ASXL1 chr20_31022460_2430_2 MDS 23.1	ASXL1 chr20_31022460_2430_2 MDS 23.2	ASXL1 chr20_31022460_2430_2 MDS 25.1	ASXL1 chr20_31022460_2430_2 MDS 25.2	ASXL1 chr20_31022460_2430_2 MDS 27.1	ASXL1 chr20_31022460_2430_2 MDS 27.2	ASXL1 chr20_31022460_2430_2 MDS 28.1	ASXL1 chr20_31022460_2430_2 MDS 28.2	ASXL1 chr20_31022460_2430_2 MDS 31.1	ASXL1 chr20_31022460_2430_2 MDS 31.2	ASXL1 chr20_31022460_2430_2 MDS 36.1	ASXL1 chr20_31022460_2430_2 MDS 36.2
D	ASXL1 chr20_31022460_2430_2 MDS 37.1	ASXL1 chr20_31022460_2430_2 MDS 37.2	ASXL1 chr20_31022460_2430_2 MDS 39.1	ASXL1 chr20_31022460_2430_2 MDS 39.2	ASXL1 chr20_31022460_2430_2 MDS 40.1	ASXL1 chr20_31022460_2430_2 MDS 40.2	ASXL1 chr20_31022460_2430_2 MDS 41.1	ASXL1 chr20_31022460_2430_2 MDS 41.2	ASXL1 chr20_31022460_2430_2 MDS 42.1	ASXL1 chr20_31022460_2430_2 MDS 42.2	ASXL1 chr20_31022460_2430_2 MDS 43.1	ASXL1 chr20_31022460_2430_2 ntc

Ryc. 9. Przykładowa płytka i program do pirosekwencjonowania genu ASXL1 pacjentów z MDS

IV. Wyniki

1. Analiza cytogenetyczna

Analizie metodami cytogenetyki klasycznej poddano 80 pacjentów z rozpoznaniem zespołu mielodysplastycznego (37 kobiet oraz 43 mężczyzn). U wszystkich pacjentów wykonano badanie GTG zgodnie w opisaną w pracy metodyką i analizowano co najmniej 20 metafaz. W przypadku pacjentów z niskim indeksem mitotycznym lub gdy aberracje chromosomowe występowały we wszystkich metafazach analizie poddano minimum 10 metafaz. Wynik zapisano zgodnie z uniwersalnym systemem nomenklatury cytogenetycznej (ISCN) rekomendowanym przez International Standing Committee on Human Cytogenetic Nomenclature [47]. Wynik badania dla złożonych kariotypów przedstawiono w formie opisowej.

Pierwsze badanie wykonano w momencie rozpoznania, natomiast kolejne podczas kontroli pacjenta w jednostce prowadzącej leczenie. Mediana wieku pacjentów w momencie rozpoznania wynosiła 59 lat, przy czym najmłodszy pacjent miał 8 lat a najstarszy 85 lat. Średni czas pomiędzy kolejnymi badaniami cytogenetycznymi wynosił 498 dni (najkrótszy odstęp czasowy to 182 a najdłuższy to 1868 dni).

Po wykonaniu analizy GTG wyodrębniono cztery grupy pacjentów:

- GRUPA 1 (n=22 pacjentów) z nieprawidłowym kariotypem w dwóch kolejnych;
- GRUPA 2 (n=10 pacjentów) z nieprawidłowym kariotypem w pierwszym badaniu i prawidłowym w kolejnym, grupę tę określono na potrzeby pracy jako remisję choroby;
- GRUPA 3 (n=6 pacjentów) z prawidłowym kariotypem w pierwszym badaniu i nieprawidłowym w kolejnym, grupę tę określono na potrzeby pracy jako progresja choroby;
- GRUPA 4 (n=42 pacjentów) z prawidłowym kariotypem zarówno w pierwszym jak i kolejnym badaniu.

Wyniki badań metodami cytogenetyki klasycznej (GTG) przedstawiono w Tabeli nr 17, 18, 19 oraz 20, natomiast podział pacjentów z uwzględnieniem przynależności do jednej z powyższych grup w Tabeli nr 21 i zamieszczono je poniżej.

Tab. 17. Wyniki badań cytogenetycznych pacjentów w dwóch punktach czasowych z grupy pierwszej (GRUPA 1)

L.p.	Płeć	Wiek pacjenta w momencie rozpoznania	Numer pacjenta	Nr MDS	Wynik badania cytogenetycznego (rozpoznanie – I badanie)	Numer pacjenta	Nr MDS	Wynik badania cytogenetycznego (II badanie)	Czas pomiędzy I i II badaniem (w dniach)
1	m	67	16414	MDS 1.1	47,XY,+8[3]/46,XY[21]	13218	MDS 1.2	46,XY,del(12)(p13)[6], t(15;18)(q?12;p?11.2)[14][cp14]	1416
2	m	66	88316	MDS 2.1	42~45,XY,-5[14],-6[14],del(7)(q22)[14], -9[8],-9[7],-15[14],-18[4],-19[14], +mar1[14],+mar2[8],+mar3[10], +mar4[9],+mar5[4][cp14]/46,XY[1]	43017	MDS 2.2	40~46,XY,?add(2)(q37)[6],-5[4],-8[3], -9[4],?del(12)(p13)[4],-13[3],-14[3],-15[5], -17[3],-18[4],del(20)(q12)[3], +mar1[3],+mar2[3],+mar3[2],+mar4[2], +mar5[2],+mar6[2][cp11]/ 46,XY,add(1)(p36)[2]/46,XY[4]	231
3	k	42	29114	MDS 3.1	44~47,XX,+X,[2],del(5)(q13q33)[17], der(6)t(6;9)(p23;q22)[17],+8[10], der(9)t(6;9)(p23;q22)[13],-9[3],-17[6], -19[4],-20[16],-21[4],-22[7],+mar1[15], +mar2[13][cp17]/46,XX[3]	93214	MDS 3.2	46,XX,del(5)(q13q33)[13], der(6)t(6;9)(p23;q22)[13], der(9)t(6;9)(p23;q22)[10],-17[4],-18[3], -19[5],-20[10],-21[2],-22[10],+mar1[11], +mar2[4][cp13]/46,XX[6]	183
4	m	73	34713	MDS 4.1	44~45,X,-Y[4],inv(3)(p25p11?)[5],-5[7], -7[3],+8[5],+8[3],+10[2],12[4],add(12)(p?)[3], -15[4],-17[3],-21[3],-22[5],+mar[2][cp17]/ 46,XY[13]	65514	MDS 4.2	W 10 metafazach zaobserwowano utraty chromosomów pary 3, 5, 7, 13 17; obecności 2 dodatkowych kopii chromosomu pary 8 oraz chromosomu pochodnego pary 12 powstałego najprawdopodobniej w wyniku translokacji pomiędzy krótkim ramieniem chromosomu pary 12 a długim ramieniem chromosomu pary 17, obecności chromosomów markerowych - mar1 (wielkości chromosomów z grupy B), mar2 (wielkości chromosomów z grupy B), mar3 (wielkości 1/3 chromosomów z grupy G), mar4 (wielkości chromosomów z grupy E)	435

L.p.	Płeć	Wiek pacjenta w momencie rozpoznania	Numer pacjenta	Nr MDS	Wynik badania cytogenetycznego (rozpoznanie – I badanie)	Numer pacjenta	Nr MDS	Wynik badania cytogenetycznego (II badanie)	Czas pomiędzy I i II badaniem (w dniach)
5	m	64	11514	MDS 5.1	46,XY,t(4;7;12)(p16;q22;q24.1)[8]/ 45,XY,t(4;7;12)(p16;q22;q24.1),-17[1]/ 46,XY,t(2;13)(q23;q14)[2]/ 45,XY,-17[2]/ 46,XY[10]	11715	MDS 5.2	W 16 analizowanych metafazach występowała najprawdopodobniej zrównoważona translokacji pomiędzy chromosomami pary 4, 7 i 12 - t(4;7;12)(p16;q22;q24.1); najprawdopodobniej translokacji t(1;11) z jednoczesną delecją materiału genetycznego z ramienia p chromosomu pary 1; najprawdopodobniej translokacji t(12;17); delecja ramienia q chromosomu pary 7 i/lub translokacji chromosomu pary 7 z innym chromosomem [t(7;?)]; addycja materiału genetycznego nieznanego pochodzenia na ramieniu p chromosomu pary 17; obecność chromosomów markerowych: mar1 - wielkością zbliżony do chromosomów z grupy C; mar2 wielkością zbliżony do chromosomów z grupy B, mar3 – kształt akrocentryczny wielkością zbliżony do grupy E, mar4 – kształt akrocentryczny, wielkością zbliżony do grupy G, mar5 - kształt akrocentryczny, wielkością zbliżony do ½ grupy G, mar6 – wielkością zbliżony do grupy F; utraty chromosomów pary 15, pary 14 oraz dodatkowej kopii chromosomu pary 8 i 20.	647
6	k	68	18007	MDS 6.1	46,XX,del(5)(q22q35)[18]/46,XX[3]	32110	MDS 6.2	46,XX,del(5)(q22q35)[13]/ 47,XX,del(5)(q22q35),+8[4]/ 45,XX,del(5)(q22q35),-19[2]/ 46,XX,+8,-19[1]/ 46,XX[3]	753
7	m	70	72914	MDS 7.1	44~45,X,-Y[19],-21[3][cp21]	73215	MDS 7.2	45,X,-Y[14]/45,X,-Y,add(16)(q24)[3]/ 46,XY[5]	320
8	k	63	35811	MDS 8.1	47,XX,+8[19]/46,XX,+8,-21[3]/47,XX,+9[3]	45814	MDS 8.2	47,XX,+8[8]/44~45,XX,+8[3],-18[3], -21[3][cp5]	1020

L.p.	Płeć	Wiek pacjenta w momencie rozpoznania	Numer pacjenta	Nr MDS	Wynik badania cytogenetycznego (rozpoznanie – I badanie)	Numer pacjenta	Nr MDS	Wynik badania cytogenetycznego (II badanie)	Czas pomiędzy I i II badaniem (w dniach)
9	m	42	100618	MDS 19.1	47,XY,+19[8]/48,XY,+8,+19[1]/47,XY,+8[1]/46,XY[2]	35420	MDS 19.2	48,XY,+19,+21[9]	599
10	k	56	78617	MDS 31.1	47,XX,+8[10]	72718	MDS 31.2	47,XX,+8[3]/46,XX[3]	372
11	k	61	113815	MDS 32.1	46,XX,add(11)(q?23)[13]/ 46,XX[7].ish add(11)(q23)(MLL-)	48717	MDS 32.2	46,XX,der(11)add(11)(q23)[14]/46,XX[5]	526
12	k	52	18314	MDS 33.1	46,XX,del(2)(q?31), der(12)(12q?14→12p13::2q?31→2q?37::12q?→12qter)[5]/ 46,XX[16]	151317	MDS 33.2	46,XX,del(2)(q?31), der(12)(12q?14→12p13::2q?31→2q?37::12 q?→12qter)[5]/46,XX[17]	1332
13	k	76	8113	MDS 34.1	46,XX,del(5)(q13q33),+mar[3]/ 46,XX,del(5)(q13q33)[22]/46,XX[1]	23716	MDS 34.2	46,XX,del(5)(q13q33)[20]	1120
14	k	69	5012	MDS 35.1	47,XX,del(3)(q21),+8[12]/47,XX,+8[2]	57813	MDS 35.2	46~47,XX,del(3)(q21)[20],+8[19],-13[3], -21[4][cp20]	620
15	m	71	3416	MDS 36.1	46,XY,t(12;12)(q13;q24.1)[11]	76516	MDS 36.2	46,XY,t(12;12)(q14;q24.1)[15]	182
16	m	85	130016	MDS 37.1	42~46,XY,add(4)(p16)[12], -4[12],del(5)(q15q33)[11],-7[11], der(8)(8pter→8q12::12q13→12qter)[12], der(8)(?::cen→?::8q13→8qter)[11], -12[8],add(13)(p13)[9], der(16)add(16)(q24)[10],+18[9], -20[8],+mar1[2],+mar2[2][cp12]	129017	MDS 37.2	42~46,XY,add(4)(p16)[13], -4[13],del(5)(q15q33)[13],-7[10], der(8)(8pter→8q12::12q13→12qter)[13], der(8)(?::cen→?::8q13→8qter)[13], -12[13],add(13)(p13)[8],-13[4], der(16)add(16)(q24)[5], inv(16)(p11.1q11.2)[3],+18[6], -20[9],-20[4],+mar1[3],+mar2[5][cp13]	976
17	m	74	6414	MDS 38.1	46,XY,del(5)(q22q35)[20]	65317	MDS 38.2	46,XY,del(5)(q22q35)[15]	1211
18	k	62	127817	MDS 39.1	44~45,X,-X[4],del(5)(q13q33)[10], add(7)(p22)[10],del(12)(p11.2)[3], -12[3],del(13)(?q12q21)[4],-17[3], -18[3][cp10]/46,XX[12]	60518	MDS 39.2	44~45,XX,del(5)(q13q33)[7], add(7)(p22)[7],del(13)(12q21)[2],-18[6], -20[4][cp7]/46,XX[8]	307
19	k	75	1719	MDS 40.1	46,XX,del(5)(q13q33)[4]/47,XX,+8[2]/ 46,XX[15]	55220	MDS 40.2	46,XX,del(5)(q13q33)[9]/46,XX[5]	540
20	m	63	4714	MDS 41.1	46,XY,del(5)(q21q33),del(20)(q12)[15]/ 46,XY,del(5)(q13q33)[4]/46,XY[11]	72815	MDS 41.2	46,XY,del(5)(q21q33),del(20)(q12)[10]/ 46,XY[10]	552
21	k	78	90815	MDS 42.1	46,XX,del(5)(q12q33)[10]/46,XX[8]	119019	MDS 42.2	46,XX,del(5)(q12q33)[2]/46,XX[18]	1555

L.p.	Płeć	Wiek pacjenta w momencie rozpoznania	Numer pacjenta	Nr MDS	Wynik badania cytogenetycznego (rozpoznanie – I badanie)	Numer pacjenta	Nr MDS	Wynik badania cytogenetycznego (II badanie)	Czas pomiędzy I i II badaniem (w dniach)
22	k	66	94018	MDS 43.1	44~45,XX,del(5)(q13q33)[10],-19[4],-21[4], -22[3][cp10]	60919	MDS 43.2	46,XX,del(5)(q13q33)[7]	307

Tab. 18. Wyniki badań cytogenetycznych pacjentów w dwóch punktach czasowych z grupy drugiej (GRUPA 2)

L.p.	Płeć	Wiek w momencie rozpoznania	Nr pacjenta	Nr MDS	Wynik badania cytogenetycznego (rozpoznanie –I badanie)	Nr pacjenta	Nr MDS	Wynik badania cytogenetycznego (II badanie)	Czas pomiędzy I i II badaniem (w dniach)
1	m	54	114216	MDS 18.1	46,XY,del(5)(q12q33)[11]	12918	MDS 18.2	46,XY[13]	462
2	k	66	117616	MDS 20.1	45~46,XX,-19[4],-20[7],+mar1[6],+mar1[2], +mar2[3][cp7]/46,XY[11]	108517	MDS 20.2	46,XX[20]	299
3	m	74	121418	MDS 21.1	W 8 z 15 analizowanych metafaz stwierdzono addycję materiału genetycznego nieznanego pochodzenia na długim ramieniu chromosomu pary 12; aberracje w obrębie krótkiego ramienia chromosomu pary 17; obecność acentrycznych form chromosomów - dmin (od 1 do 4); obecności 5 chromosomów markerowych - mar1 wielkości chromosomów z grupy E (chromosomy pary 16-18), mar2 2/3 wielkości chromosomów z grupy C (chromosomy pary 6- 12 i X), mar3 wielkości chromosomów z grupy G (chromosomy pary 21-22 i Y), mar4 wielkości chromosomów z grupy C, mar5 wielkości chromosomów z grupy a (chromosomy pary 1-3). w pozostałych 7 metafazach stwierdzono kariotyp prawidłowy.	83219	MDS 21.2	46,XY[16]	316
4	k	74	41210	MDS 22.1	47,XX,+8[3]/46,XY[25]	60812	MDS 22.2	46,XX[25]	771
5	k	71	9015	MDS 23.1	46,XX,del(5)(q13q33)[20]/46,XX[2]	6116	MDS 23.2	46,XX[20]	358
6	m	71	41814	MDS 25.1	46,XY,del(11)(q23)[2]/46,XY[17]	16015	MDS 25.2	46,XY[20]	258

L.p.	Płeć	Wiek w momencie rozpoznania	Nr pacjenta	Nr MDS	Wynik badania cytogenetycznego (rozpoznanie –I badanie)	Nr pacjenta	Nr MDS	Wynik badania cytogenetycznego (II badanie)	Czas pomiędzy I i II badaniem (w dniach)
7	m	60	79414	MDS 26.1	46,XY,inv(11)(p14p15)[2]/46,XY[17]	138916	MDS 26.2	46,XY[20]	811
8	m	77	53714	MDS 27.1	46,XY,del(22)(q12)[2]/46,XY[22]	132616	MDS 27.2	46,XY[19]	1607
9	k	62	55012	MDS 28.1	45,XX,del(5)(q12q33),-21[3]/ 46,XX,del(5)(q12q33)[14]/46,XX[1]	49613	MDS 28.2	46,XX[21]	302
10	m	8	103815	MDS 29.1	46,XY,del(7)(q31)[3]/46,XY[18]	55016	MDS 29.2	46,XY[17]	222

Tab. 19. Wyniki badań cytogenetycznych pacjentów w dwóch punktach czasowych z grupy trzeciej (GRUPA 3)

L.p.	Płeć	Wiek w momencie rozpoznania	Nr pacjenta	Nr MDS	Wynik badania cytogenetycznego (rozpoznanie – I badanie)	Nr pacjenta	Nr MDS	Wynik badania cytogenetycznego (II badanie)	Czas pomiędzy I i II badaniem (w dniach)
9	m	62	74216	MDS 9.1	45,XY,-21[3]/46,XY[17]	137918	MDS 9.2	47,XY,+8[6],add(9)(q?34)[1], del(20)(q12)[1][cp6]/46,XY[9]	875
10	k	61	41616	MDS 11.1	46,XX[29]	125616	MDS 11.2	47~50,XX,+8[5],+10[6],+14[7], +21[6][cp7]/46,XX[11]	210
11	m	61	20512	MDS 12.1	43~45,X,-Y[4],-15[3],-17[3][cp6]/46,XY[20]	11213	MDS 12.2	45,X,-Y[6],-15[3],16[4],17[3],-18[3], -19[9],-20[3],-22[6][cp17]/46,XY[17]	322
12	m	67	15512	MDS 14.1	45,XY[25]	21313	MDS 14.2	47,XY,+8[14]/48,XY,+8,+mar[1]/ 45,XY,-7[3]/47,XY,+mar[1]/46,XY[17]	384
14	m	77	121518	MDS 16.1	46,XY[12]	76819	MDS 16.2	47,XY,+8[3]/46,XY[5]	294
15	m	83	12715	MDS 17.1	46,XY[19]	127215	MDS 17.2	46,XY,del(11)(q23)[4]/46,XY[17]	304

Tab. 20. Wyniki badań cytogenetycznych pacjentów w dwóch punktach czasowych z grupy czwartej (GRUPA 4)

L.p.	Płeć	Wiek w momencie rozpoznania	Nr pacjenta	Nr MDS	Wynik badania cytogenetycznego (rozpoznanie – I badanie)	Nr pacjenta	Nr MDS	Wynik badania cytogenetycznego (II badanie)	Czas pomiędzy I i II badaniem (w dniach)
1	m	71	92215	MDS 15.1	45,XY,-21[3]/46,XY[19]	86516	MDS 15.2	46,XY[18]	330
2	k	63	132515	MDS 44.1	46,XX,inv(9)(p11q12)[20]	129817	MDS 44.2	45~46,XX, -2[3],inv(9)(p12q13)[8], -21[4][cp7]/ 46,XX,inv(9)(p12q13)[11]	646
3	m	19	33010	MDS 45.1	46,XY[23]	70113	MDS 45.2	46,XY[20]	1182
4	m	65	93217	MDS 46.1	46,XY[20]	71018	MDS 46.2	46,XY[12]	336
5	k	34	31910	MDS 47.1	46,XX[20]	54113	MDS 47.2	46,XX[24]	1122
6	m	57	61513	MDS 49.1	45,XY,-20[3]/46,XY[19]	59215	MDS 49.2	46,XY[20]	609
7	m	71	61818	MDS 50.1	46,XY[18]	43620	MDS 50.2	46,XY[12]	343
8	k	63	115116	MDS 51.1	46,XX[16]	24619	MDS 51.2	46,XX[9]	869
9	m	76	20817	MDS 53.1	46,XY[18]	55918	MDS 53.2	43~45,XY,-14[3],-15[3], -20[3][cp5]/46,XY[12]	455
10	k	61	125215	MDS 54.1	46,XX[17]	94918	MDS 54.2	42~45,X,-X[4],-2[3],-13[3], -14[3],-18[4],-19[4], -22[3][cp12]/46,XX[10]	990
11	k	29	43814	MDS 55.1	45,XX,-20[3]/46,XX[21]	49516	MDS 55.2	45,XX,-22[3]/46,XX[17]	701
12	m	68	18417	MDS 56.1	46,XY[20]	79018	MDS 56.2	46,XY[20]	511
13	k	37	8217	MDS 57.1	47,XX,+mar[2]/46,XX[19]	73818	MDS 57.2	45,XX,-21[5]/46,XX[9]	525
14	m	54	7010	MDS 58.1	46,XY[20]	7711	MDS 58.2	46,XY[21]	365
15	m	71	76517	MDS 59.1	46,XY[19]	55818	MDS 59.2	44~45,XY,-6[3], -20[3][cp5]/46,XY[8]	338

L.p.	Płeć	Wiek w momencie rozpoznania	Nr pacjenta	Nr MDS	Wynik badania cytogenetycznego (rozpoznanie – I badanie)	Nr pacjenta	Nr MDS	Wynik badania cytogenetycznego (II badanie)	Czas pomiędzy I i II badaniem (w dniach)
16	k	64	121615	MDS 61.1	45,XX,-21[3]/46,XX[17]	76818	MDS 61.2	46,XX[20]	947
17	m	58	49313	MDS 65.1	46,XY[21]	2615	MDS 65.2	46,XY[22]	510
18	m	37	29212	MDS 66.1	45,X,-Y[3]/45,XY,-18[3]/46,XY[22]	86317	MDS 66.2	46,XY[13]	1857
19	k	40	13115	MDS 67.1	46,XX[22]	52416	MDS 67.2	46,XX[23]	462
20	k	49	43919	MDS 68.1	46,XX[20]	106919	MDS 68.2	45,XX,-22[4]/46,XX[19]	187
21	k	64	32913	MDS 69.1	46,XX[25]	66914	MDS 69.2	46,XX[20]	447
22	m	62	87215	MDS 70.1	46,XY[19]	99116	MDS 70.2	46,XY[25]	374
23	k	67	152417	MDS 71.1	47,XX,+mar[2]/46,XX[20]	73418	MDS 71.2	46,XX[21]	226
24	m	37	45519	MDS 72.1	45,XY,-21[3]/46,XY[13]	79320	MDS 72.2	46,XY[20]	483
25	m	58	10008	MDS 73.1	46,XY[25]	9910	MDS 73.2	45,XY,-21[4]/46,XY[20]	709
26	m	11	74315	MDS 74.1	46,XY[19]	63516	MDS 74.2	45,XY,-22[4]/46,XY[15]	379
27	m	28	15113	MDS 75.1	46,XY[30]	71913	MDS 75.2	46,XY[20]	265
28	k	64	32417	MDS 77.1	44~45,XX,-11[4],-21[4], -22[3][cp8]/46,XX[14]	21718	MDS 77.2	46,XX[20]	336
29	m	54	92419	MDS 78.1	42~45,X,-Y[3],-6[3],-8[3],-14[3], -22[3][cp6]/46,XY[4]	109620	MDS 78.2	46,XY[12]	441
30	k	36	42609	MDS 80.1	46,XX[20]	29512	MDS 80.2	46,XX[25]	924
31	k	72	77218	MDS 81.1	45,XX,-2[3]/46,XX[6]	72019	MDS 81.2	46,XX[14]	756
32	k	74	45211	MDS 82.1	46,XX[22]	45915	MDS 82.2	46,XX[18]	1296

L.p.	Płeć	Wiek w momencie rozpoznania	Nr pacjenta	Nr MDS	Wynik badania cytogenetycznego (rozpoznanie – I badanie)	Nr pacjenta	Nr MDS	Wynik badania cytogenetycznego (II badanie)	Czas pomiędzy I i II badaniem (w dniach)
33	k	69	5114	MDS 83.1	46,XX[23]	42515	MDS 83.2	46,XX[19]	460
34	k	28	7811	MDS 84.1	46,XX[23]	33816	MDS 84.2	45,XX,-21[3]/46,XX[18]	1868
35	k	31	39415	MDS 85.1	45,XX,-13[3]/46,XX[24]	127616	MDS 85.2	45,XX,-19[3]/46,XX[20]	580
36	k	52	5515	MDS 86.1	46,XX[20]	54616	MDS 86.2	45,XX,-18[3]/46,XX[20]	489
37	m	60	26215	MDS 87.1	45,X,-Y[5]/45,XY,-19[3]/46,XY[13]	93515	MDS 87.2	44~45,X,-Y[2], -16[3][cp4]/46,XY[18]	183
38	m	61	18713	MDS 88.1	41~45,XY,-2[3],-5[3],-6[5],-8[3],-9[3],-10[6], -11[3],-15[4],-20[4],-21[6],-22[3][cp19]/ 46,XY[9]	13414	MDS 88.2	46,XY[10]	341
39	k	73	97416	MDS 89.1	46,XX[19]	43417	MDS 89.2	46,XX[19]	205
40	m	68	14016	MDS 90.1	46,XY[20]	78417	MDS 90.2	46,XY[20]	497
41	k	76	26914	MDS 91.1	46,XX[21]	25515	MDS 91.2	46,XX[17]	320
42	m	63	13211	MDS 93.1	45,XY,-22[3]/46,XY[18]	24914	MDS 93.2	46,XY[22]	1118

Tab. 21. Podział pacjentów na 4 grupy na podstawie wyniku badania cytogenetycznego.

Numer grupy	Charakterystyka grupy	Liczba pacjentów [n=80]	Odsetek pacjentów w danej grupie [%]	Średni czas pomiędzy dwoma badaniami w danej grupie
GRUPA 1	Kariotyp nieprawidłowy w dwóch badaniach	22	27%	436 dni
GRUPA 2	Badanie I – kariotyp nieprawidłowy; Badanie II – Kariotyp prawidłowy (Remisja cytogenetyczna)	10	12%	540 dni
GRUPA 3	Badanie I – Kariotyp prawidłowy Badanie II - kariotyp nieprawidłowy; (progresja choroby)	6	8%	398 dni
GRUPA 4	Kariotyp prawidłowy w dwóch badaniach	42	53%	618 dni
suma		80	100%	

1.1 Częstość występowania aberracji cytogenetycznych w grupach pacjentów z nieprawidłowym kariotypem (korelacja wieku, płci i ryzyka cytogenetycznego)

W niniejszej pracy podjęto próbę oceny częstości występowania poszczególnych aberracji cytogenetycznych oraz ich korelacji z wiekiem i płcią pacjentów. Na podstawie badania GTG, stosując system CCSS, będący częścią zrewidowanego systemu prognostycznego IPSS-R dokonano również stratyfikacji pacjentów do określonej grupy ryzyka cytogenetycznego.

1.1.1 Pacjenci z nieprawidłowym kariotypem w dwóch badaniach (GRUPA 1)

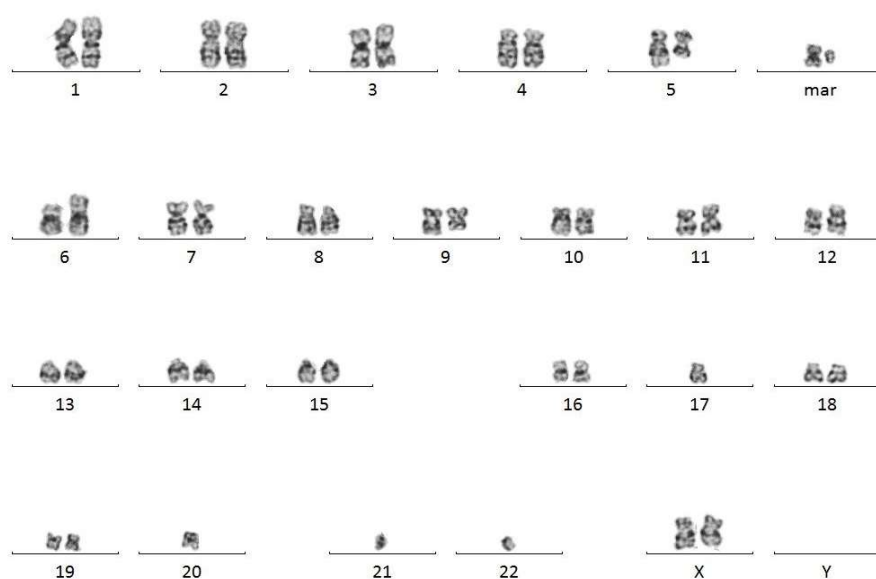
W przypadku pierwszej grupy pacjentów z nieprawidłowym kariotypem w dwóch kolejnych badaniach cytogenetycznym należy zaznaczyć, że aberracje występujące w tej grupie chorych nie zawsze były takie same. U pięciu spośród 22 pacjentów (23%) obserwowano ewolucję kariotypu, to znaczy zmiany cytogenetyczne wykryte w drugim badaniu były inne niż w pierwszym badaniu u tych pacjentów.

W grupie chorych z zawsze takimi samymi zmianami najczęściej obserwowany był kariotyp złożony (definiowany jako występowanie trzech lub więcej aberracji cytogenetycznych w jednym klonie komórkowym). Z taką samą częstością obserwowano delecje fragmentu długiego ramienia chromosomu pary 5. Dodatkową kopię chromosomu pary 8 zaobserwowano u trzech chorych natomiast aberracje dotyczące chromosomów pary 11 lub 12 dotyczyły pojedynczych pacjentów i występowały z najniższą częstością w tej grupie chorych.

Aberracje cytogenetyczne z podziałem na dwie podgrupy pacjentów przedstawiono w Tabeli nr 22 natomiast przykładowe kariogramy na Rycinie nr 10 i 11.

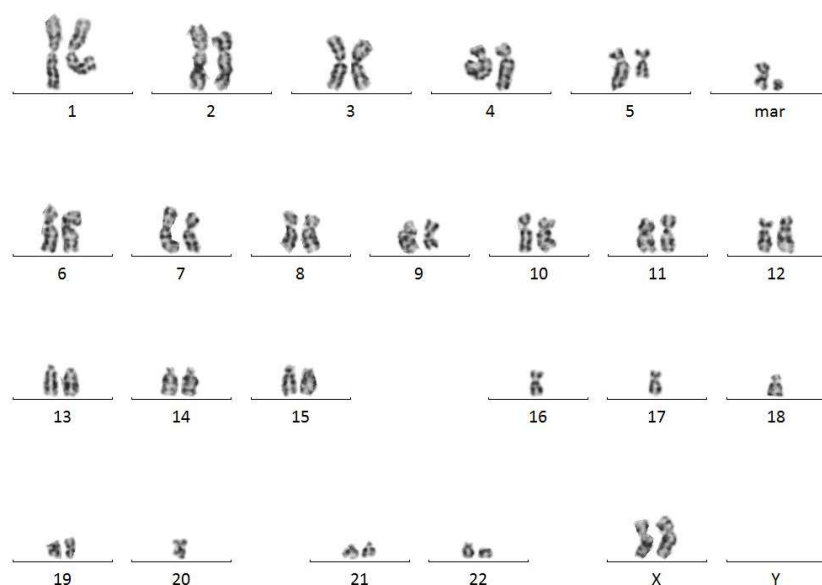
Tab. 22. Aberracje cytogenetyczne obserwowane w GRUPIE 1 – pacjenci z zawsze takimi samymi aberracjami (n=17) lub z różnymi aberracjami w pierwszym i drugim badaniu (ewolucja kariotypu) (n=5)

Aberracja cytogenetyczna	Liczba pacjentów [n=17]	Częstość występowania zaobserwowanej zmiany w badanej grupie[%]
kariotyp złożony	5	29
del(5q)	5	29
+8	3	18
del(5q) + del(20q)	1	6
add(11q)	1	6
der(12)	1	6
t(12;12)	1	6
Aberracja cytogenetyczna	Liczba pacjentów [n=5]	Częstość występowania zaobserwowanej zmiany w badanej grupie[%]
kariotyp złożony versus kariotyp złożony	1	20
del(5q) versus del(5q) i +8	1	20
+8,+19 versus +19,+21	1	20
+8,+9 versus +8	1	20
-Y versus -Y, del16q	1	20



Ryc.10. Przykładowy kariogram pacjenta MDS 3.1 wraz z zapisem kariotypu (badanie pierwsze, chory z GRUPY 1):

44~47,XX,+X,[2],del(5)(q13q33)[17],der(6)t(6;9)(p23;q22)[17],+8[10],der(9)(t(6;9)(p23;q22)[13],-9[3],-17[6],-19[4],-20[16],-21[4],-22[7],+mar1[15],+mar2[13][cp17]/46,XX[3]



Ryc. 11. Przykładowy kariogram pacjenta MDS 3.2 wraz z zapisem kariotypu (badanie drugie, chory z GRUPY 1):
 46,XX,del(5)(q13q33)[13],der(6)t(6;9)(p23;q22)[13],der(9)t(6;9)(p23;q22)[10],-17[4],-18[3],-19[5],-20[10],
 -21[2],-22[10],+mar1[11],+mar2[4][cp13]/46,XX[6]

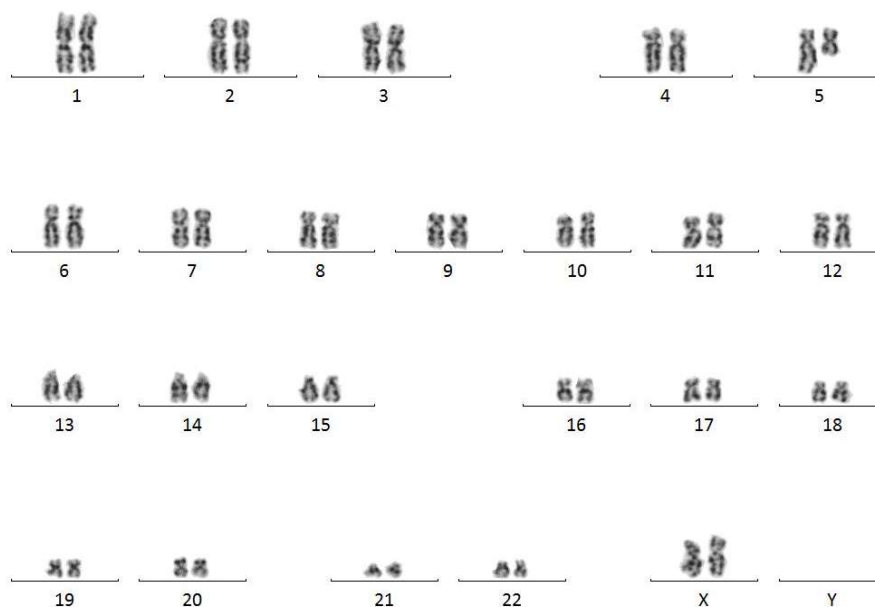
1.1.2 Pacjenci z nieprawidłowym kariotypem tylko w pierwszym badaniu (GRUPA 2)

W przypadku drugiej grupy pacjentów z nieprawidłowym kariotypem w pierwszym badaniu, a prawidłowym w drugim najczęściej obserwowaną była delecja fragmentu długiego ramienia chromosomu pary 5, natomiast kariotyp złożony (definiowany jako występowanie trzech lub więcej aberracji cytogenetycznych w jednym klonie komórkowym) był drugą co do częstości występującą zmianą w tej grupie chorych. Aberracje dotyczące delecji fragmentu długiego ramienia chromosomu pary 7, obecności dodatkowej kopii chromosomu pary 8 czy aberracje chromosomów pary 11 lub 22 dotyczyły pojedynczych pacjentów i występowały z najniższą częstością w tej grupie chorych.

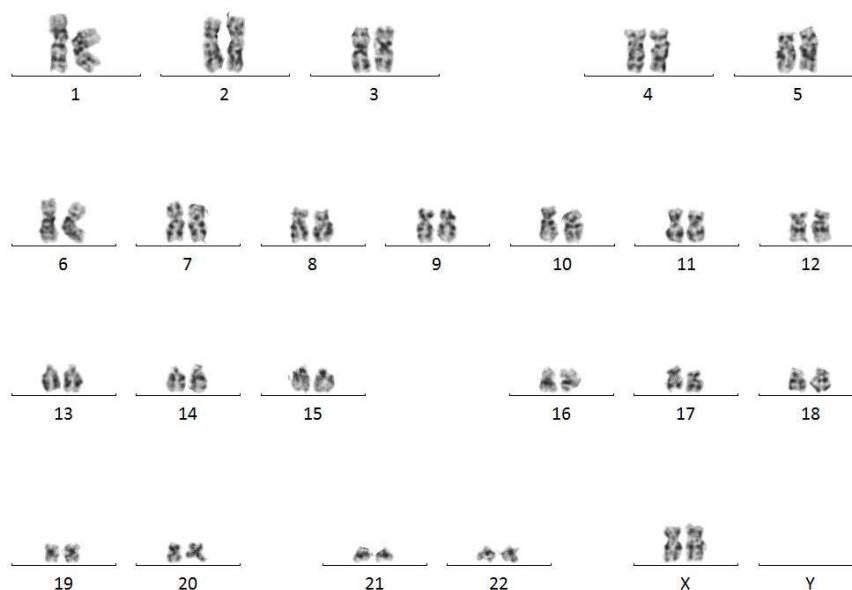
Aberracje cytogenetyczne obserwowane w tej grupie chorych przedstawiono w Tabeli nr 23 natomiast przykładowe kariogramy na Rycinie nr 12 oraz 13.

Tab. 23. Aberracje cytogenetyczne obserwowane w GRUPIE 2

Aberracja cytogenetyczna	Liczba pacjentów [n=10]	Częstość występowania zaobserwowanej zmiany w badanej grupie[%]
del(5q)	3	30
kariotyp złożony	2	20
del(7q)	1	10
+8	1	10
del(11q)	1	10
inv(11)	1	10
del(22q)	1	10



Ryc. 12. Przykładowy kariogram pacjenta MDS 23.1 wraz z zapisem kariotypu (badanie pierwsze, chora z GRUPY 2):46,XX,del5)(q13q33)[20]/46,XX[2]



Ryc. 13. Przykładowy kariogram pacjenta MDS 23.2 wraz z zapisem kariotypu (badanie pierwsze, chora z GRUPY 2):46,XX[20]

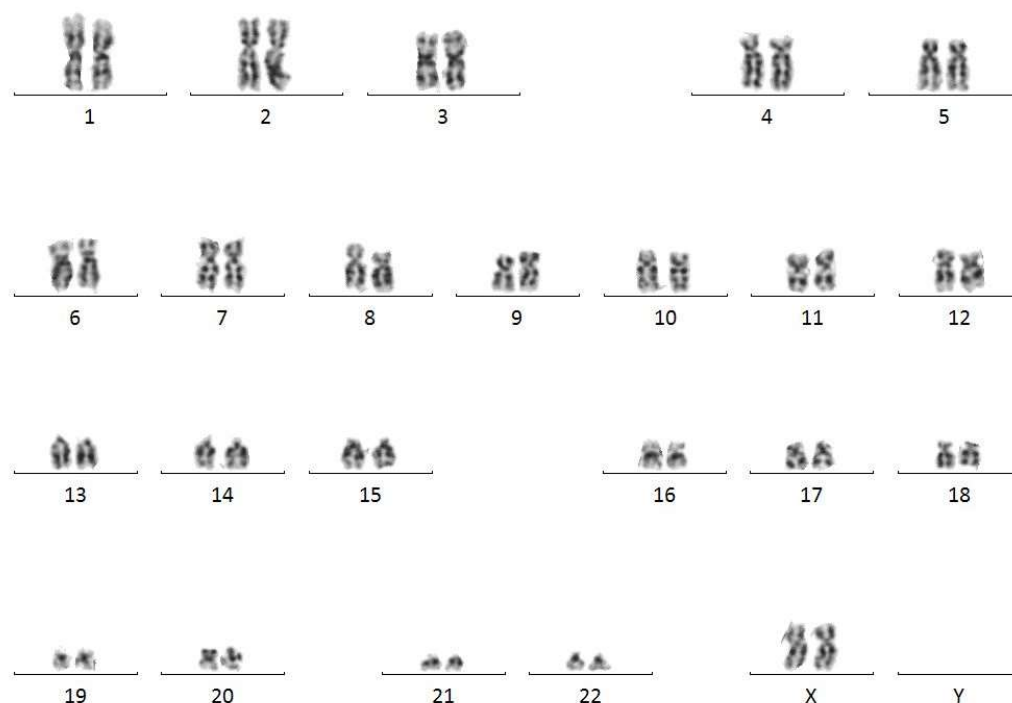
1.1.3 Pacjenci z nieprawidłowym kariotypem tylko w drugim badaniu (GRUPA 3)

Pacjenci z grupy trzeciej, u których nieprawidłowy kariotyp obserwowano w drugim badaniu najczęściej prezentowali obecność kariotypu złożonego (definiowany jako występowanie trzech lub więcej aberracji cytogenetycznych w jednym klonie komórkowym). Kolejnymi, co do częstości, występującymi zmianami w tej grupie chorych była obecność dodatkowej kopii chromosomu pary 8, aberracje chromosomów pary 11 oraz zmiany liczbowe, które dotyczyły pojedynczych pacjentów.

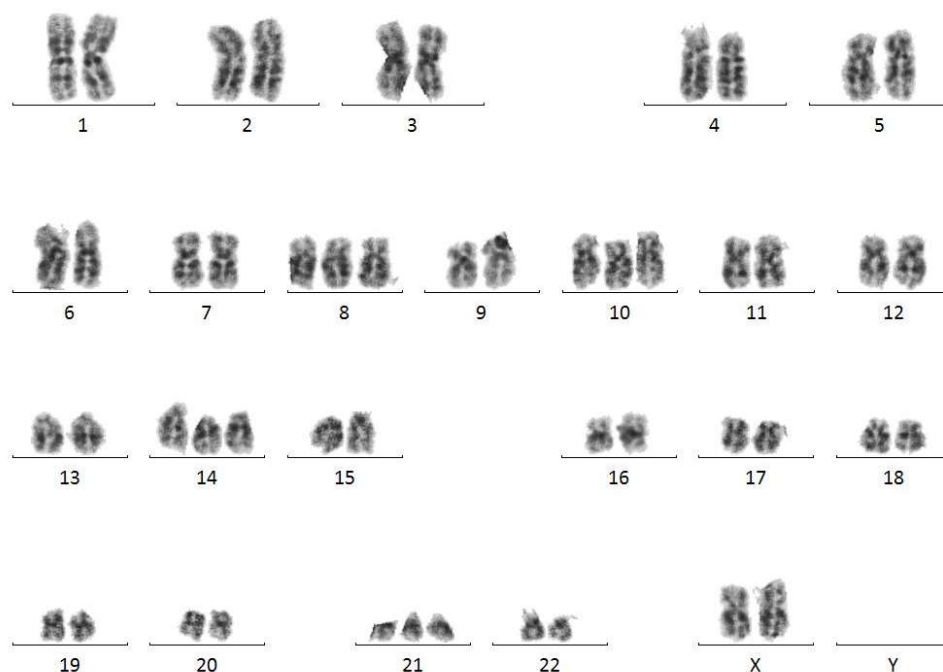
Aberracje cytogenetyczne obserwowane w tej grupie chorych przedstawiono w Tabeli nr 24, natomiast przykładowe kariogramy na Rycinie nr 14 oraz 15.

Tab. 24. Aberracje cytogenetyczne obserwowane w GRUPIE 3

Aberracja cytogenetyczna	Liczba pacjentów [n=6]	Częstość występowania zaobserwowanej zmiany w badanej grupie[%]
kariotyp złożony	3	51
+8	1	16
del(11q)	1	16
zmiany liczbowe	1	16



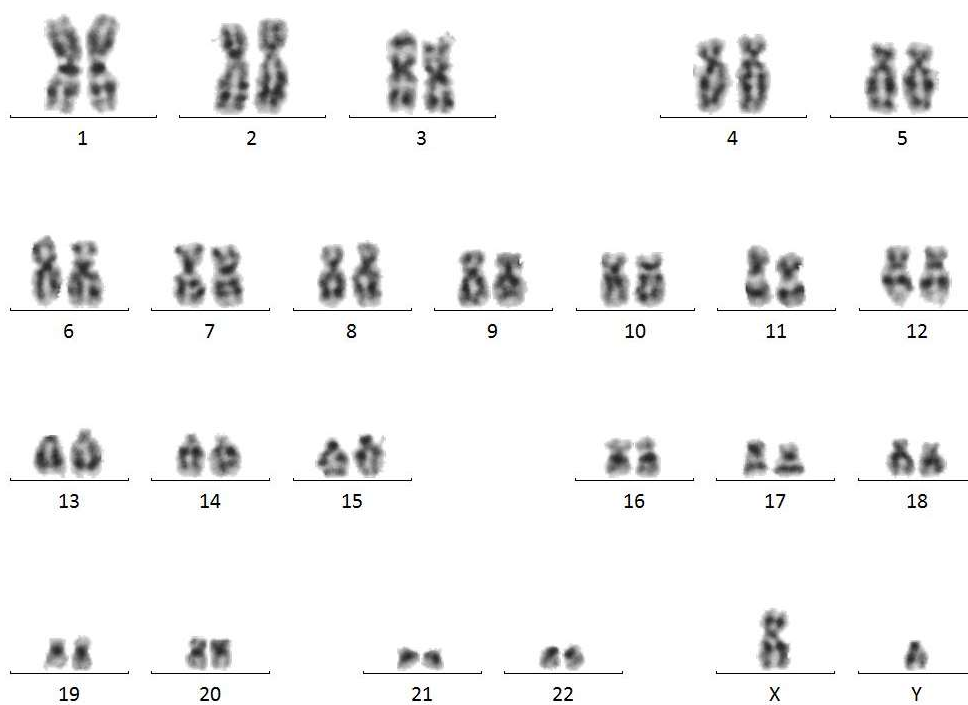
Ryc. 14. Przykładowy kariogram pacjenta MDS 11.1 wraz z zapisem kariotypu (badanie pierwsze, chora z GRUPY 3):46,XX[29]



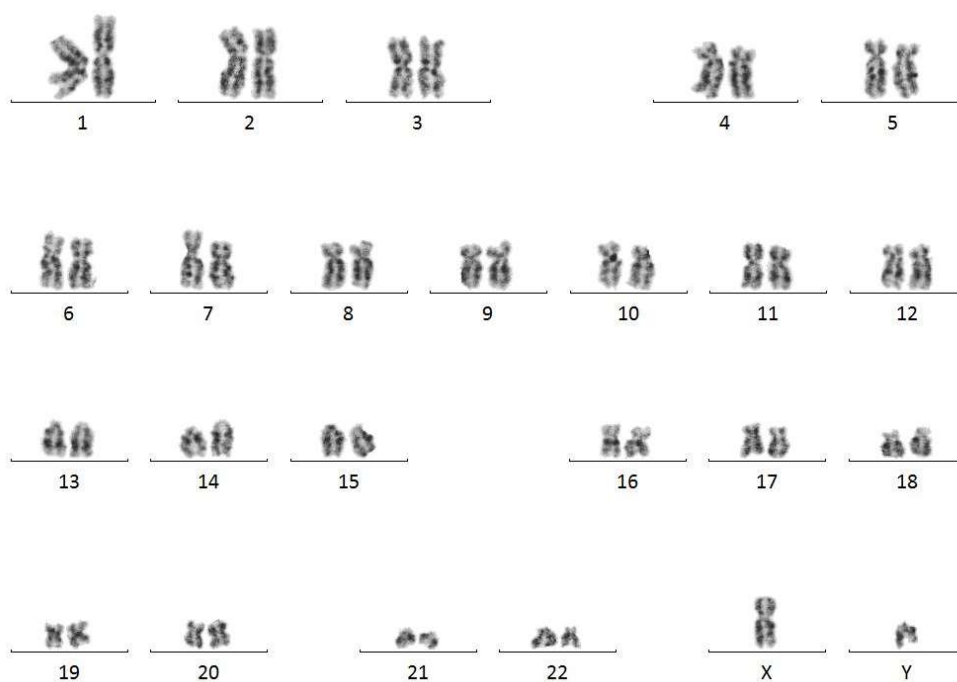
Ryc. 15. Przykładowy kariogram pacjenta MDS 11.2 wraz z zapisem kariotypu (badanie drugie, chora z GRUPY 3): 47~50,XX,+8[5],+10[6],+14[7],+21[6][cp7]/46,XX[11]

1.1.4 Pacjenci z prawidłowym kariotypem w dwóch badaniach (GRUPA 4)

U pacjentów z czwartej grupy zarówno w pierwszym jaki i drugim badaniu stwierdzono prawidłowy kariotyp i jednocześnie stanowili oni najliczniejszą grupę analizowaną w niniejszej pracy (n=42). Tutaj również zostali sklasyfikowani chorzy z utratą pojedynczych chromosomów, które występowały w maksymalnie pięciu spośród 20 analizowanych metafaz oraz pacjent z obecnością zmiany będącej polimorfizmem. Przykładowe kariogramy przedstawiono na Rycinie nr 16 oraz 17.



Ryc. 16. Przykładowy kariogram pacjenta MDS 90.1 wraz z zapisem kariotypu (badanie pierwsze, chory z GRUPY 4):46,XY[20]



Ryc. 17. Przykładowy kariogram pacjenta MDS 90.2 wraz z zapisem kariotypu (badanie drugie, chory z GRUPY 4):46,XY[20]

1.1.5 Ogólna częstość występowania aberracji cytogenetycznych w grupach pacjentów z nieprawidłowym kariotypem

Podsumowując tą część niniejszej pracy należy zwrócić uwagę, iż:

1. Prawidłowy kariotyp zaobserwowano u 42 chorych, co stanowi 53% (n=80);
2. Aberracje cytogenetyczne (Tabela nr 25) występujące w przynajmniej jednym badaniu zaobserwowano u 38 chorych, co stanowi 48% (n=80) przy czym w tej grupie:
 - 22 chorych miało nieprawidłowy kariotyp zarówno w pierwszym jak i drugim badaniu (22/38 tj. 58%),
 - 10 chorych (10/38 tj. 26%) kariotyp nieprawidłowy zawsze tylko w pierwszym badaniu,
 - 6 chorych (6/38 tj. 16%) kariotyp nieprawidłowy zawsze tylko drugim badaniu.

Tab. 25. Aberracje cytogenetyczne obserwowane w trzech grupach z kariotypem nieprawidłowym

Aberracja cytogenetyczna	Liczba pacjentów [n=38]	Częstość występowania zaobserwowanej zmiany w badanej grupie[%]
kariotyp złożony	12	32%
del(5q) (izolowana lub z dodatkową aberracją)	10	28%
del(7q)	1	5%
+8	6	16%
del(11q)	2	5%
inv(11)	1	2%
del(22q)	1	2%
Zmiany liczbowe	1	2%
der(12)	1	2%
t(12;12)	1	2%
add11q	1	2%
-Y	1	2%

1.2 Ryzyko cytogenetyczne w poszczególnych grupach pacjentów wg CCSS a wiek i płeć pacjentów

Na podstawie powyższych danych pacjenci z zespołem mielodysplastycznym zakwalifikowani zostali do odpowiednich grup ryzyka cytogenetycznego wg Kompleksowego Systemu Punktacji Cytogenetycznej (CCSS).

W grupie pierwszej (pacjenci z nieprawidłowym kariotypem w dwóch badaniach, n=22) mediana wieku pacjentów wynosiła 65 lat, a stosunek płci mężczyźni versus kobiety wynosił 10:12. Ryzyko cytogenetyczne dla poszczególnych pacjentów przedstawiono w Tabeli nr 26. Zarówno w pierwszym jak i w drugim badaniu najliczniej reprezentowane były grupa bardzo wysokiego ryzyka cytogenetycznego, pośredniego

i dobrego. W tej grupie chorych w pierwszym badaniu ryzyko cytogenetyczne było bardzo dobre lub dobre odpowiednio u jednego i siedmiu pacjentów. Natomiast ryzyko cytogenetyczne bardzo złe, złe lub pośrednie odpowiednio u sześciu, jednego lub siedmiu pacjentów. Należy podkreślić, że u dwóch pacjentów doszło do zmiany analizowanego parametru z pośredniego na złe oraz z bardzo dobrego na pośrednie (9%). Pozostali pacjenci pozostali w tych samych grupach ryzyka bez względu na rodzaj aberracji.

Tab. 26. Ryzyko cytogenetyczne obserwowane w grupie pierwszej

Ryzyko cytogenetyczne wg CCSS	Ryzyko cytogenetyczne wg CCSS (BADANIE I) (n=22)	Ryzyko cytogenetyczne wg CCSS (BADANIE I) (n=22)
Bardzo dobre	1	0
Dobre	7	7
Pośrednie	7	7
Złe	1	2
Bardzo złe	6	6

W grupie drugiej pacjentów (kariotyp nieprawidłowy tylko w pierwszym badaniu) mediana wieku wynosiła 60 lat i nie zaobserwowano różnic w rozkładzie płci (stosunek mężczyzn w tej grupie do kobiet to 6:4). W pierwszym badaniu u pacjentów z tej grupy najwięcej chorych znalazło się kolejno w grupie pośredniego i dobrego ryzyka cytogenetycznego.

W tej grupie chorych w pierwszym badaniu ryzyko cytogenetyczne było pośrednie lub dobre odpowiednio u czterech i trzech pacjentów. Natomiast ryzyko cytogenetyczne bardzo złe lub złe odpowiednio u dwóch i jednego pacjenta. Ze względu na fakt, że w drugim badaniu wszyscy pacjenci mieli prawidłowy kariotyp ryzyko cytogenetyczne dla wszystkich było dobre. Należy podkreślić, w związku z tym, że u 7 na 10 pacjentów doszło do zmiany ryzyka cytogenetycznego z pośredniego, złego lub bardzo złego na dobre (70%). Pozostali pacjenci pozostali w tej samej grupie ryzyka cytogenetycznego, które nadal pozostało dobre. Ryzyko cytogenetyczne dla poszczególnych pacjentów z grupy drugiej przedstawiono w Tabeli nr 27.

Tab. 27. Ryzyko cytogenetyczne obserwowane w grupie drugiej

Ryzyko cytogenetyczne wg CCSS	Ryzyko cytogenetyczne wg CCSS (BADANIE I) (n=10)	Ryzyko cytogenetyczne wg CCSS (BADANIE I) (n=10)
Bardzo dobre	0	0
Dobre	3	10
Pośrednie	4	0
Złe	1	0
Bardzo złe	2	0

W grupie trzeciej chorych (kariotyp nieprawidłowy tylko w drugim badaniu) mediana wieku wynosiła 70 lat i była najwyższa spośród wszystkich grup. Zaobserwowano również różnicę w płci pacjentów stosunek mężczyzn do kobiet wynosił 5:1 i był najwyższy. Ponadto u pięciu pacjentów doszło do zmiany ryzyka cytogenetycznego z dobrego na pośrednie (dwóch chorych), złe (jeden chory) i bardzo złe (dwóch chorych). U jednego pacjenta zmiana była korzystna, z grupy dobrego na bardzo dobre ryzyko cytogenetycznego. Ryzyko cytogenetyczne dla poszczególnych pacjentów z grupy trzeciej przedstawiono w Tabeli nr 28.

Tab. 28. Ryzyko cytogenetyczne obserwowane w grupie trzeciej

Ryzyko cytogenetyczne wg CCSS	Ryzyko cytogenetyczne wg CCSS (BADANIE I) (n=6)	Ryzyko cytogenetyczne wg CCSS (BADANIE I) (n=6)
Bardzo dobre	0	1
Dobre	6	0
Pośrednie	0	2
Złe	0	1
Bardzo złe	0	2

W czwartej grupie pacjentów (kariotyp prawidłowy w dwóch kolejnych badaniach) mediana wieku wynosiła 58 lat i była najniższą spośród wszystkich grup. W tej grupie chorych liczba mężczyzn i kobiet była równa (mężczyźni versus kobiety 21:21). Ponieważ kariotyp był prawidłowy u wszystkich pacjentów w tej grupie ryzyko cytogenetyczne wg CCSS było dobre.

Natomiast w całej badanej grupie 80 pacjentów bez względu na rodzaj występujących aberracji chromosomowych szacowane ryzyko cytogenetyczne nie różniło się znacząco pomiędzy pierwszym i drugim badaniem, najliczniej reprezentowana była grupa pacjentów, u których ryzyko cytogenetyczne było niskie (Tabela nr 29).

Tab. 29. Ryzyko cytogenetyczne obserwowane we wszystkich czterech grupach chorych

Ryzyko cytogenetyczne wg CCSS	Ryzyko cytogenetyczne wg CCSS (BADANIE I) (n=80)	Ryzyko cytogenetyczne wg CCSS (BADANIE II) (n=80)
Bardzo dobre	1	1
Dobre	58	59
Pośrednie	11	9
Złe	2	3
Bardzo złe	8	8

Ponadto zaobserwowano, że mediana wieku była najniższa w grupie chorych z prawidłowym kariotypem i ryzykiem cytogenetycznym dobrym, natomiast najwyższa

w grupie chorych z nieprawidłowym kariotypem w drugim badaniu i wynosiła 70 lat. Również w tej grupie chorych zaobserwowano różnicę w płci chorych – stosunek mężczyzn do kobiet wynosił 5:1 podczas gdy w pozostałych analizowanych grupach był podobny. Większe różnice obserwowano u pacjentów w poszczególnych grupach cytogenetycznych (Tabela nr 30).

Tab. 30. Ryzyko cytogenetyczne obserwowane we wszystkich grupach a wiek i płeć

Ryzyko /grupa chorych	Pogorszenie rokowania wg CCSS	Mediana wieku w danej grupie	Płeć (M vs K)
Grupa 1 (n=22)	2 (9%)	65 lat	10:12
Grupa 2 (n=10)	0 (0%)	60 lat	6:4
Grupa 3 (n=6)	6 (100%)	70 lat	5:1
Grupa 4 (n=42)	0 (0%)	58 lat	21:21

2. Analiza molekularna

Spośród 80 pacjentów, u których z zabezpieczonego po badaniu cytogenetycznym peletu komórkowego wyizolowano DNA wg opisanego w pracy protokołu izolacji na aparacie MagCore. Po izolacji oceniono stężenie i jakość uzyskanego DNA z wykorzystaniem metody spektrofotometrycznej i wybrano ostateczną grupę 59 pacjentów, u której wykonano analizę wariantów sekwencji trzech wybranych genów: *ASXL1*, *SF3B1*, *RUNX1* zgodnie z założeniami niniejszej pracy (stężenie DNA ≥ 10 ng/ μ l). Liczba pacjentów wybrana do ostatecznej analizy metodami pirosekwencjonowania wynikała z faktu, iż korzystano z materiału archiwalnego, wcześniej wykorzystywanego do analizy GTG, w związku z tym jego ilość nie zawsze była wystarczająca do przeprowadzenia izolacji DNA, natomiast wykorzystanie materiału pacjenta z innego pobrania uniemożliwiłoby rzeczywistą korelację kariotypu pacjenta i profilu molekularnego w zakresie wybranych do analizy genów.

2.1 Analiza ilościowa i jakościowa wyizolowanego DNA

W celu określenia jakości i stężenia wyizolowanego DNA wykonano pomiary spektrofotometryczne na aparacie NanoDrop N-1000. Wartość parametru A260/A280 dla wyizolowanych próbek mieściła się w zakresie wartości 1,8-1,9, co świadczyło o dobrym oczyszczeniu wyizolowanego DNA.

Stężenie otrzymanego DNA w poszczególnych próbkach od pacjentów z zespołami mielodysplastycznym różniło się od siebie w zależności od objętości materiału pozostałego po hodowli komórkowej. W celu przeprowadzenia analizy sekwencji DNA metodą pirosekwencjonowania konieczne było uzyskanie DNA o stężeniu nie mniejszym niż 10 ng/ μ l. W związku z tym dalszej analizie metodami biologii molekularnej poddano 59 spośród 80 pacjentów.

Lista pacjentów wytypowana do analizy profilu molekularnego w zakresie wybranych genów została przedstawiona w Tabeli nr 31.

Tab. 31. Lista pacjentów wytypowana do analizy profilu molekularnego w zakresie wybranych genów [w tabeli zamieszczono wartości stężenia wyizolowanego DNA]

Lp.	nr MDS (I badanie)	nr pacjenta	stężenie DNA (ng/μl)	nr MDS (II badanie)	nr pacjenta	stężenie DNA (ng/μl)
1	MDS 1.1	16414	434,2	MDS 1.2	13218	159,7
2	MDS 3.1	29114	91,2	MDS 3.2	93214	62,6
3	MDS 6.1	18007	45,7	MDS 6.2	32110	20,9
4	MDS 7.1	72914	204,9	MDS 7.2	73215	170,8
5	MDS 9.1	74216	39,4	MDS 9.2	137918	168,8
6	MDS 11.1	41616	241,3	MDS 11.2	125616	72,6
7	MDS 12.1	20512	116,1	MDS 12.2	11213	92,9
8	MDS 14.1	15512	153,8	MDS 14.2	21313	285,9
9	MDS 15.1	92215	53,3	MDS 15.2	86516	348,3
10	MDS 16.1	121518	43,6	MDS 16.2	76819	44,00
11	MDS 17.1	12715	243,9	MDS 17.2	127215	100
12	MDS 20.1	117616	102,6	MDS 20.2	108517	45,6
13	MDS 23.1	9015	280,8	MDS 23.2	6116	58,1
14	MDS 25.1	41814	87,8	MDS 25.2	16015	167,3
15	MDS 27.1	53714	33,3	MDS 27.2	132616	527,7
16	MDS 28.1	55012	16,3	MDS 28.2	49613	130
17	MDS 31.1	78617	96	MDS 31.2	72718	35,3
18	MDS 36.1	3416	76,1	MDS 36.2	76516	184,4
19	MDS 37.1	130016	316,9	MDS 37.2	129017	70,9
20	MDS 39.1	127817	42,5	MDS 39.2	60518	170
21	MDS 40.1	1719	83	MDS 40.2	55220	108
22	MDS 41.1	4714	73	MDS 41.2	72815	125,8
23	MDS 42.1	90815	140,4	MDS 42.2	119019	100,9

Lp.	nr MDS (I badanie)	nr pacjenta	stężenie DNA (ng/μl)	nr MDS (II badanie)	nr pacjenta	stężenie DNA (ng/μl)
24	MDS 43.1	94018	147,5	MDS 43.2	60919	21,4
25	MDS 44.1	132515	30,7	MDS 44.2	129817	167,8
26	MDS 45.1	33010	36,7	MDS 45.2	70113	66,4
27	MDS 46.1	93217	232,2	MDS 46.2	71018	206,3
28	MDS 47.1	31910	248	MDS 47.2	54113	40,3
29	MDS 49.1	61513	200,9	MDS 49.2	59215	141,9
30	MDS 50.1	61818	122,2	MDS 50.2	43620	23,9
31	MDS 51.1	115116	16,6	MDS 51.2	24619	218,5
32	MDS 54.1	125215	84,9	MDS 54.2	94918	109,8
33	MDS 56.1	18417	114,5	MDS 56.2	79018	116,4
34	MDS 57.1	8217	94,7	MDS 57.2	73818	84,8
35	MDS 58.1	7010	22,2	MDS 58.2	7711	119,8
36	MDS 59.1	76517	176,8	MDS 59.2	55818	131,1
37	MDS 61.1	121615	222,8	MDS 61.2	76818	26,1
38	MDS 65.1	49313	670	MDS 65.2	2615	160,7
39	MDS 66.1	29212	157,2	MDS 66.2	86317	3,5 (26,9)
40	MDS 67.1	13115	297,5	MDS 67.2	52416	115,5
41	MDS 68.1	43919	109	MDS 68.2	106919	88,8
42	MDS 69.1	32913	67,7	MDS 69.2	66914	12,8
43	MDS 71.1	152417	86,9	MDS 71.2	73418	46,1
44	MDS 72.1	45519	380	MDS 72.2	79320	33,5
45	MDS 74.1	74315	50,5	MDS 74.2	63516	145,2
46	MDS 75.1	15113	102	MDS 75.2	71913	53,8
47	MDS 77.1	32417	108,5	MDS 77.2	21718	205
48	MDS 78.1	92419	130,2	MDS 78.2	109620	36

Lp.	nr MDS (I badanie)	nr pacjenta	stężenie DNA (ng/μl)	nr MDS (II badanie)	nr pacjenta	stężenie DNA (ng/μl)
49	MDS 80.1	42609	194	MDS 80.2	29512	87,9
50	MDS 81.1	77218	36,4	MDS 81.2	72019	76,5
51	MDS 82.1	45211	102,3	MDS 82.2	45915	135,2
52	MDS 83.1	5114	52,7	MDS 83.2	42515	19
53	MDS 84.1	7811	20,3	MDS 84.2	33816	39,5
54	MDS 85.1	39415	275	MDS 85.2	127616	166,5
55	MDS 86.1	5515	258	MDS 86.2	54616	90,7
56	MDS 87.1	26215	222	MDS 87.2	93515	488,7
57	MDS 88.1	18713	180,4	MDS 88.2	13414	22,6
58	MDS 90.1	14016	367	MDS 90.2	78417	37
59	MDS 93.1	13211	55,3	MDS 93.2	24914	17,5

2.2 Sekwencje starterów

Sekwencje starterów wykorzystanych w niniejszej pracy przedstawiono w Tabeli nr 32.

Tab. 32. Sekwencje starterów do reakcji PCR i pirosekwencjonowania (F- forward, R – reverse, S- starter sekwencyjny, biot – starter biotynylowany)

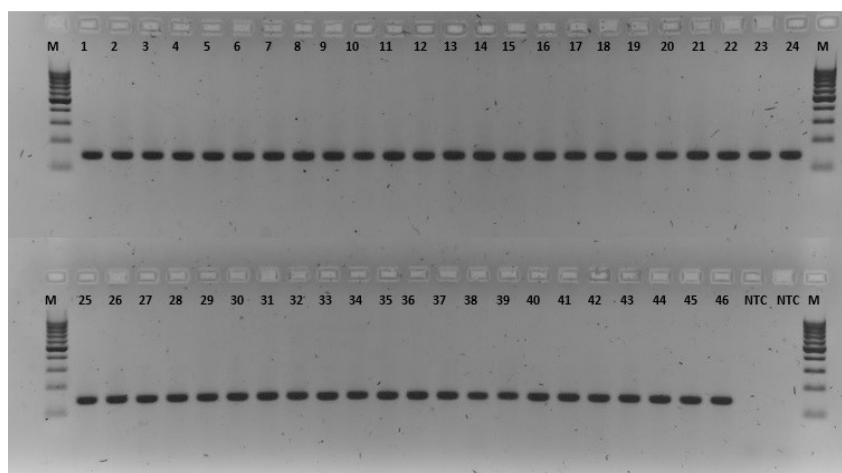
Gen	Analizowana zmiana	starter	Sekwencja startera	Temp. przyłączania (°C)	Długość ampliconu (pz)
ASXL1	c.1945G>T	F	GAGGTCACCACTGCCATAGAGAG	55 °C	135
		R	biot-CACAGGCCTCACCACCAT		
		S	GAGGTCACCACTGCCATAGAGAG		
RUNX1	c.509-2A>C	F	GAGGTCACCACTGCCATAGAGAG	55 °C	76
		R	biot-CACAGGCCTCACCACCAT		
		S	GGGGGGGGTGGCCCG		
SF3B1	c.1874G>T	F	biot-TTAAGAAGGGCAATAAAGAAGGAA	61 °C	151
		R	TTTACATTTTAGGCTGCTGGTCT		
		S	ATAGATAACATGGATGAGTA		

Wszystkie startery zsyntezowane zostały przez firmę Genomed.

2.3 Rozdział elektroforetyczny produktów amplifikacji

2.3.1 Wariant c.1945G>T genu *ASXL1*

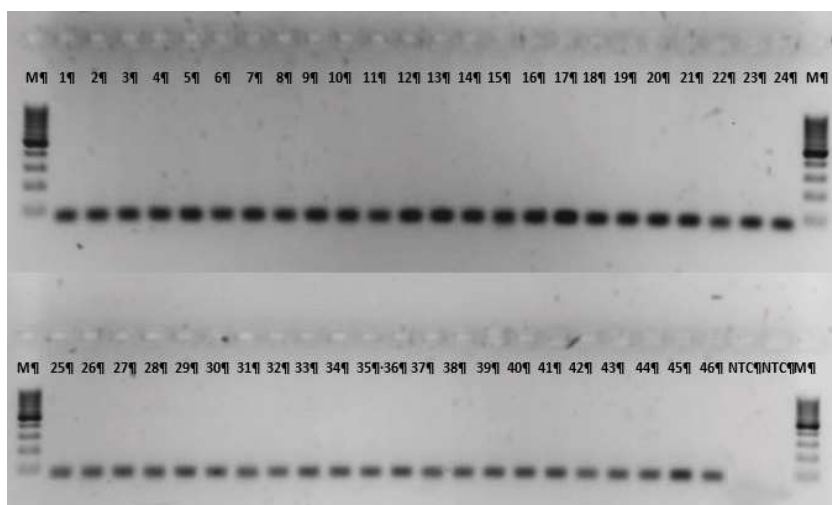
W wyniku rozdziału elektroforetycznego produktów reakcji PCR potwierdzono otrzymanie produktów o wielkości 135 pz (Rycina nr 18).



Ryc. 18. Przykładowy wynik rozdziału elektroforetycznego produktów PCR wykorzystanych do pirosekwencjonowania dla genu *ASXL1*. Numery 1-46 oznaczają próbki, z których wyizolowano DNA i wykonano reakcję PCR, M - marker wielkości, NTC – kontrola bez matrycy DNA (ang. No Template Control)

2.3.2 Wariant c.509-2A>C genu *RUNXI*

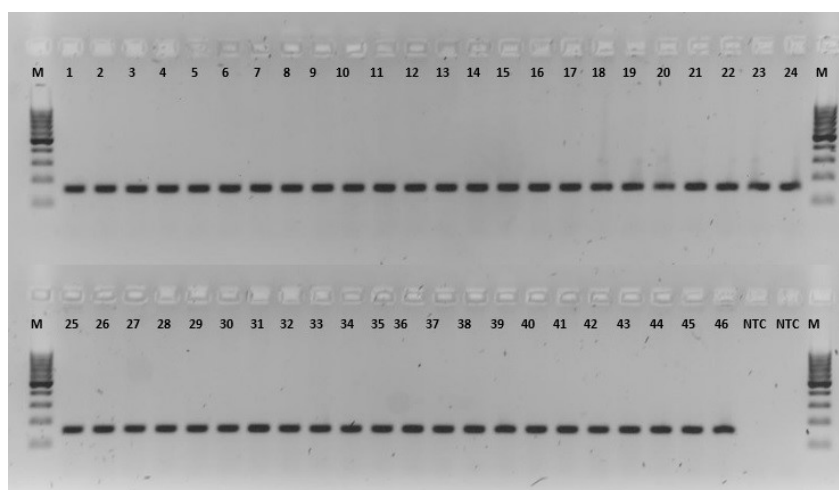
W wyniku rozdziału elektroforetycznego produktów reakcji PCR potwierdzono otrzymanie produktów o wielkości 76 pz (Rycina nr 19).



Ryc. 19. Przykładowy wynik rozdziału elektroforetycznego produktów PCR wykorzystanych do pirosekwencjonowania dla genu *RUNXI*. Numery 1-46 oznaczają próbki, z których wyizolowano DNA i wykonano reakcję PCR, M - marker wielkości, NTC – kontrola bez matrycy DNA (ang. No Template Control)

2.3.3 Wariant c.1874G>T genu *SF3B1*

W wyniku rozdziału elektroforetycznego produktów reakcji PCR potwierdzono otrzymanie produktów o wielkości 151 pz (Rycina nr 20).



Ryc. 20. Przykładowy wynik rozdziału elektroforetycznego produktów PCR wykorzystanych do pirosekwencjonowania dla genu *SF3B1*. Numery 1-46 oznaczają próbki, z których wyizolowano DNA i wykonano reakcję PCR, M - marker wielkości, NTC – kontrola bez matrycy DNA (ang. No Template Control)

2.4 Analiza wyników pirosekwencjonowania

Analiza pirosekwencjonowania została przeprowadzona dla 59 pacjentów z rozpoznaniem zespołu mielodysplastycznego. Dla każdego pacjenta analizowano dwie próbki, które kolekcjonowane były w dwóch punktach czasowych. W wyniku przeprowadzonej analizy warianty sekwencji genów *ASXL1*, *RUNX1* oraz *SF3B1* wykryto sumarycznie u siedmiu spośród 59 pacjentów (7/59, tj. 12%). Byli to pacjenci MDS 7, MDS 43, MDS 44, MDS 45, MDS 49, MDS 69 oraz MDS 77. U każdego z w/w siedmiu pacjentów wykryto tylko jedną analizowaną zmianę w genie *ASXL1* (4/59) lub *SF3B1* (3/59). Natomiast we wszystkich analizowanych próbkach nie stwierdzono obecności wariantu próbkach c.509-2A>C genu *RUNX1*.

Aby otrzymać wiarygodne wyniki badań przeprowadzono optymalizację metody pirosekwencjonowania z wykorzystaniem próbek DNA pochodzących od osób zdrowych. W pierwszym etapie dokonano analizy wariantów sekwencji DNA genów *ASXL1*, *RUNX1* oraz *SF3B1*. Dzięki temu możliwe było dokładne określenie punktu odcięcia (*cutt-off*) dla poszczególnych analizowanych wariantów. I tak dla wariantu c.1945G>T genu *ASXL1* było to 2, dla wariantu c.509-2A>C genu *RUNX1* to 5, a wariantu c.1874G>T genu *SF3B1* to 4.

2.4.1 Wariant c.1945G>T genu *ASXL1*

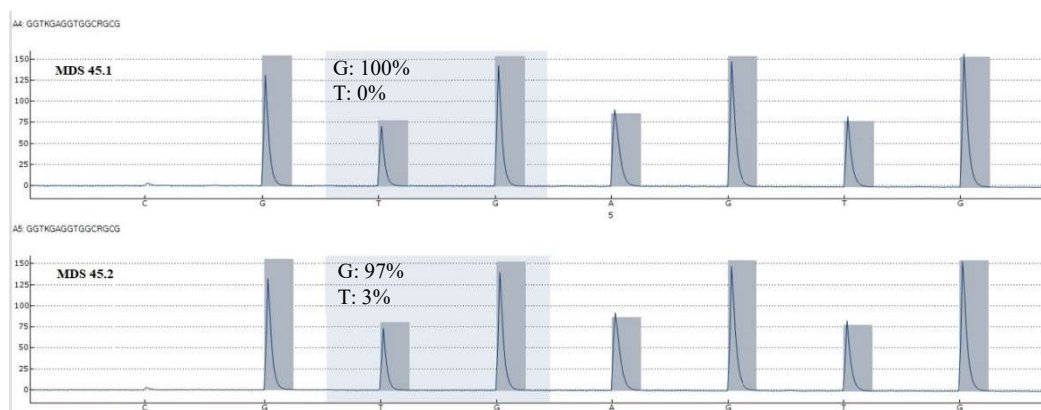
Analiza wariantu sekwencji genu *ASXL1* metodą pirosekwencjonowania u pacjentów z zespołem mielodysplastycznym wykazała, występowanie poszukiwanej zmiany c.1945G>T u czterech pacjentów (4/59 tj. 7%): MDS 45, MDS 49, MDS 69 oraz MDS 77. Co więcej analizowana zmiana występowała zawsze w próbce pochodzącej z kolejnego badania pacjenta. Natomiast stosunek allelu dzikiego do zmutowanego wynosił dla pacjenta MDS 45 – 97:3, MDS 49 – 96:4, MDS 69 – 98:2 oraz MDS 77 – 93:7. Wyniki pirosekwencjonowania dla wszystkich pacjentów przedstawiono w Tabeli nr 33, natomiast przykładowe pirogramy na Rycinach nr 21, 22, 23 oraz 24.

Tab. 33. Zestawienie wyników pirosekwencjonowania fragmentu genu *ASXL1* dla całej grupy pacjentów w dwóch punktach czasowych (kolorem czerwonym zaznaczono próbki pacjentów z poszukiwaną zmianą).

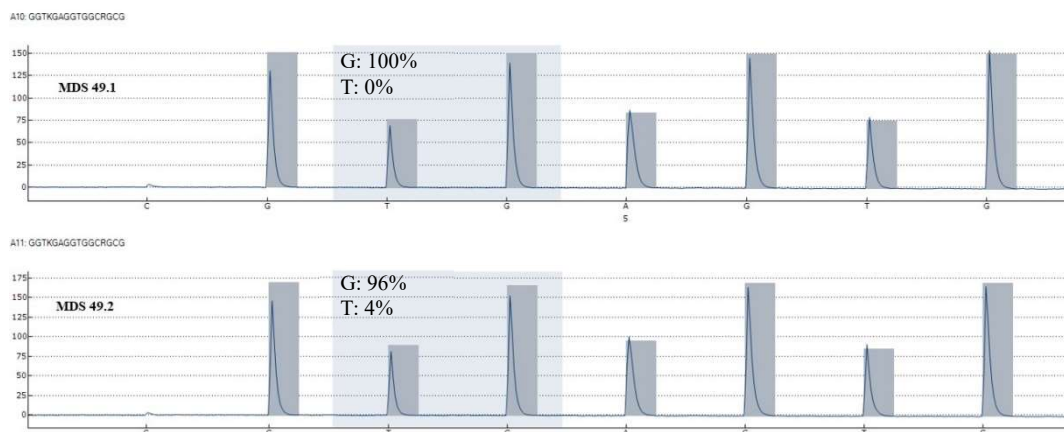
Numer pacjenta	częstość występowania zasady azotowej G (%)	częstość występowania zasady azotowej T (%)
MDS 1.1	100	0
MDS 1.2	100	0
MDS 3.1	100	0
MDS 3.2	100	0
MDS 6.1	100	0
oraz MDS 6.2	100	0
MDS 7.1	100	0
MDS 7.2	100	0
MDS 9.1	100	0
MDS 9.2	100	0
MDS 11.1	100	0
MDS 11.2	100	0
MDS 12.1	100	0
MDS 12.2	100	0
MDS 14.1	100	0
MDS 14.2	100	0
MDS 15.1	100	0
MDS 15.2	100	0
MDS 16.1	100	0
MDS 16.2	100	0
MDS 17.1	100	0
MDS 17.2	100	0
MDS 20.1	100	0
MDS 20.2	99,52	0,48
MDS 23.1	100	0
MDS 23.2	100	0
MDS 25.1	100	0
MDS 25.2	100	0
MDS 27.1	100	0
MDS 27.2	100	0
MDS 28.1	100	0
MDS 28.2	100	0
MDS 31.1	100	0
MDS 31.2	100	0
MDS 36.1	100	0
MDS 36.2	100	0
MDS 37.1	100	0
MDS 37.2	100	0
MDS 39.1	100	0
MDS 39.2	100	0
MDS 40.1	100	0
MDS 40.2	100	0
MDS 41.1	100	0
MDS 41.2	100	0
MDS 42.1	100	0
MDS 42.2	100	0

Numer pacjenta	częstość występowania zasady azotowej G (%)	częstość występowania zasady azotowej T (%)
MDS 43.1	98,35	1,65
MDS 43.2	100	0
MDS 44.1	100	0
MDS 44.2	100	0
MDS 45.1	100	0
MDS 45.2	97,05	2,95
MDS 46.1	100	0
MDS 46.2	99,18	0,82
MDS 47.1	98,59	1,41
MDS 47.2	100	0
MDS 49.1	100	0
MDS 49.2	96,02	3,98
MDS 50.1	100	0
MDS 50.2	100	0
MDS 51.1	100	0
MDS 51.2	100	0
MDS 54.1	100	0
MDS 54.2	98,85	1,15
MDS 56.1	100	0
MDS 56.2	100	0
MDS 57.1	100	0
MDS 57.2	100	0
MDS 58.1	100	0
MDS 58.2	100	0
MDS 59.1	100	0
MDS 59.2	100	0
MDS 61.1	100	0
MDS 61.2	100	0
MDS 65.1	100	0
MDS 65.2	100	0
MDS 66.1	100	0
MDS 66.2	100	0
MDS 67.1	100	0
MDS 67.2	100	0
MDS 68.1	100	0
MDS 68.2	100	0
MDS 69.1	100	0
MDS 69.2	97,76	2,24
MDS 71.1	100	0
MDS 71.2	99,79	0,21
MDS 72.1	100	0
MDS 72.2	98,54	1,46
MDS 74.1	100	0
MDS 74.2	98,15	1,85
MDS 75.1	99,09	0,91
MDS 75.2	99,19	0,81
MDS 77.1	99,93	0,07
MDS 77.2	92,63	7,37

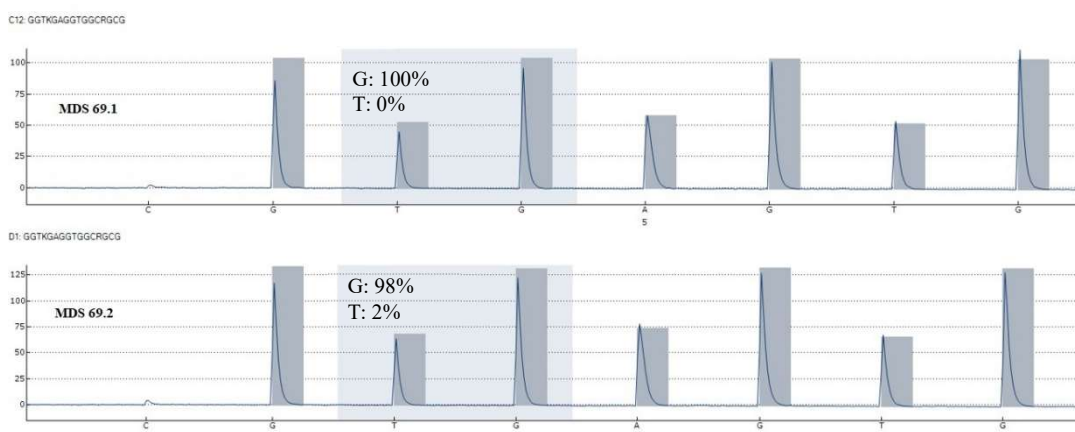
Numer pacjenta	częstość występowania zasady azotowej G (%)	częstość występowania zasady azotowej T (%)
MDS 78.1	100	0
MDS 78.2	100	0
MDS 80.1	100	0
MDS 80.2	100	0
MDS 81.1	100	0
MDS 81.2	99,88	0,12
MDS 82.1	100	0
MDS 82.2	100	0
MDS 83.1	100	0
MDS 83.2	100	0
MDS 84.1	100	0
MDS 84.2	100	0
MDS 85.1	100	0
MDS 85.2	100	0
MDS 86.1	100	0
MDS 86.2	100	0
MDS 87.1	100	0
MDS 87.2	100	0
MDS 88.1	100	0
MDS 88.2	100	0
MDS 90.1	100	0
MDS 90.2	100	0
MDS 93.1	100	0
MDS 93.2	100	0



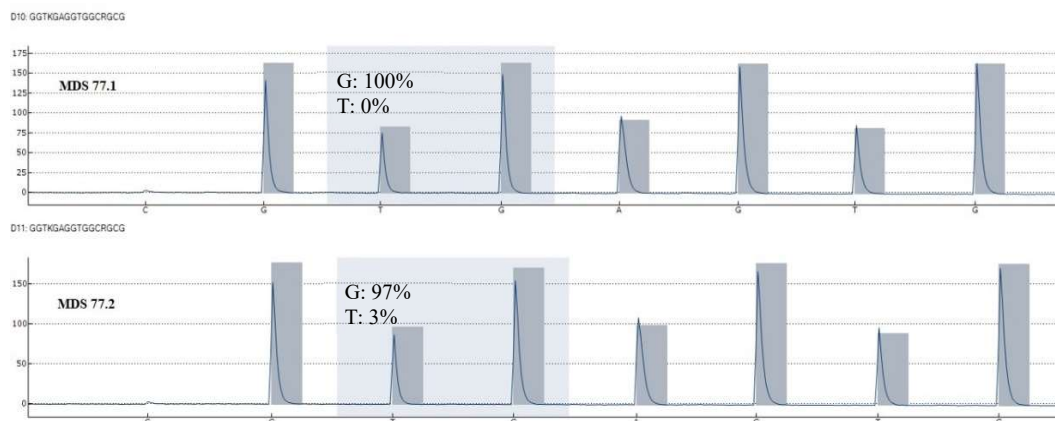
Ryc. 21. Wynik pirosekwencjonowania pacjenta MDS45 (MDS 45.1 – badanie pierwsze, MDS 45.2 – badanie drugie)



Ryc. 22. Wynik pirosekwencjonowania pacjenta MDS49 (MDS 49.1 – badanie pierwsze, MDS 49.2 – badanie drugie)



Ryc. 23. Wynik pirosekwencjonowania pacjenta MDS69 (MDS 69.1 – badanie pierwsze, MDS 69.2 – badanie drugie)



Ryc. 24. Wynik pirosekwencjonowania pacjenta MDS77 (MDS 77.1 – badanie pierwsze, MDS 77.2 – badanie drugie)

W przypadku tego wariantu w dodatkowo analizowanej grupie w jednym punkcie czasowym poszukiwany patogenny wariant wykryto u dwóch na 41 chorych co stanowi 5%, ponadto Ci pacjenci transformowali do ostrej białaczki szpikowej (uzyskano dane kliniczne z ośrodka leczącego pacjentów, w których potwierdzono fakt transformacji do AML oraz uściślono, iż próbka z patogennym wariantem pochodziła od pacjenta z okresu kiedy nie doszło u niego jeszcze do rozwinięcia ostrej białaczki szpikowej.

Reasumując patogenny wariant c.1945G>T wykryto u 6 na 100 chorych, co stanowi 6%.

2.4.2 Wariant c.509-2A>C genu *RUNX1*

Analiza wariantu sekwencji genu *RUNX1* metodą pirosekwencjonowania u pacjentów z zespołem mielodysplastycznym nie wykazała obecności poszukiwanej zmiany we wszystkich analizowanych próbkach. Wyniki pirosekwencjonowania dla wszystkich pacjentów przedstawiono w Tabeli nr 34.

Tab. 34. Zestawienie wyników pirosekwencjonowania fragmentu genu *RUNX1* dla całej grupy pacjentów w dwóch punktach czasowych.

Numer pacjenta	częstość występowania zasady azotowej A (%)	częstość występowania zasady azotowej C (%)
MDS 1.1	100	0
MDS 1.2	100	0
MDS 3.1	100	0
MDS 3.2	100	0
MDS 6.1	99,89	0,11
MDS 6.2	99,1	0,9
MDS 7.1	100	0
MDS 7.2	100	0
MDS 9.1	100	0
MDS 9.2	100	0
MDS 11.1	100	0
MDS 11.2	99,45	0,55
MDS 12.1	100	0
MDS 12.2	100	0
MDS 14.1	100	0
MDS 14.2	100	0
MDS 15.1	100	0
MDS 15.2	100	0
MDS 16.1	100	0
MDS 16.2	100	0
MDS 17.1	100	0
MDS 17.2	100	0
MDS 20.1	100	0
MDS 20.2	100	0

Numer pacjenta	częstość występowania zasady azotowej A (%)	częstość występowania zasady azotowej C (%)
MDS 23.1	100	0
MDS 23.2	100	0
MDS 25.1	99,56	0,44
MDS 25.2	100	0
MDS 27.1	100	0
MDS 27.2	100	0
MDS 28.1	100	0
MDS 28.2	100	0
MDS 31.1	100	0
MDS 31.2	100	0
MDS 36.1	100	0
MDS 36.2	100	0
MDS 37.1	100	0
MDS 37.2	100	0
MDS 39.1	100	0
MDS 39.2	100	0
MDS 40.1	100	0
MDS 40.2	100	0
MDS 41.1	100	0
MDS 41.2	99,82	0,18
MDS 42.1	100	0
MDS 42.2	100	0
MDS 43.1	99,89	0,11
MDS 43.2	99,51	0,49
MDS 44.1	100	0
MDS 44.2	100	0
MDS 45.1	100	0
MDS 45.2	99,91	0,09
MDS 46.1	100	0
MDS 46.2	99,66	0,34
MDS 47.1	100	0
MDS 47.2	100	0
MDS 49.1	100	0
MDS 49.2	99,87	0,13
MDS 50.1	100	0
MDS 50.2	99,34	0,66
MDS 51.1	100	0
MDS 51.2	100	0
MDS 54.1	99,26	0,74
MDS 54.2	100	0
MDS 56.1	100	0
MDS 56.2	100	0
MDS 57.1	100	0
MDS 57.2	100	0
MDS 58.1	100	0
MDS 58.2	100	0
MDS 59.1	100	0
MDS 59.2	99,96	0,04
MDS 61.1	100	0

Numer pacjenta	częstość występowania zasady azotowej A (%)	częstość występowania zasady azotowej C (%)
MDS 61.2	100	0
MDS 65.1	100	0
MDS 65.2	100	0
MDS 66.1	100	0
MDS 66.2	100	0
MDS 67.1	100	0
MDS 67.2	99,94	0,06
MDS 68.1	100	0
MDS 68.2	100	0
MDS 69.1	100	0
MDS 69.2	98,64	1,36
MDS 71.1	98,97	1,03
MDS 71.2	100	0
MDS 72.1	100	0
MDS 72.2	100	0
MDS 74.1	100	0
MDS 74.2	99,17	0,83
MDS 75.1	99,9	0,1
MDS 75.2	100	0
MDS 77.1	100	0
MDS 77.2	100	0
MDS 78.1	100	0
MDS 78.2	100	0
MDS 80.1	100	0
MDS 80.2	100	0
MDS 81.1	100	0
MDS 81.2	100	0
MDS 82.1	100	0
MDS 82.2	100	0
MDS 83.1	99,56	0,44
MDS 83.2	100	0
MDS 84.1	100	0
MDS 84.2	100	0
MDS 85.1	100	0
MDS 85.2	100	0
MDS 86.1	100	0
MDS 86.2	100	0
MDS 87.1	100	0
MDS 87.2	100	0
MDS 88.1	99,47	0,53
MDS 88.2	99,16	0,84
MDS 90.1	100	0
MDS 90.2	99,41	0,59
MDS 93.1	99,93	0,07
MDS 93.2	100	0

W przypadku tego wariantu w grupie dodatkowo analizowanej w jednym punkcie czasowym poszukiwany patogenny wariant wykryto u jednego na 41 chorych co stanowi 2%.

Reasumując patogenny wariant c.502-2A>C genu *RUNX1* wykryto u 1 na 100 chorych, co stanowi 1%.

2.4.3 Wariant c.1874G>T genu *SF3B1*

Analiza wariantu sekwencji genu *SF3B1* metodą pirosekwencjonowania u pacjentów z zespołem mielodysplastycznym wykazała, występowanie poszukiwanej zmiany c.1874G>T u trzech pacjentów (3/59 tj. 5%): MDS 7, MDS 43 oraz MDS 44. W przypadku pacjenta MDS 7 zmiana występowała zarówno w próbce pobranej podczas pierwszego badania jak i w próbce z kolejnego badania tego pacjenta. Natomiast stosunek allelu dzikiego do zmutowanego u tego pacjenta wynosił odpowiednio dla pierwszej próbki 70:30, a dla drugiej 71:29. W przypadku pacjentów MDS 43 i MDS 44 analizowana zmiana występowała zawsze w jednej próbce. U pacjenta MDS 43 była to próbka pochodząca z drugiego badania, a stosunek allelu dzikiego do zmutowanego wynosił 95:5. Natomiast dla pacjenta MDS 44 była to próbka pochodząca z pierwszego badania, a stosunek allelu dzikiego do zmutowanego wynosił 94:6. Wyniki pirosekwencjonowania dla wszystkich pacjentów przedstawiono w Tabeli nr 35, natomiast przykładowe pirogramy na Rycinach nr 25, 26 oraz 27.

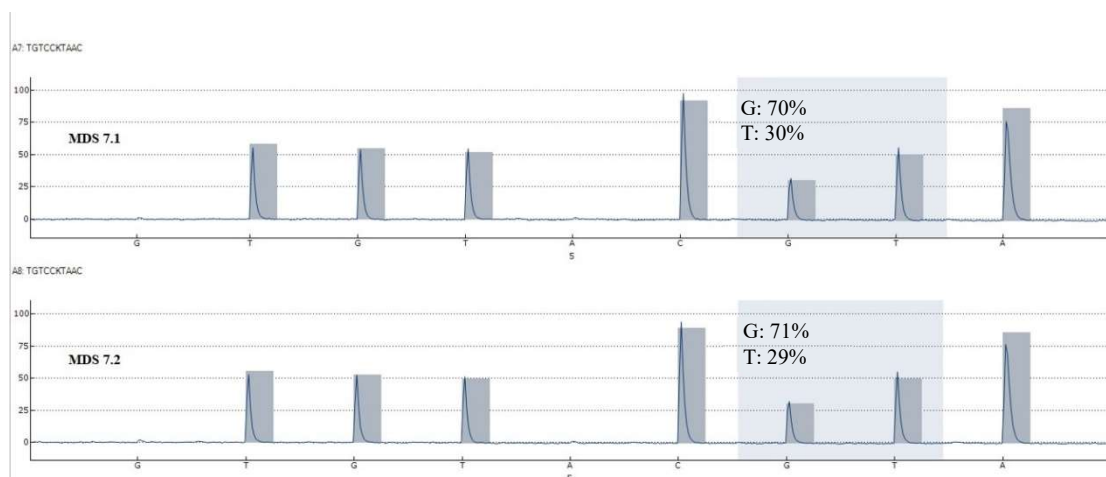
Tab. 35. Zestawienie wyników pirosekwencjonowania fragmentu genu *SF3B1* dla całej grupy pacjentów w dwóch punktach czasowych (kolorem czerwonym zaznaczono próbki pacjentów z poszukiwaną zmianą).

Numer pacjenta	częstość występowania zasady azotowej G (%)	częstość występowania zasady azotowej T (%)
MDS 1.1	98,59	1,41
MDS 1.2	98,3	1,7
MDS 3.1	98,08	1,92
MDS 3.2	98,42	1,58
MDS 6.1	97,64	2,36
MDS 6.2	99,65	0,35
MDS 7.1	70,05	29,95
MDS 7.2	71,47	28,53
MDS 9.1	99,98	0,02
MDS 9.2	100	0
MDS 11.1	97,46	2,54
MDS 11.2	98,45	1,55
MDS 12.1	98,91	1,09
MDS 12.2	99,65	0,35
MDS 14.1	98,72	1,28

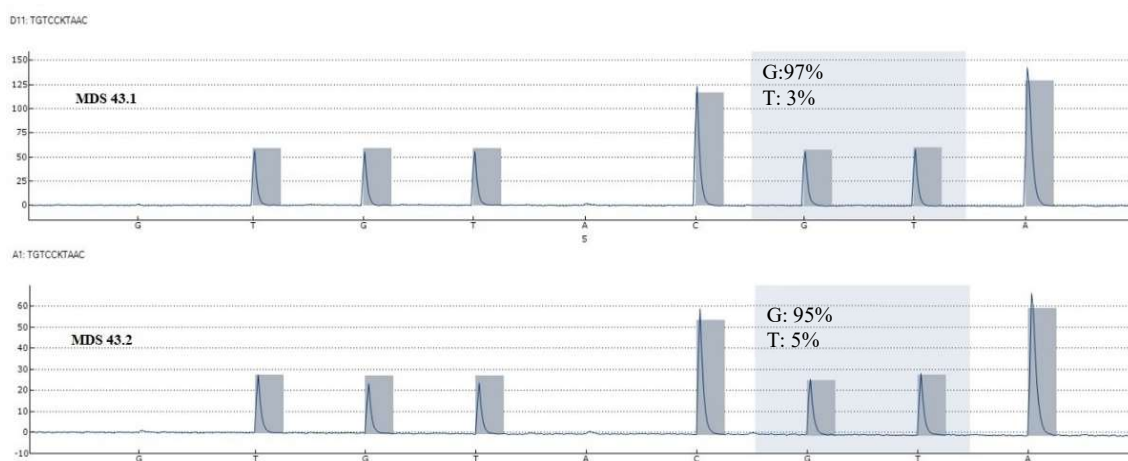
Numer pacjenta	częstość występowania zasady azotowej G (%)	częstość występowania zasady azotowej T (%)
MDS 14.2	98,45	1,55
MDS 15.1	99,27	0,73
MDS 15.2	97,47	2,53
MDS 16.1	99,3	0,7
MDS 16.2	98,51	1,49
MDS 17.1	97,68	2,32
MDS 17.2	98,02	1,98
MDS 20.1	98,78	1,22
MDS 20.2	97,24	2,76
MDS 23.1	98,76	1,24
MDS 23.2	99,29	0,71
MDS 25.1	98,97	1,03
MDS 25.2	99,02	0,98
MDS 27.1	100	0
MDS 27.2	99,18	0,82
MDS 28.1	99,26	0,74
MDS 28.2	99,15	0,85
MDS 31.1	98,05	1,95
MDS 31.2	98,13	1,87
MDS 36.1	96,78	3,22
MDS 36.2	99,25	0,75
MDS 37.1	98,34	1,66
MDS 37.2	98,11	1,89
MDS 39.1	98,53	1,47
MDS 39.2	100	0
MDS 40.1	99	1
MDS 40.2	99,45	0,55
MDS 41.1	98,03	1,97
MDS 41.2	99,68	0,32
MDS 42.1	99,77	0,23
MDS 42.2	99,5	0,5
MDS 43.1	97,38	2,62
MDS 43.2	94,98	5,02
MDS 44.1	94,02	5,98
MDS 44.2	96,57	3,43
MDS 45.1	99	1
MDS 45.2	96,81	3,19
MDS 46.1	99,05	0,95
MDS 46.2	99,7	0,3
MDS 47.1	98,86	1,14
MDS 47.2	99,16	0,84
MDS 49.1	100	0
MDS 49.2	98,39	1,61
MDS 50.1	98,88	1,12
MDS 50.2	97,74	2,26
MDS 51.1	97,01	2,99
MDS 51.2	98,02	1,98
MDS 54.1	98,24	1,76

Numer pacjenta	częstość występowania zasady azotowej G (%)	częstość występowania zasady azotowej T (%)
MDS 54.2	98,6	1,4
MDS 56.1	98,95	1,05
MDS 56.2	100	0
MDS 57.1	100	0
MDS 57.2	99,79	0,21
MDS 58.1	99,9	0,1
MDS 58.2	99,14	0,86
MDS 59.1	99,92	0,08
MDS 59.2	98,51	1,49
MDS 61.1	99,55	0,45
MDS 61.2	98,27	1,73
MDS 65.1	98,71	1,29
MDS 65.2	99,13	0,87
MDS 66.1	100	0
MDS 66.2	98,33	1,67
MDS 67.1	100	0
MDS 67.2	98,21	1,79
MDS 68.1	99,78	0,22
MDS 68.2	99,23	0,77
MDS 69.1	99,88	0,12
MDS 69.2	98,28	1,72
MDS 71.1	99,06	0,94
MDS 71.2	98,82	1,18
MDS 72.1	98,45	1,55
MDS 72.2	96,84	3,16
MDS 74.1	99,35	0,65
MDS 74.2	98,8	1,2
MDS 75.1	100	0
MDS 75.2	99,7	0,3
MDS 77.1	100	0
MDS 77.2	95,88	4,12
MDS 78.1	98,56	1,44
MDS 78.2	99,53	0,47
MDS 80.1	97,34	2,66
MDS 80.2	98,88	1,12
MDS 81.1	98,26	1,74
MDS 81.2	97,81	2,19
MDS 82.1	98,29	1,71
MDS 82.2	98,38	1,62
MDS 83.1	97,58	2,42
MDS 83.2	98,36	1,64
MDS 84.1	98,61	1,39
MDS 84.2	98,3	1,7
MDS 85.1	98,02	1,98
MDS 85.2	98,59	1,41
MDS 86.1	99,21	0,79
MDS 86.2	98,44	1,56
MDS 87.1	96,27	3,73

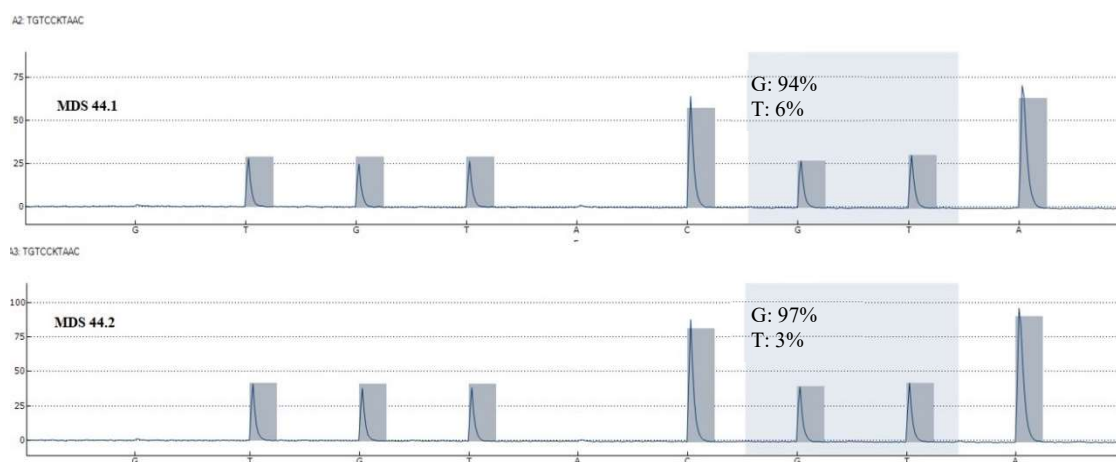
Numer pacjenta	częstość występowania zasady azotowej G (%)	częstość występowania zasady azotowej T (%)
MDS 87.2	98,59	1,41
MDS 88.1	98,43	1,57
MDS 88.2	98,68	1,32
MDS 90.1	97,44	2,56
MDS 90.2	98,18	1,82
MDS 93.1	98,89	1,11
MDS 93.2	99,27	0,73



Ryc. 25. Wynik pirosekwencjonowania pacjenta MDS7 (MDS 7.1 – badanie pierwsze, MDS 7.2 – badanie drugie)



Ryc. 26. Wynik pirosekwencjonowania pacjenta MDS43 (MDS 43.1 – badanie pierwsze, MDS 43.2 – badanie drugie)



Ryc. 27. Wynik pirosekwencjonowania pacjenta MDS44 (MDS 44.1 – badanie pierwsze, MDS 44.2 – badanie drugie)

W przypadku tego wariantu w grupie dodatkowo analizowanej w jednym punkcie czasowym poszukiwany patogenny wariant wykryto u dwóch na 41 chorych co stanowi 5%.

Reasumując patogenny wariant c.1874G>T genu *SF3B1* wykryto u 5 na 100 chorych, co stanowi 5%

2.4.4 Podsumowanie analizy molekularnej w grupie badanej

Podsumowując tą część niniejszej pracy należy zwrócić uwagę na fakt, iż:

- poszukiwane warianty sekwencji DNA wykryto u siedmiu pacjentów,
- u pięciu pacjentów zmiana występowała w materiale pacjenta pochodzącym z drugiego badania (dla genu *ASXL1* było to zawsze drugie badanie),
- u jednego pacjenta zmiana występowała w próbce z pierwszego badania a w drugim patogenny wariant nie był obecny,
- tylko u jednego pacjenta zaobserwowano występowanie poszukiwanego wariantu sekwencji w obu badanych próbkach – dotyczyło to genu *SF3B1*,
- powiększenie grupy pacjentów poddanych analizie metodą pirosekwencjonowania pozwoliło dodatkowo potwierdzić występowanie patogennego wariantu genu *ASXL1* u dwóch pacjentów (5%) z potwierdzoną

klinicznie transformacją do AML, w genie *SF3B1* u kolejnych dwóch pacjentów oraz u jednego pacjenta w genie *RUNX1*,

- u żadnego z pacjentów, u których poszukiwano wariantów sekwencji, nie wykryto więcej niż jednej zmiany.

3. Podsumowanie – analiza cytogenetyczna i molekularna a wiek i płeć pacjentów

Podsumowując dwie części niniejszej pracy dotyczące badań cytogenetycznych i molekularnych na uwagę zasługuje fakt, że u 5 na 36 chorych z prawidłowym kariotypem w dwóch badaniach wykryto jeden z poszukiwanych wariantów sekwencji DNA, co stanowi 14%. Mediana wieku wynosiła w tej grupie 55 lat (najmłodszy chory miał 19 lat a najstarszy 71), a stosunek mężczyzn do kobiet 3:2. Ponadto u 2 na 12 pacjentów z nieprawidłowym kariotypem w dwóch badaniach wykryto jeden z poszukiwanych wariantów sekwencji DNA, co stanowi 16%. Mediana wieku wynosiła 68 lat i nie zaobserwowano różnic w płci (mężczyźni versus kobiety 1:1). U 11 pacjentów z nieprawidłowym kariotypem tylko w jednym z badań (pierwszym lub drugim) nie wykryto żadnego z poszukiwanych wariantów sekwencji DNA. Mediana wieku w tej grupie wynosiła 64 lata a stosunek mężczyzn do kobiet wyniósł 12:4. Podsumowanie wyników analizy cytogenetycznej i molekularnej przedstawiono w Tabeli nr 36.

Tab. 36. Podsumowanie wyników analizy cytogenetycznej i molekularnej

Gen	Liczba pacjentów z badanym wariantem (n=59)	Nr pacjenta	Kariotyp
ASXL1	4 (7%)	MDS 45	Prawidłowy (I i II badanie)
		MDS 49	
		MDS 59	
		MDS 77	
SF3B1	3 (5%)	MDS 7	Badanie I:-Y, Badanie II: -Y, add16q
		MDS 43 *	badanie I: del5q badanie II: del5q
		MDS 44 **	Prawidłowy (badanie i i II)
* wariant patogenny w materiale z drugiego pobrania			
** wariant patogenny w materiale z pierwszego pobrania			

4. Wybrane parametry kliniczne pacjentów poddanych analizie GTG i pirosekwencjonowaniu

Ze względu na fakt, że materiał do badań kolekcjonowany był od roku 2008 Pracowni Cytogenetyki Laboratorium Diagnostyki Hematologicznej i pochodził od

pacjentów leczonych w Ośrodkach w Poznaniu, Pleszewie, Pile oraz Olsztynie dostęp do danych klinicznych był utrudniony.

Możliwe było zgromadzenie danych laboratoryjnych dla 16 pacjentów diagnozowanych i leczonych w Katedrze i Klinice Hematologii i Transplantacji Szpiku Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu. Badania laboratoryjne wykonano w dwóch jednostkach Szpitala Klinicznego Przemienienia Pańskiego w Poznaniu, tj. w Laboratorium nr 2 (parametry morfologii) oraz w Pracowni Cytometrii Przepływowej Laboratorium Diagnostyki Hematologicznej (odsetek blastów) i pozyskano ze szpitalnego systemu informatycznego Eskulap.

Parametry laboratoryjne wybrane w oparciu o IPSS-R, takie jak stężenie hemoglobiny, liczba neutrofili, liczba płytek krwi oraz odsetek blastów przedstawiono w Tabeli nr 37.

Na podstawie parametrów laboratoryjnych oraz wyniku badania cytogenetycznego dokonano stratyfikacji pacjentów do określonej grupy ryzyka wg IPSS posługując się dostępnym na stronie <https://www.mds-foundation.org/ipss-r-calculator/> narzędziem kalkulacyjnym. Ze względu na fakt, iż w narzędziu kalkulacyjnym stężenie hemoglobiny należało podać w jednostkach g/dL, a nie jak powyżej w mmol/l do przeliczenia użyto narzędzia internetowego http://www.seymed.com/en/smnxpf/pfxd_q210_c.htm. Otrzymane wyniki przedstawiono poniżej w Tabeli nr 38.

Tab. 37. Wybrane parametry laboratoryjne pacjentów z MDS (Zakres wartości referencyjnych: stężenie hemoglobiny - 7.0-10.2 mmol/l; liczba płytek krwi - 130-390 x10⁹/L; liczba neutrofili 1,8-7,7x10⁹/L)

L.p.	Grupa pacjentów	Charakterystyka grupy	pleć	Żyje (tak/nie)	nr MDS	stężenie hemoglobiny (mmol/l)	Liczba płytek krwi (x10 ⁹ /L)	Liczba neutrofili (x10 ⁹ /L)	odsetek blastów (%)	nr MDS	stężenie hemoglobiny (mmol/l)	Liczba płytek krwi (x10 ⁹ /L)	Liczba neutrofili (x10 ⁹ /L)	odsetek blastów (%)
1	GRUPA 1	nieprawidłowy kariotyp w dwóch badaniach	m	nie	MDS 1.1	6,90	85,00	1,15	11,00	MDS 1.2	6,00	24,00	0,79	1,00
2	GRUPA 1	nieprawidłowy kariotyp w dwóch badaniach	k	nie	MDS 3.1	5,50	38,00	0,39	19,00	MDS 3.2	7,20	60,00	1,69	3,00
3	GRUPA 3	Progresja choroby	m	tak	MDS 12.1	5,80	543,00	2,48	2,50	MDS 12.2	5,40	587,00	2,29	3,00
4	GRUPA 1	nieprawidłowy kariotyp w dwóch badaniach	m	nie	MDS 37.1	5,50	59,00	0,51	16,00	MDS 37.2	5,30	53,00	0,31	1,00
5	GRUPA 1	nieprawidłowy kariotyp w dwóch badaniach	k	nie	MDS 39.1	7,50	68,00	1,91	1,00	MDS 39.2	8,00	71,00	2,85	2,00
6	GRUPA 1	nieprawidłowy kariotyp w dwóch badaniach	k	tak	MDS 40.1	7,80	211,00	1,98	1,00	MDS 40.2	6,80	440,00	0,85	1,00
7	GRUPA 4	prawidłowy kariotyp w dwóch badaniach	m	nie	MDS 45.1	3,73	101,00	0,59	1,00	MDS 45.2	5,20	13,00	0,69	1,00
8	GRUPA 4	prawidłowy kariotyp w dwóch badaniach	k	tak	MDS 47.1	8,36	122,10	3,88	1,00	MDS 47.2	8,20	87,00	2,19	1,40

L.p.	Grupa pacjentów	Charakterystyka grupy	pleć	Żyje (tak/nie)	nr MDS	stężenie hemoglobiny (mmol/l)	Liczba płytek krwi (x10 ⁹ /L)	Liczba neutrofili (x10 ⁹ /L)	odsetek blastów (%)	nr MDS	stężenie hemoglobiny (mmol/l)	Liczba płytek krwi (x10 ⁹ /L)	Liczba neutrofili (x10 ⁹ /L)	odsetek blastów (%)
9	GRUPA 4	prawidłowy kariotyp w dwóch badaniach	k	tak	MDS 51.1	7,00	312,00	3,29	2,00	MDS 51.2	6,90	316,00	2,72	2,00
10	GRUPA 4	prawidłowy kariotyp w dwóch badaniach	m	nie	MDS 65.1	5,10	248,00	2,37	4,00	MDS 65.2	5,40	275,00	3,10	3,60
11	GRUPA 4	prawidłowy kariotyp w dwóch badaniach	k	nie	MDS 68.1	4,70	51,00	2,74	1,00	MDS 68.2	6,00	36,00	0,59	1,00
12	GRUPA 4	prawidłowy kariotyp w dwóch badaniach	m	tak	MDS 75.1	5,10	100,00	0,59	3,00	MDS 75.2	6,30	120,00	5,69	2,30
13	GRUPA 4	prawidłowy kariotyp w dwóch badaniach	m	tak	MDS 78.1	5,20	300,00	2,31	1,00	MDS 78.2	6,40	333,00	3,80	2,00
14	GRUPA 4	prawidłowy kariotyp w dwóch badaniach	k	tak	MDS 80.1	6,60	411,00	2,10	2,50	MDS 80.2	7,10	422,00	2,96	1,50
15	GRUPA 4	prawidłowy kariotyp w dwóch badaniach	k	tak	MDS 84.1	6,40	150,00	0,43	1,00	MDS 84.2	7,80	129,00	0,57	1,50
16	GRUPA 4	prawidłowy kariotyp w dwóch badaniach	m	nie	MDS 93.1	7,40	55,60	5,60	4,00	MDS 93.2	6,50	17,00	9,20	1,00
Średnia						6,16	178,42	2,02	4,44		6,53	176,80	2,52	1,77

Tab. 38. Stratyfikacja pacjentów do grup ryzyka wg IPSS-R na podstawie wybranych parametrów laboratoryjnych

L.p.	Grupa pacjentów	Charakterystyka grupy	pleć	Żyje (T/N)	nr MDS	IPSS R score	ryzyko	nr MDS	IPSS-R score	ryzyko
1	GRUPA 1	nieprawidłowy kariotyp w dwóch badaniach	m	nie	MDS 1.1	5,5	wysokie	MDS 1.2	4,5	pośrednie
2	GRUPA 1	nieprawidłowy kariotyp w dwóch badaniach	k	nie	MDS 3.1	9,5	bardzo wysokie	MDS 3.2	6,5	bardzo wysokie
3	GRUPA 3	Progresja choroby	m	tak	MDS 12.1	3	niskie	MDS 12.2	5	wysokie
4	GRUPA 1	nieprawidłowy kariotyp w dwóch badaniach	m	nie	MDS 37.1	9	bardzo wysokie	MDS 37.2	6	wysokie
5	GRUPA 1	nieprawidłowy kariotyp w dwóch badaniach	k	nie	MDS 39.1	4,5	pośrednie	MDS 39.2	4,5	pośrednie
6	GRUPA 1	nieprawidłowy kariotyp w dwóch badaniach	k	tak	MDS 40.1	1	bardzo niskie	MDS 40.2	1,5	bardzo niskie
7	GRUPA 4	prawidłowy kariotyp w dwóch badaniach	m	nie	MDS 45.1	3	niskie	MDS 45.2	3,5	pośrednie
8	GRUPA 4	prawidłowy kariotyp w dwóch badaniach	k	tak	MDS 47.1	1	bardzo niskie	MDS 47.2	1,5	bardzo niskie
9	GRUPA 4	prawidłowy kariotyp w dwóch badaniach	k	tak	MDS 51.1	1	bardzo niskie	MDS 51.2	1	bardzo niskie
10	GRUPA 4	prawidłowy kariotyp w dwóch badaniach	m	nie	MDS 65.1	3	niskie	MDS 65.2	3	niskie

L.p.	Grupa pacjentów	Charakterystyka grupy	pleć	Żyje (T/N)	nr MDS	IPSS R score	ryzyko	nr MDS	IPSS-R score	ryzyko
11	GRUPA 4	prawidłowy kariotyp w dwóch badaniach	k	nie	MDS 68.1	2,5	niskie	MDS 68.2	3,5	niskie
12	GRUPA 4	prawidłowy kariotyp w dwóch badaniach	m	tak	MDS 75.1	3,5	pośrednie	MDS 75.2	2	niskie
13	GRUPA 4	prawidłowy kariotyp w dwóch badaniach	m	tak	MDS 78.1	2	niskie	MDS 78.2	2	niskie
14	GRUPA 4	prawidłowy kariotyp w dwóch badaniach	k	tak	MDS 80.1	1	bardzo niskie	MDS 80.2	1	bardzo niskie
15	GRUPA 4	prawidłowy kariotyp w dwóch badaniach	k	tak	MDS 84.1	2,5	niskie	MDS 84.2	1,5	bardzo niskie
16	GRUPA 4	prawidłowy kariotyp w dwóch badaniach	m	nie	MDS 93.1	2,5	niskie	MDS 93.2	3,0	niskie
Średnia						~3,0 (3,4)		~3,0 (3,1)		

Z powyższych danych wynika, że u czterech pacjentów: MDS 1, 37, 75 oraz 84 nastąpiła zmiana w kwalifikacji pacjenta do grupy ryzyka w czasie obserwacji/leczenia. W przypadku pacjenta MDS 1 z grupy wysokiego do pośredniego ryzyka, MDS 37 z grupy bardzo wysokiego ryzyka do wysokiego, MDS 75 z grupy pośredniego do niskiego ryzyka oraz MDS 84 z niskiego do bardzo niskiego ryzyka. U dwóch pacjentów MDS 12 oraz MDS 45 ryzyko wg IPSS-R zmieniło się na niekorzyść, odpowiednio z niskiego na wysokie oraz z niskiego na pośrednie w czasie obserwacji/leczenia pacjenta i dotyczyło pacjentów z progresją choroby lub zawsze prawidłowym kariotypem. Tylko u jednego pacjenta, któremu określono ryzyko wg IPSS-R wykryto patogenny wariant sekwencji DNA genu *ASXL1*. U pozostałych pacjentów bez względu na oszacowane ryzyko wg IPSS-R nie wykryto żadnego z poszukiwanych w niniejszej pracy patogennych wariantów sekwencji DNA. Liczbę pacjentów zakwalifikowanych do odpowiedniej grupy ryzyka cytogenetycznego na podstawie wybranych parametrów badań laboratoryjnych przedstawiono w Tabeli nr 39.

Tab. 39. Liczba pacjentów w poszczególnych grupach ryzyka

Ryzyko wg IPSS-R	Liczba pacjentów (n=16)	
	I punkt czasowy	II punkt czasowy
Bardzo niskie	4	5
Niskie	7	5
Pośrednie	2	3
Wysokie	1	2
Bardzo wysokie	2	1

5. Analiza statystyczna

W związku z dużą heterogennością i jednocześnie niską liczebnością badanych grup odstąpiono od zaawansowanej analizy statystycznej. Wynikało to z braku możliwości doboru optymalnych narzędzi statystycznych.

V. Dyskusja

Wynik badania kariotypu u pacjentów z rozpoznaniem zespołu mielodysplastycznego (MDS) jest głównym elementem zrewidowanego Międzynarodowego Systemu Prognostycznego (IPSS-R) i stanowi ważny element w diagnostyce tych pacjentów [28, 55, 56, 57]. Ponadto ocena aberracji chromosomowych pozwala na umiejscowienie pacjenta na odpowiedniej ścieżce terapeutycznej z zastosowaniem dostępnych terapii (lenalidomid, azacytydyna) lub skierowanie chorego z wysokim ryzykiem cytogenetycznym do procedury allogenicznego przeszczepienia komórek krwiotwórczych [55, 60]. Wśród zmian cytogenetycznych występujących z największą częstością należy wymienić takie aberracje jak: delecja fragmentu długiego ramienia chromosomu pary 5, 7, obecność dodatkowej kopii chromosomu pary 8, czy utrata chromosomu płci Y. Ponadto zaobserwować można aberracje chromosomów pary 3, 11, 12, 13, 17 czy 21 [28, 62, 63]. W grupach pacjentów, u których obserwowane aberracje są zmianami cytogenetycznymi o wyższej częstości występowania łatwiej można dokonać oceny ryzyka, natomiast w przypadku aberracji cytogenetycznych występujących rzadko i u niewielu pacjentów ocena ta jest znacznie utrudniona [28]. W przypadku zespołów mielodysplastycznych należy pamiętać, że dużą grupę (40-50%) stanowią pacjenci z prawidłowym kariotypem [28], a zastosowanie bardziej czułych metod pozwala na wykrycie zmian u 80% pacjentów [28]. Dowiedziono tego już na początku XXI wieku kiedy jeszcze stosowanymi metodami były SNP czy porównawcza hybrydyzacja genomowa (CGH lub aCGH). W chwili obecnej cały czas trwają badania mające na celu wytypowanie patogennych wariantów genów, a badaniami z wyboru w dużych populacjach chorych i na dużych grupach genów jest sekwencjonowanie następnej generacji (NGS) [64]. Prowadzone w ten sposób badania dotyczą genów splicingu RNA takich jak *SF3B1*, *SRSF2*, *U2AF1*, *ZRSR2*, metylacji: *DNMT3A*, *IDH1/2*, *TET2* czy modyfikujących histony: *ASXL1*, *BCOR*, *EZH2* [41, 63-66]. Ich celem jest korelacja zmian cytogenetycznych z występowaniem określonych mutacji w wyżej wymienionych genach [28], co ma pomóc w zrozumieniu biologii tej choroby, stratyfikacji pacjentów do określonych grup ryzyka i możliwości zastosowania nowych terapii [28]. Dzięki tej metodzie można również spośród dużych paneli genów wytypować te, które mogłyby stanowić wraz z badaniem cytogenetycznym pierwszy etap screeningu pacjentów znacznie przyspieszając czas wykonania badań [69, 70, 71].

Głównym celem niniejszej pracy była charakterystyka aberracji chromosomowych w przebiegu zespołu mielodysplastycznego oraz ocena częstości występowania wariantów sekwencji DNA: c.1945G>T genu *ASXL1*, c.1874G>T genu *SF3B1* i c.502-2A>C genu *RUNX1* z zastosowaniem metody pirosekwencjonowania. Wybór określonych zmian w sekwencji DNA, które zostały poddane analizie w niniejszej pracy nie był przypadkowy i opierał się o prowadzone badania zespołu naukowców z Katedry i Kliniki Hematologii i Transplantacji Szpiku oraz Zakładu Genetyki Nowotworów Instytutu Genetyki Człowieka PAN w Poznaniu (część wyników opublikowano w 2021 roku w czasopiśmie Central European Journal of Immunology) [51].

W wyniku przeprowadzonego sekwencjonowania następnej generacji (NGS) z wykorzystaniem platformy MiSeq firmy Illumina dla 9 genów (67 eksonów, 91 amplikonów) u 15 pacjentów z rozpoznaniem zespołu mielodysplastycznego wytypowano patogenne zmiany, spośród których trzy zostały wybrane do analizy w niniejszej pracy. Patogenne warianty c.1874G>T w genie *SF3B1* był wcześniej opisany w literaturze, natomiast zmiany c.1945G>T genu *ASXL1* i c.502-2A>C genu *RUNX1* były wariantami do tej pory nieopisanymi w MDS. Celem było sprawdzenie częstości ich występowania w większej grupie chorych z MDS.

Przeprowadzona w pracy analiza cytogenetyczna 80 pacjentów z zespołem mielodysplastycznym w dwóch punktach czasowych pozwoliła na wyodrębnienie czterech grup pacjentów.

Grupę pierwszą (n=22) stanowili chorzy, u których zarówno w pierwszym jak i drugim badaniu zaobserwowano aberracje cytogenetyczne. U pięciu z tych pacjentów do występujących już aberracji w pierwszym badaniu dołączały kolejne lub pojawiały się inne wcześniej nieobserwowane u nich zmiany. Natomiast u 17 pacjentów aberracje zawsze były takie same w pierwszym i kolejnym badaniu (pełne dane dotyczące otrzymanych wyników znajdują się w Tabeli nr 17, 18, 19, 20).

Jednym z przykładów z tej grupy może być pacjent MDS 1, u którego w pierwszym badaniu (MDS 1.1) obok klonu komórkowego z prawidłowym kariotypem pojawił się klon komórkowy z obecnością dodatkowej kopii chromosomu pary 8. Zmiana ta jest często raportowana u pacjentów z zespołem mielodysplastycznym i dotyczy 10% wszystkich przypadków pierwotnego MDS i aż 40% przypadków z wtórnym MDS [27, 28, 34, 35]. Natomiast w kolejnym badaniu u tego pacjenta (MDS 1.2) obok delecji fragmentu krótkiego ramienia chromosomu pary 12 [del(12)(p13)] zaobserwowano

zrównoważoną translokację pomiędzy długim ramieniem chromosomu pary 15 oraz krótkim ramieniem chromosomu pary 18. W przypadku pierwszej zaobserwowanej zmiany literatura wskazuje obecność delecji fragmentu krótkiego ramienia chromosomu pary 12 u 3% pacjentów z rozpoznaniem zespołu mielodysplastycznego [26, 29, 30, 35], natomiast do tej pory nie została w literaturze opisana translokacja t(15;18) u tych chorych. W związku z tym, że pojawiła się ona u tego chorego dopiero w drugim badaniu cytogenetycznym można przypuszczać, że związana jest ona z wystąpieniem zespołu mielodysplastycznego (jego ewolucją cytogenetyczną wynikającą z biologii choroby lub zastosowanego leczenia) i nie ma konstytucyjnego (wrodzonego) charakteru. W przypadku pacjenta MDS 6 w pierwszym badaniu (MDS 6.1) zaobserwowano jedną z najczęstszych aberracji związaną z zespołem mielodysplastycznym tj. delecję fragmentu długiego ramienia chromosomu pary 5 [del(5)(q22q35)]. Według różnych danych literaturowych zmiana ta występuje u 10-20% pacjentów z pierwotnym MDS i 40% z wtórnym zespołem mielodysplastycznym [27, 28, 34, 35, 72, 73]. W kolejnym badaniu u tego pacjenta (MDS 6.2) wyżej opisanej delecji towarzyszyła dodatkowa aberracja również raportowana w przypadku MDS tj. dodatkowa kopia chromosomu pary 8 [27, 28, 34, 35, 74]. Natomiast u chorego MDS 31 zarówno w pierwszym (MDS 31.1) jak i drugim (MDS 31.2) badaniu obserwowano taką samą aberrację opisywaną już powyżej u innych chorych tj. obecność dodatkowej kopii chromosomu pary 8. Kariotyp złożony w dwóch kolejnych badaniach obserwowano u pacjenta MDS 37 (MDS 37.1 oraz MDS 37.2), co więcej były to takie same aberracje cytogenetyczne: addycja materiału genetycznego na krótkim ramieniu chromosomu pary 4 [add(4)(p16)], utrata prawidłowej kopii chromosomu pary 4, delecja fragmentu długiego ramienia chromosomu pary 5 [del(5)(q15q33)], obecność pochodnego chromosomu pary 8 [der(8)], addycja materiału genetycznego na długim ramieniu chromosomu pary 13 [add(13)(p13)], pochodny chromosom pary 16 [der(16)add(16)(q24)], dodatkowa kopia chromosomu pary 18, monosomia chromosomów pary 7, 12 oraz 20 i obecności dwóch chromosomów markerowych mar1 o wielkości chromosomów z grupy C (chromosomy pary 6-12) i mar2 o wielkości chromosomów z grupy G (chromosomy pary 21-22 i Y). Wśród nich występowały te częste dla zespołu mielodysplastycznego takie jak del5q czy monosomia chromosomu pary 7 oraz rzadkie nie raportowane wcześniej.

Podsumowując w tej grupie chorych najczęściej obserwowano występowanie kariotypu złożonego, co stanowiło średnio 28% wszystkich analizowanych w tej grupie przypadków (29% w grupie gdzie zmiany były takie same w dwóch kolejnych badaniach

i 27% w grupie z ewolucją klonalną kariotypu złożonego) i był on wyższy niż dane literaturowe [36, 75]. Drugą co do częstości występującą aberracją była izolowana delecja długiego ramienia chromosomu pary 5 - najczęstsza zmiana w populacji europejskiej, kształtująca się wg danych literaturowych na poziomie 10-20% [27, 28, 34, 35, 53], natomiast obserwowana w tej grupie na poziomie 29%, co odbiega od danych literaturowych. Należy ponadto zauważyć, że u chorych z ewolucją klonalną kariotypu tej zmianie w kolejnym badaniu towarzyszyła druga aberracja w postaci dodatkowej kopii chromosomu pary 8, co znajduje swoje potwierdzenie w danych literaturowych ponieważ ta aberracja występuje u pacjentów w badaniu pierwszym i klon ten utrzymuje się w badaniach kolejnych lub pojawia się dodatkowo jako aberracja wtórna [55]. U jednego pacjenta w dwóch kolejnych badaniach delecji 5q towarzyszyła inna zmiana charakterystyczna dla zespołu mielodysplastycznego czyli delecja 20q. Trzecią co do częstości była dodatkowa kopia chromosomu pary 8 stwierdzona u 18% chorych z tej grupy, co również jest wynikiem wyższym niż dane literaturowe [26, 29, 30, 35]. Na szczególną uwagę zasługuje tu jednak fakt, że u jednego z pacjentów, u którego w pierwszym badaniu występowała dodatkowa kopia chromosomu pary 8 i współtowarzyszyła jej dodatkowa kopia chromosomu pary 19, w/w aberracja nie pojawiła się w kolejnym badaniu przy jednoczesnym ciągłym występowaniu dodatkowej kopii chromosomu pary 19. Ze względu na fakt, że w pierwszym badaniu klon komórek z +8 był reprezentowany w niskim odsetku a kolejne badanie kariotypu u pacjenta wykonane było po upływie aż 599 dni właściwe byłoby zweryfikowanie obecności +8 w niskim odsetku metodą fluorescencyjnej hybrydyzacji in situ (FISH) [76]. Ponadto długi czas pomiędzy badaniami utrudnia prześledzenie historii pacjenta i rozstrzygnięcia jakim procedurom medycznym został w tym czasie poddany. Można natomiast przypuszczać, że zmianą pierwotną była dodatkowa kopia 19, a wtórna do niej +8. Porównywalny z doniesieniami naukowymi i jednocześnie najniższy odsetek stanowiły aberracje dotyczące utraty chromosomu płci Y czy chromosomów pary 11 i 12 (4%) w tej grupie chorych.

Na uwagę zasługuje również fakt, że mediana wieku w tej grupie wynosiła 65 lat i była wyższa niż średnia całej grupy, związane jest to z faktem iż częstość występowania aberracji cytogenetycznych wzrasta z wiekiem pacjenta, co jest zgodne z danymi literaturowymi [55].

Grupę drugą (n=10) stanowili pacjenci, u których aberracje cytogenetyczne występowały w pierwszym badaniu, a w kolejny kariotyp był prawidłowy. Pomimo

braku danych klinicznych można przypuszczać, że chorzy z tej grupy zostali poddani leczeniu, którego efektem było osiągnięcie przez nich remisji cytogenetycznej.

Jedną z aberracji stwierdzaną w pierwszym badaniu u tych chorych była delecja fragmentu długiego ramienia chromosomu pary 5 [del(5)(q12q33)] zaobserwowana np. u pacjenta MDS 18. U pacjenta MDS 22 zaobserwowano dodatkową kopię chromosomu pary 8, a u pacjenta MDS 29 delecję fragmentu długiego ramienia chromosomu pary 7. W przypadku pacjenta MDS 21 kariotyp w pierwszym badaniu (MDS 21.1) był złożony i obejmował aberracje liczbowe i strukturalne w postaci: addycji materiału genetycznego nieznanego pochodzenia na długim ramieniu chromosomu pary 12 w dwóch metafazach, aberracji w obrębie krótkiego ramienia chromosomu pary 17, obecności acentrycznych form chromosomów tzw. double minutes (dmin w liczbie od 1 do 4), obecności 5 chromosomów markerowych - mar1 wielkości chromosomów z grupy E (chromosomy pary 16-18), mar2 wielkości 2/3 chromosomów z grupy C (chromosomy pary 6-12 i X), mar3 wielkości chromosomów z grupy G (chromosomy pary 21-22 i Y), mar4 wielkości chromosomów z grupy C oraz mar5 wielkości chromosomów z grupy A (chromosomy pary 1-3). Wyniki badań cytogenetycznych w tej grupie szczegółowo przedstawiono w Tabeli nr 17. U wszystkich pacjentów z tej grupy w kolejnym badaniu stwierdzono kariotyp prawidłowy.

Reasumując najczęstszą obserwowaną w tej grupie aberracją była delecja fragmentu długiego ramienia chromosomu pary 5 ale jej częstość również tutaj była wyższa niż raportowana w literaturze i wynosiła 30% [26, 28, 29, 35, 53]. Kariotyp złożony w tej grupie był obserwowany w 20% przypadków i zgodny w tej grupie z danymi raportowanymi przez inne zespoły badawcze [53]. Aberracje takie jak del7q czy dodatkowa kopia chromosomu pary 8 raportowano w literaturze z częstością porównywalną jak w grupie badanej, natomiast aberracje chromosomów pary 11 i 22 występowały w tej grupie pacjentów w wyższym odsetku (10% versus 3-5%) [26, 28, 29, 35, 53]. Mediana wieku w tej grupie wynosiła 60 lat i była zbliżona do średniej dla całej badanej grupy.

Grupę trzecią (n=6) stanowili chorzy, u których zaobserwowano kariotyp prawidłowy w pierwszym badaniu, natomiast w kolejnym aberracje cytogenetyczne. Pomimo braku danych klinicznych można przypuszczać, że u tych pacjentów mogła nastąpić progresja choroby, której odzwierciedleniem jest nieprawidłowy kariotyp w kolejnym badaniu.

Przykładem pacjenta z tej grupy może być MDS 9. W pierwszym badaniu (MDS 9.1) zaobserwowano prawidłowy kariotyp natomiast w kolejnym badaniu (MDS 9.2) obecność dodatkowej kopii chromosomu pary 8, addycję materiału genetycznego na długim ramieniu chromosomu pary 9 [add(9)(q?34)] oraz delecję fragmentu długiego ramienia chromosomu pary 20 [del(20)(q12)]. Oprócz tego nadal w 60% analizowanych metafaz utrzymywał się klon komórkowy z prawidłowym kariotypem.

W przypadku kolejnego pacjenta z tej grupy chorych MDS 11, podobnie jak u chorego MDS 9 w pierwszym badaniu (MDS 11.1) we wszystkich analizowanych metafazach zaobserwowano kariotyp prawidłowy. Kolejne badanie (MDS 11.2) ujawniło występowanie kariotypu hiperdiploidalnego z obecnością dodatkowych kopii chromosomu pary 8, 10, 14 oraz 21. Podobnie jak w przypadku MDS 9 także tutaj opisanemu klonowi komórkowemu z aberracjami towarzyszył klon komórkowy o prawidłowym kariotypie i stanowił on również 60%.

Resumując w tej grupie chorych w drugim badaniu dominował kariotyp złożony (51%), aberracje dotyczące chromosomów pary 7, 8 czy 11 występowały u pojedynczych pacjentów w jednakowym odsetku (16%). Na uwagę zasługuje jednak fakt, iż w tej grupie chorych nie obserwowano najczęstszej zmiany występującej w zespołach mielodysplastycznych czyli del5q, która jest korzystnym czynnikiem rokowniczym, a występowały aberracje niekorzystne takie jak monosomia 7 czy kariotyp złożony oraz z kategorii pośredniego rokowania takie jak +8. Zjawisko to zgodne jest z danymi literaturowymi [55, 59] i wskazuje na kierunek ewolucji kariotypu prawidłowego będący korzystnym do kariotypu mniej korzystnego jednocześnie zwracając uwagę na konieczność obserwacji pacjentów z tej grupy.

Na uwagę zasługuje również fakt, że mediana wieku w tej grupie wynosiła 70 lat i była wyższa niż średnia całej grupy oraz najwyższa w porównaniu z wszystkimi czterema analizowanymi grupami, co również potwierdza korelację pomiędzy wzrostem częstości występowania aberracji cytogenetycznych a wiekiem pacjenta [55].

Ostatnią najliczniejszą grupę pacjentów (n=42) stanowili chorzy z prawidłowym kariotypem w dwóch kolejnych badaniach. Do tej grupy zakwalifikowano pacjentów z utratą pojedynczych chromosomów, które występowały w maksymalnie pięciu spośród 20 analizowanych metafaz oraz pacjentów z obecnością zmiany będącej polimorfizmem tj. pericentrycznej inwersji chromosomu pary 9, która w populacji występuje z częstością około 2% i na razie nie udowodnionej jej wpływu na wystąpienie zespołu mielodysplastycznego czy innego nowotworu hematologicznego [54]. Kwalifikacja

pacjentów, u których doszło do utraty pojedynczych chromosomów była trudna. Należało wziąć pod uwagę techniczne aspekty przygotowywania preparatów do analizy GTG, które wykonywane były w sposób manualny i w związku z tym mogły pojawić się losowe utarty chromosomów w analizowanych metafazach niezwiązane z chorobą. Dlatego podczas analizy kariotypów pacjentów z tej grupy zwracano uwagę czy utraty chromosomów pojawiały się z równą częstością w dwóch badaniach. Jeżeli w badaniu pierwszym pojawiła się monosomia, która nie była obserwowana w drugim badaniu to kariotyp uznawany był za prawidłowy w obu punktach czasowych.

Grupa ta stanowiła 53% całej grupy badanej, co jest zgodne z dostępnymi danymi literaturowymi, wg których pacjenci z prawidłowym kariotypem stanowią około 50% wszystkich chorych z zespołem mielodysplastycznym [27, 28, 34, 35, 55].

Mediana wieku w tej grupie wynosiła 58 lat i była zbliżona do średniej całej grupy, natomiast najniższa w porównaniu z wszystkimi czterema analizowanymi grupami, co po raz kolejny potwierdziło obserwowane już powyżej zależności pomiędzy wiekiem i częstością występowania zmian cytogenetycznych.

Podsumowując tą część badań należy zwrócić przede wszystkim uwagę na fakt, że ocena aberracji cytogenetycznych u chorych z zespołem mielodysplastycznym pozwoliła na zakwalifikowanie pacjentów do określonych grup ryzyka cytogenetycznego. Pozwoliło to na stwierdzenie, że bez względu na rodzaj wykrytych aberracji cytogenetycznych ryzyko pacjentów nie różniło się znacząco pomiędzy pierwszym a drugim badaniem. Różnice natomiast obserwowane były w poszczególnych grupach pacjentów, zwłaszcza u chorych, u których w kolejnym badaniu obserwowano kariotyp nieprawidłowy. W tej bowiem grupie (grupa 3) u pięciu spośród sześciu pacjentów ryzyko cytogenetyczne zmieniło się na niekorzystne, średni wiek pacjentów był najwyższy, a dominującą grupą byli chorzy płci męskiej. Takich zależności nie zaobserwowano w pozostałych trzech grupach (grupa 1, 2 i 4). Analizując natomiast średni czas pomiędzy badaniami cytogenetycznymi należy również zauważyć, że najkrótszy średni czas między dwoma badaniami cytogenetycznymi zaobserwowano również w grupie chorych z nieprawidłowym kariotypem w drugim badaniu, co może być związane z pogorszeniem stanu klinicznego pacjenta, który swoje odzwierciedlenie znalazł w badaniu cytogenetycznym. Najdłuższy czas pomiędzy badaniami zaobserwowano u chorych z prawidłowym kariotypem w kolejnych dwóch badaniach (grupa 4), co może być związane z dobrym ryzykiem cytogenetycznym i ich lepszym ogólnym stanem klinicznym.

W niniejszej pracy zastosowano dwa kryteria kwalifikacji próbek do badań molekularnych. Pierwszym było kryterium czasowe - takie same jak do badań metodami cytogenetyki klasycznej. Drugie kryterium wynikało z metodyki badań, a mianowicie w celu prawidłowego przebiegu pirosekwencjonowania stężenie całogenomowego DNA nie mogło być niższe niż 10 ng/μl, a materiał musiał pochodzić dokładnie z tej samej próbki wykorzystanej do wykonania kariotypu metodą GTG. Dzięki temu porównanie tych dwóch wyników było najbardziej miarodajne. Powyższe kryteria pozwoliły na przeprowadzenie badania metodami biologii molekularnej u 59 spośród 80 pacjentów. Z tego powodu w celu oszacowania częstości występowania poszukiwanych wariantów c.1945G>T genu *ASXL1*, c.502-2A>C genu *RUNX1* oraz c.1874G>T genu *SF3B* postanowiono poszerzyć grupę badaną o 41 chorych z rozpoznaniem zespołu mielodysplastycznego. Badanie metodą pirosekwencjonowania dla tej grupy pacjentów wykonano tylko w jednym punkcie czasowym i dodatkowo zaobserwowano poszukiwany wariant c.1945G>T genu *ASXL1* u dwóch chorych, c.502-2A>C genu *RUNX1* u jednego chorego oraz c.1874G>T genu *SF3B1* u dwóch chorych.

Dobierając metodę badawczą kierowano się między innymi jej czułością oraz możliwością wykrycia zmian pojedynczych nukleotydów. Rozważano więc wykorzystanie techniki sekwencjonowania metodą Sanger, metody HRM (*ang. high resolution melting*) oraz pirosekwencjonowania. Ze względu na fakt, że czułość sekwencjonowania Sanger to około 20%, a materiał pacjentów podanych analizie pochodził z zabezpieczonych po analizie cytogenetycznej zawieszin komórkowych istniało ryzyko, że zbyt niska czułość tej metody spowoduje uzyskanie wyników fałszywie ujemnych. Metoda HRM, choć bardzo dobra w swoich założeniach wymaga natomiast DNA o bardzo dobrej jakości i stężeniu co najmniej 50 ng/μl, co również mogło być trudne do realizacji w kontekście stosowanej matrycy DNA [56, 57]. W związku z powyższym w niniejszych badaniach zastosowano metodę pirosekwencjonowania łączącą w sobie kilka zalet takich jak: czułość na poziomie 1%, możliwość zastosowania całogenomowego DNA o stężeniu 10 ng/μl oraz stosunkowo szybką w porównaniu do sekwencjonowania Sanger. Za wyborem tej metody przemawiał również fakt, że, wykorzystywana była ona już wcześniej do potwierdzenia występowania analizowanych w pracy wariantów sekwencji DNA wykrytych za pomocą sekwencjonowania następnej generacji (NGS) [51].

Analizowane w pracy warianty sekwencji DNA w trzech genach *ASXL1*, *SF3B1* oraz *RUNX1* mają charakter patogenny i zareportowane zostały w bazie COSMIC. Wariant genu *ASXL1* oraz *RUNX1* wcześniej wykryte były tylko u chorych z ostrą białaczką szpikową, a genu *SF3B1* u chorych zarówno z AML jak i MDS [58].

Z pierwszej grupy pacjentów (w pierwszym jak i drugim badaniu zaobserwowano aberracje cytogenetyczne) do dalszych badań metodami biologii molekularnej wytypowano 12 chorych, spośród których tylko u dwóch zaobserwowano jedną poszukiwaną zmianę c.1874G>T genu *SF3B1*. W przypadku pacjenta MDS 7, u którego w pierwszym badaniu cytogenetycznym zaobserwowano utratę chromosomu płci Y, a w kolejnym tej zmianie towarzyszyła druga aberracja w postaci addycji materiału genetycznego na ramieniu q chromosomu pary 16 patogenny wariant sekwencji genu *SF3B1* obserwowano w każdym z badań. W przypadku pacjenta MDS 43, u którego badanie cytogenetyczne zarówno pierwsze i kolejne ujawniły występowanie delecji fragmentu długiego ramienia chromosomu pary 5 poszukiwana zmiana występowała w jednej próbce i było to drugie badanie. W tej grupie chorych (n=12) zatem poszukiwany wariant sekwencji DNA pojawił się w przypadku genu *SF3B1* z częstością 16%, a w jednym przypadku zgodnie z doniesieniami naukowymi korelował z del5q [59]. U żadnego pacjenta z tej grupy nie występował patogenny wariant w sekwencji genu *ASXL1* oraz *RUNX1*. Niektóre źródła donoszą, że mutacja w genie *SF3B1* może być zmianą wtórną do tej obserwowanej w genie *ASXL1* zwłaszcza u starszych chorych, jednakże pomimo zaobserwowania dość wysokiej częstości badanych wariantów sekwencji genów *SF3B1* i *ASXL1* w niniejszej pracy nie potwierdzono tego zjawiska [61]. Należy jednak zaznaczyć, iż badano występowanie pojedynczych wariantów tych genów.

Z drugiej grupy pacjentów (aberracje cytogenetyczne w pierwszym badaniu) do dalszych analiz metodami biologii molekularnej wytypowano 5 chorych i nie zaobserwowano u nich żadnego z poszukiwanych w niniejszej pracy wariantów sekwencji DNA. Pomimo faktu, że w tej grupie dominowała w kariotypie aberracja w postaci del5q u żadnego z pacjentów nie zaobserwowano patogennego wariantu sekwencji DNA genu *SF3B1*, który wg doniesień literaturowych w 20% przypadków dotyczy właśnie chorych z del5q [59].

Z trzeciej grupy pacjentów (aberracje cytogenetyczne w drugim badaniu) do dalszych badań metodami biologii molekularnej wytypowano 6 chorych i również tutaj nie zaobserwowano żadnego z poszukiwanych w niniejszej pracy wariantu sekwencji

DNA. Biorąc pod uwagę fakt, że w tej grupie chorych mediana wieku była najwyższa a pojawienie się aberracji świadczy o progresji choroby brak wykrycia poszukiwanych zmian wynika raczej z małej liczebności grupy i mniejszego niż w innych badania analizowanego panelu genów.

Natomiast czwarta grupa z prawidłowym kariotypem w dwóch badaniach była najliczniej reprezentowana w badaniach metodami biologii molekularnej i było to 36 chorych. Ponadto każdy z pacjentów był w grupie dobrego ryzyka cytogenetycznego według CCSS.

W przypadku jednego pacjenta z czwartej grupy wykryto patogenny wariant sekwencji genu *SF3B1* w próbce z pierwszego badania. Wariant c.1874G>T genu *SF3B1*, który pojawił się w tylko w pierwszym badaniu pacjenta z prawidłowym kariotypem, jest zmianą raportowaną już wcześniej w zespołach mielodysplastycznych [60, 62]. W związku z tym konieczna byłaby korelacja tego wyniku z większą liczbą danych klinicznych by określić do jakiej grupy ryzyka według IPSS został on zakwalifikowany w momencie rozpoznania. Na podstawie samego wyniku pirosekwencjonowania można przypuszczać, że brak tej zmiany w kolejnym badaniu może wynikać z zastosowanego u pacjenta leczenia, a podjęte decyzje terapeutyczne zapewne nie opierały się tylko na wynikach badania cytogenetycznego. Możliwe więc, że pacjent pomimo kariotypu prawidłowego nie spełniał kryteriów zespołu mielodysplastycznego niskiego ryzyka i wymagał zastosowania jednej z dostępnych terapii.

W tej grupie chorych u czterech pacjentów zaobserwowano również patogenny wariant sekwencji DNA genu *ASXL1* i zawsze dotyczył on próbki pochodzącej z drugiego badania. Według danych literaturowych obecność jakiegokolwiek patogennego wariantu sekwencji w genie *ASXL1* jest niekorzystnym czynnikiem prognostycznym mającym negatywny wpływ na całkowite przeżycie pacjentów [60] również w przypadku chorych, którzy na podstawie systemu stratyfikacji IPSS-R znaleźli się w grupie niskiego ryzyka [60]. Dodatkowo, obserwowana zmiana opisana wcześniej tylko u chorych z ostrą białaczką szpikową została wykryta u pacjentów z grupy z prawidłowym kariotypem i może stanowić jeden z elementów oceny ryzyka progresji MDS do AML a w kontekście wieku pacjentów mieć wpływ na podejmowane decyzje terapeutyczne.

Ze względu na brak możliwości uzyskania pełnych danych klinicznych na temat pacjentów z tej grupy (część chorych nie była leczona w ośrodku, w którym prowadzone było badanie) tylko w przypadku jednego pacjenta MDS 45 udało się uzyskać dane

niezbędne do obliczenia IPSS-R i zauważono, że pacjent ten pomimo kwalifikacji do dobrej grupy ryzyka cytogenetycznego wg CCSS w toku obserwacji zmienił całkowite ryzyko wg IPSS-R z dobrego na pośrednie (Tabela nr 37). Pogorszenie paramentów morfologii zbiegło się z wykryciem patogennego wariantu sekwencji DNA w genie *ASXL1*, a fakt iż wykryta zmiana do tej pory raportowana była tylko u chorych z AML sprawia, że należy rozważyć poszukiwanie tej zmiany u pacjentów z MDS pomimo, iż była to tylko pojedyncza obserwacja w tej pracy. Potwierdzeniem powyższej tezy może być fakt, że w toku prowadzonych badań analizowaną w niniejszej pracy grupę chorych powiększono o 41 pacjentów z diagnozowanym MDS. W tej dodatkowej grupie chorych u dwóch pacjentów wykryto analizowany również w tej pracy patogenny wariant c.1945G>T genu *ASXL1*. W analizie cytogenetycznej natomiast u jednego z nich potwierdzono aberracje cytogenetycznej pod postacią kariotypu złożonego, który definiowany jest jako występowanie trzech lub więcej zmian o charakterze klonalnym czyli w więcej niż dwóch analizowanych metafazach. W przypadku drugiego chorego kariotyp był prawidłowy podobnie jak w przypadku grupy badanej w niniejszej pracy. Ponadto dla tych chorych uzyskano dane kliniczne dzięki którym potwierdzono, że w momencie wykonywania badania pacjenci mieli postawione rozpoznanie zespołu mielodysplastycznego oraz ich choroba transformowała do ostrej białaczki szpikowej.

Reasumując po raz kolejny powyższe obserwacje dają podstawę do stwierdzenia, że poszukiwanie patogennego wariantu c.1945G>T genu *ASXL1* u chorych z rozpoznaniem zespołu mielodysplastycznego może mieć wpływ na ustalenie rokowania dla pacjenta i określenie najlepszej ścieżki terapeutycznej nie tylko na etapie ustalenia rozpoznania ale również w toku leczenia czy obserwacji pacjenta w związku z rozpoznaniem zespołu mielodysplastycznego.

Pod dyskusję należy poddać również uzyskane wyniki stosunku allelu dzikiego do zmutowanego w tej grupie chorych, który wynosił pomiędzy 2 a 7% (VAF – *variant allele frequency* - pomiędzy 2 a 7%) i był dwukrotnie wyższy niż wynikający z błędu metody ale niższy niż raportowany w danych literaturowych. Według doniesień z innych ośrodków badawczych VAF u pacjentów z cytopenią/zespołem mielodysplastycznym/mieloproliferacyjnym wahał się w granicach wartości od 1 do 90%, przy czym dla pacjentów z zespołem mielodysplastycznym wynosił około 20% dla jednej zmiany lub 10% jeśli obserwowano więcej niż jeden patogenny wariant sekwencji [77, 78, 79, 80]. Należy jednak podkreślić, że pacjenci w badaniach prowadzonych przez Malcoviati’ego, Shanmugam;a, Zheng’a czy Ibrar’a, w przeciwieństwie do badanej w niniejszej pracy

grupy chorych, badanie NGS przeprowadzane mieli w jednym punkcie czasowym. Natomiast w grupie pacjentów analizowanych w niniejszej pracy badanie wykonywano w dwóch punktach czasowych, a patogenny wariant sekwencji występował zawsze w drugim badaniu u chorych z potwierdzonym rozpoznaniem zespołu mielodysplastycznego. Należy również podkreślić, że w badaniu przeprowadzanym w momencie rozpoznania wariant patogenny allelu był niewykrywany (występował na poziomie 0%), a co za tym idzie pojawienie się wyniku dodatniego w kolejnym badaniu nawet na niższym poziomie niż wskazują dane literaturowe może sugerować zmianę związaną z rozpoznaniem zespołu mielodysplastycznego.

Od lat prowadzone są również badania dotyczące zjawisk klonalnej cytopenii o nieokreślonym pochodzeniu (CCUS) czy klonalnej hematopoezy o nieokreślonym potencjale (CHIP). Szczególne miejsce w tych rozważaniach zajmują również pacjenci z zespołem mielodysplastycznym ze względu częste początkowe trudności w postawieniu prawidłowej diagnozy. Stwierdzenie u pacjenta występowania dysplazji w obrębie komórek układu granulocytarnego czy płytkotwórczego nie jest wystarczające do postawienia diagnozy MDS. Pomocne okazują się więc badania dodatkowe takie jak cytogenetyka klasyczna czy poszukiwanie wariantów sekwencji wybranych genów zaangażowanych w patogenezę MDS [17,18]. Właśnie patogenne warianty sekwencji genu *ASXL1* obok takich jak *DNMT3A*, *TET2*, *ASXL1*, *TP53*, *JAK2* czy *SF3B1* typowane są również jako mutacje prowadzące do wystąpienia zjawiska klonalnej hematopoezy o nieokreślonym potencjale [77, 78, 79]. Niezaprzeczalne jest to, że te same somatyczne mutacje są związane z wystąpieniem zespołu mielodysplastycznego czy innego nowotworu hematologicznego. Kluczowy zdaje się jednak między innymi wiek pacjentów w momencie wykrycia opisywanych zmian. W trzech niezależnych badaniach udowodniono bowiem, związek pomiędzy klonalną hematopoezą a wiekiem pacjentów [77, 78, 79, 80]. Mutacje związane z CHIP były rzadkie w grupie chorych w wieku poniżej 40 lat, w wieku pomiędzy 60 a 69 lat częstość ich występowania wzrastała do 6%, między 70 a 89 rokiem życia do 12% by w wieku powyżej 90 lat występować już u 20% chorych z klonalną hematopoezą [80].

Biorąc pod uwagę, że mediana wieku w grupie pacjentów z patogennym wariantem genu *ASXL1* wykrytym w niniejszej pracy wynosiła 51 lat i była niższa niż średnia całej grupy, a najmłodszy chory miał 19 lat można na podstawie danych literaturowych stwierdzić, że obserwowana zmiana nie miała związku z wystąpieniem CHIP, a zaobserwowany VAF niższy niż raportowany w zespołach

mielodysplastycznych, mimo wszystko związany jest z wystąpieniem MDS, co dodatkowo potwierdza jego nieobecność w pierwszym badaniu.

Podsumowując w grupie chorych z prawidłowym kariotypem patogenny wariant sekwencji DNA w jednym spośród trzech analizowanych w pracy genów stwierdzono u 5 na 36 pacjentów, co stanowi 14%. Określenie występowania wariantów sekwencji genu *ASXL1* i poszerzenie panelu genów dla wyżej analizowanych pacjentów zapewne znacznie zwiększyłoby odsetek chorych z patogennymi wariantami sekwencji w genach biorących udział w patogenezie MDS i ułatwiło interpretację otrzymanych wartości VAF. Zgodnie z doniesieniami literaturowymi znalezienie wariantu patogennego w więcej niż dwóch genach sprawia, że próg wartości VAF na podstawie którego daną zmianę uznaje się za związaną z patologią choroby, może być niższy niż 20% [81, 82, 83, 84].

Nie zmienia to jednak faktu, że uzyskane wyniki sugerują, że wykryte zmiany mają związek z patologią/progresją choroby jaką jest MDS a pojawienie się patogennych wariantów w kolejnym badaniu pacjenta zwłaszcza w przypadku wariantu c.1945G>T genu *ASXL1* może świadczyć o progresji choroby.

W niniejszej pracy podjęto również próbę wykrycia patogennego wariantu sekwencji DNA w genie *RUNX1* u pacjentów z zespołem mielodysplastycznym. Do tej pory raportowane zmiany wg różnych źródeł dotyczyły eksonów od 3 do 8 [51, 62, 63] oraz występowały z częstością od 10 do 15%. Wariant analizowany w pracy nie był raportowany u pacjentów z MDS, natomiast został wcześniej wykryty u chorych w badaniu prowadzonym w Klinice Hematologii i Transplantacji Szpiku oraz Instytucie Genetyki Człowieka PAN [51]. Według doniesień literaturowych patogenezy warianty sekwencji w genie *RUNX1* są niekorzystnym czynnikiem rokowniczym. Dowiedziono ponadto, że może się ona pojawić na początku choroby lub w trakcie leczenia pacjenta i częściej związana jest z obecnością delecji 7q lub monosomii chromosomu pary 7 w formie izolowanej [63]. Poza określeniem częstości występowania nieopisanego w MDS wariantu c.502-2A>C genu *RUNX1* w niniejszej pracy założono, że w grupie 59 pacjentów badanie będzie dotyczyło dwóch punktów czasowych. Zasadne wydało się wybranie do tych analiz również genu *RUNX1*, by określić zmiany jego statusu w czasie obserwacji pacjentów. Ponadto, ze względu na jego występowanie również u chorych z ostrą białaczką szpikową mógłby on stanowić czynnik prognostyczny transformacji zespołu mielodysplastycznego do MDS ponieważ według

niektórych źródeł literaturowych [85, 86] u części pacjentów z MDS patogenny wariant sekwencji DNA genu *RUNX1* pojawiał się w momencie transformacji MDS do AML.

Pomimo tych doniesień u żadnego z 59 pacjentów z rozpoznaniem zespołu mielodysplastycznego w żadnej z grup cytogenetycznych niezależnie od oszacowanego ryzyka nie została ona stwierdzona. Może to wynikać z faktu, że spośród pacjentów z MDS tylko u dwóch obserwowano del7q częściej skorelowaną z w/w wariantem i nie była to zmiana izolowana [85, 86].

Powyższe wyniki i rozważania spowodowały, że wytypowana początkowo grupa pacjentów została powiększona o kolejnych 41 pacjentów z rozpoznaniem zespołu mielodysplastycznego. Celem tej dodatkowej analizy trzech wariantów c.1945G>T genu *ASXL1*, c.502-2A>C genu *RUNX1* oraz c.1874G>T genu *SF3B1* było dokładniejsze oszacowanie częstości występowania poszukiwanych zmian. Wśród 41 pacjentów u dwóch dodatkowo wykryto wariant c.1945G>T genu *ASXL1*, u kolejnych dwóch wariant c.1874G>T genu *SF3B1* oraz u jednego wariant c.502-2A>C genu *RUNX1*.

Podsumowując w niniejszej pracy jeden patogenny wariant sekwencji DNA wykryto u siedmiu pacjentów na 59 chorych poddanych badaniu, co stanowi 12%, przy czym patogenny wariant c.1945G>T genu *ASXL1* występował u czterech pacjentów z prawidłowym kariotypem i zawsze w drugim badaniu, co stanowi 7% wszystkich chorych. Natomiast wariant c.1874G>T genu *SF3B1* występował u trzech pacjentów, co stanowi 5% wszystkich chorych, a u dwóch pacjentów (2/3 tj. 67%) współistniał nieprawidłowy kariotyp w kolejnych dwóch badaniach. Powiększenie analizowanej grupy do 100 chorych nieznacznie zmieniło uzyskane wyniki. Porównanie częstości występowania dwóch patogennych wariantów sekwencji DNA c.1945G>T genu *ASXL1*, oraz c.502-2A>C genu *RUNX1* jest trudne ponieważ wcześniej nie były one raportowane w zespołach mielodysplastycznych. Natomiast wariant c.1874G>T genu *SF3B1* według bazy COSMIC występuje u około 0,5% chorych z zespołem mielodysplastycznym, a sam stanowi około 2% spośród wszystkich wariantów tego genu raportowanych w tej bazie w MDS. W związku z tym uzyskanie wyników na poziomie 5% w grupie chorych analizowanej w niniejszej pracy jest wyższym wynikiem i sugeruje, że należy więcej uwagi poświęcić poszukiwaniom tego wariantu w grupie pacjentów z MDS.

Za powyższymi rozważaniami może przemawiać również fakt, że w niniejszej pracy badano jeden hot-spot dla każdego z genów. W opublikowanej natomiast w 2021 pracy autorstwa Matteo Bersanelli i współpracowników zaraportowano 141 zmian o charakterze patogennym w genie *ASXL1*, 39 zmian o charakterze patogennym w genie

SF3B1 oraz 197 zmian o charakterze patogennym w genie *RUNX1* [87]. W związku z tym jeżeli częstość występowania mutacji w wybranych do analizy w tej pracy genach waha się pomiędzy 10-20% (dla genu *ASXL1* i *RUNX1*) oraz 20-30% (dla genu *SF3B1*), a ogólna ilość raportowanych zmian to 377 tylko w cytowanej tutaj pracy, to występowanie jednego hot-spot na poziomie 7% wykrytego w niniejszej pracy znaczący odsetek w grupie 59 pacjentów poddanych analizie, a występowanie nieopisanych wcześniej w zespołach mielodysplastycznych wariantów, wykrytych z zastosowaniem sekwencjonowania następnej generacji (NGS) zostało w niniejszej pracy potwierdzone również na większej grupie chorych (dodatkowo 41 pacjentów). Wyniki te wskazują jak ważne są poszukiwania patogennych wariantów sekwencji i ich korelacja z danymi klinicznymi w większych grupach pacjentów by ułatwić ich stratyfikację do określonych grup ryzyka i umożliwić podejmowanie najlepszych decyzji terapeutycznych.

VI. Podsumowanie

1. Potwierdzono występowanie aberracji chromosomowych u 47% chorych oraz prawidłowego kariotypu u 53% chorych w badanej grupie i częstość ich występowania była porównywalna w dwóch punktach czasowych. Bez względu na zaobserwowany kariotyp szacowane ryzyko cytogenetyczne nie różniło się znacząco pomiędzy pierwszym i drugim badaniem – 8 na 80 pacjentów (10%) zmieniło ryzyko cytogenetyczne na gorsze podczas obserwacji.
2. Zaobserwowano różnice w wieku pacjentów w poszczególnych grupach chorych – najniższą medianę wieku zaobserwowano u chorych z ryzykiem cytogenetycznym dobrym, a najwyższą u pacjentów z progresją zmian w kariotypie (w tej grupie zaobserwowano również różnice w płci).
3. Zaobserwowano różnice w czasie pomiędzy pierwszym a drugim badaniem cytogenetycznym - najdłuższy u chorych z ryzykiem cytogenetycznym dobrym, a najkrótszy u pacjentów z progresją zmian w kariotypie, co może odzwierciedlać stan kliniczny pacjentów.
4. Występowanie wariantów sekwencji DNA w genie *ASXL1* literaturowo szacuje się na 15 - 20%, natomiast nieopisany w MDS wariant c.1945G>T w badanej grupie występował z częstością 6%.
5. Z niższą częstością obserwowano występowanie wariantu c.1874G>T genu *SF3B1* (5%) oraz wariantu c.509-2A>C genu *RUNX1* (1%), przy czym opisany wcześniej wariant c.1874G>T genu *SF3B1* w analizowanej grupie występował z wyższą częstością aniżeli wg danych z bazy COSMIC (5% versus 0,5%).
6. Wykazano użyteczność metody pirosekwencjonowania w wykrywaniu wariantów sekwencji DNA z materiału pacjentów pochodzącego z zabezpieczonych po analizie cytogenetycznej peletów komórkowych.

VII. Wnioski

1. W badanej grupie pacjentów rodzaj wykrywanych aberracji chromosomowych w przebiegu choroby nie zmieniał ryzyka cytogenetycznego według CCSS określonego w chwili rozpoznania.
2. Najczęściej występujący w grupie badanej, nieopisany wcześniej w MDS, patogenny wariant c.1945G>T genu *ASXL1* może odgrywać rolę w progresji zespołu mielodysplastycznego (potwierdzenie tego wniosku wymaga jednak przeprowadzenia analizy w liczniejszej grupie chorych).
3. Wykazano celowość oceny występowania wariantów sekwencji zarówno w momencie rozpoznania jak i obserwacji/leczenia pacjenta zwłaszcza u pacjentów z prawidłowym kariotypem, u których ewolucja cytogenetyczna jest zjawiskiem rzadko obserwowanym.
4. Potwierdzono użyteczność metody pirosekwencjonowania jako narzędzia służącego do oceny obecności patogennych wariantów sekwencji o charakterze „hot-spot” również w badaniach retrospektywnych.

Reasumując, uzyskane wyniki badań dają podstawę do stwierdzenia, że konieczne jest jednoczesne wykonywanie badań metodami cytogenetyki klasycznej (kariotyp) i biologii molekularnej (poszukiwanie wariantów sekwencji DNA genów zaangażowanych w patogenezę choroby) u pacjentów z rozpoznaniem zespołu mielodysplastycznego.

VIII. Streszczenie

Złotym standardem w diagnostyce zespołów mielodysplastycznych nadal pozostają metody cytogenetyki klasycznej. Na ich podstawie stratyfikuje się pacjentów do określonej grupy ryzyka oraz determinuje opcje terapeutyczne. Zgodnie z danymi literaturowymi aberracje cytogenetyczne występują u około 40-50% chorych ze zdiagnozowanym pierwotnym zespołem mielodysplastycznym oraz u 80% pacjentów z wtórną postacią MDS [26]. Charakteryzują się dużą różnorodnością, a więc nie ma jednej zmiany będącej swoistym markerem w przypadku MDS [27]. Wiadomo już, że wiele genów zaangażowanych jest w rozwój i patogenezę tej choroby. W związku z tym trwają intensywne badania dotyczące poszukiwania nowych markerów w MDS.

Celem niniejszej pracy była charakterystyka aberracji chromosomowych, ocena częstości występowania wybranych wariantów sekwencji DNA genów: *ASXL1*, *RUNX1* oraz *SF3B1* u chorych z zespołem mielodysplastycznym oraz ocena przydatności metody pirosekwencjonowania w diagnostyce MDS.

Grupę badaną stanowiło 80 pacjentów, u których wykonano analizę GTG w dwóch punktach czasowych.

Po wykonaniu analizy GTG wyodrębniono cztery grupy pacjentów: grupę 1 (n=22), w której zaobserwowano kariotyp nieprawidłowy w dwóch badaniach (były to takie same aberracje cytogenetyczne lub w pierwszym badaniu zmiany cytogenetyczne były inne niż w badaniu drugim), grupę 2 (n=10) gdzie zaobserwowano występowanie aberracji cytogenetycznych w pierwszym badaniu natomiast kariotypu prawidłowego w kolejnym, grupę 3 (n=6) z kariotypem prawidłowym w pierwszym badaniu i aberracjami cytogenetycznymi w drugim, grupę 4 (n=42) z prawidłowym kariotypem w dwóch badaniach. Najczęściej obserwowanymi aberracjami były charakterystyczne dla MDS del5q, del7q, dodatkowa kopia chromosomu pary 8 i kariotyp złożony. Na podstawie badania GTG określono u pacjentów ryzyko cytogenetyczne z wykorzystaniem systemu stratyfikacji CCSS i stwierdzono, że bez względu na kariotyp szacowane ryzyko cytogenetyczne nie różniło się znacząco pomiędzy pierwszym i drugim badaniem, a najliczniej reprezentowana była grupa pacjentów, u których ryzyko cytogenetyczne było niskie. Ponadto zaobserwowano, że mediana wieku była najniższa w grupie chorych z prawidłowym kariotypem i niskim ryzykiem cytogenetycznym, natomiast najwyższa w grupie chorych z nieprawidłowym kariotypem w drugim badaniu.

Analiza metodami biologii molekularnej wykonana została u 59 chorych. Poszukiwano wariantów sekwencji: c.1945G>T genu *ASXL1*, c.502-2A>C genu *RUNX1* oraz c.1874G>T genu *SF3B1*.

Następnie grupę powiększono o 41 chorych z MDS u których takie same analizy wykonano w jednym punkcie czasowym. Pozwoliło to na dokładniejsze określenie częstości występowania wytypowanych wariantów w sekwencji DNA u pacjentów z zespołem mielodysplastycznym.

W badanej grupie chorych (n=100) patogenny wariant c.1945G>T genu *ASXL1* wykryto u 6 chorych (6/100, 6%), wariant c.1874G>T genu *SF3B1* u pięciu chorych (5/100, 5%), a c.502-2A>C genu *RUNX1* u jednego chorego (1/100, 1%).

Zaobserwowano, że nieopisany wcześniej wariant c.1945G>T genu *ASXL1* był najczęściej występującą w grupie badanej zmianą i może on, podobnie jak wcześniej opisane inne warianty w tym genie, odgrywać rolę w progresji zespołu mielodysplastycznego.

W toku badań wykazano również użyteczność metody pirosekwencjonowania w wykrywaniu wariantów sekwencji DNA z materiału pacjentów pochodzącego z zabezpieczonych po analizie cytogenetycznej peletów komórkowych. Metoda ta pozwoliła na wykorzystanie całogenomowego DNA o stężeniu 10ng/μl, była szybsza niż sekwencjonowanie Sangera i jednocześnie bardziej czuła.

Reasumując, uzyskane wyniki badań dały podstawę do stwierdzenia, że konieczne jest jednoczesne wykonywanie badań metodami cytogenetyki klasycznej (kariotyp) i biologii molekularnej (poszukiwanie wariantów sekwencji DNA genów zaangażowanych w patogenezę choroby) u pacjentów z zespołem mielodysplastycznym.

IX. Summary

Classical cytogenetics still remains the gold standard in the diagnosis of myelodysplastic syndromes. On their basis, patients are stratified to a specific risk group and therapeutic options are determined. According to the literature, cytogenetic aberrations occur in about 40-50% of patients diagnosed with primary myelodysplastic syndrome and in 80% of patients with secondary MDS [26]. They are characterized by high diversity, so there is no single change that is a specific marker in MDS [27]. It is already known that many genes are involved in the development and pathogenesis of this disease. Additionally, intensive research for new markers of MDS are underway.

The aim of this study was to characterize chromosomal aberrations and to assess the frequency of occurrence of selected variants of the DNA sequence of genes: *ASXL1*, *RUNX1* and *SF3B1* in patients with myelodysplastic syndrome and assessment of the pyrosequencing method in the diagnosis of MDS.

Classical cytogenetic (GTG) was performed in group of 80 patients who were subjects to GTG analysis at two time points.

After the GTG analysis, 4 groups of patients were distinguished: group 1 (n = 22) in which an abnormal karyotype was observed in two tests (these were the same cytogenetic aberrations or in the first study the cytogenetic changes were different than in the second test), group 2 (n = 10) where the occurrence of cytogenetic aberrations in the first test and normal karyotype in the next one were observed, group 3 (n = 6) with normal karyotype in the first test and cytogenetic aberrations in second one, group 4 (n = 42) with normal karyotype in two tests. The most frequently observed aberrations were del5q, del7q, an extra copy of pair 8 chromosome and a complex karyotype specific to the MDS. On the basis of GTG study cytogenetic risk in patients using the CCSS stratification system was determined and it was found that, irrespective of the karyotype, the estimated cytogenetic risk did not differ significantly between the first and second tests, and the most numerous group was the group of patients with low cytogenetic risk. Moreover, it was observed that the median age was the lowest in the group of patients with normal karyotype and low cytogenetic risk, while it was highest in the group of patients with abnormal karyotype in the second test.

Molecular biology analysis was performed in 59 patients. Sequence variant analysis were performed for: c.1945G> T of the *ASXL1* gene, c.502-2A> C of the *RUNX1* gene and c.1874G> T of the *SF3B1* gene.

Then the group was enlarged by 41 patients with MDS in whom the same analyzes were performed at one time point. This allowed for a more accurate determination of the frequency of the selected variants in the DNA sequence in patients with myelodysplastic syndrome.

In the tested group of patients (n = 100) pathogenic variant c.1945G> T of *ASXL1* gene was detected in 6 patients (6/100, 6%), variant c.1874G> T of *SF3B1* gene in five patients (5/100, 5%) , and c.502-2A> C of the *RUNX1* gene in one patient (1/100, 1%). It was observed that the previously undescribed variant c.1945G> T of the *ASXL1* gene was the most common in the study group and that it may, like the previously described other variant in this gene, play a role in the progression of the myelodysplastic syndrome. The research also demonstrated the usefulness of the pyrosequencing method in detecting DNA sequence variants from patients' material obtained from cell pellets preserved after cytogenetic analysis. This method allowed the use of whole genomic DNA with a concentration of 10ng/μl, was faster than Sanger sequencing and, at the same time, more sensitive.

In summary, the obtained results of the studies led to a conclusion, that it is necessary to conduct simultaneous tests with the methods of classical cytogenetics (karyotype) and molecular biology (searching for DNA sequence variants of genes involved in the pathogenesis of the disease) in patients with myelodysplastic syndrome.

X. Bibliografia

1. Czyż A., Kozłowska-Skrzypczak M., Wojtasińska E., Atlas hematologiczny z elementami diagnostyki laboratoryjnej i hemostazy, wyd. I, PZWL, 2016
2. Jagannathan-Bogdan, M., & Zon, L. I. (2013). Hematopoiesis. *Development* (Cambridge, England), 140(12), 2463–2467. <https://doi.org/10.1242/dev.083147>
3. Konturek S., Brzozowski T., Fizjologia człowieka T. 1, Wydanie Uniwersytetu Jagiellońskiego, Kraków, 2003
4. Traczyk W., Trzebski A., Fizjologia człowieka z elementami fizjologii stosowanej i klinicznej, Wydanie PZWL, 2003
5. Dan L. Longo, Harrison's Hematology and Oncology, Wydawnictwo The McGraw Companies Inc., USA/China 2010
6. Dembińska-Kieć A., Naskalski J. W., Diagnostyka laboratoryjna z elementami biochemii klinicznej, wyd. III poprawione, Elsevier Urban & Partner, Wrocław 2009
7. Szymała, K., & Komarnicki, M. (2003). Myelodysplastic syndromes. *Contemporary Oncology/Współczesna Onkologia*, 7(9), 692–701.
8. Szczeklik A., Choroby wewnętrzne. Przyczyny, rozpoznanie i leczenie, tom II, Wydawnictwo Medycyna Praktyczna, Kraków 2006
9. Drozd-Sokołowska, J. E., Mądry, K., Waszczuk-Gajda, A., Żółtak, T., Sikorska, A., Mital, A., Wajs, J., Semeńczuk, G., Szmigielska-Kapłon, A., Szczepańska, M., Wasilewska, E., Szwedek, P., Hołojda, J., Wątek, M., Stella-Hołowiecka, B., Soroka-Wojtaszko, M., Homenda, W., Polak, M., Guzicka-Kazimierska, R., Porowska, A., ... Dwilewicz-Trojaczek, J. (2017). Are myelodysplastic syndromes underdiagnosed in Poland? A report by the Polish Adult Leukaemia Group. *European journal of haematology*, 98(2), 154–159. <https://doi.org/10.1111/ejh.12814>
10. Luzzatto A.M., Sull anemia grave megaloblastica sensa reporto ematologica correspondentes (anemia pseudo-aplastica). „Riv Ven”. 47, 193, 1907
11. Rhoads C.P., Barker W.H., Refractory anemia: analysis of 100 cases. „JAMA”. 110, 794, 1938.
12. Bennett, J. M., Catovsky, D., Daniel, M. T., Flandrin, G., Galton, D. A., Gralnick, H. R., & Sultan, C. (1976). Proposals for the classification of the acute leukaemias. French-American-British (FAB) co-operative group. *British journal of haematology*, 33(4), 451–458. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.1976.tb03563.x>
13. Vardiman J. (2012). The classification of MDS: from FAB to WHO and beyond. *Leukemia research*, 36(12), 1453–1458. <https://doi.org/10.1016/j.leukres.2012.08.008>
14. Hasserjian R. P. (2019). Myelodysplastic Syndrome Updated. *Pathobiology : journal of immunopathology, molecular and cellular biology*, 86(1), 7–13. <https://doi.org/10.1159/000489702>
15. Hong M., He G., The 2016 revision to the World Health Organization classification of myelodysplastic syndromes. *Journal of Translational Internal Medicine*, 5(3), 139–143. doi:10.1515/jtim-2017-0002, 2017
16. Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, Thiele J, Vardiman JW. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues WHO Classification of Tumours, 4th Edition, Volume 2, ISBN 928324494X
17. Naqvi, K., Jabbour, E., Bueso-Ramos, C., Pierce, S., Borthakur, G., Estrov, Z., Ravandi, F., Faderl, S., Kantarjian, H., & Garcia-Manero, G. (2011). Implications of discrepancy in morphologic diagnosis of myelodysplastic syndrome between referral and tertiary care centers. *Blood*, 118(17), 4690–4693. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-03-342642>
18. Montalban-Bravo G., Garcia-Manero G., Myelodysplastic syndromes: 2018 update on diagnosis, risk-stratification and management. *Am J Hematol* 2018 Jan;93(1):129-147. doi: 10.1002/ajh.24930
19. Haferlach, T., Nagata, Y., Grossmann, V., Okuno, Y., Bacher, U., Nagae, G., Schnittger, S., Sanada, M., Kon, A., Alpermann, T., Yoshida, K., Roller, A., Nadarajah, N., Shiraishi, Y., Shiozawa, Y., Chiba, K., Tanaka, H., Koefler, H. P., Klein, H. U., Dugas, M., Ogawa, S. (2014). Landscape of genetic lesions in 944 patients with myelodysplastic syndromes. *Leukemia*, 28(2), 241–247. <https://doi.org/10.1038/leu.2013.336>
20. Bejar, R., Stevenson, K. E., Caughey, B. A., Abdel-Wahab, O., Steensma, D. P., Galili, N., Raza, A., Kantarjian, H., Levine, R. L., Neuberg, D., Garcia-Manero, G., & Ebert, B. L. (2012). Validation of a prognostic model and the impact of mutations in patients with lower-risk myelodysplastic syndromes. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 30(27), 3376–3382. <https://doi.org/10.1200/JCO.2011.40.7379>
21. Kantarjian, H., O'Brien, S., Ravandi, F., Cortes, J., Shan, J., Bennett, J. M., List, A., Fenaux, P., Sanz, G., Issa, J. P., Freireich, E. J., & Garcia-Manero, G. (2008). Proposal for a new risk model in myelodysplastic syndrome that accounts for events not considered in the original International Prognostic Scoring System. *Cancer*, 113(6), 1351–1361. <https://doi.org/10.1002/cncr.23697>

22. Veryaskina Y.A., Titov S. E., Kovynev I. B., Pospelova T. I., Zhimulev I. F., Prognostic Markers of Myelodysplastic Syndromes., *Medicina (Kaunas)*. 2020 Aug; 56(8): 376. doi: 10.3390/medicina56080376
23. Della Porta, M. G., Tuechler, H., Malcovati, L., Schanz, J., Sanz, G., Garcia-Manero, G., Solé, F., Bennett, J. M., Bowen, D., Fenaux, P., Dreyfus, F., Kantarjian, H., Kuendgen, A., Levis, A., Cermak, J., Fonatsch, C., Le Beau, M. M., Slovak, M. L., Krieger, O., Luebbert, M., Cazzola, M. (2015). Validation of WHO classification-based Prognostic Scoring System (WPSS) for myelodysplastic syndromes and comparison with the revised International Prognostic Scoring System (IPSS-R). A study of the International Working Group for Prognosis in Myelodysplasia (IWG-PM). *Leukemia*, 29(7), 1502–1513. <https://doi.org/10.1038/leu.2015.55>
24. Leukemia&Lymphoma Society, www.lls.org/myelodysplastic-syndromes/diagnosis/international-prognostic-scoring-system.
25. Dwilewicz-Trojaczek J., Zespoły mielodysplastyczne (MDS) – nowe możliwości terapii. *Acta Haematologica Polonica* Volume 44, Issue 4, October–December 2013, Pages 378–382
26. Pellagatti A., Boultonwood J., Recent Advances in the 5q- Syndrome., *Mediterr J Hematol Infect Dis*. 2015; 7(1): e2015037. doi: 10.4084/MJHID.2015.037
27. Ogawa S., Genetics of MDS., *Blood* (2019) 133 (10): 1049–1059. doi.org/10.1182/blood-2018-10-844621
28. Zahid, M. F., Malik, U. A., Sohail, M., Hassan, I. N., Ali, S., Shaukat, M. (2017). Cytogenetic Abnormalities in Myelodysplastic Syndromes: An Overview. *International journal of hematology-oncology and stem cell research*, 11(3), 231–239.
29. Arber, D. A., Orazi, A., Hasserjian, R., Thiele, J., Borowitz, M. J., Le Beau, M. M., Bloomfield, C. D., Cazzola, M., & Vardiman, J. W. (2016). The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood*, 127(20), 2391–2405. <https://doi.org/10.1182/blood-2016-03-643544>
30. Greenberg, P. L., Tuechler, H., Schanz, J., Sanz, G., Garcia-Manero, G., Solé, F., Bennett, J. M., Bowen, D., Fenaux, P., Dreyfus, F., Kantarjian, H., Kuendgen, A., Levis, A., Malcovati, L., Cazzola, M., Cermak, J., Fonatsch, C., Le Beau, M. M., Slovak, M. L., Krieger, O., ... Haase, D. (2012). Revised international prognostic scoring system for myelodysplastic syndromes. *Blood*, 120(12), 2454–2465. <https://doi.org/10.1182/blood-2012-03-420489>
31. Van den Berghe, H., Cassiman, J. J., David, G., Fryns, J. P., Michaux, J. L., Sokal, G. (1974). Distinct haematological disorder with deletion of long arm of no. 5 chromosome. *Nature*, 251(5474), 437–438. <https://doi.org/10.1038/251437a0>
32. Kantarjian, H., O'Brien, S., Ravandi, F., Borthakur, G., Faderl, S., Bueso-Ramos, C., Abruzzo, L., Pierce, S., Shan, J., Issa, J. P., Garcia-Manero, G. (2009). The heterogeneous prognosis of patients with myelodysplastic syndrome and chromosome 5 abnormalities: how does it relate to the original lenalidomide experience in MDS?. *Cancer*, 115(22), 5202–5209. <https://doi.org/10.1002/cncr.24575>
33. Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology, online
34. Haase D. (2008). Cytogenetic features in myelodysplastic syndromes. *Annals of hematology*, 87(7), 515–526. <https://doi.org/10.1007/s00277-008-0483-y>
35. Hematology: Basic Principles and Practice, 7th Edition <https://doi.org/10.1016/C2013-0-23355-9>
36. Valcárcel, D., Ademà, V., Solé, F., Ortega, M., Nomdedeu, B., Sanz, G., Luño, E., Cañizo, C., de la Serna, J., Ardanaz, M., Marco, V., Collado, R., Grau, J., Montoro, J., Mallo, M., Vallespi, T. (2013). Complex, not monosomal, karyotype is the cytogenetic marker of poorest prognosis in patients with primary myelodysplastic syndrome. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 31(7), 916–922. <https://doi.org/10.1200/JCO.2012.41.6073>
37. Atlas of Haematological Cytology, online
38. Delhommeau, F., Dupont, S., Della Valle, V., James, C., Trannoy, S., Massé, A., Kosmider, O., Le Couedic, J. P., Robert, F., Alberdi, A., Lécluse, Y., Plo, I., Dreyfus, F. J., Marzac, C., Casadevall, N., Lacombe, C., Romana, S. P., Dessen, P., Soulier, J., Viguié, F., ... Bernard, O. A. (2009). Mutation in TET2 in myeloid cancers. *The New England journal of medicine*, 360(22), 2289–2301. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa0810069>
39. Nikoloski, G., Langemeijer, S. M., Kuiper, R. P., Knops, R., Massop, M., Tönnissen, E. R., van der Heijden, A., Scheele, T. N., Vandenbergh, P., de Witte, T., van der Reijden, B. A., Jansen, J. H. (2010). Somatic mutations of the histone methyltransferase gene EZH2 in myelodysplastic syndromes. *Nature genetics*, 42(8), 665–667. <https://doi.org/10.1038/ng.620>
40. Sanada, M., Suzuki, T., Shih, L. Y., Otsu, M., Kato, M., Yamazaki, S., Tamura, A., Honda, H., Sakata-Yanagimoto, M., Kumano, K., Oda, H., Yamagata, T., Takita, J., Gotoh, N., Nakazaki, K., Kawamata, N., Onodera, M., Nobuyoshi, M., Hayashi, Y., Harada, H., ... Ogawa, S. (2009). Gain-of-function of mutated C-CBL tumour suppressor in myeloid neoplasms. *Nature*, 460(7257), 904–908. <https://doi.org/10.1038/nature08240>
41. Ley, T. J., Ding, L., Walter, M. J., McLellan, M. D., Lamprecht, T., Larson, D. E., Kandoth, C., Payton, J. E., Baty, J., Welch, J., Harris, C. C., Licht, C. F., Townsend, R. R., Fulton, R. S., Dooling, D. J., Koboldt, D. C.,

- Schmidt, H., Zhang, Q., Osborne, J. R., Lin, L., ... Wilson, R. K. (2010). DNMT3A mutations in acute myeloid leukemia. *The New England journal of medicine*, 363(25), 2424–2433. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1005143>
42. Nagata, Y., Maciejewski, J. P. (2019). The functional mechanisms of mutations in myelodysplastic syndrome. *Leukemia*, 33(12), 2779–2794. <https://doi.org/10.1038/s41375-019-0617-3>
43. Lin Y., Zheng Y., Wang Z., Wang S. (2016) Prognostic significance of *ASXL1* mutations in myelodysplastic syndromes and chronic myelomonocytic leukemia: a meta-analysis, *Hematology*, 21:8, 454-461, DOI: 10.1080/10245332.2015.1106815
44. Gangat N, Patnaik MM, Tefferi A. Myelodysplastic syndromes: Contemporary review and how we treat. *Am J Hematol*. 2016 Jan;91(1):76-89. doi: 10.1002/ajh.24253.
45. Świtoński M., Słota E., Jaszcak K. Diagnostyka cytogenetyczna zwierząt domowych, Wydanie I, Wydawnictwo Akademii Rolniczej im. A. Cieszkowskiego, Poznań 2006
46. Małuszyńska J. (2007) Zobaczyć gen chromosom i genom- czyli badania cytogenetyki molekularnej, *Nauka*, 4/2007, 107-115
47. McGowan-Jordan J., Hastings Ros J., Moore S. ISCN 2020. An International System for Human Cytogenomic Nomenclature (2020) ISBN: 978-3-318-06706-4 DOI: 10.1159/isbn.978-3-318-06867-2
48. RBC Bioscience Corp., Birmingham, U.K.;
49. Kennedy, J. A., Ebert, B. L. (2017). Clinical Implications of Genetic Mutations in Myelodysplastic Syndrome. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 35(9), 968–974. <https://doi.org/10.1200/JCO.2016.71.0806>
50. Gill, H., Leung, A. Y., Kwong, Y. L. (2016). Molecular and Cellular Mechanisms of Myelodysplastic Syndrome: Implications on Targeted Therapy. *International journal of molecular sciences*, 17(4), 440. <https://doi.org/10.3390/ijms17040440>
51. Adamska, M., Kowal-Wisniewska, E., Kiwerska, K., Ustaszewski, A., Czerwińska-Rybak, J., Kanduła, Z., Wojtaszewska, M., Barańska, M., Pruchniewski, L., Lewandowski, K., Jarmuż-Szymczak, M., Gil, L. (2021). New genetic variants of TET2 and *ASXL1* identified by next generation sequencing and pyrosequencing in a patient with MDS-RS-MLD and secondary acute myeloid leukemia. *Central-European journal of immunology*, 46(4), 524–530. <https://doi.org/10.5114/ceji.2021.111166>
52. Słomski R. Przykłady analiz DNA, Wydanie II, Wydawnictwo Akademii Rolniczej im. A. Cieszkowskiego, Poznań, 2004
53. Wang, X., Liu, W., Wang, M., Fan, T., Li, Y., Guo, X., Yang, X., Wang, H., Xiao, H., Zhang, S., Quan, R., Liu, C., Tang, X., Lv, Y., Chen, Z., Li, L., Xu, Y., Ma, R., Hu, X. (2021). Cytogenetic characteristics of 665 patients with myelodysplastic syndrome in China: a single-center report. *Oncology letters*, 21(2), 126. <https://doi.org/10.3892/ol.2020.12387>
54. Mozdarani H, Meybodi AM, Karimi H. Impact of pericentric inversion of Chromosome 9 [inv (9) (p11q12)] on infertility. *Indian J Hum Genet*. 2007 Jan;13(1):26-9. doi: 10.4103/0971-6866.32031.
55. Schanz, J., Cevik, N., Fonatsch, C., Bräulke, F., Shirmeshan, K., Bacher, U., Haase, D. (2018). Detailed analysis of clonal evolution and cytogenetic evolution patterns in patients with myelodysplastic syndromes (MDS) and related myeloid disorders. *Blood cancer journal*, 8(3), 28. <https://doi.org/10.1038/s41408-018-0061-z>
56. Fakrudin, M. & Chowdhury, A. (2012). Pyrosequencing-An Alternative to Traditional Sanger Sequencing. *American Journal of Biochemistry and Biotechnology*, 8(1), 14-20. <https://doi.org/10.3844/ajbbsp.2012.14.20>
57. Skroński, M., Szpechciński, A., Chorostowska-Wynimko, J. (2014). Współczesne metody wykrywania mutacji genu EGFR jako czynnika predykcyjnego dla terapii ukierunkowanej molekularnie chorych na niedrobnokomórkowego raka płuca - czy istnieje "złoty standard" diagnostyczny? [Current methods to detect EGFR gene mutations as predictive factor for targeted therapies in non-small cell lung cancer - is there a "golden standard" in diagnostics?]. *Pneumonologia i alergologia polska*, 82(3), 311–322. <https://doi.org/10.5603/PiAP.2014.0036>
58. Catalogue of Somatic Mutations in Cancer, COSMIC;
59. Haase D. (2008). Cytogenetic features in myelodysplastic syndromes. *Annals of hematology*, 87(7), 515–526. <https://doi.org/10.1007/s00277-008-0483-y>
60. Haase, D., Germing, U., Schanz, J., Pfeilstöcker, M., Nösslinger, T., Hildebrandt, B., Kundgen, A., Lübbert, M., Kunzmann, R., Giagounidis, A. A., Aul, C., Trümper, L., Krieger, O., Stauder, R., Müller, T. H., Wimazal, F., Valent, P., Fonatsch, C., Steidl, C. (2007). New insights into the prognostic impact of the karyotype in MDS and correlation with subtypes: evidence from a core dataset of 2124 patients. *Blood*, 110(13), 4385–4395. <https://doi.org/10.1182/blood-2007-03-082404>
61. Scalzulli, E., Pepe, S., Colafigli, G., Breccia, M. (2021). Therapeutic strategies in low and high-risk MDS: What does the future have to offer?. *Blood reviews*, 45, 100689. <https://doi.org/10.1016/j.blre.2020.100689>
62. Jädersten, M., Saft, L., Smith, A., Kulasekararaj, A., Pomplun, S., Göhring, G., Hedlund, A., Hast, R., Schlegelberger, B., Porwit, A., Hellström-Lindberg, E., Mufti, G. J. (2011). TP53 mutations in low-risk

- myelodysplastic syndromes with del(5q) predict disease progression. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 29(15), 1971–1979. <https://doi.org/10.1200/JCO.2010.31.8576>
63. Yoshizato, T., Nannya, Y., Atsuta, Y., Shiozawa, Y., Iijima-Yamashita, Y., Yoshida, K., Shiraishi, Y., Suzuki, H., Nagata, Y., Sato, Y., Kakiuchi, N., Matsuo, K., Onizuka, M., Kataoka, K., Chiba, K., Tanaka, H., Ueno, H., Nakagawa, M. M., Przychodzen, B., Haferlach, C., Ogawa, S. (2017). Genetic abnormalities in myelodysplasia and secondary acute myeloid leukemia: impact on outcome of stem cell transplantation. *Blood*, 129(17), 2347–2358. <https://doi.org/10.1182/blood-2016-12-754796>
 64. Tobinsson, M., Kittang, A. O. (2019). Treatment of myelodysplastic syndrome in the era of next-generation sequencing. *Journal of internal medicine*, 286(1), 41–62. <https://doi.org/10.1111/joim.12893>
 65. Rahman, M. A., Lin, K. T., Bradley, R. K., Abdel-Wahab, O., Krainer, A. R. (2020). Recurrent SRSF2 mutations in MDS affect both splicing and NMD. *Genes & development*, 34(5-6), 413–427. <https://doi.org/10.1101/gad.332270.119>
 66. Hosono N. (2019). Genetic abnormalities and pathophysiology of MDS. *International journal of clinical oncology*, 24(8), 885–892. <https://doi.org/10.1007/s10147-019-01462-6>
 67. Makishima, H., Yoshizato, T., Yoshida, K., Sekeres, M. A., Radivoyevitch, T., Suzuki, H., Przychodzen, B., Nagata, Y., Meggendorfer, M., Sanada, M., Okuno, Y., Hirsch, C., Kuzmanovic, T., Sato, Y., Sato-Otsubo, A., LaFramboise, T., Hosono, N., Shiraishi, Y., Chiba, K., Haferlach, C., Maciejewski, J. P. (2017). Dynamics of clonal evolution in myelodysplastic syndromes. *Nature genetics*, 49(2), 204–212. <https://doi.org/10.1038/ng.3742>
 68. Zhang, Y. Y., Zhou, J. D., Yang, D. Q., He, P. F., Yao, D. M., Qian, Z., Yang, J., Xu, W. R., Lin, J., Qian, J. (2018). Intragenic hypomethylation of DNMT3A in patients with myelodysplastic syndrome. *Clinical chemistry and laboratory medicine*, 56(3), 485–491. <https://doi.org/10.1515/cclm-2016-0142>
 69. Malcovati, L., Stevenson, K., Papaemmanuil, E., Neuberg, D., Bejar, R., Boulwood, J., Bowen, D. T., Campbell, P. J., Ebert, B. L., Fenaux, P., Haferlach, T., Heuser, M., Jansen, J. H., Komrokji, R. S., Maciejewski, J. P., Walter, M. J., Fontenay, M., Garcia-Manero, G., Graubert, T. A., Karsan, A., Cazzola, M. (2020). *SF3B1*-mutant MDS as a distinct disease subtype: a proposal from the International Working Group for the Prognosis of MDS. *Blood*, 136(2), 157–170. <https://doi.org/10.1182/blood.2020004850>
 70. Jiang, L., Luo, Y., Zhu, S., Wang, L., Ma, L., Zhang, H., Shen, C., Yang, W., Ren, Y., Zhou, X., Mei, C., Ye, L., Xu, W., Yang, H., Lu, C., Jin, J., Tong, H. (2020). Mutation status and burden can improve prognostic prediction of patients with lower-risk myelodysplastic syndromes. *Cancer science*, 111(2), 580–591. <https://doi.org/10.1111/cas.14270>
 71. Visconte, V., Makishima, H., Jankowska, A., Szpurka, H., Traina, F., Jerez, A., O'Keefe, C., Rogers, H. J., Sekeres, M. A., Maciejewski, J. P., Tiu, R. V. (2012). *SF3B1*, a splicing factor is frequently mutated in refractory anemia with ring sideroblasts. *Leukemia*, 26(3), 542–545. <https://doi.org/10.1038/leu.2011.232>
 72. Almeida, A., Fenaux, P., List, A. F., Raza, A., Platzbecker, U., Santini, V. (2017). Recent advances in the treatment of lower-risk non-del(5q) myelodysplastic syndromes (MDS). *Leukemia research*, 52, 50–57. <https://doi.org/10.1016/j.leukres.2016.11.008>
 73. Gorshein, E., Weber, U. M., Gore, S. (2020). Higher-risk myelodysplastic syndromes with del(5q): does the del(5q) matter?. *Expert review of hematology*, 13(3), 233–239. <https://doi.org/10.1080/17474086.2020.1730806>
 74. Drevon, L., Marceau, A., Maarek, O., Cuccini, W., Clappier, E., Eclache, V., Cluzeau, T., Richez, V., Berkaoui, I., Dimicoli-Salazar, S., Bidet, A., Vial, J. P., Park, S., Vieira Dos Santos, C., Kaphan, E., Berthon, C., Stamatoullas, A., Delhommeau, F., Abermil, N., Braun, T., Fenaux, P. (2018). Myelodysplastic syndrome (MDS) with isolated trisomy 8: a type of MDS frequently associated with myeloproliferative features? a report by the Groupe Francophone des Myélodysplasies. *British journal of haematology*, 182(6), 843–850. <https://doi.org/10.1111/bjh.15490>
 75. Alvarez, S., Cigudosa, J. C. (2005). Gains, losses and complex karyotypes in myeloid disorders: a light at the end of the tunnel. *Hematological oncology*, 23(1), 18–25. <https://doi.org/10.1002/hon.744>
 76. Zhang, Z. B., Liu, S. H., Li, J., Bo, L. J., Cui, H. Y., Liu, X. P., Nie, Y. X., Qin, S. (2002). Comparison of detection of trisomy 8 with fluorescence in situ hybridization and conventional karyotype analysis in myelodysplastic syndrome, 10(2), 115–118.
 77. Sperling, A. S., Gibson, C. J., Ebert, B. L. (2017). The genetics of myelodysplastic syndrome: from clonal haematopoiesis to secondary leukaemia. *Nature reviews. Cancer*, 17(1), 5–19. <https://doi.org/10.1038/nrc.2016.112>
 78. Jan, M., Ebert, B. L., Jaiswal, S. (2017). Clonal hematopoiesis. *Seminars in hematology*, 54(1), 43–50. <https://doi.org/10.1053/j.seminhematol.2016.10.002>
 79. Bowman, R. L., Busque, L., Levine, R. L. (2018). Clonal Hematopoiesis and Evolution to Hematopoietic Malignancies. *Cell stem cell*, 22(2), 157–170. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2018.01.011>
 80. Jaiswal, S., Libby, P. (2020). Clonal haematopoiesis: connecting ageing and inflammation in cardiovascular disease. *Nature reviews. Cardiology*, 17(3), 137–144. <https://doi.org/10.1038/s41569-019-0247-5>

81. Ibrar, W., Zhang, W., Cox, J. L., Cushman-Vokoun, A., Fu, K., Greiner, T. C., Yuan, J. (2021). The utility of a myeloid mutation panel for the diagnosis of myelodysplastic syndrome and myelodysplastic/myeloproliferative neoplasm. *International journal of laboratory hematology*, 43(6), 1501–1509. <https://doi.org/10.1111/ijlh.13659>
82. Malcovati, L., Galli, A., Travaglino, E., Ambaglio, I., Rizzo, E., Molteni, E., Elena, C., Ferretti, V. V., Catricalà, S., Bono, E., Todisco, G., Bianchessi, A., Rumi, E., Zibellini, S., Pietra, D., Boveri, E., Camaschella, C., Toniolo, D., Papaemmanuil, E., Ogawa, S., Cazzola, M. (2017). Clinical significance of somatic mutation in unexplained blood cytopenia. *Blood*, 129(25), 3371–3378. <https://doi.org/10.1182/blood-2017-01-763425>
83. Zheng, G., Chen, P., Pallavajjala, A., Haley, L., Gondek, L., Dezern, A., Ling, H., De Marchi, F., Lin, M. T., Gocke, C. (2019). The diagnostic utility of targeted gene panel sequencing in discriminating etiologies of cytopenia. *American journal of hematology*, 94(10), 1141–1148. <https://doi.org/10.1002/ajh.25592>
84. Shanmugam V, Parnes A, Kalyanaraman R, Morgan EA, Kim AS. Clinical utility of targeted next-generation sequencing-based screening of peripheral blood in the evaluation of cytopenias. *Blood*. 2019;134(24):2222-2225. <https://doi.org/10.1182/blood.2019001610>
85. Chen, C. Y., Lin, L. I., Tang, J. L., Ko, B. S., Tsay, W., Chou, W. C., Yao, M., Wu, S. J., Tseng, M. H., Tien, H. F. (2007). *RUNX1* gene mutation in primary myelodysplastic syndrome--the mutation can be detected early at diagnosis or acquired during disease progression and is associated with poor outcome. *British journal of haematology*, 139(3), 405–414. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.2007.06811.x>
86. Harada, H., Harada, Y., Niimi, H., Kyo, T., Kimura, A., Inaba, T. (2004). High incidence of somatic mutations in the *AML1/RUNX1* gene in myelodysplastic syndrome and low blast percentage myeloid leukemia with myelodysplasia. *Blood*, 103(6), 2316–2324. <https://doi.org/10.1182/blood-2003-09-3074>
87. Bersanelli, M., Travaglino, E., Meggendorfer, M., Matteuzzi, T., Sala, C., Mosca, E., Chiereghin, C., Di Nanni, N., Gnocchi, M., Zampini, M., Rossi, M., Maggioni, G., Termanini, A., Angelucci, E., Bernardi, M., Borin, L., Bruno, B., Bonifazi, F., Santini, V., Bacigalupo, A., Della Porta, M. G. (2021). Classification and Personalized Prognostic Assessment on the Basis of Clinical and Genomic Features in Myelodysplastic Syndromes. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 39(11), 1223–1233. <https://doi.org/10.1200/JCO.20.0165>

ZAŁĄCZNIK 1 Zgoda Komisji Bioetycznej



UNIWERSYTET MEDYCZNY IM. KAROLA MARCINKOWSKIEGO W POZNANIU

KOMISJA BIOETYCZNA PRZY UNIWERSYTECIE MEDYCZNYM
IM. KAROLA MARCINKOWSKIEGO W POZNANIU

Collegium Stomatologicum
ul. Bukowska 70
60-812 Poznań

tel. (+48 61) 854 73 36
www.bioetyka.ump.edu.pl

Uchwała nr 194/19

Ustawy z dnia 5 grudnia 1996 r. o zawodach lekarzy i lekarzy dentysty (t.j. Dz. U. z 2018 r., poz. 617 z późn. zm.); Rozporządzenia Ministra Zdrowia i Opieki Społecznej z dnia 11 maja 1999 r. w sprawie szczegółowych zasad powoływania i finansowania oraz trybu działania komisji bioetycznych (Dz. U. z 1999 r., Nr 47, poz. 480); Ustawy z dnia 6 września 2001 r. Prawo farmaceutyczne (t.j. Dz. U. z 2017 r., poz. 2211 z późn. zm.); Rozporządzenia Ministra Finansów z dnia 30 kwietnia 2004 r. w sprawie obowiązkowego ubezpieczenia odpowiedzialności cywilnej badacza i sponsora (Dz. U. z 2004 Nr 101, poz. 1034 z późn. zm.); Rozporządzenia Ministra Finansów z dnia 18 maja 2005 r. zmieniającego rozporządzenie w sprawie obowiązkowego ubezpieczenia odpowiedzialności cywilnej badacza i sponsora (Dz. U. z 2005 r. Nr 101, poz. 845); Rozporządzenia Ministra Zdrowia z dnia 30 kwietnia 2004 r. w sprawie sposobu prowadzenia badań klinicznych z udziałem małoletnich (Dz. U. z 2004 r. Nr 104, poz. 1108); Rozporządzenia Ministra Zdrowia z dnia 30 kwietnia 2004 r. w sprawie zgłoszenia niespodziewanego ciężkiego niepożądanego działania produktu leczniczego lub aktywnego wyrobu medycznego do implantacji oraz wysokości opłat za złożenie tych wniosków (Dz. U. z 2016 r., poz. 208); Ustawy z dnia 29 maja 2010 r. o wyrobach medycznych i badaczach klinicznych w związku z prowadzeniem badania klinicznego wyrobów (Dz. U. z 2010 r., poz. 194, poz. 1290); Ustawy z dnia 18 marca 2011 r. o Urzędzie Rejestracji Produktów Leczniczych, Wyrobów Medycznych i Produktów Biobójczych (t.j. Dz. U. z 2016 r., poz. 1718 z późn. zm.); Rozporządzenia Ministra Zdrowia z dnia 2 maja 2012 r. w sprawie Dobrej Praktyki Klinicznej (Dz. U. z 2012 r., poz. 489); Rozporządzenia Ministra Zdrowia z dnia 12 października 2018 r. w sprawie wzorów dokumentów przedkładanych w związku z badaniem klinicznym produktu leczniczego oraz opłat za złożenie wniosku o rozpoczęcie badania klinicznego (Dz. U. z 2018 r., poz. 1994); w oparciu o Deklarację Helsińską - Zasady Etycznego Postępowania w Eksperymentach Medycznych z Udziałem Ludzi oraz przepisy ICH GCP.

Komisja Bioetyczna, na posiedzeniu w dniu 07 lutego 2019 r.

rozpatrzyła wniosek dotyczący prowadzenia badań naukowych.

Kierownik projektu:

dr hab. n. med. Małgorzata Jarmuż-Szymczak, prof. PAN

Miejsce prowadzenia badań:

**Katedra i Klinika Hematologii i Transplantacji Szpiku
Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu**

Główny badacz: mgr inż. Joanna Czerwińska-Rybak

Członkowie zespołu

**badawczego: dr hab. Małgorzata Jarmuż-Szymczak, prof. PAN;
mgr Błażej Ratajczak; mgr inż. Anna Przybyłowicz-Chalecka; mgr inż.
Joanna Czerwińska-Rybak; dr Marta Barańska, dr hab. Lidia Gil prof. UM,
lek. Łukasz Pruchniewski**

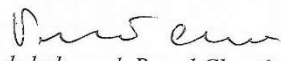
Temat badań:

**„Ocena występowania aberracji chromosomowych i wariantów
sekwencji DNA wybranych genów u chorych z zespołem
mielodysplastycznym”.**

Okres prowadzenia badań: luty 2019 r. – luty 2021 r.

Komisja wydała uchwałę o pozytywnym zaopiniowaniu tego wniosku

Przewodniczący Komisji


prof. zw. dr hab. med. Paweł Chęciński