

Міністерство освіти і науки України
Національний університет «Києво-Могилянська академія»
Факультет природничих наук
Кафедра лабораторної діагностики біологічних систем

Магістерська робота

освітній ступінь - магістр

на тему: **«ОСОБЛИВОСТІ МОРФОФУНКЦІОНАЛЬНОГО СТАНУ
ГЕМОПОЕТИЧНОЇ СИСТЕМИ У КУЛЬТУРІ КЛІТИН *IN VITRO* У
ХВОРИХ НА МІЄЛОДИСПЛАСТИЧНИЙ СИНДРОМ»**

Виконав: студент 2-го року навчання,
спеціальності

091-Біологія

Лагоднюк Ігор Юрійович

Науковий керівник: Білько Н.М.
доктор медичних наук, професор

Рецензент _____

(прізвище і підпис)

Магістерська робота захищена

з оцінкою _____

Секретар ЕК Пахаренко М.В.

«__» _____ 2020 р.

Київ 2020

ЗМІСТ

ВСТУП.....	4
1.2. Патофізіологія і етіологія МДС.....	7
1.3. Класифікація МДС.....	8
1.4. Діагностика МДС.....	10
1.5. Цитогенетичні дослідження МДС.....	11
1.6. Гемопоетичні стовбурові клітини та клітини-попередники кісткового мозку при МДС.....	13
1.7 Трансформація МДС у ГМЛ.....	16
1.8 Майбутній напрямок досліджень МДС.....	22
РОЗДІЛ 2.....	24
МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ.....	24
2.1 Об'єкт та предмет дослідження.....	24
2.2. Матеріали та реагенти, які необхідні для дослідження.....	25
2.2.1. Витратні матеріали:.....	25
2.2.2 Реактиви.....	25
2.2.3. Лабораторний посуд.....	26
2.2.4. Обладнання.....	27
2.3. Техніка методу.....	27
2.3.1. Культивування клітин попередників кісткового мозку людини у <i>in vitro</i> напіврідкому агарі.	27
2.3.2. Виявлення активності пероксидази методом Loele.....	28
2.3.3. Забарвлення культури за Паппенгеймом.	29
2.3.4. Цитоспін центрифужний метод.	30
2.3.4.3 Процедура підготовки зразків кісткового мозку до центрифугування.	31
РОЗДІЛ 3.....	33
РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ.....	33
3.1. Цитохімічні особливості гемопоетичних клітин у хворих на МДС.....	33
3.1.1. Виявлення активності пероксидази методом Loelle.....	33
3.1.2. Аналіз цитоцентрифужних препаратів кісткового мозку.	33

3.2. Оцінка колонієутворюючої здатності клітин кісткового мозку хворих на МДС	34
3.2.1 Група пацієнтів хворих на МДС.....	35
3.2.2. Порівняльна морфофункціональна характеристика груп хворих на МДС та ХМЛ у культурі <i>in vitro</i>	38
3.2.3. Група хворих з трансформацією МДС у ГМЛ.....	39
3.2.4. Особливості морфології утворених колоній при культивуванні <i>in vitro</i> клітин-попередників кісткового мозку при МДС.	42
УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ.....	45
ВИСНОВКИ	47
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	48

ВСТУП

Мієлодиспластичні синдроми (МДС), зазвичай характеризують як недостатність кісткового мозку (КМ), тобто гетерогенна група мієлоїдних клональних порушень, викликаних недостатністю дозрівання клітин крові. Супутні захворювання виникають в результаті різного ступеня цитопенії і клональній нестабільності з тенденцією до прогресування, головним чином, в гострий мієлоїдний лейкоз (ГМЛ), але також дуже рідко в гострий лімфобластний лейкоз. Наше розуміння патогенезу МДС відстає, принаймні частково, тому що вони являють собою більш гетерогенну групу розладів. Значні імунологічні порушення, описані при цьому захворюванні, в поєднанні з домішкою стовбурових або прогеніторних клітин МДС в міриаді типів диспластичних і нормальних клітин в кістковому мозку і периферичної крові ускладнили молекулярну характеристику і моделювання МДС. Колись вважалися рідкісними захворюваннями, мієлодиспластичні синдроми (МДС) в даний час визнані одними з найпоширеніших гематологічних новоутворень, які, ймовірно, вражають > 300 000 пацієнтів на рік в усьому світі. Тому вивчення цієї хвороби залишається актуальною проблемою, а саме дослідження колонієутворюючого фактора, морфофункціональні особливості гемопоетичної системи. Це в свою чергу дасть змогу для прогнозування перебігу захворювання.

Метою роботи було дослідження особливостей морфофункціонального стану гемопоетичної системи у культурі клітин *in vitro* у хворих на мієлодиспластичний синдром у порівнянні зі зразками здорової людини.

Для досягнення мети були поставлені такі завдання:

- дослідити здатність до колонієутворення клітин попередників кісткового мозку;
- описати морфологію утворених колоній та кластерів;
- дослідити процес трансформації МДС в гостру мієлоїдну лейкемію;

Об'єктом дослідження були клітини-попередники кісткового мозку людини. Предметом дослідження було визначення культуральних особливостей клітин-попередників кісткового мозку людей, хворих на мієлодиспластичний синдром.

Експериментальну частину роботи було виконано на базі Центру молекулярних і клітинних досліджень НаУКМА Національного університету «Києво-Могилянська академія».

РОЗДІЛ 1

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Загальні відомості про МДС

Мієлодиспластичні синдроми (МДС) є найбільш поширений клас синдромів хронічної недостатності кісткового мозку у дорослих. Хоча МДС все більш добре розуміють з біологічної точки зору, включаючи виявлення >40 пов'язаних з MDS рекуррентно-мутованих генів за останні 7 років, покращене патологічне розуміння ще не привело до високоефективної або виліковної терапії для більшості пацієнтів, які страждають від цих розладів [1-3].

У сукупності термін MDS описує різноманітну групу клональних порушень гемопоетичних стовбурових або прогеніторних клітин, що характеризуються неефективним кровотворенням, аномальною морфологією «диспластичних» клітин і потенціалом клональної еволюції. Посилення недостатності клітинної диференціювання пов'язане з розвитком вторинної гострої мієлоїдної лейкемії (ГМЛ), яка в даний час доволі визначається Всесвітньою організацією охорони здоров'я (ВООЗ) як $\geq 20\%$ мієлоїдних бластів в крові або кістковому мозку, або наявністю одного з декількох ГМЛ визначення каріотипічних порушень (наприклад, $t(15;17)$, $t(8;21)$, $inv(16)$ або $t(16;16)$) незалежно від частки вибуху. ГМЛ в кінцевому підсумку діагностується в 30% випадків МДС [4-6].

Згідно з даними Surveillance, Epidemiology & End Reports (SEER), МДС рідко зустрічається у віці молодше 40 років. За оцінками, захворюваність збільшується з віком з п'ятикратною різницею в ризику між 60 і 80 роками. Рівень захворюваності становить близько 4,9 на 100 000 чоловік в рік серед населення в цілому. На людей різного віку він більшою мірою впливає на чоловіків, ніж на жінок [7].

1.2. Патофізіологія і етіологія МДС

На ранніх стадіях МДС, надмірно запрограмована загибель клітин (апоптоз) є основною подією з подальшою цитопенією з її змінним ступенем та мірою. Крім того, з прогресуванням хвороби, мутацією генів та лейкемічною трансформацією, що спричиняє руйнування КМ через лейкемічні клітини. Клональна мутація є рушієм для розвитку МДС, що призводить до нормального пригнічення стовбурових клітин. Ця мутація може бути наслідком генетичної сприйнятливості або пошкодження гемопоетичних стовбурових клітин.

Більшість пацієнтів з МДС не мають явної причини (приблизно 80%) і названі як ідіопатичні або первинні МДС. Такі хвороби іноді називають ідіопатичними цитопеніями невизначеного значення (ІЦНЗ), які на відміну від моноклональної гаммопатії невизначеного значення за визначенням не відомі як клональні. ІЦНЗ також не є унікальною або чітко визначеною клінічною одиницею і включає гетерогенну групу пацієнтів, тільки деякі з яких мають ризик прогресування МДС або ГМЛ. На додаток до ІЦНЗ, деякі літні люди мають клонально обмежений гематопоез без цитопеній, іноді визначається як соматичний мозаїцизм для великих хромосомних аномалій, і швидкість, з якою ці пацієнти прогресують до МДС або інших гематологічних новоутворень, збільшується в порівнянні з пацієнтами без клонального гематопоезу. Недавнє виявлення 450 соматичних мутацій в здоровому кровоносній судині 115-річної жінки є яскравою ілюстрацією того, що не всі мутації є клінічно значущими [8-11].

Вторинна МДС за даними Всесвітньої організації охорони здоров'я (ВООЗ) розвивається через роки після впливу відомих агентів, що викликають хромосомні пошкодження, такі як хіміотерапія (алкілюючі агенти, інгібітори топоізомерази II), променева терапія, важкі метали (ртуть, свинець), вірусна інфекція, токсичні хімічні речовини (бензол, фунгіцид) і деякі аутоімунні захворювання. Пов'язані з хіміотерапією МДС представляли собою найбільш

очевидний причинний фактор. У нас є 2 види терапії; алкілюючі агенти ± адіотерапія і інгібітори топоізомерази II. Відкрита МДС мала особливі характеристики в залежності від фактора ризику порушення. Посталкілюючі агенти, такі як нітроген мустарди, характеризуються пізнім початком приблизно через 5-7 років після впливу специфічного каріотипування (-5, del (5q), -7, del (q) і комплекс). Хоча у випадку інгібіторів після топоізомерази II, таких як антрациклін / етопозид, характерним є ранній початок 1-3 років з хромосомними порушеннями (MLL ген 11q23). Хоча генетична схильність зустрічається рідко, повідомляється про сімейні захворювання. Сімейний розлад тромбоцитів – кращий приклад, що характеризується мутацією в RUNX1 і GATA2, що повертають до МДС. Сімейний ГМЛ з мутованими порушеннями СЕВРА і теломерною біологією є ще однією формою сімейної МДС, яка може бути виявлена під час скринінгу членів сім'ї на трансплантацію КМ. Модель двостороннього переходу від хронічного

МДС в ГМЛ може допомогти зрозуміти основи лейкемічної трансформації. Він може включати молекулярні та цитогенетичні аберації як у мутаціях першого, так і другого класу ураження під час прогресування захворювання. Власне, механізми лейкемічної трансформації чітко не вивчені [12-15].

1.3. Класифікація МДС

МДС є гетерогенним захворюванням, в деяких випадках протікає млявий перебіг, а в інших розвивається глибока цитопенія. Кровотеча і інфекції представляють більшу частину смертності/захворюваності, пов'язаної з МДС. Інший сценарій полягає в більш агресивній поведінці та еволюції в ГМЛ. На основі даних ВООЗ, Французько-Американсько-Британської (ФАБ) Кооперативної групи і Семінарі з аналізу ризиків МДС були розроблені системи для пацієнтів з МДС. Історично склалося так, що МДС був розділений на 5 підгруп на основі системи ФАБ.

Класифікація ВООЗ, запропонована для МДС, була вперше в 1999 році і оновлювалася 3 рази; в 2001, 2008 і 2016 роках. В оновленій класифікації ВООЗ по МДС відбулися 2 зміни; по-перше, від підрозділа МДС-кільцевих сидеробластів (КС) відділили дисплазію однієї лінії (ДОЛ) і мультилінійну дисплазію (МЛД), засновану на наявності дисплазії однієї або декількох ліній відповідно. По-друге, МДС-КС розширився і включив пацієнтів з мутаціями SF3B1, але без надмірних бластів або ізольованою аномалією 5q. Сутність 5q-розпізнається ізольованим del (5q) як єдина аномалія каріотипу, бластних клітин <5% - ні інших аномалій за винятком -7/7q-, що пов'язано з поганим прогнозом. Іншою зміною в оновленні є необхідність 1% бластів у периферичній крові для діагностики МДС-НК в 2 окремих випадках. Таблиця 1.1 підсумовує оновлену класифікацію МДС [16-21].

Таблиця 1.1

Класифікація МДС за ВООЗ 2016р.

Тип	Кров	Кістковий мозок
МДС-ДОЛ	Моно-, або біцитопенія	Дисплазія $\geq 10\%$ від лінії клітин, <5% бласти
МДС-СБ	Анемія, бласти відсутні	$\geq 15\%$ еритроїдних попередників з СБ або $\geq 5\%$ СБ, якщо присутня мутація SF3B1.
МДС-МЛД	Цитопенії < 1×10^9 /л моноцитів	Дисплазія $\geq 10\%$ клітин у гемопоетичних лініях ≥ 2 , <15% RS або <5% RS, якщо присутня мутація SF3B1) <5% бластів
МДС-НБ-1	Цитопенії $\leq 2\%$ -4% бласти, < 1×10^9 /L monocytes	ДОЛ або МЛД, 5%-9% бластів, без тіл Ауера

Продовження таблиці 1.1

МДС-НК	Цитопенії, $\pm 1\%$ бластів як мінімум 2 рази	ДОЛ чи без дисплазії, але характерна цитогенетика МДС, $<5\%$ бластів
МДС з ізолюваною del(5q)	Анемія, тромбоцити нормальні або збільшені	Еритроїдна дисплазія з однорідною лінією, ізолювана del(5q), $<5\%$ бластів \pm одна інша аномалія, за винятком -7 / del (7q)
Рефракторна цитопенія дитинства	Цитопенія $<2\%$ бластів	Дисплазія 1-3 лінії, $<5\%$ бластів

1.4. Діагностика МДС

Немає конкретного анамнезу щодо діагностики МДС, за винятком випадків, пов'язаних з недостатністю КМ у вигляді екхімозів, петехій, кровотечами з носа та ясен, які є загальними проявами тромбоцитопенії. Лихоманка, періодична інфекція та шок можуть бути проявом нейтропенії. Недуга, втома та обтяжуючі серцеві захворювання можуть бути наслідком анемії. International Consensus Working Group рекомендувала принаймні два критерії для діагностики МДС: стабільна цитопенія протягом 6 місяців або 2 місяці лише тоді, коли вона була пов'язана зі специфічною цитогенетичною або дволінійною дисплазією. Крім того, слід виключити інші причини дисплазії та цитопенії. Більше того, діагноз потребує щонайменше одного з наступних пунктів: по-перше, дисплазія $\geq 10\%$ в одному або декількох з трьох ліній КМ; по-друге, бласти складають від 5% -19%; по-третє, каріотипізація, пов'язана з МДС (5q-, 20q-, +8, -7 / 7q-). Існує більше співкритерій, які можуть допомогти в діагностиці, включаючи патологічну гістологію КМ, аберрантне імунофенотипування та наявність молекулярних маркерів як аномальних CD34 [22-25].

1.5. Цитогенетичні дослідження МДС

Роль цитогенетики набуває великого значення в зв'язку з неспецифічними гістопатологічними змінами. Деякі дослідники стверджували, що при первинних МДС до 79% хромосомних порушень. Пацієнти з МДС діляться на три категорії: складні каріотиби (> 3 аномалії), нормальний каріотип і збалансована хромосомна аномалія. Хромосомні аномалії можуть бути множинними і вказують на поганий прогноз і можуть бути одиничними і зазвичай вказують на хороший прогноз, за винятком випадків з хромосомою 7. Найбільш поширеними хромосомними аномаліями є моносомія 7 (-7) або 7q-, 5q-, трисомія 8 (+8), наявність каріотипа t(8:21), t(15,17) і інверсії 16 позначає ГМЛ, а не МДС [26-28].

Делеції довгого плеча 5 хромосоми (5q) є частішими хромосомними порушеннями при МДС (до 15% діагностованих випадків). МДС з del (5q) демонструє гетерогену клінічну картину, розділену на дві великі класифікації, засновані на особливостях клініко-патології, реагуванні на терапію і прогнозі для пацієнта. Один підтип виникає після попереднього впливу цитотоксичної хіміотерапії (головним чином, алкілюючих агентів) і/або опромінення і часто демонструє додаткові хромосомні аномалії і мутації TP53. Цей підтип демонструє підвищену ймовірність лейкозної трансформації і більш коротку загальну виживаність (в межах 6-17 місяців, залежно від кількості та серйозності інших порушень). І навпаки, у пацієнтів з ізольованою del (5q) прогноз кращий і знижений ризик щодо прогресування у ГМЛ (5-16% проти 30-45%). Пацієнти з синдромом 5q- включені в цей підтип. Пацієнти з множинними цитогенетичними порушеннями зі зрозумілих причин слідуєть агресивному перебігу захворювання зі значно нижчими показниками повної відповіді на леналідомід в порівнянні з пацієнтами з ізольованою del (5q) (приблизно 3% проти 67%). Важливо, що специфічні делеції в 5q хромосомі також диктують прогноз. Наприклад, одне дослідження Jerez et al.[29].

продемонструвало, що делеції за участю центромерних і екстремальних теломерних областей хромосоми 5q і/або специфічних генів (таких як MAML1 і NPM1) з більшою ймовірністю мають додаткові хромосомні пошкодження та агресивне протікання захворювання.

Аномалії хромосоми 7 (в основному моносомія 7 або делеція 7q) реєструються приблизно в 10% випадків МДС *de novo* і до 50% пов'язаних з терапією МДС. Аномалії хромосоми 7 корелювали з гіршим прогнозом і знижували загальну виживаність при МДС і інших мієлоїдних злоякісних новоутвореннях, таких як ГМЛ. Зазвичай віддалені області на 7q, ідентифіковані в МДС, розташовані в позиціях 7q22, 7q32-33 і 7q35-36. Недавнє дослідження McNerney et al.[30] продемонстрували, що ген CUX1 (кодує гомеодоменований білок) недостатньо експресується в мієлоїдних новоутвореннях з $-7/\text{del}(7q)$. Інше недавнє дослідження, аналізує мутації драйвера в патофізіології MDS, показало, що 3,5% пацієнтів мали мутації інактивації гена CUX1. Вважається, що CUX1 функціонує як ген-супресор пухлин в мієлоїдних клітинах-попередниках, регулюючи експресію білків, що регулюють клітинний цикл.

Ген MLL5, що кодує гістон метилтрансферазу, є ще одним геном, відображеним на 7q22. У мишачій моделі гомозиготні мутації в MLL5 призводять до порушення функції нейтрофілів та еритропоезу та зниження здатності репопуляції гемопоетичних попередників, навіть за наявності подразників самовідновлення. Не тільки це, але клітини з мутованими алелями MLL5 виявляли виражену чутливість до гемопоетичної диференціації, викликаній деметиляцією. Ці дані вказують на те, що MLL5 відіграє важливу роль у мієлоїдній диференціації (за допомогою метилювання ДНК) та вимагає її дослідження як предиктора реакції на гіпометилювання агентів, таких як азацитидин у пацієнтів із МДС. Слід зазначити, що хоча при мієлоїдній неоплазії не виявлено мутацій в MLL5, зменшена експресія MLL5 корелює зі низьким прогнозом трансформації в ГМЛ. EZH2 - це ще один ремодер хроматину, розташований на 7q36 і мутується приблизно в 6% випадків МДС,

що корелює з високим прогнозом трансформації в ГМЛ. Однак делеції в 7q не призводять до втрати гена EZH2. Делеції хромосоми 7q, як правило, досить великі, і гапло-недостатність множинних генів, розташованих у видалених областях, сприяє патології МДС.

Набута делеція статевої хромосоми (-Y, у чоловіків, -X у жінок) є феноменом, пов'язаним з віком, але також може відбуватися в зв'язку з гематологічними злоякісними новоутвореннями. Пацієнти з МДС з ізольованою делецією Y-хромосоми віднесені до групи «дуже хорошого» прогнозу. З моменту свого першого відкриття в 1960-х роках делеція Y-хромосоми і її зв'язок з мієлоїдними розладами перебували під пильною увагою. Оскільки втрата Y-хромосоми пояснюється нормальним процесом старіння і тим фактом, що частота виникнення МДС збільшується з віком, зв'язок між -Y і МДС неясна. Проте, передбачається, що -Y є потенційним драйвером при мієлоїдних розладах. Ізольована делеція Y-хромосоми є частою цитогенетичною знахідкою при МДС. Дослідження, проведене в 2008 році, показало, що у 14 з 142 пацієнтів (9,9%) з втратою хромосоми Y розвивався МДС і повідомлялося про 3,8-кратне збільшенні ризику розвитку МДС з -Y. Трисомія 15 також може відбуватися одночасно з -Y, однак при наявності трисомії 15 та -Y спостерігали з доброякісне протікання хвороби. Подальші дослідження допоможуть з'ясувати наслідки одночасного +15 і -Y[31-32].

1.6 . Гемопоетичні стовбурові клітини та клітини-попередники кісткового мозку при МДС

Недавні дослідження показали, що мієлодиспластичні синдроми (МДС) виникають з невеликої популяції ініціюють захворювання гемопоетичних стовбурових клітин (ГСК), які зберігаються і поширюються за допомогою традиційної терапії і є основними факторами, що сприяють прогресуванню і рецидиву захворювання. Стовбурові і клітини-попередники клітини МДС характеризуються ключовими драйверними та мутаціями засновника і

збагачені для цитогенетичних змін. Кількісні зміни в обсязі гемопоетичних стовбурових клітин і клітин-попередників також спостерігаються в певній стадії в зразках МДС людини, а також в мишачої моделі захворювання. Надекспресія деяких маркерів, таких як додатковий білок рецептора інтерлейкіну-1 (IL-1) (IL1RAP), CD99, Т-клітинний імуноглобулін муцин-3 і CD123, почали диференціювати гемопоетичні стовбурові клітини та клітини-попередники кісткового мозку МДС від здорових аналогів. Гіперактивація вроджених імунних компонентів, таких як Toll-подібні рецептори, сигнальні шляхи IL-1-асоційованого рецептора кінази / фактора некрозу пухлини-6, IL8 / CXCR2 і IL1RAP, була продемонстрована в гемопоетичних стовбурових клітинах та клітинах-попередниках кісткового мозку при МДС. Інші нерегульовані шляхи, такі як сигнальний перетворювач і активатор транскрипції 3, імуноглобуліноподібна Тирозинкіназа і з EGF-подібними доменами 1/ангіопоетину-1, p21-активована кіназа, мікроРНК 21 і трансформуючий фактор росту β , також досліджуються в якості терапевтичних мішеней проти гемопоетичних стовбурових клітинах та клітинах-попередниках кісткового мозку при МДС. Взяті разом, ці дослідження продемонстрували, що стовбурові клітини МДС є функціонально критичними для ініціації, трансформації і рецидиву захворювання і потребують окремого дослідження [33-36].

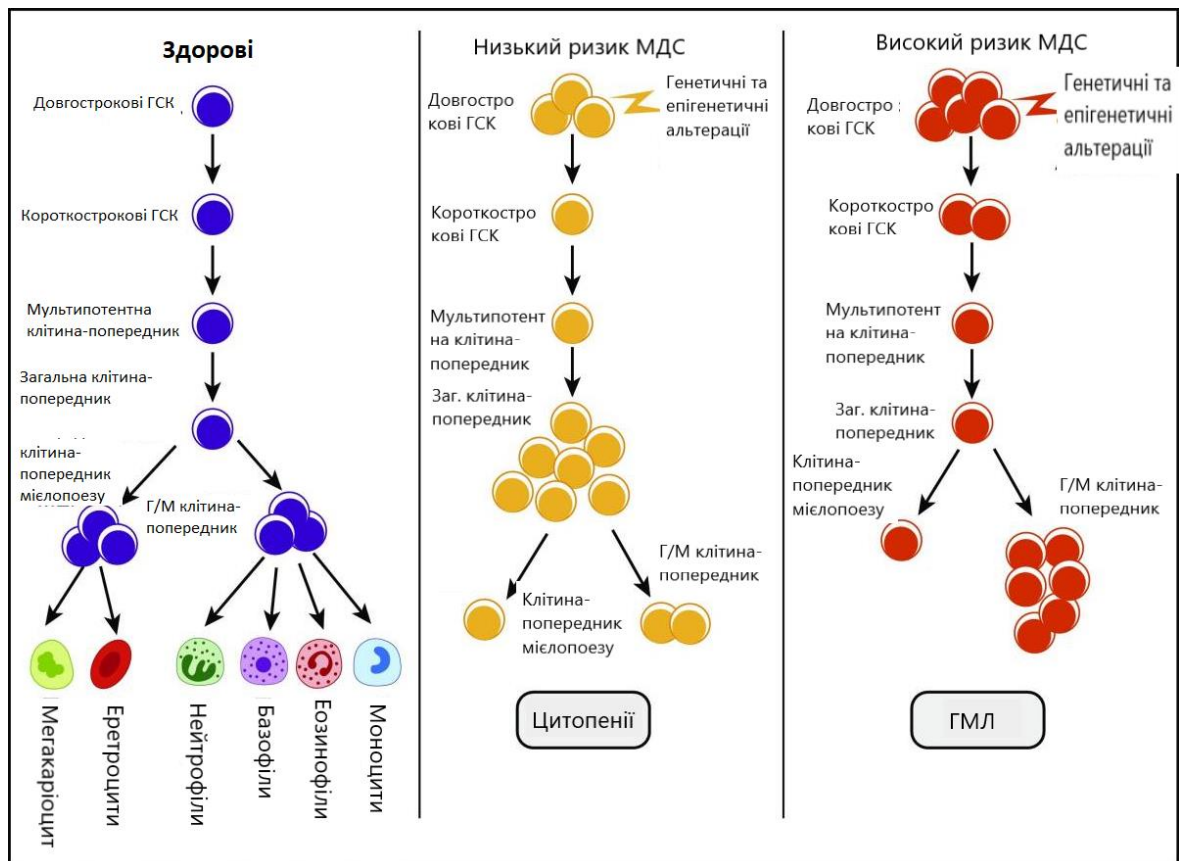


Рис.1.1. Кількісні зміни стовбурових клітин і клітин-попередників в підгрупах МДС.

Стовбурові клітини і різні популяції попередників показані при нормальному і мієлодиспластичному кровотворенні. Хоча це спрощена модель диференціації, недавні дослідження показали, що мультипотентні попередники і загальні клітини попередники можуть йти по альтернативному шляху до диференціювання. Експансія фенотипічних ГСК спостерігається в МДС і найбільш виражена в підгрупах високого ризику. Зразки МДС з низьким ризиком характеризуються фенотипічним збільшенням кількості загальних клітин попередників і зниженням кількості клітин-попередників мієлопоезу. Зразки з більш високим ризиком пов'язані зі збільшеною кількістю грануцитарно-макрофагальних клітин-попередників.

Варто зазначити, що наше розуміння ролі, яку відіграють ініціюють захворювання стовбурові клітини і клітини-попередники в МДС, експоненціально зростає протягом останніх років. Тепер ми знаємо, що

гемопоетичні стовбурові клітини та клітини-попередники кісткового мозку при МДС несуть клонотипічні порушення і беруть участь у виникненні, персистуванні і рецидиві захворювання. В останні роки було досягнуто значного прогресу в розробці доклінічних моделей для вивчення патогенезу МДС на рівень стовбурових клітин. Очікується, що майбутні доклінічні розробки ліків і клінічні випробування будуть спрямовані на гемопоетичні стовбурові клітини та клітини-попередники кісткового мозку при МДС і спрямовані на тривале лікування від цієї хвороби. Ми також прогнозуємо, що кількісні вимірювання ГСК у пацієнтів з МДС будуть все частіше використовуватися в майбутніх дослідженнях і нададуть пацієнтам і лікарям потужний інструмент для моніторингу захворювання з безпрецедентним масштабом і чутливістю [37-41].

1.7. Трансформація МДС у ГМЛ

Мієлодиспластичні синдроми часто прогресують до гострої мієлоїдної лейкемії; проте клітини, що призводять до злоякісної трансформації, наразі не були безпосередньо з'ясовані. В середньому у 30% пацієнтів з мієлодиспластичними синдромами розвивається явний гостра мієлоїдна лейкемія. Постійно ведеться пошук кращої моделі індивідуальної оцінки ризику для пацієнтів з МДС. Якщо підсумувати поточні дані про фактори, які були пов'язані з підвищеним ризиком трансформації ГМЛ, то вони будуть включати лабораторні значення, такі як високі рівні лактатдегідрогенази, складні каріотиби, число і аберантний імунофенотип бластів кісткового мозку, пов'язані з кістковим мозком особливості, такі як кількість і розподіл клітин CD34+, та молекулярні маркери. Широкий спектр описаних молекулярних аберацій в МДС, включаючи різні генні мутації, хромосомну нестабільність, короткі теломери, високий рівень метилювання генів і модифікацію гістонів, частково пояснює клінічну гетерогенність цього захворювання. Безперервні дослідження дозволять краще зрозуміти патогенез різних категорій МДС,

зробивши можливою індивідуальну оцінку ризику і індивідуальну терапію для кожного пацієнта. [42]

Механізми прогресування захворювання і переходу від хронічної фази МДС до більш агресивної фази ГМЛ все ще недостатньо вивчені. Запропоновано механізм, заснований на накопиченні цитогенетичних і молекулярних аберацій в перебігу хвороби, за багатоетапною моделю лейкемогенезу. Проте, нещодавно виявлені молекулярні зміни відбуваються тільки у частини пацієнтів з МДС, і універсальний молекулярний механізм поки не виявлено. Також важливу роль грає баланс між апоптозом і проліферацією в гемопоезі, особливостями, пов'язаними з реакцією хворого, і дефектами строми [43].

Міжнародна система прогностичної оцінки (IPSS), опублікована в 1997 році, ґрунтувалася на відсотку бластів в мазку з кісткового мозку, кількості цитопеній (визначаються як рівні гемоглобіну (Hb) менше 10 г/л, абсолютна кількість нейтрофілів менше $1,5 \times 10^9$ /л і кількість тромбоцитів менше 100×10^9 /л). Всі прогностичні показники включають кількість бластів КМ, оціненого в мазках БМ, як значущий прогностичний фактор ризику трансформації ГМЛ. Довільна межа в 5% бластів була використана для визначення пацієнтів з рефрактерною анемією з надлишком бластів (РАНБ). Недавнє китайське дослідження показало, що у пацієнтів з рефрактерною цитопенією з мультилінійною дисплазією з бластами $> 3,5\%$ прогноз може бути гіршим [51].

Аберрантні фенотипи в популяції КМ-бластів, такі як експресія лімфоїдно-асоційованих маркерів CD7, CD4 і CD56, частіше зустрічаються у МДС при трансформації в ГМЛ. Аберрантна експресія CD7, надекспресія CD34 і CD36, експресія Tdt і накопичення фенотипічних відхилень також були пов'язані з трансформацією захворювання у ГМЛ. Ступінь бластної інфільтрації також вивчалася в біоптатах кісткового мозку по морфології і імуногістохімії CD34, яка допомагає оцінити топографічний розподіл бластів. Наявність аномально локалізованих незрілих клітин-попередників і кластерів

CD34-позитивних клітин значно збільшувало ризик трансформації у ГМЛ, незалежно від прогностичних показників. Аномально локалізовані незрілі клітини-попередники і CD34 кластери частіше спостерігалися у пацієнтів з МДС з РАНБ. Причини смертей у пацієнтів з МДС, у яких були виявлені кластери CD34+, були в основному пов'язані з лейкемічною трансформацією. Підвищена експресія CD34 в мегакаріоцити була відзначена як негативний прогностичний фактор. Кластери CD117+ клітин також були описані як аномально локалізовані незрілі клітини-попередники, але їх значення та роль в трансформації у ГМЛ ще не визначено[44].

Два класи молекулярних мутацій відіграють роль у розвитку МДС і трансформації в ГМЛ. Гени-мішені класу I в основному беруть участь в передачі сигналу, а молекулярні мутації класу II впливають на фактори транскрипції. Мутації класу II (такі як мутації *Tar2*, *RUNX1* або *RSP14* гаплонедостаточності в *del(5q)*) впливають на клітинне диференціювання, але ймовірно, не є достатніми факторами для індукції трансформації у ГМЛ, але грають важливу роль в ініціації МДС[45].

Мутації класу I (такі як *Flt3*, *RAS*, *KIT*, *IDH1* і *NPM1*) впливають на проліферацію і виживання клітин, були в основному виявлені у пацієнтів з МДС при прогресуванні до ГМЛ. Коли кілька мутацій були досліджені в когорті пацієнтів з МДС і пацієнтів з ГМЛ без комплексного каріотипу або збалансованих транслокацій, мутації в генах *ASXL1* і *CBL* були частими у пацієнтів з РАНБ МДС. Мутації в гені *TET2* були виявлені як в МДС, так і в ГМЛ і можуть бути пов'язані з мутаціями *ASXL1* або *NPM1*, але не з мутацією *RUNX1*. Остання може поєднуватися з мутаціями в *ASXL1*, але не в гені *NPM1*. Мутації в *FLT3*, *IDH1*, *IDH2*, *NPM1* і *WT1* були виявлені в основному у пацієнтів з ГМЛ. Однак мутації кожного з вищезгаданих генів зустрічаються тільки у відносно невеликої частки пацієнтів з МДС, що вказує на гетерогенність захворювання [46].

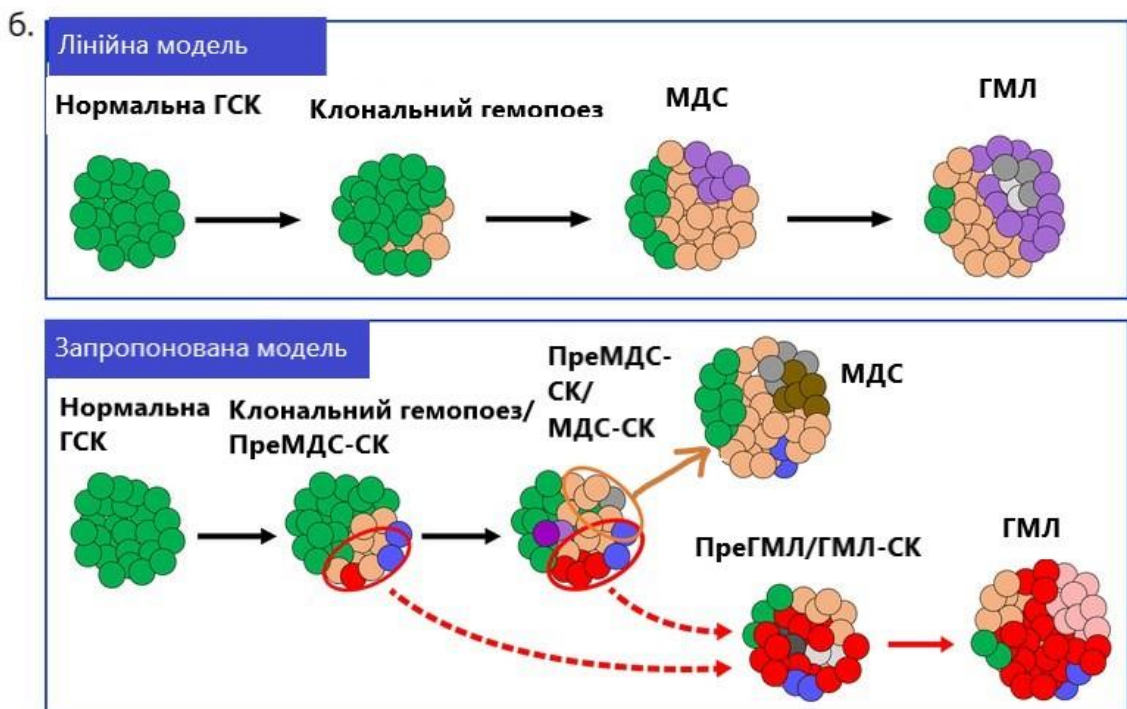
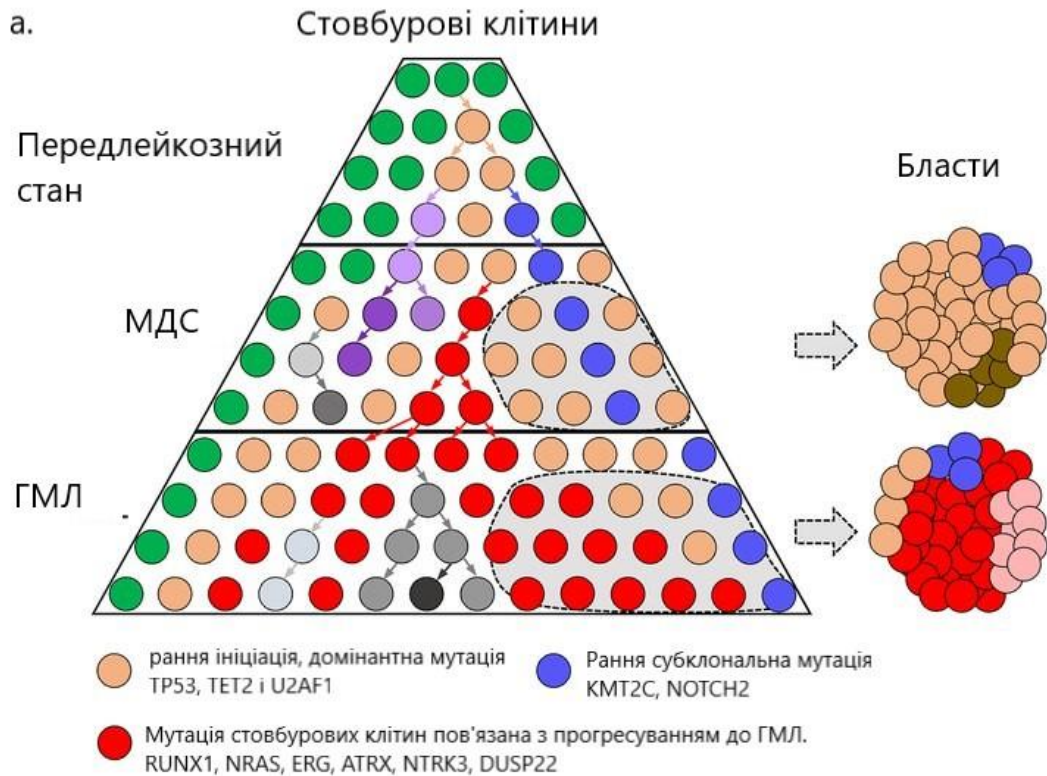


Рис 1.2. Модель субклональної еволюції стовбурових клітин при прогресуванні МДС до ГМЛ. а – Модель нелінійної клональної еволюції, виникає на рівні стовбурових клітин під час розвитку МДС і прогресування до ГМЛ. Накопичення мутацій в компартментах стовбурових клітин призводить до дуже різноманітної субклональної архітектури (позначеної різними

кольорами) в стовбурових клітинах МДС. Деякі субклони (помаранчеві, наприклад, з TP53, TET2 або U2AF1 мутаціями («клональний гемопоез») забезпечують загальну основу як для розвитку МДС (бласти МДС), так і для утворення преГМЛ- та ГМЛ-стовбурових клітин. Проте, преМДС- або МДС-стовбурові клітини набувають різних додаткових мутацій, які потім керують утворенням МДС-бластів або трансформуванням до ГМЛ, відповідно, нелінійним і досить різним чином у всіх вивчених пацієнтів. Було визначено, що домінантний клон на стадії вторинної ГМЛ стався від клону (з RUNX1, NRAS або ERG і ATRX мутації), яка виявлялася в преМДС- та МДС-стовбурових клітинах, але не виявлялася в бластних клітинах МДС. Ці результати показують, що стовбурові клітини МДС, що призводять до утворення бластів МДС, можуть відрізнитися від тих, які сприяють прогресуванню до вторинного ГМЛ, підкреслюючи критичну роль усього розмаїття пулу стовбурових клітин МДС у трансформації захворювання у ГМЛ.

б – Схеми різних моделей розвитку і розвитку МДС і ГМЛ. У порівнянні з лінійною моделлю, яка була запропонована на основі об'ємного секвенування і передбачає накопичення серійних мутацій під час прогресування захворювання, останні дані підтверджують модель паралельної клональної еволюції на рівні стовбурових клітин під час розвитку МДС і прогресування до ГМЛ. У всіх пацієнтів в якості основи для розвитку МДС і ГМЛ виявляється дуже різноманітний пул стовбурових клітин преМДС; у більшості пацієнтів виявляються дуже ранні розгалуження на рівні стовбурових клітин МДС в напрямку трансформації до стовбурових клітин ГМЛ, що призводить до різного клонального складу між лейкоцичними клітинами МДС і ГМЛ, у трохи менше половини пацієнтів спостерігається картина більш пізнього розгалуження (пунктирні червоні стрілки), що призводить до більш схожого клонального складу між лейкоцичними клітинами МДС і ГМЛ в порівнянні з ранніми випадками розгалуження [47].

Кілька досліджень показали збільшення частоти запрограмованої загибелі клітин (апоптоз) в кістковому пацієнтів з МДС. Підвищений апоптоз,

який перевищує швидкість проліферації, в основному розглядається як характеристика захворювання на ранній стадії, тоді як прогресування захворювання пов'язане зі зниженням апоптозу. Було показано, що деякі цитокіни надекспресуються в МДС, включаючи TNF- α , що трансформує фактор росту (TGF)- β , інтерферон- γ , IL-6 і IL-1 β . TNF- α може продукуватися макрофагами, і було показано, що рівні TNF- α в плазмі КМ корелюють з проапоптичною експресією Fas і апоптозом. Рівні TNF- α були нижче у пацієнтів з МДС РАНБ, ніж у МДС-СБ, що свідчить про знижену роль TNF- α в прогресуванні хвороби. Інші надекспресованні молекули, що діють як негативні регулятори гемопоезу в МДС, включають FAS-ліганд і TRAIL (або TNFSF10) з їх відповідними агоністичними рецепторами. При прогресуванні спостерігається зрушення балансу в сигналах і переважають антиапоптотичні/проліферативні сигнали, включаючи підвищену експресію Bcl-2 [48].

Крім того, CD34 + КМ-клітини від пацієнтів з МДС високого ризику або при прогресуванні показують більш високі рівні NF- κ B в порівнянні з ранньою стадією захворювання. Висока активність NF- κ B може призводити до посилення регулювання FLIP (FLICE-інгібуючого білка) і інших NF- κ B-залежних антиапоптотичних регуляторів (таких як Bcl-xL, Bcl-2, XIAP) з подальшою підвищеною стійкістю клітин CD34+ до апоптозу [49].

Деякі спостереження показують, що імунна дисрегуляція грає важливу роль в патогенезі МДС низького ризику і сприяє неефективному гемопоезу у цих пацієнтів. Модель імунного патогенезу пояснюється тим, що клітини CD8+ стимулюються унікальними або надекспресованими антигенами, що призводить до скорочення кількості рецепторів Т-клітин за рахунок експансії клітин пам'яті і зниження гемопоезу через перехресно-реактивні антигени, що експресуються на нормальних клітинах-попередниках КМ. CD4 і CD8 популяції характеризуються порушеннями у регуляції. У молодших пацієнтів з МДС зниження рівня наївних CD4+ Т-клітин було пов'язано з відповіддю на імуносупресивну терапію. Було висловлено припущення, що втрата CD4+

клітин в МДС може заціпати головним чином регуляторні Т-клітини, які важливі для периферичної толерантності та запобігання аутоімунного процесу, в той час як кількість CD3 + CD4 + IL-17, які продукують Т-клітини було збільшено. Рівні регуляторних Т-клітин в крові пацієнтів з МДС високого ризику були вищі, ніж в групі низького ризику, а рівні ще більш зросли у пацієнтів з трансформованим ГМЛ. Також регуляторні Т-клітини у пацієнтів з прогресуючим МДС зберігають свою функціональну здатність на відміну від регуляторних Т-клітин у пацієнтів з МДС низького ризику, у яких знижена здатність пригнічувати імунні відповіді. Крім того, у пацієнтів з МДС високого ризику знижується функція природних натуральних-кілерів і знижується експресія активації рецепторів натуральних кілерів. Таким чином, у пацієнтів з МДС високого ризику порушення імунної системи може сприяти трансформації та розвитку ГМЛ [50-54].

Незважаючи на значний прогрес в розумінні молекулярного патогенезу МДС, точні дефекти, які змушують деяких пацієнтів швидко переходити в агресивну і зазвичай резистентну до терапії фазу ГМЛ, часто незрозумілі і, ймовірно, є складними та комплексними. Безперервні дослідження дозволять краще зрозуміти патогенез різних категорій МДС, зробивши можливою індивідуальну оцінку ризику і індивідуальну терапію для кожного пацієнта.

1.8. Майбутній напрямок досліджень МДС

Luspatercept (ACE-536) є гібридним білоком, який діє за допомогою модифікації Act RII (рецептора активина II), що приводить до зміни TGF (трансформація сигналів фактора росту) з подальшим поліпшенням еритропоезу. В III фазі випробувань порівнювали luspatercept з плацебо (ClinicalTrials.gov. NCT02631070) для лікування анемії при МДС низького ризику. Це випробування завершено в 2017 році і чекає результатів [55].

Чимало препаратів перебувають на стадії оцінки в багатьох дослідженнях, спрямованих на розширення можливостей вибору для

поліпшення результатів у пацієнтів з МДС. До них відносяться інгібітори ригосертіба, люспатерцепта, венетоклакса, іметелстата і імунних контрольних точок. Крім того, в даний час в клінічних випробуваннях по лікуванню МДС досліджуються 3 нових гіпометілюючих агента. Guadecitabine, антиметаболит децітабіна із протипухлинною активністю (раніше називався SGI-110), CC486 є пероральну форму азацитідіна, і кедазурін (раніше називався ASTX727) є комбінацією інгібітору цитидин-деаміназа і децітабіна, перорально введеного в фіксованій дозі. APR-246, модулятор TP53 в даний час вивчається для відновлення його активності (ClinicalTrials.gov NCT03072043) [56].

Через відсутність ефективного лікування у значної групи хворих на МДС, клінічні випробування все ще є розумним варіантом у багатьох ситуаціях. Для поліпшення результатів необхідні нові терапевтичні засоби та більше досягнень та досліджень в області мієлодиспластичних синдромів.

Хоча в наше розуміння молекулярних патологічних механізмів при ГМЛ і МДС досягнуті великі успіхи, точні дефекти, що лежать в основі виникнення та прогресування захворювань, все ще залишаються неясними. Сподіваємося, що нові наукові підходи дадуть додаткову інформацію і приведуть до більш індивідуальних підходів до терапії при лікуванні МДС і ГМЛ.

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

2.1 Об'єкт та предмет дослідження

Досліджували клітини-попередники кісткового мозку 22 хворих на мієлодиспластиний синдром, а саме рефрактерну анемію з надлишком бластів І. Зразки отримували у Інституті гематології та трансфузіології НАМН України. Пункцію робили голкою Кассирського. Підготовлювали добре притертий і підігнаний до голки Кассирського шприц, інші голки, 1-2% розчин новокаїну для анестезії, спирт, ефір, спиртовий розчин йоду, предметні скла, шліфоване скло для мазків. Інструменти стерилізували, операційне поле і руки готували як для операції. Голка Кассирського і шприц для аспірації повинні бути не тільки стерильні, але і сухі, так як інакше може статися гемоліз. Висушують їх безпосередньо перед пункцією промиванням спочатку спиртом, а потім ефіром.

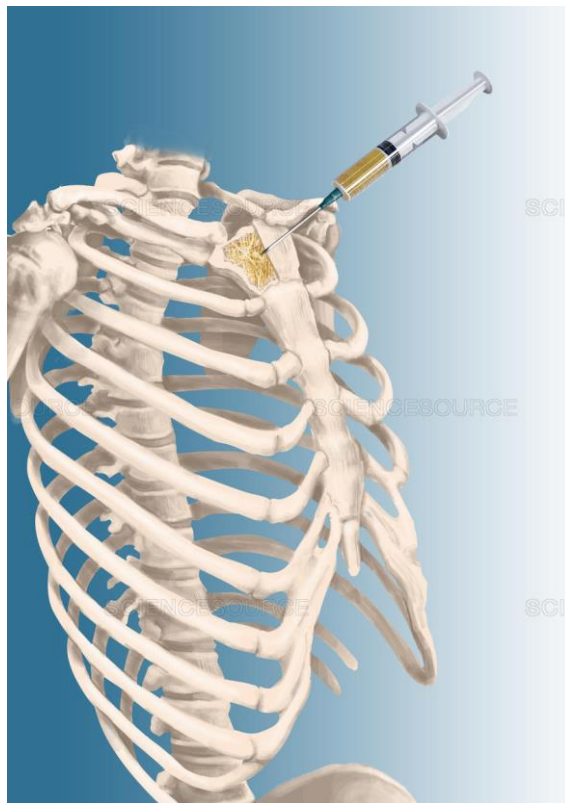


Рис.2.1. Здійснення пункції кісткового мозку людини

Пункцію здійснюють з грудини, або з клубової кістки. З грудини: хворого вкладають на спину на тверду низьку кушетку, сорочку знімають. Місце для пункції – тіло грудини на рівні третього міжребер'я по середній лінії або злегка відступаючи від середньої лінії вправо. Роблять відразу прокол шкіри і зовнішньої кісткової пластинки грудини; проходження голки через кісткову пластинку супроводжується характерним хрускотом і відчуттям подолання опору. Після цього мандрен витягають, а на голку насаджують шприц і всмоктують кістковий мозок. Аспірація відчувається хворим у формі несильного болю, що тягне. Отримавши пунктат (часто досить невеликиці), роблять мазки, а голку витягають. До місця проколу притискають ватяну кульку, просочену колодієм, роблять наклейку.

2.2. Матеріали та реагенти, які необхідні для дослідження

2.2.1. Витратні матеріали:

- ємності для дезінфекцій;
- 70% розчин етилового спирту;
- спиртові серветки;
- голка Кассирського;
- стерильні шприци;
- стерильні пробірки;
- шліфовані предметні скельця;
- жовті наконечники для автоматичної піпетки;
- стерильні і нестерильні рукавички;
- дистильована вода.

2.2.2 Реактиви

- етиловий спирт 96% (Сановет, Україна);
- барвник Май-Грюнвальда (Sigma, США);
- основний барвник Романовського-Гімза (Sigma, США);

- бензидин, чда (Україна);
- формалін 37%;
- перекис водню 3% (ТОВ Фармацевтична фабрика, Україна);
- нафтол AS-VI фосфат, 93%, 100мг (Acros organics, США);
- 1-Нафталеноцтова кислота натрієва сіль (Альфа-), 99%, 25 г (Sigma, США);
- міцний червоний TR сіль хемі(цинк хлорид) сіль, 25 г (Sigma, США);
- міцний синій RR сіль, 25 г (Sigma, США);
- парарозанілін розчин, 15 мл (Acros organics, США);
- натрію нітрит, розчин 40 wt. % в H₂O, 1 л;
- буферний розчин рН 5 (ацетатний буфер), 1 л (Acros organics, США);
- буферний розчин рН 8 (трис гідрохлорид 1М), 500 мл (Acros organics, США);
- фізіологічний розчин 0,9%, 500 мл (Hemofarm hospitalLogica, Сербія);
- середовище DMEM (Sigma, США);
- фетальна теляча сироватка (Sigma, США);
- L-глутамін (Sigma, США);
- рекомбінантний гранулоцитарно-макрофагальний фактор (Sigma, США);
- агар Difco (США);
- олія емерсійна кедрова, 100 мл (Cargille, США).

2.2.3. Лабораторний посуд

- пробірки Falcon 50 мл, нестерильні;
- автоматичні мікропіпетки (Gilson, Велика Британія; Transferpette, Германія);
- предметні скельця (Thermo scientific, США);

- покривні скельця (Sigma, США);
- контейнер для фіксації та забарвлення мазків;
- пробірки біологічні, з кришкою, нестерильні, 15 мл;
- пластикові наконечники для автоматичних дозаторів 10-100 мкл, 100-1000 мкл.

2.2.4. Обладнання

- камера Горяєва (ПАО «Склоприлад», Україна);
- інвертований мікроскоп (Olympus СК-2, Японія);
- світловий мікроскоп (Leica DMRB, Німеччина);
- цитоцентрифуга цитоспін (Shandon, США);
- холодильник (Атлант, Мінськ);
- ламінарний бокс (M. D. H. Intermed, Велика Британія);
- цифровий фотоапарат (Canon400D , Японія);
- витяжна шафа (Labcaire, США).

2.3. Техніка методу

2.3.1. Культивування клітин попередників кісткового мозку людини у *in vitro* напіврідкому агарі.

1. Кістковий мозок отримуємо у об'ємі 1 мл у пробірку із 100 мкл гепарину. Транспортуємо при температурі танучого льоду.

2. Додаємо до пробірки із кістковим мозком 3 мл PBS (попередньо запевнившись у його стерильності та відсутності контамінації).

3. У іншу пробірку наливаємо 3 мл Histopaque. Шприцом із товстою голкою відбираємо суспензію кісткового мозку та під кутом 45° повільно нашаровуємо її на Histopaque.

4. Центрифугуємо 30 хв за 2100 об/хв.

5. Центральне кільце клітин максимально знімаємо автоматичним дозатором.

6. Суспензію з клітин поміщуємо в пробірку для центрифугування.

7. Додаємо 5 мл PBS.
8. Центрифугуємо 10 хв при 1000 об/хв.
9. Супернатант зливаємо, осад ресуспендуємо у 5 мл PBS.
10. Процедуру відмивання клітин повторюємо 3 рази.
11. Після останнього центрифугування супернатант зливаємо, а осад ресуспендуємо у 1 мл середовища.
12. Рахуємо кількість мононуклеарів у камері Горяєва.
Кількість клітин у вихідній суспензії рахуємо за формулою:

$$N=a \times 5000$$

Де а – кількість мононуклеарів у 5 великих квадратах

13. Готуємо агар для культури *in vitro* (остаточна концентрація 0,33% , розведення у 10 разів – робоча концентрація, що додається до культури 3,3%):

$$\text{Кількість агару} = \frac{a \times 3,3}{100}$$

Де а – об'єм необхідний для виконання експерименту

Стандартні розрахунки :

- Бактоагар сухий - 0,165 г
- Вода для ін'єкцій - 5 мл

Приготування проводимо із дотримання умов стерильності

15. Проводимо розрахунки необхідного об'єму компонентів для культивування

2.3.2. Виявлення активності пероксидази методом Loele.

1. Беремо мазки і фіксуємо в парах 10% нейтрального формаліну 3 хв.
2. Готуємо інкубаційну суміш, робимо наважку бензидину 10г, додаємо до 40% спирту.

3. В інкубаційну суміш капаємо 20 мкл перекису водню. Після того як змішали швидко наносимо на мазок та чекаємо 6 хв, змиваємо дистильованою водою.

4. Готуємо барвник Романовського-Гімзи і наносимо на мазок на 25 сек, змиваємо.

5. Досліджуємо під мікроскопом. Під мікроскопом виявляються:

- Мієлоцити
- Промієлоцити
- Метамієлоцити
- Паличкаядерні та сегментоядерні нейтрофіли
- Еозинофіли

Не виявляються:

- Лімфоцити
- Еретробластний ряд
- Мегакаріоцити

2.3.3. Забарвлення культури за Папенгеймом.

1. Фіксуємо мазки у розчині Мей-Грюнвальда 30 сек, і додаємо воду не змиваючи розчин до 1 хв, змиваємо.

2. Наносимо барвник Романовського-Гімзи на 20-30 сек, якщо фіксацію проводили в метанолі то 1 етап пропускаємо.

Результати забарвлення мазків кісткового мозку:

- цитоплазма лімфоцитів забарвлюється в синьо-блакитний колір, їх ядра - в кольори від інтенсивно пурпурного до фіолетового;
- цитоплазма моноцитів забарвлюється в мутний блакитно-сірий колір, їх ядра - в світліший пурпурно-червоний, ніжна азурофільна зернистість;
- гранули базофілів забарвлюються в інтенсивний синьо-фіолетовий колір;
- гранули еозинофілів забарвлюються в оранжево-рожевий колір;

- гранули нейтрофілів забарвлюються в кольори від пурпурного до фіолетового;
- ядра лейкоцитів фіолетово-червоного кольору з добре видимою структурою хроматину; добре виділяються ядерця;
- тромбоцити забарвлюються в червоний;

2.3.4. Цитоспін центрифужний метод.

2.3.4.1. Принцип методу. В літературі цитологічні препарати «Цитоспін» застосовують в діагностиці різних захворювань. Цитоспіни можуть бути отримані з різних зразків, таких як мокрота, спинномозкова рідина та кістковий мозок. Центрифуга Цитоспін - це інструмент спеціального призначення, призначений для рівномірного нанесення клітин на предметне скло. При правильному використанні інструмент виробляє осадження моношарових клітин в певній частині предметного скла, використовуючи відцентрову силу. Цитологічні зразки також можуть бути нанесені на предметне скло такими методами, як пряме змазування, дотик або фільтрація. Препарат цитоспіна послідовно утворює однорідні препарати клітин, які легко забарвлюються і аналізуються. Основні вимоги полягають в тому, щоб зразок мав клітинну суспензію, переважно з окремих клітин, і щоб клітини були свіжими і неушкодженими, щоб їх можна було дослідити під мікроскопом.

2.3.4.2. Контроль якості і безпека. Всі зразки повинні бути оброблені з використанням універсальних запобіжних заходів для біологічної безпеки. PBS з додаванням FBS може бути джерелом контамінації. Необхідно подбати про те, щоб розчин PBS/FBS завжди оброблялося асептичною технікою. Свіжі реагенти слід використовувати і / або готувати кожен раз, коли готують препарати з цитоспіном. Предметні скельця повинні бути очищені 70% ізопропанолом і висушені на повітрі перед використанням. Картки фільтрів слід зберігати в сухому місці при кімнатній температурі. Фільтруючі воронки повинні бути очищені відразу після використання дезінфікуючих миючим

засобом, а також промиті і висушені перед наступним використанням. Метанол токсичний і вогненебезпечний і повинен зберігатися належним чином. Рекомендується, щоб збір зразків проводився відповідно до документа NCCLS M29T2. Жоден з відомих тестових зразків не може дати повної гарантії того, що зразки людського кісткового мозку не передаватимуть інфекцію. Тому всі похідні потенційно заразні. Завжди потрібно розпилювати спирт на ковпачки перед відкриттям розчинів. Спирт можна висушити за допомогою марлі. Якщо ви давно вийшли з боксу і наділи ту ж пару рукавичок, використовуйте нову пару рукавичок. Не можна торкатися піпеткою до бічних сторін (всередині або зовні) будь-яких пляшок - якщо ви це зробите, викидайте піпетку і почніть заново.

2.3.4.3 Процедура підготовки зразків кісткового мозку до центрифугування.

1. Як тільки буде отримано кількість клітин, об'єм зразка, що містить 1000-5000 клітин, буде вилучений із загальної клітинної суспензії вихідного зразка.

2. Клітини поміщають в PBS/FBS, 100-500 мкл. Іншими словами, використовуємо 100 мкл для кожних 10³ клітин. Аліквотуємо клітини в стерильну конічну пробірку, позначену номером або іншим ідентифікатором зразка.

3. Для кожного зразка виготовляються два цитологічних слайди. Кожен слайд коротко очистіть 70% ізопропіловим спиртом та позначаємо ідентифікатором зразка.

4. Зрівнюємо кожен слайд лицьовою стороною вгору з карткою фільтра і пластиковою лійкою (відкритим кінцем зверненим до міченого кінця слайда).

5. Вставте вузол в ковзний затиск і закрийте механізм. Рукоятка затиску повинна знаходитися на тому ж кінці, що і отвір воронки.

6. Зберіть камеру для зразків Цитоспін і обережно переверніть зразок і перенесіть не більше 0,5 мл зразка в кожен камеру для зразка. Дуже важливо, щоб зразок не стикався з предметним склом або фільтром до запуску.

7. Зразок центрифуги протягом 4 хвилин при 1000 об / хв, щоб забезпечити повне всмоктування рідини. (Pre-set Program 7)

8. Кладемо предметні скельця рівно, на вологопоглинаючий рушник; Залишаємо предметні скельця сохнути 2-24 години.

9. Коли предметні скельця висохли, фіксуємо та забарвлюємо препарат з Папенгейму, або іншим зручним методом.

РОЗДІЛ 3

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

3.1. Цитохімічні особливості гемопоетичних клітин у хворих на МДС

3.1.1. Виявлення активності пероксидази методом Loelle. Частковий дефіцит мієлопероксидази відзначений при ГМЛ, ХМЛ і також в деяких випадках рефрактерної анемії. У випадках рефрактерної анемії наявність часткового дефіциту мієлопероксидази вказує на високий ризик розвитку гострого мієлоїдного лейкозу. Виявлено частковий дефіцит мієлопероксидази в випадках рефрактерної анемії та контрольній групі, хоча частковий дефіцит мієлопероксидази раніше відзначався рідко у нормальних людей. Тому можна зробити висновок, що частота або кількість (або обидва) часткового дефіциту мієлопероксидази в нейтрофілах не допомагають діагностувати або класифікувати МДС, за винятком виявлення випадків рефрактерної анемії з надлишком бластів при переході з рідкісними тілами Ауера і менше 20%.

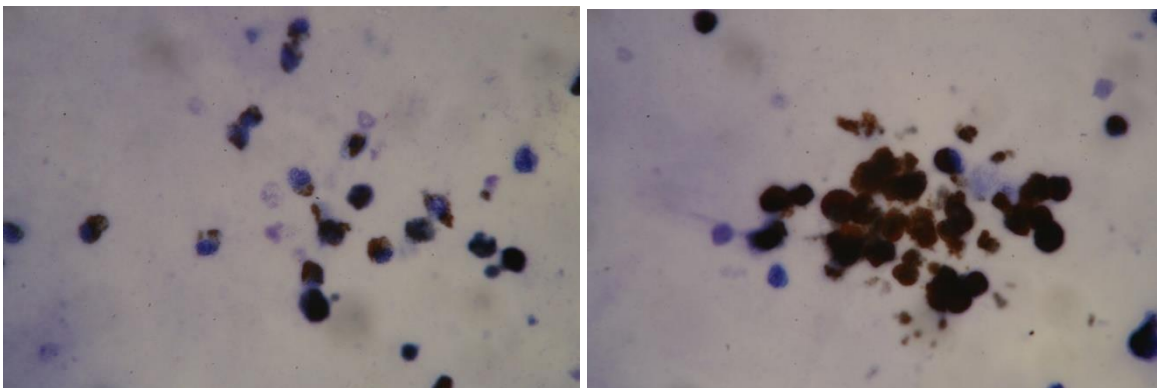


Рис. 3.1 Ферментативна активність мієлопероксидази гемопоетичних клітин-попередників хворих на МДС РАНБ-I.

3.1.2. Аналіз цитоцентрифужних препаратів кісткового мозку

. Зразки очищували 3 рази на центрифугузі, під час підготовки до культивування, цитоцентрифугували (5хв при 500 об/хв) на предметному склі, забарвлювали методом Мей-Грюнвальд Гімза по Романовському. Цитологічний аналіз проводили з використанням світлового мікроскопа з об'єктивом $\times 100$.

В результаті цитологічного аналізу в 15 пацієнтів були виявленні бласти, що характерно для РАНБ-I та РАНБ-II. Також виявленні більш рідкісні кільцеві сидеробласти у одного пацієнта.

3.2. Оцінка колонієутворюючої здатності клітин кісткового мозку хворих на МДС

Досліджували зразки кісткового мозку 23 хворих на мієлодиспластичний синдром – рефрактерну анемію з надлишком бластів I (РАНБ I і РАНБ II). Середній вік пацієнтів становив 68 років, серед яких було 10 чоловіків та 13 жінок. Діагноз встановлювався на підставі обов'язкових лабораторних досліджень відповідно до міжнародної статистичної класифікації захворювань 10-го перегляду (з уточненням від 2008 р.). Матеріал отримували шляхом взяття стерильної пункції голкою Касирського. Зразки кістковомозкових клітин розводили у співвідношенні 1:3 з PBS (Sigma, США), нашаровували на 3мл градієнта щільності Histopaque (Gibco, США) (1,077 г/мл) та центрифугували протягом 30 хв при 740 g. Відбирали за допомогою автоматичної піпетки кільце мононуклеарів та тричі відмивали у PBS (Sigma, США) протягом 10 хв при 430 g. Далі очищені клітини ресуспендували у 1мл середовища та здійснювали підрахунок їх кількості меланжерним методом за допомогою камери Горяєва при збільшенні x200.

На наступному етапі проводили культивування гемопоетичних клітин-попередників у середовищі DMEM (Sigma, США) з додаванням 20% FBS (Sigma, США), 1% антибіотиків (пеніцилін/стрептоміцин) та L-глутаміну (Sigma, США), 50 нг гранулоцитарно-макрофагального колонієстимулюючого фактору (PeproTech, США) та 3,3% агару (Difco, США) протягом 14 днів за умов абсолютної вологості, 37⁰C та 5% CO₂. Отримані клітинні агрегати аналізували під інвертованим мікроскопом (Olympus CK-2, Японія) з подальшим виділенням окремих колоній, їх забарвленням за Паппенгеймом, а при наявності жироподібних включень – Суданом чорним Б.

Суспензії кісткового мозку обробляли моноклональними антитілами CD34 та CD117 і піддавали дослідженню на проточному цитофлюориметрі (Becton Dickinson, USA) для виявлення експресії маркерів на поверхні гемопоетичних клітин.

3.2.1 Група пацієнтів хворих на МДС. Було проаналізовано 15 зразків кісткового мозку пацієнтів з мієлодиспластичним синдромом, а саме рефрактерною анемією з надлишком бластів I, для виявлення їх морфофункціональних особливостей в умовах *in vitro*.

Серед морфологічних типів колоній-клонів у культурі вирізняли дифузні, компактні та компактні з «вінчиком». Перший тип характеризувався наявністю центрального скупчення морфологічно гетерогенних клітин у колонії та так званим «вінчиком» навколо неї. Другий – вирізнявся дифузним типом розміщення клітин. Третій тип колоній компактним розміщенням клітин відносно одна одної у агрегаті.

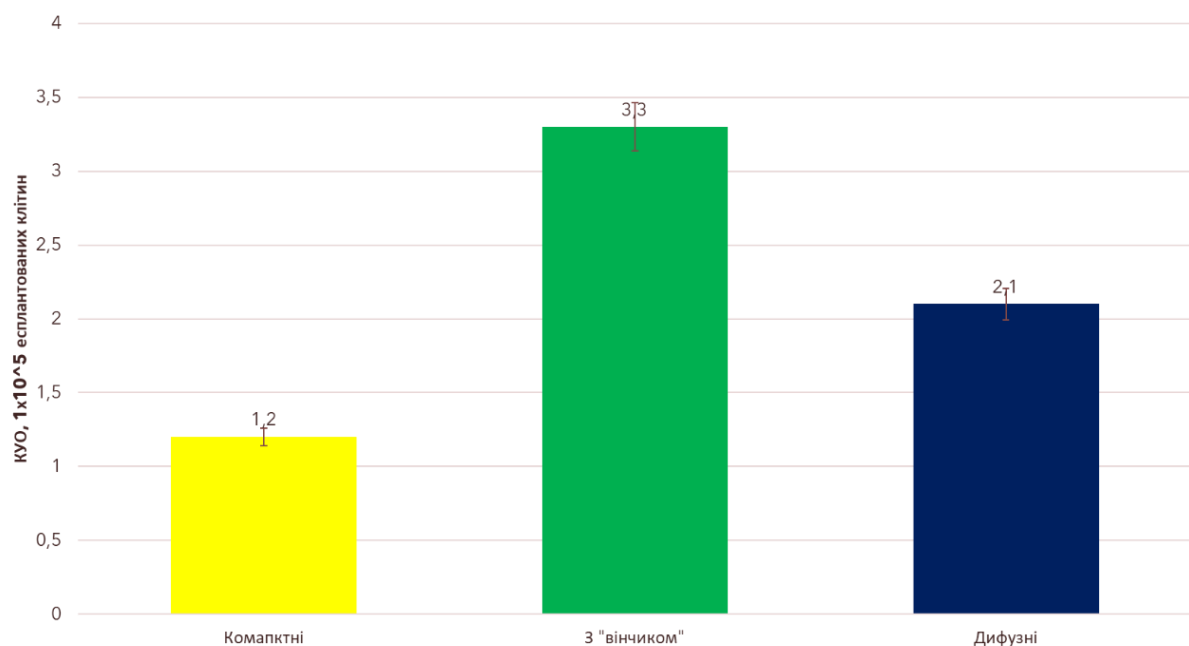


Рис. 3.2 Типи колоній утворених в результаті культивування та їх референтна колонієутворююча здатність.

У пацієнтів з МДС РАНБ I колонієутворююча здатність кісткового мозку виявилася зниженою – $5,1 \pm 2,3$ у порівнянні з нормою, яка дорівнювала 38,6

$\pm 1,2$ на 1×10^5 експлантованих клітин. Різниця статистично достовірна, $p < 0,05$. Визначали компактні ($1,0 \pm 0,2$), компактні з «вінчиком» ($3,0 \pm 1,2$) та дифузні ($2,0 \pm 1,1$) колонії на 1×10^5 експлантованих клітин (рис.3.3.).

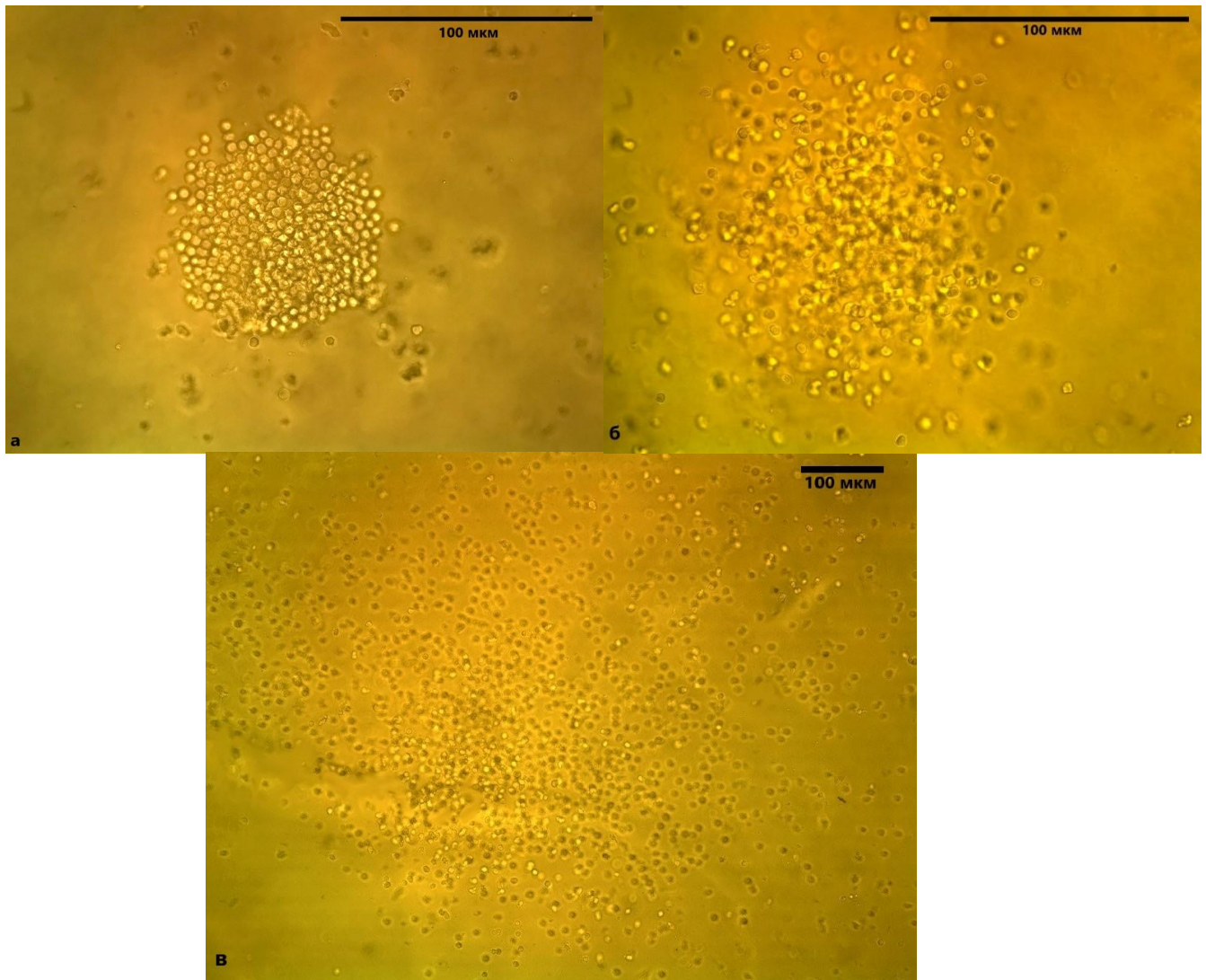


Рис. 3.3. Колонії гемопоетичних клітин-попередників у культурі з напіврідким агаром кісткового мозку при МДС. а – компактного типу; б – компактна з «вінчиком»; в – дифузного типу. 14 день культивування. Інвертований мікроскоп. Збільшення: а, б – $\times 200$, в – $\times 100$.

Щодо кластероутворення, встановлено що їх кількість була значно зниженою у порівнянні з нормою, і дорівнювала $9,2 \pm 2,1$ та $65,1 \pm 3,5$ на 1×10^5 експлантованих клітин відповідно (рис.3.4.).

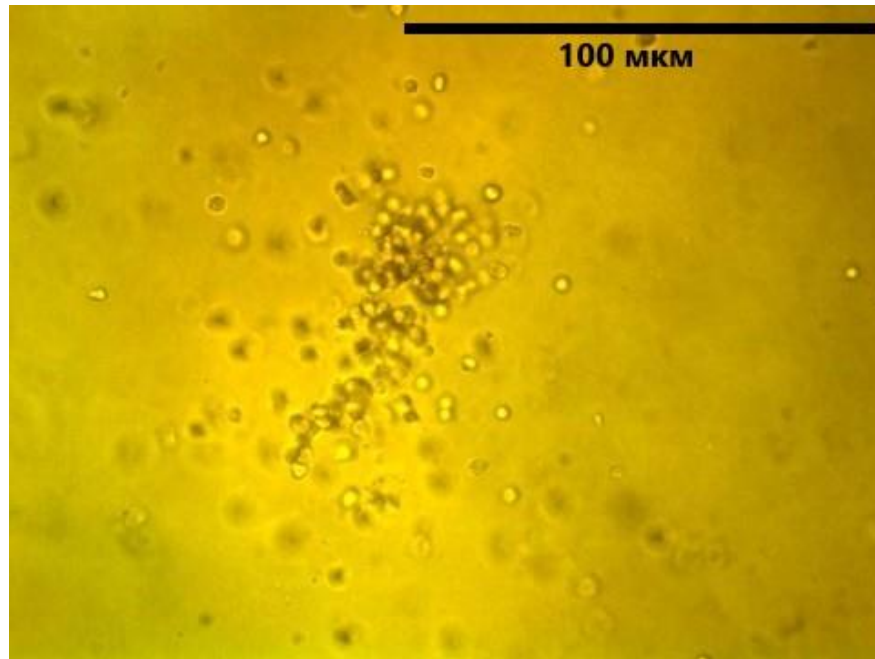


Рис. 3.4. Кластер гемопоетичних клітин-попередників у культурі з напіврідким агаром кісткового мозку при МДС, 14 день культивування. Інвертований мікроскоп. Збільшення $\times 200$.

Також було помічено, що деякі з отриманих агрегатів характеризувалися морфологічними особливостями, так деякі клітини у їх складі мали фібробластоподібну форму, поверх яких розміщувалися гемопоетичні клітини округлої форми (рис. 3.5.). Такі колонії у невеликій кількості ($1,0 \pm 0,1$ на 1×10^5 експлантованих клітин) спостерігалися у культивованих зразках кісткового мозку усіх пацієнтів.

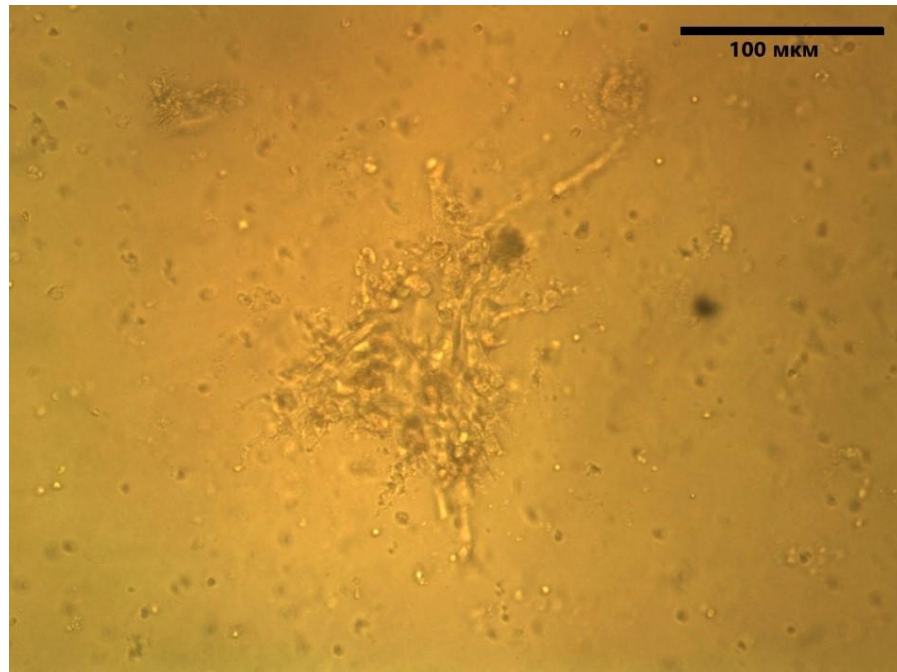


Рис. 3.5. Колонія фібробластоподібних клітин у культурі з напіврідким агаром кісткового мозку при МДС на 14-й день культивування. Інвертований мікроскоп. Збільшення $\times 200$.

3.2.2. Порівняльна морфофункціональна характеристика груп хворих на МДС та ХМЛ у культурі *in vitro*. В результаті дослідження було виявлено, що зразки кісткового мозку пацієнтів з мієлодиспластичним синдромом (РАНБ I) володіли значно зниженою колонієутворюючою здатністю ($2,4 \pm 0,3$ на 1×10^5 експлантованих клітин). Отримані клітинні агрегати мали химерну форму, а також вміщували на своїй поверхні фібробластоподібні клітини або жирові краплі. У культурі клітин кісткового мозку пацієнтів з ХМЛ спостерігалася підвищена кількість колоній правильної форми та складу ($86,5 \pm 2,1$ на 1×10^5 експлантованих клітин). Як контроль використовували зразки кісткового мозку, вилученого з фрагментів ребер, отриманих при операції торакотомії ($38,6 \pm 3,4$ на 1×10^5 експлантованих клітин).

Отже, шляхом порівняльної оцінки колонієутворюючої здатності гемопоетичних клітин-попередників кісткового мозку пацієнтів з МДС та ХМЛ, було виявлено, що у першому випадку спостерігається значне пригнічення колонієутворюючої здатності та поява абнормальних форм

клітинних агрегатів, у другому випадку – підвищений потенціал до утворення колоній класичної форми. Незважаючи на те, що обидва захворювання є клональними, і в їх основі лежить трансформація гемопоетичних стовбурових клітин, механізми кон'юкції патологічного процесу в них різні, що відображається на рівні гемопоетичних клітин-попередників.

3.2.3. Група хворих з трансформацією МДС у ГМЛ. Спостереження за хворими протягом 2 років показало, що за цей час у 3 з 5 хворих з високими показниками коекспресії маркерів CD34 та CD117 відбулася трансформація у ГМЛ. Наші дані співставні з результатами досліджень De Smet et al. [54], які визначали коекспресію маркерів CD34 та CD117 у осіб з високим ризиком трансформації МДС у ГМЛ.

В культурі з напіврідким агаром виявляли колонії, розмір яких сягав 40 і більше клітин і кластери з різною кількістю клітин в діапазоні – від 3 до 39. Проводили порівняння зі зразками здорового кісткового мозку ребер людини, колонієутворююча здатність яких дорівнювала $39,7 \pm 3,4$ на 1×10^5 експлантованих клітин, на відміну від патологічного матеріалу – $4,6 \pm 1,3$ на 1×10^5 експлантованих клітин.

Дослідженням колонієутворюючої здатності зразків хворих на МДС у культурі клітин *in vitro* було виявлено 5 морфологічних типів колоній (рис.3.6.). До першого типу належали дифузні колонії, які склалися з великих клітин, поодинокі розташованих у шарах напіврідкого агару ($0,6 \pm 0,02$ на 1×10^5 експлантованих клітин). До другого – компактного типу з дрібних, розташованих одна біля одної клітин ($1,1 \pm 0,2$ на 1×10^5 експлантованих клітин). До третього – компактні з «вінчиком», які налічували дрібні клітини у центрі та дещо більші, нещільно розташовані на периферії ($3,2 \pm 0,4$ на 1×10^5 експлантованих клітин). До четвертого типу належали колонії з фібробластоподібних клітин, які мали неправильну форму ($1,2 \pm 0,1$ на 1×10^5 експлантованих клітин). До п'ятого типу належали колонії зміненої форми з жироподібними включеннями на своїй поверхні ($3,2 \pm 0,8$ на 1×10^5

експлантованих клітин), що були виявлені лише у 5 пацієнтів (рис. 3.7.). Їх належність до жирових структур доведено забарвленням Суданом чорним Б.

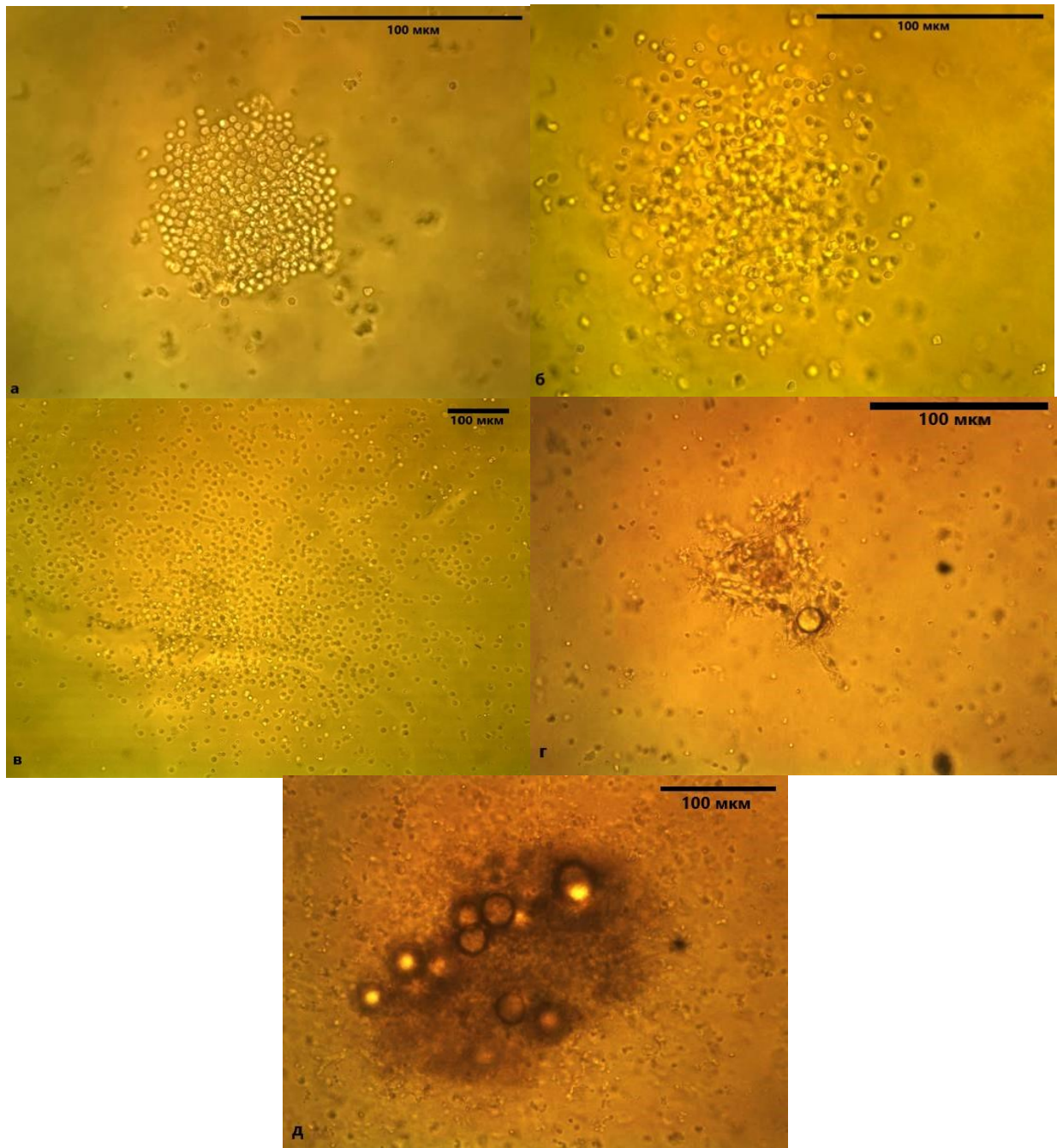


Рис.3.6. Колонії гемопоетичних клітин-попередників у культурі кісткового мозку хворих на МДС. а – колонія компактного типу; б – компактна з «вінчиком»; в – дифузна; г – з фібробластоподібних клітин; д – клітинні агрегати з жировими включеннями на поверхні. Інвертований мікроскоп. Збільшення x200.

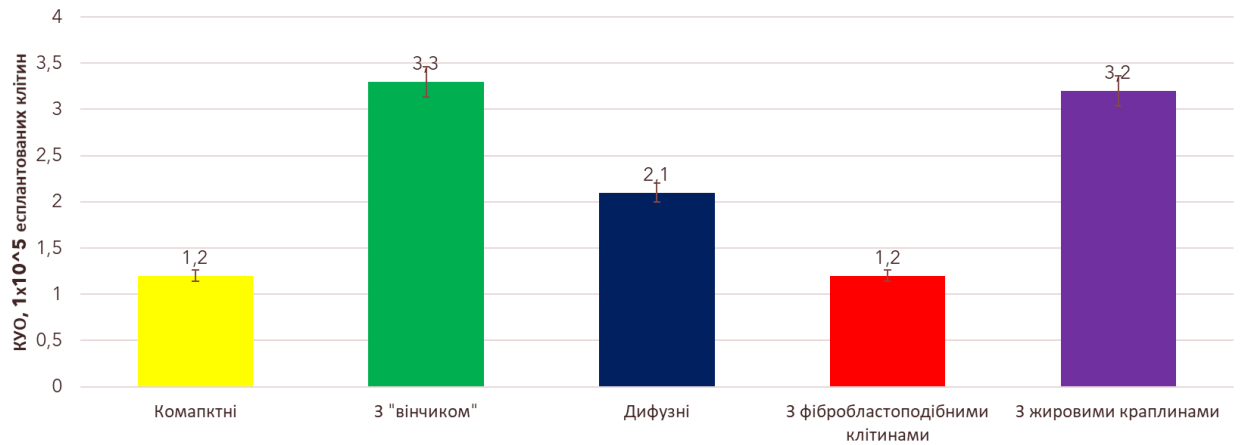


Рис. 3.7. Типи клітинних агрегатів, утворених у результаті культивування та їх колонієутворююча здатність.

При аналізі морфологічного складу клітин колоній, встановлено, що компактні колонії склалися з гранулоцитів різного ступеня зрілості, дифузні – з макрофагів, компактні з вінчиком були змішаними (рис.3.8.).

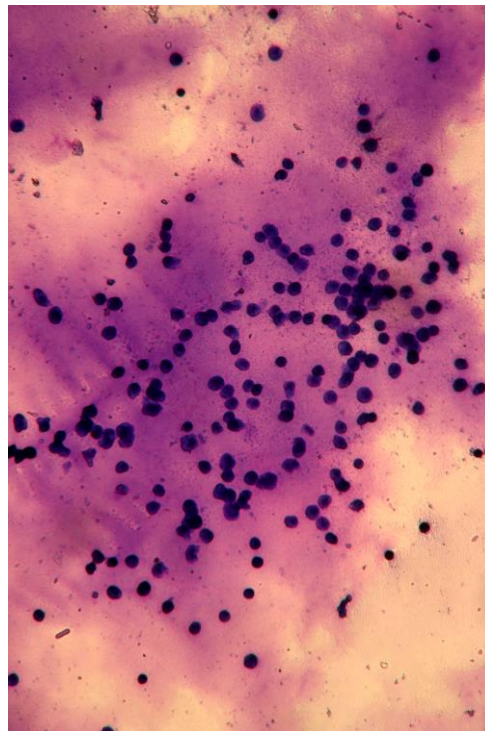


Рис.3.8. Морфологічний склад компактної з «вінчиком» колонії клітин-попередників кісткового мозку хворих на МДС. Збільшення x100.

Також важливо зазначити, що у групі пацієнтів з підвищеним ризиком трансформації у ГМЛ в культурі кісткового мозку з напіврідким агаром спостерігали абнормальні форми колоній з жировими включеннями на поверхні та без них та поодинокі групи зруйнованих клітин, що може знаходити пояснення у схильності культивованих злоякісних клітин до апоптозу. Нещодавно в науковій літературі з'явилися дані про особливу роль адипоцитів і жирових включень у формуванні мікрооточення при лейкемічному процесі. Згідно з даними Tabe et al. [70] клітини ГМЛ у безперервний спосіб модулюють свій метаболічний стан в результаті стимулів мікрооточення кісткового мозку (БМ) і/або наявності поживних речовин. Адипоцити поширені в мікрооточенні кісткового мозку і їх кількість з віком збільшується. ГМЛ у літніх пацієнтів викликає ремоделювання і ліполіз адипоцитів кісткового мозку, що може сприяти виживанню клітин ГМЛ шляхом метаболічної активації окислення жирних кислот. Реакції окислення жирних кислот генерують Ацетилкофермент А з жирних кислот в аеробних умовах і при певних умовах можуть викликати роз'єднання мітохондріального окисного фосфорилування. Недавні експериментальні дані вказують на те, що окислення жирних кислот пов'язане з спокоєм і лікарською стійкістю в стовбурових клітинах лейкемії. Отримані нами дані мікроскопічного дослідження культур кістковомозкових клітин хворих на МДС з трансформацією у ГМЛ цілком підтверджують вищенаведене твердження.

3.2.4. Особливості морфології утворених колоній при культивуванні *in vitro* клітин-попередників кісткового мозку при МДС. При цитологічному аналізі утворених клітинних агрегатів було виявлено наступні типи колоній: компактні, компактні з вінчиком, дифузні, колонії з фібробластоподібними клітинами та колонії зміненої форми з жироподібними включеннями на своїй поверхні.

Багато з отриманих колоній складаються з суміші зрілих міелоїдних клітин (еритроїдних і гранулоцитарно-макрофагальних). Пізніші експерименти показали, що клітини, які продукують колонії, походять від

клітин, які також можуть продукувати лімфоїдні клітини, що підтверджує виживаність у хворих на МДС окремих клітин з усіма цими можливостями диференціювання.

Щодо складу колоній, то компактні складаються із гранулоцитів (базофіли, нейтрофіли, еозинофіли), компактні з вінчиком або змішані колонії містять гранулоцити з макрофагами. Дифузні в свою чергу складаються в основному з макрофагів, і їх ж можна назвати останньою стадією колонієутворення. Також були виявлені колонії з фібробластоподібними клітинами, згідно досліджень Zhang et al. [71] їхня проліферативна здатність та кількість була подібна до зразків кісткового мозку здорової людини, але все ж нижча, тож можна зробити висновок, що біологічні характеристики мезенхімальних стовбурових клітини хворих на МДС та здорових людей суттєво не відрізняються.

В двох зразках були виявлені колонії з адипоцитами, що знаходилися на їх поверхні, як видно на рис. 3.9. Згідно останніх досліджень Flores-Figueroa et al. [72] роль адипоцитів в утворенні мікроотчення кісткового мозку хворих на МДС недооцінена, тож подальші дослідження проллють світло на вплив адипоцитів в лейкогенезі.

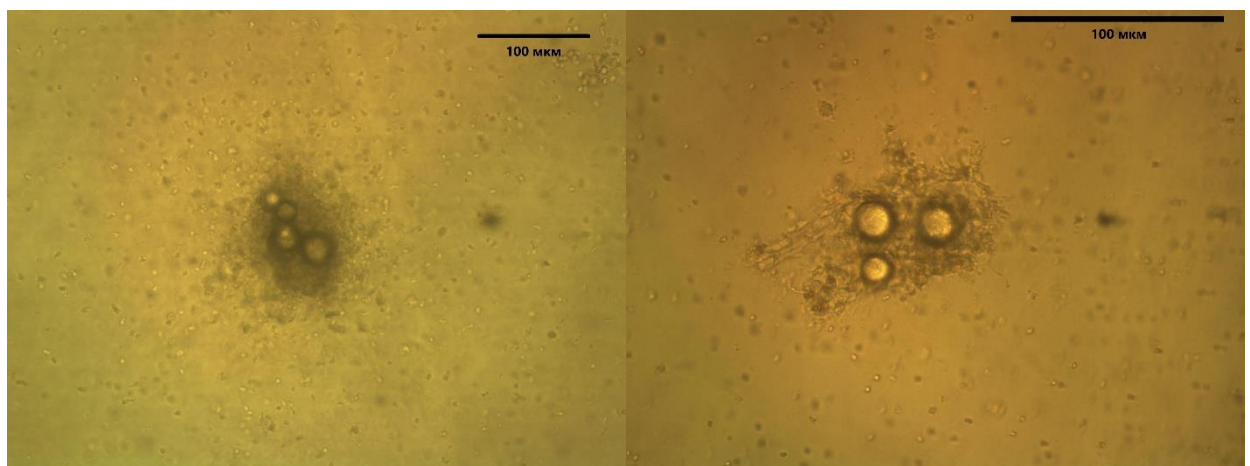


Рис. 3.9. Колонії з жировими включеннями на поверхні у культурі з напіврідким агаром кісткового мозку при МДС на 14-й день культивування. Інвертований мікроскоп. Збільшення x200.

Кількість і типи зрілих і клітин-попередників, присутніх в окремих колоніях широко і незалежно розрізняються. Ця різноманітна поведінка привела до концепції стохастичних змінних, що лежать в основі типу нащадків, що генеруються окремими гемопоетичними клітинами-попередниками.

Більшість клітин у кістковому мозку, які утворюють ці колонії, знаходяться в стані спокою (або в стані G0). Таким чином, при відсутності якого-небудь незвичайного впливу вони стійкі до лікарських препаратів або інших методів лікування, які конкретно націлені на клітини-попередники кісткового мозку.

УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ

Незважаючи на безліч спроб з'ясувати механізм трансформації клітин-попередників в лейкемічну клітину при МДС, він досі залишається нез'ясованим, тому було проведено дослідження поведінки гемопоетичних клітин-попередників у культурі *in vitro*, як з прогностичною метою, так і для з'ясування ролі ГСК у мієлопроліферативному процесі.

Було показано, що клітини кісткового мозку при МДС мають значно знижену здатність до колоніє- та кластероутворення, а деякі утворені клітинні агрегати вирізняються аномальною формою та наявністю фібробластоподібних клітин у їх складі [67]. Причина неефективного гемопоезу, що супроводжується цитопенією за всіма гілками кровотворення, може бути пов'язана з трансформацією гемопоетичної стовбурової клітини та її найближчих нащадків [68]. Трансформація плюрипотентної стовбурової клітини, яка на рівні попередників характеризується низькою колонієутворюючою і кластероутворюючою здатністю КМ при МДС є однією з причин неефективного гемопоезу, який супроводжується цитопенією за всіма гілками кровотворення. Окремими дослідженнями показано знижену здатність до колонієутворення у культурі при МДС зі збереженням кластероутворюючої функції. За останніми дослідженнями визначено є факт, що при МДС пригнічується функція як самих клітин-попередників гемопоезу, так і їх мікрооточення, що частково може пояснюватися збільшеною кількістю адипоцитів в мікрооточенні кісткового мозку. Саме з цими причинами пов'язують знижену здатність до росту у культурі з напіврідкого агару гемопоетичних клітин-попередників кісткового мозку.

За останніми даними, пацієнтів з МДС розділяють на дві категорії – з високим на низьким ризиком переходу у гостру мієлоїдну лейкемію [69]. За нашими спостереженнями, підвищена кількість колонієутворюючих одиниць супроводжується змінами у морфології клітин, які формують клони. Цей процес відображається на рівні морфологічно ідентифікованих клітин

порушеннями у процесах диференціювання, що виражається у збільшенні кількості бластних форм у мієлограмі пацієнтів.

Наявність жирових включень, виявлених у культурі кісткового мозку з напіврідким агаром у хворих на МДС з трансформацією у ГМЛ поряд з іншими наведеними ознаками, свідчить про роль жирового сектора у формуванні мікрооточення при злоякісному процесі та його підтримуючої здатності лейкемічних стовбурових клітин, яку раніше не брали до уваги [70]. Подальші дослідження в цьому напрямку на молекулярному рівні безсумнівно проллють світло на внесок адипоцитів і жирових включень у механізм лейкозогенезу.

Було виявлено, що у пацієнтів з високим ризиком трансформації в ГМЛ наявні маркери CD34 та CD 117, що в свою чергу корелює з низькою здатністю до колонієутворення та наявністю клітинних агрегатів з жировими включеннями на їх поверхні. В поєднанні ці дві ознаки дають часткове пояснення причин високого ризику трансформації в ГМЛ, а також можуть бути засобом прогнозування ризику трансформації в МДС у ГМЛ.

ВИСНОВКИ

1. Встановлено, що гемопоетичні клітини-попередники пацієнтів з мієлодиспластичним синдромом володіють зниженою здатністю до колоніє- та кластероутворення – $5,1 \pm 2,3$ та $9,2 \pm 2,1$ на 1×10^5 експлантованих клітин у порівнянні з контролем – $38,6 \pm 1,2$ та $64,3 \pm 2,6$ на 1×10^5 експлантованих клітин відповідно.

2. У результаті культивування зразків кісткового мозку хворих на МДС було виявлено агрегати з фібробластоподібних клітин у кількості $1,2 \pm 0,1$ на 1×10^5 експлантованих клітин.

3. У невеликої групи пацієнтів виявлено появу колоній-клонів з жироподібними включеннями на їх поверхні у кількості $3,2 \pm 0,8$ на 1×10^5 експлантованих клітин.

4. Помічено, що високий ризик трансформації у ГМЛ супроводжувався пригніченим колонієутворенням з появою жирових включень на поверхні клітинних агрегатів та прямо корелював з наявністю молекулярних маркерів CD34 та CD117.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Cazzola M, Della Porta MG, Malcovati L. The genetic basis of myelodysplasia and its clinical relevance., *Blood*, 2013, vol. 122 25(pg. 4021-4034)
2. Garcia-Manero G. Myelodysplastic syndromes: 2014 update on diagnosis, risk-stratification, and management., *Am J Hematol*, 2014, vol. 89 1(pg. 97-108)
3. Gangat, N., Patnaik, M.M. and Tefferi, A. Myelodysplastic syndromes: Contemporary review and how we treat. *Am. J. Hematol.* 2016, vol 91: 76-89
4. Tefferi A, Vardiman JW. Myelodysplastic syndromes., *N Engl J Med*, 2009, vol. 361 19 (pg. 1872-1885)
5. Vardiman JW, Thiele J, Arber DA, et al. The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes., *Blood*, 2009, vol. 114 5 pg. 937-951
6. Walter MJ, Shen D, Ding L, et al. Clonal architecture of secondary acute myeloid leukemia., *N Engl J Med*, 2012, vol. 366 12(pg. 1090-1098)
7. National cancer Institute SEER cancer statistics review, 1975-2013: Myelodysplastic Syndromes (MDS), Chronic Myeloproliferative Disorders (CMD), and Chronic Myelomonocytic Leukemia (CMML). 2016.
8. Valent P, Bain BJ, Bennett JM, et al. Idiopathic cytopenia of undetermined significance (ICUS) and idiopathic dysplasia of uncertain significance (IDUS), and their distinction from low risk MDS., *Leuk Res*, 2012, vol. 36 1(pg. 1-5)
9. Jacobs KB, Yeager M, Zhou W, et al. Detectable clonal mosaicism and its relationship to aging and cancer., *Nat Genet*, 2012, vol. 44 6(pg. 651-658)
10. Laurie CC, Laurie CA, Rice K, et al. Detectable clonal mosaicism from birth to old age and its relationship to cancer., *Nat Genet*, 2012, vol. 44 6(pg. 642-650)

11. Holstege H, Pfeiffer W, Sie D, et al. Somatic mutations found in the healthy blood compartment of a 115-yr-old woman demonstrate oligoclonal hematopoiesis., *Genome Res*, 2014, vol. 24 5(pg. 733-742)
12. S. B. Keel, A. Scott, M. Sanchez-Bonilla, Genetic features of myelodysplastic syndrome and aplastic anemia in pediatric and young adult patients *Haematologica* Nov 2016, 101 (11) 1343-1350
13. The genetics of myelodysplastic syndrome: from clonal haematopoiesis to secondary leukaemia. Sperling AS, Gibson CJ, Ebert BL *Nat Rev Cancer*. 2017 Jan; 17(1):5-19.
14. Molecular mechanisms involved in the progression of myelodysplastic syndrome. Nolte F, Hofmann WK *Future Oncol*. 2010 Mar; 6(3):445-55.
15. Gangat, N, Mudireddy, M, Lasho, TL, et al. Mutations and prognosis in myelodysplastic syndromes: karyotype-adjusted analysis of targeted sequencing in 300 consecutive cases and development of a genetic risk model. *Am J Hematol*. 2018; 93: 961– 697.
16. Molecular mechanisms involved in the progression of myelodysplastic syndrome. Nolte F, Hofmann WK *Future Oncol*. 2010 Mar; 6(3):445-55.
17. Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, Thiele J, Borowitz MJ, Le Beau MM, Bloomfield CD, Cazzola M, Vardiman The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *JW Blood*. 2016 May 19; 127(20):2391-405.
18. Two splice-factor mutant leukemia subgroups uncovered at the boundaries of MDS and AML using combined gene expression and DNA-methylation profiling. Taskesen E, Havermans M, van Lom K, Sanders MA, van Norden Y, Bindels E, Hoogenboezem R, Reinders MJ, Figueroa ME, Valk PJ, Löwenberg B, Melnick A, Delwel R *Blood*. 2014 May 22; 123(21):3327-35.
19. Hong M, He G. The 2016 Revision to the World Health Organization Classification of Myelodysplastic Syndromes. *J Transl Int Med*. 2017;5(3):139-143. Published 2017

20. G.J. Mufti, J. M. Bennett, J. Goasguen, Diagnosis and classification of myelodysplastic syndrome: International Working Group on Morphology of myelodysplastic syndrome (IWGM-MDS) consensus proposals for the definition and enumeration of myeloblasts and ring sideroblasts, *Haematologica* Nov 2008, 93 (11) 1712-1717
21. Robert B. Howe, Anna Porwit-MacDonald, Robert Wanat, Ramin Tehranchi, Eva Hellström-Lindberg; The WHO classification of MDS does make a difference. *Blood* 2004; 103 (9): 3265–3270
22. P, Horny HP, Bennett JM, Fonatsch C, Definitions and standards in the diagnosis and treatment of the myelodysplastic syndromes: Consensus statements and report from a working conference. *Valent, Leuk Res.* 2007 Jun; 31(6):727-36.
23. Germing U, Kobbe G, Haas R, Gattermann N. Myelodysplastic syndromes: diagnosis, prognosis, and treatment. *Dtsch Arztebl Int.* 2013;110(46):783-790. doi:10.3238/arztebl.2013.0783
24. Mufti, G.J., McLornan, D.P., van de Loosdrecht, A.A. et al. Diagnostic algorithm for lower-risk myelodysplastic syndromes. *Leukemia* 32, 1679–1696 (2018)
25. Cheng J.X., Vardiman J.W. Myelodysplastic Syndromes. In: Wang E., Lagoo A. (eds) *Practical Lymph Node and Bone Marrow Pathology. Practical Anatomic Pathology* (2020) pp 531-557
26. Elnahass Y, Youssif L J, Cytogenetic features in primary myelodysplastic syndrome Egyptian patients. *Adv Res.* 2018 Mar; 10():77-83
27. Rangel-Pozzo, A.; de Souza, D.C.; Schmid-Braz, A.T.; Azambuja, A.P.; Ferraz-Aguiar, T.; Borgonovo, T.; Mai, S. 3D Telomere Structure Analysis to Detect Genomic Instability and Cytogenetic Evolution in Myelodysplastic Syndromes. *Cells* 2019, 8, 304
28. Zahid MF, Malik UA, Sohail M, Hassan IN, Ali S, Shaukat MHS. Cytogenetic Abnormalities in Myelodysplastic Syndromes: An Overview. *Int J Hematol Oncol Stem Cell Res.* 2017;11(3):231-239.

29. Jerez A, Gondek LP, Jankowska AM, et al. Topography, clinical, and genomic correlates of 5q myeloid malignancies revisited. *J Clin Oncol.* 2012;30(12):1343–9
30. McNerney ME, Brown CD, Wang X, et al. CUX1 is a haploinsufficient tumor suppressor gene on chromosome 7 frequently inactivated in acute myeloid leukemia. *Blood.* 2013;121(6):975–83.
31. Gadji, M, Pozzo, AR. From cellular morphology to molecular and epigenetic anomalies of myelodysplastic syndromes. *Genes Chromosomes Cancer.* 2019; 58: 58: 474– 483
32. Abbas S, Kini A, Srivastava VM et al (2017) Coexistence of aberrant hematopoietic and stromal elements in myelodysplastic syndromes. *Blood Cells Mol Dis* 66:37–46
33. Pang WW, Pluvinage JV, Price EA, et al. . Hematopoietic stem cell and progenitor cell mechanisms in myelodysplastic syndromes. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2013;110(8):3011-3016
34. Sperling AS, Gibson CJ, Ebert BL. The genetics of myelodysplastic syndrome: from clonal haematopoiesis to secondary leukaemia. *Nat Rev Cancer.* 2017;17(1):5-19
35. A. Shastri, B. Will, U. Steidl, A. Verma; Stem and progenitor cell alterations in myelodysplastic syndromes. *Blood* 2017; 129 (12): 1586–1594.
36. Masala E, Valencia-Martinez A, Pillozzi S, et al. Severe hypoxia selects hematopoietic progenitors with stem cell potential from primary Myelodysplastic syndrome bone marrow cell cultures. *Oncotarget.* 2018;9(12):10561-10571. Published 2018 Jan 24.
37. V. Chesnais, M.L. Arcangeli, C. Delette; Architectural and functional heterogeneity of hematopoietic stem/progenitor cells in non-del(5q) myelodysplastic syndromes. *Blood* 2017; 129 (4): 484–496
38. Will B, Vogler TO, Narayanagari S, et al. . Minimal PU.1 reduction induces a preleukemic state and promotes development of acute myeloid leukemia. *Nat Med.* 2015;21(10):1172-1181.

39. Rouault-Pierre K, Smith AE, Mian SA, et al. Myelodysplastic syndrome can propagate from the multipotent progenitor compartment. *Haematologica*. 2017;102(1):e7-e10.
40. Zhao JL, Starczynowski DT. Role of microRNA-146a in normal and malignant hematopoietic stem cell function. *Front Genet*. 2014;5:219.
41. Schinke C, Giricz O, Li W, et al. . IL8-CXCR2 pathway inhibition as a therapeutic strategy against MDS and AML stem cells. *Blood*. 2015;125(20):3144-3152.
42. Bejar R. What biologic factors predict for transformation to AML? *Best Pract Res Clin Haematol*. 2018;31(4):341–5.
43. Yu, J., Li, Y., Li, T. et al. Gene mutational analysis by NGS and its clinical significance in patients with myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukemia. *Exp Hematol Oncol* 9, 2 (2020).
44. Imperato MR, Cauchy P, Obier N, Bonifer C. The RUNX1-PU.1 axis in the control of hematopoiesis. *Int J Hematol*. 2015;101:319–29.
45. Kwok B, Hall JM, Witte JS, Xu Y, Reddy P, Lin K, et al. MDS-associated somatic mutations and clonal hematopoiesis are common in idiopathic cytopenias of undetermined significance. *Blood*. 2015;126:2355–61.
46. Stengel A, Kern W, Meggendorfer M, Nadarajah N, Perglerova K, Haferlach T, et al. Number of RUNX1 mutations, wild-type allele loss and additional mutations impact on prognosis in adult RUNX1-mutated AML. *Leukemia*. 2018;32:295–302.
47. Chen J, Kao YR, Sun D, et al. Myelodysplastic syndrome progression to acute myeloid leukemia at the stem cell level. *Nature Medicine*. 2019 Jan;25(1):103-110.
48. Hussaini MO, Mirza AS, Komrokji R, et al. Genetic landscape of acute myeloid leukemia interrogated by next-generation sequencing: a large cancer center experience. *Cancer Genomics Proteomics*. 2018;15:121–6.
49. Haferlach T, Nagata Y, Grossmann V, et al. Landscape of genetic lesions in 944 patients with myelodysplastic syndromes. *Leukemia*. 2014;28:241–7.

50. Iqbal, S. M., Aslam, H. M., Faizee, F., Qadir, S., & Waheed, S. (2018). Pseudogout: An Autoimmune Paraneoplastic Manifestation of Myelodysplastic Syndrome. *Cureus*, 10(9).
51. Wolach O, Stone R. Autoimmunity and inflammation in myelodysplastic syndromes. *Acta Haematol.* 2016;136:108–117
52. ekinian A, Grignano E, Braun T. Systemic inflammatory and autoimmune manifestations associated with myelodysplastic syndromes and chronic myelomonocytic leukaemia: a French multicentre retrospective study. *M. Rheumatology (Oxford)* 2016;55:291–300.
53. Fang J, Barker B, Bolanos L. Myeloid malignancies with chromosome 5q deletions acquire a dependency on an intrachromosomal NF- κ B gene network. *Cell Rep.* 2014;8:1328–1338.
54. Saif M, Hopkins J, Gore S. Autoimmune phenomena in patients with myelodysplastic syndromes and chronic myelomonocytic leukemia. *Leuk Lymphoma.* 2002;43:2083–2092.
55. Association of comorbidities with overall survival in myelodysplastic syndrome: development of a prognostic model. Naqvi K, Garcia-Manero G, Sardesai S, Oh J, Vigil CE, Pierce S, Lei X, Shan J, Kantarjian HM, Suarez-Almazor ME *J Clin Oncol.* 2011 Jun 1; 29(16):2240-6.
56. Sperr WR, Wimazal F, Kundi M, Baumgartner C, Nösslinger T, Makrai A, Stauder R, Krieger O, Pfeilstöcker M, Valent P Ann Comorbidity as prognostic variable in MDS: comparative evaluation of the HCT-CI and CCI in a core dataset of 419 patients of the Austrian MDS Study Group. *Oncology.* 2010 Jan; 21(1):114-9.
57. Della Porta MG, Galli A, Bacigalupo A, et al. Clinical Effects of Driver Somatic Mutations on the Outcomes of Patients With Myelodysplastic Syndromes Treated With Allogeneic Hematopoietic Stem-Cell Transplantation. *J Clin Oncol.* 2016;34(30):3627-3637. doi:10.1200/JCO.2016.67.3616

58. . Cheson BD, Greenberg PL, Bennett JM, Clinical application and proposal for modification of the International Working Group (IWG) response criteria in myelodysplasia *Blood*. 2006 Jul 15; 108(2):419-25.
59. Efficace, F., Cottone, F., Oswald, L.B. et al. The IPSS-R more accurately captures fatigue severity of newly diagnosed patients with myelodysplastic syndromes compared with the IPSS index. *Leukemia* (2020)
60. Xiong B, Nie Y, Tang Z, Xue M, Zuo X Prognostic evaluation of ALIP and CD34 immunostaining in IPSS-R subgroups of myelodysplastic syndromes. *Pathology* (2017) vol.49(5):526–533
61. List A, Dewald G, Bennett J, Lenalidomide in the myelodysplastic syndrome with chromosome 5q deletion., Myelodysplastic Syndrome-003 Study Investigators. *N Engl J Med*. 2006 Oct 5; 355(14):1456-65
62. Estey EH, Thall PF, Cortes JE, Comparison of idarubicin + ara-C-, fludarabine + ara-C-, and topotecan + ara-C-based regimens in treatment of newly diagnosed acute myeloid leukemia, refractory anemia with excess blasts in transformation, or refractory anemia with excess blasts. *Blood*. 2001 Dec 15; 98(13):3575-83.
63. Lubbert M, Suci S, Baila L, et al. Low-dose decitabine versus best supportive care in elderly patients with intermediate- or high-risk myelodysplastic syndrome (MDS) ineligible for intensive chemotherapy: final results of the randomized phase III study of the European Organisation for Research and Treatment of Cancer Leukemia Group and the German MDS Study Group. *J Clin Oncol* 2011; 29:1987-96.
64. Platzbecker U, Germing U, Götze KS, Luspatercept for the treatment of anaemia in patients with lower-risk myelodysplastic syndromes (PACE-MDS): a multicentre, open-label phase 2 dose-finding study with long-term extension study. *Oncology* 2017 ; 18(10):1338-1347.
65. Brunner AM, Steensma DP Recent advances in the cellular and molecular understanding of myelodysplastic syndromes: implications for new therapeutic approaches. *Clin Adv Hematol Oncol*. 2018 Jan; 16(1):56-66.

66. D. De Smet, F. Trullemans, K. Jochmans, Diagnostic Potential of CD34+ Cell Antigen Expression in Myelodysplastic Syndromes, *American Journal of Clinical Pathology*, Volume 138, Issue 5, November 2012, Pages 732–743
67. Aditi Shastri, Britta Will, Ulrich Steidl, Amit Verma; Stem and progenitor cell alterations in myelodysplastic syndromes. *Blood* 2017; 129 (12): 1586–1594
68. Kida J, Tsujioka T, Suemori S, Okamoto S, Sakakibara K, Takahata T, Yamauchi T, et al. An MDS-derived cell line and a series of its sublines serve as an in vitro model for the leukemic evolution of MDS. *Leukemia*. 2018 Aug, 32:846–1850
69. Elvarsdóttir, E., Mortera-Blanco, T., Dimitriou, M. et al. A three-dimensional in vitro model of erythropoiesis recapitulates erythroid failure in myelodysplastic syndromes. *Leukemia* 34, 271–282 (2020).
70. Tabe Y. Konopleva M. Andreeff M. Fatty Acid Metabolism, Bone Marrow Adipocytes, and AML *Frontiers in Oncology* 2020 vol:10 pp:155
71. Zhang YZ, Da WM. In vitro biological characteristics of mesenchymal stem cells from patients with myelodysplastic syndrome and their support to hematopoiesis. *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi*, 2005; 13: 839-842