

Myelodysplastický syndróm – klasifikácia a patofyziológia

Prof. MUDr. Elena Tóthová, CSc.

Ústav lekárskej a klinickej biofyziky Lekárska fakulta UPJŠ, Košice

Klinika hematónkologie FNO a LFO, Ostrava

Myelodysplastický syndróm (MDS) je heterogénna skupina chronických myeloidných neoplázií, pre ktoré je charakteristická cytopénia s dysplastickou morfológiou krvných buniek a častá progresia do akútnej myeloblastovej leukémie (AML). Pri MDS sú postihnuté viaceré línie krvotvorby, blasty, prstencové sideroblasty a cytogenetické lézie, v závislosti od ktorých súčasná WHO klasifikácia odlišuje rozličné podtypy MDS. Avšak odlišenie medzi MDS a ďalšími myeloidnými malignitami, tak ako AML, myeloproliferatívne neoplázie (MPN), myelodysplastický/myeloproliferatívny syndróm (MDS/MPN), ako aj medzi rôznymi podtypmi MDS, je často problematické najmä v mnohých hraničných prípadoch, a preto je snaha o objasnenie týchto zdanlivo odlišných myeloidných malignít. V posledných rokoch nastal dramatický pokrok v používaní nových technológií, čo poskytuje nové príležitosti pre pochopenie patogenézy MDS. Metódou hlbokého sekvenovania boli potvrdené mnohé mutácie, ktorých korelácia s jednotlivými podtypmi MDS ako aj s progresiou ochorenia má prognostický význam aj v klinike. Pochopenie nových ciest aj intratumorálnej heterogenity môže viesť nielen k objasneniu patogenézy MDS, ale môže mať veľký význam aj v zlepšení diagnostiky a liečby.

Kľúčové slová: myelodysplastický syndróm, klasifikácia, patogenéza, dysplázia, cytogenetika, molekulová genetika, liečba.

Myelodysplastic syndrome – classification, pathophysiology

Myelodysplastic syndrome (MDS) are a heterogenous group of chronic myeloid neoplasms characterized by varying degrees of cytopenia with dysplastic blood cell morphology, frequently terminating in acute myeloid leukemia (AML). Reflecting their heterogeneity, MDS show varying degrees of lineage involvement, blast/ring sideroblast counts and cytogenetic lesions, depending on which the current WHO classification distinguishes several subtypes of MDS. However, the discrimination between MDS and other myeloid cancer, such as acute myeloid leukemia (AML), myeloproliferative neoplasms (MPN), myelodysplastic/myeloproliferative neoplasms (MDS/MPN), and among different MDS subtypes is frequently obscured in many borderline cases, suggesting common underlying mechanisms shared by these apparently different entities of myeloid malignancies. Meanwhile, dramatic advances in high-throughput genome technology of recent years have provided a novel opportunity to understand the molecular genetics/pathogenesis of MDS. Deep sequencing of recurrent gene mutations in multiple cases indicates the presence of a hierarchy among different mutations, which might be relevant to disease progression and prognostication of clinical outcomes. Frequent presence of intratumour heterogeneity and a dynamic temporal behaviour seems to be an intrinsic feature of MDS, and an understanding of this would be indispensable not only to clarify the pathogenesis of MDS and transformation to AML, but also for the development of better MDS diagnostics and therapeutics.

Key words: myelodysplastic syndrome, classification, pathophysiology, dysplasia, cytogenetic, molecular genetic, therapy.

Úvod

Myelodysplastický syndróm (MDS) tvorí heterogénna skupina chronických myeloidných neoplázií, ktorých pôvod začína v hematopoetickej kmeňovej bunke kostnej drene (KD). Ide o klonálne ochorenie krvotvorby a spoločnými klinickými črtami, ktoré sú charakteristické pre túto kategóriu ochorení, sú periférna cytopénia, morfológická dysplázia KD prekursorov a zvýšené riziko transformácie do akútnej myeloblastovej leukémie (AML).

Na základe nových poznatkov, predovšetkým v molekulovej biológii, môžeme v súčasnosti potvrdiť nielen množstvo cytogenetických zmien, ale aj výskyt molekulových abnormalít asociovaných s MDS. Kým analýzou metafáz klasickým cytogenetickým vyšetrením boli detegované chromozomálne abnormality približne u 50 % prípadov s MDS, senzitívnejšími technikami, tak ako SNP-A (single-nucleotide polymorphism microarrays)

a metódami hlbokého sekvenovania (SS) boli potvrdené genetické mutácie vo viac ako 80 % prípadov. Sú to predovšetkým nové molekulové lézie nedávno identifikované pri MDS, ktoré pravdepodobne v blízkom období ovplyvnia tak klasifikáciu ochorenia, ako aj diagnostický a terapeutický proces.

Klasifikácia MDS

V priebehu posledných rokov boli postupne vyvinuté rozličné klasifikačné systémy. Aj keď ani v súčasnosti nie je jasná tzv. „best“ schéma, početné revízie boli v korelácii s vývojom poznatkov v patofyziológii MDS a klinických výsledkoch liečby.

FAB klasifikácia

Iniciálna klasifikácia FAB (French-American British) bol systém vyvinutý medzinárodnou skupinou klinikov a patológov v sedemdesiatych

Onkológia (Bratisl.), 2014; roč. 9(1): 39–44

rokoch, revidovaný v roku 1982 Benettom et al. (1), ktorý definoval MDS podskupiny na základe morfológických zmien s fokusom na percento blastov v KD, prítomnosť alebo chýbanie monocytózy a prítomnosť alebo chýbanie prstencových sideroblastov (1, 2). Na základe morfológických nálezov boli pacienti rozdelení do 4 skupín – nízke, stredné, vysoké riziko a chronická myelomonocytová leukémia (CMML). Avšak vo FAB systéme chýbali cytogenetické a niektoré morfológické informácie ako aj niektoré podtypy (hypoplastický MDS) a kategórie MDS (MDS/MPN).

WHO klasifikácia

V roku 1999 bol navrhnutý WHO (World Human Organization) novší klasifikačný systém, ktorý zohľadňoval niektoré známe limitácie FAB systému. Prehľad porovnania FAB (1982) a WHO klasifikácie z roku 1999 je v tabuľke 1 a 2. Revízie

WHO klasifikácie boli v rokoch 2001 a 2008. Hlavným cieľom tejto klasifikácie bola inkorporácia niektorých biologických poznatkov, zvlášť cytogenetických zmien, klinických výsledkov a počtu zahrnutých dysplastických línií, s cieľom lepšieho odlíšenia jednotlivých podskupín MDS (3, 4). V tejto klasifikácii boli identifikované aj podjednotky známe ako „5q-syndróm“ a chronická myelomonocytová leukémia (CMML) ako samostatné kategórie, ako aj odporúčené nižšie percento blastov (< 20 %) ako kritérium MDS a eliminovaná RAEB-t kategória s charakteristickými zmenami, ktoré zodpovedali kategórii AML. V tejto klasifikácii bolo aj rozdelenie kategórie RAEB (refraktérna anémia s excesom blastov) do 2 skupín v závislosti od percenta blastov. WHO klasifikácia odlišovala aj v skupine s multilíniou dyspláziou pacientov, ktorí majú < 5 % blastov v KD (nepriaznivá prognóza) so skupinou, kde dominuje iba erytroidná dysplázia (priaznivá prognóza) a pridáva podskupinu kategorizovanú ako MDS nezaraditeľný (MDS-U).

Výhody a nevýhody WHO klasifikácie z roku 2008

V súčasnosti platná verzia WHO klasifikácie pre MDS bola publikovaná v roku 2008 a zahrnuje niekoľko významných, ale aj menej významných zmien v porovnaní s predchádzajúcimi verziami a v porovnaní s verzou z roku 2001 (tabuľka 3).

Hlavnou zmenou bola náhrada kategórie „refraktérna anémia“ (RA) s unilíniou dyspláziou širšou kategóriou RCUD (refraktérna cytopénia s unilíniou dyspláziou). Do tejto kategórie boli okrem pacientov s RA zaradení aj pacienti s refraktérnou neutropéniou (RN) a refraktérnou trombocytopéniou (RT), pretože mnohí nemali iba anémiu alebo erytroidnú dyspláziu, ale izolovanú refraktérnu cytopéniu iného typu. V tejto klasifikácii z roku 2008 bola aj fúzia kategórie refraktérnej cytopénie s multilíniou dyspláziou s/alebo bez prítomnosti prstencových sideroblastov (RCMD-RS) do kategórie RCMD (5, 6).

Avšak v roku 2011 Európske konzorcium identifikovalo mutácie v SF3B1 géne u väčšiny pacientov s MDS s prítomnosťou prstencových sideroblastov, a nálezy týchto mutácií sa našli u menej ako 10 % s ďalšími typmi MDS. Preto RCMD a RCMD-RS by mali pravdepodobne zostať ako 2 odlišné entity MDS. Avšak MDS/MPN subkategória RARS s významnou trombocytózou (RARS-T) tiež nesie mutáciu SF3B1. Táto sa najčastejšie vyskytuje pred akvizíciou JAK2 mutácie, a tým sa táto kategória stala viac podobnou k RARS a RCMD-RS než k ďalším zmiešaným kategóriám zaradovaným do MDS/MPN.

Tabuľka 1. Porovnanie FAB a WHO klasifikácie jednotlivých podtypov MDS (nízke riziko)

FAB klasifikácia	WHO klasifikácia
Refraktérna anémia (RA) < 5 % blastov	Refraktérna anémia (RA) Refraktérna cytopénia s multilíniou dyspláziou (RCMD) MDS – nezaradený (MDS-U) MDS s izolovanou del(5q), 5q-syndróm
RA s ≥ 15 % prstencových sideroblastov (RARS)	Refraktérna anémia s prstencovými sideroblastmi (RARS) Refraktérna cytopénia s multilíniou dyspláziou a prstencovými sideroblastmi (RCMD-RS)

Bennet JM, et al. *Br. J. Haematol.* 1982;51:189.
Harris NL, et al. *J. Clin. Oncol.* 1999;17:3835.
Vardiman JW, et al. *The World Health Organization (WHO) classification of the myelodysplastic neoplasms. Blood* 2002;10(7):2292–2302.

Tabuľka 2. Porovnanie FAB a WHO reklasifikácie jednotlivých podtypov MDS (vysoké riziko)

FAB klasifikácia	WHO klasifikácia
RA a excesom blastov (RAEB): 5 % – 19 % blastov	RA s excesom blastov-1 (RAEB-I): 5 – 9 % RA s excesom blastov-2 (RAEB-II): 10 – 19 %
RA s excesom blastov v transformácii (RAEB-t): 20 % – 29 %	Akútna myeloblastová leukémia (AML) ≥ 20 % blastov
CMML: Monocyty v PK > 10x 10 ⁹ /L a blasty v KD ≤ 20 %	CMML-1, MDS/MPN CMML-2, MDS/MPN

Bennet JM, et al. *Br. J. Haematol.* 1982;51:189.
Harris NL, et al. *J. Clin. Oncol.* 1999;17:3835.
Vardiman JW, et al. *The World Health Organization (WHO) classification of the myelodysplastic neoplasms. Blood* 2002;10(7):2292–2302.

Tabuľka 3. WHO klasifikácia MDS z roku 2008 (Lindsley RC, et al., 2013)

Diagnóza	Skratka	Periférna krv	Kostná dreň
Refraktérna cytopénia s unilíniou cytopéniou	RCUD	Jednoduchá cytopénia alebo bicytopénia, blasty < 1 %	Jednolíniou dysplázia (≥ 10 % buniek v jednej myeloidnej línii), < 5 % blastov, < 15 % erytroidných prekurzorov tvoria prstencové sideroblasty
Refraktérna anémia	RA		
Refraktérna neutropénia	RN		
Refraktérna trombocytopénia	RT		
Refraktérna anémia s prstencovými sideroblastmi	RARS	Anémia Žiadne blasty	≥ 15 % erytroidných prekurzorov tvoria prstencové sideroblasty Dysplastické zmeny iba v erytroidnej línii < 5 % blastov
Refraktérna cytopénia a multilíniou dyspláziou	RCMD	Viacnásobná cytopénia Blasty < 1 % Žiadne AT < 1 x 10 ⁹ /L monocytov	Dysplázia ≥ 10 % buniek vo viacerých ako 2 myeloidných líniách < 5 % blastov Žiadne Auerove tyčky (AT) ± 15 % prstencových sideroblastov
Refraktérna anémia s excesom blastov – 1	RAEB-1	Viacnásobná cytopénia < 5 % blastov Žiadne AT < 1 % monocytov	Jednolíniou alebo multilíniou dysplázia 5 – 9 % blastov Žiadne Auerove tyčky
Refraktérna anémia s excesom blastov – 2	RAEB-2	Viacnásobná cytopénia 5 – 19 % blastov AT ± < 1 x 10 ⁹ /L monocytov	Jednolíniou alebo multilíniou dysplázia 10 – 19 % blastov Auerove tyčky ±
Myelodysplastický syndróm nezaradený	MDS-U	Cytopénia, ≤ 1 % blastov	Morfologická dysplázia u < 10 % buniek minimálne jednej alebo viacerých myeloidných línií + klonálne cytogenetické abnormality, < 5 % blastov
Myelodysplastický syndróm s izolovanou del(5q)	–	Anémia, N alebo ÷ počet Tr < 1 % blastov	N alebo ÷ počet Meg s hypolobulárnymi jadrami < 5 % blastov, izol. Del(5q), bez AT

Menej užitočnou zmenou bolo ponechanie t-MDS (therapy related MDS) a AML spolu v jednej skupine s názvom „therapy related neoplasms“, a to bez vyžadovania detailnejšej diagnózy týchto pacientov v súvislosti s cyto-

genetikou a morfológiou. Podobne ako vo veľkej klinickej štúdií s AML aj v rozličných malých klinických štúdiách s MDS sa ukázalo, že t-MDS odpovedá na liečbu s azacitidínom podobne ako primárny MDS s tými istými cytogenetic-

Tabuľka 4. WHO klasifikácia MDS/MPS z roku 2008 ((Lindsley RC, et al., 2013)

Diagnóza	Skratka	Periférna krv	Kostná dreň
Chronická myelomonocytová leukémia-1	CMML-1	>1 x 10 ⁹ /L monocytov (> 3 mesiace), < 5 % blastov (myeloblasty, monoblasty, promonocyty), Ph a BCR-ABL negatívna, bez prestavby PDGFRa, PDGFRβ	Dysplázia vo ≥ 1 hematopetickéj línii, < 10 % blastov (myeloblasty, monoblasty, promonocyty)
Chronická myelomonocytová leukémia-2	CMML-2	> 1 x 10 ⁹ /L monocytov (> 3 mesiace), 5 – 19 % blastov (myeloblasty, monoblasty, promonocyty, Ph negatívna, BCR-ABL negatívna, bez prestavby PDGFRa, PDGFRβ)	Dysplázia vo ≥ 1 hematopetickéj línii, 10 – 19 % blastov (myeloblasty, monoblasty, promonocyty) alebo Auerových tyčiek
Atypická chronická myelocytová leukémia-BCR-ABL negatívna	aCML	Leukocytóza ≥ 13 x 10 ⁹ /L Neutrofilné prekurzory (PM, MM, MMC), ≥ 10 % leukocytov s dyspláziou, < 20 % blastov, Minimálna bazofília (< 2 %), Žiadna alebo minimálna monocytóza < 10 % Ph negatívna, BCR-ABL negatívna, bez prestavby PDGFRa, PDGFRβ	Hypercelulárna dreň s granulocytárnou proliferáciou a dyspláziou s/bez dysplázie v erytroalebo megakaryopoézy, < 20 % blastov
Juvenilná myelomonocytová leukémia	JMML	> 1 x 10 ⁹ /L monocytov, < 20 % blastov a promonocytov, Ph, BCR-ABL negatívna	> 1 x 10 ⁹ /L monocytov, < 20 % blastov a promonocytov *
Nezaradené MDS/MPN	MDS/MPN	Dysplázia + črty proliferácie, bez predchádzajúcej MDS, MPN, bez anamnézy cytotoxickéj liečby alebo rastových faktorov, Ph, BCR-ABL negat., bez prestavby PDGFRa, PDGFRβ alebo FGFR1 a izolovanej del(5q), t(3,3)(q21,q26) alebo inv(3)(q21,q26) De novo ochorenie nezaraditeľné do inej kategórie MDS ani MPN ani MDS/MPN	Dysplázia + črty myeloproliferácie

Vysvetlivky (tabuľka 3 a 4): Ph negatívna plus ≥ 2, nálezy: zvýšenie HbF, myeloidné prekurzory v periférnej krvi, leukocyty > 10 x 10⁹/L, klonálne chromozomálne abnormality (možná monozómia 7), G-CSF hypersenzitivita in vitro. *Trombocytóza ≥ 450 x 10⁹/L, leukocytóza ≥ 13 x 10⁹/L s/bez hmatnej splenomegálie.

Tabuľka 5: Niektoré gény mutované pri MDS a poznámky o ich funkciách

Gén	Frekvencia mutácií	Popisný názov	Úloha v bunke	Molekulárna úroveň	Lokalizácia
TET2	20 %	aKG. dependantná dioxigenáza	regulácia transkripcie, epigenetický faktor	hydroxylácia 5-metyl-cytozínu v chromatine	jadro
RUNX1	< 20 %	CBA (core binding factor)	vývoj krvotvorby, kooperácia s ďalšími TF	regulácia funkcie progenitorov	jadro
TP53	< 10 %	tumor fosfoprotein 53	regulácia transkripcie, apoptózy, bunkového cyklu	ubikvitárny TF „strážca genomu“	jadro
ASXL1	< 15 %	Polycomb skupina ASXL1 isoforma 1	kooperácia s histon-modifikačnými enzýmami	regulácia transkripcie a štruktúry chromatinu	jadro
NRAS/KRAS	< 10 %	RAS vírusový onkogén-homolog	dráha cyklínových receptorov, regulácia proliferácie	postreceptorová signalizácia	cytoplazma
EZH2	< 5 %	histone-metyltransferase Enhancer of zeste homolog 2	metyltransferáza histonu H3K27 (epigenetický faktor)	kondenzácia chromatinu a transkripčná represia	jadro
CBL/CBLB	nízka	ubikvitín ligáza (asociovaná s TK)	tumor supresor (protinádorový proteín) myeloopoézy	negatívna regulácia signálne dráhy TK	cytoplazma

Vysvetlivky: aKG – a-ketoglutarát, RAR – receptor kyseliny retinovej, TK – tyrozínkináza, TF – transkripčný faktor, H – histón, K – lysín. CBL (Casitas B-cell lymphoma), RUNX-1 (Runt-related transkripcion factor-1), ASXL1 (sex-comb like 1), EZH2 (Enhancer of zeste homolog 2), TET2 (tet oncogene family member 2).

kými zmenami. Analogicky, skupiny rozdelené podľa cytogenetického rizika, ale nie rozdelené na primárny a t-MDS, ukázali významné výsledky vo veľkej retrospektívnej analýze transplantovaných pacientov s MDS (4, 5).

V tabuľkách 3 a 4 je prehľad WHO klasifikácie myelodysplastických syndrómov (MDS) a myelodysplastických a myeloproliferatívnych neoplázií (MDS/MPS), ktorá je platná v súčasnosti.

Patofyziológia MDS

Lepešie pochopenie biológie ochorenia je základom pre vývoj nových terapeutických možností a tým aj dosiahnutia lepších výsledkov liečby.

Krvotvorba je za normálnych okolností dynamický proces produkcie krviniek, v ktorom kmeňové bunky (SC) postupne strácajú schopnosť sebaobnovy a diferencujú sa bunky získavajú rozličné špecializované vlastnosti. Tak vznikajú rôzne bunkové podtypy a na základe vonkajších vplyvov (napríklad hypoxia, zápal) sú vydávané inštrukcie v podobe pôsobkov, cytokínov, ktoré ovplyvňujú prevahu niektorej populácie. V pokojovom stave existuje v krvotvorbe homeostatická regulácia a počty a štruktúra krvných elementov sú stabilné.

Vývoj MDS je mnohostupňový proces, pri ktorom dochádza k zmenám v hematopoetickej kmeňovej bunke, mikroprostredí KD a v komplexe interakcií medzi obidvomi (obrázok 1).

V literatúre sa uvádza 5 najvýznamnejších ciest zahrnutých v patofyziológii a progresii MDS:

- poškodenie buniek na základe toxickej expozície k vonkajšiemu prostrediu a veku,
- genetické zmeny vrátane straty alebo mutácie, zapríčinené cytogenetickými a epigenetickými abnormalitami,
- zmeny v mikroprostredí KD, apoptóza, cytokíny a angiogénéza,
- porušená regulácia imunitného systému,
- alterovaná regulácia bunkového cyklu a za-blokovanie diferenciácie.

Celúrne poškodenie: Toxicita expozície k vonkajšiemu prostrediu a vek buniek

V súvislosti so vznikom MDS boli opisované mnohé environmentálne vplyvy. Boli to najmä toxické látky ako fajčenie, alkohol, infekcie alebo autoimunitné ochorenia, ktorých výskyt bol v asociácii so zmenami typickými pre MDS (4, 5, 6, 11). Najviac pozornosti bolo venované benzénu, aromatickému hydrocarbónu a organickým rozpúšťadlám, a prvýkrát bolo ochorenie opísané v tejto súvislosti u tureckých obuvníkov, u ktorých sa vyvinulo zlyhanie KD (aplázia KD, pancytopenia). Tieto poznatky viedli k ďalšiemu prognostickému sledovaniu 74 828 čínskych osôb, ktoré pracovali s benzénom a bol u nich pozorovaný vyšší výskyt MDS. Potenciálny mechanizmus vývoja MDS vplyvom expozície k benzénu sa uvádza v dvoch kontextoch: **genotoxický mechanizmus** poškodenia sa

pripisoval tvorbe voľných kyslíkových radikálov z benzénových metabolitov s následným DNA poškodením a apoptózou. Podporou pre tento mechanizmus sú nálezy chromozomálnych abnormalít: trizómia chromozómu 8 (+8), delécie chromozómov 5 a 7 (-5; -7), translokácia t(8; 21) a onkogénne a somatické mutácie u MDS pacientov exponovaných k benzénu. Zvýšenie počtu somatických mutácií sa vyskytuje aj v súvislosti s vyšším vekom. Pre tzv. **non-genotoxický mechanizmus** svedčia zmeny v KD mikroprostredí a imunitné dysfunkcie cestou redukcie hladín imunoglobulínov a komplementu (6, 7, 8).

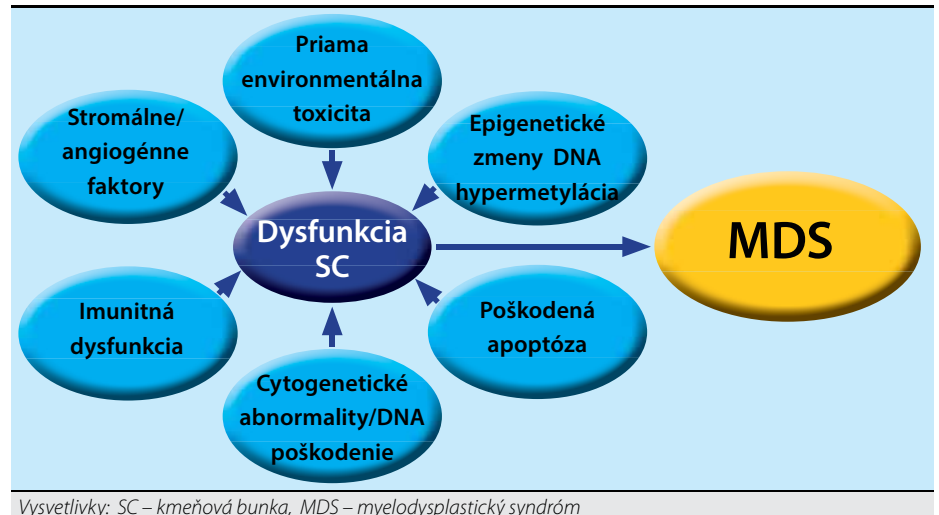
Radiácia a predchádzajúca chemoterapia boli dokumentované ako ďalšie príčiny vedúce k MDS. Špeciálne chemoterapia s použitím inhibítorov topoizomerázy II (TOPO II), antracyklínov a alkylačných látok. Chromozomálne zmeny spôsobené TOPO II a antracyklínmi sa týkajú chromozómov 5 a 7, ale aj vzniku translokácie 11q23 s nálezom MLL (Mixed Lineage leukemia) génu. Medián veku pacientov s MDS je približne 70 rokov, význam vyššieho veku vo vzťahu k MDS je známy. Vekom dochádza k vyššej produkcii genetických mutácií a alterácií. Ogawa et al. (9), ktorý vyhodnotil a porovnal nálezy v KD u 100 pacientov rôznych vekových skupín, našiel zvýšenú apoptózu a pokles celularity v súvislosti s pokročilým vekom (6, 8).

Ďalšími výsledkami potvrdzujúcimi asociáciu s vekom sú výskumy dĺžky telomeráz a telomerázovej aktivity. Skrútenie vedie k nekompletnej DNA replikácii vedúcej ku genomickej instabilitate a následným chromozomovým abnormalitám a mutáciám. Niektoré práce predpokladajú, že telomeráza pri MDS má insuficientnú aktivitu.

Strata alebo chýbanie génovej expresie: Cytogenetické a epigenetické zmeny

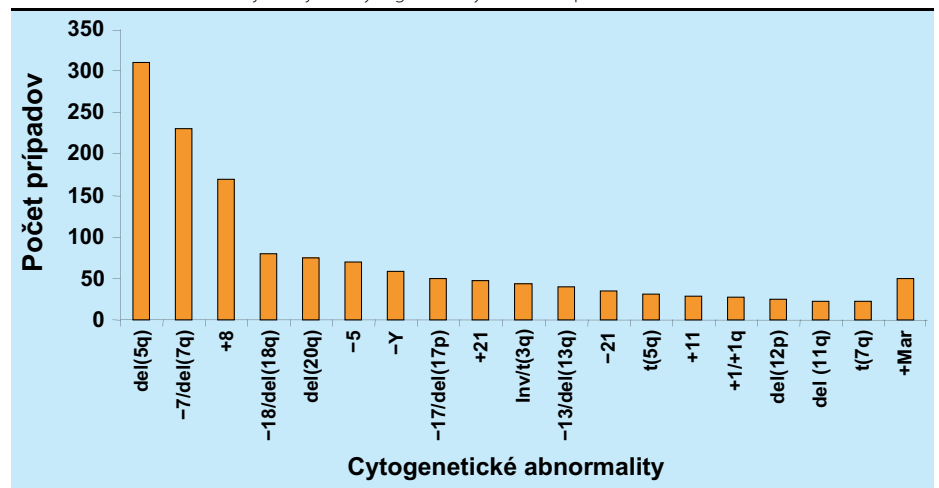
Klonálne cytogenetické abnormality sa nachádzajú u 30 – 70 % pacientov s primárnym MDS a u viac ako 80 % pacientov s t-MDS. Väčšina chromozomálnych abnormalít vedie k zmenám v chromozómoch 5, 7, 8, 11, 17, 20, Y, 17 alebo k vzniku komplexných karyotypov s mnohopočetnými abnormalitami (obrázok 2). Cytogenetické zmeny je možné potvrdiť konvenčnou cytogenetikou (CC), avšak pre analýzu chromozómov vyžadujú dostatočný počet metafáz. Vývoj novších techník dovoľuje potvrdenie aj jemnejších genetických zmien. Štúdie porovnávajúce CC, CGH a FISH (fluorescentná in situ hybridizácia) ukázali koreláciu medzi týmito 3 technikami, avšak CGH dokázala potvrdiť aj predtým nejasné genetické zmeny (7, 9, 10, 12).

Obrázok 1. Zmeny významné v patogeneze MDS



Vysvetlivky: SC – kmeňová bunka, MDS – myelodysplastický syndróm

Obrázok 2. Frekvencia najčastejších cytogenetických zmien pri MDS



Ďalšou možnosťou identifikácie aberácií je metóda jednoduchého polymorfizmu – SNPs (single nucleotide polymorphism), ktorá pomohla vysvetliť heterogenitu MDS. Polymorfizmy sú najčastejšou formou genetických variácií medzi jednotlivcami a nedávne výsledky potvrdili, že **genetický polymorfizmus** môže hrať významnú úlohu v proliferácii a diferenciácii MDS, ale aj pri odhalení genetickej predispozície. Napríklad u pacientov so zisteným polymorfizmom GLU785Lys v receptore G-CSF boli nájdené jeho funkčné aberácie v odpovedi na rastový faktor u pacientov s MDS s vysokým rizikom (HR-MDS).

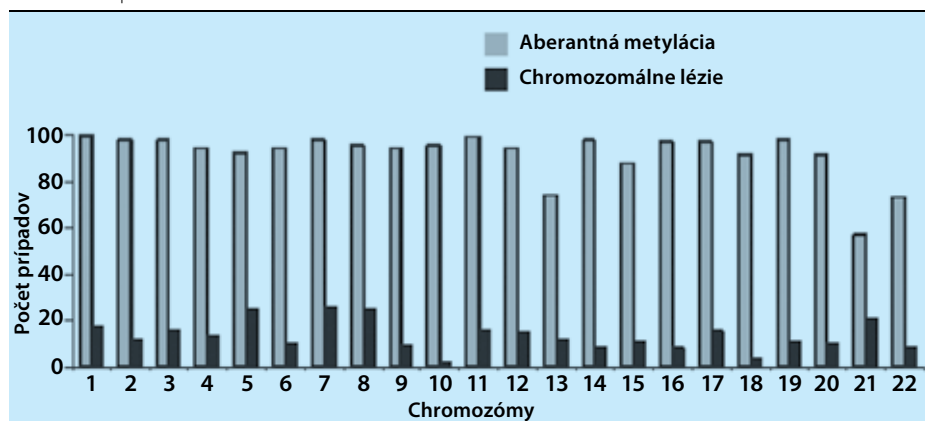
Klonálny vývoj pri MDS je charakterizovaný vývojom somatických mutácií, ktoré prebiehajú postupne v SC a ich dcérskych populáciách. Ak vzniknutá mutácia spôsobí výhodu a SC sa množia a obsadia mikroprostredie KD, mutácia sa označuje ako „driver“. Menej významné mutácie, ktoré nevedú k žiadnemu efektu, sa nazývajú „passenger“. Metódami **hlbokého sekvenovania** (SS) sa počas posledných rokov podarilo odhaliť celý rad nových mutácií.

Z radu encyklopedických vedomostí vyplýva, že väčšina mutovaných génov ovplyvňuje nastavenie genetického programu umožňujúceho diferenciáciu krvných elementov (12, 13, 14).

Celý rad mutovaných proteínov pri MDS sú práve známe regulátory génovej transkripcie myelopoézy, buď sú to priamo **transkripčné faktory** (RUNX1, p 53, CEBPA, WT1), alebo **epigenetické regulátory**, teda enzýmy so schopnosťami viazať a ovplyvňovať štruktúru chromatínu (ASXL1 a EZH2). Veľmi významnou skupinou sú **gény ovplyvňujúce metyláciu DNA** (TET2, IDH1, 2). V poslednom rade sú mutované **gény, kódujúce receptory cytokínov** (MPL, CSF1R, KIT) alebo **ovplyvňujúce ich signálne dráhy** (NRAS/KRAS, CBL/CBLB, JAK2, FLT3). V novších prácach boli pri MDS nájdené aj mutácie génov, ktoré regulujú zostrih mRNA (**SF3B1**).

V **epigenetickej modifikácii** sú to dve najvýznamnejšie alterácie zahrnujúce **DNA metyláciu a histónovú acetyláciu**. Obe tieto genetické zmeny vedú k poškodeniu chromatínu a tvorbe DNA/histónových komplexov, ktoré

Obrázok 3. Percentuálne zastúpenie metylačných a cytogenetických zmien na jednotlivých chromozónoch pacientov s MDS



nie sú schopné transkripcie. Výsledkom je zoslabenie významných génov aj napriek tomu, že nie sú mutované. Mnohé z týchto génov sú významné v procese karcinogenézy ako tumor supresory v kontrole cyklu, apoptóze, bunkovej proliferácii a diferenciácii. Metylačný aparát patrí medzi základné prostriedky, akými bunka konzervuje svoj transkripčný program v priebehu bunkového cyklu. Metylačný profil je potrebné obnoviť po každom delení, čoho sa zúčastňuje DNA metyltransferáza (DNMT). Donedávna nebolo jasné, ako sú schopné bunky odstrániť metyláciu a začať génovú transkripciu. Nakoniec sa ukázalo, že demetylácia DNA, predovšetkým metyl- cytosínu, je enzymatický proces, ktorý obsahuje hydroxyláciu metylovej skupiny a medzi enzýmy významné v tomto procese patria TET2 a IDH, ktoré sú pri MDS mutované (14, 15, 16, 17, 23, 24, 25) (obrázok 3).

Na základe týchto poznatkov MDS sa považuje za ochorenie s výraznou epigenetickou dysreguláciou vrátane narušenej metylácie DNA, čomu zodpovedá aj úspech s demetylačnou liečbou. V tabuľke 5 uvádzame prehľad niektorých mutácií, ktoré významnejšie ovplyvňujú priebeh ochorenia, ich percentuálne zastúpenie pri MDS, miesto pôsobenia ako aj cesty, ktoré ovplyvňujú.

Zmeny v mikroprostredí kostnej drene: Apoptóza, cytokíny a angiogénna

Mikroprostredie kostnej drene je významné vo vývoji a progresii MDS a početné štúdie dokázali tak alterované „mileau“ cytokínov, poruchy v apoptóze, ako aj zmeny vo vaskulárnej mikrodensite. Tieto zmeny vedú k zvýšenej apoptóze CD34+ progenitorov vo včasných štádiách MDS a reverzný proces nastáva v neskorších štádiách ochorenia.

Vzorky KD pacientov s MDS sú tradične hypercelulárne v súvislosti so zvýšením cytokínov

(**TNF-a a IFN- γ**) spolu s perzistujúcou periférnou cytopéniou. V súvislosti s výsledkami niektorých klinických štúdií často opisovaná zvýšená apoptóza je prítomná vo včasných štádiách MDS, kým v neskorších štádiách dochádza k jej poklesu. Dynamika uvoľňovania cytokínov by takto mohla pomôcť pri odhalení jednotlivých štádií MDS. Okrem 2 spomínaných cytokínov dochádza aj k elevácii **TGF- β** (transforming growth factor- β). **TNF-a** zvyšuje apoptózu cestou TNF receptora I a II (TNFRI a TNFRII), ale aj priamou väzbou s TNFRI viazaného proteínu s tzv. „death domain“ (TRADD), nepriamo sa viaže aj s FAS asociovaným proteínom s „death domain“ (FADD) a vedie aj k aktivácii kaspáz. **TNF-a** sa môže viazať aj k TNFRII, ktorému však chýba smrtiaca doména, ale viaže sa priamo s TRAF 2 (TNF receptor-associated factor 2) a aktivuje NF kappaB a JNK, cesty významné v apoptóze. Takto bolo potvrdené zvýšenie TNFRI u pacientov s nízkym rizikom MDS a zvýšenie TNFRII u pacientov s MDS s vysokým rizikom. Ďalší autori ako Bejar et al. (4) uvádzajú, že **TNF-a** má tak stimulačné ako aj inhibičné účinky, stimuluje primitívne progenitory (hypercelulárna fáza MDS) a apoptotický vplyv má na zrelejšie bunky, čo koreluje s periférnou cytopéniou (15).

Zmeny v cievnej mikrovaskulatúre sú ďalším komponentom zmien mikroprostredia KD v súvislosti s MDS. Tvorba nových ciev môže súvisieť s produkciou cytokínov, ale nová vaskulatúra môže produkovať aj excesívne množstvo cytokínov. Pri MDS sa našli v KD okrem zvýšenia **TNF-a a IFN- γ** aj zvýšené hodnoty angiogénnych cytokínov: **VEGF** (vascular endothelial growth factor), **bFGF** (basic fibroblast growth factor), **angiogenin**, **HGF** (hepatic growth factor), **EGF** (epidermal growth factor) a **TGF- β** . Nájdené zvýšené hodnoty týchto cytokínov v plazme pacientov s MDS boli v korelacii s dôkazom zvýšenej mikrovaskulárnej denzity vo vzorkách bioptovaných pacientov s MDS (11).

Porucha v regulácii imunitného systému

Úspešné použitie **imunosupresívnej terapie** (cyklosporín A, antithymocytárny globulín), potenciálne kuratívna úloha alogénnej transplantácie HSC, zlepšenie periférnej cytopéni a eliminácia niektorých cytogenetických abnormalít použitím **imunomodulačných liekov** (talidomid, lenalidomid) ukazujú, že porucha regulácie imunitného systému hrá dôležitú úlohu vo vývoji MDS. Zmeny v dynamike B- a T-buniek opísané v niektorých publikáciách (Ogawa et al.), ukázali na prítomnosť autoreaktívnych T-lymfocytov u pacientov s MDS ako aj úspechy s anti-T-bunkovou terapiou a cyklosporínom (19, 20, 25).

Porušená regulácia B-lymfocytov sa takisto skloňuje v súvislosti s MDS. U pacientov s MDS bola nájdená vyššia frekvencia autoimunitných ochorení ako aj imunitne sprostredkované komplikácie. Štúdie vyhodnocujúce koreláciu medzi prítomnosťou klinických alebo sérologických manifestácií autoimunity a vekom našli ich vyššiu prevalenciu u mladších pacientov, pri MDS súvisiaceho s liečbou alebo u tých, ktorí mali cytogenetické abnormality. Iné práce sa venovali klonalite B-buniek pri MDS. Prítomnosť alebo chýbanie klonality môže poskytnúť pohľad do začiatku ochorenia. Ďalšie skupiny našli prítomnosť cytogenetických abnormalít v oboch myeloidných a lymfoidných líniiach, čo svedčí o CFU-S pôvode ochorenia.

Porušená regulácia cyklu, abnormality v diferenciácii a alterácie v transkripčných faktoroch

Abnormálna diferenciácia a rast buniek reprezentujú jednu z najčastejších morfológických charakteristík pri MDS. Rýchlosť delenia v cykle hrá významnú úlohu vo vyrovnanej homeostáze a expanzia progenitorov s doplnením mladých buniek a apoptózou v každom rade vyžaduje udržiavanie adekvátnej krvnej náhrady. Detailné molekulové práce ukázali niektoré charakteristické **zmeny v bunkových líniiach, ktoré sú potrebné na normálnu diferenciáciu**: 1) zvýšená regulácia cdc2 a cyklínu A v erytrocytných líniiach, 2) indukcia cyklínu D1 a p15 v myeloidných líniiach a 3) selektívne zvýšená regulácia cyklínu D3 a indukcia p 21 v megakaryocytovej diferenciácii. Zmeny v týchto cestách normálnej diferenciácie môžu viesť k zástave maturácie. Špecifický blok v diferenciácii pri MDS a AML je abnormalita CDK inhibítora p16, čo vedie k zástave v G0 a G1 a následne k zástave maturácie.

Ďalšie zmeny v cykle, tak ako zmena funkcie inhibítora CDK a tumor supresora p15INK4B, boli nedávno publikované v súvislosti s progresiou MDS do AML (7, 8, 21, 22, 25).

V súvislosti s patogenézou boli prezentované aj početné **zmeny v rodine transkripčných faktorov GATA** (GATA 1, 2 a 3). Kým **GATA-1** je významný v kontrole erytrocytov, eozinofilov, megakaryocytov a mastocytov, **GATA-2** sa nachádza vo väčšom množstve na nezrelých progenitoroch a hematopoetických SC. Abnormality zvýšených hodnôt GATA-1 poškodzujú bunkový cyklus sú významné v proliferácii, diferenciácii, regulujú apoptózu merytroidných a megakaryocytových progenitorov a expresia GATA-2, nájdená zvýšená aj v kmeňových bunkách, inhibuje terminálnu diferenciáciu. Nakoniec, nevyváženosť GATA-1 a GATA-2 môže v populácii progenitorov ovplyvniť ich diferenciáciu a spolu s prídavnými genetickými poruchami viesť k progresii MDS do akútnej leukémie (21).

Záver

Myelodysplastický syndróm je veľmi heterogénne ochorenie. Okrem typických morfológických zmien sú to pokroky v cytogenetike, ale predovšetkým molekulovej patológii, ktoré vedú k postupnému odhaľovaniu nových ciest a nových mutácií. Ako sa ukázalo v poslednom období, niektoré mutácie nájdené v týchto cestách úzko korelujú s odlišnými morfológickými črtami alebo klinickým fenotypom. Napríklad mutácia SF3B1 je asociovaná s prítomnosťou prstencových sideroblastov a mutácie SRSF2, TET2 a ASXL1 sú prítomné v podskupine myelodysplastických/myeloproliferatívnych neoplázií (MDS/MPS) s vyznačenou myelomonocytovou diferenciáciou. Mutácie EZH2, RUNX1, TP53 a ASXL1 patria medzi negatívne prediktory prežívania (< 1 rok), zatiaľ čo ostatné mutácie sa vyskytujú skôr u pacientov s dlhším prežívaním. Odhalenie mutácií v epigenetickom aparáte myeloidnej diferenciácie vrátane defektu v me-

tylácii DNA, umožnilo využitie demetylačných liekov v liečbe MDS (azacitidín, decitabín), čo viedlo k dosiahnutiu vyššieho počtu odpovedí na liečbu ako aj k zlepšeniu prežívania chorých s MDS (21, 22, 23, 24). Pochopenie týchto zmien prináša nielen objasnenie patogenézy ochorenia a transformácie MDS do AML, ale vedie aj k vývoju lepších diagnostických a terapeutických možností.

Literatúra

1. Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, et al. Proposals for the classification of the myelodysplastic syndromes. *Br. J. Haematol.* 1982;51(2):189–199.
2. Vardiman JW, Harris NL, Brunning RD. The World Health Organization (WHO) classification of the myelodysplastic neoplasms. *Blood* 2002;100(7):2292–2302.
3. Greenberg P, Cox C, LeBeau MM, et al. International scoring system for evaluating prognosis in myelodysplastic syndromes. *Blood* 89;11997:2079–2088.
4. Bejar R, Stevenson KE, Caughey BA, et al. Validation of a prognostic model and the impact of mutations in patients with lower-risk myelodysplastic syndromes. *J. Clin. Oncol.* 2012;30(27):3376–2282.
5. Kayser S, Dohner K, Krauter J. The impact of therapy-related acute myeloid leukemia (AML) on outcome in 2853 adult patients with newly diagnosed AML. *Blood* 2011;117:2137–2145.
6. Jonasova A, Neuwirthova R, Cermak J, et al. Cyclosporin A therapy in hypoplastic MDS patients and certain refractory anaemias without hypoplastic bone marrow. *Br. J. Haematol.* 1998; 102(5):304–309.
7. Schanz J, Tuchler H, Sole F, et al. New comprehensive cytogenetic scoring system for primary myelodysplastic syndromes (MDS) and oligoblastic acute myeloid leukemia after MDS derived from an international database merge. *J. Clin. Oncol.* 2012;30:820–29.
8. Pappaemanuil E, Cazzola M, Boulwood J, et al. Somatic SF3B1 mutation in myelodysplasia with ring sideroblasts. *N. Engl. J. Med.* 2011;365:1384–95.
9. Ogawa T, Kitagawa M, Hirokawa K. Age-related changes of human bone marrow: a histometric estimation of proliferative cells, apoptotic cells, T cells, B-cells and macrophages. *Mech Ageing Dev.* 2000;117(1–3):57–68.
10. Delhommeau F, Dupont S, Valle Della V, et al. Mutation in TET2 in myeloid cancers. *N. Engl. J. Med.* 2009;360:2289–2301.
11. Malcovati L, Della Porta MG, Pietra D, et al. Molecular and clinical features of refractory anemia with ringed sideroblasts associated with marked thrombocytosis. *Blood* 2009;114:3538–3545.
12. Patnaik MM, Hansosn CA, Hodnefield JM, et al. Differential prognostic effect of IDH1 versus IDH2 mutations in myelodysplastic syndrome: a Mayo Clinic study of 277 patients. *Leukemia* 2012; 26:101–105.

13. Thol F, Friesen I, Damm F, et al. Prognostic significance of ASXL1 mutations in patients with myelodysplastic syndromes. *J. Clin. Oncol.* 2011;29:2499–506.

14. Curik N, Burda P, Vargova K, et al. 5-azacitidine in aggressive myelodysplastic syndromes regulates chromatin structure at PU.1 gene and cell differentiation capacity. *Leukemia* 2012;26(8):1804–1811.

15. Steensma DP. Hematopoietic growth factors in myelodysplastic syndromes. *Seminars in oncology.* 2011;38(5):635–647.

16. Stopka T, Jonášová A. Poznámky k patofyziológii myelodysplastického syndromu, demetylační terapii a roli cytokiny-indukované diferenciace. *Myelodysplastic Syndrome News.* 2013;1(2):10–13.

17. Shen L, Kantarjian H, Guo Y, et al. DNA methylation predicts survival and response to therapy in patients with myelodysplastic syndromes. *J. Clin. Oncol.* 2010;28:605–613.

18. Field T, Perkins J, Huang Y, et al. 5-Azacytidine for myelodysplasia before allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplantation* 2010;45:255–260.

19. Yoshida K, Sanada, M, Shiraishi Y, et al. Frequent pathway mutations of splicing machinery in myelodysplasia. *Nature* 2011;478:64–69.

20. Ogawa S. Recent advances in molecular genetics of myelodysplastic syndromes as revealed by massively parallel sequencing. Hematology education: the education program for the annual congress of the European Hematology Association. 2013;7(1):235–242.

21. Lindsley RC, Ebert BL. Molecular pathophysiology of myelodysplastic syndromes. *Annu Rev Pathol. Mech. Dis.* 2013;8:21–47.

22. Malcovati L, Pappaem E, Bowen DT, et al. Clinical significance of SF3B1 mutations in myelodysplastic syndromes and myelodysplastic/myeloproliferative neoplasms. *Blood* 2011;118: 6239–6246.

23. Ko M, Banukwala HS, An J, Lamperti ED, et al. Ten-eleven – translocation 2 (TET2) negatively regulates homeostasis and differentiation of hematopoietic stem cells in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2011;108:14566–71.

24. Ito S, Shen L, Dai Q, et al. Tet proteins can convert 5-methylcytosine to 5-formylcytosine and 5-carboxylcytosine. *Science* 2011;333:1300–1303.

25. Helstrom-Lindberg E. Diagnosis and biomarkers in myelodysplastic syndromes. *Hematology, Education program of EHA* 2013;7(1):243–251.

Prof. MUDr. Elena Tóthová, CSc.
Ústav lekárskej a klinickej biofyziky
Lekárska fakulta UPJŠ
Trieda SNP 1, 040 11 Košice
etothova@post.sk

