

Analiza cytogenetyczna zespołów mielodysplastycznych*

Cytogenetic analysis of myelodysplastic syndromes

Magdalena Gibka ✉

Samodzielny Publiczny Szpital Kliniczny nr 1 im. prof. Tadeusza Sokołowskiego Pomorskiego Uniwersytetu Medycznego w Szczecinie, Klinika Hematologii z Oddziałem Transplantacji Szpiku, ul. Unii Lubelskiej 1, 71-252 Szczecin
Independent Public Clinical Hospital No. 1 for them prof. Tadeusz Sokołowski, Pomeranian Medical University in Szczecin, Department of Hematology and Marrow Transplant Department
✉ magdalena.gibka@pum.edu.pl

ABSTRACT

Introduction: Myelodysplastic syndromes (MDS), classified by World Health Organization as myelodysplastic neoplasms, are a heterogeneous group of clonal disorders of haematopoietic stem cells, characterized by ineffective haematopoiesis, peripheral blood cytopenias, and the propensity to evolve into acute myeloid leukaemia.

The aim of the study was to estimate, using classical and molecular cytogenetic methods, the chromosome aberrations of adult patients with myelodysplastic syndrome.

Materials and methods: The results of patients' bone marrow tests were analysed. For each patient, a non-stimulated, a 24-hour bone marrow culture was analysed using classical cytogenetic techniques and fluorescent in situ hybridization (FISH).

Each stage of the study covered the analysis of the results of karyotype examinations as well as selected aberrations of the Y chromosome and the 3rd, 5th, 7th, 8th and 20th pair of chromosomes. The research was conducted with FISH. The effectiveness of classical and molecular methods in myelodysplastic syndrome cytogenetic diagnostics was compared, and a statistical analysis which examined the correlation of the cytogenetic results with patients' clinical data was conducted.

The cytogenetic test was done for all 38 patients, and the statistical analysis was done for the 30 who had clinically confirmed MDS.

Results: Chromosome abnormalities were detected in 14 (47%) patients. The most common cytogenetic abnormalities were: chromosome 5 deletion (13.3%), chromosome 8 trisomy (6.6%), and chromosome 20 deletion (6.6%).

The results of the statistical analysis proved a significant statistical correlation between patients' sex and the age at the onset of MDS ($p = 0.035$), and a correlation close to the limit of statistical significance between the age of patients with correct karyotype and patients with characteristic aberration karyotype suffered from MDS ($p = 0.07$).

Conclusions: The above results prove that it is justified to conduct karyotype tests for every patient with suspected MDS. The simultaneous application of both conventional cytogenetics and FISH methods allows the identification of chromosome aberrations invisible in the karyotype examination. The cytogenetic analysis together with other diagnostic criteria increases diagnostic accuracy and also allows a more precise determination of the risk groups and the choice of proper treatment methods for patients with MDS.

Keywords: myelodysplastic syndromes; conventional cytogenetics; fluorescence in situ hybridization.

ABSTRAKT

Wstęp: Zespoły mielodysplastyczne (*myelodysplastic syndromes* – MDS), wg klasyfikacji Światowej Organizacji Zdrowia nowotwory mielodysplastyczne, to heterogenna grupa klonalnych chorób komórki macierzystej szpiku charakteryzująca się nieefektywną hematopoezą, cytopeniami we krwi obwodowej oraz skłonnością do transformacji w ostrą białaczkę szpikową. Celem pracy była ocena aberracji chromosomowych dorosłych pacjentów z zespołem mielodysplastycznym metodami cytogenetyki klasycznej i molekularnej.

Materiały i metody: Materiał badawczy stanowił wynik badania szpiku kostnego. Dla każdego pacjenta została założona 24-godzinna niestymulowana hodowla szpiku kostnego. Na preparatach uzyskanych po hodowli in vitro wykonano analizę technikami cytogenetyki klasycznej GTG oraz fluorescencyjnej hybrydyzacji in situ (FISH).

Poszczególne etapy pracy obejmowały analizę wyników badania kariotypu oraz wybranych aberracji chromosomów Y, 3, 5,

7, 8 i 20 pary za pomocą techniki FISH. Porównano skuteczność metod klasycznych i molekularnych w diagnostyce cytogenetycznej zespołów mielodysplastycznych oraz przeprowadzono analizę statystyczną badającą korelację uzyskanych wyników cytogenetycznych z danymi klinicznymi pacjentów.

Badanie cytogenetyczne przeprowadzono u wszystkich 38 pacjentów, analizy statystycznej dokonano u 30, u których potwierdzono klinicznie zespół mielodysplastyczny.

Wyniki: Aberracje chromosomowe wykryto u 14 (47%) chorych. Do najczęściej występujących zmian cytogenetycznych należały: delecja długiego ramienia chromosomu 5 pary (13,3%), trisomia chromosomu 8 pary (6,6%) oraz delecja długiego ramienia chromosomu 20 pary (6,6%).

Wyniki analizy statystycznej wykazały istotny statystycznie związek pomiędzy wiekiem zachorowania na MDS a płcią pacjentów ($p = 0,035$) oraz zbliżony do progu istotności statystycznej związek pomiędzy wiekiem zachorowania pacjentów z prawidłowym wynikiem badania kariotypu i pacjentów z wynikiem

* Zwięzła wersja pracy magisterskiej przyjętej przez Radę Wydziału Lekarsko-Biotechnologicznego i Medycyny Laboratoryjnej Pomorskiego Uniwersytetu Medycznego w Szczecinie. Promotor: dr n. med. Ewa Studniak. Oryginalny maszynopis obejmuje: 85 stron, 26 rycin, 12 tabel, 66 pozycji piśmiennictwa.

kariotypu obejmującym charakterystyczne aberracje chromosomów ($p = 0,07$).

Wnioski: Powyższe wyniki dowodzą zasadności wykonywania badań kariotypu oraz badań techniką FISH u pacjentów z podejrzeniem MDS. Analiza cytogenetyczna w połączeniu z innymi kryteriami diagnostycznymi zwiększa skuteczność

diagnostyczną, a także pozwala na dokładniejsze określenie grup ryzyka oraz wybór odpowiedniej metody leczenia pacjentów z MDS.

Słowa kluczowe: zespoły mielodysplastyczne; cytogenetyka klasyczna; fluorescencyjna hybrydyzacja in situ.

WSTĘP

Zespoły mielodysplastyczne (*myelodysplastic syndrome* – MDS), wg klasyfikacji Światowej Organizacji Zdrowia (World Health Organization – WHO) nowotwory mielodysplastyczne, to heterogenna grupa klonalnych chorób komórki macierzystej szpiku charakteryzująca się nieefektywną hematopoezą, czyli nieprawidłowym różnicowaniem i dojrzewaniem komórek szpiku [1, 2]. Wszelkie nieprawidłowości w morfologii komórek szpiku, do których dochodzi w wyniku ich zaburzonego rozwoju, czyli dysmiejopoezy, określane są jako mielodysplazja. Takie komórki nie są w stanie prawidłowo spełniać swojej funkcji w organizmie. Dysplazja może obejmować zmiany jakościowe: dyserytropoezę (zaburzenia linii erytroidalnej), dysgranulopoezę (zaburzenia linii granulocytarnej) oraz dysmegakariopoezę (zaburzenie linii megakariocytowej), a także ilościowe, przejawiające się wzrostem liczby komórek prekursorowych danej linii w szpiku. Cytopenię stwierdza się we krwi obwodowej [3, 4, 5]. Mechanizm powstawania MDS jest złożony i nie do końca poznany. U podłoża choroby znajduje się mutacja w genomie komórki macierzystej pnia. W badaniach doświadczalnych wykazano, iż w miejscach złamań chromosomów znajdują się geny odpowiedzialne za kodowanie cytokin oraz hematopoetycznych czynników wzrostowych, regulujących procesy różnicowania i dojrzewania [6, 7]. Zespół mielodysplastyczny jest jedną z najczęściej rozpoznawanych chorób układu krwiotwórczego. Zespoły mielodysplastyczne wg danych epidemiologicznych występują głównie u osób starszych, gdyż w grupie wiekowej powyżej 70. r.ż. następuje gwałtowny wzrost zachorowań na MDS, czego przyczyną mogą być gromadzone mutacje powstałe w wyniku działań substancji karcynogennych [8, 9]. Pierwsze doniesienia porównujące zachorowalność na MDS wg płci pacjentów prowadzone były w Düsseldorfie (jeszcze przed 1990 r.). Germing i wsp. twierdzą, że w grupie pacjentów powyżej 50. r.ż. częściej na zespoły mielodysplastyczne chorują mężczyźni niż kobiety [10, 11].

Rozpoznanie MDS opiera się na ilościowych i jakościowych zmianach w szpiku i krwi obwodowej. Do jednych z najważniejszych kryteriów rozpoznawczych MDS należy dyshematopoeza w szpiku charakteryzująca się nieprawidłowościami morfologicznymi komórek poszczególnych linii krwiotwórczych. Badania niezbędne do szczegółowej diagnostyki obejmują morfologię krwi z oceną rozmazu oraz ocenę szpiku: cytologiczną, histopatologiczną, cytochemiczną i cytogenetyczną [12, 13]. Pierwsza klasyfikacja zespołów mielodysplastycznych została opracowana przez Francusko-Amerykańsko-Brytyjską Grupę (FAB) w 1982 r. System FAB uwzględnił

odsetek blastów we krwi obwodowej i szpiku kostnym oraz charakterystykę morfologiczną komórek. Aktualna klasyfikacja zespołów mielodysplastycznych opublikowana została przez WHO w 2008 r. Klasyfikacja wg WHO wyróżnia zespoły mielodysplastyczne charakteryzujące się dysplazją jednoliniową lub wieloliniową z uwzględnieniem odsetka blastów oraz zmian cytogenetycznych [13, 14].

Różnorodność obrazu klinicznego, zmian cytologicznych oraz cytogenetycznych w szpiku doprowadziła do opracowania wielu modeli prognostycznych MDS, m.in. Międzynarodowego Indeksu Prognostycznego (International Prognostic Scoring System – IPSS). Indeks IPSS ma znaczenie kliniczne; wykorzystywany jest w klasyfikacji chorych do danego rodzaju leczenia, uwzględnia również korelację z czasem całkowitego przeżycia i czasem transformacji do ostrej białaczki szpikowej [2, 15, 16].

W diagnostyce zespołów mielodysplastycznych brak jest jednego markera genetycznego lub biologicznego, który pozwalałby w jednoznaczny sposób identyfikować pacjentów z MDS. Dlatego tak istotna wydaje się ocena aberracji chromosomowych w szpiku kostnym. Do najczęściej występujących zmian cytogenetycznych u pacjentów z MDS, identyfikowanych u ok. 40–50%, należą: delecja długich ramion chromosomów 5, 7 i 20 pary oraz trisomia chromosomu 8. W odniesieniu do niektórych zmian ustalono ich znaczenie prognostyczne. Związane z dobrym rokowaniem są: izolowana delecja długiego ramienia chromosomu 5 pary [tzw. zespół 5q-/del(5) q], delecja długiego ramienia chromosomu 20 pary [del(20)(q)], utrata chromosomu płciowego Y [-Y]; z pośrednim rokowaniem: trisomia chromosomu 8 pary [+8], kariotyp prawidłowy; ze złym rokowaniem: monosomia chromosomu 7 pary [-7], delecja długiego ramienia chromosomu 7 pary [del(7)(q-)] oraz klonalne aberracje występujące w liczbie ≥ 3 , definiując kariotyp złożony lub bardzo złożony ≥ 5 [10, 12, 17, 18]. Specyficzne zmiany cytogenetyczne są identyfikowane dzięki analizie badania kariotypu i/lub przy użyciu fluoroscencyjnej hybrydyzacji in situ (FISH). Zmiany cytogenetyczne pojawiają się w późniejszych stadiach rozwoju komórki macierzystej. Są one obecne dopiero na etapie ukierunkowanych komórek mieloidalnych, natomiast brak ich w początkowych etapach wszystkich linii krwiotwórczych [7]. Niemiecko-austriacką grupą uczonych w 2008 r. dowiodła, jak duże znaczenie diagnostyczne oraz prognostyczne mają badania cytogenetyczne w zespołach mielodysplastycznych, dające możliwość wyboru odpowiedniej metody leczenia [19].

Celem pracy była identyfikacja aberracji chromosomowych dorosłych pacjentów z rozpoznaniem zespołu mielodysplastycznego przy zastosowaniu metod cytogenetyki klasycznej

i techniki FISH oraz ocena przydatności i porównanie skuteczności obydwu metod. Zastosowana analiza statystyczna miała na celu zbadać korelację uzyskanych wyników cytogenetycznych z danymi klinicznymi pacjentów.

MATERIAŁY I METODY

Badaniem objęto grupę 38 pacjentów z podejrzeniem zespołu mielodysplastycznego. Dalszej analizie poddano 30 chorych, u których na podstawie całości obrazu klinicznego potwierdzono MDS, u pozostałych 8 rozpoznano inne choroby rozrostowe szpiku. Grupa liczyła 16 (53%) kobiet i 14 (47%) mężczyzn; mediana wyniosła 65,5 lata, natomiast średnia wieku 62 lat.

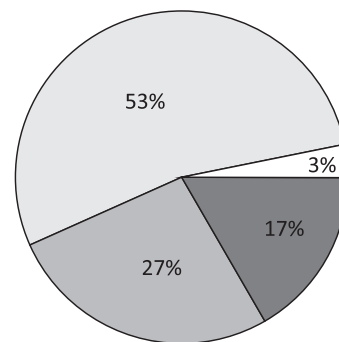
Materiał badawczy stanowił wynik badania szpiku kostnego pobrany do rutynowej diagnostyki od pacjentów z Oddziału Hematologii Samodzielnego Publicznego Szpitala Klinicznego nr 1 Pomorskiego Uniwersytetu Medycznego w Szczecinie w latach 2010–2011.

Dla każdego pacjenta przeprowadzono niestymulowane mitogenami 24 i 48 godz. hodowle szpiku kostnego, a następnie wykonano analizy technikami cytogenetyki klasycznej GTG (*G-banding using trypsyn and Giemsa*) i techniką FISH. Z uzyskanej zawiesiny komórek wykonano preparaty barwione metodą GTG, a następnie w systemie do automatycznego kariotypowania Spectral Imaging oceniano co najmniej 30 płytek metafazalnych. Badania techniką FISH wykonano przy użyciu specyficznych sond (*unique sequence probe*) – komplementarnych do określonej sekwencji DNA stosowanych w diagnostyce MDS:

1. Vysis EGR1 FISH Probe Kit.
2. Vysis LSI CSF1R Spectrum Orange/D5S23, D5S721 Spectrum Green Probes.
3. Vysis LSI D7S522 Spectrum Orange/CEP 7 Spectrum Green Probes.
4. Vysis LSI D20S108 Spectrum Orange Probe.
5. Vysis CEP X Spectrum Orange/Y Spectrum Green Direct Labeled Fluorescent DNA Probe Kit.
6. Vysis LSI RUNX1/RUNX1T1 Dual Color Dual Fusion Probes – sonda AML1/ETO (sonda wykorzystywana tylko do oznaczenia liczby kopii chromosomu 8 pary).

WYNIKI

Hodowlę szpiku kostnego przeprowadzono u wszystkich 30 pacjentów. Wynik badania kariotypu uzyskano u 29 z nich. Niepowodzeniem zakończyło się badanie kariotypu u 1 pacjenta, gdyż w całym materiale nie uzyskano komórek dzielących się (stwierdzono całkowity brak wzrostu hodowli metafaz). Badanie molekularne techniką FISH z wykorzystaniem sond dla locus 5q31, 5q33-34, 7q31 wykonano u wszystkich pacjentów. Dodatkowo u 3 pacjentów przeprowadzono badanie techniką FISH z sondą specyficzną dla locus 20q12 oraz u 2 chorych z sondą znakującą geny *RUNX1/RUNX1T1* (dawniej *AML1/ETO*)



Prawidłowy wynik badania kariotypu – 53%. Nieprawidłowy wynik obejmujący aberracje chromosomów Y, 3, 5, 7, 8 i 20 pary – 17%. Nieprawidłowy wynik badania kariotypu obejmujący inne aberracje chromosomów – 17%. Brak wyniku badania kariotypu 3%

RYCINA 1. Procentowy rozkład wyników badania kariotypu w badanej grupie pacjentów

w celu oznaczenia liczby chromosomów 8 pary. Jeden pacjent wykazał klonalną utratę chromosomu Y.

W oparciu o uzyskane analizy badania kariotypu i badania FISH wyniki pacjentów podzielono na trzy grupy. Do grupy I zaliczono pacjentów z prawidłowym wynikiem kariotypu i badania FISH. Grupę II stanowili pacjenci z aberracjami chromosomów mających znaczenie w diagnostyce i rokowaniu w MDS: byli to chorzy z delecjami długich ramion chromosomów 3, 5, 7 i 20 pary, z trisomią chromosomu 8 oraz utratą chromosomu płciowego Y. Do grupy III zaliczono pacjentów z aberracjami w innych pozostałych chromosomach (ryc. 1).

Grupa I – pacjenci z prawidłowym wynikiem kariotypu i badania FISH

Analizy cytogenetyczne oraz wyniki badań FISH w tej grupie pacjentów nie wykazały liczbowych ani strukturalnych zmian chromosomowych. Grupa liczyła 16 (53%) pacjentów, w tym 8 (50%) kobiet i 8 (50%) mężczyzn. Średnia wieku wynosiła 56 lat, mediana 63 lata. Wszystkim pacjentom zakwalifikowanym do grupy I wykonano badanie techniką FISH, stosując sondy specyficzne dla długich ramion chromosomów 5 i 7 pary. Badanie techniką FISH z sondą znakującą 20q12 przeprowadzono u 1 chorego. Analiza techniką FISH nie wykazała obecności żadnej z powyższych zmian. Wyniki badań kariotypu były zgodne z wynikami uzyskanymi techniką FISH u wszystkich pacjentów.

Grupa II – pacjenci z kariotypem nieprawidłowym obejmującym aberracje chromosomów Y, 3, 5, 7, 8 i 20 pary

Analiza cytogenetyczna i badanie techniką FISH wykazały izolowane lub współwystępujące z innymi aberracjami delecje długich ramion chromosomu 3, 5, 7, 20 pary, trzecią kopię chromosomu 8 lub monosomię chromosomu Y. Grupa liczyła 8 (27%) pacjentów, w tym 3 (38%) kobiety i 5 (62%) mężczyzn. Średnia wieku zachorowania wynosiła 68 lat, mediana 70,5 lat. Wszystkim pacjentom z tej grupy wykonano badanie techniką FISH w kierunku delecji/monosomii chromosomu 5 i 7 pary. Dodatkowo u 2 pacjentów przeprowadzono analizę techniką FISH z sondą znakującą region 20q12, a u 2 kolejnych określono odsetek komórek z obecnością trisomii chromosomu 8. Analiza

techniką FISH potwierdziła obecność w badaniu kariotypu delecję regionu 5q31 w przypadku 4 pacjentów, delecję 5q33-q34 u 3 pacjentów, delecję regionu 7q3 u 1 pacjenta, delecję regionu 20q12 u 1 pacjenta oraz trisomię chromosomu 8 u 2 pacjentów. Pacjent z utratą chromosomu płciowego Y stwierdzoną w badaniu kariotypu również w badaniu techniką FISH nie wykazał obecności tego chromosomu. W badaniu kariotypu 1 pacjent wykazał delecję długiego ramienia chromosomu 20 pary w innym regionie niż 20q12, dlatego badanie techniką FISH z zastosowaniem tej sondy wykazało wynik prawidłowy. Wśród wszystkich pozostałych pacjentów zakwalifikowanych do tej grupy wystąpiła zgodność kariotypów z wynikami uzyskanymi techniką FISH.

Grupa III – pacjenci z kariotypem nieprawidłowym z aberracjami pozostałych chromosomów

Analiza cytogenetyczna i analiza techniką FISH wykazały obecność innych zmian niż delecje długich ramion chromosomów 3, 5, 7, 20 pary, trisomia chromosomu 8 czy utrata chromosomu płciowego Y. Grupa liczyła 5 (17%) pacjentów, w tym 2 (40%) kobiety oraz 3 (60%) mężczyzn. Średnia wieku zachorowania wynosiła 67 lat, mediana 61 lat. Wszyscy pacjenci zakwalifikowani do grupy III mieli wykonane badanie techniką FISH pod kątem oceny chromosomów 5 i 7 pary i u nikogo nie stwierdzono zmian w tych chromosomach.

W badaniu cytogenetycznym w tej grupie chorych pojawiły się różne, trudne do interpretacji metodami GTG markery chromosomowe: u 2 pacjentów stwierdzono przypadkowe utraty pojedynczych chromosomów, u 1 osoby stwierdzono dodatkowy materiał na dolnym ramieniu chromosomu 7 oraz zmiany strukturalne chromosomu 12 pary (inne niż opisywane w MDS/AML), a także u 1 pacjenta obecne były zmiany strukturalne chromosomu 1 pary, nieopisywane w literaturze.

Analizy statystyczne przeprowadzono z użyciem następujących danych: płeć, wiek zachorowania oraz wynik badania kariotypu każdego pacjenta. Po przeanalizowaniu wszystkich wyników cytogenetycznych pacjentom z prawidłowym

wynikiem badania kariotypu nadano sygnaturę (symbol) A, natomiast osobom, u których w badaniu kariotypu stwierdzono utratę chromosomu Y oraz aberracje chromosomów 3, 5, 7, 8 i 20 pary, nadano symbol B, a cechę C pacjentom z wszystkimi innymi zmianami chromosomów (ryc. 2).

Analiza statystyczna obejmowała ocenę korelacji pomiędzy płcią a wiekiem zachorowania pacjentów na MDS oraz zależność pomiędzy wiekiem zachorowania pacjentów na MDS a wynikiem badania kariotypu – dla każdej z 3 kategorii. Analizy dokonano przy użyciu m.in. testu Andersona–Darlinga oraz GLM (uogólnionego modelu liniowego) – tabela 1.

TABELA 1. Wyniki analizy statystycznej

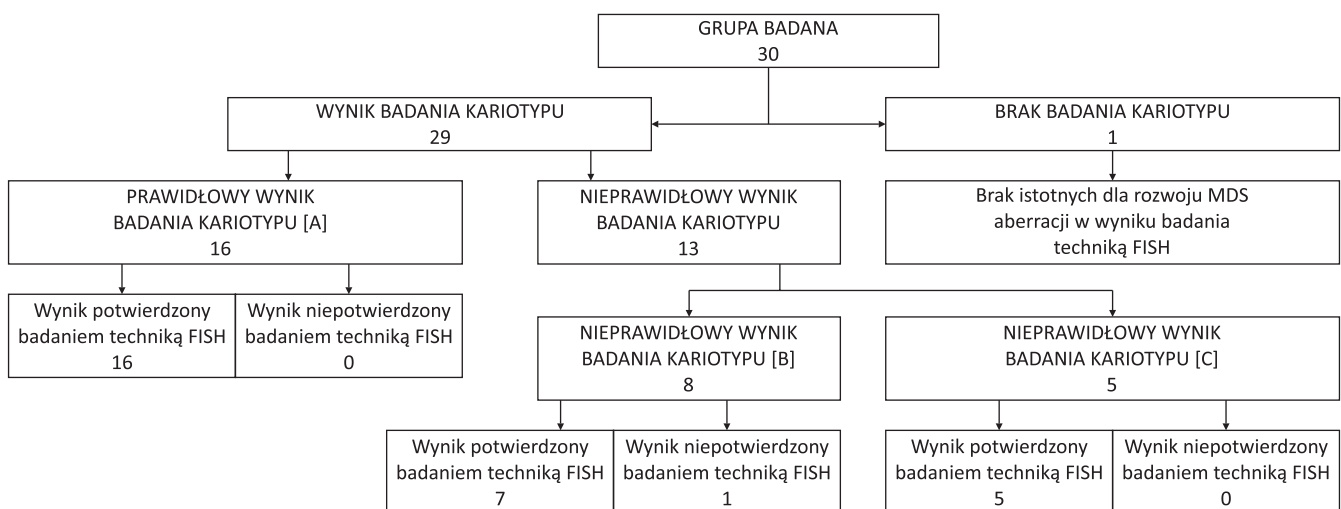
Parametry	Średni wiek zach.	SD	Zakres	p
Płeć (K)	57	15,01	19–77	ref
Płeć (M)	67	16,76	24–86	0,035
Kariotyp A	56	18,18	19–78	ref
Kariotyp B	68	8,85	54–77	0,07
Kariotyp C	67	15,31	49–86	0,17

Płeć: K – kobieta; M – mężczyzna; Kariotyp: A – prawidłowy; B – kariotyp, w którym stwierdzono aberracje chromosomów Y, 3, 5, 7, 8 i 20 pary; C – nieprawidłowy wynik badania kariotypu, inny niż w grupie B.

Wykazano istotną korelację (p = 0,035) pomiędzy płcią a wiekiem zachorowania pacjentów na MDS. Porównując wiek zachorowania pacjentów z kariotypem A i z kariotypem B, nie uzyskano istotnej korelacji, mimo iż wartość p (p = 0,07) zbliżona jest do wartości granicznej. Także w przypadku pacjentów z kariotypem A i C nie uzyskano istotności statystycznej (p = 0,17) przy założeniu p = 0,05.

DYSKUSJA

W ostatnich latach nastąpił wzrost liczby zachorowań na zespoły mielodysplastyczne. Według najnowszych danych



A – prawidłowy wynik; B – nieprawidłowy wynik; C – nieprawidłowy wynik, inny niż aberracje chromosomów Y, 5, 7, 8 i 20 pary

RYCINA 2. Badania kariotypu obejmujące aberracje chromosomów: Y, 3, 5, 7, 8 i 20 pary

liczba zachorowań na MDS w Polsce wzrosła z ok. 1156 nowych zachorowań w ciągu roku (3/100 000)/rok do ok. 2000 (5/100 000)/rok [20, 21, 22].

Porównanie parametrów klinicznych

Zapadalność na zespoły mielodysplastyczne jest inna dla kobiet i inna dla mężczyzn. Stosunek płci męskiej do żeńskiej (M:K), w zależności od źródła danych literaturowych, jest zmienny. Skonieczka i wsp. zauważyli, że częściej chorują mężczyźni, a stosunek liczbowy wynosi 1,6:1 [23]; porównywalną częstość zachorowania mężczyzn i kobiet 1:1,04 uzyskali Sekeres i Maciejewski [21], zaś wyższą częstość zachorowania wśród kobiet opisali Romeo i Chauffaille: 1:1,7 [24]. Stosunek liczbowy mężczyzn i kobiet w badanej grupie wyniósł 1:1,14; mężczyźni stanowili 46% pacjentów, natomiast kobiety 54%, co pozostaje zgodne z wynikami pracy Sekerese i Maciejewskiego [21].

Zespoły mielodysplastyczne należą do chorób wieku starszego, a średni wiek zachorowania wynosi ponad 60 lat [21, 24, 25]. W przebadanej grupie 33% stanowili pacjenci poniżej 60. r.ż., a 67% osoby, które ukończyły co najmniej 60 lat. Średni wiek zachorowania wyniósł 62 lata, a przedział wiekowy 19–86 lat. Wyższy wiek zachorowania wśród pacjentów cierpiących na MDS opisali Cordoba i wsp. Badana przez nich grupa obejmowała wyłącznie pacjentów z nieprawidłowym wynikiem kariotypu, m.in. delecję lub monosomię chromosomu 7, a średni wiek zachorowania wynosił 69 lat [26]. Zależność ta może dowodzić, iż wraz z wiekiem pacjenta wzrasta liczba posiadanych mutacji i – co się z tym wiąże – aberracji chromosomalnych.

Czynnikiem wpływającym na wiek zachorowania wydaje się także pochodzenie geograficzne. Znacznie niższy średni wiek zachorowania na MDS wśród populacji azjatyckiej, wynoszący zaledwie 51 lat, oraz bardzo niski odsetek pacjentów powyżej 60. r.ż., opisany w pracy Junga i wsp., może przemawiać za tym stwierdzeniem [27].

Aberracje chromosomowe obecne u pacjentów z MDS

Wśród pacjentów cierpiących na MDS nieprawidłowy wynik badania kariotypu obserwuje się u ok. 50% chorych [28]. Analiza cytogenetyczna przeprowadzona na grupie 30 pacjentów z województwa zachodniopomorskiego wykazała zmiany chromosomalne u 14 (47%) z nich i jest zbliżona do danych literaturowych.

Ze względu na szeroki zakres zmian w uzyskanych wynikach kariotypów badanych pacjentów dokonano ich podziału na dwie grupy. Grupa I obejmowała pacjentów z utratą chromosomy Y oraz aberracjami chromosomów: 3, 5, 7, 8, 20 pary, najczęściej opisywanych w zespołach mielodysplastycznych. Grupę II stanowiły osoby z aberracjami pozostałych chromosomów.

Jedną z najczęściej obserwowanych zmian cytogenetycznych wśród pacjentów z zespołem mielodysplastycznym jest delecja długiego ramienia chromosomu 5 pary, obecna u 10–15% chorych. Według danych literaturowych utracie ulega najczęściej segment obejmujący prążki 5q31 i 5q33–34. Region 5q31 zawiera geny supresorowe, m.in. geny *ERG1*, *CTNNA1*, *CSF2*, których delecja związana jest z rozwojem t-MDS (*therapy related MDS*). Region 5q33–34 zawiera drugi typ genów supresorowych,

do których należy m.in. gen *PDGFRB*, a ich delecja częściowo związana jest z tzw. syndromem 5q-. Zespół 5q(-) stanowi odrębny klinicznie typ MDS, a delecja długiego ramienia chromosomu 5 pary jest jedyną izolowaną zmianą obserwowaną w cytogenetyce [28, 29, 30, 31].

W badanej grupie chorych delecję długiego ramienia chromosomu 5 pary stwierdzono u 4 pacjentów (ok. 13,3% całej badanej grupy), co pokrywa się z danymi literaturowymi. Jednocześnie delecję regionu 5q31 oraz 5q33–34 stwierdzono u 3 osób. U 2 pacjentów stwierdzono izolowaną delecję długiego ramienia chromosomu 5, a u 2 innych współistniejącą delecję chromosomu 5 z innymi aberracjami. Współistnienie w badaniu kariotypu delecji w długim ramieniu chromosomu 5 pary z innymi klonalnymi zmianami, w przeciwieństwie do izolowanej *del(5)(q)*, wykazuje gorsze znaczenie prognostyczne [23, 32].

Trisomia chromosomu 8 pary była drugą najczęściej obserwowaną zmianą w badaniu kariotypu analizowanej grupy. Taki wynik badania był obecny u 2 pacjentów (6,6% wszystkich chorych), co pozostaje zgodne z danymi literaturowymi. Trisomia chromosomu 8 pary wiąże się z pośrednim rokowaniem, natomiast rokowanie jest gorsze, jeśli występuje większa liczba kopii chromosomu 8, np. tetrasomia (cztery kopie chromosomu 8) [29, 32, 33, 34].

Z porównywalną częstością co trisomia 8 pary wśród badanej grupy chorych występowała delecja długiego ramienia chromosomu 20, obecna u 2 pacjentów. W zespołach mielodysplastycznych delecji ulega najczęściej długie ramię chromosomu 20, obejmujące region 20q11–q13, co wiąże się z dobrym rokowaniem i występuje u ok. 2–5% chorych [29, 35]. Delecja długiego ramienia chromosomu 20 pary występowała u 6,6% badanych pacjentów i była nieznacznie wyższa niż dane literaturowe.

Do zmian typowych występujących stosunkowo często w badaniu kariotypu pacjentów z MDS należą aberracje chromosomu 7. Obecne są u ok. 10–20% chorych. Zazwyczaj obejmują delecję długiego ramienia lub całkowitą utratę chromosomu 7. Główne punkty złamań obejmują prążki 7q11–q22, gdzie zlokalizowane są m.in. geny *EPO* czy *ASNS* oraz prążki 7q31–q36 obejmujące m.in. sekwencje D7S522 i WI-5336. Ostatnie badania dowodzą, że delecja długiego ramienia chromosomu 7 pary wiąże się z lepszym rokowaniem niż monosomia 7. Aberracje chromosomu 7 wiążą się z ogólnie złym rokowaniem, a średnie przeżycie to 1 rok/2 lata [26, 29, 36]. W porównaniu z danymi pochodzącymi z literatury, w badanej grupie pacjentów delecja chromosomu 7 była znacznie rzadsza, obecna zaledwie u 1 pacjenta (3,3%), co może wynikać z niewielkiej grupy przebadanych chorych.

W badaniu kariotypu pacjentów z MDS u ok. 2% obserwuje się aberracje chromosomu 3 pary, głównie z punktami złamań 3q21 i 3q26. Obszar ten zawiera protoonkogen *EVI1*. W wyniku translokacji lub inwersji dochodzi do aktywacji onkogenu i zahamowania dojrzewania w układzie mielo- i erytropoetycznym. W badaniu kariotypu widoczna jest wówczas inwersja lub translokacja obejmująca prążek 3q26; zmiana ta wykazuje niekorzystne znaczenie prognostyczne. Obserwowaną aberracją współistniejącą jest najczęściej -7/7q [31, 35, 37]. W badanej

grupie chorych aberracja chromosomu 3 pary obecna była u 1 pacjenta (3,3% wszystkich chorych), a zmianami współistniejącymi były delecje w długich ramionach chromosomów 5 i 7 pary. Współwystępowanie tych aberracji również opisuje literatura. W badanej grupie chorych monosomię chromosomu Y zaobserwowano u 7% mężczyzn (1 pacjent), co nieznacznie odbiega od danych dostępnych w piśmiennictwie [38], w którym autorzy podają, że odsetek komórek z utratą chromosomu Y przekraczający 75% jest bardziej związany z rozwojem zespołu mielodysplastycznego niż z wiekiem pacjenta. Według International MDS risk Analysis Workshop aberracja ta koresponduje z korzystnym rokowaniem [39].

Pozostali chorzy wykazali w badaniu kariotypu aberracje innych niż opisywane w literaturze MDS chromosomów: chromosomu 12 pary, ale nieobejmującą genu *ETV6* (1 pacjent), chromosomu X (1 pacjent), 7 pary nieobejmujące genów kluczowych dla MDS (1 pacjent), chromosomu 1 pary (1 pacjent). Dodatkowo wśród wyników cytogenetycznych u 3 osób z wynikiem kariotypu C stwierdzono obecność nieklonalnych zmian i markerów nieznanego pochodzenia. Nieprawidłowości wymienionych chromosomów nie mają udokumentowanego wpływu na przebieg i rodzaj MDS; być może większa liczba pacjentów z tymi samymi zmianami pozwoliłaby na dokładniejszą ich analizę.

Na podstawie badań prowadzonych przez Jung i wsp. wnioskować można, iż rozkład i częstość aberracji chromosomowych obecnych w populacji zależy od pochodzenia chorych na MDS. Procentowy udział poszczególnych aberracji jest inny w przypadku populacji europejskich i azjatyckich. Do najczęstszych aberracji w populacji azjatyckiej, wśród pacjentów z nieprawidłowym wynikiem kariotypu, należą: +8 (35%), 1q+ (17%), 5q- (15,5%), 20q- (13%), -7 (8%), -5 (7%), +21 (7%) i 7q- (6%) [27], natomiast Haase i wsp. w badaniach prowadzonych na populacji europejskiej stwierdzili inny rozkład tych zmian: 5q- (30%), -7/7q- (21%), +8 (16%), -18/18q- (7%), 20q (7%) [28]. Niezależnie jednak od typu aberracji i jej znaczenia rokowniczego obecność trzech lub więcej zmian cytogenetycznych wiąże się ze złym rokowaniem.

Ocena cytogenetyczna jest zatem istotnym czynnikiem wyboru metody leczenia (bardziej lub mniej agresywnej) oraz monitorowania jej skuteczności [29].

Ocena przydatności metod GTG i FISH w diagnozowaniu pacjentów z MDS

Zmiany genetyczne analizuje się rutynowo za pomocą metod cytogenetycznych i molekularnych. Celem badań cytogenetycznych jest analiza i ocena kariotypu pod kątem struktury i liczby chromosomów. Metody cytogenetyki klasycznej polegają na analizie obrazu prążkowego chromosomów, uzyskanego przez zastosowanie specjalnych technik barwienia. Czułość i rozdzielczość GTG zależą od stopnia kondensacji chromosomów (uzyskanej rozdzielczości prążkowej). Im mniejszy stopień kondensacji chromosomów, tym wyższa rozdzielczość prążkowa i dokładniejszy wynik. Badanie techniką klasyczną GTG umożliwia analizę wszystkich chromosomów jednocześnie; pozwala potwierdzić podejrzenie danej choroby i czasem nieoczekiwanie zmienić diagnozę dzięki wykrytym innym,

nieoczekiwanym zmianom chromosomalnym. Niewątpliwym ograniczeniem metody jest ocena wyłącznie komórek proliferujących, których indeks mitotyczny w szpiku kostnym może być niski [40]. Skutecznej oceny badania kariotypu dokonano u 97% badanych chorych; jedynie w przypadku 1 pacjenta nie udało się uzyskać wyniku.

Fluorescencyjna hybrydyzacja in situ jest podstawową techniką cytogenetyki molekularnej i stanowi uzupełnienie cytogenetyki klasycznej. Celem badania FISH jest identyfikacja określonych fragmentów DNA przy użyciu specyficznych sond molekularnych, komplementarnych do części poszukiwanego genu lub chromosomu. Umożliwia również identyfikację mikroaberracji (1–10 Mb) niewidocznych w GTG. Metoda FISH jest ukierunkowaną analizą zmian genetycznych nieuwzględniającą innych aberracji chromosomowych (wykrywa tylko poszukiwane aberracje przy użyciu określonej sondy). Metoda techniką FISH, w porównaniu z techniką GTG, pozwala analizować dużo większą liczbę komórek zarówno w stadium metafazy, jak i interfazy, co w przypadku braku wyniku badania kariotypu jest niezwykle istotne [40, 41, 42]. I tak w przypadku pacjenta, u którego nie udało się uzyskać hodowli metafaz, badanie FISH wykluczyło nieprawidłowości chromosomów 5, 7, 8, 20, jednak nie pozwoliło na analizę pozostałych chromosomów. Natomiast u pacjenta, u którego analiza kariotypu wykazała delecję długiego ramienia chromosomu 20, badanie FISH wykluczyło delecję regionu 20q12, charakterystycznego w przebiegu MDS. Przyczyną niezgodności wyników uzyskanych metodą GTG i FISH była najprawdopodobniej delecja innego regionu niż 20q12.

Wielu autorów podkreśla znaczenie uzupełniania się klasycznych i molekularnych metod cytogenetycznych. Romeo i Chauffaille przebadali grupę chorych na MDS, wykorzystując technikę GTG i FISH. W grupie 40 pacjentów aberracje chromosomowe stwierdzono w 16 przypadkach. Wykorzystanie wyłącznie techniki GTG pozwoliło wykryć aberracje chromosomowe u 35,2% osób, natomiast technika FISH uwidoczniła zmiany obecne również u 35% pacjentów. Równoczesne wykorzystanie obu metod pozwoliło na wykrycie aberracji chromosomowych u 40% osób [24]. Skonieczka i wsp. stwierdzili aberracje wśród 35 z 58 chorych na MDS. W 25 przypadkach aberracje chromosomowe wykryto przy użyciu techniki GTG, zaś wykorzystanie techniki FISH umożliwiło wykrycie dodatkowych aberracji u 10 pacjentów, a w 6 przypadkach aberracje chromosomowe przy użyciu GTG i FISH były identyczne. Autorzy obu prac stwierdzają, iż metody cytogenetyki klasycznej i molekularnej zarówno zapewniają korzyści, jak i mają ograniczenia. Jednoczesne stosowanie obu metod zwiększa skuteczność diagnostyczną, pozwala na dokładniejsze przydzielenie pacjentów do grup ryzyka oraz wybór odpowiedniej metody leczenia [23].

Porównanie wyników analizy statystycznej

Wykazano zależność istotną statystycznie pomiędzy płcią a średnim wiekiem zachorowania pacjentów na MDS. Zachorowalność po 70. r.ż. jest wyższa u mężczyzn ($p = 0,035$). Średni wiek zachorowania wyniósł 57 lat w przypadku kobiet i aż 67

w przypadku mężczyzn. Wyniki te korelują z wynikami innych autorów. Germing i wsp. stwierdzili, że wskaźniki zapadalności na MDS są znacznie wyższe u mężczyzn w starszych grupach wiekowych (>60, 70 lat) [10].

Analiza statystyczna nie wykazała bezpośredniej korelacji pomiędzy uzyskanym wynikiem badania kariotypu (A, B, C) a średnią wieku zachorowania. Należy jednak zwrócić uwagę, iż uzyskana wartość $p = 0,07$, dotycząca wieku zachorowania osób z prawidłowym wynikiem kariotypu (A) i pacjentów z wynikiem badania kariotypu (B) obejmującym utratę chromosomu Y oraz aberracje chromosomów 3, 5, 7, 8 i 20 pary, była bliska wartości granicznej ($p = 0,05$), mimo niezbyt licznej grupy pacjentów. Znacznie wyższą wartość $p = 0,17$ uzyskano, badając korelację u chorych z prawidłowym wynikiem badania kariotypu (A) i chorych z aberracjami w pozostałych chromosomach (C).

Średni wiek zachorowania pacjentów z kariotypem A wyniósł 56 lat i był najniższy spośród wszystkich grup, pacjentów z kariotypem B – 68 lat, zaś z kariotypem C – 67 lat. Pomimo że średni wiek zachorowania pacjentów mających nieprawidłowy wynik badania kariotypu był wyższy niż osób z prawidłowym wynikiem badania kariotypu, nie uzyskano wartości istotnych statystycznie. Czynnikiem, który w znacznym stopniu wpłynął na ocenę statystyczną, była mała liczebność grupy badanej. Zwiększenie liczby pacjentów być może pozwoliłoby na uzyskanie wartości istotnych statystycznie. Niezależnie od wartości korelacji, na podstawie uzyskanych danych można stwierdzić, iż w badanej grupie pacjentów posiadających aberracje chromosomowe typowe dla MDS średni wiek zachorowania jest wyższy niż u osób posiadających kariotyp prawidłowy. W badaniach prowadzonych przez Cordoba i wsp. wśród pacjentów z aberracją chromosomu 7 charakterystyczną dla MDS średni wiek zachorowania pacjentów wyniósł 69 lat [26]. Wartość ta pokrywa się ze średnim wiekiem zachorowania osób z nieprawidłowym wynikiem badania kariotypu w postaci utraty chromosomu Y oraz aberracjami chromosomów: 3, 5, 7, 8 i 20 pary.

Zespoły mielodysplastyczne są chorobą objawiającą się szerokim zakresem zmian cytogenetycznych. Pomimo powstania licznych nowych metod biologii molekularnej, niezmiennie badanie kariotypu stanowi podstawę rutynowej diagnostyki MDS, pozwalając na analizę struktury i liczby wszystkich chromosomów jednocześnie. Stosowanie wyłącznie metod prążkowych GTG nie zawsze jest wystarczające do pełnej diagnostyki i powinno być uzupełnione technikami o wyższej rozdzielczości, np. FISH. Rolą badań cytogenetycznych pacjentów z MDS jest nie tylko identyfikacja aberracji chromosomowych, lecz także ocena rokowania, wybór metody leczenia oraz ocena jej skuteczności.

WNIOSKI

1. Delecja długiego ramienia chromosomu 5 pary to wciąż najczęściej występującą aberracją cytogenetyczną u pacjentów z rozpoznaniem zespołu mielodysplastycznego.

2. Częstość pojawiania się w szpiku kostnym aberracji chromosomowych wzrasta wraz z wiekiem pacjenta.

3. Jednoczesne wykorzystanie metod cytogenetyki klasycznej i molekularnej podnosi skuteczność diagnostyczną i zwiększa wykrywalność aberracji chromosomowych.

4. U pacjentów po 70. r.ż. zachorowalność na MDS jest wyższa u mężczyzn.

5. Średni wiek zachorowania wśród pacjentów wykazujących w badaniu kariotypu aberracje typowe dla MDS jest wyższy niż u osób z prawidłowym wynikiem badania kariotypu.

PIŚMIENNICTWO

1. Marshall D, Roboz GJ. Standardizing the initial evaluation for myelodysplastic syndromes. *Curr Hematol Malig Rep* 2013;8:361-9.
2. Mądry K. Klasyfikacja i czynniki prognostyczne w zespołach mielodysplastycznych. *Acta Haematol Pol* 2011;42:171-6.
3. Giagounidis A, Haase D. Morphology, cytogenetics and classification of MDS. *Best Pract Res Clin Haematol* 2013;26:337-53.
4. Craig JIO, McClelland DBL, Ludlam CA. Choroby krwi. In: Kokot F, Hyla-Klekt L, editors. *Choroby wewnętrzne Davidsona*. T. 3. Wrocław: Elsevier Urban & Partner; 2010. p. 925-35.
5. Mądry K. Klasyfikacja i czynniki prognostyczne w zespołach mielodysplastycznych. *Acta Haematol Pol* 2011;42:171-6.
6. Homenda W, Pejska M, Kochanowska-Demczyna A. Zespoły mielodysplastyczne – patogeneza i leczenie. *Wiad Lek* 2005;58:204-9.
7. Szymała K, Komarnicki M. Zespoły mielodysplastyczne. *Współcz Onkol* 2003;7:692-701.
8. Rekomendacja nr 17/2011 Prezesa Agencji Oceny Technologii Medycznych z dnia 28 marca 2011 r. w sprawie usunięcia z wykazu świadczeń gwarantowanych albo zmiany poziomu lub sposobu finansowania świadczenia gwarantowanego „leczenie zespołów mielodysplastycznych przy wykorzystaniu produktu leczniczego Vidaza (azacytydyna)”, rozumianego, jako wchodzącego w skład programu terapeutycznego chemioterapii niestandardowej. Agencja Oceny Technologii Medycznych. http://onkologia-online.pl/upload/12/22/RP_17_2011_azacytydyna_Vidaza_MDS.pdf (5.06.2012).
9. Dmoszyńska A, Giannopoulos K. Nowotwory hematologiczne wieku starszego. *Post Biol Komórki* 2005;32:115-24.
10. Germing U, Strupp C, Kundgen A, Bowen D, Aul C, Haas R, et al. No increase in age-specific incidence of myelodysplastic syndromes. *Haematologica* 2004;89(8):905-10.
11. Mądry K, Dwilewicz-Trojaczek J, Jędrzejczak WW. Epidemiology of myelodysplastic syndromes. *Adv Clin Exp Med* 2009;18:415-24.
12. Cioch M. Zespoły mielodysplastyczne. *Zamojskie Studia i Materiały* 2011;34:65-9.
13. Kata D, Kyrzc-Krzemień S. Zespoły mielodysplastyczne – współczesna diagnostyka, klasyfikacja i leczenie. Część I: Diagnostyka, klasyfikacja i stratyfikacja prognostyczna zespołów mielodysplastycznych. *Post Nauk Med* 2011;6:499-503.
14. Becha M, Braham Jmili N. Myelodysplastic syndromes: pathophysiology, clinical and biological features. *Ann Biol Clin (Paris)* 2015;73(6):643-56.
15. Dwilewicz-Trojaczek J, Deptała A, Hellmann A, Mądry K, Podolak-Dawidziak M, Warzocha K. Diagnostyka, klasyfikacja i leczenie zespołów mielodysplastycznych – zalecenie ekspertów polskich. *Acta Haematol Pol* 2010;41:101-14.
16. Valent P, Horny HP, Bennett JM, Fonatsch C, Germing U, Greenberg P, et al. Definitions and standards in the diagnosis and treatment of the myelodysplastic syndromes: Consensus statements and report from a working conference. *Leuk Res* 2007;31:727-36.
17. Mihon C. Chromosomal abnormalities in myeloproliferative disorders (myelodysplastic syndromes, acute myeloid leukemia). *Doctor Tipster*. <http://www.doctortipster.com/9419-chromosomal-abnormalities-in-myeloproliferative-disorders-myelodysplastic-syndromes-acute-myeloid-leukemia.html> (5.06.2012).

18. Hofmann W-K, Lübbert M, Hoelzer D, Koefler HP. Myelodysplastic syndromes. *Hematology J* 2004;5:1-8.
19. Valent P, Hofmann W-K, Büsche G, Sotlar K, Horny H-P, Haase D, et al. Meeting report: Vienna 2008 Workshop of the German–Austrian Working Group for Studying Prognostic Factors in Myelodysplastic Syndromes. *Ann Hematol* 2009;88(7):607-11. doi: 10.1007/s00277-008-0673-7.
20. Sekeres MA. The epidemiology of myelodysplastic syndrome. *Hematol Oncol Clin North Am* 2010;24(2):287-94. doi: 10.1016/j.hoc.2010.02.011.
21. Sekeres MA, Maciejewski JP. Perceptions of disease state, treatment outcomes, and prognosis among patients with myelodysplastic syndromes: results from an internet-based survey. *Oncologist* 2011;16:904-11.
22. Stanowisko Rady Przejrzystości nr 18/2012 z dnia 16 marca 2012 r. w zakresie usunięcia z wykazu świadczeń gwarantowanych/zmiany poziomu lub sposobu finansowania świadczenia gwarantowanego „Podanie lenalidomidu we wskazaniu zespoły mielodysplastyczne/mieloproliferacyjne”. Rada Przejrzystości. Agencja Oceny Technologii Medycznych. http://www.oadm.gov.pl/assets/files/rada/rekomendacje_stanowiska/2012_SRP/R-18-2012-Revlimid/Stanowisko_RP_AOTM_18_2012_Revlimid_zesp_mielodysplastyczne.pdf (13.04.2013).
23. Skonieczka K, Duszeńko E, Wyrowińska E, Haus O. Usefulness of classic cytogenetic testing compared to fluorescence in situ hybridization in genetic diagnosis of 58 patients with myelodysplastic syndromes. *Pol Arch Med Wewn* 2009;119:366-72.
24. Romeo M, Chauffaille M. Comparison of cytogenetics with FISH in 40 myelodysplastic syndrome patients. *Leuk Res* 2002;26:993-6.
25. Catenacci DVT, Schiller GJ. Myelodysplastic syndromes: A comprehensive review. *Blood Rev* 2005;19:301-19.
26. Cordoba I, González-Porrás JR, Nomdedeu B, Luño E, de Paz R, Such E, et al. Better prognosis for patients with del(7q) than for patients with monosomy 7 in myelodysplastic syndrome. *Cancer* 2012;118:127-33.
27. Jung SW, Lee SY, Jekarl D-W, Kim M, Lim J, Kim Y, et al. Cytogenetic characteristics and prognosis analysis in 231 myelodysplastic syndrome patients from a single institution. *Leuk Res* 2011;35:735-40.
28. Haase D, Germing U, Schanz J, Pfeilstöcker M, Nösslinger T, Hildebrandt B, et al. New insights into the prognostic impact of the karyotype in MDS and correlation with subtypes: evidence from a core dataset of 2124 patients. *Blood* 2007;110:4385-95.
29. Dwilewicz J, Mądry K. Zespoły mielodysplastyczne. In: Dmoszyńska A, editor. *Hematologia*. Warszawa: Medical Tribune Polska; 2011. p. 398-416.
30. Maryniak RK. Klasyfikacja morfologiczna zespołów mielodysplastycznych wg zaleceń WHO 2008. *Acta Haematol Pol* 2011;42:165-9.
31. Olney HJ, le Beau MM. Myelodysplastic Syndrom. In: Heim S, Mitelman F, editors. *Cancer cytogenetics*. 3rd ed. Wiley-Blackwell: John Wiley & Sons, Hoboken; 2009. p. 141-78.
32. Garcia-Manero G. Myelodysplastic syndromes: 2012 update on diagnosis, risk-stratification, and management. *Am J Hematol* 2012;87:692-701.
33. Paulsson K, Johansson B. Trisomy 8 as the sole chromosomal aberration in acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndromes. *Pathol Biol (Paris)* 2007;55(1):37-48.
34. Saumell S, Florensa L, Luño E, Sanzo C, Cañizo C, Hernández JM, et al. Prognostic value of trisomy 8 as a single anomaly and the influence of additional cytogenetic aberrations in primary myelodysplastic syndromes. *Br J Haematol* 2012;159:311-21.
35. Haus O. Zmiany cytogenetyczne i molekularne w zespołach mielodysplastycznych i ich znaczenie kliniczne. *Pol Arch Med Wewn* 1998;99:114-22.
36. Panani AD, Roussos Ch. Cytogenetic aspects of adult primary myelodysplastic syndromes: Clinical implications. *Cancer Lett* 2006;235:177-90.
37. Piątkowska-Jakubas B, Skotnicki AB. Czynniki prognostyczne w ostrej białaczce szpikowej. *Acta Haematol Pol* 2010;41:381-93.
38. Nomdedeu M, Pereira M, Calvo X, Colomer J, Sole F, Arias A, et al. Clinical and biological significance of isolated Y chromosome loss in myelodysplastic syndromes and chronic myelomonocytic leukemia. A report from the Spanish MDS Group. *Leuk Res* 2017;28:85-9.
39. Heim S, Mitelman F, editors. *Cancer cytogenetics*. 3rd ed. John & Sons; 2009. DS. p.147.
40. Haus O. Badania cytogenetyczne i molekularne. In: Dmoszyńska A, editor. *Hematologia*. Warszawa: Medical Tribune Polska; 2011. p. 117-36.
41. Szczaluba K, Obersztyn E, Mazurczak T. Zastosowanie nowoczesnych technik cytogenetyki molekularnej w diagnostyce wrodzonych wad rozwojowych. *Perinatol Neonatol Ginekol* 2010;3:108-16.
42. Kokate P, Dalvi R, Koppaka N, Mandawa S. Prognostic classification of MDS is improved by the inclusion of FISH panel testing with conventional cytogenetics. *Cancer Genet* 2017;216-217:120-7. doi: 10.1016/j.cancergen.2017.05.004.