



ΕΘΝΙΚΟ & ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
«ΚΛΙΝΙΚΗ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑ-ΜΟΡΙΑΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΗ»

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

**ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΩΝ PD-1/PD-L1 ΣΕ ΚΑΚΟΗΘΗ
ΑΙΜΑΤΟΛΟΓΙΚΑ ΝΟΣΗΜΑΤΑ**

ΑΘΑΝΑΣΙΟΣ ΔΟΔΟΠΟΥΛΟΣ
ΒΙΟΛΟΓΟΣ

ΑΘΗΝΑ 2018



ΕΘΝΙΚΟ & ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
«ΚΛΙΝΙΚΗ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑ-ΜΟΡΙΑΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΗ»

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

**ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΩΝ PD-1/PD-L1 ΣΕ ΚΑΚΟΗΘΗ
ΑΙΜΑΤΟΛΟΓΙΚΑ ΝΟΣΗΜΑΤΑ**

ΑΘΑΝΑΣΙΟΣ ΔΟΔΟΠΟΥΛΟΣ
ΒΙΟΛΟΓΟΣ

ΑΘΗΝΑ 2018



ΕΘΝΙΚΟ & ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΚΑΙ

Γ.Ν.Α. «Ο ΕΥΑΓΓΕΛΙΣΜΟΣ»

ΤΜΗΜΑ ΑΝΟΣΟΛΟΓΙΑΣ-ΙΣΤΟΣΥΜΒΑΤΟΤΗΤΑΣ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΙΑΣ ΡΟΗΣ

**ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΩΝ PD-1/PD-L1 ΣΕ ΚΑΚΟΗΘΗ
ΑΙΜΑΤΟΛΟΓΙΚΑ ΝΟΣΗΜΑΤΑ**

**ΑΘΑΝΑΣΙΟΣ ΔΟΔΟΠΟΥΛΟΣ
ΒΙΟΛΟΓΟΣ**

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΜΕΛΟΣ ΔΕΠ: Ε. Λιανίδου, Καθηγήτρια, Τμήμα Χημείας, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών (ΕΚΠΑ)

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

- Ε. Λιανίδου, Καθηγήτρια, Τμήμα Χημείας, Σχολή Θετικών Επιστημών, ΕΚΠΑ
- Α. Σκορίλας, Καθηγητής, Τμήμα Βιολογίας, Σχολή Θετικών Επιστημών, ΕΚΠΑ
- Π. Μουτσάτσου, Καθηγήτρια, Ιατρική Σχολή, Σχολή Επιστημών Υγείας, ΕΚΠΑ

ΑΘΗΝΑ 2018

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε το ακαδημαϊκό έτος 2017-2018 κατά τη διάρκεια του Διατμηματικού Προγράμματος Μεταπτυχιακών Σπουδών «Κλινική Βιοχημεία – Μοριακή Διαγνωστική» του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών (ΕΚΠΑ). Το πειραματικό μέρος της εργασίας πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Κυτταρομετρίας Ροής του Τμήματος Ανοσολογίας και Ιστοσυμβατότητας του Γ.Ν.Α. «Ο Ευαγγελισμός».

Πρωτίστως, οφείλω να ευχαριστήσω τον Καθηγητή Κλινικής Βιοχημείας του Τμήματος Βιολογίας ΕΚΠΑ και Διευθυντή του μεταπτυχιακού προγράμματος κ. Ανδρέα Σκορίλα καθώς και την Καθηγήτρια Αναλυτικής Χημείας – Κλινικής Χημείας του Τμήματος Χημείας ΕΚΠΑ κα. Ευρύκλεια Λιανίδου για την ανάθεση και την επιστημονική επίβλεψη της παρούσης εργασίας. Τις θερμότερες ευχαριστίες μου εκφράζω στη Δρ. Αικατερίνη Ψαρρά Χημικό του Εργαστηρίου Κυτταρομετρίας Ροής του Γ.Ν.Α. «Ο Ευαγγελισμός» για την επιστημονική καθοδήγηση, την ενθάρρυνση και τις εύστοχες υποδείξεις καθ' όλη τη διάρκεια της εργασίας. Εξίσου ευχαριστώ τη Δρ. Ειρήνη Γρηγορίου Αιματολόγο Επιμελήτρια Α' του Εργαστηρίου Κυτταρομετρίας Ροής για την υποστήριξη και τις υποδείξεις της. Ευχαριστίες απευθύνω προς τη διευθύντρια του Τμήματος Ανοσολογίας και Ιστοσυμβατότητας Βιοπαθολόγο κα. Αλεξάνδρα Τσιρογιάννη για τη φιλοξενία στους χώρους του τμήματος.

Ευχαριστώ επίσης τους επιστημονικούς υπευθύνους της Beckman Coulter Δρ. Μ. Γεωργίου και κ. Σπ. Μπότσα, τις τεχνολόγους του εργαστηρίου Κυτταρομετρίας Ροής κ.κ. Α. Κατσαβριά, Μ. Ζαφείρη, Σ. Ψυρρή, Γ. Παπαγιαννοπούλου για τη συνεργασία και τις υποδείξεις τους στο πειραματικό τμήμα της εργασίας καθώς και το υπόλοιπο προσωπικό του τμήματος Ανοσολογίας και Ιστοσυμβατότητας. Ιδιαίτερες ευχαριστίες απευθύνω στο προσωπικό του εργαστηρίου Μοριακής Βιολογίας και στους ιατρούς της Αιματολογικής Κλινικής – Λεμφωμάτων του Γ.Ν.Α. «Ο Ευαγγελισμός». Ευχαριστώ ιδιαίτερος τη Διευθύντρια Ερευνών του Εργαστηρίου Υγειοφυσικής του Τμήματος Κυτταρογενετικής του ΕΚΕΦΕ «Δημόκριτος» Δρ. Κ. Σαμπάνη και τους υπόλοιπους ιατρούς ΕΣΥ ή ιδιώτες που συνεργάστηκαν μαζί μας. Τέλος, ευχαριστώ την οικογένεια μου για τη συνεχή και αδιάκοπη υποστήριξή τους.

Αθήνα 2018

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΚΕΦ. 1 ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΙΑ ΡΟΗΣ (FC)	1
1.1. ΑΡΧΗ ΜΕΘΟΔΟΥ	1
1.2. Ο ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΗΤΗΣ ΡΟΗΣ (FLOW CYTOMETER)	2
1.3. ΕΛΕΓΧΟΣ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ	4
1.4. ΕΙΔΗ ΑΝΑΛΥΣΕΩΝ	6
1.5. ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΤΗΣ ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΙΑΣ ΡΟΗΣ	8
ΚΕΦ. 2 ΚΑΚΟΗΘΗ ΑΙΜΑΤΟΛΟΓΙΚΑ ΝΟΣΗΜΑΤΑ	9
2.1. ΝΕΟΠΛΑΣΜΑΤΑ ΑΙΜΟΠΟΙΗΤΙΚΟΥ ΙΣΤΟΥ	9
2.2. ΟΞΕΙΕΣ ΛΕΥΧΑΙΜΙΕΣ	10
2.2.1. Οξεία Λεμφοβλαστική Λευχαιμία (ALL)	10
2.2.2. Οξεία Μυελογενής Λευχαιμία (AML)	11
2.3. ΜΥΕΛΟΔΥΣΠΛΑΣΤΙΚΑ ΣΥΝΔΡΟΜΑ (MDS)	13
2.4. ΛΕΜΦΟΫΠΕΡΠΛΑΣΤΙΚΑ ΝΟΣΗΜΑΤΑ (LPD)	14
2.4.1. Χρόνια Λεμφοκυτταρική Λευχαιμία (CLL)	15
2.4.2. Non Hodgkin Λεμφώματα (NHL)	17
2.5. ΠΟΛΛΑΠΛΟ ΜΥΕΛΩΜΑ (MM)	19
2.6. Η ΣΥΜΒΟΛΗ ΤΗΣ ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΙΑ ΡΟΗΣ ΣΤΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ ΤΩΝ ΑΙΜΑΤΟΛΟΓΙΚΩΝ ΝΟΣΗΜΑΤΩΝ	20
ΚΕΦ. 3 Η ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΙΚΗ ΟΔΟΣ PD1/PD-L1	26
3.1. Ο ΥΠΟΔΟΧΕΑΣ PD-1	26
3.2. ΟΙ ΣΥΝΔΕΤΕΣ PD-L1, PD-L2	27
3.3. Ο ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ PD1/PD-L1 ΣΤΗ ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΗΣ ΑΝΟΣΙΑΚΗΣ ΑΠΑΝΤΗΣΗΣ	28
3.4. Η ΣΥΜΒΟΛΗ ΤΩΝ PD1/PD-L1 ΣΤΗ ΔΙΑΦΥΓΗ ΤΩΝ ΚΑΡΚΙΝΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΑΠΟ ΤΗΝ ΑΝΟΣΟΕΠΙΤΗΡΗΣΗ	32

3.5. Η ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΩΝ PD1/PD-L1 ΣΤΑ ΚΑΚΟΗΘΗ ΑΙΜΑΤΟΛΟΓΙΚΑ ΝΟΣΗΜΑΤΑ	34
3.6. ΤΟ ΖΕΥΓΟΣ PD1/PD-L1 ΩΣ ΑΝΕΡΧΟΜΕΝΟΙ ΒΙΟΔΕΙΚΤΕΣ	37
ΚΕΦ. 4 ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ	42
ΚΕΦ. 5 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	42
5.1. ΒΙΟΛΟΓΙΚΟ ΥΛΙΚΟ	42
5.2. ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ ΚΑΙ ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ	43
5.2.1. Αναλώσιμα.....	54
5.3. ΟΡΓΑΝΑ	54
ΚΕΦ. 6 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ	57
6.1. ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΟΥ PD-L1 (CD274).....	57
6.1.2. Πορεία εργασίας.....	57
6.2. ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΟΥ PD-1 (CD279).....	59
6.3. ΕΣΩΤΕΡΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ	61
6.3.1. Μέτρηση υποπληθυσμών λεμφοκυττάρων με τετραπλό φθορισμό.....	62
6.3.2. Μέτρηση υποπληθυσμών λεμφοκυττάρων με εξαπλό φθορισμό.....	63
6.3.3. Έλεγχος κλωνικότητας Β λεμφοκυττάρων	63
6.4. ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ	64
6.5. ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ.....	64

ΚΕΦ. 7 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	66
7.1. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΓΙΑ ΤΗΝ ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΟΥ PD-1 ΣΤΟΥΣ ΜΑΡΤΥΡΕΣ. 66	
7.2. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΓΙΑ ΤΗΝ ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΟΥ PD-1 ΣΤΟΥΣ ΑΣΘΕΝΕΙΣ...67	
7.2.1. Αποτελέσματα για την έκφραση του PD-1 στη CLL-MBL	69
7.2.2. Αποτελέσματα για την έκφραση του PD-1 στα NHL	70
7.2.3. Αποτελέσματα για την έκφραση του PD-1 στο MM.....	72
7.2.4. Αποτελέσματα για την έκφραση του PD-1 στα MDS	73
7.2.5. Αποτελέσματα για την έκφραση του PD-1 στην AML	74
7.2.6. Αποτελέσματα για την έκφραση του PD-1 στην ALL	76
7.3. ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΤΩΝ ΜΕΘΟΔΩΝ BASIC ΚΑΙ T CELLS ΓΙΑ ΤΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΟΥ PD-1	77
7.4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΓΙΑ ΤΗΝ ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΟΥ PD-L1 ΣΤΟΥΣ ΑΣΘΕΝΕΙΣ	80
7.4.1. Αποτελέσματα για την έκφραση του PD-L1 στη CLL-MBL.....	80
7.4.2. Αποτελέσματα για την έκφραση του PD-L1 στα NHL.....	82
7.4.3. Αποτελέσματα για την έκφραση του PD-L1 στο MM	84
7.4.4. Αποτελέσματα για την έκφραση του PD-L1 στα MDS.....	86
7.4.5. Αποτελέσματα για την έκφραση του PD-L1 στην AML	88
7.4.6. Αποτελέσματα για την έκφραση του PD-L1 στην ALL	91
7.5. ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΟΥ PD-1 ΣΤΟΥΣ ΥΠΟΠΑΘΟΥΣΜΟΥΣ ΤΩΝ ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΩΝ ΤΩΝ ΑΣΘΕΝΩΝ	93
7.6. ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΤΩΝ ΕΠΙΠΕΔΩΝ ΤΩΝ PD-1/PD-L1 ΑΝΑ ΑΣΘΕΝΗ	94

7.7. ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΩΝ PD-1/PD-L1 ΜΕ ΤΟΥΣ ΚΥΡΙΟΥΣ ΠΡΟΓΝΩΣΤΙΚΟΥΣ ΔΕΙΚΤΕΣ ΤΩΝ ΑΣΘΕΝΩΝ	96
7.7.1. Συσχέτιση της έκφρασης των PD-1/PD-L1 με την ηλικία των ασθενών	96
7.7.2. Συσχέτιση της έκφρασης των PD-1/PD-L1 με το φορτίο της νόσου κατά τη διάγνωση	97
7.7.3. Συσχέτιση της έκφρασης των PD-1/PD-L1 με τον ανοσοφαινότυπο της διάγνωσης των ασθενών	104
7.7.4. Συσχέτιση της έκφρασης των PD-1/PD-L1 με τον καρυότυπο και το μοριακό έλεγχο κατά τη διάγνωση των ασθενών	106
ΚΕΦ. 8 ΣΥΖΗΤΗΣΗ	111
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	123
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	134
ABSTRACT	136

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΩΝ ΟΡΩΝ

ADCC (Antibody dependent cell-mediated cytotoxicity) κυττατοξικότητα που εξαρτάται από αντίσωμα

ALL (Acute Lymphoblastic Leukemia) Οξεία Λεμφοβλαστική Λευχαιμία

AML (Acute Myeloid Leukemia) Οξεία Μυελογενής Λευχαιμία

APC (Allophycocyanin) αλλοφυκοκυανίνη

APCs (Antigen Presenting Cells) αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα

BAL (Broncho Alveolar Lavage) βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα

BCR (B Cell Receptor) Υποδοχέας Β λεμφοκυττάρων

BM (Bone Marrow) μυελός των οστών

CAR (Chimeric Antigen Receptor) χιμαιρικός υποδοχέας

CD antigens (Cluster of Differentiation antigens) αντιγόνα ομάδων διαφοροποίησης

CLL (Chronic Lymphocytic Leukemia) Χρόνια Λεμφοκυτταρική Λευχαιμία

CML (Chronic Myelogenous Leukemia) Χρόνια Μυελογενής Λευχαιμία

CMML (Chronic MyeloMonocytic Leukemia) Χρόνια Μυελομονοκυτταρική Λευχαιμία

CNS (Central Nervous System) Κεντρικό Νευρικό Σύστημα (ΚΝΣ)

CSF (CerebroSpinal Fluid) Εγκεφαλονωτιαίο Υγρό (ΕΝΥ)

CT (Computed Tomography) αξονική τομογραφία

CTLA-4 (Cytotoxic T Lymphocyte associated Antigen 4)

CTLs (Cytotoxic T lymphocytes) κυτταροτοξικά Τ λεμφοκύτταρα

DCs (Dendritic cells) δένδριτικά κύτταρα

DLBCL (Diffuse Large B-cell lymphoma) διάχυτο λέμφωμα από μεγάλα Β κύτταρα

ECD εμπορική ονομασία της συζευγμένης χρωστικής PE-Texas Red

EDTA (Ethylene diaminetetraacetic acid) αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό οξύ

ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay) ανοσοενζυμική δοκιμασία

FAB (French–American–British) classification

FACS (Fluorescence Activated Cell Sorting) διαχωρισμός κυττάρων ενεργοποιούμενος από φθορισμό

FC (Flow Cytometry) Κυτταρομετρία ροής

FISH (Fluorescent in situ hybridization) Φθορίζων in situ υβριδισμός

FITC (Fluorescein isothiocyanate) ισοθειοκυανική φλουορεσκεΐνη

FL (Follicular lymphoma) οζώδες λέμφωμα

FLT3-ITD (FMS-LikeTyrosine kinase 3 Internal Tandem Duplication)

FS (Forward Scatter) πρόσθιος σκεδασμός του φωτός

GM-CSF (Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor) αυξητικός παράγοντας κοκκιοκυττάρων/μονοκυττάρων

GPI (Glycosyl Phosphatidyl Inositol) Γλυκοζυλο φωσφατιδυλινοσιτόλη

GVHD (Graft Versus Host Disease) νόσος μοσχεύματος κατά του ξενιστή

HCL (Hairy Cell Leukemia) λευχαιμία από τριχωτά κύτταρα

HIV (Human Immunodeficiency Virus) ιός της ανθρώπινης ανοσοανεπάρκειας

HL (Hodgkin Lymphoma) λέμφωμα Hodgkin

HLA (Human Leukocyte Antigens) το μείζον σύμπλεγμα ιστοσυμβατότητας του ανθρώπου

HSCT (Hematopoietic stem cell transplantation) μεταμόσχευση αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων

IFN (Interferon) ιντερφερόνη

Ig (Immunoglobulin) ανοσοσφαιρίνη

IHC (Immunohistochemistry) ανοσοϊστοχημεία

IL (Interleukin) ιντερλευκίνη

LAG-3 (Lymphocyte Activation Gene 3)

LDH (Lactate Dehydrogenase) γαλακτική αφυδρογονάση

LMD (List Mode Data) αρχεία δεδομένων κυτταρομετρητή ροής

LPD (Lymphoproliferative Diseases) Λεμφοϋπερπλαστικά νοσήματα

mAb (monoclonal Antibody) μονοκλωνικό αντίσωμα

MBL (Monoclonal B-cell Lymphocytosis) μονοκλωνική B λεμφοκυττάρωση

MCL (Mantle Cell Lymphoma) λέμφωμα κυττάρων μανδύα

MDS (Myelodysplastic syndromes) Μυελοδυσπλαστικά Σύνδρομα

MDSCs (Myeloid Derived Suppressor Cells) κατασταλτικά κύτταρα της μυελικής σειράς

MFI (Mean Fluorescence Intensity) μέση ένταση φθορισμού

MGUS (Monoclonal Gammopathy of Undetermined Significance) Μονοκλωνική γαμμαπάθεια αδιευκρίνιστης σημασίας

MHC (Major Histocompatibility Complex) Μείζον Σύμπλεγμα Ιστοσυμβατότητας

MLL (Mixed Lineage Leukemia) διφαινοτυπική λευχαιμία

MM (Multiple Myeloma) Πολλαπλό Μυέλωμα

MRD (Minimal Residual Disease) ελάχιστη υπολειμματική νόσος

MRI (Magnetic Resonance Imaging) μαγνητική τομογραφία

MZL (Marginal zone lymphoma) λέμφωμα οριακής ζώνης

NEQAS (National External Quality Assessment Service) Εθνική υπηρεσία αξιολόγησης εξωτερικού ελέγχου ποιότητας

NGS (Next Generation Sequencing) αλληλούχηση νέας γενιάς

NHL (Non Hodgkin Lymphomas) Non Hodgkin λεμφώματα

NK cells (Natural Killer cells) κύτταρα φυσικοί φονείς

NPM1 (Nucleophosmin 1)

NSCLC (Non-small cell lung cancer) μη μικροκυτταρικός καρκίνος του πνεύμονα

PB (Peripheral Blood) περιφερικό αίμα

PBS (Phosphate Buffered Saline) ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών

PC5 (PE-CY5 ή Phycoerythrin Cyanin 5.1) φυκοερυθρίνη – κυανίνη 5

PC7 (PE-CY5 ή Phycoerythrin Cyanin 7) φυκοερυθρίνη – κυανίνη 7

PCR (Polymerase Chain Reaction) αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης

PD-1 (Programmed cell Death protein 1)

PD-L1 (Programmed cell Death protein 1 ligand)

PE (Phycoerythrin) φυκοερυθρίνη

PLT (Platelets) αιμοπετάλια

PMT (Photmultiplier Tube) φωτοπολλαπλασιαστής

PNH (Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria) Παροξυσμική Νυκτερινή Αιμοσφαιρινουρία

RAEB (Refractory Anemia with Excess Blasts) Ανθεκτική Αναιμία με περίσσεια βλαστών

RBC (Red Blood Cells) ερυθρά αιμοσφαίρια

RCC (Renal Cell Carcinoma) νεφρικό καρκίνωμα

SLL (Small Lymphocytic Lymphoma) λέμφωμα από μικρά λεμφοκύτταρα

SS (Side Scatter) πλάγιος σκεδασμός του φωτός

TCR (T-cell receptor) υποδοχέας των T λεμφοκυττάρων

TGF (Transforming growth factor) αυξητικός παράγοντας μετασχηματισμού

TILs (Tumor Infiltrating Lymphocytes) διηθούντα τον όγκο λεμφοκύτταρα

TIM-3 (T-cell immunoglobulin and mucin-domain containing-3)

TKIs (Tyrosine Kinase Inhibitors) αναστολείς κινάσηςτυροσίνης

TLR (Toll Like Receptors) υποδοχείς φυσικής ανοσίας τύπου Toll

Tregs (T regulatory cells) T ρυθμιστικά κύτταρα

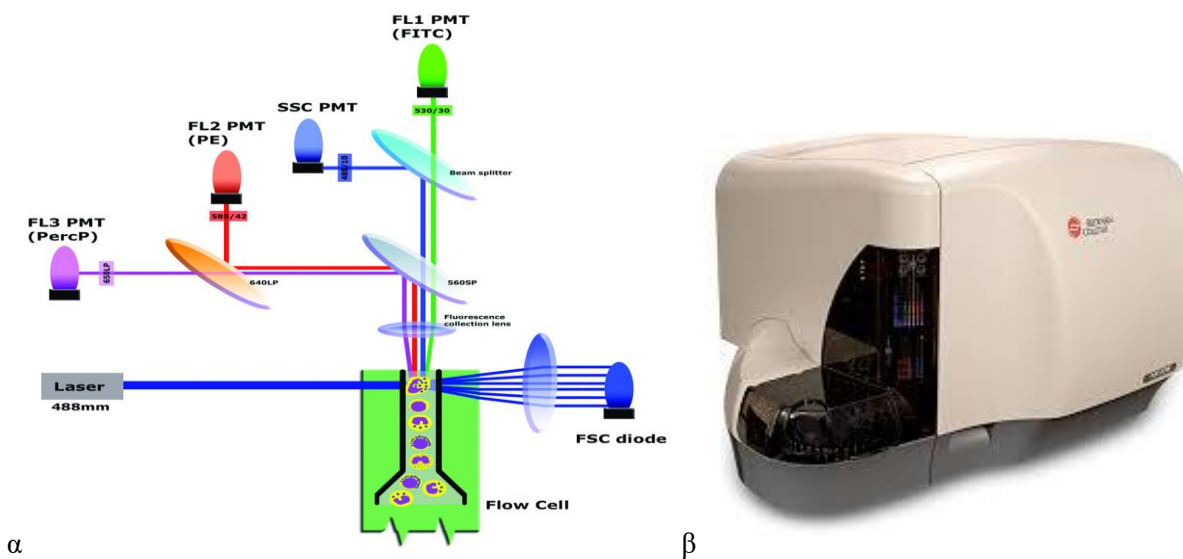
WBC (White Blood Cells) λευκά αιμοσφαίρια

WHO (World Health Organization) Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας (ΠΟΥ)

1. ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΙΑ ΡΟΗΣ (FLOW CYTOMETRY, FC)

1.1. ΑΡΧΗ ΜΕΘΟΔΟΥ

Η κυτταρομετρία ροής αποτελεί μια αυτοματοποιημένη οπτικοηλεκτρονική μέθοδο ανάλυσης των φυσικοχημικών ιδιοτήτων κυττάρων ή σωματιδίων σε πολύπλοκα μίγματα (π.χ. περιφερικό αίμα), τα οποία βρίσκονται υπό μορφή εναιωρήματος σε υγρό μέσο.[1,2,3] Το υπό μελέτη αντιγόνο ενός σωματιδίου συνδέεται με ειδικό μονοκλωνικό αντίσωμα (mAb) επισημασμένο με φθορίζουσα ουσία. Κατά τη συνεχή ροή των σωματιδίων στο υδροδυναμικό σύστημα του κυτταρομετρητή (θάλαμος ροής), η φωτεινή δέσμη από το οπτικό σύστημα προσπίπτει ευθέως στο εναιώρημα και ο σκεδασμός του φωτός μαζί με το φθορίζον σήμα για κάθε σωματίδιο καταγράφονται από ανιχνευτές τοποθετημένους παράλληλα και κάθετα ως προς την φωτεινή δέσμη [Σχήμα 1.1.]. [4,5] Όλα τα παραπάνω απεικονίζονται σε διαγράμματα που εμφανίζουν τις μεταβολές του φθορισμού και των σκεδαστικών χαρακτηριστικών των σωματιδίων σε πραγματικό χρόνο. [1,3,6]



Σχήμα 1.1.

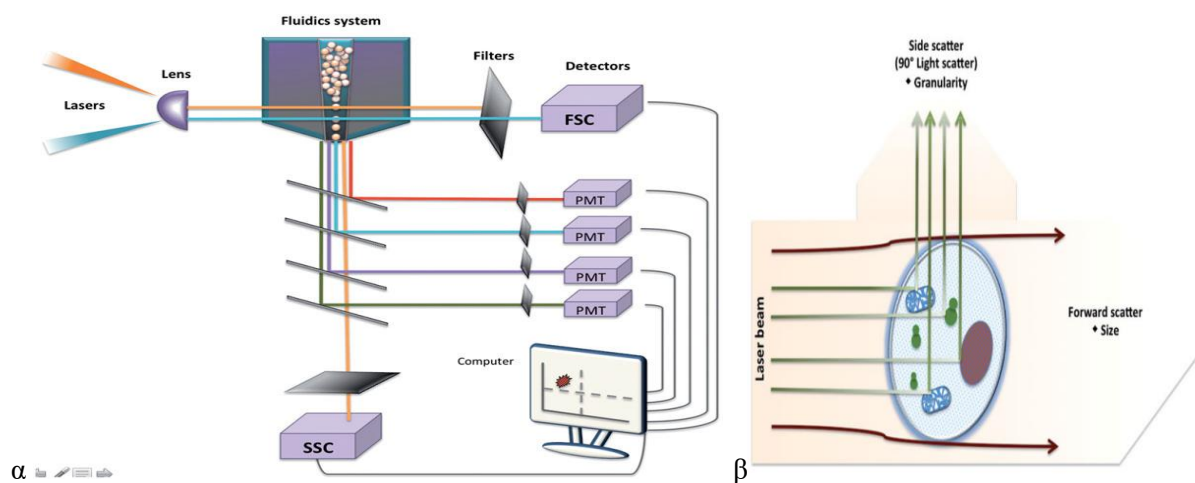
α) Η αρχή λειτουργίας του κυτταρομετρή ροής. Το κυτταρικό εναιώρημα εστιάζεται υδροδυναμικά με το περιρρέον ρυθμιστικό διάλυμα (sheath fluid) και κάθε ένα κύτταρο διέγεται από τη φωτεινή πηγή (laser). Τα εκπεμπόμενα σήματα (φωτοσκεδαστικά,

φθορίζοντα) καταγράφονται από ανιχνευτές, ενισχύονται και απεικονίζονται σε ψηφιακή μορφή στον ηλεκτρονικό υπολογιστή. [1] β) Ο κυτταρομετρητής ροής Navios (Beckman Coulter Life Sciences) του εργαστηρίου Κυτταρομετρίας Ροής του Γ.Ν.Α. «Ο Ευαγγελισμός». [7]

Ο κυτταρομετρητής ροής, σε αντίθεση με το μικροσκόπιο, ποσοτικοποιεί ένα σύνολο παραμέτρων (π.χ. μέγεθος, κοκκίωση, πολυπλοκότητα κυτταροπλάσματος, περιεχόμενο DNA/RNA, επιφανειακά και ενδοκυττάρια αντιγόνα, γονιδιακή έκφραση) των ελαιωρούμενων σωματιδίων. [1,3,8] Ο βασικός περιορισμός της FC αφορά την ικανότητα ανάλυσης ελαιωρήματος ζωντανών κυττάρων σε μονήρη ροή. Επιπλέον, απαιτείται εξειδικευμένο προσωπικό για το χειρισμό και τη συντήρηση του οργάνου. [8]

1.2. Ο ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΗΤΗΣ ΡΟΗΣ (FLOW CYTOMETER)

Ο κυτταρομετρητής ροής περιέχει τρία λειτουργικά συστήματα, το υδροδυναμικό σύστημα ροής (θάλαμος ροής), το οπτικό σύστημα (φωτεινή πηγή, ανιχνευτής), το ηλεκτρονικό και υπολογιστικό σύστημα ανάλυσης δεδομένων [Σχήμα 1.2.]. Το τελευταίο περιλαμβάνει ένα μετατροπέα σήματος (αναλογικού προς ψηφιακό), το σύστημα ενίσχυσης γραμμικού ή λογαριθμικού σήματος και τον ηλεκτρονικό υπολογιστή. [1,2,5,6]



Σχήμα 1.2.

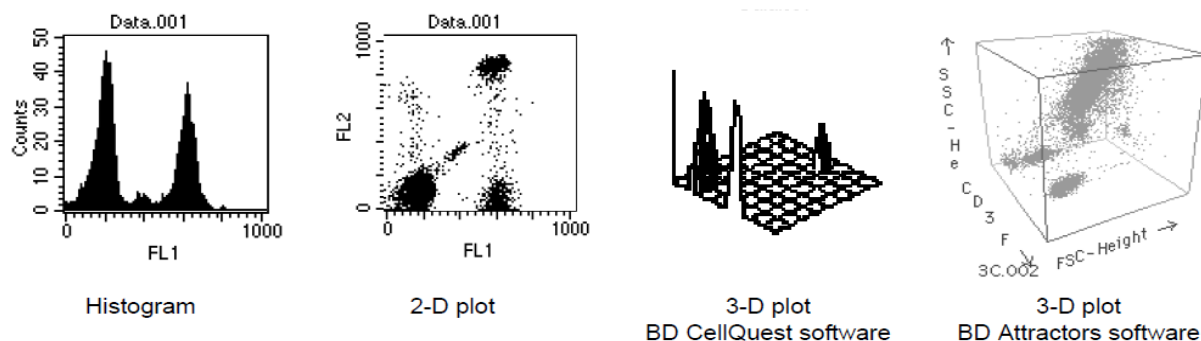
α. Η ανίχνευση και επεξεργασία του σήματος. [5]

β. Το φαινόμενο του σκεδασμού του φωτός (FS, SS). [5]

Ένα από τα πλεονεκτήματα της FC είναι η ικανότητα επεξεργασίας και αξιολόγησης των δεδομένων κάθε δείγματος (LMD) κατά την ανάλυση με την οριοθέτηση (gating), δηλαδή την απομόνωση ενός κυτταρικού πληθυσμού από το σύνολο των κυττάρων για περαιτέρω ανάλυση. [1,5,6,8] Το gate είναι ένα αριθμητικό ή γραφικό σύνορο που χρησιμοποιείται για να μελετηθούν τα χαρακτηριστικά των επιλεγμένων κυττάρων και να εξαιρεθούν νεκρά κύτταρα ή θραύσματα κυττάρων. Όλες οι παράμετροι φθορισμού στη συνέχεια της ανάλυσης θα αφορούν μόνο τον επιλεγμένο πληθυσμό. [5]

Η διάκριση των ζωντανών κυττάρων στο στικτόγραμμα FS-SS και η απομόνωση των μονοπύρηνων λευχαιμικών βλαστικών κυττάρων από το στικτόγραμμα CD45=f(SS) αποτελούν τις συνηθέστερες στρατηγικές οριοθέτησης.[1,8] Η στρατηγική του “back-gating” είναι πολύτιμη όταν δεν είναι γνωστή η θέση των υπό μελέτη κυττάρων στο διάγραμμα FS-SS. Βασίζεται σε διαδοχικά gating από το διάγραμμα του φθορισμού του χαρακτηριστικού αντιγόνου των κυττάρων στο διάγραμμα FS-SS. Η οριοθέτηση κυττάρων της ίδιας σειράς (lineage gating) με βάση πανδείκτες (π.χ. CD19, CD64) χρησιμοποιείται εξίσου συχνά στην κλινική πράξη.[2,8]

Τα δεδομένα απεικονίζονται υπό μορφή γραφημάτων που συνοδεύουν τα αποτελέσματα της ανάλυσης. Τα γραφήματα αυτά ποικίλλουν από τα ιστογράμματα κατανομής συχνότητας και τα δισδιάστατα διάγραμμα (στικτόγραμμα, πυκνόγραμμα) έως τα τρισδιάστατα ατομογράμματα [Σχήμα 1.3.]. Συνήθως, για την παρουσίαση δεδομένων για δύο παραμέτρους χρησιμοποιείται το στικτόγραμμα (dot plot), το οποίο δίνει πληροφορίες για τις δύο μεταβλητές μέσω κατανομής συχνότητας. [5,6,8]



Σχήμα 1.3. Τρόποι αναπαράστασης δεδομένων στην FC. [9]

Τα αποτελέσματα για κάθε δείκτη εκφράζονται σε ποικίλες μορφές όπως ποσοστό κυττάρων με θετική έκφραση, μέση ένταση φθορισμού (MFI) στην περίπτωση μελέτης της αντιγονικής πυκνότητας, σχετικός λόγος (ratio), απόλυτος αριθμός κυττάρων ανά μL κ.λ.π. Το ποσοστό θετικής έκφρασης και η ένταση του φθορισμού χρησιμοποιούνται συνήθως στα περισσότερα πρωτόκολλα εργασίας. Το όριο για το θετικό αποτέλεσμα (cut off) ποικίλλει και εξαρτάται από την ευαισθησία, την ειδικότητα της μεθόδου και το φυσιολογικό πρότυπο έκφρασης του αντιγόνου. [4,10]

1.3. ΕΛΕΓΧΟΣ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ

Ο εσωτερικός έλεγχος ποιότητας των αποτελεσμάτων εκτελείται καθημερινά παράλληλα με την εκπαίδευση του τεχνικού προσωπικού. [1] Αναλύονται καθημερινά πρότυπα δείγματα και τα αποτελέσματα καταχωρούνται στο αρχείο ελέγχου ποιότητας (Quality Control, QC). [2] Εξειδικευμένο τεχνικό προσωπικό αναλαμβάνει τον ετήσιο έλεγχο για τη συντήρηση των lasers, των φωτοπολλαπλασιαστών (PMTs), των φίλτρων, των ενισχυτών και τη βελτιστοποίηση της ευθυγράμμισης του οπτικού συστήματος του οργάνου.[11] Η λειτουργία των lasers ελέγχεται σε ημερήσια βάση. [2]

Συμπληρωματικά με τον εσωτερικό έλεγχο ποιότητας, επιβεβλημένη θεωρείται η συμμετοχή του εργαστηρίου κυτταρομετρίας ροής σε προγράμματα εξωτερικού ελέγχου ποιότητας (προαναλυτικά, αναλυτικά, μετααναλυτικά). [11] Στον εξωτερικό έλεγχο ποιότητας χρησιμοποιούνται μονιμοποιημένα δείγματα και αναλύονται σύμφωνα με τα διαγνωστικά πρωτόκολλα του εργαστηρίου. [1] Ο φορέας αξιολόγησης εκδίδει αναφορά για τις επιδόσεις του εργαστηρίου και αναφέρεται τυχόν επίμονη απόκλιση από τα αναμενόμενα αποτελέσματα για να γίνουν οι απαραίτητες διορθώσεις.[10] Στη χώρα μας, η Ελληνική Εταιρεία Κυτταρομετρίας Ροής συντονίζει τον εξωτερικό έλεγχο ποιότητας, ενώ σε ευρωπαϊκό επίπεδο υπάρχουν περισσότεροι φορείς αξιολόγησης (π.χ. NEQAS). [11]

Κατά τη βαθμονόμηση του οργάνου χρησιμοποιούνται ειδικά σφαιρίδια αναφοράς (calibration beads) για να πραγματοποιηθεί ο έλεγχος της ευαισθησίας των PMTs και η ευθυγράμμιση (alignment) του οπτικού συστήματος, με σκοπό τον περιορισμό της επικάλυψης του φθορισμού. [11] Με κατάλληλο λογισμικό προσαρμόζονται οι ανιχνευτές του κυτταρομετρητή ώστε να τοποθετηθούν τα σφαιρίδια στα αντίστοιχα κανάλια. Στη συνέχεια,

καταγράφεται και παρακολουθείται η διαφορά δυναμικού που αναπτύσσεται στον ανιχνευτή. Παράλληλα, μετράται ο διαχωρισμός του σήματος για κάθε παράμετρο και συγκρίνεται με την αναμενόμενη ελάχιστη τιμή (ευαισθησία). [2]

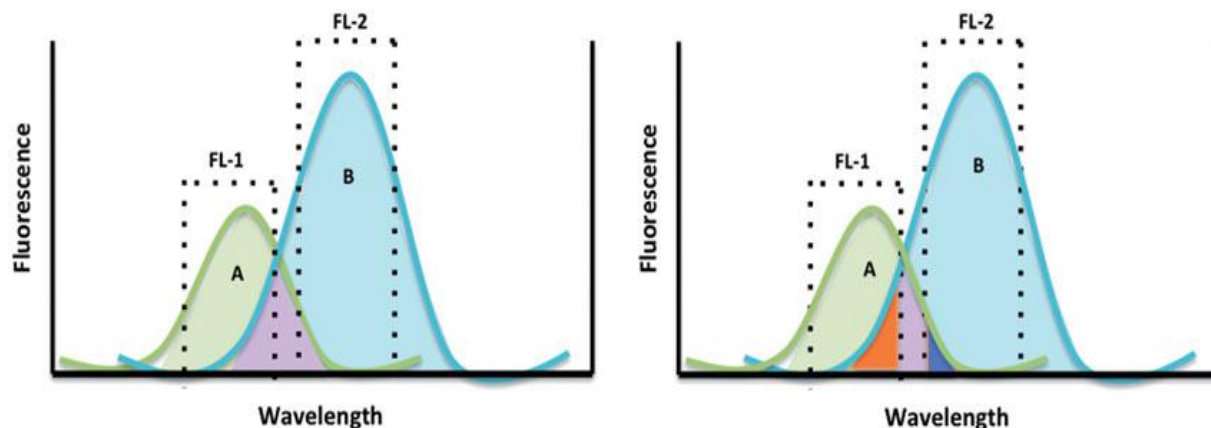
Τα σφαιρίδια αναφοράς ποικίλλουν ως προς το μέγεθος και το είδος της φθορίζουσας ουσίας με την οποία σημαίνονται, ώστε να προσομοιάζουν με τα υπό μελέτη κύτταρα. Τα σφαιρίδια που χρησιμοποιούνται στην FC διακρίνονται στα σφαιρίδια τύπου I (οπτικής ευθυγράμμισης), τα σφαιρίδια αναφοράς τύπου II με συγκεκριμένη ένταση φθορισμού και τα σφαιρίδια βαθμονόμησης τύπου III για τον έλεγχο της απόδοσης και την ποσοτικοποίηση των σημάτων φθορισμού. Επιπλέον, διατίθενται σφαιρίδια βαθμονόμησης με ποικίλη ένταση φθορισμού για τη διόρθωση της φασματικής επικάλυψης (compensation). [11]

Τα δείγματα ελέγχου είναι σταθερά υλικά που δίνουν γνωστά ή αναμενόμενα αποτελέσματα. Ανιχνεύουν αλλαγές στο οπτικό σήμα, οι οποίες τροποποιούν την εκπομπή του φθορισμού. Υπάρχουν τρία είδη δειγμάτων ελέγχου. Πρώτον, δείγματα που χρησιμεύουν για τον καθορισμό της κατώφλιου τιμής για το θετικό αποτέλεσμα (cut-off). Δεύτερον, δείγματα ελέγχου που δίνουν παρόμοιες βιολογικές συνθήκες με το υπό εξέταση δείγμα (π.χ. δείγματα από υγιείς δότες). Τέλος, υπάρχουν δείγματα ελέγχου για τη βαθμονόμηση (set up) του κυτταρομετρητή ροής. [1]

Απαραίτητη θεωρείται η τιτλοδότηση των νέων mAbs (titration) για να βρεθεί η βέλτιστη συγκέντρωση για τη χρώση των κυττάρων, με βάση τις οδηγίες του κατασκευαστή και τις απαιτήσεις του οργάνου. Επίσης, διεξάγονται μετρήσεις του αριθμού κυττάρων και γίνονται οι απαραίτητες αραιώσεις στα δείγματα για να εξασφαλιστεί ότι δεν διαταρράσσεται η αναλογία αντιγόνων και mAbs. Όταν χρειασθεί προστίθεται περίσσεια mAb για να εξασφαλισθεί ότι το αρνητικό αποτέλεσμα δεν οφείλεται στην ανεπαρκή συγκέντρωση του mAb. [1]

Οι περισσότερες φθορίζουσες ουσίες έχουν ευρύ φάσμα εκπομπής, γεγονός που συχνά οδηγεί σε φασματική επικάλυψη (spectral overlap). Η φασματική επικάλυψη, ανάλογα με την έκτασή της, προκαλεί αύξηση του δυναμικού στον PMT. [1,3] Για παράδειγμα, κατά την επικάλυψη των FITC και PE, ο εκπεμπόμενος φθορισμός της FITC (FL-1) μπορεί να παρεισφύσει στο κανάλι της PE (FL-2) και να καταγραφεί από τον PMT ως σήμα της PE

(και αντίστροφα) [Σχήμα 1.4.]. Όσες περισσότερες φθορίζουσες ουσίες χρησιμοποιούνται στην ανάλυση τόσο πιο πολύπλοκη γίνεται η διαδικασία ανίχνευσης πιθανής φασματικής επικάλυψης και διαχωρισμού του εκπεμπόμενου φθορισμού των χρωστικών.



Σχήμα 1.4. Παράδειγμα εφαρμογής του compensation για τη διόρθωση της φασματικής επικάλυψης των ουσιών A (FL-1) και B (FL-2). Με πορτοκαλί χρώμα διακρίνεται το τμήμα του φάσματος εκπομπής της B που καταγράφεται από το κανάλι FL-1. Με μπλε χρώμα διακρίνεται το τμήμα του φάσματος εκπομπής της A που παρεισφρύνει στο κανάλι FL-2. [5]

Η διόρθωση της φασματικής επικάλυψης (compensation) γίνεται με τη διόρθωση της αύξησης στην τάση του PMT για το κανάλι κάθε χρωστικής. Συνήθως, οι περισσότεροι κυτταρομετρητές διαθέτουν σύστημα διόρθωσης ή αφαίρεσης του φθορισμού που προέρχεται από τη φασματική επικάλυψη δύο ή περισσότερων ουσιών και δεν ανιχνεύεται από τα οπτικά φίλτρα (π.χ. FL1-FL2, FL3-FL2, FL3-FL1). [1, 10] Για να καθοριστεί η επικάλυψη του σήματος, πρώτα πρέπει να γίνουν μετρήσεις ελέγχου. Σε αυτές κάθε φθορίζουσα ουσία αναλύεται χωριστά και καθορίζεται το ποσοστό του ανιχνευόμενου φθορισμού αυτής στο κανάλι της δεύτερης χρωστικής. Αυτό επιτυγχάνεται με τη χρήση mAbs σημασμένων με φθορισμό ή φθορίζοντων σφαιριδίων επικαλυμμένων με mAbs (γνωστής έντασης φθορισμού για κάθε ουσία). [1] Η διαδικασία επαναλαμβάνεται για τα υπόλοιπα ζεύγη των χρωστικών. [5]

1.4. ΕΙΔΗ ΑΝΑΛΥΣΕΩΝ

Τα συνηθέστερα βιολογικά υγρά που μπορούν να αναλυθούν με την FC είναι το περιφερικό αίμα (Peripheral blood, PB), ο μυελός των οστών (Bone marrow, BM) και το

εγκεφαλονωτιαίο υγρό (Cerebrospinal Fluid, CSF). [8] Άλλα σπανιότερα δείγματα περιλαμβάνουν υγρά από ορώδεις κοιλότητες (π.χ. πλευριτικό υγρό, ασκитικό υγρό) και το βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα (BAL). [1,3] Οι αναλύσεις αφορούν ολόκληρα κύτταρα ή κυτταρικά συστατικά (οργανίδια, πυρήνες, DNA, RNA, ολικές πρωτεΐνες), χρωμοσώματα, μικροοργανισμούς, σφαιρίδια latex, κυτταροκίνες και ορμόνες. Η μελέτη του κυτταρικού κύκλου, η μέτρηση του δυναμικού της μεμβράνης και της ροής ασβεστίου στο κύτταρο μπορούν να πραγματοποιηθούν και με την FC. [3,5]

Με την FC είναι η δυνατή η ανίχνευση μεμβρανικών, κυτταροπλασματικών και πυρηνικών αντιγόνων. Η ταυτόχρονη ανάλυση της μεμβρανικής και ενδοκυττάριας έκφρασης του υπό μελέτη αντιγόνου διαθέτει ισχυρή διαγνωστική αξία (π.χ. CD3). [10] Στο προαναλυτικό στάδιο, το δείγμα επωάζεται με τον κατάλληλο συνδυασμό mAbs τα οποία συνδέονται με διαφορετικές φθορίζουσες ουσίες. Στην περίπτωση που μελετάται η έκφραση ενδοκυττάρια αντιγόνου, προηγείται κατάλληλη επεξεργασία των κυττάρων για να γίνει διαπερατή η κυτταρική μεμβράνη στα mAbs. Στη συνέχεια, γίνεται η λύση των ερυθρών αιμοσφαιρίων και (όπου απαιτείται) μονιμοποίηση των λευκών αιμοσφαιρίων. Η απώλεια της μεμβρανικής ακεραιότητας αλλοιώνει την αντιγονική πυκνότητα, ενώ η μη ειδική σύνδεση των mAbs αυξάνει τον φθορισμό υποβάθρου. [10] Τέλος, προστίθενται σφαιρίδια γνωστής συγκέντρωσης (εφόσον χρειάζεται να μετρηθεί ο απόλυτος αριθμός των υπό μελέτη κυττάρων) και το δείγμα αναλύεται στον κυτταρομετρητή ροής. [12]

Ο ανοσοφαινότυπος (Immunophenotype), δηλαδή η ταυτοποίηση και ανοσολογική τυποποίηση κυτταρικών πληθυσμών με βάση τα αντιγόνα διαφοροποίησης (CD antigens) συμβάλλει ουσιαστικά στη διάγνωση και παρακολούθηση ποικίλων νοσημάτων.[1,5,8] Η υψηλή ταχύτητα ανάλυσης των κυτταρομετρητών (έως 10.000 κύτταρα/s) συνδυασμένη με την πολυπαραμετρική ανάλυση (έως 8 χρωστικές στα κλινικά πρωτόκολλα), διευκολύνει την ανίχνευση κυττάρων που αντιπροσωπεύουν πολύ μικρό τμήμα του συνόλου (rare events). Χαρακτηριστικό παράδειγμα, η ανίχνευση λευχαιμικών κυττάρων (MRD) σε ασθενείς υπό και μετά τη θεραπεία αποτελεί εξέταση ρουτίνας για το εργαστήριο FC. [10]

1.5. ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΤΗΣ ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΙΑΣ ΡΟΗΣ

Η FC οδήγησε σε μεγάλη πρόοδο επιστημονικούς κλάδους όπως η Αιματολογία, η Ανοσολογία, η Κυτταρολογία και η Μικροβιολογία. Η Πνευμονολογία βασίζεται στην FC για τη μελέτη του βρογχοκυψελιδικού εκπλύματος (BAL), η Νευρολογία για το ENY και η Οφθαλμολογία για το υαλοειδές και το υδατοειδές υγρό. [1,12] Πέρα από τις κλινικές εφαρμογές, τομείς όπως η επιστήμη των τροφίμων και η ζωική βιομηχανία, περιβαλλοντικές επιστήμες όπως η Βοτανική, η υδρόβια Μικροβιολογία, η Φυσική καθώς και η Κτηνιατρική έχουν επωφεληθεί από την FC. [1,4]

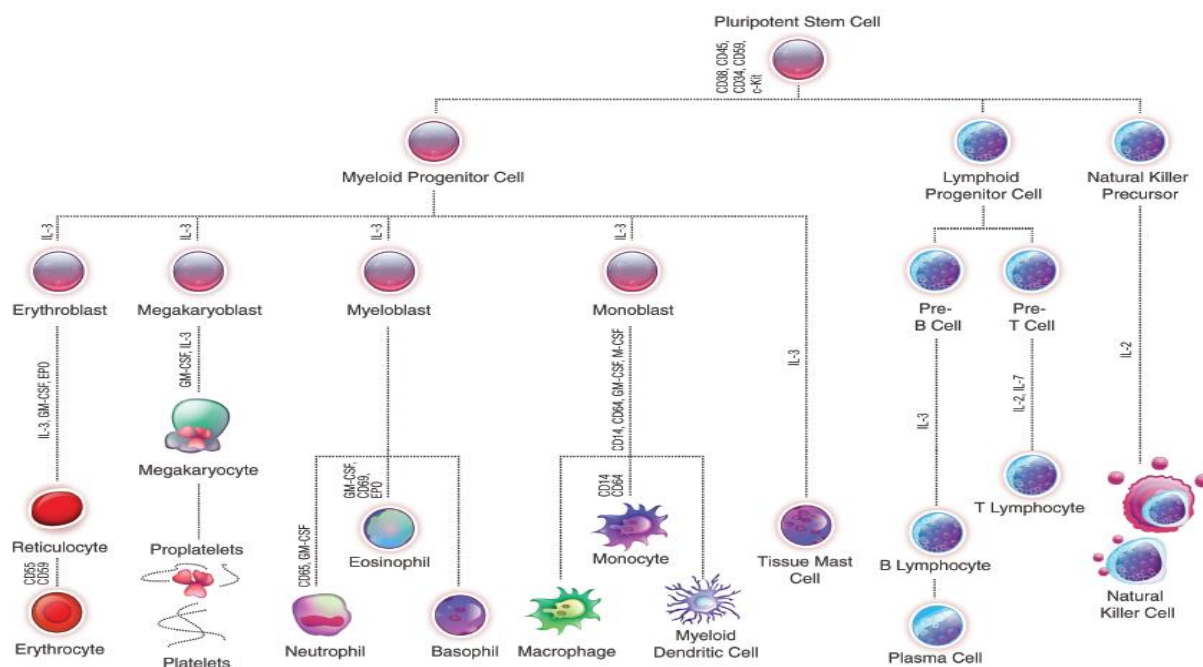
Η Κυτταρομετρία Ποσοτικού Φθορισμού (Quantitative Flow Cytometry) παρέχει ακριβή αριθμητική τιμή για τον αριθμό και την αντιγονική πυκνότητα των κυττάρων που εκφράζουν το υπό μελέτη αντιγόνο. Σε πολλούς πολυπαραμετρικούς κυτταροτρητές υπάρχει η δυνατότητα οπτικοποίησης των υπό ανάλυση κυττάρων (image cytometry). [10] Ο σχεδιασμός φασματικών κυτταρομετρητών ροής (spectral flow cytometers) επιτρέπει ταχεία ανάλυση υψηλής διακριτικότητας, από τη μέτρηση του συνεχούς φάσματος. Οι κυτταρομετρητές με μικροϋδραυλικό σύστημα μπορούν να ανιχνεύσουν σπάνιους πληθυσμούς κυττάρων σε ένα δείγμα (π.χ. κυκλοφορούντα καρκινικά κύτταρα) σε ελάχιστο όγκο δείγματος με ταυτόχρονη ανάλυση πολλών δειγμάτων. [5] Επιπλέον, η τεχνολογική πρόοδος συνδυάζει μεθοδολογίες φασματομετρίας μαζών (ICP-MS, TOF) και FC, στην κυτταρομετρία μαζών (CyTOF). Στην CyTOF χρησιμοποιούνται mAbs σημασμένα με βαρέα μέταλλα, τα οποία διαβιβάζονται ένα προς ένα στο θάλαμο ιονισμού, όπου εκεί τα βαρέα μέταλλα ταυτοποιούνται με βάση το χρόνο πτήσης (TOF). Συνεπώς, οι εφαρμογές της FC περιορίζονται μόνο από τη δημιουργικότητα του ερευνητή. [4]

Η FC είναι από τις πλέον ισχυρές μεθόδους ανάλυσης ποικίλων δειγμάτων σε μικρό χρονικό διάστημα. Παρά την αλματώδη πρόοδο της FC τις τελευταίες δεκατίες, καταβάλλονται προσπάθειες για τη μείωση του κόστους και της πολυπλοκότητας των κυτταρομετρητών, την αύξηση του αριθμού των διαθέσιμων mAbs και χρωστικών, με παράλληλη αύξηση της ευαισθησίας της μεθόδου. [3] Μερικές από αυτές καινοτομίες αφορούν τον σχεδιασμό νέων φωτοσταθερών ουσιών (π.χ. φθορίζοντες μικροκρύσταλλοι ή quantum dots) και μικροϋδραυλικών συστημάτων (microfluidics). [5]

2. ΚΑΚΟΗΘΗ ΑΙΜΑΤΟΛΟΓΙΚΑ ΝΟΣΗΜΑΤΑ

2.1. ΝΕΟΠΛΑΣΜΑΤΑ ΑΙΜΟΠΟΙΗΤΙΚΟΥ ΙΣΤΟΥ

Η πρώτη περιγραφή για νεόπλασμα κυττάρων του αιμοποιητικού ιστού δόθηκε το 1832 από τον Thomas Hodgkin. Αφορούσε ασθενή με ένα είδος λεμφώματος που αργότερα ονομάστηκε νόσος Hodgkin (HL). Ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας (WHO), στην αναθεωρημένη έκδοση (2018) της εργασίας των Swerdlow et al. (2008) με τίτλο «Classification of Tumours of the Haematopoietic and Lymphoid Tissues, A Consensus Classification of Hematologic Malignancies», ταξινομεί τα κακοήγη αιματολογικά νοσήματα (hematological malignancies) με βάση τον ανοσοφαινότυπο, τις κυτταρογενετικές ανωμαλίες, την κυτταρική μορφολογία και άλλες κλινικές παραμέτρους. [13]



Σχήμα 2.1. Οι πορείες διαφοροποίησης του αρχέγονου αιμοποιητικού κυττάρου. [13]

Σύμφωνα με το κλασικό μοντέλο της αιμοποίησης, η διαφοροποίηση του αρχέγονου αιμοποιητικού κυττάρου (hematopoietic stem cell) κατευθύνεται προς τον κλάδο των κυττάρων της λεμφικής σειράς (B, T, NK λεμφοκύτταρα) και τον κλάδο των κυττάρων της μυελικής (κοκκιοκύτταρα, μονοκύτταρα) - ερυθράς σειράς (ερυθροκύτταρα,

μεγακαρυοκύτταρα) [Σχήμα 2.1.]. Η παθογένεση των αιματολογικών νεοπλασμάτων αποδίδεται στην κακοήγη εξαλλαγή του αρχέγονου αιμοποιητικού κυττάρου ή προγονικών αιμοποιητικών κυττάρων από πολλαπλές γενετικές βλάβες. [13,14]

2.2. ΟΞΕΙΕΣ ΛΕΥΧΑΙΜΙΕΣ

Η λευχαιμία (ελλην. λευκός + αίμα) αποτελεί κακοήγη διαταραχή των αιμοποιητικών κυττάρων, κατά την οποία τα κακοήγη κύτταρα (βλάστες) σταματούν να διαφοροποιούνται και διαιρούνται ανεξέλεγκτα. Η εκτεταμένη διήθηση του μυελού των οστών εμποδίζει τη φυσιολογική αιμοποίηση. Ανάλογα με την εξέλιξη της νόσου, οι λευχαιμίες διαιρούνται σε οξείες και χρόνιες. Οι δύο κυριότερες μορφές οξείας λευχαιμίας είναι η Οξεία Λεμφοβλαστική Λευχαιμία (ALL) και η Οξεία Μυελογενής Λευχαιμία (AML).

2.2.1. Οξεία Λεμφοβλαστική Λευχαιμία (ALL)

Η ALL χαρακτηρίζεται από τον ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό B ή T λεμφοβλαστών στο μυελό των οστών. Το 75% των ασθενών διαγιγνώσκεται με B-ALL, η οποία ταξινομείται σε τρεις υπότυπους, την πρόιμη πρόδρομη (pro), την πρόδρομη ή κοινή (pre) και την ώριμη B-ALL. Δομικές και αριθμητικές χρωμοσωματικές ανωμαλίες ανευρίσκονται στο 70% των παιδιών και στο 90% των ενηλίκων ασθενών [Πίνακας 2.1.]. [15]

Πίνακας 2.1. Η ταξινόμηση της Οξείας Λεμφοβλαστικής Λευχαιμίας κατά WHO (2016). [16]

B-lymphoblastic leukemia/lymphoma

B-lymphoblastic leukemia/lymphoma, NOS

B-lymphoblastic leukemia/lymphoma with recurrent genetic abnormalities

B-lymphoblastic leukemia/lymphoma with t(9;22)(q34.1;q11.2);*BCR-ABL1*

B-lymphoblastic leukemia/lymphoma with t(v;11q23.3);*KMT2A* rearranged

B-lymphoblastic leukemia/lymphoma with t(12;21)(p13.2;q22.1); *ETV6-RUNX1*

B-lymphoblastic leukemia/lymphoma with hyperdiploidy

B-lymphoblastic leukemia/lymphoma with hypodiploidy

B-lymphoblastic leukemia/lymphoma with t(5;14)(q31.1;q32.3) *IL3-IGH*

B-lymphoblastic leukemia/lymphoma with t(1;19)(q23;p13.3);*TCF3-PBX1*

Provisional entity: B-lymphoblastic leukemia/lymphoma, BCR-ABL1-like

Provisional entity: B-lymphoblastic leukemia/lymphoma with iAMP21

T-lymphoblastic leukemia/lymphoma

Provisional entity: Early T-cell precursor lymphoblastic leukemia

Provisional entity: Natural killer (NK) cell lymphoblastic leukemia/lymphoma

Οι σημαντικότεροι δυσμενείς προγνωστικοί παράγοντες για τη ALL αφορούν την μεγάλη ηλικία (ασθενείς >60 ετών), τον αριθμό των λευκών αιμοσφαιρίων (WBC) διάγνωσης (>30.000/μL στην B-ALL και >100.000/μL στην T-ALL), τον καρυότυπο μυελού των οστών και το χρόνο επίτευξης πλήρους ύφεσης. Η κινητική της ελάχιστης υπολειμματικής νόσου (MRD), η οποία μελετάται κυρίως με FC και Real time PCR, αποτελεί το βασικότερο προγνωστικό παράγοντα των ασθενών. Ασθενείς με καθυστέρηση στην εξάλειψη της MRD ($<10^{-4}$ παθολογικά κύτταρα επί συνόλου μονοπύρηνων κυττάρων μυελού) ή μοριακή υποτροπή έχουν υψηλό κίνδυνο κλινικής υποτροπής και μειωμένη επιβίωση. [15]

2.2.2. Οξεία Μυελογενής Λευχαιμία (AML)

Η AML αποτελεί τη συχνότερη (80%) μορφή οξείας λευχαιμίας των ενηλίκων, με αυξημένη επίπτωση σε άτομα >65 ετών. Χαρακτηρίζεται από ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό κλωνικού πληθυσμού αώρων κυττάρων της μυελικής σειράς στο BM. Παρά την πρόοδο στη θεραπεία της νόσου στους νεαρούς ασθενείς, το 70% των ηλικιωμένων ασθενών έχει μέση επιβίωση ~1 έτος. Το πρώτο σύστημα ταξινόμησης της AML, από την Γαλλική, Αμερικανική και Βρετανική ένωση επιστημόνων (FAB) ορίζει οκτώ υπότυπους (M0-M7) βάσει μορφολογικών και κυτταροχημικών ιδιοτήτων των λευχαιμικών κυττάρων [Πίνακας 2.2.A]. Το αναθεωρημένο σύστημα ταξινόμησης του WHO ταξινομεί την AML σε έξι κύριες οντότητες με κριτήρια τη μορφολογία, τον ανοσοφαινότυπο και τα κλινικά συμπτώματα [Πίνακας 2.2.B]. Ανάλογα με τις κυτταρογενετικές βλάβες, αναγνωρίζονται ένδεκα υπότυποι καθώς οι περιπτώσεις που σχετίζονται με ιστορικό μυελοδυσπλασίας (π.χ. μονοσωμία 5 ή 7 και οι ελλείψεις στα 5q ή 7q). [17]

Πίνακας 2.2. Ταξινόμηση της AML κατά FAB (A) και κατά τον WHO στην αναθεώρηση του 2016 (B). [18,19]

Α

Υπότυπος (FAB)	Όνομα
M0	Αδιαφοροποίητη AML
M1	AML με ελάχιστη ωρίμανση
M2	AML με πλήρη ωρίμανση
M3	Οξεία Προμυελοκυτταρική Λευχαιμία (APL)
M4	Οξεία Μυελομονοκυτταρική Λευχαιμία
M5	Οξεία Μονοκυτταρική Λευχαιμία με ηωσινοφιλία
M6	Οξεία Ερυθρολευχαιμία
M7	Οξεία Μεγακαρυοβλαστική Λευχαιμία

Β

ΟΜΛ με επαναλαμβανόμενες γενετικές ανωμαλίες

ΟΜΛ με t(8;21)(q22;q22.1); *RUNX1-RUNX1T1*

ΟΜΛ με inv(16)(p13.1q22) ή t(16;16)(p13.1;q22); *CBFB-MYH11*

Οξεία προμυελοκυτταρική λευχαιμία με *PML-RARA*¹

ΟΜΛ με t(9;11)(p21.3;q23.3); *MLLT3-KMT2A*²

ΟΜΛ με t(6;9)(p23;q34.1); *DEK-NUP214*

ΟΜΛ με inv(3)(q21.3q26.2) ή t(3;3)(q21.3;q26.2); *GATA2, MECOM(EVI1)*

ΟΜΛ (μεγακαρυοβλαστική) με t(1;22)(p13.3;q13.3); *RBM15-MKL1*³

Προσωρινή οντότητα: ΟΜΛ με *BCR-ABL1*

ΟΜΛ με μεταλλαγμένο *NPM1*⁴

ΟΜΛ με διαλληλικές μεταλλάξεις του *CEBPA*⁴

Προσωρινή οντότητα: ΟΜΛ με μεταλλαγμένο *RUNX1*

ΟΜΛ με αλλαγές που σχετίζονται με μυελοδυσπλασία⁵

Μυελικά νεοπλάσματα που σχετίζονται με θεραπεία⁶

ΟΜΛ, με μη ειδικούς χαρακτήρες (NOS)

ΟΜΛ με ελάχιστη διαφοροποίηση

ΟΜΛ χωρίς ωρίμανση

ΟΜΛ με ωρίμανση

Οξεία μυελομονοκυτταρική λευχαιμία

Οξεία μονοβλαστική/μονοκυτταρική λευχαιμία

Αμιγής ερυθρολευχαιμία⁷

Οξεία μεγακαρυοβλαστική λευχαιμία

Οξεία βασεοφιλική λευχαιμία

Οξεία πανμυέλωση με μυελοϊνωση

Μυελοειδές σάρκωμα

Μυελική υπερπλασία που σχετίζεται με σύνδρομο Down

Παροδική ανώμαλη μυελοποίηση

Μυελογενής λευχαιμία που συνδυάζεται με το σύνδρομο Down

Νεόπλασμα από πλασμακυτταροειδή δένδριτικά κύτταρα

Η ηλικία και η φυσική κατάσταση του ασθενούς σε συνδυασμό με άλλες εργαστηριακές παραμέτρους (αιμοπετάλια, κρεατινίνη ορού, αλβουμίνη) αποτελούν τους βασικούς προγνωστικούς παράγοντες για την εμφάνιση τοξικότητας από τη χημειοθεραπεία. Οι κυτταρογενετικές ανωμαλίες θεωρούνται ο ισχυρότερος προγνωστικός παράγοντας επιβίωσης των ασθενών. Οι γονιδιακές μεταλλάξεις σε συνδυασμό με τις κυτταρογενετικές βλάβες βοηθούν στην προγνωστική ταξινόμηση των ασθενών. [17]

2.3. ΜΥΕΛΟΔΥΣΠΛΑΣΤΙΚΑ ΣΥΝΔΡΟΜΑ (MDS)

Τα Μυελοδυσπλαστικά Σύνδρομα (Myelodysplastic Syndromes, MDS) αποτελούν μια ομάδα στενά συνδεδεμένων κλωνικών αιμοποιητικών διαταραχών. Χαρακτηρίζονται από μη αποδοτική αιμοποίηση (δυσμυελοποίηση), κυτταροπενίες και υψηλό κίνδυνο μετασχηματισμού προς AML (προλευχαιμικές οντότητες). Η επίπτωση των MDS είναι συχνότερη στους ηλικιωμένους άνδρες (>60 ετών) και σε ασθενείς που μετά από κυτταροτοξική θεραπεία, ακτινοθεραπεία ή έκθεση σε γενοτοξικούς παράγοντες (π.χ βενζένιο). Σε αρκετούς ασθενείς με ιδιοπαθή κυτταροπενία χωρίς δυσπλασία (ICUS) ανιχνεύονται μεταλλάξεις και κλωνική αιμοποίηση, τα οποία προδιαθέτουν για την ανάπτυξη MDS. [20,21]

Τα MDS ταξινομούνται σε de novo και δευτεροπαθή (μετά από εντατική χημειοθεραπεία για άλλο νεόπλασμα) [Πίνακας 2.3.]. Με την FC γίνεται η καταμέτρηση του αριθμού των άωρων κυττάρων της μυελικής σειράς (μυελοβλάστες) και ανιχνεύονται μη φυσιολογικά ανοσοφαινοτυπικά πρότυπα, ιδιαίτερα σε περιστατικά με ελάχιστη δυσπλασία. Η κλασσική κυτταρογενετική ανάλυση (καρυότυπος 25 μεταφάσεων) χρησιμεύει στην επιλογή της θεραπείας και στην αξιολόγηση του κινδύνου εκτροπής του MDS. Η χρήση της FISH και η ανίχνευση μεταλλάξεων (αλληλούχηση νέας γενιάς) κατέχει επικουρικό ρόλο.[20]

Πίνακας 2.3. Ταξινόμηση των MDS κατά FAB (A) και WHO (B). [16,22]

A	
Classification	Characteristics
Refractory anemia (RA)	Cytopenia of 1 PB lineage; normo- or hypercellular marrow with dysplasias; < 1% blasts in PB and < 5% bone marrow blasts
Refractory anemia with ringed sideroblasts (RARS)	Cytopenia and dysplasia, with same percentage blast as RA; > 15% ringed sideroblasts in bone marrow
Refractory anemia with excess blasts (RAEB)	Cytopenia of ≥ 2 PB lineages; dysplasia involving all 3 lineages; < 5% PB blasts and 5%–20% bone marrow blasts
Refractory anemia with excess blasts in transformation (RAEB-t)	Same hematologic features as RAEB; > 5% blasts in PB or 21%–30% blasts in bone marrow or presence of Auer rods in blasts
Chronic myelomonocytic leukemia (CMML)	Monocytosis in PB; < 5% blasts in PB and up to 20% bone marrow blasts
PB = peripheral blood. Adapted from Catenacci DV, Schiller GJ. Myelodysplastic syndromes: a comprehensive review. <i>Blood Rev.</i> 2005;19(6): 301-319. Reprinted with permission. © 2008 Elsevier.	

Myelodysplastic syndromes (MDS)

MDS with single lineage dysplasia

MDS with ring sideroblasts (MDS-RS)

MDS-RS and single lineage dysplasia

MDS-RS and multilineage dysplasia

MDS with multilineage dysplasia

MDS with excess blasts

MDS with isolated del(5q)

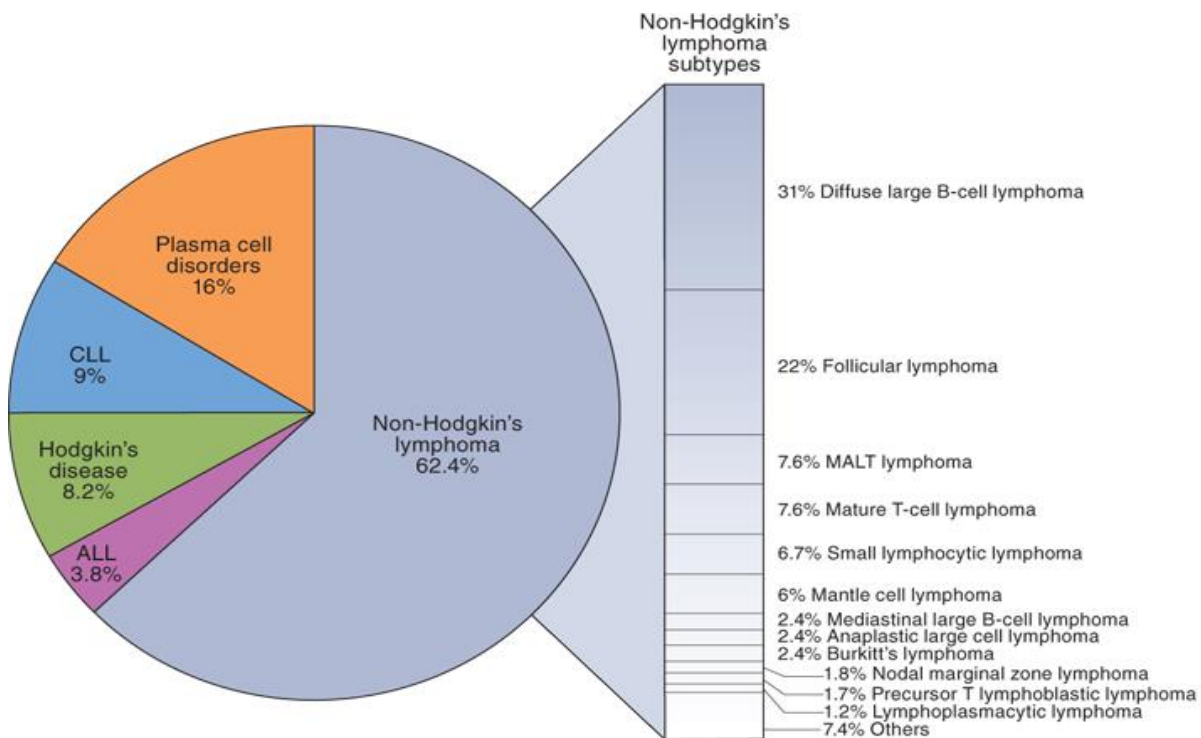
MDS, unclassifiable

Provisional entity: Refractory cytopenia of childhood

Η πρόγνωση των ασθενών εκτιμάται, από το 1997, μέσω του προγνωστικού συστήματος IPSS (International Prognostic Scoring System). Το προγνωστικό score καταρτίζεται από τρεις παραμέτρους (αριθμός βλαστών, κυτταροπενίες, κυτταρογενετική). Στην αναθεώρηση του IPSS (2012) προστέθηκαν τα επίπεδα της αιμοσφαιρίνης και ο απόλυτος αριθμός των ουδετερόφιλων. Οι ασθενείς κατατάσσονται, βάσει του IPSS, σε ομάδες πολύ χαμηλού, χαμηλού, ενδιάμεσου, υψηλού και πολύ υψηλού κινδύνου. [21]

2.4. ΛΕΜΦΟΪΠΕΡΠΛΑΣΤΙΚΑ ΝΟΣΗΜΑΤΑ (LPD)

Στα κακοήγη λεμφοϋπερπλαστικά νοσήματα περιλαμβάνονται το λέμφωμα Hodgkin (HL), τα Non Hodgkin λεμφώματα (NHL), οι λεμφογενείς λευχαιμίες και οι πλασματοκυτταρικές δυσκρασίες [Σχήμα 2.2.]. Με την εφαρμογή εργαστηριακών (π.χ. FISH, PCR), απεικονιστικών (CT, MRI, PET scan) και άλλων μεθόδων επιτυγχάνεται η κατάταξη και η σταδιοποίηση για το >97% των ασθενών. Σε ένα μικρό ποσοστό ασθενών, λόγω επικάλυψης νοσολογικών οντοτήτων, η κατάταξη και περιγραφή της νόσου είναι δύσκολη ή αδύνατη. [23]

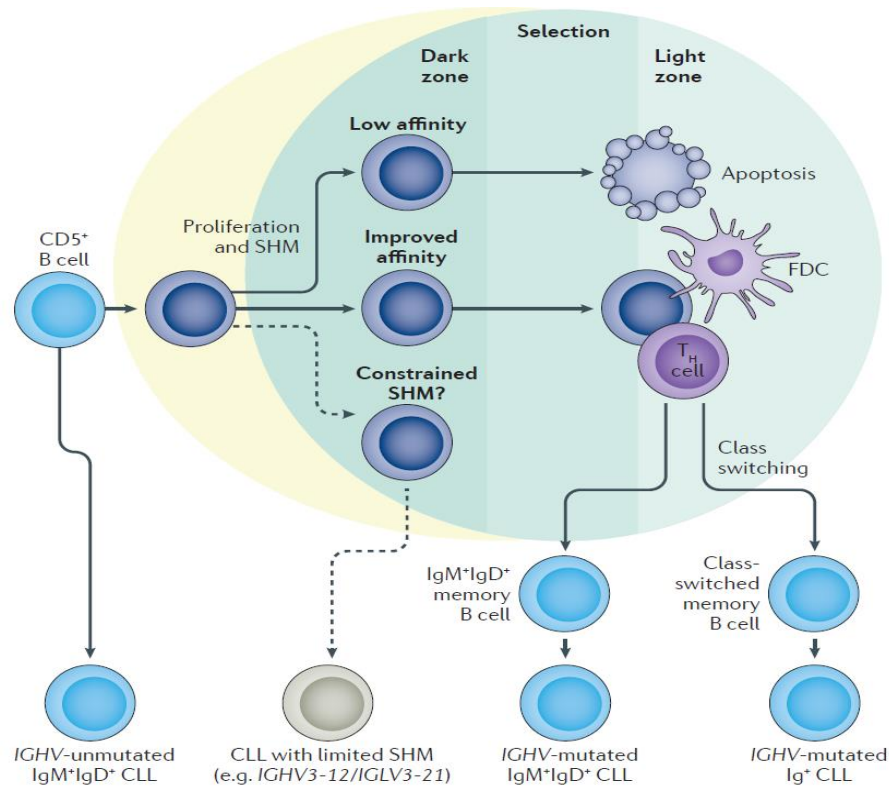


Source: D. L. Kasper, A. S. Fauci, S. L. Hauser, D. L. Longo, J. L. Jameson, J. Loscalzo: Harrison's Principles of Internal Medicine, 19th Edition. www.accessmedicine.com Copyright © McGraw-Hill Education. All rights reserved.

Σχήμα 2.2. Η αναθεωρημένη ταξινόμηση (2016) του WHO για τα νεοπλάσματα του λεμφικού ιστού. [24]

2.4.1. Χρόνια Λεμφοκυτταρική Λευχαιμία (CLL)

Η Χρόνια Λεμφοκυτταρική Λευχαιμία (CLL) χαρακτηρίζεται από τη διήθηση του μυελού των οστών, του περιφερικού αίματος και του λεμφικού ιστού από μικρά, ώριμα CD5(+) νεοπλασματικά B λεμφοκύτταρα [Σχήμα 2.3.]. Οι ασθενείς προσέρχονται στη διάγνωση με λεμφοκυττάρωση, λευχαιμική διήθηση του μυελού, λεμφαδενοπάθεια και σπληνομεγαλία. Η παρουσία σωματικών υπερμεταλλάξεων στην περιοχή του γονιδίου *IGHV* είναι δηλωτική της ωρίμανσης του νεοπλασματικού κλώνου. Οι ασθενείς χωρίς μεταλλαγμένο *IGHV* φέρουν επιθετική νόσο από B κύτταρα που δεν έχουν εισέλθει στα βλαστικά κέντρα. [25]



Σχήμα 2.3. Η κυτταρική προέλευση της CLL. Τα φυσιολογικά B κύτταρα υφίστανται $V(D)J$ ανασυνδυασμό, εκφράζουν λειτουργικό BCR, διεγείρονται από αντιγόνα και αλληλεπιδρούν με $CD4(+)$ T βοηθητικά και άλλα κύτταρα στα θυλάκια των βλαστικών κέντρων των λεμφαδένων. Στη σκοτεινή ζώνη του βλαστικού κέντρου, τα B κύτταρα πολλαπλασιάζονται ταχέως και αποκτούν σωματικές υπερμεταλλάξεις στις μεταβλητές περιοχές των γονιδίων της βαριάς (IGHV) και ελαφριάς (IGHL) αλυσίδας της ανοσοσφαιρίνης. Στη φωτεινή ζώνη του βλαστικού κέντρου, τα B κύτταρα αλληλεπιδρούν με αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα και υφίστανται μετάπτωση τάξης. Η CLL μπορεί να προκύψει από B κύτταρα που δεν φέρουν ή έχουν υποστεί μερικώς σωματικές μεταλλάξεις ή από μνημονικά B κύτταρα του βλαστικού κέντρου με ή χωρίς μετάπτωση τάξης. [25]

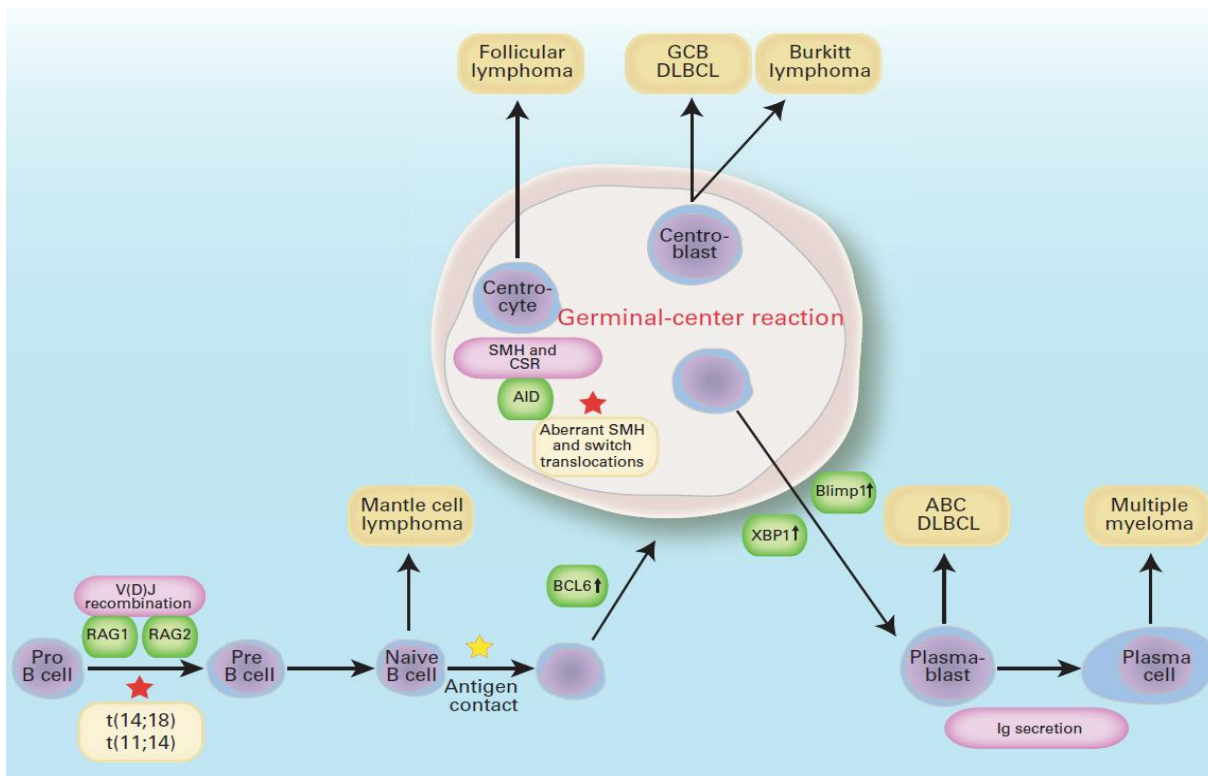
Η εργαστηριακή αξιολόγηση βασίζεται στη γενική εξέταση αίματος και τον ανοσοφαινότυπο περιφερικού αίματος με κυτταρομετρία ροής. Στους ασθενείς, ο αριθμός των WBC συχνά ξεπερνά τα 10.000 κύτταρα/ μL και συνοδεύεται με απόλυτη λεμφοκυττάρωση (>3500 λεμφοκύτταρα/ μL). Η $\text{del}(13q)$ είναι η συχνότερη ($>50\%$) χρωμοσωματική ανωμαλία που ανευρίσκεται στα κύτταρα των ασθενών με CLL. Η ανωτέρω έλλειψη περιέχει τα miR-15,16 που αναστέλλουν την έκφραση αντιαποπτωτικών γονιδίων και συνδέεται με ευνοϊκή

πρόγνωση. Σχεδόν το 80% των ασθενών φέρει ελλείψεις όπως οι *del(13q)* και *del(17p)* ή τρισωμία 12 (ενδιάμεση πρόγνωση). Οι *del(13q)* και *del(17p)* περιέχουν τα ογκοκατασταλτικά γονίδια *TP53* και *ATM* αντίστοιχα και συνδέονται με δυσμενή πρόγνωση. [25]

Η διαφορική διάγνωση περιλαμβάνει την προλεμφοκυτταρική λευχαιμία (σε περίπτωση ατελώς διαφοροποιημένου μονοκλωνικού πληθυσμού), το λέμφωμα από μικρά λεμφοκύτταρα (SLL) και τη μονοκλωνική B λεμφοκυττάρωση (MBL). Στο SLL, οι ασθενείς έχουν <5000 κλωνικά B κύτταρα/μL στο PB. Στη MBL, οι ασθενείς δεν εμφανίζουν ψηλαφητούς λεμφαδένες και φέρουν <5000 κλωνικά B κύτταρα/μL με ανοσοφαινότυπο της CLL. Ανάλογα με τον αριθμό των κυττάρων, η MBL διακρίνεται σε MBL high count (>500 κύτταρα/μL) και MBL low count (<500 κύτταρα/μL). Η MBL σπάνια (1-2%) εξελίσσεται σε CLL. [25]

2.4.2. Non Hodgkin Λεμφώματα (NHL)

Τα Non Hodgkin λεμφώματα (NHL) προσβάλλουν κατά κανόνα άτομα μέσης ή και προχωρημένης ηλικίας (60-70 ετών) και περιλαμβάνουν ετερογενή ομάδα νεοπλασιών του λεμφικού ιστού. Οι περισσότεροι τύποι λεμφωμάτων εμφανίζονται με σχετικά αυξημένη συχνότητα στους άνδρες (λόγος ♂/♀ 1-1,5). Ανάλογα με την εξέλιξη της νόσου, διακρίνονται στα χαμηλής κακοήθειας λεμφώματα και στα επιθετικά λεμφώματα [Σχήμα 2.4.]. Τα πρώτα χαρακτηρίζονται παραμένουν ανίατα και χαρακτηρίζονται από βραδεία κλινική εξέλιξη. Τα δεύτερα είναι εν πολλοίς ιάσιμα (40-80%), αλλά εμφανίζουν ταχεία εξέλιξη. Το 85% των NHLs είναι B κυτταρικής προέλευσης (B NHL) και στο υπόλοιπο 15% των περιστατικών ο λεμφωματικός κλώνος προέρχεται από τα T λεμφοκύτταρα (T NHL). [23]



Σχήμα 2.4. Τα λεμφώματα προέρχονται από διάφορα στάδια της διαφοροποίησης των *B* κυττάρων. Η αναδιάταξη των γονιδίων των ανοσοσφαιρινών μπορεί να οδηγήσει σε χρωμοσωματικές αναδιατάξεις, όπως οι *t*(14;18) και *t*(11;14), που αποτελούν κρίσιμα στάδια για την παθογένεση πολλών NHL, όπως το λέμφωμα κυττάρων μανδύα (Mantle Cell Lymphoma, MCL). Σε σφάλματα επί διαδικασιών ανασυνδυασμού (σωματικές υπερμεταλλάξεις, μετάπτωση τάξης) στα διεγερμένα από αντιγόνο *B* κύτταρα των βλαστικών κέντρων αποδίδεται η παθογένεση λεμφωμάτων όπως το οζώδες λέμφωμα (Follicular lymphoma, FL) και το λέμφωμα Burkitt. Κατά τη διαφοροποίηση των *B* κυττάρων σε πλασματοκύτταρα, μπορεί να προκύψει το διάχυτο λέμφωμα από ενεργοποιημένα *B* κύτταρα (Activated *B* Cell-like Diffuse Large *B* Cell Lymphoma, ABC DLBCL). [26]

Συνήθως η ιστολογική διάγνωση των NHL τίθεται με βιοψία λεμφαδένος, σπληνός ή οστεομυελική βιοψία επί πρωτοπαθούς εστίας στον μυελό των οστών. Η οστεομυελική βιοψία είναι απαραίτητη για τη σταδιοποίηση της νόσου και διαγνωστική για ορισμένα λεμφώματα (π.χ. σπληνικό λέμφωμα). Μεγάλη διαγνωστική ευαισθησία εμφανίζει η μέθοδος FISH για κυτταρογενετικές ανωμαλίες όπως οι *t*(14;18), *t*(11;14), *t*(8;14) και άλλες. Η PCR

χρησιμοποιείται για αναδιατάξεις συγκεκριμένων ογκογονιδίων (π.χ. *BCL-2*, *c-MYC*, *PAX-5*). [23]

2.5. ΠΟΛΛΑΠΛΟ ΜΥΕΛΩΜΑ (MM)

Το Πολλαπλό Μυέλωμα (MM) προκύπτει από τον κακοήγη μετασχηματισμό των τελικώς διαφοροποιημένων πλασματοκυττάρων. Ανήκει σε ένα σύνολο παθήσεων που ονομάζονται μονοκλωνικές γαμμαπάθειες (monoclonal gammopathies). Σε αυτές ανήκει και η ασυμπτωματική μονοκλωνική γαμμαπάθεια αδιευκρίνιστης σημασίας (MGUS), η οποία εξελίσσεται σε MM (~15%) ή κακοήθες λέμφωμα (~20%) εντός 25 ετών. Το MM προκύπτει από μία πολυσταδιακή διεργασία που ξεκινά με την εμφάνιση μονοκλωνικού πληθυσμού πλασματοκυττάρων (MGUS). Το MM εξελίσσεται με την εμφάνιση της νόσου αρχικά στο μυελό των οστών και στη συνέχεια σε εξωμυελικές θέσεις (εξωμυελικό MM, πλασματοκυτταρική λευχαιμία). [27]

Οι κυριότερες κυτταρογενετικές βλάβες στο MM περιλαμβάνουν την ήπια (47-50 χρωμοσώματα) ή υψηλή υπερδιπλοειδία (>50 χρωμοσώματα) λόγω τρισωμίας (επιπλέον χρωμοσώματα 5, 7, 9, 11, 15 ή 19) και τις t(4;14) *NSD2/FGFR3* [11%], t(14;16) [3%], t(14;20) [3%]. Η τρισωμία 3 ή 5 συνδέεται με ευνοϊκή πρόγνωση, σε αντίθεση με την τρισωμία 21 και την t(4;14). Άλλες κυτταρογενετικές ανωμαλίες που εμφανίζονται αφορούν ελλείψεις [del(1p), del(13q), del(17p)] ή προσθήκες [π.χ. gain(1q)]. Οι del(17p) και η t(8;14) ανιχνεύονται σε ανθεκτική νόσο ή στην πλασματοκυτταρική λευχαιμία (PCL). Προκαλούν τη μεταγραφική ενεργοποίηση και υπερπαραγωγή του MYC λόγω μετατόπισης του γονιδίου *c-MYC* καθοδικά του υποκινητή του γονιδίου *IGH*. Σημειώνεται, ότι η συνυπάρξη χρωμοσωματικής ανωμαλίας δυσμενούς πρόγνωσης [del(17p), t(4;14), del(1p32), del(6q)] εξασθενεί την προγνωστική αξία χρωμοσωματικής ανωμαλίας ευνοϊκής πρόγνωσης (υπερδιπλοειδία, τρισωμία 3 ή 5, t(11;14)]. Ανεξάρτητοι παράγοντες υψηλού κινδύνου θεωρούνται οι t(4;14), t(14;16), t(14;20) και η del(17/17p), απουσία υπερδιπλοειδίας. Συνδυασμός >3 βλαβών σχετίζεται με μειωμένη επιβίωση. Ο FISH στα CD138(+)

πλασματοκύτταρα θεωρείται η μέθοδος εκλογής για την ανίχνευση των παραπάνω βλαβών. [27]

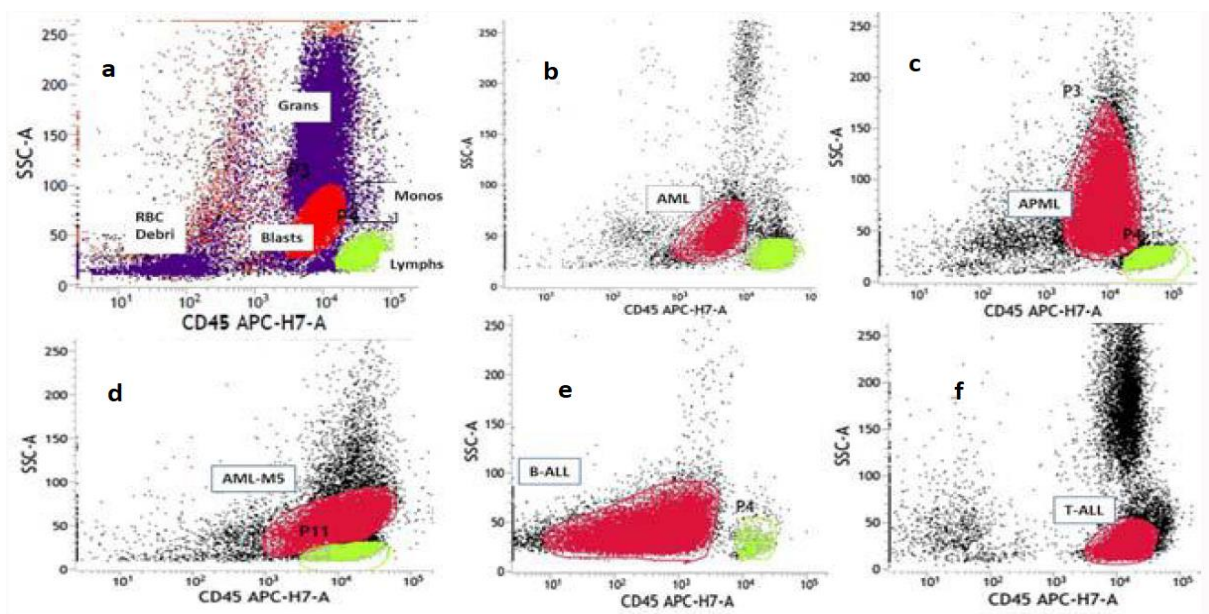
Τα εν χρήσει διαγνωστικά κριτήρια της διεθνούς ομάδας εργασίας για το MM (IMWG) βασίζονται στην ανίχνευση πλασματοκυτταρικής διήθησης ή μονοκλωνικής ανοσοσφαιρίνης και στη συμπτωματολογία CRAB (υπερασβεστιαμία, αναιμία, νεφρική ανεπάρκεια, οστεολυτικές βλάβες στην CT). Επιπλέον, η μέτρηση των ελεύθερων αλυσίδων ορού (FLC) και η χρήση της MRI επιτρέπουν τη διαφοροδιάγνωση του MM από άλλες πλασματοκυτταρικές δυσκρασίες. Στο μυελόγραμμα ή την οστεομυελική βιοψία, η διήθηση του μυελού ($\geq 10\%$) από μονοκλωνικά πλασματοκύτταρα θέτει την διάγνωση της νόσου. Η κλωνικότητα των πλασματοκυττάρων επιβεβαιώνεται και με την κυτταρομετρία ροής (ανοσοφαινότυπος). [27]

Το διεθνές σύστημα σταδιοποίησης (ISS) του MM κατατάσσει την νόσο σε 3 στάδια με βάση τα επίπεδα αλβουμίνης (Alb) και $\beta 2$ μικροσφαιρίνης ($\beta 2$ -M) στον ορό, το στάδιο I ($\beta 2$ -M $< 3,5$ g/dL, Alb $\geq 3,5$ g/dL), το στάδιο II ($\beta 2$ -M 3,5-5,4 g/dL, Alb $\geq 3,5$ g/dL) και το στάδιο III ($\beta 2$ -M $\geq 5,4$ g/dL). Στην αναθεωρημένη του ISS, στο στάδιο III εντάσσεται η γαλακτική αφυδρονάση (LDH) ορού και ο καρυότυπος/FISH. Προγνωστική σημασία διαθέτει η μορφολογία, ο αριθμός και ο ρυθμός πολλαπλασιασμού των κυκλοφορούντων πλασματοκυττάρων, η παρουσία μεταλλαγών στο γονίδιο *TP53*, η υπογαμμασφαιριναιμία, η παρουσία εξωμυελικής νόσου ή νεφρικής ανεπάρκειας και η φυσική κατάσταση του ασθενούς. [27]

2.6. Η ΣΥΜΒΟΛΗ ΤΗΣ ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΙΑΣ ΡΟΗΣ ΣΤΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ ΤΩΝ ΑΙΜΑΤΟΛΟΓΙΚΩΝ ΝΟΣΗΜΑΤΩΝ

Τα φυσιολογικά αιμοποιητικά κύτταρα διαθέτουν συγκεκριμένο πρότυπο έκφρασης αντιγόνων διαφοροποίησης (CD antigens) σε κάθε στάδιο ωρίμανσης. Αντίθετα, τα νεοπλασματικά κύτταρα εκφράζουν αντιγόνα που ανιχνεύονται σε άλλα στάδια διαφοροποίησης (π.χ. δείκτες αωρότητας όπως το CD34, HLA-DR, TdT) ή σε διαφορετικούς κυτταρικούς τύπους (aberrant antigen expression). Ακόμη, παρατηρείται ομοιογενής έκφραση

αντιγόνων σε ένα πληθυσμό κυττάρων που φυσιολογικά εμφανίζει ποικίλη έκφραση (π.χ. περιορισμός ελαφριών αλυσίδων στα λεμφώματα). [2,28]



Σχήμα 2.5. Το βλαστικό «παράθυρο» στο στικτόγραμμα $CD45=f(SS)$. Διακρίνεται (a) ο πληθυσμός των $CD45$ weak βλαστικών κυττάρων (b) σε περιστατικό AML (c) προμυελοκυτταρικής AML (M3) με χαρακτηριστικό δακρυόσχημο gate (αυξημένος SS) (d) μονοκυτταρικής AML (M5) όπου ο βλαστικός πληθυσμός εντοπίζεται στη θέση των μονοκυττάρων (e) B-ALL όπου οι λεμφοβλάστες εμφανίζουν διακύμανση ως προς την έκφραση του $CD45$ και (f) T-ALL όπου οι λεμφοβλάστες βρίσκονται στην περιοχή των λεμφοκυττάρων. Προσαρμογή από [28]

Ο ανοσοφαινότυπος των λευχαιμιών και λεμφωμάτων αποτελεί μία από τις σπουδαιότερες κλινικές εφαρμογές της πολυπαραμετρικής FC. Ο βλαστικός πληθυσμός (βλαστικό παράθυρο) γενικά διαθέτει ασθενή έκφραση του $CD45$ στο στικτόγραμμα $CD45=f(SS)$ [Σχήμα 2.5.]. Με την FC διακρίνονται με ευκολία τα κύτταρα της μυελικής και λεμφικής σειράς στις αντίστοιχες οξείες λευχαιμίες καθώς και στις αδιαφοροποίητες οντότητες. Χρησιμοποιούνται εκτενείς ομάδες δεικτών για την ταυτοποίηση των B ($CD19$, $CD10$, $CD20$, $CD22$, $cCD79a$), T ($CD3$, $CD5$, $CD7$, $CD1a$, $CD2$, $CD4$, $CD8$), NK ($CD16$, $CD56$) κύτταρων της λεμφικής σειράς αλλά και των κυττάρων της μυελικής ($CD13$, $CD33$, $CD117$, $CD15$, $CD38$, $CD123$, $cMPO$), μονοκυτταρικής ($CD64$, $CD14$, $CD11b$, $CD11c$,

λυσοζύμη), ερυθράς (CD71, CD235a) και μεγακαρυοκυτταρικής (CD41, CD61, CD36) σειράς [Πίνακας 2.4.]. [2,3,28]

Πίνακας 2.4. Τα κυριότερα αντιγόνα που χρησιμοποιείται στη μελέτη του ανοσοφαινότυπου. Διακρίνεται η μεταβολή της έκφρασης των αντιγόνων (CD antigens) κατά την ωρίμανση των κυττάρων. Με (++) σημειώνεται η ισχυρή έκφραση, με sub η μερική έκφραση (subset) και με var η ποικίλη έκφραση (variable) του εκάστοτε αντιγόνου στους κυτταρικούς πληθυσμούς. [29]

Antigen	Myelo- blasts	Promyelo- cytes	Maturing Grans	Mono- cytes	Erythroids	Megakar- yocytes	B Lym- phoid	T Lym- phoid	Comments
CD2	-	-	-	-	-	-	-	+	LFA-2; pan T-cell marker
CD3	-	-	-	-	-	-	-	+	OKT3; pan T-cell marker
CD4	-	-	-	-	-	-	-	Sub ^b	MHC-II associated; helper T cells
CD5	-	-	-	-	-	-	-	+	Leu-1; pan T-cell marker
CD7	-	-	-	-	-	-	-	+	Leu-9; pan T-cell marker
CD8	-	-	-	-	-	-	-	Sub	MHC-I associated; cytotoxic T cells
CD19	-	-	-	-	-	-	+	-	Leu-12; pan B-cell marker
CD20	-	-	-	-	-	-	+	-	L26; B-cell marker
CD22	-	-	-	-	-	-	+	-	BL-CAM; pan B-cell marker
CD79a	-	-	-	-	-	-	+	-	MB-1; pan B-cell marker
CD13	+	+	+	+	-	-	-	-	Aminopeptidase N; pan myeloid marker
CD14	-	-	+	++	-	-	-	-	LPS receptor; bright on monocytes
CD15	-	+	+	-	-	-	-	-	LeuM1; maturing granulocytes
CD33	+	+	+	++	+	-	-	-	Sialic acid adhesion molecule; pan myeloid marker
CD36	-	-	-	+	+	+	-	-	GP IIIb/IV
CD117	+	+	-	-	+	-	-	-	c-kit; bright on mast cells
CD64	-	-	+	+	-	-	-	-	FC-γ receptor
MPO	Sub	+	+	-/+	-	-	-	-	Myeloperoxidase; definitive myeloid marker
CD71	-	-	-	-	++	-	-	-	Transferrin receptor; dim expression on activated cells
GlyA	-	-	-	-	++	-	-	-	CD235a; carries MN antigens on red cells
CD41	-	-	-	-	-	+	-	-	GP IIb; megakaryocytic
CD61	-	-	-	-	-	+	-	-	GP IIIa; megakaryocytic
CD10	-	-	+	-	-	-	Sub	-	CALLA, also expressed by hematogones
CD38	+	Var ^c	Var	+	-	-	Var	Var	Broadly expressed
CD45	+	+	+	+	-	+	+	+	Leukocyte common antigen
HLA-DR	+	-	-	+	-	-	+	-	Class II MHC component
CD34	+	-	-	-	-	-	Sub	-	Adhesion molecule; marker of immature cells
TdT	-	-	-	-	-	-	Sub	-	Nucleotide transferase; marker of immature cells

Στα περισσότερα κλινικά εργαστήρια χρησιμοποιούνται panels mAbs έναντι αντιγόνων ειδικών για την προέλευση και την ωρίμανση των αιμοποιητικών κυττάρων, ώστε να ταυτοποιηθούν οι πληθυσμοί με παθολογικό πρότυπο έκφρασης αντιγόνων. Με την ανοσοφαινοτυπική μελέτη ανιχνεύονται σε ποικιλία δειγμάτων (περιφερικό αίμα, μυελός των οστών, βιοπτικό υλικό λεμφαδένα) χαρακτηριστικά πρότυπα έκφρασης ή παρουσία αντιγόνων που χαρακτηρίζουν τον πληθυσμό των νεοπλασματικών κυττάρων. Η αναζήτηση της MRD

μετά τη θεραπεία, βασίζεται στον καθορισμό των «συντεταγμένων» και της αντιγονικής υπογραφής των νεοπλασματικών κυττάρων κατά τη διάγνωση. [2]

Στη CLL, τα νεοπλασματικά κύτταρα εκφράζουν τους B δείκτες CD19 και CD20 (ασθενώς). Συχνά ανιχνεύεται η έκφραση του CD23 (χαμηλής συγγένειας Ige FcR), ενώ το 90% των ασθενών εμφανίζει χαρακτηριστική έκφραση του δείκτη της T σειράς CD5. Ασθενής ή αρνητική έκφραση αναφέρεται για τα αντιγόνα CD22, FMC7 και για τη μονοκλωνική ανοσοσφαιρίνη επιφανείας (surface Immunoglobulin, sIg). Το CD38 ανιχνεύεται στο 20% των ασθενών και συνδέεται με πτωχή πρόγνωση. [10] Η παρουσία του CD38 σε συνδυασμό με το FMC7 σχετίζεται με την παρουσία τρισωμίας 12. Σε αντίθεση με τα υπόλοιπα B-LPD, το αντιγόνο CD79b δεν ανιχνεύεται στο 95% των περιπτώσεων. Επίσης, εκφράζεται το CD200 (OX-2), γεγονός που συμβάλλει στη διαφοροδιάγνωση της CLL από το MCL. [25,30]

Στο MM απαιτείται η ταυτοποίηση μονοκλωνικού πληθυσμού πλασματοκυττάρων για να τεθεί η διάγνωση της νόσου. Τα παθολογικά πλασματοκύτταρα δεν εκφράζουν ή εμφανίζουν ασθενή έκφραση των CD19, CD27 και CD45. Σε όλες τις περιπτώσεις ανιχνεύεται το CD79a, το CD20 στο 15-20% των ασθενών και σπάνια το CD10. Τα νεοπλασματικά κύτταρα είναι θετικά ως προς τα CD28, CD38, CD138 (ισχυρό), και CD56. Εκφράζουν κυτταροπλασματική ανοσοσφαιρίνη (cytoplasmic Ig, cIg) και όχι ανοσοσφαιρίνη επιφανείας (sIg). Σε μικρό ποσοστό πλασματοκυττάρων μπορεί να εμφανισθεί ποικίλη έκφραση των CD20 και CD117. [31]

Ο ανοσοφαινότυπος στα κακοήγη NHLs είναι ιδιαίτερα ετερογενής και συχνά χρησιμοποιείται συνδυαστικά με τα αποτελέσματα της ανοσοϊστοχημικής μελέτης του βιοπτικού υλικού (παρακέντηση λεμφαδένου, οστεομυελική βιοψία) για την πλήρη τυποποίηση της νόσου. Τα περισσότερα λεμφώματα από B κύτταρα είναι CD19(+), CD20(+) και sIg (+). Το διάχυτο λέμφωμα από μεγάλα B κύτταρα είναι κατ' εξαίρεση sIg (±) και δεν φέρει άλλους χαρακτηριστικούς δείκτες. Το οζώδες λέμφωμα (Follicular Lymphoma, FL) χαρακτηρίζεται από μονοκλωνικό πληθυσμό B κυττάρων CD10(+), CD79b (+), FMC7(+), CD43(-), BCL-2(+) και BCL-6(+). Το λέμφωμα από κύτταρα μανδύα (Mantle Cell Lymphoma, MCL) είναι συνήθως CD5(+), CD79b (+), FMC7(+) και BCL-1(+). Στα λεμφώματα οριακής ζώνης (Marginal Zone Lymphoma, MZL) ανευρίσκονται μονοκλωνικά B

κύτταρα CD5(-), CD79b (+), FMC7(+) και BCL-2(+). Τέλος, το ιδιαίτερα επιθετικό λέμφωμα Burkitt εμφανίζει αυξημένο δείκτη πολλαπλασιασμού [ki-67(+ +)] και ανοσοφαινότυπο CD5(-), CD10(+), BCL-6(+), Tdt (-) και BCL-2(-). [23]

Κατά τη μελέτη του ανοσοφαινότυπου των MDS, σύμφωνα με τον WHO, εκτιμάται η παρουσία τουλάχιστον τριών ανοσολογικών ανωμαλιών, όπως η παθολογική αύξηση ή μείωση κυτταρικών πληθυσμών σε συνδυασμό με την έκτοπη έκφραση δεικτών αωρότητας σε ώριμα κύτταρα ή την παρουσία αντιγόνων άλλης κυτταρικής σειράς (π.χ. λεμφικής). Μεγάλη απήχηση απέκτησε το διαγνωστικό score των Ogata et al. (2009) για τη διάγνωση και πρόγνωση πιθανού MDS. Βασίζεται στην ανίχνευση ανοσολογικών ανωμαλιών κατά την ωρίμανση της κοκκιδώδους, της μονοκυτταρικής και της λεμφικής σειράς. [32] Κατά την ανοσοφαινοτυπική μελέτη της AML χρησιμοποιείται συνδυασμός ανοσολογικών δεικτών για τον προσδιορισμό της προέλευσης και του σταδίου διαφοροποίησης των λευχαιμικών κυττάρων [Πίνακας 2.5.]. [33] Κατά την εκτροπή του MDS προς AML, η δυσπλασία της κοκκιδώδους σειράς, εκτός από τη διαταραχή των FS/SS, εμφανίζεται και με παθολογικό πρότυπο των δεικτών ωρίμανσης. [28]

Πίνακας 2.5. Τα κυριότερα αντιγόνα που εκφράζονται στις συχνότερες μορφές AML. [29]

Υπότυπος (FAB)	Ανοσοφαινότυπος
M0	Αδιαφοροποίητη AML CD34(+) CD117(+) CD13(±) CD15(±) CD33(±) CD64(±)
M4	Οξεία Μυελομονοκυτταρική Λευχαιμία CD14(+), CD36(+) ή CD64, ισχυρώς τα CD33, CD4, CD11b ή CD11c
M5	Οξεία Μονοκυτταρική Λευχαιμία με ηωσινοφιλία CD34(-) CD117(-), ισχυρώς το CD64
M6	Οξεία Ερυθρολευχαιμία CD36(+) CD71(+) CD235a (+)
M7	Οξεία Μεγακαρυοβλαστική Λευχαιμία CD41 (gp IIb), CD61 (gp IIIa)

Στη διάγνωση της B-ALL, ανιχνεύεται η έκφραση του HLA-DR και CD19, CD79a, cCD22 (τουλάχιστον ένας B δείκτης). Βασικοί δείκτες κατάταξης της νόσου θεωρούνται το

αντιγόνο CD10 που εκφράζεται στην κοινή (common) B-ALL και οι sIg, cIg. Σημειώνεται ότι το CD10 ανιχνεύεται και στα φυσιολογικά αιματογόνια (ανώριμα B λεμφοκύτταρα), συνεπώς αυτή καθ' εαυτή η παρουσία του δεν κατέχει ισχυρή διαγνωστική αξία. Η Tdt ανιχνεύεται στην πλειονότητα των περιπτώσεων, με εξαίρεση τις ώριμες μορφές τύπου Burkitt.

Η B-ALL t(4;11) είναι συνήθως CD10(-), CD24(±), CD15,65(+). Η B-ALL t(1;19) είναι συνήθως CD34(-), CD10(-), CD20(+), CD19(+), ενώ η B-ALL t(12;21) εκφράζει ισχυρώς τα CD10, HLA-DR και ασθενώς τα CD45, CD20 και CD34 μαζί με πιθανή έκτοπη έκφραση του CD56. Η παρουσία του CD20 στους ενήλικες με κοινή B-ALL εξασθενεί την ευνοϊκή πρόγνωση της νόσου. Υπερέκφραση του CD22 αναφέρεται για την υπερδιπλοειδική B-ALL. [28]

Δείκτες κλειδιά για την κατάταξη της T-ALL θεωρούνται τα cCD1a και sCD3, cCD3. Για τη διάγνωση της T-ALL απαιτείται η έκφραση της Tdt και ενός εκ των sCD3 και cCD3. Το CD7 εκφράζεται σχεδόν πάντοτε μαζί με άλλους βασικούς T δείκτες, αλλά επειδή συχνά ανευρίσκεται και στους βλάστες της AML διαθέτει μειωμένη διαγνωστική αξία. Μυελικοί δείκτες (π.χ. CD117) εκφράζονται και στην T-ALL, ενώ το CD34 ανιχνεύεται στην πρόδρομη T-ALL. Ανάλογα με την έκφραση των CD4, CD8 η T-ALL διακρίνεται στην πρόδρομη CD4(-) CD8(-), στη θυμική CD4(+) CD8(+) και την ώριμη CD4(+) ή CD8(+) T-ALL. Η ισχυρή έκφραση του CD45 στην ALL συνδέεται με υψηλό κίνδυνο υποτροπής. [15,34]

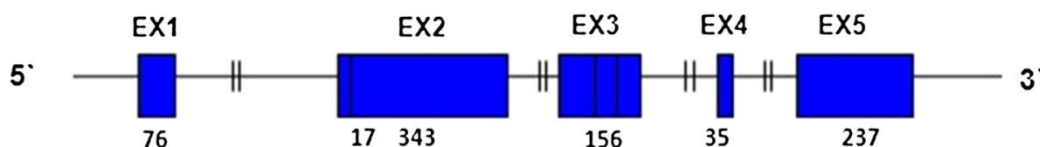
Για τη διάκριση των βλαστικών κυττάρων από φυσιολογικά κύτταρα (π.χ. αιματογόνια, διεγερμένα T κύτταρα), την περαιτέρω ταξινόμηση της οξείας λευχαιμίας (κυτταρική σειρά, στάδιο διαφοροποίησης, κυτταρικός φαινότυπος) και την εκτίμηση της MRD, χρησιμοποιούνται εξίσου η FC αλλά και οι μοριακές τεχνικές (PCR, FISH, καρυότυπος, microarrays, NGS). [28]

3. Η ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΙΚΗ ΟΔΟΣ PD-1/PD-L1

3.1 Ο ΥΠΟΔΟΧΕΑΣ PD-1

Ο PD-1 (Programmed Death-1) ανήκει στην οικογένεια του B7/CD28 και είναι μέλος της υπεροικογένειας των ανοσοσφαιρινών (Ig). [35-39] Απομόνωθηκε από τους Ishida et al. (1992) σε αποπτωτικά T λεμφοκύτταρα ποντικών. [36,40-43] Το ανθρώπινο ομόλογο γονίδιο *PDCD1* (*PD-1*) χαρτογραφείται στο χρωμόσωμα 2q37.3 και αποτελείται από πέντε εξώνια (EX1–EX5) [Σχήμα 3.1.]. [38,41] Ο υποδοχέας PD-1 (CD279) είναι μια διαμεμβρανική πρωτεΐνη τύπου I μοριακού βάρους 50–55 kDa με πέντε ισομορφές. [37,43,44] Η κυτταροπλασματική ουρά της πρωτεΐνης περιλαμβάνει ανασταλτικά μοτίβα τυροσίνης (ITIM), με τα οποία ο PD-1 παρεμποδίζει τη μεταγωγή σήματος από τον TCR. [41,42,44,45]

Homo sapiens PD-1 2q37.3



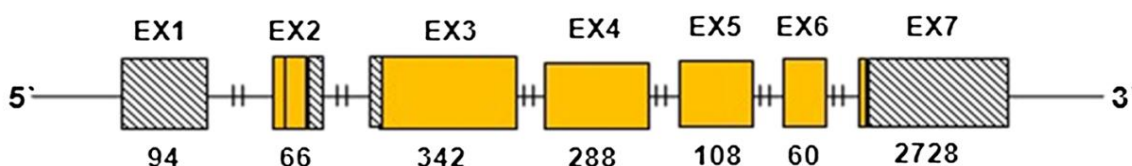
Σχήμα 3.1. Οργάνωση του γονιδίου *PD-1*. Διακρίνονται τα εξώνια (EX) με μπλε χρώμα, τα οποία διακόπτονται από εσώνια (ευθεία γραμμή). Το EX1 κωδικοποιεί την περιοχή L, ενώ το EX2 την υδρόφιλη και την V-like περιοχή. Το EX3 περιέχει τη συνδετική, τη διαμεμβρανική και την C-like περιοχή. Η κυτταροπλασματική περιοχή περιλαμβάνεται στο EX4. Το μήκος των εξωνίων καταγράφεται σε bp. [45]

Ο PD-1 εκφράζεται σε πολλά ανοσοκύτταρα (π.χ DCs, NK κύτταρα, μονοκύτταρα, μακροφάγα), αλλά ανιχνεύεται κυρίως στα ενεργοποιημένα T λεμφοκύτταρα. Παρεμποδίζει την ενεργοποίηση των T λεμφοκυττάρων για την πρόληψη της αυτοανοσίας ή της εκτεταμένης ιστικής βλάβης κατά τη φλεγμονώδη αντίδραση. [35-37,40-44,46] Ο PD-1 ανιχνεύεται και στα ενεργοποιημένα ρυθμιστικά T κύτταρα (Tregs). Η παρουσία του PD-1 συμβάλλει στην ενεργοποίηση των Tregs μέσω του FOXP3. [36,47]

3.2 ΟΙ ΣΥΝΔΕΤΕΣ PD-L1 ΚΑΙ PD-L2

Το γονίδιο *PD-L1* (*Programmed Death-Ligand 1*), γνωστό και ως *B7-H1* (*CD274*), ανήκει στην οικογένεια του B7. [47] Ο B7-H1 απομονώθηκε από τους Dong et al. (1999), ενώ οι Freeman et al. (2000) απέδειξαν ότι ο PD-L1 ταυτίζεται με τον B7-H1. [39,42] Το γονίδιο *PD-L1* χαρτογραφείται στο χρωμόσωμα 9p24.1, μεταγράφεται σε mRNA μήκους 870nt, από τη μετάφραση του οποίου προκύπτει πολυπεπτίδιο μήκους 290 αμινοξέων [Σχήμα 3.2.]. Η πρωτεΐνη PD-L1 πιθανώς να ανήκει στις διαμεμβρανικές πρωτεΐνες τύπου I. [43,45] Η μεταγραφή του PD-L1 επάγεται ισχυρά από μιτογόνα και την IFN γ . [40]

Homo sapiens PD-L1 9p24



Σχήμα 3.2. Οργάνωση του γονιδίου *PD-L1*. Διακρίνονται τα εξώνια (*EX*) με κίτρινο χρώμα, τα εσώνια (ευθεία γραμμή) και με ασπρόμαυρη σκίαση οι περιοχές των εξωνίων που δεν υφίστανται εναλλακτική συρραφή. Το *EX2* κωδικοποιεί την *V-set* περιοχή με δομή ανοσοσφαιρίνης, το *EX3* τη σταθερή περιοχή ανοσοσφαιρίνης και τα *EX4-7* τη διαμεμβρανική περιοχή. Το μήκος των εξωνίων αναγράφεται σε bp. [45]

Ο PD-L1 ανιχνεύεται σε διάφορους κυτταρικούς τύπους και διατηρεί ασθενές αλλά επαγωγίμο πρότυπο έκφρασης στους υγιείς ιστούς. [36,38,44] Στον υγιή λεμφικό ιστό εκφράζεται συνεχώς στα Β κύτταρα, στα θυλακιώδη (follicular) βοηθητικά Τ κύτταρα και στα μακροφάγα. [43] Ανίχνευεται σε DCs και μονοκύτταρα ιστών (ήπαρ, πνεύμονες), στα ενδοθηλιακά κύτταρα της καρδιάς, στα β παγκρεατικά κύτταρα, στα μυικά κύτταρα, στον πλακουντιακό συγκυτιοτροφοβλάστη και σε άλλους κυτταρικούς τύπους (κερατινοκύτταρα, γλοιοκύτταρα, αστροκύτταρα). [35,38,41,42]

Ο δεύτερος γνώστος συνδέτης του PD-1 ταυτοποιήθηκε από τις μελέτες των Latchman et al. και Tseng et al. το 2001. Το γονίδιο *PDCD1LG2* ή *PD-L2* (*B7-DC*, *CD273*)

χαρτογραφείται στο χρωμόσωμα 9p24.1 σε απόσταση 42 kb από το γονίδιο *PD-1*. Σε αντίθεση με τον PD-L1, ο PD-L2 διατηρεί περιορισμένο πρότυπο έκφρασης κυρίως στα APCs, στα mDCs, στα μαστοκύτταρα και σε κάποια μακροφάγα. [35,42-44,48,49] Δρα ανασταλτικά και επαγωγικά στα ενεργοποιημένα T κύτταρα. [40,42,48] Επάγεται από την IFN- γ , την IL-4 και τον GM-CSF. [40] Σημειώνεται ότι ο PD-L2 έχει δύο έως και έξι φορές μεγαλύτερη συγγένεια για τον PD-1, συγκριτικά με τον PD-L1. [48]

3.3. Ο ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ PD1/PD-L1 ΣΤΗ ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΗΣ ΑΝΟΣΙΑΚΗΣ ΑΠΑΝΤΗΣΗΣ

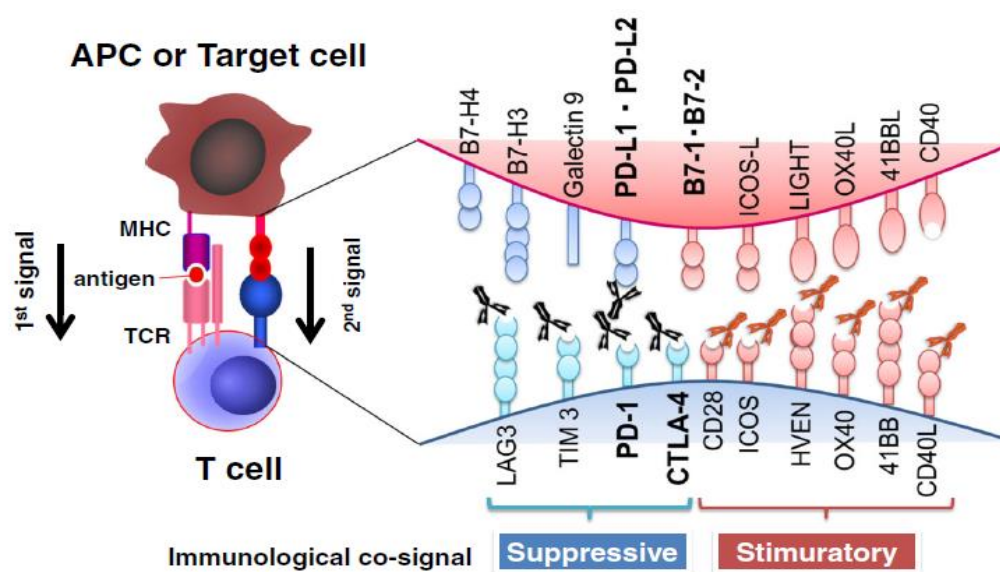
Τα ανώτερα θηλαστικά διαθέτουν πολύπλοκους μηχανισμούς για τη ρύθμιση της ομοιοστασίας του ανοσοποιητικού συστήματος. Κατά την ωρίμανση των T κυττάρων στο θύμο αδέν, η αναγνώριση ξένων (μη εαυτών) αντιγόνων καθορίζει την επιβίωση των παρθένων (naïve) T κυττάρων (θετική επιλογή). Παράλληλα, τα λεμφοκύτταρα που αντιδρούν ισχυρά με ευατά αντιγόνα οδηγούνται σε απόπτωση (αρνητική επιλογή). [47]

Για την ενεργοποίηση των T κυττάρων απαιτούνται δύο σήματα. [36] Το πρώτο σήμα αφορά την αλληλεπίδραση του αντιγόνου με τον υποδοχέα των T κυττάρων (TCR). [42] Το σύμπλοκο MHC και αντιγονικού πεπτιδίου αναγνωρίζεται από τον TCR με τη βοήθεια των συνυποδοχέων CD4 ή CD8 και προκαλεί την ενεργοποίηση της ειδικής ανοσίας. [35,40] Τα ενεργοποιημένα δραστικά CD8(+) CTLs εγκαταλείπουν το λεμφαδένα και αναζητούν το αντιγόνο στους περιφερικούς ιστούς. Τα CTLs αναγνωρίζουν το αντιγόνο που εκθέτουν τα κύτταρα στόχοι μέσα σε μόρια MHC τάξης I και τα οδηγούν σε λύση μέσω κυτταροτοξικότητας (περφορίνη-θρυμματίνη, κοκκιοένζυμο). [35,49]

Οι Jenkins και Schwartz (1987) έδειξαν ότι το παρθένο T λεμφοκύτταρο χρειάζεται απαραίτητως και δεύτερο (συνδιεγερτικό) σήμα για τον κλώνικό πολλαπλασιασμό και την παραγωγή IL-2. [36,42] Αυτό βασίζεται στη συνδιεγερτική αλληλεπίδραση μεταξύ του CD28 και του CD80/86 (B7-1/2) που εκθέτουν τα APCs. [47] Χωρίς το δεύτερο σήμα τα T κύτταρα καθίστανται δυσλειτουργικά και οδηγούνται σε ανέργια (anergy), δηλαδή αδυναμία ανταπόκρισης σε αντιγονική διέγερση των APCs. [42,49]

Η επιβίωση των T λεμφοκυττάρων καθορίζεται από μοριακά σημεία ελέγχου (checkpoints), δηλαδή από την αλληλεπίδραση συνδιεγερτικών (co-stimulatory) και

συνανασταλτικών (co-inhibitory) υποδοχέων [Σχήμα 3.3.]. [36,43,45,49] Οι κύριοι συνδιεγερτικοί υποδοχείς που εκφράζονται στα T κύτταρα είναι το CD28 και ο επαγωγίμος T συνδιεγέρτης (ICOS). Τα συνηθέστερα συνδιεγερτικά μόρια που εκφράζονται παρουσία παθογόνων από τα APCs είναι οι συνδέτες του B7, δηλαδή το CD80 (B7-1) και το CD86 (B7-2) καθώς και ο ICOSL (CD275). [40] Τα ανασταλτικά σήματα είναι απαραίτητα για την πρόληψη της αυτοανοσίας και την ελαχιστοποίηση της ιστικής βλάβης κατά την ανοσολογική απάντηση. [36,40,42,43,] Σε αυτά συγκαταλέγονται μεταξύ άλλων το CTLA-4, ο PD-1, ο LAG-3 (CD223), το CD160, το 2B4 (CD244), η TIM-3 (HAVCR2), οι υποδοχείς TIGIT, KLRG1 και ο BTLA. [42,43]

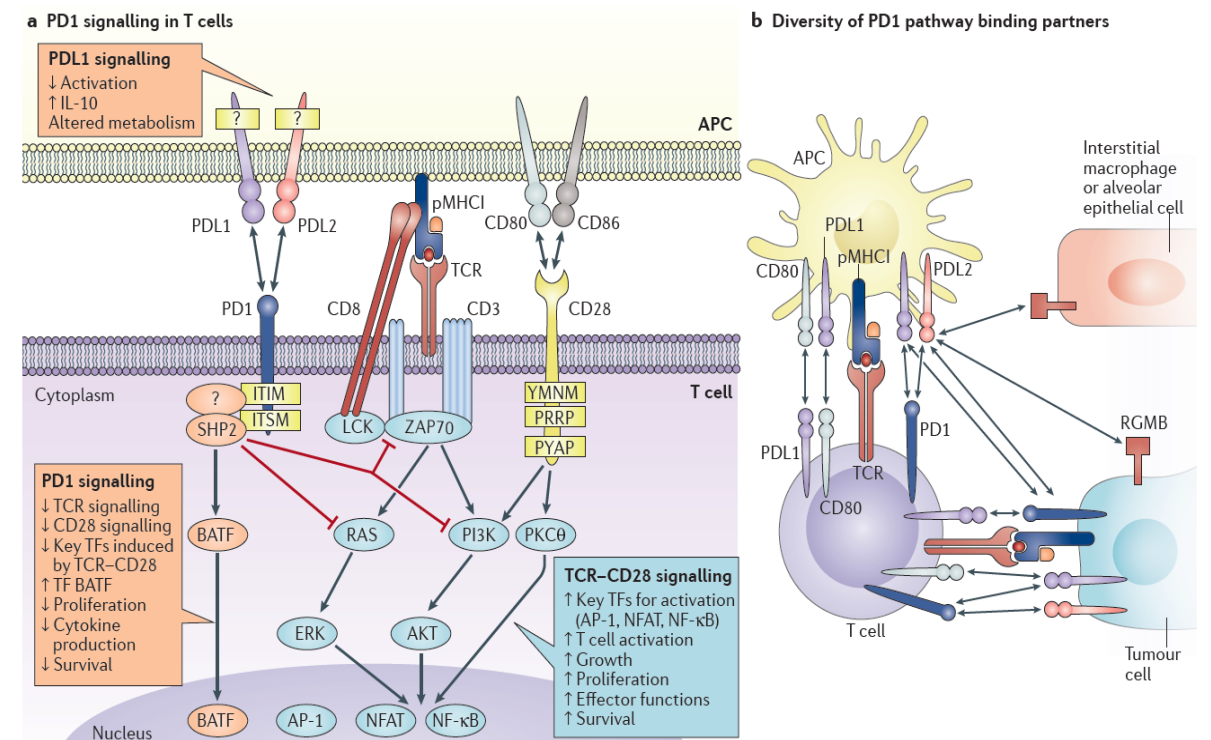


Σχήμα 3.3 Ρύθμιση της δράσης των T κυττάρων μέσω σημείων ανοσολογικού ελέγχου (*immune checkpoints*). Το πρώτο σήμα παρέχεται από το σύμπλοκο MHC-αντιγόνο-TCR. Η επιβίωση του κυττάρου καθορίζεται από το είδος του δεύτερου σήματος (επαγωγικό, κατασταλτικό). [50]

Τα κεντρικά σημεία ελέγχου εντοπίζονται στα λεμφικά όργανα και δρουν κατά την έναρξη της ενεργοποίησης των T κυττάρων. Το επιφανειακό αντιγόνο των κυτταροτοξικών T λεμφοκυττάρων (CTLA-4 ή CD152) προσδένεται στα B7-1/B7-2 των APCs και επάγει ανοσολογική ανοχή στα λεμφικά όργανα. [35,42] Η έκφραση του CTLA-4 στα παρθένα T κύτταρα επάγεται μετά από ισχυρή αντιγονική διέγερση, ελαττώνεται στα δραστικά CD4(+) T κύτταρα και ενισχύει την δράση των T ρυθμιστικών κυττάρων. Το CTLA-4 ανταγωνίζεται το CD28 για τους υποδοχείς B7-1/B7-2 των APCs και επάγει περιφερική ανοχή. [42]

Σε αντίθεση με τον ρυθμιστή των πρώιμων σταδίων ενεργοποίησης των T κυττάρων CTLA-4, ο PD-1 λειτουργεί ως ροοστάτης και παρεμποδίζει την δράση των διεγερμένων T κυττάρων στους ιστούς. [46] Η σύνδεση του PD-L1 (B7-H1 ή CD274) με τον PD-1 (CD279) παρεμποδίζει το διαμεσολαβούμενο από τον TCR πολλαπλασιασμό των T κυττάρων καθώς και την έκκριση κυτταροκινών από τα CD4(+) T κύτταρα. [35,36,38,41-44,46-49] Το τελικό αποτέλεσμα της δράσης των PD-1/PD-L1 είναι η απόπτωση των ενεργοποιημένων T κυττάρων και η παρεμπόδιση της έκκρισης κυτταροκινών. [35,37,40,42,44,48]

Η πρόσδεση του PD-L1 στον PD-1 ενός T κυττάρου επάγει φωσφορυλίωση της κυτταροπλασματικής περιοχής του υποδοχέα από τις κινάσες τυροσίνης Src [Σχήμα 3.4.]. [42,44] Στα φωσφορυλιωμένα μοτίβα προσελκύονται οι φωσφατάσες τυροσίνης SHP-1 και SHP-2. [41,44,49] Ακολουθεί αποφωσφορυλίωση ενδιάμεσων τελεστών του TCR (π.χ ZAP70, PKCθ, CD3ζ), απαραίτητων για την παραγωγή IL-2 και την ενεργοποίηση των T κυττάρων. [36,37,42,44,45,49] Ακολούθως, αναστέλλονται κύρια σηματοδοτικά μονοπάτια κινασών (PI3K-Akt, Ras-MEK-ERK, JAK/STAT) που ρυθμίζουν την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου. [35,44-46,48] Λόγω της καταστολής της οδού PI3K/Akt, μειώνονται τα επίπεδα της αντιαποπτωτικής μιτοχονδριακής πρωτεΐνης BCL-XL και το κύτταρο οδηγείται σε απόπτωση. [37,41]



Σχήμα 3.4.

a) Διαγραμματική παρουσίαση των μηχανισμών μεταγωγής σήματος από τον PD-1 στα T λεμφοκύτταρα. b) Οι πιθανοί συνδέτες του PD-1. Εκτός από τους PD-L1, PD-L2 είναι εφικτή η αλληλεπίδραση του PD-1 με τον CD80 των APCs και του PD-L2 με την RGMB (RGM domain family member B) των νεοπλασματικών κυττάρων. [51]

Οι Francisco et al. (2010) απέδειξαν in vivo και in vitro, ότι το σήμα που μετάγεται από τον PD-1 δεν είναι πάντα ανασταλτικό. Οι PD-L1, PD-L2 μεταδίδουν συνδιεγερτικά σήματα στα T κύτταρα. Ο PD-L1 συνδέεται με τον B7 (CD80) των APCs για να περιορίσει την κατασταλτική δράση του CTLA-4. [40,41,43,46] Επιπλέον, ο PD-L1 μπορεί να μετατρέψει CD4(+) FOXP3(-) T κύτταρα σε CD4(+) FOXP3(+) ρυθμιστικά T κύτταρα (Tregs) χωρίς τη διαμεσολάβηση του TGF-β (γνωστός ενεργοποιητής των Tregs). [41,42] Ο PD-1 επηρεάζει με άγνωστο μηχανισμό και τη λειτουργία των B κυττάρων. Ποντικοί με έλλειψη του αντίστοιχου γονιδίου εμφανίζουν φαινότυπο αυτοανοσίας, διότι τα B κύτταρα αδυνατούν να αντεπιδράσουν με τα θυλακιώδη κύτταρα των βλαστικών κέντρων (TFH) για να αποτραπεί η υπερπαραγωγή αντισωμάτων. Επίσης, τα Tregs καταστέλλουν τη δράση των B κυττάρων μέσω του PD-1. [43]

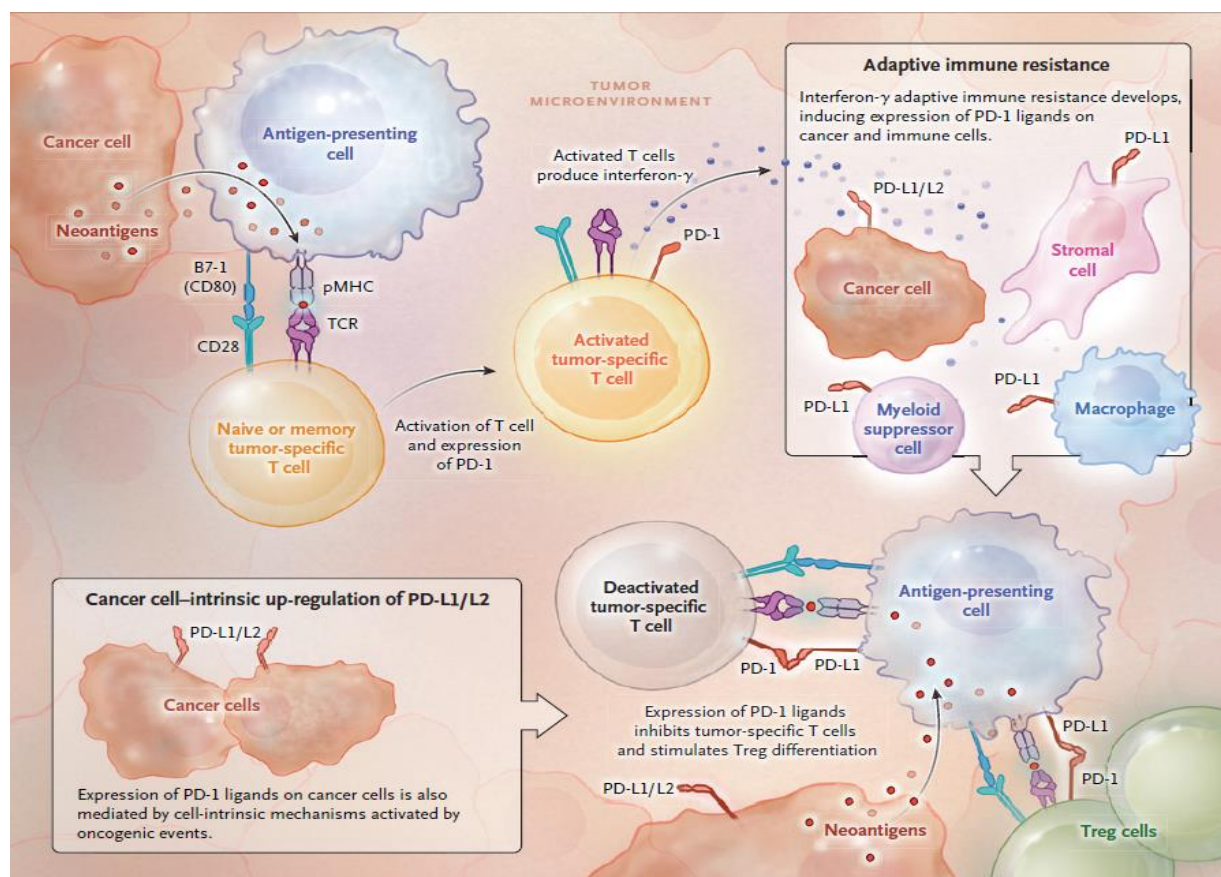
Η μεταγωγή σήματος μέσω του PD-1 ενέχεται στη ρύθμιση των μηχανισμών άμυνας του οργανισμού σε μικροβιακές λοιμώξεις. Η επαγωγή του PD-1, παρουσία παθογόνου, στα ενεργοποιημένα μονοκύτταρα συνοδεύεται από έκκριση IFN γ , IL-2 και IL-10, η οποία αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό των CD4(+) T κυττάρων. Ενεργότητα του PD-1 παρατηρείται σε υποπληθυσμούς των NK κυττάρων σε πολλές χρόνιες λοιμώξεις (*M. tuberculosis*, HIV-1, HBV, HCV, *H. pylori*). [38,40,43,49]

Η παρατεταμένη έκθεση σε αντιγόνα σε καταστάσεις όπως οι χρόνιες λοιμώξεις και ο καρκίνος, επάγει την έκφραση υποδοχέων όπως ο PD-1. [40,41,43] Ο PD-1 υπερεκφράζεται στην πλειοψηφία των T λεμφοκυττάρων που διηθούν καρκινικούς όγκους (Tumor Infiltrating Lymphocytes, TILs), συγκριτικά με τα T κύτταρα που ενδημούν σε υγιείς ιστούς. Οι λειτουργικές διαταραχές στα PD-1(+) TILs ευθύνονται για το χαρακτηριστικό φαινότυπο εξάντλησης (“exhausted” phenotype), δηλαδή εξασθένηση της δράσης του TCR,

διαταραγμένη ροή ιόντων Ca^{2+} , ελαττωμένη παραγωγή κυτταροκινών (IL-2, IFN- γ , TNF α) και αυξημένη έκκριση IL-10. [40,41,44] Η παραγωγή IFN- γ και προφλεγμονωδών κυτταροκινών (π.χ. IL-4) επάγει την έκφραση του PD-L1 σε γειτονικά ανοσοκύτταρα μέσω θετικής ανάδρασης (positive feedback). [40,43] Στη συνέχεια, ο PD-L1 προάγει τη λειτουργική εξάντληση των ενεργοποιημένων T κυττάρων για να περιορισθεί το μέγεθος ιστικής βλάβης. [40,45]

3.4. Η ΣΥΜΒΟΛΗ ΤΩΝ PD-1/PD-L1 ΣΤΗ ΔΙΑΦΥΓΗ ΤΩΝ ΚΑΡΚΙΝΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΑΠΟ ΤΗΝ ΑΝΟΣΟΕΠΙΤΗΡΗΣΗ

Τα νεοπλασματικά κύτταρα αναπτύσσουν στρατηγικές για να διαφύγουν της ανοσοεπιτήρησης. Ο PD-1 υπερεκφράζεται στα δυσλειτουργικά ογκοειδικά CD8(+) T κύτταρα in vitro and in vivo και συντελεί στη διαφυγή των PD-L1(+) καρκινικών κυττάρων [Σχήμα 3.5.]. [45] Η υπερέκφραση του PD-L1 σχετίζεται με την καταστολή της δράσης των NK και CD8(+) T κυττάρων, η δράση των οποίων είναι απαραίτητη για την εξάλειψη των παθολογικών κυττάρων. [52]



Σχήμα 3.5 Η κατασταλτική δράση των PD-1/PD-L1 στο μικροπεριβάλλον του όγκου (*Tumor Microenvironment, TME*). Τα T κύτταρα αναγνωρίζουν νεοαντιγόνα και εκκρίνουν IFN- γ , η οποία πυροδοτεί την έκφραση του PD-L1 στα νεοπλασματικά κύτταρα, στα μακροφάγα, στρωματικά και δενδριτικά κύτταρα. Τα τελευταία διαφοροποιούνται σε MDSCs (*Myeloid Derived Suppressor Cells*). Η γενετική αστάθεια των νεοπλασματικών κυττάρων συμβάλλει στην υπερέκφραση του PD-L1. [51]

Η αντιαποπτωτική δράσή του PD-L1 σχετίζεται με in vivo φαινόμενα ογκογένεσης και με την αντίσταση στην κυτταροξοτική δράση των TILs. [40] Μελέτες σε μοντέλα χρόνιας φλεγμονής έδειξαν ότι η παρεμπόδιση της ενεργοποίησης του PD-1 αναστρέφει την εξάντληση των T κυττάρων. [43] Νεοαντιγόνα επάγουν την εξάντληση των T κυττάρων. [48] Ως εκ τούτου, η χρόνια αντιγονική διέγερση ευθύνεται για την ανίχνευση TILs και κυκλοφορούντων δυσλειτουργικών PD-1(+) T κυττάρων. [41,42] Η έκφραση του PD-L1 από μη καρκινικά κύτταρα του μικροπεριβάλλοντος της νόσου [π.χ ενδοθηλιακά κύτταρα, MDSCs, CD4(+) CD25^{hi} Tregs] συμβάλλει σημαντικά στο φαινότυπο δυσλειτουργίας των CD8(+) T κυττάρων. Η παρουσία του PD-L1 στα APCs σχετίζεται με την κινητοποίηση των Tregs της περιφέρειας. Η έκφραση του PD-L1 από τα αιμοποιητικά κύτταρα περιορίζει την κλωνική επέκταση των δραστικών T λεμφοκυττάρων in vitro. [43]

Τρεις κύριοι μηχανισμοί έχουν προταθεί για την επαγωγή της έκφρασης του PD-L1 από ενδογενή σήματα. Πρώτον, οι αλλαγές στον αριθμό αντιγράφων του γονιδίου και οι χρωμοσωματικές μετατοπίσεις που αφορούν το γενετικό τόπο των PD-L1/PD-L2 (9p24.1). [38] Αυτές έχουν συσχετισθεί με την υπερέκφραση του PD-L1 σε καρκινώματα (στόματος, μαστού) στο HL και πολλά άλλα NHLs (π.χ PMBL, PCNSL, PTL). [40,43,49] Φαινόμενα πολυσωμίας, γονιδιακής ενίσχυσης στο γενετικό τόπο 9p24.1 συνήθως οδηγούν στην υπερέκφραση του PD-L1, με παράλληλη ενίσχυση του γειτονικού γονιδίου της JAK2, η οποία ενισχύει την υπερέκφραση του PD-L1 μέσω της οδού JAK2-STAT (Janus kinase / Signal Transducer and Activator of Transcription). [38,42,47,49]

Δεύτερον, οι ιοί χρησιμοποιούν (π.χ. HIV, EBV) το μονοπάτι PD-1/PD-L1 και επάγουν ανοσολογική ανοχή, όπως συμβαίνει σε HIV(+) ασθενείς που αναπτύσσουν

επιθετικά Β λεμφώματα (π.χ DLBCL). [40,43] Η ιική πρωτεΐνη LMP1 (Latent Membrane Protein 1) ενεργοποιεί τις οδούς JAK/STAT, και τη συνεχή ενεργοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα AP-1, ο οποίος πυροδοτεί την μεταγραφή του *PD-L1*. Ένας τρίτος μηχανισμός αφορά την παραγωγή ακρωτηριασμένου PD-L1, λόγω βλάβης στην 3'-UTR του PD-L1 mRNA. Το ίδιο συμβαίνει σε ασθενείς με DLBCL και T λευχαιμία των ενηλίκων, όπου ο PD-L1 υπερεκφράζεται λόγω αδυναμίας αποικοδόμησης των mRNAs. [49]

3.5. Η ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΩΝ PD-1/PD-L1 ΣΤΑ ΚΑΚΟΗΘΗ ΑΙΜΑΤΟΛΟΓΙΚΑ ΝΟΣΗΜΑΤΑ

Η εμμένουσα ανοσοανεπάρκεια, η δυσλειτουργία του θύμου και η διαταραγμένη απόκριση σε αντιγόνα ευθύνονται για την εγκαθίδρυση ανοσολογικής ανοχής στους αιματολογικούς ασθενείς. Η τελευταία συχνά αποδίδεται στην υπερέκφραση ανασταταλτικών υποδοχέων (π.χ CTLA4, PD-1, LAG-3, NKG2A). [45]

Η ιδιαίτερα συχνή επαγωγή της έκφρασης του PD-L1 στα TILs ή τα T κύτταρα της περιφέρειας, αποτελεί προγνωστικό παράγοντα για την επιβίωση των ασθενών με τη κλασσική νόσο Hodgkin (cHL) ή την νόσο με οζώδη λεμφοκυτταρική επικράτηση (NLPHL). [37,38,45,47] Η έκφραση του PD-L1 από τα κακοήγη λεμφοκύτταρα είναι ένας από τους κυριότερους μηχανισμός ανοσοδιαφυγής των λεμφωμάτων. Ο PD-L1 ανευρίσκεται σχεδόν σε όλα τα επιθετικά Β λεμφώματα (π.χ PMBL, DLBCLs), ιδίως σε εκείνα που σχετίζονται με ανοσοανεπάρκεια ή ικές λοιμώξεις (π.χ EBV), αλλά και στο NK/T λέμφωμα. [37,49] Η υπερέκφραση των *PD-L1/L2* οφείλεται και πάλι σε φαινόμενα γονιδιακής ενίσχυσης στο γενετικό τόπο 9p24.1. Χρωμοσωμικές μετατοπίσεις (*BCNP1 - PD-L1*, *Igl - PD-L2*) και αλλαγές στον αριθμό αντιγράφων (CNA) ανιχνεύθηκαν με μοριακές τεχνικές στα πρωτογενή λεμφώματα των όρχεων και του CNS. [47]

Στη CLL παρατηρείται υπερέκφραση του PD-L1 στην επιφάνεια των CD23(+) λευχαιμικών Β κυττάρων, ιδιαίτερα στο βλαστικό κέντρο των λεμφαδένων. [38] Τα ενεργοποιημένα μνημονικά T κύτταρα υπερεκφράζουν τον PD-1, αλληλεπιδρούν με τον PD-L1 των νεοπλασματικών κυττάρων και καθίστανται δυσλειτουργικά. [38,47] Η έκφραση του

PD-L1 σε λευχαιμικά κύτταρα και μονοπύρηνια κύτταρα της περιφέρειας και του μυελού των οστών είναι αυξημένη σε σχέση με τα λεμφοκύτταρα από υγιή άτομα. Ο αυξημένος αριθμός των κυκλοφορούντων CD4(+) PD-1(+) T κυττάρων εμφανίζεται, κατά τους Rusak et al. (2015), σε νόσο προχωρημένου σταδίου. [40]

Υψηλή έκφραση του PD-L1 παρατηρείται στα T λεμφώματα και ιδιαίτερα στο αναπλαστικό λέμφωμα από μεγάλα T κύτταρα (ALCL). Στα T-NHLs, η έκφραση του PD-L1 διαθέτει ισχυρή διαγνωστική αξία στο αγγειοανοσοβλαστικό T λέμφωμα και στο δερματικό T λέμφωμα. Στο περιφερικό T λέμφωμα (Peripheral T-cell Lymphoma, PTCL), ο PD-L1 επάγεται σε καρκινικά κύτταρα, μονοκύτταρα και μυελοειδή m-DCs, μέσω της δράσης των FOXP-3(+) Tregs. [49] Οι PD-1/PD-L1 υπερεκφράζονται και σε δερματικά λεμφώματα όπως η σπογγιοειδής μυκητίαση (Mycosis Fungoides, MF) και το σύνδρομο Sezary (SS). [38,40,49]

Το ανοσοκατασταλτικό μικροπεριβάλλον του μυελού των οστών στο πολλαπλό μυέλωμα (MM) συγκροτείται από οστεοβλάστες, οστεοκλάστες, στρωματικά κύτταρα του μυελού, MDSCs και Tregs. Στο MM παρατηρείται δυσλειτουργία του Th1 κλάδου της προσαρμοστικής ανοσίας στο μικροπεριβάλλον του μυελού των οστών. [49] Τα T κύτταρα εμφανίζουν μεταβολές στον αριθμό και την κατανομή τους, μειωμένη κυτταροτοξική δράση και ανταπόκριση στην IL-2. [47] Ο PD-L1 εκφράζεται ισχυρότερα στα CD138(+) πλασματοκύτταρα ασθενών με MM σε σχέση με υγιή άτομα ή ασθενείς με μονοκλωνική γαμμαπάθεια αδιευκρίνιστης σημασίας (Monoclonal Gammopathy of Undetermined Significance, MGUS). Η έκφραση του PD-L1 δεν σχετίζεται με το φορτίο της νόσου, διότι ενισχύεται και από άλλα κύτταρα του TME (π.χ. στρωματικά κύτταρα, DCs). [38,43]

Η υπερέκφραση του PD-L1 στα παθολογικά πλασματοκύτταρα αποδίδεται σε εξωγενή (IFN- γ , TLR) και ενδογενή αίτια (Akt, Ras). [37,47] Τα στρωματικά κύτταρα του μυελού επάγουν την έκφραση του PD-L1 στα παθολογικά πλασματοκύτταρα. Η υπερέκφραση του PD-1 στα T κύτταρα παρατηρείται συχνά κατά τη διάγνωση των ασθενών ή επί ανθεκτικής νόσου. Ο PD-L2 δεν ανιχνεύεται στα παθολογικά πλασματοκύτταρα. [42,49] Από in vitro μελέτες, τα PD-L1(+) μυελωματικά κύτταρα μπορούν να οδηγήσουν CD8(+) T κύτταρα σε

λειτουργική εξάντληση άμεσα, πυροδοτώντας την έκφραση ανασταλτικών υποδοχέων (PD1, TIM-3), ή έμμεσα, μέσω της δράσης των Tregs. [42]

Ο PD-1 έχει συσχετισθεί με τη διαφυγή της CML από την ανοσοεπιτήρηση. Στους ασθενείς με CML υψηλού κινδύνου, παρατηρείται αυξημένος αριθμός MDSCs που ενεργοποιούν το ζεύγος PD-1/PD-L1, επάγουν την έκκριση αργινάσης και διαλυτού CD25. Η αύξηση στα επίπεδα του PD-L1 είναι ιδιαίτερα εμφανής *in vitro* κατά την απόπτωση των αντιγονοειδικών T κυττάρων. [45] Ταυτόχρονη έκφραση των PD-1/PD-L1 διαπιστώνεται στην HTLV-1 T λευχαιμία των ενηλίκων. [37,40] Στο T λέμφωμα/λευχαιμία των ενηλίκων (ATL), η έκφραση του PD-1 είναι σημαντικά αυξημένη στα περιφερικά παρθένα CD4(+) CD25(-) T και στα ρυθμιστικά CD4(+) CD25(+) T κύτταρα. [40,45]

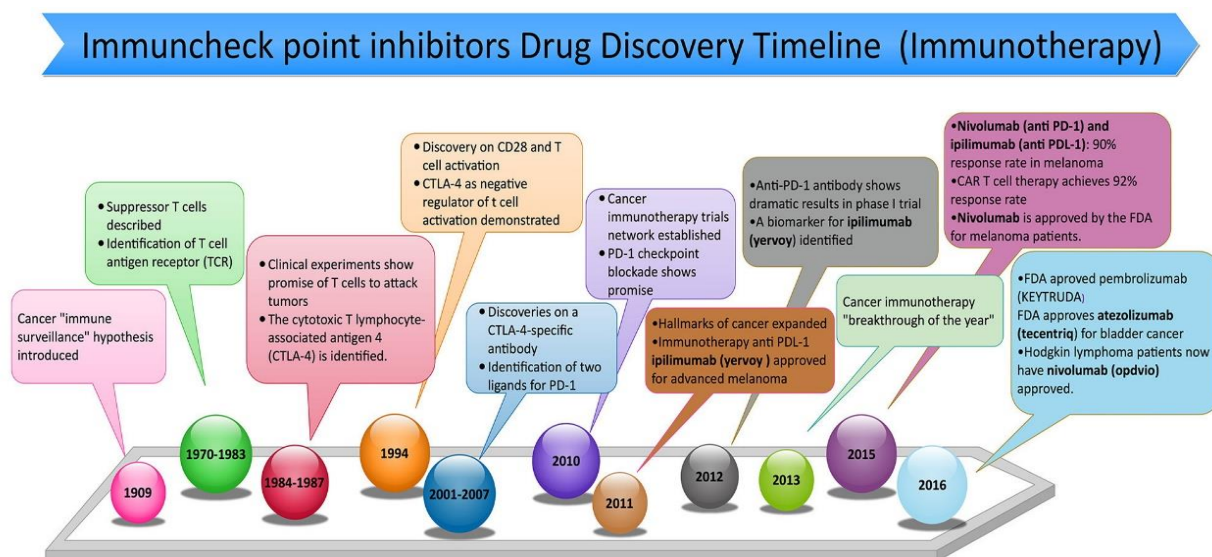
Στα Μυελοδυσπλαστικά Σύνδρομα (MDS) ποικίλες διαταραχές προκαλούν την απόπτωση των T κυττάρων, ενώ παρατηρείται αυξημένη παραγωγή TNF-α και IFN-γ από μακροφάγα του BM και μονοπύρρηνα κύτταρα του PB (peripheral blood mononuclear cells, PBMC). Σύμφωνα με σχετικές μελέτες, ο TNF-α και η IFN-γ επάγουν την έκφραση του PD-L1 στους βλάστες μέσω του NF-κB. Επιπρόσθετα, οι PD-L1(+) βλάστες έχουν μεγαλύτερη ικανότητα πολλαπλασιασμού, μέσω του επαγωγέα του κυτταρικού κύκλου Ki-67, συγκριτικά με τα υπόλοιπα βλαστικά κύτταρα. [41] Από μελέτες με χρήση μεθοδολογίας q-PCR και IHC αναδείχθηκε αυξημένη έκφραση του PD-L1 στα CD34(+) άωρα κύτταρα της μυελικής σειράς ασθενών με AML και MDS. [42]

Η έκφραση του PD-1 είναι στατιστικά σημαντικά αυξημένη στους ασθενείς με AML. Η έκφραση του *PD-L1* στους βλάστες της AML πυροδοτείται και από την προφλεγμονώδη IL-6 μέσω της οδού JAK/STAT. Η υπερέκφραση συγκεκριμένων TLRs (TLR-2, TLR-4) ή τα υψηλά επίπεδα της IFN-γ, αυξάνουν *in vivo* την έκφραση του PD-L1 στους μυελοβλάστες μέσω των MEK/Erk και MyD88/TRAF6. [36,41] Αυξημένα επίπεδα των PD-L1 και PD-L2 mRNAs ανιχνεύονται σε πολλές λευχαιμικές κυτταρικές σειρές AML (π.χ HL-60), ενώ αντίστοιχη έκφραση για το PD-1 αναφέρεται μόνο για την κυτταρική σειρά KG-1. [36] Η συνέκφραση του PD-1 και του ανασταλτικού υποδοχέα Tim-3/galectin-9 στα CD8(+) T κύτταρα σχετίζεται με επιδείνωση της νόσου. [53]

Η αναστολή του PD-L1 επιταχύνει τη λύση λευχαιμικών κυττάρων in vitro και οδηγεί σε αύξηση των επιπέδων της IFN- γ και του TNF- α με μείωση της παραγόμενης IL-10. [38] Η επιδείνωση της AML σε πειραματόζωα (ποντικούς) συσχετίζεται με την επαγωγή της έκφρασης του PD-1 στα CD8(+) CTLs και την αύξηση του πληθυσμού των Tregs. Η εξάλειψη των Tregs σε σύνδυασμο με την αναστολή του PD-L1 βελτιστοποιεί την αντιλευχαιμική απάντηση. [36]

3.6. ΤΟ ΖΕΥΓΟΣ PD1/PD-L1 ΩΣ ΑΝΕΡΧΟΜΕΝΟΙ ΒΙΟΔΕΙΚΤΕΣ

Η θεραπευτική αναστολή του PD-1 παρεμβαίνει στα σημεία ανοσολογικού ελέγχου και κινητοποιεί το ανοσιακό σύστημα έναντι της νόσου. Ευνοεί την ενεργοποίηση των T κυττάρων, αποκαθιστά την δράση των NK και επάγει την παραγωγή αντισωμάτων από τα PD-1(+) B κύτταρα. [37] Η κυριότερη φαρμακολογική στρατηγική παρεμπόδισης της σύνδεσης του PD1 με τους PD-L1/PD-L2 βασίζεται στη χρήση εξανθρωποποιημένων anti-PD1 mAbs [Σχήμα 3.6.]. [47,49]



Σχήμα 3.6. Η εξέλιξη της anti PD-1/PD-L1 ανοσοθεραπείας. [53]

Μετά από μεγάλο αριθμό κλινικών δοκιμών σε συμπαγείς όγκους (πνεύμονος, νεφρού, παχέος εντέρου, προστάτη και μελάνωμα), το Nivolumab (Opdivo; Bristol-Myers Squibb/Ono Pharmaceuticals) έλαβε έγκριση από τον FDA για τη θεραπεία του μεταστατικού

μελανώματος (Δεκέμβριος 2014) και του μεταστατικού πλακώδους NSCLC (Μάρτιος 2015). [38,44,46] Θεραπευτικά αντισώματα έναντι των PD-1 (Nivolumab, Pembrolizumab, CT-011) και PD-L1 (Atezolizumab, MPDL3280A, BMS936559, Durvalumab ή MEDI4736) έχουν ενταχθεί ήδη σε κλινικές μελέτες. [38,46] Σημειωτέον ότι και άλλα αντισώματα (AMP-224, BGB-A317, MEDI0680, PDR001, PF-06801591, REGN2810) προστίθενται συνεχώς στη φαρέτρα της συγκεκριμένης ανοσοθεραπείας. [42,46]

Αν και διεξάγονται πάνω από 600 κλινικές μελέτες σχετικά με την αναστολή των PD-1/PD-L1 στην Ογκολογία, οι αντίστοιχες μελέτες για τα αιματολογικά νεοπλάσματα είναι κατά πολύ λιγότερες. Παρ' όλα αυτά, ο αριθμός των μελετών αυξάνει συνεχώς, διότι σχεδιάζονται πολλοί νέοι αναστολείς. [40,47-49] Το Pidilizumab ή CT-011 (εξανθρωποποιημένο IgG1 mAb) ήταν ένα από τα πρώτα mAbs που δοκιμάστηκαν για τη θεραπεία των λεμφωμάτων με ενθαρρυντικά αποτελέσματα. [35,37,40,42,43] Τον Μαΐο του 2016, ο FDA ενέκρινε τη χρήση του Nivolumab ως θεραπεία διάσωσης στο ανθεκτικό/υποτροπιάζον HL, βασιζόμενος σε δύο κλινικές μελέτες που περιγράφουν την εξαιρετική ανταπόκριση των ασθενών στο Nivolumab (87%) αλλά και το Pembrolizumab (53%). [36,38,40,42,43,44,49] Επιπρόσθετα, διεξάγονται κλινικές μελέτες φάσης I και II με συνδυασμούς του nivolumab με την anti-CD30 ανοσοτοξίνη brentuximab vedotin, το Ipilimumab (anti-CTLA-4) και τον αναστολέα κινάσης τυροσίνης (TKI) ibrutinib. [47,49]

Η χρήση αναστολέων των σημείων ελέγχου της ανοσολογικής απάντησης φάνηκε σχετικώς δραστική για την θεραπεία των NHL (π.χ DLBCL, FL, MF-SS). [38] Πολλά NHL (PMBL, PCNSL, PTL) με κοινό γενετικό υπόβαθρο θεωρούνται υποψήφια για τη δοκιμή της anti-PD-1 ανοσοθεραπείας. [42] Από κλινικές μελέτες φάσης II (συνδυασμός Pidilizumab και Rituximab) προτάθηκε η αξία διερεύνησης της χρήσης του Pidilizumab στο οζώδες λέμφωμα (FL). [40,45] Στο οζώδες λέμφωμα, η παρουσία PD-1(+) TILs, CD14(+) θυλακιωδών DCs και Tregs αποτελεί ανεξάρτητο προγνωστικό δείκτη μετασχηματισμού της νόσου προς DLBCL. [40,49] Η παρουσία PD-1(+) TILs στο διάχυτο λέμφωμα από μεγάλα Β κύτταρα βλαστικού κέντρου (GCB-DLBCL) και στο FL σχετίζεται με ευνοϊκή πρόγνωση. [42] Πρώιμα κλινικά δεδομένα των Rosille et al. (2014), υποστηρίζουν τη μέτρηση (με ELISA) των επιπέδων του διαλυτού PD-L1 (sPD-L1) για την πρόγνωση του DLBCL. [37,42,48]

Στην ανοσοθεραπεία του MM προκλινικές μελέτες (π.χ. NCT02036502) υποστηρίζουν τη συγχορήγηση anti PD-1 mAb (π.χ Nivolumab) με ανοσοτροποποιητικούς παράγοντες (π.χ. thalidomide, lenalidomide, pomalidomide) και αναστολείς του πρωτεασώματος. [38,49] Οι ανωτέρω παράγοντες αυξάνουν την ανταπόκριση των T στα APCs, συμβάλλουν στην Th1 πόλωση (μέσω των IFN γ και TNF α), ενισχύουν την κυτταροτοξική δράση των NK κυττάρων, καταστέλλουν τον PD-L1 καθώς και τη δράση των Tregs, MDSCs. [37,38,43] Για τους ασθενείς που υποβλήθηκαν σε ASCT διεξάγονται κλινικές μελέτες φάσης I σε συνδυασμό με την anti-PD-1/PD-L1 και anti-CTLA-4 ανοσοθεραπεία (Durvalumab/Tremelimumab, Nivolumab/Ipilimumab). [42] Ο συνδυασμός anti-PD-1 και anti-CD38 mAbs (π.χ Daratumumab) συμβάλλει στην εξάλειψη των Tregs και των CD38(+) MDSCs. [49] Η χρήση του anti-PD-1 Pidilizumab στο MM διευκολύνει τη μετανάστευση των NK κυττάρων στο μυελό των οστών. [43]

Για τη μελέτη της έκφρασης του PD-L1 στο MM πολλοί ερευνητές χρησιμοποιούν την FC. Η αύξηση του αριθμού των αντιγράφων του PD-L1 με παρόμοιους με το cHL μηχανισμούς, σχετίζεται με την αυξημένη συγκέντρωση της πρωτεΐνης PD-L1 στον ορό. Στο MM, η έκφραση του PD-L1 είναι συχνότερη στους ασθενείς με υποτροπή ή υψηλό φορτίο νόσου και αυξημένα επίπεδα LDH ορού. Στον ορό των ασθενών με MM, οι υψηλές συγκεντρώσεις του διαλυτού PD-L1 (>2.78 ng/mL) αποτελούν ανεξάρτητο δυσμενή προγνωστικό παράγοντα. [40,42]

Κλινικές μελέτες φάσης I (μονοθεραπεία με Nivolumab) και φάσης II (συνδυασμός του Nivolumab και του αναστολέα κινάσης τυροσίνης ibrutinib) υποστηρίζουν τη χρησιμότητα των PD-1/PD-L1 αναστολέων στη θεραπεία της CLL. [38] Στη CLL, δεν υπάρχει συσχέτιση μεταξύ της έκφρασης του PD-L1 και των κύριων προγνωστικών παραγόντων (ηλικία, φύλο, LDH, WBC, στάδιο νόσου). Όμως, ο PD-L1 σχετίζεται ευθέως με τα επίπεδα του PD-1 και των TILs. Η παρεμπόδιση του PD-L1 προλαμβάνει την αναστροφή του λόγου CD8:CD4 και τα φαινόμενα εξάντλησης των CD8(+) T κυττάρων. Η ποσοτικοποίηση του αριθμού των CD4(+) PD-1(+) T κυττάρων με κυτταρομετρία ροής μπορεί να χρησιμεύσει για την εκτίμηση της πρόγνωσης νεοδιαγνωσμένων ασθενών με CLL. [40]

Ο συνδυασμός της ανοσοθεραπείας με την χρήση της την υπομεθυλιωτικής χημειοθεραπείας με 5'-azacitidine (Vidaza) βελτιώνει την επιβίωση ασθενών με AML και MDS. Σχετική κλινική μελέτη (φάσης I/II) στην AML, αναφέρει την αποτελεσματική δράση του συνδυασμού Nivolumab/5-azacitidine (Vidaza). [38,41,42] Στα MDS, ο PD-L1 υπερεκφράζεται σε ασθενείς υψηλού κινδύνου υπό θεραπεία με Vidaza. Το Pembrolizumab (anti-PD-1) και το Pembrolizumab παρέχει αξιόλογες απαντήσεις στην ανοσοθεραπεία προθεραπευμένων ασθενών. [42,47] Μεταξύ άλλων anti-PD-L1 mAbs, το Durvalumab μελετάται εκτενώς στην θεραπεία των MDS ή της AML με σχετικές μελέτες εν εξελίξει (π.χ. NCT02275533, NCT02532231). Παρόμοιες μελέτες διενεργούνται και για anti-PD-1 mAbs (π.χ. NCT02845297, NCT02599649). [42] Λίγα δεδομένα υπάρχουν για την αξία της χορήγησης της PD-1/PD-L1 ανοσοθεραπείας στη B-ALL και τη CML. Από προκλινικές μελέτες στη CML, η παρεμπόδιση του PD-L1 αποκαθιστά την έκκριση IL-2 χωρίς αύξηση του πολλαπλασιασμού των T κυττάρων. Απεναντίας, η εφαρμογή anti-PD-1 ανοσοθεραπείας μπορεί να επανεκπαιδεύσει τα MDSCs και να προσελκύσει ογκοειδικά T κύτταρα. [45]

Οι τρέχουσες μελέτες διεξάγουν συγκρίσεις μεταξύ μονοθεραπείας και συνδυασμών Nivolumab ή Ipilimumab με άλλες προσεγγίσεις όπως τα τεχνητά αντισώματα διπλής εξειδίκευσης (π.χ. Blinatumomab, CD33/CD3 BiTE) και οι αναστολείς μεθυλίωσης του DNA (π.χ. decitabine). [38,47] Τα ανοσοϊστοχημικά δεδομένα από διάφορες ερευνητικές μελέτες στο PB και/ή το BM υποστηρίζουν ότι η έκφραση του PD-L1 σε κύτταρα οξείας λευχαιμίας (AML, ALL) κυμαίνεται από 18% και ξεπερνά το 50%. Υψηλή έκφραση του PD-L1 (>25% επί του συνόλου των λευχαιμικών κυττάρων) σχετίζεται με μειωμένη επιβίωση. Υποστηρίζεται επίσης, ότι η έκφραση του PD-L1 ενισχύεται κατά την υποτροπή της νόσου. Οι διαφορές που παρατηρούνται στην έκφραση του PD-L1 οφείλονται σε διάφορους παράγοντες, όπως η ετερόγενεια της νόσου, το είδος της θεραπείας, η προέλευση του δείγματος και οι διαφορετικές τεχνικές ανίχνευσης. [36]

Οι μεθοδολογίες που χρησιμοποιούνται για την εκτίμηση της έκφρασης του PD-L1 περιορίζονται συνήθως στην ανοσοϊστοχημεία (IHC), την κυτταρομετρία ροής (FC) και τη μελέτη των επιπέδων του PD-L1 mRNA. Η χρώση για το PD-1 στο παθολογοανατομικό

εργαστήριο, συμβάλλει στη διαφοροδιάγνωση επικαλυπτόμενων μορφών λεμφωμάτων. [42,46,48,49]

Η εκτίμηση του ανοσολογικού προφίλ των ασθενών στην αρχή της θεραπείας (ανοσοϊστοχημεία, ανοσοφαινότυπος PB με FC) έχει προγνωστική αξία για την ανταπόκριση στην ανοσοθεραπεία. [42,49] Ο υπολογισμός της προγνωστικής αξίας των PD1/PD-L1 στα κακοήγη αιματολογικά νοσήματα είναι ιδιαίτερα δύσκολος, διότι αντικατοπτρίζει τη γενική έκταση της ανοσοαπάντησης και όχι εκείνη έναντι των καρκινικών κυττάρων. [48,49] Οι διαφορές στην αποτελεσματικότητα των ανοσοχημικών τεχνικών ανίχνευσης, η δυναμική ρύθμιση της έκφρασης του PD-L1 και η συνεισφορά άλλων κατασταλτικών μηχανισμών (π.χ. άλλοι ανασταλτικοί υποδοχείς, IDO, αργινάση, VEGF) δεν καθιστούν αυτή καθ' εαυτή την έκφραση του PD-L1 αποτελεσματικό προγνωστικό βιοδείκτη. [43,48]

Η ένταξη των αναστολέων ανοσολογικών σημείων ελέγχου στην κλινική πράξη αντιμετωπίζει δύο κύρια προβλήματα. Το πρώτο αφορά τον περιορισμένο αριθμό ασθενών που συμμετέχει στις μελέτες και το δεύτερο την ανάγκη εύρεσης προγνωστικών βιοδεικτών. Παράλληλα, η βιολογική ετερογένεια των αιματολογικών νεοπλασμάτων, συγκριτικά με τους συμπαγείς όγκους, δυσκολεύει την επιτυχή δράση των PD-1/PD-L1 αναστολέων. [38] Οι λευχαιμίες δεν είναι εξίσου ανοσογονικές όπως οι συμπαγείς όγκοι. Οι βλάστες μπορεί να εκφράζουν αντιγόνα άλλων κυτταρικών σειρών ή να μην εκφράζουν συνδεδεγμένα μόρια για την ενεργοποίηση των T κυττάρων. Επίσης, μπορεί να καταστείλουν την έκφραση των MHC μορίων ή να προσελκύσουν κατασταλτικά κύτταρα (π.χ. Tregs, MDSCs). Ακόμη, το διαφορετικό ανοσολογικό μικροπεριβάλλον τροποποιεί τους μηχανισμούς διαφυγής των λευχαιμικών κυττάρων. [36] Η ευκολία λήψης δειγμάτων πριν και μετά τη θεραπεία διευκολύνει τις προσπάθειες για τη διερεύνηση των παραπάνω προβλημάτων και την επιλογή των υποψήφιων για anti-PD-1/PD-L1 ανοσοθεραπεία ασθενών. [36]

ΚΕΦ. 4 ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Η μελέτη της έκφρασης των μορίων PD-1 και PD-L1 σε επιλεγμένα κακοήγη αιματολογικά νοσήματα μέσω πολυπαραμετρικής κυτταρομετρίας ροής αποτελεί τον σκοπό της παρούσης εργασίας. Διερευνάται η ύπαρξη διαφοροποιήσεων ως προς την έκφραση των PD-1/PD-L1 κατά τη διάγνωση των ασθενών, σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου (μάρτυρες). Επιπλέον, γίνεται προσπάθεια συσχέτισης της έκφρασης των PD-1/PD-L1 με τους κυριότερους προγνωστικούς δείκτες των ασθενών. Η μελέτη αυτή εντάσσεται στη διερεύνηση της χρήσης της κυτταρομετρίας ροής για την ορθή διάγνωση και την εκτίμηση της πρόγνωσης των ασθενών με κακοήγη αιματολογικά νοσήματα.

Η πειραματική διαδικασία διαρθρώνεται από δύο πρωτόκολλα με συνδυασμούς πέντε φθορίζουσών ουσιών για τον προσδιορισμό της έκφρασης του PD-L1 και επτά φθορίζουσών ουσιών για τον προσδιορισμό της έκφρασης του PD-1. Οι συνδυασμοί για το PD-L1 βασίζονται στην πλήρη ανοσοφαινοτυπική τυποποίηση του δείγματος σύμφωνα με το πρωτόκολλο εργασίας του εργαστηρίου Κυτταρομετρίας Ροής του Γ.Ν.Α. «Ο Ευαγγελισμός» για κάθε νόσημα. Η έκφραση του PD-L1 μελετάται στα νεοπλασματικά κύτταρα και συγκρίνεται με εκείνη των λεμφοκυττάρων των ασθενών. Η έκφραση του PD-1 μελετάται στους υποπληθυσμούς των λεμφοκυττάρων των ασθενών και συγκρίνεται με εκείνη των μαρτύρων.

ΚΕΦ. 5 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

5.1. ΒΙΟΛΟΓΙΚΟ ΥΛΙΚΟ

Τα δείγματα μυελού των οστών (BM) και περιφερικού αίματος (PB) προέρχονται από τη διάγνωση ασθενών που παραπέμφθηκαν για ανοσοφαινοτυπική τυποποίηση στο εργαστήριο Κυτταρομετρίας Ροής του Τμήματος Ανοσολογίας και Ιστοσυμβατότητας του Γ.Ν.Α. «Ο Ευαγγελισμός». Τα δείγματα αφορούν ασθενείς με λέμφωμα (CLL-SLL, NHL), Πολλαπλό Μυέλωμα (MM), Μυελοδυσπλαστικά Σύνδρομα (MDS) και Οξεία Λευχαιμία

(AML, ALL) που δεν έχουν λάβει θεραπεία. Τα δείγματα για την ομάδα ελέγχου προέρχονται κυρίως από γυναίκες με ιστορικό αυτόματων αποβολών αγνώστου αιτιολογίας και ασθενείς με αντιδραστική λεμφοκυττάρωση που παραπέμφθηκαν στο εργαστήριο για ανοσοφαινοτυπική μελέτη περιφερικού αίματος. Όλα τα δείγματα λαμβάνονται σε πλαστικά σωληνάρια κενού των 4mL με αντιπηκτικό K₃EDTA. Κάθε δείγμα συνοδεύεται από συνοπτικό ατομικό ιστορικό και τον πρόσφατο κλινικοεργαστηριακό έλεγχο του ασθενούς. Μετά την παραλαβή, τα δείγματα επεξεργάζονται εντός 24 ωρών.

5.2. ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ ΚΑΙ ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ

- Flow-Check FluorospheresTM: φθορίζοντα σφαιρίδια τύπου I
- Flow-Check FluorospheresTM: φθορίζοντα σφαιρίδια τύπου IIA
- ImmunotrolTM (μονιμοποιημένο πλήρες αίμα) της Beckman Coulter
- Μονοκλωνικά αντισώματα των Beckman Coulter, Immunotech, Becton Dickinson, Pharmigen
- IsoFlowTM Sheath Fluid της Beckman Coulter (αδρανές ρυθμιστικό διάλυμα για το σχηματισμό της ομοαξονικής ροής)
- Phosphate Buffer Saline (PBS): ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών σε φυσιολογικό ορό
- Paraformaldehyde (PFA) της Sigma: 0,5% PFA σε PBS
- Fetal Bovine Serum (FBS): Βόειος εμβρυικός ορός (4% FBS σε PBS) της Biochem
- Normal Human Serum (NHS): Φυσιολογικός ορός της Biochrom
- Ammonium chloride (NH₄Cl) της Beckman Coulter για τη λύση των ερυθροκυττάρων
- VersalyseTM της Beckman Coulter για τη λύση των ερυθροκυττάρων
- ImmunoPrep
- FACS FlowTM
- FACS RinseTM
- FACS Clean
- Clenz

Παρακάτω γίνεται περιγραφή για κάθε ένα από τα αντιγόνα (Clusters of Differentiation, CD) που χρησιμοποιούνται για την ανοσοφαινοτυπική τυποποίηση των ασθενών στο εργαστήριο Κυτταρομετρίας Ροής του ΓΝΑ «Ο Ευαγγελισμός». [13,55] Με βάση τα παρακάτω αντιγόνα, έγινε επιλογή δεικτών και καταρτίστηκε το πρωτόκολλο της πειραματικής διαδικασίας:

Γενικοί δείκτες

CD45: Κοινό λευκοκυτταρικό αντιγόνο (LCA). Γλυκοπρωτεΐνη τύπου I με 180-220 kDa με ποικίλες ισομορφές. Υψηλή έκφραση στα λεμφοκύτταρα, ιδιαίτερα στις διαφοροποιημένες μορφές. Φωσφατάση τυροσίνης με βασικό ρόλο στην αντιγονοεξαρτώμενη ενεργοποίηση των B και T κυττάρων. Ισομορφές του CD45 (CD45RA/CD45RO) χρησιμοποιούνται για τον διαχωρισμό παρθένων και μνημονικών λεμφοκυττάρων.

CD34: Βασικός δείκτης αωρότητας. Μουκοσιαλίνη (μόριο προσκόλλησης, γλυκοπρωτεΐνη τύπου I) 40 kDa. Εκφράζεται στα αρχέγονα αιμοποιητικά και λεμφικά προγονικά κύτταρα, στα στρωματικά κύτταρα του μυελού, στα ενδοθηλιακά κύτταρα και στους ινοβλάστες. Συμμετέχει στην αναστολή της διαφοροποίησης των αιμοποιητικών κυττάρων. Χρησιμοποιείται σε δοκιμασίες κινητοποίησης και συλλογής αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων (stem cells).

HLA-DR: Ανήκει στην οικογένεια των MHC τάξης II. Εκφράζεται στα APCs και παρουσιάζει αντιγόνα στα CD4(+) T λεμφοκύτταρα. Μαζί με το CD154 θεωρείται δείκτης της ενεργοποίησης των T λεμφοκυττάρων από τον TCR και το CD28. Χρησιμοποιείται στην ανοσολογική τυποποίηση της AML. Η απουσία του HLA-DR σε συνδυασμό με την ασθενή έκφραση/απουσία του CD34 και την έκφραση του CD117 χαρακτηρίζει την AML t(15;17). Ορισμένα αλληλόμορφα του HLA-DR συνδέονται με φλεγμονώδη και αυτοάνοσα νοσήματα (π.χ. ρευματοειδής αρθρίτιδα).

Δείκτες για τα T λεμφοκύτταρα:

- i. **CD1:** Εκφράζεται σε ενεργοποιημένα T κύτταρα, θυμοκύτταρα, B κύτταρα, DCs, κύτταρα Langerhans, μονοκύτταρα και επιθηλιακά κύτταρα. Απαντάται σε 5 ισομορφές (a-e) μοριακού βάρους 43-49 kDa. Εμφανίζει δομή παρόμοια

- με το MHC τάξης I και συμμετέχει στην παρουσίαση μη πεπτιδικών αντιγόνων σε T κύτταρα.
- ii. **CD2:** Γνωστό και ως LFA-2 ή T11. Μόριο προσκόλλησης 45-48 kDa που αλληλεπιδρά με το CD58 κατά την ενεργοποίηση των T κυττάρων. Εκφράζεται σε θυμοκύτταρα, T και NK κύτταρα. Χρήσιμο για την ανοσοφαινοτυπική μελέτη της T οξείας λευχαιμίας.
 - iii. **CD3:** Γνωστό και ως T3 (25-28 kDa). Αποτελείται από τρεις πολυπεπτιδικές αλυσίδες (γ, δ, ε) και διαδραματίζει βασικό ρόλο στην μεταγωγή σήματος από τον TCR. Εκφράζεται σε θυμοκύτταρα, T και NK-T κύτταρα. Ο δείκτης εκλογής για την T σειρά.
 - iv. **CD4:** Γνωστό και ως T4 ή L3T4. Συνυποδοχέας του TCR (55 kDa) και υποδοχέας του HIV. Εκφράζεται κυρίως από MHC II T κύτταρα, θυμοκύτταρα (δείκτης θυμικής διαφοροποίησης). Χαρακτηριστικός δείκτης των βοηθητικών T κυττάρων.
 - v. **CD7:** Μέλος της οικογένειας της γαλεκτίνης 1 (40 kDa). Εκφράζεται σε πολυδύναμα αιμοποιητικά κύτταρα (HSCs), θυμοκύτταρα, T κύτταρα, NK και πρόδρομα B κύτταρα. Δείκτης διάκρισης των προγονικών λεμφοειδών κυττάρων από τα HSCs. Ρυθμίζει την παραγωγή κυτταροκινών από περιφερικά NK, T κύτταρα και ενέχεται στο επαγόμενο από τον LPS σηπτικό σοκ. Δείκτης της T-ALL. Εμφανίζεται και στην AML (aberrant expression) και συνδέεται με πτωχή πρόγνωση.
 - vi. **CD8:** Ομοδιμερής (αα) ή ετεροδιμερής (αβ) μεμβρανικός συνυποδοχέας του TCR των MHCI T κυττάρων. Γνωστός και ως T8 ή Leu2. Χαρακτηριστικός δείκτης των κυτταροτοξικών T λεμφοκυττάρων.
 - vii. **CD28:** Ομοδιμερές 90 kDa, γνωστό και ως T44. Εκφράζεται στα ώριμα CD3(+) θυμοκύτταρα, στα περιφερικά T κύτταρα και τα πλασματοκύτταρα. Διεγείρει τον πολλαπλασιασμό των T κυττάρων μέσω κυτταροκινών μετά την σύνδεσή του με το CD80 ή CD86 (μέλη της οικογένειας του B7). Στόχος ανοσοκατασταλτικής θεραπείας.
 - viii. **Tdt:** Η ακραία νουκλεοτιδική τρανσφεράση δρα κατά την αναδιατάξη V-(D)-J με σκοπό την επέκταση της ποικιλομορφίας του ρεπερτορίου των BCR και

TCR κατά την ωρίμανση των B και T λεμφοκυττάρων αντίστοιχα. Προσθέτει δεοξυριβονουκλεοτίδια στο 3' άκρο των μορίων DNA. [56] Θεωρείται ολιγοκλωνικός δείκτης για τους αδιαφοροποίητους ή ατελώς διαφοροποιημένους λεμφοβλάστες της ALL. Ανιχνεύεται επίσης και στην αδιαφοροποίητη AML (M0). [57]

Δείκτες για τα B λεμφοκύτταρα:

- i. **CD5:** Γνωστό και ως T1, Leu1, Ly-1, O_x19 (55 kDa). Εκφράζεται κυρίως στα ώριμα T κύτταρα και στα πρώιμα θυμοκύτταρα. Ασθενής έκφραση σε υποπληθυσμό των ώριμων B κυττάρων (B1a). Ρυθμιστής της μεταγωγής σήματος από τον BCR και TCR, ανάλογα με το αναπτυξιακό στάδιο. Βασικός δείκτης των κυττάρων της CLL.
- ii. **CD10:** Μεμβρανική μεταλλοπεπτιδάση (100 kDa) με υπόστρωμα φλεγμονώδη και αγγειενεργά πεπτίδια. Εκφράζεται σε πρόδρομα λεμφοκύτταρα, στρωματικά κύτταρα του μυελού των οστών, μονοκύτταρα, ουδετερόφιλα και κερατινοκύτταρα. Γνωστή και ως το κοινό αντιγόνο της B-ALL (CALLA).
- iii. **CD19:** Τμήμα του συνυποδοχέα του BCR μαζί με το CD21 και το CD81. Γνωστό και ως B4 (>120kDa). Εκφράζεται καθ' όλη τη διαφοροποίηση των B λεμφοβλαστών, αλλά η έκφραση του χάνεται στα πλασματοκύτταρα. Κατέχει κομβικό ρόλο στη μεταγωγή σήματος από τον BCR και ρυθμίζει την ανάπτυξη, ενεργοποίηση και διαφοροποίηση των B κυττάρων. Ο κυριότερος B δείκτης.
- iv. **CD20:** Εκφράζεται αποκλειστικά στα B κύτταρα. Ανήκει στην υπερικογένεια της 4-διαμεμβρανικά εκτεινόμενης πρωτεΐνης. Γνωστό και ως B1 (33-37 kDa). Ρυθμίζει την ενεργοποίηση των B κυττάρων μέσω οδών κινάσης τυροσίνης, μέσω της υπομονάδας του διαμεμβρανικού καναλιού ιόντων Ca²⁺ και της προόδου του κυτταρικού κύκλου. Δείκτης ανοσοθεραπείας (anti-CD20 Rituximab) για πολλά NHL και αυτοάνοσα νοσήματα.

- v. **CD22:** Γλυκοπρωτεΐνη μονής αλυσίδας τύπου I (140 kDa). Ανιχνεύεται στην επιφάνεια και το κυτταρόπλασμα των όψιμων προγονικών και πρόδρομων B κυττάρων. Δρα ως μόριο προσκόλλησης και μεταγωγής σήματος. Χρήσιμο για τη διάγνωση και την παρακολούθηση νεοπλασιών από ώριμα B κύτταρα.
- vi. **CD23:** Ομοτριμερής C-τύπου λεκτίνη τύπου II (45 kDa). Υποδοχέας χαμηλής συγγένειας της IgE. Εκφράζεται κυρίως στα B κύτταρα και στα μονοκύτταρα. Ρυθμιστής της σύνθεσης IgE αλλά και της απελευθέρωσης TNF, GM-CSF, IL-1 και IL-6 από τα μονοκύτταρα. Αυξημένα επίπεδα του CD23 στον ορό των ασθενών με CLL συνδέονται με πτωχή πρόγνωση.
- vii. **CD24:** Μόριο προσκόλλησης με ιδιότητες μουκίνης (35-45 kDa). Εκφράζεται στα B κύτταρα πλην πλασματοκυττάρων, στα θυμοκύτταρα, στα ερυθροκύτταρα, στα μονοκύτταρα, στα ώριμα κοκκιοκύτταρα, στα κύτταρα Langerhans και στο φυσιολογικό επιθήλιο. Θεωρείται ότι ενισχύει το μεταστατικό δυναμικό των καρκινικών κυττάρων. Χρήσιμο στη μελέτη της ωρίμανσης των B κυττάρων.
- viii. **CD25:** Βασικός δείκτης ενεργοποίησης των B, T, NK κυττάρων και των μακροφάγων. Υποδοχέας χαμηλής συγγένειας (α αλυσίδα) της IL-2 (IL-2R). Συνδέεται με τις αλυσίδες β, γ για να σχηματισθεί ο IL-2R υψηλής συγγένειας.
- ix. **CD27:** Γνωστό και ως T14 (55 kDa). Μέλος της υπερικογένειας του TNF. Εκφράζεται στα ώριμα θυμοκύτταρα, στα ενεργοποιημένα B και T κύτταρα, στα περιφερικά T κύτταρα και τα μνημονικά B κύτταρα, στα NK κύτταρα και τα μακροφάγα. Παρέχει συνδιεγερτικό σήμα για την ενεργοποίηση των B και T κυττάρων. Δείκτης των παρθένων T κυττάρων. Αυξημένα επίπεδα διαλυτού CD27 συναντώνται συχνά σε φλεγμονώδεις παθήσεις.
- x. **CD38:** Διαμεμβρανική γλυκοπρωτεΐνη τύπου II (45 kDa) με ενεργότητα κυκλάσης του ριβοζυλο-ADP και δράση μορίου προσκόλλησης. Ανιχνεύεται σε μεμβρανική μορφή στα άωρα και ενεργοποιημένα B ή T κύτταρα, στα πλασματοκύτταρα καθώς και στους ιστούς με αυξημένο

μεταβολισμό γλυκόζης. Ανιχνεύεται και σε διαλυτή μορφή στον ορό. Χρησιμοποιείται για τη διάγνωση του MM, ενώ κατέχει θετική προγνωστική αξία για την οξεία λευχαιμία και αρνητική προγνωστική αξία για τη CLL.

- xi. **CD43:** Σιαλογλυκοπρωτεΐνη μοριακού βάρους (95-135 kDa). Παρεμποδιστής της προσκόλλησης μεταξύ λευκοκυττάρων και άλλων κυττάρων. Παρούσα σε όλα τα WBC εκτός των παρθένων B κυττάρων. Ιστοπαθολογικός δείκτης διαχωρισμού φυσιολογικών και νεοπλασματικών T κυττάρων. Χρήσιμος στην ανοσοφαινοτυπική μελέτη λευχαιμιών/λεμφωμάτων.
- xii. **CD58:** Γλυκοπρωτεΐνη μονής αλυσίδας τύπου I (55-70 kDa) με δύο ισομορφές (διαμεμβρανική, συνδεδεμένη με GPI). Ιδιαίτερα υψηλή έκφραση στα μνημονικά T κύτταρα και στα DCs. Στα APCs συνδέεται με το CD2 των T κυττάρων και ενισχύει την αναγνώριση του αντιγόνου από τα τελευταία. Διευκολύνει την προσκόλληση των CTLs με τα κύτταρα στόχους αυτών.
- xiii. **CD79b:** Γλυκοπεπτίδιο τύπου I (60 kDa) ετεροδιμερές του CD79a. Συναντάται σε όλα τα B κύτταρα. Αποτελεί μέρος του BCR με δράση ανάλογη εκείνης του CD3.
- xiv. **CD81:** Γλυκοπρωτεΐνη μονής αλυσίδας τύπου III-IV (26 kDa) μέλος της οικογένειας TM4SF και τμήμα του συμπλέγματος μεταγωγής σήματος CD19/CD21/TAPA-1. Ευρεία έκφραση στα αιμοποιητικά (πλην ερυθροκυττάρων, αιμοπεταλίων, ουδετεροφίλων), ενδοθηλιακά και επιθηλιακά κύτταρα. Συμμετέχει στην ανάπτυξη των T κυττάρων, δεσμεύει το αντιγόνο E2 του HCV και ρυθμίζει την κυτταρική ανάπτυξη και κινητικότητα.
- xv. **CD103:** Τμήμα γλυκοπεπτιδίου τύπου I (α αλυσίδα) 25 kDa. Δεσμεύεται στην E καδερίνη και την ιντεγκρίνη β7. Εκφράζεται στα διαεπιθηλιακά λεμφοκύτταρα πολλών ιστών (βοηθητικό μόριο για την ενεργοποίηση των λεμφοκυττάρων παρουσία φλεγμονής), στα T κύτταρα της βασεοπλευρικής πλευράς του εντερικού επιθηλίου, καθώς και σε μερικά λεμφοκύτταρα του

PB ή λεμφικών οργάνων. Δείκτης λεμφωμάτων από ενδοεπιθηλιακά λεμφοκύτταρα.

- xvi. **CD138:** Πρωτεογλυκάνη θεικής ηπαράνης (Syndecan 1, SDC1) με δράση υποδοχέα μορίων της εξωκυττάριας ουσίας. Εκφράζεται στα πλασματοκύτταρα και τα πρόδρομα B κύτταρα. Χρησιμοποιείται ως διαγνωστικός δείκτης για τις πλασματοκυτταρικές δυσκρασίες.
- xvii. **CD200:** Μονή αλυσίδα γλυκοπρωτεΐνης μονής αλυσίδας τύπου I (45-50 kDa) γνωστή και ως OX2. Πιθανό ανοσορυθμιστικό μόριο που εκφράζεται σε B κύτταρα, DCs, μακροφάγα και νευρώνες.
- xviii. **FMC7:** Το anti-FMC7 mAb ανιχνεύει μια πρωτεΐνη των ώριμων B κυττάρων που δεν ανήκει στην ομάδα των αντιγόνων CD. Η έκφραση του FMC7 σχετίζεται με εκείνη του CD20 και χρησιμεύει στην ανοσοφαινοτυπική μελέτη λευχαιμιών και λεμφωμάτων. [58]
- xix. **NG2:** Το νευρογλοιακό αντιγόνο 2 εκφράζεται ειδικά στις λευχαιμίες με αναδιάταξη του *MLL* και συνδέεται με επιθετική νόσο. Επίσης, εκφράζεται κατά την ανάπτυξη του εγκεφάλου αλλά και στο μεταστατικό μελάνωμα. [59]

Δείκτες για τη μυελική/μονοκυτταρική σειρά:

- i. **CD11b:** Διαμεμβρανική γλυκοπρωτεΐνη τύπου I (170 kDa), μέλος της οικογένειας της α αλυσίδας της ιντεγκρίνης. Κατά τη φλεγμονώδη αντίδραση, συνδέεται με το CD18 και σχηματίζει σύμπλοκο με ιδιότητες κυτταρικής προσκόλλησης (στόχος αντιφλεγμονώδους). Εκφράζεται στα κύτταρα της μυελικής σειράς, στα NK και σε υποπληθυσμούς των B, T κυττάρων. Χρησιμοποιείται ως δείκτης των μακροφάγων και των μονοκυττάρων.
- ii. **CD11c:** Διαμεμβρανική γλυκοπρωτεΐνη τύπου I (150 kDa), μέλος της οικογένειας της α αλυσίδας της ιντεγκρίνης. Εκφράζεται ισχυρά στα μονοκύτταρα, μακροφάγα και NK κύτταρα. Διαμεσολαβεί διακυτταρικές αλληλεπιδράσεις κατά τη φλεγμονή. Χρησιμοποιείται για την ανίχνευση κυττάρων της μυελικής σειράς στους ιστούς.

- iii. **CD13:** Διαμεμβρανική γλυκοπρωτεΐνη τύπου II (150 kDa) με ενεργότητα μεταλλοπρωτεάσης Zn. Διασπά πεπτίδια που προσδένονται στα MHC II. Παρούσα σε προγονικά κύτταρα της μυελικής σειράς, κοκκιοκύτταρα, μονοκύτταρα, στρωματικά κύτταρα του μυελού, οστεοκλάστες και μη αιμοποιητικά κύτταρα. Χρησιμοποιείται στη ταξινόμηση της οξείας λευχαιμίας. Η ανίχνευση anti-CD13 αυτοαντισωμάτων συνδέεται με φαινόμενα GVHD στη HSCT.
- iv. **CD14:** Γλυκοπρωτεΐνη (53-55kDa) συνδεδεμένη με GPI πλούσια σε λευκίνη. Υποδοχέας του βακτηριακού λιποπολυσακχαρίτη (LPS). Εκφράζεται στα μονοκύτταρα, μακροφάγα, κοκκιοκύτταρα και τους οστεοκλάστες. Χρησιμοποιείται ως δείκτης για τα μονοκύτταρα και τους οστεοκλάστες.
- v. **CD15:** Τρισακχαρίτης (3-fucosyl-N-acetyl-lactosamine) που εκφράζεται σε όλα τα κοκκιοκύτταρα. Ανευρίσκεται επίσης στα μακροφάγα, μονοκύτταρα, μαστοκύτταρα και κύτταρα Langerhans. Δρα ως μόριο προσκόλλησης και δεσμεύεται από το CD62, ενώ η απουσία του σχετίζεται με το σύνδρομο ανεπάρκειας προσκόλλησης των λευκοκυττάρων τύπου II (LAD II). Χρησιμοποιείται ως δείκτης των ωριμων κοκκιοκυττάρων και των κυττάρων Reed – Sternberg (cHL).
- vi. **CD33:** Διαμεμβρανική γλυκοπρωτεΐνη τύπου I (67 kDa) που δεσμεύει παράγωγα σιαλικού οξέος (γνωστή ως My9). Η έκφρασή της περιορίζεται στα κύτταρα της μυελικής σειράς. Ισχυρή έκφραση του CD33 ανιχνεύεται στα μονοκύτταρα, μακροφάγα και μαστοκύτταρα. Χρησιμοποιείται στην τυποποίηση και θεραπεία (mAbs, CARs) της AML.
- vii. **CD36:** Γλυκοπρωτεΐνη τύπου I (85 kDa) που εκφράζεται στα ώριμα μονοκύτταρα, μακροφάγα, ενδοθηλιακά κύτταρα και αιμοπετάλια. Στα μακροφάγα, δρα ως υποδοχέας scavenger της LDL. Συμμετέχει στην αναγνώριση και φαγοκυττάρωση αποπτωτικών κυττάρων. Διευκολύνει τη συσσώματωση των αιμοπεταλίων και παρουσιάζει πεπτίδια στους υποδοχείς TLR2,6 της έμφυτης ανοσίας.
- viii. **CD41:** Διαμεμβρανική γλυκοπρωτεΐνη τύπου I (135 kDa) που διασπάται μεταμεταφραστικά και σχηματίζει σύμπλοκο με το CD61 κατά την

ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων. Εκφράζεται σε πρόδρομα ή ώριμα αιμοπετάλια και δρα ως υποδοχέας του ινωδογόνου, της φιβρονεκτίνης και του παράγοντα von Willebrand. Χρησιμοποιείται στην αντιθρομβωτική θεραπεία και στην ανοσολογική τυποποίηση της Οξείας Μεγακαρυοβλαστικής Λευχαιμίας (AML M7).

- ix. **CD61:** Ιντεγκρίνη β3 (110 kDa) που εκφράζεται κυρίως στα αιμοπετάλια και μεγακαρυοκύτταρα ως τμήμα του συμπλόκου CD41/CD61. Διαμεσολαβεί την προσκόλληση σε πρωτεΐνες της εξωκυττάριας ουσίας (π.χ. ινωδογόνο) και συνδέεται με τη μετάσταση των συμπαγών όγκων. Η απουσία του CD61 ευθύνεται για τις αιμορραγικές διαταραχές της θρομβασθένειας του Glanzmann.
- x. **CD64:** Διαμεμβρανική γλυκοπρωτεΐνη τύπου I (72kDa) χαρακτηριστική για τα μονοκύτταρα και τα μακροφάγα. Δρα ως υποδοχέας του Fc τμήματος της IgG στη φαγοκυττάρωση ανοσυμπλόκων, στην ADCC, στην αντιγονοπαρουσίαση, στην έκκριση κυτταροκινών και ενεργών μορφών O₂. Βασικός δείκτης για την τυποποίηση της Οξείας Μονοκυτταρικής Λευχαιμίας (AML M5).
- xi. **CD117:** Διαμεμβρανική πρωτεΐνη τύπου I (145 kDa) με ενεργότητα κινάσης τυροσίνης γνωστή και ως c-kit ή SCFR (Stem Cell Factor Receptor). Εκφράζεται στα αρχέγονα και προγονικά αιμοποιητικά κύτταρα όπου ενεργοποιείται (διμερισμός, αυτοφωσφορυλίωση, μεταγωγή αυξητικού σήματος) από τον SCF. Θεωρείται ογκογονίδιο για πολλά νεοπλάσματα του γαστρεντερικού σωλήνα αλλά και στην AML. [60]
- xii. **CD123:** Διαμεμβρανική γλυκοπρωτεΐνη τύπου I (70 kDa) γνωστή ως IL-3Rα. Κατά την ωρίμανση των αιμοποιητικών κυττάρων της μυελικής, μονοκυτταρικής και ερυθράς σειράς, συνδέεται με το CD131 και σχηματίζει τον υποδοχέα της IL-3 (IL-3R). Η αυξημένη έκφραση του CD123 στην AML συνδέεται με πτωχή πρόγνωση.
- xiii. **MPO:** Η μυελοϋπεροξειδάση θεωρείται κατ' εξοχήν ειδικός δείκτης της μυελικής σειράς. Ανιχνεύεται στο κυτταρόπλασμα των μυελοβλαστών της AML με κυτταροχημεία, ανοσοϊστοχημεία και κυτταρομετρία ροής. Η απουσία της MPO στην AML σχετίζεται με πτωχή πρόγνωση. [61]

- xiv. **LF:** Η λακτοφερίνη είναι μια σιδηροδεσμευτική πρωτεΐνη με αντιβακτηριακή δράση που εκφράζεται κατά τη μεταμιτωτική ωρίμανση των κοκκιοκυττάρων και συγκεκριμένα από το στάδιο τα μυελοκύτταρα έως τις ώριμες μορφές. Οι φυσιολογικοί και λευχαιμικοί μυελοβλάστες και τα προμυελοκύτταρα δεν εκφράζουν την LF. [62]

Δείκτες για τα NK κύτταρα:

- i. **CD16:** Διαμεμβρανική γλυκοπρωτεΐνη τύπου I 50-80 kDa. Τμήμα του υποδοχέα III του Fc τμήματος της IgG που δεσμεύει ανοσοσύμπλοκα. Εκφράζεται κυρίως στα NK κύτταρα αλλά και στα μακροφάγα, ενεργοποιημένα μονοκύτταρα και μαστοκύτταρα.
- ii. **CD56:** Μόριο προσκόλλησης (N-CAM1) που εκφράζεται σε αιμοποιητικούς και άλλους ιστούς (π.χ. νευρικός). Η έκφραση της περιορίζεται στα NK κύτταρα και σε υποπληθυσμούς των T κυττάρων (NK-T).

Δείκτες για την ερυθροκύτταρα:

- i. **CD235:** Γλυκοφορίνη των ερυθροκυττάρων με τρεις ισομορφές a (35 kDa), b (20 kDa) και ab (55 kDa). Χρησιμοποιούνται στα ελάσσονα συστήματα ομάδων αίματος MN (CD245a) και SS (CD235b). Τα CD235a (+) ερυθροκύτταρα είναι ανθεκτικά στο *P. falciparum*.
- ii. **CD71:** Ο υποδοχέας τρανσφερίνης (190 kDa). Ομοδιμερής γλυκοπρωτεΐνη τύπου II που εκφράζεται από όλα τα πολλαπλασιαζόμενα κύτταρα και συμμετέχει στην πρόσληψη σιδήρου. Δείκτης πολλαπλασιασμού σε συγκεκριμένους συμπαγείς όγκους και στόχος κυτταροτοξικών μορίων. Πιθανώς να ενέχεται στην παθογένεση της IgA νεφροπάθειας.

Τα μονοκλωνικά αντισώματα (mAbs) που χρησιμοποιήθηκαν στη πειραματική διαδικασία προέρχονται από τις εταιρείες Beckman Coulter, Immunotech, Becton Dickinson (BD), Pharmingen και Cytognos. Για το panel του PD-L1 χρησιμοποιείται πενταπλός φθορισμός με συνδυασμό των FITC (Fluorescein-5-isothiocyanate), PE (Phycoerythrin), ECD (PE-Texas Red-X), PC5 (PE-CY5 ή Phycoerythrin Cyanin 5.1) και PC7 (PE-CY7 ή Phycoerythrin Cyanin 7). Για τον προσδιορισμό της έκφρασης του PD-1 κατασκευάζεται

panel με επταπλό φθορισμό αποτελούμενο από το συνδυασμό FITC, PE, ECD, PC7, APC (Allophycocyanin), KRO (Krome Orange) και PB (Pacific Blue). Τα mAbs όπως και τα διαλύματα διατηρούνται σε θερμοκρασία συντήρησης στο ψυγείο.

Πίνακας 5.1. Κατάλογος των μονοκλωνικών αντισωμάτων που χρησιμοποιήθηκαν στην πειραματική διαδικασία.

Α/Α	Μονοκλωνικό αντίσωμα			Εταιρεία
	Αντιγόνο	Φθορίζουσα ουσία	Κλώνος	
1	CD16	PE	3G8	Immunotech
2	CD19	ECD	HD237	Beckman Coulter
3	CD20	PC5	B9E9	Beckman Coulter
4	CD7	FITC	8H8.1	Beckman Coulter
5	CD10	PE	ALB1	Beckman Coulter
6	CD13	ECD	Immu103.44	Beckman Coulter
7	CD14	PC5	RMO52	Beckman Coulter
8	CD45	PC7	J.33	Beckman Coulter
9	CD22	FITC	ST10.1H11	Beckman Coulter
10	HLA-DR	PE	L243	Becton Dickinson
11	CD5	ECD	BL1a	Beckman Coulter
12	CD33	PC5	D3HL60.251	Beckman Coulter
13	CD138	FITC	B-a38	Cytognos
14	CD45	ECD	J.33	Beckman Coulter
15	CD38	PC5	LS198-4-3	Beckman Coulter
16	CD56	PC7	N901	Beckman Coulter
17	CD23	FITC	9P25	Beckman Coulter
18	CD22	PC5	SJ10.1H11	Beckman Coulter
19	CD5	PC7	SFCI24T6G12	Beckman Coulter
20	CD34	FITC	8G 12	Beckman Coulter
21	CD13	PC5	Immu103.44	Beckman Coulter
22	CD10	PC5	J5	Beckman Coulter
23	CD117	PC7	104D2D1	Beckman Coulter
24	CD3	FITC	UCHT1	Beckman Coulter
25	CD56	PE	MY31	Becton Dickinson

26	CD8	PC7	SFC121Thy2D3 (T8)	Beckman Coulter
27	CD4	APC	HIT2	Becton Dickinson
28	CD45	KRO	J33	Beckman Coulter
29	CD64	FITC	22	Beckman Coulter
30	CD2	FITC	39C1.5	Beckman Coulter
31	CD103	FITC	BER-ACT8	Becton Dickinson
32	CD25	ECD	B1.49.9	Beckman Coulter
33	CD20	PC5	B9E9	Beckman Coulter
34	CD19	PC7	J3-119	Beckman Coulter
35	CD3	PC5	UCTH1	Beckman Coulter
36	CD4	ECD	SFCI12T4D11	Beckman Coulter
37	CD274	PE	29E.2AE	Beckman Coulter
38	CD279	PB	EH12.2H7	Beckman Coulter
39	CD8	APC	B9.M	Beckman Coulter
40	CD4	PC7	SFCI12T4D11	Beckman Coulter
41	K/L/CD19	FITC/PE/ECD		Beckman Coulter
42	TETRA CD45 CD19 CD56 CD3	FITC/ECD/PE/PC5		Beckman Coulter
43	TETRA CD45 CD4 CD8 CD3			Beckman Coulter
44	6 TBNK			Becton Dickinson

5.2.1. Αναλώσιμα

- Ρύγχη για πιπέτες όγκου 10, 100 και 1000 μL
- Πλαστικές πιπέτες τύπου Pasteur
- Πλαστικά σωληνάρια κυτταρομετρίας ροής
- Πλαστικά σωληνάρια τύπου Falcon
- Σωληνάρια αιμοληψίας με αντιπηκτικό ξηρό K_3EDTA των 4mL
- Φίλτρα διήθησης μυελού των οστών (διάμετρος πόρων 100 μm)

5.3. ΟΡΓΑΝΑ

- Κυτταρομετρητής ροής NAVIOS της Beckman Coulter
- Κυτταρομετρητής ροής NAVIOS EX της Beckman Coulter

- Κυτταρομετρητής ροής FC500 της Beckman Coulter
- Κυτταρομετρητής ροής BD FACS CANTO II της BD Biosciences
- Σύστημα λύσης ερυθροκυττάρων QPrep
- Φυγόκεντρος της Heraeus της Thermo Scientific
- Μηχανικός αναδευτήρας (vortex) της AXION
- Υδατόλουτρο (37°C) της Techne
- Αυτόματες πιπέτες ακριβείας των 10 µL, 20 µL, 50µL, 100 µL και 1000 µL
- Κοινό ψυγείο συντήρησης και κατάψυξης

Για τη μέτρηση της έκφρασης των PD-1, PD-L1 στα δείγματα PB και BM χρησιμοποιήθηκαν οι κυτταρομετρητές Navios και Navios EX της εταιρείας Beckman Coulter. Ο κυτταρομετρητής Navios παρέχει την δυνατότητα μέτρησης έως 10 παραμέτρων με χρήση τριών laser (ερυθρό με λ διέγερσης 488nm, κυανό με λ διέγερσης 638nm και ιώδες με λ διέγερσης 405nm). [7] Κατά τη διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας η ταχύτητα ροής του εναιωρήματος ρυθμίστηκε στο Medium και μετρήθηκαν τουλάχιστον 50000 έως 100.000 ungated events. Τα αποτελέσματα των μετρήσεων αποθηκεύονται σε αρχεία LMD του προγράμματος listmode του λογισμικού επεξεργασίας του οργάνου. Για την περαιτέρω επεξεργασία των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό KALUZA της εταιρείας Beckman Coulter.

Για τον εσωτερικό και τον εξωτερικό έλεγχο ποιότητας του εργαστηρίου χρησιμοποιήθηκαν και οι κυτταρομετρητές Cytomics FC500 και BD FACS Canto II. Ο κυτταρομετρητής Cytomics FC500 της Beckman Coulter υποστηρίζει την δυνατότητα ανάλυσης πενταπλού φθορισμού και χρησιμοποιεί είτε ένα (κυανό 488nm) είτε δύο (κυανό 488nm, κόκκινο 635nm) laser. Ο κυτταρομετρητής χρησιμοποιείται για μέτρηση σωληναρίων FC αλλά και πλακιδίων μικροτιτλοδότησης. Το οπτικό σύστημα του κυτταρομετρητή BD FACS CANTO II περιλαμβάνει πηγή διέγερσης αποτελούμενη από δύο ή τρία laser (κυανό 488nm ψυχόμενο, ερυθρό He-Ne 633nm, ιώδες 405nm). [63]

Για την αυτόματη λύση των ερυθρών αιμοσφαιρίων (άνευ έκπλυσης) χρησιμοποιείται το σύστημα ImmunoPrepTM της Beckman Coulter. Το ανωτέρω σύστημα αντιδραστηρίων διατηρεί την ακεραιότητα των λευκοκυττάρων και τα φυσικά σκεδαστικά τους χαρακτηριστικά. Μεγιστοποιεί τον διαχωρισμό των επιθυμητών κυττάρων από θραύσματα

ερυθροκυττάρων (debris) και αιμοπετάλια. Παρέχει σταθερότητα στα κύτταρα για 24 ώρες όταν το δείγμα φυλάσσεται στους 2-8°C. Εξωτερικά, το όργανο αποτελείται από ένα φορητό δειγματοδιανομέα (carousel) 32 θέσεων, αισθητήρα και συσκευή ελέγχου της θέσεως των σωληναρίων, αναμικτήρα και ηλεκτρονικό χρονόμετρο. Εντός του οργάνου, υπάρχει ο χώρος αποθήκευσης και τα συστήματα μεταφοράς των αντιδραστηρίων λύσης των ερυθροκυττάρων, συμπιεστής αέρα (air compressor) και δοχείο αποβλήτων (waste). Ο μέσος χρόνος επεξεργασίας του κάθε δείγματος ανέρχεται στα 40±4s. Το ImmunoPrepTM αυτοματοποιεί πλήρως τη διαδικασία λύσης των ερυθροκυττάρων, εξοικονομώντας χρόνο και αντιδραστήρια χωρίς απώλειες λευκοκυττάρων από το δείγμα.

Η λύση των ερυθροκυττάρων και η μονιμοποίηση των λευκοκυττάρων επιτυγχάνεται μέσω τριών αντιδραστηρίων. Το Reagent A του ImmunoPrepTM περιέχει μυρμηκικό οξύ (HCOOH) 1,2 mg/L και σταθεροποιητή, Λύει μαζικά τα ερυθροκύτταρα, χωρίς να επηρεάζονται τα λευκοκύτταρα (WBC). Το Reagent B σταματά την λύση των ερυθροκυττάρων. Περιέχει σταθεροποιητή των WBC και Na₂CO₃ 6,0 mg/L, NaClO₂ 14,5 mg/L και Na₂SO₄ 31,3 mg/L. Το Reagent C περιέχει παραφορμαλδεϋδη (PFA) 10,0 mg/L, δρα ως σταθεροποιητής της μεμβράνης των λευκοκυττάρων και μονιμοποιεί τα κύτταρα. [64]

ΚΕΦ. 6 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

6.1 ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΟΥ PD-L1 (CD274)

Η πειραματική διαδικασία ξεκινά με την προσθήκη των μονοκλωνικών αντισωμάτων στο δείγμα (PB ή BM). Ακολουθεί επώαση και αυτοματοποιημένη λύση των ερυθροκυττάρων. Η λύση των ερυθροκυττάρων είναι απαραίτητη για να καταστραφούν μη λευκοκυτταρικοί επίτοποι που μπορούν να δώσουν ψευδώς θετικό σήμα. Το δείγμα μετά τη λύση διατηρεί τον αρχικό αριθμό λευκών αιμοσφαιρίων μαζί με μικρό αριθμό αιμοπεταλίων, εμπύρηνων ερυθροκυττάρων και νεκρών κυττάρων (cell debris).

Τέλος, το κυτταρικό εναιώρημα εισάγεται στον κυτταρομετρητή, οριοθετείται ο πληθυσμός των παθολογικών κυττάρων με βάση τον ανοσοφαινότυπο του ασθενούς και υπολογίζεται το επί τοις εκατό ποσοστό των PD-L1(+) κυττάρων. Παράλληλα, οριοθετείται ο πληθυσμός των φυσιολογικών λεμφοκυττάρων, εκτιμάται σε αυτόν η επί τοις εκατό έκφραση του PD-L1 και συγκρίνεται με αυτή των καρκινικών κυττάρων.

6.1.2. Πορεία εργασίας

Σε πλαστικό σωληνάριο κυτταρομετρίας ροής προστίθεται ο συνδυασμός των μονοκλωνικών αντισωμάτων, καθένα από τα οποία συνδέεται με ξεχωριστή φθορίζουσα χρωστική. Ο όγκος που προστίθεται από κάθε μονοκλωνικό αντίσωμα είναι συνήθως 5 ή 10μL, ανάλογα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Για το anti-PD-L1 mAb η κατασκευάστρια εταιρεία προτείνει τιτλοδότηση (titration) για τη βελτιστοποίηση των αποτελεσμάτων. Μετά από τιτλοδότηση για όγκους 1, 2 και 5 μL αποφασίστηκε να προστίθενται 2 μL αντισώματος σε κάθε δείγμα. Ακολούθως, προστίθενται με πιπέτα ακριβείας 50μL περιφερικού αίματος (PB) ή μυελού των οστών (BM). Στην περίπτωση του BM, προηγείται ήπια ανάδευση του δείγματος με πλαστική σύριγγα και ακολούθως λαμβάνεται ο απαιτούμενος όγκος δείγματος με αυτόματη πιπέτα. Μετά από καλή ανάδευση στο vortex, το δείγμα επωάζεται σε θερμοκρασία δωματίου (20-25°C) για 10min. Η λύση των ερυθροκυττάρων γίνεται με κατάλληλο διάλυμα του εμπορίου (ImmunoPREP™) στο αυτοματοποιημένο σύστημα Coulter TQPrep της Beckman Coulter.

Ο συνδυασμός των δεικτών στο panel του πενταπλού φθορισμού εξαρτάται από το είδος και τον ανοσοφαινότυπο του νοσήματος. Ανάλογα με την κατηγορία του νοσήματος χρησιμοποιήθηκαν οι κάτωθι συνδυασμοί:

- ❖ Για τη Χρόνια Λεμφοκυτταρική Λευχαιμία (CLL), και τα Non Hodgkin λεμφώματα (NHL) ο συνδυασμός CD23-FITC/ CD274-PE/ CD19-ECD/ CD22-PC5/ CD5-PC7
- ❖ Για το Πολλαπλό Μυέλωμα (MM) ο συνδυασμός CD138-FITC/ CD274-PE/ CD45-ECD/ CD38-PC5/ CD56-PC7
- ❖ Για τα Μυελοδυσπλαστικά Σύνδρομα (MDS) και την Οξεία Μυελογενή Λευχαιμία (AML) ο συνδυασμός CD34-FITC/ CD274-PE/ CD45-ECD/ CD33-PC5/ CD117- PC7 για τα άωρα κύτταρα της μυελικής σειράς και (όταν απαιτείται) ο συνδυασμός CD64-FITC/ CD274-PE/ CD13-ECD/ CD14-PC5/ CD45- PC7 για τα μονοκύτταρα
- ❖ Για την Β Οξεία Λεμφοβλαστική Λευχαιμία (B-ALL) ο συνδυασμός CD19-FITC/ CD274-PE/ CD34-ECD/ CD10-PC5/ CD45-PC7

Εκτός των ανωτέρω συνδυασμών, χρησιμοποιήθηκαν και οι παρακάτω συνδυασμοί για τις ακόλουθες ειδικές περιπτώσεις:

- ❖ CD103-FITC/ CD274-PE/ CD20-ECD/ CD25-PC5/ CD19-PC7 για περιστατικά λευχαιμίας από τριχωτά κύτταρα (HCL)
- ❖ CD2-FITC/CD274-PE/CD45-ECD/CD33-PC5 για ένα περιστατικό δενδριτικής λευχαιμίας
- ❖ (HLA-DR)-FITC/CD274-PE/CD34-ECD/CD33-PC5/CD45-PC7 για μία αδιαφοροποίητη HLA-DR (+) λευχαιμία

6.2. ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΟΥ PD-1 (CD279)

Κατά τον προσδιορισμό της έκφρασης του PD-1 χρησιμοποιήθηκε για την πλειοψηφία των δειγμάτων in house μέθοδος επταπλού φθορισμού, βασισμένη σε πρωτόκολλα δύο συνδυασμών Duraclone της εταιρείας Beckman Coulter.

Το πρώτο kit είναι το Dura clone IM T-cell subsets. Χρησιμοποιείται για τη μελέτη των υποπληθυσμών των ανθρώπινων T λεμφοκυττάρων στο PB με FC [Πίνακας 6.1]. Περιλαμβάνει panel δεκαπλού φθορισμού για την ανίχνευση επιφανειακών δεικτών διάφορων υποπληθυσμών T λεμφοκυττάρων. Επιπλέον, περιέχει και τρία compensation kits των δέκα σωληναρίων, για τη διόρθωση της φασματικής επικάλυψης κάθε ουσίας.

Πίνακας 6.1. Τα mAbs και οι φθορίζουσες ουσίες του Duraclone IM T-cell subsets kit. Το anti-PD-1 mAb συνδέεται με PC5.5. [65]

	Specifications of Constituent 1	Specifications of Constituent 2	Specifications of Constituent 3	Specifications of Constituent 4	Specifications of Constituent 5	Specifications of Constituent 6	Specifications of Constituent 7	Specifications of Constituent 8	Specifications of Constituent 9	Specification of Constituent 10
Specificity	CD45RA	CD197 (CCR7)	CD28	CD279 (PD1)	CD27	CD4	CD8	CD3	CD57	CD45
Clone	2H4	G043H7	CD28.2	PD1.3.5	1A4.CD27	13B8.2	B9.11	UCHT-1	NC1	J33
Immunogen	T lymphocyte line from Aotus trivirgatus	CCR7-transfected cells	Transfected murine cell line	PD1-FcIg	PHA-stimulated human T cells	Human thymocytes	Cytotoxic human T clone HLA A2	T cell line + IL2	Cells from quail ciliary ganglia	Laz 221 cell line
Isotype	IgG1	IgG2a	IgG1	IgG2b	IgG1	IgG1	IgG1	IgG1	IgM	IgG1
Species	Mouse	Mouse	Mouse	Mouse	Mouse	Mouse	Mouse	Mouse	Mouse	Mouse
Source	Conditioned Media	Ascites fluid								
Purification	Affinity chromatography									
Fluorochrome	Fluorescein isothiocyanate (FITC)	R Phycoerythrin (PE)	R Phycoerythrin-Texas Red-X(ECD)	R Phycoerythrin-Cyanine 5.5 (PC5.5)	R Phycoerythrin-Cyanine 7 (PC7)	Allophycocyanin(APC)	Alexa Fluor 700 (A700)	Allophycocyanin Alexa Fluor 750 (APC-A750)	Pacific Blue	Krome Orange
λ Excitation	488 nm	488 nm	488 nm	488 nm	488 nm	633 nm	633nm	633 nm	405 nm	405 nm
Emission peak	523 nm	575 nm	613 nm	692 nm	760 nm	650 nm	720nm	767 nm	455 nm	528 nm

Κατά την προετοιμασία του δειγμάτων, προστίθενται 100μL PB στο σωληνάριο Duraclone που περιέχει τα αντιδραστήρια σε αποξηραμένη μορφή. Μετά από καλό vortex (6-8s) το δείγμα επωάζεται για 15min (20-30°C) στο σκοτάδι. Στη συνέχεια, προστίθενται 2mL λυτικού μέσου (Versalyse), γίνεται vortex (1-3s) και επώαση για 15min (20-30°C) στο σκοτάδι.

Ακολουθεί φυγοκέντρηση (200g, 5min), απορρίπτεται το υπερκείμενο και το ίζημα αποκολλάται με vortex. Το ίζημα επαναιωρείται σε 3 mL 1X PBS και φυγοκεντρείται (200g, 5min). Το υπερκείμενο απορρίπτεται και το κυτταρικό ίζημα επαναιωρείται σε 500μL διαλύματος μονιμοποίησης (PFA). Το δείγμα είναι έτοιμο για μέτρηση.

Το δεύτερο kit είναι εμπορικά γνωστό ως DuraClone IM Phenotyping Basic tube [Πίνακας 6.2.]. Περιλαμβάνει δείκτες για τη μελέτη των υποπληθυσμών (B, CD4, CD8, NK) των λεμφοκυττάρων σε πάνελ οκταπλού φθορισμού. Περιλαμβάνει επίσης και compensation kit.

Πίνακας 6.2. Τα mAbs και οι φθορίζουσες ουσίες του DuraClone IM Phenotyping Basic tube. Το anti-PD-1 mAb είναι συνδεδεμένο με Pacific Blue και προστίθεται επιπλέον. [66]

	Specifications of Constituent 1	Specifications of Constituent 2	Specifications of Constituent 3	Specifications of Constituent 4	Specifications of Constituent 5	Specifications of Constituent 6	Specifications of Constituent 7	Specifications of Constituent 8
Specificity	CD16	CD56	CD19	CD14	CD4	CD8	CD3	CD45
Clone	3G8	N901	J3_119	RMO52	13B8.2	B9.11	UCHT-1	J33
Immunogen	Human neutrophils	Human chronic myeloid leukemia cells	SK LY18 Lymphoma Hybridoma	Human monocytes	Human thymocytes	Cytotoxic human T clone HLA A2	T cell line + IL2	Laz 221 cell line
Isotype	IgG1	IgG1	IgG1	IgG2a	IgG1	IgG1	IgG1	IgG1
Species	Mouse	Mouse	Mouse	Mouse	Mouse	Mouse	Mouse	Mouse
Source	Ascites fluid or supernatant of in vitro cultured hybridoma cells							
Purification	Affinity chromatography							
Fluorochrome	Fluorescein isothiocyanate (FITC)	R Phycoerythrin (PE)	R Phycoerythrin-Texas Red-X(ECD)	R Phycoerythrin-Cyanine 7 (PC7)	Allophycocyanin(A PC)	Alexa Fluor 700 (A700)	Allophycocyanin Alexa Fluor 750 (APC-A750)	Krome Orange
λ Excitation	488 nm	488 nm	488 nm	488 nm	633 nm	633nm	633 nm	405 nm
Emission peak	525 nm	575 nm	613 nm	720nm	660 nm	720nm	783 nm	528 nm

Πριν την πειραματική διαδικασία, προστίθενται με πιπέτα ακριβείας 2μL anti PD-1/Pacific Blue στο σωληνάριο που περιέχει τα αποξηραμένα αντιδραστήρια. Αμέσως μετά, γίνεται προσθήκη 100μL περιφερικού αίματος, καλό vortex (6-8s) και επώαση για 15min (20-30°C) στο σκοτάδι. Μετά την επώαση, γίνεται προσθήκη του λυτικού Versalyse, vortex (1-3s) και επώαση για 15min (20-30°C) στο σκοτάδι. Το κυτταρικό εναιώρημα φυγοκεντρείται (200g, 5min), το υπερκείμενο απορρίπτεται και το ίζημα επαναιωρείται σε 3mL 1X PBS και φυγοκεντρείται (200g, 5min). Μετά τη φυγοκέντρηση, αφού απορριφθεί το υπερκείμενο, τα

κύτταρα μονιμοποιούνται με διάλυμα PBS-PFA και το δείγμα είναι έτοιμο για μέτρηση. Με βάση το τελευταίο πρωτόκολλο, καταρτίστηκε συνδυασμός επταπλού φθορισμού για τον προσδιορισμό της έκφρασης του PD-1 [Πίνακας 6.3.].

Πίνακας 6.3. Το panel επταπλού φθορισμού για το PD-1 (CD279). Κατά τη διάρκεια της εργασίας πραγματοποιήθηκε αντικατάσταση του anti-CD8-PC7 mAb με το anti-CD8-APC και του anti-CD4-APC με το anti-CD4-PC7 mAb.

mAb	CD3	CD56	CD19	CD8	CD4	CD45	CD279
φθορίζουσα ουσία	FITC	PE	ECD	PC7	APC	KRO	PAC.BLUE
Όγκος (μL)	2	2	2	2	10	5	2

Κατά την πειραματική διαδικασία, αρχικά προστίθεται ο συνδυασμός του πίνακα 6.1 σε σωληνάριο κυτταρομετρίας ροής. Στη συνέχεια, προστίθενται 100μL PB ή BM. Μετά από επώαση 10min σε θερμοκρασία δωματίου, τα ερυθρά αιμοσφαίρια λύνονται στο σύστημα λύσης ερυθροκυττάρων Coulter Multi QPrep. Τέλος, το δείγμα μετράται στον κυτταρομετρητή NAVIOS.

6.3. ΕΣΩΤΕΡΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ

Για τον έλεγχο της αξιοπιστίας των μεθόδων που εφαρμόζονται σε ένα εργαστήριο κυτταρομετρίας ροής, απαιτείται η συχνή μέτρηση δειγμάτων ελέγχου (controls). Πρόκειται για μονιμοποιημένα παρασκευάσματα περιφερικού αίματος, των οποίων τόσο το ποσοστό όσο και ο απόλυτος αριθμός των κυττάρων που εκφράζουν ένα επιφανειακό δείκτη είναι γνωστός.

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε το IMMUNO-TROL™ Cells της Beckman Coulter. Το παραπάνω αντιδραστήριο έχει σχεδιασθεί για την μέτρηση (ποσοστό και απόλυτος αριθμός) δεικτών της λεμφικής, της μυελικής και της μονοκυτταρικής σειράς. Τα σκεδαστικά χαρακτηριστικά, η κατανομή του κυτταρικού πληθυσμού, η ένταση του φθορισμού και η αντιγονική πυκνότητα ανά κύτταρο προσομοιάζουν εκείνη του ολικού αίματος. [67]

6.3.1. Μέτρηση υποπληθυσμών λεμφοκυττάρων με τετραπλό φθορισμό

Το panel εργασίας (tetrapanel) περιλαμβάνει δύο συνδυασμούς σύμφωνα με όσα αναγράφονται στον Πίνακα 6.2.

Πίνακας 6.2 Οι συνδυασμοί *mAbs* για το *tetrapanel*.

Σωληνάριο	Φθορίζουσα ουσία	FITC	PE	ECD	PC5
1	Αντιγόνο	CD45	CD4	CD8	CD3
	Όγκος (μL)	10	10	10	10
2	Αντιγόνο	CD45	CD16, CD56	CD19	CD3
	Όγκος (μL)	10	5	10	10

Αρχικά, προσθέτουμε σε κάθε σωληνάριο τα *mAbs* και στη συνέχεια 100μL παρασκευάσματος Immunotrol™. Μετά από καλό vortex, το δείγμα επωάζεται για 10min σε θερμοκρασία δωματίου. Αμέσως μετά, γίνεται λύση των ερυθροκυττάρων στο T-Qprep. Πριν από τη μέτρηση, προστίθενται 100μL σφαιριδίων για την μέτρηση του απόλυτου αριθμού των κυττάρων.

Με την ίδια διαδικασία παρασκευάζονται και τα σωληνάρια για τον έλεγχο δεικτών της μυελικής σειράς με πενταπλό φθορισμό [Πίνακας 6.3.].

Πίνακας 6.3 Οι συνδυασμοί *mAbs* για τη μελέτη δεικτών της μυελικής σειράς.

Σωληνάριο	Φθορίζουσα ουσία	FITC	PE	ECD	PC5	PC7
1	Αντιγόνο	CD7	-	CD13	CD14	CD45
	Όγκος (μL)	10	-	10	10	10
2	Αντιγόνο	CD22	HLA-DR	CD5	CD33	CD45
	Όγκος (μL)	10	10	10	10	10

6.3.2. Μέτρηση υποπληθυσμών λεμφοκυττάρων με εξαπλό φθορισμό

Η μέτρηση πραγματοποιείται στον κυτταρομετρητή BD FACS Canto σε ειδικά σχεδιασμένα σωληνάρια (BD Trucount™ tubes). Τα σωληνάρια περιέχουν ξηρό ίζημα που περιέχει γνωστό αριθμό σφαιριδίων σημασμένων με φθορισμό. Κατά την πειραματική διαδικασία προστίθενται 20μL αντιδραστηρίου (μίγμα έξι διαφορετικά σημασμένων mAbs), γίνεται vortex και το δείγμα επωάζεται για 15min (θερμοκρασία δωματίου) στο σκοτάδι. Για τη λύση των ερυθροκυττάρων, γίνεται προσθήκη 450μL FACS lysing (αραίωση 1:10 με dH₂O). Το δείγμα αναδεύεται και επωάζεται για 15min (θερμοκρασία δωματίου) στο σκοτάδι.

Κατά τη μέτρηση στον κυτταρομετρητή, για τον προσδιορισμό του απόλυτου αριθμού των κυττάρων συγκρίνεται ο αριθμός των πληροφοριών/συμβάντων (events) μεταξύ κυττάρων και σφαιριδίων. Αν και συνήθως η τελική τιμή προκύπτει μέσω ειδικού λογισμικού, ο υπολογισμός αυτής προκύπτει από το γινόμενο του λόγου των events των κυττάρων προς εκείνο των σφαιριδίων με την συγκέντρωση των σφαιριδίων. [68]

6.3.3. Έλεγχος κλωνικότητας B λεμφοκυττάρων

Η εκτίμηση της κλωνικότητας των B λεμφοκυττάρων βασίζεται στη σχέση μεταξύ των κ-λ ελαφριών αλυσίδων των ανοσοσφαιρινών. Υπό φυσιολογικές συνθήκες, στον άνθρωπο η αναλογία κ/λ είναι περίπου 2:1. Παθολογικές τιμές του λόγου κ/λ παρατηρούνται πρακτικά μόνο σε πλασματοκυτταρικές δυσκρασίες και λεμφοϋπερπλαστικά σύνδρομα. [69]

Κατά την πειραματική διαδικασία, σε ένα σωληνάριο κυτταρομετρίας ροής προστίθενται 100μL περιφερικού αίματος (Immunotrol™) και 3mL PBS. Το δείγμα φυγοκεντρείται (400g, 5min) και η έκπλυση με PBS επαναλαμβάνεται. Στη συνέχεια, απορρίπτεται το υπερκείμενο και προστίθενται 2mL NH₄Cl (αραίωση 1:10). Γίνεται ισχυρό vortex για να επιτευχθεί η (χειροκίνητη) λύση των ερυθρών και το δείγμα επωάζεται για 10min. Έπειτα, προστίθεται 1mL PBS και γίνεται φυγοκέντρωση (300g, 5min). Αφού απορριφθεί το υπερκείμενο, η έκπλυση επαναλαμβάνεται με 3mL PBS. Και πάλι, απορρίπτεται το υπερκείμενο και στο κυτταρικό ίζημα προστίθενται 10μL αντιδραστηρίου mAbs με το συνδυασμό K-FITC/ L-PE/ CD19-ECD. Τα κύτταρα επωάζονται με τα mAbs για 15min στους 4°C. Ακολούθως, γίνεται φυγοκέντρωση με 3mL PBS, απορρίπτεται το υπερκείμενο και προστίθενται 500μL παραφορμαλδεΐδης (PFA).

6.4. ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Μετά την ανάλυση των αποτελεσμάτων στον κυτταρομετρητή ροής, τα αποτελέσματα υφίστανται περαιτέρω επεξεργασία με το λογισμικό Kaluza™ της εταιρείας Beckman Coulter. Σε περιστατικά οξείας λευχαιμίας, MDS ή MM οριοθετείται ο πληθυσμός των άωρων κυττάρων (CD45 ασθενές, SS low/intermediate) από το διάγραμμα $CD45 = f(SS)$. Στη συνέχεια, οριοθετείται ο πληθυσμός των νεοπλασματικών κυττάρων με βάση τον ανοσοφαινότυπο του ασθενούς. Στα MDS και την AML αναζητείται ο πληθυσμός των άωρων κυττάρων της μυελικής σειράς με βάση τους κατάλληλους δείκτες (CD34, HLA-DR, CD117, CD33). Στη B-ALL αναζητείται ο πληθυσμός των λεμφοβλαστών με βάση την έκφραση των CD34, CD10, CD19 και CD20. Στο Πολλαπλό Μυέλωμα (MM) απομονώνονται τα παθολογικά πλασματοκύτταρα που εκφράζουν τα CD138, CD38(ισχυρό), και CD56. Στην περίπτωση των λεμφωμάτων, επιλέγονται τα B κύτταρα από το διάγραμμα $CD19 = f(SS)$. Για τη CLL αναζητούνται τα CD19(+), CD5(+), CD23(+) μονοκλωνικά B κύτταρα. Για τα υπόλοιπα λεμφώματα ο παθολογικός πληθυσμός εντοπίζεται ανάλογα με την έκφραση των CD5, CD22 και CD23.

Κατόπιν από το διάγραμμα $CD274=f(SS)$ υπολογίζεται η έκφραση του PD-L1 (CD274) στο σύνολο των ζώντων λευκοκυττάρων (WBC) και στον πληθυσμό των νεοπλασματικών κυττάρων του εκάστοτε νοσήματος. Ακολούθως, οριοθετείται ο πληθυσμός των λεμφοκυττάρων και υπολογίζεται η έκφραση του PD-L1 σε αυτόν. Τα φυσιολογικά λεμφοκύτταρα αποτελούν είδος εσωτερικού control για τη σύγκριση των επιπέδων του PD-L1 μεταξύ νεοπλασματικών και φυσιολογικών κυττάρων που φυσιολογικά δεν υπερεκφράζουν τον υπό μελέτη δείκτη.

6.5. ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων για τους δείκτες PD-1 και PD-L1 πραγματοποιήθηκε με το στατιστικό πακέτο για τις κοινωνικές επιστήμες (Statistical Package for the Social Sciences, SPSS). Επειδή η κατανομή των αποτελεσμάτων δεν ακολουθεί την κανονική κατανομή, για τις συγκρίσεις χρησιμοποιήθηκαν μη παραμετρικές δοκιμασίες. Για τη σύγκριση μεταξύ των ομάδων (ελέγχου, ασθενών) εφαρμόστηκε το Kruskal Wallis H test για κ ($\kappa \geq 1$) ανεξάρτητα δείγματα. Για τις συγκρίσεις ομάδας ελέγχου – ασθενών και των ομάδων των ασθενών κατά ζεύγη χρησιμοποιήθηκε το Mann Whitney U test για ζεύγη παρατηρήσεων χωρίς αντιστοιχία. Για τη συσχέτιση ποσοτικών μεταβλητών ο μη παραμετρικός συντελεστής

συσχέτισης (r) του Spearman. Για τις κατά ζεύγη μετρήσεις στον κάθε ασθενή η δοκιμασία του Wilcoxon για παρατηρήσεις κατά ζεύγη (Wilcoxon Signed-Rank Test). Οι διαφορές μεταξύ των ομάδων αξιολογούνται με το κριτήριο p -value (p) με επίπεδο σημαντικότητας $\alpha = 0.05$ (5%).

Η κατανομή των PD-1/PD-L1 μεταξύ των ομάδων των ασθενών αλλά και σε σύγκριση με την ομάδα των μαρτύρων παρουσιάζεται με θηκογράμματα (box plots). Σε κάθε θηκόγραμμα, η κάτω βάση του ορθογωνίου αντιστοιχεί στο πρώτο τεταρτημόριο (Quartile 1, Q1) και η άνω στο τρίτο τεταρτημόριο (Quartile 3, Q3). Η διάμεσος (δ) ή δεύτερο τεταρτημόριο είναι η παράλληλη προς τις βάσεις ευθεία εντός του ορθογωνίου. Η θέση της διαμέσου καθορίζει αν οι πιο πολλές παρατηρήσεις ευρίσκονται κοντά στο πρώτο ή τρίτο τεταρτημόριο. Το πλαίσιο του θηκογράμματος αντιπροσωπεύει το ενδοτεταρτημοριακό εύρος (InterQuartile Range, IQR= Q3 - Q1). Οι διακεκομμένες γραμμές ή μύστακες (whiskers) εκτείνονται από το μέσο των βάσεων προς τις οριακές (adjacent) τιμές. Εάν υπάρχουν παρατηρήσεις έξω από το εύρος των οριακών τιμών, αυτές ονομάζονται εξωτερικές τιμές και συμβολίζονται με τελεία ($\bullet$). Τα αποτελέσματα από τη μη παραμετρική συσχέτιση σειράς Spearman παρουσιάζονται με στικτόγραμμα (scatter dot plot).

ΚΕΦ. 7 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Στην παρούσα μελέτη προσδιορίζονται τα επίπεδα έκφρασης του PD-1 στους υποπληθυσμούς των λεμφοκυττάρων και του PD-L1 στα παθολογικά κύτταρα της νόσου. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, ο PD-1 υπερεκφράζεται κυρίως στην επιφάνεια των ενεργοποιημένων Τ λεμφοκυττάρων και ο PD-L1 στα νεοπλασματικά κύτταρα. Για τη σύγκριση της έκφρασης του PD-1 χρησιμοποιείται ομάδα ελέγχου υγιών ως προς τα υπό μελέτη νοσήματα ατόμων. Για την περίπτωση του PD-L1 συγκρίνεται η έκφραση του δείκτη μεταξύ των νεοπλασματικών κυττάρων και των λεμφοκυττάρων των ασθενών.

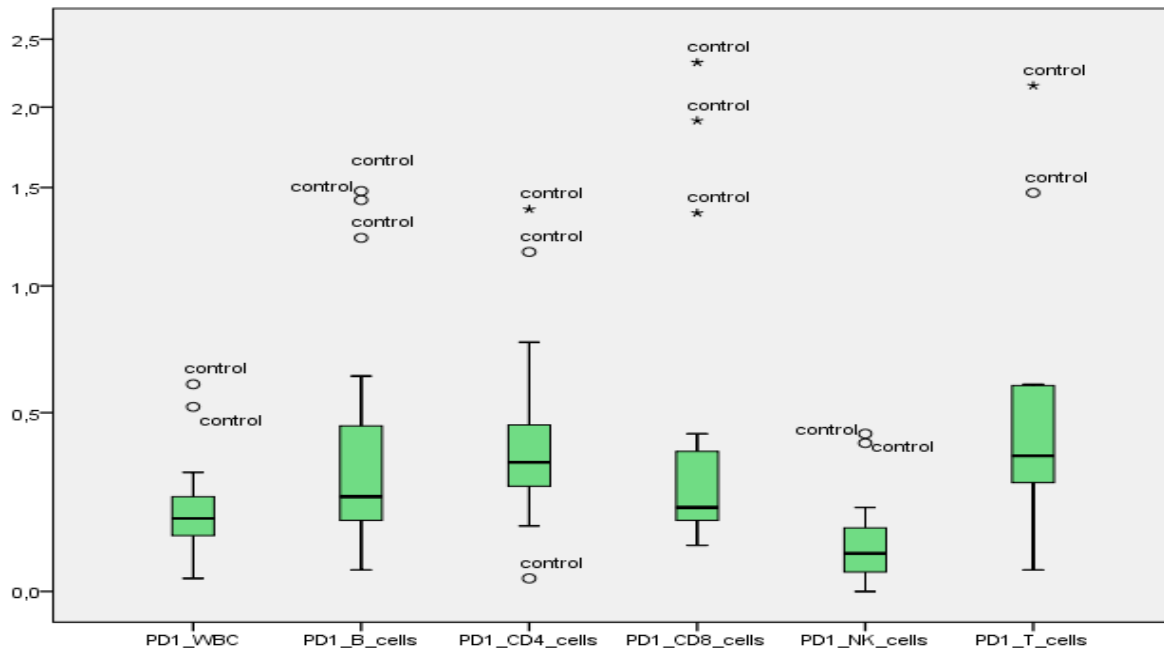
Στους παρακάτω πίνακες παρουσιάζεται η ανάλυση της έκφρασης των PD-1 και PD-L1 σε 117 δείγματα μυελού των οστών (BM) ή περιφερικού αίματος (PB) ασθενών με μία από τις ακόλουθες αιματολογικές κακοήθειες CLL-SLL, NHL, MM, MDS, AML και ALL. Επιπλέον, παρουσιάζεται η έκφραση των ανωτέρω δεικτών σε 11 δείγματα μαρτύρων. Υπολογίζεται η επί τοις εκατό μέση τιμή ($\bar{x}$) του έκφρασης των PD-1/PD-L1 επί συνόλου κυττάρων και η τυπική απόκλιση (s).

7.1 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΓΙΑ ΤΗΝ ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΟΥ PD-1 ΣΤΟΥΣ ΜΑΡΤΥΡΕΣ

Η ομάδα ελέγχου αποτελείται από 15 άτομα (6 άνδρες, 9 γυναίκες) μέσης ηλικίας 45,1 ετών. Τα θηλυκά άτομα προσήλθαν στο εργαστήριο για διερεύνηση ιστορικού Αυτόματων Αποβολών Άγνωστης Αιτιολογίας (ΑΑΑΑ). Οι υπόλοιποι ασθενείς προσήλθαν για διερεύνηση λεμφοκυττάρωσης, χωρίς να προκύψει διάγνωση αιματολογικού νοσήματος.

Πίνακας 7.1. Περιγραφική στατιστική συνεχών μεταβλητών για την έκφραση του PD-1 στους υποπληθυσμούς των λεμφοκυττάρων των μαρτύρων ($N=15$). Οι τιμές αφορούν το ποσοστό των PD-1(+) κυττάρων επί συνόλου κυττάρων κάθε υποπληθυσμού.

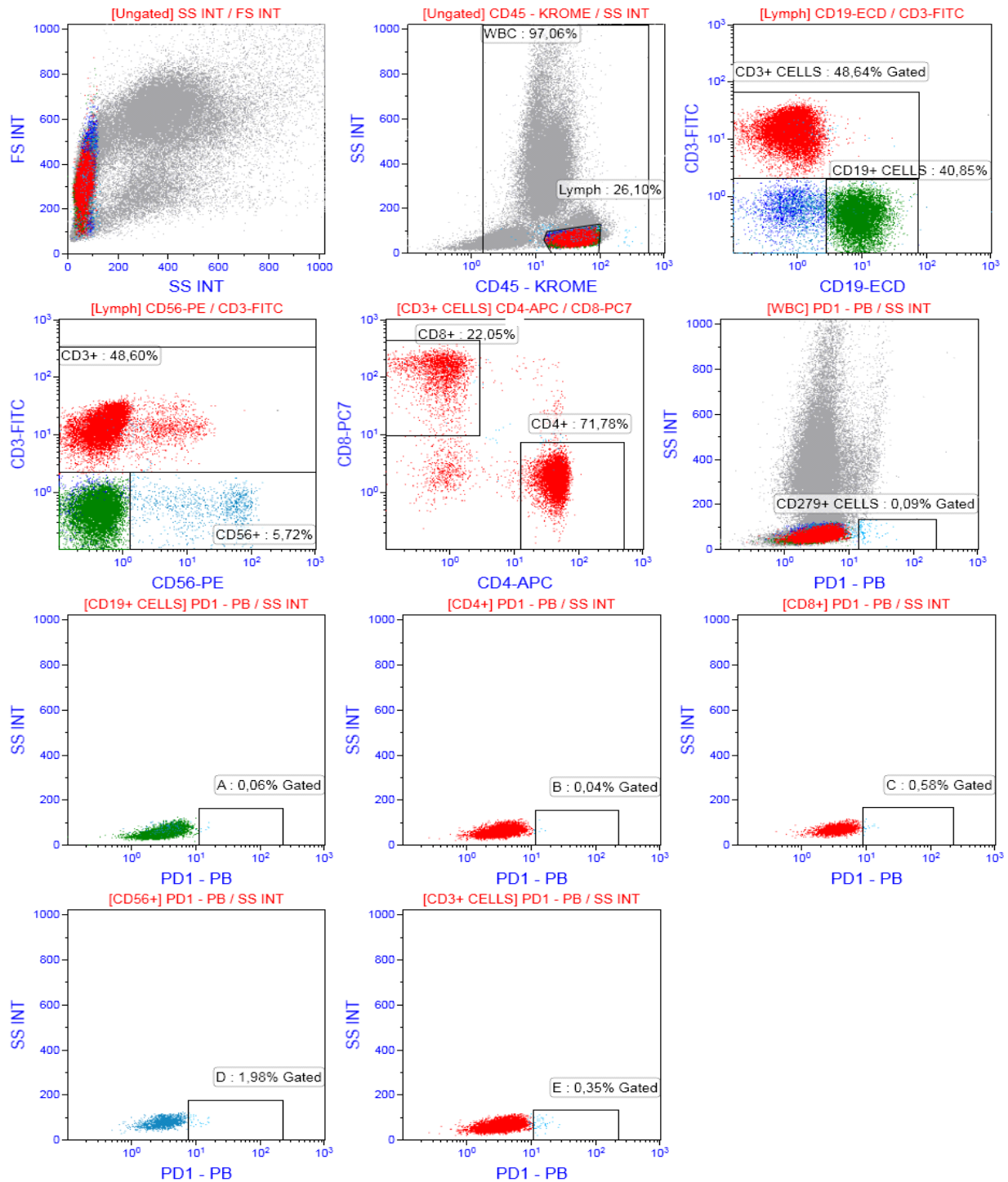
PD-1(%)	$\bar{x} \pm s$	R	Εκατοστημόριο				
			10°	25°	50° (δ)	75°	90°
WBC	0,22 $\pm$ 0,16	0,57	0,04	0,12	0,18	0,26	0,55
B	0,45 $\pm$ 0,50	1,43	0,06	0,17	0,24	0,63	1,45
CD4 T	0,46 $\pm$ 0,37	1,35	0,11	0,24	0,34	0,52	1,25
CD8 T	0,55 $\pm$ 0,71	2,21	0,13	0,16	0,21	0,43	2,07
NK	0,13 $\pm$ 0,13	0,43	0	0,04	0,09	0,16	0,41
T	0,55 $\pm$ 0,55	2,1	0,09	0,27	0,36	0,6	1,74



Σχήμα 7.1. Κατανομή της έκφρασης του PD-1 στους υποπληθυσμούς των λεμφοκυττάρων (% επί συνόλου κυττάρων κάθε υποπληθυσμού) των ατόμων της ομάδας ελέγχου (N=15, ημιλογαριθμική κλίμακα).

7.2 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΓΙΑ ΤΗΝ ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΟΥ PD-1 ΣΤΟΥΣ ΑΣΘΕΝΕΙΣ

Η έκφραση του PD-1 μελετήθηκε σε 100 ασθενείς (54 άνδρες, 45 γυναίκες) με διάμεση ηλικία 68,5 έτη. Συγκεκριμένα, από 15 ασθενείς με Χρόνια Λεμφοκυτταρική Λευχαιμία (CLL), 16 ασθενείς με Non Hodgkin Λεμφώματα (NHLs), 8 ασθενείς με Πολλαπλό Μυέλωμα (MM), 13 ασθενείς με Μυελοδυσπλαστικά Σύνδρομα (MDS), 40 ασθενείς με Οξεία Μυελογενή Λευχαιμία (AML) και 8 ασθενείς με Οξεία Λεμφοβλαστική Λευχαιμία (ALL). Η επεξεργασία των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε με το λογισμικό επεξεργασίας δεδομένων κυτταρομετρίας ροής Kaluza™ 1.5 της εταιρείας Beckman Coulter [Σχήμα 7.2.].



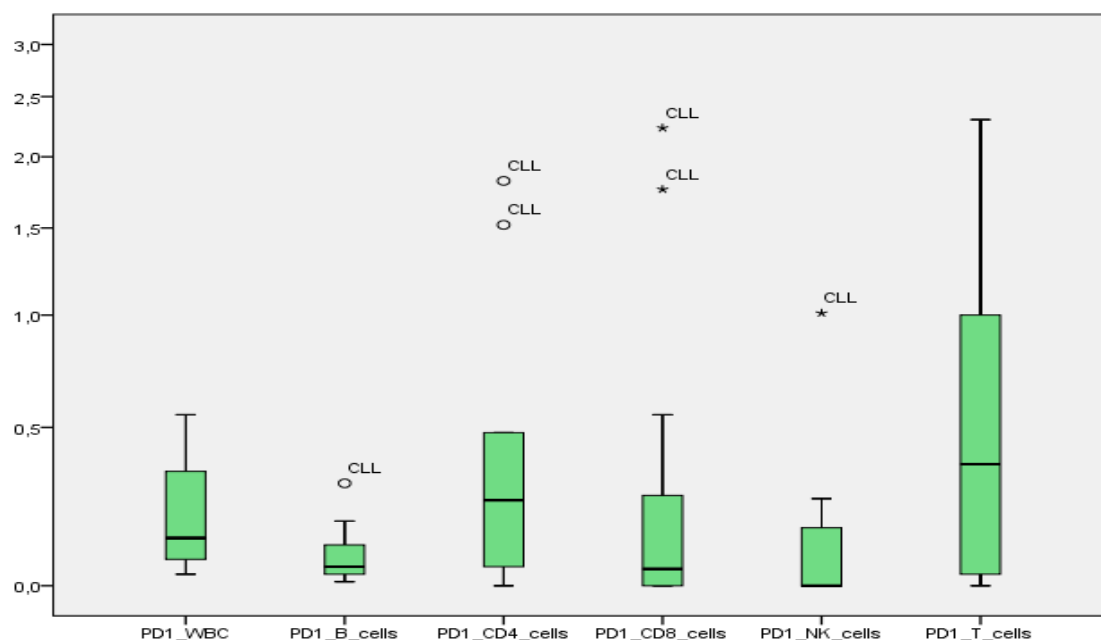
Σχήμα 7.2. Ενδεικτικό αποτέλεσμα από την επεξεργασία των αποτελεσμάτων για την έκφραση του PD-1 στους υποπληθυσμούς των λεμφοκυττάρων σε δείγμα μυελού των οστών ασθενούς με AML.

7.2.1. Αποτελέσματα για την έκφραση του PD-1 στη CLL-MBL

Η ομάδα της CLL αποτελείται από 15 άτομα (5 άνδρες, 10 γυναίκες) μέσης ηλικίας 68,6 ετών. Τα περισσότερα άτομα προσήλθαν στο εργαστήριο για διερεύνηση λεμφοκυττάρωσης. Από την ανοσοφαινοτυπική μελέτη του περιφερικού αίματος (υπήρξε και ένα δείγμα BM) με συνδυασμούς πενταπλού φθορισμού, ετέθη η διάγνωση της CLL για 12 άτομα και της MBL για 3 άτομα.

Πίνακας 7.2. Περιγραφική στατιστική συνεχών μεταβλητών για την έκφραση του PD-1 στους υποπληθυσμούς των λεμφοκυττάρων των ασθενών με CLL-MBL (N=15). Οι τιμές αφορούν το ποσοστό των PD-1(+) κυττάρων επί συνόλου κυττάρων κάθε υποπληθυσμού.

PD-1(%)	x ± s	R	Εκατοστημόριο				
			10°	25°	50° (δ)	75°	90°
WBC	0,20 ± 0,20	0,52	0,05	0,07	0,13	0,34	0,51
B	0,08 ± 0,08	0,29	0,01	0,03	0,04	0,23	0,30
CD4 T	0,60 ± 0,96	3,45	0	0,05	0,23	0,48	2,47
CD8 T	0,46 ± 0,77	2,23	0	0	0,09	0,55	1,95
NK	0,15 ± 0,27	1,01	0	0	0	0,17	0,68
T	0,72 ± 0,86	2,30	0	0,23	0,37	1,28	2,27



Σχήμα 7.3. Κατανομή της έκφρασης του PD-1 στους υποπληθυσμούς των λεμφοκυττάρων (% επί συνόλου κυττάρων κάθε υποπληθυσμού) των ασθενών με CLL (N=15, ημιλογαριθμική κλίμακα).

Από τη σύγκριση της κατανομής των αποτελεσμάτων, τα επίπεδα του PD-1 στο επί των WBC και NK κυττάρων είναι παρόμοια μεταξύ ασθενών και μαρτύρων. Εμφανή μείωση εμφανίζει η έκφραση του PD-1 κυρίως στα B κύτταρα των ασθενών, αλλά και στα CD8 T κύτταρα. Αντίθετα, η έκφραση του PD-1 στα CD4 T κύτταρα είναι αυξημένη στους ασθενείς [Πίνακας 7.2., Σχήμα 7.3.]. Από τις συγκρίσεις μεταξύ ασθενών με CLL και μαρτύρων (Mann Whitney U test), η μειωμένη έκφραση του PD-1 στα B κύτταρα των ασθενών με CLL είναι στατιστικά παρά πολύ σημαντική ($p=0,000$). Οριακά σημαντική θεωρείται η μείωση που εμφανίζεται στα επίπεδα του PD-1 στα CD8 T κύτταρα των ασθενών ($p=0,058$), συγκριτικά με τα υγιή άτομα.

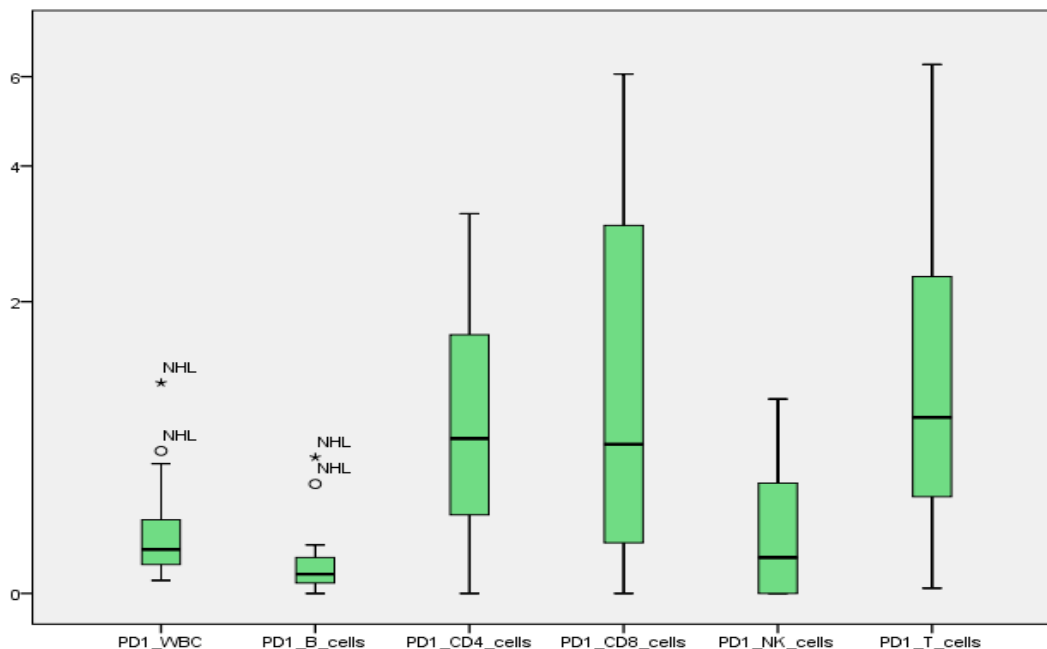
7.2.2. Αποτελέσματα για την έκφραση του PD-1 στα NHL

Η ομάδα των NHLs αποτελείται από 16 άτομα (10 άνδρες, 6 γυναίκες) μέσης ηλικίας 73,9 ετών. Οι ασθενείς προσήλθαν στο εργαστήριο για διερεύνηση κλινικής υποψίας λεμφώματος ή λεμφοκυττάρωσης με ή χωρίς κυτταροπενία. Από την ανοσοφαινοτυπική μελέτη (12 δείγματα PB, 4 δείγματα BM) με συνδυασμούς πενταπλού φθορισμού, έγινε η ανοσολογική τυποποίηση του λεμφώματος. Ο ιστολογικός τύπος του λεμφώματος προέκυψε από την παθολογοανατομική μελέτη (βιοψία λεμφαδένος ή οστεομυελική βιοψία). Με βάση τα παραπάνω ταυτοποιήθηκε η παρουσία λεμφώματος οριακής ζώνης (Marginal Zone Lymphoma, MZL) σε 5 ασθενείς και λεμφώματος κυττάρων μανδύα (Mantle Cell Lymphoma) σε 2 ασθενείς. Επιπλέον, υπήρξαν από ένα περιστατικό λευχαιμίας τριχωτών κυττάρων (Hairy Cell Leukemia, HCL) και T προλεμφοκυτταρικής λευχαιμίας.

Πίνακας 7.3. Περιγραφική στατιστική συνεχών μεταβλητών για την έκφραση του PD-1 στους υποπληθυσμούς των λεμφοκυττάρων των ασθενών με NHLs (N=16). Οι τιμές αφορούν το ποσοστό των PD-1(+) κυττάρων επί συνόλου κυττάρων κάθε υποπληθυσμού.

			Εκατοστημόριο				
PD-1(%)	$\bar{x} \pm s$	R	10°	25°	50° (δ)	75°	90°
WBC	0,25 $\pm$ 0,25	1,13	0,06	0,08	0,15	0,32	0,61
B	0,11 $\pm$ 0,15	0,67	0,01	0,03	0,07	0,12	0,28
CD4 T	0,84 $\pm$ 0,97	3,45	0,04	0,15	0,41	1,52	2,72

CD8 T	1,01 ± 1,50	6,07	0	0	0,26	1,70	3,33
NK	0,21 ± 0,30	1,08	0	0	0,05	0,34	0,60
T	1,25 ± 1,67	6,33	0,02	0,27	0,51	1,95	3,78



Σχήμα 7.4. Κατανομή της έκφρασης του *PD-1* στους υποπληθυσμούς των λεμφοκυττάρων (% επί συνόλου κυττάρων κάθε υποπληθυσμού) των ασθενών με NHLs (N=16, ημιλογαριθμική κλίμακα).

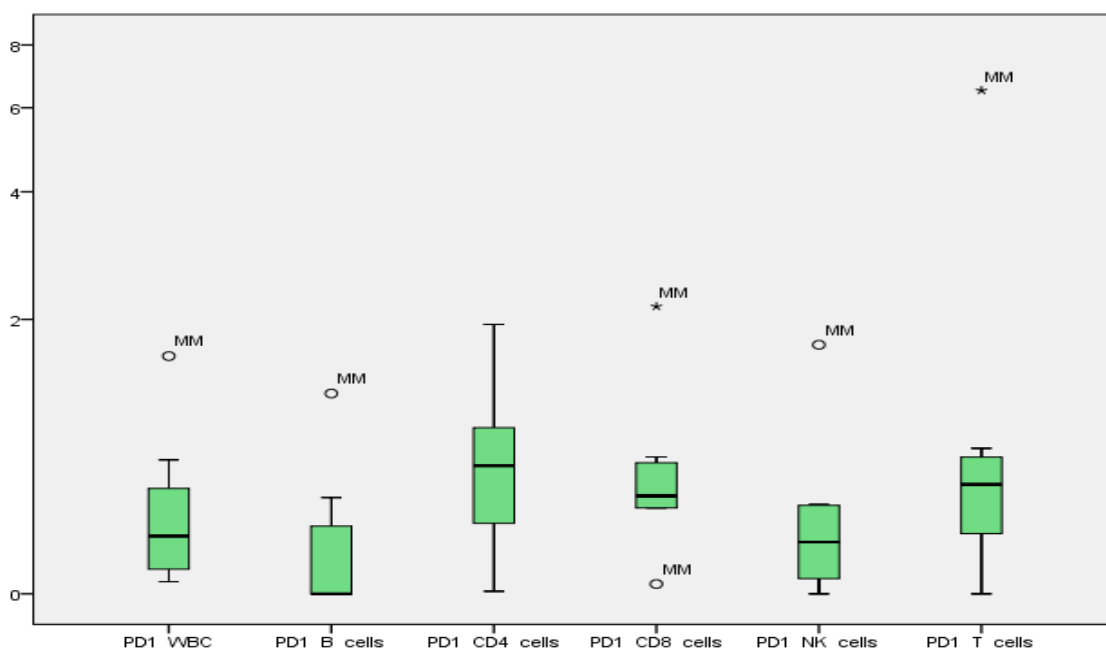
Από τη σύγκριση της κατανομής των αποτελεσμάτων, τα επίπεδα του PD-1 στο σύνολο των WBC είναι παρόμοια μεταξύ ασθενών και μαρτύρων. Επίσης, η έκφραση του PD-1 είναι αυξημένη στους υποπληθυσμούς και στο σύνολο των T κυττάρων καθώς και στα NK κύτταρα των ασθενών. Αντίθετα, η έκφραση του PD-1 στα B κύτταρα των ασθενών είναι μειωμένη σε σχέση με τους μάρτυρες [Πίνακας 7.3., Σχήμα 7.4.]. Από τις συγκρίσεις μεταξύ ασθενών με NHL και μαρτύρων (Mann Whitney U test), βρέθηκε μειωμένη έκφραση του PD-1 στα B κύτταρα των ασθενών ($p=0,05$) και αυξημένη έκφραση στα T κύτταρα ($p=0,037$). Επιπλέον, από την σύγκριση μεταξύ CLL-NHL (Mann Whitney U test) παρατηρείται στατιστικά σημαντικά αυξημένη έκφραση του PD-1 στα CD4 ($p=0,011$) και CD8 ($p=0,037$) T κύτταρα των ασθενών με NHL σε σχέση με τους ασθενείς με CLL.

7.2.3. Αποτελέσματα για την έκφραση του PD-1 στο MM

Η ομάδα του MM αποτελείται από 8 άτομα (2 άνδρες, 6 γυναίκες) μέσης ηλικίας 66,6 ετών. Οι ασθενείς προσήλθαν στο εργαστήριο για διερεύνηση κλινικής υποψίας πολλαπλού μυελώματος ή παγκυτταροπενίας. Η ανοσοφαινοτυπική μελέτη του μυελού των οστών έγινε με συνδυασμούς πενταπλού φθορισμού. Από τον προσδιορισμό του ισοτύπου του μυελώματος (ανοσοκαθήλωση ορού) προέκυψε ότι τα κακοήγη πλασματοκύτταρα εκκρίνουν μονοκλωνική IgGκ (3 ασθενείς) και IgAκ ή IgAλ (4 ασθενείς). Σημειώνεται ότι διαγνώσθηκε και ένα (σπάνιο) περιστατικό πλασματοκυτταρικής λευχαιμίας (PCL).

Πίνακας 7.4. Περιγραφική στατιστική συνεχών μεταβλητών για την έκφραση του PD-1 στους υποπληθυσμούς των λεμφοκυττάρων των ασθενών με MM (N=8). Οι τιμές αφορούν το ποσοστό των PD-1(+) κυττάρων επί συνόλου κυττάρων κάθε υποπληθυσμού.

PD-1(%)	$\bar{x} \pm s$	R	Εκατοστημόριο				
			10°	25°	50° (δ)	75°	100°
WBC	0,45 ± 0,55	1,54	0,05	0,05	0,26	0,71	1,59
B	0,26 ± 0,46	1,23	0	0	0	0,47	1,23
CD4 T	0,74 ± 0,66	1,93	0,01	0,22	0,67	1,25	1,94
CD8 T	0,70 ± 0,68	2,12	0,04	0,41	0,48	0,73	2,16
NK	0,42 ± 0,60	1,71	0	0	0,23	0,43	1,71
T	1,30 ± 2,31	6,50	0	0,08	0,55	0,79	6,50



Σχήμα 7.5. Κατανομή της έκφρασης του PD-1 στους υποπληθυσμούς των λεμφοκυττάρων (% επί συνόλου κυττάρων κάθε υποπληθυσμού) των ασθενών με MM (N=8, ημιλογαριθμική κλίμακα).

Από τις συγκρίσεις μεταξύ ασθενών με MM και μαρτύρων, η έκφραση του PD-1 φαίνεται αυξημένη στο σύνολο των WBC, στους υποπληθυσμούς και το σύνολο των T κυττάρων και στα NK κύτταρα. Από την άλλη, η έκφραση του PD-1 στα B κύτταρα των ασθενών είναι μειωμένη, συγκριτικά με τους μάρτυρες [Πίνακας 7.4., Σχήμα 7.5.]. Από τη στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων (Mann Whitney U test), δεν αναδεικνύονται στατιστικά σημαντικές διαφορές.

7.2.4. Αποτελέσματα για την έκφραση του PD-1 στα MDS

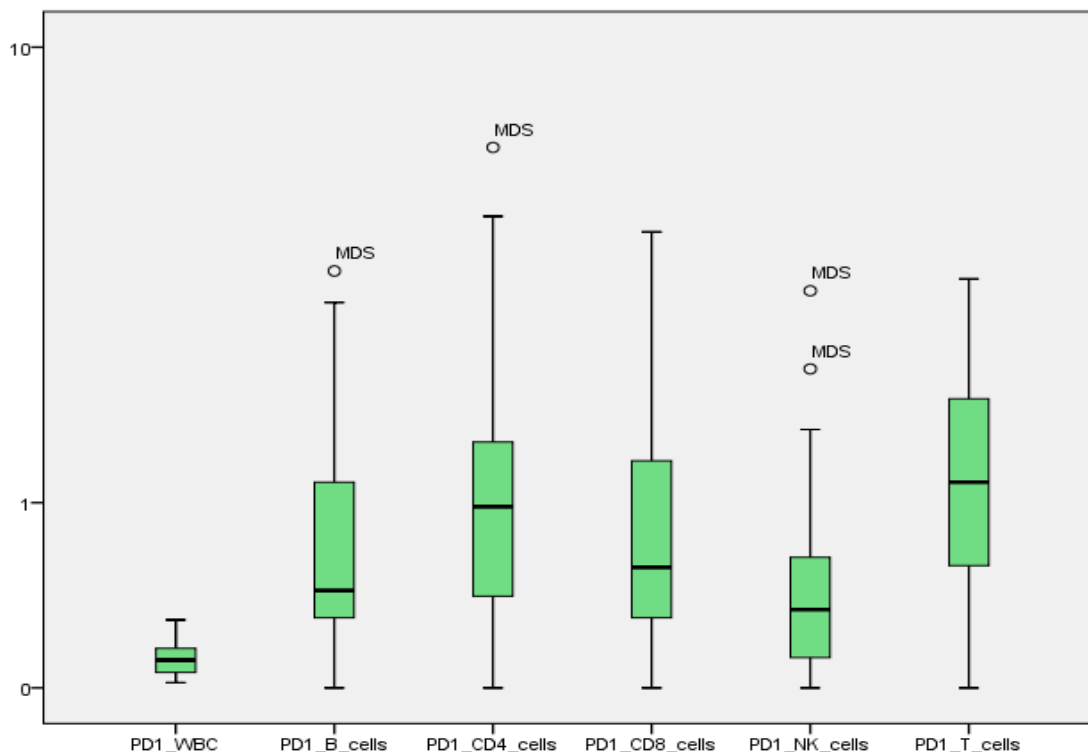
Η ομάδα των MDS αποτελείται από 13 άτομα (10 άνδρες, 3 γυναίκες) μέσης ηλικίας 70,3 ετών. Οι ασθενείς προσήλθαν στο εργαστήριο για τη διερεύνηση κλινικής υποψίας μυελοδυσπλαστικού/μυελοϋπερπλαστικού συνδρόμου ή παγκυτταροπενίας. Η ανοσοφαινοτυπική μελέτη του μυελού των οστών έγινε με συνδυασμούς πενταπλού φθορισμού.

Πίνακας 7.5. Περιγραφική στατιστική συνεχών μεταβλητών για την έκφραση του PD-1 στους υποπληθυσμούς των λεμφοκυττάρων των ασθενών με MDS (N=13). Οι τιμές αφορούν το ποσοστό των PD-1(+) κυττάρων επί συνόλου κυττάρων κάθε υποπληθυσμού.

			Εκατοστημόριο				
PD-1(%)	$\bar{x} \pm s$	R	10°	25°	50° (δ)	75°	90°
WBC	0,12 $\pm$ 0,09	0,27	0,02	0,05	0,11	0,16	0,29
B	1,09 $\pm$ 1,26	3,76	0	0,27	0,44	1,86	3,54
CD4 T	1,55 $\pm$ 1,95	6,56	0,04	0,36	0,97	1,61	5,87
CD8 T	1,07 $\pm$ 1,29	4,51	0,08	0,29	0,57	1,46	3,85
NK	0,78 $\pm$ 1,04	3,42	0,03	0,12	0,34	1,13	2,97
T	1,41 $\pm$ 1,20	3,62	0,12	0,51	1,16	2,24	3,42

Από την κατανομή των αποτελεσμάτων φαίνεται πως η έκφραση του PD-1 είναι αυξημένη στους υποπληθυσμούς των λεμφοκυττάρων των ασθενών με MDS, αλλά όχι στο σύνολο των WBC [Πίνακας 7.5., Σχήμα 7.6.]. Από τις συγκρίσεις μεταξύ ασθενών και μαρτύρων (Mann Whitney U test), βρέθηκε στατιστικά σημαντικά μειωμένη έκφραση του PD-1 στο σύνολο των WBC των ασθενών με MDS (p=0,041) και στατιστικά σημαντικά αυξημένη

έκφρασή του στα CD4 T ($p=0,041$) και NK κύτταρα ($p=0,007$). Επιπλέον, παρατηρήθηκε οριακά σημαντική αύξηση του PD-1 στα CD8 T κύτταρα ($p=0,058$) των ασθενών με MDS.



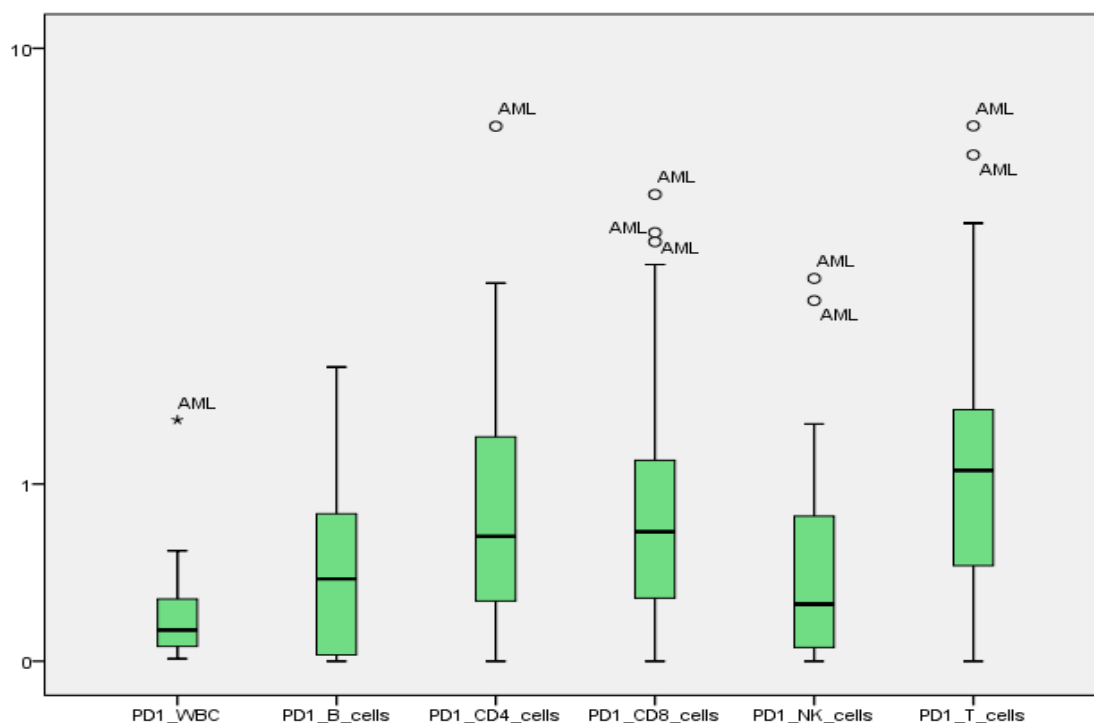
Σχήμα 7.6. Κατανομή της έκφρασης του PD-1 στους υποπληθυσμούς των λεμφοκυττάρων (% επί συνόλου κυττάρων κάθε υποπληθυσμού) των ασθενών με MDS ($N=13$, ημιλογαριθμική κλίμακα).

7.2.5. Αποτελέσματα για την έκφραση του PD-1 στην AML

Η ομάδα της AML αποτελείται από 40 άτομα (21 άνδρες, 19 γυναίκες) μέσης ηλικίας 69,6 ετών. Οι ασθενείς προσήλθαν στο εργαστήριο κυρίως για διερεύνηση παγκυτταροπενίας ή εκτροπής μυελοδυσπλαστικού συνδρόμου προς οξεία λευχαιμία. Η ανοσοφαινοτυπική μελέτη δειγμάτων περιφερικού αίματος ($N=13$) και μυελού των οστών ($N=27$) έγινε με συνδυασμούς πενταπλού φθορισμού. Μεταξύ άλλων, ταυτοποιήθηκαν 3 περιστατικά αδιαφοροποίητης (M0) AML, 3 περιστατικά μυελομονοκυτταρικής (M4) AML, 4 περιστατικά μονοκυτταρικής (M5) AML και ένα σπάνιο περιστατικό δενδριτικής λευχαιμίας.

Πίνακας 7.6. Περιγραφική στατιστική συνεχών μεταβλητών για την έκφραση του PD-1 στους υποπληθυσμούς των λεμφοκυττάρων των ασθενών με AML (N=40). Οι τιμές αφορούν το ποσοστό των PD-1(+) κυττάρων επί συνόλου κυττάρων κάθε υποπληθυσμού.

PD-1(%)	$\bar{x} \pm s$	R	Εκατοστημόριο				
			10°	25°	50° (δ)	75°	90°
WBC	0,22 ± 0,26	1,56	0,04	0,06	0,13	0,28	0,43
B	0,58 ± 0,63	2,16	0	0,13	0,38	0,78	1,71
CD4 T	1,11 ± 1,31	7,11	0,44	0,26	0,64	1,43	2,45
CD8 T	1,27 ± 1,66	7,25	0	0,28	0,68	1,69	4,12
NK	0,53 ± 0,76	3,47	0	0,04	0,24	0,79	1,24
T	1,53 ± 1,66	7,12	0	0,39	1,11	1,69	4,26



Σχήμα 7.7. Κατανομή της έκφρασης του PD-1 στους υποπληθυσμούς των λεμφοκυττάρων (% επί συνόλου κυττάρων κάθε υποπληθυσμού) των ασθενών με AML (N=40, ημιλογαριθμική κλίμακα).

Από την κατανομή των αποτελεσμάτων, η έκφραση του PD-1 δεν διαφοροποιείται μεταξύ του συνόλου των WBC ασθενών και μαρτύρων. Επίσης, αυξημένη είναι η έκφραση του δείκτη κυρίως στα T και NK κύτταρα των ασθενών και δευτερευόντως στα B κύτταρα [Πίνακας 7.6., Σχήμα 7.7.]. Από τις συγκρίσεις μεταξύ ασθενών με AML και μαρτύρων (Mann Whitney U test), βρέθηκε στατιστικά σημαντικά αυξημένη έκφραση του PD-1 στα T ($p=0,018$) και NK

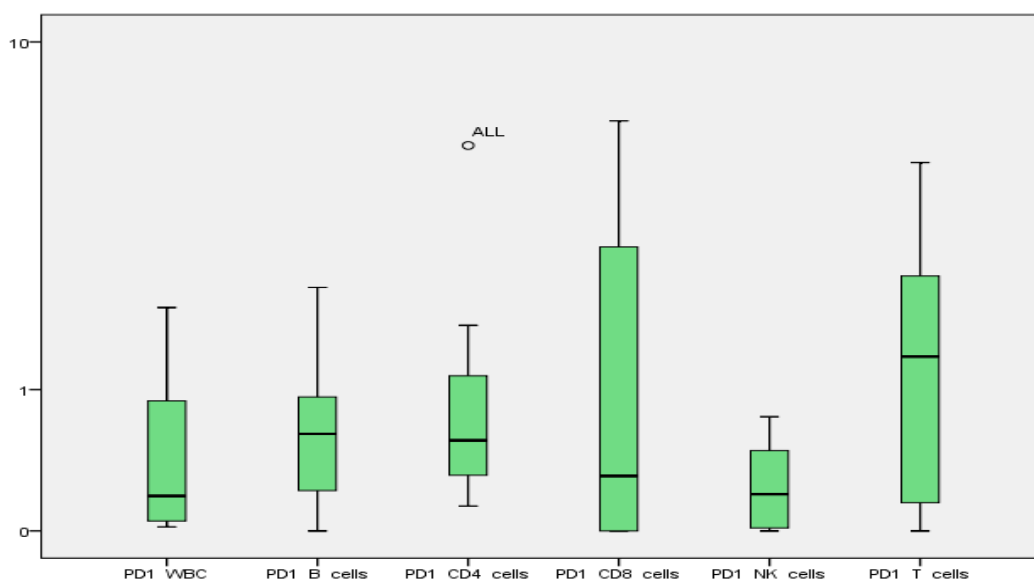
κύτταρα ($p=0,047$). Επιπλέον, παρατηρήθηκε οριακά σημαντική αύξηση του PD-1 στα CD8 T κύτταρα ($p=0,052$) των ασθενών με AML.

7.2.6. Αποτελέσματα για την έκφραση του PD-1 στην ALL

Η ομάδα της ALL αποτελείται από 8 άτομα (6 άνδρες, 2 γυναίκες) μέσης ηλικίας 49,5 ετών. Οι ασθενείς προσήλθαν στο εργαστήριο κυρίως για διερεύνηση κλινικής υποψίας οξείας λευχαιμίας (υπερλευκοκυττάρωση, βλάστες στο περιφερικό αίμα). Η ανοσοφαινοτυπική μελέτη δειγμάτων περιφερικού αίματος ($N=4$) και μυελού των οστών ($N=4$) έγινε με συνδυασμούς πενταπλού φθορισμού.

Πίνακας 7.7 Περιγραφική στατιστική συνεχών μεταβλητών για την έκφραση του PD-1 στους υποπληθυσμούς των λεμφοκυττάρων των ασθενών με ALL ($N=8$). Οι τιμές αφορούν το ποσοστό των PD-1(+) κυττάρων επί συνόλου κυττάρων κάθε υποπληθυσμού.

PD-1(%)	$\bar{x} \pm s$	R	Εκατοστημόριο				
			10 ^ο	25 ^ο	50 ^ο (δ)	75 ^ο	100 ^ο
WBC	$0,54 \pm 0,70$	1,97	0,02	0,45	0,20	0,95	1,99
B	$0,73 \pm 0,73$	2,30	0	0,16	0,62	0,97	2,30
CD4 T	$1,24 \pm 1,84$	5,49	0,13	0,29	0,56	1,47	5,62
CD8 T	$1,68 \pm 2,45$	6,47	0	0	0,31	3,74	6,47
NK	$0,27 \pm 0,29$	0,75	0	0,01	0,21	0,52	0,75
T	$1,66 \pm 1,76$	5,09	0	0,08	1,36	2,87	5,09



Σχήμα 7.8. Κατανομή της έκφρασης του PD-1 στους υποπληθυσμούς των λεμφοκυττάρων (% επί συνόλου κυττάρων κάθε υποπληθυσμού) των ασθενών με ALL (N=8, ημιλογαριθμική κλίμακα).

Η έκφραση του PD-1 είναι αυξημένη στα WBC και στους υποπληθυσμούς των λεμφοκυττάρων των ασθενών με ALL, συγκριτικά με τους μάρτυρες [Πίνακας 7.7., Σχήμα 7.8.]. Όμως, οι συγκρίσεις μεταξύ ασθενών και μαρτύρων (Mann Whitney U test), δεν αναδεικνύουν στατιστικά σημαντικές διαφορές.

7.3. ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΤΩΝ ΜΕΘΟΔΩΝ BASIC ΚΑΙ T CELLS ΓΙΑ ΤΗΝ ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΟΥ PD-1

Η μέθοδος μελέτης των υποπληθυσμών των ανθρώπινων λεμφοκυττάρων DuraClone IM Phenotyping Basic tube (Beckman Coulter) χρησιμοποιεί πρωτόκολλο οκταπλού φθορισμού που περιλαμβάνει mAbs για τα χαρακτηριστικά αντιγόνα των B (CD19), T (CD3, CD4, CD8) και NK (CD16, CD56) κυττάρων. Επιπλέον, περιέχει mAbs έναντι του CD14 των μονοκυττάρων και του κοινού λευκοκυτταρικού αντιγόνου CD45. Το Duraclone IM T-cell subsets kit (Beckman Coulter) έχει σχεδιασθεί για τη μελέτη αντιγόνων που αφορούν τα στάδια ωρίμανσης των T λεμφοκυττάρων. Πέρα από τα αντιγόνα CD3, CD4 και CD8, περιλαμβάνει δείκτες για τα παρθένα (naïve) T κύτταρα (CD197 γνωστό και ως CCR7), τα ενεργοποιημένα από αντιγόνο T κύτταρα [CD45RA(+), CD27(-), CD28(-)], τα δραστικά (effector) T κύτταρα (CD57) και τα δυσλειτουργικά T κύτταρα (CD279 ή PD-1). [65]

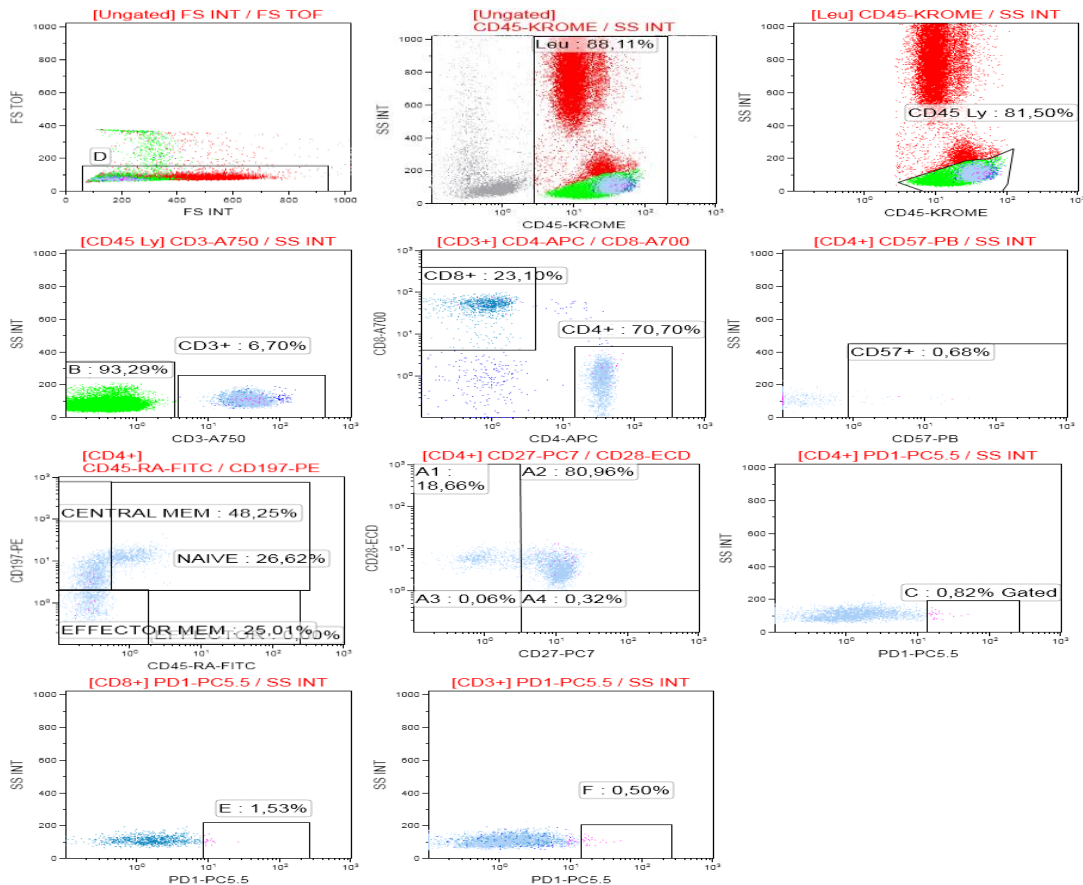
Κατά την πειραματική διαδικασία, έγινε σύγκριση μεταξύ των δύο kits για την έκφραση του PD-1 στο σύνολο των WBC και στους υποπληθυσμούς των T λεμφοκυττάρων (CD4, CD8). Έγινε επεξεργασία σε 19 δείγματα ασθενών με τα ανωτέρω kit. Η επεξεργασία των αποτελεσμάτων έγινε με το λογισμικό Kaluza™ 1.5.

Πίνακας 7.8. Περιγραφική στατιστική συνεχών μεταβλητών για την έκφραση του PD-1 στους υποπληθυσμούς των T λεμφοκυττάρων των ασθενών με βάση το DuraClone IM Phenotyping Basic tube kit (Beckman Coulter).

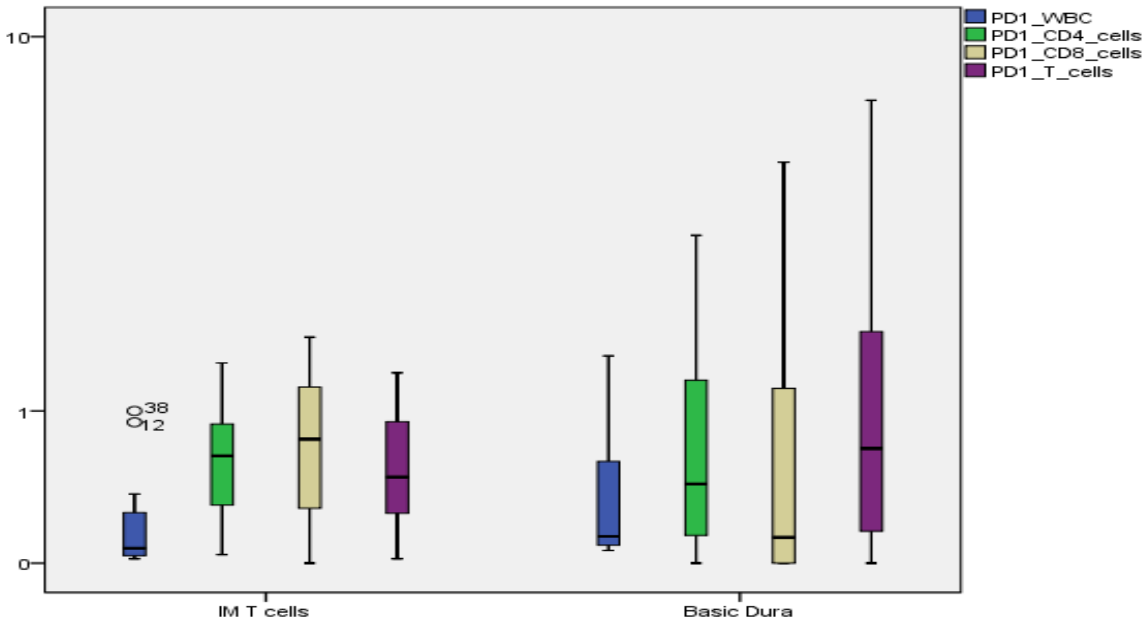
			Εκατοστημόριο				
PD-1(%)	$\bar{x} \pm s$	R	10°	25°	50° (δ)	75°	90°
WBC	$0,34 \pm 0,41$	1,53	0,06	0,08	0,13	0,59	0,95
CD4 T	$0,84 \pm 1,06$	3,45	0,04	0,10	0,41	1,31	3,23
CD8 T	$0,84 \pm 1,39$	5,21	0,00	0,00	0,15	1,26	3,19
T	$1,27 \pm 1,81$	7,23	0,00	0,10	0,70	1,89	4,09

Πίνακας 7.9. Περιγραφική στατιστική συνεχών μεταβλητών για την έκφραση του PD-1 στους υποπληθυσμούς των T λεμφοκυττάρων των ασθενών με βάση το Duraclone IM T-cell subsets kit (Beckman Coulter).

			Εκατοστημόριο				
PD-1(%)	$\bar{x} \pm s$	R	10°	25°	50° (δ)	75°	90°
WBC	$0,20 \pm 0,29$	0,98	0,02	0,03	0,07	0,31	0,90
CD4 T	$0,66 \pm 0,43$	1,45	0,06	0,24	0,63	0,90	1,35
CD8 T	$0,81 \pm 0,58$	1,80	0,09	0,24	0,76	1,26	1,71
T	$0,56 \pm 0,39$	1,36	0,05	0,24	0,48	0,91	1,03



Σχήμα 7.9. Ενδεικτικό αποτέλεσμα από την επεξεργασία των αποτελεσμάτων για την έκφραση του PD-1 στους υποπληθυσμούς των T λεμφοκυττάρων σε δείγμα περιφερικού αίματος ασθενούς με CLL (μέθοδος Duraclone IM T-cell subsets).



Σχήμα 7.10. Κατανομή της έκφρασης του PD-1 (% επί συνόλου κυττάρων) στους υποπληθυσμούς των T λεμφοκυττάρων για τα DuraClone IM Phenotyping Basic tube και Duraclone IM T-cell subsets kit (N=19).

Από την κατανομή των αποτελεσμάτων διαπιστώνεται πως η διακύμανση των μετρήσεων με το Duraclone IM T-cell subsets kit είναι περιορισμένη, συγκριτικά με το DuraClone IM Phenotyping Basic tube kit. Η έκφραση του PD-1 στους υποπληθυσμούς και το σύνολο των T κυττάρων με βάση το DuraClone IM Phenotyping Basic tube kit είναι ασθενέστερη, συγκριτικά με το άλλο kit [Πίνακες 7.8.-7.9., Σχήματα 7.9.-7.10.]. Όμως, οι συγκρίσεις μεταξύ των δύο kit για την έκφραση του PD-1 στους ασθενείς (Mann Whitney U test) δεν ανέδειξαν στατιστικά σημαντικές διαφορές. Οριακά σημαντική ($p=0,071$) θεωρείται η διαφορά μεταξύ των μεθόδων για την έκφραση του PD-1 στο σύνολο των WBC των ασθενών.

7.4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΓΙΑ ΤΗΝ ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΟΥ PD-L1 ΣΤΟΥΣ ΑΣΘΕΝΕΙΣ

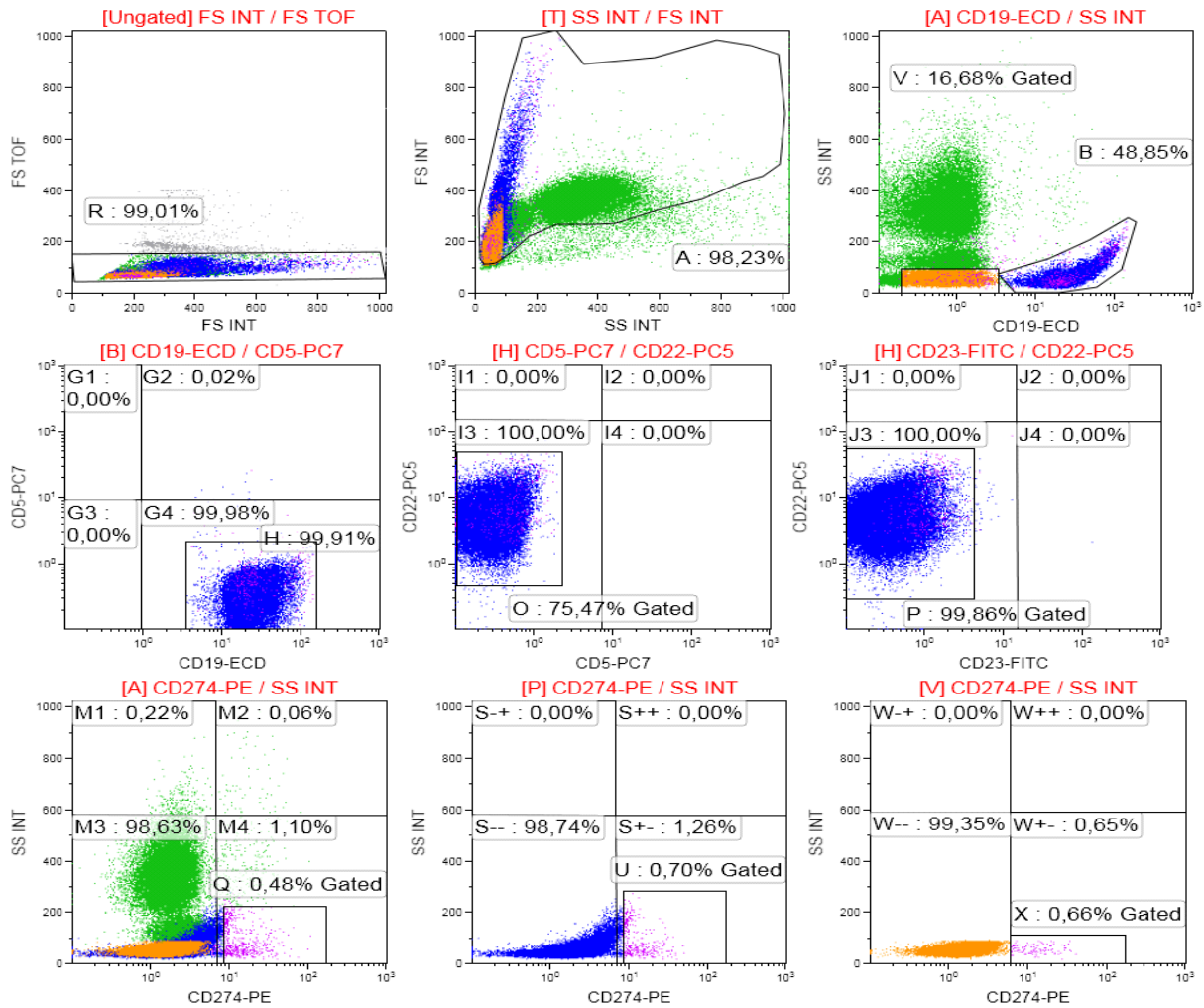
Η έκφραση του PD-L1 συνολικά σε 117 άτομα (63 άνδρες, 54 γυναίκες) με διάμεση ηλικία 68,5 έτη. Συγκεκριμένα, από 20 ασθενείς με Χρόνια Λεμφοκυτταρική Λευχαιμία (CLL), 19 ασθενείς με Non Hodgkin Λεμφώματα (NHLs), 10 ασθενείς με Πολλαπλό Μυέλωμα (MM), 18 Μυελοδυσπλαστικά Σύνδρομα (MDS), 41 ασθενείς με Οξεία Μυελογενή Λευχαιμία (AML) και 9 ασθενείς με Οξεία Λεμφοβλαστική Λευχαιμία (ALL). Η επεξεργασία των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε με το λογισμικό επεξεργασίας δεδομένων κυτταρομετρίας ροής Kaluza™ 1.5 της εταιρείας Beckman Coulter.

7.4.1. Αποτελέσματα για την έκφραση του PD-L1 στη CLL

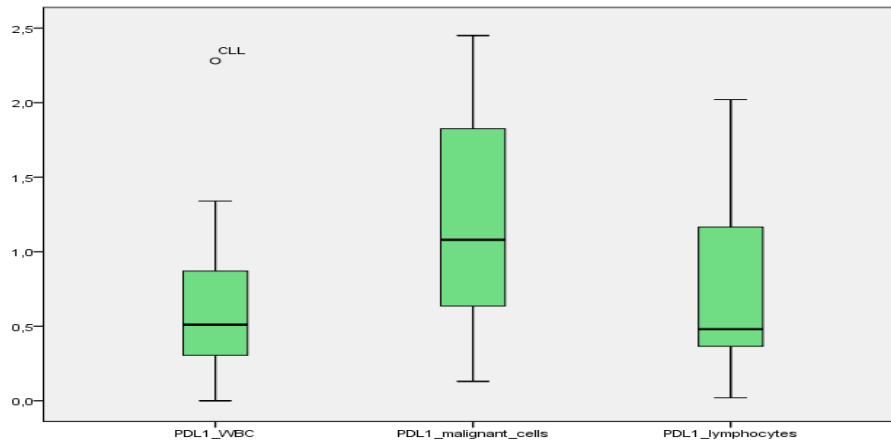
Η ομάδα της CLL αποτελείται από 20 άτομα (7 άνδρες, 13 γυναίκες) μέσης ηλικίας 69,5 ετών. Τα περισσότερα άτομα προσήλθαν στο εργαστήριο για διερεύνηση λεμφοκυττάρωσης. Από την ανοσοφαινοτυπική μελέτη του περιφερικού αίματος (παραλήφθηκε και ένα δείγμα BM) με συνδυασμούς πενταπλού φθορισμού, ετέθη η διάγνωση της CLL για 16 άτομα και της MBL για 4 άτομα.

Πίνακας 7.10. Περιγραφική στατιστική συνεχών μεταβλητών για την έκφραση του PD-L1 στο σύνολο των λευκών αιμοσφαιρίων (WBC), στα νεοπλασματικά κύτταρα και στα λεμφοκύτταρα των ασθενών με CLL (N=20). Οι τιμές αφορούν το ποσοστό των PD-L1(+) κυττάρων επί συνόλου κυττάρων κάθε υποπληθυσμού.

			Εκατοστημόριο				
PD-L1(%)	$\bar{x} \pm s$	R	10°	25°	50° (δ)	75°	90°
WBC	0,63 ± 0,52	2,28	0,05	0,38	0,51	0,88	1,31
νεοπλασματικά κύτταρα	1,18 ± 0,73	2,32	0,29	0,63	1,08	1,88	2,39
λεμφοκύτταρα	0,76 ± 0,62	2,00	0,08	0,34	0,48	1,33	1,85



Σχήμα 7.11. Ενδεικτικό αποτέλεσμα από την επεξεργασία των αποτελεσμάτων για την έκφραση του PD-L1 στο σύνολο των WBC, στα νεοπλασματικά κύτταρα και τα λεμφοκύτταρα από δείγμα περιφερικού αίματος ασθενούς με CLL.



Σχήμα 7.12. Κατανομή της έκφρασης του PD-L1 (% επί συνόλου κυττάρων κάθε υποπληθυσμού) στο σύνολο των WBC, στα νεοπλασματικά κύτταρα και τα λεμφοκύτταρα των ασθενών με CLL (N=20).

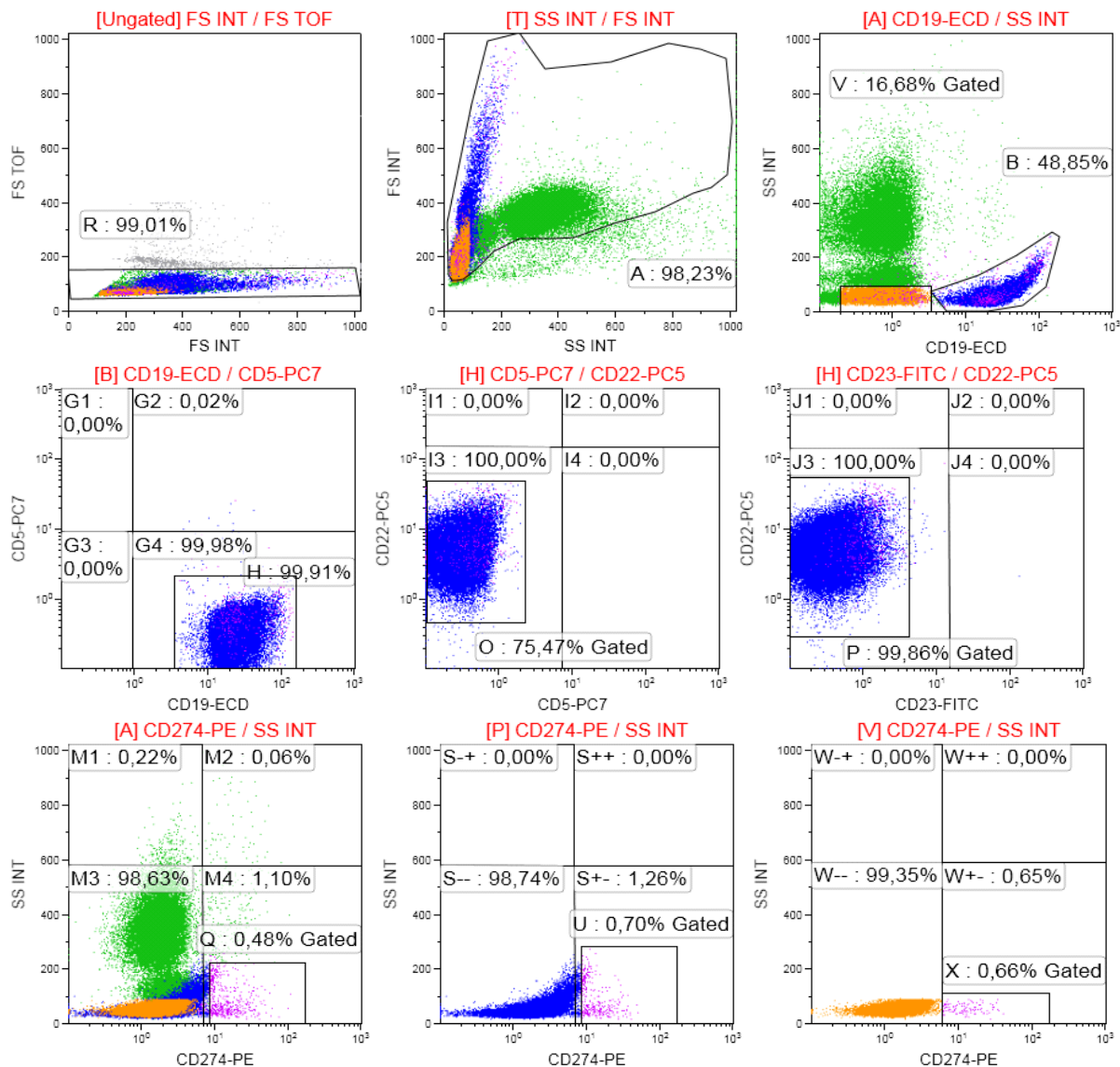
Η διάμεσος τιμή της έκφρασης του PD-L1 στα νεοπλασματικά λεμφοκύτταρα των ασθενών είναι σχεδόν υπερδιπλάσια από εκείνη των μαρτύρων. Παρατηρώντας την κατανομή των παρατηρήσεων στα εκατοστημόρια, φαίνεται ότι η έκφραση του PD-L1 είναι αυξημένη στα παθολογικά συγκριτικά με τα φυσιολογικά λεμφοκύτταρα [Πίνακας 7.10., Σχήμα 7.12.]. Πράγματι, σύμφωνα με τα αποτελέσματα του Mann Whitney U test, η διαφορά είναι στατιστικά πάρα πολύ σημαντική ($p < 0,001$).

7.4.2. Αποτελέσματα για την έκφραση του PD-L1 στα NHL

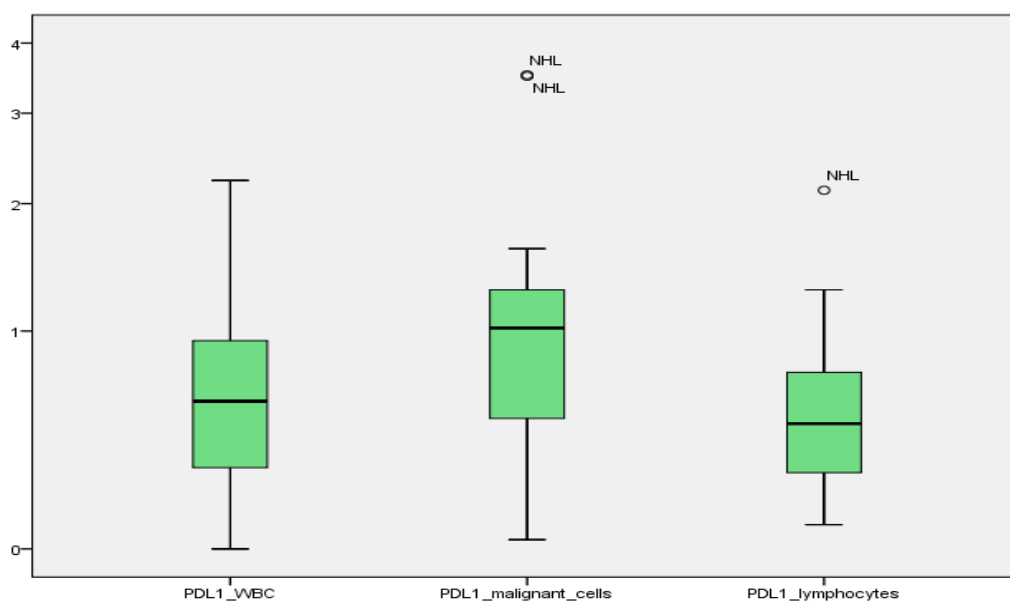
Η ομάδα των NHLs αποτελείται από 19 άτομα (11 άνδρες, 8 γυναίκες) μέσης ηλικίας 71,2 ετών. Οι ασθενείς προσήλθαν στο εργαστήριο για διερεύνηση κλινικής υποψίας λεμφώματος ή λεμφοκυττάρωσης με ή χωρίς κυτταροπενία. Η ανοσολογική τυποποίηση του λεμφώματος έγινε με ανοσοφαινοτυπική μελέτη (14 δείγματα PB, 5 δείγματα BM) αποτελούμενη από συνδυασμούς πενταπλού φθορισμού. Ο ιστολογικός τύπος του λεμφώματος προέκυψε από την παθολογοανατομική μελέτη (βιοψία λεμφαδένου ή οστεομυελική βιοψία). Με βάση τα παραπάνω ταυτοποιήθηκε η παρουσία λεμφώματος οριακής ζώνης (Marginal Zone Lymphoma, MZL) σε 6 ασθενείς, λεμφώματος κυττάρων μανδύα (Mantle Cell Lymphoma) σε 3 ασθενείς. Επιπλέον υπήρξαν δύο διαγνώσεις λευχαιμίας τριχωτών κυττάρων (Hairy Cell Leukemia, HCL) και ένα περιστατικό T προλεμφοκυτταρικής λευχαιμίας.

Πίνακας 7.11. Περιγραφική στατιστική συνεχών μεταβλητών για την έκφραση του PD-L1 στο σύνολο των λευκών αιμοσφαιρίων (WBC), στα νεοπλασματικά κύτταρα και στα λεμφοκύτταρα των ασθενών με NHLs (N=19). Οι τιμές αφορούν το ποσοστό των PD-L1(+) κυττάρων επί συνόλου κυττάρων δείγματος.

PD-L1(%)	x ± s	R	Εκατοστημόριο				
			10°	25°	50° (δ)	75°	90°
WBC	0,65 ± 0,51	2,28	0,13	0,27	0,56	0,89	1,26
νεοπλασματικά κύτταρα	1,15 ± 0,83	3,49	0,27	0,53	1,06	1,32	2,40
λεμφοκύτταρα	0,69 ± 0,57	2,11	0,09	0,31	0,49	0,83	1,75



Σχήμα 7.13. Ενδεικτικό αποτέλεσμα από την επεξεργασία των αποτελεσμάτων για την έκφραση του PD-L1 στο σύνολο των WBC, στα νεοπλασματικά κύτταρα και τα λεμφοκύτταρα του περιφερικού αίματος ασθενούς με NHL CD5(-), CD19(+), CD20(+), CD23(-), CD25(-), CD11c(-), CD43(-), CD79b(+), CD103(-), CD200(-), FMC7(+), κ(+).



Σχήμα 7.14. Κατανομή της έκφρασης του PD-1 (% επί συνόλου κυττάρων κάθε υποπληθυσμού) στο σύνολο των WBC, στα νεοπλασματικά κύτταρα και τα λεμφοκύτταρα των ασθενών με NHL (N=19, ημιλογαριθμική κλίμακα).

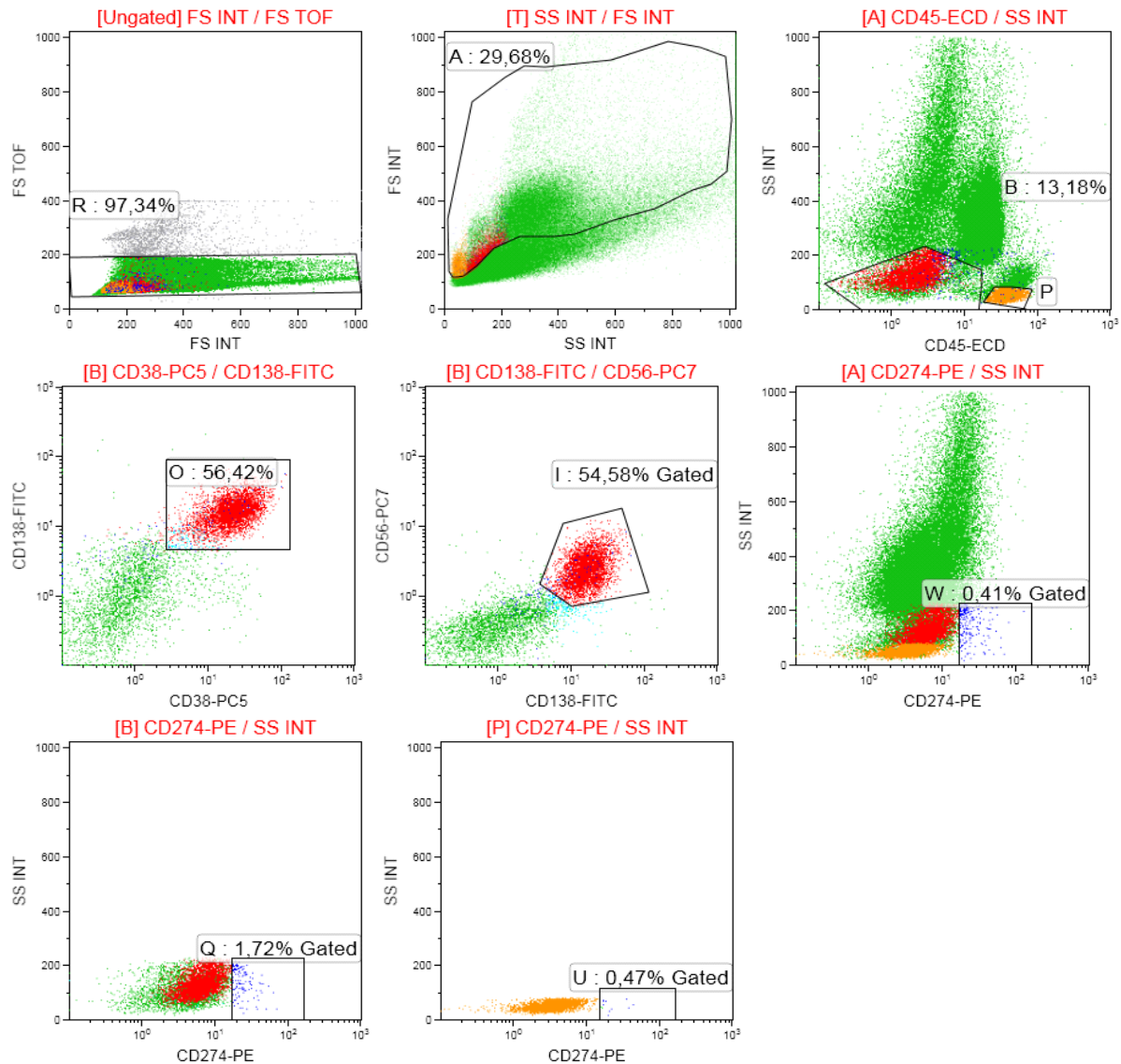
Από την κατανομή των αποτελεσμάτων η έκφραση του PD-L1 στα νεοπλασματικά κύτταρα είναι μεγαλύτερη από εκείνη των λεμφοκυττάρων, ενώ η έκφραση του PD-L1 στο σύνολο των WBC ελαφρώς ισχυρότερη από εκείνη των λεμφοκυττάρων [Πίνακας 7.11., Σχήμα 7.14.]. Με βάση το μη παραμετρικό κριτήριο των Mann Whitney προκύπτει το συμπέρασμα ότι η έκφραση του PD-L1 στα λεμφοματικά κύτταρα είναι σημαντικά ισχυρότερη από εκείνη των λεμφοκυττάρων ($p=0,003$).

7.4.3. Αποτελέσματα για την έκφραση του PD-L1 στο MM

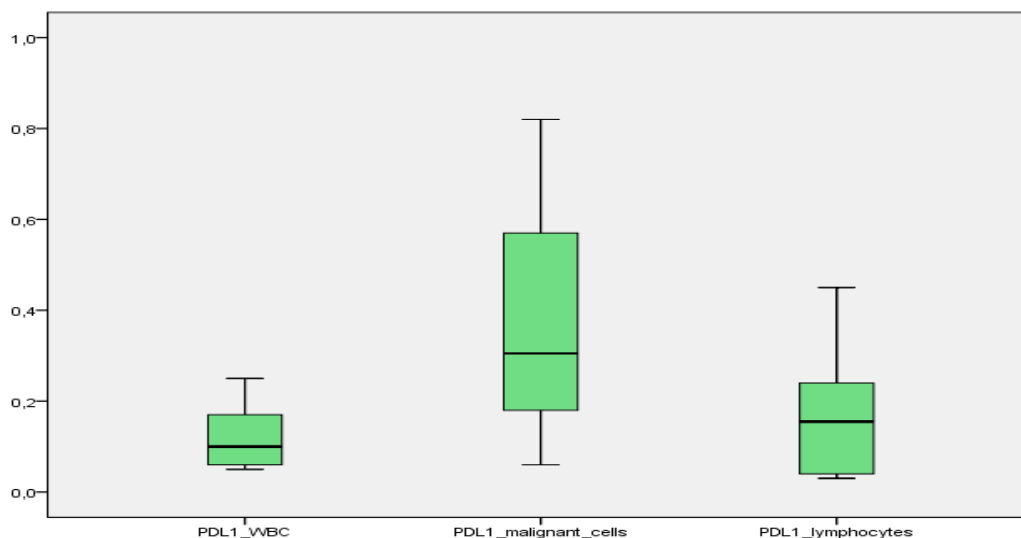
Η ομάδα του MM αποτελείται από 10 άτομα (3 άνδρες, 7 γυναίκες) μέσης ηλικίας 66,6 ετών. Οι ασθενείς προσήλθαν στο εργαστήριο για διερεύνηση κλινικής υποψίας πολλαπλού μυελώματος ή παγκυτταροπενίας. Η ανοσοφαινοτυπική μελέτη του μυελού των οστών έγινε με συνδυασμούς πενταπλού φθορισμού. Από τον προσδιορισμό του ισοτύπου του μυελώματος (ανοσοκαθήλωση ορού) προέκυψε ότι τα κακοήγη πλασματοκύτταρα εκκρίνουν μονοκλωνική IgGκ ή IgGλ (4 ασθενείς) και IgAκ ή IgAλ (4 ασθενείς). Σημειώνεται ότι μελετήθηκε και ένα (σπάνιο) περιστατικό πλασματοκυτταρικής λευχαιμίας (PCL).

Πίνακας 7.12. Περιγραφική στατιστική συνεχών μεταβλητών για την έκφραση του *PD-L1* στο σύνολο των λευκών αιμοσφαιρίων (*WBC*), στα νεοπλασματικά κύτταρα και στα λεμφοκύτταρα των ασθενών με *MM* (*N*=10). Οι τιμές αφορούν το ποσοστό των *PD-L1*(+) κυττάρων επί συνόλου κυττάρων δείγματος.

PD-L1(%)	$\bar{x} \pm s$	R	Εκατοστημόριο				
			10°	25°	50° (δ)	75°	100°
WBC	0,12 ± 0,67	0,20	0,05	0,58	0,10	0,18	0,25
νεοπλασματικά κύτταρα	0,37 ± 0,26	0,76	0,63	0,16	0,31	0,60	0,82
λεμφοκύτταρα	0,18 ± 0,15	0,42	0,03	0,04	0,16	0,29	0,45



Σχήμα 7.15. Ενδεικτικό αποτέλεσμα για την έκφραση του PD-L1 στο σύνολο των WBC, στα νεοπλασματικά κύτταρα και τα λεμφοκύτταρα από δείγμα περιφερικού αίματος ασθενούς με MM CD19(-), CD56(+), CD27(-), CD28(+), CD81(-), CD20(-), CD200(-), CD117(-), λ (+).



Σχήμα 7.16. Κατανομή της έκφρασης του PD-L1 (% επί συνόλου κυττάρων) στο σύνολο των WBC, στα νεοπλασματικά κύτταρα και τα λεμφοκύτταρα των ασθενών με MM (N=10).

Με βάση τα αποτελέσματα, μόνο η έκφραση του PD-L1 στα κακοήγη κύτταρα είναι ισχυρότερη από αυτή των λεμφοκυττάρων [Πίνακας 7.12., Σχήμα 7.16.]. Από την κατανομή των αποτελεσμάτων και το μη παραμετρικό κριτήριο των Mann Whitney προκύπτει το συμπέρασμα ότι η έκφραση του PD-L1 στα μυελωματικά κύτταρα είναι σημαντικά ισχυρότερη από εκείνη των λεμφοκυττάρων ($p=0,007$). Επιπλέον, από τις συγκρίσεις CLL-NHLs και NHL-MM με το ίδιο στατιστικό κριτήριο προκύπτει ότι οι ασθενείς με MM εμφανίζουν ασθενέστερη έκφραση του PD-L1 στο σύνολο των WBC αλλά και στα κακοήγη κύτταρα από τους ασθενείς με CLL και NHLs ($p<0,01$).

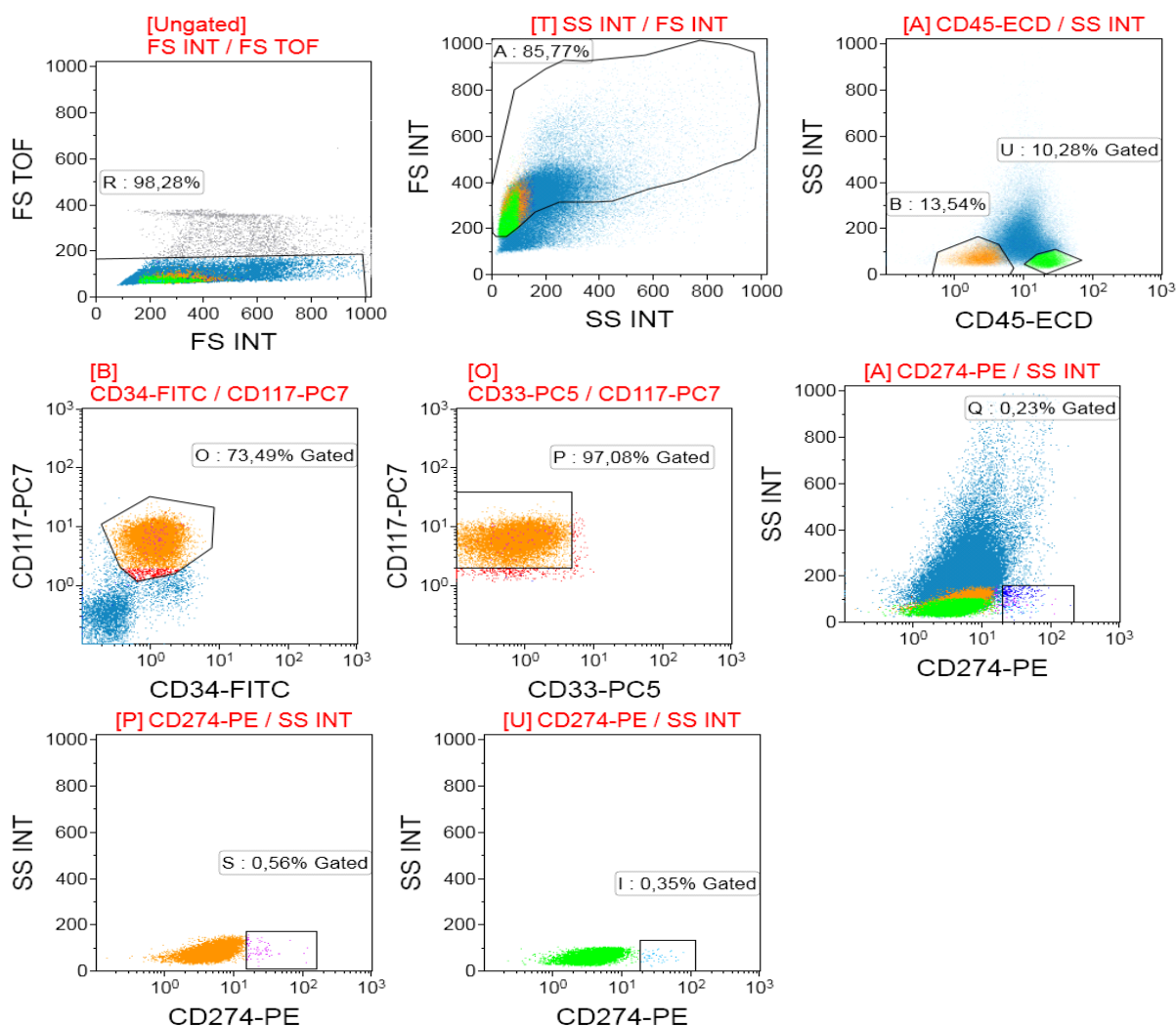
7.4.4. Αποτελέσματα για την έκφραση του PD-L1 στα MDS

Η ομάδα των MDS αποτελείται από 18 άτομα (15 άνδρες, 3 γυναίκες) μέσης ηλικίας 70,3 ετών. Οι ασθενείς προσήλθαν στο εργαστήριο για διερεύνηση κλινικής υποψίας μυελοδυσπλαστικού/μυελοϋπερπλαστικού συνδρόμου ή παγκυτταροπενίας. Η ανοσοφαινοτυπική μελέτη του μυελού των οστών (12 δείγματα) και του περιφερικού αίματος (6

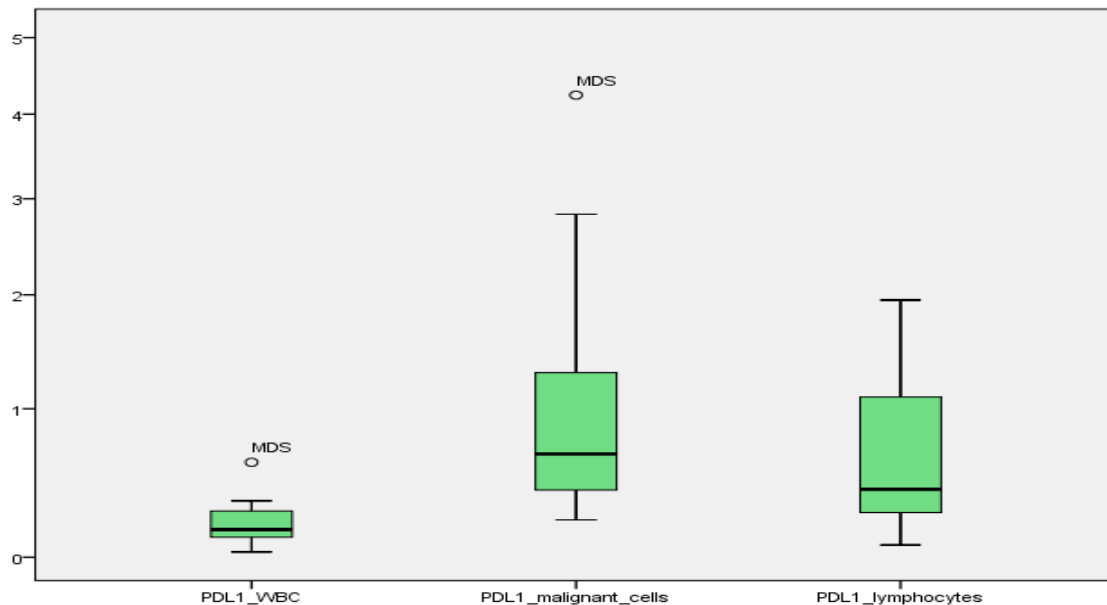
δείγματα) έγινε με συνδυασμούς πενταπλού φθορισμού. Χρησιμοποιήθηκαν συνδυασμοί για την μελέτη της έκφρασης στα άωρα κύτταρα της μυελικής και τα μονοκύτταρα (όπου χρειάστηκε).

Πίνακας 7.13. Περιγραφική στατιστική συνεχών μεταβλητών για την έκφραση του *PD-L1* στο σύνολο των λευκών αιμοσφαιρίων (*WBC*), στα νεοπλασματικά κύτταρα και στα λεμφοκύτταρα των ασθενών με *MDS* (*N=18*). Οι τιμές αφορούν το ποσοστό των *PD-L1*(+) κυττάρων επί συνόλου κυττάρων κάθε υποπληθυσμού.

PD-L1(%)	$\bar{x} \pm s$	R	Εκατοστημόριο				
			10°	25°	50° (δ)	75°	100°
WBC	0,20 ± 0,13	0,57	0,08	0,11	0,16	0,29	0,34
νεοπλασματικά κύτταρα	1,10 ± 0,98	4,02	0,29	0,42	0,69	1,31	2,77
λεμφοκύτταρα	0,66 ± 0,55	1,88	0,14	0,26	0,42	1,15	1,60



Σχήμα 7.17. Ενδεικτικό αποτελέσματα από την επεξεργασία των αποτελεσμάτων για την έκφραση του PD-L1 στο σύνολο των WBC, στα άωρα κύτταρα της μυελικής σειράς (CD45 weak) και τα λεμφοκύτταρα από δείγμα περιφερικού αίματος ασθενούς με MDS και ανοσοφαινότυπο CD13(+), CD33(-), CD34(weak), CD38(+), CD117(+), HLA-DR (+), MPO (-).



Σχήμα 7.18. Κατανομή της έκφρασης του PD-1 (% επί συνόλου κυττάρων κάθε υποπληθυσμού) στο σύνολο των WBC, στα νεοπλασματικά κύτταρα και τα λεμφοκύτταρα των ασθενών με MDS (N=18, ημιλογαριθμική κλίμακα).

Από την κατανομή των αποτελεσμάτων και με κριτήριο την έκφραση του PD-L1 στα φυσιολογικά λεμφοκύτταρα, η έκφραση του PD-L1 είναι αυξημένη στα άωρα κύτταρα της μυελικής σειράς και μειωμένη στο σύνολο των WBC [Πίνακας 7.13., Σχήμα 7.18.]. Από την εφαρμογή του Mann Whitney test προκύπτει ότι η έκφραση του PD-L1 στα άωρα κύτταρα της μυελικής σειράς είναι σημαντικά αυξημένη από εκείνη των λεμφοκυττάρων ($p=0,001$).

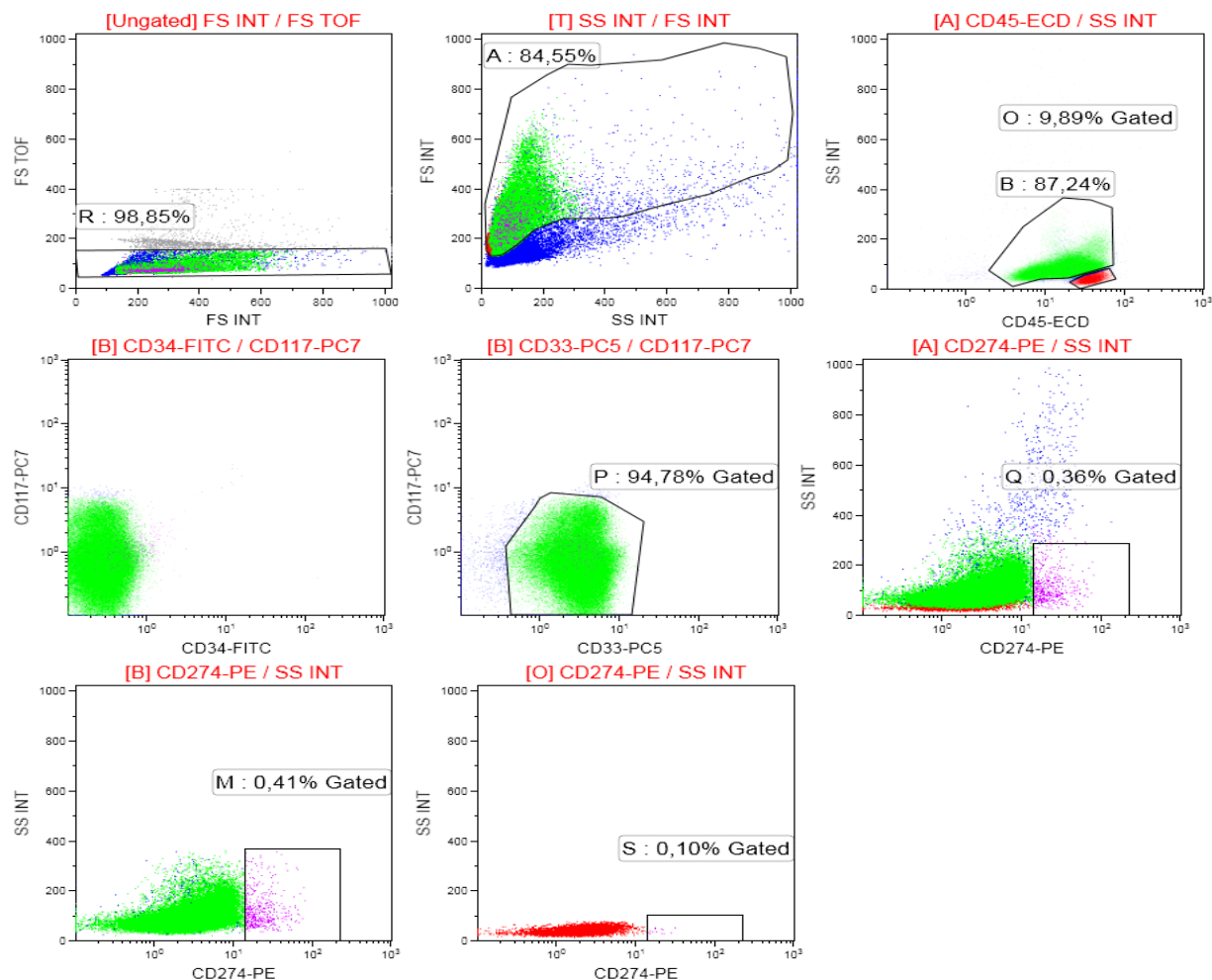
7.4.5. Αποτελέσματα για την έκφραση του PD-L1 στην AML

Η ομάδα της AML αποτελείται από 41 άτομα (22 άνδρες, 19 γυναίκες) μέσης ηλικίας 70,3 ετών. Οι ασθενείς προσήλθαν στο εργαστήριο κυρίως για διερεύνηση κλινικής παγκυτταροπενίας ή εκτροπής μυελοδυσπλαστικού συνδρόμου προς οξεία λευχαιμία. Η ανοσοφαινοτυπική μελέτη δειγμάτων περιφερικού αίματος (N=13) και μυελού των οστών

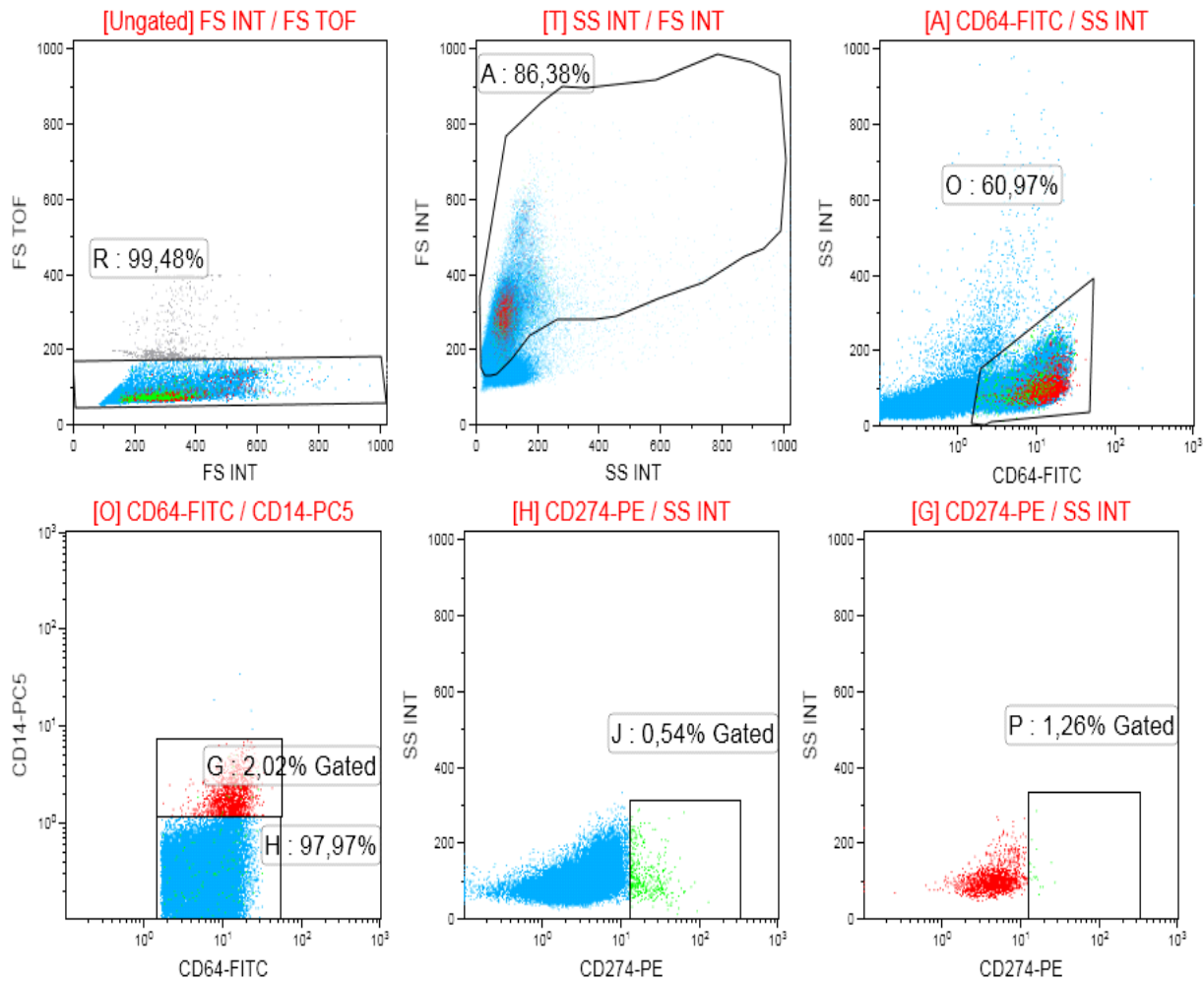
(N=28) έγινε με συνδυασμούς πενταπλού φθορισμού. Μεταξύ άλλων, ταυτοποιήθηκαν 3 περιστατικά αδιαφοροποίητης (M0) AML, 3 περιστατικά μυελομονοκυτταρικής (M4) AML, 4 περιστατικά μονοκυτταρικής (M5) AML και ένα σπάνιο περιστατικό δενδριτικής λευχαιμίας.

Πίνακας 7.14. Περιγραφική στατιστική συνεχών μεταβλητών για την έκφραση του PD-L1 στο σύνολο των λευκών αιμοσφαιρίων (WBC), στα νεοπλασματικά κύτταρα και στα λεμφοκύτταρα των ασθενών με ALL (N=41). Οι τιμές αφορούν το ποσοστό των PD-L1(+) κυττάρων επί συνόλου κυττάρων κάθε υποπληθυσμού.

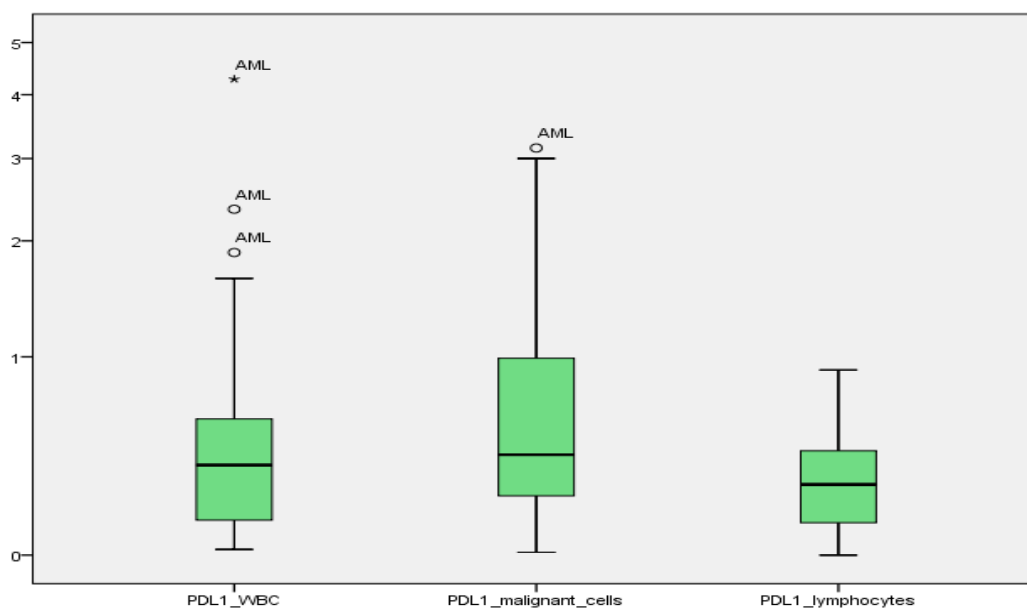
PD-L1(%)	$\bar{x} \pm s$	R	Εκατοστημόριο				
			10°	25°	50° (δ)	75°	100°
WBC	0,55 ± 0,74	4,26	0,66	0,13	0,37	0,62	1,20
νεοπλασματικά κύτταρα	0,70 ± 0,72	3,14	0,95	0,22	0,44	0,96	1,68
λεμφοκύτταρα	0,33 ± 0,24	0,91	0,47	0,12	0,29	0,44	0,73



Σχήμα 7.19. Ενδεικτικό αποτελέσματα από την επεξεργασία των αποτελεσμάτων για την έκφραση του *PD-L1* στο σύνολο των *WBC*, στα νεοπλασματικά κύτταρα και τα λεμφοκύτταρα από δείγμα περιφερικού αίματος ασθενούς με μυελομονοκυτταρική *AML* (*M4*) και ανοσοφαινότυπο μυελοβλαστών *CD13(-)*, *CD33(-)*, *CD34(-)*, *CD38(-)*, *CD117(+)* μερικώς, *HLA-DR (+)*, *MPO (+)*.



Σχήμα 7.20. Ενδεικτικό αποτελέσματα από την επεξεργασία των αποτελεσμάτων για την έκφραση του *PD-L1* στο σύνολο των *WBC*, στα μονοκύτταρα (άωρα, ώριμα) και τα λεμφοκύτταρα από δείγμα περιφερικού αίματος ασθενούς με μυελομονοκυτταρική *AML* (*M4*) και ανοσοφαινότυπο άωρων μονοκυττάρων *CD64(+)*, *CD4(+)* ασθενές, *CD11b (+)*, *CD13(-)*, *CD14(-)*, *CD33(-)*, *CD117(+)*.



Σχήμα 7.21. Κατανομή της έκφρασης του PD-1 (% επί συνόλου κυττάρων κάθε υποπληθυσμού) στο σύνολο των WBC, στα νεοπλασματικά κύτταρα και τα λεμφοκύτταρα των ασθενών με AML (N=41, ημιλογαριθμική κλίμακα).

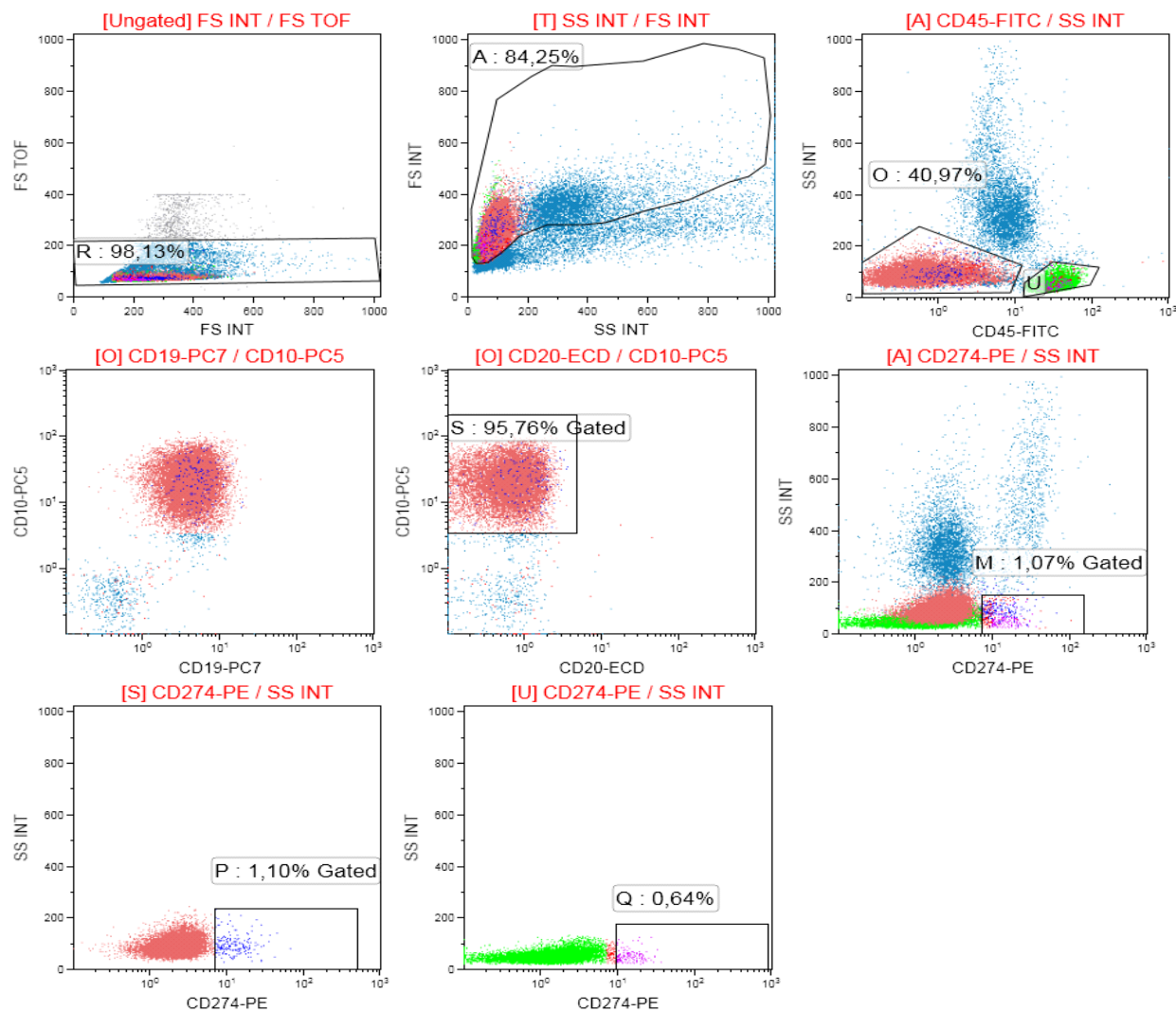
Από την κατανομή των αποτελεσμάτων και το μη παραμετρικό κριτήριο των Mann Whitney προκύπτει ότι η έκφραση του PD-L1 στους μυελοβλάστες της AML είναι σημαντικά αυξημένη από εκείνη των λεμφοκυττάρων ($p=0,001$) [Πίνακας 7.14., Σχήμα 7.21.]. Επιπλέον, από συγκρίσεις μεταξύ των ομάδων MDS-AML με βάση το ίδιο στατιστικό κριτήριο προέκυψε ότι η έκφραση του PD-L1 στα παθολογικά κύτταρα της AML είναι ισχυρότερη από εκείνη που παρατηρείται στα MDS ($p=0,021$). Αντίθετα, η έκφραση του PD-L1 στο σύνολο των WBC των ασθενών με MDS είναι σημαντικά ισχυρότερη από εκείνη των ασθενών με AML ($p=0,016$).

7.4.6. Αποτελέσματα για την έκφραση του PD-L1 στην ALL

Η ομάδα της ALL αποτελείται από 9 άτομα (5 άνδρες, 4 γυναίκες) μέσης ηλικίας 46,5 ετών. Οι ασθενείς προσήλθαν στο εργαστήριο κυρίως για διερεύνηση κλινικής υποψίας οξείας λευχαιμίας (υπερλευκοκυττάρωση, βλάστες στο περιφερικό αίμα). Η ανοσοφαινοτυπική μελέτη δειγμάτων περιφερικού αίματος (N=4) και μυελού των οστών (N=5) έγινε με συνδυασμούς πενταπλού φθορισμού. Με B-ALL διαγνώστηκαν 7 ασθενείς και οι υπόλοιποι 2 ασθενείς με T-ALL.

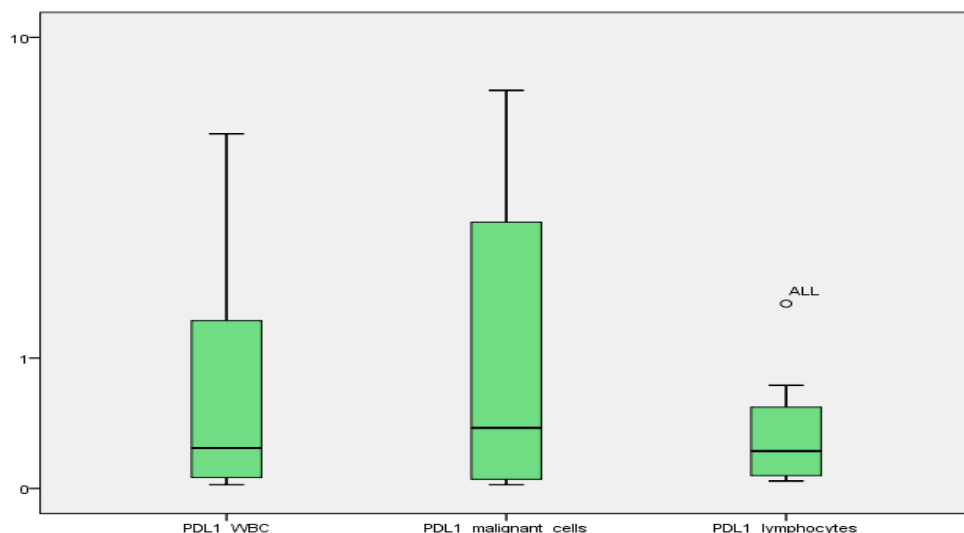
Πίνακας 7.15. Περιγραφική στατιστική συνεχών μεταβλητών για την έκφραση του *PD-L1* στο σύνολο των λευκών αιμοσφαιρίων (*WBC*), στα νεοπλασματικά κύτταρα και στα λεμφοκύτταρα των ασθενών με *ALL* (*N*=9). Οι τιμές αφορούν το ποσοστό των *PD-L1*(+) κυττάρων επί συνόλου κυττάρων κάθε υποπληθυσμού.

PD-L1(%)	$\bar{x} \pm s$	R	Εκατοστημόριο				
			10°	25°	50° (δ)	75°	100°
WBC	1,18 ± 1,81	5,57	0,02	0,05	0,24	1,69	5,59
νεοπλασματικά κύτταρα	2,02 ± 2,77	7,28	0,02	0,04	0,38	4,43	7,30
λεμφοκύτταρα	0,41 ± 0,53	1,63	0,04	0,06	0,22	0,64	1,67



Σχήμα 7.22. Ενδεικτικό αποτέλεσμα από την επεξεργασία των αποτελεσμάτων για την έκφραση του *PD-L1* στο σύνολο των *WBC*, στα νεοπλασματικά κύτταρα και τα λεμφοκύτταρα από δείγμα

περιφερικού αίματος ασθενούς με κοινή B-ALL και ανοσοφαινότυπο λεμφοβλαστών CD10(+), CD19(+), CD20(-), CD22(+), CD24(+), CD34(-), CD38(-) CD58(+), Tdt(+), cμ(-).



Σχήμα 7.23. Κατανομή της έκφρασης του PD-L1 (% επί συνόλου κυττάρων κάθε υποπληθυσμού) στο σύνολο των WBC, στα νεοπλασματικά κύτταρα και τα λεμφοκύτταρα των ασθενών με ALL (N=9, ημιλογαριθμική κλίμακα).

Από την κατανομή των αποτελεσμάτων είναι εμφανής η αυξημένη έκφραση του PD-L1 στο σύνολο των WBC και τα βλαστικά κύτταρα, συγκριτικά με τα φυσιολογικά λεμφοκύτταρα [Πίνακας 7.15., Σχήμα 7.23.]. Παρ' όλα αυτά, λόγω του μικρού αριθμού των δειγμάτων δεν αναδεικνύονται στατιστικά σημαντικές διαφορές ($p > 0,05$).

7.5. ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΟΥ PD-1 ΣΤΟΥΣ ΥΠΟΠΛΗΘΥΣΜΟΥΣ ΤΩΝ ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΩΝ ΤΩΝ ΑΣΘΕΝΩΝ

Η μη παραμετρική συσχέτιση κατά Spearman ανέδειξε ισχυρά θετική συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων έκφρασης του PD-1 στους υποπληθυσμούς των λεμφοκυττάρων. Αξιολογήθηκαν όλα τα στατιστικά σημαντικά αποτελέσματα ($p < 0,05$) με ισχυρή συσχέτιση ($r > 0,5$, $r < -0,5$). Θετική συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων του PD-1 στα B και CD4 T εμφανίζεται στο MM. Στην ALL τα επίπεδα του PD-1 στα B κύτταρα συσχετίζονται με τα CD8 T κύτταρα και το σύνολο των T κυττάρων. Θετική συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων του PD-1 στα B και NK κύτταρα παρατηρήθηκε στο MM, στην ALL και τα MDS [Πίνακας 7.16.].

Πίνακας 7.16. Αποτελέσματα μη παραμετρικής συσχέτισης για τα επίπεδα του PD-1 στους υποπληθυσμούς των λεμφοκυττάρων. Παρατίθενται η τιμή του μη παραμετρικού συντελεστή *Spearman* και σε παρένθεση η *p-value*. (*) Οι μη σημαντικές ($p > 0,05$) και ασθενείς συσχετίσεις ($r < 0,5$) δεν αναγράφονται.

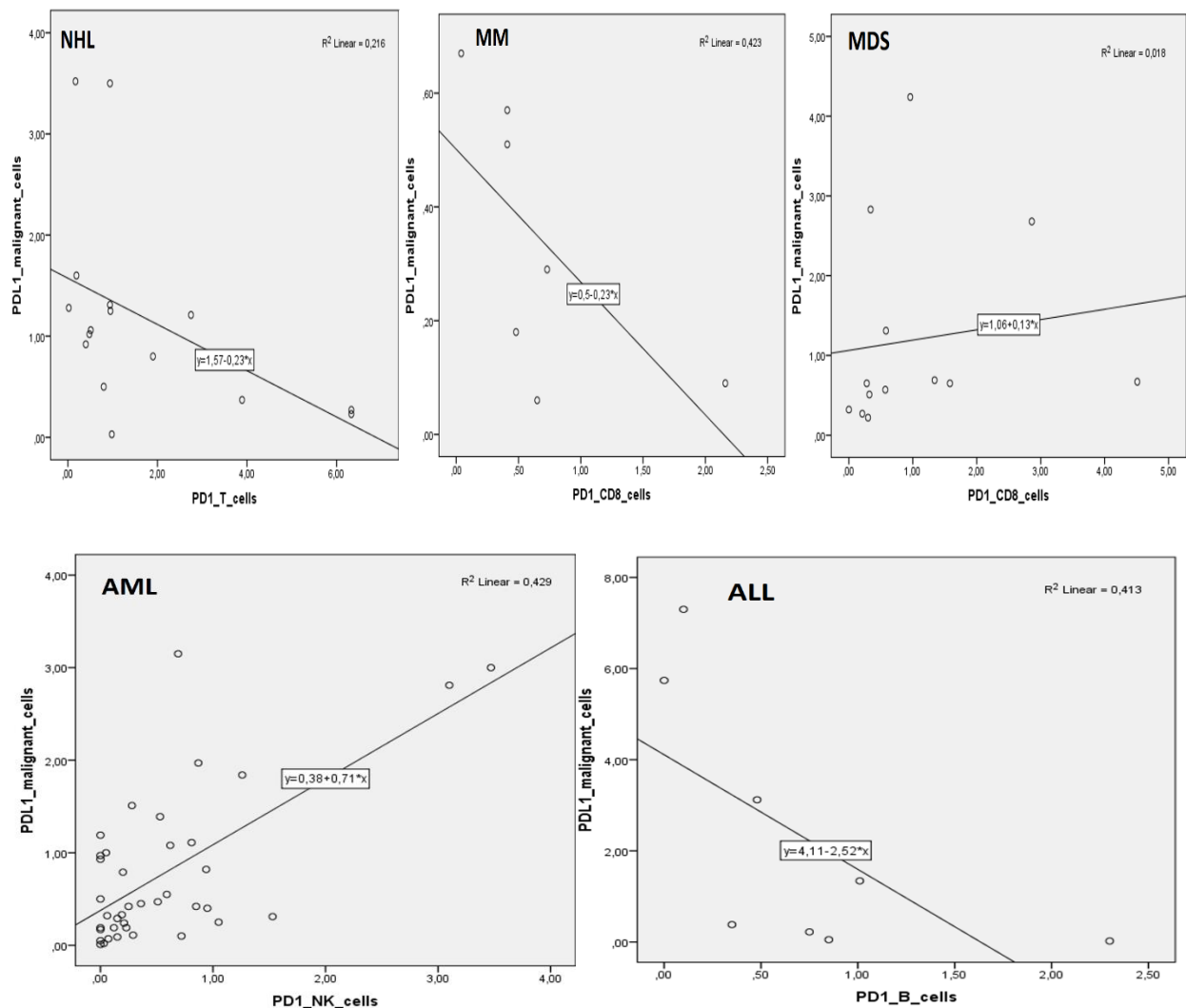
	B - T	B - CD4	B - CD8	CD4 - CD8	T - NK	NK - CD4	NK - CD8	B - NK
CLL	*	*	*	*	*	*	*	*
NHL	*	*	*	0,867 (0,000)	*	*	*	*
MM	*	0,867 (0,012)	*	*	*	0,811 (0,027)	*	0,915 (0,004)
MDS	*	*	*	0,560 (0,046)	0,890 (0,000)	0,702 (0,007)	0,603 (0,029)	0,596 (0,032)
AML	*	*	*	0,539 (0,000)	*	*	*	*
ALL	0,892 (0,002)	*	0,732 (0,039)	*	0,976 (0,000)	0,731 (0,040)	0,982 (0,000)	0,826 (0,011)
LPD	*	*	*	0,664 (0,000)	*	*	*	*
AL	*	*	*	*	*	*	*	*

Συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων του PD-1 στα CD4 και CD8 T κύτταρα εμφανίζεται κυρίως στα NHL, στα MDS και στην AML. Στα MDS και την ALL εμφανίζεται θετική συσχέτιση μεταξύ της έκφρασης του PD-1 στο σύνολο των T κυττάρων και στα NK κύτταρα. Επίσης, αναδεικνύονται στατιστικά σημαντικές σχέσεις από τις συγκρίσεις για τα επίπεδα του PD-1 μεταξύ CD4 T – NK και CD8 T-NK. Η τελευταία συσχέτιση είναι ιδιαίτερη ισχυρή στην ομάδα των ασθενών με ALL [Πίνακας 7.16.].

7.6. ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΤΩΝ ΕΠΙΠΕΔΩΝ ΤΩΝ PD-1/PD-L1 ΑΝΑ ΑΣΘΕΝΗ

Η μη παραμετρική συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων των PD-1/PD-L1 ανά ασθενή κάθε ομάδας (*Spearman*), ανέδειξε σημαντικές σχέσεις για όλες τις ομάδες νοσημάτων εκτός της CLL, αναφορικά με την έκφραση του PD-1 στα T κύτταρα και του PD-L1 στα νεοπλασματικά κύτταρα των ασθενών [Σχήμα 7.17.]. Αρνητική συσχέτιση προέκυψε για την έκφραση του PD-1 στα T κύτταρα και του PD-L1 στα μονοκλωνικά B κύτταρα των ασθενών με NHL ($r = -0,644$, $p=0,007$). Στο MM παρατηρήθηκε αρνητική συσχέτιση της έκφρασης του PD-1 στα CD8 T

κύτταρα με την έκφραση του PD-L1 στα λεμφωματικά κύτταρα ($r = -0,811$, $p=0,027$). Ομοίως και για την έκφραση του PD-1 στα B κύτταρα και του PD-L1 στους λεμφοβλάστες των ασθενών με ALL ($r = -0,782$, $p=0,021$). Απεναντίας, θετική συσχέτιση παρατηρήθηκε για την έκφραση του PD-1 στα CD8 T κύτταρα και του PD-L1 στους μυελοβλάστες των ασθενών με MDS ($r = 0,633$, $p=0,020$). Ασθενώς θετική συσχέτιση παρατηρήθηκε μεταξύ της έκφρασης του PD-1 στα NK κύτταρα και του PD-L1 στα άωρα κύτταρα της μυελικής σειράς των ασθενών με AML ($r = 0,436$, $p=0,006$).



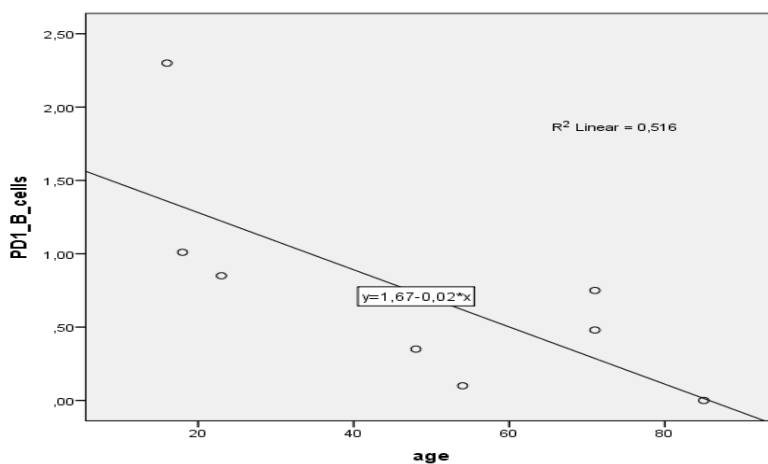
Σχήμα 7.24. Συσχετίσεις της έκφρασης του PD-L1 στα νεοπλασματικά κύτταρα με εκείνη του PD-1 στα T (NHL, MM, MDS) B (ALL) και NK κύτταρα (AML)

7.7. ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΩΝ PD-1/PD-L1 ΜΕ ΤΟΥΣ ΚΥΡΙΟΥΣ ΠΡΟΓΝΩΣΤΙΚΟΥΣ ΔΕΙΚΤΕΣ ΤΩΝ ΑΣΘΕΝΩΝ

Τα αποτελέσματα από την ανάλυση της έκφρασης των PD-1/PD-L1 συσχετίστηκαν με τα κλινικοπαθολογικά δεδομένα των ασθενών καθώς και με συγκεκριμένους δείκτες από τον ανοσοφαινότυπο της διάγνωσης. Συγκεκριμένα εξετάστηκε η συσχέτιση των PD-1/PD-L1 με την ηλικία και τον αριθμό των λευκών αιμοσφαιρίων των ασθενών, την παρουσία δεικτών αωρότητας (CD34, CD117), την έκτοπη αντιγονική έκφραση στις οξείες λευχαιμίες, τον καρυότυπο του μυελού των οστών και την παρουσία μεταλλάξεων σε γονίδια με προγνωστική σημασία.

7.7.1. Συσχέτιση της έκφρασης των PD-1/PD-L1 με την ηλικία των ασθενών

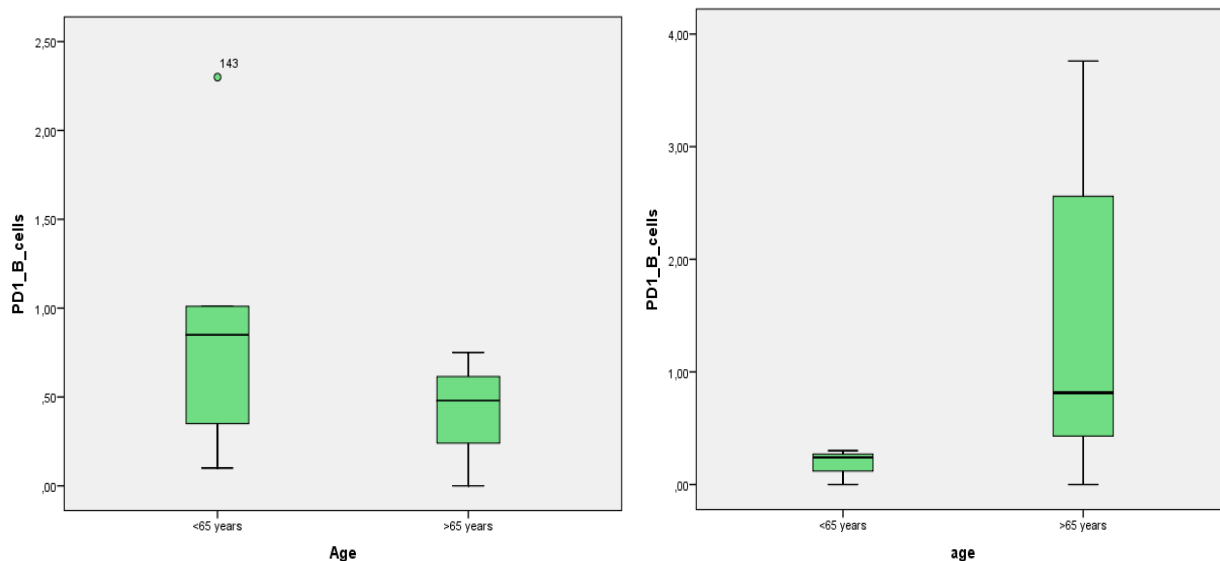
Αρχικά, έγινε συσχέτιση της ηλικίας των ασθενών με τα επίπεδα των PD-1/PD-L1 κατά τη διάγνωση χρησιμοποιώντας το μη παραμετρικό συντελεστή συσχέτισης του Spearman. Προέκυψε στατιστικά σημαντική ($p=0,017$) αρνητική συσχέτιση ($r = -0,802$) αναφορικά με τα επίπεδα του PD-1 στα B κύτταρα των ασθενών με ALL [Σχήμα 7.24.].



Σχήμα 7.24. Στικτόγραμμα μη παραμετρικής συσχέτισης (Spearman) της έκφρασης του PD-1 στα B κύτταρα με την ηλικία των ασθενών με ALL (N=8).

Παράλληλα, έγινε διαχωρισμός των ηλικιωμένων ασθενών (≥ 65 ετών) από τους υπόλοιπους ασθενείς και σύγκριση με το Mann Whitney U test με βάση τα ισχύοντα προγνωστικά κριτήρια. Στην ομάδα των MDS παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική αύξηση της

έκφρασης του PD-1 στα B κύτταρα των ηλικιωμένων ασθενών ($p=0,028$). Στατιστικά ασαφής σχέση προέκυψε για τα μειωμένα επίπεδα του PD-L1 στο σύνολο των WBC στους ηλικιωμένους ασθενείς με AML ($p=0,055$). Για τις υπόλοιπες κατηγορίες δεν προέκυψαν στατιστικά σημαντικές σχέσεις [Σχήμα 7.25.].



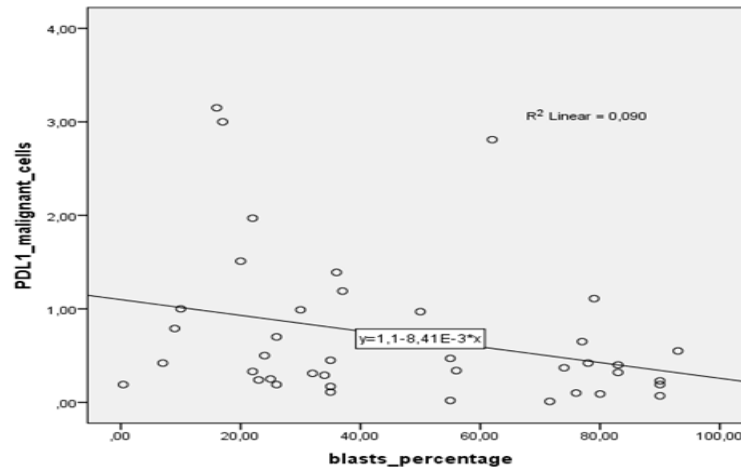
Σχήμα 7.25. Κατανομή της έκφρασης του PD-1 (% επί συνόλου κυττάρων κάθε υποπληθυσμού) στα B κύτταρα των ηλικιωμένων και των υπόλοιπων ασθενών με ALL ($N=8$) και MDS ($N=18$).

7.7.2. Συσχέτιση της έκφρασης των PD-1/PD-L1 με το φορτίο της νόσου κατά τη διάγνωση

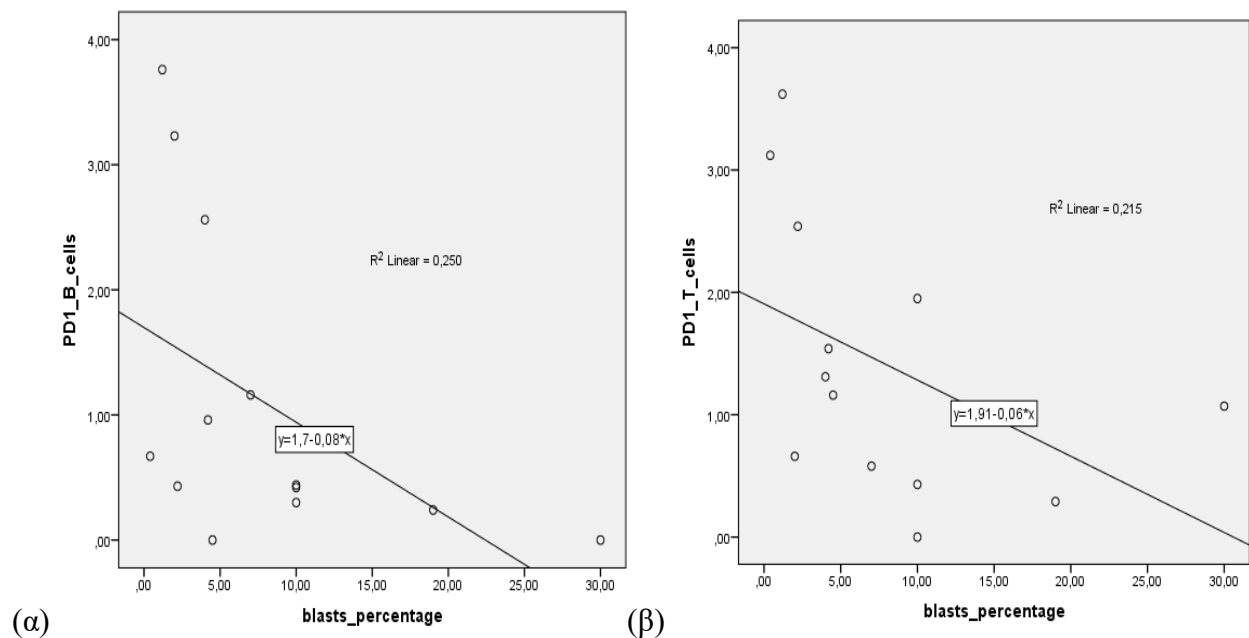
Πραγματοποιήθηκε μη παραμετρική συσχέτιση (Spearman) της έκφρασης των PD-1/PD-L1 και του αριθμού των νεοπλασματικών κυττάρων κατά τη διάγνωση. Για τη CLL έγιναν συγκρίσεις των PD-1/PD-L1 με τον απόλυτο αριθμό (κύτταρα/ μ L) των νεοπλασματικών κυττάρων στο δείγμα. Για τις υπόλοιπες ομάδες χρησιμοποιήθηκε το ποσοστό (%) των παθολογικών κυττάρων επί συνόλου κυττάρων του δείγματος.

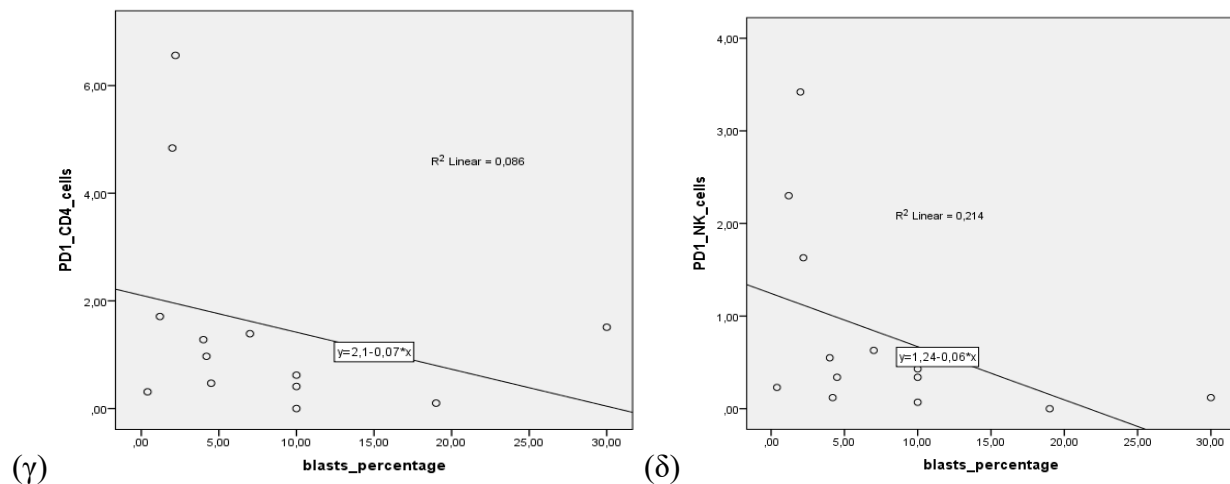
Στους ασθενείς με AML προέκυψε στατιστικά σημαντική αρνητική συσχέτιση για τα επίπεδα του PD-L1 στα νεοπλασματικά κύτταρα και το ποσοστό των άωρων κυττάρων των ($r = -0,328$, $p=0,039$) [Σχήμα 7.26.]. Στους ασθενείς με MDS προέκυψε αρνητική συσχέτιση αναφορικά με τα επίπεδα του PD-1 στα B ($r = -0,708$, $p=0,007$), NK ($r = -0,615$, $p=0,025$), T ($r = -0,680$, $p=0,011$) και CD8(+) T κύτταρα ($r = -0,685$, $p=0,010$) και τον αριθμό των CD34(+) άωρων κυττάρων της μυελικής σειράς [Σχήμα 7.27.]. Οριακά σημαντική σχέση προέκυψε για

τα επίπεδα του PD-1 στο σύνολο των WBC σε σχέση με τον απόλυτο αριθμό (κύτταρα ανά μL) των μονοκλωνικών B κυττάρων των ασθενών με CLL ($r = -0,515$, $p=0,060$) [Σχήμα 7.28.]. Για τις υπόλοιπες κατηγορίες δεν προέκυψαν στατιστικά σημαντικές σχέσεις.

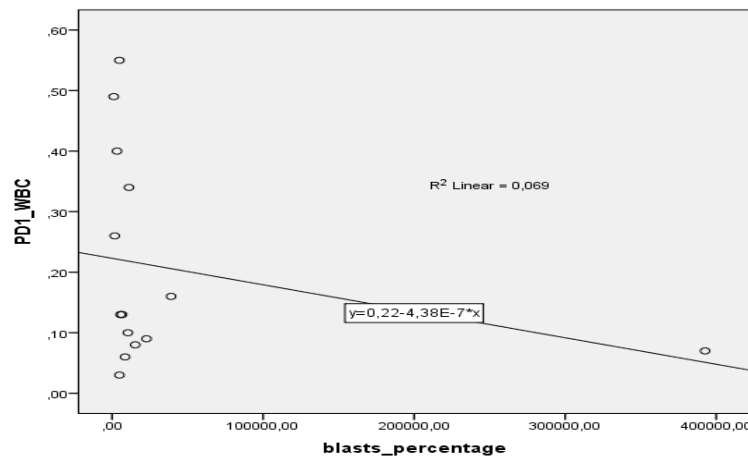


Σχήμα 7.26. Στικτόγραμμα μη παραμετρικής συσχέτισης (*Spearman*) της έκφρασης του PD-L1 στους μυελοβλάστες με το ποσοστό των νεοπλασματικών κυττάρων επί συνόλου κυττάρων δείγματος για τους ασθενείς με AML ($N=33$).





Σχήμα 7.27. Στικτόγραμμα μη παραμετρικής συσχέτισης (*Spearman*) της έκφρασης του *PD-1* στα (α) *B* (β) *T* (γ) *CD8 T* (δ) *NK* κύτταρα με το ποσοστό των *CD34(+)* άωρων κυττάρων επί συνόλου κυττάρων δείγματος για τους ασθενείς με *MDS* ($N=18$).

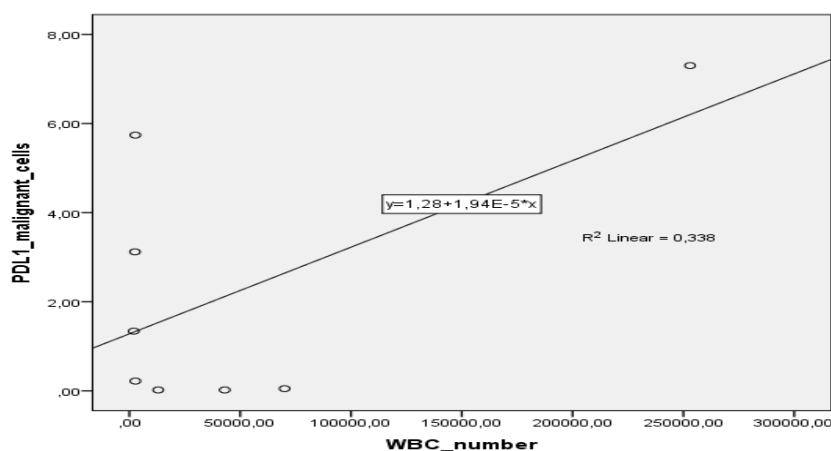


Σχήμα 7.28. Στικτόγραμμα μη παραμετρικής συσχέτισης (*Spearman*) της έκφρασης του *PD-1* στο σύνολο των *WBC* σε σχέση με τον απόλυτο αριθμό (κύτταρα ανά μL) των μονοκλωνικών *B* κυττάρων των ασθενών με *CLL* ($N=20$).

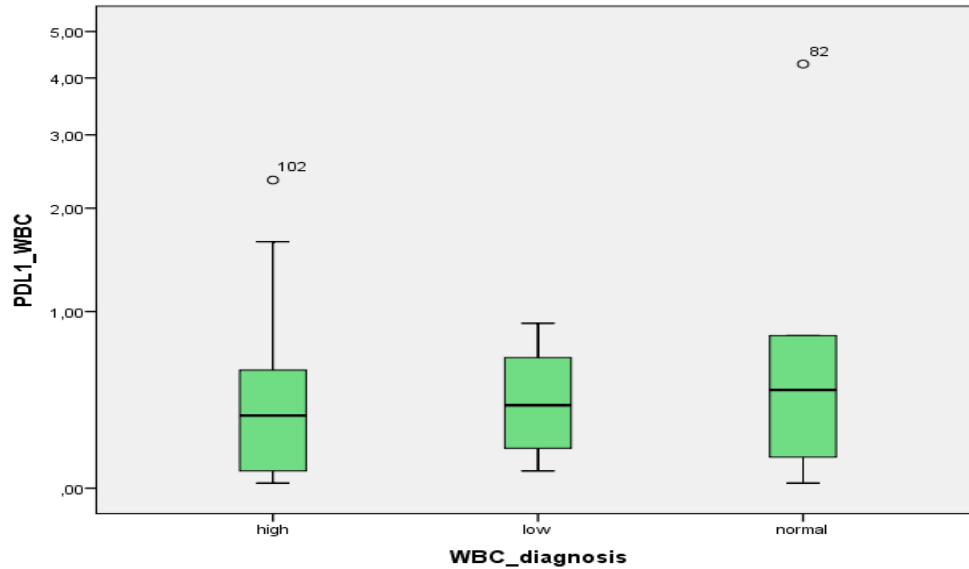
Ειδικά για τους ασθενείς με οξεία λευχαιμία (*AML*, *ALL*), πραγματοποιήθηκε συσχέτιση των *PD-1/PD-L1* με τον αριθμό των λευκών αιμοσφαιρίων (*WBC*) κατά την διάγνωση. Συνήθως, οι περισσότεροι ασθενείς προσέρχονται με λευκοκυττάρωση (>10.000 κύτταρα/ μL), αλλά ενδέχεται ο αριθμός των *WBC* να κυμαίνεται εντός φυσιολογικών ορίων ($4.000 - 10.000$ κύτταρα/ μL). Υπάρχει όμως και το σπάνιο ενδεχόμενο, οι ασθενείς να φέρουν μειωμένο αριθμό

WBC (<4.000 κύτταρα/μL) κατά τη διάγνωση (αλευχαιμικά περιστατικά). Γενικά, οι ασθενείς με υψηλό λευχαιμικό φορτίο κατά τη διάγνωση εντάσσονται στην ομάδα υψηλού κινδύνου.

Χρησιμοποιώντας μη παραμετρικές στατιστικές δοκιμασίες (Kruskal Wallis H test, συσχέτιση κατά Spearman) παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική σχέση μεταξύ των επιπέδων του PD-L1 στους μυελοβλάστες και του αριθμού των WBC των ασθενών με AML. Συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική αρνητική συσχέτιση σειράς Spearman ($r = -0,374$, $p=0,035$), η οποία επιβεβαιώθηκε και με τη δοκιμασία των Kruskal Wallis ($p=0,014$) [Σχήμα 7.29.]. Κατά την αναζήτηση της σχέσης των επιπέδων του PD-L1 με τον αριθμό των WBC των ασθενών (αυξημένα, μειωμένα, εντός φυσιολογικών ορίων) με κατάλληλο post hoc test (διόρθωση κατά Bonferroni), προέκυψε στατιστικά σημαντική σχέση για τα επίπεδα του PD-L1 στους ασθενείς με αυξημένα ή μειωμένα WBC ($p=0,016$) [Σχήμα 7.31.]. Σύμφωνα με αυτή, οι ασθενείς με μειωμένα WBC τείνουν να έχουν αυξημένα επίπεδα του PD-L1 κατά τη διάγνωση (μέση έκφραση 1,13% επί συνόλου λευχαιμικών κυττάρων). Αντίθετα, οι ασθενείς με λευκοκυττάρωση φαίνεται πως έχουν μειωμένα επίπεδα του PD-L1 κατά τη διάγνωση (μέση έκφραση 0,67% επί συνόλου λευχαιμικών κυττάρων).

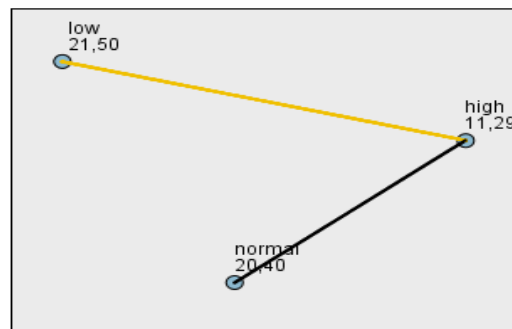


Σχήμα 7.29. Στικτόγραμμα μη παραμετρικής συσχέτισης (Spearman) της έκφρασης του PD-L1 στους μυελοβλάστες με τα WBC διάγνωσης των ασθενών με AML (N=33).



Σχήμα 7.30. Κατανομή της έκφρασης του PD-L1 στο σύνολο των λευκών αιμοσφαιρίων των ασθενών με βάση τα WBC διάγνωσης (N=33, ημιλογαριθμική κλίμακα).

Pairwise Comparisons of WBC_diagnosis



Each node shows the sample average rank of WBC_diagnosis.

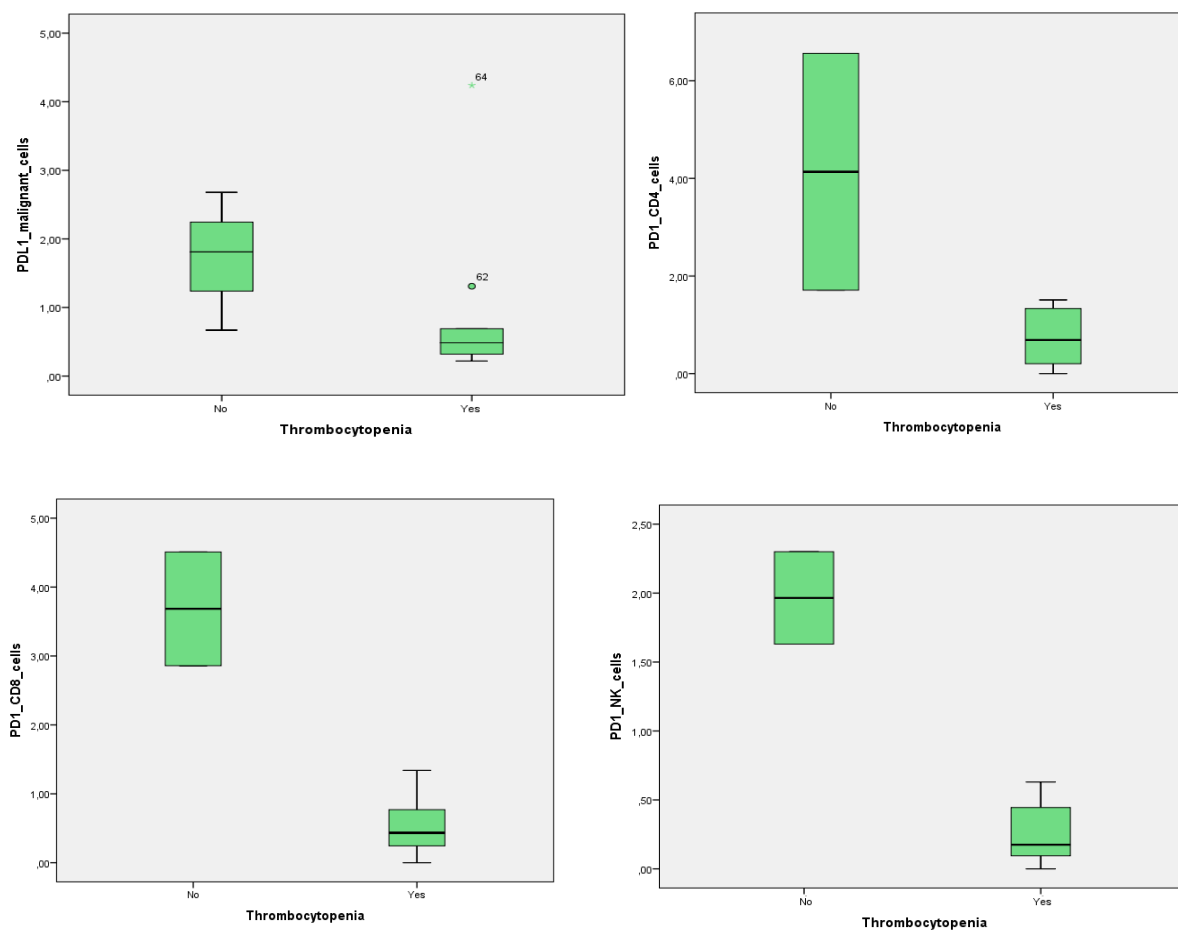
Sample1-Sample2	Test Statistic	Std. Error	Std. Test Statistic	Sig.	Adj.Sig.
high-normal	-9,114	5,036	-1,810	,070	,211
high-low	-10,214	3,654	-2,796	,005	,016
normal-low	1,100	5,036	,218	,827	1,000

Each row tests the null hypothesis that the Sample 1 and Sample 2 distributions are the same. Asymptotic significances (2-sided tests) are displayed. The significance level is ,05. Significance values have been adjusted by the Bonferroni correction for multiple tests.

Σχήμα 7.31. Τα αποτελέσματα του Bonferroni post hoc test για την έκφραση του PD-L1 στα λευχαιμικά κύτταρα των ασθενών με βάση τα WBC διάγνωσης (N=33). Διακρίνεται στατιστικά σημαντική σχέση ($p=0,016$) για τους ασθενείς με μη φυσιολογικό αριθμό WBC.

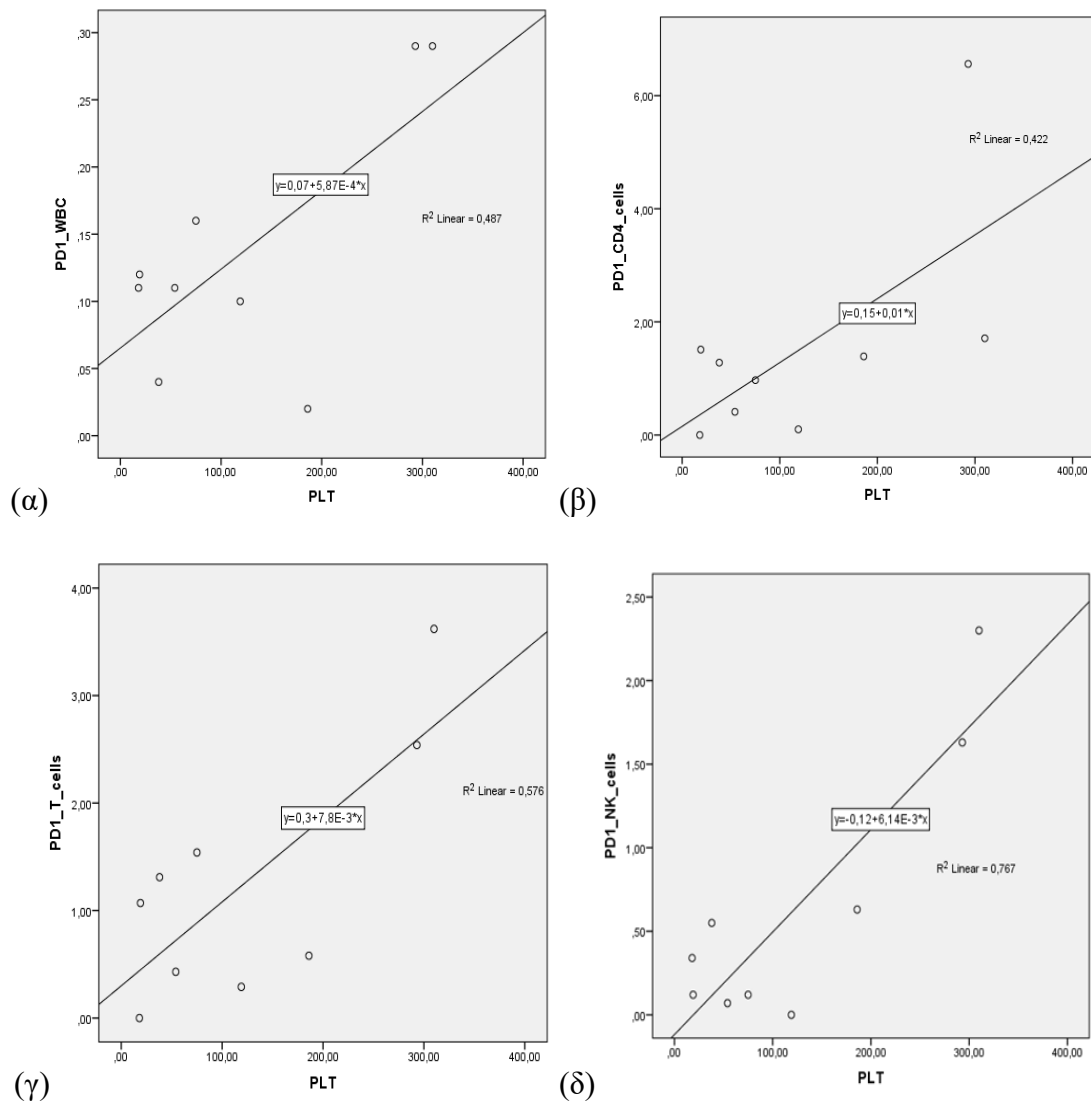
Επιπρόσθετα, διερευνήθηκε η σχέση των PD-1/PD-L1 με την παρουσία θρομβοπενίας (<150.000 αιμοπετάλια/μL) στη γενική εξέταση αίματος κατά τη διάγνωση των ασθενών με MDS και AML. Η παρουσία θρομβοπενίας σχετίζεται με την κλινική εξέλιξη του MDS, ενώ συνδέεται με δυσμενή πρόγνωση για την AML.

Στην ομάδα των MDS από σύνολο 13 ασθενών, οι 3 είχαν φυσιολογικό αριθμό αιμοπεταλίων (PLT) και οι υπόλοιποι 10 εμφάνισαν σοβαρή θρομβοπενία κατά τη διάγνωση. Η έκφραση των PD-1/PD-L1 ήταν μειωμένη στους ασθενείς με θρομβοπενία, συγκριτικά με τους ασθενείς με φυσιολογικό αριθμό PLT [Σχήμα 7.32.]. Από τη στατιστική διερεύνηση (Mann Whitney U test) προέκυψαν σημαντικές διαφορές για την ομάδα των MDS, αναφορικά με την έκφραση του PD-1 στο σύνολο των WBC καθώς και στα CD4, CD8 T και NK κύτταρα ($p=0,044$).



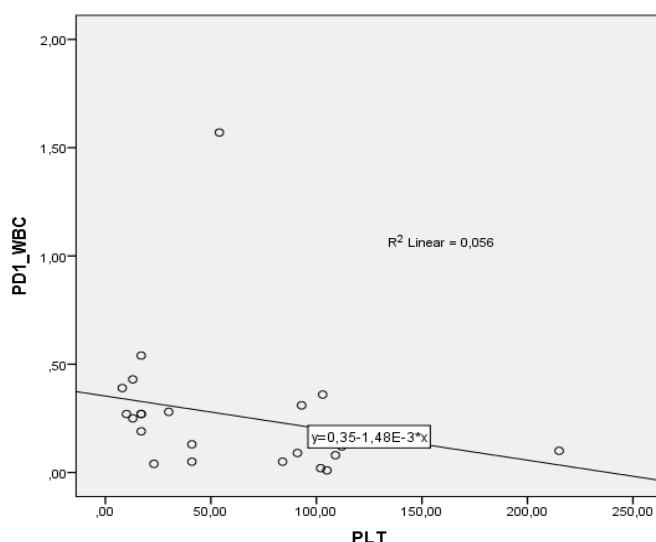
Σχήμα 7.32. Κατανομή της έκφρασης του PD-L1 στα λευχαιμικά κύτταρα των ασθενών με MDS με βάση την παρουσία θρομβοπενίας κατά τη διάγνωση (N=13).

Η μη παραμετρική συσχέτιση σειράς Spearman με βάση τον αριθμό των αιμοπεταλίων (PLT) ανέδειξε ισχυρά αρνητική συσχέτιση μεταξύ του αριθμού των αιμοπεταλίων και της έκφρασης του PD-1 στα WBC ($r = -0,731$, $p=0,044$), CD4 T ($r = -0,725$, $p=0,027$), CD8 T ($r = -0,725$, $p=0,027$), NK κύτταρα ($r = -0,728$, $p=0,026$) και επιπλέον για την έκφραση του PD-L1 στα κακοήθη κύτταρα ($r = -0,641$, $p=0,025$) των ασθενών με MDS [Σχήμα 7.33].



Σχήμα 7.33. Στικτόγραμμα μη παραμετρικής συσχέτισης (Spearman) της έκφρασης του PD-1 στα (α) WBC (β) CD4 T (γ) T (δ) NK κύτταρα με τον αριθμό των αιμοπεταλίων των ασθενών με MDS ($N=9$).

Στην AML, μόνο ένας από τους 25 ασθενείς είχε φυσιολογικό αριθμό αιμοπεταλίων κατά τη διάγνωση. Το Mann Whitney U test δεν ανέδειξε στατιστικά σημαντικές διαφορές ($p > 0,05$), ενώ η μη παραμετρική συσχέτιση κατά Spearman ανέδειξε στατιστικά σημαντική ($p = 0,025$) αρνητική συσχέτιση ($r = -0,475$) μεταξύ του αριθμού των PLT και της έκφρασης του PD-1 στα WBC των ασθενών [Σχήμα 7.34.].



Σχήμα 7.34. Στικτόγραμμα μη παραμετρικής συσχέτισης (Spearman) της έκφρασης του PD-1 στα WBC με τον αριθμό των αιμοπεταλίων των ασθενών με AML ($N = 25$).

7.7.3. Συσχέτιση της έκφρασης των PD-1/PD-L1 με τον ανοσοφαινότυπο της διάγνωσης των ασθενών

Πραγματοποιήθηκαν συγκρίσεις μεταξύ των ασθενών με NHL με βάση την παρουσία του CD5 και τον ιστολογικό τύπο του λεμφώματος (π.χ. λέμφωμα οριακής ζώνης, λέμφωμα κυττάρων μανδύα). Η παρουσία του CD5 έχει συσχετισθεί με πτωχή πρόγνωση στο διάχυτο λέμφωμα από μεγάλα Β κύτταρα (DLBCL). [70]

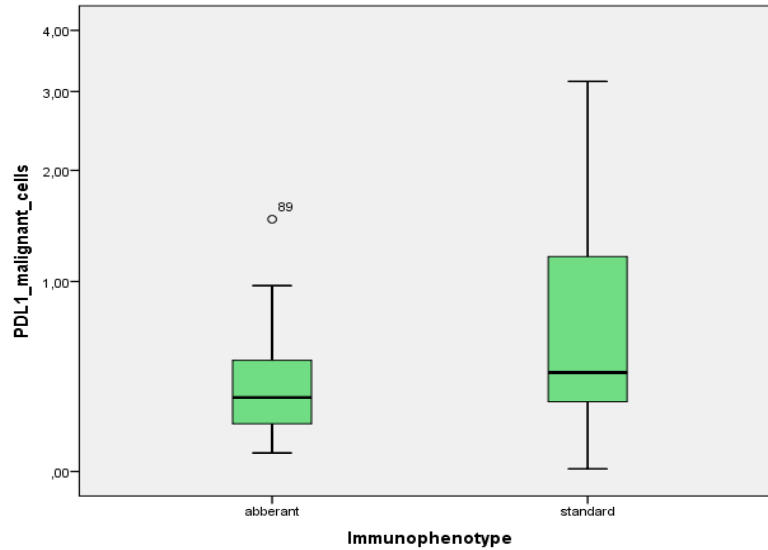
Σε σύνολο 17 ασθενών, 7 ασθενείς διαγνώστηκαν με CD5(+) NHL και 10 ασθενείς με CD5(-) NHL. Ως προς τον ιστολογικό τύπο του λεμφώματος στο σύνολο 19 ασθενών, 7 ασθενείς διαγνώστηκαν με λέμφωμα οριακής ζώνης (MZL) και οι υπόλοιποι 12 με άλλης μορφής λέμφωμα (κυττάρων μανδύα, τριχωτή λευχαιμία, ιστολογικά αταξινόμητο λέμφωμα). Οι συγκρίσεις έγιναν με το μη παραμετρικό Mann Whitney U test και δεν προέκυψαν στατιστικά σημαντικές σχέσεις ($p > 0,05$).

Στη συνέχεια διερευνήθηκε η πιθανότητα σχέσης μεταξύ των PD-1/PD-L1 και άλλων επιφανειακών δεικτών των νεοπλασματικών κυττάρων. Η απουσία του CD34 στην AML σχετίζεται με καλή πρόγνωση των ασθενών σε σχέση με τους ασθενείς με CD34(+) νόσο. Το ίδιο προγνωστικό αποτελέσματα φέρει και η ισχυρή έκφραση του CD38 στις AML και ALL. Απεναντίας, η έκφραση του υποδοχέα με ενεργότητα κινάσης τυροσίνης CD117 (*c-kit*) κυρίως στην AML και δευτερευόντως στην T-ALL σχετίζεται με δυσμενή πρόγνωση. [71-73]

Σε σύνολο 65 ασθενών (ALL, AML, MDS), σε 39 από αυτούς βρέθηκε έκφραση του CD34 και στους υπόλοιπους 29 όχι. Στους ασθενείς με AML (N=41), 27 άτομα είχαν έκφραση του CD117 στη διάγνωση και οι υπόλοιποι 14 ήταν αρνητικοί. Σε 38 ασθενείς με οξεία λευχαιμία (ALL, AML) βρέθηκε κατά τη διάγνωση ότι οι 23 εμφανίζουν ισχυρή ή μερικώς θετική έκφραση του CD38, ενώ οι υπόλοιποι 15 δεν εκφράζουν το CD38. Από όλες τις ανωτέρω συγκρίσεις με τα PD-1/PD-L1 (Mann Whitney U test) δεν προέκυψαν στατιστικά σημαντικές διαφορές ($p > 0,05$).

Ειδικά για τους ασθενείς με οξεία λευχαιμία (ALL, AML) έγινε συσχέτιση των PD-1/PD-L1 με την παρουσία ασυνήθιστων δεικτών (aberrant markers) στον ανοσοφαινότυπο της διάγνωσης. Η παρουσία λεμφοκυτταρικών αντιγόνων (π.χ. CD2, CD5, CD7, CD19, CD56) στην επιφάνεια των μυελοβλαστών συνδέεται με πτωχή πρόγνωση. [74-76]

Από το σύνολο των ασθενών με οξεία λευχαιμία (N=48), 18 ασθενείς είχαν έκτοπη έκφραση αντιγονικών δεικτών. Από τους ασθενείς με AML (N=39), 6 ασθενείς εμφάνισαν μερική ή πλήρως θετική έκφραση του CD56, 7 ασθενείς είχαν έκφραση του CD7, ενώ η παρουσία των CD5 και CD19 βρέθηκε σε 2 ασθενείς. Στην ομάδα της ALL (N=9), βρέθηκε ένας ασθενής με T-ALL να εκφράζει το μυελικό αντιγόνο CD33. Οι ασθενείς με ασυνήθιστη αντιγονική έκφραση παρουσιάζουν μειωμένη έκφραση του PD-L1 στα λευχαιμικά κύτταρα, συγκριτικά με τους υπόλοιπους ασθενείς [Σχήμα 7.35.]. Όμως, η παρατηρούμενη διαφορά είναι οριακά σημαντική ($p=0,055$) και απαιτείται μεγαλύτερος αριθμός δειγμάτων για να διερευνηθεί η παραπάνω σχέση.

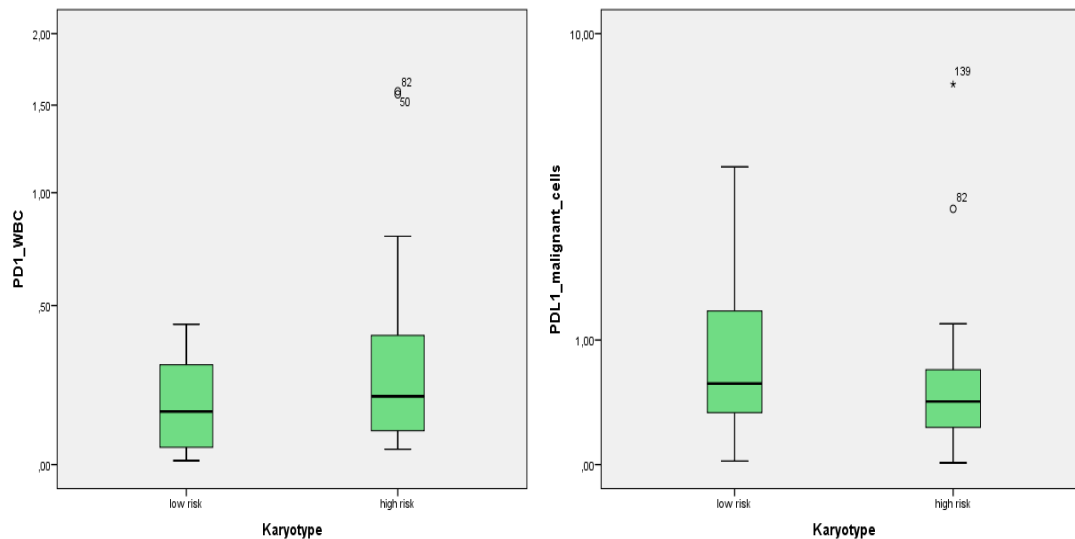


Σχήμα 7.35. Κατανομή της έκφρασης του PD-L1 στα λευχαιμικά κύτταρα των ασθενών με AML βάσει της παρουσίας ασυνήθιστων (aberrant) αντιγονικών δεικτών (N=41, ημιλογαριθμική κλίμακα).

7.7.4. Συσχέτιση της έκφρασης των PD-1/PD-L1 με τον καρυότυπο και το μοριακό έλεγχο κατά τη διάγνωση των ασθενών

Έγινε η σύγκριση των PD-1/PD-L1 μεταξύ των ασθενών με καρυότυπο μυελού των οστών υψηλού κινδύνου και των ασθενών με καρυότυπο χαμηλού ή ενδιάμεσου κινδύνου. Σημειώνεται ότι συχνά στους ηλικιωμένους ασθενείς ή σε εκείνους που λόγω κακής φυσικής κατάστασης (συννοσηρότητες) είναι ακατάλληλοι για να λάβουν πλήρη χημειοθεραπεία, δεν αποστέλλονται δείγματα για καρυότυπο ή μοριακό έλεγχο. Τα κλινικά δεδομένα για τον καρυότυπο του μυελού των οστών παραχωρήθηκαν από τους θεράποντες ιατρούς και το εργαστήριο Υγιοφυσικής του Τμήματος Κυτταρογενετικής του ΕΚΕΦΕ «Δημόκριτος».

Σε σύνολο 38 ασθενών (MDS, AML, ALL, MM), 19 ασθενείς με είχαν καρυότυπο υψηλού κινδύνου (π.χ. σύνθετος καρυότυπος, t(9;22), τρισωμία 8, μονοσωμία 7) και οι υπόλοιποι 19 καρυότυπο χαμηλού ή ενδιάμεσου κινδύνου (π.χ. φυσιολογικός, -Y).



Σχήμα 7.36. Κατανομή της έκφρασης του PD-1 στα WBC (N=33) και του PD-L1 στα λευχαιμικά κύτταρα των ασθενών (N=39) με βάση τον καρυότυπο του μυελού των οστών. Οι παρατηρούμενες διαφορές είναι στατιστικά μη σημαντικές ($p > 0,05$).

Από τη σύγκριση μεταξύ των ασθενών, φαίνεται ότι η παρουσία του PD-1 είναι αυξημένη στα T λεμφοκύτταρα και μειωμένη στα B, NK κύτταρα των ασθενών με καρυότυπο υψηλού κινδύνου [Σχήμα 7.36., Πίνακας 7.17.]. Ο PD-L1 δείχνει να εκφράζεται ισχυρότερα στα κακοήγη κύτταρα των ασθενών χαμηλού κινδύνου. Εντούτοις, από την εφαρμογή του Mann Whitney U test δεν προκύπτουν στατιστικά σημαντικές διαφορές ($p > 0,05$). Σημειώνεται η παρουσία οριακά σημαντικής αύξησης των επιπέδων του PD-1 στα NK κύτταρα των ασθενών με καρυότυπο χαμηλού κινδύνου ($p=0,056$).

Πίνακας 7.17. Η διάμεση έκφραση του PD-1 στους υποπληθυσμούς των λεμφοκυττάρων και του PD-L1 στα κακοήγη κύτταρα των ασθενών με καρυότυπο υψηλού και χαμηλού κινδύνου. Οι τιμές αφορούν το ποσοστό των PD-1(+) ή PD-L1(+) κυττάρων επί συνόλου κυττάρων κάθε υποπληθυσμού.

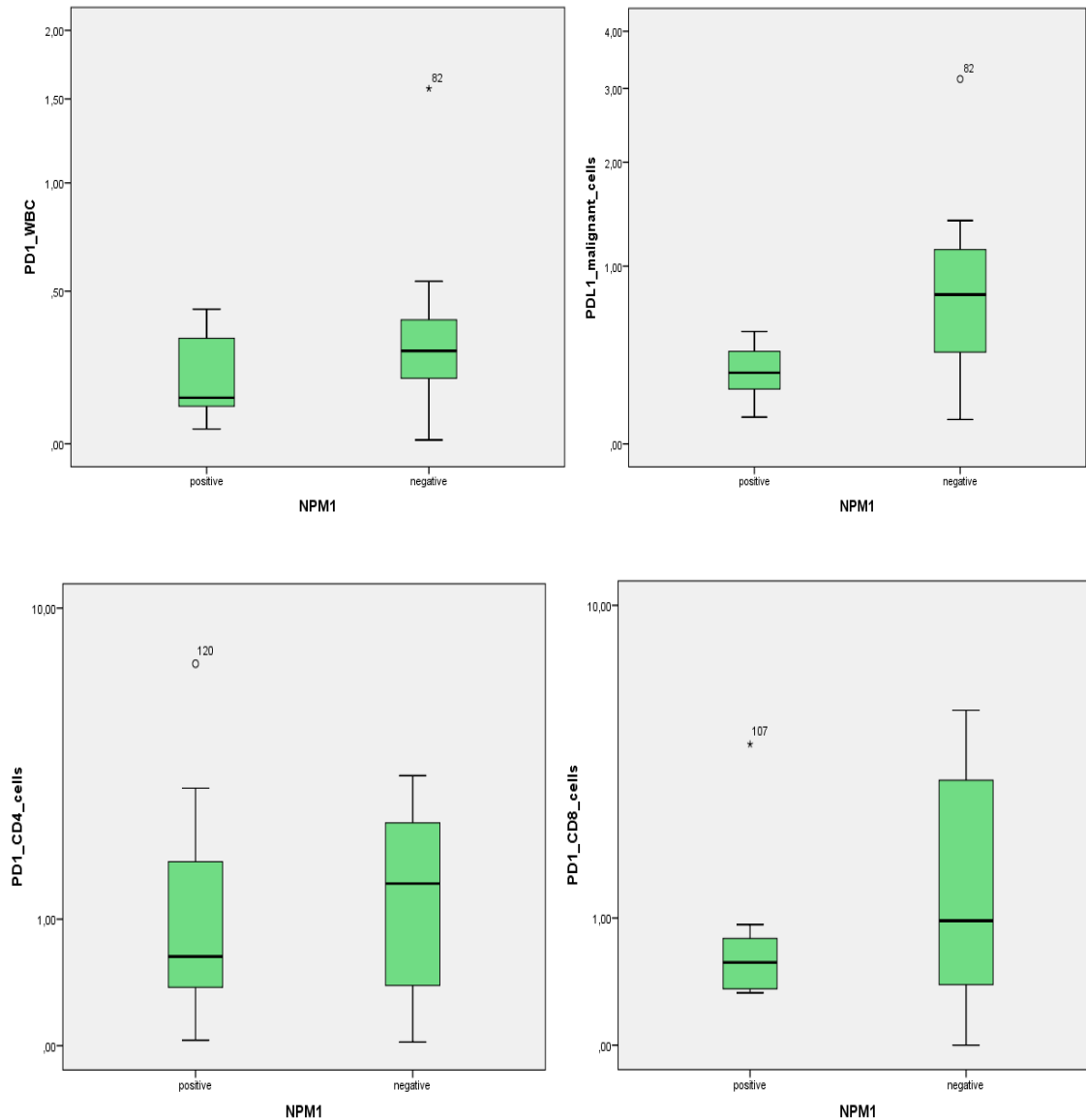
Καρυότυπος	PD-L1 (WBC)	PD-L1 (malignant)	PD-1 (WBC)	PD-1 (B)	PD-1 (CD4)	PD-1 (CD8)	PD-1 (NK)	PD-1 (T)
χαμηλού κινδύνου	0,24	0,57	0,15	0,41	0,51	0,47	0,75	1,36
υψηλού κινδύνου	0,57	0,42	0,19	0,24	1,38	1,34	0,19	1,31

Στους ασθενείς με AML μελετήθηκε η πιθανότητα σχέσης της έκφρασης των PD-1/PD-L1 με την παρουσία μεταλλάγων στα γονίδια *NPM1* και *FLT3*. Η παρουσία μεταλλάγων στο γονίδιο *NPM1* (*Nucleophosmin 1*) συναντάται στο 20-30% των ασθενών και συνδέεται με ευνοϊκή πρόγνωση. [77] Απεναντίας, η παρουσία εσωτερικών διαδοχικών διπλασιασμών (ITDs) στην κινάση τυροσίνης FLT3 συνδέεται με επιθετική νόσο (*FLT3*-ITD AML) και πτωχή πρόγνωση. [78] Η παρουσία των ITD στο γονίδιο *FLT3* ελαττώνει τη θετική προγνωστική αξία των μεταλλάγων στο *NPM1*. Τα κλινικά δεδομένα για τις παραπάνω μεταλλαγές παραχωρήθηκαν από το εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας της Αιματολογικής Κλινικής - Λεμφωμάτων του Γ.Ν.Α «Ο Ευαγγελισμός».

Πίνακας 7.18. Η διάμεση έκφραση του PD-1 στους υποπληθυσμούς των λεμφοκυττάρων και του PD-L1 στα κακοήγη κύτταρα των ασθενών με παρουσία ή απουσία μεταλλάγων στο *NPM1*. Οι τιμές αφορούν το ποσοστό των PD-1(+) ή PD-L1(+) κυττάρων επί συνόλου κυττάρων κάθε υποπληθυσμού.

<i>NPM1</i>	PD-L1 (WBC)	PD-L1 (malignant)	PD-1 (WBC)	PD-1 (B)	PD-1 (CD4)	PD-1 (CD8)	PD-1 (NK)	PD-1 (T)
μεταλλαγμένο (mut)	0,45	0,32	0,13	0,33	0,63	0,57	0,29	1,45
φυσικού τύπου (wt)	0,47	0,79	0,28	0,31	1,43	0,97	0,21	1,47

Σε σύνολο 18 ασθενών, η παρουσία μεταλλαγής στο *NPM1* διαπιστώθηκε σε 7 ασθενείς. Με βάση τη διάμεσο τιμή, παρατηρούνται μειωμένα επίπεδα των PD-1/PD-L1 στους υποπληθυσμούς των T λεμφοκυττάρων και στα κακοήγη κύτταρα των ασθενών με *NPM1*(+) AML [Πίνακας 7.18.]. Με βάση το Mann Whitney U test, η παρατηρούμενη διαφορά για το PD-1 είναι μη σημαντική ($p > 0,05$) και για το PD-L1 οριακά σημαντική ($p = 0,056$).

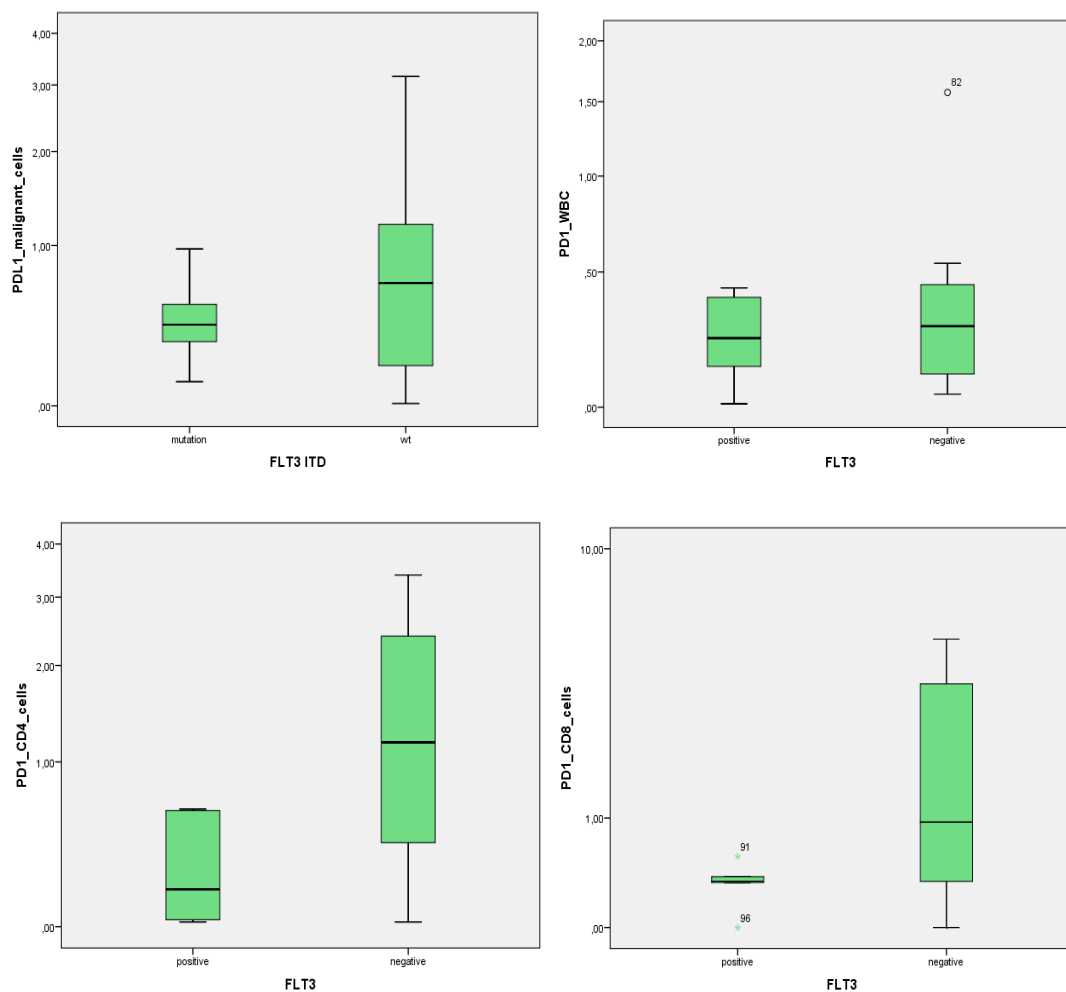


Σχήμα 7.37. Κατανομή της έκφρασης του PD-1 στα WBC και του PD-L1 στα λευχαιμικά κύτταρα των ασθενών με βάση την παρουσία ή απουσία μεταλλαγών στο NPM1. (N=18, ημιλογαριθμική κλίμακα). Οι παρατηρούμενες διαφορές είναι στατιστικά μη σημαντικές ($p > 0,05$).

Αναφορικά με το γονίδιο *FLT3*, οι μεταλλαγές ITD ανιχνεύθηκαν σε 5 από συνολικά 18 ασθενείς. Από την κατανομή των αποτελεσμάτων με βάση τη διάμεση τιμή, παρατηρείται ισχυρότερη έκφραση του PD-L1 στα κακοήγη κύτταρα και ασθενέστερη έκφραση του PD-1 στα CD8 T κύτταρα των ασθενών με *FLT3*-ITD (+) AML [Σχήμα 7.38., Πίνακας 7.19.]. Καμία από τις παρατηρούμενες διαφορές δεν είναι στατιστικά σημαντική ($p > 0,05$), ενώ οι διαφορές για τα επίπεδα του PD-1 στα CD4 ($p = 0,064$) και CD8 T κύτταρα ($p = 0,082$) είναι οριακά σημαντικές.

Πίνακας 7.19. Η διάμεση έκφραση του *PD-1* στους υποπληθυσμούς των λεμφοκυττάρων και του *PD-L1* στα κακοήγη κύτταρα των ασθενών με παρουσία ή απουσία *ITD* μεταλλαγών στο γονίδιο *FLT3*. Οι τιμές αφορούν το ποσοστό των *PD-1(+)* ή *PD-L1(+)* κυττάρων επί συνόλου κυττάρων κάθε υποπληθυσμού.

<i>FLT3</i>	<i>PD-L1</i> (WBC)	<i>PD-L1</i> (malignant)	<i>PD-1</i> (WBC)	<i>PD-1</i> (B)	<i>PD-1</i> (CD4)	<i>PD-1</i> (CD8)	<i>PD-1</i> (NK)	<i>PD-1</i> (T)
φυσικού τύπου (wt)	0,70	0,37	0,28	0,45	1,18	0,95	0,25	1,38
μεταλλαγμένο (ITD)	0,42	0,59	0,23	0,21	1,17	0,34	0,29	0,90



Σχήμα 7.38. Κατανομή της έκφρασης του *PD-1* στα *WBC* και του *PD-L1* στα λευχαιμικά κύτταρα των ασθενών με βάση την παρουσία ή απουσία *ITD* μεταλλαγών στο γονίδιο *FLT3* ($N=18$, ημιλογαριθμική κλίμακα). Οι παρατηρούμενες διαφορές είναι στατιστικά μη σημαντικές ($p > 0,05$).

ΚΕΦ. 8 ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η κλινική δοκιμή του Nivolumab στο ανθεκτικό/υποτροπιάζον λέμφωμα Hodgkin (HL) γνώρισε εξαιρετική επιτυχία και γι' αυτό δόθηκε έγκριση από τον FDA (2016). Το γεγονός αυτό ενθαρρύνει τις προσπάθειες για τη συνέχιση των κλινικών δοκιμών με βάση την anti PD-1/PD-L1 ανοσοθεραπεία και στα υπόλοιπα κακοήγη αιματολογικά νοσήματα. Εξάλλου, η προσπάθεια αυτή υποστηρίζεται και από βιβλιογραφικές αναφορές που υποδεικνύουν την υπερέκφραση των PD-1/PD-L1 στα ανωτέρω νοσήματα. Σύμφωνα με τους Xerri et al. (2008), κατά την επεξεργασία δειγμάτων περιφερικού αίματος ασθενών με CLL με κυτταρομετρία ροής (FC) και ανοσοϊστοχημεία (IHC) διαπιστώθηκε ότι ο PD-1 υπερκφράζεται στα λεμφοκύτταρα. Οι Liu et al. (2007) χρησιμοποιώντας την FC και μοριακές τεχνικές (Real time PCR) επιβεβαίωσαν την υπερέκφραση του PD-L1 στα CD138(+) πλασματοκύτταρα των ασθενών με MM. [37]

Οι Tamura et al. (2005) ανακοίνωσαν ότι οι PD-L1, PD-L2 υπερκφράζονται σε λευχαιμικές κυτταρικές σειρές αλλά και σε ασθενείς με de novo AML. [37] Οι Yang et al. (2014) με χρήση Real time PCR ανίχνευσαν αυξημένα επίπεδα των PD-L1, PD-L2, PD-1 και CTLA-4 mRNAs στα CD34(+) άωρα μυελοκύτταρα ασθενών με AML και MDS. [79,97] Επίσης, οι μελέτες των Si et al. (2012) σε πειραματόζωα έδειξαν ότι η πρόοδος της pre-B-ALL συνδέεται με την υπερέκφραση των ανασταλτικών υποδοχέων PD-1, TIM-3 στα T κύτταρα των ποντικών, ιδιαίτερα εκείνα που βρίσκονται σε ιστούς που διηθούνται από την νόσο. [80]

Ακόμη, υπάρχουν ενδείξεις για την προγνωστική αξία των επιπέδων των PD-1/PD-L1 στα αιματολογικά νεοπλάσματα. Χαρακτηριστικό παράδειγμα, η κλινική μελέτη των Rossille et al. (2014), σύμφωνα με την οποία τα αυξημένα επίπεδα διαλυτού PD-L1 (sPD-L1) στον ορό των ασθενών με διάχυτο λέμφωμα από μεγάλα Β κύτταρα (DLBCL), συνδέονται με μειωμένη ολική επιβίωση. [49] Αναφορικά με το PD-1, οι Richendollar et al. (2011) αναφέρουν ότι η παρουσία PD-1(+) λεμφοκυττάρων στο μικροπεριβάλλον του οζώδους λεμφώματος (FL) είναι ανεξάρτητος αρνητικός προγνωστικός παράγοντας για την επιβίωση των ασθενών. Επιπρόσθετα, οι Haroun et al. (2017) παρατήρησαν αυξημένη έκφραση των PD-1/PD-L1 στο μικροπεριβάλλον του μυελού των οστών ασθενών με MDS ή AML, η οποία συσχετίστηκε με μειωμένη ενεργότητα της ογκοκατασταλτικής TP53 και πτωχή πρόγνωση. [79]

Με βάση τα παραπάνω γίνεται εμφανής η αξία της μελέτης της έκφρασης και η διερεύνηση της κλινικής αξίας των PD-1/PD-L1 στα κακοήγη αιματολογικά νοσήματα. Για τον σκοπό αυτό, σχεδιάστηκε κατάλληλο πειραματικό πρωτόκολλο για την μελέτη των PD-1/PD-L1 σε ασθενείς με κακοήγη αιματολογικά νοσήματα (CLL, NHL, MM, MDS, AML, ALL) και μάρτυρες. Η κυτταρομετρία ροής είναι ιδιαίτερα ταχεία και κατάλληλη μέθοδος για τη μελέτη των παραπάνω δεικτών σε συνάρτηση με το πλήρες αντιγονικό προφίλ των ασθενών (ανοσοφαινότυπος).

Για την μελέτη της έκφρασης του PD-1 (CD-279) στους υποπληθυσμούς των λεμφοκυττάρων ασθενών και μαρτύρων σχεδιάστηκε πρωτόκολλο επταπλού φθορισμού (CD3-FITC/ CD56-PE /CD19-ECD/ CD8-PC7/ CD4-APC/ CD45-KRO/ CD279-PB). Το anti PD-1 mAb συνδέεται με την φθορίζουσα χρωστική Pacific Blue (PB). Ο συνδυασμός των αντιγόνων για το PD-1 περιέχει τους συνήθεις δείκτες των B (CD19), T (CD3, CD4, CD8) και NK (CD56) καθώς και το πανλευκοκυτταρικό αντιγόνο CD45. Αναφορικά με το PD-L1, σχεδιάστηκε πρωτόκολλο πενταπλού φθορισμού (FITC/ PE/ ECD/ PC5/ PC7) για τη μελέτη της έκφρασης του PD-L1 στα νεοπλασματικά κύτταρα και τα λεμφοκύτταρα των ασθενών. Το anti-PD-1 mAb συνδέεται με τη φθορίζουσα χρωστική Phycoerythrin (PE). Ο συνδυασμός αντιγόνων για το PD-L1 εξαρτάται από τον ανοσοφαινότυπο των ασθενών.

Από την επεξεργασία των αποτελεσμάτων προέκυψε ότι η έκφραση του PD-1 διαφοροποιείται μεταξύ ασθενών και μαρτύρων. Από τις συγκρίσεις μεταξύ των ομάδων των ασθενών και των μαρτύρων για την έκφραση του PD-1 (Kruskal Wallis H test) αναδεικνύονται στατιστικά σημαντικές διαφορές αναφορικά με την έκφραση του PD-1 στα B ($p=0,001$) και NK κύτταρα ($p=0,048$). Σε όλα τα νοσήματα η έκφραση του PD-L1 είναι σημαντικά ισχυρότερη στα κακοήγη κύτταρα συγκριτικά με τα λεμφοκύτταρα ($p=0,000$). Παράλληλα, οι διαφορές στην έκφραση του PD-L1 μεταξύ του συνόλου των WBC και των λεμφοκυττάρων, είναι στατιστικά μη σημαντικές για το σύνολο των νοσημάτων ($p>0,05$).

Στους ασθενείς με CLL, ο PD-1 υποεκφράζεται σημαντικά στα B κύτταρα ($p=0,000$), ενώ οριακά σημαντική θεωρείται η μείωση των επιπέδων του PD-1 στα CD8 T κύτταρα ($p=0,058$). Αναφορικά με την έκφραση του PD-L1, αυτή βρίσκεται αυξημένη στα παθολογικά λεμφοκύτταρα συγκριτικά με τα λεμφοκύτταρα των ασθενών με CLL ($p=0,000$).

Τα ανωτέρω ευρήματα της μελέτης συμφωνούν με τα βιβλιογραφικά δεδομένα. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, ο PD-1 έχει προταθεί ως διαγνωστικός δείκτης για την CLL, διότι η παρουσία του στα CD8 T κύτταρα σχετίζεται με την εξέλιξη της νόσου. Οι Qorraj et al. (2017) έδειξαν ότι η μεταβολική δυσλειτουργία των μονοκυττάρων κατά την εξέλιξη της CLL οφείλεται στην υπερέκφραση του PD-1. [79] Σύμφωνα με τους Ramsay et. al. (2012), η δυσλειτουργία των T κυττάρων στην CLL οφείλεται στην υπερέκφραση του PD-L1 στα κακοήθη κύτταρα. [47] Οι μελέτες των Grzywnowicz et. al. (2015) επιβεβαίωσαν την υπερέκφραση του PD-1 στους ασθενείς με CLL και συσχέτισαν την παρουσία του με μοριακούς προγνωστικούς δείκτες, όπως η παρουσία μεταλλαγών στο γονίδιο *IGHV* και η απουσία μεταλλαγών στο γονίδιο *ZAP-70*. [81]

Στην ομάδα των NHL βρέθηκε σημαντικά αυξημένη έκφραση του PD-1 στο σύνολο των T κυττάρων ($p=0,037$) και σημαντικά μειωμένη στα B κύτταρα των ασθενών ($p=0,05$). Από τη σύγκριση μεταξύ των CLL-NHL αναδεικνύεται σημαντικά αυξημένη έκφραση του PD-1 στα CD4 ($p=0,011$) και CD8 ($p=0,037$) T κύτταρα. Η έκφραση του PD-L1 στα λεμφωματικά κύτταρα των NHL είναι σημαντικά ισχυρότερη από εκείνη των λεμφοκυττάρων των ασθενών ($p=0,003$).

Τα ανωτέρω ευρήματα της μελέτης συμφωνούν με τα βιβλιογραφικά δεδομένα σχετικά με τη δράση των PD-1/PD-L1 στα λεμφώματα. Οι *in vitro* μελέτες των Tonino et al. (2012) έδειξαν ότι τα κακοήθη κύτταρα της CLL και άλλων χαμηλής κακοήθειας λεμφωμάτων (π.χ. FL) περιορίζουν την έκφραση του PD-1 στα ενεργοποιημένα T κύτταρα. Το εύρημα αυτό, σύμφωνα με τους ερευνητές, δεν παρατηρείται σε υψηλής κακοήθειας λεμφώματα και στο MM. [82] Οι Andorsky et al. (2011) διαπίστωσαν ότι ο PD-L1 υπερεκφράζεται σε κυτταρικές σειρές συγκεκριμένων NHL (DLBCL, ALCL) τόσο στα νεοπλασματικά όσο και σε ανοσορυθμιστικά κύτταρα (π.χ. Tregs, ιστιοκύτταρα, μακροφάγα), με σκοπό την εγκαθίδρυση ανοσοκατασταλτικού μικροπεριβάλλοντος που θα επιτρέψει την εξέλιξη της νόσου. [83]

Στο MM η έκφραση του PD-1 φαίνεται μειωμένη στα B κύτταρα και αυξημένη στους υπόλοιπους πληθυσμούς των λεμφοκυττάρων και το σύνολο των WBC των ασθενών, συγκριτικά με την ομάδα των ασθενών. Εντούτοις, οι παρατηρούμενες διαφορές είναι στατιστικά μη σημαντικές ($p > 0,05$). Η έκφραση του PD-L1 στο MM είναι σημαντικά αυξημένη στα μυελωματικά κύτταρα σε σχέση με τα λεμφοκύτταρα ($p=0,007$). Επιπλέον, από τις

συγκρίσεις CLL-NHL και NHL-MM προκύπτει ότι οι ασθενείς με MM εμφανίζουν ασθενέστερη έκφραση του PD-L1 στο σύνολο των WBC αλλά και στα κακοήγη κύτταρα από τους ασθενείς με CLL και NHLs ($p < 0,01$).

Η έκφραση του PD-L1 στο MM επιβεβαιώνεται και από τους Liu et al. (2007). Οι ερευνητές διαπίστωσαν υπερέκφραση του PD-L1 μόνο στα CD138(+) πλασματοκύτταρα των ασθενών με MM (και όχι στην MGUS) μέσω των MyD88/TRAF6 και MEK/ERK/STAT1. [84,85] Οι Dong et al. (2002) με *in vivo* πειράματα σε PD-1 (-/-) ποντικούς έδειξαν ότι η αλληλεπίδραση των PD-1/PD-L1 συμμετέχει ενεργά στην εξέλιξη του MM. Απουσία του PD-1 από τα λεμφοκύτταρα των ποντικών τα PD-L1(+) κακοήγη πλασματοκύτταρα αδυνατούν να πολλαπλασιαστούν. [86] Επιπλέον, πολλές κλινικές μελέτες υποδεικνύουν τη δυσμενή προγνωστική αξία της αύξησης των επιπέδων του διαλυτής μορφής του PD-L1 (sPD-L1) στον ορό των ασθενών με MM και DLBCL. [87] Ακόμη, η μελέτη σε ασθενείς με MM από τους Chang et al. (2018) έδειξε ότι η έκφραση του PD-1 σχετίζεται με προγνωστικούς παράγοντες όπως το φορτίο της νόσου και τα επίπεδα της $\beta 2$ μικροσφαιρίνης. [88]

Στους ασθενείς με MDS βρέθηκε στατιστικά σημαντικά μειωμένη έκφραση του PD-1 στο σύνολο των WBC ($p = 0,041$) και αυξημένη έκφραση του δείκτη στα CD4 T ($p = 0,041$) και NK κύτταρα ($p = 0,007$). Επιπλέον, παρατηρήθηκε οριακά σημαντική αύξηση του PD-1 στα CD8 T κύτταρα ($p = 0,058$) των ασθενών με MDS. Η έκφραση του PD-L1 στα CD34(+) άωρα κύτταρα της μυελικής σειράς των ασθενών με MDS είναι σημαντικά αυξημένη από εκείνη των λεμφοκυττάρων ($p = 0,001$).

Τα ανωτέρω ευρήματα της μελέτης συμφωνούν με τα βιβλιογραφικά δεδομένα για τη συμμετοχή των PD-1/PD-L1 στην παθογένεση των MDS και AML. Οι Kondo et. al. (2010) έδειξαν σε κυτταρικές σειρές MDS και δείγματα ασθενών ότι ο PD-L1 υπερκφράζεται στα βλαστικά κύτταρα μέσω των IFN γ και TNF α . Οι ασθενείς υψηλού κινδύνου εμφάνισαν ισχυρότερη έκφραση του PD-L1 στα βλαστικά κύτταρα, γεγονός που συνδέεται με την κλινική εξέλιξη της νόσου και την καταστολή της δράσης των T κυττάρων μέσω του PD-1. [89] Οι Yang et. al. (2014) μέτρησαν τα επίπεδα του PD-L1 mRNA κατά τη διάρκεια της θεραπείας 124 ασθενών με CMML, MDS και AML. Οι ερευνητές έδειξαν ότι τα επίπεδα του PD-L1 αυξάνονται στους ασθενείς που εμφανίζουν αντίσταση στην υπομεθυλιωτική θεραπεία. Επιπλέον, ο ανοσοϊστοχημικός εντοπισμός των πρωτεϊνών PD-1 και PD-L1 στα στρωματικά και

βλαστικά κύτταρα αντίστοιχα, υποδηλώνει πιθανή συμμετοχή των PD-1/PD-L1 στην παθογένεση των MDS. [43,91,97]

Στην AML ο PD-1 υπερεκφράζεται σημαντικά στα T ($p=0,018$) και NK κύτταρα ($p=0,047$) των ασθενών, σε σχέση με τους μάρτυρες. Επιπλέον, παρατηρήθηκε οριακά σημαντική αύξηση του PD-1 στα CD8 T κύτταρα ($p=0,052$). Από τις συγκρίσεις μεταξύ των AML και MDS δεν αναδεικνύονται στατιστικά σημαντικές διαφορές ($p > 0,05$). Η έκφραση του PD-L1 στα λευχαιμικά κύτταρα της AML είναι στατιστικά σημαντικά αυξημένη, συγκριτικά με εκείνη των λεμφοκυττάρων των ασθενών ($p=0,001$). Από συγκρίσεις μεταξύ των ομάδων MDS-AML προέκυψε ότι η έκφραση του PD-L1 στα παθολογικά κύτταρα της AML είναι ισχυρότερη από εκείνη που παρατηρείται στα MDS ($p=0,021$). Αντίθετα, η έκφραση του PD-L1 στο σύνολο των WBC των ασθενών με MDS είναι σημαντικά ισχυρότερη από εκείνη των ασθενών με AML ($p=0,016$).

Σε κλινική μελέτη των Kronig et al. (2014) δεν βρέθηκαν σημαντικές διαφορές μεταξύ νεοδιαγνωσθέντων ασθενών με AML και μαρτύρων αναφορικά με τα επίπεδα του PD-L1. Στη παρούσα μελέτη δεν κατέστη δυνατόν να συγκριθεί η έκφραση του PD-L1 στα νεοπλασματικά και φυσιολογικά άωρα κύτταρα μυελικής σειράς. Όμως, οι ερευνητές διαπίστωσαν ότι ο PD-L1 υπερεκφράζεται στα άωρα κύτταρα της μυελικής σειράς μετά τη χημειοθεραπεία ή κατά την υποτροπή της νόσου μετά από αλλογενή μεταμόσχευση μυελού των οστών. [92] Η δράση των PD-L1(+) νεοπλασματικών κυττάρων κατά τη διάρκεια της θεραπείας επιδεινώνει την δυσλειτουργία των T κυττάρων μέσω του PD-1 και δυσχεραίνει τον ανοσολογικό περιορισμό της νόσου. Για την προγνωστική σημασία των παραπάνω φαινομένων στην AML εμφανίζονται αντικρουόμενες απόψεις. Οι ομάδες των Salih et al. (2006) και Huang et al. (2006) μελέτησαν λευχαιμικές κυτταρικές σειρές με κυτταρομετρία ροής και παρατήρησαν ότι ο PD-L1 υπερεκφράζεται στα κύτταρα των ασθενών με μυελομονοκυτταρική (M4) ή μονοκυτταρική (M5) AML. Το ίδιο παρατηρήθηκε και στην παρούσα μελέτη για τα ανωτέρω νοσήματα καθώς και για άλλους υποτύπους AML. [93]

Η έκφραση του PD-1 είναι αυξημένη στα WBC και στους υποπληθυσμούς των λεμφοκυττάρων των ασθενών με ALL, συγκριτικά με τους μάρτυρες. Όμως, οι συγκρίσεις μεταξύ και μαρτύρων δεν αναδεικνύουν στατιστικά σημαντικές διαφορές ($p > 0,05$). Από τις συγκρίσεις μεταξύ των AML και MDS δεν αναδεικνύονται στατιστικά σημαντικές διαφορές (p

>0,05). Η έκφραση του PD-L1 είναι εμφανώς αυξημένη στο σύνολο των WBC και τα βλαστικά κύτταρα της ALL, συγκριτικά με τα φυσιολογικά λεμφοκύτταρα. Παρ' όλα αυτά, λόγω του μικρού αριθμού των δειγμάτων δεν αναδεικνύονται στατιστικά σημαντικές διαφορές ($p > 0,05$).

Οι Burk et al. (2011) σε *in vivo* μοντέλο της B-ALL t(1;19) *E2A-PBX1* μελέτησαν τον πληθυσμό των T κυττάρων με χρήση FC και PCR. Η έκφραση των PD-L1, PD-L2 ήταν σταθερά ισχυρότερη *in vivo* και *in vitro* στα βλαστικά κύτταρα των ποντικών, συγκριτικά με τα φυσιολογικά B κύτταρα υγιών ποντικών. Κατά την εξέλιξη της νόσου παρατηρήθηκε επαγωγή της έκφρασης των *PD-1* και *TIM3* στα T κύτταρα. Παράλληλα, κλινικές μελέτες σε ασθενείς με ανθεκτικής μορφής B-ALL ανέδειξαν τη συμβολή της υπερέκφρασης του PD-L1 στην επιβίωση των λεμφοβλαστών, ειδικά μετά από την χορήγηση του διπλής ειδικότητας anti-CD3/CD19 Blinatumomab. [94,95] Ο PD-1, σύμφωνα με τους Köhnke et al. (2015), εκφράζεται μόνο στα T κύτταρα του μυελού των οστών και απουσιάζει στα κυκλοφορούντα T κύτταρα των ασθενών με ALL. [96]

Από τη μη παραμετρική συσχέτιση (Spearman) των πειραματικών αποτελεσμάτων, αναδεικνύονται ισχυρά θετικές σχέσεις μεταξύ των επιπέδων έκφρασης του PD-1 στους υποπληθυσμούς των λεμφοκυττάρων. Στην ALL τα επίπεδα του PD-1 στα B κύτταρα συμμεταβάλλονται τόσο με εκείνα για το σύνολο των T κυττάρων όσο και με εκείνα για τα CD8 T κύτταρα. Θετική συσχέτιση των επιπέδων του PD-1 μεταξύ B και NK κυττάρων παρατηρήθηκε στο MM, στην ALL και τα MDS. Συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων του PD-1 στα CD4 και CD8 T κύτταρα εμφανίζεται στα NHL, στα MDS και στην AML. Στα MDS και την ALL εμφανίζεται θετική συσχέτιση για την έκφραση του PD-1 μεταξύ των T και NK κυττάρων. Επίσης, στους ασθενείς με MDS αναδεικνύονται στατιστικά σημαντικές σχέσεις για τα επίπεδα του PD-1 μεταξύ CD4 T- NK και CD8 T-NK κυττάρων. Οι ίδιες σχέσεις μεταξύ CD4 T -NK και CD8 T-NK κυττάρων παρατηρούνται και στην ομάδα των ασθενών με ALL.

Η συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων των PD-1/PD-L1 στο σύνολο των WBC και των νεοπλασματικών κυττάρων αντίστοιχα ανά ασθενή κάθε ομάδας ανέδειξε σημαντικές σχέσεις για όλες τις ομάδες νοσημάτων εκτός της CLL. Αρνητική συσχέτιση προέκυψε για την έκφραση του PD-1 στα T κύτταρα και του PD-L1 στα μονοκλωνικά B κύτταρα των ασθενών με NHL. Στο MM παρατηρήθηκε αρνητική συσχέτιση της έκφρασης του PD-1 στα CD8 T κύτταρα με την έκφραση του PD-L1 στα λεμφωματικά κύτταρα. Παρόμοια σχέση βρέθηκε και για την έκφραση

του PD-1 στα B κύτταρα και του PD-L1 στους λεμφοβλάστες των ασθενών με ALL. Θετική συσχέτιση παρατηρήθηκε για την έκφραση του PD-1 στα CD8 T κύτταρα και του PD-L1 στους μυελοβλάστες των ασθενών με MDS. Ασθενώς θετική συσχέτιση παρατηρήθηκε μεταξύ της έκφρασης του PD-1 στα NK κύτταρα και του PD-L1 στα άωρα κύτταρα της μυελικής σειράς των ασθενών με AML. Μετά από αναζήτηση στη βιβλιογραφία δεν ανευρέθηκαν σχετικά δεδομένα από ανάλογες δημοσιεύσεις.

Στη συνέχεια, αποτελέσματα από την ανάλυση της έκφρασης των PD-1/PD-L1 συσχετίστηκαν με τα κλινικοπαθολογικά δεδομένα και τον ανοσοφαινότυπο της διάγνωσης των ασθενών. Από τη συσχέτιση της ηλικίας των ασθενών με τα επίπεδα των PD-1/PD-L1 κατά τη διάγνωση προέκυψε ισχυρά αρνητική συσχέτιση αναφορικά με τα επίπεδα του PD-1 στα B κύτταρα των ασθενών με ALL. Στην ομάδα των MDS παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική αύξηση της έκφρασης του PD-1 στα B κύτταρα των ασθενών >65 ετών. Η παρατήρηση αυτή έρχεται σε σύμπτωση με ανάλογα ευρήματα των Yang et al. (2014) σε ηλικιωμένους ασθενείς με MDS και AML. [97] Οριακά σημαντικά σχέση προέκυψε για τα μειωμένα επίπεδα του PD-L1 στο σύνολο των WBC στους ηλικιωμένους ασθενείς με AML ($p=0,055$). Ωστόσο, οι Schmoehl et al. (2016) αναφέρουν ότι το ζεύγος PD-1/PD-L1 εκφράζεται ισχυρά σε νεαρούς ασθενείς και ιδιαίτερα σε εκείνους με δευτεροπαθή AML. [98]

Τα επίπεδα του PD-L1 στα νεοπλασματικά κύτταρα συσχετίστηκαν με το ποσοστό των παθολογικών κυττάρων κατά τη διάγνωση των ασθενών. Από αυτή προέκυψε αρνητική συσχέτιση των επιπέδων του PD-L1 με το ποσοστό των άωρων κυττάρων των ασθενών με AML. Επιπλέον, αναδεικνύεται αρνητική συσχέτιση για το ποσοστό των CD34(+) βλαστικών κυττάρων των ασθενών με MDS και τα επίπεδα του PD-1 στα B, NK, T και CD8(+) T κύτταρα. Οριακά σημαντική ($r = -0,515$, $p=0,060$) θεωρείται η αρνητική συσχέτιση για τα επίπεδα του PD-1 στο σύνολο των WBC και τον αριθμό των μονοκλωνικών B κυττάρων των ασθενών με CLL.

Στους ασθενείς με οξεία λευχαιμία (AML, ALL), πραγματοποιήθηκε συσχέτιση των PD-1/PD-L1 με τον αριθμό των λευκών αιμοσφαιρίων (WBC) κατά τη διάγνωση. Παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική αρνητική συσχέτιση σειράς Spearman, η οποία επιβεβαιώθηκε και με τη δοκιμασία των Kruskal Wallis για τη σχέση του των επιπέδων του PD-L1 στους μυελοβλάστες και του αριθμού των WBC των ασθενών με AML. Σύμφωνα με αυτή, οι ασθενείς με AML και

μειωμένα WBC (< 4.000 κύτταρα/ μL) τείνουν να έχουν αυξημένα επίπεδα του PD-L1 κατά τη διάγνωση. Αντίθετα, οι ασθενείς με λευκοκυττάρωση (>10.000 κύτταρα/ μL) φαίνεται πως έχουν μειωμένα επίπεδα του PD-L1 κατά τη διάγνωση.

Τα ανωτέρω ευρήματα δεν συμφωνούν με εκείνα των Brodská et al. (2016) που συσχέτισαν τα αυξημένα επίπεδα των PD-L1 mRNAs με την παρουσία λευκοκύτταρωσης σε ασθενείς με AML. Οι ερευνητές επισημαίνουν πως στη διάγνωση της AML η έκφραση του PD-L1 είναι σχετικά ασθενής και αυξάνει κατά τη διάρκεια της θεραπείας. Με βάση τα αποτελέσματα της μελέτης προτάθηκε ότι τα αυξημένα επίπεδα του PD-L1 σε συνδυασμό με τα αυξημένα WBC διάγνωσης πιθανώς να συνδέονται με ανεπιτυχή ανταπόκριση των ασθενών στην ανοσοθεραπεία. [99] Επισημαίνεται ότι στη μελέτη των Brodská et al. (2016) χρησιμοποιήθηκε διαφορετική μεθοδολογία (Real time PCR) για τον προσδιορισμό της έκφρασης του PD-L1 στα κύτταρα των ασθενών.

Επιπρόσθετα, διερευνήθηκε η σχέση των PD-1/PD-L1 με την παρουσία θρομβοπενίας (<150.000 αιμοπετάλια/ μL) στη γενική εξέταση αίματος κατά τη διάγνωση των ασθενών με MDS και AML. Προέκυψαν σημαντικές διαφορές αναφορικά με την έκφραση του PD-1 στο σύνολο των WBC καθώς και στα CD4, CD8 T και NK κύτταρα των ασθενών με MDS (Mann Whitney U test). Η μη παραμετρική συσχέτιση σειράς Spearman με βάση τον αριθμό των αιμοπεταλίων (PLT) ανέδειξε ισχυρά αρνητική συσχέτιση μεταξύ του αριθμού των αιμοπεταλίων και της έκφρασης του PD-1 στα WBC, CD4 T, CD8 T, NK κύτταρα και επιπλέον για την έκφραση του PD-L1 στα κακοήγη κύτταρα των ασθενών με MDS. Στην AML αναδεικνύεται ασθενώς αρνητική συσχέτιση για τον αριθμό των αιμοπεταλίων και τα επίπεδα του PD-1 στο σύνολο των WBC.

Σχετικά με τις ανωτέρω παρατηρήσεις, επιστρατεύεται η μελέτη των Kubasch et al. (2017). Οι ερευνητές αναφέρουν ότι κατά τη θεραπεία ασθενούς με ιστορικό βλεννογονικού μελανώματος και δευτεροπαθούς AML με το anti-PD-1 Pembrolizumab παρατηρήθηκε υπερέκφραση του PD-L1 στα βλαστικά κύτταρα της AML. Η αύξηση της έκφρασης του PD-L1 συνοδεύθηκε με την αποκατάσταση του αριθμού των αιμοπεταλίων σε φυσιολογικά επίπεδα. [100] Οι Rofles et al. (2018) επισημαίνουν ότι ο PD-L1 εκφράζεται και στα αιμοπετάλια, γεγονός που καθιστά τον αριθμό των αιμοπεταλίων πιθανό βιοδείκτη ανταπόκρισης στην anti-PD-1/PD-L1 ανοσοθεραπεία. [101]

Οι συγκρίσεις των PD-1/PD-L1 στους ασθενείς με NHL σχετικά με το ιστολογικό τύπο της νόσου και την παρουσία του CD5 στον ανοσοφαινότυπο της νόσου, δεν ανέδειξαν στατιστικά σημαντικές διαφορές. Στο ίδιο συμπέρασμα κατέληξε και η αναζήτηση πιθανής σχέσης μεταξύ των PD-1/PD-L1 και των δεικτών CD34, CD117, η παρουσία των οποίων συνδέεται με πτωχή πρόγνωση για τους ασθενείς με MDS, AML και ALL. [102-104] Μη σημαντικές διαφορές προέκυψαν και από τη συσχέτιση των επιπέδων των PD-1/PD-L1 με την παρουσία του δείκτη ευνοϊκής πρόγνωσης CD38 στα κύτταρα των ασθενών με οξεία λευχαιμία. [105] Επιπρόσθετα, εξετάστηκε η αποκλίνουσα έκφραση αντιγονικών δεικτών (aberrant antigen expression) στα λευχαιμικά κύτταρα των ασθενών με AML και ALL με τα επίπεδα των PD-1/PD-L1. Οι ασθενείς με αποκλίνουσα έκφραση αντιγόνων (π.χ. τα λεμφοκυτταρικά αντιγόνα CD56, CD7 για την AML) παρουσιάζουν μειωμένη έκφραση του PD-L1 στα λευχαιμικά κύτταρα, συγκριτικά με τους υπόλοιπους ασθενείς. Όμως, η παρατηρούμενη διαφορά είναι οριακά σημαντική ($p=0,055$) και απαιτείται μεγαλύτερος αριθμός δειγμάτων για να διερευνηθεί η παραπάνω σχέση.

Με βάση τον καρυότυπο των νεοπλασματικών κυττάρων του μυελού των οστών έγινε κατάταξη των ασθενών με AML, ALL και MM σε ομάδες χαμηλού και υψηλού κινδύνου. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα των συγκρίσεων, η έκφραση του PD-1 είναι αυξημένη στα T λεμφοκύτταρα και μειωμένη στα B, NK κύτταρα των ασθενών με καρυότυπο υψηλού κινδύνου. Ο PD-L1 δείχνει να εκφράζεται ισχυρότερα στα κακοήγη κύτταρα των ασθενών χαμηλού κινδύνου. Εντούτοις, οι παραπάνω διαφορές δεν είναι στατιστικά σημαντικές. Σημειώνεται η παρουσία οριακά αυξημένης έκφρασης των επιπέδων του PD-1 στα NK κύτταρα των ασθενών με καρυότυπο χαμηλού κινδύνου ($p=0,056$).

Οι Chen et al. (2018) αναδεικνύουν το CD38 ως βασικό διαμεσολαβητή της αντίστασης των καρκινικών κυττάρων από συμπαγείς όγκους στην anti PD-1/PD-L1 ανοσοθεραπεία. Η ταυτόχρονη αναστολή των CD38 και PD-L1 αποκαταστέλλει την κυτταροξική δράση των T κυττάρων. [106] Αναφορικά με τον καρυότυπο του μυελού των οστών, οι Yang et al. (2016) μελέτησαν την έκφραση του PD-L1 στα μονοπύρρηνα κύτταρα του μυελού των οστών 120 ασθενών με AML χρησιμοποιώντας την FC και την Real Time RCR. Οι ερευνητές παρατήρησαν ότι τα λευχαιμικά κύτταρα από ασθενείς με κυτταρογενετικές ανωμαλίες υψηλού κινδύνου εμφανίζουν υψηλότερη έκφραση του PD-L1. Το γεγονός αυτό συνδέθηκε με πτωχή

ανταπόκριση στην θεραπεία εφόδου, πιθανώς λόγω καταστολής της αντιλευχαιμικής δράσης των CTLs. [107]

Παράλληλα, οι Dufva et al. (2016) παρατήρησαν υψηλή κυτταρολυτική ενεργότητα (αύξηση των mRNAs της περφορίνης και του κοκκιοενζύμου A) και αυξημένη έκφραση των PD-L1, PD-L2, CTLA-4 και LAG3 mRNAs σε ασθενείς υψηλού κινδύνου με σύνθετο καρυότυπο. [108] Σε παρόμοια μελέτη, οι Williams et al. (2017) χρησιμοποίησαν πολυπαραγοντική FC και μελέτησαν την έκφραση ανασταλτικών υποδοχέων στον μυελό των οστών ασθενών με AML. Οι ερευνητές αναφέρουν ότι η έκφραση του PD-L1 είναι ισχυρότερη στους ασθενείς με καρυότυπο υψηλού κινδύνου και συνδέεται με την αύξηση της διήθησης του μυελού από PD-1(+) CD8 T κύτταρα και Tregs. [109]

Στους ασθενείς με AML μελετήθηκε η πιθανότητα σχέσης της έκφρασης των PD-1/PD-L1 με την παρουσία μεταλλαγών στα γονίδια *NPM1* και *FLT3*. Η παρουσία μεταλλαγών στο *NPM1* (*Nucleophosmin 1*) συναντάται στο 20-30% των ασθενών και συνδέεται με ευνοϊκή πρόγνωση. [110] Παρατηρήθηκε μειωμένη έκφραση των PD-1/PD-L1 στους υποπληθυσμούς των T λεμφοκυττάρων και στα κακοήγη κύτταρα των ασθενών με *NPM1*(+) AML. Όμως, η παρατηρούμενη διαφορά για το PD-1 είναι μη σημαντική ($p > 0,05$) και για το PD-L1 οριακά σημαντική ($p = 0,056$).

Οι Brodská et al. (2016) μελέτησαν την έκφραση του PD-L1 σε δείγματα cDNA ασθενών με AML και συσχέτισαν την υπερέκφρασή του με την παρουσία λευκοκυττάρωσης και μεταλλαγών στο *NPM1* κατά τη διάγνωση. Σε ανακοίνωση των Williams et al. (2018), η υπερέκφραση του PD-L1 συνδέεται με την παρουσία μεταλλαγών στο ογκοκατασταλτικό γονίδιο *TP53*. [111] Παράλληλα, οι Greiner et al. (2017) ανίχνευσαν επίσης αυξημένη έκφραση του PD-L1 στους ασθενείς με *NPM1*(+) AML και διατύπωσαν την πιθανή χρήση των μεταλλαγμένων πεπτιδίων της *NPM1* ως εμβόλια σε πρωτόκολλα ανοσοθεραπείας για την εξάλειψη της MRD. [112]

Απεναντίας, η παρουσία εσωτερικών διαδοχικών διπλασιασμών (ITDs) στην κινάση τυροσίνης *FLT3* συνδέονται με επιθετική νόσο και πτωχή πρόγνωση. [78] Η παρουσία μεταλλαγών στο γονίδιο *FLT3* ανευρίσκεται στο 30% των ασθενών με AML και ελαττώνει την θετική προγνωστική αξία των μεταλλαγών του *NPM1*. Από τα αποτελέσματά των μετρήσεων,

παρατηρείται ισχυρότερη έκφραση του PD-L1 στα κακοήθη κύτταρα και ασθενέστερη έκφραση του PD-1 στα CD8 T κύτταρα των ασθενών με ITDs στο γονίδιο *FLT3* συγκριτικά με τους υπόλοιπους ασθενείς με AML. Καμία από τις παρατηρούμενες διαφορές δεν είναι στατιστικά σημαντική ($p > 0,05$), ενώ οι διαφορές για τα επίπεδα του PD-1 στα CD4 ($p = 0,064$) και CD8 T κύτταρα ($p = 0,082$) είναι οριακά σημαντικές.

Σε μαζική μελέτη της γονιδιακής έκφρασης των ασθενών με AML (transcriptomics) που διεξήχθη από τους Dufva et al. (2016) διαπιστώθηκε πως οι μεταλλαγές στο *FLT3* και στο *NPM1* συνδέονται με ήπιου βαθμού μείωση της κυτταρολυτική ικανότητα, η οποία αντικατοπτρίζεται από τα επίπεδα των mRNAs της περφορίνης (*perforin*) και του κοκκιοενζύμου A (*granzyme A*). [108] Επίσης, οι Lau et al. (2016) έδειξαν in vivo ότι η παρουσία της μεταλλαγής του *FLT3* σε ετερόζυγη μορφή επάγει τον πολλαπλασιασμό PD-L1(+) DCs. Όμως, η χορήγηση anti-PD-1 ή anti-PD-L1 mAbs οδήγησε σε σημαντική μείωση του αριθμού των αλλοενεργών T κυττάρων, κατά τη μελέτη του φαινομένου GVHD, τόσο στους φορείς της μεταλλαγής στο *FLT3* όσο και στα φυσικού τύπου (wild type) πειραματόζωα. Συνεπώς, η δράση της *FLT3*-ITD μπορεί να επηρεάζεται και από άλλα μοριακά μονοπάτια εκτός του PD-1/PD-L1. [113]

Η επιτυχής ένταξη της anti PD-1/PD-L1 ανοσοθεραπείας στην πρώτη γραμμή αντιμετώπισης των ασθενών με συμπαγείς όγκους, σήμανε την έναρξη σχετικών κλινικών δοκιμών και για τους αιματολογικούς ασθενείς. Στην παρούσα μελέτη αναδεικνύεται η συμβολή της κυτταρομετρίας ροής στη μελέτη της έκφρασης των PD-1/PD-L1 κατά την διάγνωση ασθενών με αιματολογικά νεοπλάσματα. Η μελέτη των PD-1/PD-L1, συνδυαστικά με τον ανοσοφαινότυπο του μυελού των οστών, μπορεί να συμβάλλει στην επιλογή και την εκτίμηση της κλινικής πορείας των υποψήφιων προς ανοσοθεραπεία ασθενών.

Επισημαίνεται ότι στην παρούσα μελέτη συμμετείχε περιορισμένος αριθμός ασθενών, διότι για συγκεκριμένα νοσήματα (π.χ. MM, ALL) ο αριθμός των νέων διαγνώσεων είναι μικρός. Ακόμη, η προχωρημένη ηλικία (>70 έτη) αρκετών ασθενών περιόρισε το σύνολο των μοριακών δεδομένων, διότι κατά τη διάγνωση αυτών των περιστατικών δεν διενεργείται μοριακός έλεγχος ή καρυότυπος μυελού των οστών. Επιπρόσθετα, πολλοί ασθενείς με CLL απέφυγαν την ιατρική παρακολούθηση λόγω της απουσίας κλινικών συμπτωμάτων, γεγονός που παρεμπόδισε τη συλλογή κλινικοπαθολογικών δεδομένων.

Στους μελλοντικούς στόχους για την περαιτέρω διερεύνηση της παθογενετικής δράσης των PD-1/PD-L1 στα αιματολογικά νεοπλάσματα εντάσσεται η αύξηση του αριθμού των ασθενών και των μαρτύρων της μελέτης. Παράλληλα, θα μπορούσε να μελετηθεί η έκφραση του ενδοκυττάριου του PD-1 και του διαλυτού PD-L1, δεδομένου ότι η τελευταία παράμετρος έχει άμεση κλινική αξία σε πολλά λεμφώματα. Προς επιβεβαίωση της έκφρασης των PD-1/PD-L1 θα μπορούσε να χρησιμοποιηθούν η ανοσοϊστοχημία και οι μοριακές τεχνικές (π.χ. μελέτη της έκφρασης των PD-1/PD-L1 mRNAs με Real Time PCR). Επίσης, θα μπορούσε να συγκριθεί το πρότυπο έκφρασης των δεικτών στο περιφερικό αίμα (PB) και το μυελό των οστών (BM) κάθε ασθενούς. Επιπρόσθετα, θα μπορούσε να συσχετισθεί η έκφραση των PD-1/PD-L1 με τη δράση ανοσορυθμιστικών κυττάρων όπως τα Tregs και τα MDSCs.

Μέχρι στιγμής, υπάρχει περιορισμένος αριθμός δημοσιεύσεων στη διεθνή βιβλιογραφία σχετικά με τη δράση των PD-1/PD-L1 στα κακοήγη αιματολογικά νοσήματα. Απαιτούνται επιπλέον μελέτες για την κατανόηση των αλληλεπιδράσεων μεταξύ των PD-1/PD-L1 και άλλων ανοσολογικών τελεστών κατά την παθογένεση και εξέλιξη των αιματολογικών νεοπλασμάτων.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Errante, P.R., Ebbing, P.C, Menezes Rodrigues, F.S., Nogueira Ferraz, R.R. and da Silva, N.P., 2016, Flow cytometry: a literature review. doi:10.13140/RG.2.1.2461.0969
2. Henel, G. and Schmitz, J., 2007, Basic Theory and Clinical Applications of Flow Cytometry. *Lab. Med.*, **38**, 428–436.
3. Brown, M. and Wittwer, C., 2000, Flow cytometry: Principles and clinical applications in hematology. *Clin. Chem.*, **46**, 1221–1229.
4. Silveira, G.F., 2015, Evolution of Flow Cytometry Technology. *J. Microb. Biochem. Technol.*, **07**, 213–216.
5. Adan, A., Alizada, G., Kiraz, Y., Baran, Y. and Nalbant, A., 2017, Flow cytometry: basic principles and applications. *Crit. Rev. Biotechnol.*, **37**, 163–176.
6. Ψαρρά, Κ., Καψιμάλη, Β., Κώνστα, Ε. και Βικεντίου Μ., in Κλινικό Φροντιστήριο ‘Κυτταρομετρία Ροής: Κλινικές και Ερευνητικές Εφαρμογές’, 1–9 (2007).
7. <https://www.beckman.com/coulter-flow-cytometers/navios> (τελευταία επίσκεψη Σεπτέμβριος 2018).
8. Betters, D.M., 2015, Use of Flow Cytometry in Clinical Practice. *J. Adv. Pract. Oncol.*, **6**, 435–440.
9. BD Biosciences, Introduction to Flow Cytometry - A Learning Guide. *Methods* (San Diego, Calif.) **21**, 29 (2000).
10. Virgo, P.F. and Gibbs, G.J., 2012, Flow cytometry in clinical pathology. *Ann. Clin. Biochem.*, **49**, 17–28.
11. Ψαρρά, Κ., Καψιμάλη, Β., Κώνστα, Ε. και Βικεντίου, Μ. Κλινικό Φροντιστήριο “Κυτταρομετρία Ροής: Κλινικές και Ερευνητικές Εφαρμογές”. in Ημερίδα Κυτταρομετρίας Ροής, 13–18 (2007).
12. Ψαρρά, Κ., Καψιμάλη, Β., Κώνστα, Ε. και Βικεντίου, Μ. “Κυτταρομετρία Ροής: Κλινικές και Ερευνητικές Εφαρμογές”. in Ημερίδα Κυτταρομετρίας Ροής, 19–77 (2007).
13. Olsen, M., in Hematologic Malignancies in Adults. 1st ed, Pittsburgh, Pennsylvania, 2013, ch. 1, pp. 1-17.
14. Kindt, T.J., Osborne, B.A., Goldsby, R. A. in Kuby Immunology, eds. Πασχαλίδης-Broken Hill Publishers Ltd, 2nd ed, Nicosia, Cyprus, 2013, pt.1, ch. 2, pp. 27–30.

15. Al Ustwania, O., Guptab, N., Bakhribaha, H., Griffithsa, E., Wanga, E. and Wetzler, M., 2016, Clinical updates in adult acute lymphoblastic leukemia. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.*, **99**, 189–199.
16. Arber D.A., Orazi A., Hasserjian, R., Thiele, J., Borowitz, M.J., Le Beau, M.M., Bloomfield, C.D., Cazzola, M. and Vardiman J.W., 2016, The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood*, **127**, 2391–2406.
17. De Kouchkovsky, I. and Abdul-Hay, M., 2016, ‘Acute myeloid leukemia: A comprehensive review and 2016 update’. *Blood Cancer J.*, **6**, 441-451.
18. Χατζημιχαήλ, Ε., Παπαθανασίου, Κ. και Μαρινάκης Θ., 2016, Νέα Ταξινόμηση και Προγνωστικοί Δείκτες στην Οξεία Μυελογενή Λευχαιμία. *Haema*, **8**, 147–167.
19. Kabel, A.M., Zamzami, F., Al-Talhi, M., Al-Dwila, K. and Hamza, R., 2017, Acute Myeloid Leukemia: A focus on Risk Factors, Clinical Presentation, Diagnosis and Possible Lines of Management. *J. Cancer Res., Treat.* **5**, 62-67.
20. Montalban-Bravo, G. and Garcia-Manero, G., 2018, Myelodysplastic syndromes: 2018 update on diagnosis, risk-stratification and management. *Am. J. Hematol.*, **93**, 129–147.
21. <https://emedicine.medscape.com/article/207347-overview> (τελευταία επίσκεψη Σεπτέμβριος 2018).
22. Malcovati, L. and Nimer, S.D., 2008, Myelodysplastic syndromes: diagnosis and staging. *Cancer Control*, **15**, Suppl, 4–13.
23. Πάγκαλης Γ.Α., in Αιματολογία στην κλινική πράξη, eds. Πασχαλίδης, 2nd ed, Athens, Greece, 2008, ch. 36, pp. 640–657.
24. <https://accessmedicine.mhmedical.com> (τελευταία επίσκεψη Σεπτέμβριος 2018).
25. Kipps, T.J., Stevenson, F.K., Wu, C.J., Croce, C.M., Packham, G., William, G.W., O’Brien, S., Gribben, J. and Kanti, R., 2017, Chronic lymphocytic leukaemia. *Nat. Rev. Dis. Prim.*, **3**, 16096.
26. Nogai, H., Dörken, B. and Lenz, G., 2011, Pathogenesis of non-Hodgkin’s lymphoma. *J. Clin. Oncol.*, **29**, 1803–1811.
27. Shaji, K.K., Rajkumar, V., Robert A.K., van Duin, M., Sonneveld, P., Mateos, M.V., Gay, F. and Anderson, K.C., 2017, Multiple myeloma. *Nat. Rev. Dis. Prim.*, **3**, 1–20.
28. Gajendra, S., 2016, Flow cytometry in Acute Leukemia, *Clinics in Oncology*, **1**, 8–10.

29. Peters, J.M. and Ansari, M.Q., 2011, Multiparameter flow cytometry in the diagnosis and management of acute leukemia. *Arch. Pathol. Lab. Med.*, **135**, 44–54.
30. Πάγκαλης Γ.Α., in *Αιματολογία στην κλινική πράξη*, eds. Πασχαλίδης, 2nd ed, Athens, Greece, 2008, ch. 32, pp. 583–600.
31. Πάγκαλης Γ.Α., in *Αιματολογία στην κλινική πράξη*, eds. Πασχαλίδης, 2nd ed, Athens, Greece, 2008, ch. 53, pp. 795–809.
32. Bento, L.C., Correia, R.P., Pitangueiras Mangureira, C.L., De Souza Barroso, R., Agostini Rocha, F., Strachman Bacal, N. and Cavaleiro Marti, L., 2017, The Use of Flow Cytometry in Myelodysplastic Syndromes: A Review. *Front. Oncol.*, **7**, 1-13.
33. Πάγκαλης Γ.Α., in *Αιματολογία στην κλινική πράξη*, eds. Πασχαλίδης, 2nd ed, Athens, Greece, 2008, ch. 29, pp. 537–563.
34. Πάγκαλης Γ.Α., in *Αιματολογία στην κλινική πράξη*, eds. Πασχαλίδης, 2nd ed, Athens, Greece, 2008, ch. 31, pp. 568–582.
35. Rezaeeyan, H., Hassani, S. N., Barati, M., Shahjahani, M. & Saki, N., 2017, PD-1/PD-L1 as a prognostic factor in leukemia. *J. Hematop.*, **10**, 17–24.
36. Knaus, H. A., Kanakry, C. G., Luznik, L. and Gojo, I., 2017, Immunomodulatory Drugs: Immune Checkpoint Agents in Acute Leukemia. *Curr. Drug Targets*, **18**, 315–331.
37. Bryan, L. J. and Gordon, L.I., 2015, Blocking tumor escape in hematologic malignancies: The anti-PD-1 strategy. *Blood Rev.*, **29**, 25–32.
38. Jelinek, T., Mihalyova, J., Kascak, M., Duras, J. and Hajek, R., 2017, PD-1/PD-L1 inhibitors in haematological malignancies: update 2017. *Immunology*, **152**, 357–371.
39. Nishimura, H. and Honjo, T., 2001, PD-1: An inhibitory immunoreceptor involved in peripheral tolerance. *Trends Immunol.*, **22**, 265–268.
40. Ilcus, C., Bagacean, C., Tempescul, A., Popescu, C., Parvu, A., Cenariu, M., Bocsan, C. and Zdrengeha, M., 2017, Immune checkpoint blockade: The role of PD-1-PD-L axis in lymphoid malignancies. *Onco. Targets. Ther.* **10**, 2349–2363.
41. Balar, A.V. and Weber, J.S., 2017, PD-1 and PD-L1 antibodies in cancer: current status and future directions. *Cancer Immunol. Immunother.* **66**, 551–564.
42. Ok, C.Y. and Young, K.H., 2017, Checkpoint inhibitors in hematological malignancies. *J. Hematol. Oncol.* **10**, 103-119.

43. Nguyen, L.T. and Ohashi, P.S., 2015, Clinical blockade of PD1 and LAG3-potential mechanisms of action. *Nat. Rev. Immunol.*, **15**, 45–56.
44. Sui, X., Ma, J., Weidong, H., Wang, X., Fang, Y., Li, D., Pan, H. and Zhang, L., 2015, The anticancer immune response of anti-PD-1/PD-L1 and the genetic determinants of response to anti-PD-1/PD-L1 antibodies in cancer patients. *Oncotarget*, **6**, 19393–19404.
45. Shi, L., Chen, S., Yang, L. and Li, Y., 2013, The role of PD-1 and PD-L1 in T-cell immune suppression in patients with hematological malignancies. *J. Hematol. Oncol.*, **6**, 74-79.
46. Postow, M.A., Callahan, M.K. and Wolchok, J.D., 2015, Immune checkpoint blockade in cancer therapy. *J. Clin. Oncol.*, **33**, 1974–1982.
47. Pianko, M.J., Liu, Y., Bagchi, S. and Lesokhin, A.M., 2017, Immune checkpoint blockade for hematologic malignancies: a review. *Stem Cell Investig.*, **4**, 32–32.
48. Juárez-Salcedo, L.M., Sandoval-Sus, J., Sokol, L., Chavez, J.C. and Dalia, S., 2017, The role of anti-PD-1 and anti-PD-L1 agents in the treatment of diffuse large B-cell lymphoma: The future is now. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.*, **113**, 52–62.
49. Goodman, A., Patel, S.P. and Kurzrock, R., 2017, PD-1–PD-L1 immune-checkpoint blockade in B-cell lymphomas. *Nat. Rev. Clin. Oncol.*, **4**, 203-220.
50. Iwai, Y., Hamanishi, J., Chamoto, K. and Honjo, T., 2017, Cancer immunotherapies targeting the PD-1 signaling pathway. *J. Biomed. Sci.*, **24**, 1–11.
51. Sharpe, A.H. and Pauken, K.E., 2018, The diverse functions of the PD1 inhibitory pathway. *Nat. Rev. Immunol.* **18**, 153–167.
52. Rezaeeyan, H., Hassani, S.N., Barati, M., Shahjahani, M. and Saki, N., 2017, PD-1/PD-L1 as a prognostic factor in leukemia. *J. Hematop.*, **10**, 17–24.
53. Shi, L., Chen, S., Yang, L. and Li, Y., 2013, The role of PD-1 and PD-L1 in T-cell immune suppression in patients with hematological malignancies. *J. Hematol. Oncol.*, **6**, 74-79.
54. Alsaab, H.O. Sau, S., Alzhrani, R. Tatiparti, K., Bhise, K., Kashaw, S.K. and Iyer, A.K., 2017, PD-1 and PD-L1 checkpoint signaling inhibition for cancer immunotherapy: mechanism, combinations, and clinical outcome. *Front. Pharmacol.*, **8**, 1–15.
55. Kindt, T.J., Osborne, B.A., Goldsby, R. A. in *Kuby Immunology*, eds. Πασχαλίδης-Broken Hill Publishers Ltd, 2nd ed, Nicosia, Cyprus, 2013, Appendix I, pp. 701–740.

56. Campagnari, F., Bombardieri, E., de Braud, F., Baldini, L. and Maiolo, A.T., 1987, Terminal deoxynucleotidyl transferase, TdT, as a marker for leukemia and lymphoma cells. *Int. J. Biol. Markers*, **1**, 31-42.
57. Patel, K.P., Khokhar, F.A., Muzzafar, T., Ravandi, F., Bueso-Ramos, C and Medeiros L.J., 2013, TdT expression in acute myeloid leukemia with minimal differentiation is associated with distinctive clinicopathological features and better overall survival following stem cell transplantation. *Mod. Pathol.*, **2**, 195–203.
58. Deans, J.P. and Polyak, M.J., 2008, FMC7 is an epitope of CD20, *Blood*. **111**, 2492.
59. Prieto, C., López-Millán, B., Roca-Ho, H., Stam, R.W., Romero-Moya, D., Rodríguez-Baena, F.J., Sanjuan-Pla, A., Ayllón, V., Ramírez, M., Bardini, M., De Lorenzo, P., Valsecchi, M.G., Stanulla, M., Iglesias, M., Ballerini, P., Carcaboso, Á.M., Mora, J., Locatelli, F., Bertaina, A., Padilla, L., Carlos Rodríguez-Manzaneque, L., Bueno, C. and Menéndez, P., 2018, NG2 antigen is involved in leukemia invasiveness and central nervous system infiltration in MLL-rearranged infant B-ALL. *Leukemia*, **3**, 633–644.
60. Miettinen, M. and Lasota, J., 2005, KIT (CD117): a review on expression in normal and neoplastic tissues, and mutations and their clinicopathologic correlation. *Appl. Immunohistochem. Mol. Morphol.* **3**, 205-20.
61. Kim, Y., Yoon, S., Kim, S.J., Kim, J.S., Cheong, J.W. and Min, Y.H., 2012, Myeloperoxidase Expression in Acute Myeloid Leukemia Helps Identifying Patients to Benefit from Transplant. *Yonsei Med. J.*, **3**, 530–536.
62. Knapp, W., Strobl, H. and Majdic, O., 1994, Flow cytometric analysis of cell-surface and intracellular antigens in leukemia diagnosis. *Cytometry*, **4**, 187-98.
63. <http://www.bdbiosciences.com/us/instruments/research/cell-analyzers/bd-facsanto-ii/> (τελευταία επίσκεψη Σεπτέμβριος 2018).
64. <https://www.beckman.com/reagents/coulter-flow-cytometry/sample-preparation/lysis-without-permeabilization> (τελευταία επίσκεψη Σεπτέμβριος 2018).
65. <https://www.bc-cytometry.com/PDF/DataSheet/B53328DS.pdf> (τελευταία επίσκεψη Σεπτέμβριος 2018).
66. <https://www.bc-cytometry.com/PDF/DataSheet/B53309DS.pdf> (τελευταία επίσκεψη Σεπτέμβριος 2018).

67. <https://www.beckman.com/reagents/coulter-flow-cytometry/antibodies-and-kits/clinical-research-systems-and-kits/> (τελευταία επίσκεψη Σεπτέμβριος 2018).
68. <http://www.bdbiosciences.com/ds/is/tds/23-3483.pdf> (τελευταία επίσκεψη Σεπτέμβριος 2018).
69. Kakkas, I., 2011, The contribution of serum free light chain assay in the prognostic classification and monitoring of plasma cell disorders. Archives of Hellenic Medicine, **3**, 372–378.
70. Alinari, L., Gru, A., Quinion, C., Huang, Y., Jones, J.A., Devine, S.M., Maddocks, K.J., Christian, B., Baiocchi R.A. and Blum, K.A., 2014, Poor Prognostic Effect of CD5 Positivity for Patients with Diffuse Large B-Cell Lymphoma: Results from a Retrospective Single Institution Analysis. Blood, **124**, 1700.
71. Schuurhuis, G.J., Kelder, A., Terwijn, M., Rutten, A.P., Smit, L., Zweegman, S., and Ossenkoppele, G., 2010, The Prognostic Value of CD34 Expression in Acute Myeloid Leukemia. A Mystery Solved, Blood, **21**, 2725.
72. Jiang, Z., Wu, D., Lin, S. and Li, P., 2016, CD34 and CD38 are prognostic biomarkers for acute B lymphoblastic leukemia, Biomark Res., **4**: 23.
73. Sperling, C., Schwartz, S., Büchner, T., Thiel, E. and Ludwig W.D., 1997, Expression of the stem cell factor receptor C-KIT (CD117) in acute leukemias. Haematologica, **5**, 617-621.
74. Alegretti, A.P., Bittar, C.M., Bittencourt, R., Piccoli, A.K., Schneider, L., Silla, L.M., Dal Bó, S. and Xavier, R.M. (2011). The expression of CD56 antigen is associated with poor prognosis in patients with acute myeloid leukemia. Rev. Bras. Hematol. Hemoter., **3**, 202–206.
75. Ball, E.D., Davis, R.B., Griffin, J.D., Mayer, R.J., Davey, F.R., Arthur, D.C., Wurster-Hill, D., Noll, W., Elghetany, M.T. and Allen, S.L., 1991, Prognostic value of lymphocyte surface markers in acute myeloid leukemia. Blood, **10**, 2242-50.
76. Del Poeta, G., Stasi, R., Venditti, A., Cox, C., Aronica, G., Masi, M., Bruno, A., Simone, M.D., Buccisano, F. and Papa G., 1995, CD7 expression in acute myeloid leukemia. Leuk Lymphoma, **1-2**, 111-9.

77. Heath, E.M., Chan, S.M., Minden, M.D., Murphy, T., Shlush, L.I. and Schimmer, A.D., 2017, Biological and clinical consequences of NPM1 mutations in AML. *Leukemia*, **4**, 798-807.
78. Levis, M., 2011, FLT3/ITD AML and the law of unintended consequences. *Blood*, **26**, 6987-6990.
79. Annibaldi, O., Crescenzi, A., Tomarchio, V., Pagano, A., Bianchi, A., Grifoni, A. and Avvisati, G., 2018, PD-1 /PD-L1 checkpoint in hematological malignancies. *Leuk. Res.* **67**, 45–55.
80. Su, P., Burk, C., Fix, W., Qin, H.Y. and Terry, F., 2012, Progression of acute lymphoblastic leukemia (ALL) results in compartment-restricted T cell expression of PD-1 and T cell dysfunction (46.22). *J Immunol.*, **188**, (1 Supplement) 46.22.
81. Grzywnowicz, M., Karabon, L., Karczmarczyk, A., Zajac, M., Skorka, K., Zaleska, J., Wlasiuk, S.C., Tomczak, W., Bojarska-Junak, A., Dmoszynska, A., Frydecka, I. and Giannopoulos, K., 2015, The function of a novel immunophenotype candidate molecule PD-1 in chronic lymphocytic leukemia. *Leuk. Lymphoma*, **56**, 2908–2913.
82. Tonino, S.H., Sanne, H., van de Berg, P.J. Yong, S.L., Ten Berge, I.J., Kersten, M.J., van Oers, R.A.W., Kater, M.H. and Arnon, P., 2012, Expansion of effector T cells associated with decreased PD-1 expression in patients with indolent B cell lymphomas and chronic lymphocytic leukemia. *Leuk. Lymphoma*, **53**, 1785–1794.
83. Andorsky, D.J., Yamada, R.E., Said, J., Pinkus, G.S., Betting, D.J. and Timmerman, J.M., 2011, Programmed death ligand 1 is expressed by non-Hodgkin lymphomas and inhibits the activity of tumor-associated T cells. *Clin. Cancer Res.*, **17**, 4232–4244.
84. Liu, J., Hamrouni, A., Wolowiec, D., Coiteux, V., Kuliczowski, K., Hetuin, D., Saudemont, A. and Quesnel, B., 2007, Plasma cells from multiple myeloma patients express B7-H1 (PD-L1) and increase expression after stimulation with IFN- γ and TLR ligands via a MyD88-, TRAF6-, and MEK-dependent pathway. *Blood*, **1**:296-304.
85. Ostrand-Rosenberg S., Horn, L.A. and Haile S.T., 2014, The programmed death-1 immune-suppressive pathway: barrier to antitumor immunity. *J Immunol.*, **8**, 3835-41.

86. Okazaki, T., Chikuma, S., Iwai, Y., Fagarasan, S. and Honjo, T., 2013, A rheostat for immune responses: The unique properties of PD-1 and their advantages for clinical application. *Nat. Immunol.*, **14**, 1212–1218.
87. Zhu, X. and Lang, J., 2017, Soluble PD-1 and PD-L1: predictive and prognostic significance in cancer. *Oncotarget*, **8**, 97671–97682.
88. Jelinek, T., Mihalyova, J., Kascak, M., Duras, J. and Hajek, R., 2017, PD-1/PD-L1 inhibitors in haematological malignancies: update 2017. *Immunology*, **152**, 357–371.
89. Kondo, A., Yamashita, T., Tamura, H., Zhao, W., Tsuji, T., Shimizu, M., Shinya, E., Takahashi, H., Tamada, K., Chen, L., Dan, K. and Ogata, K., 2010, Interferon-gamma and tumor necrosis factor-kappa B induce an immunoinhibitory molecule, B7-H1, via nuclear factor-alfaB activation in blasts in myelodysplastic syndromes. *Blood*, **116**, 1124–1131.
90. Tsirigotis, P., Savani, B.N. and Nagler, A., 2016, Programmed death-1 immune checkpoint blockade in the treatment of hematological malignancies. *Ann. Med.*, **48**, 428–439.
91. You, E., Park, C.J., Cho, Y.U., Yoon, C.H., Jang, S., Joon Im, H., Jin Seo, J., Lee, J.H., Lee, K.J., Proceedings of the 22nd EHA Congress, Poster E909 (2017).
92. Sehgal, A., Whiteside, T.L. and Boyiadzis, M., 2015, Programmed death-1 checkpoint blockade in acute myeloid leukemia. *Expert Opin. Biol. Ther.*, **15**, 1191–1203.
93. Chen, X. Liu, S., Wang, L., Zhang, W., Ji, Y. and Ma, X., 2008, Clinical significance of B7-H1 (PD-L1) expression in human acute leukemia. *Cancer Biol. Ther.*, **7**, 622–7.
94. Feucht, J., Kayser, S., Gorodezki, D., Hamieh, M., Döring, M., Blaesche, F., Schlegel, P., Bösmüller, H., Quintanilla-Fend, L., Ebinger, M., Lang, P., Handgretinger, R. and Feuchtinger, T., 2016, T-cell responses against CD19+ pediatric acute lymphoblastic leukemia mediated by bispecific T-cell engager (BiTE) are regulated contrarily by PD-L1 and CD80/CD86 on leukemic blasts. *Oncotarget*, **47**, 76902-76919.
95. Feuchtinger, T., Feucht, J., Kayser, S., Gorodezki, D., Döring, M., Blaesche, F., Bösmüller, H., Quintanilla-Fend, L., Schlegel, P., Ebinger, M., Lang, P.J. and Handgretinger R., 2015, Leukemia Related Co-Stimulation / Co-Inhibition Predict T-Cell Attack of Acute Lymphoblastic Leukemia Mediated by Blinatumomab, *Blood*, **126**, 3764.

96. Köhnke, T., Krupka, C., Tischler, J., Knösel, T. and Subklewe, M., 2015, Increase of PD-L1 expressing B-precursor ALL cells in a patient resistant to the CD19/CD3-bispecific T cell engager antibody blinatumomab. *Journal of Hematology & Oncology*, **8**, 111-115.
97. Yang, H., Bueso-Ramos, C., DiNardo, C., Estecio, M.R., Davanlou, M., Geng, Q.R., Garcia-Manero, G. (2014). Expression of PD-L1, PD-L2, PD-1 and CTLA4 in myelodysplastic syndromes is enhanced by treatment with hypomethylating agents. *Leukemia*, **6**, 1280–1288.
98. Schmohl, J.U., Nuebling, T., Wild, J., Kroell, T., Kanz, L., Salih, H.R. and Schmetzer, H., 2016, Expression of RANK-L and in part of PD-1 on blasts in patients with acute myeloid leukemia correlates with prognosis. *Eur J Haematol.*, **20166**, 517-527.
99. Brodská, B., Fuchs, O., Otevřelová, P., Salek, C. and Kuželová, K., 2016, PD-L1 is Frequently Expressed in Acute Myeloid Leukemia Patients with Leukocytosis. *Blood*, **22**, 5229.
100. Kubasch, A.S., Wehner, R., Bazzurri, S., Tunger, A., Stasik, S., Garzarolli, M., Meinel, J., Baretton, G., Meier, F., Thiede, C., Schmitz, M. and Platzbecker, U., 2018, Clinical, molecular, and immunological responses to pembrolizumab treatment of synchronous melanoma and acute myeloid leukemia. *Blood Advances*, **11**, 1187–1190.
101. Rolfes, V., Idel, C., Pries, R., Plötze-Martin, K., Habermann, J., Gemoll, T., Bohnet, S., Latz, E., Ribbat-Idel, J., Franklin, B.S. and Wollenberg, B., 2018, PD-L1 is expressed on human platelets and is affected by immune checkpoint therapy. *Oncotarget*, **44**, 27460–27470.
102. Schuurhuis, G. J., Kelder, A., Terwijn, M., Rutten, A. P., Smit, L., Zweegman, S., & Ossenkoppele, G. (2010). The Prognostic Value of CD34 Expression in Acute Myeloid Leukemia. A Mystery Solved. *Blood*, **21**, 2725.
103. Sperling, C., Schwartz, S., Büchner, T., Thiel, E., Ludwig, W.D., 1997, Expression of the stem cell factor receptor C-KIT (CD117) in acute leukemias. *Haematologica*, **5**, 617-21.
104. Wells, S.J., Bray, R.A., Stempora, L.L., Farhi, D.C., 1996, CD117/CD34 expression in leukemic blasts. *Am J Clin Pathol.*, **2**, 192-5.
105. Keyhani, A., Huh, Y.O., Jendiroba, D., Pagliaro, L., Cortez, J., Pierce, S., Pearlman, M., Estey, E., Kantarjian, H. and Freireich E.J., 2000, Increased CD38

- expression is associated with favorable prognosis in adult acute leukemia. *Leuk Res.*, **2**, 153-9.
106. Chen, L., Diao, L., Yang, Y., Yi, X., Rodriguez, B.L., Li, Y., Villalobos, P.A., Cascone, T., Liu, X., Tan, L., Lorenzi, P.L., Huang, A., Zhao, Q., Peng, D., Fradette, J.J., Peng, D.H., Ungewiss, C., Roybal, J., Tong, P., Oba, J., Skoulidis, F., Peng, W., Carter B.W., Gay, C.M., Fan, Y., Class, C.A., Zhu, J., Rodriguez-Canales, J., Kawakami, M., Byers, L.A., Woodman, S.E., Papadimitrakopoulou, V.A., Dmitrovsky, E., Wang, J., Ullrich, S.E., Wistuba, I.I., Heymach, J.V., Qin, F.X. and Gibbons D.L., 2018, CD38-Mediated Immunosuppression as a Mechanism of Tumor Cell Escape from PD-1/PD-L1 Blockade. *Cancer Discov.*, **9**, 1156-1175.
 107. Yang, S. and Huang, X.J., 2016, the Poorer-Risk AML, the Weaker Immunologic Surveillance? --Higher PD-L1 Expression on Non-APL AML Cells Is Associated with Poorer Risk Status According to Cytogenetics and Molecular Abnormalities. *Blood*, **22**, 1619.
 108. Dufva, O., Pölönen, P., Keränen, M.A., Liuksiala, T., Lin, J., Mehtonen, J., Häyrynen, S., Granberg, K., Nykter, M., Lohi, O., Heinäniemi, M. and Mustjoki, S., 2016, Pan-Hematopoietic Cancer Gene Expression Analysis Identifies Immunologically Active Acute Myeloid Leukemia Subtypes. *Blood*, **22**, 1725.
 109. Williams, P., Basu, S., Garcia-Manero, G., Cortes, J.E., Ravandi, F., Al-Hamal, Z., Konopleva, M., Ning, J., Xiao, L., Hidalgo Lopez, J., Kornblau, S., Andreeff, M., Flores, W., Bueso-Ramos, C.E., Somani, N., Blando, J., Alatrash, G., Allison, J.P., Kantarjian, H.M., Sharma, P. and Daver, N., 2017, Checkpoint Expression By Acute Myeloid Leukemia (AML) and the Immune Microenvironment Suppresses Adaptive Immunity. *Blood*, **130** (Suppl 1), 185.
 110. Heath, E.M., Chan, S.M., Minden, M.D., Murphy, T., Shlush, L.I. and Schimmer, A.D., 2017, Biological and clinical consequences of NPM1 mutations in AML. *Leukemia*. **4**, 798-807.
 111. Williams, P., Basu, S., Garcia-Manero, G., Cortes, J.E., Ravandi, F., Jabbour, E., Al-Hamal, Z., Konopleva, M., Ning, J., Xiao, L., Hidalgo Lopez, J., Kornblau, S., Andreeff, M., Bueso-Ramos, C.E., Blando, J.M., Alatrash, G., Allison, J.P., Kantarjian,

H.M., Sharma, P. and Daver, N.V., Proceedings of the 2018 ASCO Annual Meeting, Abstract 7016, (2018).

112. Greiner, J., Hofmann, S., Schmitt, M., Götz, M., Wiesneth, M., Schrezenmeier, H., Bunjes, D., Döhner, H. and Bullinger, L., 2017, Acute myeloid leukemia with mutated nucleophosmin 1: an immunogenic acute myeloid leukemia subtype and potential candidate for immune checkpoint inhibition. *Haematologica*, **12**, e499-e501.
113. Lau, C.M., Nish, S.A., Yogev, N., Waisman, A., Reiner, S.L., and Reizis, B., 2016, Leukemia-associated activating mutation of Flt3 expands dendritic cells and alters T cell responses. *J Exp Med.*, **3**, 415–431.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ
ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΩΝ PD-1/PD-L1 ΣΕ ΚΑΚΟΗΘΗ
ΑΙΜΑΤΟΛΟΓΙΚΑ ΝΟΣΗΜΑΤΑ

Αθανάσιος Δοδόπουλος

Σημαντικό ποσοστό ασθενών με κακοήθη αιματολογικά νοσήματα δεν ανταποκρίνεται στην θεραπεία ή υποτροπιάζει μετά την πρώτη ύφεση της νόσου. Η αλληλεπίδραση των PD-1/PD-L1 συγκαταλέγεται στους πιθανούς τρόπους διαφυγής των νεοπλασματικών κυττάρων από την ανοσοεπιτήρηση. Η δυσλειτουργία των T λεμφοκυττάρων οφείλεται στη δράση του υποδοχέα PD-1 (Programmed Death-1), ο οποίος επάγεται από τον συνδέτη PD-L1 (Programmed Death Ligand-1) που υπερεκφράζουν τα κακοήθη κύτταρα.

Σκοπός της παρούσης εργασίας είναι η μελέτη της έκφρασης του PD-1 στα λεμφοκύτταρα καθώς και του PD-L1 στα νεοπλασματικά κύτταρα ασθενών με αιματολογικά νεοπλάσματα με πολυπαραμετρική κυτταρομετρία ροής. Η έκφραση των PD-1/PD-L1 μελετήθηκε συνολικά σε 117 ασθενείς και 15 μάρτυρες. Η ομάδα των ασθενών αποτελείται από 20 ασθενείς με Χρόνια Λεμφοκυτταρική Λευχαιμία (CLL-SLL), 19 με Non Hodgkin Λεμφώματα (NHL), 10 με Πολλαπλό Μυέλωμα (MM), 18 με Μυελοδυσπλαστικά Σύνδρομα (MDS), 41 με Οξεία Μυελογενή Λευχαιμία (AML) και 9 ασθενείς με Οξεία Λεμφοβλαστική Λευχαιμία (ALL). Για την μελέτη του PD-L1 στα κακοήθη κύτταρα και του PD-1 στους υποπληθυσμούς των λεμφοκυττάρων σχεδιάστηκε πρωτόκολλο πενταπλού και επταπλού φθορισμού αντίστοιχα.

Η έκφραση του PD-1 διαφέρει σημαντικά μεταξύ ασθενών και μαρτύρων. Η έκφραση του PD-1 στους υποπληθυσμούς των λεμφοκυττάρων είναι στατιστικά σημαντικά αυξημένη στα NHL (στα CD4, CD8 T κύτταρα), MDS (στα CD4 T, NK κύτταρα) και την AML (στα T, NK κύτταρα). Η έκφραση του PD-1 μεταξύ των υποπληθυσμών των λεμφοκυττάρων (B, CD4 T, CD8 T, NK) εμφανίζει ισχυρά θετική συσχέτιση ($r > 0.5$, $p < 0.05$) στις ομάδες των ALL, MM, MDS, NHL και AML.

Η έκφραση του PD-L1 είναι σημαντικά ισχυρότερη στα κακοήθη κύτταρα των NHL, CLL, MM, MDS και AML ($p=0,001$) σε σχέση με τα λεμφοκύτταρα. Η συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων των PD-1/PD-L1 ανά ασθενή κάθε ομάδας ανέδειξε σημαντικές σχέσεις, σε όλες τις ομάδες των ασθενών εκτός από το MM.

Στην ALL, τα επίπεδα του PD-1 στα B κύτταρα εμφανίζουν αρνητική συσχέτιση με την ηλικία των ασθενών. Στην ομάδα των MDS παρατηρήθηκε υπερέκφραση του PD-1 στα B κύτταρα των ασθενών >65 ετών. Το ποσοστό των νεοπλασματικών κυττάρων των ασθενών με MDS και AML εμφανίζει αρνητική συσχέτιση με τα επίπεδα του PD-1 (στα B, NK, CD8 T και τα ολικά T κύτταρα) και PD-L1 αντίστοιχα.

Οι ασθενείς με AML και μειωμένα WBC (< 4.000 κύτταρα/ μL) τείνουν να έχουν αυξημένα επίπεδα του PD-L1 κατά τη διάγνωση, σε σχέση με τους ασθενείς με λευκοκυττάρωση (>10.000 κύτταρα/ μL). Οι ασθενείς με MDS και θρομβοπενία (<150.000 αιμοπετάλια/ μL) στη διάγνωση φέρουν αυξημένα επίπεδα του PD-1, συγκριτικά με τους ασθενείς με φυσιολογικό αριθμό αιμοπεταλίων. Οι ασθενείς με AML που εκφράζει λεμφοκυτταρικά αντιγόνα (π.χ. CD56, CD7) παρουσιάζουν μειωμένη έκφραση του PD-L1 στα λευχαιμικά κύτταρα, συγκριτικά με τους υπόλοιπους ασθενείς. Όμως, η παρατηρούμενη διαφορά είναι οριακά σημαντική ($p=0,055$) και απαιτείται μεγαλύτερος αριθμός δειγμάτων για να διερευνηθεί η παραπάνω σχέση.

Η έκφραση του PD-1 είναι αυξημένη στα T λεμφοκύτταρα και μειωμένη στα B, NK κύτταρα των ασθενών με καρυότυπο υψηλού κινδύνου. Ο PD-L1 δείχνει να εκφράζεται ισχυρότερα στα κακοήθη κύτταρα των ασθενών με καρυότυπο χαμηλού κινδύνου. Όμως, οι παραπάνω διαφορές είναι στατιστικά μη σημαντικές ($p >0,05$). Στους ασθενείς με *NPM1*(+) AML, παρατηρήθηκε μειωμένη έκφραση των PD-1 και PD-L1 στους υποπληθυσμούς των T λεμφοκυττάρων και στα κακοήθη κύτταρα αντίστοιχα. Όμως, η παρατηρούμενη διαφορά για το μεν PD-1 είναι μη σημαντική ($p >0,05$), για δε το PD-L1 οριακά σημαντική ($p=0,056$). Στην *FLT3*-ITD (+) AML, παρατηρείται ισχυρότερη έκφραση του PD-L1 στα κακοήθη κύτταρα και ασθενέστερη έκφραση του PD-1 στα CD4, CD8 T κύτταρα. Και αυτές οι διαφορές δεν είναι στατιστικά σημαντικές ($p >0,05$), ενώ οι διαφορές για τα επίπεδα του PD-1 στα CD4 ($p= 0,064$) και CD8 T κύτταρα ($p= 0,082$) είναι οριακά σημαντικές.

ABSTRACT

**STUDY OF PD-1/PD-L1 EXPRESSION IN HEMATOLOGICAL
MALIGNANCIES**

Athanasios Dodopoulos

Despite advances in treatment and drug design, there are still patients with hematological malignancies who fail to reach full remission. T lymphocyte dysfunction, as the result of inhibitory receptor expression, could be one of the causes. Coinhibitory receptors are mainly expressed on activated T lymphocytes, to maintain self-tolerance and prevent excessive tissue damage during inflammatory reaction. Interaction between PD-1 (Programmed Death protein 1) and its respective ligand (PD-L1) contributes to T cell anergy, ergo helping malignant cells to evade immune surveillance.

This study attempted to assess the expression of these two T cell exhaustion markers (PD-1, PD-L1) on peripheral blood and bone marrow samples from newly diagnosed patients, by using multiparameter flow cytometry. PD-L1/PD-1 expression was assessed on patients' samples with a 5 and 7 color protocol respectively. Patients group consisted of 117 people, including 9 patients with Acute Lymphoblastic Leukemia (ALL), 41 with Acute Myelogenous Leukemia (AML), 18 with Myelodysplastic Syndromes (MDS), 10 with Multiple Myeloma (MM), 19 with Non Hodgkin Lymphomas (NHL) and 20 patients with Chronic Lymphocytic Leukemia (CLL).

PD-1/PD-L1 expression is significantly different between patients' groups. MM group shows the strongest and CLL group the weakest PD-1 expression. PD-1 is significantly overexpressed on lymphocyte subpopulations in NHL (CD4 and CD8 T cells), MDS (NK, CD4 T cells) and AML (NK, T cells) group. Positive correlation ($r > 0.5$, $p < 0.05$) was found between PD-1 expression in lymphocyte subpopulations (B, CD4 T, CD8 T, NK) for MM, MDS, NHL and AML patients. PD-L1 is significantly overexpressed on malignant cells of NHL, CLL, MM, MDS and AML patients, in comparison with PD-L1 expression on patients' normal lymphocytes. PD-1 expression on total white blood cells correlates with PD-L1 levels on malignant cells in all patients' group, except MM.

PD-1 is overexpressed in MDS elderly patients (>65 years old) and correlates negatively with ALL patients' age. Diagnosis disease burden (blast cells percentage) is negatively correlated with MDS patients' PD-1 levels and AML patients' PD-L1 levels. AML patients with low WBC count at diagnosis tend to have increased PD-L1 levels. MDS patients with thrombocytopenia at diagnosis tend to overexpress PD-1 in comparison with other MDS patients. AML patients with aberrant antigen expression (ex. CD56, CD7) seem to have decreased PD-L1 expression on leukemic cells, but the difference is statistically unclear ($p=0,055$).

Regarding patients' molecular status at diagnosis, PD-1 is overexpressed on patients with low risk karyotype. On the other hand, PD-L1 is overexpressed on malignant cells from patients with low risk karyotype. But, both differences are not significant ($p >0,05$). Decreased PD-1 ($p >0,05$) and PD-L1 expression ($p=0,056$) was found in patients with mutated *NPM1*. In patients with *FLT3-ITD* (+) AML, PD-L1 was overexpressed on malignant cells ($p >0,05$) and PD-1 expression was decreased on CD4, CD8 T cells ($0,05 < p < 0,01$) in comparison to *FLT3-ITD* (-) AML patients.

PD-1/PD-L1 expression determined by flow cytometry might be useful for patients' prognosis assessment. Both molecules, in combination with other markers, can be used to evaluate host anti-tumor response and select patients for immunotherapy.