



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ, ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ
ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΔΙΠΛΩΜΑ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ
«ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΤΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΣΤΗΝ ΙΑΤΡΙΚΗ»

Μελέτη των επιπέδων και της λειτουργικότητας των ρυθμιστικών Τ λεμφοκυττάρων σε κακοήθη νοσήματα

Παναγιώτης Βίτσος, Α.Μ. 41602

Βιολόγος

Επιβλέπουσα:

Ουρανία Τσιτσιλώνη, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Ανοσολογίας,
Τομέας Φυσιολογίας Ζώων και Ανθρώπου
Τμήμα Βιολογίας, Σχολή Θετικών Επιστημών, ΕΚΠΑ

Αθήνα, Οκτώβριος 2018



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ, ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ
ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΔΙΠΛΩΜΑ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ
«ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΤΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΣΤΗΝ ΙΑΤΡΙΚΗ»**

Μελέτη των επιπέδων και της λειτουργικότητας των ρυθμιστικών T λεμφοκυττάρων σε κακοήθη νοσήματα

Παναγιώτης Βίτσος, Α.Μ. 41602

Βιολόγος

Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή:

Ουρανία Τσιτσιλώνη, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια (Επιβλέπουσα),
Ισιδώρα Παπασιδέρη, Καθηγήτρια
Ιωάννης Τρουγκάκος, Αναπληρωτής Καθηγητής

Αθήνα, Οκτώβριος 2018

Πρόλογος

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε κατά το ακαδημαϊκό έτος 2017-2018 στον τομέα Φυσιολογίας Ζώων και Ανθρώπου του τμήματος Βιολογίας του Πανεπιστημίου Αθηνών στο πλαίσιο του ΜΔΕ «Εφαρμογές της Βιολογίας στην Ιατρική». Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια, Ουρανία Τσιτσιλώνη για την ανάθεση του συγκεκριμένου θέματος, αλλά και για την εμπιστοσύνη, την καθοδήγηση και τις ευκαιρίες που μου έχει προσφέρει όντας από προπτυχιακός φοιτητής στο εργαστήριό της.

Θα ήθελα, επίσης, να απευθύνω ιδιαίτερες ευχαριστίες στην Καθηγήτρια Ισιδώρα Παπασιδέρη και στον Αναπληρωτή Καθηγητή Ιωάννη Τρουγκάκο που δέχθηκαν να συμμετέχουν στην Τριμελή Εξεταστική Επιτροπή της παρούσας διπλωματικής εργασίας και με τον τρόπο τους συνέβαλαν στην ολοκλήρωση αυτού του εγχειρήματος.

Ιδιαίτερος πολύτιμη για την πραγματοποίηση αυτής της διπλωματικής εργασίας ήταν η συνεργασία με την ιατρική ομάδα της Αιματολογικής-Ογκολογικής Μονάδας της Θεραπευτικής Κλινικής της Ιατρικής Σχολής, ΕΚΠΑ, Γ.Ν.Α. «Αλεξάνδρα». Συνεπώς, ευχαριστώ θερμά για την παροχή των δειγμάτων τον Καθηγητή και Πρύτανη του ΕΚΠΑ Μελέτιο-Αθανάσιο Δημόπουλο, τον Αναπληρωτή Καθηγητή Ευάγγελο Τέρπο, τον Αναπληρωτή Καθηγητή Ευστάθιο Καστρίτη και την υπόλοιπη ιατρική ομάδα.

Παράλληλα, ευχαριστώ θερμά το μεταδιδακτορικό ερευνητή Ιωάννη Κωστόπουλο για τη βοήθεια και καθοδήγηση που μου παρείχε για την υλοποίηση της διπλωματικής εργασίας. Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω από καρδιάς την Παρασκευή Μιχελή και τον Παναγιώτη Πόθο για την άριστη συνεργασία που είχαμε κατά τη διάρκεια της εργαστηριακής μας καθημερινότητας. Ακόμη, θα ήταν παράλειψη να μην ευχαριστήσω και τα υπόλοιπα μέλη της ερευνητικής μας ομάδας, ειδικότερα τη Σύλvia, την Αναστασία και τον Κωνσταντίνο.

Επιπλέον, οφείλω να ευχαριστήσω τους καθηγητές Hubert Kalbacher και Graham Pawelec, αλλά και τους μεταδιδακτορικούς ερευνητές Kilian Wistuba-Hamprecht και Henning Zelba από το Πανεπιστήμιο του Tübingen για τη φιλοξενία που μου παρείχαν στα εργαστήριά τους και τις γνώσεις που μου μετέφεραν, ιδιαίτερα στο κομμάτι της Πολυπαραμετρικής Κυτταρομετρίας Ροής.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους φίλους μου εντός και εκτός της σχολής, καθώς και την οικογένειά μου για την απλόχερη στήριξή τους.

Βιογραφικό Σημείωμα



Βιογραφικό σημείωμα

ΠΡΟΣΩΠΙΚΕΣ ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ

Βίτσος Παναγιώτης

📍 Ευτέρπης 29, 15561 Χολαργός, Αθήνα (Ελλάδα)

☎ (+30)6972905315 📞 2106536870

✉ nk.panos_@hotmail.com

Φύλο Άρρεν | Ημερομηνία γέννησης 28/05/1991

ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ ΚΑΙ ΚΑΤΑΡΤΙΣΗ

09/2009–09/2016

Πτυχίο Βιολογίας, "Λίαν Καλώς"

Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Αθήνα (Ελλάδα)

2013-2014: Εκπόνηση διπλωματικής εργασίας με θέμα : "Φαινοτυπικές μεταβολές κατά τον κυτταρικό κύκλο λευκοκυτταρικών υποπληθυσμών περιφερικού αίματος και καρκινικών κυτάρων μετά από επώασή τους με πεπτιδία του θύμου αδένος."

Τομέας Φυσιολογίας Ζώων και Ανθρώπου, Τμήμα Βιολογίας, ΕΚΠΑ, Επιβλέπουσα: Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Ουρανία Τσιτσιλώνη

10/2016–Σήμερα

Μεταπτυχιακό Δίπλωμα Ειδίκευσης: Εφαρμογές της Βιολογίας στην Ιατρική

Τμήμα Βιολογίας και Ιατρική Σχολή, ΕΚΠΑ, Αθήνα (Ελλάδα)

2017-2018: Εκπόνηση διπλωματικής εργασίας με θέμα : "Μελέτη των επιπέδων και της λειτουργικότητας των ρυθμιστικών T λεμφοκυττάρων σε κακοήγη νοσήματα."

Τομέας Φυσιολογίας Ζώων και Ανθρώπου, Τμήμα Βιολογίας, ΕΚΠΑ, Επιβλέπουσα: Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Ουρανία Τσιτσιλώνη

ΕΠΑΓΓΕΛΜΑΤΙΚΗ ΕΜΠΕΙΡΙΑ

07/2010–08/2010

Πρακτική άσκηση στο Χημείο της Διεύθυνσης Τεχνικών Υπηρεσιών στις βιομηχανικές εγκαταστάσεις Ασπρόπυργου

Ελληνικά Πετρέλαια Α.Ε., Ασπρόπυργος, Αττική

Ποιοτικός έλεγχος δειγμάτων νερού

06/2012–Σήμερα

Παράδοση ιδιαίτερων μαθημάτων Φυσικής, Χημείας και Βιολογίας σε μαθητές Γυμνασίου-Λυκείου

11/2013–Σήμερα

Μέλος ερευνητικής ομάδας

Εργαστήριο Ανοσολογίας, Τομέας Φυσιολογίας Ζώων και Ανθρώπου, Τμήμα Βιολογίας, ΕΚΠΑ, Υπεύθυνη: Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Ουρανία Τσιτσιλώνη

ΑΤΟΜΙΚΕΣ ΔΕΞΙΟΤΗΤΕΣ

Μητρική(ές) γλώσσα(ες)

Ελληνικά

Ξένες γλώσσες

Αγγλικά

ΚΑΤΑΝΟΗΣΗ		ΟΜΙΛΙΑ		ΓΡΑΦΗ
Προφορική	Γραπτή (ανάγνωση)	Επικοινωνία	Προφορική έκφραση	
C2	C2	C2	C2	C2
Certificate of Proficiency in English, University of Michigan				

Γερμανικά

C1	C1	C1	C1	C1
Zentrale Mittelstufenprüfung (C1), Goethe Institut				

Επίπεδα: A1 και A2: Βασικός χρήστης - B1 και B2: Ανεξάρτητος χρήστης - C1 και C2: Έμπειρος χρήστης
Κοινό Ευρωπαϊκό Πλαίσιο Αναφοράς για Γλώσσες

Επαγγελματικές δεξιότητες

- Κυτταροκαλλιέργειες
- Εξοικειωμένος με την τεχνολογία κυτταρομετρίας ροής.
- Γνώση και εφαρμογή προγραμμάτων επεξεργασίας δεδομένων βιολογικών παραμέτρων, BD FACSDIVA, ModFit LT, Infinicyt, FlowJo.
- Χειρισμός πειραματοζώων, ανάπτυξη και παρακολούθηση in vivo μοντέλων όγκου σε ποντίκια.

Ψηφιακές δεξιότητες

ΑΥΤΟΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ				
Επεξεργασία δεδομένων	Επικοινωνία	Δημιουργία Περιεχομένου	Ασφάλεια	Επίλυση προβλημάτων
Έμπειρος χρήστης	Έμπειρος χρήστης	Ανεξάρτητος χρήστης	Έμπειρος χρήστης	Βασικός χρήστης

Ψηφιακές δεξιότητες - Πίνακας αυτοαξιολόγησης

- Χειρισμός Microsoft Office, GraphPad Prism

ΠΡΟΣΘΕΤΕΣ ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ

Δημοσιεύσεις

- Papaioannou NE, Beniata OV, Vitsos P, Tsitsilonis O, Samara P. Harnessing the immune system to improve cancer therapy. Ann Transl Med. 2016 Jul;4(14):261.
- Argyriou A, Rousakis P, Papaioannou N, Beniata O, Vitsos P, Kostopoulos I, Tsitsilonis O, Samara P. The role of immunotherapy in cancer treatment.Arch Hellen Med, 35(3), May-June 2018, 351-357

Προγράμματα

- Integrating the emerging potential of the University of Athens Cancer Research Group in the European Research area [INsPIRE], Χορηγός: EU FP7 Capacities REGPOT-CT-2011-284460, Επιστημονικός Υπεύθυνος: Καθηγητής Χρ. Κίπας
- IKYDA 2016, Επιστημονικός Υπεύθυνος: Αναπλ. Καθηγήτρια Ουρανία Τσιτσιλώνη

Ανακοινώσεις σε Συνέδρια

- 36ο Ετήσιο Επιστημονικό Συνέδριο Ελληνικής Εταιρείας Βιολογικών Επιστημών, Ιωάννινα, Μάιος 2014
- 40ο Ετήσιο Πανελλήνιο Ιατρικό Συνέδριο, Αθήνα, Μάιος 2014
- Tumor biomarkers: From discovery to clinical applications INsPIRE International Conference, Αθήνα, Ιούνιος 2014
- INsPIRE Final/Evaluation Meeting, Σπέτσες, Ιούλιος 2014
- 40ο Ετήσιο Επιστημονικό Συνέδριο Ελληνικής Εταιρείας Βιολογικών Επιστημών, Βέροια, Μάιος 2018

Παρακολούθηση Συνεδρίων

- 9ο Πανελλήνιο Συνέδριο Κλινικής Χημείας, Αθήνα, Οκτώβριος 2010
- INsPIRE ATHENS 2012, "Progress in combination therapy of cancer using novel immunomodulators", Αθήνα, Νοέμβριος 2012
- 9ο Πανελλήνιο Συνέδριο Ανοσολογίας, Αθήνα, Δεκέμβριος 2013
- 36ο Ετήσιο Επιστημονικό Συνέδριο Ελληνικής Εταιρείας Βιολογικών Επιστημών, Ιωάννινα, Μάιος 2014
- 40ο Ετήσιο Πανελλήνιο Ιατρικό Συνέδριο, Αθήνα, Μάιος 2014
- INsPIRE Final/Evaluation Meeting, Σπέτσες, Ιούλιος 2014
- Advances in cancer immunology and immunotherapy, Αθήνα, Οκτώβριος 2015

Περιεχόμενα

Εισαγωγή

1)Πολλαπλούν Μυέλωμα (ΠΜ).....	9
1.1) Γενικά και επιδημιολογικά στοιχεία	9
1.2)Γενετική παθοφυσιολογία του ΠΜ	10
1.3)Διάγνωση του ΠΜ	12
1.4) Θεραπεία – Διαχείριση της νόσου	12
1.4.1) Θεραπεία πρώτης γραμμής	12
1.4.2) Καταλληλότητα για ASCT	12
1.4.3) Φαρμακευτική θεραπεία	13
1.4.4) Αυτόλογη Μεταμόσχευση Αιμοποιητικών Βλαστοκυττάρων (ASCT)	14
1.5) Ανίχνευση της Ελάχιστης Υπολειπόμενης Νόσου (EYN)	15
1.6) Ρυθμιστικά Τ λεμφοκύτταρα (regulatory T cells, Tregs)	17
1.6.1) Εισαγωγικά Στοιχεία.....	17
1.6.2) Οντογένεση των Tregs.....	20
1.6.3) Μοριακοί μηχανισμοί της Treg-επαγόμενης καταστολής	21
1.6.4) Τα Tregs σε κακοήθειες νεοπλασίες	25
1.6.5) Τα Tregs στο ΠΜ.....	26
1.7) Βασικές αρχές Κυτταρομετρίας Ροής	27
1.8) Η Πολυπαραμετρική Κυτταρομετρία Ροής (ΠΚΡ) στη Διάγνωση και την ανίχνευση της EYN σε ασθενείς με ΠΜ.....	34
1.8.1) Ταυτοποίηση των πλασματοκυττάρων.....	34
1.8.2) Ανοσοφαινότυπος φυσιολογικών πλασματοκυττάρων.....	35
1.8.3) Ανοσοφαινότυπος μη φυσιολογικών πλασματοκυττάρων	35
1.9) Κυριότεροι αντιγονικοί δείκτες για την ταυτοποίηση των Tregs και τη μελέτη της λειτουργικότητάς τους με Κυτταρομετρία Ροής.....	36
Σκοπός	37

2) Υλικά και Μέθοδοι	38
2.1) Συλλογή δειγμάτων περιφερικού αίματος και μυελού των οστών από ασθενείς με ΠΜ ..	42
2.2) Προσδιορισμός συγκέντρωσης και βιωσιμότητας κυττάρων	43
2.3) Πρωτόκολλο επεξεργασίας και χρώσης δειγμάτων μυελού των οστών από ασθενείς με ΠΜ για ανίχνευση EYN	45
2.4) Πρωτόκολλο επεξεργασίας και χρώσης δειγμάτων μυελού των οστών και περιφερικού αίματος από ασθενείς με ΠΜ για το φαινοτυπικό προσδιορισμό των Tregs	49
2.5) Τιτλοδότηση αντισωμάτων και χρωματική επιδιόρθωση (compensation).....	52
3) Αποτελέσματα	55
3.1) Ομαδοποίηση των ασθενών με ΠΜ	56
3.2) Στρατηγική ανάλυσης των δειγμάτων για την αναγνώριση και λειτουργική μελέτη των Tregs	60
3.3) Ποσοτική εκτίμηση των επιπέδων των Tregs με βάση το φαινότυπο CD3+CD4+CD25 ^{hi} FoxP3+	64
3.4) Ποσοτική εκτίμηση των επιπέδων των Tregs με βάση το φαινότυπο CD3+CD4+CD25 ^{hi} FoxP3+CD127 ^{lo}	67
3.5) Μελέτη της έκφρασης μεμονωμένων αντιγονικών δεικτών στα CD3+CD4+CD25 ^{hi} FoxP3+ Tregs.....	70
4) Συμπεράσματα	74
5) Βιβλιογραφία	80
6) Περιλήψεις	89
7) Παράρτημα	94

Εισαγωγή

1. Πολλαπλούν Μυέλωμα (ΠΜ)

1.1 Γενικά και επιδημιολογικά στοιχεία

Το Πολλαπλούν Μυέλωμα (ΠΜ) είναι μια αιματολογική νεοπλασία που χαρακτηρίζεται από τον ανεξέλεγκτο κλωνικό πολλαπλασιασμό κακοήθων πλασματοκυττάρων στο μυελό των οστών και από την παρουσία παθολογικής μονοκλωνικής πρωτεΐνης (Μ-πρωτεΐνη) στο αίμα και τα ούρα (Palumbo & Anderson, 2011). Ουσιαστικά, η Μ-πρωτεΐνη συνίσταται από ανοσοσφαιρίνες που παράγονται από τον παθολογικό κλώνο των τελικώς διαφοροποιημένων Β λεμφοκυττάρων. Το ΠΜ περιλαμβάνεται στο φάσμα των πλασματοκυτταρικών δυσκρασιών μαζί με τη Μονοκλωνική Γαμμαπάθεια Αδιευκρίνιστης Σημασίας (Monoclonal Gammopathy of Undetermined Significance, MGUS), το Ασυμπτωματικό ΠΜ (smoldering Multiple Myeloma, sMM) και τη Μακροσφαιριναιμία του Waldenstrom (Waldenstrom's Macroglobulinaemia, WM). Όλες οι προαναφερθείσες διαταραχές σχετίζονται με έναν κλωνικό πληθυσμό πλασματοκυττάρων ή πρόδρομων μορφών αυτών. Επειδή το ΠΜ μπορεί να επηρεάσει πολλά όργανα του ανθρώπινου οργανισμού, τα συμπτώματα ποικίλλουν. Τα κυριότερα από αυτά συνοψίζονται με το ακρώνυμο CRAB (HyperCalcemia - Renal failure – Anaemia - Bone disease) και περιλαμβάνουν υπερασβεστιαμία, νεφρική ανεπάρκεια, αναιμία και οστικές βλάβες.

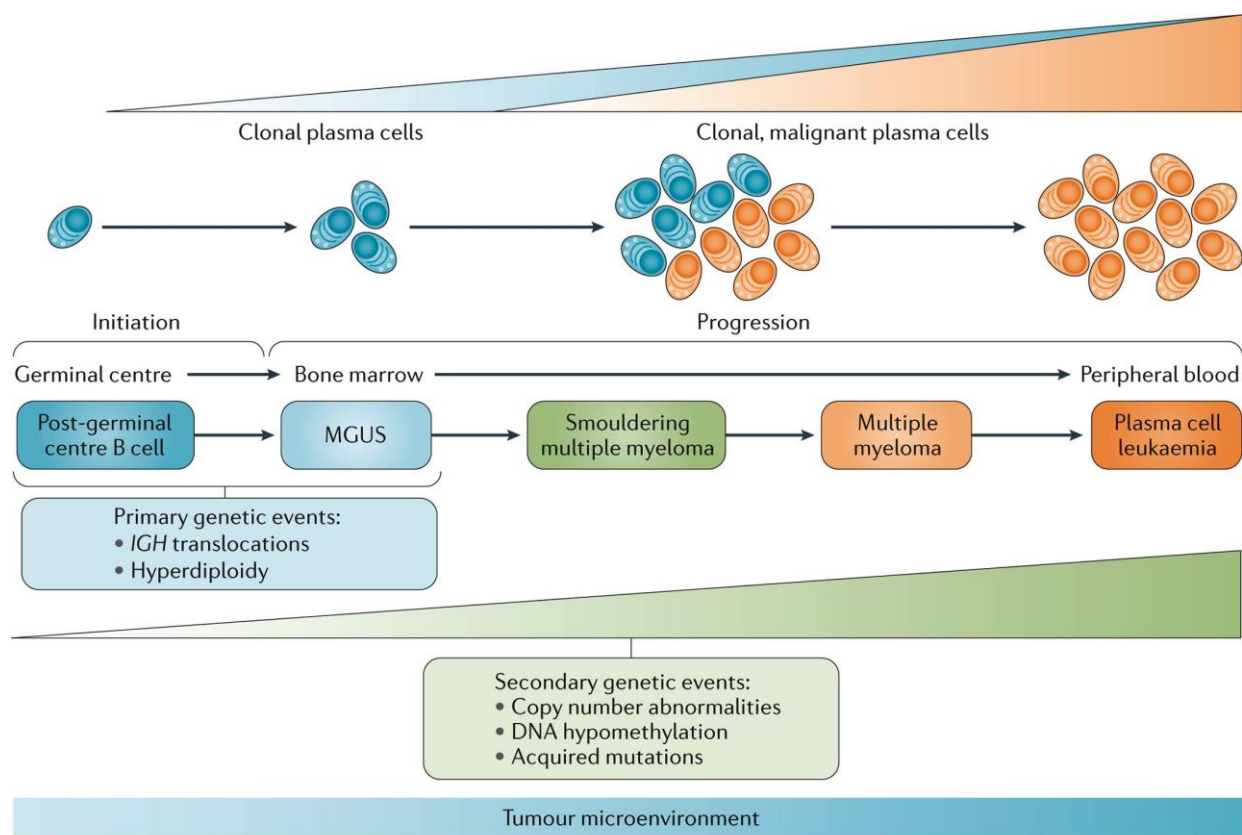
Το ΠΜ συνιστά περίπου το 1% των νεοπλασματικών ασθενειών και το 13% των αιματολογικών κακοηθειών. Στις χώρες του Δυτικού κόσμου η επίπτωσή του είναι 5,6 περιστατικά ανά 100.000 άτομα, ενώ η μέση ηλικία διάγνωσης είναι περίπου τα 70 έτη. Παρά το γεγονός ότι το ΠΜ είναι ανίατη νόσος, τα τελευταία χρόνια με την εφαρμογή της αυτόλογης μεταμόσχευσης αιμοποιητικών βλαστικών κυττάρων και με την εισαγωγή ανοσοτροποποιητικών μορίων, όπως η λεναλιδομίδη, και αναστολέων πρωτεασώματος, όπως το Bortezomib, σε θεραπευτικά πρωτόκολλα, έχει αυξηθεί η ολική επιβίωση των ασθενών. Μάλιστα, σε ασθενείς που διαγιγνώσκονται πριν την ηλικία των 60 ετών, η 10-ετής επιβίωση είναι περίπου 30% (Brenner *et al.*, 2008).

1.2 Γενετική παθοφυσιολογία του ΠΜ

Η γνώση της ωρίμανσης των B λεμφοκυττάρων και της βιολογίας των πλασματοκυττάρων είναι απαραίτητη για την κατανόηση του ΠΜ. Τα πλασματοκύτταρα αναπτύσσονται από αιμοποιητικά βλαστικά κύτταρα, τα οποία μετά από πολλαπλά στάδια ωρίμανσης στο μυελό των οστών και στα δευτερογενή λεμφικά όργανα διαφοροποιούνται σε B λεμφοκύτταρα και ύστερα σε πλασματοκύτταρα. Στον μυελό των οστών τα ανώριμα B λεμφοκύτταρα αναδιατάσσουν τα V(D)J γονίδια τους, αποκτώντας, έτσι, ένα πλούσιο ρεπερτόριο ανοσοσφαιρινών. Τα B λεμφοκύτταρα που φέρουν σύμπλοκο IgH-IgL (ουσιαστικά έναν υποδοχέα B λεμφοκυττάρου) στην κυτταρική τους μεμβράνη μεταναστεύουν σε δευτερογενή λεμφικά όργανα, δηλαδή στους λεμφαδένες ή το σπλήνα, όπου λαμβάνουν χώρα οι διαδικασίες της ωρίμανσης συγγένειας, οι σωματικές υπερμεταλλάξεις και ο ανασυνδυασμός μετάπτωσης τάξης. Οι παραπάνω διεργασίες οδηγούν στην παραγωγή αντισωμάτων με υψηλή συγγένεια για συγκεκριμένα αντιγόνα και διαφορετικές ιδιότητες. Οι διπλόκλωνες θραύσεις στο DNA του γενετικού τόπου των ανοσοσφαιρινών είναι απαραίτητες για τη μετάπτωση τάξης και τις σωματικές υπερμεταλλάξεις. Όμως, οι θραύσεις αυτές μπορούν να συντηχθούν με άλλες θραύσεις που έχουν συμβεί σε διαφορετικούς γενετικούς τόπους του γονιδιώματος και να οδηγήσουν στη δημιουργία χρωμοσωμικών διαμεταθέσεων. Οι περισσότερες από αυτές τις διαμεταθέσεις δεν είναι σημαντικές, καθώς αυτά τα κύτταρα δεν παράγουν απόγονο, κάτι που είναι πιθανότατα αποτέλεσμα της έλλειψης πλεονεκτήματος ανάπτυξης, το οποίο προσδίδεται από την ίδια τη χρωμοσωμική ατυπία. Παρόλα αυτά, οι διαμεταθέσεις που περιλαμβάνουν συγκεκριμένα ογκογονίδια μπορούν να προσδώσουν στα κύτταρα πολλαπλασιαστικό πλεονέκτημα, το οποίο να οδηγήσει στην εκδήλωση πλασματοκυτταρικών δυσκρασιών, δηλαδή MGUS, sMM και στη συνέχεια ΠΜ (Εικόνα 1). Από τα παραπάνω διαφαίνεται ότι οι χρωμοσωμικές διαμεταθέσεις είναι ένα πιθανό εναρκτήριο γεγονός σε ορισμένες περιπτώσεις ΠΜ. Εναλλακτικά, η ανευπλοειδία και συγκεκριμένα η υπερδιπλοειδία θα μπορούσε να αποτελέσει εξίσου εναρκτήριο γεγονός για εκδήλωση της ίδιας παθολογίας.

Οι διαμεταθέσεις που περιλαμβάνουν τα γονίδια *MMSET*, *FGFR3* και *CCND1* αντιπροσωπεύουν εναρκτήρια γεγονότα που έχουν ταυτοποιηθεί στην εκδήλωση MGUS, sMM, και ΠΜ. Δευτερευόντως, υπάρχουν συγκεκριμένες γονιδιακές μεταλλάξεις που συμβάλλουν στην εξέλιξη του ΠΜ και αφορούν τα γονίδια *MYC*, *NRAS*, *KRAS*, *FAM46C* και *TP53* και την αδρανοποίηση των αναστολέων κυκλινοεξαρτώμενων κινασών *CDKN2A* και *CDKN2C*. Ακόμη, λαμβάνουν χώρα επιγενετικές τροποποιήσεις, όπως η μεταβολή της

έκφρασης ορισμένων microRNAs και η αλλαγή στα πρότυπα μεθυλίωσης συγκεκριμένων γονιδίων (Kumar *et al.*, 2017).



Nature Reviews | Disease Primers

Εικόνα 1: Η ανάπτυξη ΠΜ είναι μια πολυσταδιακή διαδικασία, η οποία εκδηλώνεται με πρόδρομες ασθένειες, όπως η MGUS και το sMM. Παρότι η MGUS, το sMM και το ΠΜ έχουν χαρακτηριστεί πολύ καλά από κλινική άποψη, έχουν βρεθεί πολλές βιολογικές ομοιότητες μεταξύ των τριών αυτών πλασματοκυτταρικών δυσκρασιών. Το ΠΜ μπορεί να εξελιχθεί σε περαιτέρω παθολογικούς φαινοτύπους εκτός του μυελού των οστών, όπως το εξωμυελικό μύελωμα και η πλασματοκυτταρική λευχαιμία. Εναρκτήρια γενετικά γεγονότα που ενοχοποιούνται για την εκδήλωση πλασματοκυτταρικών δυσκρασιών είναι οι χρωμοσωμικές ατυπίες που περιλαμβάνουν τα γονίδια των βαριών αλυσίδων των ανοσοσφαιρινών και η ανευπλοειδία (πιο συχνά στη μορφή της υπερδιπλοειδίας). Ακολούθως, ο αριθμός των δευτερευόντων γενετικών μεταλλάξεων αυξάνεται και συντελεί στην εξέλιξη της MGUS σε sMM και έπειτα σε ΠΜ (Kumar *et al.*, 2017).

1.3 Διάγνωση του ΠΜ

Η διάγνωση για το ΠΜ στηρίζεται σε τρία κλινικά ευρήματα σύμφωνα με τα κριτήρια του International Myeloma Working Group (IMWG):

1. μια κορυφή μονοκλωνικής πρωτεΐνης (M spike) σε ηλεκτροφόρηση δείγματος ορού ή/και ούρων (ή η παρουσία ανώμαλου λόγου ελεύθερων ελαφριών αλυσίδων ορού, sFLC).
2. η διήθηση του μυελού των οστών από κακοήγη πλασματοκύτταρα σε ποσοστό τουλάχιστον 10%.
3. παρουσία βλάβης σχετιζόμενης με συγκεκριμένα όργανα και ιστούς (related organ or tissue impairment, ROTI), όπως κάποιο από τα προαναφερθέντα συμπτώματα CRAB, αμυλοείδωση σχετιζόμενη με αμυλοειδείς ελαφριές αλυσίδες, επαναλαμβανόμενες λοιμώξεις, κ.α. (IMWG, 2003).

1.4 Θεραπεία – Διαχείριση της νόσου

1.4.1 Θεραπεία πρώτης γραμμής

Η αρχική επιλογή της θεραπείας για το ΠΜ πρέπει να γίνει αφού συνυπολογιστούν διάφοροι παράγοντες (Εικόνα 2). Ο στόχος της θεραπείας πρέπει να είναι ο άμεσος και αποτελεσματικός έλεγχος του ΠΜ και η υποστροφή των επιπλοκών αυτού, και παράλληλα να επιτρέπει τη συλλογή αιμοποιητικών βλαστικών κυττάρων στους ασθενείς που είναι κατάλληλοι για αυτόλογη μεταμόσχευση αιμοποιητικών βλαστοκυττάρων (autologous stem cell transplantation, ASCT).

1.4.2 Καταλληλότητα για ASCT

Η θεραπευτική στρατηγική στο ΠΜ έχει ιστορικά εξαρτηθεί από το αν ο ασθενής είναι κατάλληλος ή όχι για ASCT, καθώς ορισμένα φάρμακα, όπως η μελφαλάνη, μπορούν να παρεμποδίσουν τη συλλογή βλαστοκυττάρων. Καθώς οι θεραπείες έχουν γίνει ασφαλέστερες και χαρακτηρίζονται από μειωμένη αιματολογική τοξικότητα, υπάρχει ολοένα και αυξανόμενη σύγκλιση στις θεραπευτικές προσεγγίσεις που ακολουθούνται για τους κατάλληλους και τους ακατάλληλους προς ASCT ασθενείς. Έτσι, μελλοντικά, η καταλληλότητα για ASCT μπορεί να

έχει περιορισμένη επίδραση στην επιλογή θεραπείας. Επί του παρόντος, παραμένει ένας ουσιαστικός παράγοντας για τον καθορισμό της θεραπείας, ενώ παράλληλα υπάρχουν και διαφορές ως προς το ποιος ασθενής μπορεί να θεωρείται κατάλληλος για ASCT.

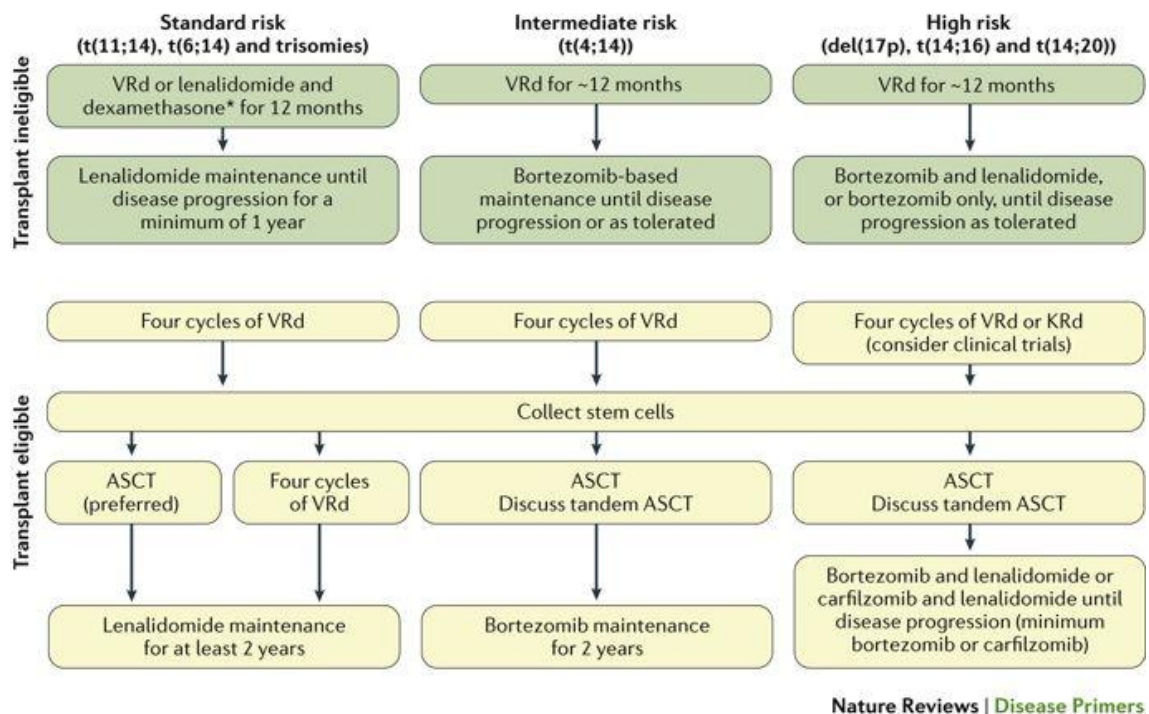
1.4.3 Φαρμακευτική θεραπεία

Το θεραπευτικό οπλοστάσιο στο ΠΜ συνεχίζει να βελτιώνεται, με αρκετές κατηγορίες αποτελεσματικών φαρμάκων, τα οποία είναι διαθέσιμα για τη θεραπεία νεοδιαγνωσθέντων ασθενών και ασθενών που έχουν υποτροπιάσει. Μία από τις πρώτες βελτιώσεις στη θεραπεία του ΠΜ ήταν η επίδειξη της βλαπτικής επίδρασης των υψηλών δόσεων στεροειδών που χρησιμοποιήθηκαν ως μέρος των πρώτων θεραπευτικών αγωγών. Παρόμοια, η εβδομαδιαία δόση δεξαμεθαζόνης οδήγησε σε βελτιωμένα ποσοστά επιβίωσης και έτσι, συμπεριλήφθη σε ποικίλα θεραπευτικά σχήματα.

Σήμερα, ο συνδυασμός ενός αναστολέα πρωτεασώματος μαζί με έναν ανοσοτροποποιητικό παράγοντα αποτελεί μια από τις πιο αποτελεσματικές προσεγγίσεις σε νεοδιαγνωσθέντες ασθενείς με ΠΜ. Πράγματι, η χρήση του Bortezomib σε συνδυασμό με λεναλιδομίδη και δεξαμεθαζόνη (αναφέρεται ως VRd) είναι η θεραπεία πρώτης γραμμής στους ασθενείς, στους οποίους είναι ανεκτή η χορήγηση πολλαπλών φαρμάκων. Μάλιστα, αποτελέσματα από μια μεγάλη κλινική μελέτη φάσης III, έδειξαν βελτίωση στην ολική επιβίωση (overall survival, OS) και την επιβίωση ελεύθερη προόδου της νόσου (progression-free survival, PFS) σε νεοδιαγνωσθέντες ασθενείς με ΠΜ που έλαβαν το θεραπευτικό σχήμα VRd, σε σχέση με αυτούς που έλαβαν μόνο λεναλιδομίδη και δεξαμεθαζόνη (Durie *et al.*, 2017). Οι αναστολείς πρωτεασώματος έχουν μελετηθεί και σε συνδυασμό με αλκυλιωτικούς παράγοντες, όπως η μελφαλάνη και η κυκλοφωσφαμίδη ως θεραπεία πρώτης γραμμής σε μη κατάλληλους για ASCT ασθενείς. Μάλιστα, η συνδυαστική θεραπεία με Bortezomib, κυκλοφωσφαμίδη και δεξαμεθαζόνη έχει δείξει υψηλή αποτελεσματικότητα και καλή ανοχή σε αρκετές κλινικές μελέτες φάσης II (Kumar *et al.*, 2012). Πάντως, οι θεραπευτικές προσεγγίσεις για ασθενείς που είναι μη κατάλληλοι για ASCT χρειάζονται τροποποίηση ανάλογα με τα χαρακτηριστικά και την κλινική εικόνα του κάθε ασθενούς. Το σύννηθες φαρμακευτικό σχήμα περιλαμβάνει μελφαλάνη και πρεδνιζόνη.

1.4.4 Αυτόλογη Μεταμόσχευση Αιμοποιητικών Βλαστοκυττάρων (ASCT)

Η ASCT εισήχθη ως θεραπευτική προσέγγιση για το ΠΜ πριν δύο δεκαετίες και έχει πλέον παγιωθεί. Μάλιστα, έχειδειχθεί σε κλινικές δοκιμές φάσης III ότι η ASCT οδηγεί σε βελτιωμένα επίπεδα ολικής επιβίωσης (Attal *et al.*, 1996). Η διαδικασία της ASCT ξεκινά με τη συλλογή αιμοποιητικών βλαστοκυττάρων από το περιφερικό αίμα των ασθενών αφού έχουν λάβει αυξητικούς παράγοντες (συγκεκριμένα granulocyte colony-stimulating factor, GCSF) με ή χωρίς χημειοθεραπεία. Κατόπιν, προκαλείται καταστροφή του παθολογικού μυελού των οστών και επανεισάγονται τα βλαστοκύτταρα που συλλέχθηκαν. Τυπικά, η ASCT πραγματοποιείται μετά από 4-6 κύκλους θεραπείας επαγωγής (Kumar *et al.*, 2017).



Εικόνα 2: Προτεινόμενος αλγόριθμος για τη διαχείριση του ΠΜ. Διάφοροι παράγοντες υπαγορεύουν τη θεραπευτική προσέγγιση που πρέπει να ακολουθηθεί κατά περίπτωση, με κυριότερο από αυτούς να είναι η καταλληλότητα ή μη ενός ασθενούς για ASCT. Η καταλληλότητα για ASCT καθορίζεται σε μεγάλο βαθμό από την ηλικία. Ο δεύτερος παράγοντας είναι η συννοσηρότητα. Για παράδειγμα, οι ασθενείς με ΠΜ που παράλληλα υποφέρουν από καρδιακές ή αναπνευστικές διαταραχές δεν είναι κατάλληλοι για ASCT (Kumar *et al.*, 2017).

1.5 Ανίχνευση της Ελάχιστης Υπολειπόμενης Νόσου (EYN)

Η θεραπευτική προσέγγιση του ΠΜ έχει αλλάξει με την πάροδο του χρόνου, καθώς τα νεότερα φάρμακα, όπως οι αναστολείς πρωτεασώματος και οι ανοσοτροποποιητές, έχουν μικρότερη σωρευτική τοξικότητα και μπορούν να χορηγηθούν για μεγάλες χρονικές περιόδους. Το γεγονός αυτό συνεπάγεται επίτευξη αυξημένων ποσοστών OS και PFS στους ασθενείς με ΠΜ (Kristinsson *et al.*, 2014). Μείζονα ρόλο στην αύξηση των προαναφερθέντων παραμέτρων επιβίωσης κατέχει η αυξημένη διατήρηση της πλήρους απόκρισης στη θεραπεία. Επειδή με τα τωρινά δεδομένα οι αποκρίσεις στη θεραπεία είναι μετρήσιμες, έχουν οριστεί από το IMWG συγκεκριμένα κριτήρια που τις κατηγοριοποιούν και εφαρμόζονται σε ευρεία κλίμακα στην κλινική πράξη (Πίνακας 1).

Ωστόσο, παρά τα θεαματικά αποτελέσματα των σύγχρονων θεραπευτικών σχημάτων, πάντα υπάρχει ο κίνδυνος οι ασθενείς με ΠΜ να υποτροπιάσουν. Το γεγονός αυτό οφείλεται στο ότι μετά τη θεραπεία παραμένει ένας πληθυσμός παθολογικών πλασματοκυττάρων, τα οποία είναι ανθεκτικά στο θεραπευτικό σχήμα που εφαρμόστηκε. Ο εν λόγω πληθυσμός συνιστά την Ελάχιστη Υπολειπόμενη Νόσο (EYN). Η EYN αποτελεί έναν πολύ σημαντικό προγνωστικό και προβλεπτικό βιοδείκτη στο ΠΜ, ενώ υπάρχουν μελέτες στις οποίες φαίνεται πως οι ασθενείς που επιτυγχάνουν πλήρη απόκριση και χαρακτηρίζονται EYN⁻, εμφανίζουν υψηλότερα επίπεδα OS και PFS (Paiva *et al.*, 2008, Rawstron *et al.*, 2008, Martinez-Lopez *et al.*, 2014). Για την ανίχνευση της EYN χρησιμοποιούνται δοκιμασίες υψηλής ευαισθησίας όπως είναι η Πολυπαραμετρική Κυτταρομετρία Ροής (ΠΚΡ), η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης με χρήση ειδικών ολιγονουκλεοτιδίων για συγκεκριμένα αλληλόμορφα (allele-specific oligonucleotide – polymerase chain reaction, ASO-PCR) και η αλληλούχιση νέας γενιάς (next generation sequencing, NGS). Στην παρούσα εργασία θα επικεντρωθούμε στην ΠΚΡ.

Πίνακας 1: Κριτήρια απόκρισης στη θεραπεία του ΠΜ (IMWG 2011).

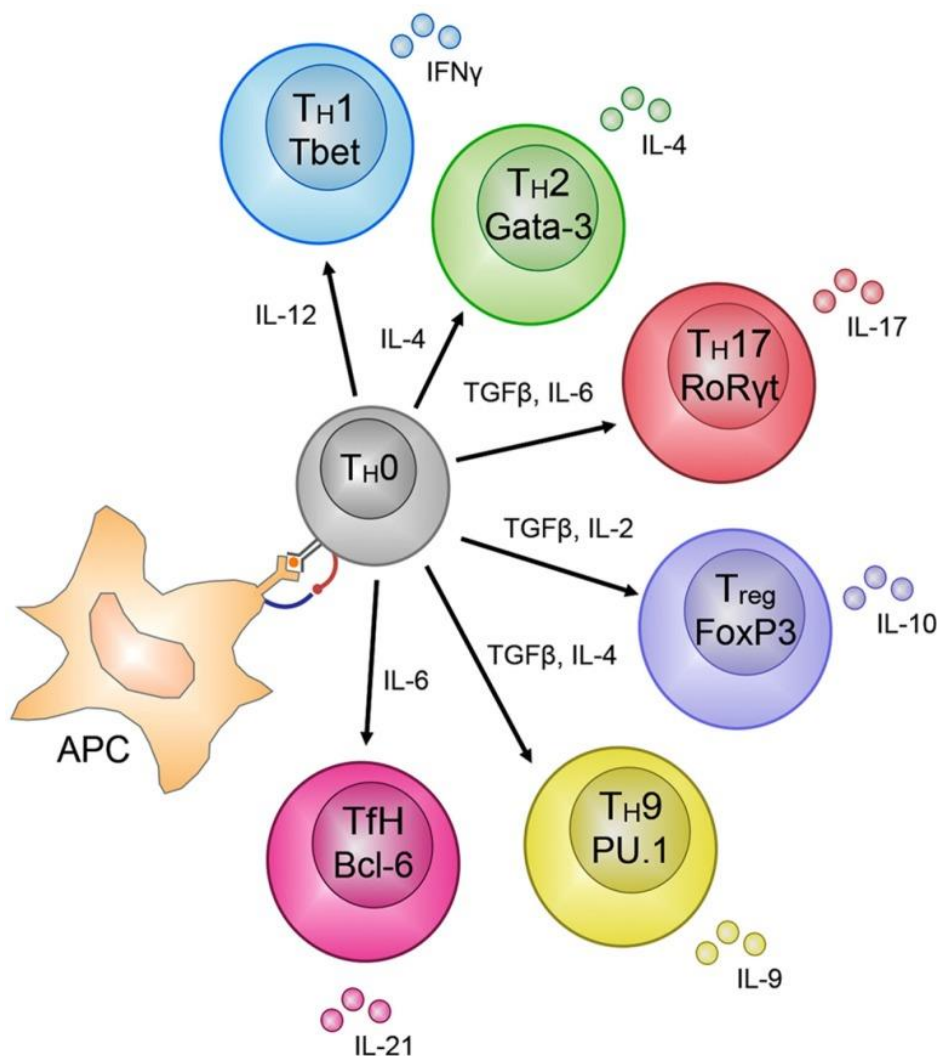
Ανοσοφαινοτυπική πλήρης απόκριση (iCR)	Αυστηρή πλήρης απόκριση σε συνδυασμό με έλλειψη παθολογικών πλασματοκυττάρων στο μυελό των οστών, μετά από ανάλυση τουλάχιστον 10^6 κυττάρων με κυτταρομετρία ροής > 4 χρωμάτων
Μοριακή πλήρης απόκριση (mCR)	Αυστηρή πλήρης απόκριση σε συνδυασμό με αρνητική δοκιμασία ASO-PCR
Αυστηρή πλήρης απόκριση (sCR)	Καλύπτονται τα κριτήρια της πλήρους απόκρισης σε συνδυασμό με φυσιολογικό λόγο fLC και απουσία κλωνικών πλασματοκυττάρων μετά από ανίχνευση με ανοσοϊστοχημεία ή κυτταρομετρία ροής 2-4 χρωμάτων
Πλήρης απόκριση (CR)	Αρνητική ανοσοκαθήλωση ορού και ούρων, σε συνδυασμό με απουσία πλασματοκυττάρων σε μαλακούς ιστούς και παρουσία πλασματοκυττάρων στο μυελό των οστών < 5%
Πολύ καλή μερική απόκριση (VGPR)	Η μονοκλωνική ανοσοσφαιρίνη είναι ανιχνεύσιμη στον ορό και τα ούρα με ανοσοκαθήλωση, αλλά όχι με ηλεκτροφόρηση, ή > 90% μείωση στη μονοκλωνική κορυφή του ορού μαζί με παρουσία μονοκλωνικής ανοσοσφαιρίνης στα ούρα < 100 mg/24 h
Μερική απόκριση (PR)	$\geq 50\%$ μείωση των επιπέδων της μονοκλωνικής ανοσοσφαιρίνης του ορού και μείωσή της σε δείγματα ούρων 24ώρου $\geq 90\%$ ή στα 200 mg/24 h. Επιπλέον, απαιτείται μείωση κατά 50% στα πλασματοκυττάρωματα σε μαλακούς ιστούς, αν υπάρχουν, σε σχέση με τη διάγνωση
Σταθερή νόσος	Δεν ικανοποιούνται τα κριτήρια για καμία από τις παραπάνω κατηγορίες
Πρόοδος νόσου	Αύξηση κατά 25% από τη μικρότερη τιμή απόκρισης στη μονοκλωνική πρωτεΐνη του ορού ή/και των ούρων, ή/και ανάπτυξη νέων οστικών κακώσεων ή πλασματοκυττωμάτων σε μαλακούς ιστούς ή αύξηση στο μέγεθος των ήδη υπαρχόντων μαλακών πλασματοκυττωμάτων και οστικών κακώσεων

1.6 Ρυθμιστικά T λεμφοκύτταρα (regulatory T cells, Tregs)

1.6.1 Εισαγωγικά στοιχεία

Ένα θεμελιώδες χαρακτηριστικό του προσαρμοστικού σκέλους της ανοσίας είναι η τεράστια ποικιλομορφία των αντιγονικών υποδοχέων. Το χαρακτηριστικό αυτό ενέχει, όμως, τον κίνδυνο ενεργοποίησης του ανοσοποιητικού συστήματος έναντι περιβαλλοντικών, τροφικών και εαυτών αντιγόνων, καθώς και αντιγόνων της συμβιωτικής μικροχλωρίδας, με καταστροφικές συνέπειες για τον ανθρώπινο οργανισμό. Παράλληλα, υπάρχει η ανάγκη αποτελεσματικής καταπολέμησης των παθογόνων που προσβάλλουν τον οργανισμό, με ταυτόχρονη ελαχιστοποίηση της παράπλευρης ιστικής βλάβης που μπορεί να προκαλέσει μια εξελισσόμενη φλεγμονή στον προσβεβλημένο ιστό. Έτσι, το ανοσοποιητικό σύστημα έχει εξελιχθεί έχοντας πολλαπλά επίπεδα προστασίας έναντι ανεπιθύμητων φλεγμονωδών αποκρίσεων που μπορεί να μεσολαβούνται από τα T λεμφοκύτταρα. Το πρώτο επίπεδο προστασίας συνιστά η αρνητική επιλογή που λαμβάνει χώρα στο θύμο αδένα κατά την ωρίμανση των T λεμφοκυττάρων. Κατά τη διαδικασία αυτή τα T λεμφοκύτταρα που αναγνωρίζουν και προσδένονται με υψηλή συγγένεια σε εαυτά MHC μόρια ή σε συμπλέγματα εαυτών MHC μορίων – εαυτών πεπτιδίων πεθαίνουν με απόπτωση και υφίστανται κλωνική εξάλειψη (Starr *et al.*, 2003, Klein *et al.*, 2016). Το δεύτερο επίπεδο προστασίας αποτελεί η επαγωγή ανέργειας σε T λεμφοκύτταρα μετά από παρατεταμένη διέγερση του T κυτταρικού υποδοχέα (TCR) (Schwartz, 2003). Το τρίτο επίπεδο προστασίας αφορά στην ενεργοποίηση των T λεμφοκυττάρων, η οποία εκτός από την αναγνώριση του αντιγόνου που παρουσιάζεται με εαυτό MHC μόριο προϋποθέτει την ύπαρξη συνδιεγερτικού σήματος και των κατάλληλων κυτταροκινών στο μικροπεριβάλλον του T λεμφοκυττάρου (Lenschow *et al.*, 1996, Corthay, 2006, Chen & Flies, 2013). Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελούν τα παρθένα CD4⁺ T λεμφοκύτταρα, τα οποία μετά την ενεργοποίησή τους μπορούν να διαφοροποιηθούν σε συγκεκριμένους υποπληθυσμούς, όπως T_H1, T_H2, T_H17 κύτταρα, ανάλογα με το μικροπεριβάλλον κυτταροκινών στο οποίο θα εκτεθούν (Russ *et al.*, 2013) (Εικόνα 3). Η ύπαρξη των προαναφερθέντων επιπέδων προστασίας είναι πολύ σημαντική για την επαγωγή ανοσολογικής αυτοανοχής και σε συγκεκριμένες περιπτώσεις ανοχής έναντι περιβαλλοντικών αντιγόνων, ωστόσο δεν είναι επαρκής, καθώς έχει δειχθεί ότι και σε υγιή άτομα υπάρχουν αυτοδραστικά T λεμφοκύτταρα που διαφεύγουν της αρνητικής επιλογής στο θύμο αδένα και μεταναστεύουν στην περιφέρεια (Danke *et al.*, 2004). Η δράση των αυτοδραστικών T

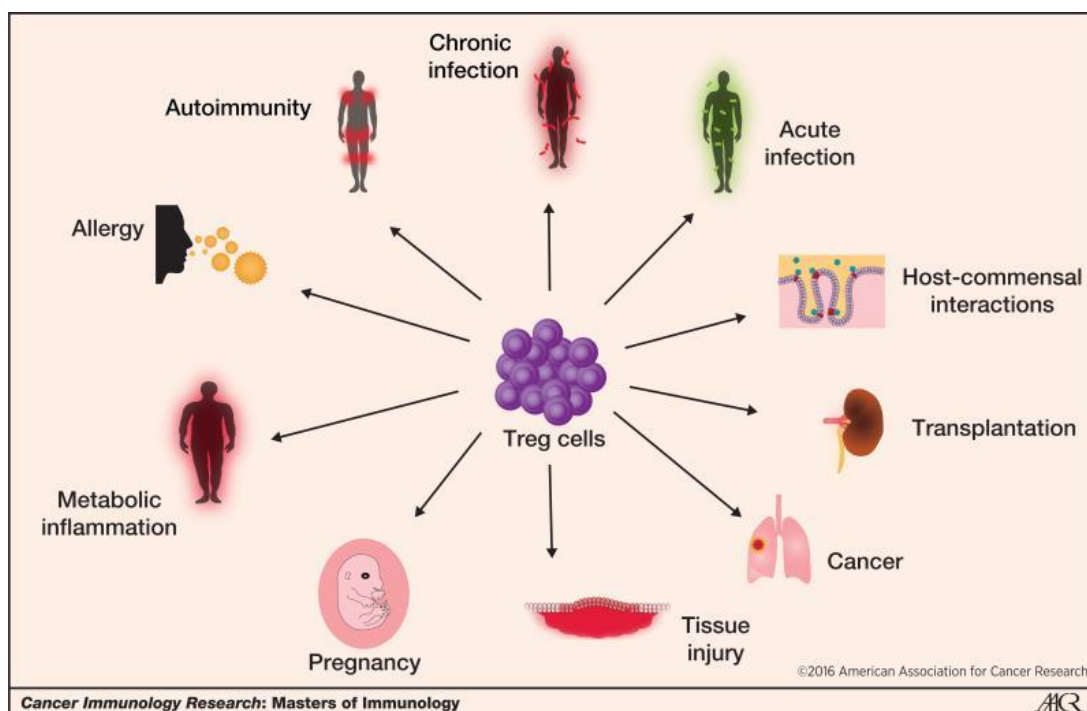
λεμφοκυττάρων και η επακόλουθη εκδήλωση αυτοάνοσης παθολογίας προλαμβάνεται από έναν υποπληθυσμό $CD4^+$ T λεμφοκυττάρων με ανοσοκατασταλτικό δυναμικό, που εκφράζει σε υψηλά επίπεδα τον επιφανειακό δείκτη CD25 και συνιστά τα ρυθμιστικά T λεμφοκύτταρα (regulatory T cells, Tregs) (Sakaguchi, 2004, Plitas & Rudensky, 2016).



Εικόνα 3: Ένα ώριμο παρθένο $CD4^+$ T λεμφοκύτταρο (T_H0) αφού ενεργοποιηθεί από ένα αντιγονοπαρουσιαστικό κύτταρο (APC) μπορεί να διαφοροποιηθεί, ανάλογα με το μικροπεριβάλλον κυτταροκινών στο οποίο εκτίθεται, σε διαφορετικούς υποπληθυσμούς $CD4^+$ T κυττάρων. Οι υποπληθυσμοί αυτοί με τη σειρά τους εκκρίνουν διαφορετικές κυτταροκίνες (Πηγή: Russ *et al.*, 2013).

Τα Tregs ανακαλύφθηκαν από την ομάδα του Ιάπωνα ανοσολόγου Shimon Sakaguchi το 1995 σε μία μελέτη που έδειξε ότι η αυτοανοσία που εκδηλώνεται σε ποντικούς μετά από θυμεκτομή μπορεί να προληφθεί με τη χορήγηση $CD4^+CD25^+$ T λεμφοκυττάρων (Sakaguchi *et al.*, 1995). Ωστόσο, το μόριο CD25 που συνιστά την α αλυσίδα του υποδοχέα της ιντερλευκίνης-2 (IL-2) απαντά και στα ενεργοποιημένα T λεμφοκύτταρα, επομένως δε συνιστά αξιόπιστο αντιγονικό δείκτη για τα Tregs. Η μελέτη της βιολογίας των Tregs διευκολύνθηκε σε

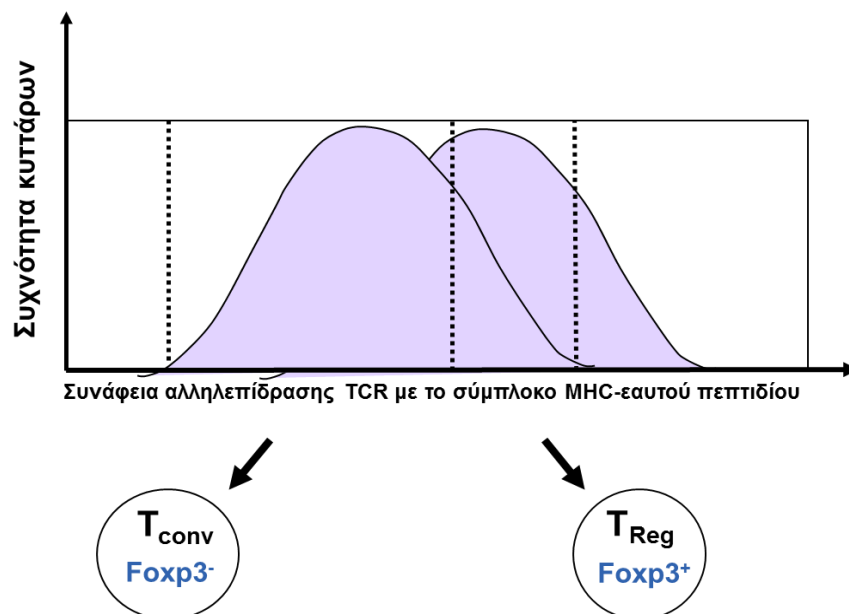
πολύ μεγάλο βαθμό μετά την ανακάλυψη του μεταγραφικού παράγοντα FoxP3 (Forkhead box P3) ως κύριου ρυθμιστή του αναπτυξιακού προγράμματος των Tregs και απαραίτητου για την εγκαθίδρυση λειτουργικού Treg φαινοτύπου (Fontenot *et al.*, 2003, Hori *et al.*, 2003). Τα $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ Tregs είναι απαραίτητα καθ' όλη τη διάρκεια της ζωής, διότι καταστέλλουν ενεργά τα αυτοδραστικά T λεμφοκύτταρα και προλαμβάνουν την εκδήλωση αυτοανοσίας. Στον άνθρωπο η σημασία της δράσης αυτών των κυττάρων φαίνεται σε ασθενείς που πάσχουν από σύνδρομο IPEX, οι οποίοι εξαιτίας ανεπάρκειας του γονιδίου *FoxP3* παρουσιάζουν έλλειψη Tregs (Wildin *et al.*, 2001). Το σύνδρομο IPEX μπορεί να είναι θανατηφόρο κατά τον πρώτο χρόνο ζωής και σχετίζεται συχνά με την εμφάνιση ινσουλινοεξαρτώμενου σακχαρώδους διαβήτη, εντεροπάθειας, εκζέματος, αναιμίας και καχεξίας (Bennett & Ochs, 2001). Εκτός από την πρόληψη της αυτοανοσίας, τα Tregs διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στον καρκίνο, στις αλλεργίες, στις φλεγμονές, στις αλλογενείς μεταμοσχεύσεις, στην πρόληψη της ιστικής βλάβης από τη φλεγμονή, ενώ επάγουν αυτοανοχή σε ειδικές περιπτώσεις, όπως η εγκυμοσύνη και ρυθμίζουν τις αλληλεπιδράσεις ξενιστή - συμβιωτικού μικροβιακού φορτίου (Εικόνα 4) (Gratz & Campbell, 2014, Plitas & Rudensky, 2016).



Εικόνα 4: Τα Tregs έχει βρεθεί ότι εμπλέκονται σε βιολογικά μονοπάτια που περιλαμβάνουν την αυτοανοσία, τον καρκίνο, τις αλλεργίες, τις φλεγμονές, την εγκυμοσύνη, τις αλλογενείς μεταμοσχεύσεις, την πρόληψη της ιστικής βλάβης και τη ρύθμιση της αλληλεπίδρασης ξενιστή – συμβιωτικού μικροβιακού φορτίου (Plitas & Rudensky, 2016).

1.6.2 Οντογένεση των Tregs

Η πλειονότητα των FoxP3⁺ Tregs που βρίσκονται στην περιφέρεια προκύπτουν από τη διαδικασία της ωρίμανσης στο θύμο αδένα (θυμικά ή φυσικά Tregs, tTregs ή nTregs). Μετά από τη διαδικασία της θετικής επιλογής και τη δημιουργία μονά θετικών CD4⁺ θυμοκυττάρων, τα CD4⁺ κύτταρα που φέρουν T κυτταρικούς υποδοχείς (TCRs), οι οποίοι αλληλεπιδρούν με ενδιάμεση συνάφεια με τα συμπλέγματα εαυτών MHC μορίων τάξης II – εαυτών πεπτιδίων, διαφοροποιούνται σε CD4⁺CD25⁺ Tregs (Curotto de Lafaille & Lafaille, 2009) (Εικόνα 5). Μάλιστα, μετά από αντιγονική διέγερση του TCR τους, τα CD4⁺CD25⁺ Tregs εμφανίζουν υψηλά επίπεδα έκφρασης του μεταγραφικού παράγοντα FoxP3, ο οποίος μπορεί να λειτουργεί είτε σαν μεταγραφικός ενεργοποιητής, είτε σαν καταστολέας σε περίπου 700 γονίδια-στόχους (Walker *et al.*, 2003, Zheng *et al.*, 2007). Ένα δεύτερο μονοπάτι γένεσης των Tregs πραγματοποιείται εκτός θύμου αδένα, στους περιφερικούς ιστούς, όπου ώριμα, παρθένα CD4⁺ T λεμφοκύτταρα διαφοροποιούνται σε περιφερικά Tregs (pTregs) μετά από επαφή με αντιγόνο υπό συγκεκριμένες συνθήκες (Curotto de Lafaille & Lafaille, 2009).



Εικόνα 5: Η συνάφεια της αλληλεπίδρασης των TCR που φέρουν στην επιφάνειά τους τα CD4⁺ θυμοκύτταρα θα καθορίσει την πορεία διαφοροποίησής τους. Όσα CD4⁺ θυμοκύτταρα διαθέτουν ρεπερτόριο TCR που αλληλεπιδρά με χαμηλή συνάφεια με το σύμπλεγμα εαυτού MHC μορίου-εαυτού πεπτιδίου διαφοροποιούνται σε συμβατικά CD4⁺ T λεμφοκύτταρα (Tconv). Αντίθετα, τα CD4⁺ θυμοκύτταρα που διαθέτουν ρεπερτόριο TCR που αλληλεπιδρά με ενδιάμεση συνάφεια με το σύμπλεγμα εαυτού MHC μορίου-εαυτού πεπτιδίου διαφοροποιούνται σε φυσικά CD4⁺CD25⁺ Tregs. Μάλιστα, έχει βρεθεί ότι το ρεπερτόριο TCR των Tconv και των Tregs παρότι έχει μεγάλες διαφορές παρουσιάζει και κάποιου βαθμού αλληλοεπικάλυψη (Pacholczyk & Kern, 2008).

1.6.3 Μοριακοί μηχανισμοί της Treg-επαγόμενης καταστολής

Τα Tregs χρησιμοποιούν μια ποικιλία στρατηγικών που έχουν ως αποτέλεσμα την παρεμπόδιση του πολλαπλασιασμού των T λεμφοκυττάρων και την παραγωγή κυτταροκινών. Εκτός από τα T λεμφοκύτταρα, τα Tregs μπορούν να καταστέλλουν τη δράση των B λεμφοκυττάρων, των NK κυττάρων, των NKT κυττάρων και των αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων, όπως είναι τα δενδριτικά κύτταρα και τα μονοκύτταρα. Οι στρατηγικές αυτές χωρίζονται σε δύο κατηγορίες. Η πρώτη κατηγορία περιλαμβάνει αυτές που απαιτούν κυτταρική επαφή, όπως η καταστολή του πολλαπλασιασμού των δραστικών T λεμφοκυττάρων μέσω του μορίου CTLA-4. Η δεύτερη κατηγορία περιλαμβάνει τις στρατηγικές καταστολής που δεν απαιτούν κυτταρική επαφή, όπως η παραγωγή των ανοσοκατασταλτικών κυτταροκινών TGF-β και IL-10 (Εικόνα 6).

Έκκριση κυτταροκινών από τα Tregs

Έχειδειχθεί ότι τα Tregs παράγουν κατασταλτικές κυτταροκίνες που χαρακτηρίζονται από ισχυρά ανοσοκατασταλτική δράση, όπως ο TGF-β και η ιντερλευκίνη-10 (IL-10). Ωστόσο, σε πειράματα απενεργοποίησης της δράσης είτε του TGF-β, είτε της IL-10 η ικανότητα καταστολής των Tregs *in vitro* φαίνεται να μην επηρεάζεται (Thornton & Shevach, 1998). Μεταγενέστερες μελέτες έδειξαν ότι η κύρια κατασταλτική κυτταροκίνη που παράγεται από τα φυσικά Tregs είναι η IL-35, η οποία είναι απαραίτητη για τη διατήρηση της ομοιόστασης και της λειτουργικότητας των κυττάρων αυτών (Collison *et al.*, 2007).

Επίδραση των Tregs στα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα

Τα Tregs μπορούν να καταστείλουν με έμμεσο τρόπο τον πολλαπλασιασμό των T λεμφοκυττάρων ασκώντας ρυθμιστικές δράσεις στα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα, ειδικά στα δενδριτικά κύτταρα. Τα Tregs μπορούν είτε να μπλοκάρουν την ωρίμανση και τη λειτουργία των δενδριτικών κυττάρων, είτε μέσω κυτταροκινών, όπως ο TGF-β, να μειώνουν την ικανότητα αυτών των κυττάρων να ενεργοποιούν τα δραστικά T λεμφοκύτταρα, εμποδίζοντας τον πολλαπλασιασμό των τελευταίων (Misra *et al.*, 2004). Τα Tregs μπορούν να επάγουν μείωση της έκφρασης των συνδιεγερτικών μορίων CD80 και CD86 στην επιφάνεια των δενδριτικών κυττάρων. Αυτό επιτυγχάνεται με τη δράση του κατασταλτικού μορίου

CTLA-4, που εκφράζεται σε υψηλά επίπεδα στην επιφάνεια των Tregs. Μια μελέτη του 2011 έδειξε ότι τα Tregs μπορούν να μειώνουν τη διαθεσιμότητα συνδιεγερτικών μορίων στην επιφάνεια των δενδριτικών κυττάρων μέσω του CTLA-4, το οποίο επάγει την ενδοκυττάρωση του συνδιεγερτικού μορίου CD86 (Qureshi *et al.*, 2011). Ακόμη, ένα άλλο μόριο που εκφράζεται στην επιφάνεια των Tregs είναι το LAG3, το οποίο μπορεί να προσδένεται με υψηλή συγγένεια στα μόρια MHC τάξης II στην επιφάνεια των δενδριτικών κυττάρων. Η πρόσδεση αυτή οδηγεί στην ενεργοποίηση ενός καταρράκτη σηματοδότησης που διαμεσολαβείται από το μόριο ITAM και προκαλεί αναστολή της ωρίμανσης των δενδριτικών κυττάρων και της ικανότητάς τους να ενεργοποιούν δραστικά T λεμφοκύτταρα (Liang *et al.*, 2008). Επιπλέον, τα Tregs εκφράζουν το εκτοένζυμο CD39, το οποίο μετατρέπει το ATP σε ADP ή AMP, με αποτέλεσμα να παρεμποδίζεται η ATP-εξαρτώμενη ωρίμανση των δενδριτικών κυττάρων (Borsellino *et al.*, 2007). Τέλος, τα Tregs μπορούν να επάγουν την παραγωγή ανοσοκατασταλτικών μορίων από τα δενδριτικά κύτταρα. Συγκεκριμένα, η πρόσδεση του CTLA-4 των Tregs στα μόρια CD80/CD86 των δενδριτικών κυττάρων επάγει την έκφραση του ενζύμου IDO (2,3-διοξυγενάση της ινδολοαμίνης), το οποίο είναι ισχυρά ανοσοκατασταλτικό και μπλοκάρει την ενεργοποίηση των δραστικών T λεμφοκυττάρων (Fallarino *et al.*, 2003, Meng *et al.*, 2016).

Θανάτωση κυττάρων-στόχων από τα Tregs

Ένας άλλος μηχανισμός καταστολής των Tregs είναι η λύση των κυττάρων-στόχων, όπως ακριβώς πραγματοποιείται και από τα CD8⁺ T λεμφοκύτταρα και τα NK κύτταρα με τη χρήση του μονοπατιού περφορίνης – θρυμματίνης B. Τα Tregs μπορούν μέσω αυτού του μονοπατιού να επάγουν απόπτωση σε CD8⁺ και CD4⁺ T λεμφοκύτταρα, αλλά και σε αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα, όπως τα δενδριτικά κύτταρα (Grossman *et al.*, 2004, Gondek *et al.*, 2005). Παράλληλα, υπάρχουν ενδείξεις ότι τα Tregs μπορούν να θανατώνουν CD8⁺ T λεμφοκύτταρα, μέσω του μη εκκριτικού μονοπατιού Fas/FasL (Strauss *et al.*, 2009).

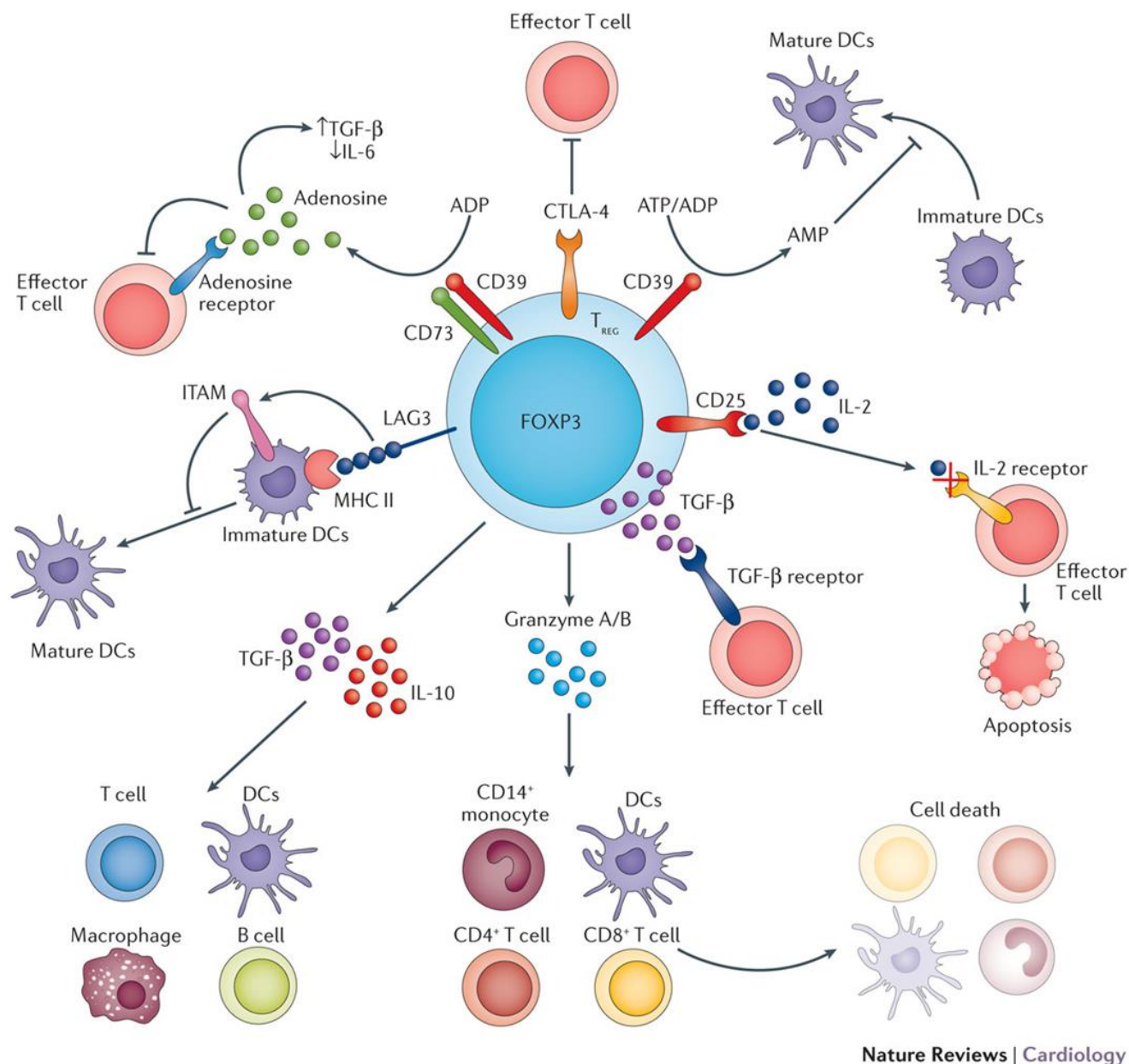
Άλλοι μηχανισμοί καταστολής των Tregs

Η ταυτόχρονη έκφραση των επιφανειακών μορίων CD39 και CD73 στα Tregs μπορεί να επάγει την δημιουργία αδενοσίνης από ADP που βρίσκεται εξωκυτταρικά. Η αδενοσίνη μπορεί να καταστείλει τη λειτουργία των δραστικών T λεμφοκυττάρων, καθώς προσδένεται στους A_{2A}

υποδοχείς αδενοσίνης που φέρουν τα κύτταρα αυτά. Η ενεργοποίηση των συγκεκριμένων υποδοχέων εκτός από την καταστολή που προκαλεί στα δραστικά T λεμφοκύτταρα, επάγει και την παραγωγή περισσότερων Tregs, καθώς αναστέλλει την έκφραση της IL-6 και επάγει την έκφραση TGF- β (Deaglio *et al.*, 2007, Zarek *et al.*, 2008).

Η IL-2 είναι μια απαραίτητη κυτταροκίνη για την ανάπτυξη, την ομοιόσταση και τη λειτουργία τόσο των Tregs όσο και των υπόλοιπων T λεμφοκυττάρων. Τα Tregs καθώς εκφράζουν υψηλά επίπεδα του μορίου CD25, που συνιστά την α αλυσίδα του υποδοχέα της IL-2, έχουν ανταγωνιστικό πλεονέκτημα στην πρόσδεση της συγκεκριμένης κυτταροκίνης συγκριτικά με τα υπόλοιπα CD4⁺ T λεμφοκύτταρα. Συνεπώς, μια ακόμη στρατηγική καταστολής είναι η αποστέρηση της IL-2 από το μικροπεριβάλλον των CD4⁺ T λεμφοκυττάρων, γεγονός που οδηγεί στον κυτταρικό θάνατο των τελευταίων (Pandiyani *et al.*, 2007).

Αρχικά, είχε υποτεθεί ότι τα Tregs μπορούν να καταστέλλουν τις B λεμφοκυτταρικές αποκρίσεις έμμεσα μέσω καταστολής της δράσης των CD4⁺ T λεμφοκυττάρων που «βοηθούν» τα B λεμφοκύτταρα να παράγουν αντισώματα. Ωστόσο, έχειδειχθεί ότι τα Tregs μπορούν να δρουν απευθείας στα B λεμφοκύτταρα αναστέλλοντας τη διαδικασία μετάπτωσης τάξης και επάγοντας απόπτωση μέσω του μονοπατιού περφορίνης-θρυμματίνης B (Lim *et al.*, 2005).



Εικόνα 6: Μοριακοί μηχανισμοί ανοσοκαταστολής διαμεσολαβούμενοι από τα Tregs. Οι μηχανισμοί αυτοί μπορούν να διακριθούν σε δύο μεγάλες κατηγορίες. Η πρώτη κατηγορία μηχανισμών καταστολής απαιτεί κυτταρική επαφή, όπως η παρεμπόδιση του T κυτταρικού πολλαπλασιασμού μέσω του μορίου CTLA-4 των Tregs. Η δεύτερη κατηγορία μηχανισμών καταστολής δεν απαιτεί κυτταρική επαφή, όπως η αποστέρηση της κυτταροκίνης IL-2 από το μικροπεριβάλλον των CD4⁺ T λεμφοκυττάρων (Meng *et al.*, 2016).

1.6.4 Τα Tregs σε κακοήθεις νεοπλασίες

Η συμμετοχή των Tregs στον καρκίνο είναι ιδιαίτερης σημασίας, ωστόσο ο ακριβής ρόλος που διαδραματίζουν παραμένει αμφιλεγόμενο θέμα. Σε πολλές ανθρώπινες νεοπλασίες και στα πιο πολλά *in vivo* μοντέλα όγκων, η συχνότητα και η κατασταλτική ικανότητα των Tregs είναι αυξημένες, συγκριτικά με αυτές που παρατηρούνται σε υγιή άτομα (Mougiakakos *et al.*, 2010, Wolf *et al.*, 2003). Παρά τη γενική αντίληψη ότι η αύξηση των Tregs στις κακοήθειες συνεπάγεται κακή πρόγνωση (Curiel *et al.*, 2004, Deng *et al.*, 2010), υπάρχουν διάφορες μελέτες που δείχνουν ότι σε συγκεκριμένες περιπτώσεις η αύξηση του αριθμού και της δράσης των Tregs σχετίζεται με καλύτερη πρόγνωση ως προς την εξέλιξη μιας νεοπλασίας (Badoual *et al.*, 2006, Tzankov *et al.*, 2008, Farinha *et al.*, 2010). Παρότι ο ρόλος των Tregs στην ανάπτυξη ενός όγκου, στην εξέλιξη της μετάστασης και εν τέλει στην πρόγνωση της νόσου, παραμένει υπό συζήτηση, υπάρχει πληθώρα πειραματικών και κλινικών δεδομένων που συνηγορεί στο ότι τα Tregs εμπλέκονται στην καταστολή των αντικαρκινικών ανοσοαποκρίσεων και έτσι, διευκολύνουν τη διαφυγή των καρκινικών κυττάρων από τον έλεγχο του ανοσοποιητικού συστήματος (ανοσοεπιτήρηση).

Γενικά, τα Tregs στρατολογούνται για να καταστείλουν την ενεργή ανοσοαπόκριση έναντι ενδογενών ή εξωγενών παραγόντων σε περιοχές, όπου ελλοχεύει ο κίνδυνος ιστικής βλάβης από την εξελισσόμενη φλεγμονή. Παράλληλα, τα Tregs μπορούν να στρατολογηθούν από έναν αναπτυσσόμενο όγκο, ώστε να καταστείλουν τις αντικαρκινικές ανοσοαποκρίσεις. Για τους παραπάνω λόγους έχει αποδοθεί διττός ρόλος στα Tregs όσον αφορά στη συμμετοχή τους στις νεοπλασίες (Whiteside, 2012). Η στρατολόγηση των Tregs σε όγκους ρυθμίζεται από χημειοκίνες που παράγονται από το μικροπεριβάλλον του όγκου, όπως για παράδειγμα η χημειοκίνη CCL22 που αποτελεί προσδέτη του υποδοχέα CCR4. Τα ενεργοποιημένα Tregs εκφράζουν διάφορους υποδοχείς χημειοκινών (π.χ. CCR4, CCR5, CCR6, CCR7 και CCR10) (Ondondo *et al.*, 2013). Παρουσία των χημειοκινών αυτών που απελευθερώνονται από τα καρκινικά κύτταρα, τα Tregs μεταναστεύουν στο μικροπεριβάλλον του όγκου, όπου παρεμποδίζουν τις ανοσοαποκρίσεις των δραστικών κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος που διηθούν στον όγκο.

Από την άλλη, είναι πιθανό σε όγκους που χαρακτηρίζονται από εκτεταμένη φλεγμονή, όπως ο καρκίνος του παχέος εντέρου, να είναι απαραίτητη η παρουσία των Tregs για τον έλεγχο της χρόνιας φλεγμονής, την πρόληψη της ιστικής βλάβης και τον περιορισμό της περαιτέρω ανάπτυξης του όγκου που υποβοηθείται από την υπάρχουσα φλεγμονή (Ladoire *et*

al., 2011). Μάλιστα, σε ασθενείς με καρκίνο του παχέος εντέρου, η παρουσία και ο αυξημένος αριθμός Tregs στο μικροπεριβάλλον του όγκου έχουν συσχετιστεί με καλύτερη πρόγνωση της νόσου. Η ίδια συσχέτιση με τον αυξημένο αριθμό Tregs έχει παρατηρηθεί σε ασθενείς με διάχυτο λέμφωμα από μεγάλα Β κύτταρα (germinal center-like diffuse large B cell lymphoma), οζώδες λέμφωμα (follicular lymphoma) και σε λέμφωμα Hodgkin (Tzankov *et al.*, 2008). Τέλος, σε ασθενείς με ακανθοκυτταρικό καρκίνωμα κεφαλής και τραχήλου (head and neck squamous cell carcinoma), τα αυξημένα επίπεδα Tregs στο μικροπεριβάλλον του όγκου έχουν συσχετιστεί με καλό τοπικό έλεγχο του όγκου και με υψηλότερη ολική επιβίωση (Badoual *et al.*, 2006).

1.6.5 Τα Tregs στο ΠΜ

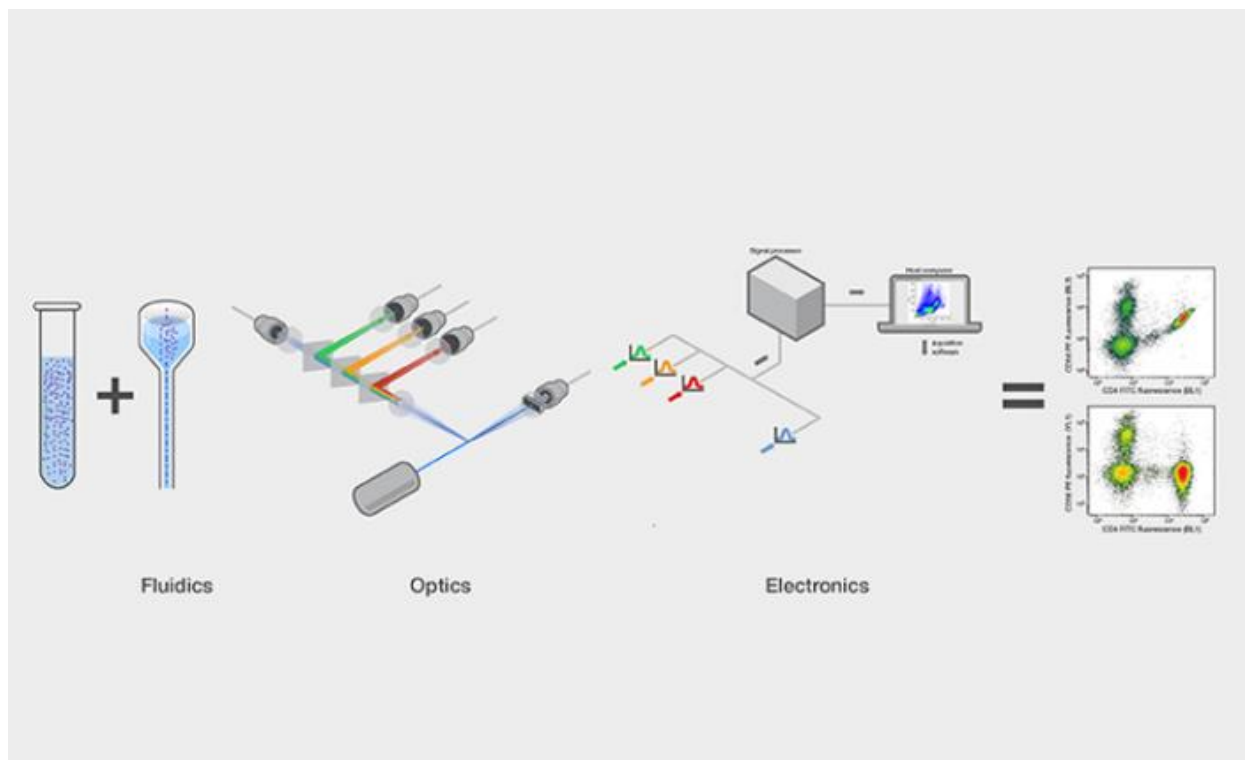
Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, έχει φανεί ότι σε αρκετές νεοπλασίες τα Tregs στρατολογούνται μέσω χημειοκινών στο μικροπεριβάλλον του όγκου, όπου είτε συμμετέχουν στην καταστολή των ανοσοαποκρίσεων έναντι του όγκου, είτε μετριάζουν την εξελισσόμενη φλεγμονή προστατεύοντας τους φυσιολογικούς ιστούς από εκτεταμένη βλάβη. Όσον αφορά στο ΠΜ αρκετές ερευνητικές ομάδες έχουν δείξει ότι υπάρχει μια αύξηση των Tregs στο περιφερικό αίμα ασθενών με ΠΜ σε σύγκριση με τα υγιή άτομα (Feyler *et al.*, 2009, Brimnes *et al.*, 2010). Ακόμη, έχει βρεθεί συσχέτιση μεταξύ αυξημένων επιπέδων λειτουργικών Tregs και προόδου της νόσου σε *in vivo* μοντέλο ΠΜ σε ποντικό (Laronne-Bar-On *et al.*, 2008). Επίσης, η ομάδα των Beyer *et al.* έδειξε ότι τα Tregs από ασθενείς με ΠΜ εκφράζουν υψηλότερα επίπεδα IL-10 και TGF- β σε σύγκριση με τα υγιή άτομα, υποδηλώνοντας πιθανώς ότι έχουν ισχυρότερο κατασταλτικό δυναμικό. Παρόλα αυτά, υπάρχουν αντικρουόμενες μελέτες που δείχνουν μειωμένα ποσοστά Tregs στο περιφερικό αίμα ασθενών με ΠΜ (Gupta *et al.*, 2011; Prabhala *et al.*, 2006). Πιθανώς, οι διαφορές να οφείλονται στο διαφορετικό συνδυασμό αντιγονικών δεικτών που χρησιμοποιεί η κάθε ερευνητική ομάδα για την ταυτοποίηση ή/και την απομόνωση των Tregs. Εντούτοις, παραμένει άγνωστη η αλληλεπίδραση των Tregs με τα μυελωματικά κύτταρα. Μάλιστα, υπάρχει μελέτη σύμφωνα με την οποία ανεξαρτήτως του σταδίου της νόσου, ο αριθμός των Tregs στο μυελό των οστών ασθενών με ΠΜ είναι ίδιος με αυτόν που παρατηρείται σε υγιή άτομα (Foglietta *et al.*, 2014).

1.7 Βασικές αρχές κυτταρομετρίας ροής

Η κυτταρομετρία ροής είναι μια αυτοματοποιημένη βιοφυσική τεχνολογία που χρησιμοποιεί δέσμες laser, ώστε να μετρά και στη συνέχεια να αναλύει ταυτόχρονα πολλαπλά φυσικοχημικά χαρακτηριστικά σωματιδίων σε ένα εναιώρημα, συνηθέστερα κυττάρων. Τα σωματίδια αυτά αναλύονται καθώς διέρχονται σε μονήρη ροή μπροστά από μία δέσμη φωτός. Η τεχνολογία αυτή εφαρμόζεται στην κατάμετρηση αλλά και το διαχωρισμό κυττάρων, στην ανίχνευση επιφανειακών αντιγόνων και γενικότερα βιοδεικτών, όπως και σε τεχνικές πρωτεϊνικής μηχανικής. Στα χαρακτηριστικά των μεμονωμένων σωματιδίων που αξιολογούνται συμπεριλαμβάνεται το σχετικό μέγεθος, η εσωτερική πολυπλοκότητα καθώς και η σχετική ένταση φθορισμού που εκπέμπεται. Τα προαναφερθέντα χαρακτηριστικά προσδιορίζονται μέσω ενός συζευγμένου συστήματος οπτικής-ηλεκτρονικής που καταγράφει τον τρόπο με τον οποίο το σωματίδιο/κύτταρο φθορίζει και προκαλεί σκέδαση της προσπίπτουσας δέσμης laser. Ένα κυτταρόμετρο ροής απαρτίζεται από τρία κύρια συστήματα (Εικόνα 7) :

- 1) το υδραυλικό σύστημα (fluidics), που είναι επιφορτισμένο με τη μεταφορά των σωματιδίων/κυττάρων σε νηματική ροή ώστε αυτά να στοχευθούν από τη δέσμη laser ένα προς ένα,
- 2) το οπτικό σύστημα (optics), το οποίο αποτελείται από τις δέσμες laser που προσπίπτουν στο υπό ανάλυση δείγμα, και από οπτικά φίλτρα και κάτοπτρα που κατευθύνουν τα προκύπτοντα φωτεινά σήματα στους ανιχνευτές/δέκτες και
- 3) το ηλεκτρονικό σύστημα (electronic), το οποίο μετατρέπει τα φωτεινά σήματα που ανιχνεύονται σε ηλεκτρονικά-ψηφιακά δεδομένα, τα οποία προσφέρονται για περαιτέρω επεξεργασία στον υπολογιστή. Ακόμη, αν το κυτταρόμετρο ροής είναι εξοπλισμένο με τη δυνατότητα διαχωρισμού των κυττάρων, τότε μέσω του ηλεκτρονικού συστήματος μπορούν να επιλεγθούν τα επιθυμητά κριτήρια διαλογής των κυττάρων.

Αξίζει να αναφερθεί ακόμη ότι κατάλληλα για ανάλυση στο κυτταρόμετρο ροής θεωρούνται σωματίδια που εμπίπτουν στο εύρος μεγέθους μεταξύ 0,2 μm και 150 μm , ενώ μπορούν να αναλυθούν και κύτταρα τα οποία προέρχονται από συμπαγείς ιστούς, αφού ομογενοποιηθούν και μετατραπούν σε κυτταρικό εναιώρημα.



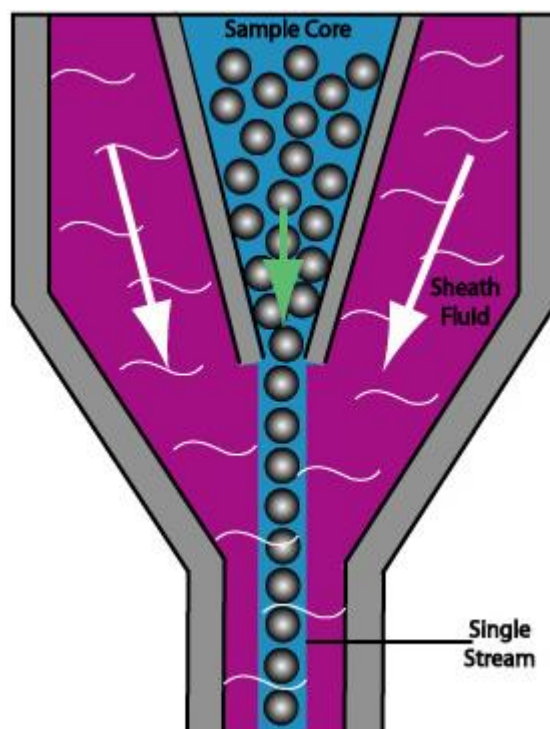
Εικόνα 7: Απλουστευμένη σχηματική αναπαράσταση των τριών συστημάτων ενός κυτταρομέτρου ροής.

Υδραυλικό σύστημα

Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, ο σκοπός του υδραυλικού συστήματος είναι η μεταφορά των αιωρούμενων μονήρων σωματιδίων στο σημείο όπου θα στοχευθούν από τη δέσμη laser. Για τη βέλτιστη πρόσπτωση της φωτεινής δέσμης πρέπει η νηματική ροή του υπό ανάλυση δείγματος να είναι εστιασμένη και ευθυγραμμισμένη στο κέντρο της δέσμης laser, ώστε να διέρχεται ένα κύτταρο ανά δεδομένη στιγμή.

Όσον αφορά τη δομή του, το υδραυλικό σύστημα αποτελείται από ένα κεντρικό κανάλι/πυρήνα (central core ή central sample), μέσω του οποίου εγχύεται το δείγμα, και ο οποίος περιβάλλεται από ένα εξωτερικό υγρό περιβλήματος ταχύτερης ροής (sheath fluid) (Εικόνα 8). Καθώς το υγρό περιβλήματος ρέει, δημιουργεί μία δύναμη έλξης στο υγρό του κεντρικού πυρήνα, ο οποίος έχει κωνική δομή. Με τον τρόπο αυτό η ταχύτητα ροής του υγρού στο κεντρικό πυρήνα αλλάζει, και το μέτωπό της γίνεται παραβολικό με μεγαλύτερη ταχύτητα στο κέντρο του και σχεδόν μηδενική στα περιφερειακά σημεία. Το φαινόμενο αυτό δημιουργεί ροή μονήρων σωματιδίων και καλείται υδροδυναμική εστίαση. Τα δύο υγρά έχουν διαφορετικές πυκνότητες και όπως είδαμε αναπτύσσουν διαφορετικές ταχύτητες, με

αποτέλεσμα, ειδικά στις ιδανικές συνθήκες νηματικής ροής, να αποφεύγεται η τυρβώδης κίνηση των υγρών στα σημεία επαφής τους, άρα και η ανάμειξή τους.



Εικόνα 8: Τρόπος δημιουργίας ροής μονήρων σωματιδίων στο υδραυλικό σύστημα. Το φαινόμενο είναι γνωστό ως υδροδυναμική εστίαση.

Αυξάνοντας την πίεση του ρυθμού ροής (high flow rate), αυξάνεται η διάμετρος του υγρού του κεντρικού πυρήνα, επιτρέποντας την είσοδο περισσότερων σωματιδίων στη ροή. Έχοντας λοιπόν μια πιο ευρεία ροή σωματιδίων, κάποια κύτταρα είναι δυνατόν να διέλθουν εκτός κέντρου ακτίνας laser σε όχι και τόσο βέλτιστη γωνία. Αυτό μπορεί να φανεί χρήσιμο σε ορισμένες εφαρμογές που έχουν στόχο τον ποιοτικό προσδιορισμό, όπως είναι η περίπτωση προσδιορισμού του ανοσοφαινοτύπου. Παρ'όλα αυτά σε αναλύσεις ποσοτικού προσδιορισμού, όπως το κυτταρικό περιεχόμενο σε DNA, είναι προτιμότερο η ροή των σωματιδίων να είναι χαμηλότερη (low flow rate) και τα κύτταρα να είναι ευθυγραμμισμένα με τη δέσμη laser, ώστε τα αποτελέσματα να είναι πιο ομοιόμορφα και με όσο το δυνατόν μικρότερες αποκλίσεις.

Οπτικό και ηλεκτρονικό σύστημα

Μόλις το σωματίδιο περάσει μέσα από μία ή και περισσότερες φωτεινές δέσμες θα προκαλέσει σκέδαση του φωτός και θα εκπέμψει φθορισμό εφόσον είναι σημασμένο με κάποιο φθοριόχρωμα. Οι συνηθέστερες πηγές φωτός είναι οι ακτίνες laser καθώς προσφέρουν το

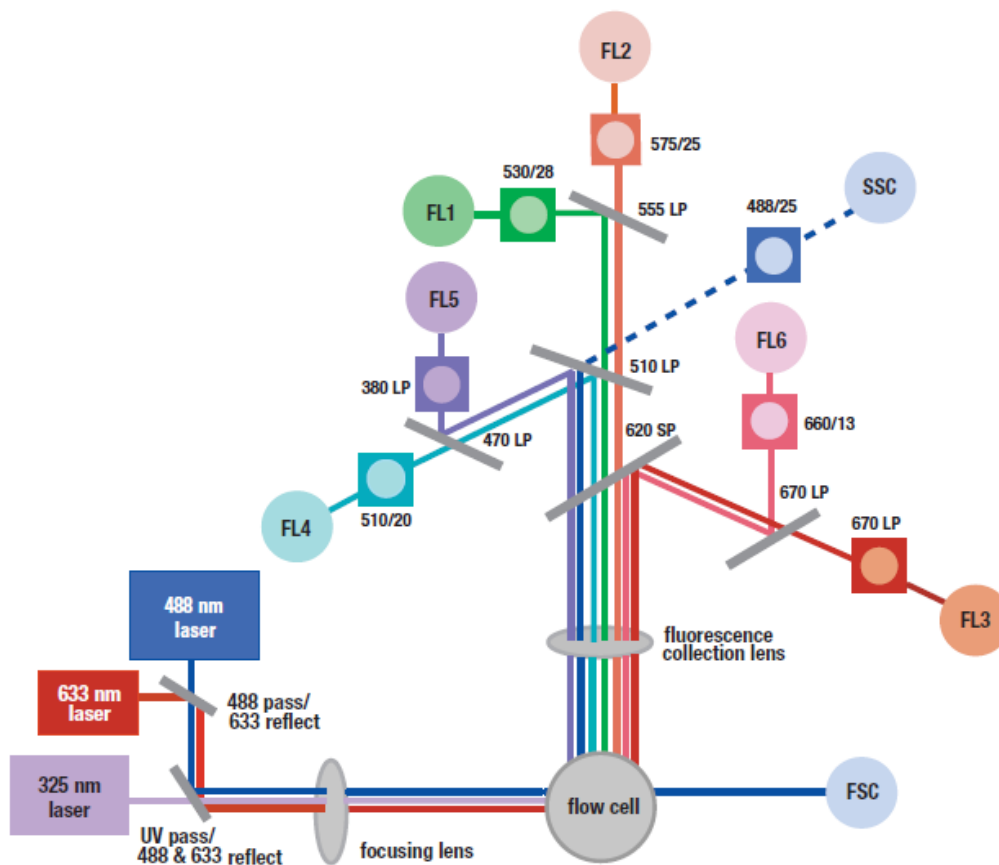
πλεονέκτημα παραγωγής ακτινοβολίας πολύ συγκεκριμένου μήκους κύματος. Η σκέδαση και ο εκπεμπόμενος φθορισμός ανιχνεύονται και μπορούν να δώσουν πληροφορίες για τις φυσικοχημικές ιδιότητες των υπό ανάλυση σωματιδίων.

Από τις πρώτες πληροφορίες που εκτιμώνται είναι το φως με εμπρόσθια κατεύθυνση σκέδασης, το οποίο σκεδάζεται με απόκλιση έως 20° από τη διεύθυνση της δέσμης laser και συλλέγεται από τον ανιχνευτή-φακό που ονομάζεται εμπρόσθιο κανάλι σκέδασης (forward scatter channel, FSC). Η εκτίμηση του FSC αντιστοιχεί στο σχετικό μέγεθος των σωματιδίων και χρησιμεύει στο διαχωρισμό ζωντανών κυττάρων από κυτταρικά υπολείμματα και συσσωματώματα. Ακολούθως, σκεδαζόμενο φως υπό γωνία περίπου 90° συλλέγεται από το φωτοπολλαπλασιαστή-φακό, που ονομάζεται πλάγιο κανάλι σκέδασης (side scatter channel, SSC) και η εκτίμησή του αντιστοιχεί στη σχετική εσωτερική πολυπλοκότητα και την κοκκίωση που τυχόν παρουσιάζουν τα κύτταρα/σωματίδια. Ο συνδυασμός των δύο αυτών παραμέτρων διαφέρει ανάμεσα στα σωματίδια και επιτρέπει τον αναλυτικό διαχωρισμό κυτταρικών υποπληθυσμών οι οποίοι συνυπάρχουν στο αναλυόμενο κυτταρικό εναιώρημα.

Εκτός από την εμπρόσθια και πλάγια σκέδαση του φωτός υπάρχουν και ειδικοί ανιχνευτές που είναι σε θέση να εκτιμούν τον εκπεμπόμενο φθορισμό από συγκεκριμένα φθοριοχρώματα, δίνοντας πληροφορίες για περαιτέρω χαρακτηριστικά των δειγμάτων, όπως η έκφραση επιφανειακών και ενδοκυττάρων δεικτών, η παραγωγή κυτταροκινών και άλλων πρωτεϊνών. Οι ανιχνευτές αυτοί είναι δύο ειδών, οι φωτοδιόδοι σιλικόνης που χρησιμεύουν στη μέτρηση του FSC και οι πιο ευαίσθητοι φωτοπολλαπλασιαστές που μετρούν το SSC αλλά και τον φθορισμό.

Λειτουργικό στοιχείο με μεγάλη σημασία για την εκτίμηση του φθορισμού και του SSC συνιστούν τα οπτικά φίλτρα. Αυτά έχουν κατοπτρική μορφή και είναι υπεύθυνα για την κατανομή των επιθυμητών μηκών κύματος στους αντίστοιχους φωτοπολλαπλασιαστές, επιτρέποντας την επιλεκτική διέλευση συγκεκριμένων μηκών κύματος (Εικόνα 9). Τα οπτικά φίλτρα χωρίζονται σε τρεις κατηγορίες:

- 1) Long pass φίλτρα, τα οποία επιτρέπουν τη διέλευση φωτός πάνω από ένα όριο (cut-off) μήκους κύματος,
- 2) Short pass φίλτρα, τα οποία λειτουργούν αντίστροφα με τα προηγούμενα και
- 3) Band pass φίλτρα, τα οποία επιτρέπουν τη διέλευση φωτός συγκεκριμένου εύρους μήκους κύματος.



Εικόνα 9: Στο κάτω μέρος φαίνονται οι τρεις προσπίπτουσες δέσμες laser να αναλύουν το δείγμα. Η φωτοδίοδος σιλικόνης του καναλιού εμπρόσθιας σκέδασης (FSC) συλλέγει το σκεδαζόμενο φως με γωνία απόκλισης μέχρι 20° από τη διεύθυνση των προσπιπτουσών δεσμών, και εκτιμά το σχετικό μέγεθος των σωματιδίων. Οι υπόλοιπες σκεδαζόμενες ακτίνες με πολύ μεγαλύτερη γωνία απόκλισης, με τη βοήθεια των οπτικών φίλτρων κατευθύνονται στους αντίστοιχους φωτοπολλαπλασιαστές, όπου αξιολογούνται παράμετροι όπως η πλάγια σκέδαση (SSC) και ο φθορισμός.

Στη συνέχεια, μόλις το φως προσπέσει στους ανιχνευτές μετατρέπεται σε ηλεκτρικό ρεύμα χαμηλής έντασης, το οποίο ενισχύεται μέσω μιας διάταξης ενισχυτών και ακολούθως μεταφράζεται από αναλογικό σε ψηφιακό σήμα στον ηλεκτρονικό υπολογιστή. Πλέον τα δεδομένα της ανάλυσης είναι αποθηκευμένα στο αντίστοιχο πρόγραμμα του υπολογιστή και μπορούν να επεξεργαστούν περαιτέρω με ποικίλους τρόπους, τόσο συνολικά όσο κι αποσπασματικά, επιλέγοντας με περίφραξη (gating) τους κυτταρικούς υποπληθυσμούς ενδιαφέροντος.

Φθοριοχρώματα

Τα φθοριοχρώματα είναι φθορίζοντες χημικοί παράγοντες, οι οποίοι δεχόμενοι ακτινοβολία συγκεκριμένου μήκους κύματος (ορατό φως ή ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία) είναι σε θέση να την επανεκπέμψουν σε μεγαλύτερο μήκος κύματος. Η παραπάνω διαδικασία συνιστά το φθορισμό και είναι μία μορφή φωταύγειας. Το πρώτο κομμάτι ονομάζεται διέγερση και το δεύτερο όπου εκπέμπεται ακτινοβολία μεγαλύτερου μήκους κύματος ονομάζεται εκπομπή.

Ο μηχανισμός του φθορισμού έχει ως εξής: όταν ένα φθοριόχρωμα απορροφά ενέργεια από την ακτινοβολία, κάποια ηλεκτρόνια μεταπηδούν σε στιβάδα υψηλότερης ενέργειας, κατάσταση η οποία ονομάζεται διεγερμένη. Η ποσότητα της ενέργειας που απαιτείται για τη διέγερση διαφέρει μεταξύ των φθοριοχρωμάτων και αναφέρεται ως ενέργεια διέγερσης. Κάποια από αυτήν την ενέργεια μετατρέπεται σε θερμότητα, ενώ η υπόλοιπη απελευθερώνεται με τη μορφή φθορισμού, καθώς το ηλεκτρόνιο επιστρέφει στη θεμελιώδη κατάσταση.

Η εκπεμπόμενη ακτινοβολία είναι χαμηλότερης ενέργειας από αυτή της διέγερσης, άρα είναι και μεγαλύτερου μήκους κύματος, και πρακτικά αντιστοιχεί σε διαφορετικό χρώμα. Κάθε φθοριόχρωμα έχει ένα χαρακτηριστικό φάσμα απορρόφησης και εκπομπής, τα οποία φέρουν κάποιες μέγιστες τιμές και είναι οι περιοχές όπου το εκάστοτε φθοριόχρωμα διεγείρεται καλύτερα και συγχρόνως επανεκπέμπει ακτινοβολία με μεγαλύτερη ένταση (Liu *et. al.*, 2013) (Εικόνα 10).

Fluorochrome	Fluorescence Emission Color	Em-Max (nm)
Brilliant Violet™ 421	Blue	421
BD Horizon™ V450	Blue	448
Pacific Blue™	Blue	452
BD Horizon™ V500	Green	500
Alexa Fluor® 488	Green	519
FITC	Green	519
PE	Yellow	578
BD Horizon PE-CF594	Orange	612
APC	Red	660
Alexa Fluor® 647	Red	668
PE-Cy™5	Red	667
PerCP	Red	678
PerCP-Cy™5.5	Far Red	695
Alexa Fluor® 700	Far Red	719
PE-Cy™7	Infrared	785
APC-Cy7	Infrared	785
BD APC-H7	Infrared	785

Εικόνα 10: Τα κυριότερα φθοριοχρώματα που χρησιμοποιούνται στην κυτταρομετρία ροής. Διακρίνεται το μέγιστο μήκος κύματος εκπομπής, καθώς και το χρώμα στο οποίο αντιστοιχεί.

1.8. Η Πολυπαραμετρική Κυτταρομετρία Ροής (ΠΚΡ) στη Διάγνωση και την ανίχνευση της EYN σε ασθενείς με ΠΜ

Η ΠΚΡ παρουσιάζει πολλά πλεονεκτήματα ως μέθοδος μελέτης των κακοήθων πλασματοκυττάρων και κατ' επέκταση μπορεί να εφαρμοστεί με ευκολία για την ανίχνευση της EYN στο ΠΜ. Η ΠΚΡ επιτρέπει:

- την ταυτοποίηση και το χαρακτηρισμό κάθε μοναδιαίου κύτταρου με βάση μεγάλο αριθμό παραμέτρων
- τη δυνατότητα ανάλυσης μεγάλου αριθμού κυττάρων σε σύντομο χρονικό διάστημα
- τη μελέτη τόσο επιφανειακών όσο και ενδοκυτταρικών αντιγονικών δεικτών/παραμέτρων
- την ποσοτικοποίηση των επιθυμητών κυτταρικών υποπληθυσμών του βιολογικού δείγματος (μυελός των οστών, περιφερικό αίμα) και την έκφραση αυτών ως ποσοστού των ολικών κυττάρων
- την ποιοτική αξιολόγηση του βιολογικού δείγματος
- την ευρεία εφαρμοσιμότητα στο σύνολο σχεδόν των δειγμάτων από ασθενείς με ΠΜ
- την καταγραφή αποτελεσμάτων που χαρακτηρίζονται από υψηλή ευαισθησία και ειδικότητα της τάξης του 10^{-5} με 10^{-6} (Paiva *et al.*, 2010, Galtseva *et al.*, 2017)

1.8.1 Ταυτοποίηση των πλασματοκυττάρων

Το επιφανειακό αντιγόνο CD38 συνιστά έναν αξιόπιστο δείκτη για την αναγνώριση τόσο των φυσιολογικών, όσο και των παθολογικών πλασματοκυττάρων. Το συγκεκριμένο μόριο παρουσιάζει υψηλά επίπεδα έκφρασης σε διάφορα αναπτυξιακά στάδια όπως αυτά των CD34⁺ κυττάρων, των πρόδρομων Β λεμφοκυττάρων, των ενεργοποιημένων Β λεμφοκυττάρων, ενώ φτάνει σε μέγιστα επίπεδα έκφρασης στα πλασματοκύτταρα. Ένας επιπλέον δείκτης που σχετίζεται με τα πλασματοκύτταρα είναι το επιφανειακό μόριο CD138, ενώ για την πιο αξιόπιστη αναγνώριση των CD38⁺CD138⁺ πλασματοκυττάρων και το διαχωρισμό αυτών από άλλους πληθυσμούς, χρησιμοποιούνται οι παράμετροι εμπρόσθιας και πλάγιας σκέδασης, FSC και SSC αντίστοιχα, καθώς και το μόριο CD45 (Arroz *et al.*, 2016, Campana *et al.*, 2000; Wijdenes *et al.*, 1996).

1.8.2 Ανοσοφαινότυπος φυσιολογικών πλασματοκυττάρων

Τα τελικώς διαφοροποιημένα και μακρόβια πλασματοκύτταρα του μυελού των οστών τυπικά δεν εκφράζουν CD20, CD22 και μεμβρανική ανοσοσφαιρίνη (SmIg). Χαρακτηρίζονται ως CD45^{lo} και CD56^{-/lo}, εκφράζουν σε υψηλά επίπεδα τα μόρια CD138 και CD38, ενώ παρουσιάζουν ετερογένεια όσον αφορά στην έκφραση του μορίου CD19. Ωστόσο, παρά την ύπαρξη του προαναφερθέντος γενικού ανοσοφαινοτύπου, μπορεί να παρατηρηθούν πληθυσμοί με φαινότυπο CD19⁺/CD45⁺/CD81⁺/CD56⁺ που ανήκουν εξίσου στα φυσιολογικά/δραστικά πλασματοκύτταρα, αλλά αντιπροσωπεύουν διαφορετικό στάδιο ωρίμανσης. Η προοδευτική ωρίμανση των πλασματοκυττάρων μπορεί να σχετίζεται με τη μείωση της έκφρασης του μορίου CD19 και συνεπώς, με την εντόπιση των κυττάρων αυτών σε άλλους υποπληθυσμούς από τον κυρίαρχο CD19⁺CD56⁻ (Robillard *et al.*, 2014, Pojero *et al.*, 2015).

1.8.3 Ανοσοφαινότυπος μη φυσιολογικών πλασματοκυττάρων

Οι αντιγονικοί δείκτες που παρουσιάζουν αποκλίσεις στην έκφραση μεταξύ των φυσιολογικών και των μυελωματικών πλασματοκυττάρων είναι κυρίως τα μόρια CD19, CD56, CD45, CD38 και CD27 και σε μικρότερο βαθμό οι δείκτες CD20, CD28, CD33 και CD117 και SmIg (Flores-Montero *et al.*, 2016). Παράλληλα με τους προαναφερθέντες δείκτες πρέπει να συνεκτιμώνται και τα επίπεδα έκφρασης των κυτταροπλασματικών κ και λ ελαφριών αλυσίδων, ώστε να μπορεί να καθοριστεί με σαφήνεια η κλωνικότητα του παθολογικού υποπληθυσμού πλασματοκυττάρων. Αν λάβουμε υπόψη τις διακυμάνσεις στην έκφραση των δεικτών από ασθενή σε ασθενή, για να γίνει αξιόπιστη ταυτοποίηση του παθολογικού κλώνου πλασματοκυττάρων και διαχωρισμός αυτού από τα φυσιολογικά πλασματοκύτταρα, πρέπει να γίνει συνδυαστική αξιολόγηση όλων των επιφανειακών δεικτών μαζί με την κλωνικότητα (Stetler-Stevenson *et al.*, 2016).

1.9 Κυριότεροι αντιγονικοί δείκτες για την ταυτοποίηση των Tregs και τη μελέτη της λειτουργικότητάς τους με Κυτταρομετρία Ροής

Τα Tregs είναι ένα υποσύνολο $CD4^{+}$ T λεμφοκυττάρων με ικανότητα καταστολής των δραστικών ανοσοαποκρίσεων. Μάλιστα, στο πεδίο της ανοσοθεραπείας του καρκίνου τα Tregs αποτελούν ελκυστικό στόχο, ώστε να ξεπεραστεί η ανοσοκαταστολή που επάγουν σε ασθενείς με καρκίνο. Παρά το γεγονός ότι η μελέτη των Tregs με κυτταρομετρία ροής είναι ευρέως διαδεδομένη στην ανοσολογία, δεν υπάρχει ομοφωνία για τους δείκτες που πρέπει να χρησιμοποιούνται για το φαινοτυπικό προσδιορισμό των Tregs, αλλά ούτε και μια ενιαία, καθολικά αποδεκτή στρατηγική ανάλυσης. Στον παρακάτω πίνακα συνοψίζονται οι κυριότεροι αντιγονικοί δείκτες που χρησιμοποιούνται για την αναγνώριση των Tregs και τη μελέτη του λειτουργικού προφίλ τους (Πίνακας 2).

Πίνακας 2: Αντιγονικοί δείκτες που χρησιμοποιούνται για τη μελέτη των Tregs με κυτταρομετρία ροής. Οι δείκτες CD3, CD4, CD25 και FoxP3 είναι οι ελάχιστοι απαιτούμενοι για την ταυτοποίηση των Tregs.

Αντιγονικός Δείκτης	Τοπολογία
CD3	Κυτταρική Επιφάνεια
CD4	Κυτταρική Επιφάνεια
CD25	Κυτταρική Επιφάνεια
FoxP3	Ενδοπυρηνικά
CD127	Κυτταρική Επιφάνεια
CD45RA/CD45RO	Κυτταρική Επιφάνεια
Helios	Ενδοπυρηνικά
Ki67	Ενδοπυρηνικά
LAP/GARP	Κυτταρική Επιφάνεια
CTLA-4	Ενδοκυτταρικά
CD39	Κυτταρική Επιφάνεια
CD73	Ενδοκυτταρικά
CD147	Κυτταρική Επιφάνεια
CD137⁺/CD154⁻	Κυτταρική Επιφάνεια
CD49d	Κυτταρική Επιφάνεια
IL-2	Ενδοκυτταρικά
Neuropilin-1	Κυτταρική Επιφάνεια
CCR2	Κυτταρική Επιφάνεια

Σκοπός της εργασίας

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι η μελέτη των επιπέδων και της λειτουργικότητας των ρυθμιστικών Τ λεμφοκυττάρων (Tregs) στο μυελό των οστών και στο περιφερικό αίμα σε EYN^{+} και EYN^{-} ασθενείς με ΠΜ χρησιμοποιώντας Πολυπαραμετρική Κυτταρομετρία Ροής (ΠΚΡ).

Υλικά και Μέθοδοι

ΑΝΑΛΩΣΙΜΑ

- Καλλιεργητικές μικροπλάκες 96 φρεατίων με πυθμένα σε σχήμα U (Cellstar, Greiner Bio-One)
- Πλαστικά σωληνάρια (FACS tubes) ειδικά για κυτταρομετρία ροής (BD Biosciences, NJ, USA)
- Πλαστικά σωληνάρια (eppendorfs) όγκου 1,5 mL (Greiner Bio-One)
- Πλαστικές πιπέττες Pasteur όγκου 3 mL (Cellstar, Greiner Bio-One)
- Πλαστικές ορολογικές πιπέττες 5 και 10 mL μιας χρήσης (Cellstar, Greiner Bio-One)
- Πλέγματα με πόρους διαμέτρου 70 μm (Cell Strainers) για το φιλτράρισμα κυτταρικών εναιωρημάτων (BD Falcon, NJ, USA)
- Ρύγχη πιπετών Ultratip, όγκου 10, 20, 200 και 1000 μL (Cellstar, Greiner Bio-One)
- Σωληνάρια falcon όγκου 15 και 50 mL (Cellstar, Greiner Bio-One)

ΣΥΣΚΕΥΕΣ-ΟΡΓΑΝΑ

- Αιμοκυτταρόμετρο (Neubauer Bright Line Hematocytometer) (Sigma-Aldrich)
- Ηλεκτροκίνητος επαναφορτιζόμενος ελεγκτής πιπέτας (pipette controller) (FastPette, Labnet International Inc, NJ, USA)
- Θάλαμος νηματικής ροής FASTER BH-EN 2004
- Κυτταρόμετρο BD FACSCanto TM II (BD Biosciences, NJ, USA)

- Οπτικό μικροσκόπιο (Optika microscopes, Italy)
- Πιπέττες Pipetman μεταβλητού όγκου (Gilson, Middleton, WI, USA)
- Ψυχόμενη φυγόκεντρος (centrifuge) HERMLE Z 300K με κεφαλές 220.12 VO4 για σωλήνες falcon, 220.50 VO6 για μικροπλάκες καλλιέργειας και 220.87 VO3 για σωλήνες eppendorf (Hernie Labortechnik GmbH, Germany)

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

- Αιθυλενοδιακυλοτετραοξικό οξύ (EDTA) (Sigma Chemical Co, St Louis, MO, USA)
- Αλατούχο φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα σε ταμπλέτες (Phosphate buffer saline tablets, PBS) (Sigma Chemical Co, St Louis, MO, USA)
- Αμμωνιακά άλατα, διττανθρακικό αμμώνιο (NH_4HCO_3) & χλωριούχο αμμώνιο (NH_4Cl) (Sigma Chemical Co, St Louis, MO, USA)
- Κυανούν του Τρυπανίου (Trypan Blue) 0,4% w/v (Sigma Chemical Co, St Louis, MO, USA)
- Ορός νεογνού μόσχου (Fetal bovine serum, FBS) (Lonza, Verviers, Belgium)
- BD PharmLyseTM διάλυμα λύσης ερυθροκυττάρων συμπυκνωμένο 10X (BD Biosciences, NJ, USA)
- BD FACSTM διάλυμα λύσης ερυθροκυττάρων με <15% φορμαλδεΰδη και <50% διαιθυλογλυκόλη (BD FACSTM lysing solution) (BD Biosciences, NJ, USA)
- BD FACSDivaTM CS&T σφαιρίδια (CS&T research beads) (BD Biosciences, NJ, USA)
- BDTM CompBeads Set Anti-Mouse Ig, κ (BD Biosciences, NJ, USA)
- Fix&Perm A+B (Nordic Mubio, Susteren, Netherlands)

- BD Pharmingen™ Human FoxP3 Buffer Set (Human FoxP3 Buffer A 10X και Human FoxP3 Buffer B 50X), αντιδραστήριο μονιμοποίησης – διάτρησης, ειδικό για χρώση έναντι του μεταγραφικού παράγοντα FoxP3. (BD Biosciences, NJ, USA)

ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΑ ΣΥΖΕΥΓΜΕΝΑ ΜΕ ΦΘΟΡΙΟΧΡΩΜΑΤΑ

Για την ανίχνευση EYN

- BD Horizon™ BV421 Mouse Anti-Human CD138, κλώνος MI15 (BD Biosciences, NJ, USA)
- BD Horizon™ V450 Mouse Anti-Human CD138, κλώνος MI15 (BD Biosciences, NJ, USA)
- BD PE Mouse Anti-Human CD56, κλώνος MY31 (BD Biosciences, NJ, USA)
- BD FITC Mouse Anti-Human CD38, κλώνος HB7 (BD Biosciences, NJ, USA)
- BD PerCP Mouse Anti-Human CD45, κλώνος 2D1 (BD Biosciences, NJ, USA)
- BD PerCPCy5.5 Mouse Anti-Human CD45, κλώνος HI30 (BD Biosciences, NJ, USA)
- BD Pharmingen™ PE-Cy™7 Mouse Anti-Human CD19, κλώνος SJ25C1 (BD Biosciences, NJ, USA)
- BD APC Mouse Anti-Human CD117, κλώνος 104D2 (BD Biosciences, NJ, USA)
- BV510 Mouse Anti-Human CD27, κλώνος O323 (Biolegend Inc., CA, USA)
- FITC Mouse Anti-Human CD38, κλώνος LD38 (Cytognos, Salamanca, Spain)
- PE Mouse Anti-Human CD56, κλώνος C5.9 (Cytognos, Salamanca, Spain)
- APCC750 Polyclonal goat Anti-Human cyIgλ (Cytognos, Salamanca, Spain)
- APCC750 Mouse Anti-Human CD81, κλώνος M38 (Cytognos, Salamanca, Spain)
- PE-Cy Mouse Anti-Human CD19, κλώνος J3119 (Beckman Coulter, Nyon, Switzerland)
- APC Polyclonal rabbit Anti-Human cyIgκ (Dako, Glostrup, Denmark)

Για το φαινοτυπικό προσδιορισμό των Tregs

- FITC Mouse Anti-Human CD3 κλώνος HIT3a (BD Biosciences, NJ, USA)
- APC-Cy7 Mouse Anti-Human CD4 κλώνος RPA-T4 (BD Biosciences, NJ, USA)
- APC Mouse Anti-Human CD25 κλώνος M-A251 (BD Biosciences, NJ, USA)
- PE Mouse anti-Human FoxP3 κλώνος 236A/E7 (BD Biosciences, NJ, USA)

- PerCP-CyTM5.5 Mouse Anti-Human CD8 κλώνος SK1 (BD Biosciences ,NJ, USA)
- BV421 Mouse Anti-Human CD39 κλώνος TU66 (ή αλλιώς Tü 66, Tü66) (BD Biosciences ,NJ, USA)
- BV510 Mouse Anti-Ki-67 κλώνος B56 (BD Biosciences ,NJ, USA)
- PE-CyTM7 Mouse Anti-Human CD45RA κλώνος HI100 (BD Biosciences ,NJ, USA)
- PerCP-CyTM5.5 Mouse Anti-Human CD45RO κλώνος UCHL1 (BD Biosciences ,NJ, USA)
- BV510 Mouse Anti-Human CD127 κλώνος HIL-7R-M21 (BD Biosciences ,NJ, USA)
- PE-CyTM7 Mouse Anti-Human HLA-DR κλώνος G46-6 (BD Biosciences ,NJ, USA)
- BV421 Mouse Anti-Human CD152 (CTLA-4) κλώνος BNI3 (BD Biosciences ,NJ, USA)

ΛΟΓΙΣΜΙΚΑ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΑ

- BD FACSDivaTM 7.0 (BD Biosciences, NJ, USA)
- Infinicyt 1.8.0 (Cytognos, Salamanca, Spain)
- GraphPad Prism

2.1 Συλλογή δειγμάτων περιφερικού αίματος και μυελού των οστών από ασθενείς με ΠΜ

Για τις ανάγκες της συγκεκριμένης εργασίας έγινε φαινοτυπική ανάλυση των Tregs σε δείγματα περιφερικού αίματος και μυελού των οστών από 27 ασθενείς με ΠΜ, οι οποίοι χωρίστηκαν σε δύο κατηγορίες. Η πρώτη κατηγορία περιελάμβανε 17 ασθενείς, οι οποίοι είχαν λάβει θεραπεία επαγωγής και η απόκρισή τους σε αυτή αξιολογήθηκε με βάση τα κριτήρια του IMWG 2008. Κατά τη συλλογή των δειγμάτων το σύνολο των συγκεκριμένων ασθενών βρισκόταν σε πλήρη ύφεση (Complete Remission, CR). Αυτό σημαίνει ότι οι ασθενείς σε CR μετά από θεραπεία είχαν αρνητικά αποτελέσματα ανοσοκαθήλωσης για την παθολογική μονοκλωνική πρωτεΐνη στο πλάσμα και τα ούρα, ενώ από οστεομυελική βιοψία εκτιμήθηκε ότι το ποσοστό των παθολογικών πλασματοκυττάρων στο μυελό των οστών ήταν μικρότερο του 5%. Παράλληλα με τη φαινοτυπική ανάλυση των Tregs έγινε ανάλυση με κυτταρομετρία ροής για την ανίχνευση EYN για κάθε έναν από τους 17 ασθενείς. Η δεύτερη κατηγορία αφορούσε 10 νεοδιαγνωσθέντες ασθενείς με ΠΜ. Τα δείγματα μυελού των οστών συλλέχθηκαν από την Αιματολογική-Ογκολογική Κλινική της Ιατρικής Σχολής του ΕΚΠΑ, Γ.Ν.Α. «Αλεξάνδρα», όπου μετά από παρακέντηση, αποθηκεύθηκαν σε σωληνάρια με αντιπηκτικό EDTA και μεταφέρθηκαν άμεσα στο εργαστήριό μας για επεξεργασία. Ακόμη, η Κλινική μας παρείχε και δείγματα περιφερικού αίματος των ασθενών, τα οποία ήταν απαραίτητα για λόγους αντιπαραβολής με τα δείγματα μυελού των οστών. Τέλος, ήταν διαθέσιμα και τα κλινικά χαρακτηριστικά των ασθενών.

2.2 Προσδιορισμός συγκέντρωσης και βιωσιμότητας κυττάρων

Ένα πρωτόκολλο για την άμεση και εύκολη εκτίμηση της βιωσιμότητας και του αριθμού των κυττάρων σε ένα κυτταρικό εναιώρημα είναι η χρώση με την αζωχρωστική κυανού του τρυπανίου (Trypan blue). Η συγκεκριμένη χρωστική ουσία διαπερνά την κατακερματισμένη κυτταρική μεμβράνη των αποπτωτικών/νεκρωτικών κυττάρων, με αποτέλεσμα να τα βάφει μπλε. Αντίθετα, τα ζωντανά κύτταρα, έχοντας ακέραιη κυτταρική μεμβράνη δεν απορροφούν τη χρωστική, και συνεπώς δεν εμφανίζονται χρωματισμένα. Η μέτρηση και η διάκριση των ζωντανών από τα αποπτωτικά/νεκρωτικά κύτταρα γίνεται σε αιμοκυτταρόμετρο Neubauer με τη χρήση οπτικού μικροσκοπίου (Εικόνα 11).

Πρωτόκολλο εργασίας:

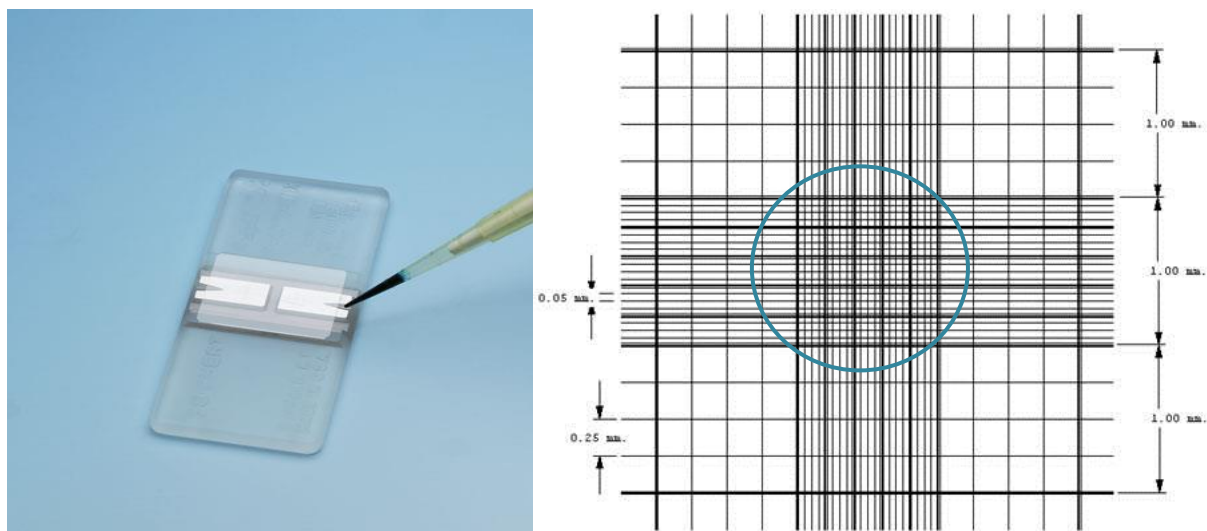
1. Ανάλογα με την εκτιμώμενη πυκνότητα του κυτταρικού εναιωρήματος μεταφέρουμε από αυτό αντίστοιχο όγκο (π.χ. 20 μL για πυκνό δείγμα, 50 μL για αραιότερο δείγμα) σε ένα από τα 96 φρεάτια της καλλιεργητικής μικροπλάκας.
2. Προσθέτουμε ίσο όγκο χρωστικής Trypan blue στο φρεάτιο και αναμειγνύουμε. Στην περίπτωση που έχουμε πυκνό κυτταρικό εναιώρημα είναι προτιμότερο να προσθέσουμε μεγαλύτερο όγκο χρωστικής, ώστε να επιτευχθεί μεγαλύτερος λόγος αραίωσης.
3. Αφού τοποθετήσουμε την καλυπτρίδα στο αιμοκυτταρόμετρο Neubauer μεταφέρουμε προσεκτικά ορισμένη ποσότητα δείγματος στο θάλαμο μέτρησης της πλάκας και ακολουθεί παρατήρηση στο οπτικό μικροσκόπιο.
4. Η καταμέτρηση των κυττάρων γίνεται στο κεντρικό τετράγωνο εμβαδού 1 mm^2 και όγκου $0,1\text{ mm}^3$ (εφόσον έχει τοποθετηθεί η καλυπτρίδα), το οποίο οριοθετείται από τριπλή γραμμή. Προκειμένου να υπολογίσουμε τον αριθμό και το ποσοστό βιωσιμότητας των κυττάρων, μετράμε τόσο τα ζωντανά, όσο και τα αποπτωτικά/νεκρωτικά κύτταρα.
5. Ο αριθμός και το ποσοστό βιωσιμότητας των κυττάρων υπολογίζονται με βάση τους ακόλουθους τύπους:

Υπολογισμός συγκέντρωσης στο κυτταρικό εναιώρημα:

$$C \text{ (κύτταρα/mL)} = \text{αριθμός ζωντανών κυττάρων} \times \text{λόγος αραίωσης} \times 10^4$$

Υπολογισμός ποσοστού (%) βιωσιμότητας

$$\% \text{ βιωσιμότητα} = [\text{αριθμός ζωντανών κυττάρων} / \text{συνολικός αριθμός κυττάρων}] \times 100\%$$



Εικόνα 11: Αιμοκυτταρόμετρο Neubauer στο οποίο μεταφέρεται κυτταρικό δείγμα που έχει βαφτεί με τη χρωστική Trypan blue (αριστερά). Εντός του μπλε κυκλικού πλαισίου βρίσκεται το κεντρικό τετράγωνο εμβαδού 1 mm^2 του θαλάμου μέτρησης του αιμοκυτταρομέτρου, όπου γίνεται η καταμέτρηση του αριθμού ζωντανών και αποπτωτικών/νεκρωτικών κυττάρων (δεξιά).

2.3 Πρωτόκολλο επεξεργασίας και χρώσης δειγμάτων μυελού των οστών από ασθενείς με ΠΜ για ανίχνευση EYN

Πρωτόκολλο εργασίας:

1. Το δείγμα μυελού των οστών συλλέγεται με πιπέττα όγκου 10 mL από το σωληνάριο με EDTA και περνά από φίλτρο (Cell Strainer) με πόρους διαμέτρου 70 μm , προκειμένου να κατακρατηθούν πήγματα, συσσωματώματα και τεμαχίδια οστών, τα οποία μπορούν να επηρεάσουν την απομόνωση κυττάρων του μυελού.
2. Το διήθημα του δείγματος μεταφέρεται σε σωλήνα falcon όγκου 50 mL, ο οποίος γεμίζεται με διάλυμα PharmLyse, αραιωμένο με απεσταγμένο H_2O σε συγκέντρωση 1X. Το διάλυμα λύσης PharmLyse δεν περιέχει μονιμοποιητικές ουσίες και η λύση των ερυθροκυττάρων πραγματοποιείται σε συνθήκες χαμηλής συγκέντρωσης χλωριούχου αμμωνίου. Το βήμα της λύσης των ερυθροκυττάρων στο ολικό δείγμα μυελού των οστών είναι απαραίτητο, ώστε να εξασφαλιστεί η μέγιστη δυνατή ανάκτηση και συμπύκνωση εμπύρηνων κυττάρων του μυελού των οστών. Παράλληλα, διευκολύνεται η επεξεργασία και η ανάλυση των δεδομένων από το κυτταρόμετρο ροής.

3. Αναμειγνύουμε καλά και επωάζουμε το σωλήνα σε συσκευή ανάδευσης για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
4. Μετά το πέρας της επώασης ο σωλήνας φυγοκεντρείται στα 800 x g για 10 λεπτά και το υπερκείμενο αφαιρείται με χρήση πιπέτας 10 mL, χωρίς να διαταραχθεί το ίζημα. Τυπικά, ο υπολειπόμενος όγκος στο σωλήνα είναι περίπου 300 μ L.
5. Προστίθενται 2 mL PBS - 0,5% FBS και το ίζημα επαναδιαλυτοποιείται με έντονη ανάδευση.
6. Συμπληρώνουμε το σωλήνα με PBS - 0,5% FBS μέχρι τα 50 mL, αναδεύουμε καλά και φυγοκεντρούμε στα 800 x g για 5 λεπτά. Αφαιρούμε με προσοχή το υπερκείμενο, όπως και προηγουμένως, με χρήση πιπέτας 10 mL.
7. Το ίζημα επαναδιαλυτοποιείται με προσθήκη 2 mL PBS-0,5%. Μετά από ανάδευση το περιεχόμενο μεταφέρεται σε σωληνάριο ειδικό για κυτταρομετρία ροής (FACS tube).
8. Εκπλένουμε τον άδειο σωλήνα των 50 mL με ακόμη 2 mL PBS - 0,5% FBS, ώστε να ανακτήσουμε όσα κύτταρα έχουν απομείνει και προσθέτουμε και αυτόν τον όγκο στο σωληνάριο FACS.
9. Το σύνολο του δείγματος στο σωληνάριο FACS φυγοκεντρείται στα 540 x g για 5 λεπτά, αφαιρείται το υπερκείμενο και το ίζημα επαναδιαλυτοποιείται σε PBS - 0,5% FBS, ώστε ο τελικός όγκος να είναι περίπου 300 μ L. Ο όγκος πρέπει να διατηρηθεί όσο το δυνατόν μικρότερος, προκειμένου να είναι εύκολη η προσαρμογή της κατάλληλης συγκέντρωσης κυττάρων ανά σωληνάριο κατά τα επόμενα βήματα.
10. Στο βήμα αυτό προσδιορίζεται ο αριθμός και η βιωσιμότητα των συνολικών εμπύρηνων κυττάρων του μυελού των οστών σε κάθε δείγμα, χρησιμοποιώντας το πρωτόκολλο χρώσης με κυανό του τρυπανίου (Trypan blue). Μετά τη μέτρηση των κυττάρων η συγκέντρωση του ολικού δείγματος εμπύρηνων κυττάρων μυελού των οστών προσαρμόζεται στα 10^5 κύτταρα/ μ L.
11. Για κάθε σωληνάριο FACS που θα χρησιμοποιήσουμε στο πρωτόκολλο της χρώσης με τα συζευγμένα με φθοριοχρώματα αντισώματα θα χρησιμοποιηθούν περίπου 100 μ L (δηλαδή 10^7 κύτταρα) από το παραπάνω εναιώρημα. Η χρώση αυτού του μεγάλου αριθμού κυττάρων είναι απαραίτητη, ώστε να επιτευχθούν υψηλά όρια ευαισθησίας, τα οποία απαιτούν την καταγραφή τουλάχιστον 5×10^6 κυτταρικών γεγονότων από κάθε σωληνάριο FACS με τον κατάλληλο συνδυασμό φθορίζοντων αντισωμάτων.
12. Προσέχουμε ώστε ο κατάλληλος όγκος από κάθε φθορίζον αντίσωμα να προστίθεται στα σωληνάρια FACS πριν τα 100 μ L του δείγματος. Τα κατάλληλα αντισώματα που τοποθετούνται στα σωληνάρια προορίζονται για την ανίχνευση επιφανειακών και

ενδοκυτταρικών δεικτών (Πίνακας 3). Έπειτα, τοποθετείται ο όγκος εμπύρηνων κυττάρων (100 μ L) για κάθε σωληνάριο και το συνολικό διάλυμα αναμειγνύεται καλά. Στο στάδιο αυτό, για όλα τα σωληνάρια προσθέτουμε μόνο τα αντισώματα που στοχεύουν επιφανειακά αντιγόνα-δείκτες.

13. Μετά την προσθήκη των αντισωμάτων και του όγκου του δείγματος, προσθέτουμε κατάλληλο όγκο διαλύματος PBS-0,5% FBS, ώστε να φτάσουμε σε τελικό όγκο 200 μ L.
14. Τα σωληνάρια FACS επωάζονται για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου προστατευόμενα από άμεση έκθεση σε φως.
15. Μετά την επώαση, ακολουθούνται ξεχωριστές διαδικασίες για τα σωληνάρια FACS που προορίζονται για ανίχνευση μόνο επιφανειακών δεικτών και για όσα προορίζονται για ανίχνευση συνδυασμού επιφανειακών και ενδοκυττάρων δεικτών.

Για ανίχνευση επιφανειακών αντιγονικών δεικτών:

1. Προστίθενται 2 mL FACS Lysing Solution, αραιωμένο με απεσταγμένο H_2O σε συγκέντρωση 1X και μετά από καλή ανάδευση τα σωληνάρια επωάζονται για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου, προστατευόμενα από απευθείας έκθεση στο φως.
2. Ακολουθεί φυγοκέντρωση για 5 λεπτά στα 540 x g και απόρριψη του υπερκείμενου, αφήνοντας περίπου 100 μ L υπολειμματικό όγκο σε κάθε σωληνάριο FACS.
3. Έπειτα προσθέτουμε 2 mL PBS - 0,5% FBS στο κυτταρικό ίζημα, αναδεύουμε προς επαναδιαλυτοποίησή του και φυγοκεντρούμε πάλι για 5 λεπτά στα 540 g.
4. Μετά το πέρας της φυγοκέντρωσης απορρίπτουμε το υπερκείμενο και προσθέτουμε 500 μ L PBS - 0,5% FBS στο ίζημα για να το επαναδιαλυτοποιήσουμε.

Για ανίχνευση επιφανειακών και ενδοκυττάρων αντιγονικών δεικτών

1. Μετά το πέρας της χρώσης με τα αντισώματα για τα επιφανειακά αντιγόνα προσθέτουμε 2 mL PBS - 0,5% FBS στο σωληνάριο FACS, αναδεύουμε καλά και φυγοκεντρούμε στα 540 x g για 5 λεπτά.
2. Απορρίπτεται το υπερκείμενο αφήνοντας περίπου 100 μ L υπολειμματικό όγκο σε κάθε σωληνάριο FACS και το ίζημα επαναδιαλυτοποιείται με ομαλή ανάδευση.
3. Προσθέτουμε 100 μ L από το Αντιδραστήριο A (Fix&Perm) που λειτουργεί ως μονιμοποιητικός παράγοντας, αναδεύουμε έντονα και επωάζουμε τα δείγματα για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου, προστατεύοντάς τα από απευθείας έκθεση στο φως.

- Μετά την επώαση προσθέτουμε 2 mL PBS-0,5% FBS και φυγοκεντρούμε για 5 λεπτά στα 540 g. Απορρίπτουμε το υπερκείμενο, χωρίς να διαταράξουμε το κυτταρικό ίζημα, αφήνοντας 100 μ L υπολειμματικό όγκο σε κάθε σωληνάριο FACS.
- Το ίζημα επαναδιαλυτοποιείται με έντονη ανάδευση και προσθέτουμε 100 μ L από το Αντιδραστήριο B (Fix&Perm), που λειτουργεί ως αντιδραστήριο που εξασφαλίζει τη διαπερατότητα των κυτταρικών μεμβρανών, και τον κατάλληλο όγκο από τα φθορίζοντα αντισώματα έναντι των κυτταροπλασματικών κ και λ ελαφριών αλυσίδων.
- Τα δείγματα επωάζονται για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου, προστατευμένα από απευθείας έκθεση στο φως.
- Μετά την επώαση προστίθενται 2 mL PBS - 0,5%, ακολουθεί έντονη ανάδευση και φυγοκέντρηση για 5 λεπτά στα 540 g. Το υπερκείμενο απορρίπτεται χωρίς να διαταράσσεται το κυτταρικό ίζημα και προσθέτουμε 500 μ L PBS - 0,5% FBS.
- Τα κυτταρικά εναιωρήματα που είναι σημασμένα με τα φθορίζοντα αντισώματα αναλύονται άμεσα με τη χρήση του κυτταρομέτρου ροής BD FACSCanto II και η περαιτέρω ψηφιακή τους καταγραφή γίνεται με το λογισμικό BD FACSDiva 7.0.
- Τα αρχεία των καταγεγραμμένων δειγμάτων εξάγονται από το λογισμικό BD FACSDiva 7.0 με τη μορφή FCS αρχείων και εισάγονται για ανάλυση στο λογισμικό Infinicyt 1.8. το λογισμικό αυτό είναι το προτεινόμενο από το EuroFlow για την ανάλυση κλινικών δειγμάτων ΠΚΡ καθώς, εκτός του ότι προσφέρει ένα περιβάλλον φιλικό προς το χρήστη, συνδυάζει τη δυνατότητα αξιόπιστης επεξεργασίας αρχείων μεγάλου αριθμού κυτταρικών γεγονότων (έως και 10×10^6) και την ταυτόχρονη οπτικοποίηση πολλών παραμέτρων, που είναι απαραίτητες για την ανίχνευση μικρού αριθμού γεγονότων, όπως απαιτείται για την ανίχνευση EYN.

Συνδυασμοί φθοριζόντων αντισωμάτων για την ανίχνευση EYN

Πίνακας 3: Συνδυασμοί φθοριζόντων αντισωμάτων για την ανίχνευση EYN. Σε κάθε αντίσωμα αναφέρεται ο κλώνος και το συζευγμένο φθοριόχρωμα.

Φθοριόχρωμα	FITC	PE	PerCP-Cy5.5	BV421	BV510	PE-Cy7	APC	APCC750
Δείγμα 1	CD38	CD56	CD45	CD138	CD27	CD19	CD117	CD81
	<i>Multi-epitope</i>	<i>C5.9</i>	<i>HI30</i>	<i>MI15</i>	<i>O323</i>	<i>J3-119</i>	<i>104D2</i>	<i>M38</i>
Δείγμα 2	CD38	CD56	CD45	CD138	CD27	CD19	CD117	CD81
	<i>Multi-epitope</i>	<i>C5.9</i>	<i>HI30</i>	<i>MI15</i>	<i>O323</i>	<i>J3-119</i>	<i>104D2</i>	<i>M38</i>

Σε κάθε σωληνάριο έγινε χρώση τουλάχιστον 10×10^6 κυττάρων και καταγραφή τουλάχιστον 5×10^6 κυττάρων, εκτός από τις λίγες περιπτώσεις όπου ο αριθμός των κυττάρων δεν επαρκούσε και η καταγραφή συνεχίστηκε έως ότου εξαντλήθηκε όλο το δείγμα. Εξαιρέση αποτέλεσαν τα δείγματα μυελού των οστών από νεοδιαγνωσθέντες ασθενείς όπου, λόγω της απουσίας ανάγκης για υψηλή ευαισθησία, καταγράφονταν λιγότερα από 5×10^6 κύτταρα ανά σωληνάριο, με ελάχιστο αριθμό τα 10^6 κύτταρα.

Σε όλες τις περιπτώσεις, η ανίχνευση EYN υποδήλωσε επιτυχή καταγραφή των δεδομένων. Στα EYN αρνητικά δείγματα, η καταγραφή θεωρήθηκε επιτυχής όταν κατεγράφη ο ελάχιστος αριθμός απαιτούμενων κυττάρων και το δείγμα πληρούσε τα κριτήρια ποιότητας. Αν καταστεί δυνατή η ανίχνευση EYN, τότε μπορεί να εξαχθεί με ασφάλεια το συμπέρασμα ότι η ποιότητα του δείγματος και ο ολικός αριθμός των κυττάρων που κατεγράφησαν ήταν επαρκείς (Stetler-Stevenson *et al.*, 2016).

2.4 Πρωτόκολλο επεξεργασίας και χρώσης δειγμάτων μυελού των οστών και περιφερικού αίματος από ασθενείς με ΠΜ για το φαινοτυπικό προσδιορισμό των Tregs

Τα δείγματα μυελού των οστών επεξεργάζονται όπως ακριβώς περιγράφηκε στην προηγούμενη ενότητα (βήματα 1-10), ενώ για τα δείγματα περιφερικού αίματος ακολουθούνται τα βήματα 2-10 της προηγούμενης ενότητας. Όμως, αντί για το διάλυμα Pharm Lyse η ερυθροκυτταρική λύση στα δείγματα περιφερικού αίματος πραγματοποιείται με διάλυμα λύσης ερυθρών αιμοσφαιρίων 10X που περιέχει 0,0185 g EDTA, 0,401 g NH_4Cl και 0,042 g NH_4HCO_3 αραιωμένο 1:10 με απεσταγμένο νερό. Ακόμη, κάθε φορά προτού αρχίσουμε το παρακάτω πειραματικό πρωτόκολλο και αφού αφήσουμε τα διαλύματα Human FoxP3 Buffer A 10X και Human FoxP3 Buffer B 50X να έρθουν σε θερμοκρασία δωματίου ετοιμάζουμε τα ακόλουθα διαλύματα εργασίας:

- Human FoxP3 Buffer A 1X: αραιώση 1:10 του Buffer A 10X με απεσταγμένο νερό
- Human FoxP3 Buffer C: αραιώση 1:50 του Buffer B με Buffer A 1X.

Πρωτόκολλο εργασίας:

1. Μετά την καταμέτρηση των κυττάρων του δείγματος προσθέτουμε τον κατάλληλο όγκο FACS washing buffer (PBS – 2% FBS – 2 mM EDTA), ώστε η συγκέντρωση του αρχικού κυτταρικού εναιωρήματος να προσαρμοστεί στα $1,5 \times 10^7$ κύτταρα/mL.
2. Μεταφέρουμε από 100 μ L του κυτταρικού εναιωρήματος, δηλαδή $1,5 \times 10^6$ κύτταρα, σε νέα σωληνάρια FACS και προσθέτουμε τον κατάλληλο όγκο από κάθε φθορίζον αντίσωμα έναντι των επιφανειακών αντιγονικών δεικτών. Με προσθήκη κατάλληλης ποσότητας FACS washing buffer ρυθμίζουμε τον τελικό όγκο του εναιωρήματος στα 200 μ L και ακολουθεί ανάδευση.
3. Τα σωληνάρια FACS επωάζονται για 20 λεπτά, σε θερμοκρασία δωματίου, στο σκοτάδι, ώστε να προστατευθούν από απευθείας έκθεση στο φως.
4. Μετά το πέρας της επώασης εκπλένουμε τα κύτταρα για την απομάκρυνση της περίσσειας αντισωμάτων, προσθέτοντας 2 mL FACS washing buffer σε κάθε σωληνάριο FACS. Ακολουθεί φυγοκέντρωση στα 250 x g για 5 λεπτά.
5. Απομακρύνουμε με πιπέττα το υπερκείμενο και επαναιωρούμε το κυτταρικό ίζημα στον υπολειμματικό όγκο του υπερκειμένου (περίπου 200 μ L).
6. Για μονιμοποίηση των κυττάρων προσθέτουμε σε κάθε σωληνάριο FACS 2 mL 1X Human FoxP3 Buffer A. Μετά από ανάδευση, επωάζουμε τα σωληνάρια για 10 λεπτά, σε θερμοκρασία δωματίου, στο σκοτάδι.
7. Μετά το πέρας της επώασης ακολουθεί φυγοκέντρωση για 5 λεπτά στα 500 g. Με χρήση πιπέττας απομακρύνουμε πολύ προσεκτικά το υπερκείμενο, ώστε να μη διαταραχθεί το ίζημα, το οποίο σε αυτό το στάδιο δεν είναι συμπαγές.
8. Εκπλένουμε τα κύτταρα προσθέτοντας 2 mL FACS washing buffer και φυγοκεντρούμε πάλι για 5 λεπτά στα 500 g. Απομακρύνουμε το υπερκείμενο και επαναιωρούμε το κυτταρικό ίζημα στον υπολειμματικό όγκο υπερκειμένου.
9. Προσθέτουμε 0,5 mL από το διάλυμα διάτρησης 1X Human FoxP3 Buffer C σε κάθε σωληνάριο FACS και μετά από ανάδευση επωάζουμε για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου στο σκοτάδι. Το βήμα αυτό πραγματοποιείται, προκειμένου να καταστήσουμε τις μεμβράνες των κυττάρων διαπερατές για σήμανση με τα φθορίζοντα αντισώματα έναντι των ενδοκυττάρων αντιγονικών δεικτών.
10. Εκπλένουμε με προσθήκη 2 mL FACS washing buffer σε κάθε σωληνάριο FACS. Φυγοκεντρούμε για 5 λεπτά στα 500 x g σε θερμοκρασία δωματίου. Απομακρύνουμε το υπερκείμενο.
11. Επανάληψη βήματος 10.

12. Προσθήκη του κατάλληλου όγκου των αντισωμάτων έναντι ενδοκυττάρων δεικτών (anti-FoxP3 κ.α.) σε κάθε σωληνάριο FACS στην απαιτούμενη συγκέντρωση.
13. Μετά από ανάδευση ακολουθεί επώαση για 30 λεπτά, σε θερμοκρασία δωματίου, στο σκοτάδι.
14. Επανάληψη βήματος 10.
15. Μετά τη φυγοκέντρωση επαναιωρούμε το κυτταρικό ίζημα στον επιθυμητό όγκο με προσθήκη κατάλληλης ποσότητας FACS washing buffer. Τα δείγματα αναλύονται άμεσα με κυτταρομετρία ροής. Για την ψηφιακή καταγραφή των αποτελεσμάτων στο κυτταρόμετρο ροής χρησιμοποιείται το λογισμικό BD FACSDiva 7.0, ενώ η περαιτέρω ανάλυση αυτών γίνεται με χρήση του λογισμικού Infinicyt 1.8.

Συνδυασμοί φθορίζοντων αντισωμάτων για τον φαινοτυπικό προσδιορισμό των Tregs

Για κάθε δείγμα περιφερικού αίματος ή μυελού των οστών, είτε από νεοδιαγνωσθέντα ασθενή, είτε από ασθενή που βρισκόταν σε πλήρη ύφεση μετά από θεραπεία, πραγματοποιήθηκε χρώση με τους δύο συνδυασμούς φθορίζοντων αντισωμάτων που φαίνονται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 4). Οι συγκεντρώσεις των φθορίζοντων αντισωμάτων καθορίστηκαν έπειτα από πειράματα τιτλοδότησης. Μεταξύ των δύο συνδυασμών, τα φθορίζοντα αντισώματα έναντι των αντιγονικών δεικτών CD3, CD4, CD25 και FoxP3 είναι κοινά. Αυτό συμβαίνει, διότι οι συγκεκριμένοι αντιγονικοί δείκτες είναι οι ελάχιστοι που απαιτούνται για το φαινοτυπικό προσδιορισμό των Tregs (Rodríguez-Perea *et al.*, 2016).

Έτσι, για κάθε δείγμα μυελού των οστών ή περιφερικού αίματος εκτός από τα δύο σωληνάρια FACS για τους δύο συνδυασμούς αντισωμάτων, χρησιμοποιήσαμε ένα τρίτο σωληνάριο FACS με 2×10^5 κύτταρα από το αρχικό κυτταρικό εναιώρημα ως μη βαμμένο μάρτυρα (unstained control). Το unstained control κατεργαζόταν μόνο με τα διαλύματα μονιμοποίησης – διάτρησης, χωρίς να γίνεται χρώση με φθορίζοντα αντισώματα. Η χρήση unstained controls στην κυτταρομετρία ροής είναι απαραίτητη για την εκτίμηση των επιπέδων αυτοφθορισμού των κυττάρων που μελετάμε κάθε φορά.

Μετά το πέρας του πρωτοκόλλου που περιγράφηκε στην παραπάνω ενότητα τα δείγματα είναι έτοιμα για ανάλυση με κυτταρομετρία ροής. Για βέλτιστα αποτελέσματα κατά την ανάλυση των δεδομένων και λαμβάνοντας υπόψη ότι τα Tregs συνιστούν προσεγγιστικά το 2-4% των $CD4^+$ T λεμφοκυττάρων στο περιφερικό αίμα και το μυελό των οστών, είναι απαραίτητο σε κάθε σωληνάριο να καταγραφούν τουλάχιστον 15.000 γεγονότα που να αντιστοιχούν σε $CD4^+$ T λεμφοκύτταρα. Τέλος, καθώς δεν υπάρχει καθολικά αποδεκτή

προσέγγιση για τη φαινοτυπική ανάλυση των Tregs με κυτταρομετρία ροής, κρίθηκε σκόπιμη η υιοθέτηση ενιαίας στρατηγικής ανάλυσης για τα δείγματα, η οποία επιτρέπει τόσο τον ποσοτικό προσδιορισμό των Tregs (με βάση το φαινότυπο (CD3⁺CD4⁺CD25^{hi}FoxP3⁺ ή/και CD3⁺CD4⁺CD25^{hi}FoxP3⁺CD127^{low}) όσο και τη μελέτη έκφρασης των υπόλοιπων δεικτών που χρησιμοποιήθηκαν.

Πίνακας 4: Οι δύο συνδυασμοί επιφανειακών και ενδοκυττάρων δεικτών που χρησιμοποιήθηκαν για το φαινοτυπικό προσδιορισμό των Tregs. Σε κάθε αντίσωμα αναφέρεται ο κλώνος και το συζευγμένο φθοριόχρωμα.

Φθοριόχρωμα	FITC	APC-Cy7	APC	PE	PerCP-Cy5.5	BV510	PE-Cy7	BV421
1	CD3 <i>HIT3a</i>	CD4 <i>RPA-T4</i>	CD25 <i>M-A251</i>	FoxP3 <i>236A/E7</i>	CD8 <i>SK1</i>	Ki67 <i>B56</i>	CD45RA <i>HI100</i>	CD39 <i>TU66</i>
2	CD3 <i>HIT3a</i>	CD4 <i>RPA-T4</i>	CD25 <i>M-A251</i>	FoxP3 <i>236A/E7</i>	CD45RO <i>UCHL1</i>	CD127 <i>HIL-7R-M21</i>	HLA-DR <i>G46-6</i>	CTLA-4 <i>BNI3</i>

2.5 Τιτλοδότηση αντισωμάτων και χρωματική επιδιόρθωση (compensation)

Μετά την εύρεση των κατάλληλων αντιγονικών δεικτών και το σχεδιασμό ενός panel πολυχρωματικής κυτταρομετρίας ροής μπορεί να ξεκινήσει η βελτιστοποίηση του πειραματικού πρωτοκόλλου που θα ακολουθηθεί. Πρώτο βήμα σε αυτή τη διαδικασία αποτελεί ο προσδιορισμός της βέλτιστης συγκέντρωσης των φθορίζοντων αντισωμάτων που θα χρησιμοποιηθούν. Κάθε εταιρεία προτείνει μια συγκεκριμένη ποσότητα φθορίζοντος αντισώματος για χρώση συγκεκριμένου αριθμού κυττάρων, σε συγκεκριμένο όγκο εναιωρήματος. Ωστόσο, είναι προτιμότερο να προσδιορίζεται η συγκέντρωση του αντισώματος με πειράματα τιτλοδότησης προσαρμοσμένα στις συνθήκες του εκάστοτε εργαστηρίου (βιολογικό δείγμα υπό ανάλυση, μηχανήματα, εξοπλισμός, εργαστηριακό προσωπικό κ.α.). Κατά τη διαδικασία αυτή χρησιμοποιούνται ελαττούμενες συγκεντρώσεις του φθορίζοντος αντισώματος, ξεκινώντας συνήθως από την προτεινόμενη συγκέντρωση, για χρώση των κυττάρων του βιολογικού δείγματος που πρόκειται να μελετηθεί. Στο τέλος επιλέγεται η συγκέντρωση εκείνη, στην οποία μεγιστοποιείται το επιθυμητό σήμα φθορισμού και παράλληλα ελαχιστοποιείται ο φθορισμός υποβάθρου. Ο φθορισμός υποβάθρου οφείλεται στον αυτοφθορισμό των κυττάρων και στη μη ειδική πρόσδεση του φθορίζοντος αντισώματος σε στόχους χαμηλότερης συγγένειας, κάτι που μπορεί να συμβεί όταν το φθορίζον αντίσωμα που προστίθεται βρίσκεται σε περίσσεια.

Όλα τα φθοριοχρώματα χαρακτηρίζονται από συγκεκριμένα φάσματα διέγερσης και εκπομπής. Το φάσμα διέγερσης αποτελεί ένα εύρος μηκών κύματος του φωτός που προσδίδει ενέργεια σε ένα φθοριόχρωμα. Ως αποτέλεσμα, το φθοριόχρωμα εκπέμπει φωτεινή ακτινοβολία σε ένα διαφορετικό φάσμα μηκών κύματος, το φάσμα εκπομπής. Σε ένα κυτταρόμετρο ροής το φάσμα διέγερσης και το φάσμα εκπομπής ρυθμίζεται μέσω ειδικών οπτικών φίλτρων (bandpass filters). Ωστόσο, σε πειράματα πολυχρωματικής κυτταρομετρίας ροής υπάρχει πολύ συχνά αλληλεπικάλυψη στα φάσματα εκπομπής, με αποτέλεσμα ένας ανιχνευτής να ανιχνεύει σήμα φθορισμού από δύο ή περισσότερα φθοριοχρώματα. Για το λόγο αυτό, εφαρμόζεται μια μαθηματική διαδικασία διόρθωσης που ονομάζεται χρωματική επιδιόρθωση (compensation), η οποία εξασφαλίζει ότι ο φθορισμός που εκπέμπεται από ένα φθοριόχρωμα θα ανιχνεύεται μόνο από τον επιθυμητό ανιχνευτή. Μέσω της χρωματικής επιδιόρθωσης αφαιρείται το σήμα κάθε φθοριοχρώματος από όλους τους ανιχνευτές εκτός από αυτόν που είναι ειδικά επιφορτισμένος για τη μέτρηση του συγκεκριμένου σήματος (Roederer, 2002).

Η διαδικασία της χρωματικής επιδιόρθωσης πρέπει να πραγματοποιηθεί αφού προσαρμοστεί η τάση των φωτοπολλαπλασιαστών (voltage) για κάθε ανιχνευτή, διότι η τιμή επιδιόρθωσης είναι εξαρτώμενη από την τιμή της τάσης. Αν για παράδειγμα αλλάξει η τάση των φωτοπολλαπλασιαστών οι τιμές χρωματικής επιδιόρθωσης δεν θα ισχύουν και θα πρέπει να υπολογιστούν εκ νέου. Για τα πειράματά μας χρησιμοποιήθηκε το σετ BD™ CompBeads, το οποίο περιλαμβάνει δύο πληθυσμούς μικροσφαιριδίων πολυστυρενίου. Ο πρώτος ονομάζεται BD™ CompBeads Anti-Mouse Ig κ particles και προσδένει οποιαδήποτε ανοσοσφαιρίνη ποντικού με κ ελαφριές αλυσίδες και ο δεύτερος δεν έχει ικανότητα πρόσδεσης και λειτουργεί ως εσωτερικός αρνητικός πληθυσμός ελέγχου.

Πρωτόκολλο εργασίας:

1. Έντονη ανάδευση των φιαλιδίων με τα μικροσφαιρίδια στο vortex
2. Χρησιμοποιείται ένα σωληνάριο FACS για κάθε φθοριόχρωμα του πειράματος και ένα επιπλέον σωληνάριο FACS που λειτουργεί ως μη βαμμένος μάρτυρας.
3. Σε κάθε σωληνάριο FACS μεταφέρονται 100 μ L PBS – 0,5% FBS και ύστερα προστίθεται μια σταγόνα από το φιαλίδιο BD™ CompBeads Anti-Mouse Ig κ particles και μια σταγόνα από το άλλο φιαλίδιο με τα μικροσφαιρίδια που στερούνται ικανότητας πρόσδεσης.
4. Ακολουθεί ανάδευση των σωληναρίων FACS στο vortex και προσθήκη του κατάλληλου όγκου φθορίζοντος αντισώματος, όπως έχει προκύψει από τα πειράματα τιτλοδότησης.
5. Επώαση των σωληναρίων FACS για 15-30 λεπτά σε πάγο στο σκοτάδι.

6. Μετά το πέρας της επώασης προστίθενται 2 mL PBS-0,5% FBS σε κάθε σωληνάριο και ακολουθεί φυγοκέντρωση στα 200 x g για 10 λεπτά. Το υπερκείμενο απομακρύνεται με πιπέττα και το ίζημα επαναδιαλυτοποιείται με προσθήκη 500 μ L PBS-0,5% FBS.
7. Η καταγραφή και ανάλυση των πειραμάτων τιτλοδότησης και χρωματικής επιδιόρθωσης πραγματοποιήθηκε στο λογισμικό BD FACSDiva 7.0. Το λογισμικό μετά την καταγραφή κάθε μοναδιαία βαμμένου δείγματος και τον καθορισμό των κατάλληλων περιοχών που αντιστοιχούν στα θετικά και τα αρνητικά συμβάντα, προσφέρει μια αυτόματη πλατφόρμα υπολογισμού των τιμών την χρωματικής επιδιόρθωσης.

Εκτός των διαδικασιών τιτλοδότησης αντισωμάτων και χρωματικής επιδιόρθωσης, χρησιμοποιούνται καθημερινά τα σφαιρίδια βαθμονόμησης BD FACSDiva™ CS&T beads ως ένας έλεγχος ποιότητας για τη λειτουργία του οπτικού, του ηλεκτρονικού και του υδραυλικού συστήματος του κυτταρομέτρου ροής. Μέσω αυτού του ελέγχου αξιολογείται καθημερινά η επίδοση και η ευαισθησία των ανιχνευτών φθορισμού του μηχανήματος. Ο συγκεκριμένος έλεγχος είναι απαραίτητος για την πρόληψη και την έγκαιρη αντιμετώπιση τυχόν προβλημάτων. Παράλληλα, εξασφαλίζεται η ακρίβεια και η επαναληψιμότητα των αποτελεσμάτων μεταξύ των δειγμάτων που αναλύονται τόσο την ίδια μέρα όσο και σε διαφορετικούς χρόνους.

Αποτελέσματα

3.1 Ομαδοποίηση των ασθενών με ΠΜ

Σε κάθε δείγμα ασθενούς με ΠΜ που αναλύθηκε για το σκοπό αυτής της εργασίας έγινε παράλληλη ταυτοποίηση του παθολογικού κλώνου των πλασματοκυττάρων με ΠΚΡ, όπως περιγράφηκε στην ενότητα 2.3. Ειδικότερα, στα δείγματα μυελού των οστών και περιφερικού αίματος νεοδιαγνωσθέντων ασθενών έγινε ταυτοποίηση του υποτύπου του ΠΜ, όπου αυτό ήταν εφικτό. Αντίστοιχα, οι ασθενείς που βρίσκονταν σε CR αφού είχαν λάβει θεραπεία, κατηγοριοποιήθηκαν ανάλογα με την εμφάνιση ή όχι EYN στα δείγματα μυελού των οστών, σε EYN⁺ ασθενείς και EYN⁻ ασθενείς αντίστοιχα. Λαμβάνοντας υπόψη τα παραπάνω πραγματοποιήθηκε ποσοτική εκτίμηση των επιπέδων των Tregs και μελέτη της έκφρασης συγκεκριμένων αντιγονικών δεικτών ξεχωριστά σε καθεμία από τις τρεις κατηγορίες ασθενών:

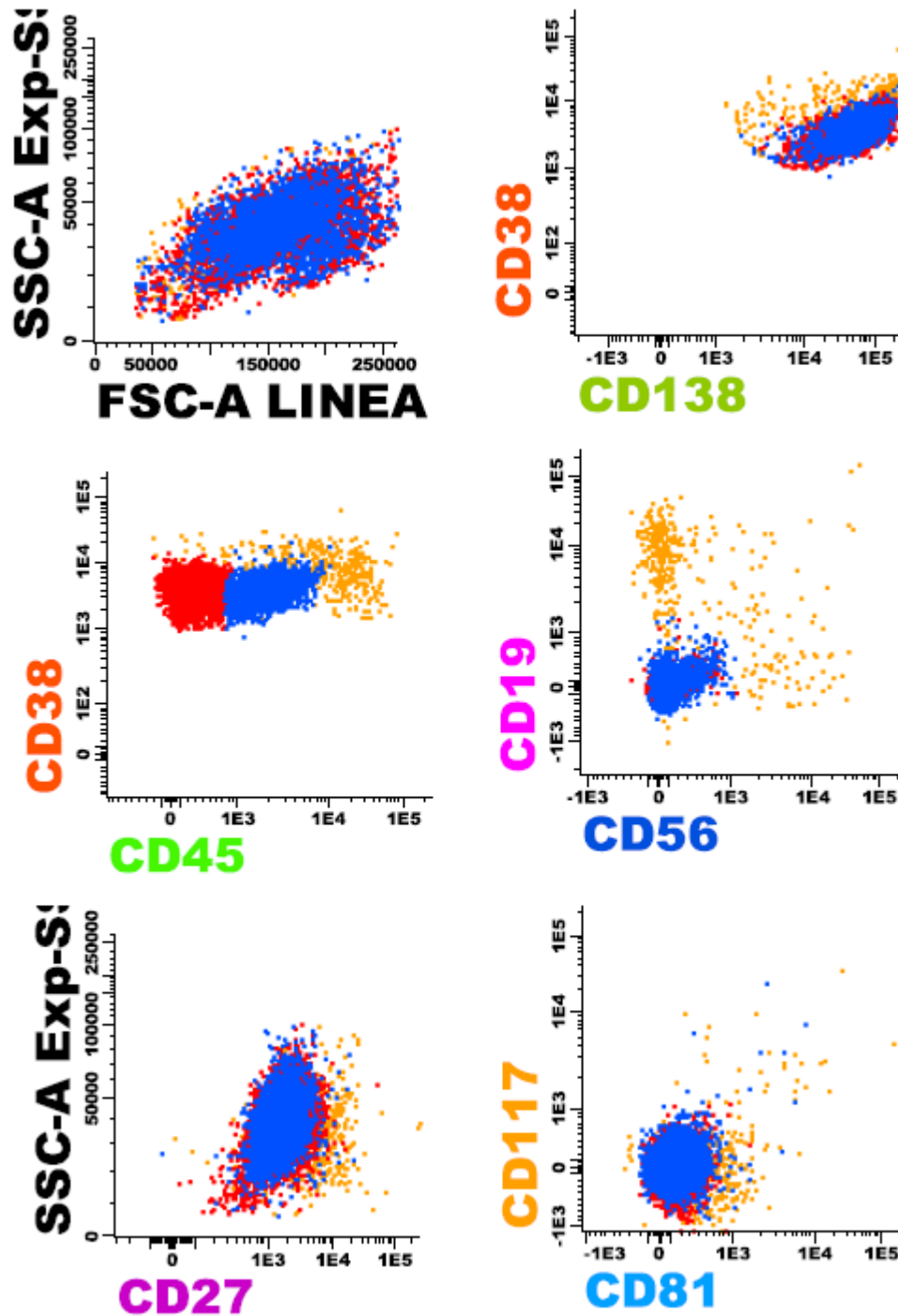
- νεοδιαγνωσθέντες ασθενείς,
- EYN⁺ ασθενείς,
- EYN⁻ ασθενείς

Τα χαρακτηριστικά των ασθενών ανά ομάδα συνοψίζονται στον ακόλουθο πίνακα (Πίνακας 5).

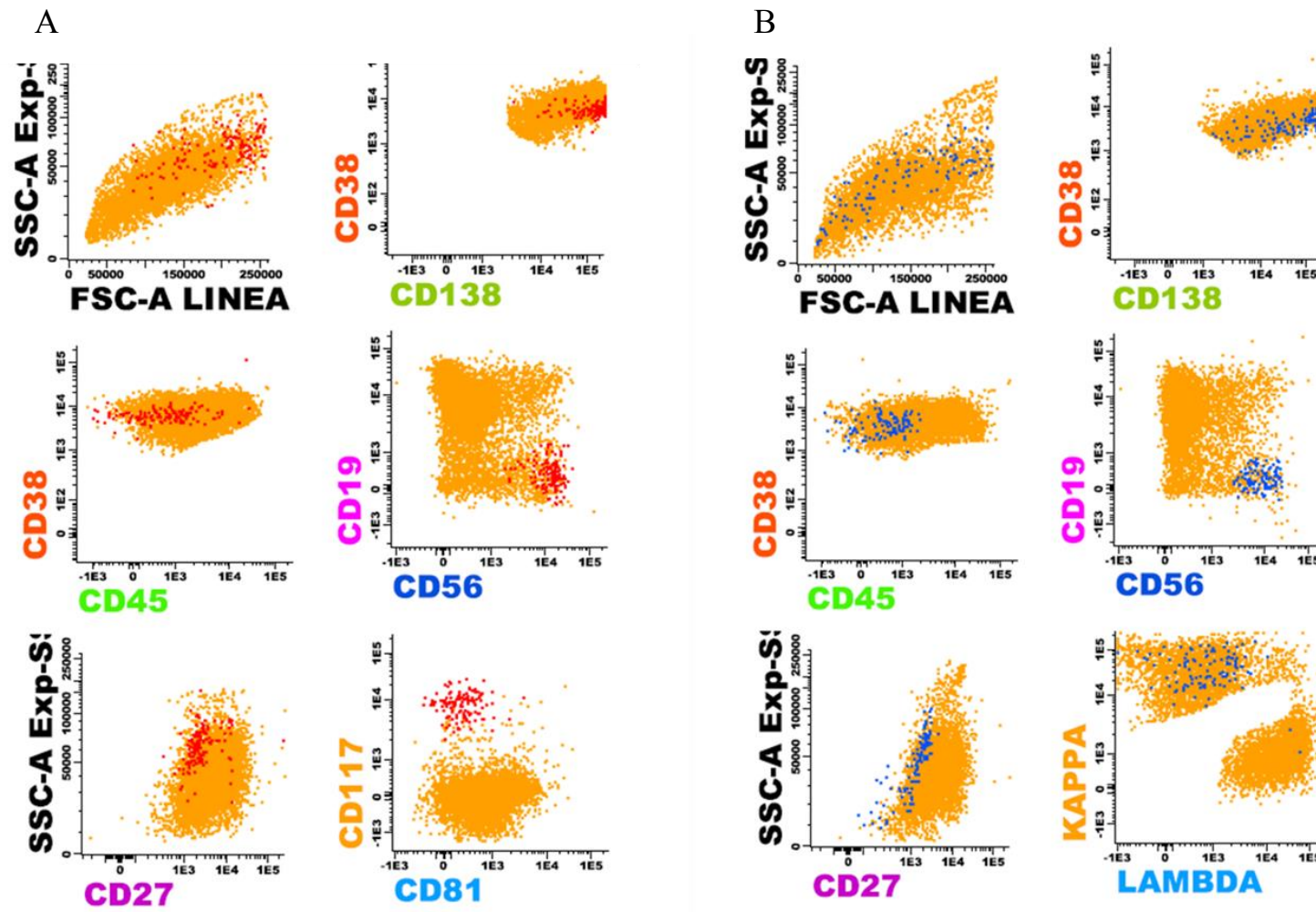
Πίνακας 5: Τα χαρακτηριστικά των ασθενών στους οποίους προσδιορίστηκαν τα επίπεδα των Tregs και μελετήθηκε ο λειτουργικός τους φαινότυπος με ΠΚΡ.

Κατηγορία ασθενών	Νεοδιαγνωσθέντες	EYN ⁺	EYN ⁻
Φύλο			
A	3	6	2
Θ	7	3	5
Μέση Ηλικία	65,5	65,9	57,6
Υπότυπος του ΠΜ			
IgA (κ)	-	1	-
IgA (λ)	1	2	-
IgG (κ)	3	3	2
IgG (λ)	2	2	2
IgD (λ)	-	-	2
κ	1	1	1
λ	2	-	-
Μη χαρακτηρισμένος	1	-	-

Ακολουθούν δύο ενδεικτικά περιστατικά στα οποία διακρίνεται ο φαινότυπος των παθολογικών πλασματοκυττάρων. Και τα δύο αφορούν δείγματα μυελού των οστών, τα οποία επεξεργάστηκαν με το πρωτόκολλο που περιγράφηκε στην ενότητα 2.3 και στη συνέχεια αναλύθηκαν με το ειδικό λογισμικό Infinicyt 1.8. Συγκεκριμένα, το πρώτο περιστατικό αφορά ένα νεοδιαγνωσθέντα ασθενή (Εικόνα 12) και το δεύτερο έναν ασθενή που βρισκόταν σε CR μετά από θεραπεία και χαρακτηρίστηκε EYN⁺ (Εικόνα 13).



Εικόνα 12: Ενδεικτικό δείγμα μυελού των οστών νεοδιαγνωσθέντα ασθενούς με ΠΜ. Τα πλασματοκύτταρα με πορτοκαλί χρώμα είναι τα φυσιολογικά, ενώ τα πλασματοκύτταρα με κόκκινο και μπλε χρώμα είναι τα μυελωματικά. Ο φαινότυπος των μυελωματικών πλασματοκυττάρων είναι CD19⁻CD56⁻CD45^{-dim}CD117⁻CD81⁻CD27^{dim}CD38^{dim}. Μάλιστα, επειδή ο ασθενής δεν έχει λάβει θεραπεία ακόμη, τα μυελωματικά πλασματοκύτταρα είναι πολύ περισσότερα από τα φυσιολογικά και έχουν διηθήσει το μυελό των οστών σε πολύ μεγάλο βαθμό.



Εικόνα 13: Ενδεικτικό δείγμα μυελού των οστών EYN⁺ ασθενή. Στο panel με τους επιφανειακούς δείκτες αριστερά (A), διακρίνεται με κόκκινο χρώμα ο παθολογικός κλώνος πλασματοκυττάρων με φαινότυπο CD19⁺CD56⁺CD117⁺CD27^{dim} CD81⁺CD45⁻ CD138^{hi}. Δεξιά, ο ίδιος πληθυσμός διακρίνεται με μπλε χρώμα στο δεύτερο panel και μάλιστα εμφανίζει καππα μονοκλωνικότητα (B). Το δείγμα κρίνεται EYN⁺ σε επίπεδο 10⁻⁵ – 10⁻⁶.

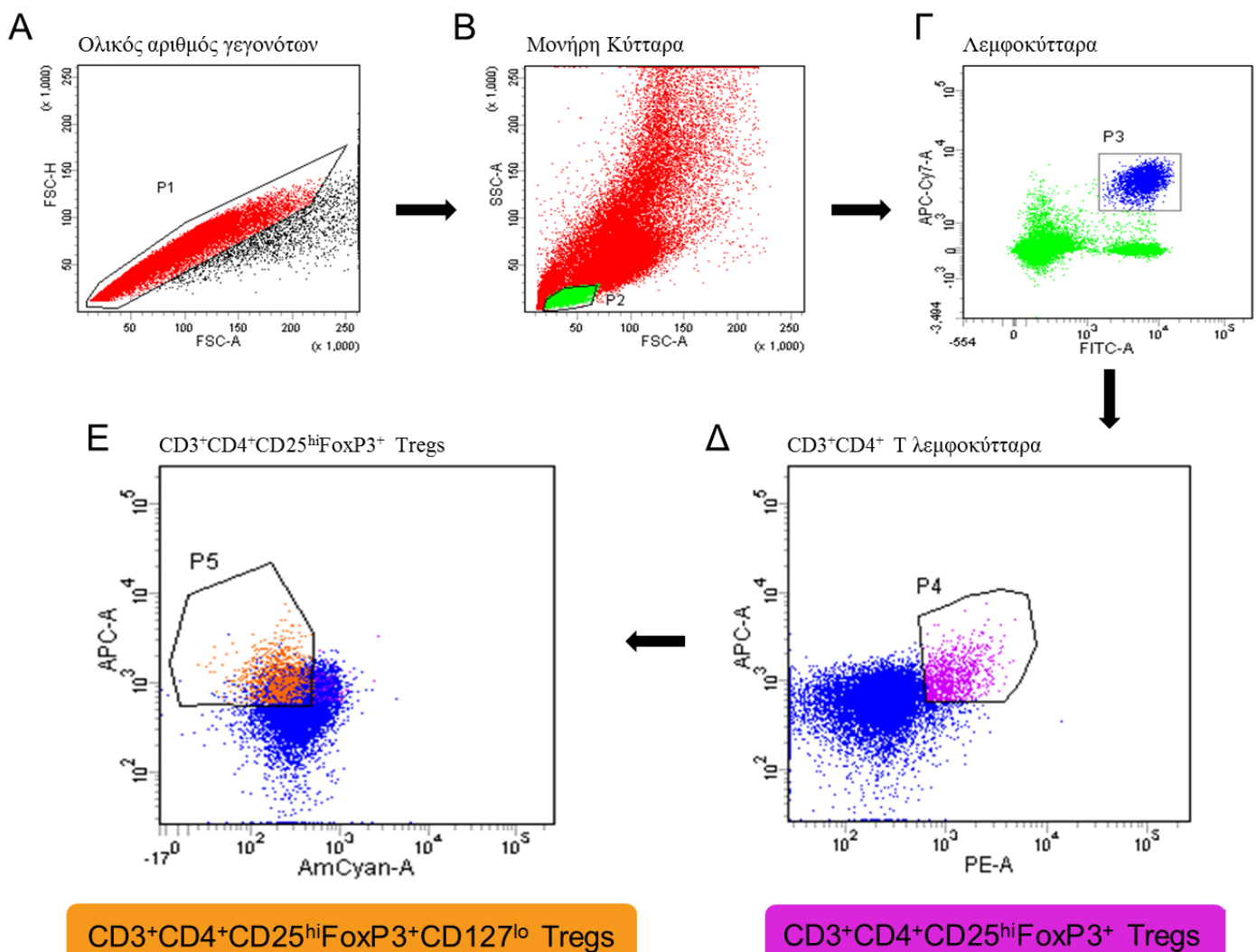
3.2 Στρατηγική ανάλυσης των δειγμάτων για την αναγνώριση και λειτουργική μελέτη των Tregs

Η οριοθέτηση/περίφραξη (gating) των πληθυσμών ενδιαφέροντος σε δεδομένα κυτταρομετρίας ροής, αποτελεί το σημαντικότερο παράγοντα για τη σωστή ερμηνεία των αποτελεσμάτων. Με βάση τους δύο συνδυασμούς οκταχρωμίας (panels) που χρησιμοποιήθηκαν (ενότητα 2.4), ακολουθήσαμε ενιαία στρατηγική ανάλυσης, η οποία εφαρμόστηκε εξίσου και για τα δείγματα μυελού των οστών και περιφερικού αίματος στις τρεις ομάδες ασθενών. Η συγκεκριμένη στρατηγική ανάλυσης επιτρέπει μέσα από διαδοχικές περιφράξεις την ταυτοποίηση και τον ποσοτικό (%) προσδιορισμό των Tregs με βάση το φαινότυπο $CD3^+CD4^+CD25^{hi}FoxP3^+$ (panel 1 και panel 2) και το φαινότυπο $CD3^+CD4^+CD25^{hi}FoxP3^+CD127^{lo}$ (panel 2), καθώς και τη μελέτη της έκφρασης των υπόλοιπων αντιγονικών δεικτών που περιλαμβάνονται στα δύο panels. Η στρατηγική ανάλυσης που ακολουθήσαμε κατά βήμα έχει ως εξής:

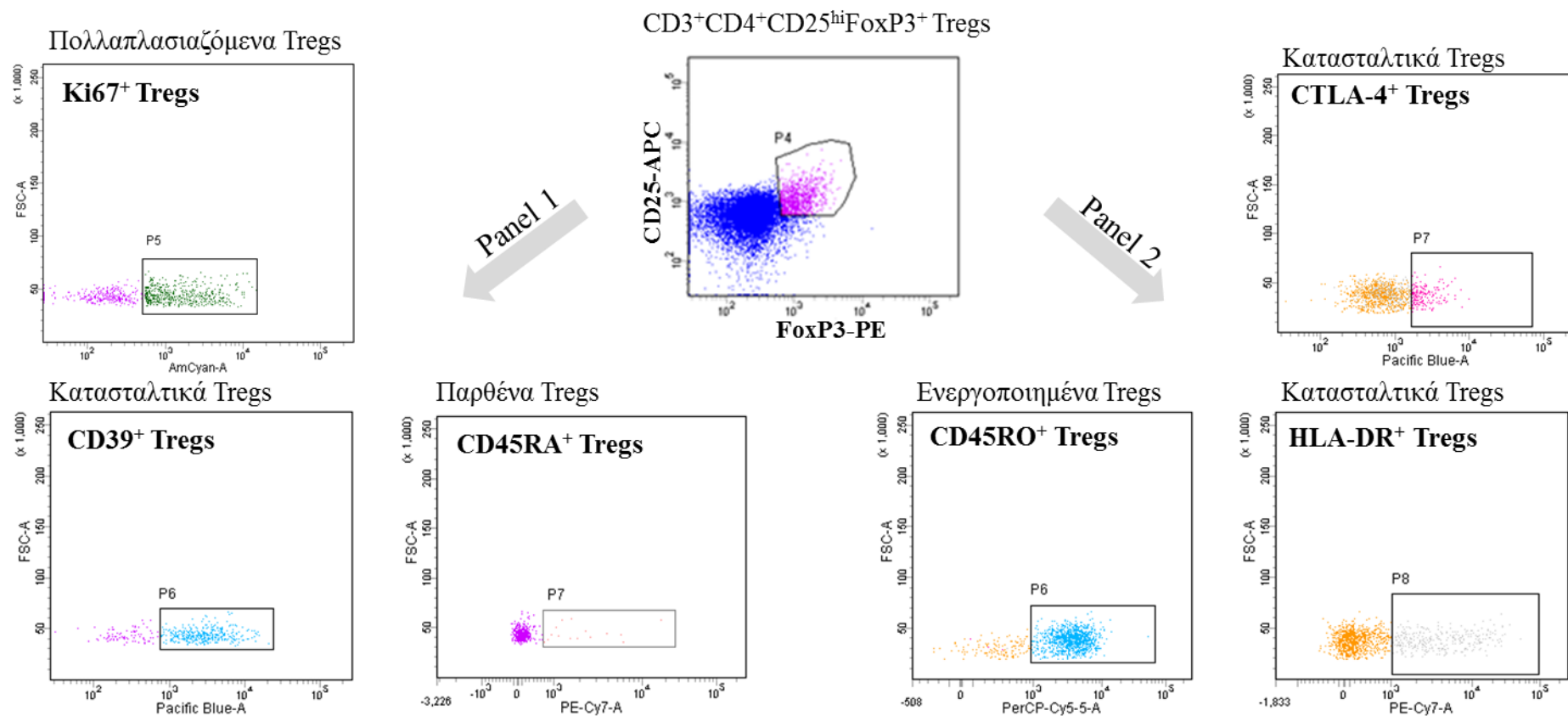
1. Από το στικτόγραμμα των παραμέτρων εμπρόσθιας σκέδασης FSC-A και FSC-H επιλέγονται τα μονήρη κύτταρα (singlets), τα οποία συνιστούν τη διαγώνιο του στικτογράμματος. Με αυτό το βήμα γίνεται παράλληλα και ο αποκλεισμός των διπλετών (doublets) (Εικόνα 14Α).
2. Στη συνέχεια, από το στικτόγραμμα των παραμέτρων εμπρόσθιας σκέδασης FSC και πλάγιας σκέδασης SSC που απεικονίζει τα μονήρη κύτταρα, επιλέγονται τα λεμφοκύτταρα. Τα λεμφοκύτταρα χαρακτηρίζονται από μικρό μέγεθος και από χαμηλή εσωτερική πολυπλοκότητα και γι'αυτό ανευρίσκονται χαμηλά στις παραμέτρους FSC και SSC αντίστοιχα, ως ένας ευδιάκριτος πληθυσμός στο στικτόγραμμα. Με αυτό το βήμα γίνεται αποκλεισμός άλλων κυτταρικών πληθυσμών του δείγματος (π.χ. κοκκιοκύτταρα, μεσεγχυματικά βλαστικά κύτταρα κ.α.) αλλά και κυτταρικών υπολειμμάτων. Μάλιστα, τα κυτταρικά υπολείμματα δεσμεύουν με μη ειδικό τρόπο τα αντισώματα που προσθέτουμε και μπορούν να αλλοιώσουν τα αποτελέσματα, καθιστώντας μη αξιόπιστη την ανάλυση (Εικόνα 14Β).
3. Από το στικτόγραμμα $CD3 - FITC$ και $CD4 - APC-Cy7$ επιλέγουμε τα διπλά θετικά κύτταρα, τα οποία αντιστοιχούν στα $CD4^+$ T λεμφοκύτταρα (Εικόνα 14Γ).
4. Ακολούθως, στο στικτόγραμμα $FoxP3 - PE$ και $CD25 - APC$, επιλέγονται εκείνα τα $CD4^+$ λεμφοκύτταρα, τα οποία είναι $FoxP3^+$ και παράλληλα παρουσιάζουν υψηλή

έκφραση του δείκτη CD25 (Εικόνα 14Δ). Αυτό το σημείο αντιστοιχεί στο φαινότυπο $CD3^+CD4^+CD25^{hi}FoxP3^+$ Tregs και από εκεί και έπειτα μπορεί να γίνει μεμονωμένα η μελέτη της έκφρασης των υπολοίπων δεικτών που περιλαμβάνονται στα δύο panels (Εικόνα 15).

5. Στην περίπτωση του panel 2 από το στικτόγραμμα AmCyan – CD127 και CD25, μπορεί να γίνει μια επιπλέον διαδοχική περίφραξη επιλέγοντας τα $CD3^+CD4^+CD25^{hi}FoxP3^+$ κύτταρα που χαρακτηρίζονται από χαμηλή έκφραση του δείκτη CD127. Με αυτόν τον τρόπο καταλήγουμε στο φαινότυπο $CD3^+CD4^+CD25^{hi}FoxP3^+CD127^{lo}$ Tregs, ο οποίος στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε μόνο για την ποσοτικοποίηση των Tregs (Εικόνα 14Ε).



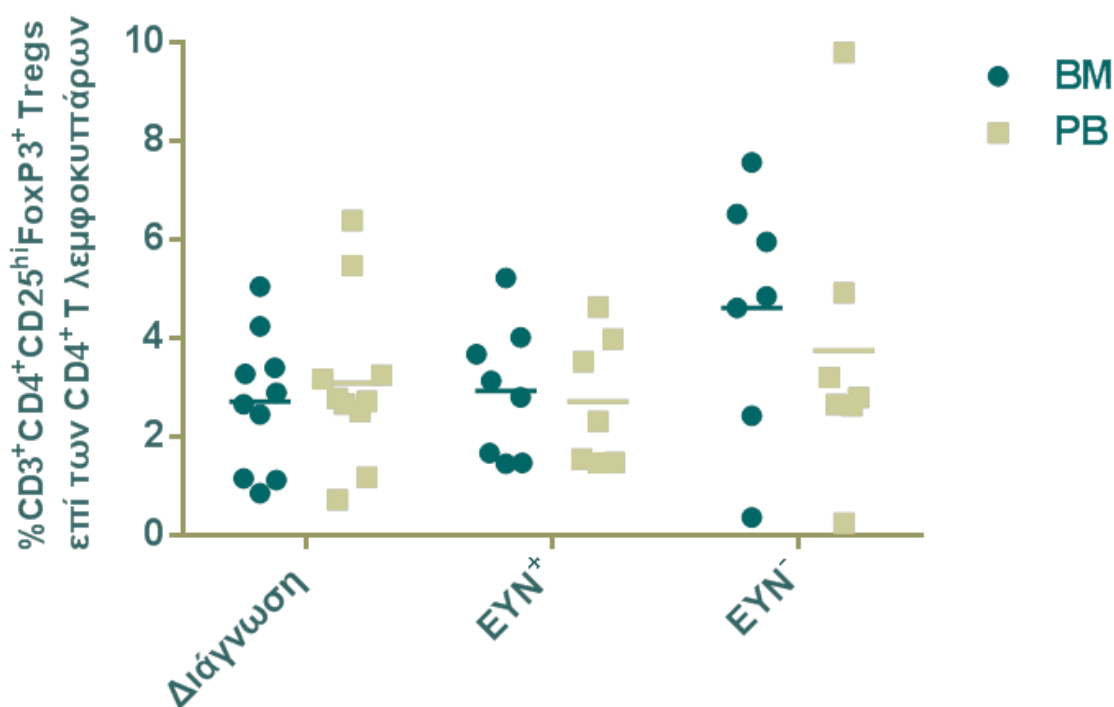
Εικόνα 14: Η στρατηγική ανάλυσης των δειγμάτων που ακολουθήσαμε. **A.** Από το στικτόγραμμα των παραμέτρων εμπρόσθιας σκέδασης FSC-A και FSC-H επιλέγονται τα μονήρη κύτταρα. **B.** Από το στικτόγραμμα των παραμέτρων εμπρόσθιας και πλάγιας σκέδασης, FSC και SSC αντίστοιχα, επιλέγονται τα λεμφοκύτταρα. **Γ.** Από το στικτόγραμμα των παραμέτρων CD3-FITC και CD4-APC/Cy7 επιλέγονται τα διπλά θετικά κύτταρα, που αντιστοιχούν στα $CD4^+$ T λεμφοκύτταρα. **Δ.** Από το στικτόγραμμα των παραμέτρων FoxP3-PE και CD25-APC επιλέγονται τα διπλά θετικά κύτταρα, που αντιστοιχούν στο φαινότυπο $CD3^+CD4^+CD25^{hi}FoxP3^+$ Tregs. Μέχρι εδώ τα βήματα είναι κοινά και για τα δύο panels οκταχρωμίας. **Ε.** Το βήμα αυτό αφορά μόνο τα σωληνήρια στα οποία έχει γίνει χρώση με τον συνδυασμό φθορίζοντων αντισωμάτων του panel 2, το οποίο περιέχει τον αντιγονικό δείκτη CD127. Στο διάγραμμα των παραμέτρων CD127-AmCyan και CD25-APC επιλέγονται τα $CD3^+CD4^+CD25^{hi}FoxP3^+$ κύτταρα που έχουν χαμηλά επίπεδα έκφρασης του δείκτη CD127. Σε αυτό το σημείο, έχουν αναγνωριστεί τα Tregs με φαινότυπο $CD3^+CD4^+CD25^{hi}FoxP3^+CD127^{lo}$.



Εικόνα 15: Μελέτη της έκφρασης μεμονωμένων αντιγονικών δεικτών στα $CD3^+CD4^+CD25^{hi}FoxP3^+$ Tregs. Για λόγους αντιπαραβολής μεταξύ των δύο panels, η μελέτη έκφρασης των αντιγονικών δεικτών πραγματοποιήθηκε στα Tregs με φαινότυπο $CD3^+CD4^+CD25^{hi}FoxP3^+$, ο οποίος είναι κοινός και στα δύο panels. Οι αντιγονικοί δείκτες που χρησιμοποιήθηκαν δίνουν πληροφορίες για την κατάσταση ενεργοποίησης των κυττάρων (Ki67, CD45RA, CD45RO), αλλά και για το κατασταλτικό προφίλ τους (CD39, CTLA-4, HLA-DR).

3.3 Ποσοτική εκτίμηση των επιπέδων των Tregs με βάση το φαινότυπο $CD3^+CD4^+CD25^{hi}FoxP3^+$

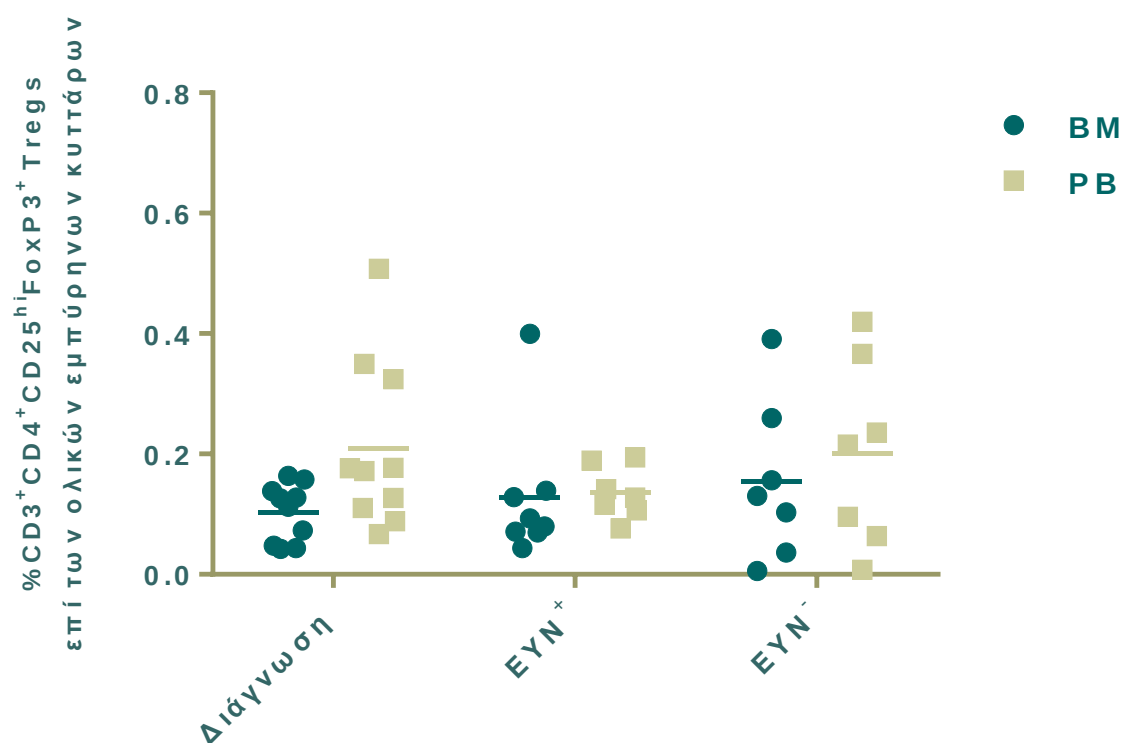
Αρχικά, αφού πραγματοποιήθηκε η ταυτοποίηση των Tregs με βάση το φαινότυπο $CD3^+CD4^+CD25^{hi}FoxP3^+$, ο πληθυσμός αυτός εκφράστηκε ξεχωριστά ως ποσοστό επί των $CD3^+CD4^+$ T λεμφοκυττάρων και ως ποσοστό επί των ολικών εμπύρηνων κυττάρων του δείγματος. Η ποσοστιαία έκφραση των Tregs επί των $CD4^+$ T λεμφοκυττάρων χρησιμεύει στη σύγκριση των τριών ομάδων ασθενών μεταξύ τους, αλλά και μεταξύ των δειγμάτων μυελού των οστών (Bone Marrow, BM) και περιφερικού αίματος (Peripheral Blood, PB) εντός μιας ομάδας, λαμβάνοντας φυσικά υπόψη ότι σε φυσιολογικούς δότες το παραπάνω ποσοστό αντιστοιχεί σε λιγότερο από 5% και στα δύο βιολογικά δείγματα. Αξίζει να σημειωθεί, ωστόσο, ότι το ποσοστό αυτό εξαρτάται από το δότη και μπορεί να παρουσιάζει έντονη διακύμανση από ασθενή σε ασθενή. Παράλληλα, η ποσοστιαία έκφραση των Tregs επί των ολικών εμπύρηνων κυττάρων του δείγματος, εκτός από τη σύγκριση, εξυπηρετεί και τον προσδιορισμό της ποσοτικής υπεροχής των Tregs ανά ομάδα ασθενών και βιολογικό υλικό.



Εικόνα 16: Γραφική αναπαράσταση του ποσοστού των $CD3^+CD4^+CD25^{hi}FoxP3^+$ Tregs στο σύνολο των $CD4^+$ T λεμφοκυττάρων για τις τρεις ομάδες ασθενών (νεοδιαγνωσθέντες ασθενείς, EYN^+ και EYN^- ασθενείς) ανά βιολογικό δείγμα μυελού των οστών (BM) και περιφερικού αίματος (PB).

Όσον αφορά στη σύγκριση των ποσοστών των $CD3^+CD4^+CD25^{hi}FoxP3^+$ Tregs επί των $CD4^+$ T λεμφοκυττάρων μεταξύ των δύο βιολογικών δειγμάτων ανά ομάδα, παρατηρήσαμε ότι οι νεοδιαγνωσθέντες ασθενείς εμφάνιζαν υψηλότερα ποσοστά Tregs στο περιφερικό αίμα σε σχέση με το μυελό των οστών. Η αντίστροφη εικόνα παρατηρήθηκε στους EYN^+ και EYN^- ασθενείς, όπου η αναλογία των Tregs στα $CD4^+$ T λεμφοκύτταρα ήταν υψηλότερη στο μυελό των οστών σε σύγκριση με το περιφερικό αίμα.

Όσον αφορά στη σύγκριση μεταξύ των τριών ομάδων, τα υψηλότερα ποσοστά Tregs επί των $CD4^+$ T λεμφοκυττάρων καταγράφηκαν στους EYN^- ασθενείς, ενώ οι EYN^+ ασθενείς και οι νεοδιαγνωσθέντες ασθενείς εμφάνισαν παρόμοια ποσοστά Tregs. (Εικόνα 16).



Εικόνα 17: Γραφική αναπαράσταση του ποσοστού των $CD3^+CD4^+CD25^{hi}FoxP3^+$ Tregs στο σύνολο των εμπύρηνων κυττάρων του κάθε δείγματος για τις τρεις ομάδες ασθενών (νεοδιαγνωσθέντες ασθενείς, EYN^+ και EYN^- ασθενείς) ανά βιολογικό δείγμα μυελού των οστών (BM) και περιφερικού αίματος (PB).

Εξετάζοντας τα ποσοστά των $CD3^+CD4^+CD25^{hi}FoxP3^+$ Tregs επί των ολικών εμπύρηνων κυττάρων μεταξύ των δύο βιολογικών δειγμάτων, παρατηρούμε ότι και στις τρεις ομάδες ασθενών τα εν λόγω ποσοστά είναι υψηλότερα στο περιφερικό αίμα συγκριτικά με το μυελό των οστών. Η ποσοστιαία έκφραση των Tregs στο σύνολο των εμπύρηνων κυττάρων του δείγματος μας δίνει μια καλύτερη εκτίμηση για τον απόλυτο αριθμό των Tregs σε κάθε δείγμα.

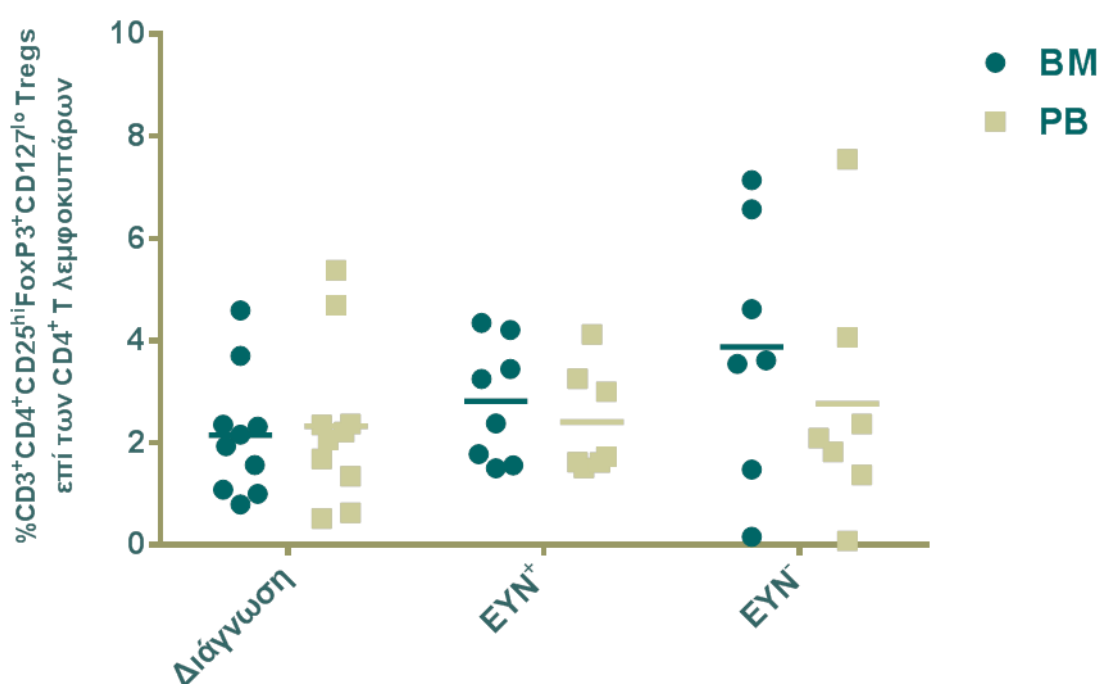
Η διαφορά που φαίνεται σε σχέση με την προηγούμενη γραφική παράσταση οφείλεται στο ότι το περιφερικό αίμα περιέχει 2 έως και 3 φορές περισσότερα $CD4^+$ T λεμφοκύτταρα σε σύγκριση με το μυελό των οστών. Το γεγονός αυτό σημαίνει ότι ο πληθυσμός των Tregs στο περιφερικό αίμα υπερέχει αριθμητικά έναντι του πληθυσμού Tregs του μυελού των οστών.

Παράλληλα, τα υψηλότερα ποσοστά Tregs επί των ολικών εμπύρηνων κυττάρων καταγράφηκαν στο περιφερικό αίμα των νεοδιαγνωσθέντων ασθενών, ενώ τα χαμηλότερα αντίστοιχα ποσοστά παρατηρήθηκαν στο μυελό των οστών των ασθενών της ίδιας ομάδας. Οι ασθενείς που βρίσκονται σε CR μετά από θεραπεία παρουσίασαν ενδιάμεσα ποσοστά Tregs επί των ολικών εμπύρηνων κυττάρων, με τους EYN⁻ ασθενείς να εμφανίζουν υψηλότερα ποσοστά και στο μυελό των οστών και στο περιφερικό αίμα σε σύγκριση με τους EYN⁺ ασθενείς (Εικόνα 17).

Οι διαφορές στα ποσοστά των $CD3^+CD4^+CD25^{hi}FoxP3^+$ Tregs μεταξύ περιφερικού αίματος και μυελού των οστών ανά ομάδα ασθενών αξιολογήθηκαν με unpaired Student's t test. Αντίστοιχα, οι διαφορές στα ίδια ποσοστά μεταξύ των τριών ομάδων ασθενών ανά βιολογικό υλικό αξιολογήθηκαν με ANOVA. Οι τιμές p-value < 0,05 θεωρήθηκαν στατιστικά σημαντικές, ωστόσο η στατιστική ανάλυση δεν κατέδειξε κάποια στατιστική σημαντικότητα.

3.4 Ποσοτική εκτίμηση των επιπέδων των Tregs με βάση το φαινότυπο $CD3^+CD4^+CD25^{hi}FoxP3^+CD127^{lo}$

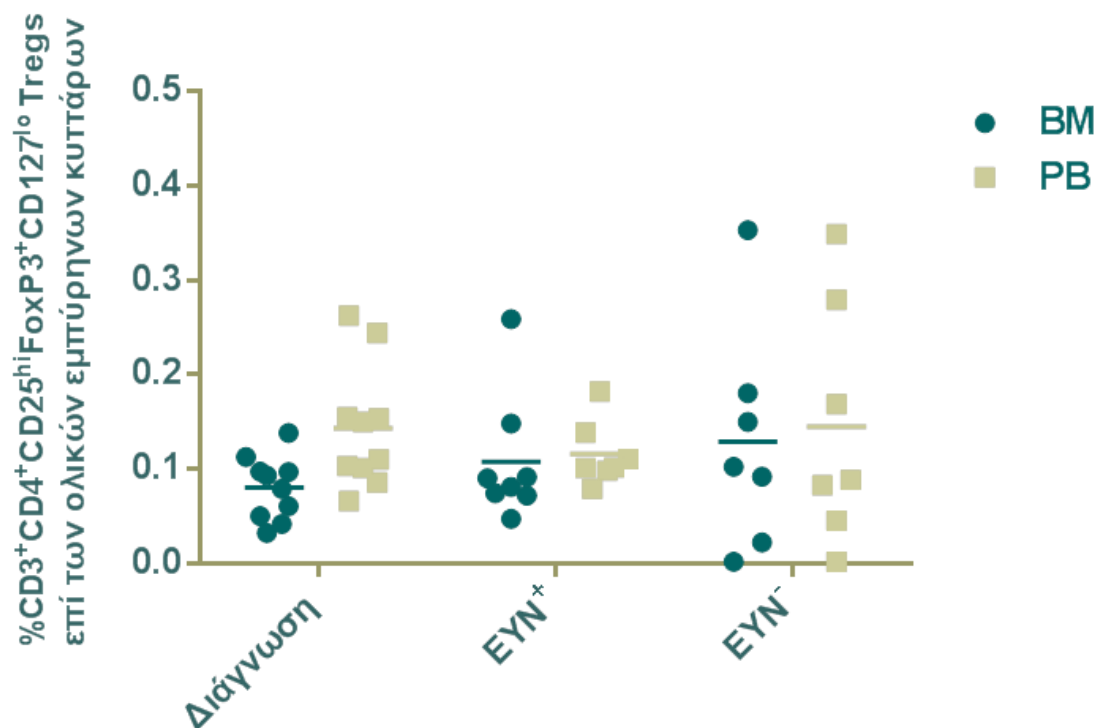
Αφού έγινε χρώση των κυττάρων με το συνδυασμό φθορίζοντων αντισωμάτων του panel 2 που περιγράφηκε στην ενότητα 2.4 και ακολουθώντας τα βήματα 1-5 που αναφέρθηκαν προηγουμένως για τη στρατηγική ανάλυσης των δειγμάτων, ταυτοποιήθηκε ο πληθυσμός των Tregs με φαινότυπο $CD3^+CD4^+CD25^{hi}FoxP3^+CD127^{lo}$. Ομοίως με πριν, ο αριθμός των Tregs με το συγκεκριμένο φαινότυπο υπολογίστηκε ως ποσοστό επί των $CD4^+$ T λεμφοκυττάρων και ως ποσοστό επί των ολικών εμπύρηνων κυττάρων που καταγράφηκαν σε κάθε δείγμα.



Εικόνα 18: Γραφική αναπαράσταση του ποσοστού των $CD3^+CD4^+CD25^{hi}FoxP3^+CD127^{lo}$ Tregs στο σύνολο των $CD4^+$ T λεμφοκυττάρων για τις τρεις ομάδες ασθενών (νεοδιαγνωσθέντες ασθενείς, EYN⁺ και EYN⁻ ασθενείς) ανά βιολογικό δείγμα μυελού των οστών (BM) και περιφερικού αίματος (PB).

Τα αποτελέσματα των ποσοστών των $CD3^+CD4^+CD25^{hi}FoxP3^+CD127^{lo}$ Tregs επί των $CD4^+$ T λεμφοκυττάρων παρουσιάζουν την ίδια εικόνα με αυτή του φαινοτύπου που χρησιμοποιήθηκε προηγουμένως. Παρατηρούμε και πάλι ότι στους νεοδιαγνωσθέντες ασθενείς τα ποσοστά Tregs είναι υψηλότερα στο περιφερικό αίμα σε σχέση με το μυελό των οστών, ενώ ισχύει το αντίθετο στους EYN⁺ και EYN⁻ ασθενείς, όπου ο μυελός των οστών εμφανίζει υψηλότερα ποσοστά Tregs στο σύνολο των $CD4^+$ T λεμφοκυττάρων.

Για ακόμη μια φορά, παρατηρούμε το ίδιο πρότυπο μεταξύ των τριών ομάδων, όπου οι EYN⁻ ασθενείς εμφανίζουν τα υψηλότερα ποσοστά CD3⁺CD4⁺CD25^{hi}FoxP3⁺CD127^{lo} Tregs, ακολουθούν οι EYN⁺ ασθενείς, ενώ οι νεοδιαγνωσθέντες ασθενείς χαρακτηρίζονται από τα χαμηλότερα ποσοστά (Εικόνα 18).



Εικόνα 19: Γραφική αναπαράσταση του ποσοστού των CD3⁺CD4⁺CD25^{hi}FoxP3⁺CD127^{lo} Tregs στο σύνολο των εμπύρηνων κυττάρων του κάθε δείγματος για τις τρεις ομάδες ασθενών (νεοδιαγνωσθέντες ασθενείς, EYN⁺ και EYN⁻ ασθενείς) ανά βιολογικό δείγμα μυελού των οστών (BM) και περιφερικού αίματος (PB).

Από τη γραφική αναπαράσταση του ποσοστού των CD3⁺CD4⁺CD25^{hi}FoxP3⁺CD127^{lo} Tregs ως ποσοστό των εμπύρηνων κυττάρων, παρατηρείται η ίδια τάση, συγκεκριμένα ότι το περιφερικό αίμα περιέχει περισσότερα Tregs σε απόλυτους αριθμούς σε σχέση με το μυελό των οστών και στις τρεις ομάδες ασθενών. Το γεγονός αυτό, όπως αναφέρθηκε και στην προηγούμενη ενότητα, αποδόθηκε στο ότι η συγκέντρωση CD4⁺ T λεμφοκυττάρων στο περιφερικό αίμα είναι υψηλότερη συγκριτικά με το μυελό των οστών.

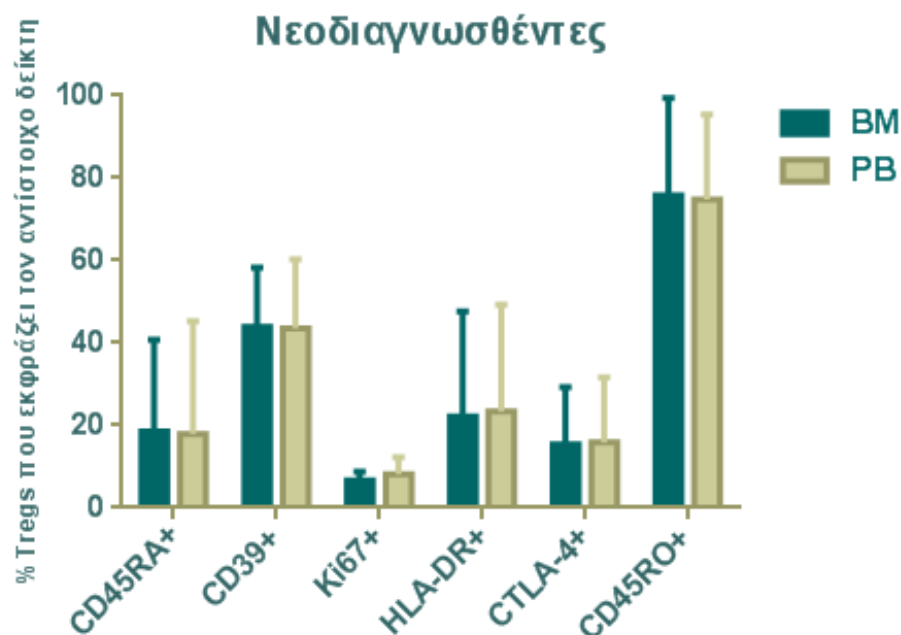
Συγχρόνως, τα υψηλότερα ποσοστά Tregs στο σύνολο των εμπύρηνων κυττάρων εντοπίζονται όπως και πριν στο περιφερικό αίμα των νεοδιαγνωσθέντων ασθενών, ενώ ο μυελός των οστών στην ίδια ομάδα ασθενών παρουσιάζει τα χαμηλότερα ποσοστά. Ενδιάμεσα βρίσκονται και πάλι τα ποσοστά Tregs για τους EYN⁺ και EYN⁻ ασθενείς, με την ομάδα των

δεύτερων να εμφανίζει και πάλι υψηλότερα επίπεδα Tregs σε απόλυτους αριθμούς σε σύγκριση με την πρώτη (Εικόνα 19).

Οι διαφορές στα ποσοστά των $CD3^{+}CD4^{+}CD25^{hi}FoxP3^{+}$ Tregs μεταξύ περιφερικού αίματος και μυελού των οστών ανά ομάδα ασθενών αξιολογήθηκαν με unpaired Student's t test. Αντίστοιχα, οι διαφορές στα ίδια ποσοστά μεταξύ των τριών ομάδων ασθενών ανά βιολογικό υλικό αξιολογήθηκαν με ANOVA. Οι τιμές p-value < 0,05 θεωρήθηκαν στατιστικά σημαντικές, ωστόσο η στατιστική ανάλυση δεν κατέδειξε κάποια στατιστική σημαντικότητα.

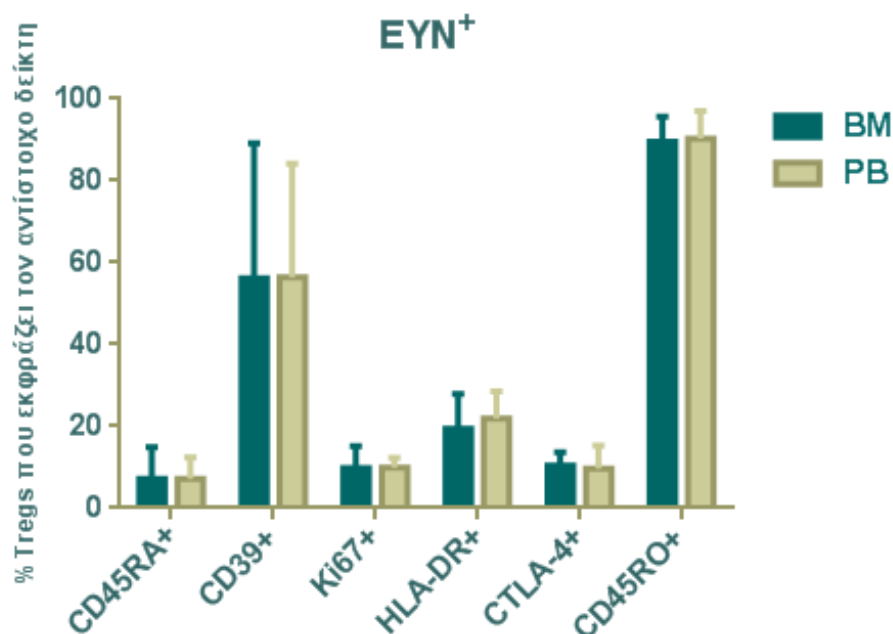
3.5 Μελέτη της έκφρασης μεμονωμένων αντιγονικών δεικτών στα CD3⁺CD4⁺CD25^{hi}FoxP3⁺ Tregs

Σχεδιάζοντας τα δύο panels οκταχρωμίας για τη μελέτη των Tregs συμπεριλάβαμε και φθορίζοντα αντισώματα έναντι αντιγονικών δεικτών, οι οποίοι είναι πληροφοριακοί για την κατάσταση ενεργοποίησης και το λειτουργικό προφίλ των Tregs. Έτσι, αφού ακολουθήσαμε τα βήματα 1-4 της στρατηγικής ανάλυσης που περιγράφηκε παραπάνω και για τα δύο panels και ταυτοποιήθηκε ο πληθυσμός των Tregs με φαινότυπο CD3⁺CD4⁺CD25^{hi}FoxP3⁺, μελετήσαμε μεμονωμένα την έκφραση των αντιγονικών δεικτών CD45RA, CD39, Ki67, HLA-DR, CTLA-4 και CD45RO σε περιφερικό αίμα και μυελό των οστών στις τρεις ομάδες ασθενών. Στη συνέχεια, χαρακτηρίστηκαν κατασταλτικά τα Tregs που ήταν θετικά για κάποιον από τους τρεις δείκτες CD39, CTLA-4 ή HLA-DR. Συγχρόνως, τα CD45RA⁺ Tregs χαρακτηρίστηκαν παρθένα Tregs, καθώς η έκφραση του CD45RA μαρτυρά ότι δεν έχει γίνει διέγερση του TCR τους μετά από αντιγονοπαρουσίαση. Από την άλλη, τα CD45RO⁺ Tregs αντιστοιχούν σε ενεργοποιημένο φαινότυπο, γεγονός που σημαίνει ότι έχει προηγηθεί διέγερση του TCR των Tregs μέσω αντιγονοπαρουσίασης. Τέλος, τα Ki67⁺ Tregs χαρακτηρίστηκαν πολλαπλασιαζόμενα Tregs, καθώς το μόριο Ki67 συνιστά μια ενδοπυρηνική πρωτεΐνη, η οποία σχετίζεται με τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό.



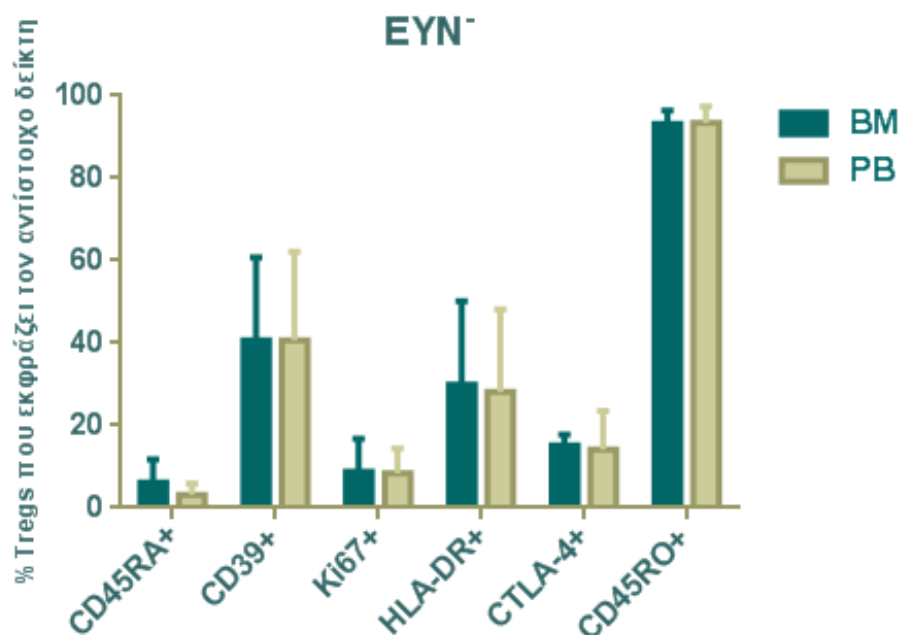
Εικόνα 20: Γραφική αναπαράσταση του ποσοστού έκφρασης των αντιγονικών δεικτών CD45RA, CD39, Ki67, HLA-DR, CTLA-4 και CD45RO στα CD3⁺CD4⁺CD25^{hi}FoxP3⁺Tregs στο μυελό των οστών (BM) και το περιφερικό αίμα (PB) νεοδιαγνωσθέντων ασθενών με ΠΜ.

Παρατηρούμε ότι στην ομάδα των νεοδιαγνωσθέντων ασθενών οι αντιγονικοί δείκτες που ελέγξαμε εμφανίζουν παρόμοιο πρότυπο έκφρασης ανάμεσα στα δείγματα μυελού των οστών και περιφερικού αίματος. Εντοπίστηκαν υψηλά ποσοστά CD45RO⁺ Tregs τόσο στο μυελό των οστών όσο και στο περιφερικό αίμα, όπως επίσης και κατασταλτικών CD39⁺ Tregs εξίσου και στα δύο βιολογικά υλικά. Μάλιστα, είναι χαρακτηριστική η εικόνα έκφρασης του δείκτη πολλαπλασιασμού Ki67, ο οποίος παρουσιάζει χαμηλή έκφραση και στο μυελό των οστών και στο περιφερικό αίμα, υποδηλώνοντας την απουσία πολλαπλασιαζόμενων Tregs (Εικόνα 20).



Εικόνα 21: Γραφική αναπαράσταση του ποσοστού έκφρασης των αντιγονικών δεικτών CD45RA, CD39, Ki67, HLA-DR, CTLA-4 και CD45RO στα CD3⁺CD4⁺CD25^{hi}FoxP3⁺Tregs στο μυελό των οστών (BM) και το περιφερικό αίμα (PB) EYN⁺ ασθενών.

Όπως ακριβώς παρατηρήθηκε και στους νεοδιαγνωσθέντες ασθενείς, η έκφραση των αντιγονικών δεικτών CD45RA, CD39, Ki67, HLA-DR, CTLA-4 και CD45RO στα Tregs των EYN⁺ ασθενών παρουσιάζει ομοιόμορφο πρότυπο μεταξύ του μυελού των οστών και του περιφερικού αίματος. Τα υψηλότερα ποσοστά έκφρασης απαντούν στα CD45RO⁺ Tregs και στα κατασταλτικά CD39⁺ Tregs, ενώ οι δείκτες CD45RA, Ki67 και CTLA-4 εμφανίζουν τα χαμηλότερα ποσοστά έκφρασης (Εικόνα 21).



Εικόνα 22: Γραφική αναπαράσταση του ποσοστού έκφρασης των αντιγονικών δεικτών CD45RA, CD39, Ki67, HLA-DR, CTLA-4 και CD45RO στα $CD3^+CD4^+CD25^{hi}FoxP3^+$ Tregs στο μυελό των οστών (BM) και το περιφερικό αίμα (PB) EYN⁻ ασθενών.

Το πρότυπο έκφρασης των αντιγονικών δεικτών που ελέγχθηκαν δεν παρουσιάζει ουσιαστικές διαφορές μεταξύ μυελού των οστών και περιφερικού αίματος ούτε στην ομάδα των EYN⁻ ασθενών. Για ακόμη μια φορά, το υψηλότερο ποσοστό έκφρασης καταγράφεται στα $CD45RO^+$ Tregs, ενώ ακολουθούν τα $CD39^+$ Tregs. Οι δείκτες CD45RA και Ki67 χαρακτηρίζονται και πάλι από ιδιαίτερα χαμηλά ποσοστά έκφρασης (Εικόνα 22).

Μεταξύ των τριών ομάδων ασθενών, οι διαφορές που παρατηρούνται αφορούν κυρίως τους δείκτες CD45RA, CD45RO και CD39. Στους νεοδιαγνωσθέντες ασθενείς παρατηρείται υψηλότερο ποσοστό παρθένων $CD45RA^+$ Tregs και στο μυελό των οστών και στο περιφερικό αίμα σε σχέση με τους EYN⁺ και τους EYN⁻ ασθενείς, οι οποίοι φαίνεται ότι χαρακτηρίζονται από πιο γηρασμένους πληθυσμούς Tregs εμφανίζοντας πολύ υψηλά ποσοστά $CD45RO^+$ Tregs. Μάλιστα, οι EYN⁺ ασθενείς χαρακτηρίζονται από Tregs εντονότερη έκφραση για το εκτοένζυμο CD39, σε σχέση και με τους νεοδιαγνωσθέντες και με τους EYN⁻ ασθενείς.

Οι διαφορές μεταξύ περιφερικού αίματος και μυελού των οστών ανά ομάδα ασθενών αξιολογήθηκαν στατιστικά με unpaired Student's t-test, ενώ οι διαφορές στην έκφραση κάθε αντιγονικού δείκτη μεταξύ των τριών ομάδων ανά βιολογικό υλικό αξιολογήθηκαν με ANOVA. Οι τιμές p-value < 0,05 θεωρήθηκαν στατιστικά σημαντικές, ωστόσο η στατιστική ανάλυση δεν κατέδειξε κάποια στατιστική σημαντικότητα.

Συμπεράσματα

Το Πολλαπλούν Μυέλωμα (ΠΜ) είναι μια ανίατη αιματολογική κακοήθεια που περιλαμβάνει τη διήθηση του μυελού των οστών από παθολογικά πλασματοκύτταρα, τα οποία υπερπαράγουν μονοκλωνική ανοσοσφαιρίνη. Το ΠΜ ανήκει στις πλασματοκυτταρικές δυσκρασίες από τις οποίες διαφοροποιείται μεταξύ άλλων λόγω εμφάνισης συγκεκριμένων κλινικών εκδηλώσεων, όπως η νεφρική ανεπάρκεια και οι οστεολυτικές βλάβες.

Η ενσωμάτωση νέων φαρμάκων στη θεραπευτική διαχείριση των ασθενών με ΠΜ, όπως οι ανοσοτροποποιητές (π.χ. λεναλιδομίδη, πομαλιδομίδη), οι αναστολείς πρωτεασώματος (π.χ. Bortezomib, Carfilzomib, Ixazomib) και τα μονοκλωνικά αντισώματα (π.χ. Daratumumab) έχει οδηγήσει σε αυξημένα ποσοστά επιβίωσης των ασθενών σε σχέση με παλαιότερα. Τα σύγχρονα θεραπευτικά πρωτόκολλα είναι συνδυαστικά, περισσότερο αποτελεσματικά και λιγότερο τοξικά για τον οργανισμό, με αποτέλεσμα περίπου το 80% των νεοδιαγνωσθέντων ασθενών με ΠΜ να επιτυγχάνει πλήρη απόκριση στη θεραπεία (Landgren & Iskander, 2017). Πλέον, η αξιολόγηση της απόκρισης στη θεραπεία γίνεται με αυστηρά κριτήρια που εφαρμόζονται σε ευρεία κλίμακα (IMWG, 2011). Ένα από αυτά είναι η ανίχνευση της Ελάχιστης Υπολειπόμενης Νόσου (EYN) με μεθόδους υψηλής ευαισθησίας, όπως η Πολυπαραμετρική Κυτταρομετρία Ροής (ΠΚΡ), η οποία επιτρέπει την ποσοτική εκτίμηση της EYN σε επίπεδα της τάξης του 10^{-5} με 10^{-6} . Μάλιστα, η αρνητικότητα στην EYN είναι ένας από τους ισχυρότερους προγνωστικούς βιοδείκτες, καθώς έχει συσχετιστεί με αυξημένη επιβίωση ελεύθερη προόδου της νόσου (Munshi *et al.*, 2017, Landgren *et al.*, 2018).

Παρά την αύξηση στα ποσοστά επιβίωσης που έχουν επιφέρει οι νέες θεραπευτικές προσεγγίσεις, το ΠΜ παραμένει μια ανίατη νόσος και οι περισσότεροι ασθενείς υποτροπιάζουν. Συνεπώς, είναι επιτακτική ανάγκη να βρεθούν θεραπευτικοί παράγοντες που θα στοχεύουν όχι μόνο τον ίδιο τον παθολογικό κλώνο πλασματοκυττάρων, αλλά και το μικροπεριβάλλον του μυελού, το οποίο υποστηρίζει την ανάπτυξη και την κλωνική επέκταση των μυελωματικών πλασματοκυττάρων.

Αρκετές μελέτες έχουν δείξει ότι σε ασθενείς με ΠΜ το μικροπεριβάλλον του μυελού των οστών εμφανίζει αυξημένα ποσοστά ανοσοκατασταλτικών κυτταρικών πληθυσμών, όπως τα κατασταλτικά κύτταρα μυελοειδούς σειράς (Myeloid Derived Suppressor Cells, MDSCs) (Ramachandran *et al.*, 2013) και τα κύτταρα T_H17 (Prabhala *et al.*, 2010). Αντίθετα, δεν υπάρχουν ακόμη σαφή δεδομένα για τη συχνότητα των ρυθμιστικών T λεμφοκυττάρων (Tregs) στο μικροπεριβάλλον του μυελού των οστών ασθενών με ΠΜ, όπως επίσης παραμένει αδιευκρίνιστος ο ρόλος των συγκεκριμένων κυττάρων στην παθοφυσιολογία και στην εξέλιξη της νόσου. Τα Tregs αποτελούν έναν από τους πιο σημαντικούς υποπληθυσμούς κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος με κατασταλτική και ανοσορρυθμιστική λειτουργία. Στο

συγκεκριμένο υποπληθυσμό έχει αποδοθεί διττός ρόλος όσον αφορά στη συμμετοχή του στα κακοήγη νεοπλάσματα, καθώς η παρουσία Tregs στο μικροπεριβάλλον του όγκου έχει συσχετιστεί και με κακή αλλά και με βελτιωμένη πρόγνωση, ανάλογα με την περίπτωση (Whiteside, 2012). Ο διττός ρόλος αφορά στην ικανότητα που έχουν τα Tregs αφ' ενός να καταστέλλουν τις δραστικές T λεμφοκυτταρικές ανοσοαποκρίσεις έναντι του όγκου και αφ' ετέρου να περιχαράκωνουν και εν τέλει να μετριάζουν μια φλεγμονώδη απόκριση, ώστε να προληφθεί η πρόκληση ιστικής βλάβης. Ωστόσο, ο ρόλος τους στο ΠΜ και στη γενικότερη δυσλειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος που χαρακτηρίζει αυτή τη νόσο δεν έχει αποσαφηνιστεί ακόμη. Μάλιστα, υπάρχουν αντικρουόμενες μελέτες για τη συχνότητα των Tregs στο περιφερικό αίμα ασθενών με ΠΜ (Prabhala *et al.*, 2006, Gupta *et al.*, 2011).

Σκοπός της συγκεκριμένης εργασίας ήταν η ανάπτυξη μεθόδου με χρήση ΠΚΡ, η οποία επιτρέπει την εκτίμηση των επιπέδων και τη μελέτη της λειτουργικότητας των Tregs στο μυελό των οστών και στο περιφερικό αίμα EYN⁺ και EYN⁻ ασθενών με ΠΜ.

Για το λόγο αυτό, πραγματοποιήθηκε συλλογή δειγμάτων μυελού των οστών και περιφερικού αίματος ασθενών με ΠΜ από την Πανεπιστημιακή Αιματολογική-Ογκολογική Κλινική του Γ.Ν.Α. «Αλεξάνδρα». Χρησιμοποιήθηκαν δείγματα από ασθενείς που βρίσκονταν σε κλινική ύφεση μετά από θεραπεία και, για λόγους αντιπαραβολής, αναλύθηκαν και δείγματα νεοδιαγνωσθέντων ασθενών. Τα δείγματα αναλύθηκαν με ΠΚΡ χρησιμοποιώντας δύο συνδυασμούς φθορίζοντων αντισωμάτων, οι οποίοι περιελάμβαναν επιφανειακούς και ενδοκυττάρους αντιγονικούς δείκτες για την ταυτοποίηση των Tregs (CD3, CD4, CD25, FoxP3, CD127), αλλά και αντιγονικούς δείκτες πληροφοριακούς για την κατάσταση ενεργοποίησης των Tregs (Ki67, CD45RA, CD45RO) και το κατασταλτικό τους προφίλ (CD39, HLA-DR, CTLA-4). Παράλληλα με τη μελέτη των Tregs, στο εργαστήριό μας πραγματοποιήθηκε και η ανίχνευση της EYN με ΠΚΡ στους ασθενείς σε CR, ενώ στην περίπτωση των νεοδιαγνωσθέντων ασθενών έγινε πλήρης ανοσοφαινοτυπικός χαρακτηρισμός των μυελωματικών πλασματοκυττάρων.

Η αρχική υπόθεση που πραγματοποιήσαμε είναι ότι στους EYN⁺ ασθενείς, οι οποίοι χαρακτηρίζονται από την παρουσία ενός μικρού πληθυσμού παθολογικών πλασματοκυττάρων στο μυελό των οστών, είναι πιθανότερο να είναι αυξημένα τα επίπεδα των Tregs στο μυελό των οστών, ίσως και στο περιφερικό αίμα, έτσι ώστε η επαγόμενη από τα Tregs ανοσοκαταστολή θα μπορούσε πιθανά να διευκολύνει τη διαφυγή των μυελωματικών κυττάρων από τον έλεγχο του ανοσοποιητικού συστήματος. Αντίθετα, στους EYN⁻ ασθενείς θα αναμένονταν χαμηλότερα ποσοστά Tregs, στο μυελό των οστών πιθανά και στο περιφερικό αίμα, καθώς ο παθολογικός

κλώνος πλασματοκυττάρων στο μυελό των οστών είναι σε μη ανιχνεύσιμα επίπεδα, δηλ. κάτω από το επίπεδο ευαισθησίας της μεθόδου που χρησιμοποιούμε.

Προσδιορίζοντας τα ποσοστά των Tregs στο σύνολο των $CD4^+$ T λεμφοκυττάρων με βάση το φαινότυπο $CD3^+CD4^+CD25^{hi}FoxP3^+$ και το φαινότυπο $CD3^+CD4^+CD25^{hi}FoxP3^+CD127^{lo}$ φάνηκε ότι η συγκεκριμένη αρχική υπόθεση δεν ισχύει, καθώς τα υψηλότερα ποσοστά Tregs όπως τα ταυτοποιήσαμε με βάση και τους δύο φαινοτύπους, καταγράφηκαν στους EYN⁻ ασθενείς. Συγχρόνως, παρατηρήσαμε ότι οι νεοδιαγνωσθέντες ασθενείς χαρακτηρίζονται από υψηλότερα ποσοστά Tregs επί των $CD4^+$ T λεμφοκυττάρων στο περιφερικό αίμα σε σχέση με το μυελό των οστών, ενώ στους EYN⁺ και EYN⁻ παρατηρείται η αντίστροφη εικόνα. Το γεγονός αυτό υποδεικνύει ότι ίσως οι φαρμακευτικοί παράγοντες που χρησιμοποιούνται στα θεραπευτικά πρωτόκολλα να μεταβάλλουν άμεσα ή έμμεσα το πρότυπο μετανάστευσης και αγκυροβόλησης των Tregs από το περιφερικό αίμα προς το μυελό των οστών ή αντίστροφα. Συγκεκριμένα, είναι πιθανό μετά τη θεραπεία και την εξάλειψη του μεγαλύτερου αριθμού των παθολογικών πλασματοκυττάρων, τα Tregs να είναι «ελεύθερα» να επανεποικίσουν το μικροπεριβάλλον του μυελού των οστών, όπως έχει φανεί ότι συμβαίνει μετά από αυτόλογη μεταμόσχευση αιμοποιητικών βλαστοκυττάρων σε ασθενείς με PIM (Atanackovic *et al.*, 2008).

Η ποσοστιαία έκφραση των Tregs όπως ταυτοποιήθηκαν με βάση και τους δύο φαινοτύπους ως προς το σύνολο των εμπύρηνων κυττάρων του αναλυθέντος δείγματος έδειξε ότι τα Tregs υπερέχουν αριθμητικά στο περιφερικό αίμα συγκριτικά με το μυελό των οστών και στις τρεις ομάδες ασθενών (νεοδιαγνωσθέντες, EYN⁺, EYN⁻) που εξετάσαμε. Το εύρημα αυτό είναι σύμφωνο με βιβλιογραφικά δεδομένα σύμφωνα με τα οποία εξαιτίας της αύξησης στη συγκέντρωση των κυτταροκινών TGF- β και IL-6 στο μυελό των οστών, επάγεται η μειорύθμιση του μεταγραφικού παράγοντα FoxP3 και η απώλεια του χαρακτηριστικού για τα Tregs φαινοτύπου (Gao *et al.*, 2012), γεγονός που ευνοεί τη διαφοροποίηση των $CD4^+$ T λεμφοκυττάρων προς T_H17 κύτταρα σε βάρος των Tregs (Mucida *et al.*, 2007).

Εκτός από τον % ποσοτικό προσδιορισμό των επιπέδων των Tregs πραγματοποιήθηκε μελέτη της έκφρασης και μεμονωμένων αντιγονικών δεικτών στα $CD3^+CD4^+CD25^{hi}FoxP3^+$ Tregs των τριών ομάδων ασθενών. Οι διαφορές που παρατηρήθηκαν αφορούν στους αντιγονικούς δείκτες CD45RA, CD45RO και CD39. Τα Tregs των ασθενών που ήταν σε πλήρη κλινική ύφεση μετά από θεραπεία ήταν σε ποσοστό περίπου 90% $CD45RO^+$ σε σχέση με τους νεοδιαγνωσθέντες ασθενείς, οι οποίοι εμφάνιζαν περίπου 80% $CD45RO^+$ Tregs. Και τα δύο αυτά αυξημένα ποσοστά επιβεβαιώνονται από την υπάρχουσα βιβλιογραφία σύμφωνα με την οποία τα $CD4^+CD25^+$ Tregs σε ποσοστό περίπου 90% εκφράζουν το δείκτη $CD45RO^+$ (Taams *et al.*, 2001), που σημαίνει ότι έχει μεσολαβήσει ενεργοποίηση των συγκεκριμένων κυττάρων

και αυτά πλέον έχουν αποκτήσει ένα φαινότυπο κυττάρων μνήμης, κύτταρα που συνήθως βρίσκονται στη φάση G_0 του κυτταρικού κύκλου. Η τελευταία υπόθεση, μάλιστα, επιβεβαιώνεται από τα αποτελέσματά μας σχετικά με την έκφραση του δείκτη κυτταρικού πολλαπλασιασμού Ki67 στα Tregs, η οποία χαρακτηρίζεται εξαιρετικά χαμηλή και στις τρεις ομάδες ασθενών. Η ενδοπυρηνική πρωτεΐνη Ki67 εκφράζεται σε υψηλά ποσοστά κατά τις τρεις φάσεις του κυτταρικού κύκλου G_1 , S και G_2/M , ενώ κατά τη φάση G_0 το συγκεκριμένο μόριο δεν εκφράζεται. Τέλος, συγκριτικά με τους νεοδιαγνωσθέντες ασθενείς και τους EYN⁻ ασθενείς, στους EYN⁺ ασθενείς παρατηρήθηκαν αυξημένα ποσοστά έκφρασης του εκτοενζύμου CD39, που είναι υπεύθυνο για την υδρόλυση ADP και ATP προς σχηματισμό αδενοσίνης, η οποία είναι γνωστό ότι δρα ανοσοκατασταλτικά (Deaglio *et al.*, 2007). Είναι πιθανό, λοιπόν, τα Tregs αυτών των ασθενών, νεοδιαγνωσθέντων και EYN⁺, να εμφανίζουν ισχυρότερο ανοσοκατασταλτικό φαινότυπο, διευκολύνοντας την ανοσοδιαφυγή των μυελωματικών κυττάρων, παρά το γεγονός ότι σε απόλυτους αριθμούς δεν παρουσιάζουν αριθμητική αύξηση.

Η στατιστική ανάλυση των διαφορών μεταξύ των βιολογικών υλικών, δηλ. μυελού των οστών και περιφερικού αίματος, αλλά και των τριών ομάδων ασθενών που μελετήσαμε, δηλ. νεοδιαγνωσθέντων, EYN⁺ και EYN⁻, δεν κατέδειξε κάποια στατιστική σημαντικότητα στο επίπεδο του 95%. Αυτό πιθανότατα οφείλεται στο μικρό αριθμό δειγμάτων που αναλύθηκαν, αλλά και στην έντονη διακύμανση που υπήρχε στα δείγματα εντός κάθε ομάδας. Πιθανά επίσης να οφείλεται και στις διαφορετικές θεραπευτικές προσεγγίσεις που ακολουθήθηκαν στους ασθενείς της μελέτης μας (πχ. ASCT, VRd) προκειμένου να επιτύχουν πλήρη απόκριση για διάστημα ≥ 2 ετών. Επιπλέον θα πρέπει να συνυπολογιστεί ότι, παρότι τα Tregs συνιστούν ποσοστό λιγότερο του 5% στο σύνολο των CD4⁺ T λεμφοκυττάρων, η συχνότητά τους παρουσιάζει μεγάλες διαφοροποιήσεις από ασθενή σε ασθενή. Συγχρόνως, η απουσία δειγμάτων μυελού των οστών από υγιείς δότες καθιστά δυσκολότερη τη σύγκριση των ποσοστών των Tregs και την εξαγωγή ασφαλών συμπερασμάτων για το ρόλο των συγκεκριμένων κυττάρων στην παθοφυσιολογία του ΠΜ.

Μελλοντικός μας στόχος είναι η ανάλυση περισσότερων δειγμάτων ασθενών με ΠΜ και από τις τρεις ομάδες ασθενών, καθώς και από ασθενείς που εμφανίζουν πρόδρομες μορφές ΠΜ, όπως η Μονοκλωνική Γαμμαπάθεια Αδιευκρίνιστης Σημασίας (MGUS) και το Ασυμπτωματικό ΠΜ (sMM). Με αυτόν τον τρόπο θα μπορέσουμε να μελετήσουμε την πιθανή συμμετοχή των Tregs στην εξέλιξη της νόσου από το ασυμπτωματικό στάδιο προς ΠΜ. Ακόμη, στοχεύουμε σε περαιτέρω ανάλυση των Tregs σε υποπληθυσμούς αξιοποιώντας στο μέγιστο τις δυνατότητες των γεγονότων που συλλέξαμε με τους δύο συνδυασμούς οκταχρωμίας που σχεδιάσαμε. Επιπλέον, θα ήταν υποβοηθητικό να γίνει μέτρηση των επιπέδων αδενοσίνης στο μυελό των

οστών για να επιβεβαιωθούν τα αποτελέσματα από τους EYN⁺ ασθενείς, οι οποίοι εμφάνισαν αύξηση στο ποσοστό των CD39⁺ Tregs. Τέλος, παράλληλα με τα Tregs σκοπεύουμε να μελετήσουμε περισσότερους ανοσοκατασταλτικούς πληθυσμούς, όπως τα MDSCs και τα T_H17 κύτταρα, με σκοπό να διερευνηθεί το μικροπεριβάλλον του μυελού, το οποίο συμβάλλει στην ανοσοδιαφυγή των μυελωματικών πλασματοκυττάρων. Με αυτόν τον τρόπο, ελπίζουμε να ανοίξουμε το δρόμο για την ανεύρεση νέων στόχων ανοσοθεραπείας για τους ασθενείς με ΠΜ.

Βιβλιογραφία

- Arroz, M., Came, N., Lin, P., et al. (2016). Consensus guidelines on plasma cell myeloma minimal residual disease analysis and reporting. *Cytometry B Clin Cytom.* 2016 Jan;90(1):31-9.
- Atanackovic, D., Cao, Y., Luetkens, T., et al. (2008). CD4+CD25+FOXP3+ T regulatory cells reconstitute and accumulate in the bone marrow of patients with multiple myeloma following allogeneic stem cell transplantation. *Haematologica.* 2008 Mar;93(3):423-30.
- Attal, M., Harousseau, J. L., Stoppa, A. M., et al. (1996). A prospective, randomized trial of autologous bone marrow transplantation and chemotherapy in multiple myeloma. Intergroupe Français du Myélome. *N Engl J Med.* 1996 Jul 11;335(2):91-7.
- Badoual, C., Hans, S., Rodriguez, J., et al. (2006). Prognostic Value of Tumor-Infiltrating CD4+ T-Cell Subpopulations in Head and Neck Cancers. *Clin Cancer Res.* 2006 Jan 15;12(2):465-72.
- Bennett, C. L., & Ochs, H. D. (2001). IPEX is a unique X-linked syndrome characterized by immune dysfunction , polyendocrinopathy, enteropathy, and a variety of autoimmune phenomena. *Curr Opin Pediatr.* 2001 Dec;13(6):533-8.
- Borsellino, G., Kleinewietfeld, M., Mitri, D. Di., et al. (2007). Expression of ectonucleotidase CD39 by Foxp3+ Treg cells: hydrolysis of extracellular ATP and immune suppression. *Blood.* 2007 Aug 15;110(4):1225-32.
- Brenner, H., Gondos, A., Pulte, D. (2008). Recent major improvement in long-term survival of younger patients with multiple myeloma. *Blood.* 2008 Mar 1;111(5):2521-6.
- Brimnes, M. K., Vangsted, A. J., Knudsen, L. M. (2010). Increased level of both CD4+FOXP3+ Regulatory T Cells and CD14+HLA-DR^{-low} myeloid-derived suppressor cells and decreased level of dendritic cells in patients with multiple myeloma. *Scand J Immunol.* 2010 Dec;72(6):540-7.
- Campana, D., Suzuki, T., Todisco, E., Kitanaka, A. (2000). CD38 in Hematopoiesis. *Chem Immunol.* 2000;75:169-88.
- Chen, L., & Flies, D. B. (2013). Molecular mechanisms of T cell co-stimulation and co-inhibition. *Nat Rev Immunol.* 2013 Apr;13(4):227-42.

Collison, L. W., Workman, C. J., Kuo, T. T., et al. (2007). The inhibitory cytokine IL-35 contributes to regulatory T-cell function. *Nature*. 2007 Nov 22;450(7169):566-9.

Corthay, A. (2006). A three-cell model for activation of naïve T helper cells. *Scand J Immunol*. 2006 Aug;64(2):93-6.

Curiel, T. J., Coukos, G., Zou, L., et al. (2004). Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. *Nat Med*. 2004 Sep;10(9):942-9.

Curroto de Lafaille, M. A., & Lafaille, J. J. (2009). Review Natural and Adaptive Foxp3 + Regulatory T Cells: More of the Same or a Division of Labor? *Immunity*. 2009 May;30(5):626-35.

Danke, N. A., Koelle, D. M., Yee, C., et al. (2004). Autoreactive T Cells in Healthy Individuals. *J Immunol*. 2004 May 15;172(10):5967-72.

Deaglio, S., Dwyer, K. M., Gao, W., et al. (2007). Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression. *J Exp Med*. 2007 Jun 11;204(6):1257-65.

Deng, L., Zhang, H., Luan, Y., et al. (2010). Accumulation of Foxp3+ T Regulatory Cells in Draining Lymph Nodes Correlates with Disease Progression and Immune Suppression in Colorectal Cancer Patients. *Clin Cancer Res*. 2010 Aug 15;16(16):4105-12.

Durie, B. G., Hoering, A., Abidi, M. H., et al. (2017). Bortezomib with lenalidomide and dexamethasone versus lenalidomide and dexamethasone alone in patients with newly diagnosed myeloma without intent for immediate autologous stem-cell transplant (SWOG S0777): a randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet*. 2017 Feb 4;389(10068):519-527.

Fallarino, F., Grohmann, U., Hwang, K. W., et al. (2003). Modulation of tryptophan catabolism by regulatory T cells. *Nat Immunol*. 2003 Dec;4(12):1206-12.

Farinha, P., Al-Tourah, A., Gill, K., et al. (2010). The architectural pattern of FOXP3-positive T cells in follicular lymphoma is an independent predictor of survival and histologic transformation. *Blood*. 2010 Jan 14;115(2):289-95.

- Feyler, S., von Lilienfeld-Toal, M., Jarmin, S., et al. (2009). CD4(+)CD25(+)FoxP3(+) regulatory T cells are increased whilst CD3(+)CD4(-)CD8(-)alpha-betaTCR(+) Double Negative T cells are decreased in the peripheral blood of patients with multiple myeloma which correlates with disease burden. *Br J Haematol.* 2009 Mar;144(5):686-95.
- Flores-Montero, J., de Tute, R., Paiva, B., et al. (2016). Immunophenotype of normal vs. myeloma plasma cells: Toward antibody panel specifications for MRD detection in multiple myeloma. *Cytometry B Clin Cytom.* 2016 Jan;90(1):61-72.
- Foglietta, M., Castella, B., Mariani, S., et al. (2014). The bone marrow of myeloma patients is steadily inhabited by a normal-sized pool of functional regulatory T cells irrespective of the disease status. *Haematologica.* 2014 Oct;99(10):1605-10.
- Fontenot, J. D., Gavin, M. A., Rudensky, A. Y. (2003). Foxp3 programs the development and function of CD4 + CD25 + regulatory T cells. *Nat Immunol.* 2003 Apr;4(4):330-6.
- Galtseva, Y O, Davydova, I. V., Kapranov, N.M., et al. (2017). Minimal residual disease in multiple myeloma : Benefits of flow cytometry. *Int J Lab Hematol.* 2018 Feb;40(1):12-20.
- Gao, Z., Gao, Y., Li, Z., et al. (2012). Synergy between IL-6 and TGF- β signaling promotes FOXP3 degradation. *Int J Clin Exp Pathol.* 2012;5(7):626-33.
- Gondek, D. C., Lu, L.F., Quezada, S. A., et al. (2005). Cutting Edge: Contact-Mediated Suppression by CD4+CD25+ Regulatory Cells Involves a Granzyme B-Dependent, Perforin-Independent Mechanism. *J Immunol.* 2005 Feb 15;174(4):1783-6.
- Gratz, I. K., & Campbell, D. J. (2014). Organ-specific and memoryTreg cells : specificity , development , function , and maintenance. *Front Immunol.* 2014 Jul 15;5:333.
- Grossman, W. J., Verbsky, J. W., Barchet, W., et al. (2004). Human T regulatory cells can use the perforin pathway to cause autologous target cell death. *Immunity.* 2004 Oct;21(4):589-601.
- Gupta, R., Ganeshan, P., Hakim, M., et al. (2011). Significantly reduced regulatory T cell population in patients with untreated multiple myeloma. *Leuk Res.* 2011 Jul;35(7):874-8.
- Hori, S., Nomura, T., Sakaguchi, S. (2003). Control of Regulatory T Cell Development by the transcription factor Foxp3. *Science.* 2003 Feb 14;299(5609):1057-61.

International Myeloma Working Group. Criteria for the classification of monoclonal gammopathies,multiple myeloma and related disorders: a report of the International Myeloma Working Group. *Br J Haematol.* 2003;121:749-757.

Klein, L., Kyewski, B., Allen, P. M., Hogquist, K. A. (2016). Positive and negative selection of the T cell repertoire: what thymocytes see and don't see. *Nat Rev Immunol.* 2014 Jun;14(6):377-91.

Kristinsson, S. Y., Anderson, W. F., Landgren, O. (2014). Improved long-term survival in multiple myeloma up to the age of 80 years. *Leukemia.* 2014 Jun;28(6):1346-8.

Kumar, S., Flinn, I., Richardson, P. G., et al. (2012). Randomized, multicenter, phase 2 study (EVOLUTION) of combinations of bortezomib, dexamethasone, cyclophosphamide, and lenalidomide in previously untreated multiple myeloma. *Blood.* 2012 May 10;119(19):4375-82.

Kumar, S. K., Rajkumar, V., Kyle, R. A., et al. (2017). Multiple myeloma. *Nat Rev Dis Primers.* 2017 Jul 20;3:17046.

Ladoire, S., Martin, F., Ghiringhelli, F. (2011). Prognostic role of FOXP3+ regulatory T cells infiltrating human carcinomas: The paradox of colorectal cancer. *Cancer Immunol Immunother.* 2011 Jul;60(7):909-18.

Landgren, O., & Iskander, K. (2017). Modern multiple myeloma therapy: deep, sustained treatment response and good clinical outcomes. *J Intern Med.* 2017 Apr;281(4):365-382.

Landgren, O., Lu, S. X., Hultcrantz, M. (2018). MRD testing in multiple myeloma: the main future driver for modern tailored treatment. *Semin Hematol.* 2018 Jan;55(1):44-50.

Laronne-Bar-On, A., Zipori, D., Haran-Ghera, N. (2008). Increased regulatory versus effector T cell development is associated with thymus atrophy in mouse models of multiple myeloma. *J Immunol.* 2008 Sep 1;181(5):3714-24.

Lenschow, D. J., Walunas, T. L., Jeffrey, J. A. (1996). CD28 / B7 System of T Cell costimulation. *Annu Rev Immunol.* 1996;14:233-58.

Liang, B., Workman, C., Lee, J.,et al. (2008). Regulatory T Cells Inhibit Dendritic Cells by Lymphocyte Activation Gene-3 Engagement of MHC Class II. *J Immunol.* 2008 May 1;180(9):5916-26.

- Lim, H. W., Hillsamer, P., Banham, A. H., Kim, C. H. (2005). Cutting Edge: Direct Suppression of B Cells by CD4+CD25+ Regulatory T Cells. *J Immunol.* 2005 Oct 1;175(7):4180-3.
- Liu, J., Liu, C., Wei, H. 2013. Fluorophores and Their Applications as Molecular Probes in Living Cells. *Curr Org Chem.* 2013 Mar 17(6):564-579.
- Martinez-Lopez, J., Lahuerta, J. J., Pepin, F., et al. (2014). Prognostic value of deep sequencing method for minimal residual disease detection in multiple myeloma. *Blood.* 2014 May 15;123(20):3073-9.
- Meng, X., Yang, J., Dong, M., et al. (2016). Regulatory T cells in cardiovascular diseases. *Nat Rev Cardiol.* 2016 Mar;13(3):167-79.
- Misra, N., Bayry, J., Lacroix-Desmazes, S., et al. (2004). Cutting Edge: Human CD4+CD25+ T Cells Restrain the Maturation and Antigen-Presenting Function of Dendritic Cells. *J Immunol.* 2004 Apr 15;172(8):4676-80.
- Mougiakakos, D., Choudhury, A., Lladser, A., et al. (2010). Regulatory T cells in cancer. *Adv Cancer Res.* 2010;107:57-117.
- Mucida, D., Park, Y., Kim, G., et al. (2007). Reciprocal TH17 and regulatory T cell differentiation mediated by retinoic acid. *Science.* 2007 Jul 13;317(5835):256-60.
- Munshi, N. C., Avet-Loiseau, H., Rawstron, A. C., et al. (2017). Association of Minimal Residual Disease With Superior Survival Outcomes in Patients With Multiple Myeloma: A Meta-analysis. *JAMA Oncol.* 2017 Jan 1;3(1):28-35.
- Ondondo, B., Jones, E., Godkin, A., Gallimore, A. (2013). Home sweet home: The tumor microenvironment as a haven for regulatory T cells. *Front Immunol.* 2013 Jul 16;4:197.
- Pacholczyk, R., & Kern, J. (2008). The T-cell receptor repertoire of regulatory T cells. *Immunology.* 2008 Dec;125(4):450-8.
- Paiva, B., Almeida, J., Perez-Andres, M., et al. (2010). Utility of flow cytometry immunophenotyping in multiple myeloma and other clonal plasma cell-related disorders. *Cytometry B Clin Cytom.* 2010 Jul;78(4):239-52.

- Paiva, B., Cervero, J., Mateo, G., Pe, J. J., Montalba, M. A., Sureda, A., ... Orfao, A. (2008). Multiparameter flow cytometric remission is the most relevant prognostic factor for multiple myeloma patients who undergo autologous stem cell transplantation. *Blood*. 2008 Nov 15;112(10):4017-23.
- Palumbo, A., & Anderson, K. (2011). Multiple Myeloma. *N Engl J Med*. 2011 Mar 17;364(11):1046-60.
- Pandiyan, P., Zheng, L., Ishihara, S., et al. (2007). CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells induce cytokine deprivation-mediated apoptosis of effector CD4+ T cells. *Nat Immunol*. 2007 Dec;8(12):1353-62.
- Plitas, G., & Rudensky, A. Y. (2016). Regulatory T Cells: Differentiation and Function. *Cancer Immunol Res*. 2016 Sep 2;4(9):721-5.
- Pojero, F., Casuccio, A., Parrino, M. F., et al. (2015). Old and new immunophenotypic markers in multiple myeloma for discrimination of responding and relapsing patients: The importance of “normal” residual plasma cell analysis. *Cytometry B Clin Cytom*. 2015 May-Jun;88(3):165-82.
- Prabhala, R. H., Neri, P., Bae, J. E., et al. (2006). Dysfunctional T regulatory cells in multiple myeloma. *Blood*. 2006 Jan 1;107(1):301-4.
- Prabhala, R. H., Pelluru, D., Fulciniti, M., et al. (2010). Elevated IL-17 produced by TH17 cells promotes myeloma cell growth and inhibits immune function in multiple myeloma. *Blood*. 2010 Jul 1;115(26):5385-92.
- Qureshi, O. S., Zheng, Y., Nakamura, K., et al. (2011). Trans-endocytosis of CD80 and CD86: a molecular basis for the cell-extrinsic function of CTLA-4. *Science*. 2011 Apr 29;332(6029):600-3.
- Ramachandran, I., Martner, A., Pisklakova, A., et al. (2013). Myeloid derived suppressor cells regulate growth of multiple myeloma by inhibiting T cells in bone marrow. *J Immunol*. 2013 Apr 1;190(7):3815-23.

- Rawstron, A. C., Orfao, A., Beksac, M., et al. (2008). Report of the European Myeloma Network on multiparametric flow cytometry in multiple myeloma and related disorders. *Haematologica*. 2008 Mar;93(3):431-8.
- Robillard, N., Wuillème, S., Moreau, P., Béné, M. C. (2014). Immunophenotype of normal and myelomatous plasma-cell subsets. *Front Immunol*. 2014 Mar 31;5:137.
- Rodríguez-Perea, A. L., Arcia, E. D., Rueda, C. M., Velilla, P. A. (2016). Phenotypical characterization of regulatory T cells in humans and rodents. *Clin Exp Immunol*. 2016 Sep;185(3):281-91.
- Roederer, M. (2002). Compensation in flow cytometry. *Curr Protoc Cytom*. 2002 Dec;Chapter 1:Unit 1.14.
- Russ, B. E., Prier, J. E., Rao, S., Turner, S. J. (2013). T cell immunity as a tool for studying epigenetic regulation of cellular differentiation. *Front Genet*. 2013 Nov 12;4:218.
- Sakaguchi, S., Sakaguchi, N., Asano, M. et al. (1995). Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol*. 1995 Aug 1;155(3):1151-64.
- Sakaguchi, S. (2004). Naturally arising CD4⁺ regulatory t cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses. *Annu Rev Immunol*. 2004;22:531-62.
- Schwartz, R. H. (2003). T cell anergy. *Annu Rev Immunol*. 2003;21:305-34.
- Starr, T. K., Jameson, S. C., Hogquist, K. A. (2003). Positive and negative selection of T cells. *Annu Rev Immunol*. 2003;21:139-76.
- Stetler-Stevenson, M., Paiva, B., Stoolman, L., et al. (2016). Consensus guidelines for myeloma minimal residual disease sample staining and data acquisition. *Cytometry B Clin Cytom*. 2016 Jan;90(1):26-30.
- Strauss, L., Bergmann, C., Whiteside, T. L. (2009). Human Circulating Human circulating CD4⁺CD25^{high}Foxp3⁺ regulatory T cells kill autologous CD8⁺ but not CD4⁺ responder cells by Fas-mediated apoptosis. *J Immunol*. 2009 Feb 1;182(3):1469-80.

Taams, L. S., Smith, J., Rustin, M. H., et al. (2001). Human anergic/suppressive CD4(+)CD25(+) T cells: a highly differentiated and apoptosis-prone population. *Eur J Immunol.* 2001 Apr;31(4):1122-31.

Thornton, A. M., & Shevach, E. M. (1998). CD4+CD25+ immunoregulatory T cells suppress polyclonal T cell activation in vitro by inhibiting interleukin 2 production. *J Exp Med.* 1998 Jul 20;188(2):287-96.

Tzankov, A., Meier, C., Hirschmann, P., et al. (2008). Correlation of high numbers of intratumoral FOXP3+ regulatory T cells with improved survival in germinal center-like diffuse large B-cell lymphoma, follicular lymphoma and classical Hodgkin's lymphoma. *Haematologica.* 2008 Feb;93(2):193-200.

Walker, M. R., Kasproicz, D. J., Gersuk, V. H., et al. (2003). Induction of FoxP3 and acquisition of T regulatory activity by stimulated human CD4+CD25- T cells. *J Clin Invest.* 2003 Nov;112(9):1437-43.

Whiteside, T. L. (2012). What are regulatory T cells (Treg) regulating in cancer and why? *Semin Cancer Biol.* 2012 Aug;22(4):327-34.

Wijdenes, J., Vooijs, W., Clement, C., et al. (1996). A plasmocyte selective monoclonal antibody (B-B4) recognizes syndecan-1. *Br J Haematol.* 1996 Aug;94(2):318-23.

Wildin, R. S., Ramsdel, F., Peake, J., et al. (2001). X-linked neonatal diabetes mellitus, enteropathy and endocrinopathy syndrome is the human equivalent of mouse scurfy. *Nat Genet.* 2001 Jan;27(1):18-20.

Wolf, A. M., Wolf, D., Steurer, M., et al. (2003). Increase of regulatory T cells in the peripheral blood of cancer patients. *Clin Cancer Res.* 2003 Feb;9(2):606-12.

Zarek, P. E., Huang, C., Lutz, E. R., et al. (2008). A2A receptor signaling promotes peripheral tolerance by inducing T-cell anergy and the generation of adaptive regulatory T cells. *Blood.* 2008 Jan 1;111(1):251-9.

Zheng, Y., Josefowicz, S. Z., Kas, A., et al. (2007). Genome-wide analysis of Foxp3 target genes in developing and mature regulatory T cells. *Nature.* 2007 Feb 22;445(7130):936-40.

Περίληψεις

Ελληνική Περίληψη

Το Πολλαπλούν Μυέλωμα (ΠΜ) είναι μια ανίατη κακοήθεια που χαρακτηρίζεται από τον ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό παθολογικών πλασματοκυττάρων τα οποία διηθούν το μυελό των οστών και παράγουν περίσσεια μονοκλωνικής ανοσοσφαιρίνης. Τα νέα θεραπευτικά πρωτόκολλα που περιλαμβάνουν, μεταξύ άλλων, τη χρήση αναστολέων του πρωτεασώματος και ανοσοτροποποιητών επιτρέπουν την επίτευξη συμβατικής πλήρους απόκρισης (CR) στην πλειονότητα των ασθενών με ΠΜ. Ωστόσο, συχνά πολλοί ασθενείς υποτροπιάζουν μετά από τη θεραπεία. Για το λόγο αυτό, έχει ενοχοποιηθεί και το μικροπεριβάλλον του μυελού των οστών, το οποίο πιθανά δρα υποστηρικτικά συμβάλλοντας στην κλωνική επέκταση των μυελωματικών πλασματοκυττάρων. Πρόσφατες μελέτες της παθοφυσιολογίας του ΠΜ υποδεικνύουν την πιθανή συμμετοχή δύο ανοσοκατασταλτικών πληθυσμών, των TH17 λεμφοκυττάρων και των κατασταλτικών κυττάρων μυελοειδούς προέλευσης (MDSCs), τα οποία εμφανίζουν αυξημένα ποσοστά στο μυελό των οστών των ασθενών με ΠΜ. Παραδόξως, η μελέτη των ρυθμιστικών T λεμφοκυττάρων, τα οποία επίσης χαρακτηρίζονται από ισχυρή ανοσοκατασταλτική δραστηριότητα, δεν έχει καταδείξει σαφή συσχέτιση των συγκεκριμένων κυττάρων στην εμφάνιση και πρόοδο της νόσου. Σκοπός της συγκεκριμένης εργασίας ήταν η ανάπτυξη μεθόδου Πολυχρωματικής Κυτταρομετρίας Ροής (PKP) για τη μελέτη των επιπέδων και της λειτουργικότητας των Tregs στο μυελό των οστών και στο περιφερικό αίμα ασθενών με ΠΜ στους οποίους, μετά από θεραπεία, ανιχνεύουμε ελάχιστη υπολειπόμενη νόσο (EYN⁺) ή όχι (EYN⁻) στο μυελό των οστών τους. Για τις ανάγκες της συγκεκριμένης εργασίας έγινε φαινοτυπική ανάλυση των Tregs σε δείγματα περιφερικού αίματος και μυελού των οστών από 27 ασθενείς με ΠΜ. Τα δείγματα συλλέχθηκαν από την Αιματολογική-Ογκολογική Κλινική της Ιατρικής Σχολής του ΕΚΠΑ, Γ.Ν.Α. «Αλεξάνδρα». Για την πραγματοποίηση της φαινοτυπικής ανάλυσης των Tregs με PKP τα δείγματα και των δύο βιολογικών υλικών σημάνθηκαν με 12 φθορίζοντα αντισώματα χρησιμοποιώντας δύο διαφορετικούς συνδυασμούς οκταχρωμίας: CD3-FITC, CD4-APC/Cy7, CD25-APC, FoxP3-PE, CD8-PerCP/Cy5-5, Ki67-AmCyan, CD45RA-PE/Cy7, CD39-Pacific Blue, CD45RO-PerCP/Cy5-5, CTLA-4-Pacific Blue, CD127-AmCyan, HLADR-PE/Cy7. Παράλληλα με τη φαινοτυπική ανάλυση των Tregs, στα δείγματα μυελού των οστών και περιφερικού αίματος νεοδιαγνωσθέντων ασθενών έγινε ταυτοποίηση του υποτύπου της παραπρωτεΐνης, όπου αυτό ήταν εφικτό, ενώ οι ασθενείς που βρίσκονταν σε πλήρη κλινική ύφεση μετά από θεραπεία, κατηγοριοποιήθηκαν ανάλογα με την εμφάνιση ή όχι EYN στα δείγματα μυελού των οστών με τη χρήση PKP. Με βάση τα

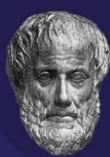
παραπάνω έγινε (%) ποσοτικός προσδιορισμός των επιπέδων των Tregs και μελέτη της λειτουργικότητάς τους ξεχωριστά σε τρεις ομάδες ασθενών: α) νεοδιαγνωσθέντες ασθενείς, β) EYN⁺ ασθενείς και γ) EYN⁻ ασθενείς. Σύμφωνα με τα αποτελέσματά μας, τα Tregs υπερέχουν αριθμητικά στο περιφερικό αίμα συγκριτικά με το μυελό των οστών και στις τρεις ομάδες ασθενών (νεοδιαγνωσθέντες, EYN⁺, EYN⁻) που εξετάσαμε, ενώ οι EYN⁻ ασθενείς εμφάνισαν τα υψηλότερα ποσοστά CD3⁺CD4⁺CD25^{hi}FoxP3⁺ Tregs και CD3⁺CD4⁺CD25^{hi}FoxP3⁺CD127^{lo} Tregs τόσο στο σύνολο των CD4⁺ T λεμφοκυττάρων όσο και στο σύνολο των εμπύρηνων κυττάρων για κάθε αναλυθέν δείγμα. Παράλληλα, οι νεοδιαγνωσθέντες ασθενείς χαρακτηρίζονταν από υψηλότερα ποσοστά Tregs επί των CD4⁺ T λεμφοκυττάρων στο περιφερικό αίμα σε σχέση με το μυελό των οστών, ενώ στους EYN⁺ και EYN⁻ παρατηρήθηκε η αντίστροφη εικόνα. Όσον αφορά τη μελέτη του λειτουργικού προφίλ των CD3⁺CD4⁺CD25^{hi}FoxP3⁺ Tregs, δεν παρατηρήθηκαν διαφορές στην έκφραση των αντιγονικών δεικτών που μελετήσαμε μεταξύ μυελού των οστών και περιφερικού αίματος ανά ομάδα ασθενών, ωστόσο οι EYN⁺ ασθενείς εμφάνισαν υψηλότερα ποσοστά CD39⁺ Tregs. Τα παραπάνω αποτελέσματα αποτελούν μια πρώτη ένδειξη ότι τα Tregs των EYN⁺ ασθενών πιθανά εμφανίζουν ισχυρότερα ανοσοκατασταλτικό φαινότυπο, διευκολύνοντας την ανοσοδιαφυγή των μυελωματικών κυττάρων, παρά το γεγονός ότι σε απόλυτους αριθμούς δεν παρουσιάζουν αριθμητική αύξηση. Ακόμη, είναι πιθανό οι φαρμακευτικοί παράγοντες που χρησιμοποιούνται στα θεραπευτικά πρωτόκολλα να μεταβάλλουν άμεσα ή έμμεσα το πρότυπο μετανάστευσης και αγκυροβόλησης των Tregs από το περιφερικό αίμα προς το μυελό των οστών ή αντίστροφα. Παρόλα αυτά, απαιτείται ανάλυση περισσότερων δειγμάτων για την αποσαφήνιση του ρόλου των Tregs στην παθοφυσιολογία του ΠΜ.

Αγγλική Περίληψη

Multiple Myeloma (MM) is an incurable malignancy characterized by the uncontrolled proliferation of aberrant plasma cells that infiltrate the bone marrow and overproduce abnormal immunoglobulin fragments. Modern therapeutic regimens that include proteasome inhibitors and immunomodulators allow for the achievement of a complete response (CR) in the majority of MM patients. Nevertheless, many patients often relapse after treatment. For this reason, the bone marrow microenvironment has also been implicated, due to its' potential supportive role in contributing to the clonal expansion of myeloma plasma cells. Recent studies on the pathophysiology of MM indicate a possible involvement of two immunosuppressive populations, TH17 lymphocytes and Myeloid Derived Suppressor Cells (MDSCs), which appear to be increased in the bone marrow of MM patients. Surprisingly, studies performed on regulatory T cells (Tregs), which exhibit potent immunosuppressive activity, have not yet demonstrated the correlation of these cells with disease onset and progression. The purpose of this project was to develop a method based on Multiparameter Flow Cytometry (MFC) to study the levels and functionality of Tregs in the bone marrow and peripheral blood of MM patients, including those with detectable levels of Minimal Residual Disease (MRD⁺) or not (MRD⁻) in their bone marrow. For this purpose, we performed immunophenotypic analysis of Tregs in peripheral blood and bone marrow samples from 27 MM patients. The samples were collected at the Department of Clinical Therapeutics, School of Medicine, University of Athens. In order to identify Tregs and study their functional profile, samples of both biologic materials were labeled with 12 fluorescent antibodies comprising two different 8-color panels: CD3-FITC, CD4-APC / Cy7, CD25-APC, FoxP3-PE, CD8- Cy5-5, Ki67-AmCyan, CD45RA-PE / Cy7, CD39-Pacific Blue, CD45RO-PerCP / Cy5-5, CTLA-4-Pacific Blue, CD127-AmCyan, HLADR-PE / Cy7. Along with Treg immunophenotyping, we identified the paraprotein subtype in newly diagnosed patients and assessed the MRD status with MFC in those MM patients that achieved CR after treatment, thus grouping the latter based on the presence or not of MRD in their bone marrow. Based on the above, we determined the (%) levels of Tregs and studied their functional profile separately in three groups of patients: a) newly diagnosed MM patients, b) MRD⁺ patients, and c) MRD⁻ patients. Our results revealed that in all three groups of patients (newly diagnosed, MRD⁺, MRD⁻) Tregs are numerically higher in the peripheral blood than in the bone marrow. Also, MRD⁻ patients displayed the highest CD3⁺CD4⁺CD25^{hi}FoxP3⁺ Tregs and CD3⁺CD4⁺CD25^{hi}FoxP3⁺CD127^{lo} Tregs, expressed as

separate percentages on gated CD4⁺ T cells and total nucleated cells. The group of newly diagnosed patients was characterized by higher Treg ratio on gated CD4⁺ T cells in the peripheral blood rather than in the bone marrow, whereas MRD⁺ and MRD⁻ patients displayed the opposite trend. Concerning the study of the functional profile of CD3⁺CD4⁺CD25^{hi}FoxP3⁺ Tregs there were no differences between bone marrow and peripheral blood in each group; however MRD⁺ patients showed higher rates of CD39⁺ Tregs. The above results suggest that Tregs in MRD⁺ patients, despite not showing an increase in absolute numbers, may have a stronger immunosuppressive phenotype, therefore facilitating the escape of myeloma cells from immunosurveillance. It is also possible that the drugs used in MM therapeutics directly or indirectly alter the migration capacity and anchoring pattern of Tregs from the peripheral blood to the bone marrow or *vice versa*. Nevertheless, more samples need to be analyzed in order to decipher the exact role of Tregs in the pathophysiology of MM.

Παράρτημα



Ελληνική Εταιρεία
Βιολογικών Επιστημών

40^ο

Επιστημονικό
Συνέδριο

24–26
Μαΐου
2018

Χώρος Τεχνών Δήμου Βέροιας
Παύλου Μελά και Μπιζανίου



Καταληκτική
ημερομηνία
υποβολής
περιλήψεων
**6 ΑΠΡΙΛΙΟΥ
2018**

Πληροφορίες:
conference2018.eebe.gr
info@eebe.gr

Υπό την αιγίδα των Πανεπιστημίων
Αθηνών, Θεσσαλονίκης, Θράκης, Πατρών & Θεσσαλίας

Συνδιοργάνωση με τον Δήμο Βέροιας



ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΤΩΝ ΕΠΙΠΕΔΩΝ ΤΩΝ ΡΥΘΜΙΣΤΙΚΩΝ Τ ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΩΝ ΚΑΙ ΤΩΝ ΚΑΤΑΣΤΑΛΤΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΜΥΕΛΟΕΙΔΟΥΣ ΠΡΟΕΛΕΥΣΗΣ ΜΕ ΠΟΛΥΠΑΡΑΓΟΝΤΙΚΗ ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΙΑ ΡΟΗΣ ΣΕ ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ ΠΟΛΛΑΠΛΟΥΝ ΜΥΕΛΩΜΑ

Βίτσος Παναγιώτης^{1*}, Πόθος Παναγιώτης^{1*}, Κωστόπουλος Ιωάννης¹, Ωρολογάς Νικόλαος³, Καστρίτης Ευστάθιος², Τέρπος Ευάγγελος², Δημόπουλος Μελέτιος-Αθανάσιος², Τσιτσιλώνη Ουρανία¹

¹Τομέας Φυσιολογίας Ζώων και Ανθρώπου, Τμήμα Βιολογίας και ²Θεραπευτική Κλινική, Ιατρική Σχολή, Εθνικό & Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, ³SafeBlood BioAnalytica AE, Αθήνα (*ισότιμη συμμετοχή)

Το πολλαπλούν μυέλωμα (ΠΜ) είναι αιματολογική κακοήθεια που χαρακτηρίζεται από διήθηση του μυελού των οστών από παθολογικά πλασματοκύτταρα. Παρότι το ΠΜ παραμένει ανίατη νόσος, νέα θεραπευτικά πρωτόκολλα επιτρέπουν την επίτευξη πλήρους ύφεσης (CR) στους ασθενείς για μεγάλα χρονικά διαστήματα. Μάλιστα, η εκτίμηση της ελάχιστης υπολειμματικής νόσου (MRD) ασθενών σε CR έχει πλέον ενσωματωθεί στην κλινική πράξη λόγω της υψηλής προγνωστικής και προβλεπτικής της αξίας. Η παθολογία του ΠΜ αφορά και στην καταστολή των χυμικών και Τ λεμφοκυτταρικών ανοσοαποκρίσεων, όπου πιθανό ρόλο ενδέχεται να διαδραματίζουν δύο ανοσοκατασταλτικοί πληθυσμοί, τα ρυθμιστικά Τ λεμφοκύτταρα (Tregs) και τα κατασταλτικά κύτταρα μυελοειδούς προέλευσης (MDSCs), οι οποίοι σύμφωνα με έρευνες είναι αυξημένοι στο μυελό των οστών ασθενών με ΠΜ. Σκοπός μας ήταν η ανάπτυξη μεθόδου πολυπαραγοντικής κυτταρομετρίας ροής για την εκτίμηση των επιπέδων των Tregs και MDSCs σε MRD-θετικούς ασθενείς με ΠΜ. Μονοπύρηννα περιφερικού αίματος υγιών δοτών σημάνθηκαν με τα ακόλουθα αντισώματα που συνιστούν δύο διαφορετικούς συνδυασμούς οκταχρωμίας: CD3-FITC, CD4-APC/Cy7, CD25-APC, FoxP3-PE, CD8-PerCP/Cy5-5, Ki67-AmCyan, CD45RA-PE/Cy7, CD39-Pacific Blue, CD45RO-PerCP/Cy5-5, CTLA-4-Pacific Blue, CD127-AmCyan, HLADR-PE/Cy7 για τα Tregs, και CD11b-PE/Cy7, CD14-FITC, CD15-APC, CD33-AmCyan, CD124-Pacific Blue, Lin-APC/Cy7, HLADR-PE, 7-AAD-PerCP/Cy5-5 για τα MDSCs. Αφού καταγράφηκε ικανοποιητικός αριθμός γεγονότων σε κυτταρόμετρο BD FACSCantoII ακολούθησε ανάλυση των δεδομένων με το ειδικό λογισμικό Infinicyt. Με ενιαία στρατηγική ομαδοποίησης των κυττάρων, ορίστηκαν ως Tregs τα κύτταρα με φαινότυπο CD3⁺CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ και έγινε επιμέρους ανάλυση σε 6 υποπληθυσμούς τους. Αντίστοιχα, αναλύθηκαν και 6 διαφορετικοί υποπληθυσμοί των MDSCs. Με τη χρήση των παραπάνω δεικτών, τα επίπεδα των υποπληθυσμών και των δύο τύπων κυττάρων είναι φαινοτυπικά διακριτά και μετρήσιμα τόσο σε δείγματα περιφερικού αίματος όσο και μυελού των οστών.

Χρηματοδότηση: ΕΟΠΕ, αρ. έργου 6954/2017

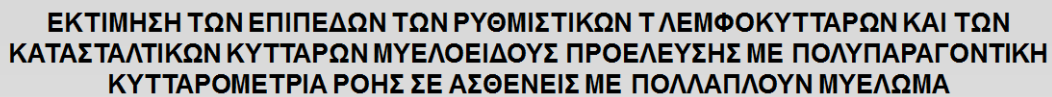
EVALUATING THE LEVELS OF REGULATORY T CELLS AND MYELOID-DERIVED SUPPRESSOR CELLS BY MULTIPARAMETER FLOW CYTOMETRY IN MULTIPLE MYELOMA PATIENTS

Vitsos Panagiotis^{1*}, Pothos Panagiotis^{1*}, Kostopoulos Ioannis¹, Orologas Nikolaos³, Kastritis Efstathios², Terpos Evangelos², Dimopoulos Meletios-Athanasios², Tsitsilonis Ourania¹

¹Section of Animal and Human Physiology, Department of Biology and ²Department of Clinical Therapeutics, School of Medicine, National and Kapodistrian University of Athens, ³SafeBlood BioAnalytica SA, Athens, (*equal contribution)

Multiple myeloma (MM) is a hematologic malignancy characterized by infiltration of the bone marrow by pathological plasma cells. Although MM remains an incurable disease, new therapeutic protocols achieve complete remission (CR) in patients for prolonged periods. Interestingly, the assessment of minimal residual disease (MRD) in patients in CR has now been incorporated into clinical practice due to its high prognostic and predictive value. Among others, MM pathology also involves the impairment of humoral and T cell immune responses. This could be linked to the activity of two immunosuppressive populations, regulatory T cells (Tregs) and myeloid-derived suppressor cells (MDSCs). According to research data, both Treg and MDSC numbers are increased in the bone marrow of patients with MM. Our aim was to develop a multiparameter flow cytometric method for determining the levels of Tregs and MDSCs in MRD-positive patients with MM. Healthy donor-derived peripheral blood mononuclear cells were isolated and subsequently labeled with the following antibodies constituting two different 8-color panels: CD3-FITC, CD4-APC/Cy7, CD25-APC, FoxP3-PE, CD8-PerCP/Cy5-5, Ki67-AmCyan, CD45RA-PE/Cy7, CD39-Pacific Blue, CD45RO-PerCP/Cy5-5, CTLA-4-Pacific Blue, CD127-AmCyan, HLADR-PE/Cy7 for Tregs, and CD11b-PE/Cy7, CD14-FITC, CD15-APC, CD33-AmCyan, CD124-Pacific Blue, Lin-APC/Cy7, HLADR-PE, 7-AAD-PerCP/Cy5-5 for MDSCs. Upon recording a sufficient number of events on a BD FACSCantoII flow cytometer, data analysis was carried out using the Infinicyt software. Following a unified gating strategy, cells with immunophenotype CD3⁺CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ were identified as Tregs and were further analyzed in 6 subpopulations. Similarly, 6 different subpopulations of MDSCs were analyzed. Using the aforementioned markers, the levels of the subpopulations of both cell types are phenotypically distinct and measurable in both peripheral blood and bone marrow samples.

Funding: HESMO, grant number 6954/2017



¹Τομέας Φυσιολογίας Ζώων και Ανθρώπου, Τμήμα Βιολογίας και ²Θεραπευτική Κλινική, Ιατρική Σχολή, Εθνικό & Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, ³SafeBlood BioAnalytica AE, Αθήνα (*ισότιμη συμμετοχή)

Το Πολλαπλούν Μυέλωμα (ΠΜ) είναι μια ανίατη αιματολογική κακοήθεια που οφείλεται στην παρουσία παθολογικών πλασματοκυττάρων. Νέες θεραπευτικές προσεγγίσεις έχουν παρατείνει την επιβίωση των ασθενών με ΠΜ και παράλληλα έχουν καταστήσει δυνατή την επίτευξη μακροχρόνιας πλήρους ύφεσης (CR). Μάλιστα, η εκτίμηση της Ελάχιστης Υπολειμματικής Νόσου (MRD) σε ασθενείς σε CR έχει ενσωματωθεί στην κλινική πράξη εξαιτίας της υψηλής προγνωστικής της αξίας. Το ΠΜ χαρακτηρίζεται από γενικότερη καταστολή δραστηριών ανοσοαποκρίσεων, η οποία πιθανώς σχετίζεται με το κατασταλτικό μικροπεριβάλλον του μυελού των οστών, όπου έχουν βρεθεί αυξημένα ποσοστά δύο ανοσοκατασταλτικών πληθυσμών, των ρυθμιστικών Τ λεμφοκυττάρων (Tregs) και των κατασταλτικών κυττάρων μυελοειδούς πρόέλευσης (MDSCs). Σκοπός μας ήταν η ανάπτυξη μεθόδου πολυπαραγοντικής καταρομετρίας ροής για την εκτίμηση των επιπέδων των Tregs και MDSCs σε ασθενείς με ΠΜ.

Δείγματα μυελού των οστών και περιφερικού αίματος από 17 ασθενείς με ΠΜ στη διάγνωση και σε πλήρη ύφεση, μετά από λύση των ερυθροκυττάρων, σημάνθηκαν με τους ακόλουθους συνδυασμούς αντισωμάτων:

Ανάλυση με
κυτταρομετρία ροής

Επεξεργασία των αποτελεσμάτων με το ειδικό λογισμικό Infinicyt (Cytognos)

Ολικός αριθμός γεννητών

Μονήρια κίττα

Λεμφοκύτταρα

Φανότοπος ρυθμιστικών Τ Λεμφοκυττάρων: $CD3^+CD4^+FoxP3^+$

Πολυπλασασαζόμενα Tregs

Ki67⁺ Tregs

Κατασταλτικά Tregs

CD39⁺ Tregs

Παρένεα Tregs

CD45RA⁺ Tregs

Ενεργοποιημένα Tregs

CD45RO⁺ Tregs

Κατασταλτικά Tregs

HLA-DR⁺ Tregs

Panel 1

Panel 2

CD3⁺CD4⁺ T Λεμφοκύτταρα

CD25-APC

FoxP3-PE

Group	Διάγνωση (Diagnosis)	MRD (+)	MRD (-)
Dep. APL	~2.8	~3.0	~4.5
Muc2Δ5	~2.8	~6.0	~5.0

MRD(+)

Μarker	Παρενέργειά αίμα (%)	Μυϊλός των οστών (%)
CD45RA	~10	~10
κλ87	~10	~10
CD39	~55	~50
CD45RO	~90	~90
CTL44	~10	~10
HLA-DR	~25	~15

MRD(-)

Μarker	Παρενέργειά αίμα (%)	Μυϊλός των οστών (%)
CD45RA	~5	~5
κλ87	~5	~5
CD39	~40	~45
CD45RO	~95	~95
CTL44	~15	~15
HLA-DR	~20	~20

- Αναπτύξαμε μια μέθοδο για την εκτίμηση των επιπέδων των ρυθμιστικών T λεμφοκυττάρων στο περιφερικό αίμα και το μυελό των οστών ασθενών με ΠΜ
- Μέχρι τώρα φαίνεται ότι οι ασθενείς που έχουν λάβει θεραπεία και είναι σε πλήρη ύφεση εμφανίζουν αυξημένα ποσοστά Tregs στο μυελό των οστών σε σχέση με το περιφερικό αίμα. Στους ασθενείς στη διάγνωση εμφανίζεται η αντίστροφη εικόνα, όπου τα Tregs είναι περισσότερα στο περιφερικό αίμα συγκριτικά με το μυελό των οστών.
- Η ανάλυση έδειξε ότι υπάρχουν διαφορές στην έκφραση ορισμένων δεικτών των Tregs, όπως για παράδειγμα στην έκφραση του δείκτη HLA-DR μεταξύ ασθενών στη διάγνωση και ασθενών σε πλήρη ύφεση και του δείκτη CD39 μεταξύ MRD(+) και MRD(-) ασθενών.
- Παρατηρήθηκαν διαφορές και στα αποτελέσματα για τα MDSCs μεταξύ ασθενών στη διάγνωση και ασθενών σε πλήρη ύφεση αν και απαιτείται περαιτέρω διερεύνηση λόγω περιορισμένου αριθμού δειγμάτων.
- Μελλοντικός στόχος είναι η ανάλυση περισσότερων δειγμάτων, ώστε να καθοριστούν με σαφήνεια οι υποπληθυσμοί των Tregs και των MDSCs και να αξιολογηθεί η κλινική τους σημασία.