



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

*ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ*

**ΜΕΛΕΤΗ ΜΟΝΟΚΥΤΤΑΡΩΣΗΣ ΜΕ ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΙΑ ΡΟΗΣ -  
ΑΝΟΣΟΦΑΙΝΟΤΥΠΟΣ ΧΡΟΝΙΑΣ ΜΥΕΛΟΜΟΝΟΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΛΕΥΧΑΙΜΙΑΣ  
(ΧΜΜΛ)**

**ΣΕΡΑΦΕΙΜ ΚΑΡΑΘΑΝΟΣ  
ΒΙΟΛΟΓΟΣ**

ΑΘΗΝΑ 2020



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

*ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ*

**ΜΕΛΕΤΗ ΜΟΝΟΚΥΤΤΑΡΩΣΗΣ ΜΕ ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΙΑ ΡΟΗΣ -  
ΑΝΟΣΟΦΑΙΝΟΤΥΠΟΣ ΧΡΟΝΙΑΣ ΜΥΕΛΟΜΟΝΟΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΛΕΥΧΑΙΜΙΑΣ  
(ΧΜΜΛ)**

ΣΕΡΑΦΕΙΜ ΚΑΡΑΘΑΝΟΣ  
ΒΙΟΛΟΓΟΣ

ΑΘΗΝΑ 2020



ΕΘΝΙΚΟ & ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ  
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ  
ΤΟΜΕΑΣ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ  
ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΜΟΝΑΔΑ IV

ΚΑΙ

Γ.Ν.Α. «Ο ΕΥΑΓΓΕΛΙΣΜΟΣ»  
ΤΜΗΜΑ ΑΝΟΣΟΛΟΓΙΑΣ-ΙΣΤΟΣΥΜΒΑΤΟΤΗΤΑΣ  
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΙΑΣ ΡΟΗΣ

**ΜΕΛΕΤΗ ΜΟΝΟΚΥΤΤΑΡΩΣΗΣ ΜΕ ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΙΑ ΡΟΗΣ -  
ΑΝΟΣΟΦΑΙΝΟΤΥΠΟΣ ΧΡΟΝΙΑΣ ΜΥΕΛΟΜΟΝΟΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΛΕΥΧΑΙΜΙΑΣ  
(ΧΜΜΛ)**

**ΣΕΡΑΦΕΙΜ ΚΑΡΑΘΑΝΟΣ**  
ΒΙΟΛΟΓΟΣ

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

**ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗ ΚΑΘΟΔΗΓΗΣΗ:** Α. Ψαρρά, Χημικός MSc PhD, Τμήμα Ανοσολογίας – Ιστοσυμβατότητας, Γ.Ν.Α. «Ο Ευαγγελισμός»

**ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ**

- Όνομα, Βαθμίδα, Τμήμα, Πανεπιστήμιο
- Όνομα, Βαθμίδα, Τμήμα, Πανεπιστήμιο/Ίδρυμα
- Όνομα, Βαθμίδα, Τμήμα, Πανεπιστήμιο/Ίδρυμα

ΑΘΗΝΑ 2020

## ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στα πλαίσια του Διατμηματικού Προγράμματος Μεταπτυχιακών Σπουδών με τίτλο «Κλινική Βιοχημεία-Μοριακή Διαγνωστική» του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών (ΕΚΠΑ). Το πειραματικό μέρος της εργασίας πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Κυτταρομετρίας Ροής του Τμήματος Ανοσολογίας Ιστοσυμβατότητας του Γ.Ν.Α «Ο Ευαγγελισμός».

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

Ευχαριστώ επίσης τους επιστημονικούς υπευθύνους της Beckman Coulter και της BD Biosciences, τις τεχνολόγους του Εργαστηρίου Κυτταρομετρίας Ροής κυρίες Α. Κατσαβριά, Γ. Παπαγιαννοπούλου, Μ. Ζαφείρη, Σ. Ψυρρή για τη συνεργασία και τις υποδείξεις τους στο πειραματικό τμήμα τις εργασίας, καθώς και το υπόλοιπο προσωπικό του Τμήματος Ανοσολογίας και Ιστοσυμβατότητας. Ιδιαίτερες ευχαριστίες απευθύνω στους ιατρούς της Αιματολογικής Κλινικής- Λεμφωμάτων του Γ.Ν.Α «Ο Ευαγγελισμός» και τους υπόλοιπους ιατρούς ΕΣΥ ή ιδιώτες, που συνεργάστηκαν μαζί μας. Τέλος, ευχαριστώ την οικογένεια μου για την συνεχή και αδιάκοπη υποστήριξή τους.

Αθήνα 2020

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

|   |           |
|---|-----------|
| <b>1.ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΙΑ ΡΟΗΣ</b> .....   | <b>1</b>  |
| 1.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ .....  | 1         |
| 1.2 ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΗΤΗΣ ΡΟΗΣ .....  | 2         |
| 1.2.1 Υδροδυναμικό σύστημα .....  | 3         |
| 1.2.2 Οπτικό σύστημα .....  | 4         |
| 1.2.3 Ηλεκτρονικό σύστημα και απεικόνιση αποτελεσμάτων .....  | 9         |
| 1.3 ΕΛΕΓΧΟΣ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ .....   | 10        |
| 1.4 ΕΙΔΗ ΑΝΑΛΥΣΕΩΝ- ΑΝΟΣΟΦΑΙΝΟΤΥΠΟΣ.....  | 11        |
| 1.5 ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΤΗΣ ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΙΑΣ .....  | 12        |
| <b>2. ΜΟΝΟΚΥΤΤΑΡΑ</b> .....   | <b>15</b> |
| 2.1 ΟΡΙΣΜΟΣ.....  | 15        |
| 2.2 ΠΡΟΕΛΕΥΣΗ ΜΟΝΟΚΥΤΤΑΡΩΝ .....  | 15        |
| 2.3 ΕΠΙΦΑΝΕΙΑΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ ΜΟΝΟΚΥΤΤΑΡΩΝ- ΥΠΟΠΛΗΘΥΣΜΟΙ<br>ΜΟΝΟΚΥΤΤΑΡΩΝ .....                               | 18        |
| 2.4 ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΕΣ ΚΑΤΑΣΤΑΣΕΙΣ ΜΟΝΟΚΥΤΤΑΡΩΝ .....  | 19        |
| <b>3.ΚΑΚΟΗΘΗ ΑΙΜΑΤΟΛΓΙΚΑ ΝΟΣΗΜΑΤΑ</b> .....   | <b>21</b> |
| 3.1 ΜΥΕΛΟΔΥΣΠΛΑΣΤΙΚΑ ΣΥΝΔΡΟΜΑ .....   | 21        |
| 3.1.1 Ταξινόμηση ΜΔΣ.....   | 22        |
| 3.1.2 Παθογένεια των ΜΔΣ .....  | 25        |
| 3.1.3 Διάγνωση- Πρόγνωση .....  | 27        |
| 3.1.4 Θεραπευτική αντιμετώπιση .....  | 28        |
| 3.2 ΜΥΕΛΟΔΥΣΠΛΑΣΤΙΚΑ/ ΜΥΕΛΟΥΠΕΡΠΛΑΣΤΙΚΑ ΣΥΝΔΡΟΜΑ ΚΑΙ<br>ΧΡΟΝΙΑ ΜΥΕΛΟΜΟΝΟΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΛΕΥΧΑΙΜΙΑ (CMML)..... | 29        |
| 3.2.1 Χρόνια Μυελομονοκυτταρική Λευχαιμία (CMML).....   | 30        |
| 3.2.2 Παθογένεια της χρόνιας μυελομονοκυτταρικής λευχαιμίας.  | 31        |
| 3.2.3. Διάγνωση- Πρόγνωση CMML.....   | 32        |
| 3.2.4 Θεραπεία CMML .....   | 34        |
| 3.3 ΟΞΕΙΕΣ ΜΥΕΛΟΓΕΝΕΙΣ ΛΕΥΧΑΙΜΙΕΣ.....  | 35        |
| 3.3.1 Λευχαιμίες .....  | 35        |
| 3.3.2 Οξεία μυελογενής λευχαιμία .....  | 36        |
| 3.3.3 Ταξινόμηση ΟΜΛ .....  | 37        |
| 3.3.4 Παθογένεια της ΟΜΛ.....   | 39        |
| 3.3.5 Οξεία μυελομονοκυτταρική λευχαιμία (M4) .....   | 40        |
| 3.3.6 Οξεία μονοβλαστική λευχαιμία (M5).....  | 42        |

|   |           |
|---|-----------|
| 3.3.7 Θεραπεία της ΟΜΛ .....  | 43        |
| <b>4. ΣΥΜΒΟΛΗ ΤΗΣ ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΙΑΣ ΡΟΗΣ ΣΤΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ<br/>ΑΙΜΑΤΟΛΟΓΙΚΩΝ ΝΟΣΗΜΑΤΩΝ.....</b>   | <b>45</b> |
| 4.1 ΑΝΤΙΓΟΝΑ ΔΙΑΦΟΡΟΠΟΙΗΣΗΣ ΚΑΙ ΟΡΙΟΘΕΤΗΣΗ ΚΥΤΤΑΡΙΚΩΝ<br>ΠΛΗΘΥΣΜΩΝ .....  | 46        |
| 4.2. ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΒΛΑΣΤΩΝ- ΜΟΝΟΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΔΙΑΦΟΡΟΠΟΙΗΣΗ   | 48        |
| 4.3 FC ΣΤΑ MDS .....  | 50        |
| 4.4 FC ΣΤΗ CMMML .....  | 52        |
| 4.5 FC ΣΤΗΝ ΟΞΕΙΑ ΜΥΕΛΟΜΟΝΟΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΛΕΥΧΑΙΜΙΑ .....  | 54        |
| 4.6 FC ΣΤΗΝ ΟΞΕΙΑ ΜΟΝΟΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΛΕΥΧΑΙΜΙΑ .....   | 55        |
| <b>5. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ .....</b>   | <b>57</b> |
| <b>6. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ .....</b>   | <b>57</b> |
| 6.1 ΒΙΟΛΟΓΙΚΟ ΥΛΙΚΟ.....  | 57        |
| 6.2 ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ ΚΑΙ ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ.....  | 58        |
| 6.3 ΑΝΑΛΩΣΙΜΑ .....   | 62        |
| 6.4 ΟΡΓΑΝΑ.....   | 62        |
| <b>7. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΠΟΡΕΙΑ .....</b>  | <b>64</b> |
| 7.1 ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑ ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΩΝ- ΣΤΡΑΤΗΓΙΚΗ ΟΡΙΟΘΕΤΗΣΗΣ...   | 64        |
| 7.2 ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ .....  | 69        |
| 7.3 ΕΣΩΤΕΡΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ.....   | 71        |
| 7.3.1 Μέτρηση λεμφοκυτταρικών υποπληθυσμών με τετραπλό<br>φθορισμό.....   | 72        |
| 7.3.2 Μέτρηση λεμφοκυτταρικών υποπληθυσμών με εξαπλό φθορισμό<br>.....  | 72        |
| 7.3.3 Έλεγχος κλωνικότητας Β λεμφοκυττάρων .....  | 73        |
| 7.4 ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ.....  | 73        |
| 7.5 ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ .....  | 74        |
| <b>8. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ .....</b>  | <b>76</b> |
| 8.1 ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΚΛΙΝΙΚΟΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΩΝ ΕΥΡΗΜΑΤΩΝ ΜΕ ΤΑ<br>ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΙΑΣ- ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ<br>ΤΩΝ ΔΥΟ ΛΟΓΙΣΜΙΚΩΝ ..... | 83        |
| 8.2 ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΤΩΝ ΠΟΣΟΣΤΩΝ ΤΩΝ ΜΟΝΟΚΥΤΤΑΡΙΚΩΝ<br>ΥΠΟΠΛΗΘΥΣΜΩΝ ΜΕΤΑΞΥ ΑΤΟΜΩΝ ΠΟΥ ΠΑΣΧΟΥΝ ΚΑΙ ΑΤΟΜΩΝ<br>ΧΩΡΙΣ ΤΟ ΝΟΣΗΜΑ .....            | 89        |
| 8.3 ΚΑΜΠΥΛΕΣ ROC ΓΙΑ ΤΑ ΠΟΣΟΣΤΑ ΤΩΝ ΚΛΑΣΙΚΩΝ (cMo),<br>ΕΝΔΙΑΜΕΣΩΝ (iMo) ΚΑΙ ΜΗ ΚΛΑΣΙΚΩΝ (ncMo) ΜΟΝΟΚΥΤΤΑΡΩΝ                           | 92        |

|  |            |
|--|------------|
| <b>8.4 ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΠΕΡΙΦΕΡΙΚΟΥ ΑΙΜΑΤΟΣ ΚΑΙ ΜΥΕΛΟΥ ΤΩΝ ΟΣΤΩΝ ΑΠΟ ΙΔΙΟΥΣ ΑΣΘΕΝΕΙΣ .....</b> | <b>95</b>  |
| <b>8.4.1 Συσχέτιση αποτελεσμάτων στο περιφερικό αίμα και στον μυελό των οστών.....</b>                         | <b>95</b>  |
| <b>9. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ .....</b>   | <b>99</b>  |
| <b>10. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ .....</b>  | <b>106</b> |
| <b>ΠΕΡΙΛΗΨΗ .....</b>  | <b>115</b> |
| <b>ABSTRACT .....</b>  | <b>118</b> |

# 1.ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΙΑ ΡΟΗΣ

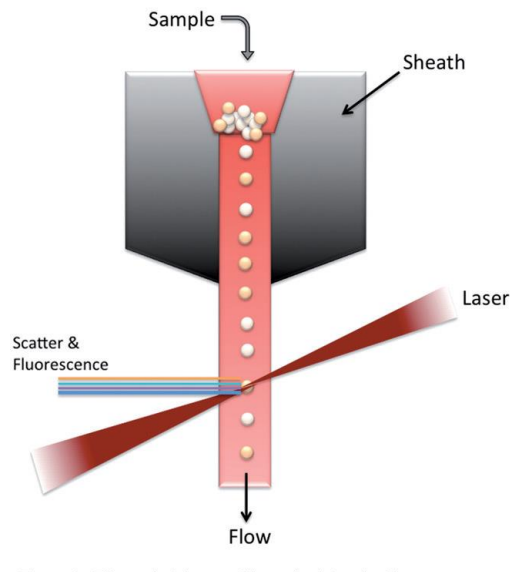
## 1.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η κυτταρομετρία ροής (Flow cytometry - FC) αποτελεί μια αυτοματοποιημένη, πολυπαραμετρική και ποσοτική μέθοδο μέτρησης και ανάλυσης των σημάτων σκεδασμού και φθορισμού που παράγονται από ένα κύτταρο ή από οποιοδήποτε άλλο μικρό σωματίδιο, όπως μικροοργανισμοί, πυρήνες κυττάρων και χρωμοσώματα υπό μορφή εναιωρήματος, καθώς αυτά διέρχονται μπροστά από μια δέσμη φωτός [1], [2].

Η γενική αρχή λειτουργίας της κυτταρομετρίας ροής στηρίζεται στην κατευθυνόμενη ακτινοβολή μιας υδροδυναμικά εστιασμένης ροής υγρού, στην οποία εμπεριέχονται τα προς μελέτη σωματίδια, από μία ακτίνα φωτός και συγκεκριμένα από ένα μονοχρωματικό λέιζερ [1]–[3]. Η ακτινοβολή των σωματιδίων που ρέουν κατά μονάς, προκαλεί σκέδαση του φωτός και εκπομπή φθορισμού (εικόνα 1.1). Τα δεδομένα που λαμβάνονται δίνουν πολύτιμες πληροφορίες σχετικά με βιοχημικά, βιοφυσικά και μοριακά χαρακτηριστικά των σωματιδίων. Η σκέδαση του φωτός συνδέεται άμεσα με τις δομικές και μορφολογικές ιδιότητες του κυττάρου, ενώ η ένταση του φθορισμού που προέρχεται από φθορίζουσες ουσίες, είναι ανάλογη με την ποσότητα των φθορίζουσών ουσιών, που συνδέονται με το κύτταρο ή το κυτταρικό στοιχείο [1].

Τα μηχανήματα στα οποία πραγματοποιείται η FC ονομάζονται κυτταρομετρητές ροής και θεωρούνται αυτοματοποιημένα μικροσκόπια ανοσοφθορισμού, τα οποία πλεονεκτούν, σε σχέση με τα τελευταία, στο ότι μπορούν να εξετάζουν τα κύτταρα με πολύ μεγαλύτερο ρυθμό, γεγονός που επιτρέπει τη μελέτη πολύ μικρών κυτταρικών πληθυσμών (π.χ. ένα κύτταρο σε εναιώρημα  $10^5$  κυττάρων). Επιπλέον, οι υπό μελέτη κυτταρικές παράμετροι (μέχρι και 20 ή και περισσότερες) μετρώνται ταυτόχρονα και σε κάθε κύτταρο ξεχωριστά, ενώ είναι δυνατή η απομόνωση και ο διαχωρισμός ομάδων κυττάρων με συγκεκριμένα χαρακτηριστικά [3], [4].



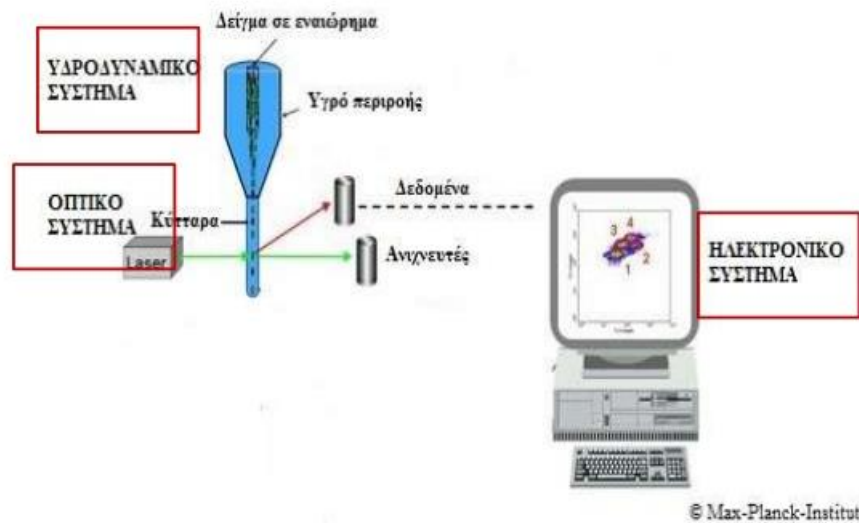


Εικόνα 1.1. Αρχή λειτουργίας ενός κυτταρομετρητή ροής [1].

## 1.2 ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΗΤΗΣ ΡΟΗΣ

Οι κυτταρομετρητές ροής είναι πολύπλοκα όργανα, που εκτελούν πολυπαραμετρικές αναλύσεις, καταγράφοντας πολλές διαφορετικές μετρήσεις για κάθε κύτταρο καθιστώντας έτσι δυνατό τον προσδιορισμό ενός ομοιογενούς υποπληθυσμού μέσα σε έναν ετερογενή πληθυσμό.

Οι περισσότεροι κυτταρομετρητές ροής έχουν τη δυνατότητα να κάνουν πέντε ή περισσότερες ταυτόχρονες μετρήσεις σε κάθε κύτταρο, αλλά ορισμένα εξειδικευμένα ερευνητικά όργανα έχουν σημαντικά μεγαλύτερη δυνατότητα [1], [4]. Ένας τυπικός κυτταρομετρητής ροής αποτελείται από τρεις λειτουργικές μονάδες: (1) ένα υδροδυναμικό σύστημα που ελέγχει τη διέλευση των κυττάρων μέσω του συστήματος ανίχνευσης, (2) το οπτικό σύστημα (μία ή περισσότερες πηγές φωτός λέιζερ και ένα σύστημα ανίχνευσης, και (3) ένα ηλεκτρονικό και υπολογιστικό σύστημα, που συλλέγει δεδομένα και εκτελεί αναλυτικές διαδικασίες σχετικά με τα ηλεκτρικά σήματα, που αναμεταδίδονται από το σύστημα ανίχνευσης[1], [5] (εικόνα 1.2).



Εικόνα 1.2. Λειτουργικές μονάδες κυτταρομετρητή

### 1.2.1 Υδροδυναμικό σύστημα

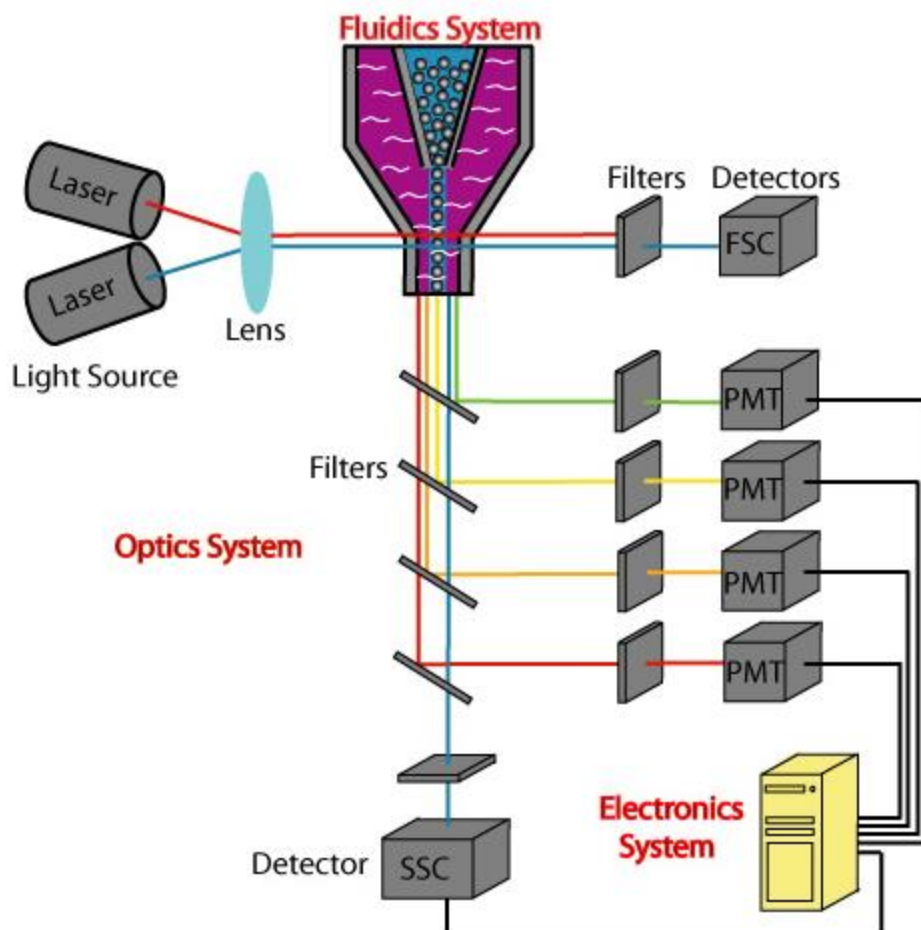
Το υδροδυναμικό σύστημα, αποτελεί εκείνο το σύστημα με το οποίο επιτυγχάνεται η μονήρης σωματιδιακή διάταξη ενός δείγματος (συνήθως κυτταρική), ώστε να επιτρέπεται η πρόσπτωση της φωτεινής δέσμης σε κάθε ένα μεμονωμένο σωματίδιο/κύτταρο που διέρχεται με νηματική ροή και με τον τρόπο αυτό να γίνεται η μέτρηση των διαφόρων παραμέτρων του.

Μια αντλία ή σύριγγα λαμβάνει καθορισμένη ποσότητα από το εναιώρημα και τη διοχετεύει με καθορισμένο ρυθμό ροής και πίεσης ο οποίος καθορίζεται από το χρήστη ανάλογα με την εφαρμογή. Μια δεύτερη αντλία διοχετεύει με καθορισμένο ρυθμό ροής και πίεσης το υγρό περιροής (sheath fluid, PBS ή ddH<sub>2</sub>O). Ο όγκος του υγρού περιροής μπορεί είναι 10-10.000 φορές μεγαλύτερος. Τελικά, τα δύο υγρά ενώνονται στον θάλαμο ροής με το δείγμα να βρίσκεται στο κέντρο της ροής χωρίς να αναμειγνύονται μεταξύ τους (νηματική ροή). Οι θάλαμοι ροής μπορούν να περιλαμβάνουν κυψελίδες με επίπεδη όψη για να ελαχιστοποιούνται οι ανεπιθύμητες αντανάκλασεις φωτός ενώ, όπου απαιτείται διαλογή κυττάρων, χρησιμοποιούνται οι λεγόμενες "jet in air" κυψελίδες ροής [1], [6] .

Καθώς τα κύτταρα διέρχονται από το ρύγχος της κυψέλης ροής, μια δέσμη φωτός λέιζερ προσπίπτει κάθετα πάνω σε αυτά. Εάν προηγηθεί σύνδεση ορισμένων μεμβρανικών ή ενδοκυτταρικών συστατικών των κυττάρων με φθορίζουσες ουσίες, η πρόσπτωση της φωτεινής δέσμης προκαλεί διέγερση των φθορίζουσών ουσιών και εκπομπή αντίστοιχων σημάτων φθορισμού [4].

### 1.2.2 Οπτικό σύστημα

Το οπτικό σύστημα του κυτταρομετρητή αποτελείται από ένα ή περισσότερα λέιζερ διέγερσης και από μια σειρά φακών, κατόπτρων και φίλτρων, για τη συλλογή της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας και των σημάτων φθορισμού από τη διέγερση των φθορίζουσών ουσιών [3] (εικόνα 1.3).



Εικόνα 1.2. Σχηματική απεικόνιση μιας τυπικής εγκατάστασης του κυτταρομετρητή ροής

Οι φακοί χρησιμοποιούνται για τη διαμόρφωση και εστίαση της δέσμης λέιζερ, η οποία παράγει φως ενεργοποιώντας ηλεκτρόνια σε τροχιακά υψηλής ενέργειας με

ηλεκτρισμό υψηλής τάσης και καθώς αυτά μεταπίπτουν σε τροχιακά χαμηλότερης ενέργειας παράγονται φωτόνια. Η εκτροπή του φωτός καθώς αυτό προσπίπτει πάνω στα κύτταρα/ σωματίδια, ονομάζεται σκέδαση του φωτός και προσδιορίζονται δύο τύποι σκεδασμού, ο πρόσθιος σκεδασμός (FSC) και ο πλάγιος σκεδασμός (SSC). Ο πρώτος δίνει πληροφορίες σχετικά με το μέγεθος των κυττάρων, ενώ ο δεύτερος για την περιεκτικότητά τους σε κοκκία. Οι συσχετισμένες με FCS/SSC μετρήσεις, χρησιμοποιούνται για την διάκριση διαφόρων κυτταρικών τύπων μέσα από έναν ετερογενή πληθυσμό [2], [4].

Υπάρχουν πολλά και διαφορετικά λέιζερ που μπορούν να χρησιμοποιηθούν στους κυτταρομετρητές ροής, με βάση τον τύπο των φθορίζουσών ουσιών, που διεγείρουν, όπως υγρόψυκτα λέιζερ υψηλής ισχύος (αργού, κρυπτού, χρωστικό λέιζερ), αερόψυκτα λέιζερ χαμηλής ισχύος (αργού (488 nm), ερυθρού ηλίου-νέον (633 nm), πράσινο ηλίου-νέον, υπεριώδες ηλίου-καδμίου) και λέιζερ διόδου (κυανό, πράσινο, ερυθρό και ιώδες). Τα λέιζερ παράγουν μονοχρωματικό φως, δηλαδή φως με συγκεκριμένο μήκος κύματος-χρώμα, το οποίο διαδίδεται σε μια συγκεκριμένη κατεύθυνση σχηματίζοντας στενές δέσμες. Επειδή τα λέιζερ υπερθερμαίνονται καθώς εκπέμπουν φως χρειάζονται ένα σύστημα, είτε με νερό (υγρόψυκτα), είτε με αέρα (αερόψυκτα), για να κρυώσουν [2], [3].

Το οπτικό σύστημα, εκτός από λέιζερ, περιλαμβάνει και έναν αριθμό ανιχνευτών, που περιβάλλουν το σημείο όπου η δέσμη του φωτός διαπερνάει τη ροή του υγρού. Ένας ανιχνευτής σε ευθυγράμμιση με τη δέσμη φωτός, κάποιοι άλλοι κάθετοι σε αυτήν και ένας ή περισσότεροι ανιχνευτές φθορισμού. Ως φωτοανιχνευτές (photodetectors) χρησιμοποιούνται οι βολταϊκοί φωτοδίοδοι κυρίως για το σήμα του FSC, που είναι ισχυρότερο, και φωτοπολλαπλασιαστές (photomultipliers – PMTs), που είναι περισσότερο ευαίσθητοι στα ασθενέστερα φωτεινά σήματα. Οι φωτοανιχνευτές μετατρέπουν τα φωτεινά σήματα σε ηλεκτρικούς παλμούς, η ένταση των οποίων είναι ανάλογη εκείνης του φωτεινού σήματος, που δέχονται και έτσι είναι δυνατή η λήψη πληροφοριών σχετικών με τη φυσική και χημική δομή κάθε μεμονωμένου σωματιδίου-κυττάρου[2]–[4].

## Φθορίζουσες ουσίες

Φθορισμός είναι το φαινόμενο κατά το οποίο ορισμένα σώματα εκπέμπουν φως μετά από διέγερση από κάποια ακτινοβολία. Η εκπομπή φωτός σταματάει αμέσως μετά την παύση της διεγείρουσας ακτινοβολίας. Κατά το φαινόμενο του φθορισμού ισχύει ο νόμος του Stokes, σύμφωνα με τον οποίο το μήκος κύματος της ακτινοβολίας που παράγεται (εκπομπής), είναι μεγαλύτερο από το μήκος κύματος της ακτινοβολίας διέγερσης [7].

Τα σημαντικότερα χαρακτηριστικά μιας φθορίζουσας ουσίας είναι το φάσμα απορρόφησης, στο οποίο μπορεί να διεγερθεί η φθορίζουσα ουσία και μια περιοχή εκπεμπόμενων μηκών κύματος, που ονομάζεται φάσμα εκπομπής. Η διαφορά μεταξύ των μεγίστων στα μήκη κύματος απορρόφησης και εκπομπής (μετατόπιση Stoke) καθορίζει πόσο καλή είναι μια φθορίζουσα ουσία. Όσο μεγαλύτερη είναι η μετατόπιση Stoke, τόσο καλύτερος είναι ο διαχωρισμός μεταξύ της απορροφούμενης και της εκπεμπόμενης ακτινοβολίας. Επειδή το χρώμα της απορροφούμενης και της εκπεμπόμενης ακτινοβολίας είναι διαφορετικό, μπορούν να διαχωριστούν η μια από την άλλη με την χρήση οπτικών φίλτρων. Στην ανίχνευση φθορισμού, ένα θετικό σήμα παρατηρείται έναντι ενός αρνητικού υποβάθρου, γεγονός που την καθιστά πολύ ευαίσθητη τεχνική.

Στην κυτταρομετρία ροής χρησιμοποιούνται φθορίζουσες ουσίες για την επισήμανση πρωτεϊνών, νουκλεϊκών οξέων και μορίων αναφοράς. Οι φθορίζουσες ουσίες, που χρησιμοποιούνται για την σήμανση πρωτεϊνών συνδέονται συνήθως με κάποιο αντισώμα ειδικό έναντι της συγκεκριμένης πρωτεΐνης. Οι πιο ευρέως χρησιμοποιούμενες φθορίζουσες ουσίες για την επισήμανση αντισωμάτων είναι η ισοθειοκυανική φλουορεσκεΐνη (FITC), η φυκοερυθρίνη (PE) και η αλλοφυκοκυανίνη (APC). Η επιλογή των καταλληλότερων φθορίζουσών ουσιών, αποτελεί σημαντικό ζήτημα και εξαρτάται από το λέιζερ, που πρόκειται να χρησιμοποιηθεί. Εάν πρόκειται να χρησιμοποιηθεί ένα λέιζερ αργού-ιόντος, η πρώτη επιλογή θα είναι η FITC, δεδομένου ότι υπάρχουν πολυάριθμα αντισώματα σημασμένα με FITC (μέγιστο μήκος: διέγερσης 495nm / εκπομπής 520nm). Ωστόσο, προβλήματα, που δημιουργούνται λόγω εκπομπής μεγάλου μήκους κύματος (σε πολυχρωματικές αναλύσεις), εξαιρετικά ευαίσθητου στο pH φθορισμού και φωτοεασθησίας, έχουν δώσει ώθηση στην ανάπτυξη φθορίζουσών ουσιών με μεγαλύτερη

φωτοσταθερότητα και αυξημένο φθορισμό, όπως αυτές της σειράς Alexa™ καθώς και των διαταγμένων σε σειρά φθορίζουσών ουσιών (Tandem dyes) [1], [7], [8].

Οι φθορίζουσες ουσίες, που χρησιμοποιούνται για τη σήμανση των νουκλεϊνικών οξέων στην κυτταρομετρία ροής, έχουν κύριες εφαρμογές, που περιλαμβάνουν τον ποσοτικό προσδιορισμό του DNA, την αξιολόγηση της ακεραιότητας της μεμβράνης, την ανίχνευση πλοειδίας και τη μελέτη του κυτταρικού κύκλου. Οι πιο κοινές ουσίες για τη σήμανση τόσο του RNA όσο και το DNA είναι το βρωμιούχο αιθίδιο (EB) και το ιωδιούχο προπίδιο (PI) [2]. Στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 1.1) φαίνονται μερικές από τις πιο ευρέως χρησιμοποιούμενες φθορίζουσες ουσίες.

Πίνακας 1.1. Κοινώς χρησιμοποιούμενες φθορίζουσες ουσίες και τα αντίστοιχα μήκη κύματος διέγερσης και εκπομπής.

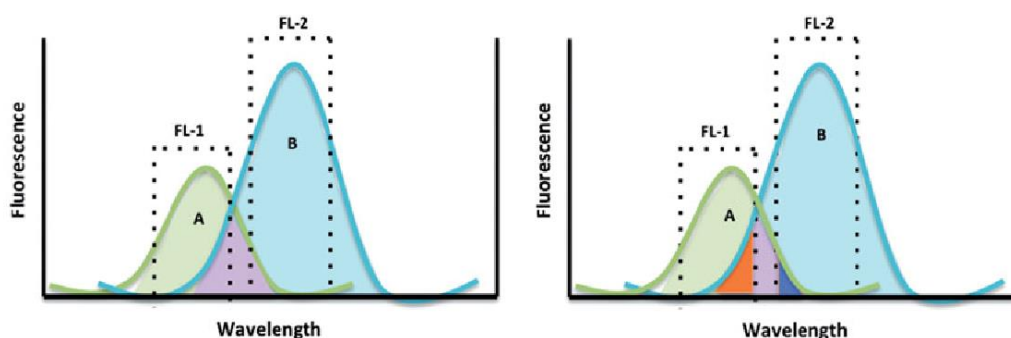
| Fluorophore                  | Excitation Max (nm) | Excitation Laser Lines (nm) | Emission Max (nm) |
|------------------------------|---------------------|-----------------------------|-------------------|
| Brilliant Violet 421™        | 405                 | 360, 405                    | 421               |
| Alexa Fluor® 405             | 401                 | 360, 405                    | 421               |
| BD Horizon™ V450             | 406                 | 405                         | 450               |
| Pacific Blue™                | 410                 | 360, 405                    | 455               |
| AmCyan                       | 458                 | 405, 457                    | 489               |
| BD Horizon™ V500             | 415                 | 405                         | 500               |
| Pacific Orange™              | 400                 | 360, 405                    | 551               |
| Brilliant Violet 570™        | 405                 | 405                         | 570               |
| DyLight® 488                 | 493                 | 488                         | 518               |
| Alexa Fluor® 488             | 495                 | 488                         | 519               |
| FITC (fluorescein)           | 493                 | 488                         | 525               |
| PE (R-Phycoerythrin)         | 496, 565            | 488, 561                    | 575               |
| PE/Cy5                       | 496, 565            | 488, 561                    | 670               |
| PerCP                        | 482                 | 488                         | 675               |
| PE/Cy5.5                     | 496, 565            | 488, 561                    | 690               |
| PerCP-Cy5.5                  | 482                 | 488                         | 690               |
| PE/Texas Red®                | 496, 565            | 488, 561                    | 613               |
| PE/Cy7                       | 496, 565            | 488, 561                    | 774               |
| APC (allophycocyanin)        | 645                 | 595, 633, 635, 647          | 660               |
| Cy5                          | 649                 | 633, 635                    | 666               |
| Alexa Fluor® 647             | 650                 | 595, 633, 635, 647          | 668               |
| DyLight® 649                 | 652                 | 633                         | 670               |
| APC/Cy5.5                    | 650                 | 595, 633, 635, 647          | 690               |
| Alexa Fluor® 700             | 696                 | 633, 635                    | 719               |
| APC/Cy7                      | 650                 | 595, 633, 635, 647          | 774               |
| APC/Alexa Fluor® 750         | 650                 | 595, 633, 635, 647          | 774               |
| <b>Viability Probe</b>       |                     |                             |                   |
| DAPI                         | 359                 | 325, 360, 405, 407          | 461               |
| 7-AAD (7-aminoactinomycin D) | 546                 | 488                         | 647               |
| PI (Propidium Iodide)        | 305, 540            | 325, 360, 488               | 620               |

## Αντιστάθμιση φθορισμών

Κάθε φθορίζουσα ουσία έχει ευρύ φάσμα εκπομπής με αποτέλεσμα μερική επικάλυψη μεταξύ των φασμάτων, όταν χρησιμοποιούνται πολλές φθορίζουσες ουσίες, όπως συμβαίνει σε μια πολυχρωματική ανάλυση. Αυτή η κατάσταση ονομάζεται φασματική επικάλυψη και μπορεί να αποφευχθεί με τη χρήση φθορίζουσών ουσιών σε πολύ διαφορετικά άκρα του φάσματος, π.χ. Alexa Fluor 405 και Φυκοερυθρίνη. Ωστόσο, αυτό δεν είναι πάντα πρακτικό.

Η διαδικασία που ακολουθείται για την επίλυση της φασματικής επικάλυψης ονομάζεται αντιστάθμιση φθορισμών (compensation) (εικόνα 1.4). Σύμφωνα με αυτή, υπολογίζεται πόση παρέμβαση (ποσοστό επί τις %) έχει μια φθορίζουσα ουσία σε ένα κανάλι που δεν έχει ενταχθεί ειδικά για τη μέτρηση αυτής. Προκειμένου να προσδιοριστεί σε τι βαθμό θα γίνει αντιστάθμιση, πρέπει πρώτα να γίνουν κάποιες μετρήσεις ελέγχου. Η μια φθορίζουσα ουσία θα πρέπει να διαβάζεται μόνη της στον κυτταρομετρητή, έτσι ώστε να καθορίζεται το ποσοστό του συνόλου εκπομπής, που ανιχνεύεται από το κανάλι, το οποίο είναι ειδικό για την δεύτερη φθορίζουσα αλλά όχι για την πρώτη. Η διαδικασία θα πρέπει να επαναληφθεί για τη δεύτερη ουσία.

Ευτυχώς, τα σύγχρονα λογισμικά για τις αναλύσεις κυτταρομετρίας εφαρμόζουν τις μαθηματικές πράξεις αντιστάθμισης αυτόματα, γεγονός που απλοποιεί σημαντικά θέματα.



Εικόνα 1.3. Επεξήγηση αντιστάθμισης φθορισμού. Α και Β φθορίζουσες ουσίες. Η Α διαβάζεται από το FL-1 κανάλι και η Β από το FL-2. Το πορτοκαλί τμήμα (δεξιά) αντιστοιχεί στο ποσοστό της Β που παρεμβαίνει στο FL-1 ενώ το μπλέ στο ποσοστό της Α που παρεμβαίνει στο FL-2 κανάλι [2]

### 1.2.3 Ηλεκτρονικό σύστημα και απεικόνιση αποτελεσμάτων

Τα φθορίζοντα σήματα από την ανάλυση των κυττάρων, συλλέγονται, ψηφιοποιούνται και τελικά μεταφράζονται σε μορφή εύκολα ερμηνεύσιμη από τον χρήστη. Το φως που εκπέμπεται κατά την ανάλυση, σημασμένων με φθορίζουσες ουσίες σωματιδίων, διασχίζει τους καθρέφτες και τα φίλτρα του οπτικού συστήματος και τελικά φτάνει στους φωτοπολλαπλασιαστές (PMTs) ή φωτοδιόδους όπου μετατρέπεται σε ηλεκτρικά σήματα/ ηλεκτρικούς παλμούς. Μόλις παραχθεί ένα σήμα από τους PMTs, αυτό πρέπει να ενισχυθεί και τελικά να ψηφιοποιηθεί για ανάλυση στον υπολογιστή. Η διαδικασία αυτή γενικά επιτυγχάνεται μέσω της χρήσης ενισχυτών και αναλογο-ψηφιακών μετατροπών (analog to digital converters – ADCs) και η ένταση των σημάτων που παράγονται από αυτούς είναι ανάλογη της έντασης των φωτεινών σημάτων, που προσπιπτουν στους φωτοανιχνευτές [2], [9], [10]. Το ηλεκτρονικό σύστημα εκτός αυτού, ελέγχει επίσης την ηλεκτρονική αντιστάθμιση, τη διαλογή (sorting) και την πίεση του υγρού περιροής [8].

Οι περισσότεροι κυτταρομετρητές συνδέονται με εξωτερικούς υπολογιστές και μέσω αυτών ελέγχονται πολλές λειτουργίες του οργάνου (PMT τάσεις, όρια ανίχνευσης, ρυθμίσεις ενισχυτών), η αντιστάθμιση φθορισμών καθώς και η κατεύθυνση της διαλογής κυττάρων. Εκτός από τον έλεγχο λειτουργίας του οργάνου, συστήματα υπολογιστών χρησιμοποιούνται και για την ανάλυση, παρουσίαση και αποθήκευση των δεδομένων, που προκύπτουν από την ανάλυση των κυττάρων. Υπάρχει ποικιλία λογισμικών προγραμμάτων για το σκοπό αυτό, μερικά από τα οποία πωλούνται από τους κατασκευαστές κυτταρομετρητών, άλλα από ανεξάρτητους πωλητές λογισμικών ή είναι διαθέσιμα ως δωρεάν ή shareware και παρέχουν μεγάλη ευελιξία ως προς τον τρόπο με τον οποίο τα δεδομένα αναλύονται και εμφανίζονται. Συχνά τα δεδομένα, παρουσιάζονται ως ιστογράμματα δυο παραμέτρων ή στικτογραμματα (dot plots), αν και υπάρχουν διαθέσιμες και πολλές άλλες μορφές παρουσίασης. Τα λογισμικά μπορεί να παρέχουν στατιστικά στοιχεία των δεδομένων που εμφανίζονται στο ιστόγραμμα, όπως το ποσοστό και ο αριθμός των κυττάρων, που εκφράζουν έναν συγκεκριμένο δείκτη, η σχετική ένταση του φθορισμού, και πόσο ομοιόμορφη είναι η ένταση αυτή. Μια περαιτέρω χρήση των υπολογιστών είναι η αποθήκευση δεδομένων κυτταρομετρίας ροής. Σχεδόν όλα τα δεδομένα κυτταρομετρίας ροής συλλέγονται ως "listmode" αρχεία, τα οποία



περιλαμβάνουν όλες τις μετρήσεις για κάθε κύτταρο και επιτρέπουν την επανειλημμένη ανάλυση δειγμάτων, συχνά με διαφορετικές παρεμβολές από τον χρήστη. Το μέγεθος των αρχείων listmode συχνά είναι πολύ μεγάλο και για τον λόγο αυτό αποθηκεύονται σε CD-ROM που είναι υψηλής χωρητικότητας και φιλικά προς το χρήστη [9], [10].

Σημαντική αρχή των αναλύσεων με κυτταρομετρία ροής είναι ότι υπάρχει δυνατότητα μελέτης συγκεκριμένων κυττάρων ενδιαφέροντος, χωρίς να λαμβάνονται υπόψη μη επιθυμητά σωματίδια, όπως νεκρά κύτταρα ή κυτταρικά κατάλοιπα. Αυτή η διαδικασία καλείται οριοθέτηση/gating. Μέσω του υπολογιστή σχεδιάζεται ένα διαχωριστικό όριο (gate), το οποίο χρησιμοποιείται για τον καθορισμό των χαρακτηριστικών συγκεκριμένων κυττάρων που επιλέγονται για περαιτέρω ανάλυση. Το gating μπορεί να εφαρμοστεί για αναλύσεις μιας παραμέτρου αλλά και για πολυπαραμετρικές αναλύσεις [2], [9], [10].

### **1.3 ΕΛΕΓΧΟΣ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ**

Λόγω της εκτεταμένης χρήσης της κυτταρομετρίας ροής στην κλινική πράξη, είναι απαραίτητη η ύπαρξη μεθόδων ελέγχου ώστε να διασφαλίζεται η ορθότητα των αποτελεσμάτων. Επίσης είναι απαραίτητη η συχνή εφαρμογή αυτών των μεθόδων για τον άμεσο εντοπισμό προβλημάτων και την αποφυγή σφαλμάτων, όπως απαραίτητη είναι και η ύπαρξη εσωτερικού και εξωτερικού ελέγχου ποιότητας [11].

Ο εσωτερικός έλεγχος ποιότητας περιλαμβάνει τις διαδικασίες εκείνες, που ελέγχουν το όργανο, παρακολουθούν την αναλυτική μέθοδο και την απόδοση του χειριστή και επικυρώνουν τις αναφορές, που προκύπτουν. Πρέπει να εφαρμόζεται σε αρκετά συχνή βάση ώστε να ανιχνεύεται άμεσα ολίσθηση ή συστηματικό σφάλμα του οργάνου και να διορθώνεται. Επίσης το προσωπικό θα πρέπει να είναι εξοικειωμένο με αυτές τις διαδικασίες.

Ο έλεγχος ποιότητας του οργάνου αποτελεί ένα από τα σημαντικότερα μέρη του εσωτερικού ελέγχου και περιλαμβάνει διαδικασίες καθημερινής βαθμονόμησης του οργάνου. Η βαθμονόμηση γίνεται με σφαιρίδια latex και με βιολογικά δείγματα ελέγχου που επιτρέπουν στον χειριστή την παρακολούθηση των συντελεστών διακύμανσης (CVs) των καναλιών κορυφής φθορισμού και σκέδασης φωτός, την

ολίσθηση του καναλιού κορυφής φθορισμού και φωτός, την ευαισθησία του οργάνου και τη διευκόλυνση της αντιστάθμισης φθορισμών κατά τη φασματική επικάλυψη. Για τον έλεγχο του κυτταρομετρητή υπάρχουν διάφοροι τύποι σφαιριδίων: σφαιρίδια για τον καθορισμό του "επιπέδου θορύβου" σε συνδυασμό με πρότυπα δέσμευσης αντισωμάτων ή βαθμονόμησης, σφαιρίδια ευθυγράμμισης (επαλήθευση της ευθυγράμμισης ρευστών και οπτικών στοιχείων), σφαιρίδια αναφοράς (ρύθμιση των PMTs), σφαιρίδια αντιστάθμισης και τα σφαιρίδια βαθμονόμησης και δέσμευσης αντισωμάτων (έλεγχος των επιπέδων γραμμικότητας, ευαισθησίας και ανίχνευσης κάθε PMT). Υπάρχουν ακόμη πολλά εμπορικά διαθέσιμα προϊόντα που παρέχουν στον χειριστή τιμές - στόχους για την επικύρωση της λειτουργίας και της μεθοδολογίας. Τα προϊόντα αυτά (δείγματα ελέγχου) είναι σταθερά με την πάροδο του χρόνου και ομοιάζουν με τα υπό μελέτη δείγματα αντικατοπτρίζοντας τα επίπεδα των κυτταρικών πληθυσμών, που συναντώνται στην κλινική πράξη. Ενώ μέχρι πρόσφατα δεν υπήρχαν δείγματα ελέγχου για ανοσοφαινότυπο λευχαιμίας και λεμφωμάτων, λόγω της μεγάλης ποικιλίας διαταραχών που συναντώνται σε αυτές τις περιπτώσεις, πλέον είναι διαθέσιμα στο εμπόριο. Τα σφαιρίδια και τα δείγματα ελέγχου θα πρέπει να χρησιμοποιούνται καθημερινά μαζί με τις ρυθμίσεις των οργάνων και παράλληλα η χρήση των Levy-Jennings διαγραμμάτων μπορεί να βοηθήσει στον εντοπισμό προβλήματος του οργάνου ή της μεθοδολογίας [11], [12].

Για τον εξωτερικό έλεγχο ποιότητας υπάρχουν τοπικά, περιφερειακά, εθνικά και διεθνή (π.χ. NEQAS) συστήματα. Στη χώρα μας η Ελληνική Εταιρεία Κυτταρομετρίας είναι ο φορέας εκείνος, που συντονίζει τον εξωτερικό έλεγχο ποιότητας. Ο εξωτερικός έλεγχος ποιότητας λαμβάνει χώρα 4-6 φορές ετησίως και παρά το γεγονός ότι αποτελεί ένα "στιγμιότυπο" των εργαστηριακών επιδόσεων, μπορεί να παρέχει χρήσιμες πληροφορίες για την απόδοση συγκεκριμένων οργάνων, την αποτελεσματικότητα συγκεκριμένων αντιδραστηρίων και μεθοδολογικών προσεγγίσεων, λόγω της συμμετοχής πολλών εργαστηρίων σε αυτόν [11].

#### **1.4 ΕΙΔΗ ΑΝΑΛΥΣΕΩΝ- ΑΝΟΣΟΦΑΙΝΟΤΥΠΟΣ**

Η κυτταρομετρία ροής χρησιμοποιείται για την μελέτη ποικιλίας δειγμάτων, συμπεριλαμβανομένων του ολικού αίματος, του μυελού των οστών, του

εγκεφαλονωτιαίου υγρού, των υγρών από ορώδεις κοιλότητες, των ούρων και στερεών ιστών. Τα χαρακτηριστικά, που μπορούν να μετρηθούν περιλαμβάνουν μέγεθος κυττάρων, κυτταροπλασματική πολυπλοκότητα, περιεχόμενο DNA ή RNA και ένα ευρύ φάσμα δεσμευμένων με τη μεμβράνη και ενδοκυτταρικών πρωτεϊνών [13].

Όλα τα φυσιολογικά κύτταρα εκφράζουν μια ποικιλία δεικτών στην επιφάνειά τους. Οι δείκτες αυτοί εξαρτώνται από το συγκεκριμένο τύπο κυττάρων και το βαθμό ωρίμανσής τους. Ωστόσο, η μη φυσιολογική ανάπτυξη μπορεί να επηρεάσει την έκφραση των δεικτών με αποτέλεσμα την υπερέκφραση ή τη μείωση της έκφρασης ορισμένων από αυτούς. Πολλοί από τους δείκτες αυτούς, έχουν μελετηθεί με μεγάλη λεπτομέρεια και υπάρχουν διαθέσιμα μονοκλωνικά αντισώματα, που στρέφονται κατά αυτών. Εκτός από του δείκτες επιφανείας, αντισώματα εναντίον ενδοκυτταρικών πρωτεϊνών, όπως η μυελοϋπεροξειδάση και η τερματική δεοξυνουκλεοτιδυλοτρανσφεράση είναι επίσης εμπορικά διαθέσιμα και επιτρέπουν την ανάλυση ενός αυξανόμενου αριθμού ενδοκυτταρικών δεικτών. Η κυτταρομετρία ροής χρησιμοποιεί τα μονοκλωνικά αυτά αντισώματα για τον ανοσοφαινότυπο των κυττάρων και με τον τρόπο αυτό μπορεί να γίνει διάκριση μεταξύ υγιών και παθολογικών κυττάρων. Ο ανοσοφαινότυπος σήμερα είναι μία από τις μεγαλύτερες κλινικές εφαρμογές της κυτταρομετρίας ροής και χρησιμοποιείται μεταξύ άλλων στη διάγνωση του λεμφώματος, του μυελώματος και των διαφόρων τύπων λευχαιμίας. Μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί για την παρακολούθηση της αποτελεσματικότητας της κλινικής θεραπείας [13], [14].

## **1.5 ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΤΗΣ ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΙΑΣ**

Η τεχνολογία της κυτταρομετρίας ροής έχει ένα ευρύ πεδίο εφαρμογών όπως στην αιματολογία, στη μοριακή βιολογία, στην ανοσολογία, στη θαλάσσια βιολογία. Στην ιατρική οι εφαρμογές της τεχνολογίας είναι πολλές τόσο στο πεδίο της κλινικής πράξης όσο και στη βασική έρευνα. Έτσι, η κυτταρομετρία ροής μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη μελέτη βασικής βιολογίας κυττάρων, την ανάλυση κυτταρικών λειτουργιών, την κινητική κυττάρων, τη μελέτη του καρυότυπου, την ταυτοποίηση και απομόνωση βλαστικών κυττάρων, τη διάγνωση ασθενειών και την ταυτοποίηση καρκινικών κυττάρων [1], [2], [12].

Οι κυριότεροι από τους κλάδους-τομείς όπου βρίσκεται σήμερα εφαρμογή η Κυτταρομετρία Ροής είναι:

**1.Αιματολογία.** Η κυτταρομετρία ροής χρησιμοποιείται τόσο στη διάγνωση όσο και στη θεραπεία και παρακολούθηση της πορείας των ασθενών με αιματολογικά νοσήματα. Στα πλαίσια αυτά, γίνεται φαινοτυπική ανάλυση των λευκοκυττάρων και των υποπληθυσμών τους (Ανοσοφαινότυπος) , διάγνωση και τυποποίηση των διαφόρων μορφών λεμφωμάτων και λευχαιμιών με τη χρήση μονοκλωνικών αντισωμάτων έναντι αντιγονικών επιτόπων, που σχετίζονται με την ωρίμανση και διαφοροποίηση των διαφόρων κυτταρικών σειρών του αίματος, διάγνωση Παροξυσμικής Νυχτερινής Αιμοσφαιρινουρίας (PNH), καθορισμός του λευκοκυτταρικού τύπου, ποσοτικοποίηση των αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων, θετική διαλογή προγονικών αιμοποιητικών κυττάρων καθώς επίσης και παρακολούθηση (μέσω του τακτικού ελέγχου για τα ποσοστά της υπολειπόμενης νόσου - MRD), της αποτελεσματικότητας της ανοσοθεραπείας /χημειοθεραπείας ή/ και αντοχής στα χημειοθεραπευτικά, που μπορεί να έχει λάβει ή να λαμβάνει ένας αιματολογικός ασθενής[5], [15].

**2.Ανοσολογία.** Περιλαμβάνει αναλύσεις μεταξύ των οποίων είναι η HLA τυποποίηση και η διασταύρωση ιστοσυμβατότητας (Cross-matching) σε περιπτώσεις μεταμόσχευσης συμπαγών οργάνων, ο έλεγχος της πατρότητας, η διάγνωση και η παρακολούθηση κληρονομικών και επίκτητων ανοσοανεπαρκειών (συνήθως σε παιδιατρικούς ασθενείς), η διάγνωση και η παρακολούθηση αυτοάνοσων νοσημάτων, ο έλεγχος της αιτιολογίας των καθ' έξιν αυτόματων αποβολών σε γυναίκες αναπαραγωγικής ηλικίας, η μέτρηση των δικτυοενδοθηλιακών κυττάρων και ο προσδιορισμός των αντιερυθροκυτταρικών/ αντιαιμοπεταλιακών αντισωμάτων[5].

**3.Ογκολογία.** Στα πλαίσια της μελέτης, της διάγνωσης, της θεραπείας και της παρακολούθησης των διαφόρων τύπων νεοπλασιών, γίνεται ανάλυση της πλοειδίας του DNA, ανάλυση του κυτταρικού κύκλου (πόσα κύτταρα, τι ποσοστό των κυττάρων βρίσκονται σε ποιες φάσεις του κυτταρικού κύκλου, τη στιγμή της μέτρησης), ανάλυση των προϊόντων διαφόρων ογκογονιδίων, ανάλυση της απόπτωσης, ανάλυση για λοίμωξη από τον HPV και πρόβλεψη για την πιθανότητα

καρκινογένεσης, καθώς επίσης και προσδιορισμός διαφόρων καρκινικών δεικτών (π.χ. υποδοχείς οιστρογόνων στον καρκίνο του μαστού) [16].

## 2. ΜΟΝΟΚΥΤΤΑΡΑ

Τα κυκλοφορούντα μονοκύτταρα του περιφερικού αίματος είναι βασικοί παράγοντες της έμφυτης ανοσίας. Προέρχονται πρωτίστως από αιματοποιητικά βλαστοκύτταρα του μυελού των οστών και είναι πολύ ευπροσάρμοστα με ικανότητα μετανάστευσης σε θέσεις φλεγμονής. Επίσης, διαφοροποιούνται σε μακροφάγα και εξειδικευμένους υποτύπους δενδριτικών κυττάρων, εκκρίνουν κυτοκίνες και χημειοκίνες για να προσελκύσουν άλλα φλεγμονώδη κύτταρα και φαγοκυτταρώνουν θραύσματα που προέρχονται από διάφορους ιστούς και μικροοργανισμούς. Συμμετέχουν ακόμη στην έναρξη της προσαρμοστικής ανοσίας με την παρουσίαση αντιγόνων σε αντιγονοειδικά λεμφοκύτταρα. Οι λειτουργίες και ο ρόλος, που παίζουν αυτά τα κύτταρα, στη διαμεσολάβηση της οξείας και της χρόνιας φλεγμονής, της αντιμικροβιακής άμυνας, της επιδιόρθωσης των ιστών και της επούλωσης των πληγών είναι ζωτικής σημασίας για τη διατήρηση μιας υγιούς σταθερής κατάστασης. Όταν όμως δυσλειτουργούν ή δεν ρυθμίζονται, τα μονοκύτταρα μπορούν να συνεισφέρουν και να προκαλέσουν σημαντική ασθένεια. Επειδή, η παρούσα μελέτη αφορά σε νοσήματα, που σχετίζονται με τα μονοκύτταρα, το ενδιαφέρον επικεντρώνεται σε αυτά.

### 2.1 ΟΡΙΣΜΟΣ

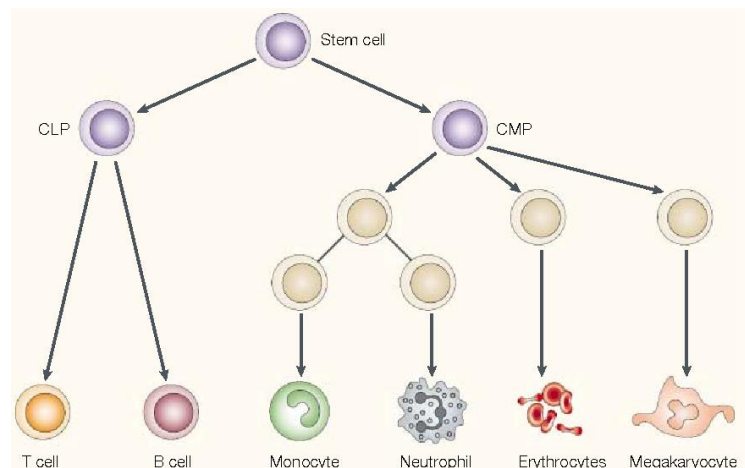
Τα μονοκύτταρα είναι λευκοκύτταρα που προέρχονται από το μυελό των οστών και αποτελούν το 5-10% αυτού του πληθυσμού στο αίμα ( $\approx 200-800 \times 10^6 / L$  αίματος). Λειτουργικά χαρακτηρίζονται από την ικανότητα φαγοκυττάρωσης, αντιγονοπαρουσίασης και συμμετέχουν στις διεργασίες της φλεγμονής και καταστροφής όγκων, ενώ εκκρίνουν και μόρια τα οποία εμπλέκονται στην άμυνα εναντίον των λοιμώξεων και των κακοηθειών [17].

### 2.2 ΠΡΟΕΛΕΥΣΗ ΜΟΝΟΚΥΤΤΑΡΩΝ

Το αιματοποιητικό στελεχιαίο κύτταρο (HSC) ορίζεται ως ένα κύτταρο, που έχει την ικανότητα αυτοανανέωσης όσο και την πολυδυναμία για να εξελιχθεί προς τις

διάφορες κυτταρικές σειρές. Η συχνότητα των HSCs στα εμπύρνηνα κύτταρα του μυελού των οστών (BM) είναι περίπου 1/100.000 [18].

Υπάρχουν διάφορες αντιλήψεις σχετικά με το θέμα της αιμοποίησης και της δημιουργίας των διάφορων κυτταρικών σειρών. Σύμφωνα με την επικρατέστερη άποψη, τα μονοκύτταρα παράγονται στον μυελό των οστών από HSCs μέσω πολλών βημάτων δέσμευσης και προγονικών σταδίων. Το αιμοποιητικό στελεχιαίο κύτταρο διαφοροποιείται προς το προγονικό κύτταρο που θα δώσει γένεση στα T και B λεμφοκύτταρα (CLP, common lymphoid progenitor) και προς το προγονικό κύτταρο της μυελοειδούς σειράς (CMP, common myeloid progenitor) που θα δώσει γένεση σε μονοκύτταρα, ουδετερόφιλα, ερυθροκύτταρα και μεγακαρυοκύτταρα (ιεραρχικό μοντέλο, Εικόνα 2.1). Ένα δεύτερο μοντέλο, το στοχαστικό, προτείνει ότι η κυτταρική πορεία είναι τυχαία και εξαρτάται από τη διαθεσιμότητα κάθε φορά των παραγόντων επιβίωσης και διαφοροποίησης, ενώ τέλος το σειριακό μοντέλο προτείνει ότι η επιλογή της κυτταρικής πορείας είναι προκαθορισμένη και τα κύτταρα διαφοροποιούνται προς ένα ή το πολύ δύο διακριτά μονοπάτια και σταδιακά εκφράζουν την δυνατότητα ανάπτυξης μεγακαρυοκυττάρων, ερυθρών αιμοσφαιρίων, κοκκιοκυττάρων, μονοκυττάρων, B και T λεμφοκυττάρων[18]–[20].



Εικόνα 2.1. Ιεραρχικό μοντέλο αιμοποίησης

Επομένως σύμφωνα με την επικρατέστερη άποψη, τα μονοκύτταρα παράγονται στο μυελό των οστών και μοιράζονται τα ίδια προγονικά κύτταρα με εκείνα των ουδετερόφιλων κοκκιοκυττάρων. Στη συνέχεια απελευθερώνονται στην περιφερική κυκλοφορία, ως μη διαφοροποιημένα κύτταρα, μέχρις ότου δεχτούν τα κατάλληλα

ερεθίσματα (π.χ. χημειοκίνες, κυτοκίνες, παράγοντες διαφοροποίησης από κύτταρα περιοχών στις οποίες έχει ξεκινήσει φλεγμονή) προκειμένου να εισέλθουν σε συγκεκριμένες ιστούς, όπου και διαφοροποιούνται. Η μετακίνηση των μονοκυττάρων γίνεται μέσα σε 8 έως 12 ώρες από τη στιγμή που δέχονται το ερέθισμα της φλεγμονής και ανάλογα με τον ιστό, τα παράγωγα κύτταρα της διαφοροποίησής τους μπορεί να είναι μακροφάγα κύτταρα, δενδριτικά κύτταρα, κύτταρα Langerhans (ειδικός τύπος δενδριτικών κυττάρων της επιδερμίδας), οστεοκλάστες (μεγάλα, πολυπύρρηνα κύτταρα που πραγματοποιούν την απορρόφηση των οστών χάρις στα ισχυρά ένζυμα που παράγουν) και άλλοι τύποι κυττάρων [18]–[20].

### **Πρόδρομα στάδια μονοκυττάρων**

Σε κανονικές συνθήκες, τα πρόδρομα στάδια των μονοκυττάρων δεν υπάρχουν στο περιφερικό αίμα και βρίσκονται μόνο στον μυελό των οστών. Το πρώτο αναγνωρίσιμο πρόδρομο κύτταρο είναι ο μυελοβλάστης, μεγέθους 20-30μM που έχει μεγάλο πυρήνα με λεπτή χρωματίνη και δύο έως πέντε πυρηνίσκους, ενώ το κυτταρόπλασμα περιέχει βασεοφιλικά κοκκία και σπάνια αζουροφιλικά. Ο φυσιολογικός μυελός των οστών περιέχει έως 5% μυελοβλάστες, οι οποίοι με κυτταρική διαίρεση, μετατρέπονται στα προμονοκύτταρα. Τα προμονοκύτταρα είναι όμοια με τους μυελοβλάστες με εξαίρεση τον πυρήνα τους, ο οποίος είναι οδοντωτός σε αντίθεση με τον οβάλ πυρήνα των μυελοβλαστών και το κυτταρόπλασμά τους περιέχει βασεοφιλικά και αζουροφιλικά κοκκία. Από τα κύτταρα αυτά παράγονται κατόπιν τα άωρα μονοκύτταρα, στα οποία η χρωματίνη είναι πιο συμπυκνωμένη σε σχέση με τις προηγούμενες μορφές, οι πυρηνίσκοι σπάνια είναι ορατοί και το μέγεθός τους είναι παρόμοιο με των μονοκυττάρων αλλά είναι εμφανώς μικρότερα από αυτά. Τελικά, δημιουργούνται τα μονοκύτταρα (20-25μM) με λοβοειδείς πυρήνες, πολύ πιο συμπυκνωμένη χρωματίνη, χωρίς πυρηνίσκους και τα οποία στο κυτταρόπλασμά τους έχουν τυχαία αζουροφιλικά κοκκία και κενοτόπια [21], [22].



## **2.3 ΕΠΙΦΑΝΕΙΑΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ ΜΟΝΟΚΥΤΤΑΡΩΝ- ΥΠΟΠΛΗΘΥΣΜΟΙ ΜΟΝΟΚΥΤΤΑΡΩΝ**

Με την χρήση μονοκλωνικών αντισωμάτων και την κυτταρομετρία ροής, είναι πλέον διαθέσιμες οι πληροφορίες για τον προσδιορισμό, την απαρίθμηση και την απομόνωση των υποπληθυσμών των μονοκυττάρων με βάση τη διαφορική έκφραση των δεικτών επιφανείας.

Η μονοκυτταρική διαφοροποίηση μπορεί να κατηγοριοποιηθεί σύμφωνα με τα ανωτέρω σε τρία στάδια: μονοβλάστες (μυελομονοβλάστες), προμονοκύτταρα και μονοκύτταρα. Οι πρώιμοι μονοβλάστες εκφράζουν τα CD34, CD117 και HLA-DR και στη συνέχεια χάνουν το CD34 και γίνονται CD4+. Καθώς τα κύτταρα ωριμάζουν σε προμονοκύτταρα, η έκφραση του CD117 αρχίζει να μειώνεται, το CD34 χάνεται και αρχίζουν να αποκτούν την έκφραση CD64, CD15, CD11b και CD11c. Η πρωτεΐνη CD14 αποτελεί τον πιο χαρακτηριστικό δείκτη της μεμβράνης των μονοκυττάρων, ο οποίος χρησιμεύει κυρίως για την ανίχνευση των λιποπολυσακχαριτών (LPS), δομικών συστατικών των εξωτερικών κυτταρικών μεμβρανών αρνητικών κατά Gram βακτηρίων ενώ, η πρωτεΐνη CD16, η οποία εκφράζεται σε έναν μικρό υποπληθυσμό των ώριμων μονοκυττάρων, μπορεί να αύξηθεί σε βακτηριακές ή ιογενείς λοιμώξεις [23]. Κατά το έτος 2010, με κοινοπραξία των οργανισμών WHO και IUIS προτάθηκε συγκεκριμένη ονοματολογία των μονοκυτταρικών υποπληθυσμών με βάση την έκφραση των δεικτών επιφανείας CD14 και CD16 [17]. Σύμφωνα με την πρόταση αυτή καθορίστηκε ο κύριος πληθυσμός των κυττάρων περιφερικού αίματος με υψηλή έκφραση του CD14 ως "κλασικά μονοκύτταρα" και ο μικρότερος πληθυσμός κυττάρων με υψηλή έκφραση του CD16 και χαμηλή του CD14 ως "μη κλασικά μονοκύτταρα". Ο ενδιάμεσος αυτών των δύο υποπληθυσμών ονομάστηκε "ενδιάμεσα μονοκύτταρα" [17], [19], [24].

Κάθε ένας από τους παραπάνω τρεις υποπληθυσμοί μονοκυττάρων έχει διαφορετικά χαρακτηριστικά και λειτουργίες. Έτσι, οι χρόνοι ημιζωής των κλασικών, ενδιάμεσων και μη κλασικών μονοκυττάρων είναι ~1.6, ~4 και ~7 ημέρες, αντίστοιχα. Επίσης, τα κλασικά μονοκύτταρα αποτελούν την ώριμη μορφή, έχουν μεγαλύτερη αντιγονοπαρουσιαστική ικανότητα και εκφράζουν περισσότερες προφλεγμονώδεις κυτοκίνες, ενώ τα μη κλασικά αντιπροσωπεύουν "νεαρά" μονοκύτταρα που μόλις εισήλθαν στην κυκλοφορία του αίματος. Συγκεκριμένα, τα

μη κλασικά μονοκύτταρα παράγουν μικρότερες ποσότητες του παράγοντα νέκρωσης όγκου TNF- $\alpha$  (Tumor Necrosis Factor- $\alpha$ ), ιντερλευκίνης 1 και ιντερλευκίνης 6 έπειτα από επώαση με λιποπολυσακχαρίτες LPS ή έπειτα από επώαση με τον παράγοντα ενεργοποίησης αιμοπεταλίων PAF. Η έκφραση ωστόσο της δεϋδρογονάσης της 3-φωσφορικής γλυκεραλδεϋδης σε επίπεδο mRNA καθώς και η επιφανειακή έκφραση της πρωτεΐνης κλάσης II (αντιγονοπαρουσίαση) σε αυτά, είναι υψηλότερες σε σχέση με τα κλασικά μονοκύτταρα. Επιπρόσθετα, τα μη κλασικά μονοκύτταρα εκφράζουν εξίσου τις ειδικές για τα μονοκύτταρα εστεράσες, αλλά η ικανότητά τους να φαγοκυτταρώνουν, να προσκολλώνται στο πλαστικό και να παράγουν ρίζες οξυγόνου είναι μικρότερη σε σύγκριση με τα κλασικά μονοκύτταρα [17], [24], [25].

Τέλος, φαίνεται να υπάρχει σταδιακή αναπτυξιακή σχέση μεταξύ των τριών υποπληθυσμών, με τα ενδιάμεσα να εμφανίζονται αργότερα από τα κλασικά και τα μη κλασικά να ακολουθούν σε μια λοίμωξη ή έπειτα από την επίδραση του παράγοντα M-CSF (Macrophage Colony-Stimulating Factor). Οι υποπληθυσμοί έχουν ίδια μορφολογία και ιστοχημεία, αλλά διαφέρουν στη συχνότητα εμφάνισης, με τα κλασικά μονοκύτταρα να εμφανίζονται συχνότερα [26].

#### **2.4 ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΕΣ ΚΑΤΑΣΤΑΣΕΙΣ ΜΟΝΟΚΥΤΤΑΡΩΝ**

Αν και τα κύτταρα της σειράς των μονοκυττάρων εκτελούν κρίσιμες για το σώμα λειτουργίες, υπάρχουν καταστάσεις δυσλειτουργίας αυτών, που οδηγούν σε πολλαπλές ασθένειες. Προβλήματα σε κάποιο από τα στάδια ωρίμανσης των μονοκυττάρων μπορούν να οδηγήσουν σε κυτταροπενίες, διαταραχές ωρίμανσης [π.χ., μυελοδυσπλαστικό σύνδρομο (MDS)], χρόνιες ασθένειες όπως χρόνια μυελομονοκυτταρική λευχαιμία (CMML) ή ακόμα και επιθετικές πολλαπλασιαστικές ασθένειες όπως οξεία μυελογενής λευχαιμία (AML). Άλλες παθολογικές καταστάσεις, συνδέονται με λειτουργικές ελλείψεις, που επηρεάζουν τη φαγοκυττάρωση ή τη βακτηριοκτόνο δράση και τέτοιες καταστάσεις μπορούν να προκύψουν από εξάντληση των κυττάρων μετά από εκτεταμένη σήψη. Ωστόσο, και οι ακατάλληλες αποκρίσεις των μονοκυττάρων μπορούν να προκαλέσουν απειλητική για τη ζωή υπερέκκριση κυτταροκίνης (σηπτικό σοκ), κοκκιωμάτωση ή πιο αργή και σταδιακή φλεγμονή που συμβάλλει στην εμφάνιση χρόνιου

μεταβολικού συνδρόμου, αθηροσκλήρωση και άλλες εκφυλιστικές διαταραχές. Έχει αποδειχθεί ακόμη συμβολή των μακροφάγων και σε νευροεκφυλιστικά νοσήματα, όπως η "ήπια εγκεφαλίτιδα" ή η νόσος του Alzheimer [27], [28].

Τα μονοκύτταρα στα MDS είναι κλωνικές διαταραχές αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων με μορφολογικές, φυσιολογικές και φαινοτυπικές διαταραχές. Τα MDS αποτελούν ετερογενή, βιολογικά πολύπλοκη και κλινικά μεταβλητή ομάδα αιματολογικών κακοηθειών, στην οποία μία ή περισσότερες κυτταρικές σειρές (μυελοειδής, μονοκυτταρική και ερυθροειδής) μπορούν να επηρεαστούν καταλήγοντας σε υψηλό ποσοστό κυτταρικού θανάτου, κυτταροπενία και υψηλό κίνδυνο διαφοροποίησης σε λευχαιμικούς κλώνους[29].

Στην περίπτωση της AML, τα κύτταρα σταματούν σε ένα από τα πρώιμα στάδια ωρίμανσης (μυελομονοβλάστες, προμονοκύτταρα) συνεχίζοντας να εκφράζουν CD34 και CD117. Η υψηλή έκφραση των δεικτών CD11b, CD33, CD64 και HLA-DR ταυτοποιεί την μονοκυτταρική γενεά στην οποία μπορούν να προσδιοριστούν αποκλίνουσες εκφράσεις διαφόρων δεικτών [27], [29].

### **3.ΚΑΚΟΗΘΗ ΑΙΜΑΤΟΛΓΙΚΑ ΝΟΣΗΜΑΤΑ**

#### **3.1 ΜΥΕΛΟΔΥΣΠΛΑΣΤΙΚΑ ΣΥΝΔΡΟΜΑ**

Τα Μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα (ΜΔΣ, Myelodysplastic Syndromes MDS) αποτελούν μία ετερογενή ομάδα επίκτητων κλωνικών διαταραχών, που προέρχονται από το πολυδύναμο αιμοποιητικό κύτταρο και χαρακτηρίζονται από αναποτελεσματική αιμοποίηση στον μυελό των οστών, κυτταροπενίες στο περιφερικό αίμα και αυξημένο κίνδυνο για εκτροπή σε οξεία μυελογενή λευχαιμία (ΟΜΛ, Acute Myeloid Leukemia AML) [30].

Τα ΜΔΣ είναι νοσήματα που εμφανίζονται σε μεγαλύτερες ηλικίες, με μέση ηλικία διάγνωσης 65-70 έτη ενώ μόνο ένα μικρό ποσοστό (<10%) των περιπτώσεων αφορά ασθενείς μικρότερους της ηλικίας των 50 ετών. Επίσης, είναι πιο συχνή η εμφάνιση σε άνδρες εκτός των περιπτώσεων μεμονωμένης κυτταρογενετικής ανωμαλίας Del(5q), όπου εμφανίζεται υπεροχή του γυναικείου φύλου [31], [32].

Από επιδημιολογικές μελέτες, έχει φανεί ότι η ετησια συχνότητα εμφάνισης ΜΔΣ είναι περίπου 5 περιστατικά ανά 100000 άτομα, φτάνοντας σε 40-50 ανά έτος μετά την ηλικία των 70 ετών. Ενώ δεν φαίνεται να υπάρχουν διαφορές στη συχνότητα μεταξύ διαφορετικών εθνικοτήτων, στους πληθυσμούς της Ασίας τα ΜΔΣ εμφανίζονται σε νεαρότερες ηλικίες, περιλαμβάνουν συνήθως υποκυτταρικό μυελό οστών και τα ποσοστά της κατηγορίας με Del(5q) είναι μικρότερα σε σχέση με τους δυτικούς πληθυσμούς [31], [33]. Στην Ελλάδα, κατά το διάστημα 1990- 2009, σε μελέτη που διενεργήθηκε στον πληθυσμό της Νοτιοδυτικής Ελλάδας καταγράφηκα 830 ασθενείς με ΜΔΣ, με μέση ηλικία 73,2 έτη και διπλάσια συχνότητα στους άνδρες σε σχέση με τις γυναίκες [34].

Τα ΜΔΣ με βάση την αιτιολογία τους διακρίνονται σε πρωτοπαθή και δευτεροπαθή. Για την εμφάνιση των πρωτοπαθών ΜΔΣ έχουν προταθεί διάφοροι παράγοντες κινδύνου, από τους οποίους όμως, λίγοι έχουν επιβεβαιωθεί από επιδημιολογικές μελέτες. Μετά το φύλο και την ηλικία, η περιβαλλοντική και επαγγελματική έκθεση σε οργανικά διαλύματα όπως η βενζίνη και τα παράγωγά της, το οικογενειακό ιστορικό αιματολογικών νεοπλασιών, η έκθεση σε γεωργικά χημικά προϊόντα (εντομοκτόνα, παρασιτοκτόνα, ζιζανιοκτόνα ή λιπάσματα) και η έκθεση σε ακτινοβολία, αποτελούν παράγοντες κινδύνου για ΜΔΣ. Επιπλέον, έχει αναφερθεί

ότι το κάπνισμα και μάλιστα η αυξημένη κατανάλωση αυτού μπορεί να συμβάλει στην εμφάνιση ΜΔΣ καθώς ο καπνός αποτελεί πηγή υψηλής λήψης βενζολίου [35].

Τα δευτεροπαθή ΜΔΣ ορίζονται ως οι μορφές αιματολογικών διαταραχών, που εκδηλώνονται μετά από χημειοθεραπείες ή ακτινοθεραπείες, για την αντιμετώπιση άλλων νεοπλασματικών νοσημάτων όπως καρκίνο μαστού, ωθηκών, καρκίνο των όρχεων, νόσο Hodgkin και non Hodgkin's λέμφωμα και πολλαπλό μυέλωμα. Δηλαδή αναπτύσσονται από έκθεση σε αλκυλιωτικούς παράγοντες ή και μετά από αυτόλογη μεταμόσχευση μυελού των οστών [36].

### 3.1.1 Ταξινόμηση ΜΔΣ

**Ταξινόμηση κατά FAB.** Η πρώτη ταξινόμηση ΜΔΣ, η Γαλλο- Αμερικανο- Βρετανική (French- American- British, FAB) έγινε το έτος 1976 αναγνωρίζοντας μόνο δύο υποτύπους ΜΔΣ, την ανθεκτική αναιμία με περίσσεια βλαστών (RAEB) και τη χρόνια μυελομονοκυτταρική λευχαιμία (CMML). Με τη μελέτη περισσότερων ασθενών, εκτιμήθηκε η ετερογένεια των ΜΔΣ και τρεις επιπλέον υποτύποι, ανθεκτική αναιμία (RA), ανθεκτική αναιμία με δακτυλιοειδείς σιδηροβλάστες (RARS) και ανθεκτική αναιμία με περίσσεια βλαστών σε μεταμόρφωση (RAEB-T) συμπεριλήφθηκαν στην αναθεωρημένη ταξινόμηση το 1982 (Πίνακας 3.1) [37], [38].

Πίνακας 3.1. Ταξινόμηση ΜΔΣ κατά FAB

| Υποκατηγορία | Ονομασία  | Χαρακτηριστικά   |
|--------------|---|--|
| RA           | Ανθεκτική αναιμία (Refractory anemia)   | Βλάστες <5% στο μυελό των οστών  |
| RARS         | Ανθεκτική αναιμία με δακτυλιοειδείς σιδηροβλάστες (Refractory anemia with ringed sideroblasts)                    | Βλάστες <5% και δακτυλιοειδείς σιδηροβλάστες >15% στο μυελό  |
| RAEB         | Ανθεκτική αναιμία με περίσσεια βλαστών (Refractory anemia with excess of blasts)                                  | Βλάστες 5-20% στο μυελό  |
| RAEB-T       | Ανθεκτική αναιμία με περίσσεια βλαστών σε μεταμόρφωση (Refractory anemia with excess of blasts in transformation) | Βλάστες 20-30% στο μυελό ή βλάστες ≥5% αλλά παρουσία ραβδίων Auer εντός αυτών                      |
| CMML         | Χρόνια μυελομονοκυτταρική λευχαιμία (Chronic myelomonocytic leukemia)   | Βλάστες <20% στο μυελό και απόλυτος αριθμός μονοκυττάρων >1000/mm <sup>3</sup> στο περιφερικό αίμα |

**Ταξινόμηση κατά WHO.** Το έτος 2000 προτάθηκε από τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας ένα νεότερο και περισσότερο βελτιωμένο σύστημα ταξινόμησης, που αποτελεί την ταξινόμηση κατά WHO και αναθεωρήθηκε στη συνέχεια για πρώτη φορά το 2008 και για δεύτερη το 2016. Με βάση αυτό το σύστημα ταξινόμησης η κατηγορία RAEB–T κατά FAB δεν θεωρείται πλέον ΜΔΣ αλλά οξεία μυελογενής λευχαιμία (ΟΜΛ) και η κατηγορία RAEB χωρίστηκε σε δύο υποκατηγορίες, ανάλογα με το ποσοστό βλαστών στο μυελό (τύπος 1 ή 2 με ποσοστό βλαστών στο μυελό κάτω ή πάνω από 10%). Επίσης αναγνωρίστηκε ένας πληθυσμός ασθενών με απώλεια των μακρών σκελών του χρωμοσώματος 5 σαν μοναδική χρωμοσωμική ανωμαλία, χωρίς περίσσεια βλαστών που συνιστά ξεχωριστή κλινική οντότητα, το σύνδρομο Del(5q) και η κατηγορία CMML της FAB ταξινόμησης παύει να θεωρείται αμιγώς ΜΔΣ και καθιερώνεται ως υβριδική κλινική οντότητα μεταξύ ΜΔΣ και μυελοϋπερπλαστικού νεοπλασματος (Myeloproliferative neoplasm-MPN). Τέλος, η ταξινόμηση κατά WHO συμπεριέλαβε στην ομάδα Ανθεκτική Κυτταροπενία με δυσπλασία μιας κυτταρικής σειράς (Refractory Cytopenia with Unilineage Dysplasia, RCUD) τις υποομάδες Ανθεκτική Αναιμία (Refractory Anemia, RA), Ανθεκτική Ουδετεροπενία (Refractory Neutropenia, RN) και την Ανθεκτική Θρομβοπενία (Refractory Thrombocytopenia, RT), εισήγαγε τη νέα κατηγορία-Ανθεκτική κυτταροπενία με δυσπλασία πολλών κυτταρικών σειρών (RCMD) με ή χωρίς δακτυλιοειδείς σιδηροβλάστες κι προσέθεσε την κατηγορία των αταξινόμητων ΜΔΣ (Πίνακας 3.2) [31], [38], [39].

Πίνακας 2.2. Ταξινόμηση ΜΔΣ κατά WHO 2008

| Κατηγορία                            | Όνομασία  | Περιφερικό αίμα   | Μυελός των οστών  |
|--------------------------------------|---|---|---|
| RCUD<br>RA<br>RN<br>RT               | Ανθεκτική κυτταροπενία με μονογραμμική δυσπλασία<br>Ανθεκτική αναιμία<br>Ανθεκτική ουδετεροπενία<br>Ανθεκτική θρομβοπενία | Μία ή δύο κυτταροπενίες<br>Βλάστες <1%  | Μονογραμμική δυσπλασία (>10% των κυττάρων σε μία σειρά)<br>Βλάστες <5%<br>Δακτυλιοειδείς σιδηροβλάστες <15%   |
| RARS                                 | Ανθεκτική αναιμία με δακτυλιοειδείς σιδηροβλάστες   | Αναιμία<br>Όχι βλάστες  | Δακτυλιοειδείς σιδηροβλάστες ≥15%<br>Δυσπλασία ερυθράς σειράς μόνο<br>Βλάστες <5%   |
| RCMD                                 | Ανθεκτική κυτταροπενία με πολυγραμμική δυσπλασία  | Κυτταροπενία/-ες<br>Βλάστες <5%<br>Όχι ραβδία Auer                                      | Δυσπλασία σε ≥10% των κυττάρων σε ≥2 σειρές<br>Βλάστες <5%<br>Όχι ραβδία Auer<br>±15% δακτυλιοειδείς ερυθροβλάστες  |
| RAEB-1                               | Ανθεκτική αναιμία με περίσσεια βλαστών-1  | Κυτταροπενία/-ες<br>Βλάστες <5%<br>Όχι ραβδία Auer<br>Μονοκύτταρα <1x10 <sup>9</sup> /L | Μονογραμμική ή πολυγραμμική δυσπλασία<br>Βλάστες 5-9%<br>Όχι ραβδία Auer  |
| RAEB-2                               | Ανθεκτική αναιμία με περίσσεια βλαστών-2  | Κυτταροπενία/-ες<br>Βλάστες 5-19%<br>Ραβδία Auer ±<br>Μονοκύτταρα <1x10 <sup>9</sup> /L | Μονογραμμική ή πολυγραμμική δυσπλασία<br>Βλάστες 10-19%<br>Ραβδία Auer ±  |
| MDS-U                                | Αταξινόμητο ΜΔΣ   | Κυτταροπενίες<br>Βλάστες <1%  | Ανομοιόμορφη δυσπλασία σε <10% των κυττάρων μιας ή περισσότερων σειρών συνοδευόμενη από μια κυτταρογενετική ανωμαλία που θεωρείται τεκμήριο για τη διάγνωση ΜΔΣ |
| MDS associated with isolated del(5q) | ΜΔΣ που σχετίζεται με μεμονωμένη έλλειψη των μακρών σκελών του χρωμοσώματος 5   | Αναιμία<br>Φυσιολογικός ή αυξημένος αριθμός αιμοπεταλίων<br>Βλάστες <1%                 | Φυσιολογικά προς αυξημένα μεγακαρυοκύτταρα με υπολοβίωση πυρήνων<br>Βλάστες <5%<br>Μεμονωμένη κυτταρογενετική ανωμαλία del(5q)<br>Όχι ραβδία Auer               |

Το 2016 στην αναθεωρημένη έκδοση ο όρος RA (ανθεκτική αναιμία) αντικαταστάθηκε με τον όρο ΜΔΣ και δημιουργήθηκαν οι κατηγορίες : ΜΔΣ με μονογραμμική δυσπλασία (MDS-SLD), ΜΔΣ με πολυγραμμική δυσπλασία (MDS-MLD), ΜΔΣ παρουσία δακτυλιοειδών σιδηροβλαστών (MDS-RS), ΜΔΣ με μεμονωμένη έλλειψη del(5q) [MDS with isolated del(5q)], ΜΔΣ με περίσσεια βλαστών-1 (MDS-EB-1), ΜΔΣ με περίσσεια βλαστων-2 (MDS-EB-2), Αταξινόμητο ΜΔΣ (MDS-U), Ανθεκτική κυτταροπενία της νεανικής ηλικίας (RCC) (Πίνακας 3.3) [40].

Πίνακας 3.3. Ταξινόμηση ΜΔΣ κατά WHO 2016

| Τύποι ΜΔΣ                                   | Αίμα  | Μυελός των οστών   |
|---|---|--|
| MDS-SLD                                     | 1 ή 2 κυτταροπενίες   | Δυσπλασία ≥10% μιας κυτταρικής γραμμής, <5% βλάστες  |
| MDS-RS                                      | Αναιμία, όχι βλάστες  | ≥15% των ερυθροειδών προδρόμων με RS ή ≥5% RS εάν υπάρχει μετάλλαξη SF3B1.   |
| MDS-MLD                                     | Κυτταροπενία <1 × 10 <sup>9</sup> / L μονοκύτταρα                     | Δυσπλασία ≥10% των κυττάρων σε ≥2 αιματοποιητικές σειρές, <15% RS ή <5% RS εάν υπάρχει μετάλλαξη SF3B1) <5% βλάστες            |
| MDS-EB-1                                    | Κυτταροπενίες, ≤2% -4% βλάστες, <1 × 10 <sup>9</sup> / L μονοκύτταρα  | SLD ή MLD, 5% -9% βλάστες, χωρίς ραβδία Auer   |
| MDS-EB-2                                    | Κυτταροπενίες, ≤5% -19% βλάστες, <1 × 10 <sup>9</sup> / L μονοκύτταρα | SLD ή MLD, 10% -19% βλάστες, ± ραβδία Auer   |
| MDS-U                                       | Κυτταροπενία, ± 1% βλάστες σε τουλάχιστον 2 περιπτώσεις               | SLD ή όχι δυσπλασία αλλά κυτταρογενετικά χαρακτηριστικά των MDS, <5% βλάστες   |
| MDS με μεμονωμένη έλλειψη del (5q)          | Αναιμία, αιμοπετάλια φυσιολογικά ή αυξημένα                           | Ερυθροειδής δυσπλασία όλων των κυτταρικών σειρών, μεμονωμένη del (5q), <5% βλάστες ± μία άλλη ανωμαλία εκτός από -7 / del (7q) |
| Ανθεκτική κυτταροπενία της νεανικής ηλικίας | Κυτταροπενίες <2% βλάστες   | Δυσπλασία 1-3 γενεαλογίες, <5% βλαστών   |

### 3.1.2 Παθογένεια των ΜΔΣ

Όπως είναι γνωστό, τα ΜΔΣ χαρακτηρίζονται από μοριακές διαταραχές, την αδυναμία του κλώνου για φυσιολογική διαφοροποίηση και την μη αποδοτική αιμοποίηση. Πλήθος μελετών έχουν αποκαλύψει γενετικές και επιγενετικές διαταραχές- κλειδιά στην παθοφυσιολογία των ΜΔΣ, ωστόσο δεν έχουν διαλευκανθεί πλήρως οι παθογενετικοί μηχανισμοί. Η παθογένειά τους θεωρείται πολύπλοκη, καθώς οι μοριακές ή χρωμοσωματικές διαταραχές που έχουν περιγραφεί ως τώρα και συνεχώς εμπλουτίζονται, δεν μπορούν η κάθε μία χωριστά να προκαλέσει τη νόσο αλλά απαιτείται συνέργεια αυτών. Μεγάλη σημασία στην εμφάνιση ΜΔΣ φαίνεται να έχουν οι ακόλουθοι παράγοντες:

α) Η μη αποτελεσματική αιμοποίηση. Στα ΜΔΣ προκύπτει από την αυξημένη ευαισθησία των κλώνων των μυελοειδών προγονικών κυττάρων σε απόπτωση, γεγονός που οδηγεί σε κυτταροπενίες παρά την ύπαρξη ενός υπερκυτταρικού μυελού. Η εξέλιξη προς οξεία μυελογενή λευχαιμία θεωρείται ότι συμβαίνει από μια



μετέπειτα στροφή από την απόπτωση στον πολλαπλασιασμό αυτών των προγονικών κλώνων[41].

Η απόπτωση των προγονικών κυττάρων της μυελοειδούς σειράς μπορεί να προκληθεί από ενδογενείς παράγοντες όπως οι σχετιζόμενες με την BCL2 πρωτεΐνες, που μπορεί να προέρχονται για παράδειγμα από την μιτοχονδριακή αποπόλωση κατά τη συγκράτηση του σιδήρου στους δακτυλιοειδείς σιδηροβλάστες καθώς και από εξωγενείς παράγοντες, συμπεριλαμβανομένων σημάτων θανάτου (TNF, Fas) ή μυελοκατασταλτικές κυτοκίνες (transforming growth factor β). Τα ενδογενή σήματα προς απόπτωση φαίνεται να αντανακλούν τον ρόλο κλωνικών χρωμοσωμικών αλλαγών, γονιδιακές μεταλλάξεις ή επιγενετικές αλλαγές, ενώ τα εξωγενή σήματα σχετίζονται με προβλήματα του ανοσοποιητικού συστήματος και του μικροπεριβάλλοντος του μυελού[42].

β) Το σύνδρομο 5q. Η ενδιάμεση διαγραφή del (5) (q31q33) που συμβαίνει στα αρχέγονα αιμοποιητικά κύτταρα οδηγεί σε απλο-ανεπάρκεια ποικίλου αριθμού γονιδίων που βρίσκονται στην περιοχή του ελλείμματος. Απλό-ανεπάρκεια της ριβοσωμικής υπομονάδας RPS14 προκαλεί μια εξαρτώμενη από την p53 παρεμπόδιση της διαφοροποίησης και του πολλαπλασιασμού των ερυθροκυττάρων ενώ απλο-ανεπάρκεια δύο micro-RNAs, mir-145 και mir-146a οδηγεί σε θρομβοκυττάρωση και δυσμεγακαρουποίηση. Τα ΜΔΣ με περισσότερο πολύπλοκους καρυοτύπους σε σχέση με το σύνδρομο 5q τείνουν να έχουν μεγαλύτερα ελλείμματα στην περιοχή με αποτέλεσμα πιο επιθετικούς φαινοτύπους, που μπορεί να περιλαμβάνουν απλο-ανεπάρκεια γειτονικών ογκοκατασταλτικών γονιδίων, συμπεριλαμβανομένων των CTTNA136 ή EGR1 [31], [43].

γ) Σωματικές γονιδιακές μεταλλάξεις. Οι μεταλλάξεις που σχετίζονται με ΜΔΣ αφορούν γονίδια μεταγραφικών παραγόντων (TP53, ETV6), ρυθμιστών μεθυλίωσης (DNMT3A) και υδροξυ-μεθυλίωσης (TET2, IDH1, IDH2) της κυτοσίνης καθώς και παραγόντων που προκαλούν ομοιοπολικές τροποποιήσεις των ιστονών (EZH2, UTX, ASXL1). Οι μεταλλάξεις αυτές μπορεί να είναι αρνητικά επικρατείς, να οδηγούν σε κέρδος ή απώλεια μιας λειτουργίας και επιδρούν στην σταθερότητα του γονιδιώματος και στα πρότυπα έκφρασης. Επίσης, οι μεταλλάξεις που αφορούν συστατικά των συμπλόκων ματίσματος είναι χαρακτηριστικές των ΜΔΣ ενώ κατά την εξέλιξη της νόσου εμφανίζονται και επιγενετικές αλλαγές, που αφορούν κυρίως

στη μη φυσιολογική μεθυλίωση υποκινητών γονιδίων (π.χ του ογκοκατασταλτικού γονιδίου P15 INK4B) [44].

δ) Μικροπεριβάλλον και ανοσοποιητικό σύστημα. Επέκταση διαφορετικών υποπληθυσμών των T- λεμφοκυττάρων θα μπορούσε να συμβάλει σε διαφορετικά στάδια της νόσου. Τα φλεγμονώδη Th17 κύτταρα θα μπορούσαν να συμβάλλουν στην αναποτελεσματική αιμοποίηση σε ΜΔΣ χαμηλού κινδύνου και τα ρυθμιστικά T κύτταρα στη διαφυγή από την αντικαρκινική ανοσία σε ΜΔΣ υψηλότερου κινδύνου [45].

### **3.1.3 Διάγνωση- Πρόγνωση**

Τα κλινικά ευρήματα είναι μη ειδικά και προέρχονται κυρίως από τις κυτταροπενίες. Η θρομβοπενία σχετίζεται με δυσλειτουργία των αιμοπεταλίων και μπορεί να οδηγήσει σε αιμοραγικά επεισόδια ακόμη και σε καταστάσεις ελεγχόμενης θρομβοπενίας, ενώ οι ασθενείς με ΜΔΣ εμφανίζουν επίσης και διαταραχές του ανοσοποιητικού συστήματος όπως αγγειίτιδα, οροαρνητική πολυαρθροίτιδα και πολυχονδρίτιδα.

Το 90% των ασθενών εμφανίζει αναιμία και οι βλάστες σε επίχρισμα περιφερικού αίματος σπάνια ξεπερνούν το 5%. Κατά την ανάλυση δειγμάτων μυελού, αυτά παρατηρούνται υπερκυτταρικά με δυσπλαστικά χαρακτηριστικά μιας ή περισσότερων μυελοειδών σειρών. Επίσης, ύστερα από ειδική χρώση παρατηρούνται δακτυλιοειδείς σιδηροβλάστες.

Τα αποτελέσματα κυτταρογενετικών αναλύσεων έχουν μεγάλη προγνωστική σημασία και μπορούν να βοηθήσουν και στη διάγνωση. Τα ΜΔΣ χαρακτηρίζονται από μερική ή ολική απώλεια ή προσθήκη χρωμοσωμάτων και τα ευρήματα συνήθως αφορούν τα χρωμοσώματα 5,7,8,20 και 17 [31], [46].

Επειδή τα ΜΔΣ είναι νοσήματα με σημαντική κλινική και προγνωστική ετερογένεια, για τον ασφαλέστερο καθορισμό της πρόγνωσης υπάρχει το Διεθνές Προγνωστικό Σύστημα Βαθμολόγησης (International Prognostic Scoring System), το οποίο αξιολογεί την πρόγνωση με βάση το ποσοστό των βλαστών στο μυελό των οστών, τον αριθμό των κυτταροπενιών στο περιφερικό αίμα και το είδος των καρυοτυπικών

ανωμαλιών. Το σύστημα προγνωστικής κατηγοριοποίησης κατά IPSS παρατίθεται στον πίνακα 3.4 [47].

Πίνακας 3.4. Προγνωστική ταξινόμηση κατά IPSS και προγνωστικές κατηγορίες

| IPSS score         | 0        | 0,5        | 1        | 1,5   | 2     | IPSS score | Προγνωστική κατηγορία                   |
|--------------------|----------|------------|----------|-------|-------|------------|---|
| Βλάστες μυελού (%) | <5       | 5-10       | -        | 11-20 | 21-30 | 0          | Low (Χαμηλού κινδύνου)                  |
| Καρυότυπος         | Ευνοϊκός | Ενδιάμεσος | Δυσμενής |       |       | 0,5-1      | Intermediate-1 (Ενδιάμεσου κινδύνου -1) |
| Κυτταροπενίες      | 0/1      | 2/3        |          |       |       | 1,5-2      | Intermediate-2 (Ενδιάμεσου κινδύνου -2) |
|                    |          |            |          |       |       | ≥2,5       | High (Υψηλού κινδύνου)                  |

### 3.1.4 Θεραπευτική αντιμετώπιση

Η θεραπεία των ΜΔΣ βασίζεται κυρίως στο Διεθνές Σύστημα Προγνωστικής Βαθμολόγησης IPSS. Τα ΜΔΣ υψηλότερου κινδύνου (Ενδιάμεσου κινδύνου-2 και Υψηλού κινδύνου κατά IPSS) χαρακτηρίζονται από διάμεση επιβίωση περίπου 15 μηνών και υψηλό κίνδυνο εξέλιξης σε Οξεία Μυελογενή Λευχαιμία. Σε αυτούς τους ασθενείς η θεραπεία στοχεύει στο να μεταβάλει τη φυσική πορεία της νόσου, όπου βέβαια αυτό είναι δυνατό. Σε ΜΔΣ χαμηλότερου κινδύνου (Χαμηλού κινδύνου και Ενδιάμεσου κινδύνου-1 κατά IPSS), όπου η διάρκεια νόσου είναι μεγαλύτερη και το ποσοστό εξέλιξης σε Οξεία Μυελογενή Λευχαιμία μικρότερο, ο κύριος στόχος της θεραπείας είναι η αντιμετώπιση των κυτταροπενιών. Η συμπτωματική αντιμετώπιση των κυτταροπενιών, συμπεριλαμβανομένης της αναιμίας, και των συνεπειών τους, όπως είναι οι λοιμώξεις και οι αιμορραγικές εκδηλώσεις, απαιτείται στους περισσότερους ασθενείς με ΜΔΣ.

Η θεραπεία των υψηλού κινδύνου ΜΔΣ περιλαμβάνει: 1. Χημειοθεραπεία (κυταραμπίνη, clofarabine, cloretazine) 2. Παράγοντες υπομεθυλίωσης (5-αζακυτιδίνη και η 5-αζα-2'- δεοξυκυτιδίνη-decitabine) 3. Αλλογενή μεταμόσχευση αιμοποιητικών κυττάρων 4. Υποστηρικτική θεραπεία με τη χορήγηση μεταγγίσεων.

Η θεραπεία των χαμηλότερου κινδύνου ΜΔΣ περιλαμβάνει: 1. Παράγοντες που διεγείρουν την ερυθροποίηση (Erythropoiesis Stimulating Agents - ESAs, όπως π.χ. ερυθροποιητίνη ή δαρβεποετίνη) 2. Λεναλιδομίδη [σε ΜΔΣ με del(5q)] 3.

Ανοσοκατασταλτικά φάρμακα (όπως π.χ. η αντιθυμοκυτταρική σφαιρίνη ATG) 4. Θεραπεία της ουδετεροπενίας και της θρομβοπενίας (αυξητικοί παράγοντες G-CSF ή GM-CSF για μικρό χρονικό διάστημα) 5. Υποστηρικτική θεραπεία με τη χορήγηση μεταγγίσεων [48].

### **3.2 ΜΥΕΛΟΔΥΣΠΛΑΣΤΙΚΑ/ ΜΥΕΛΟΥΠΕΡΠΛΑΣΤΙΚΑ ΣΥΝΔΡΟΜΑ ΚΑΙ ΧΡΟΝΙΑ ΜΥΕΛΟΜΟΝΟΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΛΕΥΧΑΙΜΙΑ (CMML)**

Τα μυελοδυσπλαστικά/μυελοϋπερπλαστικά νεοπλάσματα (Myelodysplastic syndromes/ Myeloproliferative Neoplasms, MDS/MPNs) είναι σπάνια κλωνικά μυελικά νοσήματα, που παρουσιάζουν δυσπλαστικά και μυελοϋπερπλαστικά χαρακτηριστικά κατά τη διάγνωση με αποτέλεσμα να είναι δύσκολη η ταξινόμησή τους μόνο σαν μυελοϋπερπλαστικό ή μόνο σαν μυελοδυσπλαστικό νεοπλασματικό νόσημα. Εκτός από την δυσπλασία του μυελού, εμφανίζουν και αύξηση του αριθμού των κυττάρων μιας ή περισσότερων σειρών και περιλαμβάνουν 4 κατηγορίες:

-Χρόνια μυελομονοκυτταρική λευχαιμία. Σχετικά συχνή στους ενήλικους, με ήπια αναιμία, αυξημένα μονοκύτταρα στο περιφερικό αίμα, λίγους βλάστες στον μυελό, σπληνομεγαλία και σχετικά βραδεία εξέλιξη.

-Νεανική μυελομονοκυτταρική λευχαιμία. Κακή λευχαιμία της παιδικής ηλικίας, συχνότερη, όταν συνυπάρχουν και άλλες γενετικές ανωμαλίες, με ποικίλες χρωμοσωματικές ανωμαλίες, αύξηση της εμβρυϊκής αιμοσφαιρίνης και ταχεία εξέλιξη.

-Άτυπη (BCR-ABL1 αρνητική) μυελοκυτταρική λευχαιμία. Σπάνιο σύνδρομο με μεγάλη αύξηση των ουδετερόφιλων πολυμορφοπύρηνων, αλλά χωρίς χρωμόσωμα Ph ή BCR-ABL1 μετάγραφα.

-Αταξινόμητο μυελοϋπερπλαστικό/μυελοδυσπλαστικό σύνδρομο [49]–[51].

Στη συγκεκριμένη διπλωματική εργασία το ενδιαφέρον επικεντρώνεται στη χρόνια μυελομονοκυτταρική λευχαιμία (CMML).

### 3.2.1 Χρόνια Μυελομονοκυτταρική Λευχαιμία (CMML)

Οι αιτίες της CMML είναι σε μεγάλο βαθμό άγνωστες, όπως και η μοριακή βάση του νοσήματος. Προς το παρόν, δεν είναι σαφές σε ποιο βαθμό εμπλέκονται στην ανάπτυξη της νόσου περιβαλλοντικοί παράγοντες, η έκθεση σε καρκινογόνες ουσίες, η ιονίζουσα ακτινοβολία ή τα φάρμακα που βλάπτουν το DNA. Επίσης, σπάνια αναφέρεται ως σχετιζόμενο με θεραπεία νόσημα καθώς μελέτες έχουν δείξει ότι μόνο ένα μικρό ποσοστό ασθενών, των οποίων η θεραπεία περιλάμβανε παράγοντες που βλάπτουν το DNA, εμφάνισε CMML ως δευτερογενή σχετιζόμενη με τη θεραπεία κακοήθεια ενώ στις υπόλοιπες περιπτώσεις αυτή προέκυψε ως δεύτερη, άσχετη κακοήθεια [52].

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, η CMML αποτελεί κλωνική διαταραχή του αιμοποιητικού στελεχιαίου κυττάρου και χαρακτηρίζεται από την παρουσία και παραμονή (>3μήνες) μονοκυττάρωσης στο περιφερικό αίμα ( $\geq 1 \times 10^9 /L$  και μονοκύτταρα  $\geq 10\%$  του αριθμού των λευκών αιμοσφαιρίων) μαζί με δυσπλαστικά χαρακτηριστικά στο μυελό των οστών. Λόγω της εμφάνισης μυελοδυσπλαστικών και μυελοϋπερπλαστικών χαρακτηριστικών, με την αναθεώρηση της κατά WHO ταξινόμησης το 2016, προτάθηκε η κατηγοριοποίηση της CMML σε 2 υποτύπους, “υπερπλαστική” (MPN-CMML) και “δυσπλαστική” (MDS-CMML) με αριθμό λευκών αιμοσφαιρίων  $\geq 13 \times 10^9 /L$  για την MPN-CMML. Επιπλέον, με βάση το ποσοστό βλαστών στο περιφερικό αίμα και στο μυελό η CMML μπορεί να χωριστεί σε 3 κατηγορίες: (α) CMML-0 (<2% βλάστες στο περιφερικό αίμα συμπεριλαμβανομένων των προμονοκυττάρων και <5% βλάστες μυελού), (β) CMML-1 (2%-4% βλάστες στο περιφερικό αίμα συμπεριλαμβανομένων των προμονοκυττάρων και 5%-9% βλάστες μυελού), και (γ) CMML-2 (>5% βλάστες στο περιφερικό αίμα συμπεριλαμβανομένων των προμονοκυττάρων και 10%-19% βλάστες μυελού ή/και όταν υπάρχουν ραβδία Auer) [53].

Η μέση ηλικία διάγνωσης της CMML είναι 71-74 έτη, με υπεροχή αρρένων έναντι των θηλέων (1.5-3: 1). Η ακριβής συχνότητα εμφάνισης CMML παραμένει άγνωστη, αλλά εκτιμάται σε 4 περιπτώσεις ανά 100000 άτομα ετησίως [54].

### 3.2.2 Παθογένεια της χρόνιας μυελομονοκυτταρικής λευχαιμίας

Η παθοφυσιολογία της CMML δεν είναι πλήρως κατανοητή λόγω του ότι η CMML έχει μελετηθεί συχνά ως υποτύπος του MDS και όχι ως ξεχωριστή οντότητα. Η μεγάλη ποικιλότητα της κλινικής εικόνας και η εξέλιξη της νόσου αντικατοπτρίζουν την ετερογένεια των παθογενετικών χαρακτηριστικών της CMML.

Μελέτες έχουν δείξει ότι περίπου 20%-40% των ασθενών με CMML εμφανίζουν κυτταρογενετικές διαταραχές με πιο κοινές την τρισωμία 8, μονοσωμία 7, del(7q) καθώς και δομικές αλλαγές στον μικρό βραχίονα του χρωμοσώματος 12. Τα ευρήματα αυτά ήταν πιο συχνά στους ασθενείς με αυξημένο ποσοστό βλαστων στο περιφερικό αίμα και στον μυελό, καθώς και σε αυτούς που εμφάνιζαν δυσκοκκιοποίηση και δυσσερυθροποίηση[55].

Εκτός από τις κυτταρογενετικές ανωμαλίες, τα αποτελέσματα από αλληλούχιση (NGS) έχουν δείξει μοριακές αλλαγές στο 90% των ασθενών με CMML. Οι αλλαγές αυτές μπορούν να ταξινομηθούν σε 4 κατηγορίες:

1. Μεταλλάξεις σε γονίδια επιγενετικών ρυθμιστών όπως EZH2, ASXL1, TET2, DNMT3A, IDH1 και IDH2, επηρεάζοντας τα πρότυπα μεθυλίωσης του DNA και τροποποίησης των ιστονών.
2. Μεταλλάξεις που περιλαμβάνουν συστατικά του μηχανισμού ματίσματος όπως SF3B1, SRSF2, U2AF1 (U2AF35), ZRSR2, SF3A1, PRPF40B, U2AF2 (U2AF65) και SF1
3. Μεταλλάξεις σε γονίδια που εμπλέκονται στην επιδιόρθωση του DNA όπως TP53
4. Μεταλλάξεις σε γονίδια που ρυθμίζουν υποδοχείς κινάσης τυροσίνης και σε γονίδια μεταγραφικών παραγόντων όπως JAK2, KRAS, NRAS, CBL, FLT3 και RUNX1

Επικρατεί η άποψη για την δημιουργία και εξέλιξη της CMML υπάρχει μια προτιμώμενη σειρά συσσώρευσης μεταλλάξεων στα προγονικά κύτταρα. Έτσι, πρώτα συμβαίνουν οι μεταλλάξεις που περιλαμβάνουν τα TET2 (ή IDH1 και IDH2) ή ASXL1, έπειτα οι μεταλλάξεις σε συστατικά της μηχανής ματίσματος και τέλος, σε περίπου 30%-40% των περιπτώσεων, συμβαίνουν μεταλλάξεις που αφορούν τη μεταγωγή σήματος [56], [57].

### 3.2.3. Διάγνωση- Πρόγνωση CMML

Σύμφωνα με τα κριτήρια του WHO, για την διάγνωση CMML όλοι οι ασθενείς θα πρέπει να υποβάλλονται σε αξιολόγηση του περιφερικού αίματος, οστεομυελική βιοψία καθώς και κυτταρογενετικές και μοριακές αναλύσεις.

Όπως έχει ήδη αναφερθεί η CMML χαρακτηρίζεται από επίμονη (>3μήνες) μονοκυττάρωση στο περιφερικό αίμα (μονοκύτταρα  $\geq 1 \times 10^9/L$  και  $\geq 10\%$  του αριθμού των λευκών αιμοσφαιρίων). Αρχικά, πρέπει να αποκλειστεί η πιθανότητα η μονοκυττάρωση αυτή να είναι αντιδραστική. Υπάρχει μια σειρά μη-κακοήθων αιτιών που μπορούν να προκαλέσουν μονοκυττάρωση, όπως η φυματίωση, οι χρονιες μυκητιασικές λοιμώξεις, η υποξεία βακτηριακή ενδοκαρδίτιδα, οι μολύνσεις από ιούς και πρωτόζωα καθώς και διαταραχές συνδετικού ιστού, όπως ο συστηματικός ερυθματώδης λύκος, η σαρκοείδωση και οι διαταραχές αποθήκευσης λιπιδίων. Η φάση ανάκαμψης μετά από μια οξεία λοίμωξη (συνήθως ιογενή) ή αναγέννηση μυελού των οστών μετά από χημειοθεραπεία σχετίζονται επίσης με μονοκυττάρωση [58].

Μετά τον αποκλεισμό των παραπάνω αιτιών μονοκυττάρωσης, πρέπει να εξεταστούν οι μοριακά καθορισμένες κλωνικές αιματοποιητικές διαταραχές. Πρώτον, η χρόνια μυελογενής λευχαιμία (CML) με το διακριτικό χρωμόσωμα Φιλαδέλφειας και το ογκογονίδιο σύντηξης BCR-ABL1 πρέπει να αξιολογηθεί και να αποκλειστεί. Επίσης, σε ασθενείς που συνυπάρχει και ηωσινοφιλία θα πρέπει να αποκλειστούν αναδιατάξεις PDGFRA/B (platelet-derived growth factor receptors). Οι PDGFRA/B είναι τύπου III υποδοχείς κινάσης τυροσίνης και έχουν συσχετιστεί με μυελογενή νεοπλάσματα. Επειδή τα νεοπλάσματα αυτά μπορεί να εμφανιστούν μαζί με μονοκυττάρωση και δυσπλασία μυελού, πρέπει να γίνει σωστή αξιολόγηση καθώς δεν ταξινομούνται ως CMML. Μοριακοί δείκτες όπως αναδιατάξεις στο FGFR1 και το γονίδιο σύντηξης PCM1-JAK2 πρέπει επίσης να εξεταστούν και να αποκλειστούν σε περιπτώσεις μονοκυττάρωσης με ταυτόχρονη ηωσινοφιλία [57]–[59].

Δεν υπάρχει κάποιο μοναδικό παθολογοανατομικό χαρακτηριστικό για τη διάγνωση της CMML. Τα δείγματα μυελού είναι υπερκυτταρικά με κοκκιοκυτταρική/ μυελική υπερπλασία και δυσπλασία. Ο μονοκυτταρικός πολλαπλασιασμός στους μυελούς των οστών είναι τυπικά παρών, αλλά συχνά είναι πολύ δύσκολο να εκτιμηθεί.

Σχεδόν το 80% των ασθενών παρουσιάζουν δυσμεγακαρουοποίηση με μικρο-μεγακαρουοκύτταρα ή μεγακαρουοκύτταρα με μη φυσιολογικές πυρηνικές λοβώσεις και συσώρευση χρωματίνης. Περίπου το 30% των ασθενών μπορεί να παρουσιάσει ελαφρά αύξηση της ίνωσης του μυελού ενώ το 20% των ασθενών θα έχει διακριτά οζίδια μονοπύρηνων τα οποία σημαίνονται με μονοκυτταρικούς δείκτες και δείκτες δενδριτικών κυττάρων, όπως το CD123 [50], [57].

Η αύξηση των προμοκυττάρων και των βλαστών είναι ένα σημαντικό πρόβλημα που μπορεί να υποδηλώνει είτε CMML ή ακόμη και ΟΜΛ με μονοκυτταρική διαφοροποίηση. Ωστόσο, ο προσδιορισμός των προμοκυττάρων μπορεί να είναι αρκετά δυσχερής και πρέπει να συνοψίζονται με βλαστικά κύτταρα όταν εκτιμάται ο συνολικός αριθμός βλαστών. Οι πιο αξιόπιστοι ανοσοιστοχημικοί δείκτες που μπορούν να ανδείξουν τα άωρα μυελομονοκυτταρικά στοιχεία και τα μονοκύτταρα είναι η λυσοζύμη και τα αντισώματα CD14, CD68, CD163 και CD123. Τα διαγνωστικά κριτήρια για CMML επικεντρώνονται στην παρουσία μονοκυττάρωσης στο περιφερικό αίμα. Όπως αναφέρθηκε, η μονοκυττάρωση συνδέεται με μια ποικιλία αντιδραστικών αιτιών. Η επίμονη αντιδρώσα μονοκυττάρωση με δυσπλασία του μυελού μπορεί να οδηγήσει εσφαλμένα σε μια διάγνωση CMML. Παρομοίως, οι ασθενείς με CMML με προοδευτική δυσπλασία ή σπληνομεγαλία μπορεί να αναπτύξουν κυτταροπενίες περιφερικού αίματος, μη ικανοποιώντας αριθμητικά τα μονοκυτταρικά κριτήρια, που απαιτούνται για τη διάγνωση. Αξίζει να σημειωθεί ότι η μονοκυττάρωση στο μυελό δεν ενσωματώνεται στους διαγνωστικούς ή προγνωστικούς αλγορίθμους της CMML εξαιτίας της δυσχέρειας στην αξιόπιστη αναγνώριση των άτυπων μονοκυττάρων στο μυελό των ασθενών με αυτή τη διαταραχή.

Το μοντέλο του Διεθνούς Προγνωστικού συστήματος (IPSS) δεν μπορεί να εφαρμοστεί στη CMML. Προτάθηκαν συστήματα όπως το M.D. Anderson prognostic score (MDAPS) στο οποίο συσχετίστηκαν χαρακτηριστικά της νόσου και επιβίωση. Τιμές όπως Hb<12,0 g/dL, απόλυτος αριθμός λεμφοκυττάρων >2,5x10<sup>3</sup>/μL, κυκλοφορούντα άωρα κύτταρα της μυελικής σειράς και βλάστες ≥10% στο μυελό των οστών, ήταν ανεξάρτητοι παράγοντες, που σχετίζονταν με μικρότερη συνολική επιβίωση (OS). Το μοντέλο κατέδειξε 4 υποομάδες με διάμεση συνολική επιβίωση 24, 15, 8 και 5 μήνες για χαμηλού, ενδιάμεσου 1 και 2 και υψηλού κινδύνου ασθενείς. Πρόσφατα ο ανώμαλος καρυότυπος συσχετίστηκε με μικρότερη συνολική επιβίωση



και υψηλότερο κίνδυνο μετατροπής σε ΟΜΛ. Διαχωρίστηκαν 3 κυτταρογενετικές ομάδες: (1) η χαμηλού κινδύνου με φυσιολογικό καρυότυπο ή έλλειψη Υ σαν μόνη ανωμαλία, (2) η υψηλού κινδύνου με τρισωμία 8, ανωμαλίες του χρωμοσώματος 7 ή σύνθετους καρυότυπους, ενώ όλες οι υπόλοιπες κυτταρογενετικές ανωμαλίες συνιστούσαν την (3) ομάδα ενδιάμεσου κινδύνου. Η 5ετής επιβίωση για ασθενείς χαμηλού, ενδιάμεσου και υψηλού κινδύνου ήταν 35%, 26% και 4% αντίστοιχα [55].

### 3.2.4 Θεραπεία CMML

Μετά την ένταξή του ως ειδική κατηγορία μυελοειδών νεοπλασμάτων στην ταξινόμηση WHO, οι θεραπευτικές επιλογές για την CMML έχουν εξελιχθεί. Στα τέλη της δεκαετίας του 1990, μείζονες θεραπευτικές επιλογές συνίσταντο για χημειοθεραπεία όπως η ετοποσίδη, κυταραβίνη, τρετινοΐνη, τοποτεκάνη, [95] 9-nitro-camptothecin (αναστολέας τοποϊσομεράσης) και το Isonafarnib (αναστολέας φαρνεσυλοτρανσφεράσης) [60].

Το Isonafarnib ανήκει στους αναστολείς της φαρνεσυλ-τρανσφεράσης, λαμβάνεται από το στόμα και εμποδίζει την φαρνεσυλίωση πρωτεϊνών-στόχων, συμπεριλαμβανομένων και των RAS. Από μελέτες φάνηκε ότι η ανταπόκριση ασθενών με CMML ήταν 29%. Διακοπή των μεταγγίσεων διάμεσης διάρκειας 6 μηνών επετεύχθη στο 26% των ασθενών που μεταγγίζονταν με αιμοπετάλια. Στην πλειοψηφία των ασθενών παρατηρήθηκε ελάττωση της φαρνεσυλίωσης της HDJ-2 πρωτεΐνης. Σε ποσοστό 19% οι ασθενείς εμφάνισαν τοξικότητα από το γαστρεντερικό σύστημα και διέκοψαν τη θεραπεία. Συμπερασματικά, το Isonafarnib έχει υψηλές θεραπευτικές δυνατότητες αλλά αυξημένη τοξικότητα [61].

Η θεραπεία με κυτταροστατικά μπορεί να χρησιμοποιηθεί αρχικά σε ασθενείς με εξαιρετικά πολλαπλασιαστική ασθένεια για τη μείωση σπληνομεγαλίας και του αριθμού των λευκών αιμοσφαιρίων. Σε σύγκριση με ετοποσίδη, η θεραπεία με υδροξουρία αποδείχθηκε πιο αποτελεσματική και λιγότερο τοξική. Ωστόσο, το μόνο αποτέλεσμα του φαρμάκου είναι η μείωση του μεγέθους του κλώνου χωρίς επέκταση των υπολειμματικών κυττάρων άγριου τύπου [62].

Η Αμερικανική Υπηρεσία Τροφίμων και Φαρμάκων (FDA) ενέκρινε 2 υπομεθυλιοτικούς παράγοντες, την 5-αζακιδίνη και τη δεσιταβίνη, για τη θεραπεία

ασθενών με MDS. Μελέτες έδειξαν ότι το συνολικό ποσοστό ανταπόκρισης κυμάνθηκε από 25-70% (~ 30-40%) και η διάμεσος συνολική επιβίωση (OS) κυμάνθηκε από 12 έως 37 μήνες. Αυτά τα φάρμακα είναι καλά ανεκτά, αποκαθιστούν μια πιο ισορροπημένη αιμοποίηση, βελτιώνουν τις κυτταροπενίες, μειώνουν τον αριθμό βλαστών στο μυελό και τη σπληνομεγαλία, μειώνουν τον αριθμό των μονοκυττάρων καθώς και αποκαθιστούν μια κανονική κατανομή των μονοκυτταρικών υποπληθυσμών [63].

Η μεταμόσχευση αλλογενών αιματοποιητικών βλαστικών κυττάρων είναι σήμερα η μοναδική θεραπευτική επιλογή σε ασθενείς με CMML. Σπανίως προτείνεται λόγω ηλικίας ασθενούς ή συνοσηρότητας. Πολλοί παράγοντες φαίνεται να επηρεάζουν την έκβαση της μεταμόσχευσης, όπως η θεραπεία με υπομεθυλιωτικά φάρμακα πριν τη μεταμόσχευση, η πηγή των βλαστικών κυττάρων, η σπληνομεγαλία και άλλοι, ενώ χρειάζεται να αξιολογηθεί και το όφελος από την χρήση υπομεθυλιωτικών παραγόντων ως θεραπεία συντήρησης [64].

### **3.3 ΟΞΕΙΕΣ ΜΥΕΛΟΓΕΝΕΙΣ ΛΕΥΧΑΙΜΙΕΣ**

#### **3.3.1 Λευχαιμίες**

Ο ρυθμός πολλαπλασιασμού και διαφοροποίησης των λευκοκυττάρων ελέγχεται με πολλούς μηχανισμούς, οι οποίοι σε ορισμένες περιπτώσεις δεν λειτουργούν σωστά, οπότε ο κλώνος των κυττάρων με την βλάβη εκτρέπεται προς αναίτιο και ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό, αναστολή της διαφοροποίησης προς ώριμα κύτταρα ή αναστολή της απόπτωσης. Τότε ο μυελός και το αίμα γεμίζουν με άωρα ή αδιαφοροποίητα κύτταρα, τα οποία διασπείρονται σε όργανα και ιστούς με καταστροφικά αποτελέσματα. Οι καταστάσεις αυτές ονομάζονται λευχαιμίες και αποτελούν το 4-5% του συνόλου των κακοήθων νοσημάτων στον άνθρωπο.

Οι λευχαιμίες μπορεί να αφορούν την μυελική (κοκκιώδη) ή την λεμφική σειρά και διακρίνονται σε οξείες ή χρόνιες. Οι οξείες λευχαιμίες έχουν βαριές εκδηλώσεις και εξελίσσονται γρήγορα, ενώ οι χρόνιες είναι ηπιότερες και εξελίσσονται με βραδύ ρυθμό. Ωστόσο, πολλές οξείες λευχαιμίες που αρχίζουν άμεσα την ειδική για αυτές χημειοθεραπευτική αγωγή έχουν πολλές πιθανότητες να ιαθούν. Αντίθετα, οι χρόνιες λευχαιμίες δεν μπορούν να εκκριζωθούν και έχουν κακή εξέλιξη. Οι

Λευχαιμίες απαντούν με μέση συχνότητα 5/100,000 άτομα ανά χρόνο. Υπάρχει ηλικιακή κατανομή: η οξεία λεμφοβλαστική λευχαιμία είναι συχνότερη στην παιδική ηλικία, ενώ η οξεία μυελοβλαστική είναι συχνότερη στις μεγάλες ηλικίες. Η χρόνια λεμφοκυτταρική λευχαιμία εμφανίζεται σε μεγάλες ηλικίες (>65 ετών), ενώ η χρόνια μυελοκυτταρική είναι σπάνια στα παιδιά και προσβάλλει κατά βάση ενήλικα άτομα.

Κατά γενικό κανόνα, οι λευχαιμίες οφείλονται σε υπέρμετρη ενεργοποίηση γονιδίων που προάγουν τον πολλαπλασιασμό ή γονιδίων που αναστέλλουν την απόπτωση. Η ενεργοποίηση είναι αποτέλεσμα είτε (α) χρωμοσωματικών μεταθέσεων, που οδηγούν στην δημιουργία υβριδικών γονιδίων με ανώμαλη/υπέρμετρη έκφραση που οδηγεί στην λευχαιμογένεση, ή (β) μεταλλάξεων σε γονίδια που είναι κρίσιμα για τον πολλαπλασιασμό/διαφοροποίηση της κοκκιδώδους σειράς[65].

### **3.3.2 Οξεία μυελογενής λευχαιμία**

Η οξεία μυελογενής λευχαιμία (AML, OML) είναι μορφή καρκίνου που χαρακτηρίζεται από διήθηση του μυελού των οστών, του αίματος και άλλων ιστών από πολλαπλασιαστικά, κλωνικά, μη φυσιολογικά διαφοροποιημένα και περιστασιακά κακώς διαφοροποιημένα κύτταρα του αιματοποιητικού συστήματος. Στην ουσία η OML είναι μια ομάδα ασθενειών, όπου κάποια αρχέγονα αιμοποιητικά κύτταρα συσσωρεύουν γενετικές μεταλλάξεις, οι οποίες εμποδίζουν τη διαφοροποίηση και ωρίμανση τους, δημιουργώντας έτσι τα λευχαιμικά αρχέγονα κύτταρα (leukemic stem cell, LSC). Τα φυσιολογικά SC εξακολουθούν να διαφοροποιούνται στις αιμοποιητικές προβαθμίδες που γεννούν τα ερυθροκύτταρα, τα αιμοπετάλια, τα λευκοκύτταρα και τα κοκκιοκύτταρα. Τα μεταλλαγμένα SC μπορούν επίσης να διαφοροποιούνται στις αιμοποιητικές σειρές διατηρώντας τις μεταλλάξεις ή μπορούν να παραμείνουν και να συσσωρεύονται ως άωρα πρόδρομα κύτταρα, γνωστά και ως βλάστες. Για να προκληθεί λευχαιμία απαιτούνται αρκετές μεταλλάξεις, γι' αυτό μελετούνται οι χρωμοσωμικές ανωμαλίες μέσω κυτταρογενετικής, οι οποίες αναγνωρίζουν χαρακτηριστικές αλλαγές για διάφορους τύπους μυελογενούς λευχαιμίας[66].

Είναι η συχνότερη μορφή λευχαιμίας που παρατηρείται στους ενήλικες, με διάμεση ηλικία κατά τη διάγνωση 68 έτη, και παρόλο που πριν από 50 χρόνια ήταν ανίατη, η ΟΜΛ σήμερα θεραπεύεται σε 35 έως 40% των ενηλίκων ασθενών ηλικίας 60 ετών και νεότερους και σε 5 έως 15% των ασθενών ηλικίας άνω των 60 ετών. Ηλικιωμένοι ασθενείς που δεν μπορούν να λάβουν εντατική χημειοθεραπεία χωρίς τις ανεπιθύμητες παρενέργειες αυτής, έχουν μια μέση επιβίωση μόνο 5-10 μήνες[67].

Αρκετοί παράγοντες έχουν ενοχοποιηθεί για την εμφάνιση ΟΜΛ όπως προηγούμενες αιματολογικές διαταραχές, οικογενή σύνδρομα, έκθεση σε περιβαλλοντικούς παράγοντες καθώς και έκθεση σε φάρμακα. Ο πιο κοινός παράγοντας κινδύνου για την εμφάνιση ΟΜΛ είναι η ύπαρξη μιας προηγηθείσας αιματολογικής διαταραχής, η οποία διαταραχή πιο συχνά είναι ΜΔΣ. Άλλες αιματολογικές διαταραχές που προδιαθέτουν σε ΟΜΛ είναι η απλαστική αναιμία, η πρωτοπαθής μυελοϊνώση, η παροξυσμική νυκτερινή αιμοσφαιρινουρία και η αληθής πολυκυτταραιμία. Οι ασθενείς που έχουν λάβει θεραπεία με αλκυλιωτικά μέσα, με ή χωρίς ακτινοβολία, παρουσιάζουν συχνά μια μυελοδυσπλαστική φάση πριν από την ανάπτυξη ΟΜΛ[67], [68].

Υπάρχουν διάφορες μορφές ΟΜΛ που κατατάσσονται με μορφολογικά ή καρυοτυπικά/μοριακά κριτήρια. Επιβάλλεται άμεσα η χορήγηση της κατάλληλης θεραπείας σε συνδυασμό με υποστήριξη του ασθενούς (αίμα, αιμοπετάλια, πλάσμα). Άλλως, ο ασθενής καταλήγει εντός εβδομάδων (4-8) από την έναρξη των κλινικών συμπτωμάτων. Η θεραπεία περιλαμβάνει διάφορα σχήματα κυτταροστατικών και συμπληρώνεται σε πολλές περιπτώσεις με αλλογενή μεταμόσχευση στελεχιαίων κυττάρων από ιστοσυμβατό δότη [69].

### **3.3.3 Ταξινόμηση ΟΜΛ**

Με την πάροδο των χρόνων υπήρξαν πολλά διαφορετικά συστήματα ταξινόμησης για την ΟΜΛ με βάση την αιτιολογία, τη μορφολογία, τον ανοσοφαινότυπο και τη γενετική. Η πιο ευρέως χρησιμοποιούμενη κατάταξη είναι η κατά FAB (French-American-British) κατάταξη όπως προτάθηκε το 1976 και η οποία βασίστηκε στην μορφολογία των κυττάρων και στην κυτταροχημεία (Πίνακας 3.5) [70], [71].

Πίνακας 3.5. Οι συνηθέστερες καρυοτυπικές ανωμαλίες και η σχέση τους με τους τύπους λευχαιμίας κατά την ταξινόμηση FAB.

| Τύπος λευχαιμίας κατά FAB |   | Κυτταρογενετική διαταραχή           |
|---------------------------|---|-------------------------------------|
| M0                        | ΟΜΛ αδιαφοροποίητη                                  | inv(3q26) και t(3;3)                |
| M1                        | ΟΜΛ χωρίς ωρίμανση                                  | t(9;22)                             |
| M2                        | ΟΜΛ με ωρίμανση                                     | t(8;21), t(6;9)                     |
| M3                        | Οξεία Προμυελοκυτταρική                             | t(15;17), t(11;17), t(5;17)         |
| M4                        | Οξεία Μυελομονοκυτταρική                            | 11q23, inv(3q26) και t(3;3), t(6;9) |
| M4eo                      | Οξεία Μυελομονοκυτταρική με ηωσινοφιλία μυελού      | inv(16), t(16;16)                   |
| M5                        | Οξεία Μονοβλαστική(M5a) ή Οξεία Μονοκυτταρική (M5b) | 11q23, t(8;16)                      |
| M6                        | Ερυθρολευχαιμία(M6a)<br>Οξεία ερυθράς σειράς (M6b)  |                                     |
| M7                        | Οξεία Μεγακαρυοβλαστική                             | t(1;22)                             |

Η κατά WHO ταξινόμηση της ΟΜΛ, μετά την τελευταία αναθεώρηση 2016 ενσωματώνει μορφολογικά, ανοσοφαινοτυπικά, γενετικά και κλινικά χαρακτηριστικά σε μια προσπάθεια να προσδιορίσει οντότητες που είναι βιολογικά ομοιογενείς και παρουσιάζουν συγγένειες. Επίσης για τη διάγνωση της ΟΜΛ θεωρεί απαραίτητη την παρουσία βλαστών σε ποσοστό >20% και περιλαμβάνει τις εξής κατηγορίες:

- 1) ΟΜΛ με επαναλαμβανόμενες κυτταρογενετικές ανωμαλίες
- 2) ΟΜΛ με αλλοιώσεις σχετιζόμενες με μυελοδυσπλασία
- 3) Μυελικά νεοπλάσματα σχετιζόμενα με προηγηθείσα θεραπεία
- 4) ΟΜΛ με μη ειδικούς χαρακτήρες (ή μη περαιτέρω προσδιοριζόμενη, not otherwise specified: NOS)
- 5) Μυελοειδές σάρκωμα
- 6) Μυελικές υπερπλασίες σχετιζόμενες με σύνδρομο Down
- 7) Νεοπλάσματα από βλαστικά πλασματοκυτταροειδή δενδριτικά κύτταρα [72]

### 3.3.4 Παθογένεια της ΟΜΛ

Η ΟΜΛ μπορεί να προκύψει σε ασθενείς με υποκείμενο αιματολογικό νόσημα ή ως συνέπεια προηγούμενης θεραπείας (για παράδειγμα, έκθεση σε τοποϊσομεράσες II, παράγοντες αλκυλίωσης ή ακτινοβολία). Ωστόσο, στην πλειονότητα των περιπτώσεων, εμφανίζεται ως *de novo* κακοήθεια σε προηγουμένως υγιή άτομα. Ανεξάρτητα από την αιτιολογία της, η παθογένεια της ΟΜΛ συνεπάγεται τον ανώμαλο πολλαπλασιασμό και διαφοροποίηση ενός κλωνικού πληθυσμού μυελοειδών βλαστικών κυττάρων.

Καλά χαρακτηρισμένες χρωμοσωμικές μετατοπίσεις, όπως η t(8:21) στον παράγοντα δέσμευσης πυρήνα ΟΜΛ (Core binding factor, CBF-AML) ή η t(15:17) στην οξεία προμυελοκυτταρική λευχαιμία (APL) οδηγούν στον σχηματισμό χιμαιρικών πρωτεϊνών (RUNX1-RUNX1T1 και PML-RARA, αντιστοίχως), οι οποίες τροποποιούν τη φυσιολογική διαδικασία ωρίμανσης των πρόδρομων μυελοειδών κυττάρων. Εκτός από την ύπαρξη μεγάλων χρωμοσωμικών αναδιατάξεων, μοριακές μεταβολές επίσης εμπλέκονται στην ανάπτυξη της ΟΜΛ και στην πραγματικότητα, γενετικές μεταλλάξεις εντοπίζονται σε περισσότερο από το 97% των περιπτώσεων, συχνά απουσία οποιασδήποτε μεγάλης χρωμοσωμικής ανωμαλίας.

Μελέτες έχουν αναδείξει ένα μοντέλο λευχαιμογένεσης 2 χτυπημάτων. Σύμφωνα με αυτό το μοντέλο, οι μεταλλάξεις κατηγορίας I που έχουν ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση προ-πολλαπλασιαστικών οδών πρέπει να συμβούν σε συνδυασμό με μεταλλάξεις της κατηγορίας II που βλάπτουν τη φυσιολογική διαφοροποίηση των αιμοποιητικών κυττάρων, προκειμένου να αναπτυχθεί η λευχαιμία. Κοινές μεταλλάξεις της κατηγορίας I όπως η FLT3 (εσωτερικοί εν σειρά διπλασιασμοί, ITD, και μεταλλάξεις της επικράτειας κινάσης τυροσίνης, TKD), K/NRAS, TP53 και c-KIT έχουν βρεθεί σε ~ 28%, 12%, 8% και 4% των περιπτώσεων, αντίστοιχα. Επίσης, μελέτες στερεών όγκων και αιματολογικών κακοηθειών έχουν τονίσει το ρόλο του μεταγωγέα σήματος και ενεργοποιητή της μεταγραφής 3 (STAT3) στη διέγερση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και της επιβίωσης. Αυξημένη φωσφορυλίωση της τυροσίνης του STAT3 είτε λόγω αύξησης στην έκκριση κυτοκινών, όπως IL-6 ή λόγω μεταλλάξεων στον υποδοχέα κινάσης τυροσίνης (για παράδειγμα, επαναλήψεις FLT3 ή λιγότερο συχνά JAK2) εμφανίζεται σε ποσοστό έως και 50% των

περιπτώσεων ΟΜΛ και σημαίνει χειρότερη πρόγνωση. Μεταλλάξεις της κατηγορίας II αποτελούν οι NPM1 και CEBPA, που ανιχνεύονται σε 27% και 6% αντίστοιχα και συνδέονται με καλύτερη πρόγνωση. Μεταλλάξεις σε γονίδια που εμπλέκονται σε επιγενετικές τροποποιήσεις προέκυψαν πρόσφατα ως μια τρίτη κατηγορία μεταλλάξεων με αντίκτυπο τόσο στην κυτταρική διαφοροποίηση όσο και στον πολλαπλασιασμό. Αυτές περιλαμβάνουν μεταλλάξεις σε γονίδια που σχετίζονται με τη μεθυλίωση του DNA όπως DNMT3A, TET2 και IDH-1 και IDH-2,6,7 που βρίσκονται σε περισσότερες από το 40% των περιπτώσεων ΟΜΛ.

Οι περισσότερες από τις κλινικές εκδηλώσεις της ΟΜΛ αντικατοπτρίζουν τη συσσώρευση των κακοήθων, κακώς διαφοροποιημένων μυελοειδών κυττάρων στο μυελό, στο περιφερικό αίμα και σπάνια σε άλλα όργανα. Η πλειονότητα των ασθενών εμφανίζει λευκοκυττάρωση, αναιμία και θρομβοπενία ενώ η λεμφαδενοπάθεια και η οργανομεγαλία δεν είναι τυπικά της κλινικής εικόνας. Χωρίς θεραπεία, ο θάνατος συνήθως επέρχεται μέσα σε μερικούς μήνες από διάγνωση και οφείλεται σε λοίμωξη ή αιμορραγία. Η διάγνωση της οξείας λευχαιμίας καθορίζεται από την παρουσία 20% ή μεγαλύτερου ποσοστού βλαστών στο μυελό ή στο περιφερικό αίμα. Η περαιτέρω διάγνωση της ΟΜΛ περιλαμβάνει καθορισμό της μυελοειδούς προέλευσης αυτών των κυττάρων μέσω δοκιμής για δραστικότητα μυελοϋπεροξειδάσης, ανοσοφαινότυπου ή τεκμηρίωσης της παρουσίας ραβδίων Auer [73]–[76].

Στην παρούσα μελέτη, το ενδιαφέρον επικεντρώνεται στις λευχαιμίες των μονοκυττάρων και συγκεκριμένα στη χρόνια μυελομονοκυττάρικη λευχαιμία.

### **3.3.5 Οξεία μυελομονοκυτταρική λευχαιμία (M4)**

Η οξεία μυελομονοκυτταρική λευχαιμία (AMML) χαρακτηρίζεται από τον πολλαπλασιασμό τόσο των ουδετεροφίλων όσο και των μονοκυτταρικών προδρόμων με 20% ή περισσότερους βλάστες στο περιφερικό αίμα ή στο μυελό (συμπεριλαμβανομένων των προμονοκυττάρων). Τόσο οι μονοκυτταρικές όσο και οι κοκκιοκυτταρικές σειρές περιλαμβάνουν η κάθε μία τουλάχιστον το 20% των μυελικών κυττάρων. Αυτό το συμβατικό ελάχιστο όριο 20% των μονοκυττάρων και των προδρόμων τους διακρίνει την οξεία μυελομονοκυτταρική λευχαιμία από περιπτώσεις οξείας μυελογενούς λευχαιμίας (AML) με ή χωρίς ωρίμανση, στην

οποία μπορεί να παρουσιαστούν ορισμένα μονοκύτταρα. Ο αριθμός των κυττάρων της μονοκυτταρικής σειράς και των προδρόμων τους στο περιφερικό αίμα είναι συνήθως μεγαλύτερος από  $5 \times 10^9/L$ . Μη ειδικές κυτταρογενετικές ανωμαλίες όπως για παράδειγμα ύπαρξη ενός επιπλέον χρωμοσώματος 8 είναι συχνές.

Η οξεία μυελομονοκυτταρική λευχαιμία αποτελεί το 5-10% των περιπτώσεων AML και εμφανίζεται σε όλες τις ηλικιακές ομάδες, αλλά είναι πιο συχνή σε άτομα μεγαλύτερης ηλικίας. Η μέση ηλικία διάγνωσης είναι 50 έτη και ο λόγος αρσενικού προς θηλυκό είναι 1,4: 1. Οι ασθενείς παρουσιάζουν συνήθως αναιμία, θρομβοπενία, πυρετό και κόπωση. Ο αριθμός των λευκών αιμοσφαιρίων μπορεί να είναι υψηλός, με πολλούς βλάστες και προμονοκύτταρα.

Μικροσκοπικά ευρήματα της AMML αποτελούν οι μονοβλάστες που είναι μεγάλα κύτταρα με άφθονο κυτταρόπλασμα (μέτρια ως έντονα βασεοφιλικό) και μπορεί να παρουσιάζουν σχηματισμό ψευδοποδίων. Μπορεί να υπάρχουν επίσης διάσπαρτα λεπτά αζουρόφιλα κοκκία, κενοτόπια και ραβδία Auer. Οι μονοβλάστες συνήθως έχουν στρογγυλεμένους πυρήνες με έναν ή περισσότερους μεγάλους προεξέχοντες πυρηνίσκους. Τα προμονοκύτταρα έχουν μια πιο ακανόνιστη πυρηνική διαμόρφωση, με συνήθως λιγότερο βασεοφιλικό κυτταρόπλασμα, με περιστασιακά μεγάλα αζουρόφιλα κοκκία και κενοτόπια. Τα μονοκύτταρα και τα προμονοκύτταρα δεν διακρίνονται εύκολα πάντα από τα ωρίμα μυελοειδή κύτταρα και η κυτταροχημεία μπορεί να είναι χρήσιμη σε τέτοιες περιπτώσεις. Το μονοκυτταρικό συστατικό μπορεί να είναι πιο εμφανές στο περιφερικό αίμα από ό,τι στον μυελό των οστών.

Τουλάχιστον 3% των βλαστών πρέπει να παρουσιάζει θετικότητα για MPO. Οι μονοβλάστες, τα προμονοκύτταρα και τα μονοκύτταρα είναι τυπικά θετικά για τη μη ειδική εστεράση, αν και η δραστηριότητα μπορεί να είναι ασθενής ή να απουσιάζει σε ορισμένες περιπτώσεις. Εάν τα κύτταρα πληρούν τα μορφολογικά κριτήρια για μονοκύτταρα, η έλλειψη μη ειδικής εστεράσης δεν αποκλείει τη διάγνωση.

Η διάκριση από τους άλλους τύπους AML βασίζεται στα κυτταροχημικά ευρήματα και το ποσοστό των μονοκυτταρικών κυττάρων. Η διαφορική διάγνωση με χρόνια μυελομονοκυτταρική λευχαιμία είναι κρίσιμη και βασίζεται στην σωστή αναγνώριση των βλαστών και των προμονοκυττάρων, τα οποία μπορεί να αυξηθούν μόνο στο



μυελό. Σε ορισμένες περιπτώσεις, εξέταση μόνο στο περιφερικό αίμα μπορεί να οδηγήσει σε λανθασμένη διάγνωση χρόνιας μυελομονοκυτταρικής λευχαιμίας αντί για AML [77].

### **3.3.6 Οξεία μονοβλαστική λευχαιμία (M5)**

Η οξεία μονοβλαστική λευχαιμία και η οξεία μονοκυτταρική λευχαιμία είναι μυελογενείς λευχαιμίες στις οποίες το περιφερικό αίμα ή ο μυελός των οστών έχει >20% βλάστες (συμπεριλαμβανομένων των προμονοκυττάρων) και >80% των λευχαιμικών κυττάρων είναι της μονοκυτταρικής γραμμής, συμπεριλαμβανομένων των μονοβλαστών, των πορομονοκυττάρων και των μονοκυττάρων ενώ μπορεί να υπάρχει και μικρό ποσοστό ουδετεροφίλων (<20%). Η οξεία μονοβλαστική λευχαιμία και η οξεία μονοκυτταρική λευχαιμία διακρίνονται από τις σχετικές αναλογίες μονοβλαστών και προμονοκυττάρων. Στην οξεία μονοβλαστική λευχαιμία, τα περισσότερα (> 80%) των μονοκυτταρικών στοιχείων είναι μονοβλάστες ενώ στην οξεία μονοκυτταρική λευχαιμία, είναι προμονοκύτταρα ή μονοκύτταρα.

Η οξεία μονοβλαστική λευχαιμία αντιπροσωπεύει <5% των περιπτώσεων OML και μπορεί να εμφανιστεί σε οποιαδήποτε ηλικία, αλλά είναι πιο συνηθισμένη στα νεαρά άτομα. Μπορεί να εμφανιστούν εξωμυελικές αλλοιώσεις. Η οξεία μονοκυτταρική λευχαιμία αντιπροσωπεύει <5% των περιπτώσεων OML. Είναι πιο συνηθισμένη στους ενήλικες. η μέση ηλικία διάγνωσης είναι 49 έτη και η αναλογία αρσενικού προς θηλυκό είναι 1,8 : 1. Οι ασθενείς συνήθως εμφανίζουν αιμορραγικές διαταραχές, εξωμυελικές μάζες, διόγκωση των ούλων, ενώ συχνή είναι και η εμπλοκή του κεντρικού νευρικού συστήματος.

Τα μικροσκοπικά ευρήματα είναι όμοια με αυτά που παρατηρούνται στην AMML και συχνά παρατηρείται ερυθροφαγοκυττάρωση. Ο μυελός των οστών στην οξεία μονοβλαστική λευχαιμία είναι συνήθως υπερκυτταρικός, με κυρίαρχο πληθυσμό μεγάλων, κακώς διαφοροποιημένων βλαστών με άφθονο κυτταρόπλασμα. Τα προμοκύτταρα στην οξεία μονοκυτταρική λευχαιμία παρουσιάζουν πυρηνική κατάτμηση. Οι εξωμυελικές αλλοιώσεις μπορεί να αποτελούνται κυρίως από μονοβλάστες ή προνοκύτταρα ή από ένα μίγμα των δύο κυτταρικών τύπων.

Στις περισσότερες περιπτώσεις, οι μονοβλάστες και τα προμυελοκύτταρα παρουσιάζουν έντονη δράση μη ειδικής εστεράσης. Σε ποσοστό 10-20% των περιπτώσεων οξείας μονοβλαστικής λευχαιμίας, η αντίδραση μη ειδικής εστεράσης είναι αρνητική ή πολύ ασθενώς θετική. Σε περιπτώσεις όπου η μη ειδική εστεράση είναι αρνητική, ο ανοσοφαινοτυπικός έλεγχος μπορεί να είναι απαραίτητος για τον καθορισμό της μονοκυτταρικής διαφοροποίησης. Οι μονοβλάστες είναι τυπικά MPO-αρνητικοί ενώ, τα προμυελοκύτταρα μπορεί να εμφανίζουν κάποια διάσπαρτη θετικότητα MPO.

Η διαφορική διάγνωση με τη χρόνια μυελομονοκυτταρική λευχαιμία είναι κρίσιμη και βασίζεται στην κατάλληλη αναγνώριση προμυελοκυττάρων και στην ένταξή τους ως ισοδύναμα βλαστών.

Στις περισσότερες περιπτώσεις υπάρχουν μυελοειδείς, μη ειδικές κυτταρογενετικές ανωμαλίες. Το t (8; 16) (p11.2, p13.3) μπορεί να συσχετιστεί με οξεία μονοκυτταρική λευχαιμία ή οξεία μυελομονοκυτταρική λευχαιμία και στις περισσότερες περιπτώσεις σχετίζεται με αιμοφαγοκυττάρωση και διαταραχές του μηχανισμού πήξης [77].

### **3.3.7 Θεραπεία της ΟΜΛ**

Οι γενικές αρχές της θεραπευτικής προσπέλασης όλων των λευχαιμιών βασίζονται σε μελέτες της κυτταρικής κινητικής, όπου καταδείχθηκε ότι, όταν η λευχαιμία εκδηλώνεται κλινικά (πάνω από  $10^9$  κύτταρα), τα λευχαιμικά κύτταρα είναι ήδη πάρα πολλά και έχουν πάψει να πολλαπλασιάζονται γρήγορα, όπως θα αναμενόταν. Κατά συνέπεια, ενδείκνυνται φάρμακα που δρουν στη φάση G0 (αλκυλιοτικοί παράγοντες, κορτικοειδή, ανθρακυκλίνες, ασπαραγινάση) ώστε το φορτίο νόσου να μειωθεί και τα κύτταρα να επανέλθουν σε φάση γρήγορου πολλαπλασιασμού. Όταν αυτό επιτευχθεί, τότε έχουν καλή ένδειξη τα κυτταροστατικά που είναι ειδικά για τις φάσεις S (σύνθεση DNA) και M (μίτωση), τα οποία αναστέλλουν επιτυχώς τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό (μεθοτρεξάτη, μερκαπτοπουρίνη, υδροξυκαρβαμίδη και αραβινοσίδη της κυτοσίνης για την S και αλκαλοειδή της vinca για την M). Η στρατηγική αυτή ισχύει τόσο για την ΟΛΛ όσο και την ΟΜΛ. Στην τελευταία, η καθιερωμένη θεραπεία σήμερα περιλαμβάνει συνδυασμούς των παραπάνω φαρμάκων και χωρίζεται στις ακόλουθες φάσεις:

Θεραπεία εφόδου. Ο συνηθέστερος χημειοθεραπευτικός συνδυασμός είναι η χορήγηση αραβινοσίδης της κυτοσίνης μαζί με ανθρακυκλίνη σε ενδοφλέβια έγχυση επί τρεις ημέρες. Τα φάρμακα αυτά επιφέρουν σημαντική μείωση των βλαστικών κυττάρων, αλλά και αναπόφευκτη τοξικότητα στα φυσιολογικά κύτταρα του μυελού και του αίματος. Στις επόμενες ημέρες θα ακολουθήσει σχεδόν πλήρης μυελική απλασία (αναιμία, θρομβοπενία, λευκοπενία) και ο ασθενής θα έχει ανάγκη προσεκτικής φροντίδας και υποστήριξης με μεταγγίσεις αίματος και αιμοπεταλίων, αυξητικούς παράγοντες, και αντιβιοτικά επί λοιμώξεων). Μετά δύο περίπου εβδομάδες, τα φυσιολογικά στελεχιαία κύτταρα που έχουν διασωθεί αρχίζουν να επαναποικίζουν τον μυελό και το «συναγωνιστικό πλεονέκτημα» που διαθέτουν επιτρέπει την ταχύτερη και καλύτερη αποκατάσταση της φυσιολογικής αιμοποίησης, σε αντίθεση προς την λευχαιμική αιμοποίηση, η οποία είτε καθυστερεί σημαντικά είτε παραμένει σε επίπεδα που δεν είναι ανιχνεύσιμα. Εάν οι βλάστες στον μυελό είναι <5%, τότε έχει επιτευχθεί αιματολογική πλήρης ύφεση της ΟΜΛ. Η πιθανότητα ύφεσης στις περισσότερες ΟΜΛ είναι της τάξεως του 70%. Οι υπόλοιπες περιπτώσεις θα χρειασθούν θεραπεία με άλλα φαρμακευτικά πρωτόκολλα ανθεκτικής ΟΜΛ ή δεν θα απαντήσουν σε καμία θεραπεία.

Θεραπεία ενίσχυσης. Στις περιπτώσεις που έχει επιτευχθεί μορφολογικά πλήρης ύφεση της νόσου, η συνέχεια της θεραπευτικής αγωγής εξαρτάται από την πρόγνωση της ΟΜΛ: Εάν η πρόγνωση είναι ευνοϊκή χορηγείται θεραπεία ενίσχυσης με σκοπό τη αποφυγή επανεμφάνισης (υποτροπής) της ΟΜΛ. Η θεραπεία αυτή συνίσταται σε χορήγηση αραβινοσίδης (αραβινοσίδη της κυτοσίνης) επί 3 ημέρες. Εάν η ΟΜΛ είναι ενδιάμεσης ή κακής πρόγνωσης, τότε, μετά την θεραπεία ενίσχυσης, καλόν είναι να γίνει αλλογενής μεταμόσχευση μυελού των οστών, εφόσον η ηλικία και η γενική κατάσταση του ασθενούς το επιτρέπουν

Άλλα φάρμακα. Όταν η αγωγή που αναφέρθηκε δεν αποδώσει, τότε χρησιμοποιούνται άλλα φάρμακα, συμβατικά ή πειραματικά. Ειδικά για τα άτομα μεγάλης ηλικίας, που δεν μπορούν να ανεχθούν ισχυρά χημειοθεραπευτικά σχήματα, χρησιμοποιούνται ολοένα και περισσότερο οι αναστολείς της μεθυλίωσης με κύριο εκπρόσωπο την 5΄αζακυτιδίνη και την δεσιταμπίνη.

Η παρακολούθηση του ασθενούς δεν τελειώνει με την επίτευξη της ύφεσης και την θεραπεία ενίσχυσης γιατί υπάρχει πάντοτε πιθανότητα υποτροπής, ιδιαίτερα στις

περιπτώσεις μη ευνοϊκής πρόγνωσης. Η υποτροπή αυτή πρέπει να διαγνωσθεί όσο το δυνατό ενωρίτερα ώστε να εφαρμοσθεί άμεσα η ενδεικνυόμενη θεραπευτική αγωγή. Κατά συνέπεια, η ανίχνευση της «ελάχιστης υπολειμματικής νόσου» (MRD, minimal residual disease), είτε για επιβεβαίωση της πλήρους ύφεσης είτε για την διάγνωση της επερχόμενης υποτροπής, έχει ιδιαίτερο κλινικό ενδιαφέρον. Η ανίχνευση αυτή γίνεται (α) με την αναζήτηση της παραμονής κυττάρων με τις μοριακές βλάβες που είχαν ανιχνευθεί κατά τη διάγνωση, και (β) με αναζήτηση κυττάρων με τον αρχικό ανοσοφαινότυπο [78].

#### **4. ΣΥΜΒΟΛΗ ΤΗΣ ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΙΑΣ ΡΟΗΣ ΣΤΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ ΑΙΜΑΤΟΛΟΓΙΚΩΝ ΝΟΣΗΜΑΤΩΝ**

Η κυτταρομετρία ροής (FC) αποτελεί χρήσιμο εργαλείο για τη διάγνωση, ταξινόμηση και τον μετά-θεραπείας έλεγχο των αιματολογικών νεοπλασμάτων. Η πολυπαραμετρική FC μετρά ταυτόχρονα αρκετούς επιφανειακούς και / ή κυτταροπλασματικούς δείκτες σε ένα μόνο κύτταρο, επιτρέποντας έτσι τον ακριβή φαινοτυπικό χαρακτηρισμό του πληθυσμού, που έχει αναλυθεί και την έγκαιρη επιλογή της πιο κατάλληλης περαιτέρω δοκιμής (όπως FISH ή PCR) για να καθορισθεί οριστικά η διάγνωση και να χαρακτηριστεί περαιτέρω η κακοήθεια. Μολονότι κανένας μεμονωμένος δείκτης δεν επιτρέπει καθορισμένη ταξινόμηση των κυτταρικών σειρών, η ανάλυση με ομάδες αντισωμάτων επιτρέπει τον διαχωρισμό των αιματολογικών όγκων σε πολύ ακριβείς υποτύπους με διαφορετικές προγνωστικές και θεραπευτικές απαιτήσεις, όπως ορίζεται από την τρέχουσα κατά WHO ταξινόμηση αιματοποιητικών και λεμφοειδών όγκων [79].

Στο πρωτόκολλο FC, το δείγμα επωάζεται με αντισώματα, ακολουθούμενη από λύση των ερυθρών αιμοσφαιρίων, πλύση, σταθεροποίηση σε παραφορμαλδεΐδη και ανάλυση FC. Η λύση του πλήρους αίματος αντιπροσωπεύει την συνηθέστερα χρησιμοποιούμενη τεχνική για την προετοιμασία του δείγματος. Συνήθως συλλέγονται 100000 κύτταρα (σε πρωτόκολλα MRD, minimal residual disease, 500.000 συμβάντα). Τα μονοκλωνικά αντισώματα που χρησιμοποιούνται στην FC συζεύγνυνται με φθορίζουσες ουσίες, διεγείρονται με λέιζερ και τα αποτελέσματα τελικά παρουσιάζονται σε dot plots ή/ και ιστογράμματα όπως έχει ήδη αναφερθεί στο κεφάλαιο 1 [80].

#### **4.1 ΑΝΤΙΓΟΝΑ ΔΙΑΦΟΡΟΠΟΙΗΣΗΣ ΚΑΙ ΟΡΙΟΘΕΤΗΣΗ ΚΥΤΤΑΡΙΚΩΝ ΠΛΗΘΥΣΜΩΝ**

Ο ανοσοφαινότυπος του μυελού των οστών και του περιφερικού αίματος είναι ιδιαίτερα σημαντικός στη διάγνωση και μελέτη αιματολογικών νοσημάτων και χρησιμοποιείται ευρύτατα στην κλινική πράξη, κυρίως μετά τη βελτίωση της μεθόδου της κυτταρομετρίας ροής. Το σύμπλεγμα αντιγόνων διαφοροποίησης CD<sub>s</sub> (Clusters of differentiation), περιλαμβάνει επιφανειακά (μεμβρανικά) μόρια των λευκοκυττάρων, καθένα από τα οποία αναγνωρίζεται από μονοκλωνικά αντισώματα. Πρόκειται για μόρια που εμπλέκονται σε αρκετές λειτουργίες του ανοσοποιητικού συστήματος και μεσολαβούν στην αλληλεπίδραση των κυττάρων του ανοσοποιητικού με αντιγόνα, μεταξύ τους και με άλλα κύτταρα. Η αναγνώριση των αντιγόνων διαφοροποίησης (CD<sub>s</sub>) καθιστά εφικτή την αναγνώριση της βιολογικής δραστηριότητας και της κυτταρικής κατανομής αυτών των μορίων.

Τα CD αντιγόνα είναι πολύ χρήσιμα στην αναγνώριση και απομόνωση κυτταρικών πληθυσμών ενώ, η ειδικότητα της διαδικασίας εξαρτάται από την έκταση εμφάνισης ενός CD αντιγόνου σε διάφορους κυτταρικούς τύπους και σε διάφορα στάδια διαφοροποίησης μιας κυτταρικής σειράς. Η ταυτόχρονη χρήση περισσότερων του ενός CD ενισχύει τον ακριβή προσδιορισμό ενός κυτταρικού πληθυσμού. Στον παρακάτω πίνακα φαίνονται τα κυριότερα αντιγόνα που χρησιμοποιούνται στη μελέτη του ανοσοφαινότυπου [81].

Πίνακας 4.1. Τα κυριότερα αντιγόνα που χρησιμοποιούνται στη μελέτη ανοσοφαινότυπου και μεταβολή της έκφρασης αυτών κατά την ωρίμανση των κυττάρων. (++) ισχυρή έκφραση, (sub) μερική έκφραση και (var) ποικίλη έκφραση του εκάστοτε αντιγόνου στους κυτταρικούς πληθυσμούς.

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

Το CD45 είναι ένα πανλευκοκυτταρικό αντιγόνο που εκφράζεται με διαφοροποίηση σε διαφορετικούς πληθυσμούς λευκοκυττάρων και η ανάλυση της έκφρασης του σε συνδυασμό με τον πλάγιο σκεδασμό (SSC) παρέχει μια απλή και αναπαραγωγίμη μέθοδο για την οριοθέτηση (gating) των κύριων κυτταρικών πληθυσμών στο μυελό των οστών και το περιφερικό αίμα. Τα λεμφοκύτταρα εμφανίζουν έντονο CD45 και χαμηλό SSC, τα μονοκύτταρα έντονο CD45 και αυξημένο SSC και κοκκιοκύτταρα μέτριο CD45 και υψηλό SSC. Σε δείγματα BM οι επιπλέον πληθυσμοί περιλαμβάνουν βλάστες (μέτριο CD45 και χαμηλό SSC), αιματογόνια (μέτριο CD45, πολύ χαμηλό SSC) και πλασματοκύτταρα (αρνητικό CD45 και χαμηλό ή ενδιάμεσο SSC). Δεδομένου ότι οι κακοήθεις πληθυσμοί δεν παρουσιάζουν πάντα τυπικές ιδιότητες έκφρασης αντιγόνου ή σκέδασης φωτός και δεν εμπίπτουν σε συγκεκριμένη πύλη (gate), η ανάλυση FC θα πρέπει επίσης να περιλαμβάνει αξιολόγηση της έκφρασης αντιγόνου σε ανοιχτό (ungated) πλαίσιο [82].

## 4.2. ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΒΛΑΣΤΩΝ- ΜΟΝΟΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΔΙΑΦΟΡΟΠΟΙΗΣΗ

Η αναγνώριση των βλαστών (και των ισοδύναμων κυττάρων) με κυτταρομετρία ροής (FC) είναι πολύ σημαντική στη διάγνωση και ταξινόμηση οξείας λευχαιμίας, μυελοδυσπλαστικών συνδρόμων (MDS), μυελοϋπερπλαστικών νεοπλασμάτων (MPN) και σε διαφορική διάγνωση κυττάρων με "βλαστικά" μορφολογικά χαρακτηριστικά. Οι βλάστες και τα κύτταρα με "βλαστική" μορφολογία περιλαμβάνουν:

- Μυελοβλάστες (συμπεριλαμβανομένων των μονοβλαστών, προμονοκυττάρων, προμυελοκυττάρων, μεγακαρυοβλαστών και ερυθροβλαστών)
- Λεμφοβλάστες
- Βλαστικά πλασματοκυτταροειδή δενδριτικά κύτταρα (BPDCN)
- Πλασμαβλάστες

Οι μυελοβλάστες χαρακτηρίζονται συνήθως από έκφραση CD117 και / ή CD34, HLA-DR, CD133, CD13, CD33 και CD38. Η έκφραση του CD45 είναι μέτρια και έχουν χαμηλό SSC. Οι υποομάδες των μυελοβλαστών μπορεί να είναι θετικές για TdT, CD123, CD71, CD7, CD2, CD19, CD56 και CD11c. Περιστασιακές περιπτώσεις μπορεί να είναι HLA-DR-αρνητικές.

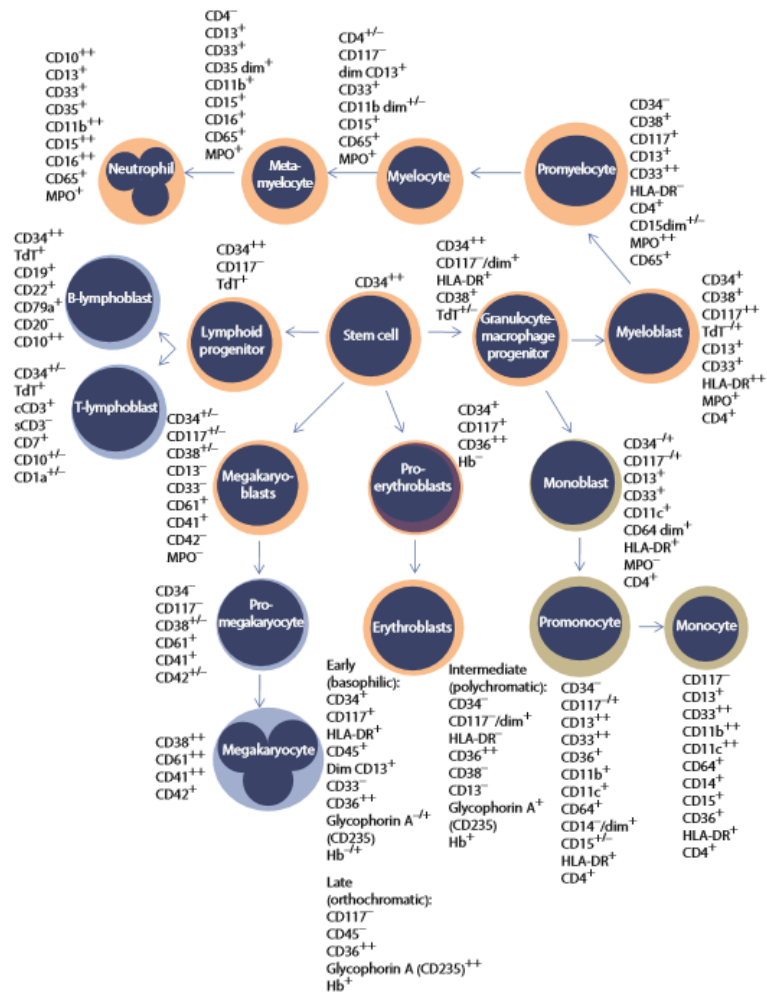
Οι μονοβλάστες χαρακτηρίζονται από θετικό CD64 (μέτριας ή υψηλής έκφρασης), συνήθως εντονότερη έκφραση CD45 σε σχέση με τους μυελοβλάστες, θετικό HLADR, CD11b, CD11c, CD4, CD36, και συχνά θετικό CD2, CD56, CD71 και / ή CD123. Η έκφραση του CD14 κυμαίνεται από θετική (υψηλή), ετερογενή (ποικίλη), μέτρια ή μερική έως εντελώς αρνητική, ανάλογα με τον βαθμό ωρίμανσης (οι ανώριμοι μονοβλάστες είναι συνήθως CD14-). Η έκφραση του CD11b, αν και συχνά θετική, μπορεί να είναι μερική, μέτρια ή ποικίλη. Σπάνιες περιπτώσεις μπορεί να είναι θετικές για τους βλαστικούς δείκτες (CD34 και / ή CD117).

Η μονοκυτταρική διαφοροποίηση μπορεί να κατηγοριοποιηθεί με τρία στάδια: μονοβλάστες, προμονοκύτταρα και μονοκύτταρα. Οι πρώιμοι μονοβλάστες εκφράζουν τα CD34, CD117 και HLA-DR. Οι ώριμοι μονοβλάστες αρχίζουν να χάνουν το CD34 και γίνονται CD4 +. Καθώς τα κύτταρα ωριμάζουν σε προμονοκύτταρα, η έκφραση του CD117 αρχίζει να μειώνεται, το CD34 χάνεται και

τα κύτταρα αρχίζουν να αποκτούν την έκφραση CD64, CD15, CD11b και CD11c. Τα ώριμα προνοκύτταρα είναι θετικά για το CD14. Η έκφραση των CD11b, CD11c, CD14, CD64 και HLA-DR γίνεται πιο έντονη καθώς τα μονοκυτταροειδή κύτταρα γίνονται πιο ώριμα. Η έκφραση του CD14 είναι ισχυρότερη στα ώριμα κύτταρα (μονοκύτταρα). Σε αντίθεση με την διαφοροποίηση των ουδετερόφιλων, η έκφραση του CD11b τυπικά προηγείται του CD15 και η έκφραση του HLA-DR διατηρείται. Τα ώριμα μονοκύτταρα στο αίμα είναι θετικά για CD11b, CD11c, CD13, CD14, CD33 και CD64. Μικρά υποσύνολα μονοκυττάρων μπορεί να είναι CD16 + και CD56 + (ο πληθυσμός CD16 + μπορεί να αυξηθεί σε βακτηριακές ή ιικές λοιμώξεις). Τα μονοκύτταρα δημιουργούν μακροφάγα ιστών, οστεοκλάστες (οστά), κύτταρα Langerhans (δέρμα, άλλα), κύτταρα Kupfer (ήπαρ) και δενδριτικά κύτταρα (δέρμα, άλλα).

Στην παρακάτω εικόνα φαίνεται η έκφραση αντιγόνων των κυριότερων κυτταρικών τύπων κατά την διαδικασία της φυσιολογικής αιμοποίησης [83], [84].





Εικόνα 4.1. Έκφραση αντιγόνων κατά τη φυσιολογική αιμοποίηση

### 4.3 FC ΣΤΑ MDS

Η FC παρέχει χρήσιμες πληροφορίες στη διαχείριση ασθενών με MDS και μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την αξιολόγηση του αριθμού των βλαστών και / ή για την ανίχνευση βλαστών με παρεκκλίνοντα ανοσοφαινότυπο, για την αναγνώριση των χαρακτηριστικών της δυσπλασίας σε πρόδρομα κύτταρα και για την απόκλιση άλλων διαταραχών που έχουν μερικά κοινά χαρακτηριστικά με τα MDS (π.χ. οξεία λευχαιμία, λέμφωμα, τριχωτή λευχαιμία, κλπ). Συμπεριλαμβάνεται αξιολόγηση των πρόδρομων ερυθροκυττάρων για την εκτίμηση της δυερυθροποίησης αν και αυτά λύνονται μαζί με τα ερυθρά αιμοσφαίρια κατά την προετοιμασία του δειγματος. Επίσης, σε μερικές περιπτώσεις είναι δυνατή η ανίχνευση άωρων κυττάρων της ερυθράς σειράς, που δεν λύνονται εύκολα.

Η FC είναι ιδιαίτερα χρήσιμη όταν κατά την εξέταση της μορφολογίας δεν έχει ανιχνευθεί αυξημένο ποσοστό βλαστών ή δακτυλιοειδών σιδηροβλαστών και η κυτταρογενετική ανάλυση έχει αποκαλύψει φυσιολογικό καρυότυπο. Οποιαδήποτε απόκλιση από το πρότυπο φυσιολογικής ωρίμανσης, που προσδιορίζεται από την FC μπορεί να σχετίζεται με δυσκοκκιοποίηση και είναι χρήσιμη για τον καθορισμό της διάγνωσης του MDS.

Όλα τα κυτταρικά χαρακτηριστικά, που ανιχνεύει η κυτταρομετρία ροής μπορεί να υπάρχουν σε μια υποομάδα κυττάρων ή σε ολόκληρο τον πληθυσμό. Τα MDS εμφανίζουν ποικιλία διαταραχών και όχι μια μοναδική αντιγονική διαταραχή και η ένταση της ανώμαλης έκφρασης είναι επίσης μεταβλητή αλλά συχνά συσχετίζεται με το βαθμό μυελοδυσπλασίας [85]. Οι διαταραχές που μπορούν να εντοπιστούν από την FC σε ασθενείς με MDS περιλαμβάνουν:

- Μειωμένος πλάγιος σκεδασμός (SSC) των κοκκιοκυττάρων
- Παρεκκλίνων ανοσοφαινότυπος κοκκιοκυττάρων/ μυελικών κυττάρων (έκτοπη έκφραση CD10, CD11b, CD13, CD14, CD15, CD16, CD33, CD45, CD56, CD64, CD66, και/ ή HLA-DR)
- Ασύγχρονη μετατόπιση προς τα αριστερά κοκκιοκυττάρων/ μυελικών κυττάρων και μη φυσιολογικό πρότυπο ωρίμανσης (άτυπη έκφραση CD11b έναντι CD13, CD11b έναντι HLA-DR, CD11b έναντι CD16, και/ ή CD13 έναντι CD16)
- Παρουσία CD34, CD117, και / ή HLA-DR σε κοκκιοκύτταρα
- Ανώμαλος φαινότυπος μονοκυττάρων (μη φυσιολογική έκφραση CD2, CD5, CD7, CD11b, CD11c, CD13, CD14, CD15, CD16, CD33, CD34, CD36, CD45, CD56, CD117, και/ ή HLA-DR)
- Αυξημένος αριθμός άωρων κυττάρων μυελικής σειράς (>3%)
- Μη φυσιολογικός φαινότυπος βλαστών (μη φυσιολογική έκφραση CD2, CD5, CD7, CD11b, CD13, CD15, CD19, CD33, CD34, CD56, CD65, CD117, HLA-DR, και TdT)
- Μειωμένος αριθμός αιματογονίων
- Αυξημένος ή μειωμένος αριθμός μονοκυττάρων (συγκριτικά με τα λεμφοκύτταρα)
- Αυξημένος SSC των μονοκυττάρων

- Μειωμένη αναλογία μυελοειδών/ λεμφοειδών (<1)
- Παρουσία μικρού κλώνου PNH

#### 4.4 FC ΣΤΗ CMML

Τα νεοπλασματικά μονοκύτταρα σε CMML έχουν τον φαινότυπο ώριμων μονοκυττάρων με έντονη έκφραση CD11b, CD11c, CD13, CD14, CD15, CD33, CD45 και CD64. Στην πλειοψηφία των περιπτώσεων τα μονοκύτταρα εκφράζουν HLA-DR (~77%), CD56 (~73%), and CD4 (~83%), και ένα μικρό υποσύνολο των περιπτώσεων είναι θετικό για CD2 (~48%), CD7 (~8%), CD10 (~17%), CD16 (~31%), και CD23 (~23%). Η ανώμαλη έκφραση του CD14 (αρνητική, ποικίλη ή μερική έκφραση) παρατηρείται σε ~ 15% των περιπτώσεων. Ο ανώμαλος φαινότυπος των μονοκυττάρων, συμπεριλαμβανομένων της μέτριας έντασης του CD45 (6,3%), έκτοπης έκφρασης HLA-DR (μερική ή ποικίλη, 12,6%), θετικού CD56 (16,7%), θετικού CD16 (31,3%), θετικού CD23 (22,9%), μέτριας ή ποικίλης έκφρασης CD64 (8,4%), CD13 (20,9%), CD11b (4,2%) και / ή μερικής έκφρασης του CD14 (12,5%) παρατηρείται στην πλειοψηφία των περιπτώσεων CMML (93,7%).

Πρόσθετα χαρακτηριστικά της CMML κατά την ανάλυση με FC περιλαμβάνουν ανίχνευση βλαστών στην κυκλοφορία (<20%), αυξημένο αριθμό βλαστών στο BM (<20%), έλλειψη ή μειωμένο αριθμό αιματογονίων και / ή φαινοτυπική ατυπία των κοκκιοκυττάρων (έκφραση CD56, μειωμένο πλάγιο σκεδασμό και μειωμένη έκφραση CD10, CD11b, CD13, και / ή CD16). Ο αριθμός των CD34+ βλαστών στο BM κυμαίνεται από 0,2% έως 12% (προσδιορίζεται με ανάλυση FC), με διάμεσο ποσοστό 1,25%. Παρόμοια με το MDS, οι βλάστες σε CMML εμφανίζουν συχνά αποκλίσεις στην φαινοτυπική ανάλυση, συμπεριλαμβανομένης αυξημένης έντασης έκφρασης των CD117, CD123, CD33 και CD34, και / ή παρουσία δεικτών της λεμφικής σειράς (CD19, CD7, CD56, CD2 ή CD5)

Αν και πολλές από τις φαινοτυπικές ανωμαλίες των μονοκυττάρων που υπάρχουν στην CMML μπορεί να παρατηρηθούν και σε αντιδραστικές μονοκυτταρώσεις, οι αλλαγές που παρατηρούνται σε καλοήθεις συνθήκες είναι συνήθως πολύ λιγότερο έντονες και αφορούν ένα μικρό πληθυσμό μονοκυττάρων.

Ανοσοφαινοτυπικά υπάρχει αλληλοεπικάλυψη μεταξύ οξείας μονοκυτταρικής λευχαιμίας και CMML. Παραδείγματος χάριν, το CD56 εκφράζεται και στα δύο νοσήματα, έχει όμως αναφερθεί έκφραση του CD2 σε 47% και 34% των περιπτώσεων CMML, αλλά μόνο στο 14% στις οξείες μονοκυτταρικές λευχαιμίες. Σύμφωνα με μελέτες συνέκφραση του CD56 με μειωμένη έκφραση μυελικών δεικτών όπως CD13, CD15, CD36 και HLA-DR είναι χαρακτηριστική των μονοκυττάρων της CMML [86], [87].

### **Νεότερες εξελίξεις στη διάγνωση CMML με κυτταρομετρία ροής**

Μέχρι πρόσφατα, παρά τις προσπάθειες και την ανίχνευση των παθολογικών επιφανειακών δεικτών, ατομικών ή πολλαπλών, που προσφέρει η κυτταρομετρία ροής, δεν οδήγησε σε διαγνωστικό έλεγχο για CMML με υψηλή ευαισθησία και ειδικότητα. Η διάγνωση βασίζεται στα κλινικοεργαστηριακά ευρήματα.

Μια νέα ερευνητική προσπάθεια, επικεντρώνεται στη διακριτή κατανομή των μονοκυτταρικών υποπληθυσμών στην CMML. Με βάση την έκφραση CD14 και CD16, τα κυκλοφορούντα μονοκύτταρα μπορούν να διαχωριστούν σε τρία υποσύνολα, κλασσικό (CD14++CD16-), ενδιάμεσο (CD14+CD16 +), και μη κλασσικό (CD14- CD16 +), όπως έχει αναφερθεί στο κεφάλαιο των μονοκυττάρων (Κεφάλαιο 2).

Τα τελευταία χρόνια, αρκετές μελέτες έχουν δείξει ότι αλλαγές στις εκατοστιαίες αναλογίες των μονοκυτταρικών υποσυνόλων, μπορούν να διαφοροποιήσουν τα περιστατικά CMML τόσο από τα φυσιολογικά δείγματα ελέγχου, τις αντιδραστικές μονοκυτταρώσεις όσο και από άλλες αιματολογικές κακοήθειες. Από μελέτες έχει φανεί ότι υπάρχει αυξημένο ποσοστό της υποομάδας των κλασσικών μονοκυττάρων στο περιφερικό αίμα και το μυελό των οστών των ασθενών με CMML σε σύγκριση με τους υγιείς μάρτυρες και τους ασθενείς με άλλες αιματολογικές κακοήθειες και ότι η τιμή cutoff >94% των μονοκυττάρων αυτών στο αίμα, μπορεί να διακρίνει περιπτώσεις CMML με ευαισθησία > 90% και ειδικότητα > 95% [88].

Ενδιαφέρον παρουσιάζουν επίσης τα συμπεράσματα ότι η αύξηση των κλασσικών μονοκυττάρων γίνεται εις βάρος του πληθυσμού των μη κλασσικών στη CMML. Πρόσφατα έχει δειχθεί σε μελέτες, ότι το μειωμένο ποσοστό μη κλασσικών μονοκυττάρων όπως ένα αυξημένο ποσοστό κλασσικών, θα μπορούσε να

χρησιμοποιηθεί για τον εντοπισμό περιπτώσεων CMML με ευαισθησία και ειδικότητα τουλάχιστον συγκρίσιμες με εκείνες του αυξημένου ποσοστού των κλασικών. Μάλιστα, ένα μειωμένο ποσοστό μη κλασικών μονοκυττάρων έδειξε καλύτερη ευαισθησία από ότι ένα αυξημένο κλασικών, τόσο σε δείγματα αίματος όσο και μυελού των οστών. Αυτό οφείλεται, τουλάχιστον εν μέρει, στη συνύπαρξη, σε πολλές περιπτώσεις, της CMML με αυτοάνοσα, με φλεγμονώδεις διαταραχές ή μολυσματικές ασθένειες που μπορούν να οδηγήσουν σε αύξηση των ενδιάμεσων μονοκυττάρων και ταυτόχρονη μείωση των κλασικών, με αποτέλεσμα τη λανθασμένη ταξινόμηση αυτών ως αρνητικές σύμφωνα με το επί τοις εκατό ποσοστό των κλασικών μονοκυττάρων (ψευδώς αρνητικές). Έτσι, ο συνυπολογισμός μειωμένου ποσοστού μη κλασικών μαζί με το αυξημένο ποσοστό κλασικών θα μπορούσε να εξαλείψει αυτές τις ψευδώς αρνητικές περιπτώσεις [89], [90].

Δύο πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι τα ποσοστά των μονοκυτταρικών υποπληθυσμών θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν για τη διάγνωση CMML σε περιπτώσεις μυελού των οστών, αν και με ελαφρώς χαμηλότερη τιμή cutoff για το ποσοστό των κλασικών μονοκυττάρων (90% και 93% αντίστοιχα). Επίσης, το % ποσοστό κλασικών μονοκυττάρων θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί για την παρακολούθηση της ανταπόκρισης στη θεραπεία σε ασθενείς με CMML, καθώς αυτό φαίνεται να κανονικοποιείται στις CMML περιπτώσεις, που έχουν αντιμετωπιστεί αποτελεσματικά [89], [91].

#### **4.5 FC ΣΤΗΝ ΟΞΕΙΑ ΜΥΕΛΟΜΟΝΟΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΛΕΥΧΑΙΜΙΑ**

Η ανάλυση περιστατικών AMML με κυτταρομετρία ροής, αποκαλύπτει δύο διαφορετικούς πληθυσμούς: βλάστες (μέτρια ένταση CD45 και χαμηλό SSC) και μονοκύτταρα (έντονο CD45 και ελαφρώς αυξημένο SSC). Το μονοκυτταρικό στοιχείο είναι θετικό για CD11b, CD11c, CD13, CD14, CD33, CD64 και HLA-DR ενώ, οι μυελοβλάστες είναι θετικοί για CD13, CD33, CD34, CD117 και HLA-DR. Ένα υποσύνολο των περιπτώσεων δείχνει έκφραση CD2, CD7, CD34 και CD56 από μονοκύτταρα. Η έκφραση του CD34 από μονοκύτταρα είναι σπάνια ενώ, η έκφραση του CD56 είναι λιγότερο συχνή στα νεοπλασματικά μονοκύτταρα της AMML συγκριτικά με τα μονοκύτταρα είτε από χρόνια μυελομονοκυτταρική

λευχαιμία (CMML) είτε από οξεία μονοβλαστική λευχαιμία (~ 26% σε AMML έναντι 70% σε CMML και 86% σε οξεία μονοβλαστική λευχαιμία) . Ο μονοκυτταρικός πληθυσμός από την AMML συνήθως δεν εμφανίζει παρεκκλίνουσα έλλειψη CD11b, CD14 και HLA-DR ή θετικότητα για CD16, CD23 και CD117, που παρατηρούνται συχνότερα σε οξεία μονοβλαστική λευχαιμία και CMML [77], [92].

#### **4.6 FC ΣΤΗΝ ΟΞΕΙΑ ΜΟΝΟΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΛΕΥΧΑΙΜΙΑ**

Όλες οι περιπτώσεις οξείας μονοκυτταρικής λευχαιμίας είναι θετικές για τα CD45 και CD33. Η έκφραση CD45 είναι συχνά έντονη, αλλά ένα υποσύνολο των περιπτώσεων παρουσιάζει μέτρια έκφραση (παρόμοια με βλάστες σε άλλους τύπους AML). Το CD33 είναι πιο συχνά έντονο. Η πλειοψηφία των περιπτώσεων είναι θετική για CD11c (~ 99%), CD64 (~ 98%), HLA-DR (~ 92%), CD4 (~ 92%) και CD11b (~ 89%). Το CD13 είναι θετικό σε 80% των περιπτώσεων (με την πλειοψηφία αυτών των περιπτώσεων να δείχνει είτε μέτριας έντασης έκφραση είτε μόνο ένα υποσύνολο κυττάρων θετικό). Άλλοι μυελικοί δείκτες συχνά θετικοί περιλαμβάνουν το CD15 και CD65. Σε αντίθεση με τα καλοήγη μονοκύτταρα που έχουν έντονη έκφραση CD14, τα λευχαιμικά κύτταρα στην οξεία μονοβλαστική λευχαιμία είναι συχνά αρνητικά για το CD14 (44%). Μεταξύ των CD14+, περιπτώσεων, η έκφραση είναι συχνά παρούσα μόνο σε ένα υποσύνολο (~ 15%) και μόνο το ~ 20% των περιπτώσεων έχουν μέτρια και / ή έντονη έκφραση CD14. Το CD56 είναι θετικό στο ~ 77% των περιπτώσεων. Ένα υποσύνολο των περιπτώσεων δείχνει θετική έκφραση CD2, CD7, CD10, και / ή CD23. Οι βλαστικοί δείκτες (CD34 και CD117) σπάνια εκφράζονται. Στον παρακατω πίνακα φαίνονται τα ανοσοφαινοτυπικά χαρακτηριστικά των μονοκυτταρικών πληθυσμών στις οξεία μονοκυτταρική, οξεία μυελομονοκυτταρική και χρόνια μυελομονοκυτταρική λευχαιμία [77], [92].

Πίνακας 4.2. Ανοσοφαινοτυπικά χαρακτηριστικά μονοκυττάρων σε οξεία μονοκυτταρική, χρόνια μυελομονοκυτταρική και οξεία μυελομονοκυτταρική λευχαιμία.

| Marker | Acute monocytic leukemia (AML-M5) (% positive)                | Chronic myelomonocytic leukemia (% positive) | Monocytic population in acute myelomonocytic leukemia (AML-M4) (% positive) |
|--------|---|--|---|
| CD2    | 14  | 34   | 40  |
| CD4    | 93  | 76   | 100   |
| CD7    | 21  | 9  | 40  |
| CD10   | 7   | 28   | 0   |
| CD11b  | 75  | 100  | 100   |
| CD11c  | 100   | 100  | 100   |
| CD13   | 78  | 95   | 100   |
| CD14   | 18 (additional 36% shows positive expression in small subset) | 100  | 100   |
| CD16   | 4   | 29   | 0   |
| CD23   | 32  | 9  | 0   |
| CD33   | 100   | 100  | 100   |
| CD34   | 14  | 0  | 26  |
| CD45   | 100 (moderate/bright)   | 100 (bright)                                 | 100 (bright)  |
| CD56   | 86  | 53   | 26  |
| CD64   | 89  | 100  | 100   |
| CD117  | 25  | 5  | 0   |
| HLA-DR | 96  | 71   | 100   |

## **5. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ**

Η μελέτη μονοκυτταρικών πληθυσμών σε επιλεγμένα κακοήθη αιματολογικά νοσήματα μέσω πολυπαραμετρικής κυτταρομετρίας ροής αποτελεί τον σκοπό της παρούσας διπλωματικής εργασίας. Διερευνάται η διαφοροποίηση των ανοσοφαινοτυπικών χαρακτηριστικών των μονοκυττάρων, σε ασθενείς με πιθανή CMML σε σύγκριση με την ομάδα ομάδα ελέγχου (μάρτυρες) καθώς και σε σύγκριση με ασθενείς, που εμφανίζουν αντιδραστική μονοκυττάρωση. Επιπλέον, γίνεται σύγκριση των αποτελεσμάτων από την ανάλυση με κυτταρομετρία ροής με τα αποτελέσματα λοιπών κλινικοεργαστηριακών εξετάσεων για τη διερεύνηση της χρήσης κυτταρομετρίας ροής στην ορθή διάγνωση της χρόνιας μυελομονοκυτταρικής λευχαιμίας.

Η πειραματική διαδικασία περιλαμβάνει των προσδιορισμό μονοκυτταρικών πληθυσμών με χρήση έξι φθορίζουσών ουσιών σε δείγματα πιθανής CMML και αντιδραστικών μονοκυτταρώσεων σύμφωνα με το πρωτόκολλο εργασίας του European Leukimia Net [93]. Για τον προσδιορισμό των μονοκυτταρικών πληθυσμών χρησιμοποιούνται δύο διαφορετικές μεθοδολογίες και συγκρίνονται τα αποτελέσματα μεταξύ αυτών.

## **6. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ**

### **6.1 ΒΙΟΛΟΓΙΚΟ ΥΛΙΚΟ**

Χρησιμοποιήθηκαν δείγματα μυελού των οστών (BM) και περιφερικού αίματος (PB) από ασθενείς που παραπέμφθηκαν στο εργαστήριο Κυτταρομετρίας Ροής του Γ.Ν.Α. «Ο Ευαγγελισμός» για ανοσοφαινοτυπική τυποποίηση. Τα δείγματα αφορούν ασθενείς με χρόνια μυελομονοκυτταρική λευχαιμία (CMML). Τα δείγματα από ασθενείς που εμφάνιζαν αυξημένο αριθμό μονοκυττάρων στο περιφερικό αίμα (αντιδραστική μονοκυττάρωση) προέρχονται από το Αιματολογικό τμήμα του Γ.Ν.Α. «Ο Ευαγγελισμός».

Ως ομάδα ελέγχου χρησιμοποιήθηκαν δείγματα κυρίως από γυναίκες με ιστορικό αυτόματων αποβολών, αγνώστου αιτιολογίας, και από ασθενείς με αντιδραστική λεμφοκυττάρωση, αλλά φυσιολογικό αριθμό μονοκυττάρων, που παραπέμφθηκαν στο εργαστήριο για ανοσοφαινοτυπική μελέτη περιφερικού αίματος.



Όλα τα δείγματα συλλέγονται σε πλαστικά σωληνάρια κενού των 4ml, με αντιπηκτικό K<sub>3</sub>EDTA. Η μεταφορά των βιολογικών δειγμάτων πραγματοποιείται σε θερμοκρασία δωματίου και κάθε δείγμα συνοδεύεται από συνοπτικό ατομικό ιστορικό και τα πρόσφατα κλινικοεργαστηριακά αποτελέσματα από τον έλεγχο του ασθενούς. Μετά την παραλαβή τα δείγματα επεξεργάζονται εντός 24 ωρών.

## 6.2 ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ ΚΑΙ ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ

- Flow-Check™ Fluorospheres: Πρότυπα Σφαιρίδια Οπτικής Ευθυγράμμισης
- Σφαιρίδια Flow-Set
- ImmunoTrol (μονιμοποιημένο πλήρες αίμα) της Beckman Coulter
- Μονοκλωνικά αντισώματα των Beckman Coulter, Becton Dickinson
- ISO Flow solution: Διάλυμα που χρησιμοποιείται για το σχηματισμό της ομοαξονικής ροής. Περιέχει: NaCl, KCl, K<sub>3</sub>EDTA και συντηρητικά.
- Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών αλάτων (Phosphate Buffered Saline, PBS), pH=7,2.
- FBS (Fetal Bovine Serum): Βόειος εμβρυϊκός ορός (4% FBS σε PBS)
- BD Pharm Lyse™ (1X): περιέχει χλωριούχο αμμώνιο (NH<sub>4</sub>Cl) για τη λύση των ερυθροκυττάρων
- VersaLyse Lysing Solution της Beckman Coulter για τη λύση των ερυθροκυττάρων
- ImmunoPREP

Από την ποικιλία αντιγόνων επιφανείας που εκφράζουν οι διάφοροι κυτταρικοί πληθυσμοί κατά τη διαφοροποίηση ( Clusters of Differentiation, CD), στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν τα CD7, CD45, CD24, CD56, CD14, CD16, CD64, CD36, CD15.

CD7: Είναι μια γλυκοπρωτεΐνη 40 kD που κωδικοποιείται από ένα γονίδιο που βρίσκεται στο χρωμόσωμα 17. Εκφράζεται σε αρχέγονα αιμοποιητικά κύτταρα, θυμοκύτταρα, T και NK κύτταρα, καθώς και σε πρόδρομα B κύτταρα. Στα κύτταρα T και NK το CD7 διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην ενεργοποίηση και ρύθμιση της παραγωγής κυτοκίνης και μεταξύ άλλων, δεσμεύει τη γαλεκτίνη και είναι απαραίτητο για τη μεσολαβούμενη από γαλεκτίνη απόπτωση .Το CD7 εμφανίζεται νωρίς κατά

την ωρίμανση των Τ λεμφοκυττάρων αλλά απουσιάζει από κάποια υποσύνολα αυτών.

CD45: Γνωστό επίσης ως κοινό αντιγόνο λευκοκυττάρων (LCA), είναι μια μεγάλη γλυκοπρωτεΐνη των 240 kD που κωδικοποιείται από ένα γονίδιο που βρίσκεται στον μακρύ βραχίονα του χρωμοσώματος 1. Εκφράζεται σε ώριμα και άωρα αιματοποιητικά κύτταρα με εξαίρεση αιμοπετάλια, ερυθροκύτταρα, στοιχεία που ανήκουν στην ερυθρά σειρά και εξαιρετικά ανώριμα αιματοποιητικά πρόδρομα κύτταρα. Το CD45 έχει ανιχνευθεί σε μεγακαρυοκύτταρα, σε οστεοκλάστες και σε ώριμα βασεόφιλα, όπου εκφράζεται σε ένταση χαμηλότερη από ότι στα λεμφοκύτταρα. Φωσφατάση τυροσίνης με βασικό ρόλο την αντιγονοεξαρτώμενη ενεργοποίηση των Β και Τ κυττάρων.

CD24: Είναι μια σιαλογλυκοπρωτεΐνη συνδεδεμένη με γλυκοζυλοφωσφατιδυλονοσιτόλη 42 kD, που κωδικοποιείται από ένα γονίδιο που βρίσκεται στο χρωμόσωμα 6. Δρα ως πρόσδεμα για την Ρ-σελεκτίνη και εκφράζεται σε Β κυττάρων. Το CD24 δεν εκφράζεται σε φυσιολογικά πλασματοκύτταρα αλλά έχει αναφερθεί σε νεοπλασματικά. Επίσης, το CD24 εκφράζεται σε ουδετερόφιλα, ηωσινόφιλα και υποσύνολο των θυλακικών δένδριτικών κυττάρων (FDC), αλλά απουσιάζει από βασεόφιλα, μαστοκύτταρα, μονοκύτταρα και αιμοποιητικά πρόδρομα κύτταρα. Όσον αφορά το επίπεδο εμφάνισής του κατά τη διάρκεια της μυελοειδούς ωρίμανσης, σύμφωνα με ορισμένους συγγραφείς εκφράζεται μετά το επίπεδο προμυελοκυττάρων, αλλά σύμφωνα με άλλους έχει ήδη εκφραστεί σε μυελοβλάστες.

CD56: Είναι μια γλυκοπρωτεΐνη των 180kD, που κωδικοποιείται από ένα γονίδιο που βρίσκεται στο χρωμόσωμα 11 και δρα ως μόριο προσκόλλησης νευρικών κυττάρων (NCAM). Αυτό το αντιγόνο εκφράζεται σε κύτταρα NK που ασκούν περιορισμένη κυτταροτοξικότητα καθώς σε ένα υποσύνολο περιφερικών Τ κυττάρων με κυτταροτοξική δράση. Το CD56 έχει επίσης ανιχνευθεί σε έναν υποπληθυσμό μονοκυττάρων (CD14++CD64+CD16-). Αυτό παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον αφού η έκφραση CD56 στα μονοκύτταρα θεωρείται συνήθως παθογενής και σχετίζεται με μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα και χρόνιες μυελουπερπλαστικές ασθένειες.

CD14: Είναι μια γλυκοπρωτεΐνη 55 kD που κωδικοποιείται από ένα γονίδιο που βρίσκεται στο χρωμόσωμα 5. Το CD14 είναι μεμβρανική γλυκοπρωτεΐνη συνδεδεμένη με γλυκοζυλο-φωσφατιδυλοϊσοσιτόλη και συμπεριφέρεται ως υποδοχέας για το σύμπλεγμα LPS / LBP που αποτελείται από βακτηριακό λιποπολυσακχαρίτη (LPS) και την ειδική του πρωτεΐνη ορού, δηλαδή την πρωτεΐνη δέσμευσης λιποπολυσακχαριτών (LBP).

Το CD14 εκφράζεται έντονα σε μονοκύτταρα, ενώ απουσιάζει από προμονοκύτταρα ή εκφράζεται σε χαμηλότερη ένταση. Μια μικρή υποομάδα μονοκυττάρων που χαρακτηρίζεται από χαμηλότερη έκφραση των CD11b και CD33, υψηλότερη έκφραση των HLA-DR και CD45, θετικότητα για CD16 και μειωμένες τιμές σκέδασης, εμφανίζει επίσης ασθενή έκφραση του CD14. Το CD14 εκφράζεται σε μακροφάγα, κυψελιδικά μακροφάγα, περιτοναϊκά μακροφάγα και κύτταρα Kupffer. Σε ουδετερόφιλα, το CD14 εκφράζεται σε μια ένταση που αντιστοιχεί σε 3000 μόρια ανά κύτταρο και μπορεί η έκφρασή του να αυξηθεί από τη θεραπεία με G-CSF και τη σήψη.

CD16: Διαμεμβρανική γλυκοπρωτεΐνη τύπου I, 50-80 kD. Υπάρχει σε δύο ισομορφές που κωδικοποιούνται από δύο διαφορετικά γονίδια στον μακρύ βραχίονα του χρωμοσώματος 1 και αποτελεί τμήμα του υποδοχέα III του Fc τμήματος της IgG που δεσμεύει ανοσοσυμπλέγματα. Εκφράζεται σε NK κύτταρα, μακροφάγα, μαστοκύτταρα και σε υποπληθυσμό μονοκυττάρων καθώς και ενεργοποιημένα μονοκύτταρα.

CD64: Είναι διαμεμβρανική γλυκοπρωτεΐνη (72 kDa) τύπου I και κωδικοποιείται από ένα γονίδιο που εδράζεται στο χρωμόσωμα 1. Δρα ως υποδοχέας του Fc τμήματος της IgG στη φαγοκυττάρωση, στην αντιγονοπαρουσίαση και στην έκκριση κυτοκινών και ενεργών μορφών O<sub>2</sub>. Σε περιφερικό αίμα, το CD64 εκφράζεται από μονοκύτταρα και μακροφάγα αλλά δεν εκφράζεται από βασεόφιλα ή κύτταρα Langerhans.

CD36: Γλυκοπρωτεΐνη (85 kDa) που εκφράζεται στα ώριμα μονοκύτταρα, μακροφάγα, ενδοθηλιακά κύτταρα και αιμοπαιθία. Συμμετέχει στην αναγνώριση και φαγοκυττάρωση αποπτωτικών κυττάρων, διευκολύνει τη συσσωμάτωση των αιμοπεταλίων και παρουσιάζει πεπτιδία στους υποδοχείς TLR2,6 της έμφυτης ανοσίας.

**CD15:** Είναι μία τρισακχαριδική δομή 3-φουκοζυλ-N-ακετυλολακτοζαμίνης (3-FAL) και συμμετέχει σε διαδικασίες προσκόλλησης κυττάρου προς κύτταρο. Παράγεται μέσω φουκοζυλίωσης πολυλακτοζαμίνης που διεξάγεται από κάποια φουκοζυλ-τρανσφεράση. Το CD15 εκφράζεται με σταδιακά μειούμενη ένταση σε ουδετερόφιλα, ηωσινόφιλα, CD14++CD16- μονοκύτταρα και σε ένα υποσύνολο βασεόφιλων, αλλά όχι σε μαστοκύτταρα ή CD14+CD16+ μονοκύτταρα.

Τα μονοκλωνικά αντισώματα (mAbs) που χρησιμοποιήθηκαν στην πειραματική διαδικασία προέρχονται από της εταιρίες Beckman Coulter και Becton Dickinson (BD). Για το panel των μονοκυτταρώσεων και των περισσότερων περιστατικών με υποψία CMML στον κυτταρομετρητή Navios EX της Beckman Coulter, χρησιμοποιήθηκε εξαπλός φθορισμός με συνδυασμό APC-A700 (APC-Alexa Fluor 700), PE (Phycoerythrin), PB (Pacific Blue), PC7 (Phycoerythrin-Cyanin 7), KrO (Krome Orange) και PC5.5 (Phycoerythrin-Cyanin 5.5). Για τα ίδια δείγματα, που αναλύθηκαν στον κυτταρομετρητή BD FACS CANTO II της BD χρησιμοποιήθηκε επίσης εξαπλός φθορισμός και ο συνδυασμός FITC (Fluorescein Isothiocyanate), PE (Phycoerythrin), BV421 (BD Horizon Brilliant™ Violet 421), PE-Cy™7 (Phycoerythrin-Cyanin 7), APC (Allophycocyanin), BD Horizon™ V500. Τέλος, σε αρκετά περιστατικά CMML χρησιμοποιήθηκε πενταπλός φθορισμός και ο συνδυασμός FITC (Fluorescein Isothiocyanate), PE (Phycoerythrin), ECD (Phycoerythrin-Texas Red-x), PC5 (Phycoerythrin-Cyanin 5), PC7 (Phycoerythrin-Cyanin 7) και η ανάλυση τους έγινε στους κυτταρομετρητές Navios και Navios EX της Beckman Coulter. Τα mAbs όπως και τα διαλύματα διατηρούνται σε θερμοκρασία συντήρησης στο ψυγείο. Στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 6.1) φαίνονται τα μονοκλωνικά αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν στην πειραματική διαδικασία μαζί με τις συνδεδεμένες σε αυτά φθορίζουσες ουσίες.

*Πίνακας 6.1. Μονοκλωνικά αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν στην πειραματική διαδικασία.*

| Beckman Coulter |            | BD           |
|-----------------|------------|--------------|
| CD7- APC A700   | CD36 FITCH | CD7-FITCH    |
| CD24- PE        | CD64- PE   | CD24- PE     |
| CD16- PB        | CD16- ECD  | CD16- BV421  |
| CD14- PC7       | CD14- PC5  | CD14- PE-CY7 |
| CD45- KrO       | CD45- PC7  | CD45- V500   |
| CD56- PC5,5     |            | CD56- APC    |

### 6.3 ΑΝΑΛΩΣΙΜΑ

- Ρύγχη για πιπέτες όγκου 10 και 100 μl, 1000μl
- Πιπέτες τύπου Pasteur
- Πλαστικά σωληνάρια αιμοληψίας των 4ml με K<sub>3</sub>EDTA
- Πλαστικά σωληνάρια των 5 ml, κατάλληλα για κυτταρομετρία ροής
- Πλαστικά σωληνάρια των και 50 ml τύπου Falcon
- Φίλτρα διήθησης μυελού (100μm διάμετρος πόρων)

### 6.4 ΟΡΓΑΝΑ

- Κυτταρομετρητής ροής NAVIOS της Beckman Coulter
- Κυτταρομετρητής ροής NAVIOS EX της Beckman Coulter
- Κυτταρομετρητής ροής FC 500 της Beckman Coulter
- Κυτταρομετρητής ροής BD FACS CANTO II της BD Biosciences
- Σύστημα λύσης ερυθροκυττάρων QPrep
- Φυγόκεντρος της Heraeus της Thermo Scientific
- Μηχανικός αναδευτήρας (Vortex) της AXION
- Υδατόλουτρο 37<sup>o</sup> C Techne
- Αυτόματες πιπέτες ακριβείας των 10 μL, 20 μL, 50 μL, 100 μL, 1000MI
- Κοινό ψυγείο συντήρησης και κατάψυξης

Η μελέτη των μονοκυττάρων σε δείγματα περιφερικού αίματος έγινε με δύο διαφορετικές μεθόδους. Η μία μέθοδος (μέθοδος BC) περιλάμβανε έξι μονοκλωνικά αντισώματα συνδεδεμένα με φθορίζουσες ουσίες και ανάλυση των δειγμάτων στους κυτταρομετρητές Navios και Navios EX της εταιρίας Beckman Coulter, ενώ η άλλη μέθοδος (μέθοδος BD) περιλάμβανε επίσης έξι μονοκλωνικά αντισώματα συνδεδεμένα με φθορίζουσες ουσίες και ανάλυση των δειγμάτων στον κυτταρομετρητή BD FACS Canto II της εταιρίας BD Biosciences. Τα μονοκλωνικά αντισώματα με τις αντίστοιχες συνδεδεμένες φθορίζουσες ουσίες διαφέρουν μεταξύ των δύο μεθόδων και περιγράφονται παρακάτω. Η ανάλυση δειγμάτων μυελού έγινε σύμφωνα με την μέθοδο BC. Οι κυτταρομετρητές Navios παρέχουν τη δυνατότητα μέτρησης έως 10 παραμέτρων με χρήση τριών laser (ερυθρό με λ διέγερσης 488nm, κυανό με λ διέγερσης 638 nm και ιώδες με λ διέγερσης 405 nm). Κατά τη διάρκεια

της πειραματικής διαδικασίας η ταχύτητα ροής του εναιωρήματος ρυθμίστηκε στο High και μετρήθηκαν τουλάχιστον 50000 έως 100000 ungated events. Τα αποτελέσματα των μετρήσεων αποθηκεύονται σε αρχεία LMD του προγράμματος listmode του λογισμικού επεξεργασίας του οργάνου. Για την περαιτέρω επεξεργασία των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό KALUZA της εταιρίας Beckman Coulter [94].

Το οπτικό σύστημα του κυτταρομετρητή BD FACS Canto II περιλαμβάνει πηγή διέγερσης αποτελούμενη από δύο ή τρία laser (κυανό 488nm ψυχόμενο, ερυθρό He-Ne 633nm, ιώδες 405nm). Κατά τη διεξαγωγή των αναλύσεων η ταχύτητα ροής του εναιωρήματος ρυθμίστηκε στο medium και μετρήθηκαν 20000 ungated events. Τα αποτελέσματα των μετρήσεων αποθηκεύονται σε αρχεία FCS και για την περαιτέρω επεξεργασία τους χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό Infinicyt της εταιρίας Cytognos S.L [95].

Για τον εσωτερικό και εξωτερικό έλεγχο ποιότητας του εργαστηρίου χρησιμοποιήθηκε και ο κυτταρομετρητής FC 500 της Beckman Coulter που υποστηρίζει την δυνατότητα ανάλυσης πενταπλού φθορισμού και χρησιμοποιεί ένα (κυανό 488nm laser [94].

Το σύστημα για τη λύση των ερυθρών, Coulter Qprep αποτελεί μια αυτόνομη μονάδα που χρησιμοποιείται για τη μελέτη των λευκοκυττάρων χρησιμοποιώντας ολικό αίμα ή μυελό των οστών, χωρίς πλύσιμο, διατηρώντας την ακεραιότητα τους και τα φυσικά σκεδαστικά χαρακτηριστικά τους. Το σύστημά του διακρίνεται σε 2 μέρη: σε αυτό που ελέγχει την προετοιμασία του δείγματος και σε αυτό που διεξάγει τη λύση των ερυθροκυττάρων. Το πρώτο περιλαμβάνει έναν φορητό πολυδειγματολήπτη (carousel) 32 θέσεων, αισθητήρα, και συσκευή ελέγχου της θέσεως των σωληναρίων, αναμικτήρα και ηλεκτρονικό χρονόμετρο. Το δεύτερο περιλαμβάνει το χώρο αποθήκευσης των αντιδραστηρίων λύσης των ερυθροκυττάρων, συστήματα μεταφοράς των αντιδραστηρίων, συμπιεστή αέρα (air compressor) καθώς και δοχείο αποβλήτων. Ο χρόνος επεξεργασίας για κάθε σωληνάριο υπολογίζεται σε  $40 \pm 4$  sec. Πρόκειται για ένα πλήρως αυτοματοποιημένο όργανο που επιτυγχάνει σημαντική μείωση κόστους από άποψη αντιδραστηρίων, χρόνου προετοιμασίας των δειγμάτων και απώλειας των κυττάρων.

Η λύση των ερυθροκυττάρων και η μονιμοποίηση των λευκοκυττάρων πραγματοποιείται μέσω 3 αντιδραστηρίων:

α) ImmunoPREP™ A: Λειτουργεί ως αντιδραστήριο λύσης των ερυθρών αιμοσφαιρίων. Περιέχει Μυρμηκικό οξύ (HCOOH) 1,2 mg/L και σταθεροποιητή.

β) ImmunoPREP™ B: Λειτουργεί ως σταθεροποιητής των λευκοκυττάρων. Περιέχει ανθρακικό νάτριο (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) 6,0 g/L, χλωριώδες νάτριο (NaClO<sub>2</sub>) 14,5 g/L, θειικό νάτριο (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) 31,3 g/L και σταθεροποιητή.

γ) ImmunoPREP™ C: Αποτελεί το υλικό μονιμοποίησης της κυτταρικής μεμβράνης. Περιέχει παραφορμαλδεύδη (PFA) 10,0 g/L και ρυθμιστικό διάλυμα.

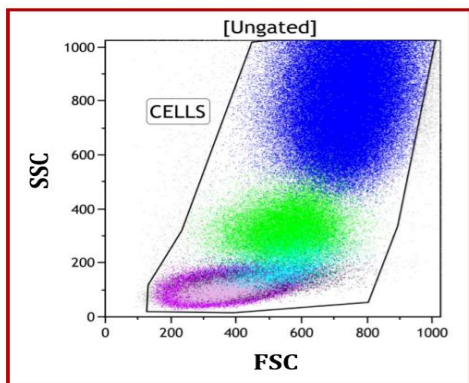
## **7. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΠΟΡΕΙΑ**

### **7.1 ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑ ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΩΝ- ΣΤΡΑΤΗΓΙΚΗ ΟΡΙΟΘΕΤΗΣΗΣ**

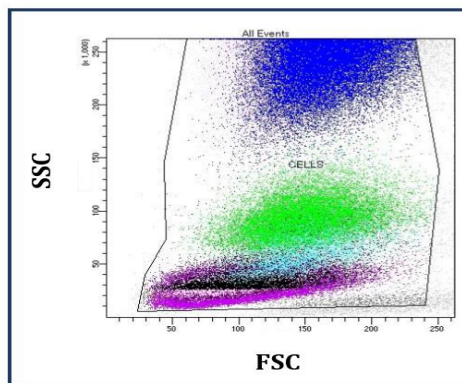
Σύμφωνα με το European Leukemia Net δημιουργήθηκαν σε Navios EX και BD FACS Canto II κατάλληλα πρωτόκολλα για την επιλογή των μονοκυτταρικών υποπληθυσμών ( κλασικά μονοκύτταρα cMo, ενδιάμεσα μονοκύτταρα iMo και μη κλασικά μονοκύτταρα ncMo). Η στρατηγική οριοθέτησης βασίστηκε στην εξαίρεση κυτταρικών πληθυσμών που μπορεί να επικαλύπτουν μονοκυτταρικούς υποπληθυσμούς. Παρακάτω παρουσιάζονται τα βήματα για την δημιουργία των πρωτοκόλλων αυτών.

Βήμα 1: Δημιουργία ενός διαγράμματος SSC/ FSC. Στο διάγραμμα αυτό επιλέγονται τα ζώντα κύτταρα (λεμφοκύτταρα, μονοκύτταρα, πολυμορφοπύρρηνα) εξαιρώντας τα θραύσματα ερυθροκυττάρων (debris).

**NAVIOS™ (Beckman-Coulter)**

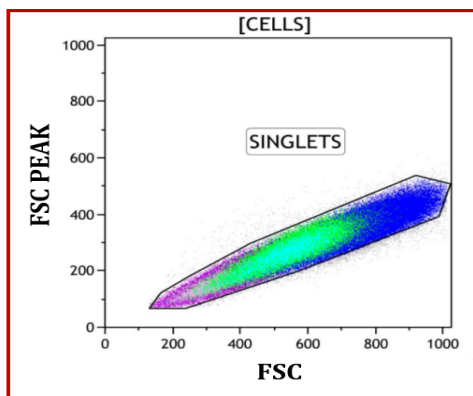


**BD FACSCanto™ II (Becton-Dickinson)**

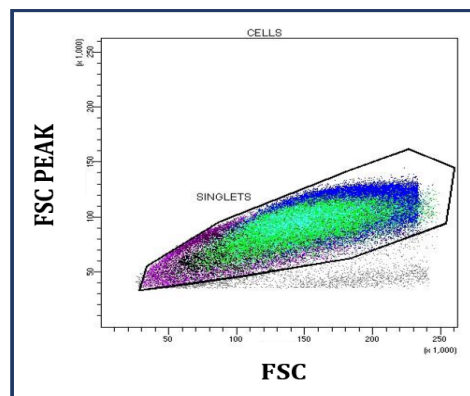


Βήμα 2: Σε ένα διάγραμμα FSC TIME/ FCS γίνεται οριοθέτηση των μοναδικών κυττάρων (singlets) εξαιρώντας τα κυτταρικά συσσωματώματα.

**NAVIOS™ (Beckman-Coulter)**

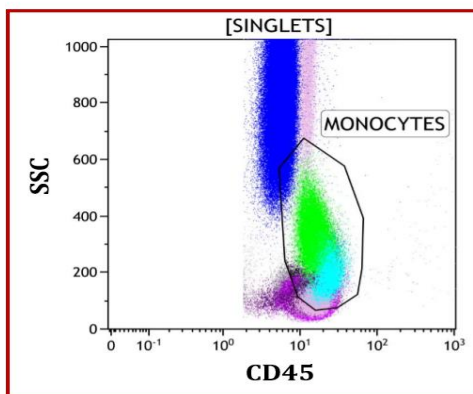


**BD FACSCanto™ II (Becton-Dickinson)**

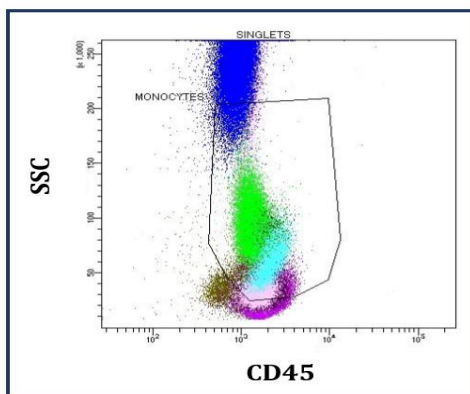


Βήμα 3: Σε διάγραμμα SSC/ CD45 οριοθετούνται με ένα αδρό όριο (gate) τα μονοκύτταρα. Τα μη επιθυμητά κύτταρα που θα συμπεριληφθούν πιθανά σε αυτό το gate εξαιρούνται παρακάτω.

**NAVIOS™ (Beckman-Coulter)**

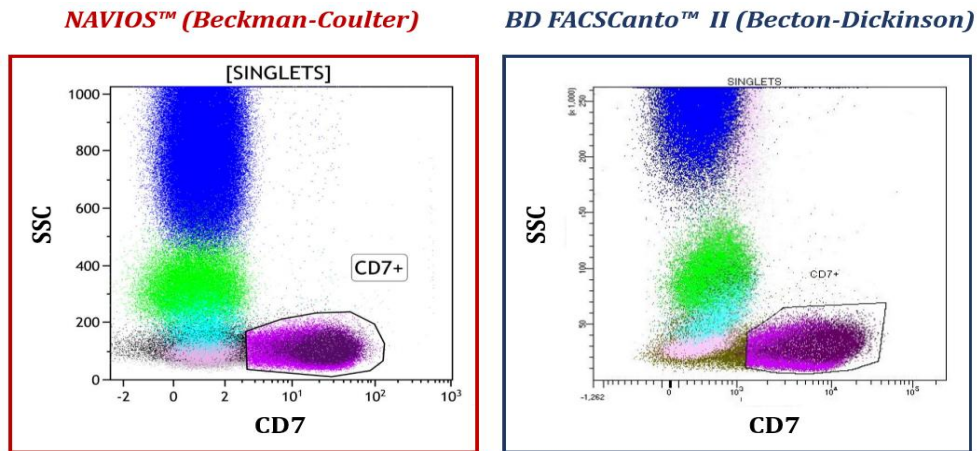


**BD FACSCanto™ II (Becton-Dickinson)**

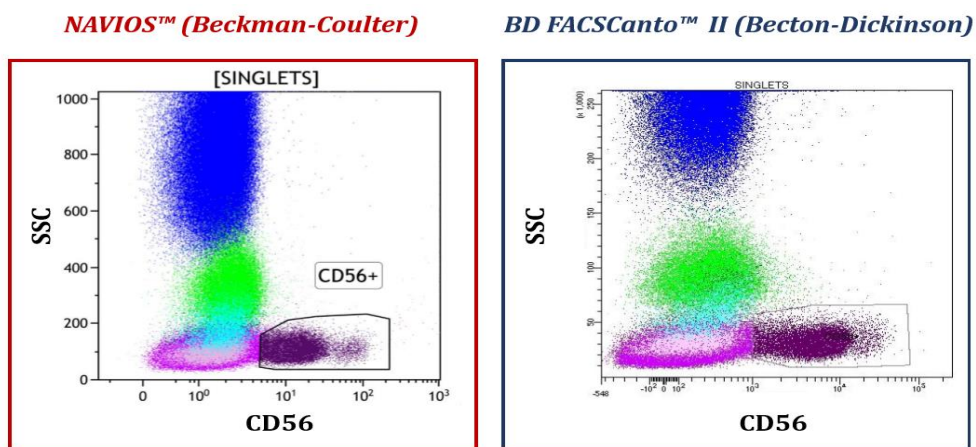




Βήμα 4: Σε διάγραμμα SSC/ CD7 οριοθετούνται τα λεμφοκύτταρα (έντονη έκφραση CD7 χαμηλό SSC).

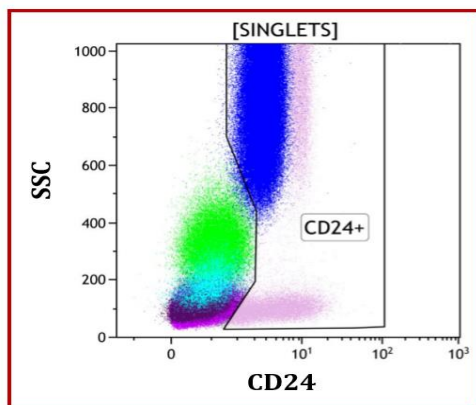


Βήμα 5: Από το διάγραμμα SSC/ CD56 γίνεται προσεκτική οριοθέτηση των NK κυττάρων χωρίς να συμπεριλαμβάνονται τα μονοκύτταρα που μπορεί να εκφράζουν CD56 σε παθολογικές καταστάσεις όπως στη CMML και στην αντιδραστική μονοκυττάρωση.

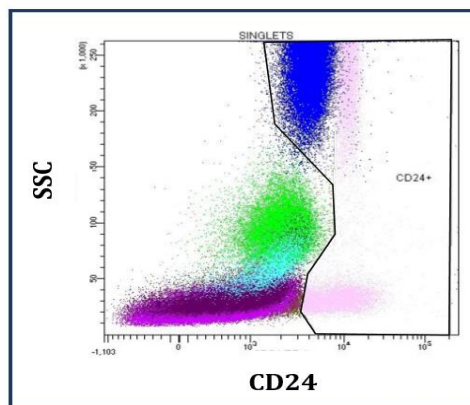


Βήμα 6: Σε διάγραμμα SSC/ CD24 οριοθετούνται τα Β λεμφοκύτταρα (χαμηλό SSC και CD24++) και τα ωριμα και άωρα κοκκικοκύτταρα (χαμηλό και υψηλό SSC και CD24++).

**NAVIOS™ (Beckman-Coulter)**

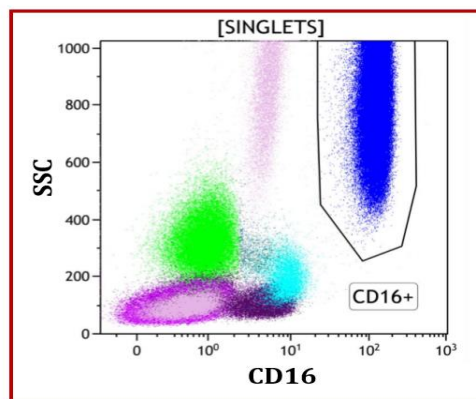


**BD FACSCanto™ II (Becton-Dickinson)**

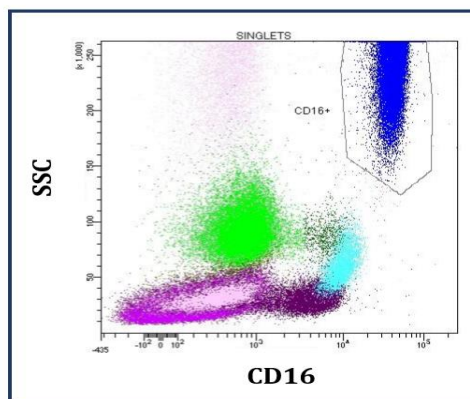


Βήμα 7: Σε διάγραμμα SSC/ CD16 γίνεται οριοθέτηση των υπολειπόμενων ουδετερόφιλων που μπορεί να μην συμπεριλήφθηκαν στο προηγούμενο βήμα.

**NAVIOS™ (Beckman-Coulter)**

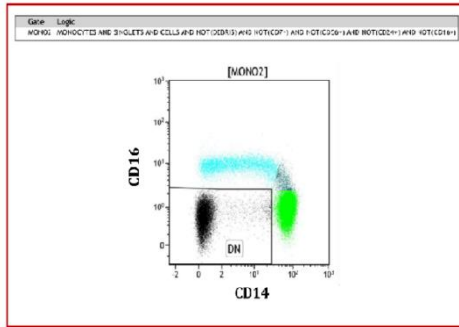


**BD FACSCanto™ II (Becton-Dickinson)**

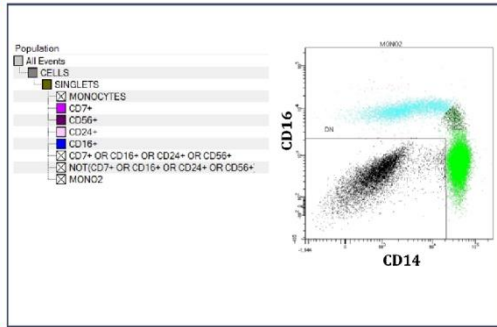


Βήμα 8: Κατασκευάζετε διάγραμμα CD16/ CD14. Με την boolean εξίσωση στον κυτταρομετρητή Navios EX, εξαιρούνται οι παραπάνω οριοθετημένοι CD7+, CD56+, CD24+, CD16+ πληθυσμοί από τον πληθυσμό των μονοκυττάρων, καταλήγοντας έτσι σε έναν αμιγή πληθυσμό μονοκυττάρων (MONO2). Ομοίως, χρησιμοποιώντας την ιεραρχική οριοθέτηση στον κυτταρομετρητή BD, δημιουργείται το gate MONO2. Από το MONO2 gate οριοθετούνται τα διπλά αρνητικά (CD14-/CD16- DN) τα οποία αποτελούν κυρίως βασεόφιλα και NK κύτταρα που δεν είχαν εξαιρεθεί με τα προηγούμενα βήματα.

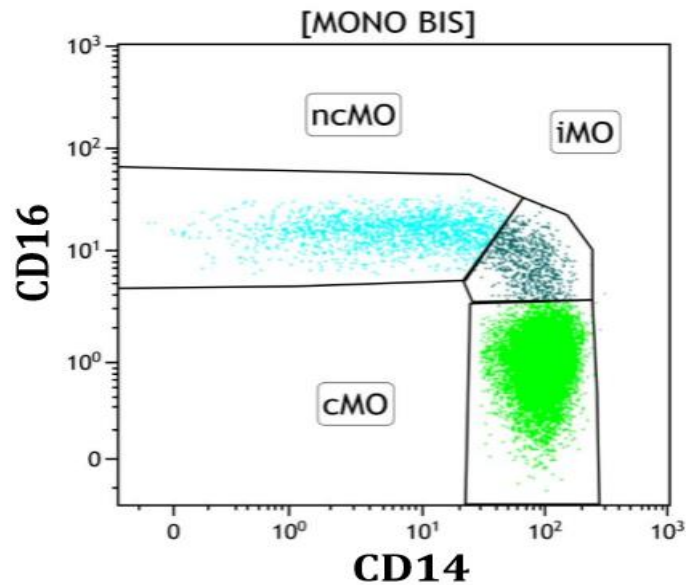
NAVIOS™ (Beckman-Coulter)



BD FACScanto™ II (Becton-Dickinson)



Βήμα 9: Όμοια με το βήμα 8, σε διάγραμμα CD16/ CD14 δημιουργείται ένα νέο gate (MONO BIS), από το οποίο έχουν εξαιρεθεί οι πληθυσμοί CD7+, CD56+, CD24+, CD16+ καθώς και DN από τον πληθυσμό των μονοκυττάρων. Τελικά, σε αυτό το τελευταίο βήμα οριοθετούνται τα τρία μονοκυτταρικά υποσύνολα (cMo, iMo, ncMo). Το άθροισμα των ποσοστών των τριών μονοκυτταρικών υποπληθυσμών θα πρέπει να υπερβαίνει το 99,5% για να είναι αξιόπιστη η προηγηθείσα οριοθέτηση.



Στα δείγματα που αναλύθηκαν με τον συνδυασμό CD36, CD64, CD16, CD14, CD45 στο διάγραμμα SSC/ CD45 έγινε αδρή οριοθέτηση των μονοκυττάρων. Στη συνέχεια, με βάση την έκφραση των CD36 και CD64 οριοθετήθηκε ένας πιο "καθαρός" πληθυσμός μονοκυττάρων και στο τελικό διάγραμμα CD16/ CD14 προσδιορίστηκαν οι τρεις μονοκυτταρικοί υποπληθυσμοί.

Σε ένα τυπικό δείγμα CMMML αναμένεται ποσοστό cMo >94% ενώ, στην περίπτωση αντιδραστικών μονοκυτταρώσεων και δειγμάτων ελέγχου το ποσοστό αυτό αναμένεται να είναι <94%.

## 7.2 ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ

Τα δείγματα που αναλύονται στην παρούσα διπλωματική εργασία είναι μυελός των οστών και περιφερικό αίμα. Τα δείγματα πρέπει να επεξεργαστούν μέσα σε 24h από την συλλογή τους. Για την προετοιμασία των δειγμάτων ακολουθήθηκαν 3 διαφορετικά πρωτόκολλα τα οποία προτείνονται από τις εταιρίες αγοράς των μονοκλωνικών αντισωμάτων.

### Πρωτοκολλο 1:

1. Το δείγμα του περιφερικού αίματος και το δείγμα μυελού των οστών συλλέγονται σε σωληνάρια γενικής αίματος που περιέχουν αντιπηκτικό. Στα δείγματα μυελού, πριν από οποιαδήποτε άλλη επεξεργασία, γίνονται συχνές αναρροφήσεις και απορρίψεις του δείγματος, εντός του σωληναρίου συλλογής, με την χρήση σύριγγας των 5ml η οποία διαθέτει αποσπώμενη βελόνα. Η διαδικασία αυτή ακολουθείται προκειμένου να διασπαστούν πήγματα, που πιθανά να περιέχονται στο δείγμα.

2. Σε δοκιμαστικό σωλήνα, με βάση το πρωτόκολλο, εισάγεται ο συνδυασμός των μονοκλωνικών αντισωμάτων συνδεδεμένων με φθορίζουσες ουσίες. Οι όγκοι που χρησιμοποιούνται απ' το κάθε μονοκλωνικό αντίσωμα είναι διαφορετικοί και λαμβάνονται με πιπέτες ακριβείας.

Για την ανάλυση στον κυτταρομετρητή Navios EX εισάγονται οι ακόλουθες ποσότητες μονοκλωνικών: 20μl CD24-PE και 10μl από τα CD7- A700, CD14- PC7, CD16- PB, CD45- KcO CD56- PC5,5.

3. Σε κάθε σωληνάριο προστίθενται 100 μl δείγματος περιφερικού αίματος ή μυελού των οστών.

4. Γίνεται ανάδευση του μίγματος με Vortex.

5. Ακολουθεί επώαση των δειγμάτων για 15-20 min σε θερμοκρασία δωματίου και στο σκοτάδι.

6. Στην συνέχεια γίνεται λύση των ερυθροκυττάρων με προσθήκη σε κάθε σωληνάριο 1ml Versalyse Lysing Solution της Beckman Coulter.

7. Επώαση για τουλάχιστον 10 min σε θερμοκρασία δωματίου και στο σκοτάδι.

8. Το δείγμα εισάγεται στον κυτταρομετρητή Navios EX για μέτρηση.

Στο παραπάνω πρωτόκολλο δεν ακολούθησε έκπλυση μετά την προσθήκη του λυτικού διότι παρατηρήθηκε ότι μετά την έκπλυση το ποσοστό των κλασικών μονοκυττάρων είναι ελαφρώς ελαττωμένο.

### Πρωτόκολλο 2:

Τα βήματα (1) και (2) είναι όμοια με αυτά που περιγράφονται ανωτέρω, στο πρωτόκολλο 1.

Για την ανάλυση στον κυτταρομετρητή BD εισάγονται οι ακόλουθες ποσότητες μονοκλωνικών: 20μl από τα CD7- FITC, CD24- PE και 5μl από τα CD16- BV421, CD14- PECY7, CD56- APC, CD45- V500.

3. Σε κάθε σωληνάριο προστίθενται 200 μl δείγματος περιφερικού αίματος ή μυελού των οστών και 2 ml 1x Lysing Solution της BD Biosciences για λύση των ερυθροκυττάρων

4. Γίνεται ανάδευση του μίγματος με Vortex.

5. Ακολουθεί επώαση των δειγμάτων για 15min σε θερμοκρασία δωματίου και στο σκοτάδι.

6. Φυγοκέντρηση στα 200g για 5 min.

7. Προσεκτική αναρρόφηση υπερκειμένου και προσθήκη 2 ml 1x FBS-PBS.

8. Φυγοκέντρηση στα 200g για 5 min.

9. Προσεκτική αναρρόφηση υπερκειμένου και επαναιώρηση του ιζήματος σε 0,5ml 1x FBS-PBS.

10. Το δείγμα εισάγεται στον κυτταρομετρητή BD FACS CANTO II για μέτρηση.

Στο συγκεκριμένο πρωτόκολλο μετά την επώαση με το λυτικό μέσο ακολουθεί έκπλυση καθώς διαπιστώθηκε ότι δεν επηρεάζεται το ποσοστό των κλασικών μονοκυττάρων.

### Πρωτοκολλο 3:

Τα βήματα (1) και (2) είναι όμοια με αυτά που περιγράφονται ανωτέρω, στο πρωτόκολλο 1.

Για την ανάλυση στους κυτταρομετρητές Navios και Navios EX εισάγονται 5μl από τα CD7- FITC, CD24- PE, CD16- ECD, CD14- PC5, CD45- PC7 και CD56- PC7 ή CD36- FITC, CD64- PE, CD16- ECD, CD14- PC5, CD45- PC7

σε δείγματα με πιθανότητα CMML.

3. Σε κάθε σωληνάριο προστίθενται 50 μl δείγματος περιφερικού αίματος ή μυελού των οστών.

4. Γίνεται ανάδευση του μίγματος με Vortex.

5. Ακολουθεί επώαση των δειγμάτων για 10 min και στην συνέχεια λύση των ερυθροκυττάρων και μονιμοποίηση του δείγματος. Η παραπάνω διαδικασία πραγματοποιείται αυτοματοποιημένα στο Coulter TQ- Prep με την χρήση του συστήματος αντιδραστηρίων ImmunoPREP™.

6. Το δείγμα εισάγεται στον κυτταρομετρητή ροής για μέτρηση

### **7.3 ΕΣΩΤΕΡΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ**

Εκτός από την μέτρηση των δειγμάτων, απαραίτητη είναι και η μέτρηση δειγμάτων ελέγχου (controls), για τον έλεγχο της αξιοπιστίας και της εγκυρότητας των μεθόδων που εφαρμόζονται σε ένα εργαστήριο κυτταρομετρίας ροής. Ως δείγματα ελέγχου χρησιμοποιούνται μονιμοποιημένα παρασκευάσματα περιφερικού αίματος, των οποίων το ποσοστό και ο απόλυτος αριθμός των κυττάρων που εκφράζουν ένα επιφανειακό δείκτη είναι γνωστά.

Στην παρούσα διπλωματική εργασία χρησιμοποιήθηκε το IMMUNO- TROL™ της Beckman Coulter. Το παραπάνω αντιδραστήριο έχει σχεδιαστεί για τη μέτρηση (ποσοστό και απόλυτος αριθμός) δεικτών της λεμφικής, μυελικής και

μονοκυτταρικής σειράς. Τα σκεδαστικά χαρακτηριστικά, η κατανομή του κυτταρικού πληθυσμού, η ένταση του φθορισμού και η αντιγονική πυκνότητα ανά κύτταρο προσομοιάζουν εκείνη του ολικού αίματος [96].

### **7.3.1 Μέτρηση λεμφοκυτταρικών υποπληθυσμών με τετραπλό φθορισμό**

Για τη μέτρηση T, B και NK λεμφοκυττάρων, ετοιμάζονται δύο σωληνάρια με τους ακόλουθους συνδυασμούς μονοκλωνικών αντισωμάτων:

- 1) CD45- FITC, CD4- PE, CD8- ECD, CD3- PC5
- 2) CD45- FITC, CD16/ CD56- PE, CD19- ECD, CD3- PC5

Αρχικά, προστίθενται σε κάθε σωληνάριο 10μl για κάθε ένα από τα μονοκλωνικά αντισώματα και στη συνέχεια 100μl παρασκευάσματος IMMUNO- TROL™ . Ακολουθεί ανάδευση του περιεχομένου με την χρήση vortex, επώαση για 10min σε θερμοκρασία δωματίου και λύση των ερυθροκυττάρων στο T- Qprep. Μετά την προσθήκη 100μl σφαιριδίων (για μέτρηση του απόλυτου αριθμού) τα δείγματα είναι έτοιμα προς μέτρηση.

Ακολοθώντας την ίδια διαδικασία παρασκευάζονται τα επόμενα δύο σωληνάρια για τον έλεγχο των δεικτών της μυελικής σειράς με πενταπλό φθορισμο:

- 1) CD7- FITC, CD2- PE, CD5- ECD, CD22- PC5, CD45-PC7
- 2) CD33- FITC, HLA-DR- PE, CD13- ECD, CD14- PC5, CD45- PC7

### **7.3.2 Μέτρηση λεμφοκυτταρικών υποπληθυσμών με εξαπλό φθορισμό**

Για τη μέτρηση χρησιμοποιούνται ειδικά σχεδιασμένα σωληνάρια ( BD Trucount™ Tubes) στον κυτταρομετρητή BD FACS Canto II. Τα σωληνάρια αυτά, περιέχουν ξηρό ίζημα με γνωστό αριθμό φθοριζόντων σφαιριδίων. Κατά την προετοιμασία προστίθενται 20μl αντιδραστηρίου (μίγμα έξι διαφορετικά σημασμένων μονοκλωνικών αντισωμάτων), 50μl αίματος από υγιή δότη, γίνεται ανάδευση με vortex και το δείγμα επωάζεται για 15min σε θερμοκρασία δωματίου και σκοτάδι. Για την λύση των ερυθροκυττάρων, γίνεται προσθήκη 450μl FACS lysing solution

(αραίωση 1:10 με dH<sub>2</sub>O). Το δείγμα αναδεύεται και επωάζεται για 15min σε θερμοκρασία δωματίου και σκοτάδι.

Για τον προσδιορισμό του απόλυτου αριθμού των κυττάρων συγκρίνεται ο αριθμός των συμβάντων (events) μεταξύ κυττάρων και σφαιριδίων. Αν και συνήθως η τελική τιμή προκύπτει μέσω ειδικού λογισμικού, ο υπολογισμός αυτής προκύπτει από το γινόμενο του λογου των events των κυττάρων προς εκείνο των σφαιριδίων με τη συγκέντρωση των σφαιριδίων[97].

### **7.3.3 Έλεγχος κλωνικότητας B λεμφοκυττάρων**

Η εκτίμηση της κλωνικότητας των B λεμφοκυττάρων βασίζεται στη σχέση μεταξύ των κ και λ ελαφρών αλύσεων των ανοσοσφαιρινών. Υπό φυσιολογικές συνθήκες, στον άνθρωπο ο λόγος κ/λ είναι περίπου 2:1 ενώ παθολογικές τιμές του λόγου παρατηρούνται σε πλασματοκυτταρικές δυσκρασίες και λεμφοϋπερπλαστικά σύνδρομα [98].

Κατά την πειραματική διαδικασία, σε ένα σωληνάριο κυτταρομετρίας ροής προστίθενται 100μl παρασκευάσματος IMMUNO- TROL™ και 3ml PBS. Το δείγμα φυγοκεντρείται (400g, 5min), απορρίπτεται το υπερκείμενο και το ίζημα επαναιωρείται σε PBS για δεύτερη φυγοκέντρωση. Το υπερκείμενο απορρίπτεται και προστίθεται NH<sub>4</sub>Cl (2ml, αραίωση 1:10). Ακολουθεί ισχυρό vortex για τη μηχανική λύση των ερυθροκυττάρων και το δείγμα επωάζεται για 10min. Έπειτα, προστίθεται 1ml PBS και γίνεται φυγοκέντρωση (300g, 5min). Γίνεται μια ακόμη έκπλυση με PBS και αφού απορριφθεί το υπερκείμενο, στο ίζημα προστίθεται 10μl αντιδραστηρίου που περιέχει τον συνδυασμό K- FITC/ L- PE/ CD19- ECD. Το δείγμα επωάζεται με τα παραπάνω μονοκλωνικά αντισώματα για 15min στους 4°C. Τέλος, γίνεται φυγοκέντρωση με 3ml PBS, απορρίπτεται το υπερκείμενο και προστίθενται 500μl παραφορμαλδεΐδης (PFA).

## **7.4 ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ**

Μετά την ανάλυση των δειγμάτων περιφερικού αίματος και μυελού στους κυτταρομετρητές NAVIOS, NAVIOS EX της Beckman Coulter και BD FACS CANTO



Η της BD Biosciences ακολούθησε επεξεργασία των αποτελεσμάτων με το λογισμικό Kaluza™ της Beckman Coulter και Infinicyt™ της Cytognos. Στα LMD αρχεία που προέκυψαν από την ανάλυση περιστατικών στους κυτταρομετρητές NAVIOS και NAVIOS EX έγινε περαιτέρω επεξεργασία με το Kaluza™, ενώ για τα FCS αρχεία που προέκυψαν από την ανάλυση στον κυτταρομετρητή BD FACS CANTO II χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό Infinicyt™.

Αρχικά, δημιουργήθηκε και για τα δύο λογισμικά ένα πρωτόκολλο εργασίας σύμφωνα με την στρατηγική οριοθέτησης που προτείνεται από το European Leukemia Net. Το πρωτόκολλο αυτό είναι όμοιο με το πρωτόκολλο για την αρχική ανάλυση των δειγμάτων στους κυτταρομετρητές και περιγράφεται λεπτομερώς σε προηγούμενο υποκεφάλαιο. Μεταφέροντας με τον κέρσορα ένα οποιοδήποτε LMD ή FCS αρχείο στο πρωτόκολλο που έχει δημιουργηθεί σε κάθε λογισμικό, εμφανίζεται η ανάλυση σύμφωνα με το πρωτόκολλο αυτό.

## **7.5. ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ**

Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων για τα ποσοστά των κλασικών, ενδιάμεσων και μη κλασικών μονοκυττάρων που προέκυψαν από την ανάλυση με τα δύο παραπάνω λογισμικά, πραγματοποιήθηκε με το στατιστικό πακέτο για τις κοινωνικές επιστήμες (Statistical Package for the Social Sciences, SPSS). Αναλύθηκαν 52 (με λογισμικό Kaluza) και 37 (με λογισμικό Infinicyt) δείγματα περιφερικού αίματος και ελέγχθηκε η συμφωνία μεταξύ των αποτελεσμάτων από την κυτταρομετρία ροής και αυτών που προέκυψαν από τις υπόλοιπες κλινικοεργαστηριακές εξετάσεις. Το ίδιο έγινε για 19 δείγματα μυελού των οστών. Ακόμη, σε 10 ασθενείς που παραμέμφθηκαν στο εργαστήριο με πιθανότητα διάγνωσης χρόνιας μυελομονοκυτταρικής λευχαιμίας έγινε ανάλυση δείγματος περιφερικού αίματος και μυελού. Επειδή, η κατανομή των δειγμάτων δεν ακολουθεί κανονική κατανομή, για τις συγκρίσεις χρησιμοποιήθηκαν μη παραμετρικές δοκιμασίες. Για τη σύγκριση ομάδας ατόμων που πάσχουν από ΧΜΜΛ με την ομάδα ατόμων που δεν φέρουν το νόσημα χρησιμοποιήθηκε το Mann Whitney U test. Για τη συσχέτιση ποιοτικών μεταβλητών χρησιμοποιήθηκε η δοκιμασία  $\chi^2$ . Για τις κατά ζεύγη μετρήσεις στον κάθε ασθενή χρησιμοποιήθηκε η δοκιμασία του Wilcoxon για παρατηρήσεις κατά ζεύγη (Wilcoxon Signed- Rank Test) και η

σύγκριση των μέσων όρων από τα ποσοστά των διαφόρων μονοκυτταρικών πληθυσμών έγινε με συσχετισμένο έλεγχο t (Dependent t-test ή Paired Samples t-test). Οι διαφορές μεταξύ των ομάδων αξιολογούνται με το κριτήριο p- value (p) με επίπεδο σημαντικότητας  $p= 0.05$  (5%).

Η κατανομή κλασικών μονοκυττάρων μεταξύ ασθενών και σε σύγκριση με τους μαρτυρες παρουσιάζεται με θηκογράμματα (box plots). Σε κάθε θηκόγραμμα, η κάτω βάση του ορθογωνίου αντιστοιχεί στο πρώτο τεταρτημόριο (Quartile 1, Q1) και η άνω στο τρίτο τεταρτημόριο (Quartile 3, Q3). Η διάμεσος ( $\delta$ ) ή δεύτερο τεταρτημόριο είναι η παράλληλη προς τις βάσεις ευθεία εντός του ορθογωνίου. Η θέση της διαμέσου καθορίζει σε ποιο τεταρτημόριο βρίσκονται οι περισσότερες παρατηρήσεις. Το πλαίσιο του θηκογράμματος αντιπροσωπεύει το ενδοτεταρτημοριακό εύρος (InterQuartile Range, IQR= Q3- Q1). Εάν υπάρχουν παρατηρήσεις έξω από το εύρος των οριακών τιμών, αυτές ονομάζονται εξωτερικές τιμές και συμβολίζονται με τελεία (\*). Επίσης, κατασκευάστηκαν ROC καμπύλες για τους τρεις διαφορετικούς μονοκυτταρικούς πληθυσμούς. Η καμπύλη δημιουργείται με τη γραφική αναπαράσταση του πραγματικού θετικού ποσοστού (TPR- True Positive Rate), έναντι του ποσοστού ψευδών θετικών (FPR- False Positive Rate) σε διάφορα σημεία διαχωρισμού. Το πραγματικό θετικό ποσοστό είναι γνωστό ως «ευαισθησία», ενώ το ψευδώς θετικό ποσοστό είναι γνωστό ως 1-ειδικότητα (se- sensitivity), όπου ως ειδικότητα (sp- specificity) ορίζεται το πραγματικά αρνητικό ποσοστό. Η καμπύλη ROC είναι συνεπώς η se σε σχέση με την 1-sp. Η περιοχή κάτω από την καμπύλη (area under curve) αντιπροσωπεύει την πιθανότητα ένας διαγνωστικός έλεγχος να διαχωρίσει ορθά ένα τυχαίο ζεύγος, ενός ατόμου με την παρουσία του συμβάντος και ενός ατόμου με την απουσία του συμβάντος. Λαμβάνει τιμές από 0 έως 1, και όσο μεγαλύτερη είναι η τιμή του εμβαδού κάτω από την καμπύλη, τόσο μεγαλύτερη είναι η ακρίβεια του διαγνωστικού ελέγχου.

-Τιμές 0,90-1. Εξαιρετικός διαχωρισμός.

-Τιμές 0,80-0,90. Καλός διαχωρισμός.

-Τιμές 0,70-0,80. Σχετικά καλός διαχωρισμός.

-Τιμές 0,60-0,70. Φτωχός διαχωρισμός.

-Τιμές 0,50-0,60. Ο διαγνωστικός έλεγχος αποτυγχάνει να κάνει ορθό διαχωρισμό.

-Τιμές 0-0,50. Ο διαχωρισμός λειτουργεί προς την αντίθετη κατεύθυνση.

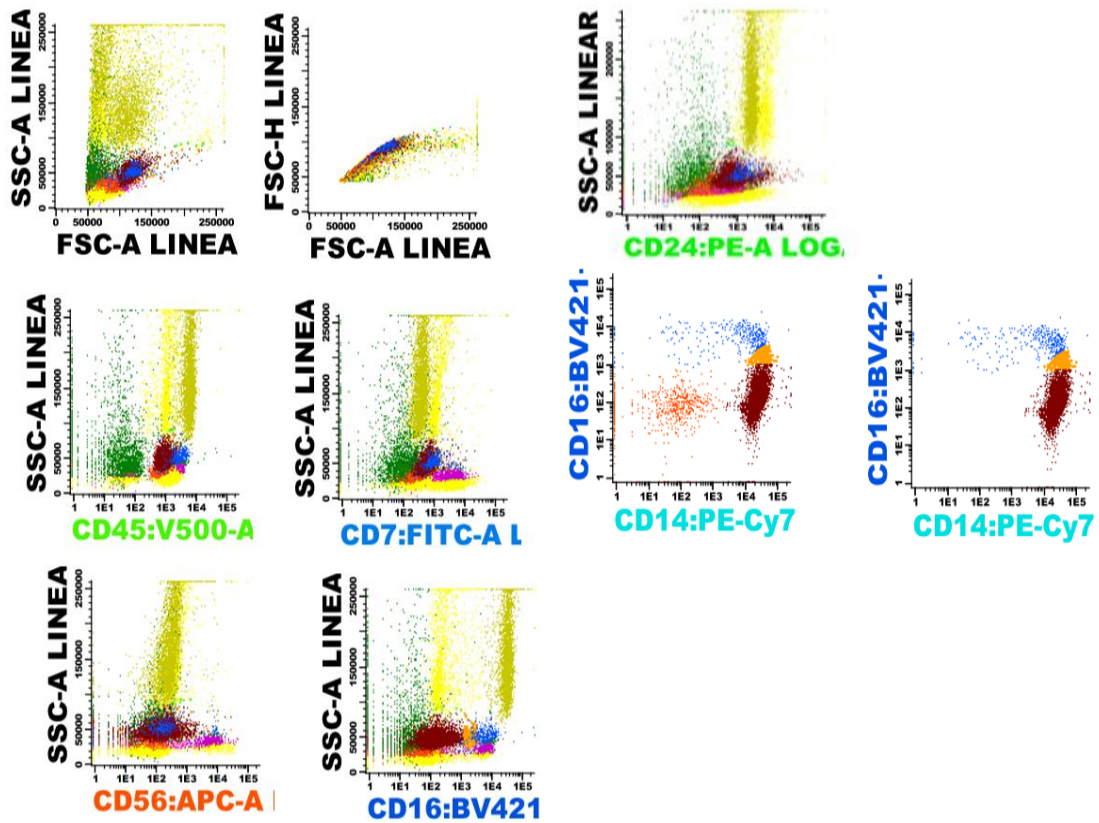
Τέλος, η συχνότητα εμφάνισης των διαφορετικών ποσοστών των κλασικών μονοκυττάρων τόσο στην ομάδα των ασθενών όσο και στην ομάδα των μαρτύρων παρουσιάζεται με το αντίστοιχο ραβδόγραμμα συχνοτήτων.

## **8. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ**

Στην παρούσα μελέτη προσδιορίζονται τα ποσοστά των μονοκυτταρικών υποπληθυσμών σε δείγματα περιφερικού αίματος και μυελού των οστών. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, στο ανθρώπινο περιφερικό αίμα και με βάση την έκφραση των δεικτών επιφανείας CD14 και CD16, ταυτοποιούνται τα τρία λειτουργικά διαφορετικά υποσύνολα μονοκυττάρων: CD14+CD16-(κλασικά), CD14+CD16+(ενδιάμεσα) και CD14+lowCD16+(μη κλασικά). Τα κλασικά αντιπροσωπεύουν περίπου το 85% του συνολικού πληθυσμού των μονοκυττάρων σε υγιείς ενώ η αύξηση του ποσοστού αυτού (>94.0%) σε δείγμα περιφερικού αίματος, μπορεί να θέσει τη διάγνωση της ΧΜΜΛ.

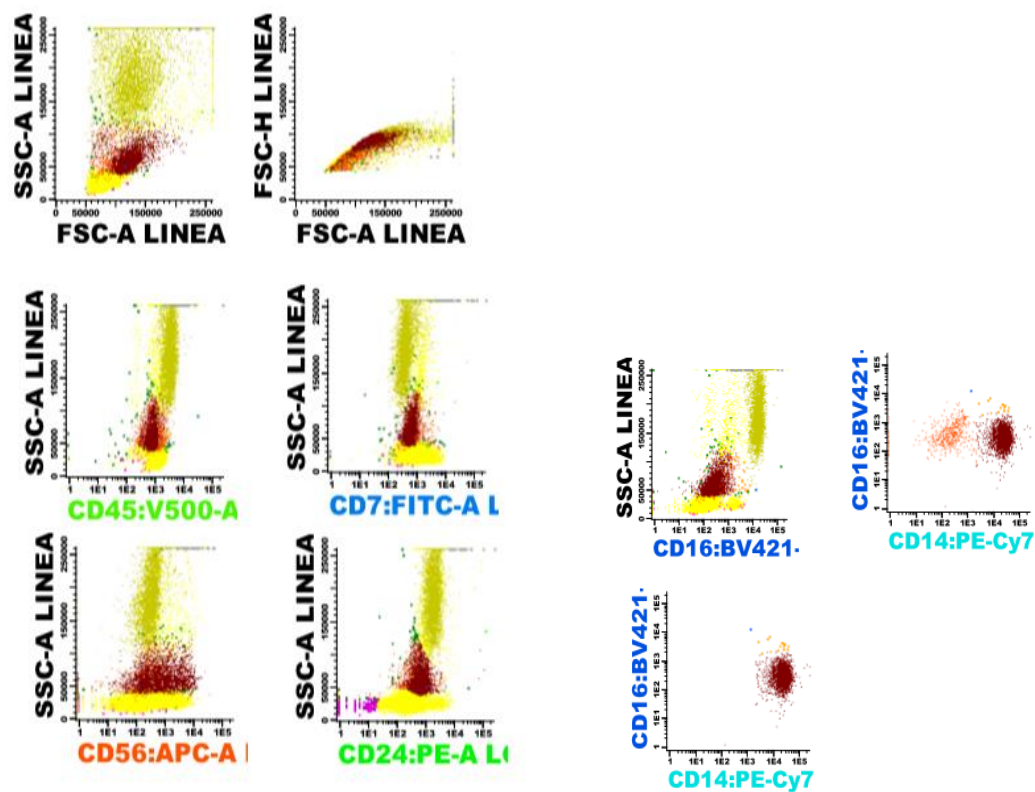
Παρακάτω παρουσιάζεται η στατιστική ανάλυση των ποσοστών των μονοκυτταρικών υποπληθυσμών, ατόμων που παραπέμφθηκαν στο εργαστήριο ως ασθενείς με πιθανότητα ΧΜΜΛ. Τα ποσοστά προέρχονται από επεξεργασία με τα λογισμικά Kaluza™ και Infinicyt™ και γίνεται σύγκριση των αποτελεσμάτων αυτών με τα κλινικοεργαστηριακά αποτελέσματα για την ύπαρξη ή όχι ΧΜΜΛ.

Στις αμέσως επόμενες εικόνες, φαίνονται οι ανοσοφαινότυποι από την ανάλυση περιφερικού αίματος ενός υγιούς ατόμου και ενός ατόμου που πάσχει από ΧΜΜΛ. Οι εικόνες είναι ενδεικτικές των αναλύσεων με το λογισμικό Infinicyt και το λογισμικό Kaluza και τα πρωτόκολλα των αναλύσεων είναι αυτά που προτείνονται από το ELN. Επίσης, παρατίθενται εικόνες από την ανάλυση μυελού των οστών υγιούς ατόμου και ατόμου με ΧΜΜΛ. Οι αναλύσεις των δειγμάτων μυελού έχουν γίνει μόνο με το λογισμικό Kaluza.



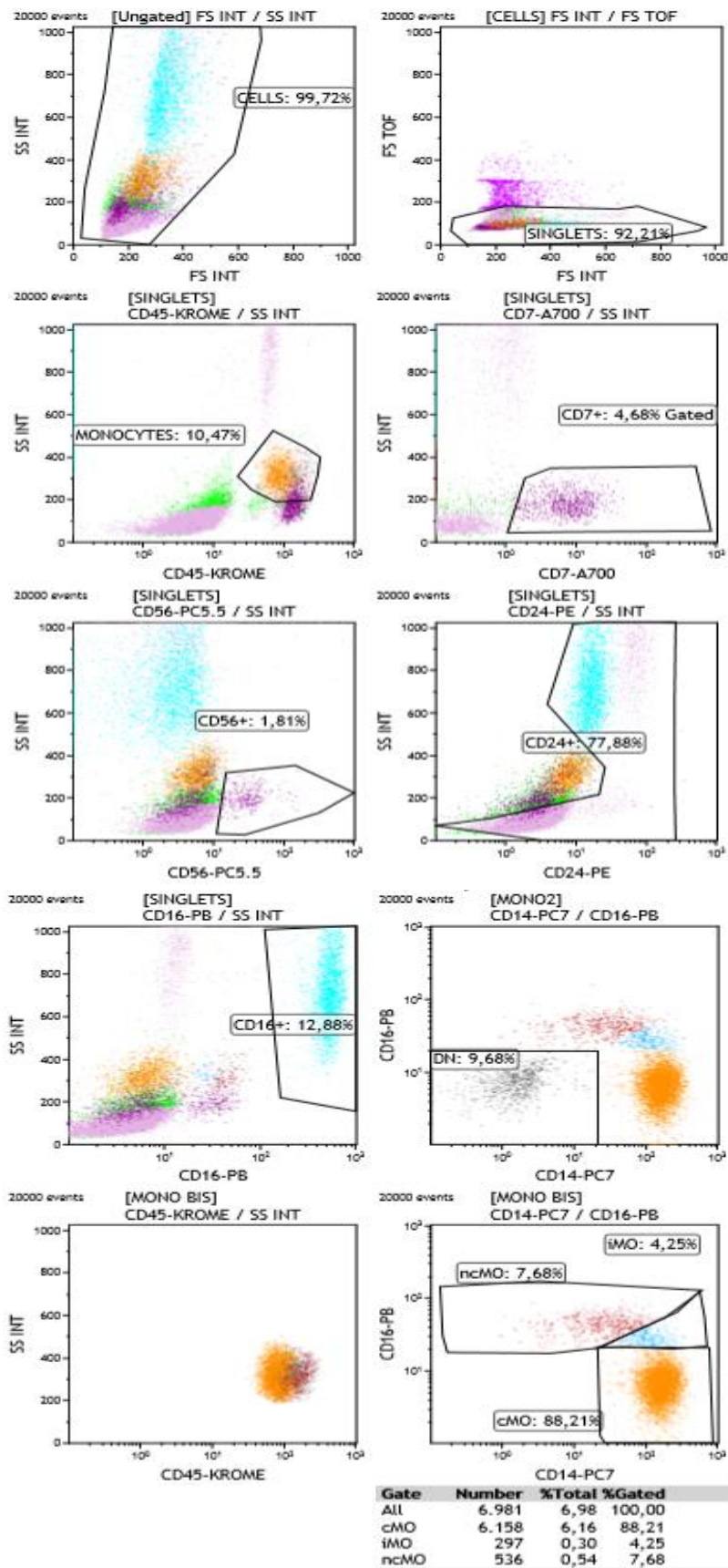
| Population    | Events | Total % | Partial % | Visibility % |
|---------------|--------|---------|-----------|--------------|
| EVENTS        | 20000  | 100.00  | NA        | 100.00       |
| Other EVENTS  | 1      | 0.00    | 0.00      | 0.00         |
| CELLS         | 19999  | 100.00  | 100.00    | 100.00       |
| Other CELLS   | 6      | 0.03    | 0.03      | 0.03         |
| SINGLET       | 14761  | 73.81   | 73.81     | 73.81        |
| Other SINGLET | 3783   | 18.92   | 25.63     | 18.92        |
| MONOCYTES     | 0      | NA      | NA        | NA           |
| CD7+          | 1239   | 6.20    | 8.39      | 6.20         |
| CD56+         | 559    | 2.80    | 3.79      | 2.80         |
| CD24+         | 5533   | 27.65   | 37.48     | 27.65        |
| CD16+         | 3647   | 18.24   | 24.71     | 18.24        |
| MONO2         | 746    | 3.73    | 3.73      | 3.73         |
| Other MONO2   | 0      | NA      | NA        | NA           |
| DN            | 746    | 3.73    | 100.00    | 3.73         |
| MONOBIS       | 4486   | 22.43   | 22.43     | 22.43        |
| Other MONOBIS | 0      | NA      | NA        | NA           |
| cMO           | 3935   | 19.68   | 87.72     | 19.68        |
| IMO           | 198    | 0.99    | 4.41      | 0.99         |
| ncMO          | 353    | 1.76    | 7.87      | 1.76         |

Εικόνα 8.1. Ανοσοφαινότυπος περιφερικού αίματος από υγιές άτομο (Infinicyt).

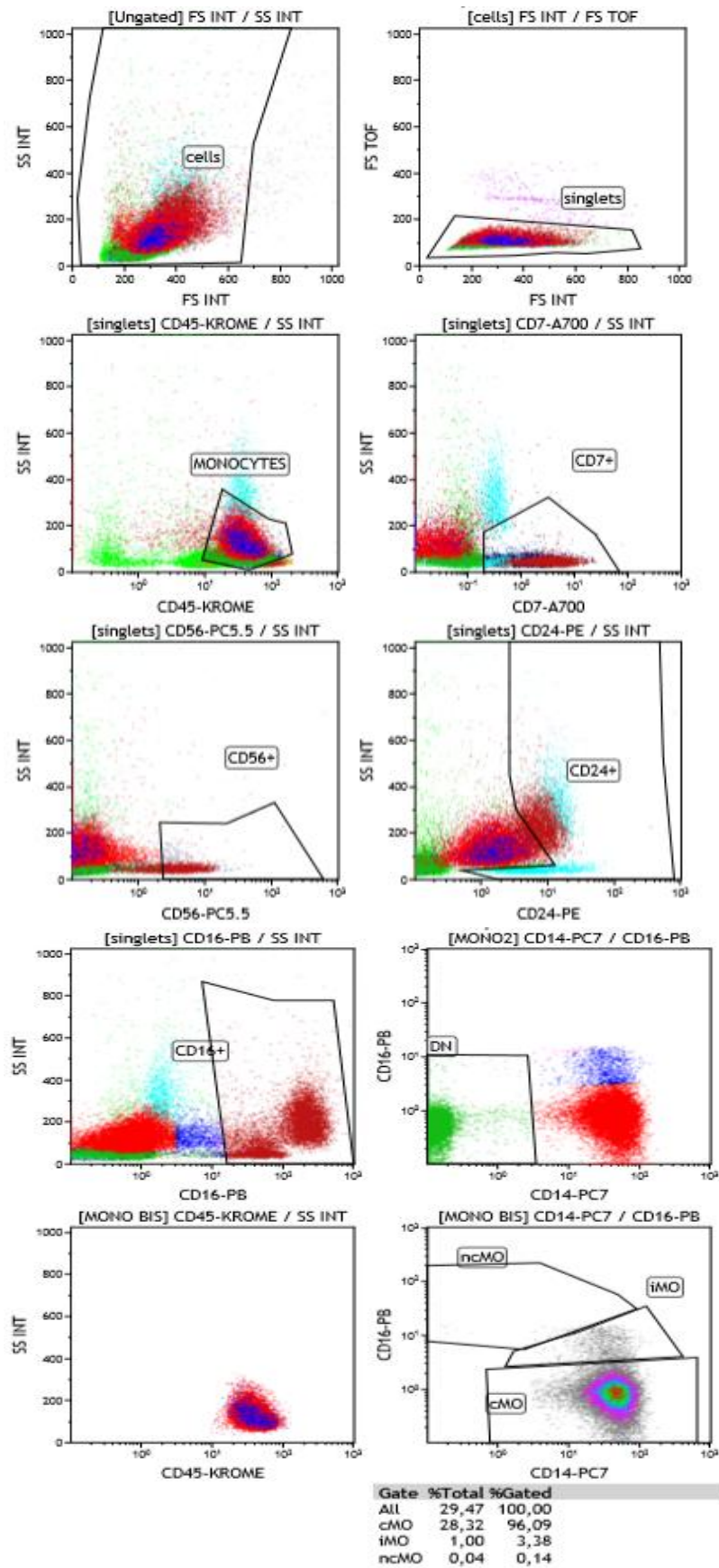


| Population    | Events | Total % | Partial % | Visibility % |
|---------------|--------|---------|-----------|--------------|
| EVENTS        | 20000  | 100.00  | NA        | 100.00       |
| Other EVENTS  | 27     | 0.14    | 0.14      | 0.14         |
| CELLS         | 19973  | 99.86   | 99.86     | 99.86        |
| Other CELLS   | 3      | 0.02    | 0.02      | 0.02         |
| SINGLET       | 16744  | 83.71   | 83.83     | 83.71        |
| Other SINGLET | 100    | 0.50    | 0.60      | 0.50         |
| MONOCYTES     | 0      | NA      | NA        | NA           |
| CD7+          | 121    | 0.60    | 0.72      | 0.60         |
| CD56+         | 147    | 0.74    | 0.88      | 0.74         |
| CD24+         | 12460  | 62.29   | 74.41     | 62.29        |
| CD16+         | 3916   | 19.58   | 23.39     | 19.58        |
| MONO2         | 555    | 2.78    | 2.78      | 2.78         |
| Other MONO2   | 0      | NA      | NA        | NA           |
| DN            | 555    | 2.78    | 100.00    | 2.78         |
| MONOBIS       | 2671   | 13.35   | 13.37     | 13.35        |
| Other MONOBIS | 0      | NA      | NA        | NA           |
| cMO           | 2656   | 13.28   | 99.44     | 13.28        |
| IMO           | 14     | 0.07    | 0.52      | 0.07         |
| ncMO          | 1      | 0.00    | 0.04      | 0.00         |

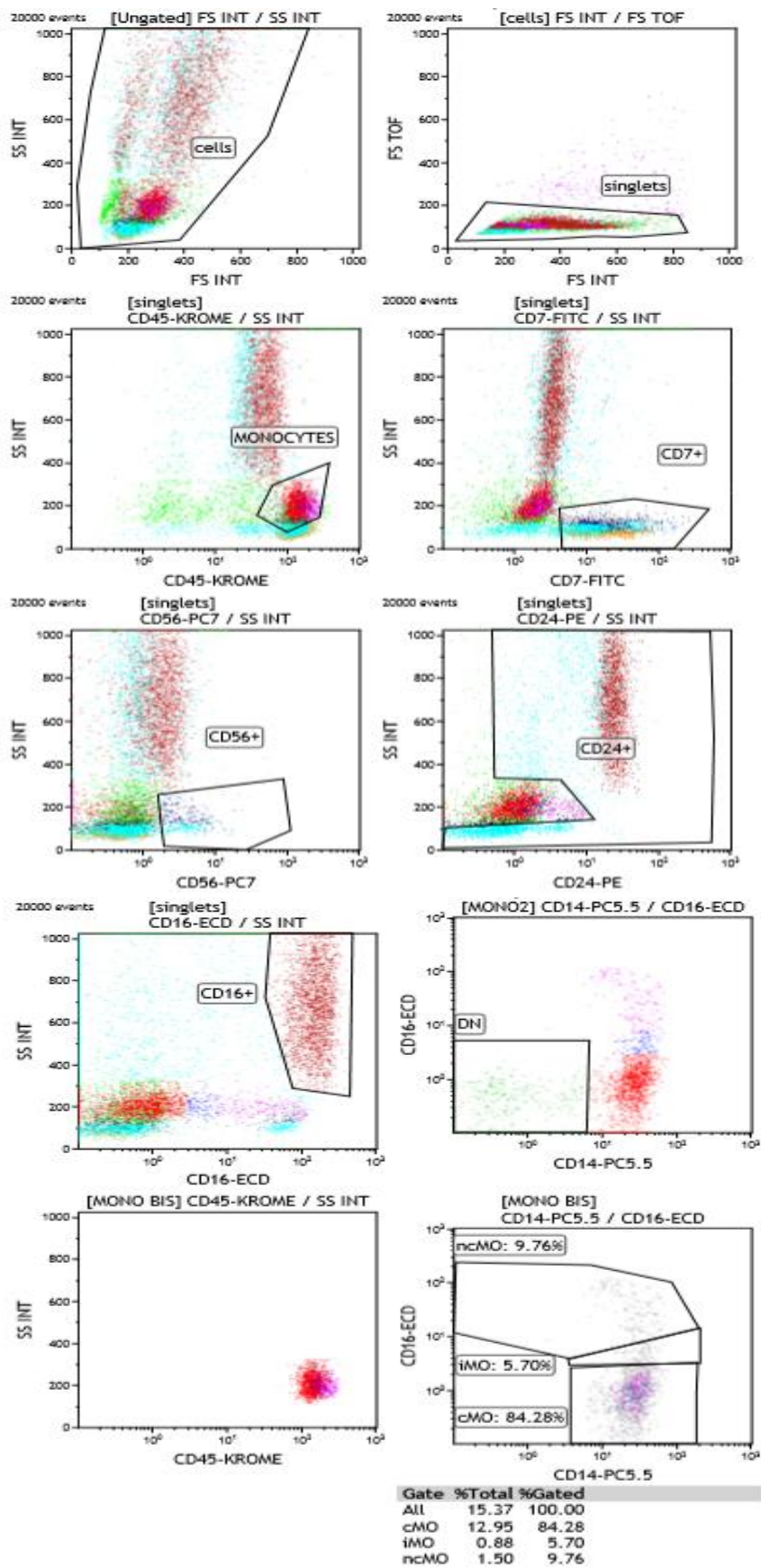
Εικόνα 8.2. Ανοσοφαινότυπος περιφερικού αίματος από άτομο με ΧΜΜΛ (Infinicyt).



Εικόνα 8.3. Ανοσοφαινότυπος περιφερικού αίματος από υγιές άτομο (Καλιζα).

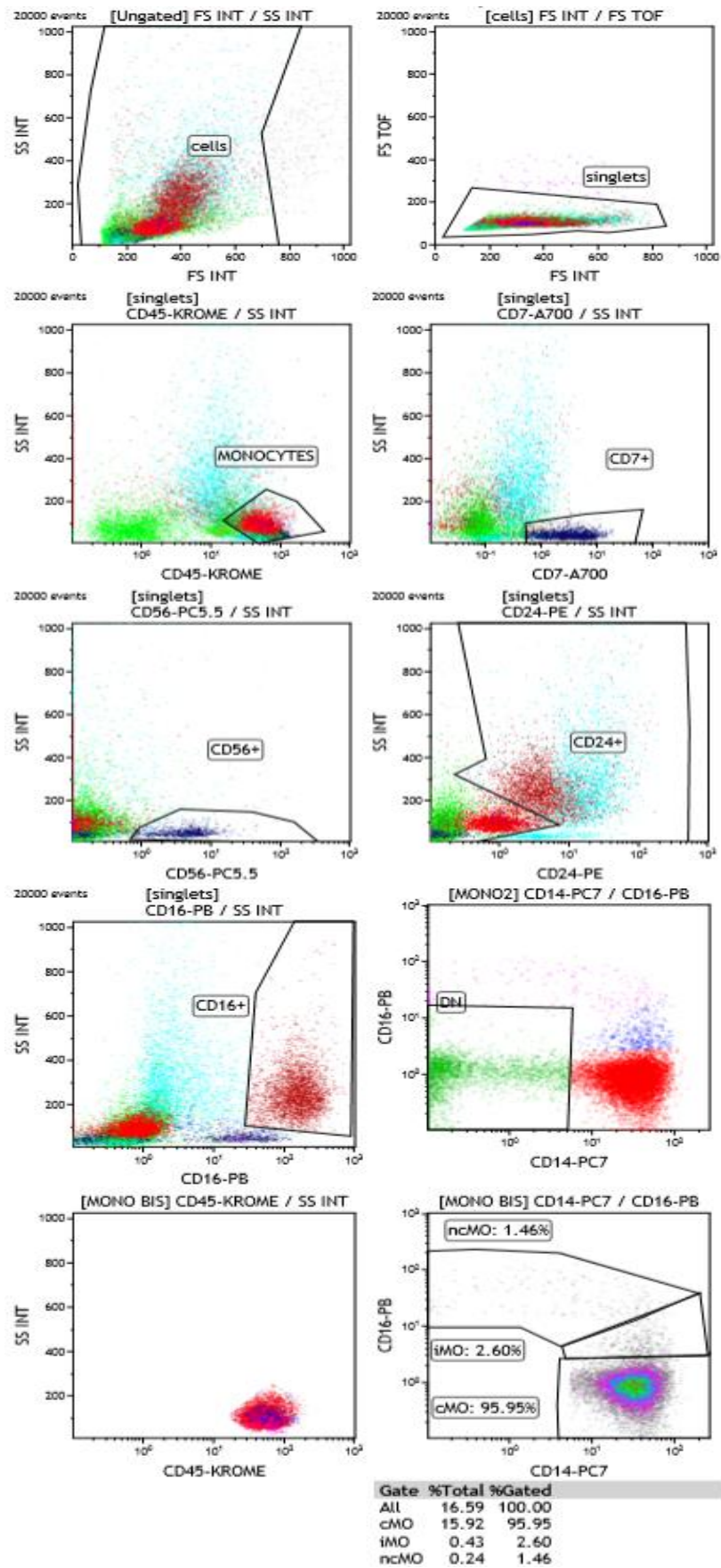


Εικόνα 8.4. Ανοσοφαινότυπος περιφερικού αίματος από άτομο με ΧΜΜΛ (Καλζα).



Εικόνα 8.5. Ανοσοφαινότυπος μμελού των οστών από υγιές άτομο (Kaluzs).





Εικόνα 8.6. Ανοσοφαινότυπος μυελού των οστών από άτομο με ΧΜΜΑ (Καλυza).

## 8.1 ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΚΛΙΝΙΚΟΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΩΝ ΕΥΡΗΜΑΤΩΝ ΜΕ ΤΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΙΑΣ- ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ ΤΩΝ ΔΥΟ ΜΕΘΟΔΩΝ

Για τη συσχέτιση μεταξύ της κλινικής διάγνωσης για ΧΜΜΛ σύμφωνα με τα κριτήρια που ορίζει ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας (WHO) και των αποτελεσμάτων που προέκυψαν από την ανάλυση των δειγμάτων με κυτταρομετρία ροής, χρησιμοποιήθηκαν οι πίνακες διπλής εισόδου (Crosstabs) και η δοκιμασία  $\chi^2$  (Chi-Square Test). Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, οι ασθενείς με ποσοστό κλασικών μονοκυττάρων >94%, όπως αυτό προέκυψε ύστερα από επεξεργασία με τα λογισμικά Kaluza™ και Infinicyt™, θεωρήθηκαν ότι νοσούν.

Στους πίνακες που ακολουθούν, φαίνεται ότι υπάρχει στατιστικά σημαντική συσχέτιση μεταξύ των αποτελεσμάτων, που προέκυψαν από κυτταρομετρία ροής και εκείνων από τους υπόλοιπους κλινικοεργαστηριακούς ελέγχους. Η στατιστικά σημαντική αυτή συσχέτιση υπάρχει τόσο για τα δείγματα περιφερικού αίματος όσο και για τα δείγματα μυελού των οστών. Ωστόσο, τα 19 δείγματα μυελού αναλύθηκαν μόνο με το λογισμικό Kaluza™.

*Πίνακας 8.1. Πίνακας διπλής εισόδου (Crosstab) για τη συσχέτιση των κλινικοεργαστηριακών αποτελεσμάτων με εκείνα από την ανάλυση με το λογισμικό Kaluza™ για δείγματα περιφερικού αίματος. Ασθενείς που εμφανίζουν ΧΜΜΛ και ασθενείς χωρίς το νόσημα (ΑΛΛΟ).*

|         |        | Kaluza™ |      | Σύνολο |
|---------|--------|---------|------|--------|
|         |        | ΑΛΛΟ    | ΧΜΜΛ |        |
| Κλινικά | ΑΛΛΟ   | 28      | 3    | 31     |
|         | ΧΜΜΛ   | 1       | 20   | 21     |
|         | Σύνολο | 29      | 23   | 52     |

Πίνακας 8.2. Πίνακας διπλής εισόδου (Crosstab) για τη συσχέτιση των κλινικοεργαστηριακών αποτελεσμάτων με εκείνα από την ανάλυση με το λογισμικό *Infinicyt™* για δείγματα περιφερικού αίματος. Ασθενείς που εμφανίζουν ΧΜΜΛ και ασθενείς χωρίς το νόσημα (ΑΛΛΟ).

|                |        | Infinicyt™ |      | Σύνολο |
|----------------|--------|------------|------|--------|
|                |        | ΑΛΛΟ       | ΧΜΜΛ |        |
| <b>Κλινικά</b> | ΑΛΛΟ   | 22         | 2    | 24     |
|                | ΧΜΜΛ   | 0          | 13   | 13     |
|                | Σύνολο | 22         | 15   | 37     |

Πίνακας 8.3. Πίνακας διπλής εισόδου (Crosstab) για τη συσχέτιση των κλινικοεργαστηριακών αποτελεσμάτων με εκείνα από την ανάλυση με το λογισμικό *Kaluza™* για δείγματα μυελού των οστών. Ασθενείς που εμφανίζουν ΧΜΜΛ και ασθενείς χωρίς το νόσημα (ΑΛΛΟ).

|                |        | Kaluza™ |      | Σύνολο |
|----------------|--------|---------|------|--------|
|                |        | ΑΛΛΟ    | ΧΜΜΛ |        |
| <b>Κλινικά</b> | ΑΛΛΟ   | 8       | 2    | 10     |
|                | ΧΜΜΛ   | 2       | 7    | 9      |
|                | Σύνολο | 10      | 9    | 19     |

Πέραν των παραπάνω συσχετίσεων, για τα δείγματα περιφερικού αίματος έγινε συσχέτιση και μεταξύ των δύο μεθόδων που χρησιμοποιήθηκαν. Τα αποτελέσματα φαίνονται στον παρακάτω πίνακα και δείχνουν ότι υπάρχει επίσης στατιστικά σημαντική συσχέτιση ( $p=0,023$ ).

Πίνακας 8.4. Πίνακας διπλής εισόδου (Crosstab) για τη συσχέτιση των αποτελεσμάτων μεταξύ των δύο μεθόδων. Ασθενείς που εμφανίζουν ΧΜΜΛ και ασθενείς χωρίς το νόσημα (ΑΛΛΟ).

|          |        | Infinicyt™ |      | Σύνολο |
|----------|--------|------------|------|--------|
|          |        | ΑΛΛΟ       | ΧΜΜΛ |        |
| Kaluzza™ | ΑΛΛΟ   | 22         | 0    | 22     |
|          | ΧΜΜΛ   | 0          | 15   | 15     |
|          | Σύνολο | 22         | 15   | 37     |

Πίνακας 8.5. Αποτελέσματα του στατιστικού τεστ *Chi-Square Test* για τη συσχέτιση μεταξύ κλινικής διάγνωση και διάγνωσης με κυτταρομετρία ροής, σε δείγματα περιφερικού αίματος (PB) και μυελού των οστών (BM), καθώς και μεταξύ των δύο διαφορετικών λογισμικών.

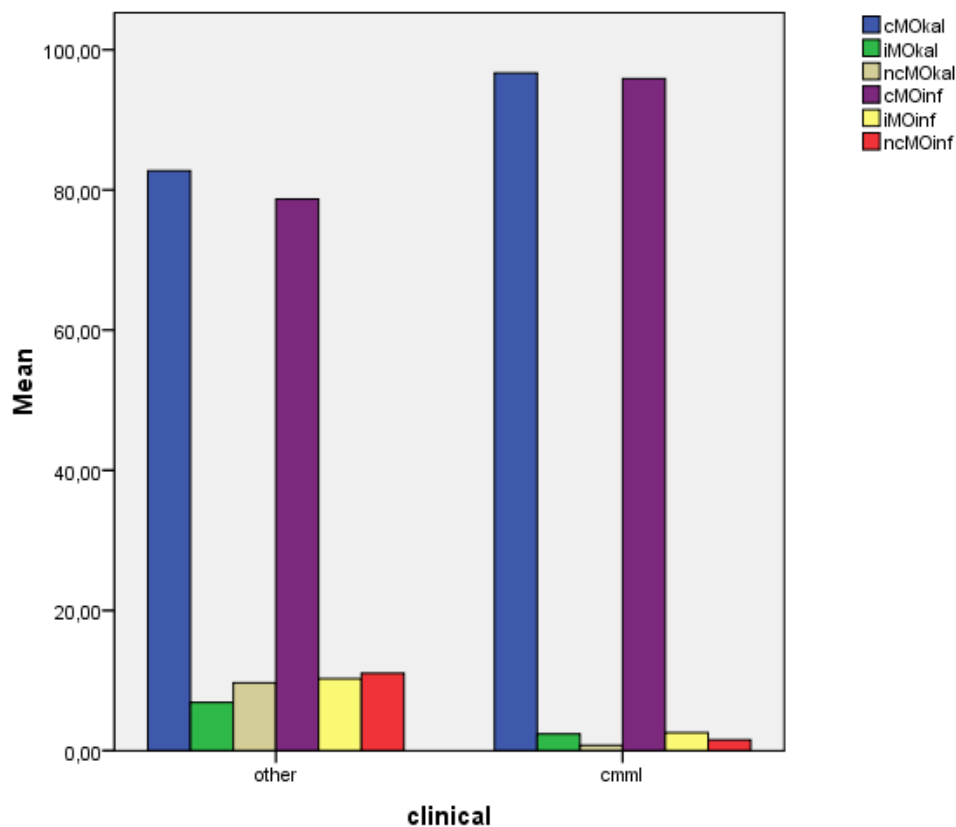
| Chi-Square Test        |         |
|------------------------|---------|
|                        | p-value |
| Κλινικά×Kaluzza (PB)   | <0,001  |
| Κλινικά×Infinicyt (PB) | <0,001  |
| Κλινικά×Kaluzza (BM)   | =0,023  |
| Kaluzza×Infinicyt (PB) | <0,001  |

Ακόμη, στον πίνακα 8.6 φαίνονται οι μέσες τιμές και η τυπική απόκλιση των ποσοστών των τριών μονοκυτταρικών υποπληθυσμών (cMo: κλασικά, iMo: ενδιάμεσα και ncMo: μη κλασικά μονοκύτταρα), όπως αυτά προέκυψαν ύστερα από επεξεργασία με τα δύο λογισμικά, στην περίπτωση ασθενών με ΧΜΜΛ και στην περίπτωση ατόμων χωρίς το νόσημα. Τα αποτελέσματα του πίνακα 8.6, αναπαριστώνται και με ραβδόγραμμα στο σχήμα 8.1. Με kal και inf σημαίνονται οι πληθυσμοί που προέκυψαν από επεξεργασία με Kaluzza™ και Infinicyt™ αντίστοιχα.

Οι μέσες τιμές των κλασικών μονοκυττάρων στην περίπτωση ΧΜΜΛ παρατηρούνται αυξημένες συγκριτικά με τις αντίστοιχες στην περίπτωση ατόμων που δεν φέρουν το νοσημα. Αντιθέτως, μειωμένες παρατηρούνται οι μέσες τιμές των ενδιάμεσων και μη κλασικών μονοκυττάρων στην περίπτωση ατόμων με ΧΜΜΛ. Οι παρατηρήσεις αφορούν δείγματα περιφερικού αίματος και ισχύουν και για τα δύο λογισμικά.

*Πίνακας 8.6. Μέσες τιμές και τυπική απόκλιση ποσοστών των μονοκυτταρικών υποπληθυσμών σε περιφερικό αίμα, ατόμων με το νόσημα και ατόμων χωρίς αυτό.*

| ΚΛΙΝΙΚΑ     |                | KALUZA  |         |          | INFINICYT |         |         |
|-------------|----------------|---------|---------|----------|-----------|---------|---------|
|             |                | cMo     | iMo     | ncMo     | cMo       | iMo     | ncMo    |
| <b>ΑΛΛΟ</b> | Mean           | 83,7848 | 7,0674  | 8,5071   | 78,7033   | 10,2542 | 11,0425 |
|             | Std. Deviation | 13,3489 | 3,67267 | 10,22332 | 13,19583  | 5,18518 | 9,85649 |
| <b>ΧΜΜΛ</b> | Mean           | 95,1438 | 2,8805  | 1,7890   | 95,8554   | 2,5577  | 1,5392  |
|             | Std. Deviation | 7,27953 | 2,35016 | 5,28164  | 1,19698   | 1,07115 | 0,69584 |

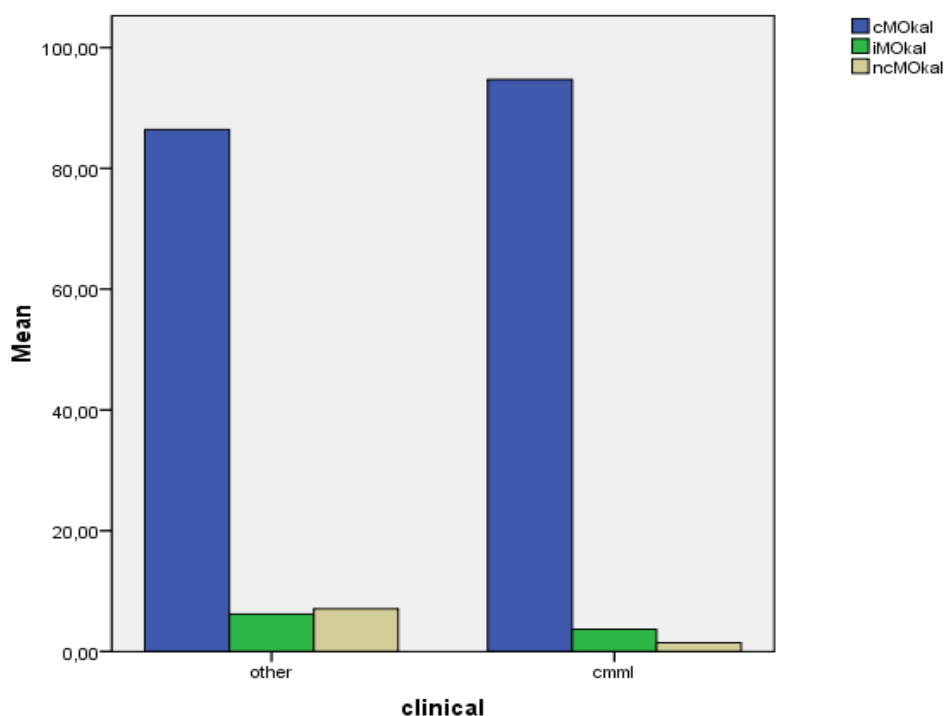


Σχήμα 8.1. Γραφική αναπαράσταση των μέσων τιμών των ποσοστών των μονοκυτταρικών υποπληθυσμών στο περιφερικό αίμα ατόμων με ΧΜΜΛ και σε άτομα χωρίς το νόσημα.

Όμοιως, ακολουθεί ο πίνακας 8.7 με τις μέσες τιμές και τις τυπικές αποκλίσεις των ποσοστών των τριών μονοκυτταρικών υποπληθυσμών όπως προέκυψαν μετά την επεξεργασία των δειγμάτων μυελού με το λογισμικό Kaluza™. Όπως και στα δείγματα περιφερικού αίματος, έτσι και στα δείγματα μυελού των οστών, παρατηρείται αύξηση της μεσης τιμής των ποσοστών των κλασικών μονοκυττάρων και ελάττωση αντίστοιχων μέσων τιμών των ενδιάμεσων και μη κλασικών στα άτομα με ΧΜΜΛ σε σχέση με εκείνα που δεν φέρουν το νόσημα.

Πίνακας 8.7. Μέσες τιμές και τυπική απόκλιση ποσοστών των μονοκυτταρικών υποπληθυσμών σε άτομα με το νόσημα και σε άτομα χωρίς αυτό. Αφορά στά δείγματα μυελού των οστών.

| ΚΛΙΝΙΚΑ     |                | KALUZA  |         |          |
|-------------|----------------|---------|---------|----------|
|             |                | cMo     | iMo     | ncMo     |
| <b>ΑΛΛΟ</b> | Mean           | 83,7848 | 7,0674  | 8,5071   |
|             | Std. Deviation | 13,3489 | 3,67267 | 10,22332 |
| <b>ΧΜΜΛ</b> | Mean           | 95,1438 | 2,8805  | 1,7890   |
|             | Std. Deviation | 7,27953 | 2,35016 | 5,28164  |



Σχήμα8.2. Γραφική αναπαράσταση των μέσων τιμών των ποσοστών των μονοκυτταρικών υποπληθυσμών, σε μυελό οστών ατόμων με ΧΜΜΛ και ατόμων χωρίς το νόσημα.

Για τη σύγκριση των αποτελεσμάτων μεταξύ των δύο μεθόδων χρησιμοποιήθηκαν οι μη παραμετρικές δοκιμασίες Wilcoxon test και Paired Samples t-test. Όπως φαίνεται στους πίνακες που ακολουθούν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των ποσοστών των ενδιάμεσων μονοκυττάρων που προέκυψαν από την μέθοδο BC (iMokal) και εκείνων που προέκυψαν από μέθοδο BD (iMoinf) ( $p <$

0,001). Αντιθέτως, η διαφορά σε κάθε ένα από τα ζεύγη κλασικά μονοκύτταρα από Kaluza με κλασικά από Infinicyt (cMokal- cMoinf) και μη κλασικά από Kaluza με μη κλασικά από Infinicyt (ncMokal- ncMoinf), δεν είναι στατιστικά σημαντική ( $p > 0,001$ ).

Πίνακας 8.8. Αποτελέσματα από τη σύγκριση μονοκυτταρικών υποπληθυσμών, μεταξύ των δύο λογισμικών, με Wilcoxon test.

**Wilcoxon Test Statistics**

|                        | cMoinf - cMokal     | iMoinf - iMokal     | ncMoinf - ncMokal   |
|------------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
| Z                      | -2,934 <sup>a</sup> | -3,327 <sup>b</sup> | -2,316 <sup>b</sup> |
| Asymp. Sig. (2-tailed) | ,003                | ,001                | ,021                |

Πίνακας 8.9. Αποτελέσματα από τη σύγκριση μονοκυτταρικών υποπληθυσμών, μεταξύ των δύο λογισμικών, με Paired Samples t-test.

**Paired Samples Test**

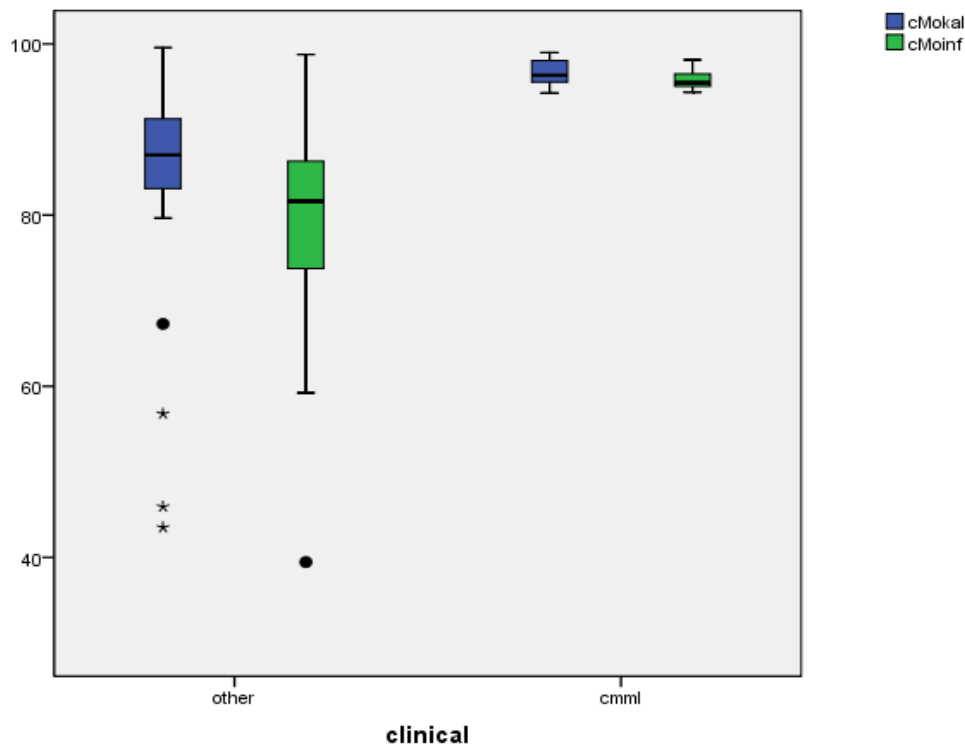
|        |                   | Paired Differences                        |          |        |    |                 |
|--------|-------------------|---|----------|--------|----|-----------------|
|        |                   | 95% Confidence Interval of the Difference |          |        |    |                 |
|        |                   | Lower                                     | Upper    | t      | df | Sig. (2-tailed) |
| Pair 1 | cMokal - cMoinf   | ,40637                                    | 5,39201  | 2,359  | 36 | ,024            |
| Pair 2 | iMokal - iMoinf   | -3,40838                                  | -1,11324 | -3,996 | 36 | ,000            |
| Pair 3 | ncMokal - ncMoinf | -2,90729                                  | ,59269   | -1,341 | 36 | ,188            |

## 8.2 ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΤΩΝ ΠΟΣΟΣΤΩΝ ΤΩΝ ΜΟΝΟΚΥΤΤΑΡΙΚΩΝ ΥΠΟΠΛΗΘΥΣΜΩΝ ΜΕΤΑΞΥ ΑΤΟΜΩΝ ΠΟΥ ΠΑΣΧΟΥΝ ΚΑΙ ΑΤΟΜΩΝ ΧΩΡΙΣ ΤΟ ΝΟΣΗΜΑ

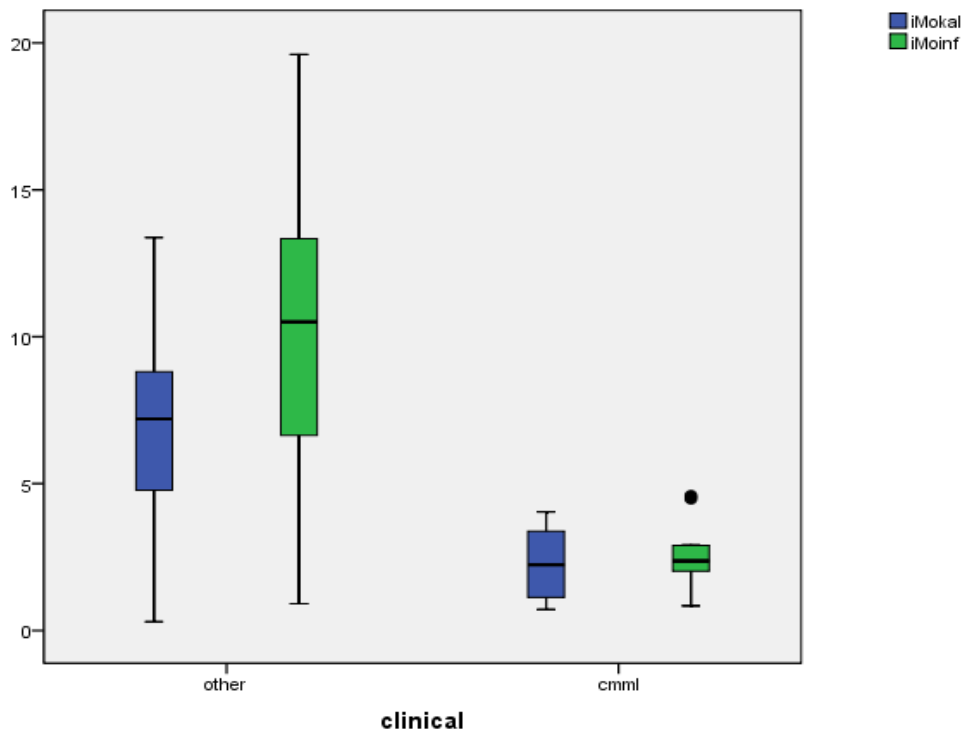
Στα παρακάτω Box-Plots ή αλλιώς θηκογράμματα, αναπαριστώνται οι κατανομές των ποσοστών, των τριών μονοκυτταρικών υποπληθυσμών όπως προέκυψαν από



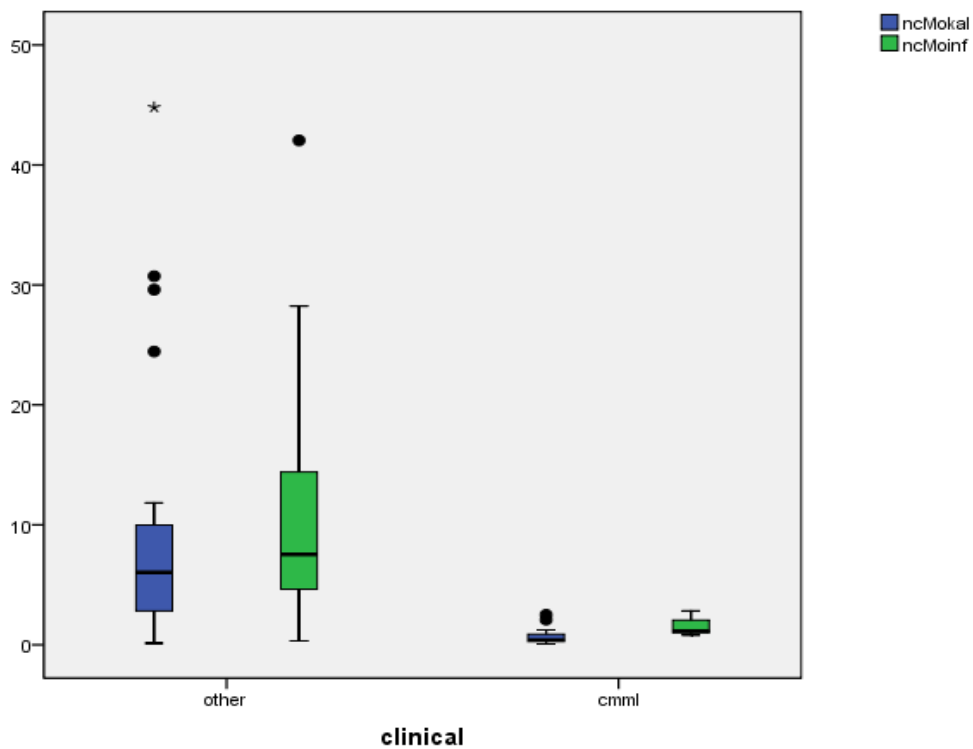
την επεξεργασία με το λογισμικό Kaluza και το λογισμικό Infinicyt. Σε κάθε περίπτωση, συγκρίνεται η κατανομή του ίδιου μονοκυτταρικού υποπληθυσμού περιφερικού αίματος, μεταξύ ατόμων που έχουν διαγνωστεί με ΧΜΜΛ (cmml) και ατόμων χωρίς το νόσημα (other). Με kal και inf σημαίνονται οι πληθυσμοί που προέκυψαν από επεξεργασία με Kaluza™ και Infinicyt™ αντίστοιχα. Ο υπολογισμός του  $p$ , έγινε με το μη παραμετρικό στατιστικό test Mann-Whitney U test. Και για τα δύο λογισμικά, βρέθηκε σε όλες τις περιπτώσεις  $p < 0,05$  δηλώνοντας στατιστικά σημαντική διαφορά στην κατανομή των ποσοστών των μονοκυτταρικών υποπληθυσμών ανάμεσα στην ομάδα ατόμων που πάσχουν από ΧΜΜΛ και την ομάδα ατόμων που δεν φέρουν το νόσημα (Σχήμα 8.3, 8.4, 8.5).



Σχήμα 8.3. Κατανομή ποσοστών κλασικών μονοκυττάρων (cMo) από Kaluza και Infinicyt σε περιφερικό αίμα ατόμων με ΧΜΜΛ και ατόμων που δεν φέρουν το νόσημα

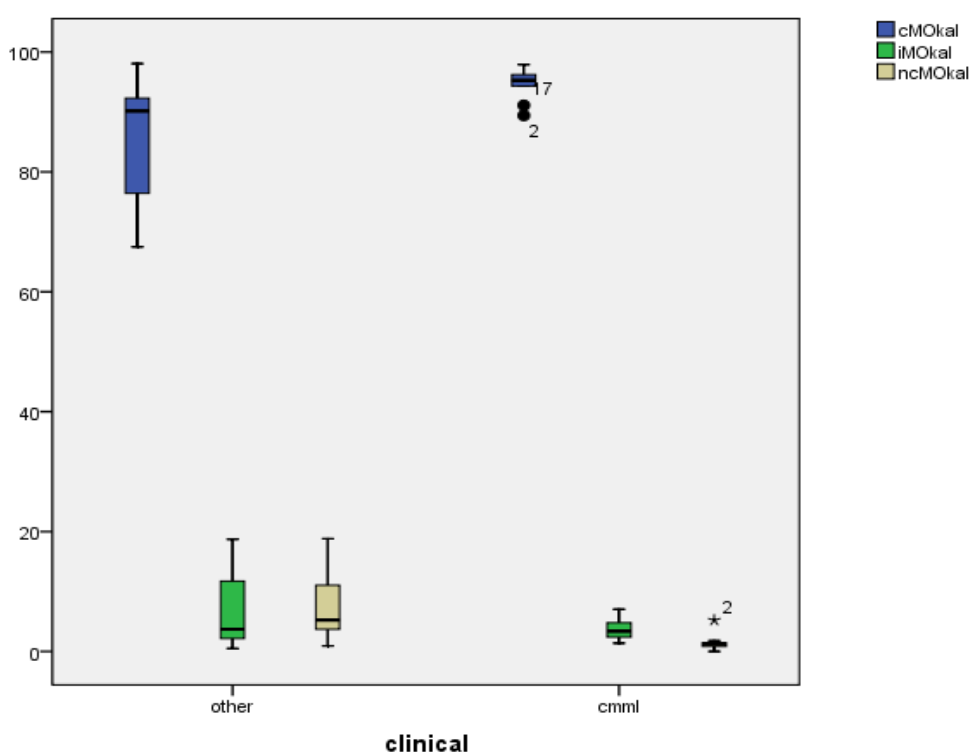


Σχήμα 8.4. Κατανομή ποσοστών ενδιάμεσων μονοκυττάρων (iMo) από Kaluza και Infinicyt σε περιφερικό αίμα ατόμων με ΧΜΜΛ και ατόμων που δεν φέρουν το νόσημα



Σχήμα 8.5. Κατανομή ποσοστών μη κλασικών μονοκυττάρων (ncMo) από Kaluza και Infinicyt σε περιφερικό αίμα ατόμων με ΧΜΜΛ και ατόμων που δεν φέρουν το νόσημα

Ομοίως, στο επόμενο θηκόγραμμα (Σχήμα 8.6) παρουσιάζονται οι κατανομές των ποσοστών και των τριών μονοκυτταρικών υποπληθυσμών, στον μυελό ατόμων με ΧΜΜΛ και ατόμων τα οποία δεν φέρουν το νόσημα. Ο υπολογισμός του  $p$ , έγινε με το μη παραμετρικό στατιστικό test Mann-Whitney U test. Βρέθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά στην κατανομή των ποσοστών, των μη κλασικών μονοκυττάρων ( $p=0,008 < 0,05$ ) μεταξύ των δύο ομάδων. Στην περίπτωση των κλασικών και ενδιάμεσων μονοκυττάρων ( $p=0,086$  και  $p=0,683$  αντίστοιχα) δεν παρατηρείται στατιστικά σημαντική διαφορά στην κατανομή των ποσοστών τους μεταξύ των δύο ομάδων ατόμων.



Σχήμα 8.6. Κατανομή ποσοστών μονοκυτταρικών υποπληθυσμών σε μυελό ατόμων με ΧΜΜΛ και ατόμων που δεν φέρουν το νόσημα.

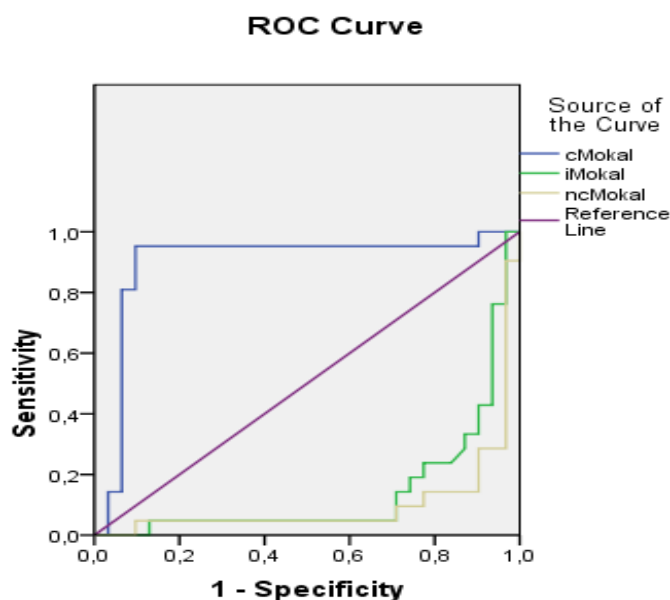
### 8.3 ΚΑΜΠΥΛΕΣ ROC ΓΙΑ ΤΑ ΠΟΣΟΣΤΑ ΤΩΝ ΚΛΑΣΙΚΩΝ (cMo), ΕΝΔΙΑΜΕΣΩΝ (iMo) ΚΑΙ ΜΗ ΚΛΑΣΙΚΩΝ (ncMo) ΜΟΝΟΚΥΤΤΑΡΩΝ

Στα πλαίσια της στατιστικής ανάλυσης που πραγματοποιήθηκε για τα ποσοστά των τριών μονοκυτταρικών υποπληθυσμών, δημιουργήθηκαν καμπύλες σχέσης ευαισθησίας-ειδικότητας ή αλλιώς καμπύλες ROC (Receive Operator Characteristic

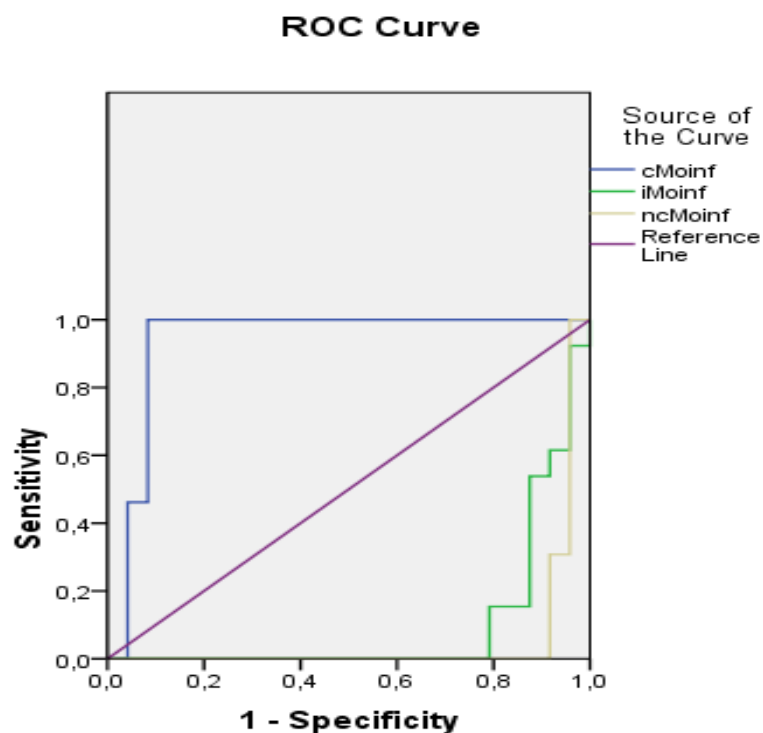
Curves). Με αυτές τις καμπύλες είναι δυνατή η αξιολόγηση της διαγνωστικής ικανότητας των συγκεκριμένων μονοκυτταρικών υποπληθυσμών. Όσο μεγαλύτερο είναι το εμβαδόν κάτω από την καμπύλη (AUC, area under the curve), όσο δηλαδή πλησιάζει τη μονάδα, τόσο μεγαλύτερη είναι η διαγνωστική αξία. Παρακάτω παρατίθενται οι καμπύλες ROC, για τα ποσοστά κλασικών (cMo), ενδιάμεσων (iMo) και μη κλασικών (ncMo) μονοκυττάρων, περιφερικού αίματος και μυελού των οστών.

Από την καμπύλη ROC των κλασικών μονοκυττάρων περιφερικού αίματος, παρατηρείται ότι ο συγκεκριμένος μονοκυτταρικός υποπληθυσμός εμφανίζει AUC=0,896 και AUC=0,936 για τα λογισμικά Kaluza (Σχήμα 18) και Infinicyt (Σχήμα 19) αντίστοιχα, με  $p < 0,001$ , κάτι που δηλώνει πως η διαγνωστική αξία του είναι στατιστικά σημαντική. Επιπλέον εμφανίζει 95% CI=0,78- 1 (Kaluza) και CI=0- 1 (Infinicyt).

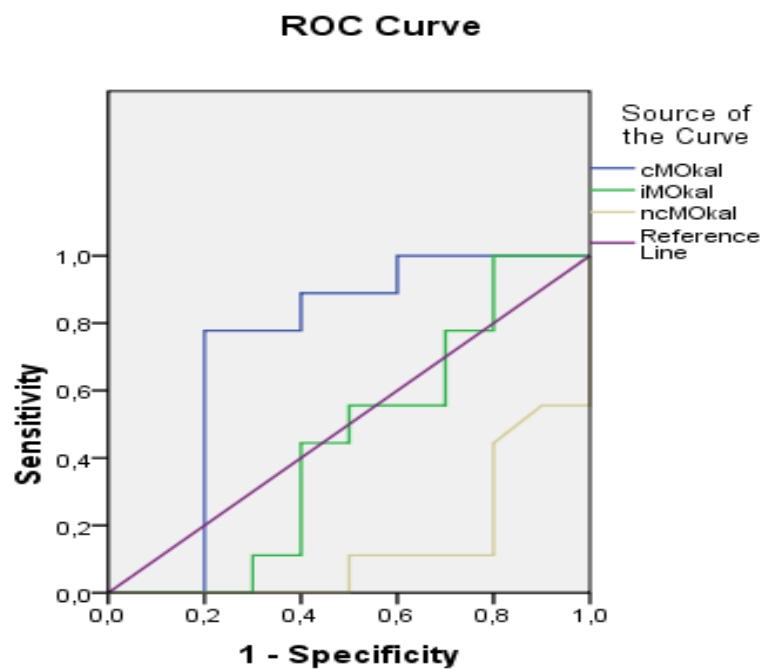
Από τις καμπύλες ROC, που αφορούν στα μονοκύτταρα του μυελού των οστών (Σχήμα 20), παρατηρείται ότι τα κλασικά μονοκύτταρα εμφανίζουν AUC=0,733 και  $p = 0,086 > 0,05$ , δηλώνοντας μη στατιστικά σημαντική διαγνωστική αξία.



Σχήμα 8.7. Καμπύλες ROC κλασικών, ενδιάμεσων και μη κλασικών μονοκυττάρων περιφερικού αίματος (Kaluza).



Σχήμα 8.8. Καμπύλες ROC κλασικών, ενδιάμεσων και μη κλασικών μονοκυττάρων περιφερικού αίματος (Infinicyt).



Σχήμα 8.9. Καμπύλες ROC κλασικών, ενδιάμεσων και μη κλασικών μονοκυττάρων μυελού των οστών.

## 8.4 ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΠΕΡΙΦΕΡΙΚΟΥ ΑΙΜΑΤΟΣ ΚΑΙ ΜΥΕΛΟΥ ΤΩΝ ΟΣΤΩΝ ΑΠΟ ΙΔΙΟΥΣ ΑΣΘΕΝΕΙΣ

Από τα άτομα, που προσήλθαν στο εργαστήριο κυτταρομετρίας ροής (με πιθανότητα ΧΜΜΛ), έγινε ταυτόχρονη ανάλυση δείγματος περιφερικού αίματος και δείγματος μυελού των οστών για 10 από αυτά. Τα αποτελέσματα από τη στατιστική ανάλυση αυτών παρουσιάζονται παρακάτω.

### 8.4.1 Συσχέτιση αποτελεσμάτων στο περιφερικό αίμα και στον μυελό των οστών

Από τα 10 άτομα, στα οποία έγινε ταυτόχρονη ανάλυση περιφερικού αίματος και μυελού των οστών, εκείνα με ποσοστό κλασικών μονοκυττάρων >94%, όπως αυτό προέκυψε ύστερα από επεξεργασία με το λογισμικό Kaluza™, θεωρήθηκε ότι νοσούν. Η υπόθεση αυτή, εφαρμόστηκε τόσο για τα δείγματα περιφερικού όσο και για τα δείγματα μυελού, όπως ακριβώς στις παραπάνω στατιστικές αναλύσεις.

Στον πίνακα , φαίνεται να μην υπάρχει στατιστικά σημαντική συσχέτιση ( $p= 0,3$ ) μεταξύ των αποτελεσμάτων από το περιφερικό αίμα και εκείνων από μυελό των οστών, όπως προέκυψαν από την ανάλυση με κυτταρομετρία ροής.

*Πίνακας 8.10. Πίνακας διπλής εισόδου (Crosstab) για τη συσχέτιση των αποτελεσμάτων από την ανάλυση μυελού των οστών (BM) με εκείνα από την ανάλυση περιφερικού αίματος (PB). Ασθενείς που εμφανίζουν ΧΜΜΛ και ασθενείς χωρίς το νόσημα (ΑΛΛΟ)*

|              |        | Kaluza™ (BM) |      | Σύνολο |
|--------------|--------|--------------|------|--------|
|              |        | ΑΛΛΟ         | ΧΜΜΛ |        |
| Kaluza™ (PB) | ΑΛΛΟ   | 1            | 0    | 1      |
|              | ΧΜΜΛ   | 2            | 7    | 9      |
|              | Σύνολο | 3            | 7    | 10     |

Για τη σύγκριση των αποτελεσμάτων μεταξύ των δύο ειδών δειγμάτων, χρησιμοποιήθηκαν οι μη παραμετρικές δοκιμασίες Wilcoxon test και Paired Samples t-test. Όπως φαίνεται στους πίνακες που ακολουθούν δεν υπάρχει

στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των ποσοστών των μονοκυτταρικών υποπληθυσμών του μυελού (BMcMo, BMiMo, BMncMo) και εκείνων του περιφερικού αίματος (PBcMo, PBiMo, PBncMo) ( $p > 0,05$ ).

Πίνακας 8.11. Αποτελέσματα από τη σύγκριση μονοκυτταρικών υποπληθυσμών, μεταξύ των δύο ειδών δειγμάτων, με Wilcoxon test.

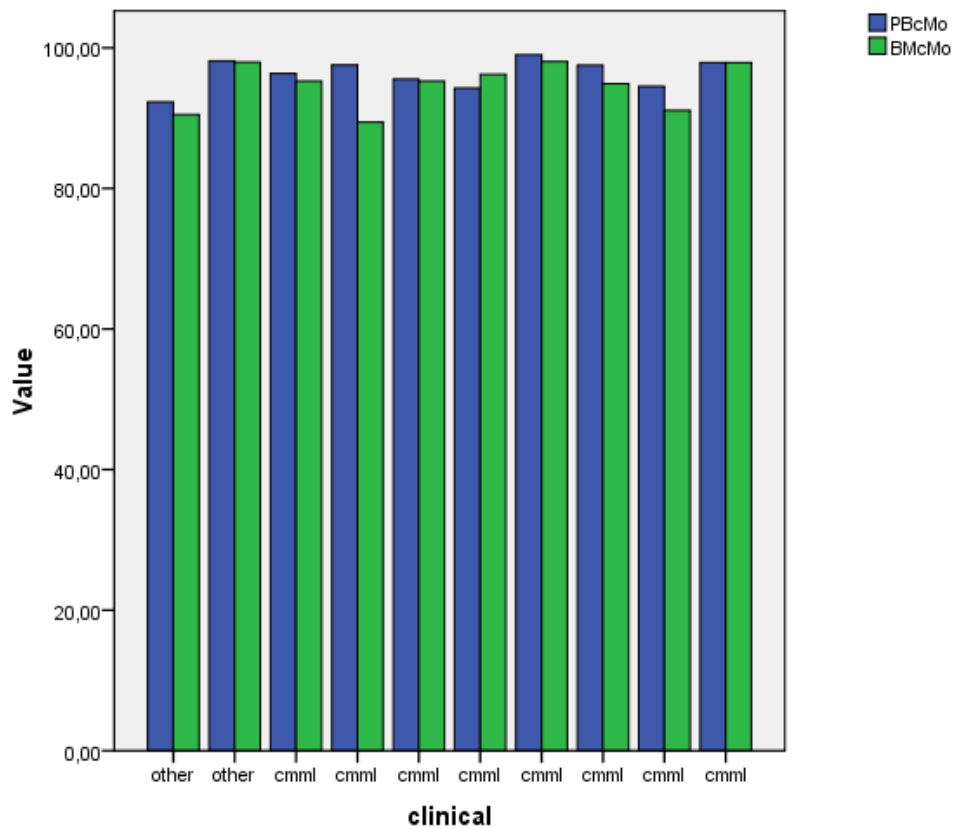
|                        | BMcMo - PBcMo       | BMiMo - PBiMo       | BMncMo - PBncMo     |
|------------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
| Z                      | -1,955 <sup>a</sup> | -1,838 <sup>b</sup> | -1,362 <sup>b</sup> |
| Asymp. Sig. (2-tailed) | ,051                | ,066                | ,173                |

Πίνακας 8.12. Αποτελέσματα από τη σύγκριση μονοκυτταρικών υποπληθυσμών, μεταξύ των δύο ειδών δειγμάτων με Paired Samples t-test.

|                        | Paired Differences                        |         |        |    |                 |
|------------------------|---|---------|--------|----|-----------------|
|                        | 95% Confidence Interval of the Difference |         |        |    |                 |
|                        | Lower                                     | Upper   | t      | df | Sig. (2-tailed) |
| Pair 1 PBcMo - BMcMo   | -,30051                                   | 3,60451 | 1,914  | 9  | ,088            |
| Pair 2 PBiMo - BMiMo   | -1,73761                                  | ,00561  | -2,248 | 9  | ,051            |
| Pair 3 PBncMo - BMncMo | -1,98022                                  | ,38222  | -1,530 | 9  | ,160            |

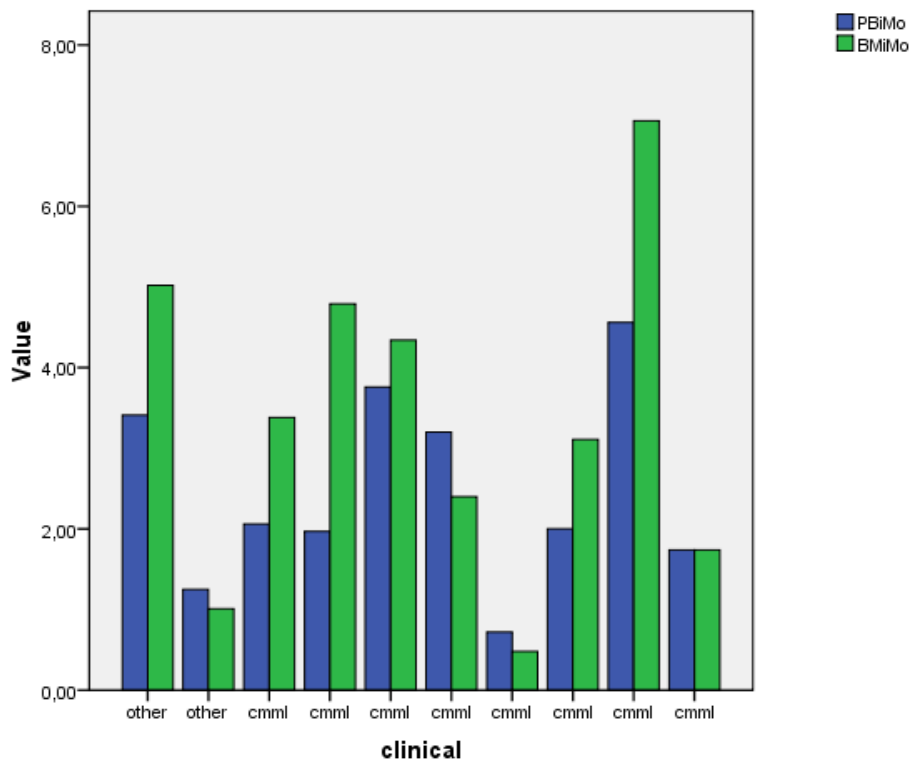
Στα παρακάτω ραβδογράμματα, αναπαριστώνται γραφικά τα ποσοστά των κλασικών (cMo), ενδιάμεσων (iMo) και μη κλασικών (ncMo) μονοκυττάρων, τόσο στο περιφερικό αίμα (PB) όσο και στον μυελό των οστών (BM), που αντιστοιχούν σε κάθε ένα από τα 10 άτομα. Η ένδειξη other στον οριζόντιο άξονα αντιστοιχεί σε άτομα χωρίς ΧΜΜΛ, σύμφωνα με την κατά WHO διάγνωση νόσου, ενώ η ένδειξη cmml αντιστοιχεί σε άτομα που φέρουν το νόσημα.

Όπως φαίνεται, οι διαφορές στα ποσοστά των κλασικών μονοκυττάρων, μεταξύ μυελού και περιφερικού αίματος, είναι μικρές. Ωστόσο, οι διαφορές στα αντίστοιχα ποσοστά των ενδιάμεσων και μη κλασικών μονοκυττάρων είναι πιο εμφανείς.

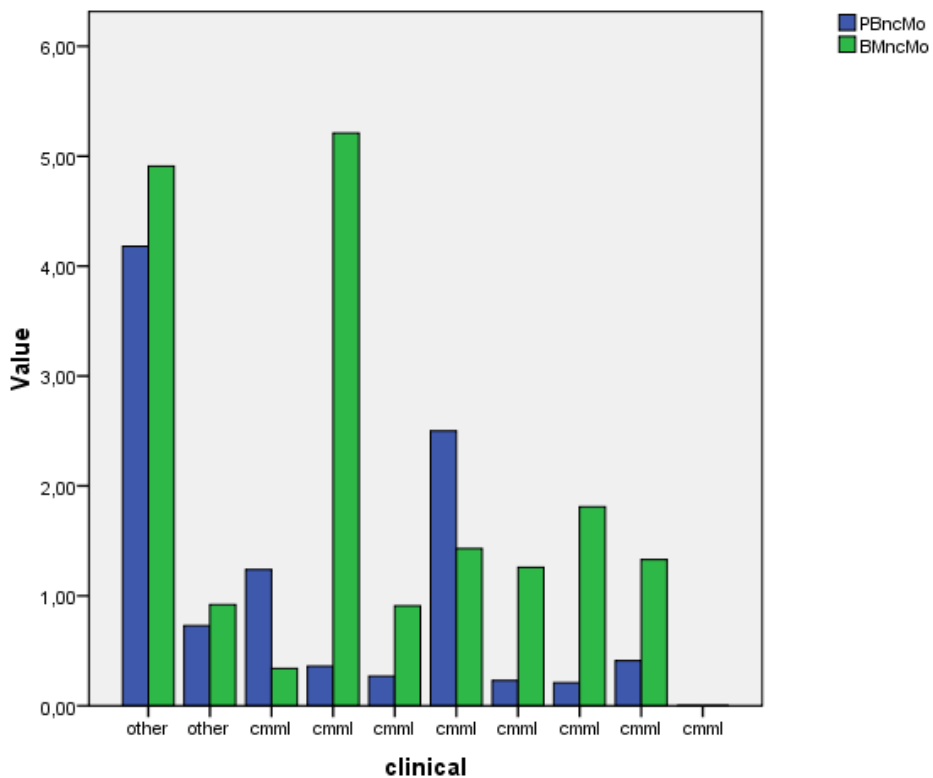


Σχήμα 8.10. Γραφική αναπαράσταση των ποσοστών των κλασικών μονοκτάρων (cMo) στο περιφερικό αίμα (PB) και στον μυελό των οστών (BM).





Σχήμα 8.11. Γραφική αναπαράσταση των ποσοστών των ενδιάμεσων μονοκτάρων (iMo) στο περιφερικό αίμα (PB) και στον μυελό των οστών (BM).



Σχήμα 8.12. Γραφική αναπαράσταση των ποσοστών των μη κλασικών μονοκτάρων (ncMo) στο περιφερικό αίμα (PB) και στον μυελό των οστών (BM).

## 9. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η χρόνια μυελομονοκυτταρική λευχαιμία (CMML) είναι κλωνική αιμοποιητική διαταραχή, χαρακτηρίζεται από εμμένουσα μονοκυττάρωση στο περιφερικό αίμα  $\geq 1 \times 10^9/L$  και χρήζει ειδικής διαχείρισης. Σχετίζεται άμεσα με την ηλικία των ασθενών και συνδυάζει κυτταρικό πολλαπλασιασμό, ως συνέπεια υπερευαισθησίας των μυελικών προγονικών κυττάρων στον παράγοντα διέγερσης αποικιών κοκκιοκυττάρων- μακροφάγων (GM-CSF), με δυσπλασία της μυελικής σειράς και αναποτελεσματική αιμοποίηση.

Η συχνότητα εμφάνισης της νόσου κυμαίνεται μεταξύ 3-4 ανά 100000 ετησίως στις Ηνωμένες Πολιτείες και στην Ευρώπη με μέση ηλικία διάγνωσης τα 72 έτη, ενώ η ΧΜΜΛ είναι σπάνια στους νέους ενήλικες. Η αλληλούχηση ολόκληρου του γονιδιώματος των λευχαιμικών κυττάρων ανέδειξε δύο "μοριακές υπογραφές" σχετικές με την ηλικία, υποστηρίζοντας την ιδέα ότι η γήρανση είναι η κύρια αιτία της νόσου. Η CMML καταδεικνύει κυριαρχία των αρσενικών (2,3 αρσενικά για 1 θυληκό), γεγονός που είναι πιο εμφανές στους ηλικιωμένους ασθενείς. Η κλινική, βιολογική και παθολογική έκφραση της ΧΜΜΛ είναι ετερογενείς, οι λανθάνουσες μορφές μπορούν να παραμεληθούν και η επίπτωση της νόσου να υποτιμηθεί.

Σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (WHO), τα κριτήρια για τη διάγνωση της χρόνιας μυελομονοκυτταρικής λευχαιμίας είναι:

1. Εμμένουσα μονοκυττάρωση περιφερικού αίματος  $\geq 1 \times 10^9/L$ , με τα μονοκύτταρα να αντιπροσωπεύουν  $\geq 10\%$  του αριθμού των λευκών αιμοσφαιρίων
2. Απουσία των κριτηρίων WHO για χρόνιες μυελογενείς λευχαιμίες, πρωτογενή μυελοϊνώματωση, πολυκυτταραιμία ή βασική θρομβοκυττάρωση. Η παρουσία χαρακτηριστικών μυελοϋπερπλαστικών νεοπλασμάτων (MPN) στον μυελό των οστών και / ή μεταλλάξεις σε JAK2, CALR ή MPL τείνουν να υποστηρίζουν MPN με μονοκυττάρωση και όχι CMML
3. Σε περιπτώσεις με ηωσινοφιλία, δεν υπάρχουν ενδείξεις αναδιάταξης στα γονίδια PDGFRA, PDGFRB ή FGFR1 ή PCM1-JAK2
4.  $< 20\%$  βλάστες (μυελοβλάστες, μονοβλάστες και προμονοκύτταρα) στο μυελό των οστών και στο περιφερικό αίμα
5. Δυσπλασία σε μία ή περισσότερες μυελικές σειρές

6. Εάν η δυσπλασία απουσιάζει ή είναι μικρή, η διάγνωση της ΧΜΜΛ μπορεί ακόμα να γίνει αν τηρούνται οι άλλες απαιτήσεις και υπάρχει αποκτηθείσα κλωνική κυτταρογενετική ή μοριακή γενετική ανωμαλία στα κύτταρα της μυελικής σειράς

7. Η μονοκυττάρωση έχει παραμείνει για τουλάχιστον 3 μήνες και έχουν αποκλειστεί όλες οι άλλες αιτίες μονοκυττάρωσης

Η Διεθνής Ένωση Ανοσολογικών Εταιρειών έχει εγκρίνει μια ονοματολογία, που υποδιαιρεί τα μονοκύτταρα σε 3 υποπληθυσμούς με βάση την έκφραση συγκεκριμένων γονιδίων. Συγκεκριμένα, η έκφραση του CD14, ενός υποδοχέα για τους βακτηριακούς λιποπολυσακχαρίτες και του CD16, που είναι υποδοχέας χαμηλής συγγένειας για την ανοσοσφαιρίνη G (υποδοχέας Fcγ-III), διακρίνει τα CD14<sup>+</sup> / CD16<sup>-</sup> (κλασικά) από τα CD14<sup>+</sup> / CD16<sup>+</sup> (ενδιάμεσα) και CD14<sup>low</sup> / CD16<sup>+</sup> (μη κλασικά) μονοκύτταρα. Οι τρεις μονοκυτταρικοί υποπληθυσμοί διαφέρουν μεταξύ τους ως προς την έκκριση κυτταροκινών και την φαγοκυτταρική τους ικανότητα. Μελέτες έχουν δείξει ότι ο προσδιορισμός των παραπάνω μονοκυτταρικών υποπληθυσμών με κυτταρομετρία ροής, μπορεί να διακρίνει τη ΧΜΜΛ από αντιδραστικές μονοκυτταρώσεις, που μπορεί ως υπόβαθρο να έχουν κάποιον όγκο. Συγκεκριμένα, ο ανοσοφαινότυπος της ΧΜΜΛ χαρακτηρίζεται από αύξηση του ποσοστού των κλασικών μονοκυττάρων >94% στο περιφερικό αίμα, η οποία όμως φαίνεται να ελαττώνεται σε ασθενείς, που έχουν λάβει θεραπεία με υπομεθυλιωτικούς παράγοντες.

Θεραπευτική επιλογή της ΧΜΜΛ, παραμένει η αλλογενής μεταμόσχευση βλαστικών κυττάρων, ενώ όταν αυτή αποκλείεται η ΧΜΜΛ κατηγοριοποιείται μεταξύ μυελοδυσπλαστικής (MD-CMML, WBC<13x10<sup>9</sup>/L) και μυελοϋπερπλαστικής (MP-CMML, WBC≥13x10<sup>9</sup>/L) ΧΜΜΛ. Ελλείψει δυσμενών προγνωστικών παραγόντων, η διαχείριση της MD-CMML προέρχεται από τα μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα, βασιζόμενη στους παράγοντες διέγερσης της ερυθροποίησης για την αντιμετώπιση της αναιμίας και την προσεκτική παρακολούθηση και υποστηρικτική περίθαλψη, ενώ η διαχείριση της MP-CMML συνήθως βασίζεται σε παράγοντες μείωσης των κυτταρικών πληθυσμών, όπως η υδροξουρία. Στην περίπτωση αυξημένου ποσοστού βλαστών και άλλων δυσμενών προγνωστικών παραγόντων, οι παράγοντες υπομεθυλίωσης είναι η προτιμώμενη επιλογή, παρόλο που η επίδρασή τους στον λευχαιμικό μετασχηματισμό και την επιβίωση δεν έχει αποδειχθεί. Οι

τρέχουσες θεραπευτικές επιλογές μπορούν να βελτιώσουν την ποιότητα ζωής του ασθενούς, αλλάζουν ελάχιστα την εξέλιξη της νόσου. Εις βάθος κατανόηση της παθοφυσιολογία της ΧΜΜΛ θα οδηγήσει στην εξερεύνηση νέων στόχων που θα μπορούσαν ενδεχομένως να είναι θεραπευτικοί.

Με βάση δημοσιεύσεις, όπως αυτή των Selimoglu-Buet, D., et al. (2015) ("Characteristic repartition of monocyte subsets as a diagnostic signature of chronic myelomonocytic leukemia." *Blood* 125(23): 3618-3626), μελετήθηκαν στα πλαίσια της συγκεκριμένης διπλωματικής εργασίας μονοκυτταρώσεις και ο ανοσοφαινότυπος της χρόνιας μυελομονοκυτταρικής λευχαιμίας. Η μελέτη έγινε με σκοπό να προσδιοριστεί η ικανότητα διάκρισης της ΧΜΜΛ από τις μονοκυτταρώσεις και διάφορες αιματολογικές κακοήθειες, με τη χρήση της κυτταρομετρίας ροής. Επίσης, στην μελέτη συμπεριλήφθηκαν δείγματα μυελού των οστών, προκειμένου να διαπιστωθεί αν υπάρχει συνάφεια με τα ευρήματα από τη χρήση κυτταρομετρίας ροής στο περιφερικό αίμα. Τέλος, έγινε σύγκριση των αποτελεσμάτων από δύο λογισμικά προγράμματα, που χρησιμοποιούνται ευρέως στην ανάλυση αρχείων κυτταρομετρίας ροής.

Συγκεκριμένα, στα πλαίσια της διπλωματικής εργασίας εξετάστηκαν 52 δείγματα περιφερικού αίματος με κυτταρομετρία ροής. Η οριοθέτηση κατά τη δημιουργία των πρωτοκόλλων στα Navios EX και BD FACS CANTO II, καθώς και κατά την ανάλυση με τα λογισμικά Kaluza™ και Infinicy™, έγινε σύμφωνα με τη στατηγική οριοθέτησης που προτείνεται από το European Leukemia Net. Τα αρχεία, που προέκυψαν κατά την ανάλυση στους δύο κυτταρομετρητές, επεξεργάστηκαν περαιτέρω με τα παραπάνω λογισμικά και από αυτά προέκυψαν τα ποσοστά των κλασικών, ενδιάμεσων και μη κλασικών μονοκυττάρων. Στη συνέχεια, τα ποσοστά αυτά εισήχθησαν στο στατιστικό πακέτο SPSS και προέκυψαν οι πίνακες και τα γραφήματα, που παρουσιάζονται στο προηγούμενο κεφάλαιο.

Από τον πίνακα διπλής εισόδου για τα 52 δείγματα περιφερικού αίματος (Πίνακας 8.1), υπάρχει συμφωνία μεταξύ των κλινικοεργαστηριακών ευρημάτων και του ανοσοφαινότυπου για 48 από αυτά. Μάλιστα, η συσχέτιση αυτή κρίνεται ως στατιστικά σημαντική σύμφωνα με τα αποτελέσματα της δοκιμασίας  $\chi^2$ . Από τα υπόλοιπα 4 δείγματα, τα 3 χαρακτηρίστηκαν ως ΧΜΜΛ με βάση τον ανοσοφαινότυπο που προέκυψε από την επεξεργασία με το λογισμικό Kaluza™,

ενώ τα υπόλοιπα κλινικοεργαστηριακά ευρήματα έδειξαν άλλο νόσημα αποκλείοντας την πιθανότητα για ΧΜΜΛ. Το 1 δείγμα από τα παραπάνω 4 χαρακτηρίστηκε ως ΧΜΜΛ με βάση τα κλινικοεργαστηριακά ευρήματα, ενώ ο ανοσοφαινότυπος δεν συμφώνησε. Για την συσχέτιση μεταξύ ανοσοφαινότυπου και κλινικοεργαστηριακών ευρημάτων τα δείγματα, που εμφάνισαν ποσοστό κλασικών μονοκυττάρων >94%, θεωρήθηκαν ως δείγματα ΧΜΜΛ σύμφωνα με την υπάρχουσα βιβλιογραφία [88]. Το ίδιο αποτέλεσμα προέκυψε και για τα 37 δείγματα περιφερικού αίματος, που αναλύθηκαν με το λογισμικό Infinicyt™ (Πίνακας 8.2). Στην περίπτωση ανάλυσης με το λογισμικό Infinicyt™ συμφωνία υπήρξε για 35 από τα 37. Τα 2 δείγματα χαρακτηρίστηκαν ως ΧΜΜΛ με βάση τον ανοσοφαινότυπο, ενώ τα υπόλοιπα κλινικοεργαστηριακά ευρήματα δεν συνηγόρησαν υπέρ της διάγνωσης για ΧΜΜΛ. Και στην περίπτωση αυτή βρέθηκε να υπάρχει στατιστικά σημαντική συσχέτιση. Με βάση λοιπόν αυτή τη στατιστικά σημαντική συσχέτιση μεταξύ κλινικοεργαστηριακών ευρημάτων και ανοσοφαινότυπου για τα παραπάνω δείγματα, είναι φανερό ότι το ποσοστό των κλασικών μονοκυττάρων, που προσδιορίζεται με κυτταρομετρία ροής μπορεί να θέσει τη διάγνωση για ΧΜΜΛ όταν είναι >94%. Ωστόσο, σύμφωνα με τη βιβλιογραφία ασθενείς με ΧΜΜΛ, που έχουν λάβει θεραπεία με υπομεθυλιωτικούς παράγοντες εμφανίζουν ποσοστό κλασικών μονοκυττάρων < 94%.

Από την ανάλυση δειγμάτων μυελού των οστών (Πίνακας 8.3) φαίνεται να υπάρχει συμφωνία μεταξύ κλινικοεργαστηριακών ευρημάτων και του ανοσοφαινότυπου, που προέκυψε από την επεξεργασία με το λογισμικό Kaluza™, για 15 από τα 19. Από τα υπόλοιπα 4 δείγματα μυελού, τα 2 χαρακτηρίστηκαν ως ΧΜΜΛ με βάση τον ανοσοφαινότυπο, αλλά τα κλινικοεργαστηριακά ευρήματα δεν συνηγόρησαν υπέρ αυτής διάγνωσης, ενώ 2 ακόμη χαρακτηρίστηκαν ως ΧΜΜΛ σύμφωνα με την κατά WHO διάγνωση της νόσου χωρίς συμφωνία του ανοσοφαινότυπου. Από τη δοκιμασία  $\chi^2$  προέκυψε στατιστικά σημαντική συσχέτιση μεταξύ κλινικοεργαστηριακών ευρημάτων και ανοσοφαινότυπου και στην περίπτωση δειγμάτων μυελού. Όπως στην περίπτωση δειγμάτων περιφερικού αίματος, έτσι και για τα δείγματα μυελού, θεωρήθηκαν ως πάσχοντες από ΧΜΜΛ οι ασθενείς, που εμφάνισαν ποσοστό κλασικών μονοκυττάρων >94%. Ωστόσο, η τιμή  $p_{value}$  βρέθηκε μεγαλύτερη από εκείνη των δειγμάτων περιφερικού αίματος. Αυτό, μπορεί να οφείλεται στο μικρότερο μέγεθος δείγματος καθώς και στο ότι σύμφωνα με τη

βιβλιογραφία και τους Picot T, et al. (2018) (Evaluation by Flow Cytometry of Mature Monocyte Subpopulations for the Diagnosis and Follow-Up of Chronic Myelomonocytic Leukemia." *Front Oncol.* 8:109.), η τιμή cutoff σε δείγματα μυελού μπορεί να είναι μικρότερη από εκείνη για τα δείγματα περιφερικού αίματος (93% αντί 94%).

Από τον πίνακα 8.6, όπου παρουσιάζονται οι μέσες τιμές και οι τυπικές αποκλίσεις για τους τρεις μονοκυτταρικούς υποπληθυσμούς (κλασικά, ενδιάμεσα και μη κλασικά μονοκύτταρα), φαίνεται ότι υπάρχει αύξηση στο ποσοστό των κλασικών μονοκυττάρων στα άτομα που πάσχουν από ΧΜΜΛ σε σχέση με εκείνα που δεν φέρουν το νόσημα. Αντιθέτως, ελαττωμένα παρουσιάζονται τα ποσοστά των ενδιάμεσων και μη κλασικών μονοκυττάρων στην περίπτωση της ΧΜΜΛ σε σχέση με τα άτομα, που δεν πάσχουν. Τα παραπάνω αφορούν στην ανάλυση με το λογισμικό Kaluza™. Ωστόσο, το ίδιο συμπέρασμα προκύπτει και για τα αναλυθέντα δείγματα με το λογισμικό Infinicyt™ με αυξημένο το ποσοστό των κλασικών μονοκυττάρων και ελαττωμένα τα ποσοστά των ενδιάμεσων και μη κλασικών. Η διαφορά στα ποσοστά των τριών μονοκυτταρικών υποπληθυσμών, μεταξύ ατόμων με ΧΜΜΛ και ατόμων χωρίς το νόσημα φαίνεται να είναι στατιστικά σημαντική τόσο στην περίπτωση του ενός όσο και στην περίπτωση του άλλου λογισμικού επεξεργασίας. Είναι προφανές και από άλλες ερευνητικές μελέτες, όπως αυτή των Hudson, C. A., et al. (2018) (Clinical utility of classical and nonclassical monocyte percentage in the diagnosis of chronic myelomonocytic leukemia. *American journal of clinical pathology*, 150(4), 293-302.) ότι η αύξηση του ποσοστού των κλασικών μονοκυττάρων συνοδεύεται από ελάττωση του ποσοστού των μη κλασικών. Η κατανομή των ποσοστών των τριών μονοκυτταρικών υποπληθυσμών, μεταξύ ατόμων με ΧΜΜΛ και ατόμων χωρίς το νόσημα, αναπαριστάται γραφικά με το ραβδόγραμμα 8.1, καθώς και με τα θηκογράμματα 8.3, 8.4 και 8.5, για κάθε υποπληθυσμό ξεχωριστά και για τα δύο λογισμικά.

Στον πίνακα 8.7, όπου παρουσιάζονται οι μέσες τιμές και οι τυπικές αποκλίσεις των τριών μονοκυτταρικών υποπληθυσμών, από την ανάλυση των 19 δειγμάτων μυελού των οστών με το λογισμικό Kaluza™, παρατηρείται επίσης αύξηση στο ποσοστό των κλασικών μονοκυττάρων στα άτομα που πάσχουν από ΧΜΜΛ σε σχέση με εκείνα, που δεν φέρουν το νόσημα. Ακόμη, όπως στην περίπτωση δειγμάτων περιφερικού αίματος, τα ποσοστά των ενδιάμεσων και μη κλασικών μονοκυττάρων

στον μυελό των οστών των ατόμων, που πάσχουν από ΧΜΜΛ, παρατηρούνται ελαττωμένα. Από τον υπολογισμό της τιμής  $p_{value}$ , αξιολογείται ως στατιστικά σημαντική η διαφορά στην κατανομή των ποσοστών, των μη κλασικών μονοκυττάρων μεταξύ των δύο ομάδων. Αντιθέτως, στην περίπτωση των κλασικών και ενδιάμεσων μονοκυττάρων δεν παρατηρείται στατιστικά σημαντική διαφορά στην κατανομή των ποσοστών τους μεταξύ των δύο ομάδων ατόμων. Το ραβδόγραμμα 8.2 και το θηκόγραμμα 8.6, αποδίδουν γραφικά την ποσοστιαία κατανομή των τριών μονοκυτταρικών υποπληθυσμών στα δείγματα μυελού.

Από τις καμπύλες ROC των μονοκυτταρικών υποπληθυσμών του περιφερικού αίματος (Σχήμα 8.7 & 8.8), παρατηρείται ότι η περιοχή, που βρίσκεται κάτω από την καμπύλη των κλασικών μονοκυττάρων είναι εκείνη με το μεγαλύτερο εμβαδό. Επομένως, από τους τρεις μονοκυτταρικούς υποπληθυσμούς, τα κλασικά μονοκύτταρα εμφανίζουν μεγαλύτερη ακρίβεια διαγνωστικού ελέγχου. Τα κλασικά μονοκύτταρα, που έχουν προκύψει από ανάλυση με το λογισμικό Kaluza, χαρακτηρίζονται από καλό διαχωρισμό ενός ατόμου με ΧΜΜΛ και ενός χωρίς το νόσημα, ενώ εκείνα από το λογισμικό Infinicyt χαρακτηρίζονται από εξαιρετικό διαχωρισμό, σύμφωνα με τις τιμές 0-1 του εμβαδού κάτω από την καμπύλη. Το ποσοστό των κλασικών μονοκυττάρων, στο οποίο εμφανίζεται η μεγαλύτερη ευαισθησία και ειδικότητα είναι περίπου 94% και συνάδει με αυτό που περιγράφεται στη μελέτη των Selimoglu-Buet, D., et al. το 2015. Στην ίδια μελέτη αναφέρεται ότι το αντίστοιχο ποσοστό για τη διάγνωση της ΧΜΜΛ στον μυελό των οστών είναι χαμηλότερο. Αυτό επιβεβαιώνεται από την παρούσα εργασία, όπου βρέθηκε να είναι περίπου 91%. Η περιοχή κάτω από την καμπύλη των κλασικών μονοκυττάρων στην περίπτωση μυελού των οστών εμφανίζει σχετικά καλό διαχωρισμό δηλώνοντας πως η διαγνωστική αξία του συγκεκριμένου δεν είναι στατιστικά σημαντική, πιθανά λόγω μικρού μεγέθους του δείγματος (Σχήμα 8.9).

Ενώ όλα τα παραπάνω αφορούν ξεχωριστά τα 52 δείγματα περιφερικού αίματος και τα 19 δείγματα μυελού των οστών, για 10 ασθενείς πραγματοποιήθηκε ταυτόχρονη ανάλυση δείγματος μυελού και δείγματος περιφερικού αίματος. Η συγκεκριμένη ανάλυση έγινε με το λογισμικό Kaluza™. Από τον πίνακα διπλης εισόδου (Πίνακας 8.10) φαίνεται ότι υπάρχει συμφωνία για 8 από τα 10 δείγματα. Συγκεκριμένα, από την ανάλυση 9 δείγματα περιφερικού αίματος και 7 δείγματα μυελού χαρακτηρίστηκαν ως ΧΜΜΛ, ενώ 1 δείγμα περιφερικού αίματος και 3 μυελού

εμφάνισαν ποσοστό κλασικών μονοκυττάρων < 94%. Από τη δοκιμασία  $\chi^2$  προέκυψε μη σημαντική στατιστικά συσχέτιση των αποτελεσμάτων. Το ίδιο αποτέλεσμα προέκυψε και από την εφαρμογή των Wilcoxon Test (Πίνακας 8.11) και Paired Samples Test (Πίνακας 8.12). Η μη σημαντική στατιστικά συσχέτιση μεταξύ των δύο ειδών δειγμάτων μπορεί να οφείλεται στο μικρό μέγεθος του δείγματος και/ή στα πολύ έντονα δυσπλαστικά χαρακτηριστικά του μυελού, που δυσκολεύουν πολλές φορές την ορθή οριοθέτηση. Επίσης, σύμφωνα με τη βιβλιογραφία και τις καμπύλες ROC της παρούσας εργασίας, το ποσοστό των κλασικών μονοκυττάρων για τον μυελό των οστών, που θέτει τη διάγνωση για ΧΜΜΛ και εμφανίζει καλή ευαισθησία και ειδικότητα, είναι μικρότερο από 94%. Επόμενως, κάποια από τα 3 δείγματα μυελού των οστών, τα οποία εμφάνισαν ποσοστό κλασικών μονοκυττάρων <94%, μπορεί να είναι ψευδώς αρνητικά με βάση τη συγκεκριμένη μεθοδολογία. Ακόμη από τα ραβδογράμματα 14, 15 και 16 φαίνεται ότι για την πλειονότητα των δειγμάτων οι διαφορές στις μέσες τιμές των κλασικών μονοκυττάρων μεταξύ περιφερικού αίματος και μυελού είναι πολύ μικρές, ενώ οι αντίστοιχες των ενδιάμεσων και μη κλασικών μονοκυττάρων είναι πιο μεγάλες και εμφανείς.

Τέλος, στην παρούσα διπλωματική εργασία χρησιμοποιήθηκαν δύο διαφορετικές ανάλυσης. Από τα 52 δείγματα περιφερικού αίματος, τα 37 αναλύθηκαν και με τις δύο μεθόδους και με βάση τα αποτελέσματα, έγινε και η σύγκριση αυτών. Από τον πίνακα διπλής εισόδου (Πίνακας 8.4) φαίνεται ότι υπήρξε συμφωνία, μεταξύ των δύο μεθόδων, στη διάγνωση. Συγκεκριμένα 15 δείγματα χαρακτηρίστηκαν ως ΧΜΜΛ και με τις δύο μεθόδους, ενώ τα υπολοίπα 22 εμφάνισαν και για τις δύο μεθόδους ποσοστό κλασικών μονοκυττάρων < 94%. Η δοκιμασία  $\chi^2$ , που εφαρμόστηκε για τη συσχέτιση των αποτελεσμάτων μεταξύ των δύο μεθόδων, απέδωσε στατιστικά σημαντική συσχέτιση. Ακόμη, εφαρμόστηκαν δύο μη παραμετρικοί έλεγχοι, Wilcoxon test (Πίνακας 8.8) και Paired Samples t-test (Πίνακας 8.9), για να ελεγχθούν οι διαφορές στα ποσοστά των τριών μονοκυτταρικών υποπληθυσμών, μεταξύ των δύο μεθόδων. Από τους δύο παραπάνω ελέγχους οι τιμές, που προέκυψαν δείχνουν να μην υπάρχει διαφορά στα ποσοστά των κλασικών και μη κλασικών μονοκυττάρων μεταξύ των δύο μεθόδων, ενώ για τα ενδιάμεσα μονοκύτταρα φαίνεται να υπάρχει διαφορά στα ποσοστά, που προέκυψαν από τις δύο αυτές μεθόδους.



Σύμφωνα με τα παραπάνω, ο πληθυσμός των κλασικών μονοκυττάρων θα μπορούσε να αποτελέσει έναν απαραίτητο και ειδικό δείκτη για τη διάγνωση της ΧΜΜΛ αντικαθιστώντας την τρίμηνη μονοκυττάρωση ως κύριο διαγνωστικό χαρακτηριστικό. Μελλοντικά, ανάλυση μεγαλύτερου αριθμού δειγμάτων από ασθενείς με ΧΜΜΛ καθώς και σύγκριση αυτών με τον ανοσοφαινότυπο ασθενών με μονοκυττάρωση και άλλα ΜΔΣ/ΜΥΝ θα βοηθήσει στην πιο ακριβή διάγνωση της ΧΜΜΛ με κυτταρομετρία ροής. Επίσης, παρακολούθηση των τριών μονοκυτταρικών υποπληθυσμών σε ασθενείς με ΧΜΜΛ πριν, μετά αλλά και κατά τη διάρκεια της θεραπείας, θα αποδώσει χρήσιμες πληροφορίες για την αποτελεσματικότητα των θεραπευτικών προσεγγίσεων.

## 10. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- [1] M. G. Macey, "Principles of Flow Cytometry."
- [2] A. Adan *et al.*, "Critical Reviews in Biotechnology Flow cytometry: basic principles and applications," vol. 8551, 2017.
- [3] M. J. Wilkerson, "Principles and Applications of Flow Cytometry and Cell Sorting in Companion," *VSP*, vol. 42, no. 1, pp. 53–71, 2012.
- [4] V. Public, P. H. Kontos, V. P. Health, P. H. Tamamidou, and P. H. Roumeliotou, "Ανασκόπηση Review article Flow cytometry and its applications," vol. 56, no. 2017, pp. 71–77, 2005.
- [5] A. Macheta, K. Radko, A. Szymczyk, and M. Podhorecka, "The technique of flow cytometry in diagnostic research," vol. 7, no. 19, pp. 55–59, 2013.
- [6] V. P. Maltsev, "Scanning flow cytometry for individual particle analysis Scanning flow cytometry for individual particle analysis," vol. 243, no. 2000, 2014.
- [7] M. G. Ormerod, *Flow Cytometry\_ A Practical Approach - Βιβλία Google*. OUP Oxford, 2000.
- [8] "Practical Flow Cytometry - Howard M." .
- [9] J. P. M. Jr, "Basic principles of f low cytometry," vol. 16, pp. 229–243, 2002.

- [10] B. Marrow, P. Blood, and S. Cells, "Teaching Notes from Multidimensional Flow Cytometric ICeU," vol. 394, pp. 387–394, 1993.
- [11] D. Barnett and J. T. Reilly, "Quality Control in Flow Cytometry," pp. 113–131.
- [12] Μ. Β. Κ. Ψαρρά, Β. Καψιμάλη, Ε. Κώνστα, *"Κυτταρομετρία Ροής: Κλινικές και Ερευνητικές Εφαρμογές."* Focus on Health, Αθήνα, 2015.
- [13] M. Brown and C. Wittwer, "Flow Cytometry: Principles and Clinical Applications in Hematology," vol. 8, pp. 1221–1229, 2000.
- [14] T. Kalina, V. H. J. Van Der Velden, and S. Bo, "EuroFlow standardization of flow cytometer instrument settings and immunophenotyping protocols," no. February, pp. 1986–2010, 2012.
- [15] N. Varma and S. Naseem, "Application of Flow Cytometry in Pediatric Hematology-Oncology," no. April 2010, pp. 18–29, 2011.
- [16] W. Giaretti, "Flow cytometry and applications in oncology," pp. 275–277, 1997.
- [17] L. Ziegler-heitbrock, "Blood monocytes and their subsets: established features," vol. 6, no. August, pp. 1–5, 2015.
- [18] H. Kawamoto and N. Minato, "Myeloid cells," vol. 36, pp. 1374–1379, 2004.
- [19] S. Yona and S. Jung, "Monocytes: subsets, origins, fates and functions," 2010.
- [20] A. G. Fisher, "Cellular identity and lineage choice," vol. 2, no. December, 2002.
- [21] J. E. Goasguen, J. M. Bennett, B. J. Bain, T. Vallespi, R. Brunning, and G. J. Mufti, "DECISION MAKING AND PROBLEM SOLVING Morphological evaluation of monocytes and their precursors," vol. 94, no. 7, pp. 994–997, 2009.
- [22] Γ. Πάγκαλης, *Αιματολογία στην κλινική πράξη.* Ιατρικές Εκδόσεις Π. Χ. Πασχαλίδης, 2008.
- [23] W. Gorczyca, Z. Sun, W. Cronin, X. Li, S. Mau, and S. Tugulea, *Immunophenotypic Pattern of Myeloid Populations by Flow Cytometry*

*Analysis*, vol. 103. Elsevier Inc.

- [24] S. Kawamura and T. Ohteki, "Monopoiesis in humans and mice," *Int Immunol*, vol. 30, no. 11, pp. 503–509, 2018.
- [25] L. Ziegler-heitbrock, "The CD14  $\geq$  CD16  $\geq$  blood monocytes : their role in infection and inflammation," 2006.
- [26] L. Ziegler-heitbrock *et al.*, "Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood," 2012.
- [27] C. Lambert, F. W. M. B. Preijers, and G. Y. Demirel, "Editorial paper Monocytes and Macrophages in Flow an ESCCA Initiative on Advanced Analyses of Monocyte Lineage Using Flow Cytometry," vol. 00, no. May 2014, 2015.
- [28] P. J. Murray, "Seminars in Immunology Immune regulation by monocytes," *Semin. Immunol.*, no. December, pp. 0–1, 2017.
- [29] J. H. K. Foucar, "How I investigate monocytosis," no. October 2017, pp. 1–8, 2018.
- [30] T. H. E. Hematopoietic, S. Cell, and I. T. S. N. Transformation, "The hematopoietic stem cell and its neoplastic transformation," pp. 1649–1660, 1999.
- [31] L. Adès, R. Itzykson, and P. Fenaux, "Myelodysplastic syndromes," vol. 6736, no. 13, pp. 1–14, 2014.
- [32] D. Mds-registry *et al.*, "Incidence and prevalence of myelodysplastic syndromes : Data from the," *Leuk. Res.*, vol. 35, no. 12, pp. 1591–1596, 2011.
- [33] A. Matsuda *et al.*, "Difference in clinical features between Japanese and German patients with refractory anemia in myelodysplastic syndromes," vol. 106, no. 8, pp. 2633–2641, 2016.
- [34] C. Avgerinou, Y. Alamanos, M. Karakantza, and A. Symeonidis, "The incidence of myelodysplastic syndromes in Western Greece is increasing," pp. 877–887, 2013.
- [35] S. S. Strom, Y. Gu, S. K. Gruschkus, S. A. Pierce, and E. H. Estey, "Risk

- factors of myelodysplastic syndromes : a case – control study,” no. April, pp. 1912–1918, 2005.
- [36] M. G. Della Porta *et al.*, “Minimal morphological criteria for defining bone marrow dysplasia : a basis for clinical implementation of WHO classification of myelodysplastic syndromes,” no. April, pp. 1–10, 2014.
- [37] G. Flandrin, “Proposals for the Classification of the Acute Leukaemias,” 1976.
- [38] C. Avgerinou *et al.*, “Epidemiology of myelodysplastic syndromes in the area of Southwestern Greece during the period 1990–2009,” vol. 30, 2011.
- [39] J. M. Bennett, “World Health Organization classification of the acute leukemias and myelodysplastic syndrome,” *Int J Hematol*, vol. 72, no. 2, pp. 131–3, 2000.
- [40] A. A. Mohammad, “Myelodysplastic syndrome from theoretical review to clinical application view,” vol. 12, pp. 134–142, 2018.
- [41] A. Raza *et al.*, “Apoptosis in bone marrow biopsy samples involving stromal and hematopoietic cells in 50 patients with myelodysplastic syndromes,” *Blood*, vol. 86, no. 1, pp. 268–76, 1995.
- [42] J. E. Parker, G. J. Mufti, F. Rasool, A. Mijovic, S. Devereux, and A. Pagliuca, “The role of apoptosis, proliferation, and the Bcl-2-related proteins in the myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemia secondary to MDS,” *Blood*, vol. 96, no. 12, pp. 3932–8, 2000.
- [43] A. Jerez *et al.*, “Topography , Clinical , and Genomic Correlates of 5q Myeloid Malignancies Revisited,” vol. 30, no. 12, pp. 1343–1349, 2012.
- [44] K. Yoshida *et al.*, “Frequent pathway mutations of splicing machinery in myelodysplasia,” *Nature*, vol. 478, no. 7367, pp. 64–69, 2011.
- [45] S. Y. Kordasti *et al.*, “apoptosis are increased in low risk myelodysplastic syndrome,” no. II, pp. 64–72, 2009.
- [46] A. Toma, P. Fenaux, F. Dreyfus, and C. Cordonnier, “Infections in myelodysplastic syndromes,” vol. 97, no. 10, pp. 1459–1470, 2012.
- [47] J. M. Bennett, “A Comparative Review of Classification Systems in

- Myelodysplastic Syndromes ( MDS ),” pp. 6–13, 2005.
- [48] P. Fenaux, “How we manage adults with myelodysplastic syndrome,” pp. 1–12, 2019.
- [49] J. W. Vardiman, N. L. Harris, and R. D. Brunning, “Review article The World Health Organization ( WHO ) classification of the myeloid neoplasms,” vol. 100, no. 7, pp. 2292–2303, 2015.
- [50] D. S. Chang, K.L., Snyder, *Ansell, S. M., & Rosen, S. T. (2008). Rare hematological malignancies. Springer US. <https://doi.org/10.1007/978-0-387-73744-7>. 2008.*
- [51] H. Malignancies and M. Dreyling, *Myelodysplastic Syndromes*. Springer; 1st ed. 2018 edition (June 6, 2018).
- [52] F. Onida *et al.*, “Prognostic factors and scoring systems in chronic myelomonocytic leukemia : a retrospective analysis of 213 patients,” vol. 99, no. 3, pp. 840–850, 2016.
- [53] D. A. Arber *et al.*, “The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia,” vol. 127, no. 20, pp. 2391–2406, 2019.
- [54] D. E. Rollison *et al.*, “Epidemiology of myelodysplastic syndromes and chronic myeloproliferative disorders in the United States , 2001-2004 , using data from the NAACCR and SEER programs Epidemiology of myelodysplastic syndromes and chronic myeloproliferative disorders in the United States , 2001-2004 , using data from the NAACCR and SEER programs,” pp. 45–52, 2013.
- [55] E. Such *et al.*, “Original Articles Cytogenetic risk stratification in chronic myelomonocytic leukemia,” vol. 96, no. 3, pp. 375–383, 2011.
- [56] R. Itzykson, M. Duchmann, N. Lucas, and E. Solary, “CMML : Clinical and molecular aspects,” *Int. J. Hematol.*, 2017.
- [57] M. M. Patnaik, S. A. Parikh, C. A. Hanson, and A. Tefferi, “Chronic myelomonocytic leukaemia : a concise clinical and pathophysiological review,” pp. 1–14, 2014.

- [58] M. M. Patnaik, "ANNUAL CLINICAL UPDATES IN HEMATOLOGICAL Chronic myelomonocytic leukemia: 2018 update on diagnosis , risk stratification and management," no. March, pp. 824–840, 2018.
- [59] E. A. Wassie *et al.*, "Molecular and prognostic correlates of cytogenetic a Mayo Clinic-French Consortium Study," vol. 89, no. 12, pp. 1111–1115, 2014.
- [60] S. Epelman, K. J. Lavine, and G. J. Randolph, "HHS Public Access," vol. 41, no. 1, pp. 21–35, 2015.
- [61] E. J. Feldman *et al.*, "On the use of lonafarnib in myelodysplastic syndrome and chronic myelomonocytic leukemia," pp. 1707–1711, 2008.
- [62] E. Wattel *et al.*, "A randomized trial of hydroxyurea versus VP16 in adult chronic myelomonocytic leukemia. Groupe Francais des Myelodysplasies and European CMML Group," *Blood*, vol. 88, no. 7, pp. 2480–7, 1996.
- [63] R. Costa, H. Abdulhaq, B. Haq, R. K. Shaddock, and J. Latsko, "Activity of Azacitidine in Chronic Myelomonocytic Leukemia," pp. 2690–2696, 2011.
- [64] I. Pusic *et al.*, "HHS Public Access," vol. 21, no. 10, pp. 1761–1769, 2016.
- [65] Q. An, C. H. Fan, and S. M. Xu, "Recent perspectives of pediatric leukemia - an update.," *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, vol. 21, no. 4 Suppl, pp. 31–36, 2017.
- [66] A. M. Leukemia, "Acute Myeloid Leukemia," 2015.
- [67] N. J. Short, M. E. Rytting, and J. E. Cortes, "Seminar Acute myeloid leukaemia," *Lancet*, vol. 6736, no. 18, pp. 1–14, 2018.
- [68] G. Leone, L. Fianchi, L. Pagano, and M. T. Voso, "Chemico-Biological Interactions Incidence and susceptibility to therapy-related myeloid neoplasms," *Chem. Biol. Interact.*, vol. 184, no. 1–2, pp. 39–45, 2010.
- [69] E. H. Estey, "ANNUAL CLINICAL UPDATES IN HEMATOLOGICAL MALIGNANCIES : A CONTINUING MEDICAL EDUCATION SERIES Acute myeloid leukemia : 2019 update on risk-stratification and management," no. July 2018, pp. 1267–1291, 2019.
- [70] J. N. Saultz and R. Garzon, "Acute Myeloid Leukemia : A Concise Review,"

- pp. 1–17, 2016.
- [71] C. Presentation, “Clinical presentation,” pp. 1051–1062, 1999.
- [72] H. Döhner *et al.*, *Diagnosis and Management of AML in Adults : 2017 ELN Recommendations from an International Expert Panel*. 2017.
- [73] D. G. Gilliland and J. D. Griffin, “Review article The roles of FLT3 in hematopoiesis and leukemia,” vol. 100, no. 5, pp. 1532–1543, 2015.
- [74] L. Res, “HHS Public Access,” vol. 32, no. 7, pp. 1005–1014, 2015.
- [75] H. Döhner *et al.*, “Diagnosis and management of acute myeloid leukemia in adults : recommendations from an international expert panel , on behalf of the European LeukemiaNet Review article Diagnosis and management of acute myeloid leukemia in adults : recommendations from an international expert panel , on behalf of the European LeukemiaNet Hartmut Do,” pp. 453–474, 2012.
- [76] S. Takahashi, “Current findings for recurring mutations in acute myeloid leukemia,” *J. Hematol. Oncol.*, vol. 4, no. 1, p. 36, 2011.
- [77] S. H. Swerdlow *et al.*, *WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues World Health Organization Classification of Tumours*. .
- [78] A. In and A. Myeloid, “An update of current treatments for adult acute myeloid leukemia,” vol. 127, no. 1, pp. 53–62, 2016.
- [79] M. W. Lowdell, “Experimental Design, Data Analysis, and Fluorescence Quantitation,” pp. 133–145.
- [80] Z. Maciorowski, P. K. Chattopadhyay, and P. Jain, “Basic Multicolor Flow Cytometry,” no. April, pp. 1–38, 2017.
- [81] J. M. Peters and M. Q. Ansari, “Multiparameter Flow Cytometry in the Diagnosis and Management of Acute Leukemia,” vol. 135, no. January, 2011.
- [82] P. MICHAEL J. BOROWITZ, MD, PHD, 1 K. LYNN GUENTHER, MT (ASCP), 1 KEITH E. SHULTS, BS, 2 AND GREGORY T. STELZER, “Immunophenotyping of Acute Leukemia by Flow Cytometric Analysis Use of CD45 and Right-Angle Light scatter to gate on leukemic Blasts in Three-Color

Analysis.”

- [83] W. Gorczyca, *Flow Cytometry in Neoplastic Hematology: Morphologic-Immunophenotypic Correlation, Third Edition 3rd Edition by Wojciech Gorczyca (Author)*. CRC Press; 3 edition (July 6, 2017).
- [84] F. E. Craig, K. A. Foon, W. Dc, F. E. Craig, and K. A. Foon, “Flow cytometric immunophenotyping for hematologic neoplasms Flow cytometric immunophenotyping for hematologic neoplasms,” pp. 3941–3967, 2013.
- [85] M. Maynadie, P. Bissie, and M. Raphae, “Immunophenotypic clustering of myelodysplastic syndromes,” vol. 100, no. 7, pp. 2349–2357, 2016.
- [86] Y. Xu, R. W. Mckenna, N. J. Karandikar, A. J. Pildain, and S. H. Kroft, “Flow Cytometric Analysis of Monocytes as a Tool for Distinguishing Chronic Myelomonocytic Leukemia From Reactive Monocytosis,” pp. 799–806, 2005.
- [87] T. First and A. Hospital, “Accepted Date : 21-Oct-2014 Article Type : Original Article,” 2014.
- [88] L. Bencheikh *et al.*, “Characteristic repartition of monocyte subsets as a diagnostic signature of chronic myelomonocytic leukemia,” vol. 125, no. 23, pp. 3618–3627, 2015.
- [89] C. A. Hudson, W. R. Burack, P. C. Leary, M. T. Ascp, and J. M. Bennett, “Clinical Utility of Classical and Nonclassical Monocyte Percentage in the Diagnosis of Chronic Myelomonocytic Leukemia,” pp. 293–302, 2018.
- [90] B. K. Stansfield and D. A. Ingram, “Clinical significance of monocyte heterogeneity,” 2015.
- [91] T. Picot, C. M. Aanei, P. F. Gresta, P. Noyel, and C. M. Aanei, “Evaluation by Flow Cytometry of Mature Monocyte Subpopulations for the Diagnosis and Follow-Up of Chronic Myelomonocytic Leukemia,” vol. 8, no. April, pp. 1–10, 2018.
- [92] W. Gorczyca, “Flow Cytometry Immunophenotypic Characteristics of Monocytic Population in Acute Monocytic Leukemia ( AML-M5 ), Acute Myelomonocytic Leukemia ( AML-M4 ), and Chronic Myelomonocytic Leukemia ( CMML ),” vol. 75.



- [93] B. D. Facscanto, "Exclusion gating strategy for monocyte subset determination," 2018.
- [94] "<https://www.beckman.com/flow-cytometry/instruments/navios-ex>." [Online]. Available: <https://www.beckman.com/flow-cytometry/instruments/navios-ex>.
- [95] "<https://www.bdbiosciences.com/en-us/instruments/research-instruments/research-cell-analyzers/facscanto-ii>." [Online]. Available: <https://www.bdbiosciences.com/en-us/instruments/research-instruments/research-cell-analyzers/facscanto-ii>.
- [96] "<https://www.beckman.de/reagents/coulter-flow-cytometry/antibodies-and-kits/clinical-research-systems-and-kits/6607077>No Title."
- [97] S. Jose, P. Road, and D. Laoghaire, "BD Trucount™ Tubes," no. 340334.
- [98] P. I. Fukushima, P. K. T. Nguyen, P. O'Grady, and M. Stetler-Stevenson, "Flow cytometric analysis of kappa and lambda light chain expression in evaluation of specimens for B-cell neoplasia," *Cytometry*, vol. 26, no. 4, pp. 243–252, 2018.

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

### ΜΕΛΕΤΗ ΜΟΝΟΚΥΤΤΑΡΩΣΗΣ ΜΕ ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΙΑ ΡΟΗΣ - ΑΝΟΣΟΦΑΙΝΟΤΥΠΟΣ ΧΡΟΝΙΑΣ ΜΥΕΛΟΜΟΝΟΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΛΕΥΧΑΙΜΙΑΣ (ΧΜΜΛ)

ΚΑΡΑΘΑΝΟΣ ΣΕΡΑΦΕΙΜ  
ΒΙΟΛΟΓΟΣ

**Σκοπός της μελέτης:** Η ΧΜΜΛ είναι ο συχνότερος υπότυπος ΜΔΣ/ΜΥΝ και σύμφωνα με τα κριτήρια της WHO, η διάγνωσή της απαιτεί σταθερή αύξηση των μονοκυττάρων στο αίμα ( $>1 \times 10^9/L$ ) για  $\geq 3$  μήνες. Στο ανθρώπινο περιφερικό αίμα, με βάση την έκφραση των δεικτών επιφανείας CD14 και CD16, ταυτοποιούνται τρία λειτουργικά διαφορετικά υποσύνολα μονοκυττάρων: CD14+CD16- (κλασικά), CD14+CD16+ (ενδιάμεσα) και CD14+lowCD16+ (μη κλασικά). Τα κλασικά αντιπροσωπεύουν περίπου το 85% του συνολικού πληθυσμού των μονοκυττάρων σε υγιείς. Μελέτες έχουν δείξει ότι η αύξηση του ποσοστού ( $>94.0\%$ ) των κλασικών μονοκυττάρων, σε δείγμα περιφερικού αίματος, αποτελεί ειδικό δείκτη για γρήγορη, ακριβή και εύκολη διάγνωση της ΧΜΜΛ, ενώ στον μυελό το αντίστοιχο ποσοστό μπορεί να είναι μικρότερο. Σκοπός της εργασίας ήταν η μελέτη των μονοκυτταρικών υποπληθυσμών και η συσχέτιση του ανοσοφαινοτύπου των μονοκυττάρων με τη διάγνωση της ΧΜΜΛ.

**Υλικά και μέθοδοι:** Δείγματα περιφερικού αίματος, καθώς και μυελού των οστών, από ασθενείς με απόλυτη μονοκυττάρωση και πιθανότητα ΧΜΜΛ αναλύθηκαν με κυτταρομετρία ροής, σε Navios EX της Beckman Coulter και BD FACS CANTO II της BD Biosciences. Χρησιμοποιήθηκαν, αντίστοιχα για τους δύο παραπάνω κυτταρομετρητές, τα εξής μονοκλωνικά αντισώματα: CD7- A700, CD24- PE, CD16- PB, CD14- PC7, CD45- Krm, CD56- PC5,5 (μέθοδος BC) και CD7- FITC, CD24- PE, CD16- BV421, CD14- PECY7, CD56- APC, CD45-V500 (μέθοδος BD). Παλιότερα δείγματα, που αναλύθηκαν με συνδυασμούς μονοκλωνικών : CD7- FITC, CD24- PE, CD16- ECD, CD14- PC5, CD45- PC7 και CD56- PC7 ή CD36- FITC, CD64- PE, CD16- ECD, CD14- PC5, CD45- PC7, συμπεριλήφθηκαν στη μελέτη. Έγινε ανάλυση των αποτελεσμάτων με το λογισμικό Kaluza (BeckmanCoulter, μέθοδος BC) και Infinicyt (Cytognos, μέθοδος BD) και μελετήθηκαν οι τρεις υποπληθυσμοί των μονοκυττάρων.

**Αποτελέσματα:** Από τα 52 δείγματα περιφερικού αίματος, που αναλύθηκαν με το λογισμικό Kaluza, υπήρξε συμφωνία του ανοσοφαινότυπου με την κατά WHO διάγνωση της νόσου για 48 από αυτά ( $p < 0,001$ ). Στην περίπτωση ανάλυσης με το λογισμικό Infinicyt, συμφωνία υπήρξε για 35 από τα 37 δείγματα ( $p < 0,001$ ). Για την περίπτωση των 19 δειγμάτων μυελού, που αναλύθηκαν με το λογισμικό Kaluza, τα αντίστοιχα αποτελέσματα ήταν συμφωνία του ανοσοφαινότυπου με την κατά WHO διάγνωση της νόσου για 15 από αυτά ( $p = 0,023 < 0,05$ ). Παρατηρήθηκε επίσης αυξημένο ποσοστό κλασικών μονοκυττάρων στο περιφερικό αίμα ασθενών με ΧΜΜΛ σε σχέση με τους ασθενείς χωρίς διάγνωση της νόσου ( $95,14 \pm 7,28$  ως  $83,78 \pm 13,35$  για Kaluza και  $95,86 \pm 1,19$  ως  $78,70 \pm 13,19$  για Infinicyt,  $p < 0,05$ ). Η αύξηση αυτή αντανάσσεται και στον μυελό των ασθενών σε σχέση με άτομα χωρίς διάγνωση της νόσου ( $95,14 \pm 7,28$  ως  $83,78 \pm 13,35$  για Kaluza,  $p = 0,086$ ).

Από τις καμπύλες ROC, για τα δείγματα περιφερικού αίματος, προέκυψε ότι τα κλασικά μονοκύτταρα εμφανίζουν μεγαλύτερο AUC (AUC=0,896 και AUC=0,936 για Kaluza και Infinicyt αντίστοιχα,  $p < 0,001$ ) σε σχέση με τα άλλα δύο μονοκυτταρικά υποσύνολα. Ίδια εικόνα παρατηρείται και στον μυελό με AUC= 0,733,  $p = 0,086$ .

Για 10 άτομα, έγινε ταυτόχρονη ανάλυση δειγμάτων περιφερικού αίματος και μυελού των οστών με το λογισμικό Kaluza. Υπήρξε συμφωνία στη διάγνωση μεταξύ περιφερικού αίματος και μυελού για 8 από τα 10 δείγματα ( $p = 0,3$ ).

Τέλος, 37 δείγματα περιφερικού αίματος αναλύθηκαν και με τις δύο μεθόδους (BC & BD). Από τη σύγκριση των αποτελεσμάτων προέκυψε συμφωνία μεταξύ των δύο μεθόδων και για τα 37 δείγματα ( $p < 0,001$ ). Συγκεκριμένα 15 χαρακτηρίστηκαν ως ΧΜΜΛ και 22 εμφάνισαν ποσοστό κλασικών μονοκυττάρων  $< 94\%$ . Δεν υπήρξαν σημαντικές διαφορές στα ποσοστά των κλασικών μονοκυττάρων, μεταξύ των δύο μεθόδων.

**Συμπεράσματα:** Οι ασθενείς με ΧΜΜΛ εμφανίζουν αυξημένο ποσοστό κλασικών μονοκυττάρων, τόσο στο περιφερικό αίμα όσο και στο μυελό, έναντι των υπόλοιπων μονοκυτταρικών υποπληθυσμών, σε σχέση με τους λοιπούς ασθενείς με μονοκυττάρωση. Ωστόσο, δεν φαίνεται να υπάρχει στατιστικά σημαντική συσχέτιση μεταξύ διάγνωσης με κυτταρομετρία ροής στο περιφερικό αίμα και της διάγνωσης στο μυελό. Επίσης, το ποσοστό 94% για τα κλασικά μονοκύτταρα αποτελεί τιμή cutoff με μεγάλη ευαισθησία και ειδικότητα στη διάγνωση της ΧΜΜΛ, ενώ για τον

μυελό των οστών η τιμή αυτή είναι μικρότερη ( $\approx 91\%$ ). Ανάλυση μεγαλύτερου αριθμού δειγμάτων από ασθενείς με ΧΜΜΛ καθώς και σύγκριση αυτών με τον ανοσοφαινότυπο ασθενών με μονοκυττάρωση και άλλα ΜΔΣ/ΜΥΝ θα βοηθήσει στην πιο ακριβή διάγνωση της ΧΜΜΛ με κυτταρομετρία ροής καθώς και στην παρακολούθηση της θεραπευτικής προσέγγισης.

## ABSTRACT

### FLOW CYTOMETRIC ANALYSIS OF MONOCYTOSIS- IMMUNOPHENOTYPE OF CHRONIC MYELOMONOCYTIC LEUKEMIA (CMML)

KARATHANOS SERAFEIM  
BIOLOGIST

**Purpose of the study:** Chronic myelomonocytic leukemia (CMML) is a myelodysplastic syndrome/ myeloproliferative neoplasm whose diagnosis is currently based on the elevation of peripheral blood monocytes to  $>1 \times 10^9/L$ , measured for  $\geq 3$  months. In the peripheral blood of humans, the expression of CD14 and CD16 distinguishes CD14+CD16- (classical), CD14+CD16+ (intermediate) and CD14+lowCD16+ (non-classical) monocytes. In healthy conditions, up to 94% of monocytes are classical monocytes. In healthy donors, the proportions of classical monocytes in the circulation are approximately 85%. Studies have shown that an increase in the percentage ( $> 94.0\%$ ) of classical monocytes in peripheral blood specimens is a specific marker for rapid, accurate and easy diagnosis of CMML, whereas in bone marrow the corresponding percentage may be lower. The main objectives of this thesis were the study of monocyte subsets and the correlation between the immunophenotype of monocytes with the diagnosis of CMML.

**Materials and methods:** Peripheral blood and bone marrow samples from patients with absolute monocytosis and probability of CMML were analyzed by flow cytometry, in Beckman Coulter's Navios EX by Beckman- Coulter and BD FACS CANTO II by BD Biosciences. The monoclonal antibodies CD7- A700, CD24- PE, CD16- PB, CD14- PC7, CD45- Krm, CD56- PC5,5 (method BC) and CD7- FITC, CD24- PE, CD16- BV421, CD14- PECY7, CD56- APC, CD45-V500 (method BD) were used, respectively, for the two above cell counts. Older samples analyzed by monoclonal combinations: CD7- FITC, CD24- PE, CD16- ECD, CD14- PC5, CD45- PC7 and CD56- PC7 or CD36- FITC, CD64- PE, CD16- ECD, CD14- PC5, CD45 - PC7, included in the study. Results were analyzed with Kaluza (BeckmanCoulter, method BC) and Infinicyt (Cytognos, method BD) software and the three monocyte subsets were studied.

**Results:** Of the 52 peripheral blood samples analyzed with Kaluza software, the immunophenotype was in agreement with the WHO diagnosis of the disease in 48 of them ( $p < 0.001$ ). In the case of analysis with Infinicyt software, agreement was found for 35 of the 37 samples ( $p < 0.001$ ). For the case of the 19 bone marrow samples analyzed with Kaluza software, the immunophenotype were in agreement with with the WHO diagnosis for 15 of them ( $p = 0.023 < 0.05$ ). Compared with healthy donors and patients with reactive monocytosis or another hematologic malignancy, CMML patients demonstrate a characteristic increase in the fraction of classical monocytes ( $95,14 \pm 7,28$  vs  $83,78 \pm 13,35$  for Kaluza and  $95,86 \pm 1,19$  to  $78,70 \pm 13,19$  for Infinicyt,  $p < 0,05$ ). This increase appears also in the bone marrow of patients ( $95.14 \pm 7.28$  to  $83.78 \pm 13.35$  for Kaluza,  $p = 0.086$ )

ROC curves for peripheral blood samples showed that classical monocytes had higher AUC (AUC = 0.896 and AUC = 0.936 for Kaluza and Infinicyt, respectively,  $p < 0.001$ ) than the other two monocyte subsets. The same image was observed in the bone marrow with AUC = 0.733,  $p = 0.086$ .

Peripheral blood and bone marrow samples, from 10 patients, were analyzed simultaneous with Kaluza software. There was agreement in the diagnosis between peripheral blood and marrow for 8 of the 10 samples ( $p = 0.3$ ).

Finally, 37 peripheral blood samples were analyzed with both of the above methods. Comparison of results showed agreement between the two methods for all 37 samples ( $p < 0.001$ ). Specifically, 15 were designated as CMML and 22 showed proportion of classical monocytes  $< 94\%$ . There were no significant differences in the percentages of classical monocytes between the two methods.

**Conclusions:** Patients with CMML show an increased proportion of classical monocytes, both in peripheral blood and marrow, compared to other monocyte subsets and patients with monocytosis or other hematologic malignancies. However, there is no statistically significant association between the diagnosis in peripheral blood and diagnosis in bone marrow. Also, 94% for classical monocytes is a cutoff value with high sensitivity and specificity in the diagnosis of CMML, whereas for bone marrow this value is lower ( $\approx 91\%$ ). Analysis of larger number of samples from patients with CMML and comparison with the immunophenotype of

patients with monocytosis and other MDS/ MPN will help to more accurate diagnosis of CMML with flow cytometry as well as to monitor the therapeutic approach.