



ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ
Εθνικόν και Καποδιστριακόν
Πανεπιστήμιον Αθηνών
— ΙΔΡΥΘΕΝ ΤΟ 1837 —

**"ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΗΣ ΣΧΕΣΗΣ ΤΗΣ ΟΓΚΟΓΟΝΙΚΟΤΗΤΑΣ ΚΑΙ ΤΟΥ
ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΥ ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟΥ ΩΣ ΣΤΟΧΟΣ ΑΝΟΣΟΡΥΘΜΙΣΗΣ: ΤΟ
ΠΑΡΑΔΕΙΓΜΑ ΤΗΣ AL ΑΜΥΛΟΕΙΔΩΣΗΣ"**

ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ
ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΤΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΣΤΗΝ ΙΑΤΡΙΚΗ

Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία

ΑΒΡΑΜΟΠΟΥΛΟΥ ΔΕΣΠΟΙΝΑ

A.M: 41808

Επιβλέπουσα:

Ουρανία Τσιτσιλώνη, Καθηγήτρια Ανοσολογίας

Τομέας Φυσιολογίας Ζώων και Ανθρώπου

Τμήμα Βιολογίας, Σχολή Θετικών Επιστημών, ΕΚΠΑ

Τα Μέλη της Εξεταστικής Επιτροπής:

Επιβλέπουσα: Ουρανία Τσιτσιλώνη, Καθηγήτρια Βιολογίας, ΕΚΠΑ

1^ο Μέλος: Ιωάννης Τρουγκάκος, Καθηγητής Βιολογίας, ΕΚΠΑ

2^ο Μέλος: Παναγιώτης Παπαγιώργης, Αναπληρωτής Καθηγητής Ευρωπαϊκού
Πανεπιστημίου Κύπρου

Αθήνα, Δεκέμβριος 2020

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η πρωτοπαθής συστηματική αμυλοείδωση εξ ελαφρών αλυσίδων (AL) χαρακτηρίζεται από την παραγωγή μονοκλωνικών αλυσίδων με διαμόρφωση β φύλλου (FLC), από έναν κακοήγη πλασματοκυτταρικό κλώνο στο μυελό των οστών. Τα αδιάλυτα ινίδια αμυλοειδούς εναποτίθενται εξωκυτταρίως σε ιστούς, προκαλώντας σταδιακά σοβαρή δυσλειτουργία των οργάνων-στόχων (νεφροί, καρδιά, ήπαρ, ΠΝΣ) (Dittrich et al., 2017). Νεότερες θεραπείες, όπως το αντι-CD38 μονοκλωνικό αντίσωμα Δαρατουμουμάμπη (Daratumumab), φαίνεται πως μπορούν να επιτύχουν βαθύτερες αιματολογικές αποκρίσεις σε ασθενείς με πρωτοπαθή συστηματική (AL) αμυλοείδωση (Sanchorawala et al., 2018). Τα τελευταία χρόνια έχει αρχίσει να αναδεικνύεται η αξία της ελάχιστης υπολειμματικής νόσου (EYN) ως προγνωστικός δείκτης στην αιματολογική και οργανική απόκριση στην AL αμυλοείδωση μέσα από δεδομένα που συσχετίζουν την επίτευξη απουσίας της με βελτιωμένα ποσοστά καρδιακής απόκρισης και παρατεταμένο διάστημα ελεύθερο νόσου (progression free survival, PFS) ακόμα και σε σύντομο χρονικό διάστημα παρακολούθησης (Sidana et al., 2020). Ωστόσο, υπάρχει ανάγκη ανάπτυξης βιοδεικτών για την εκτίμηση της EYN, καθώς επιβαρύνει τη λειτουργία οργάνων όπως η καρδιά και οι νεφροί, ακόμα και σε ασθενείς σε πλήρη ύφεση. Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας ήταν η ανάλυση του μικροπεριβάλλοντος του μυελού των οστών (MO) ασθενών με AL αμυλοείδωση σε σχέση με τη χορήγηση Δαρατουμουμάμπης, καθώς και την παρουσία ή απουσία EYN. Για το σκοπό αυτό, δείγματα MO από 25 ασθενείς με AL αμυλοείδωση ελήφθησαν κατά τη διάγνωση, μετά την ολοκλήρωση θεραπείας πρώτης γραμμής και μετά από θεραπεία εδραίωσης με Δαρατουμουμάμπη. Τα δείγματα αναλύθηκαν με κυτταρομετρία ροής νέας γενιάς, πραγματοποιώντας ανοσοφαινοτυπική αξιολόγηση των επιφανειακών δεικτών CD19, CD27, CD38, CD45, CD56, CD81, CD117, CD138 και των ενδοκυττάρων κ και λ αλυσίδων ως προς την ανίχνευση της EYN, σύμφωνα με τις οδηγίες του EuroFlow, ενώ παράλληλα ταυτοποιήθηκαν και ποσοτικοποιήθηκαν 17 αιμοποιητικοί πληθυσμοί στο MO. Η χορήγηση Δαρατουμουμάμπης αύξησε τα ποσοστά ερυθροβλαστών, T, CD27⁺ NK & NKT λεμφοκυττάρων, πρόδρομων B λεμφοκυττάρων, και μαστοκυττάρων, ενώ μείωσε το ποσοστό των παρθένων B λεμφοκυττάρων στους ασθενείς που παρέμειναν EYN⁺ μετά τη χορήγηση του φαρμάκου. Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι παρατηρήθηκε αυξητική τάση

του ποσοστού των ερυθροβλαστών στους ασθενείς που παρέμειναν EYN⁺ σε σύγκριση με τους EYN⁻ μετά τη λήψη Δαρατουμουμάμπης. Ωστόσο, η παρουσία/απουσία EYN δεν φάνηκε να επιδρά στο μικροπεριβάλλον του ΜΟ, πιθανότατα λόγω του μικρού αριθμού EYN⁻ δειγμάτων. Συμπερασματικά, αποδείχθηκε ότι η μέθοδος του EuroFlow για την ανίχνευση της EYN στην AL αμυλοείδωση επιτρέπει την ταυτοποίηση και ποσοτικοποίηση 17 πληθυσμών του ΜΟ. Παράλληλα η χορήγηση Δαρατουμουμάμπης μειώνει σημαντικά το φορτίο της νόσου στην AL αμυλοείδωση και επιδρά ριζικά στο μικροπεριβάλλον του ΜΟ. Το γεγονός αυτό διαπιστώνεται λόγω των αλλαγών που παρατηρήθηκαν στη σύσταση του κλωνικού πληθυσμού και στον ανοσοφαινότυπο των κλωνικών κυττάρων, αλλά και στη στατιστικά σημαντική αύξηση των ερυθροβλαστών.

ABSTRACT

Immunoglobulin light chain amyloidosis (AL) is caused by misfolded free light chains (FLCs) which are produced by a small and usually indolent malignant plasma cell clone. The amyloid fibrils deposit in various tissues and cause severe dysfunction of multiple organs such as kidneys, heart, liver or the peripheral nervous system (Dittrich et al., 2017). Novel therapies, such as the anti-CD38 monoclonal antibody Daratumumab are able to induce deeper hematological responses in patients with primary systemic amyloidosis (Sanchowala et al., 2018). More recently, the value of minimum residual disease (MRD) has started to emerge as a prognostic marker in hematological and organic responses to AL amyloidosis. Several data correlate MRD negativity with improved cardiac response rates and improved progression free survival (PFS) even during a short follow-up period (Sidana et al., 2020). However, there is a need to develop biomarkers to assess MRD, as it burdens the function of major organs such as the heart and kidneys, even in patients that have achieved complete remission. The purpose of this project was to analyze the bone marrow (BM) microenvironment of patients with AL amyloidosis in association with the administration of Daratumumab, and the presence or absence of MRD. For this, BM samples from 25 patients with AL amyloidosis were collected during diagnosis, after first-line therapy and after consolidation therapy with Daratumumab. The samples were analyzed with the use of New Generation Flow cytometry (NGF) in order to perform an immunophenotypic assessment of the surface markers CD19, CD27, CD38, CD45, CD56, CD81, CD117, CD138 and intracellular κ and λ chains for the detection of MRD, based on the EuroFlow guidelines. At the same time we performed the identification and quantification of 17 BM haematopoietic populations. Daratumumab increased the rates of erythroblasts, T, CD27+ NK & NKT lymphocytes, B cell precursors, and mast cells, while it reduced the percentage of naive B lymphocytes in patients who remained MRD+ after administration of Daratumumab. Interestingly, there was an increasing trend in the rate of erythroblasts in patients who remained MRD⁺ compared to MRD⁻ patients after therapy with Daratumumab. However, the presence/absence of MRD did not appear to affect the microenvironment of the BM, probably due to the low number of MRD- samples. In conclusion, we show that the EuroFlow method for the detection of MRD in AL amyloidosis permits the identification and quantification of 17 BM populations. At

the same time, administration of Daratumumab significantly reduces the burden of disease in AL amyloidosis. Finally, we observed changes in the composition of the clonal population and the immunophenotype of clonal cells, and a statistically significant increase in the rate of erythroblasts, leading us to the conclusion that Daratumumab has a profound effect on the BM microenvironment.

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία με τίτλο «Διερεύνηση της σχέσης της ογκογονικότητας και του κυτταρικού μεταβολισμού ως στόχος ανοσορύθμισης: το παράδειγμα της AL αμυλοείδωσης» πραγματοποιήθηκε κατά το ακαδημαϊκό έτος 2019-2020 στο εργαστήριο Ανοσολογίας του τομέα Φυσιολογίας Ζώων και Ανθρώπου του τμήματος Βιολογίας της Σχολής Θετικών Επιστημών του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών (ΕΚΠΑ), στα πλαίσια της μεταπτυχιακής μου φοίτησης στο Μεταπτυχιακό Πρόγραμμα Σπουδών «Εφαρμογές της Βιολογίας στην Ιατρική».

Στα ερευνητικά ενδιαφέροντα του εργαστηρίου μας εντάσσεται, μεταξύ άλλων, η κυτταρική ανοσολογία του καρκίνου, με εξειδίκευση στη μελέτη αιματολογικών κακοηθειών, όπως είναι το Πολλαπλούν Μυέλωμα αλλά και η AL αμυλοείδωση η οποία ξεκίνησε να μελετάται πιο πρόσφατα. Έτσι, η επικεφαλής του εργαστηρίου και υπεύθυνη της διπλωματικής μου εργασίας, Καθηγήτρια Ανοσολογίας κα Ουρανία Τσιτσιλώνη, μου ανέθεσε το συγκεκριμένο θέμα.

Η εν λόγω εργασία πραγματοποιήθηκε σε συνεργασία με τη Θεραπευτική Κλινική της Ιατρικής Σχολής του ΕΚΠΑ του Γ.Ν.Α. «Αλεξάνδρα», από την οποία προήλθε το σύνολο των βιολογικών δειγμάτων που χρησιμοποιήθηκαν για τους σκοπούς της εργασίας αυτής.

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

1	ΕΙΣΑΓΩΓΗ	12
1.1	ΑΙΜΑ ΚΑΙ ΜΥΕΛΟΣ ΤΩΝ ΟΣΤΩΝ.....	12
1.2	ΑΙΜΟΠΟΙΗΣΗ ΚΑΙ ΕΡΥΘΡΟΠΟΙΗΣΗ	13
1.3	ΔΟΜΗ ΚΑΙ ΓΟΝΙΔΙΑΚΟΣ ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΟΣ ΑΝΟΣΟΣΦΑΙΡΙΝΩΝ	13
1.4	ΠΛΑΣΜΑΤΟΚΥΤΤΑΡΙΚΕΣ ΔΥΣΚΡΑΣΙΕΣ.....	16
1.5	ΠΡΩΤΟΠΑΘΗΣ ΣΥΣΤΗΜΑΤΙΚΗ ΑΜΥΛΟΕΙΔΩΣΗ-ΕΙΣΑΓΩΓΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ	17
1.6	ΠΑΘΟΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ ΤΗΣ AL ΑΜΥΛΟΕΙΔΩΣΗΣ	21
1.6.1	Παραγωγή ινιδίων αμυλοειδούς	21
1.6.2	Παραγωγή ινιδίων αμυλοειδούς στην AL αμυλοείδωση	22
1.7	ΚΛΙΝΙΚΗ ΕΙΚΟΝΑ ΑΣΘΕΝΩΝ ΜΕ AL ΑΜΥΛΟΕΙΔΩΣΗ.....	24
1.8	ΠΛΑΣΜΑΤΟΚΥΤΤΑΡΙΚΟΣ ΚΛΩΝΟΣ ΚΑΙ ΓΕΝΕΤΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΣΤΗΝ AL ΑΜΥΛΟΕΙΔΩΣΗ.....	29
1.9	ΔΙΑΓΝΩΣΗ ΣΤΗΝ AL ΑΜΥΛΟΕΙΔΩΣΗ.....	32
1.10	ΣΤΑΔΙΟΠΟΙΗΣΗ ΚΑΙ ΠΡΟΓΝΩΣΗ ΣΤΗΝ AL ΑΜΥΛΟΕΙΔΩΣΗ.....	35
1.10.1	Εκτίμηση συμμετοχής οργάνων.....	35
1.10.2	Αιματολογική ανταπόκριση στη θεραπεία	38
1.10.3	Εκτίμηση κινδύνου.....	41
1.11	ΘΕΡΑΠΕΙΑ ΚΑΙ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗ ΤΗΣ ΝΟΣΟΥ.....	44
1.12	ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΤΗΣ ΕΛΑΧΙΣΤΗΣ ΥΠΟΛΕΙΜΜΑΤΙΚΗΣ ΝΟΣΟΥ (ΕΥΝ)	45
1.13	ΒΑΣΙΚΕΣ ΑΡΧΕΣ ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΙΑΣ ΡΟΗΣ.....	46
1.13.1	Υδραυλικό σύστημα	48
1.13.2	Οπτικό και ηλεκτρονικό σύστημα.....	50
1.13.3	Ηλεκτροστατικός διαχωρισμός κυττάρων.....	52
1.13.4	Φθοριοχρώματα	53
1.14	ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΤΗΣ ΕΛΑΧΙΣΤΗΣ ΥΠΟΛΕΙΠΟΜΕΝΗΣ ΝΟΣΟΥ (ΕΥΝ) ΜΕΣΩ NGF ΣΤΗΝ AL ΑΜΥΛΟΕΙΔΩΣΗ.....	54
1.15	ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΠΛΑΣΜΑΤΟΚΥΤΤΑΡΩΝ	57

1.16	ΑΝΟΣΟΦΑΙΝΟΤΥΠΟΣ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΠΛΑΣΜΑΤΟΚΥΤΤΑΡΩΝ.....	58
1.17	ΑΝΟΣΟΦΑΙΝΟΤΥΠΟΣ ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΩΝ ΠΛΑΣΜΑΤΟΚΥΤΤΑΡΩΝ.....	59
2	ΣΚΟΠΟΣ	62
3	ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	63
3.1	ΥΛΙΚΑ	63
3.1.1	ΑΝΑΛΩΣΙΜΑ.....	63
3.1.2	ΣΥΣΚΕΥΕΣ	63
3.1.3	ΛΟΓΙΣΜΙΚΑ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΑ.....	64
3.1.4	ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ.....	64
3.1.5	ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΑ ΣΥΖΕΥΓΜΕΝΑ ΜΕ ΦΘΟΡΙΖΟΥΣΕΣ ΧΡΩΣΤΙΚΕΣ	65
3.2	ΜΕΘΟΔΟΙ.....	66
3.2.1	ΣΥΛΛΟΓΗ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΜΥΕΛΟΥ ΤΩΝ ΟΣΤΩΝ ΚΑΙ ΠΕΡΙΦΕΡΙΚΟΥ ΑΙΜΑΤΟΣ ΑΠΟ ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ AL ΑΜΥΛΟΕΙΔΩΣΗ	66
3.2.2	ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΒΙΩΣΙΜΟΤΗΤΑΣ ΚΑΙ ΑΡΙΘΜΟΥ ΚΥΤΤΑΡΩΝ	66
3.2.3	ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑΣ ΚΑΙ ΧΡΩΣΗΣ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΜΥΕΛΟΥ ΤΩΝ ΟΣΤΩΝ ΑΠΟ ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ AL ΑΜΥΛΟΕΙΔΩΣΗ ΓΙΑ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΕΥΝ ΜΕΣΩ ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΙΑΣ ΡΟΗΣ ΝΕΑΣ ΓΕΝΙΑΣ	68
3.2.4	ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΕΠΙΦΑΝΕΙΑΚΩΝ ΑΝΤΙΓΟΝΙΚΩΝ ΔΕΙΚΤΩΝ.....	69
3.2.5	ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΕΠΙΦΑΝΕΙΑΚΩΝ ΚΑΙ ΕΝΔΟΚΥΤΤΑΡΙΩΝ ΑΝΤΙΓΟΝΙΚΩΝ ΔΕΙΚΤΩΝ.....	70
3.2.6	ΣΥΝΔΥΑΣΜΟΙ ΦΘΟΡΙΖΟΝΤΩΝ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΩΝ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΤΗΣ ΕΥΝ.....	71
3.2.7	ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΤΗΣ ΕΥΝ ΚΑΙ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΟΥ ΜΙΚΡΟΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ ΤΟΥ ΜΥΕΛΟΥ ΤΩΝ ΟΣΤΩΝ ΑΣΘΕΝΩΝ ΜΕ AL ΑΜΥΛΟΕΙΔΩΣΗ	73
3.2.8	ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ	75
4	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	76
4.1	ΣΤΡΑΤΗΓΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΜΥΕΛΟΥ ΤΩΝ ΟΣΤΩΝ ΑΣΘΕΝΩΝ ΜΕ AL ΓΙΑ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΕΥΝ ΜΕ NGF	76

4.2	ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΤΗΣ ΕΥΝ ΚΑΙ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΟΥ ΜΙΚΡΟΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ ΤΟΥ ΜΥΕΛΟΥ ΤΩΝ ΟΣΤΩΝ ΑΣΘΕΝΩΝ ΜΕ AL ΑΜΥΛΟΕΙΔΩΣΗ ΠΡΙΝ ΚΑΙ ΜΕΤΑ ΤΗ ΧΟΡΗΓΗΣΗ ΔΑΡΑΤΟΥΜΟΥΜΑΜΠΗΣ.....	77
5	ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	87
6	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	100
7	ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ.....	115
7.1	ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ.....	115
7.2	ΣΥΝΕΔΡΙΑ.....	117

ΠΙΝΑΚΑΣ ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΩΝ

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΑ	ΕΠΕΞΗΓΗΣΗ
FLC	Free light chain
PFS	Progression free survival
AL	Amyloid light chain
MRD	Minimal residual disease
BM	Bone marrow
NGF	Next generation flow cytometry
HSC	Hematopoietic stem cell
CLP	Lymphoid progenitor cell
CMEP	Common myeloid-erythroid progenitor cell
EBI	Erythroblastic island
EPO	Erythropoietin
LC	Light chain
H	Heavy chain
IgH	Immunoglobulin heavy chain
Igκ	Immunoglobulin κ light chain
Igλ	Immunoglobulin λ light chain
C	Constant region
V	Variable region
J	Junctional region
BCR	B cell receptor
XBP1	X box binding protein
PCD	Plasma cell dyscrasia
MM	Multiple myeloma
MGUS	Monoclonal gammopathy of undetermined significance
POEMS	Polyneuropathy, organomegaly, endocrinopathy, monoclonal gammopathy and skin changes
ATTRwt	Wild type amyloid transthyretin
AA	Amyloid A
SSA	Senile secondary amyloidosis
ApoA1	Apolipoprotein A1
Afib	A fibrinogen
CCND1	CyclinD1
IgLV	Immunoglobulin variable lamda
SAP	Pentraxin serum amyloid P
NT-proBNP	N-terminal prohormone of brain natriuretic peptide
CRAB	Hypercalcemia, renal failure, anemia, bone disease
PBPLC	Peripheral blood plasma cell
BMPC	Bone marrow plasma cell
PC	Plasma cell
IEM	Immunoelectron microscopy

CMR	Cardiovascular magnetic resonance imaging
IMWG	International myeloma working group
cTnT	Cardiac troponin T
GDF-15	Growth differentiation factor15
eGFR	Glomerular filtration rate
VGPR	Very good partial response
OS	Overall survival
CSIS	Composite scarring injury
dFLCS	Difference between involved and non-involved FLCs
AS	Amyloid score
CR	Complete remission/response
ASO-PCR	Allele-specific oligonucleotide polymerase chain reaction
NGS	Next generation sequencing
FSC	Forward scatter channel
SSC	Side scatter channel
PD	Photodiode
PMT	Photomultiplier tube
ASCT	Autologous stem cell transplantation
NK cell	Natural killer cell
EMA	Epithelial membrane antigen
FBS	Fetal bovine serum
PBS	Phosphate buffer saline
FACS	Fluorescence-activated cell sorting
LOD	Lower limit of detection
LLOQ	Lower limit of quantification
Pt	Patient
Pop	Population
APC	Abnormal plasma cell
Lo	Low
Int	Intermediate
Hi	High
TNFRSF7	Tumor necrosis factor receptor superfamily member 7
SCP	Stem cell factor
Ang-1	Angiopoietin-1
VEGF	Vascular endothelial growth factor
LTDC	Long-term control of disease
IFN	Interferon
CTL	Cytotoxic T lymphocyte
MAIT	Mucosal associated invariant T cell
HLA	Human leukocyte antigen
ΠΚΡ	Πολυπαραμετρική κυτταρομετρία ροής
ΓΕΣ	Γαστρεντερικό σύστημα
ΠΜ	Πολλαπλό μύελωμα
ΜΟ	Μυελός οστών
ΕΥΝ	Ελάχιστη υπολειμματική νόσος

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Αρχικά, θα ήθελα από καρδιάς να ευχαριστήσω την επιβλέπουσα της διπλωματικής μου εργασίας, Καθηγήτρια κα. Ουρανία Τσιτσιλώνη, για την υπομονετική της καθοδήγηση, την άρτια συμβουλευτική και την σπουδαία ευκαιρία που μου προσέφερε στο να διεκπεραιώσω ως μέλος του εργαστηρίου της, την διπλωματική μου εργασία.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες θα ήθελα ακόμα να απευθύνω στον Καθηγητή, Πρύτανη του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών και Διευθυντή της Θεραπευτικής Κλινικής της Ιατρικής Σχολής, ΕΚΠΑ, Γ.Ν.Α. «Αλεξάνδρα», Μελέτιο-Αθανάσιο Δημόπουλο, τον Καθηγητή Ευάγγελο Τέρπο, τον Αναπληρωτή Καθηγητή Ευστάθιο Καστρίτη, καθώς και όλη την ιατρική ομάδα της Αιματολογικής-Ογκολογικής Κλινικής της Ιατρικής Σχολής, ΕΚΠΑ, Γ.Ν.Α. «Αλεξάνδρα», οι οποίοι συνέβαλαν καθοριστικά στην πραγματοποίηση της παρούσας διπλωματικής εργασίας, με την παροχή όλων των απαραίτητων βιολογικών δειγμάτων. Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω θερμά τον υποψήφιο διδάκτορα Παντελή Ρουσάκη, ο οποίος μου μεταλαμπάδευσε πολλές γνώσεις και με καθοδήγησε καθόλη την διάρκεια της εκπόνησης της διπλωματικής μου εργασίας. Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον μεταπτυχιακό φοιτητή και συμφοιτητή μου Ανέστη Μακρή, με τον οποίο πραγματοποιήσαμε παράλληλα τις διπλωματικές μας εργασίες, για τη φιλία του και την άψογη συνεργασία.

Τέλος, ευχαριστώ την οικογένειά μου και όλους τους αγαπημένους μου ανθρώπους, για την άπλετη στήριξη που μου παρείχαν κατά τη διάρκεια της εκπόνησης της εργασίας αυτής.

1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 ΑΙΜΑ ΚΑΙ ΜΥΕΛΟΣ ΤΩΝ ΟΣΤΩΝ

Το αίμα είναι ένας ιστός υγρής φύσεως, ο οποίος κυκλοφορεί μέσω των αιμοφόρων αγγείων και μεταφέρει μόρια μεταξύ των οργάνων ενός οργανισμού. Αποτελείται από το πλάσμα που περιέχει ουσίες διαλυτές στο νερό, αλλά και τα έμμορφα συστατικά του. Αυτά, διακρίνονται στα λευκά αιμοσφαίρια, τα ερυθρά αιμοσφαίρια και τα θρομβοκύτταρα (αιμοπετάλια). Τα ερυθρά αιμοσφαίρια μεταφέρουν οξυγόνο από τους πνεύμονες και διοξείδιο του άνθρακα που παράγεται στα κύτταρα. Τα κύτταρα αυτά περιέχουν αιμοσφαιρίνη, η οποία μέσω των ιόντων σιδήρου που φέρει δεσμεύει το οξυγόνο. Τα λευκά αιμοσφαίρια είναι τα κύτταρα που είναι υπεύθυνα για την άμυνα του οργανισμού έναντι ξένων ή εαυτών αντιγόνων, ενώ τα αιμοπετάλια συμμετέχουν στην πήξη του αίματος. Τα παραπάνω συστατικά παράγονται μέσω της διαδικασίας της αιμοποίησης, η οποία μετά τη γέννηση πραγματοποιείται στο μυελό των οστών (Lodish et al., 2010).

Ο μυελός των οστών είναι ένας σπογγώδης ιστός που βρίσκεται εσωτερικά των οστών και φέρει πολλά αιμοφόρα αγγεία. Μέσω αυτών, ο μυελός εφοδιάζεται με θρεπτικά συστατικά και αποδίδει στην κυκλοφορία του αίματος αρχέγονα και ώριμα κύτταρα. Η διαδικασία της αιμοποίησης γίνεται στο μη αγγειώδες τμήμα του μυελού, το οποίο περιλαμβάνει λιποκύτταρα, πρόδρομα αιμοποιητικά κύτταρα, λευκοκύτταρα και δικτυωτό συνδετικό ιστό (Kricun, 1985). Συγκεκριμένα, διακρίνεται σε ωχρό μυελό των οστών που αποτελείται κυρίως από λιποκύτταρα και ερυθρό που περιέχει αρχέγονα αιμοποιητικά κύτταρα, τα οποία μπορούν να διαφοροποιηθούν σε αιμοπετάλια, λευκοκύτταρα ή ερυθροκύτταρα. Τα λεμφοκύτταρα προκύπτουν μέσα από τη διαδικασία της λεμφοποίησης, που λαμβάνει χώρα κυρίως στο μυελό των οστών. Η ωρίμανση των Β λεμφοκυττάρων γίνεται στο μυελό των οστών, ενώ τα Τ κύτταρα μεταναστεύουν και ωριμάζουν στο θύμο αδένι. Μετά την ωρίμανσή τους τα λεμφοκύτταρα εισέρχονται στην κυκλοφορία του αίματος και μεταναστεύουν και στα δευτερογενή λεμφικά όργανα, όπως ο σπλήνας και οι λεμφαδένες.

1.2 ΑΙΜΟΠΟΙΗΣΗ ΚΑΙ ΕΡΥΘΡΟΠΟΙΗΣΗ

Η διαδικασία της αιμοποίησης πραγματοποιείται σε νησίδες αιμοποιητικών κυττάρων κατά την εμβρυική περίοδο, σε ήπαρ και σπλήνα από τον τρίτο έως τον έκτο μήνα της εγκυμοσύνης και στο μυελό των οστών από τη στιγμή της γέννησης και μετά (Woolthuis et al., 2011). Το σύνολο των κυττάρων προέρχεται από την διαφοροποίηση ενός αρχέγονου πολυδύναμου αιμοποιητικού κυττάρου (multipotent hematopoietic stem cell, HSC) που βρίσκεται στο μυελό των οστών, είναι αυτοανανεούμενο και μπορεί να διαφοροποιηθεί σε όλους τους τύπους κυττάρων του αίματος (Birbrair and Frenette, 2016). Κατά τα αρχικά στάδια της αιμοποίησης ένα HSC μπορεί να δώσει γένεση σε ένα προγονικό λεμφοειδές κύτταρο (lymphoid progenitor cell, CLP) ή σε ένα προγονικό μυελοειδές-ερυθροειδές κύτταρο (myeloid-erythroid progenitor cell, CMEP). Αυτά με τη σειρά τους διαφοροποιούνται σε συγκεκριμένους τύπους κυττάρων (Morrison and Kimble, 2006). Η καταστολή της φυσιολογικής διαδικασίας της αιμοποίησης αποτελεί κλινικό χαρακτηριστικό ορισμένων πλασματοκυτταρικών δυσκρασιών, όπως το πολλαπλό μυέλωμα (multiple myeloma, ΠΜ).

Όλα τα ώριμα ερυθρά αιμοσφαίρια προέρχονται από τον ερυθροβλάστη ως προγονικό κύτταρο και προκύπτουν μέσα από τη διαδικασία της ερυθροποίησης, η οποία επιτελείται στο μυελό των οστών και συγκεκριμένα στις ερυθροβλαστικές νησίδες (erythroblastic islands, EBIs). Τα στρωματικά κύτταρα και το κεντρικό μακροφάγο της κάθε νησίδας εκκρίνουν κυτταροκίνες, οι οποίες μαζί με την ερυθροποιητίνη (erythropoietin, EPO) ρυθμίζουν τη διαδικασία της ερυθροποίησης (Bouchnita et al., 2016).

1.3 ΔΟΜΗ ΚΑΙ ΓΟΝΙΔΙΑΚΟΣ ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΟΣ ΑΝΟΣΟΣΦΑΙΡΙΝΩΝ

Οι ανοσοσφαιρίνες είναι γλυκοπρωτεΐνες που συμμετέχουν στην ανοσιακή απάντηση του οργανισμού έναντι του αντιγόνου, με σκοπό την εξουδετέρωσή του. Τα πλασματοκύτταρα αποτελούν την τελικώς διαφοροποιημένη και ώριμη μορφή των Β λεμφοκυττάρων και εκκρίνουν τις ανοσοσφαιρίνες ή αλλιώς αντισώματα. Αυτά, συναντώνται είτε στην επιφάνεια της μεμβράνης των Β κυττάρων ως υποδοχείς για

το συγγενές αντιγόνο, είτε ελεύθερα στο πλάσμα, αφού εκκριθούν από τα πλασματοκύτταρα (Litman et al., 1993).

Κάθε ανοσοσφαιρίνη αποτελείται από 2 όμοιες ελαφριές (Light, L) και 2 όμοιες βαριές (Heavy, H) πολυπεπτιδικές αλυσίδες που σχηματίζουν το γράμμα Y. Οι δύο βαριές αλυσίδες συνδέονται μεταξύ τους με δισουλφιδικούς δεσμούς, ενώ μια ελαφριά με μία βαριά αλυσίδα συνδέονται με έναν δισουλφιδικό δεσμό. Τα γονίδια που κωδικοποιούν για τις αλυσίδες των ανοσοσφαιρινών βρίσκονται σε τρεις θέσεις σε διαφορετικά χρωμοσώματα. Συγκεκριμένα, στο χρωμόσωμα 14 στο γενετικό τόπο *IGH* (immunoglobulin heavy chain), εδράζονται τμήματα γονιδίων που αφορούν την βαριά αλυσίδα των ανοσοσφαιρινών, στο χρωμόσωμα 2 και στο γενετικό τόπο *IGK* (immunoglobulin κ) συναντούμε γονίδια υπεύθυνα για το τμήμα των κ ελαφρών αλυσίδων των ανοσοσφαιρινών και τέλος στο χρωμόσωμα 22, στο γενετικό τόπο *IGL* (immunoglobulin λ) συναντούμε γονιδιακά τμήματα για τις λ ελαφριές αλυσίδες των ανοσοσφαιρινών. Κάθε αλυσίδα αποτελείται από μία μεταβλητή περιοχή (variable region, V) όπου εκεί προσδέονται τα διάφορα αντιγόνα λόγω της μεγάλης της ποικιλομορφίας, μία σταθερή περιοχή (constant region, C), η οποία είναι όμοια ανάμεσα στις ανοσοσφαιρίνες της ίδιας τάξης και μια συνδετική περιοχή (Junctional, J) (Kuby, 2010). Στην περίπτωση των βαριών αλυσίδων, υπάρχει και ένα επιπλέον τμήμα ανάμεσα στην V και J περιοχή, που περιέχει την περιοχή ποικιλότητας D. Επιπλέον, οι βαριές αλυσίδες διακρίνονται σε πέντε ισοτύπους: γ, α, μ, δ, ε, που καθορίζουν τις πέντε τάξεις των ανοσοσφαιρινών: IgG, IgA, IgM, IgD και IgE. Κάθε μία τάξη σχετίζεται και με διαφορετική λειτουργία της ανοσοσφαιρίνης κατά την ανοσολογική απόκριση και προκύπτει μέσω του μηχανισμού της μετάπτωσης τάξης (Janeway et al., 2001; Davies et al., 1990). Οι ελαφριές αλυσίδες αντίστοιχα διακρίνονται στους υπότυπους κ και λ.

Η ωρίμανση των B κυττάρων σε εκκριτικά πλασματοκύτταρα χαρακτηρίζεται αρχικά από τον ανασυνδυασμό των γονιδίων των ανοσοσφαιρινών, προκειμένου να παραγχθεί ένας λειτουργικός ανοσοσφαιρινικός υποδοχέας (B cell receptor, BCR) (Εικόνα 1). Έπειτα, τα παρθένα ακόμη B κύτταρα μεταναστεύουν από το μυελό των οστών στα δευτερογενή λεμφικά όργανα για να έρθουν σε επαφή με το αντιγόνο. Εκεί, το ενεργοποιημένο B κύτταρο διαφοροποιείται σε πλασματοκύτταρο που εκκρίνει ανοσοσφαιρίνες χαμηλής συγγενείας. Διαφορετικά, μεταναστεύει σε βλαστικά κέντρα όπου υπόκεινται σε ωρίμανση συγγενείας μέσω των μηχανισμών της σωματικής υπερμετάλλαξης και της μετάπτωσης τάξεως. Μέσω των διαδικασιών

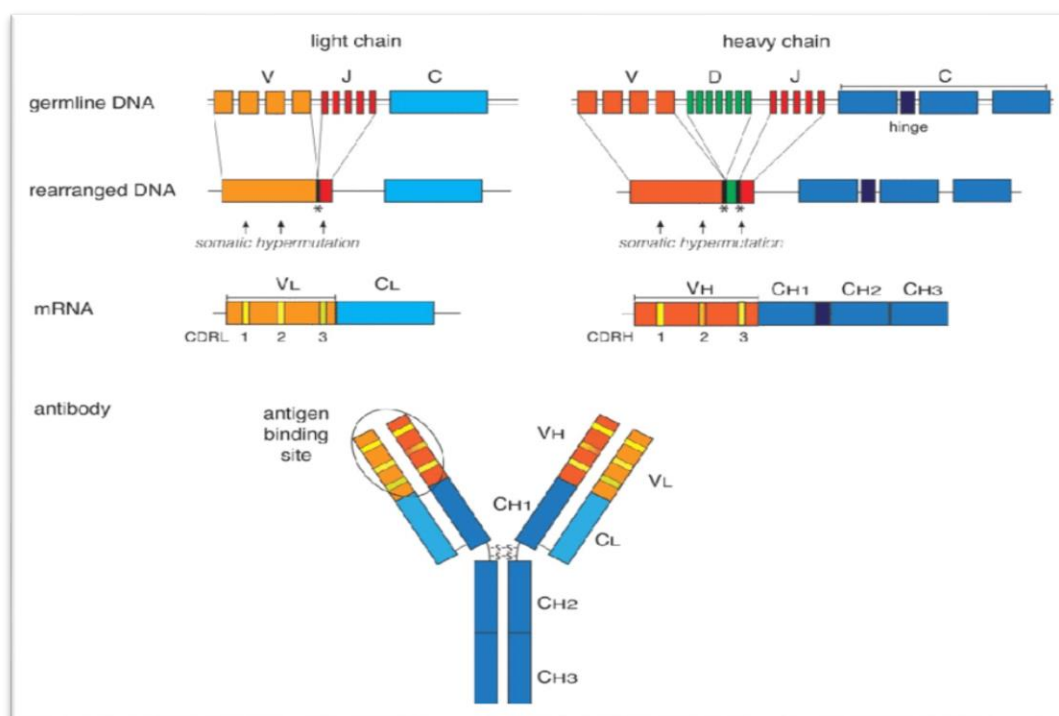
αυτών, προκύπτουν κλώνοι που παράγουν αντισώματα υψηλής συγγένειας προς το αντίστοιχο αντιγόνο-στόχο, καθώς και οι διαφορετικοί ισότυποι ανοσοσφαιρινών που αναφέρθηκαν παραπάνω. Μετά από αυτές τις διαδικασίες, τα πλασματοκύτταρα επανέρχονται στο μυελό των οστών. Εκεί, είτε υπόκεινται σε απόπτωση, αφού έχει ολοκληρωθεί η ανοσολογική απάντηση, είτε παραμένουν ως «μακρόβια» πλασματοκύτταρα μέσα σε θώκους, εκκρίνοντας συνεχώς ανοσοσφαιρίνη (Morgan et al., 2012).

Όσον αφορά την αρχική φάση του ανασυνδυασμού, τα γονιδιακά τμήματα D_H και J_H της βαριάς αλυσίδας ενώνονται μεταξύ τους. Στη συνέχεια, πραγματοποιείται η αναδιάταξη του συμπλόκου D_HJ_H με το V_H γονιδιακό τμήμα, προκειμένου να προκύψει ένα γονίδιο υπεύθυνο για τη δημιουργία των μ και δ ισοτύπων βαριών αλυσίδων των ανοσοσφαιρινών. Στην περίπτωση των ελαφριών αλυσίδων, όπου ο ανασυνδυασμός γίνεται μετά από τη λειτουργική αναδιάταξη των γονιδίων της βαριάς αλυσίδας, γίνεται ανασυνδυασμός των V γονιδιακών τμημάτων της αλυσίδας κ ή λ με το τμήμα J_H , για να προκύψει ένα σύμπλοκο VJ , πριν προστεθεί και το σταθερό γονιδιακό τμήμα C (constant).

Ύστερα από το κομμάτι του ανασυνδυασμού που αφορά τη μεταβλητή περιοχή, γίνεται καθορισμός των ισοτυπικών μορφών των βαρέων αλύσεων, μέσω της ισοτυπικής μεταστροφής. Η διαδικασία της μεταγραφής έχει ως αποτέλεσμα το ώριμο mRNA με τα εξώνια $V_H D_H J_H$. Επειδή λοιπόν τα γονιδιακά τμήματα C_μ και C_δ βρίσκονται πολύ κοντά μεταξύ τους, το εξώνιο μπορεί να συρραφεί είτε με την κωδική περιοχή C_μ , είτε με τη C_δ , με αποτέλεσμα να προκύπτουν δύο διαφορετικά mRNAs με ίδιο τμήμα V_H . Στην περίπτωση που το V_H ενωθεί με το C_μ , τότε προκύπτει μια βαριά αλυσίδα μ , ενώ αν ενωθεί με το C_δ δίνει μια δ βαριά αλυσίδα. Όταν οι αλυσίδες αυτές συνδεθούν με μια ελαφριά αλυσίδα κ ή λ , τότε προκύπτει ένα μόριο IgM και ένα μόριο IgD, αντίστοιχα, που εκφράζονται στην επιφάνεια των παρθένων B κυττάρων (Schatz and Swanson, 2011).

Κατά τη διαφοροποίηση των B λεμφοκυττάρων, πρώτα εκφράζεται η βαριά αλυσίδα μ και μετά η δ . Το γεγονός ότι ένα πλασματοκύτταρο παράγει αντισώματα διαφορετικών ισοτύπων αλλά για τον ίδιο αντιγονικό επίτοπο, οφείλεται στην αναδιάταξη του συμπλόκου VDJ και στη διαδικασία της ισοτυπικής μεταστροφής (Dudley et al., 2005). Σημαντικό σημείο στη διαφοροποίηση των πλασματοκυττάρων είναι το να αποκτήσουν την ικανότητα προς συνεχή παραγωγή και έκκριση λειτουργικών ανοσοσφαιρινών. Προκειμένου να επιτευχθεί αυτό το γεγονός, πρέπει

να διακοπεί ο κυτταρικός κύκλος, αλλά και να γίνει συμπύκνωση της χρωματίνης. Οι προϋποθέσεις αυτές κρύβουν κινδύνους που θα μπορούσαν να οδηγήσουν σε έναν κακοήγη κυτταρικό μετασχηματισμό και στην ανάπτυξη παθολογικών πλασματοκυττάρων. Κομβικό ρόλο στον έλεγχο και τη ρύθμιση της σύνθετης διαδικασίας της διαφοροποίησης των B κυττάρων σε πλασματοκύτταρα, παίζουν διάφοροι μεταγραφικοί παράγοντες όπως η πρωτεΐνη XBP1 (X box-binding protein) (Morgan et al., 2012).



Εικόνα 1. Σχηματική αναπαράσταση της οργάνωσης και έκφρασης των IG γονιδίων (Feederle and Schepers, 2017).

1.4 ΠΛΑΣΜΑΤΟΚΥΤΤΑΡΙΚΕΣ ΔΥΣΚΡΑΣΙΕΣ

Οι πλασματοκυτταρικές δυσκρασίες (plasma cell dyscrasias, PCDs) καλύπτουν ένα ευρύ φάσμα αιματολογικών παθήσεων και χαρακτηρίζονται από τον πολλαπλασιασμό μονοκλωνικών πλασματοκυττάρων που παράγουν μονοκλωνική ανοσοσφαιρίνη ή τμήματα αυτής. Οι περισσότερες PCDs αναπτύσσονται μετά την ωρίμανση συγγένειας στο βλαστικό κέντρο, αφού η γονιδιακή αλληλουχία των περισσότερων κλωνικών πλασματοκυττάρων έχει δεχθεί υπερμεταλλάξεις και έχει

εμφανίσει φαινοτυπικά χαρακτηριστικά όμοια με αυτά των «μακρόβιων» πλασματοκυττάρων. Οι πλασματοκυτταρικές δυσκρασίες περιλαμβάνουν το MM, τη μονοκλωνική γαμμαπάθεια απροσδιόριστης σημασίας (Monoclonal gammopathy of undetermined significance, MGUS), το ασυμπτωματικό μύελωμα, τη πλασματοκυτταρική λευχαιμία, τη μακροσφαιριναιμία Waldenström, το σύνδρομο POEMS (polyneuropathy, organomegaly, endocrinopathy, monoclonal gammopathy and skin changes), τη νόσο εναποθέσεως βαρέων αλύσεων, τη νόσο εναποθέσεως ελαφρών αλύσεων, το πλασματοκύττωμα και την πρωτοπαθή συστηματική (amyloid light-chain, AL) αμυλοείδωση (Soh et al., 2017). Συγκεκριμένα, η AL αμυλοείδωση θα αποτελέσει και το αντικείμενο μελέτης της παρούσας διπλωματικής εργασίας.

1.5 ΠΡΩΤΟΠΑΘΗΣ ΣΥΣΤΗΜΑΤΙΚΗ ΑΜΥΛΟΕΙΔΩΣΗ-ΕΙΣΑΓΩΓΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ

Ο όρος «αμυλοείδωση» περιγράφει ένα ευρύ φάσμα νοσολογικών οντοτήτων, οι οποίες οφείλονται στη λανθασμένη αναδίπλωση πρωτεϊνών ποικίλης προέλευσης, με αποτέλεσμα τον πολυμερισμό τους σε αδιάλυτα ινίδια αμυλοειδούς με δευτεροταγή δομή β-φύλλου. Τα ινίδια αμυλοειδούς εναποτίθενται εξωκυτταρίως σε ιστούς και όργανα, με συνέπεια να διαταράσσουν τη λειτουργία τους και να τους προκαλούν προοδευτική βλάβη. Κατά την τελευταία δεκαετία έχει υπάρξει σημαντική πρόοδος ως προς την διεύρυνση των γνώσεών μας γύρω από τους μηχανισμούς που διέπουν τις αμυλοειδώσεις, αλλά και την ανάπτυξη πιο στοχευμένων και λιγότερο τοξικών θεραπειών, ώστε να αποτρέπεται ο σχηματισμός των ινιδίων και όχι μόνο (Desport et al., 2012; Merlini et al., 2013). Έως τώρα έχουν απομονωθεί και ταυτοποιηθεί 30 διαφορετικές πρωτεΐνες με ικανότητα παραγωγής ινιδίων αμυλοειδούς υπό κατάλληλες συνθήκες (**Εικόνα 2**). Οι πρωτεΐνες αυτές σχετίζονται με νοσήματα όπως η νόσος Alzheimer, η οποία χαρακτηρίζεται από την εντοπισμένη εγκεφαλική εναπόθεση β αμυλοειδούς, μέχρι την AL αμυλοείδωση και την αμυλοείδωση από μετάλλαξη του γονιδίου της τρανσθυρετίνης (Milani, Merlini, et al., “Light Chain Amyloidosis”, 2018). Οι αμυλοειδογενείς αυτές πρωτεΐνες είναι υπεύθυνες για το σχηματισμό ινιδίων αμυλοειδούς με παρόμοια ή ίδια δομή, τα οποία όμως προσβάλλουν διαφορετικούς ιστούς. Όσον αφορά την AL αμυλοείδωση, ακόμα και η

αλλαγή σε ένα μόνο αμινοξύ θα μπορούσε να έχει ως αποτέλεσμα την εναπόθεση αμυλοειδούς σε διαφορετικά όργανα. Ως εκ τούτου, η θεραπευτική αντιμετώπιση ποικίλει ανάλογα με το ποιός ιστός/όργανο πλήττεται (Kastritis and Dimopoulos, 2016). Σημαντικό στοιχείο, επίσης για την επιλογή της θεραπευτικής προσέγγισης των αμυλοειδώσεων αποτελεί και ο καθορισμός του είδους του αμυλοειδούς. Όλα τα είδη όμως έχουν την χαρακτηριστική δομή β-φύλλου και προκύπτουν από την αρχική δημιουργία των πρωτεϊνικών ολιγομερών που προωθούν το σχηματισμό των πρωτοϊνιδίων, τα οποία αλληλεπιδρούν πλευρικά και εν τέλει σχηματίζουν τα ώριμα ινίδια του αμυλοειδούς (Hazenbergh, 2013). Οι αμυλοειδώσεις, ανάλογα με το αν προσβάλλουν ένα συγκεκριμένο όργανο/ιστό ή συστήματα οργάνων/ιστών, διακρίνονται σε εντοπισμένες ή συστηματικές, αντίστοιχα.

Η πιο συχνή μορφή συστηματικής αμυλοείδωσης είναι αυτή της AL αμυλοείδωσης, καθώς πλήττει το 70% ασθενών που πάσχουν από κάποια μορφή αμυλοείδωσης. Η AL αμυλοείδωση χαρακτηρίζεται από την εξωκυττάρια εναπόθεση μονοκλωνικών ελαφριών αλυσίδων δομής β-φύλλου, τις οποίες παράγει ένας κακοήθης πλασματοκυτταρικός κλώνος. Το φορτίο των κλωνικών πλασματοκυττάρων στο μυελό των οστών είναι συνήθως μικρό, με διάμεσο της τάξης του 5-7%. Ωστόσο, υπάρχουν διακυμάνσεις, οι οποίες μπορεί να αντικατοπτρίζουν διακυμάνσεις και ως προς τον σχηματισμό αμυλοειδούς (Muchtart et al., 2016). Ερευνητικές μελέτες υποστηρίζουν ακόμη ότι η οργανική δυσλειτουργία ίσως να μην οφείλεται μόνο στην εναπόθεση των ελαφριών αλυσίδων, αλλά και σε μια άμεση «τοξική επίδραση» των ίδιων των αλυσίδων (Thomas et al., 2019).

Ο επιπολασμός της AL αμυλοείδωσης έχει αυξηθεί ως αποτέλεσμα της πρωϊμότερης διάγνωσης και της βελτιωμένης συνολικής επιβίωσης των ασθενών στα πλαίσια νεότερων θεραπευτικών σχημάτων (Merlini, et al., 2018). Η επίπτωση αυτής της νόσου κυμαίνεται στις 9-14 περιπτώσεις ανά εκατομμύριο πληθυσμού κατά έτος (Vaxman and Gertz, 2019) και αυξάνεται με την ηλικία. Στην περίπτωση των ατόμων άνω των 65 χρόνων, παρατηρείται διπλάσια επίπτωση σε σύγκριση με άτομα ηλικίας 35-54 χρονών. Το 55% των ασθενών είναι άντρες, ενώ η διάγνωση συνήθως γίνεται στη μέση ηλικία των 63 ετών (Quock et al., 2018). Ακόμα, υποστηρίζεται ότι η πιθανότητα ανάπτυξης της AL αμυλοείδωσης σχετίζεται με το ιατρικό ιστορικό του ατόμου. Συγκεκριμένα, άτομα που πάσχουν ήδη από MGUS, χαρακτηρίζονται από αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης AL αμυλοείδωσης, σε σχέση με τα άτομα που δεν πάσχουν από τη συγκεκριμένη «νόσο». Ο σχετικός κίνδυνος ανάπτυξης AL

αμυλοείδωσης σε αυτά τα άτομα κυμαίνεται στο 8,8. Επιπλέον, έχουν υπάρξει έρευνες οι οποίες αναφέρουν ότι σε ομάδες ασθενών με ΠΜ, το 38% αυτών έπασχε από μη διαγνωσμένη συνυπάρχουσα AL αμυλοείδωση, γεγονός που υποδεικνύει πιθανές ομοιότητες στο γενετικό υπόβαθρο αυτών των ασθενειών (Kyle et al., 2018; Merlini et al., 2018).

Μια ακόμη συχνή μορφή συστηματικής αμυλοείδωσης είναι αυτή της οικογενούς αμυλοείδωσης εκ τρανσθυρετίνης (amyloid transthyretin, ATTR), η οποία οφείλεται σε μια ποικιλία σημειακών μεταλλάξεων στο γονίδιο της τρανσθυρετίνης, που προκαλούν την παραγωγή ινιδίων αμυλοειδούς και την εναπόθεσή τους στους ιστούς. Η γεροντική ATTR (wild type ATTR) χαρακτηρίζεται από την εναπόθεση μη μεταλλαγμένης τρανσθυρετίνης και προσβάλλει ηλικιωμένα άτομα (Thomas et al., 2019).

Η δευτεροπαθής συστηματική (amyloid A, AA) αμυλοείδωση είναι η δεύτερη πιο συχνή μορφή συστηματικής αμυλοείδωσης και εμφανίζεται συνήθως σε ασθενείς που ήδη πάσχουν από αυτοάνοσα νοσήματα, χρόνια φλεγμονώδη νοσήματα, όπως η ρευματοειδής αρθρίτιδα και νεοπλάσματα όπως το ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα και το λέμφωμα Hodgkin. Η AA αμυλοείδωση οφείλεται στην εξωκυττάρια εναπόθεση αδιάλυτων ινιδίων τα οποία σχηματίζονται από μια πρωτεΐνη οξείας φάσης, το αμυλοειδές A του ορού, και συναντάται σε μεγάλες συγκεντρώσεις στον ορό. Σε αυτή την μορφή αμυλοείδωσης, τα ινίδια αρχικά συσσωρεύονται στο σπλήνα, στους νεφρούς και στο ήπαρ (Obici and Merlini, 2012).

Οι πιο συχνές μορφές συστηματικής αμυλοείδωσης παρατίθενται στον παρακάτω πίνακα αναλυτικά (**Πίνακας 1**).

Fibril protein	Precursor protein	Systemic and/or localized	Acquired or hereditary	Target organs
AL	Immunoglobulin Light Chain	S, L	A, H	All organs except CNS
AH	Immunoglobulin Heavy Chain	S, L	A	All organs except CNS
AA	(Apo) Serum Amyloid A	S	A	All organs except CNS
ATTR	Transthyretin, wild type	S	A	Heart mainly in males, Ligaments, Tenosynovium
	Transthyretin, variants	S	H	PNS, ANS, heart, eye, leptomen.
A β 2M	β 2-Microglobulin, wild type	L	A	Musculoskeletal System
	β 2-Microglobulin, variant	S	H	ANS
AApoAI	Apolipoprotein A I, variants	S	H	Heart, liver, kidney, PNS, testis, larynx (C terminal variants), skin (C terminal variants)
AApoAII	Apolipoprotein A II, variants	S	H	Kidney
AApoAIV	Apolipoprotein A IV, wild type	S	A	Kidney medulla and systemic
AGel	Gelsolin, variants	S	H	PNS, cornea
ALys	Lysozyme, variants	S	H	Kidney
ALECT2	Leukocyte Chemotactic Factor-2	S	A	Kidney, primarily
AFib	Fibrinogen α , variants	S	H	Kidney, primarily
ACys	Cystatin C, variants	S	H	PNS, skin
ABri	ABriPP, variants	S	H	CNS
ADan*	ADanPP, variants	L	H	CNS
A β	A β protein precursor, wild type	L	A	CNS
	A β protein precursor, variant	L	H	CNS
APrP	Prion protein, wild type	L	A	CJD, Fatal insomnia
	Prion protein variants	L	H	CJD, GSS syndrome, Fatal insomnia
ACal	(Pro)calcitonin	L	A	C-cell thyroid tumors
AIAPP	Islet Amyloid Polypeptide†	L	A	Islets of Langerhans, Insulinomas
AANF	Atrial Natriuretic Factor	L	A	Cardiac atria
APro	Prolactin	L	A	Pituitary prolactinomas, aging pituitary
AIns	Insulin	L	A	Iatrogenic, local injection
ASPC‡	Lung Surfactant Protein	L	A	Lung
AGal7	Galectin 7	L	A	Skin
ACor	Corneodesmosin	L	A	Cornified epithelia, Hair follicles
AMed	Lactadherin	L	A	Senile aortic, Media
Aker	Kerato-epithelin	L	A	Cornea, hereditary
ALac	Lactoferrin	L	A	Cornea
AOAAP	Odontogenic Ameloblast-Associated Protein	L	A	Odontogenic tumors
ASem1	Semenogelin 1	L	A	Vesicula seminalis
AEnf	Enfuvirtide	L	A	Iatrogenic

Εικόνα 2 : Οι αμυλοειδογενείς πρωτεΐνες και οι πρόδρομες μορφές τους στον άνθρωπο (Sipe et al., 2014).

Πίνακας 1: Συχνότερες μορφές συστηματικής αμυλοείδωσης

ΤΥΠΟΣ	ΕΜΠΛΕΚΟΜΕΝΗ ΠΡΩΤΕΙΝΗ	ΠΡΟΣΒΑΛΛΟΜΕΝΑ ΟΡΓΑΝΑ
AL-εξ ελαφρών αλυσίδων	Μονοκλωνική ελαφριά αλυσίδα	Καρδιά, ήπαρ, νεφροί, μαλακά μόρια, περιφερικό νευρικό σύστημα (ΠΝΣ), αυτόνομο νευρικό σύστημα (ΑΝΣ), γαστρεντερικός σωλήνας (ΓΕΣ)
AA-αντιδραστική αμυλοείδωση	Αμυλοειδές του ορού τύπου A	Νεφροί, ΓΕΣ, ήπαρ και σε κάποιες περιπτώσεις θυρεοειδής αδένας, καρδιά και ΑΝΣ
ATTR-εκ τρανσθυρετίνης	Τρανσθυρετίνη (πάνω από 80 σημειακές μεταλλάξεις)	ΑΝΣ, ΠΝΣ, νεφροί, καρδιά, οφθαλμοί, λεπτές μήνιγγες
Senile secondary amyloidosis, SSA-γεροντική αμυλοείδωση	Τρανσθυρετίνη άγριου τύπου	καρδιά
Afib-εξ ινωδογόνου	Αλυσίδα α του ινωδογόνου	κυρίως νεφροί
ΑροΑ1-εκ απολιποπρωτεΐνης Α1	Απολιποπρωτεΐνη Α1	Καρδιά, ήπαρ, νεφροί, ΠΝΣ, λάρυγγας, όρχεις, δέρμα
Αβ2m-εκ β2 μικροσφαιρίνης	Β2 μικροσφαιρίνη	Μυοσκελετικό σύστημα

1.6 ΠΑΘΟΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ ΤΗΣ AL ΑΜΥΛΟΕΪΔΩΣΗΣ

1.6.1 Παραγωγή ινιδίων αμυλοειδούς

Όπως έχει αναφερθεί και παραπάνω, κατά την αμυλοείδωση, σφαιρικές διαλυτές πρωτεΐνες μετατρέπονται σε αδιάλυτα παθολογικά ινίδια αμυλοειδούς, τα οποία εναποτίθενται εξωκυττάρια σε ιστούς και όργανα, προκαλώντας τη σταδιακή τους δυσλειτουργία. Η πολυπλοκότητα της διαδικασίας αυτής ευνοείται από την αυξημένη συγκέντρωση των πρωτεϊνών αυτών στα βιολογικά υγρά, είτε λόγω της μειωμένης πρωτεϊνικής κάθαρσης ή της υπερπαραγωγής τους, είτε λόγω των διαφόρων μεταλλάξεων που προκαλούν αστάθεια και αλλάζουν την πρωτεϊνική δομή, με συνέπεια να εκτίθενται οι υδρόφοβες περιοχές των πρωτεϊνών σε πρωτεάσες, είτε λόγω της εγγενούς αμυλοειδογενετικής ικανότητας κάποιων πρωτεϊνών (Merlini et al., 2018). Η πρωτεόσταση είναι το σύνολο των διαδικασιών που ελέγχουν και ρυθμίζουν την συσσωμάτωση των πρωτεϊνών, αλλά και διατηρούν την εξωκυττάρια και ενδοκυττάρια ορθή πρωτεϊνική διαμόρφωση, τοπολογία και συγκέντρωση (Hipp

et al., 2014; Yerbury et al., 2016). Με το πέρας του χρόνου, η πρωτεόσταση χάνει την ακρίβειά της ως προς τον έλεγχο που ασκεί και πολλές φορές αποτυγχάνει, με αποτέλεσμα πρωτεΐνες με διαφορετική δομή, άρα και λειτουργία, να συσσωματώνονται και να σχηματίζουν ινίδια αμυλοειδούς διαμόρφωσης β-φύλλου (Merlini et al., 2018).

1.6.2 Παραγωγή ινιδίων αμυλοειδούς στην AL αμυλοείδωση

Η AL αμυλοείδωση συνήθως προκαλείται από επέκταση ενός αδρανούς Β κυτταρικού κλώνου, ο οποίος παράγει λ ελαφριές αλυσίδες ανοσοσφαιρίνης στο 75-80% των περιπτώσεων και κ ελαφριές αλυσίδες στο υπόλοιπο ποσοστό των ασθενών (Merlini and Stone, 2006). Οι ελαφριές αλυσίδες που παράγονται χαρακτηρίζονται από ποικίλες αμινοξικές αλληλουχίες, λόγω του μεγάλου αριθμού διαφορετικών γονιδίων που τις κωδικοποιούν, αλλά και των σωματικών υπερμεταλλάξεων που συμβαίνουν κατά τη διαδικασία διαφοροποίησης και ωρίμανσης των Β λεμφοκυττάρων σε πλασματοκύτταρα (Merlini and Bellotti, 2003). Η καρδιά και οι νεφροί είναι τα όργανα που επηρεάζονται συχνότερα στην AL αμυλοείδωση, ενώ φαίνεται πως οι διαφορετικοί τύποι της ελαφριάς αλυσίδας έχουν την τάση να επηρεάζουν συγκεκριμένους ιστούς (Prokaeva et al., 2007; Perfetti et al., 2012). Η χρωμοσωμική ανωμαλία που συναντάται πιο συχνά σε ποσοστό περίπου 40-60% στον Β κλώνο που παράγει τις ελαφριές αλυσίδες είναι η μετατόπιση t(11, 14), η οποία αντιπαραθέτει με το ογκογονίδιο κυκλίνης D1 (cyclin D1, CCND1) το γενετικό τόπο *IGH* (Bochtler et al., 2011). Οι σωματικές υπερμεταλλάξεις δε στο γονίδιο που κωδικοποιεί την μεταβλητή περιοχή της λ ελαφριάς αλυσίδας (immunoglobulin variable lambda, *IGLV*), έχουν ως αποτέλεσμα να μειώνουν τη σταθερότητα αναδίπλωσης της φυσιολογικής πρωτεΐνης και, έτσι, να ευνοούν την ενδοπρωτεόλυση και την παραγωγή μεταβλητών περιοχών ελαφριάς αλυσίδας που μπορούν να προκαλέσουν αμυλοείδωση (Morgan and Kelly, 2016). Η συσσωμάτωση των αμυλοειδογόνων ελαφριών αλυσίδων μπορεί να εμφανιστεί και λόγω της διαταραχής ή της υπερβολικής εξωκυττάριας πρωτεόστασης. Επιπλέον, οι αλληλεπιδράσεις των ελαφριών αλυσίδων με το ιστικό μικροπεριβάλλον, συμπεριλαμβανομένων των λιπιδίων, του κολλαγόνου και των γλυκοζαμινογλυκανών, των δυνάμεων διάτμησης, των ενδοπρωτεασών και των μετάλλων, ευνοούν και προάγουν την πρωτεϊνική συσσωμάτωση και το σχηματισμό ολιγομερών. Συγκεκριμένα, οι

γλυκοζαμινογλυκάνες λειτουργούν ως ικρίωματα, διευκολύνοντας έτσι το σχηματισμό των ινιδίων. Τα κύτταρα φαίνεται πως πιθανά προάγουν την αρχική πυρήνωση των εναποθέσεων, μέσω αλληλεπίδρασης της αμυλοειδογενούς πρωτεΐνης με τις κυτταρικές μεμβράνες, ενώ τα ολιγομερή αποτελούν τοξικό παράγοντα επηρεάζοντας την κυτταρική λειτουργία και βιωσιμότητα στα όργανα-στόχους (Diomedede et al., 2017; Ami et al., 2016; Marin-Argany et al., 2016).

Ένας επιπλέον σημαντικός παράγοντας για την αμυλοειδογένεση είναι η αυξημένη συγκέντρωση της λανθασμένα αναδιπλωμένης πρωτεΐνης, μετατοπίζοντας έτσι την ισορροπία μεταξύ των λανθασμένα αναδιπλωμένων μονομερών και των ολιγομερών προς το σχηματισμό ινιδίων αμυλοειδούς. Έτσι, οι υψηλότερες συγκεντρώσεις αυτών και η αυξημένη τάση για παραγωγή ενός ελαττωματικού προϊόντος είναι καθοριστικοί παράγοντες για το σχηματισμό των ινιδίων (Merlini and Bellotti, 2003). Επιπλέον, πρόσφατη έρευνα υποστήριξε μια εναλλακτική υπόθεση της αμυλοειδογένεσης, χρησιμοποιώντας ελαφριές αλυσίδες από ασθενείς με AL αμυλοείδωση. Συγκεκριμένα, φάνηκε ότι η παροδική απώλεια της φυσιολογικής στερεοδιαμόρφωσης και η ελλιπής εξοκυστάρια αναδίπλωση εκκρινόμενων πρωτεϊνών μπορεί να οδηγήσει σε καταστάσεις εναλλακτικής αναδίπλωσης που είναι πιο ευαίσθητες στη συσσωμάτωση ή στην ενδοπρωτεόλυση, με αποτέλεσμα την απελευθέρωση θραυσμάτων επιρρεπών στη συσσωμάτωση. Σημαντικό είναι το γεγονός ότι οι θερμοδυναμικά ασταθείς ελαφριές αλυσίδες έχουν έναν πιο σταθερό πληθυσμό λανθασμένα αναδιπλωμένων ελαφριών αλυσίδων, που φαίνεται πως προωθεί τη συσσώρευση αυτών των ελαφριών αλυσίδων άρα και την πρόοδο της AL αμυλοείδωσης. Επομένως, η φαρμακολογική σταθεροποίηση των διμερών ελαφριών αλυσίδων θα μπορούσε να αποτελέσει μια σημαντική θεραπευτική προσέγγιση (Morgan et al., 2017).

Σημαντικό ρόλο στο σχηματισμό ινιδίων αμυλοειδούς παίζει επίσης και το αμυλοειδές του ορού P (pentraxin serum amyloid P, SAP) που είναι πάντα παρόν στις εναποθέσεις αμυλοειδούς και εκτιμάται πως έχει προστατευτικό ρόλο ως προς την αποικοδόμηση των ινιδίων αμυλοειδούς. Όταν τα ινίδια συσσωρευτούν στον παρεγχυματικό ιστό, προκαλούν βλάβες και σταδιακή δυσλειτουργία των ζωτικών οργάνων, ενώ η κυτταροτοξική τους δράση ωθεί το σχηματισμό ολιγομερών (Merlini et al., 2018; Marin-Argany et al., 2016).

Ακόμη, έρευνες έχουν δείξει ότι ολιγομερή μπορούν να προκαλέσουν οργανικές βλάβες όπως η καρδιακή δυσλειτουργία, μέσω του αυξημένου ενδοκυττάρου

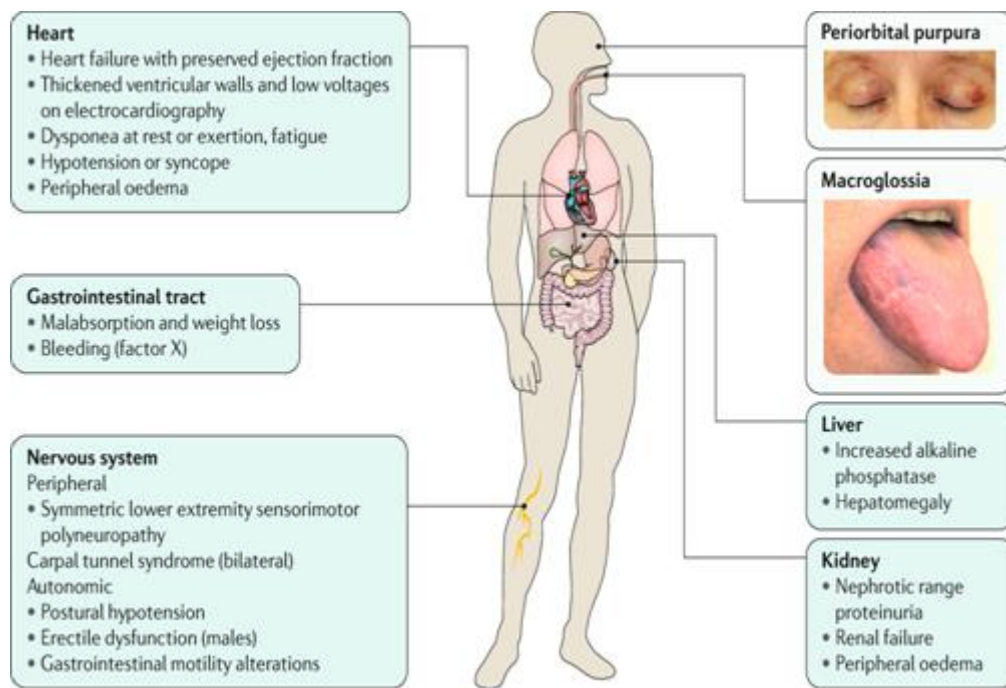
οξειδωτικού στρες που προκαλούν στα μιτοχόνδρια των κυττάρων (Brenner et al., 2004). Το οξειδωτικό στρες προκαλείται μέσω της ενεργοποίησης του σηματοδοτικού μονοπατιού p38 MAPK (Shi et al., 2010). Στην περίπτωση των νεφρών, οι οποίοι αποτελούν συχνό στόχο των αμυλοειδογόνων ελαφριών αλυσίδων, τα μεσσαγγειακά κύτταρα σχετίζονται άμεσα με την παθοφυσιολογία της νεφρικής βλάβης, καθώς μέσω αυτών οι αλυσίδες εισέρχονται, επεξεργάζονται και μεταφέρονται στα λυσοσώματα προς σχηματισμό ινιδίων (Teng et al., 2014).

Υπενθυμίζεται ότι ο σχηματισμός ινιδίων αμυλοειδούς αρχίζει από ένα διάλυμα μονομερών φυσιολογικής πρωτεΐνης, τα οποία μπορούν να αναδιπλωθούν λανθασμένα και να αποκτήσουν μια μερικώς αναδιπλωμένη διαμόρφωση. Όταν η ποσότητα των πρωτεϊνών με τη συγκεκριμένη διαμόρφωση φθάσει σε μια συγκεκριμένη συγκέντρωση, σχηματίζεται ένας πυρήνας του ινιδίου, ο οποίος παίζει κρίσιμο ρόλο, επάγοντας τη συσσωμάτωση πρωτεϊνών και την ανάπτυξη ινιδίων. Η κρίσιμη συγκέντρωση που απαιτείται για την πυρήνωση αυτή ποικίλλει και μπορεί να είναι πολύ χαμηλή για τις πιο ασταθείς ελαφριές αλυσίδες ή υψηλή για τις πιο σταθερές (Merlini et al., 2018). Η συγκέντρωση των μερικώς αναδιπλωμένων πρωτεϊνών που είναι απαραίτητη για την επιμήκυνση των ινιδίων αμυλοειδούς είναι 10 έως 20 φορές χαμηλότερη από τη συγκέντρωση που απαιτείται για το σχηματισμό του πρώτου πυρήνα, ανάλογα με το είδος της πρωτεΐνης (Westermarck et al., 2018). Έτσι, η έγκαιρη διάγνωση της AL αμυλοείδωσης και η χορήγηση θεραπείας που στοχεύει στη μείωση του αμυλοειδούς είναι πολύ σημαντική, προκειμένου να σταματήσει η περαιτέρω ανάπτυξη ινιδίων (Merlini et al., 2018). Αν και οι εναποθέσεις αμυλοειδούς είναι αρκετά ανθεκτικές στην αποικοδόμηση, παρατηρείται μία βραδεία φυσική κάθαρσή τους με ενδογενείς ανοσολογικούς μηχανισμούς που ρυθμίζονται από τα μακροφάγα (Nyström and Westermarck, 2012). Η πρόωση αυτής της ενδογενούς κάθαρσης θα συνέβαλλε σημαντικά στη βελτίωση της λειτουργίας των ζωτικών οργάνων.

1.7 ΚΛΙΝΙΚΗ ΕΙΚΟΝΑ ΑΣΘΕΝΩΝ ΜΕ AL ΑΜΥΛΟΕΙΔΩΣΗ

Αν και η AL αμυλοείδωση ανήκει στις PCDs, όπως το ΠΜ και η MGUS, υπάρχουν κλινικά και εργαστηριακά δεδομένα για το διαχωρισμό τους. Η αμυλοείδωση είναι συχνά δύσκολο να αναγνωρισθεί, καθώς τα συμπτώματα που

εμφανίζονται παρουσιάζουν βραδεία επιδείνωση, είναι μη ειδικά και διαφέρουν μεταξύ των ασθενών (Eli Muchtar, Buadi, Dispenzieri, et al., 2016). Οι κλινικές εκδηλώσεις των ασθενών με AL αμυλοείδωση (**Εικόνα 3**), εξαρτώνται από τον αριθμό των εμπλεκόμενων οργάνων και από την έκταση της βλάβης που προκαλείται. Τα πιο συχνά συμπτώματα είναι η απώλεια βάρους, το οίδημα, η αδυναμία-καταβολή και η δύσπνοια. Τα δύο τελευταία ενδέχεται να οφείλονται στην καθυστερημένη διάγνωση (Sher et al., 2012; Kyle and Gertz, 1995; Dubrey et al., 1998 Desport et al., 2012). Η κόπωση εμφανίζεται στα 2/3 των ασθενών με AL αμυλοείδωση και συνήθως σχετίζεται με ανορεξία και δυσγευσία, με αποτέλεσμα την ακούσια απώλεια βάρους σε ποσοστό 50% των περιπτώσεων. Το φαινόμενο του υποσιτισμού είναι μια συχνή συνοσηρότητα στην AL αμυλοείδωση, καθώς παρατηρείται σε ποσοστό 20% των περιπτώσεων και επηρεάζει την πρόγνωση (Caccialanza et al., 2006; Caccialanza, Palladini, Klersy, Cereda, et al., 2012). Η απώλεια βάρους επίσης μπορεί να οφείλεται σε διαρροϊκές κενώσεις και εμέτους ή να είναι συνέπεια της προοδευτικής καρδιακής ανεπάρκειας. Το οίδημα μπορεί να προκαλείται είτε λόγω της υπολευκωματιδιακής αναιμίας (νεφρικής, ηπατικής ή εντερικής αιτιολογίας), είτε λόγω καρδιακής ανεπάρκειας, είτε λόγω της αδυναμίας των αιμοφόρων αγγείων να χειριστούν προκλήσεις όπως η υδροστατική πίεση (Baker and Rice, 2012). Άλλες συχνές εκδηλώσεις είναι η ζαλάδα και τα ορθοστατικά συγκοπτικά επεισόδια, λόγω της μείωσης του ενδοαγγειακού όγκου από την υποαλβουμιναιμία και τη χρήση διουρητικών (Matsuda et al., 2011). Τα όργανα που προσβάλλονται πιο συχνά είναι η καρδιά (71%), οι νεφροί (58%), ο γαστρεντερικός σωλήνας (22%), το περιφερικό και αυτόνομο νευρικό σύστημα (23%), το ήπαρ (16%) και τα μαλακά μόρια (Vaxman and Gertz, 2019).



Εικόνα 3 : Συμμετοχή οργάνων στην πρωτοπαθή συστηματική αμυλοείδωση (Merlini et al., 2018).

Το 71% των ασθενών με AL αμυλοείδωση παρουσιάζουν καρδιακή συμμετοχή, η οποία αποτελεί τον σημαντικότερο προγνωστικό παράγοντα, καθώς σε αυτήν οφείλεται περίπου το 75% των θανάτων, λόγω καρδιακής ανεπάρκειας ή αρρυθμίας (Selvanayagam et al., 2007; Karoor et al., 2011). Η προσβολή της καρδιάς έχει ως συνέπεια την εμφάνιση δύσπνοιας, κόπωσης, περιφερικού οιδήματος και υπεζωκοτικής συλλογής. Σπανίως εκδηλώνεται και έμφραγμα του μυοκαρδίου, λόγω συσσώρευσης ινιδίων αμυλοειδούς στα στεφανιαία αγγεία (Palladini et al., 2003). Η εναπόθεση αμυλοειδούς εντός του μυοκαρδίου οδηγεί σε πάχυνση των κοιλιακών και κολπικών τοιχωμάτων, με αποτέλεσμα την καρδιοπάθεια. Η διήθηση του καρδιακού μυός μπορεί επίσης να προκαλέσει διαταραχές αγωγιμότητας και κοιλιακές ή υπερκοιλιακές αρρυθμίες (Dubrey et al., 2011). Οι ελεύθερες ελαφριές αλυσίδες (free light chains, FLCs) που συσσωρεύονται στα κύτταρα του μυοκαρδίου προκαλούν βλάβες και αυτό αντικατοπτρίζεται στα αυξημένα επίπεδα του καρδιακού βιοδείκτη του αμινοτελικού άκρου του προπεπτιδίου του εγκεφαλικού νατριουρητικού πεπτιδίου (N-terminal prohormone of brain natriuretic peptide, NT-proBNP) (Palladini et al., 2003). Το proBNP είναι ένα προπεπτίδιο που παράγεται από τα μυϊκά κύτταρα σε συνθήκες στρες. Όταν απελευθερωθεί το προπεπτίδιο, διαίρειται στο ενεργό BNP και το NT-proBNP. Η εξέταση μέσω υπερηχογραφήματος μπορεί να

αναδείξει πάχυνση του μεσοκοιλιακού διαφράγματος και διατηρημένο κλάσμα εξώθησης, γεγονός που καταδεικνύει ότι η καρδιακή αμυλοείδωση χαρακτηρίζεται από την καρδιακή διαστολική δυσλειτουργία (Vaxman and Gertz, 2019). Επίσης σημαντικό είναι να αναφερθεί ότι η ενδεχόμενη ανάπτυξη κολπικής μαρμαρυγής αυξάνει τον κίνδυνο για εμφάνιση θρομβοεμβολικών επεισοδίων.

Η νεφρική συμμετοχή εμφανίζεται στο 58% των ασθενών με AL αμυλοείδωση και γίνεται αντιληπτή μέσω της εμφάνισης, συνήθως, πρωτεϊνουρίας ή νεφρωσικού συνδρόμου. Στο 20-45% των περιπτώσεων επίσης παρατηρείται και μείωση της πειραματικής διήθησης (Desport et al., 2012). Η πρωτεϊνουρία μπορεί να οδηγήσει σε σοβαρή υπολευκωματιναιμία και ασκίτη. Περισσότερο από το 40% των AL ασθενών παρουσιάζουν νεφρωσικό σύνδρομο κατά τη διάγνωση και περίπου το 20% αυτών τελικά αναπτύσσουν νεφρική ανεπάρκεια τελικού σταδίου, οδηγώντας σε ανάγκη αιμοκάθαρσης (Leung et al., 2007; Palladini, Hegenbart, et al., 2014). Οι κλινικές εκδηλώσεις που ακόμη παρατηρούνται κατά τη νεφρική συμμετοχή είναι το περιφερικό οίδημα, οίδημα ανά σάρκα, αφρώδη ούρα και αύξηση βάρους λόγω του οιδήματος. Τα εργαστηριακά ευρήματα περιλαμβάνουν υπερλιπιδαιμία και υποαλβουμιναιμία, ενώ απεικονιστικές μέθοδοι σε κάποιες περιπτώσεις δείχνουν και αυξημένο μέγεθος των νεφρών (Vaxman and Gertz, 2019).

Η συμμετοχή του γαστρεντερικού σωλήνα (ΓΕΣ) χαρακτηρίζεται από συμπτώματα όπως η δυσκοιλιότητα, διαρροϊκές κενώσεις, άμεσος κορεσμός, αιμορραγία του ΓΕΣ, ναυτία και έμετοι λόγω γαστροπάρεσης και απώλεια βάρους (Franck et al., 2017; Hoscheit et al., 2018). Ακόμα, παρατηρείται μειωμένη εντερική διέλευση πιθανώς λόγω αυτόνομης νευροπάθειας, δυσασπορόφηση, διάτρηση ή οξεία εντερική απόφραξη. Η μακρογλωσσία συναντάται μόνο στο 15% των περιπτώσεων (Desport et al., 2012). Τα εργαστηριακά ευρήματα παρουσιάζουν αναιμία και αποαλβουμιναιμία ενώ οι απεικονιστικές μέθοδοι δείχνουν συνήθως διατεταμένο οισοφάγο, μειωμένη περισταλτικότητα, πάχυνση των τοιχωμάτων του στομάχου και του λεπτού εντέρου. Η παρουσία ηπατομεγαλίας είναι συχνή και συνοδεύεται από διαταραχή των ηπατικών βιοχημικών δεικτών (Vaxman and Gertz, 2019).

Η συμμετοχή των μαλακών μορίων στις κλινικές εκδηλώσεις παρουσιάζεται ως μακρογλωσσία, βράχνιασμα, δυσαρθρία, διόγκωση των σιελογόνων αδένων, υπνική άπνοια, πορφύρα κεφαλής-τραχήλου, ξηροστομία και αρθρική προσβολή που προκαλεί το χαρακτηριστικό σημείο του ώμου “pad sign” (προβολή του ώμου λόγω

παρουσίας υγρού στην άρθρωση ή διείσδυσης αμυλοειδούς στην αρθρική μεμβράνη και στις δομές που την περιβάλλουν). Τα συμπτώματα των αρθρώσεων εκδηλώνονται ως προοδευτική αμφοτερόπλευρη και συμμετρική πολυαρθροπάθεια, που περιλαμβάνει δάχτυλα, καρπούς, ώμους και γόνατα (Desport et al., 2012). Η μακρογλωσσία μπορεί να προκαλέσει δύσπνοια, δυσκολία στην αναπνοή, αδυναμία κατάποσης και μάζησης, με αποτέλεσμα την τοποθέτηση ρινογαστρικού σωλήνα ή την τραχειοστομία (Hoscheit et al., 2018).

Η μικτή αισθητηριακή και κινητική περιφερική νευροπάθεια και η αυτόνομη νευροπάθεια αποτελούν κλινικά χαρακτηριστικά της AL αμυλοείδωσης. Το σύνδρομο του καρπιαίου σωλήνα, το μούδιασμα, η παραισθησία και ο πόνος παρατηρούνται ως εκδηλώσεις των εμπλεκόμενων περιφερικών νεύρων. Η αυτόνομη νευροπάθεια, σχετιζόμενη ή μη με την περιφερική νευροπάθεια, χαρακτηρίζεται από συμπτώματα όπως η δυσλειτουργία της ουροδόχου κύστεως, η γαστροπάρεση, η διάρροια ή δυσκοιλιότητα και η ορθοστατική υπόταση (Vaxman and Gertz., 2019).

Οι ηπατικές κλινικές εκδηλώσεις, που παρατηρούνται στο 30% των ασθενών, συνήθως παρουσιάζονται ως διόγκωση του ήπατος με αυξημένα επίπεδα αλκαλικής φωσφατάσης στον ορό, χωρίς ενδείξεις ηπατικής ανεπάρκειας.

Η εμπλοκή του σπλήνα είναι σχεδόν σταθερή και συνήθως χωρίς την παρουσία συμπτωμάτων. Σε ασθενείς με μαζικές εναποθέσεις αμυλοειδούς μπορεί να ανιχνευθούν σημάδια υποσπληνισμού σε επιχρίσματα αίματος, συχνά με θρομβοκυτταραιμία (Di Sabatino et al., 2011).

Η πνευμονική νόσος στην αμυλοείδωση χαρακτηρίζεται κυρίως από διάμεση διήθηση αμυλοειδούς, της οποίας η κλινική εκδήλωση εξαρτάται από τη διάχυση και τον εντοπισμό των εναποθέσεων. Ταχέως προοδευτική αναπνευστική ανεπάρκεια μπορεί να προκύψει από βρογχιολογική και κυψελιδική εμπλοκή. Η κλινική αυτή εικόνα φαίνεται να είναι πιο συχνή σε ασθενείς με παραπρωτεΐνη IgM στον ορό (Terrier et al., 2008).

Τέλος, οι διαταραχές πήκτικότητας είναι αρκετά συχνές και εκδηλώνονται μέσω εκχυμώσεων κυρίως γύρω από τα μάτια (raccoon eyes). Άλλες παρόμοιες εκδηλώσεις προκύπτουν ως αποτέλεσμα αγγειακής διήθησης από αμυλοειδές, παραγωγής δυσλειτουργικών μορίων ινωδογόνου από το διηθημένο από αμυλοειδές ήπαρ, μη φυσιολογικής συσσώρευσης αιμοπεταλίων και ανεπαρκειών των παραγόντων II, V, VII, IX και, ιδιαίτερα, του παράγοντα X (Sucker et al., 2006), ο

οποίος παρουσιάζει προδιάθεση στο να συνδέεται με αμυλοειδή ινίδια (Thompson et al., 2010).

Οι ασθενείς με ΠΜ ή MGUS γενικά εμφανίζουν μονοκλωνικό κλάσμα στην ηλεκτροφόρηση ούρων ή ορού, ενώ οι ασθενείς με AL σε ποσοστό 40% έχουν μόνο μετρήσιμες FLCs στον ορό και οι μισοί εμφανίζουν φυσιολογική ηλεκτροφόρηση ορού. Η ανοσοκαθίλωση για την αναγνώριση κ ή λ ελαφριών αλυσίδων αποτελεί μια αρκετά ευαίσθητη μέθοδο. Μάλιστα, όταν συνδυαστεί με μέτρηση FLCs και ηλεκτροφόρηση ούρων και ορού, η διαγνωστική ευαισθησία για την AL προσεγγίζει το 100% για την αναγνώριση μονοκλωνικής πρωτεΐνης. Τέλος, μέσω νεφελομετρίας γίνεται η μέτρηση των FLCs κατά την χορήγηση της αντινεοπλασματικής χημειοθεραπείας, για ύπαρξη ή όχι πρώιμων ανταποκρίσεων (Palladini, Russo, et al., 2019; Dispenzieri et al., 2009).

1.8 ΠΛΑΣΜΑΤΟΚΥΤΤΑΡΙΚΟΣ ΚΛΩΝΟΣ ΚΑΙ ΓΕΝΕΤΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΣΤΗΝ AL ΑΜΥΛΟΕΙΔΩΣΗ

Οι κλινικές εκδηλώσεις και οι θανατηφόρες συνέπειες της AL αμυλοείδωσης οφείλονται κατά κύριο λόγο στις ελαφριές αλυσίδες που συσσωρεύονται στα όργανα και όχι στον ίδιο τον πλασματοκυτταρικό κλώνο. Οι περισσότεροι ασθενείς με αυτή τη νόσο χαρακτηρίζονται από μικρούς κλώνους με χαμηλή πολλαπλασιαστική ικανότητα (Gertz et al., 1989) που εκφράζουν λ ελαφριές αλυσίδες σε ποσοστό 75%. Η μέση διήθηση του μυελού των οστών είναι 7-10%. Παρόλα αυτά η μειονότητα των ασθενών που παρουσιάζουν εκτεταμένη διήθηση (πάνω από 30%), εμφανίζουν συμπτώματα αμυλοειδικής εμπλοκής οργάνων χωρίς να πληρούν όμως τα κλασικά κριτήρια μυελώματος CRAB (hyperCalcemia, Renal failure, Anemia, Bone disease). Η ακόμα πιο εκτεταμένη διήθηση του μυελού σχετίζεται με κατώτερη επιβίωση, ανεξάρτητα από άλλα χαρακτηριστικά της νόσου. Επιπλέον, έχειδειχθεί ότι σε ένα μικρό ποσοστό ασθενών (<10%) η AL αμυλοείδωση συνυπάρχει με MM, πληρώντας ένα ή περισσότερα από τα κριτήρια CRAB (Kourelis et al., 2013). Ακόμη, έχει υποστηριχθεί ότι AL ασθενείς με 2% ή περισσότερα κυκλοφορούντα κλωνικά πλασματοκύτταρα (peripheral blood plasma cells, PBPCs) έχουν μεγαλύτερη πιθανότητα ταυτόχρονης εμφάνισης ΠΜ, παρουσιάζοντας φτωχότερη πρόγνωση. Έτσι, το ποσοστό των PBPCs θεωρείται ένας ανεξάρτητος προγνωστικός δείκτης

επιβίωσης, βοηθώντας παράλληλα και στην επιλογή θεραπείας για AL ασθενείς (Pardanani et al., 2003).

Επιπρόσθετα, έρευνες υποστηρίζουν ότι τα κλωνικά πλασματοκύτταρα στην AL αμυλοείδωση έχουν παρόμοια φαινοτυπικά πρότυπα και αλλαγές στον αριθμό των αντιγράφων των γονιδίων (copy number alterations) με το ΠΜ, αλλά το μεταγράφομά τους είναι παρόμοιο με αυτό των φυσιολογικών πλασματοκυττάρων. Ακόμη, εκτιμάται ότι το προφίλ γονιδιακής έκφρασης στα κλωνικά πλασματοκύτταρα στην AL είναι πολύ λιγότερο απορρυθμισμένο από αυτό που παρουσιάζεται στο ΠΜ (Paiva et al., 2016). Σχετικά με την υπερδιπλοειδία την οποία δε συναντάμε συχνά στην AL σε σύγκριση με το ΠΜ, φαίνεται πως σε απομονωμένα κλωνικά PCs η προσθήκη στο 1q21.1 μπορεί να ανιχνευθεί στα 2/3 περίπου των ασθενών με AL (Paiva, Corchete, et al., 2013). Το 2005, ο Abraham και η ερευνητική του ομάδα υπέδειξαν, μέσω ανάλυσης γονιδιακής έκφρασης, την παρουσία ενός διαφορετικού μεταγραφωμικού προφίλ στα πλασματοκύτταρα ασθενών με AL αμυλοείδωση σε σύγκριση με ασθενείς που πάσχουν από ΠΜ (Abraham et al., 2005). Εν συνεχεία, το 2017 παρόμοια έρευνα υποστήριξε ότι το πρότυπο μεταλλάξεων στην AL είναι ενδιάμεσο μεταξύ του αντίστοιχου της MGUS και του ΠΜ (Rossi et al., 2017). Σε αντίθεση με ότι έχει παρατηρηθεί στο ΠΜ, η μετατόπιση t(11,14) είναι η πιο συχνή στην AL και σχετίζεται με δυσμενή πρόγνωση σε ασθενείς που έλαβαν συμβατική χημειοθεραπεία ή θεραπεία υψηλής δόσης (Bryce et al., 2009) ή σχήματα με βάση τη βορτεζομίμη (Bochtler, Hegenbart, Kunz, et al., 2015). Ακόμη, η t(11,14) έχει παρατηρηθεί πως είναι ιδιαίτερα διαδεδομένη στα αρχικά στάδια των PCDs και εμφανίζεται ως δείκτης πρώιμης γαμμαπάθειας στην AL αμυλοείδωση. Επίσης, υποστηρίζεται ότι προσδίδει σταθερότητα στον πλασματοκυτταρικό κλώνο, εμποδίζοντας την εμφάνιση υποκλώνων. Όπως η μετατόπιση t(11,14), έτσι και η υπερδιπλοειδία αποτελεί ένα από τα εναρκτήρια γενετικά συμβάντα στην αρχή της ογκογένεσης στην AL και εντοπίζεται στους κύριους κλώνους, ενώ οι ελλείψεις των τμημάτων 8p21, 13q14 και 17p13 εμφανίζονται ως πιθανές εκτροπές κατά την πορεία της εξέλιξης της νόσου και εντοπίζονται συχνότερα στους υποκλώνους. Τα ευρήματα αυτά εξηγούν εν μέρει την κλωνική επιλογή που προκαλείται κατά την χημειοθεραπεία, καθώς και την επακόλουθη ανάπτυξη ανθεκτικών κλώνων σε ασθενείς με AL αμυλοείδωση που βρίσκονται θετικοί στην t(11,14) (Bochtler, Merz, Hielscher, et al., 2018).

Η ενίσχυση του χρωμοσώματος 1q21 έχει συσχετιστεί με λιγότερο ευνοϊκή πρόγνωση σε ασθενείς που έλαβαν μελφαλάνη και δεξαμεθαζόνη (Bochtler, Hegenbart, Kunz, Benner, et al., 2014). Η AL αμυλοείδωση που σχετίζεται με την IgM φαίνεται πως έχει διακριτά χαρακτηριστικά σε σχέση με τον B κυτταρικό κλώνο και το πρότυπο της οργανικής εμπλοκής (Wechalekar et al., 2008). Ακόμη, κάποια προφίλ κυτταροκινών, συμπεριλαμβανομένων και αυτών με φλεγμονώδεις και αγγειογενετικές ιδιότητες, διαφέρουν από αυτά που χαρακτηρίζουν το ΠΜ (Kastritis et al., 2010) και πιθανά να έχουν προγνωστική αξία.

Πρόσφατη έρευνα αποκάλυψε το γονιδιωματικό προφίλ της AL αμυλοείδωσης, ταυτοποιώντας τέσσερις επαναλαμβανόμενες μεταλλάξεις, οι οποίες βρίσκονται στα γονίδια *ASB15* (c. 844C> T), *ASCC3* (c. 1595A> G), *HIST1H1E* (c. 311C> T) και *KRAS* (c. 35G> A). Οι πρώτες 3 μάλιστα συσχετίστηκαν με κατώτερη συνολική επιβίωση. Είναι σημαντικό να αναφερθούν επίσης τα ευρήματα έρευνας που υποστηρίζουν ότι σε συγκεκριμένα στοιχεία δευτεροταγούς δομής, υπάρχουν σημαντικές διαφορές ως προς τον αριθμό των μη συντηρημένων μεταλλάξεων μεταξύ φυσιολογικών και AL αλληλουχιών. Συγκεκριμένα, οι μη συντηρημένες μεταλλάξεις τείνουν να συσσωρεύονται σε συγκεκριμένες δομικές περιοχές των AL Vκ και Vλ περιοχών. Οι AL αλληλουχίες από ασθενείς με διαφορετικά επίπεδα εκκρινόμενης ελαφριάς αλυσίδας έχουν διαφορές ως προς την θέση των μη συντηρημένων μεταλλάξεων, γεγονός που υποδηλώνει ότι για ασθενείς με πολύ χαμηλά επίπεδα ελαφρών αλυσίδων και προχωρημένη εναπόθεση αμυλοειδούς, η θέση των μη συντηρημένων μεταλλάξεων και όχι η ποσότητα της ελεύθερης ελαφριάς αλυσίδας στην κυκλοφορία μπορεί να προσδιορίσει την αμυλοειδογόνο τάση των ελαφρών αλυσίδων. Μια τέτοια γνώση θα μπορούσε ενδεχομένως να χρησιμοποιηθεί ως δείκτης για την εξέλιξη της νόσου και την ανταπόκριση στη θεραπεία (Poshusta et al., 2009).

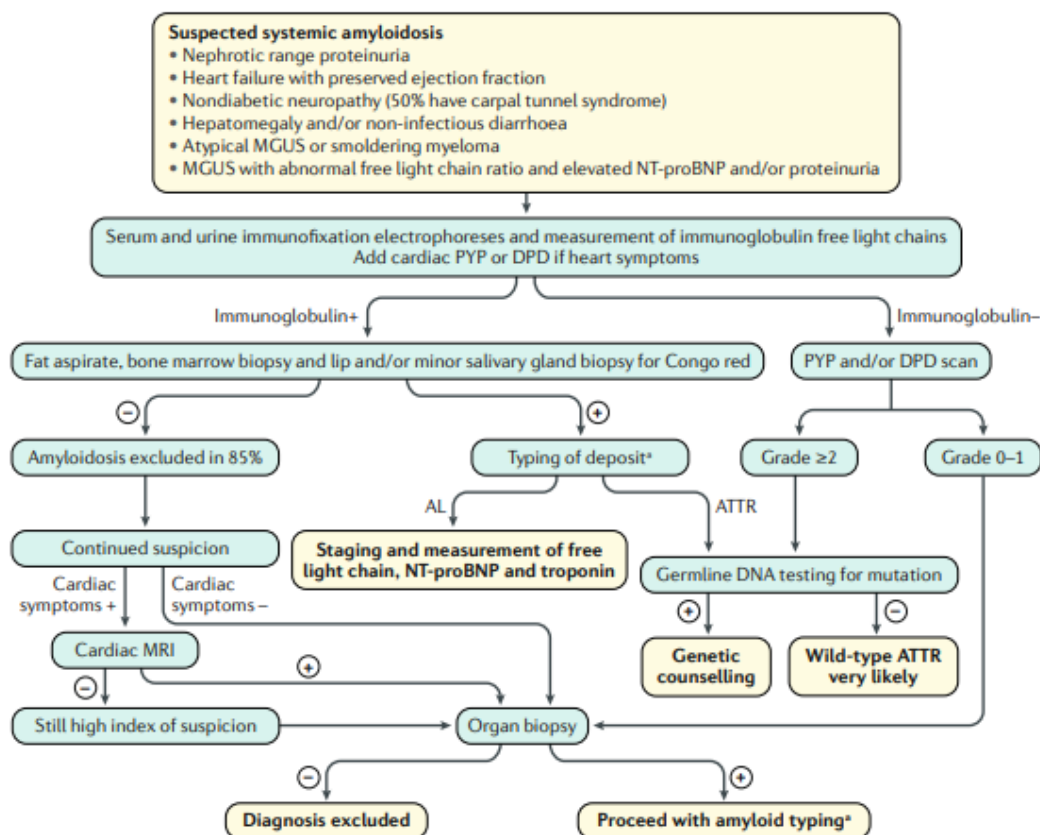
Τέλος, ερευνητικές αναφορές εκτιμούν ότι η αυξημένη έκφραση της κυκλίνης D1 σχετίζεται με την παραγωγή των ελεύθερων ελαφριών αλυσίδων (free light chains, FLCs) και την καρδιακή συμμετοχή. Ακόμη, όλα τα AL πλασματοκύτταρα φαίνεται πως εκφράζουν τον υποδοχέα CD32B και την καλρετικουλίνη, η οποία είναι μια πλειοτροπική πρωτεΐνη-συνοδός που συνδέεται με το ασβέστιο. Τα μόρια αυτά παρουσιάζουν προοπτικές στο να χρησιμοποιηθούν ως στόχοι στην ανοσοθεραπεία (Merlini, Seldin, et al., 2011).

1.9 ΔΙΑΓΝΩΣΗ ΣΤΗΝ AL ΑΜΥΛΟΕΙΔΩΣΗ

Τα κλινικά χαρακτηριστικά της AL αμυλοείδωσης μπορούν να μιμηθούν κοινές ασθένειες του γήρατος, με αποτέλεσμα να διαγιγνώσκεται καθυστερημένα ή και καθόλου. Για το λόγο αυτό, η κλινική εγρήγορση θεωρείται κρίσιμη (Dispenzieri and Merlini., 2016). Η παρουσία AL αμυλοείδωσης θα πρέπει να διερευνάται σε κάθε ασθενή με μονοκλωνική γαμμαπάθεια ή μη τυπικό MM, αλλά και σε κάθε ασθενή που πάσχει από μη ισχαιμική καρδιομυοπάθεια με υπερτροφικό μοτίβο κατά την ηχοκαρδιογραφία, αυξημένο NT-proBNP απουσία πρωτοπαθούς καρδιακής νόσου, πρωτεϊνουρία στα όρια του νεφρωσικού συνδρόμου, ταυτόχρονη μη διαβητική περιφερική και αυτόνομη νευροπάθεια με σύνδρομο καρπιαίου σωλήνα, αυξημένα επίπεδα αλκαλικής φωσφατάσης, ηπατομεγαλία χωρίς άλλα απεικονιστικά ευρήματα, μακρογλωσσία ή λευκωματουρία σε ασθενείς με MGUS (Merlini et al., 2018; Merlini et al., 2013; Dispenzieri and Merlini., 2016) (**Εικόνα 4**). Σε κάθε τέτοια περίπτωση ο ασθενής θα πρέπει να υποβάλλεται σε βιοψία οργάνου που πιθανά έχει προσβληθεί προς ανεύρεση αμυλοειδούς και να διενεργείται ηλεκτροφόρηση και ανοσοκαθήλωση πρωτεϊνών ορού και ούρων, αλλά και δοκιμασία FLC. Η FLC δοκιμασία γίνεται προς αξιολόγηση της συγκέντρωσης κ ή λ ελαφριών αλυσίδων και της αναλογίας τους στον ορό. Στην περίπτωση των ασθενών με γνωστή PCD, θα πρέπει να γίνεται έλεγχος για AL αμυλοείδωση αν μάλιστα εμφανίζουν συμπτώματα όπως περιφερικό οίδημα, δύσπνοια, συμφορητική καρδιακή ανεπάρκεια, μη επιλεκτική πρωτεϊνουρία ή νεφρωσικό σύνδρομο (Kourelis, Kumar, Go, et al., 2014). Η αρχική αξιολόγηση της οργανικής δυσλειτουργίας βασίζεται στις μετρήσεις των καρδιακών βιοδεικτών και σε εξετάσεις για πρωτεϊνουρία (Kastritis and Dimopoulos., 2016). Πιο συγκεκριμένα, προοδευτική, κλινικά «σιωπηλή» συμμετοχή της καρδιάς και των νεφρών μπορεί να ανιχνευθεί εξ αρχής με τη μέτρηση του καρδιακού βιοδείκτη NT-proBNP. Η συγκέντρωση >332 ng/L μπορεί να σηματοδοτήσει την αμυλοειδική καρδιακή συμμετοχή μήνες ή και χρόνια πριν αυτή γίνει εμφανής κλινικά. Ομοίως, η ένδειξη λευκωματίνης ούρων >0,5 g/ημέρα αποτελεί επίσης ένα πολύ πρώιμο και ευαίσθητο βιοδείκτη νεφρικής συμμετοχής (Dispenzieri and Merlini, 2016).

Στα πλαίσια της διάγνωσης όπως προαναφέρθηκε, απαιτείται η ιστολογική εξέταση του αμυλοειδούς και ιστοπαθολογική ανάλυση. Στην ιστολογική εξέταση

παρατηρείται η χαρακτηριστική πράσινη διχρωμία κάτω από το πολωμένο φως μετά τη χρώση με ερυθρό του Κονγκό (Kastritis and Dimopoulos, 2016).



Εικόνα 4 :Διαγνωστικός αλγόριθμος για την AL αμυλοείδωση (Merlini et al., 2018).

Η πιο εύκολη και ασφαλής μέθοδος είναι η αναρρόφηση του κοιλιακού υποδόριου λίπους η οποία έχει ευαισθησία περίπου 70-80% (Morie A. Gertz et al., 1988). Αν η βιοψία του λίπους αποβεί αρνητική, τότε εναλλακτικά γίνεται βιοψία των σιελογόνων αδένων με ευαισθησία που φθάνει το 90% (Foli et al., 2011) ή και του μυελού των οστών που μπορεί να οδηγήσει σε διάγνωση στο 50-85% των ασθενών (Muchtart, Dispenzieri, et al., 2017). Εάν και η βιοψία σιελογόνων αδένων είναι αρνητική και υπάρχει έντονη υποψία για αμυλοείδωση, τότε συνιστάται η βιοψία του προσβεβλημένου οργάνου. Η νεφρική βιοψία θεωρείται ασφαλής σε ασθενείς με AL αμυλοείδωση και μπορεί να οδηγήσει σε μια σωστή και αξιόπιστη διάγνωση (Soares et al., 2008). Στην περίπτωση των ασθενών με σακχαρώδη διαβήτη και μονοκλωνική γαμμαπάθεια, θα πρέπει απαραίτητα να γίνει και νεφρική βιοψία αν μάλιστα οι νεφροί είναι το μόνο προσβληθέν όργανο.

Η παρουσία μιας μονοκλωνικής γαμμαπάθειας δεν σημαίνει απαραίτητα ότι η διάγνωση είναι AL αμυλοείδωση. Ο διαχωρισμός μεταξύ AL αμυλοείδωσης και άλλων τύπων αμυλοείδωσης είναι πολύ σημαντικός, καθώς μια λανθασμένη τυποποίηση αμυλοειδούς μπορεί να οδηγήσει σε καταστροφικές θεραπευτικές επιπτώσεις, εκθέτοντας λόγω χάρη ασθενείς με ATTRwt αμυλοείδωση σε τοξική και ανούσια χημειοθεραπεία την οποία διαφορετικά δεν θα λάμβαναν (Chaulagain and Comenzo., 2013; Dispenzieri and Merlini., 2016). Για το λόγο αυτό, θεωρείται πως η κλινική εκτίμηση μπορεί να βοηθήσει στη διαφορική διάγνωση. Επίσης πρέπει να τονιστεί το γεγονός ότι η MGUS είναι μια πολύ διαδεδομένη νόσος σε ασθενείς άνω των 65 ετών, γεγονός που καθιστά αναγκαία την ταυτοποίηση των ινιδίων προς αποφυγή εσφαλμένης διάγνωσης (De Larrea et al., 2015).

Η ανοσοϊστοχημεία είναι μία μέθοδος που χρησιμοποιείται ευρέως, αλλά μπορεί να χαρακτηρίζεται από χαμηλή ειδικότητα και ευαισθησία, λόγω έλλειψης αντισωμάτων και μη ειδικής απορρόφησης από τα ινίδια αμυλοειδούς (Schönland et al., 2012). Η πιο ειδική και αξιόπιστη μέθοδος για την τυποποίηση των ινιδίων αμυλοειδούς είναι ο διαχωρισμός με laser σε συνδυασμό με φασματομετρία μάζας (Vrana et al., 2009; Brambilla et al., 2012), ιδίως σε ασθενείς που πιθανά να χαρακτηρίζονται από δύο πιθανές πρόδρομες πρωτεΐνες αμυλοειδούς. Η ανοσοηλεκτρονική μικροσκοπία (immunoelectron microscopy, IEM) με επισημασμένα με χρυσό αντισώματα είναι μια εξαιρετικά ευαίσθητη μέθοδος, αλλά δεν διατίθεται στα περισσότερα κέντρα. Ωστόσο, η IEM κοιλιακού λίπους είναι ένα αποτελεσματικό εργαλείο στη ρουτίνα διάγνωσης της συστηματικής αμυλοείδωσης (Vaxman and Gertz., 2019).

Γενετικές εξετάσεις για τον αποκλεισμό της κληρονομικής αμυλοείδωσης πρέπει να διεξάγονται σε ασθενείς με οικογενειακό ιστορικό της νόσου ή με μεμονωμένη συμμετοχή του περιφερικού νευρικού συστήματος, καρδιακή συμμετοχή με περιφερική νευροπάθεια, μεμονωμένη νεφρική συμμετοχή, συμμετοχή του ήπατος και του εντέρου με ταυτόχρονη παρουσία ξηροστομίας και δερματικών εξανθημάτων, παράλυση κρανιακών νεύρων και δυστροφία του κερατοειδούς χιτώνα (Merlini, Comenzo, et al., 2014). Το σπινθηρογράφημα με σημασμένο το συστατικό P του αμυλοειδούς στον ορό (SAP) δεν είναι ευρέως διαθέσιμο αλλά δίνει τη δυνατότητα οπτικοποίησης και ποσοτικοποίησης της διήθησης του αμυλοειδούς σε νεφρούς, ήπαρ, σπλήνα, επινεφρίδια και οστά. Η αδυναμία της σπινθηρογραφίας SAP είναι ότι δεν μπορεί να διαφοροποιήσει τους διάφορους τύπους αμυλοείδωσης, αλλά μπορεί να

χρησιμοποιηθεί για την παρακολούθηση της ανταπόκρισης στη θεραπεία (Hawkins et al., 1990).

Η ταυτοποίηση του αμυλοειδογόνου κλώνου απαιτεί ανοσοκαθήλωση ορού και ούρων σε συνδυασμό με FLC ποσοτικοποίηση και ανάλυση μυελού των οστών (Palladini, Russo, et al., 2009). Οι λ κλώνοι κυριαρχούν των κ σε αναλογία 4:1, έναντι της αντίστοιχης αναλογίας 2:3 στο μύελωμα. Για να αποκλειστεί το ΠΜ πρέπει να πραγματοποιηθεί και FISH (Fluorescence in situ hybridization) του μυελού των οστών. Η εύρεση δε ανοσοφαινοτύπου μέσω πολυπαραγοντικής κυτταρομετρίας ροής, αποτελεί χρήσιμο εργαλείο ως προς την ανίχνευση του κλώνου και την αξιολόγηση της πρόγνωσης (Paiva, Vidriales, et al., 2011; Dispenzieri and Merlini, 2016).

Τα κριτήρια διάγνωσης σύμφωνα με τη διεθνή ομάδα μελέτης του μυελώματος IMWG (International Myeloma Working Group) απαιτούν την παρουσία όλων των παρακάτω (Rajkumar et al., 2014):

- 1) Παρουσία συστηματικού κλινικού συνδρόμου που σχετίζεται με την εναπόθεση αμυλοειδούς (προσβολή νεφρών, καρδιάς ή άλλων ζωτικών οργάνων).
- 2) Θετική χρώση αμυλοειδούς με ερυθρό του Κονγκό σε οποιονδήποτε ιστό (π.χ. λίπος, μυελός των οστών ή άλλο όργανο βιοψίας) ή παρουσία ινιδίων αμυλοειδούς στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο.
- 3) Απόδειξη ότι το αμυλοειδές σχετίζεται με ελαφριές αλυσίδες, όπως αποδεικνύεται από την άμεση εξέταση του αμυλοειδούς (π.χ. πρωτεωμική ανάλυση με φασματομετρία μάζας).
- 4) Παρουσία μονοκλωνικής πλασματοκυτταρικής διαταραχής (παρουσία παραπρωτεΐνης στον ορό ή τα ούρα ή παθολογικού λόγου ελεύθερων ελαφρών αλυσίδων στον ορό, ή κλώνου πλασματοκυττάρων στο μυελό των οστών).

1.10 ΣΤΑΔΙΟΠΟΙΗΣΗ ΚΑΙ ΠΡΟΓΝΩΣΗ ΣΤΗΝ AL ΑΜΥΛΟΕΙΔΩΣΗ

1.10.1 Εκτίμηση συμμετοχής οργάνων

Οι ασθενείς με AL αμυλοείδωση είναι αρκετά ευαίσθητοι, λόγω εναπόθεσης του αμυλοειδούς σε πολλαπλά ζωτικά όργανα. Η εκτίμηση της σοβαρότητας της

οργανικής βλάβης είναι απαραίτητη για την πρόγνωση και το σχεδιασμό της θεραπευτικής προσέγγισης, έτσι ώστε τα οφέλη αναλογικά με το ρίσκο να είναι περισσότερα (Dispenzieri and Merlini, 2016). Η συνολική επιβίωση των ασθενών με AL είναι ιδιαίτερα ετερογενής και αυτό εξαρτάται από το βαθμό της καρδιακής δυσλειτουργίας κατά τη διάγνωση. Ασθενείς με καθυστερημένη διάγνωση έχουν μέση επιβίωση 3-6 μήνες (Wechalekar, Schonland, et al., 2013) ενώ ασθενείς χωρίς καρδιακή συμμετοχή μπορούν να επιβιώσουν για πολλά χρόνια, ακόμη και αν δεν ανταποκριθούν σε θεραπεία πρώτης γραμμής. Ομοίως, η έγκαιρη διάγνωση και αποτελεσματική θεραπεία ασθενών με νεφρική συμμετοχή σχεδόν καταργεί τον κίνδυνο εξέλιξης σε νεφρική νόσο τελικού σταδίου και ανάγκη αιμοκάθαρσης, ενώ αντιθέτως η καθυστερημένη διάγνωση συνδέεται με υψηλό κίνδυνο εξέλιξης της νόσου παρά τη θεραπεία (Palladini, Hegenbart, et al., 2014). Η αξιολόγηση της καρδιακής συμμετοχής μέσω απεικονιστικών, μη επεμβατικών μεθόδων όπως το υπερηχοκαρδιογράφημα Doppler και η μαγνητική τομογραφία του καρδιαγγειακού συστήματος (cardiovascular magnetic resonance imaging, CMR), είναι ιδιαίτερα σημαντική για τη σταδιοποίηση και την πρόγνωση. Στο υπερηχοκαρδιογράφημα χαρακτηριστική θεωρείται η εικόνα του μεσοκοιλιακού διαφράγματος (sparkling), ενώ επίσης παρατηρείται υπερτροφία των τοιχωμάτων της καρδιάς, διαταραχές διαστολικής λειτουργίας και δύσπνοια, ιδίως σε προχωρημένα στάδια. Στην CMR παρατηρείται υποενδοκαρδιακή ενίσχυση με γαδολίνιο και οίδημα, που προκαλούνται από τις εναποθέσεις αμυλοειδούς και συνδέονται με ίνωση που προκαλείται από ισχαιμία, ενώ στο ηλεκτροκαρδιογράφημα εμφανίζονται χαμηλά δυναμικά και ψευδή ευρήματα ισχαιμίας (Banypersad, 2019; Kastritis and Dimopoulos, 2016; Hashimura et al., 2016). Οι καρδιακοί βιοδείκτες που χαρακτηρίζονται από υψηλή ευαισθησία αποτελούν τους σημαντικότερους ανεξάρτητους προγνωστικούς δείκτες προς αξιολόγηση της οργανικής βλάβης της καρδιάς. Οι μετρήσεις του Nt-proBNP ή του BNP και των καρδιακών τροπονινών T (cTnT) ή I (cTnI) παίζουν σημαντικό ρόλο, καθώς παρέχουν κλινική εικόνα της καρδιακής ανεπάρκειας των ασθενών και ταυτοποιούν αυτούς που βρίσκονται σε υψηλό κίνδυνο (Kastritis and Dimopoulos., 2016). Ο αυξητικός παράγοντας διαφοροποίησης 15 (growth differentiation factor 15, GDF-15) εμπλέκεται σε διάφορες παθολογικές καταστάσεις, όπως στη φλεγμονή, τον καρκίνο, καρδιαγγειακές και νεφρικές παθήσεις. Πρόσφατη έρευνα επιβεβαίωσε την προγνωστική αξία του GDF-15, ο οποίος εμφανίζεται ως ένας νέος βιοδείκτης για τη νεφρική δυσλειτουργία σε ασθενείς με AL αμυλοείδωση (Kastritis, Papassotiriou, et

al., 2018). Το 60-75% των AL ασθενών παρουσιάζουν νεφρική συμμετοχή, η οποία γίνεται αντιληπτή μέσω της εμφάνισης νεφρωσικού συνδρόμου που καταλήγει συνήθως σε νεφρική ανεπάρκεια τελικού σταδίου, η οποία απαιτεί αιμοκάθαρση. Η πορεία αυτή καθορίζεται από το επίπεδο της νεφρικής ανεπάρκειας και της πρωτεϊνουρίας που αξιολογούνται από τον εκτιμώμενο ρυθμό της σπειραματικής διήθησης (Glomerular Filtration Rate, eGFR) (Palladini, Hegenbart, et al., 2014). Απεικονιστικές τεχνικές όπως το υπερηχογράφημα και η αξονική ή μαγνητική τομογραφία είναι πλέον κατάλληλες για την αξιολόγηση ενδεχόμενης αύξησης του μεγέθους του ήπατος, του σπλήνα και των λεμφαδένων. Η ηπατική συμμετοχή επιβεβαιώνεται από τα αυξημένα επίπεδα αλκαλικής φωσφατάσης ύστερα από μέτρησή της στον ορό. Το SAP σπινθηρογράφημα όπως έχει αναφερθεί και σε προηγούμενη ενότητα, είναι μια τεχνική που οπτικοποιεί και ποσοτικοποιεί το αμυλοειδικό φορτίο σε νεφρούς, ήπαρ, σπλήνα, επινεφρίδια και οστά, ενώ παράλληλα, αν και μη ευρέως διαθέσιμο, αποτελεί και χρήσιμο εργαλείο για την εκτίμηση της θεραπευτικής ανταπόκρισης (Hawkins et al., 1990). Η νευρική συμμετοχή που παρουσιάζεται ως αυτόνομη νευροπάθεια, εκτιμάται μέσα από δοκιμασίες νευρικής αγωγιμότητας και δοκιμές αυτόνομης λειτουργίας, ακόμη και σε ασθενείς που δεν έχουν παρουσιάσει συμπτώματα (Wang et al., 2008). Συνοπτικά, τα κριτήρια συμμετοχής οργάνων στην AL αμυλοείδωση κατά Gertz (2005) αναφέρονται στον **Πίνακα 2**.

Πίνακας 2:Κριτήρια συμμετοχής οργάνων στην AL αμυλοείδωση (απαραίτητη θετική βιοψία για αμυλοειδές)(Αναπροσαρμογή πίνακα από Gertz et al., 2005).

ΝΕΦΡΟΙ	Λευκωματουρία>0,5g/24h κυρίως άλβουμίνη
ΚΑΡΔΙΑ	Μέσο πάχος τοιχωμάτων στο U/S >12mm χωρίς άλλη αιτία υπερτροφίας
ΗΠΑΡ	Συνολική διάμετρος >15cm χωρίς καρδιακή ανεπάρκεια ή αλκαλική φωσφατάση> 1,5φορές του ανώτερου φυσιολογικού ορίου
ΠΕΡΙΦΕΡΙΚΟ ΝΕΥΡΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ	Συμμετρική αισθητήρια και κινητική περιφερική νευροπάθεια κυρίως των κάτω άκρων
ΑΥΤΟΝΟΜΟ ΝΕΥΡΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ	Διαταραχές γαστρικής κένωσης, ψευδοαπόφραξη, ακύρωση δυσλειτουργίας (voiding dysfunction) που δεν σχετίζεται με την άμεση οργανική διήθηση
ΓΑΣΤΡΕΝΤΕΡΙΚΟΣ ΣΩΛΗΝΑΣ	Βιοψία θετική για αμυλοειδές με παρουσία συμπτωμάτων
ΠΝΕΥΜΟΝΑΣ	Άμεση επαλήθευση βιοψίας με συμπτώματα Παρενθετικό ραδιογραφικό μοτίβο
ΜΑΛΑΚΑ ΜΟΡΙΑ	Μακρογλωσσία, αρθροπάθεια, ψευδοϋπερτροφία μυών με (+) βιοψία για αμυλοειδές, αγγειακό αμυλοειδές δέρμα, διόγκωση λεμφαδένων, σύνδρομο καρπιαίου σωλήνα

1.10.2 Αιματολογική ανταπόκριση στη θεραπεία

Η εκτίμηση της ανταπόκρισης στη θεραπεία βασίζεται σε συγκεκριμένα κριτήρια που αφορούν την αξιολόγηση της κλωνικότητας της νόσου όσο και της λειτουργίας των οργάνων που έχουν προσβληθεί (**Πίνακας 3**). Η αξιολόγηση της αιματολογικής ανταπόκρισης βασίζεται στη μέτρηση των FLCs στον ορό. Συγκεκριμένα, η μερική αιματολογική ύφεση (partial response, PR) απαιτεί 50% μείωση της διαφοράς εμπλεκόμενων και μη εμπλεκόμενων ελαφριών αλυσίδων (difference between involved and non involved free light chains, dFLCs), η πολύ

καλή μερική ύφεση (very good partial response, VGPR) απαιτεί dFLC <40 mg/l και η πλήρης αιματολογική ύφεση (complete response, CR) ορίζεται όταν υπάρχει κανονική αναλογία FLC (Palladini, Dispenzieri, et al., 2012). Σημαντική μειοψηφία ασθενών με AL αμυλοείδωση εμφανίζει επίπεδα FLC ορού κάτω από το όριο που θεωρείται ως «μετρήσιμο». Στόχος για αυτήν την μειονότητα των ασθενών είναι η μείωση των κυκλοφορούντων FLCs (Kastritis and Dimopoulos., 2016).

Τα κριτήρια ανταπόκρισης οργάνων (Gertz et al, 2005) που τροποποιήθηκαν με την εισαγωγή καρδιακών βιοδεικτών για την αξιολόγηση της καρδιακής απόκρισης ή της προόδου της νόσου (Palladini, Dispenzieri, et al, 2012) είναι τα εξής: Τουλάχιστον 30% μείωση του NT-proBNP έχοντας ως τιμή αναφοράς τα ≥ 650 ng/L, με το όριο τουλάχιστον 300 ng/L να ορίζει μια καρδιακή ανταπόκριση (Palladini, Dispenzieri, et al., 2012), η οποία μάλιστα σχετίζεται άμεσα με βελτίωση της επιβίωσης. Ωστόσο, παρατηρείται αύξηση του NTproBNP ως απόκριση θεραπειών, όπως αυτής με θαλιδομίδη, λεναλιδομίδη ή πομαλιδομίδη, αλλά και του βαθμού ανεπάρκειας των νεφρών (Dispenzieri et al., 2010). Επιπλέον, τα κριτήρια της νεφρικής ανταπόκρισης περιλαμβάνουν τη μείωση της πρωτεϊνουρίας κατά $\geq 50\%$ χωρίς αύξηση της κρεατινίνης ορού (Gertz et al., 2005). Σε έρευνά τους οι Pavia και Heidelberg υποστήριξαν ότι μείωση του eGFR $>25\%$ αποτελεί δυσμενή προγνωστικό δείκτη της νεφρικής λειτουργίας, ενώ η μείωση της πρωτεϊνουρίας κατά $\geq 30\%$ ή κάτω από 0,5 g/24ωρο χωρίς επιδείνωση της νεφρικής λειτουργίας, αποτελούσε το κριτήριο για νεφρική ανταπόκριση, η οποία σχετίζεται με καλύτερη πρόγνωση (Palladini, Hegenbart, et al., 2014). Μάλιστα, έχει αποδειχθεί ότι η μείωση της πρωτεϊνουρίας συνδέεται άμεσα με την αιματολογική ανταπόκριση, γεγονός που δίνει την μέγιστη πιθανότητα για νεφρική ανταπόκριση σε ασθενείς που επιτυγχάνουν τουλάχιστον VGPR (Pinney et al., 2011; Palladini, Hegenbart, et al., 2014).

Πίνακας 3 : Κριτήρια κλωνικής και αιματολογικής ανταπόκρισης και εξέλιξης της νόσου. (Αναπροσαρμογή πίνακα από Gertz et al., 2005; Palladini, Dispenzieri, et al., 2012; Palladini, Hegenbart, et al, 2014).

	ΑΝΤΑΠΟΚΡΙΣΗ	ΕΞΕΛΙΞΗ ΝΟΣΟΥ
ΚΛΩΝΙΚΗ ΝΟΣΟΣ (ΑΙΜΑΤΟΛΟΓΙΚΗ ΑΝΤΑΠΟΚΡΙΣΗ)	<u>Πλήρης ύφεση:</u> κανονικοποίηση (normalization) των FLC τιμών και της αναλογίας κ:λ με αρνητική ανοσοκαθήλωση ορού και ούρων <u>Πολύ καλή μερική ύφεση:</u> dFLC <40 mg / l <u>Μερική ύφεση:</u> πάνω από 50% μείωση στο dFLC	<u>Από πλήρη ύφεση:</u> οποιαδήποτε ανιχνεύσιμη μονοκλωνική πρωτεΐνη ή μη φυσιολογικός λόγος των FLC (τα αμυλοειδογενή FLC επίπεδα πρέπει να είναι διπλάσια) <u>Από μερική ύφεση:</u> 50% αύξηση στην M πρωτεΐνη του ορού και πάνω από 0,5 gr/dL ή 50% αύξηση στο λεύκωμα ούρων 24ωρου και πάνω από 200 mg/24ωρο ή 50% αύξηση των FLC σε πάνω από 100 mg/L
ΚΑΡΔΙΑ	Μείωση στο NTproBNP πάνω από 30% και πάνω από 300 ng/L (με αρχική τιμή μεγαλύτερη ή ίση με 650 ng/l) ή ανταπόκριση στο New York Heart Association (NYHA) κατά 2 (με αρχικό στάδιο 3 ή 4)	Αύξηση πάνω από 30% και πάνω από 300 ng/L στο NTproBNP ή πάνω από 33% αύξηση της τροπονίνης T (καρδιακή) ή μείωση του κλάσματος εξώθησης κατά 10%
ΝΕΦΡΟΙ	50% μείωση και τουλάχιστον κατά 0,5 g/dL στο λεύκωμα ούρων 24ώρου με αρχική τιμή τουλάχιστον 0,5 g/dL. Η επιδείνωση της κρεατινίνης ορού και της κάθαρσης κρεατινίνης δεν πρέπει να ξεπερνά το 25% της αρχικής τιμής <u>Προτεινόμενη τροποποίηση:</u> μείωση στην πρωτεϊνουρία τουλάχιστον 30% ή κάτω από 0,5 g/dL χωρίς νεφρική εξέλιξη	50% αύξηση και τουλάχιστον 1 g/dL στο λεύκωμα ούρων 24ώρου ή επιδείνωση κατά 25% της κρεατινίνης ορού ή της κάθαρσης κρεατινίνης από την αρχική τιμή
ΗΠΑΡ	>50% μείωση της τιμής της αλκαλικής φωσφατάσης (εφόσον ήταν παθολογική) και/ή μείωση 2 cm στο μέγεθος του ήπατος (εκτίμηση μέσω ακτινογραφίας)	50% αύξηση της τιμής της αλκαλικής φωσφατάσης από την ελάχιστη τιμή της
ΠΕΡΙΦΕΡΙΚΟ ΝΕΥΡΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ	Βελτίωση στο ηλεκτρομυογράφημα στην ταχύτητα αγωγής των νεύρων (σπάνια ανταπόκριση)	Επιδείνωση νευροπάθειας στο ηλεκτρομυογράφημα ή επιδείνωση στην ταχύτητα αγωγής των νεύρων

dFLC, διαφορά εμπλεκόμενων και μη εμπλεκόμενων ελαφριών αλυσίδων· NT-proBNP, αμινοτελικό άκρο του προπεπτιδίου του εγκεφαλικού νατριουρητικού πεπτιδίου

1.10.3 Εκτίμηση κινδύνου

Για το σχεδιασμό μιας αποτελεσματικής θεραπευτικής αντιμετώπισης απαιτείται τόσο η αξιολόγηση των σχετιζόμενων με τη συμμετοχή των οργάνων κινδύνων, όσο και αυτών που προκύπτουν από τον κυτταρικό κλώνο και την τοξικότητα της ίδιας της θεραπείας (Kastritis and Dimopoulos, 2016). Οι καρδιακοί βιοδείκτες NTproBNP και οι καρδιακές τροπονίνες cTnT είναι όπως έχει αναφερθεί και παραπάνω, τα πιο ισχυρά εργαλεία ως προς την εκτίμηση του κινδύνου και σε αυτούς βασίζεται το σύστημα σταδιοποίησης κατά Mayo του 2004 (Dispenzieri, Gertz, et al., 2004), το οποίο τροποποιήθηκε το 2012 (Kumar et al., 2012) χωρίζοντας τους ασθενείς με βάση τις τιμές της τροπονίνης T < 0,025 ng/mL, του NT-proBNP <1800 pg/mL, και του dFLC ορού <180 mg/L. Σύμφωνα με το αναθεωρημένο σύστημα με όριο το 0,035 μg/L για την τροπονίνη T και το 332 ng/L για το NTproBNP, οι ασθενείς διακρίνονται σε 4 στάδια (**Πίνακας 4**):

- 1) Στάδιο 1 ή χαμηλού κινδύνου: Περιλαμβάνει το 15-20% των ασθενών με τιμές NTproBNP και cTnT κάτω από το όριο (από το μη τροποποιημένο σύστημα) και μέση επιβίωση 26-94 μήνες
- 2) Στάδιο 2 ή ενδιάμεσου κινδύνου: Περιλαμβάνει το 25-30% των ασθενών των οποίων μία από τις δύο τιμές είναι πάνω από το όριο και η μέση επιβίωση είναι 12-40 μήνες
- 3) Στάδιο 3A ή υψηλού κινδύνου: Αναφέρεται στο 25-30% των ασθενών που έχουν και τις δύο τιμές πάνω από το όριο και μέση επιβίωση 9-26 μήνες
- 4) Στάδιο 3B ή πολύ υψηλού κινδύνου: Περιλαμβάνει το 10-15% των ασθενών, οι οποίοι ανήκουν στο στάδιο 3 και ταυτόχρονα έχουν NTproBNP >8500 pg/mL (Palladini, Sachchithanatham, et al., 2015; Kumar et al., 2012).

Πίνακας 4: Εκτίμηση του κινδύνου σε ασθενείς με AL αμυλοείδωση βασιζόμενη στο σύστημα σταδιοποίησης κατά Mayo (NTproBNP και cTnT) (Αναπροσαρμογή από πίνακα Dispenzieri, Gertz, et al., 2004) και το αναθεωρημένο σύστημα (NTproBNP, cTnT και dFLC) (Αναπροσαρμογή πίνακα από Kumar et al, 2012).

	ΣΤΑΔΙΟ	ΠΟΣΟΣΤΟ AL ΑΣΘΕΝΩΝ	ΜΕΣΗ ΕΠΙΒΙΩΣΗ (ΜΗΝΕΣ)
ΚΑΛΟ-ΧΑΜΗΛΟ ΡΙΣΚΟ	Μαγο στάδιο I Τροποποιημένο Μαγο στάδιο I	15-20%	26-94
ΕΝΔΙΑΜΕΣΟ ΡΙΣΚΟ	Μαγο στάδιο II Τροποποιημένο Μαγο στάδιο II ή μερικό III	25-30%	12-40
ΥΨΗΛΟ ΡΙΣΚΟ	Μαγο στάδιο III Τροποποιημένο Μαγο στάδιο III, μερικό IV και λίγο II	25-30%	9-26
ΠΟΛΥ ΥΨΗΛΟ ΡΙΣΚΟ	Μαγο στάδιο III με NTproBNP >8500pg/ml Τροποποιημένο Μαγο στάδιο IV και μερικό III	10-15%	3-6
	Μαγο στάδιο I: NTproBNP <332 pg/mL, cTnT <0,035 ng/mL Μαγο στάδιο II: NTproBNP > ή ίσο με 332 pg/ml, cTnT > ή ίσο με 0,035 ng/mL Μαγο στάδιο III: NTproBNP > ή ίσο με 332 pg/mL, cTnT > ή ίσο με 0,035ng/mL Τροποποιημένο Μαγο στάδιο: Δίνεται 1 πόντος για καθένα από τα παρακάτω: cTnT > ή ίσο με 0,025 ng/mL, NT-proBNP > ή ίσο με 1800 pg/mL και dFLC > ή ίσο με 180 mg/L. Αυτά τα αποτελέσματα αφορούν τα 4 στάδια (I,II,III,IV) με βαθμολογία 0, 1, 2 και 3 αντίστοιχα		

NT-proBNP, Αμινοτελικό άκρο του προπεπτιδίου του εγκεφαλικού νατριουρητικού πεπτιδίου· CTnT; καρδιακή τροπονίνη T.

Τόσο το φορτίο της νόσου, όσο και οι κυτταρογενετικές ανωμαλίες των πλασματοκυττάρων επηρεάζουν την πρόγνωση, κυρίως στους ασθενείς με λιγότερο σοβαρή καρδιακή συμμετοχή. Η προσθήκη 1q21, η οποία συναντάται σε περίπου στο 20% των περιπτώσεων AL, έχει θεωρηθεί ως ένας ανεξάρτητος αρνητικός προγνωστικός δείκτης σε ασθενείς που έχουν υποβληθεί σε θεραπεία με τυπική χημειοθεραπεία. Σε ασθενείς που έλαβαν θεραπεία με βάση τη βορτεζομίμπη, η μετατόπιση t(11, 14) συσχετίστηκε με δυσμενή έκβαση (Bochtler, Hegenbart, Kunz, et al., 2015; Bochtler et al., 2014). Αυτά τα ευρήματα τονίζουν ότι η προγνωστική επίδραση των κυτταρογενετικών δεικτών σε μεγάλο βαθμό εξαρτάται από τη

χορηγούμενη θεραπεία και ως εκ τούτου, θα πρέπει να λαμβάνονται υπόψη μόνο στο πλαίσιο μιας ειδικής θεραπείας (Dispenzieri et al., 2016).

Οι καμπύλες επιβίωσης των ασθενών με AL αμυλοείδωση χαρακτηρίζονται από ένα αρχικό απότομο τμήμα που αντιπροσωπεύει τα υψηλά ποσοστά της πρώιμης θνησιμότητας λόγω καρδιακής αμυλοείδωσης, και ένα δεύτερο τμήμα στο οποίο η σημασία του πλασματοκυτταρικού κλώνου γίνεται όλο και μεγαλύτερη, καθώς μπορεί να σχετίζεται με μια λιγότερο ευνοϊκή ανταπόκριση και αιματολογικές υποτροπές που συνδυαστικά οδηγούν σε περαιτέρω επιδείνωση της λειτουργίας των οργάνων. Μία ομάδα ασθενών ευνοϊκής πρόγνωσης χαρακτηρίζεται από απουσία καρδιακής συμμετοχής, χαμηλά επίπεδα FLC και μικρό πλασματοκυτταρικό κλώνο, ενώ μια ομάδα ασθενών «πολύ υψηλού κινδύνου» χαρακτηρίζεται από πολύ αυξημένα επίπεδα καρδιακών βιοδεικτών (στάδιο 3 και με NTproBNP >8500 pg/mL). Αν με τα παραπάνω συνυπάρχει και χαμηλή συστολική αρτηριακή πίεση τότε η πρόγνωση είναι εξαιρετικά δυσμενής (Wechalekar, Schonland, et al., 2013). Παρόλα αυτά, η πλειονότητα των ασθενών με AL αμυλοείδωση ανήκουν σε μία από αυτές τις δύο ομάδες (Kastritis and Dimopoulos, 2016). Η ομάδα πολύ υψηλού κινδύνου που αναφέρεται παραπάνω έχει οριστεί με βάση το Ευρωπαϊκό μοντέλο του 2015, το οποίο κατασκευάστηκε με βάση το σύστημα Mayo 2004 και υποκατηγοριοποιεί τους ασθενείς σταδίου 3 σε κατηγορίες υψηλότερου και χαμηλότερου κινδύνου, ενσωματώνοντας ένα δεύτερο όριο NT-proBNP της τιμής 8500 ng/mL (Muchtar, Kumar, et al., 2019).

Έρευνα που έγινε σε νεοδιαγνωσθέντες ασθενείς με AL αμυλοείδωση υποστήριξε ότι ο τύπος της ελαφριάς αλυσίδας επηρεάζει το φάσμα της συμμετοχής των οργάνων. Η συνολική επιβίωση (overall survival, OS) βρέθηκε πως ήταν παρόμοια για κ-AL και λ-AL και μικρότερη για τους ασθενείς με υψηλότερο dFLC (Kumar, Dispenzieri, Katzmann, et al., 2010). Σύμφωνα με άλλη πρόσφατη έρευνα, η ανοσοπάρεση επίσης έχει αρνητικό αντίκτυπο στην ανταπόκριση στη θεραπεία και στην OS στην πρόσφατα διαγνωσμένη AL αμυλοείδωση. Στο υποσύνολο ασθενών με καρδιακή συμμετοχή, η σοβαρή ανοσοπάρεση αποτελεί ιδιαίτερα δυσμενή προγνωστικό δείκτη (E. Muchtar, Dispenzieri, et al., 2017).

Σε μια μελέτη 39 ασθενών που έλαβαν θεραπεία για AL αμυλοείδωση με θετική βιοψία για νεφρική συμμετοχή, η βαθμολογία CSIS (composite scarring injury score) και η βαθμολογία αμυλοειδούς (amyloid score, AS) υπέδειξαν ότι στους ασθενείς με

AS $\geq 7,5$ υπήρξε υψηλότερος κίνδυνος ανάπτυξης νεφρικής νόσου τελικού σταδίου από εκείνους με AS $<7,5$ (Rubinstein et al., 2017).

Άξια αναφοράς είναι επιπλέον μια μελέτη που πραγματοποιήθηκε από την κλινική Mayo, η οποία αξιολόγησε την οργανική ανταπόκριση σε ασθενείς με πρόσφατη διάγνωση AL αμυλοείδωσης, για να βαθμονομήσει το εύρος της απόκρισης. Ο μέσος χρόνος στην καρδιακή, νεφρική και ηπατική απόκριση ήταν 9, 4, 6 και 6,1 μήνες, αντίστοιχα. Σε όλα τα όργανα, το εύρος της απόκρισης συσχετίστηκε με την OS. Οι συγγραφείς όρισαν 4 ομάδες κριτηρίων απόκρισης οργάνων: **1)** πλήρης απόκριση οργάνων που περιλαμβάνει τα εξής: NT-proBNP ≤ 400 pg/mL, πρωτεϊνουρία ≤ 200 mg ανά 24 ώρες, αλκαλική φωσφατάση ≤ 2 επί το κατώτερο όριο φυσιολογικού, **2)** πολύ καλή μερική απόκριση οργάνων: $>60\%$ μείωση στην παράμετρο που δεν πληρεί τον ορισμό της πλήρους απόκρισης οργάνων, **3)** μερική απόκριση οργάνων: 31-60% μείωση στην παράμετρο και **4)** μη ανταποκρινόμενοι : κάτω από 30% μείωση στην παράμετρο απόκρισης οργάνων (Eli Muchtar, Dispenzieri, Leung, et al., 2018).

Τέλος, το γεγονός ότι πολλά κέντρα δεν έχουν δυνατότητα προσδιορισμού του NT-proBNP έδωσε το έναυσμα στην ερευνητική ομάδα του Lilleness το 2019 να προτείνει και να δημιουργήσει ένα σύστημα σταδιοποίησης χρησιμοποιώντας το βιοδείκτη BNP (brain natriuretic peptide) και συγκεκριμένα το συνδυασμό BNP > 81 pg/mL και TnI $>0,1$ ng/mL, το οποίο σύστημα συσχετίζεται με το επικυρωμένο σύστημα σταδιοποίησης Mayo 2004, έχει προγνωστική αξία για την επιβίωση στην AL αμυλοείδωση και αναγνωρίζει την καρδιακή συμμετοχή με ακρίβεια. Επίσης, προτείνεται ότι πιθανώς μπορεί να φανεί χρήσιμο στην επιλογή ασθενών σε κλινικές μελέτες για την AL αμυλοείδωση αν η μέτρηση του NT-proBNP δεν είναι διαθέσιμη (Lilleness et al., 2019).

1.11 ΘΕΡΑΠΕΙΑ ΚΑΙ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗ ΤΗΣ ΝΟΣΟΥ

Οι στρατηγικές θεραπείας για την AL αμυλοείδωση βασίζονται κυρίως στην προσαρμογή των θεραπειών που χρησιμοποιούνται για ασθενείς με ΠΜ. Πρωταρχικοί στόχοι της θεραπείας της AL αμυλοείδωσης είναι η μείωση των αμυλοειδογόνων ελεύθερων ελαφριών αλυσίδων, η μείωση των παθολογικών

πλασματοκυττάρων που τις εκκρίνουν και η κατά το δυνατό βαθύτερη αιματολογική ανταπόκριση, προκειμένου να βελτιωθεί η λειτουργία των οργάνων και ιδιαίτερα της καρδιάς καθώς και να αποφευχθεί περαιτέρω βλάβη. Η πλειοψηφία των ασθενών καταλήγει σε διάστημα 3-6 μηνών από την έναρξη της θεραπείας, λόγω καρδιακής ανεπάρκειας ή επιπλοκών της θεραπείας (Kastritis and Dimopoulos, 2017; Dispenzieri and Merlini, 2016). Η επίτευξη των παραπάνω στόχων θεωρείται πολύ σημαντική, καθώς έχει μεταφραστεί σε σημαντικές βελτιώσεις της μέσης επιβίωσης, που έχει σχεδόν διπλασιαστεί την τελευταία δεκαετία, με σημαντικό ποσοστό ασθενών (30% έως 40%) να επιβιώνουν περισσότερο από 10 χρόνια (Eli Muchtar, Morie A. Gertz, Kumar, Lacy, et al., 2017). Η AL αμυλοείδωση αποτελεί μεγάλη πρόκληση για την παγκόσμια ιατρική κοινότητα λόγω της σπανιότητάς της, της ετερογένειας των συμπτωμάτων της, της καθυστερημένης διάγνωσής της και των περιορισμένων θεραπευτικών επιλογών. Συμπερασματικά, κοινός σκοπός είναι η επίτευξη της ισορροπίας μεταξύ μιας αποτελεσματικής και όσο το δυνατόν λιγότερο τοξικής θεραπείας, της οποίας η πορεία θα ελέγχεται μέσω της παρακολούθησης των καρδιακών βιοδεικτών και των επιπέδων των FLCs, αλλά και η επίτευξη της ταχείας επαγωγής μιας βαθιάς αιματολογικής και οργανικής ανταπόκρισης. Για τον λόγο αυτό, η επιλογή κατάλληλου θεραπευτικού σχήματος και υποστηρικτικής αγωγής αποτελούν βασικό μέλημα ως προς τη διατήρηση της λειτουργίας των οργάνων που πλήττονται με σκοπό την βελτίωση της ποιότητας ζωής και την παράταση της επιβίωσης των ασθενών (Milani, Palladini, et al., 2018).

1.12 ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΤΗΣ ΕΛΑΧΙΣΤΗΣ ΥΠΟΛΕΙΜΜΑΤΙΚΗΣ ΝΟΣΟΥ (ΕΥΝ)

Η επίτευξη μιας «αυστηρής πλήρους ανταπόκρισης» (complete response or remission, CR) που ορίζεται ως η μη ανίχνευση κλωνικών πλασματοκυττάρων στο μυελό των οστών με κυτταρομετρία ροής, μετά από αυτόλογη μεταμόσχευση αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων σχετίζεται με σημαντική βελτίωση της επιβίωσης ελευθέρως νόσου σε σύγκριση με το πρότυπο CR στους AL ασθενείς (Sidiqi et al., 2018). Με τον πρότυπο όρο «πλήρης ύφεση» χαρακτηρίζεται ένας ασθενής όταν έχει ανταποκριθεί στην θεραπεία και δεν παρουσιάζει συμπτώματα της νόσου με βάση τα προβλεπόμενα κριτήρια. Παρά τη βελτίωση της συνολικής

επιβίωσης που έχει συσχετιστεί με καλή αιματολογική ανταπόκριση, ένα σημαντικό ποσοστό των ασθενών που επιτυγχάνουν αυτό το στόχο μέσω συνδυαστικής χορήγησης νέων θεραπευτικών σκευασμάτων, δεν έχουν αντίστοιχη βελτίωση ως προς την οργανική ανταπόκριση και μερικοί από αυτούς υποτροπιάζουν. Ως εκ τούτου, είναι μεγάλη ανάγκη για ανάπτυξη μεθόδων υψηλής ευαισθησίας ως προς τον προσδιορισμό της βαθιάς κλωνικής ανταπόκρισης στη θεραπεία της AL αμυλοείδωσης (Hwa et al., 2017; Milani, Merlini, et al., 2018). Σε αυτό το πλαίσιο, η ανίχνευση της ελάχιστης υπολειμματικής νόσου (EYN) παίζει καθοριστικό ρόλο. Ως EYN ορίζεται η παρουσία μικρού αριθμού καρκινικών κυττάρων που έχουν απομείνει στον οργανισμό ενός ασθενούς μετά από την ολοκλήρωση της θεραπείας και ενώ ο ασθενής βρίσκεται σε CR με βάση τα συμβατικά κριτήρια. Η σημαντικότητα της EYN ως προγνωστικός δείκτης βασίζεται στα ευρήματα μελετών φάσης 3 τα οποία αποκαλύπτουν ότι η επίτευξη της EYN αρνητικότητας σχετίζεται με βελτιωμένη επιβίωση ελεύθερας νόσου ή / και συνολική επιβίωση σε ασθενείς με ΠΜ. Για το λόγο αυτό πολλές έρευνες πραγματοποιούνται πλέον σχετικά με το αν η EYN μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως υποκατάστατο τελικό σημείο και ως μέσο καθοδήγησης των θεραπευτικών αποφάσεων (Kothari et al., 2019).

Η ανίχνευση της EYN πραγματοποιείται μέσω της χρήσης μεθόδων όπως η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης με χρήση ειδικών ολιγονουκλεοτιδίων για συγκεκριμένα αλληλόμορφα (allele-specific oligonucleotide – polymerase chain reaction, ASO-PCR), η αλληλούχηση νέας γενιάς (next generation sequencing, NGS), και η κυτταρομετρία ροής επόμενης γενιάς (next generation flow cytometry, NGF). Η NGF θεωρείται πιο χρήσιμη κλινικά έναντι της ASO-PCR και της NGS καθώς χαρακτηρίζεται από υψηλή ευαισθησία, μπορεί να εφαρμοστεί στα περισσότερα είδη δειγμάτων, είναι λιγότερο χρονοβόρα σε σύγκριση με άλλες τεχνικές και δίνει την δυνατότητα για ποσοτικοποίηση (Paiva, Van Dongen, et al., 2015).

1.13 ΒΑΣΙΚΕΣ ΑΡΧΕΣ ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΙΑΣ ΡΟΗΣ

Η κυτταρομετρία ροής είναι μια αυτοματοποιημένη τεχνολογία βιοφυσικής φύσεως που βασίζεται στη χρήση δεσμών laser για να μετρήσει και έπειτα να αναλύσει ταυτόχρονα πολλά φυσικοχημικά χαρακτηριστικά σωματιδίων, συνήθως κυττάρων, που βρίσκονται σε εναιώρημα. Η ανάλυση αυτών γίνεται καθώς

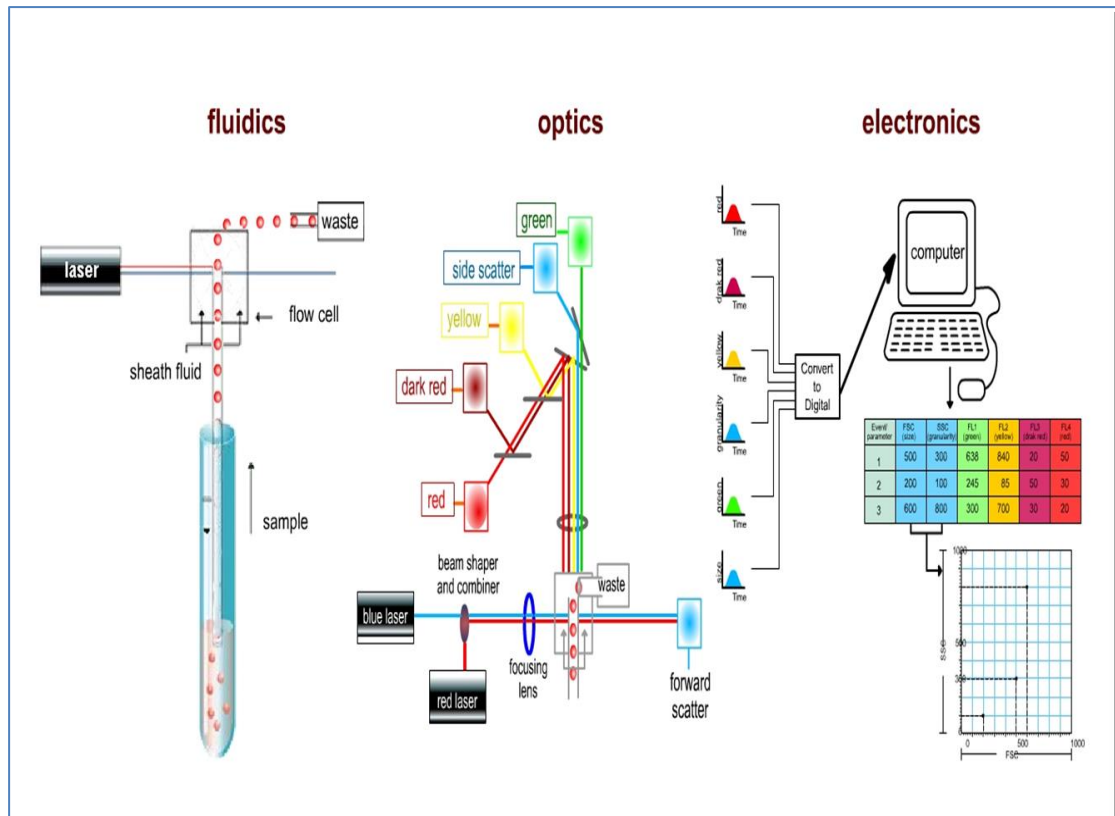
διέρχονται κατά μήκος νηματικής ροής μπροστά από μία δέσμη laser. Η κυτταρομετρία ροής εφαρμόζεται για την καταμέτρηση αλλά και τον διαχωρισμό των κυττάρων, για την ανίχνευση βιοδεικτών, την ανάλυση της απόπτωσης αλλά και για την αξιολόγηση του σχετικού μεγέθους των σωματιδίων, της εσωτερικής τους πολυπλοκότητας και της έντασης του φθορισμού που εκπέμπουν. Ο προσδιορισμός των παραπάνω χαρακτηριστικών γίνεται βάσει ενός συστήματος που μετατρέπει τα οπτικά δεδομένα σε ηλεκτρικά. Ουσιαστικά γίνεται η καταγραφή της σκέδασης που προκύπτει από την προσπίπτουσα δέσμη laser σε κάθε μεμονωμένο σωματίδιο και της έντασης που αυτό φθορίζει. Οι παραπάνω παράμετροι αποθηκεύονται ηλεκτρονικά και μέσω της χρήσης κατάλληλου λογισμικού πραγματοποιείται η ανάλυση των χαρακτηριστικών κάθε σωματιδίου/κυττάρου που εμπεριέχεται σε ένα δείγμα (Adan et al., 2017).

Τα κύρια συστήματα ενός κυτταρομέτρου ροής είναι (**Εικόνα 5**) :

1) **το υδραυλικό σύστημα (fluidics)**, που είναι υπεύθυνο για τη μεταφορά των κυττάρων μέσω νηματικής ροής στο σημείο που η δέσμη laser θα τα στοχεύσει ένα προς ένα,

2) **το οπτικό σύστημα (optics)**, που απαρτίζεται από την πηγή laser, η οποία παράγει δέσμες φωτός που αφού ευθυγραμμιστούν κατάλληλα, προσπίπτουν στα κύτταρα του δείγματος και από οπτικά φίλτρα και κάτοπτρα που κατευθύνουν τα παραγόμενα σήματα φωτός στους δέκτες/ανιχνευτές και

3) **το ηλεκτρονικό σύστημα (electronic)**, που ευθύνεται για τη μετατροπή των φωτεινών σημάτων που ανιχνεύονται σε ψηφιακά δεδομένα προς επεξεργασία τους σε κατάλληλο λογισμικό. Επιπλέον, στην περίπτωση πιο εξελιγμένων κυτταρομέτρων, υπάρχει η δυνατότητα διαχωρισμού των κυττάρων (sorting) με βάση τα κριτήρια διαλογής που ορίζει ο χειριστής του συστήματος.



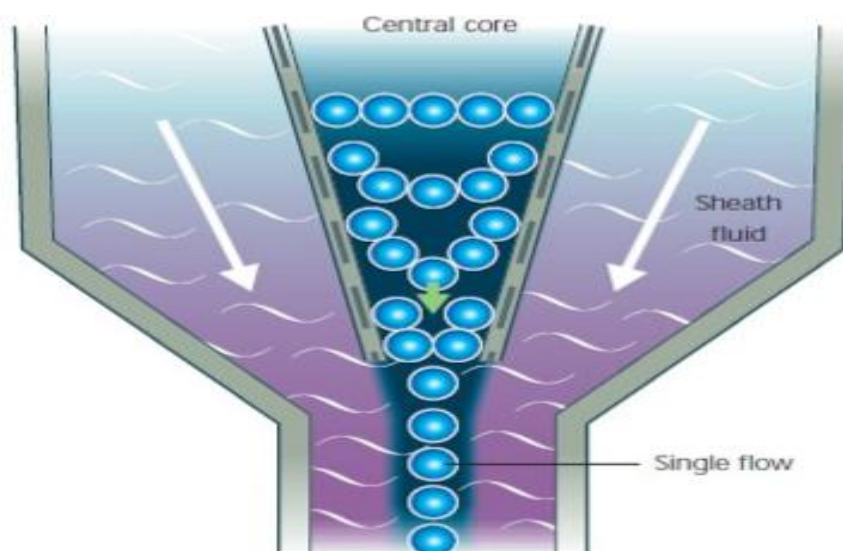
Εικόνα 5: Σχηματική αναπαράσταση των τριών συστημάτων ενός κυτταρομέτρου ροής (*Bits and Bytes of Biology:Flow cytometry*)

1.13.1 Υδραυλικό σύστημα

Κατά την εισαγωγή του δείγματος στο κυτταρόμετρο, τα εναιωρούμενα σωματίδια βρίσκονται σε τυχαίες θέσεις στο χώρο. Προκειμένου τα σωματίδια να στοχευθούν από τη δέσμη laser με το βέλτιστο τρόπο, η νηματική ροή πρέπει να εστιαστεί και να ευθυγραμμιστεί στο κέντρο της δέσμης, έτσι ώστε κάθε στιγμή να διέρχεται ένα σωματίδιο.

Το υδραυλικό σύστημα απαρτίζεται από ένα κεντρικό κανάλι/πυρήνα (central core), το οποίο περιβάλλεται από ένα εξωτερικό υγρό περιβλήματος ταχύτερης ροής (sheath fluid) (**Εικόνα 6**). Μέσω αυτού του καναλιού γίνεται η έγχυση του δείγματος. Καθώς το υγρό περιβλήματος ρέει γύρω από τον πυρήνα, δημιουργούνται ελκτικές δυνάμεις στο υγρό του κεντρικού πυρήνα κωνικής δομής με αποτέλεσμα την αλλαγή της ταχύτητας ροής του. Το μέτωπο αυτής γίνεται παραβολικό με μεγαλύτερη ταχύτητα στο κέντρο του πυρήνα, ενώ στην περιφέρεια η ταχύτητα σχεδόν ισούται με

το μηδέν. Το φαινόμενο που περιγράφεται παραπάνω ονομάζεται υδροδυναμική εστίαση και έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία μιας ροής μεμονωμένων σωματιδίων. Τα δύο υγρά όπως προαναφέρθηκε αναπτύσσουν διαφορετικές ταχύτητες, γεγονός που σηματοδοτεί την αποφυγή ανάμειξής τους υπό ιδανικές συνθήκες νηματικής ροής (Adan et al., 2017).



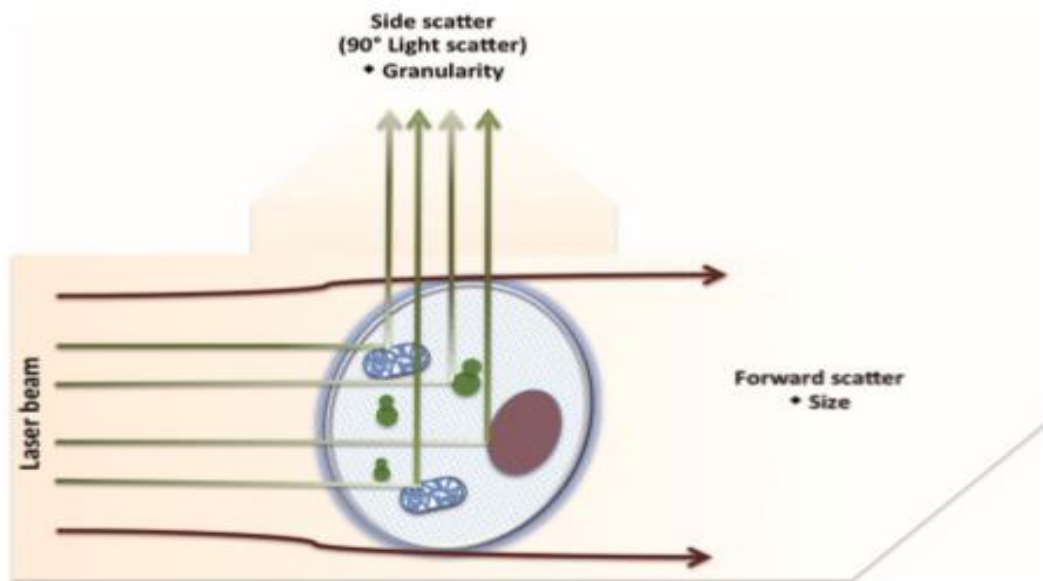
Εικόνα 6: Σχηματική αναπαράσταση του φαινομένου της υδροδυναμικής πίεσης (Αναπροσαρμογή από Rahman, 2006)

Η είσοδος περισσότερων σωματιδίων στη ροή, επιτυγχάνεται μέσω της αύξησης της πίεσης του ρυθμού ροής (high flow rate), άρα και της διαμέτρου του υγρού του κεντρικού καναλιού. Έτσι, η διέλευση κάποιων κυττάρων μπορεί να γίνει εκτός του κέντρου της δέσμης laser, γεγονός που χρησιμεύει στον ανοσοφαινοτυπικό ποιοτικό προσδιορισμό των κυττάρων. Αντιθέτως, οι αργές ταχύτητες ροής (low flow rate) είναι κατάλληλες για εφαρμογές που απαιτούν υψηλότερη ανάλυση, όπως η ανάλυση του DNA. Ο χαμηλότερος ρυθμός ροής αυξάνει την ομοιομορφία και την ακρίβεια του φθορισμού. Συνεπώς, ο χειριστής πρέπει πάντα να διασφαλίζει ότι το υδραυλικό σύστημα δεν περιέχει φυσαλίδες αέρα και υπολείμματα και ότι είναι πάντοτε υπό πίεση (Rahman, 2006; Adan et al., 2017).

1.13.2 Οπτικό και ηλεκτρονικό σύστημα

Όταν το σωματίδιο περάσει μπροστά από μία ή και περισσότερες ακτίνες φωτός, τότε το φως θα σκεδαστεί και θα εκπέμψει φθορισμό αν και εφόσον το σωματίδιο είναι σημασμένο με φθορισμοφόρο. Η ανίχνευση αυτών παρέχει πληροφορίες για τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά των σωματιδίων/κυττάρων του δείγματος που αναλύονται. Οι πιο συνηθισμένες πηγές φωτός είναι τα laser, καθώς παράγουν φως συγκεκριμένου μήκους κύματος.

Το φως που σκεδάζεται σε εμπρόσθια κατεύθυνση με απόκλιση έως 20° από τον άξονα διέλευσης της δέσμης laser, συλλέγεται από ένα φακό που λειτουργεί ως ανιχνευτής και ονομάζεται κανάλι πρόσθιας σκέδασης (forward scatter channel, FSC). Η αξιολόγηση του FSC σχετίζεται με το σχετικό μέγεθος του σωματιδίου και χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό ζωντανών κυττάρων από συσσωματώματα και υπολείμματα. Το φως που σκεδάζεται υπό γωνία περίπου 90° ως προς τον άξονα διέλευσης της ακτίνας laser, συλλέγεται από έναν φακό που λειτουργεί ως φωτοπολλαπλασιαστής και ονομάζεται κανάλι πλάγιας σκέδασης (side scatter channel, SSC) (Εικόνα 7). Το SSC είναι ενδεικτικό της εσωτερικής πολυπλοκότητας και της κοκκίωσης των κυττάρων/σωματιδίων. Επειδή ο συνδυασμός των παραμέτρων FSC και SSC είναι διαφορετικός για κάθε σωματίδιο/κύτταρο, επιτυγχάνεται ο διαχωρισμός των διάφορων κυτταρικών υποπληθυσμών σε ένα ετερογενές δείγμα (Rahman, 2006; Adan et al., 2017).



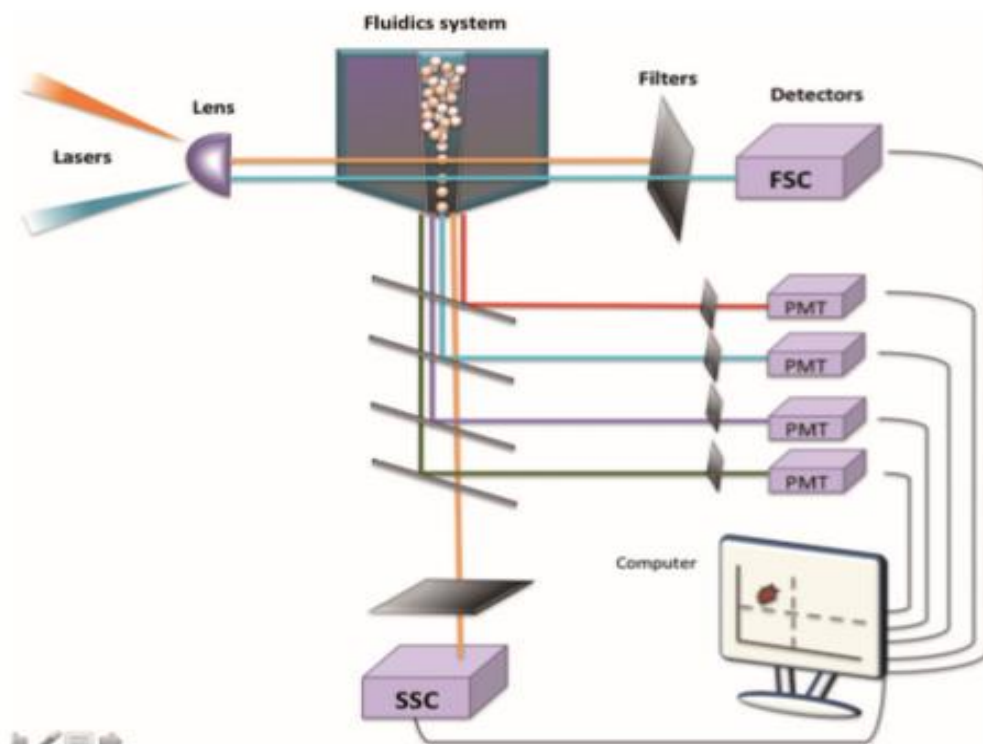
Εικόνα 7. Πρόσθια και πλάγια σκέδαση (Αναπροσαρμογή από Adan et al., 2017).

Επιπρόσθετα, υπάρχει και η παράμετρος της έντασης του φθορισμού που εκπέμπεται από κάθε σωματίδιο σημασμένο με κάποιο φθορισμοφόρο και εκτιμάται από ειδικούς ανιχνευτές. Έτσι, αποκτώνται πληροφορίες όσον αφορά την παραγωγή κυτταροκινών και την έκφραση ενδοκυττάρων και επιφανειακών μορίων-δεικτών. Κάθε κυτταρόμετρο ροής έχει διακριτά κανάλια φθορισμού έτσι ώστε να ανιχνεύει το φως που εκπέμπεται από τα διαφορετικά φθορισμοφόρα. Υπάρχουν δύο είδη ανιχνευτών και αυτά είναι οι φωτοδιόδοι σιλικόνης (photodiodes, PDs) που μετρούν το FSC και οι φωτοπολλαπλασιαστές (photomultiplier tubes, PMTs) που μετρούν SSC και φθορισμό. Επίσης, σημαντική είναι η χρήση των οπτικών φίλτρων με μορφή κατόπτρου. Αυτή εξυπηρετεί την κατανομή των επιθυμητών μηκών κύματος στον αντίστοιχο φωτοπολλαπλασιαστή, γεγονός που επιτρέπει τη διέλευση συγκεκριμένων μηκών κύματος. Υπάρχουν 3 τύποι οπτικών φίλτρων:

- 1) **Long pass φίλτρα**, τα οποία κάνουν επιτρεπτή τη διέλευση φωτός πάνω από ένα όριο μήκους κύματος,
- 2) **Short pass φίλτρα**, τα οποία επιτρέπουν τη διέλευση φωτός κάτω από ένα όριο μήκους κύματος, και
- 3) **Band pass φίλτρα**, τα οποία επιτρέπουν τη διέλευση φωτός που χαρακτηρίζεται από ένα συγκεκριμένο εύρος μήκους κύματος.

Εν συνεχεία, όταν το φως προσπέσει στον ανιχνευτή, τότε παράγεται ηλεκτρικό ρεύμα χαμηλής έντασης. Το δυναμικό του ρεύματος ενισχύεται μέσω ενισχυτών και

μετά μετατρέπεται από αναλογικό σήμα σε ψηφιακό, που με τη σειρά του μετουσιώνεται σε ηλεκτρικό σήμα επαρκούς έντασης. Με τον τρόπο αυτό, τα δεδομένα αποθηκεύονται σε κατάλληλο λογισμικό στον ηλεκτρονικό υπολογιστή για να επεξεργαστούν, να αναλυθούν, να κατανεμηθούν και να αναπαρασταθούν γραφικά (**Εικόνα 8**) (Rahman, 2006; Adan et al., 2017). Τέλος, σημαντικό σημείο αναφοράς προς καλύτερη κατανόηση είναι ότι στην κυτταρομετρία ροής, ως παράμετρος θεωρείται η μέτρηση που κάνει κάθε ανιχνευτής, ενώ «συμβάντα» (events) ονομάζονται τα δεδομένα που συλλέγονται από κάθε παράμετρο.

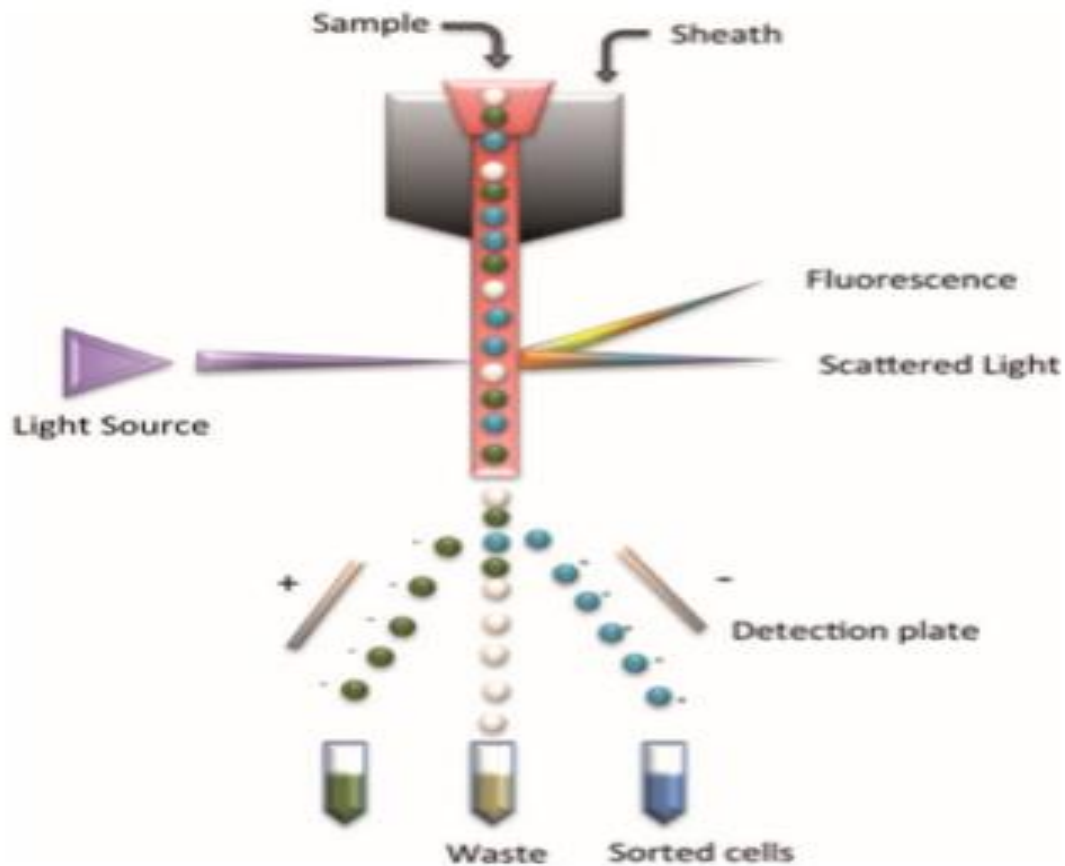


Εικόνα 8 : Ανίχνευση και επεξεργασία σήματος (Αναπροσαρμογή από Adan et al., 2017).

1.13.3 Ηλεκτροστατικός διαχωρισμός κυττάρων

Η κυτταρομετρία ροής εφαρμόζεται τόσο στην κλινική πρακτική όσο και στο πεδίο της έρευνας. Κάποια όργανα κυτταρομετρίας ροής παρέχουν την δυνατότητα του διαχωρισμού κυτταρικών υποπληθυσμών (Fluorescence Activated Cell Sorter,

FACS). Αυτό πραγματοποιείται μέσω της φόρτισης των κυττάρων και τον μετέπειτα διαχωρισμό τους σε ηλεκτρικό πεδίο (**Εικόνα 9**) (Adan et al., 2017).



Εικόνα 9: Διαχωρισμός και ταξινόμηση κυττάρων μέσω εκτροπής σταγονιδίων - ηλεκτροστατικός διαχωρισμός (Αναπροσαρμογή από Adan et al., 2017).

1.13.4 Φθοριοχρώματα

Τα φθορισμοφόρα είναι φθορίζουσες χρωστικές, οι οποίες δέχονται φωτεινή ακτινοβολία (διέγερση) συγκεκριμένου μήκους κύματος και εκπέμπουν φως μεγαλύτερου μήκους κύματος (εκπομπή). Η εκπομπή διαδέχεται τη διαδικασία της διέγερσης και μαζί συνιστούν το φαινόμενο του φθορισμού.

Αρχικά, ένα φθορισμοφόρο απορροφά ενέργεια μέσω ακτινοβολίας και τότε κάποια από τα ηλεκτρόνια του διεγείρονται και μεταπηδούν από τη στιβάδα ηρεμίας σε μία στιβάδα υψηλότερης ενέργειας, δηλαδή βρίσκονται σε διεγερμένη κατάσταση.

Κάθε φθορισμοφόρο χαρακτηρίζεται από διαφορετική ποσότητα ενέργειας η οποία ονομάζεται ενέργεια διέγερσης. Ένα μέρος αυτής της ενέργειας απελευθερώνεται ως θερμότητα και η υπόλοιπη με τη μορφή φθορισμού, εφόσον το ηλεκτρόνιο που είχε διεγερθεί επιστρέφει στη θεμελιώδη κατάσταση.

Η ακτινοβολία που εκπέμπεται είναι μικρότερης ενέργειας από αυτή της διέγερσης, άρα και μεγαλύτερου μήκους κύματος, επομένως και διαφορετικού χρώματος. Κάθε φθορισμοφόρο χαρακτηρίζεται από ένα φάσμα απορρόφησης και εκπομπής. Κάθε τέτοιο φάσμα φέρει κάποιες μέγιστες τιμές που αντιστοιχούν σε κάποια μήκη κύματος στα οποία κάθε φθοριόχρωμα επιτυγχάνει τη βέλτιστή του διέγερση και ταυτόχρονα τη μέγιστη ένταση εκπομπής (Liu et al., 2013) (Εικόνα 10).

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

Εικόνα 10: Τα συνηθέστερα σε χρήση φθορισμοφόρα στην κυτταρομετρία ροής. Διακρίνεται το μέγιστο μήκος κύματος εκπομπής και το αντίστοιχο χρώμα (Αναπροσαρμογή από "Custom Conjugations | BD Biosciences-US").

1.14 ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΤΗΣ ΕΛΑΧΙΣΤΗΣ ΥΠΟΛΕΙΠΟΜΕΝΗΣ ΝΟΣΟΥ (ΕΥΝ) ΜΕΣΩ NGF ΣΤΗΝ AL ΑΜΥΛΟΕΙΔΩΣΗ

Στην AL αμυλοείδωση, η NGF μπορεί να χρησιμοποιηθεί στα πλαίσια της διάγνωσης για την επιβεβαίωση της παρουσίας υποκείμενων παθολογικών κλωνικών πλασματοκυττάρων που είναι υπεύθυνα για την εναπόθεση αμυλοειδογόνων

ελαφριών αλυσίδων σε ιστούς. Σε έρευνα που πραγματοποίησε ο Δρ. Ραίνα και οι συνεργάτες του αναγνωρίστηκε η προγνωστική αξία της ΠΚΡ. Συγκεκριμένα, μονοκλωνικά πλασματοκύτταρα αναγνωρίστηκαν μέσω ανοσοφαινοτυπικής ανάλυσης που έγινε με τη χρήση ΠΚΡ στο 97% ασθενών με AL αμυλοείδωση. Η ποσοτικοποίηση των πλασματοκυττάρων στο μυελό των οστών (bone marrow plasma cells, BMPCs) αποτέλεσε σημαντικό προγνωστικό δείκτη για τη συνολική επιβίωση. Επιπλέον, η ανίχνευση «επίμονων» φυσιολογικών πλασματοκυττάρων στο μυελό των οστών κατά τη διάγνωση προσδιόρισε μια υπό-ομάδα AL ασθενών με παρατεταμένο OS. Ως εκ τούτου, ο ανοσοφαινοτυπικός έλεγχος μέσω ΠΚΡ φαίνεται να είναι κλινικά χρήσιμος για την απόδειξη της πλασματοκυτταρικής κλωνικότητας στην AL έναντι άλλων μορφών αμυλοείδωσης (Paiva, Vidriales, et al., 2011).

Η ΠΚΡ δίνει επίσης τη δυνατότητα για γρήγορο διαχωρισμό και ταυτοποίηση κυτταρικών υποπληθυσμών, αξιολογώντας τις ποσοτικές διαφορές ως προς την έκφραση αντιγόνων σε μοναδιαία κύτταρα, αλλά και το σχετικό μέγεθος των υποπληθυσμών που απαριθμούνται. Η ικανότητά της να εντοπίζει και να ποσοτικοποιεί σπάνιους υποπληθυσμούς, έχει οδηγήσει στην ανίχνευση της ελάχιστης υπολειμματικής νόσου (EYN) (Campana and Coustan-Smith, 1999). Ο σκοπός της ανίχνευσης EYN είναι η αξιολόγηση της ανταπόκρισης των ασθενών σε θεραπευτικές παρεμβάσεις. Πιο συγκεκριμένα, αφορά την ταυτοποίηση ασθενών με καλή ανταπόκριση προκειμένου να μειωθεί η δόση της θεραπείας και να αποφευχθούν παρενέργειες λόγω τοξικότητας, καθώς και την ταυτοποίηση ασθενών με ανεπαρκή ανταπόκριση προκειμένου να αλλάξει η δόση της θεραπείας ή εξ ολοκλήρου το θεραπευτικό σχήμα (Wood, 2016). Η αξιολόγηση της EYN από την ΠΚΡ εισήχθη σχετικά πρόσφατα στα κριτήρια συναίνεσης IMWG για απόκριση στο ΠΜ (Paiva, Vidriales, et al., 2011). Σε αυτό το πλαίσιο, η αξιολόγηση της EYN σε ασθενείς με AL αμυλοείδωση είναι ένας αναδυόμενος τομέας ενδιαφέροντος, ο οποίος έχει υιοθετήσει τους συνδυασμούς των ενδοκυττάρων και επιφανειακών αντισωμάτων σύμφωνα με τα πρότυπα που ακολουθούνται για το ΠΜ. Μέχρι σήμερα, οι διαθέσιμες μελέτες περιλάμβαναν μικρό αριθμό ασθενών, εξού και η ανάγκη για μεγαλύτερες μελέτες έτσι ώστε να εξακριβωθεί ο ρόλος της EYN στην AL αμυλοείδωση (Milani, Merlini, et al., 2018). Πρόσφατη έρευνα έδειξε ευαισθησία στο επίπεδο του 97% για την ανίχνευση παθολογικών κλωνικών πλασματοκυττάρων χρησιμοποιώντας ΠΚΡ για την ανάλυση δειγμάτων μυελού των οστών σε 63 ασθενών με AL αμυλοείδωση (Lisenko et al., 2016). Άλλη σημαντική έρευνα σε ασθενείς που

δεν είχαν υποβληθεί σε ASCT, έδειξε κατά τη διάγνωση ποσοστό μονοτυπικών (λόγος έκφρασης κ:λ αλυσίδων είτε >4:1 για [κ] ελαφριά αλυσίδα είτε <1:2 για [λ]) πλασματοκυττάρων >2,5%, το οποίο συσχετίστηκε με φτωχή PFS και OS. Επιπλέον, σε ασθενείς της ίδιας έρευνας που έφτασαν σε VGPR, η παρουσία λιγότερων από 0,1% των πλασματοκυττάρων αυτών συσχετίστηκε με μεγαλύτερη PFS και OS (Eli Muchtar, Dragan Jevremovic, Dispenzieri, Dingli, et al., 2017). Ο Lee και οι συνεργάτες του έχουν επίσης αναφερθεί στην επίτευξη EYN αρνητικότητας σε δύο ασθενείς που έφτασαν σε CR μετά από ASCT (Autologous Stem Cell Transplantation) (Lee et al., 2017). Η σημαντικότητα της EYN αρνητικότητας έχει επίσης υποστηριχθεί και από άλλες πρόσφατες μελέτες (Eli Muchtar, Angela Dispenzieri, Jevremovic, Dingli, et al., 2020; Staron et al., 2020; Milani, Margherita, et al., 2017), των οποίων τα ευρήματα έδειξαν ότι σχεδόν το 50% των ασθενών με AL αμυλοείδωση που πληρούν τα τρέχοντα κριτήρια για CR είναι EYN θετικοί μετά από ανάλυση με ΠΚΡ. Η θετικότητα αυτή που ανιχνεύει η ΠΚΡ πιθανά να οφείλεται στην επιμονή των τοξικών αμυλοειδογόνων ελαφριών αλυσίδων LCs, που παράγονται από το μικρό αριθμό των υπολειπόμενων παθολογικών πλασματοκυττάρων. Το γεγονός αυτό θα μπορούσε ενδεχομένως να εξηγήσει την επίμονη οργανική δυσλειτουργία που παρουσιάζουν κάποιοι ασθενείς, δίνοντας ενδείξεις για το δυσμενή ρόλο των τοξικών LCs στην AL (Milani, Merlini, et al., 2018). Επίσης, η EYN αρνητικότητα έχει συσχετιστεί με υψηλότερη συχνότητα νεφρικής ανταπόκρισης και με βελτιωμένη PFS σε σύγκριση με ασθενείς που αν και ήταν σε CR με βάση τα προβλεπόμενα κριτήρια, είχαν ανιχνεύσιμα κλωνικά πλασματοκύτταρα κατά την ανάλυση με ΠΚΡ.

Ο ρόλος της NGF στην AL αμυλοείδωση έχει μελετηθεί σε διάφορες έρευνες τα τελευταία χρόνια. Μία από αυτές αξιολόγησε την παρουσία EYN μέσω NGF σε 20 ασθενείς με AL αμυλοείδωση που είχαν επιτύχει CR σύμφωνα με τα τυποποιημένα κριτήρια και είχαν αρνητική βιοψία μυελού των οστών. Με διαγνωστικό επίπεδο ευαισθησίας 10^{-6} , βρήκαν 60% EYN-θετικούς και 40% EYN-αρνητικούς ασθενείς. Μάλιστα, από τους 4 ασθενείς της μελέτης που είχαν πετύχει καρδιακή απόκριση, 3 βρέθηκαν να είναι EYN- (Kastritis, Kostopoulos, et al., 2018).

Με βάση όλα τα παραπάνω γίνεται αντιληπτό ότι η αξιολόγηση της EYN μπορεί να αντιπροσωπεύει ένα πιθανό ισχυρό υποκατάστατο τελικού σημείου για κλινικές δοκιμές στην AL αμυλοείδωση, επιτρέποντας έτσι την ταχύτερη διεξαγωγή τους (Milani, Merlini, et al., 2018).

1.15 ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΠΛΑΣΜΑΤΟΚΥΤΤΑΡΩΝ

Το επιφανειακό αντιγόνο CD38 αποτελεί έναν αξιόπιστο δείκτη για την αναγνώριση των φυσιολογικών αλλά και των παθολογικών πλασματοκυττάρων. Γενικά εντοπίζεται στα T, NK και B κύτταρα ενώ επίσης εκφράζεται σε υψηλά επίπεδα στα ενεργοποιημένα B, T κύτταρα και τα πλασματοκύτταρα (Kumar, Kimlinger, and Morice., 2010; Morandi et al., 2018).

Το αντιγόνο αυτό είναι ένα πολυλειτουργικό ένζυμο που σχετίζεται άμεσα με τη μεταγωγή σήματος, την κυτταρική προσκόλληση αλλά και τα σηματοδοτικά μονοπάτια ασβεστίου (Quarona et al., 2013). Κατά τη διαδικασία της αιμοποίησης, το CD38 υπερεκφράζεται στα CD34+ κύτταρα όπως και στα ειδικά πρόδρομα B κύτταρα, ενώ η έκφρασή του αναστέλλεται όταν τα B κύτταρα ωριμάσουν (Campana et al., 2000; Quijano et al., 2008). Όταν τα B κύτταρα ενεργοποιηθούν, το CD38 ξαναεκφράζεται σε υψηλό βαθμό, όσο αυτά παραμένουν στα βλαστικά κέντρα. Κατά την ωρίμανση, το CD38 δεν εκφράζεται στα B κύτταρα μνήμης ενώ τα φυσιολογικά πλασματοκύτταρα το εκφράζουν σε υψηλά επίπεδα, ξεπερνώντας τα επίπεδα έκφρασής του σε όλους τους άλλους κυτταρικούς πληθυσμούς του αιμοποιητικού συστήματος. Για το λόγο αυτό, το αντιγόνο CD38 θεωρείται ένας ιδιαίτερα αξιόπιστος δείκτης για την ανίχνευση των πλασματοκυττάρων μέσω ΠΚΡ (Quarona et al., 2013). Επιπλέον, έχει υποστηριχθεί ότι ο αντιγονικός δείκτης CD229 μπορεί να θεωρηθεί ως ο πιο αξιόπιστος δείκτης σε αντικατάσταση του CD38 κατά την αναγνώριση των πλασματοκυττάρων του μυελού σε ασθενείς με ΠΜ που υποβάλλονται σε θεραπεία με αντι-CD38 ή αντι-CD138 (Pojero et al., 2015).

Το μόριο CD138 συμμετέχει στον πολλαπλασιασμό, την κυτταρική μετανάστευση και την αλληλεπίδραση των κυττάρων με την εξωκυττάρια ουσία και αποτελεί έναν εξίσου σημαντικό δείκτη για την ταυτοποίηση των πλασματοκυττάρων. Έρευνες βασισμένες στη σύζευξη αντι-CD138 αντισωμάτων με πολύ έντονα φθοριοχρώματα, έδειξαν πως το αντιγόνο αυτό εκφράζεται και σε άλλους πληθυσμούς κυττάρων του αιμοποιητικού συστήματος και μάλιστα πως κάποιοι μυελωματικοί πληθυσμοί εμφανίζουν έντονο αυτοφθορισμό ή/και μη ειδική σύζευξη των αντι-CD138. Επιπλέον, αναφορές υποστηρίζουν ότι τα γερασμένα

πλασματοκύτταρα παρουσιάζουν μειωμένη έκφραση του CD138 γεγονός που υποδεικνύει την παροδικότητα της έκφρασής του (Yang et al., 2003).

Με βάση όλα τα παραπάνω, η αναγνώριση των πλασματοκυττάρων με τον βέλτιστο τρόπο πραγματοποιείται με βάση τους δείκτες CD38 και CD138. Προκειμένου να γίνει σωστά ο διαχωρισμός του πληθυσμού CD38^{hi} CD138⁺ από άλλους, χρησιμοποιείται συνδυαστικά ο δείκτης CD45 και οι παράμετροι SSC και FSC (Arroz et al., 2016; van Dongen et al., 2012).

Εφόσον έχει πραγματοποιηθεί η ταυτοποίηση των πλασματοκυττάρων, επόμενο βήμα είναι ο διαχωρισμός των φυσιολογικών από τα παθολογικά, αν αυτά υπάρχουν. Η διαφοροποίησή τους βασίζεται στα διαφορετικά επίπεδα έκφρασης κάποιων αντιγόνων που μπορεί να εκφράζονται μη συγχρονισμένα κατά την ωρίμανση των κυττάρων αυτών ή να εκφράζονται έκτοπα, ενώ φυσιολογικά δεν θα εκφράζονταν. Όπως έχει δείχθει, το προφίλ έκφρασης αντιγονικών δεικτών στα φυσιολογικά πλασματοκύτταρα είναι πιο συντηρημένο, σε αντίθεση με την ποικιλομορφία που συναντάμε στα πρότυπα έκφρασης που ακολουθούν οι ανοσοφαινοτυπικοί δείκτες στα παθολογικά πλασματοκύτταρα. Το γεγονός αυτό τονίζει τη σημαντικότητα του να γνωρίζουμε επακριβώς τη διαδικασία ωρίμανσης για κάθε κυτταρικό πληθυσμό του μυελού, προκειμένου να γίνεται αξιόπιστα η αναγνώριση μιας νόσου με βάση αυτά τα πρότυπα (van Lochem et al., 2004).

1.16 ΑΝΟΣΟΦΑΙΝΟΤΥΠΟΣ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΠΛΑΣΜΑΤΟΚΥΤΤΑΡΩΝ

Όπως αναλύθηκε παραπάνω, η ταυτοποίηση των τελικώς διαφοροποιημένων πλασματοκυττάρων μέσω ΠΚΡ μπορεί να επιτευχθεί αξιολογώντας την ταυτόχρονη έκφραση των δεικτών CD38 και CD138. Ακόμη, τα φυσιολογικά πλασματοκύτταρα χαρακτηρίζονται από τη στέρηση έκφρασης των δεικτών CD22, CD117, CD20 και των επιφανειακών μορίων ανοσοσφαιρίνης, ενώ ασθενής είναι η έκφραση του CD19 και θετική του CD81. Γενικότερα όμως παρατηρείται ετερογένεια στην έκφραση των δεικτών CD45, CD56 και CD19 (Robillard et al., 2014; Draxler et al., 2019).

Παρά το γεγονός ότι υπάρχουν κάποια βασικά ανοσοφαινοτυπικά χαρακτηριστικά για τα πλασματοκύτταρα, τα πλασματοκύτταρα του μυελού αποτελούνται από διάφορους υποπληθυσμούς, οι οποίοι διαφέρουν ανοσοφαινοτυπικά και μάλιστα είναι και καλά χαρακτηρισμένοι. Κάθε διαφορετικό

υποσύνολο χαρακτηρίζεται από διαφοροποιήσεις ως προς την έκφραση των δεικτών ανάλογα με το στάδιο ωρίμανσης στο οποίο βρίσκονται τα πλασματοκύτταρα του εκάστοτε υποσυνόλου (Robillard et al., 2014). Για παράδειγμα, εντοπίζονται και υποπληθυσμοί φυσιολογικών πλασματοκυττάρων που δεν εκφράζουν το δείκτη CD19 και εκφράζουν το CD56, ενώ στην πλειοψηφία τους εκφράζουν CD19 και όχι CD56, και έχουν ανοσοφαινότυπο CD19-CD45-CD81-CD56+ (Peceliunas et al., 2011). Αυτοί οι διαφορετικοί φυσιολογικοί υποπληθυσμοί πλασματοκυττάρων μπορεί και να αποτελούν διαφορετικά στάδια της προοδευτικής ωρίμανσής τους, η οποία ενδέχεται να παρουσιάζεται μέσω της μειωμένης έκφρασης του CD19 και να τα θέτει έτσι εκτός βασικών ανοσοφαινοτυπικών χαρακτηριστικών (Pojero, Flores-Montero, et al., 2016).

1.17 ΑΝΟΣΟΦΑΙΝΟΤΥΠΟΣ ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΩΝ ΠΛΑΣΜΑΤΟΚΥΤΤΑΡΩΝ

Τα παθολογικά πλασματοκύτταρα επιδεικνύουν ανοσοφαινότυπους που διαφέρουν από αυτούς των φυσιολογικών πλασματοκυττάρων. Τα κλωνικά πλασματοκύτταρα ταυτοποιούνται με βάση την συνδυαστική αξιολόγηση της έκφρασης των βασικών δεικτών CD19, CD45, CD56, CD38, CD138, CD27, CD117 και σε μικρότερο βαθμό των CD28, CD20, CD22, CD81, CD33, της β2-μικροσφαιρίνης και των επιφανειακών ανοσοσφαιρινών. Στους δείκτες αυτούς, πρόσφατα προστέθηκαν ο CD200 και CD54 ως βοηθητικοί δείκτες για την αναγνώριση των παθολογικών πλασματοκυττάρων σε ασθενείς που πάσχουν από κάποια PCD όπως το ΠΜ (van Dongen et al., 2012) και η πρωτοπαθής αμυλοείδωση (Jelinek et al., 2017). Συγκεκριμένα, ο κύριος φαινότυπος που παρουσιάζουν τα μη φυσιολογικά πλασματοκύτταρα είναι CD38+, CD138+ και CD19-, αλλά περαιτέρω δείκτες αναλύονται κάθε φορά συνδυαστικά όπως προαναφέρθηκε (Sachchithanatham et al., 2013). Πιο συγκεκριμένα, τα παθολογικά πλασματοκύτταρα φαίνεται πως έχουν την τάση να παρουσιάζουν χαμηλή ή μηδαμινή έκφραση του CD27, ασθενή ή αρνητική έκφραση του CD45, αυξημένη έκφραση των CD28, CD33 και/ή CD56 και μεταβλητή έκφραση των CD20 και CD117 (Kumar, Kimlinger, and Morice., 2010). Επιπλέον, έρευνες αναφέρουν την έκφραση δεικτών όπως οι CD52 και SLAMF7 στην περίπτωση της πρωτοπαθούς

αμυλοείδωσης, που αποτελούν δυνητικούς στόχους για ανοσοθεραπεία (Lisenko et al., 2016).

Είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι σε πολλούς παθολογικούς πληθυσμούς πλασματοκυττάρων, η έκφραση του CD38 μειώνεται στην επιφάνειά τους και έτσι μπορεί η ένταση της χρώσης τους να είναι παρόμοια με αυτή των προδρόμων Β κυττάρων ή των ενεργοποιημένων Τ κυττάρων. Επομένως, απαραίτητη είναι η ταυτόχρονη ανάλυση του CD138, καθώς αυξάνει σημαντικά την ευαισθησία της ΠΚΡ.

Κάποιοι από τους δείκτες που προαναφέρθηκαν δεν εκφράζονται αποκλειστικά στα παθολογικά πλασματοκύτταρα. Το μόριο CD19 για παράδειγμα αν και χρησιμοποιείται για την ταυτοποίηση της ΕΥΝ, καθώς συνήθως απουσιάζει από τα παθολογικά πλασματοκύτταρα, έχει βρεθεί σε περιπτώσεις ασθενών ότι μπορεί να απουσιάζει σε σημαντικό ποσοστό και στα φυσιολογικά πλασματοκύτταρα. Παράλληλα, εκφράζεται και στα θυλακιώδη δενδριτικά κύτταρα αλλά και στα Β κύτταρα μέχρι να ωριμάσουν σε πλασματοκύτταρα. Το CD56 εκφράζεται στα NK (natural killer) κύτταρα, σε ένα υποπληθυσμό τους, τα NK-T κύτταρα και στα κλωνικά πλασματοκύτταρα. Όμως, επειδή υπάρχει ετερογένεια μεταξύ των κλωνικών πλασματοκυττάρων σε σχέση με αυτόν τον δείκτη, η έκφραση του δείκτη αυτού μπορεί να έχει αρνητικό αντίκτυπο στην πρόγνωση (Kumar, Dispenzieri, Katzmann, et al., 2010).

Στην περίπτωση του ΠΜ, οι διαφορές στην έκφραση των διαφόρων δεικτών μεταξύ φυσιολογικών και παθολογικών πλασματοκυττάρων είναι καλά τεκμηριωμένες. Τα παθολογικά πλασματοκύτταρα είναι αρνητικά για το CD79a ή το επιθηλιακό μεμβρανικό αντιγόνο EMA (epithelial membrane antigen) και δείχνουν ανώμαλη έκφραση ως προς τα μόρια CD45 και CD20, τα οποία δεν εκφράζονται στον φυσιολογικό πληθυσμό. Ο Paiva και οι συνεργάτες του υποστήριξαν σε έρευνά τους ότι τα κλωνικά παθολογικά πλασματοκύτταρα στην πρωτοπαθή αμυλοείδωση, λόγω της χαμηλής συχνότητας εμφάνισής της και του χαμηλού φορτίου νόσου που την χαρακτηρίζει, παρουσιάζουν ένα ανοσοφαινοτυπικό προφίλ που επικαλύπτεται με αυτό των αντίστοιχων πλασματοκυττάρων στο ΠΜ, αν και το μεταγράφομά τους είναι παρόμοιο με αυτό των φυσιολογικών πλασματοκυττάρων (Paiva, Vídriales, et al., 2011) (Paiva, Cedena, et al., 2016). Επιπλέον, στις περιπτώσεις της AL αμυλοείδωσης που σχετίζονται με μύελωμα, έχει

παρατηρηθεί αυξημένη διήθηση του μυελού από πλασματοκύτταρα (Deshmukh et al., 2009).

Σε αντίθεση με το ΠΜ, αν και η έκφραση δεικτών στα νεοπλασματικά πλασματοκύτταρα της πρωτοπαθούς αμυλοείδωσης δεν είναι τόσο καλά μελετημένη και τεκμηριωμένη, φαίνεται πως τα παθολογικά πλασματοκύτταρα εκφράζουν μόρια όπως τα CD20, CD79α, CD56, κυκλίνη D1 και/ή CD56. Τέλος, παθολογικά πλασματοκύτταρα ασθενών με AL αμυλοείδωση φαίνεται να εκφράζουν στον CD138+ υποπληθυσμό τους τον υποδοχέα CD32B κατά την διάγνωση, αλλά και την υποτροπή, γεγονός που μπορεί να αποτελέσει στόχο για ανοσοθεραπεία (Kumar, Kimlinger, et al., 2010).

Με βάση όλα τα παραπάνω απαραίτητη τίθεται η συνεκτίμηση της έκφρασης των δεικτών που έχουν αναλυθεί παραπάνω και των επιπέδων έκφρασης των μονοκλωνικών κ και λ ελαφριών αλυσίδων, έτσι ώστε να υπάρχει σαφής διάκριση των παθολογικών πλασματοκυττάρων (Kumar, Kimlinger, et al., 2010). Παρόλα αυτά, η συχνότητα εμφάνισης των δεικτών ποικίλει, γεγονός που οφείλεται τόσο στην ετερογένεια της νόσου που παρατηρείται από ασθενή σε ασθενή, όσο και στο φθορισμοφόρο που σημαίνει το κάθε αντίσωμα.

2 ΣΚΟΠΟΣ

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι η ανάλυση του μικροπεριβάλλοντος του μυελού των οστών (ΜΟ) ασθενών με AL αμυλοείδωση σε σχέση με τη χορήγηση Δαρατουμουμάμπης αλλά και την παρουσία ή απουσία Ελάχιστης Υπολειμματικής Νόσου (ΕΥΝ), χρησιμοποιώντας Πολυπαραμετρική Κυτταρομετρία Ροής (ΠΚΡ) οκτώ χρωμάτων.

3 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1 ΥΛΙΚΑ

3.1.1 ΑΝΑΛΩΣΙΜΑ

- Πλαστικές πιπέτες 5 και 10 mL (Cellstar, Greiner Bio-One)
- Πλαστικά σωληνάκια (FACS tubes) ειδικά για κυτταρομετρία ροής (BD Biosciences, NJ, USA)
- Πλαστικές πιπέτες Pasteur όγκου 3 ml (Cellstar, Greiner Bio-One)
- Πλέγματα με πόρους διαμέτρου 70 μm για το φιλτράρισμα κυτταρικών εναιωρημάτων (Cell Strainers) (BD Falcon, NJ, USA)
- Σωληνάκια Falcon 50 ml (Cellstar, Greiner Bio-One)
- Ρύγχι πιπετών Ultratip, όγκου 10, 200 και 1000 μL (Cellstar, Greiner Bio-One)

3.1.2 ΣΥΣΚΕΥΕΣ

- Αιματοκυτταρόμετρο (Neubauer Bright Line Hematocytometer) (Sigma Chemical Co, St Louis, MO, USA)
- Ηλεκτροκίνητος επαναφορτιζόμενος ελεγκτής πιπέτας (pipette controller) (FastPette, Labnet, International Inc, NJ, USA)
- Κυτταρόμετρο BD FACSCanto II, 3 laser, 405 nm Violet/488 nm Blue/633 nm Red (BD Biosciences, NJ, USA)
- Οπτικό μικροσκόπιο (Optika microscopes, Italy)

- Ψυχόμενη φυγόκεντρος (centrifuge) HERMLE 300K με κεφαλές 220.12 VO4 για σωλήνες falcon και 200.87 VO3 για σωλήνες eppendorf (Hernie Laborstechnik GmbH, Germany)
- Πιπέτες Pipetman όγκου 2-20,20-200, 200-1000 μl (Gilson, Middleton, WI, USA)

3.1.3 ΛΟΓΙΣΜΙΚΑ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΑ

- BD FACSDiva™ version 7.0 (BD Biosciences, NJ, USA)
- Infinicyt vesion 1.8.0 (Cytognos, Salamanca, Spain)

3.1.4 ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

- Ορός εμβρύου μόσχου (Fetal Bovine Serum, FBS) (Lonza, Verviers, Belgium)
- Κυανού του Τρυπανίου (Trypan Blue) 0,4% (Sigma Chemical Co, St Louis, MO, USA)
- Αλατούχο φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα σε ταμπλέτες (Phosphate Buffer Saline Tablets, PBS tablets) (Sigma Chemical Co, St Louis, MO, USA)
- BD Pharm Lyse™ λυτικό διάλυμα ερυθροκυττάρων συμπυκνωμένο 10X (BD Biosciences, NJ, USA) και χλωριούχο αμμώνιο (NH₄Cl) (Sigma Chemical Co, St Louis, MO, USA)
- BD FACS™ διάλυμα λύσης ερυθροκυττάρων με <15% φορμαλδεΰδη και <50% διαιθυλογλυκόλη (BD FACSTM lysing solution) (BD Biosciences, NJ, USA)

- BD FACSDiva™ CS&T σφαιρίδια (CS&T research beads) (BD Biosciences, NJ, USA)
- BD™ CompBeads Set Anti-Mouse Ig, κ (BD Biosciences, NJ, USA)
- Fix&Perm A+B (Nordic Mubio, Susteren, Netherlands)

3.1.5 ANTIΣΩΜΑΤΑ ΣΥΖΕΥΓΜΕΝΑ ΜΕ ΦΘΟΡΙΖΟΥΣΕΣ ΧΡΩΣΤΙΚΕΣ

- FITC Anti-Human Multi-Epitope CD38 (Cytognos, Salamanca, Spain)
- PE Mouse Anti-Human CD56, κλώνος 5.9 (Cytognos, Salamanca, Spain)
- BD PerCPCy5.5 Mouse Anti-Human CD45, κλώνος HI30 (BD Biosciences, NJ, USA)
- BD Horizon™ BV421 Mouse Anti-Human CD138, κλώνος MI15 (BD Biosciences, NJ, USA)
- BV510 Mouse Anti-Human CD27, κλώνος O323 (Biolegend Inc., CA, USA)
- PE-Cy7 Mouse Anti-Human CD19, κλώνος J3119 (Beckman Coulter, Nyon, Switzerland)
- BD APC Mouse Anti-Human CD117, κλώνος 104D2 (BD Biosciences, NJ, USA)
- APCC750 Mouse Anti-Human CD81, κλώνος M38 (Cytognos, Salamanca, Spain)
- APC Polyclonal Rabbit Anti-Human cyIgκ (Dako, Glostrup, Denmark)
- APCC750 Polyclonal Goat Anti-Human cyIgλ (Cytognos, Salamanca, Spain)

3.2 ΜΕΘΟΔΟΙ

3.2.1 ΣΥΛΛΟΓΗ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΜΥΕΛΟΥ ΤΩΝ ΟΣΤΩΝ ΚΑΙ ΠΕΡΙΦΕΡΙΚΟΥ ΑΙΜΑΤΟΣ ΑΠΟ ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ ΑΛ ΑΜΥΛΟΕΙΔΩΣΗ

Στην παρούσα εργασία, δείγματα μυελού των οστών 25 ασθενών με ΑΛ αμυλοείδωση ελήφθησαν κατά τη διάγνωση, μετά την ολοκλήρωση θεραπείας πρώτης γραμμής και μετά την θεραπεία εδραίωσης με Δαρατουμουμάμπη. Τα δείγματα μυελού των οστών συλλέχθηκαν από την Αιματολογική-Ογκολογική Κλινική της Ιατρικής Σχολής, ΕΚΠΑ, Γ.Ν.Α. «Αλεξάνδρα» μέσω παρακέντησης, αποθηκεύτηκαν σε σωληνάκια με αντιπηκτικό EDTA και μεταφέρθηκαν άμεσα στο εργαστήριό μας για να τα επεξεργαστούμε.

3.2.2 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΒΙΩΣΙΜΟΤΗΤΑΣ ΚΑΙ ΑΡΙΘΜΟΥ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

Για τον προσδιορισμό της βιωσιμότητας και του αριθμού των κυττάρων σε ένα δείγμα κυτταρικού εναιωρήματος, έγινε η χρήση πρωτοκόλλου χρώσης με κυανό του τρυπανίου (trypan blue). Ουσιαστικά, η χρωστική αυτή μπορεί και διαπερνά την κατακερματισμένη πλασματική μεμβράνη των νεκρών κυττάρων, με αποτέλεσμα να βάψει το κυτταρόπλασμά τους με έντονο μπλε χρώμα. Αντιθέτως, η ακέραιη πλασματική μεμβράνη των ζωντανών κυττάρων δεν επιτρέπει στη χρωστική να εισέλθει στο εσωτερικό των κυττάρων και να τα βάψει. Η μέτρηση των ζωντανών κυττάρων γίνεται σε αιματοκυτταρόμετρο Neubauer με τη χρήση οπτικού μικροσκοπίου (Εικόνα 11). Σε όλες τις περιπτώσεις της παρούσας εργασίας, η βιωσιμότητα που εκτιμήθηκε ήταν $\geq 90\%$.

Πρωτόκολλο:

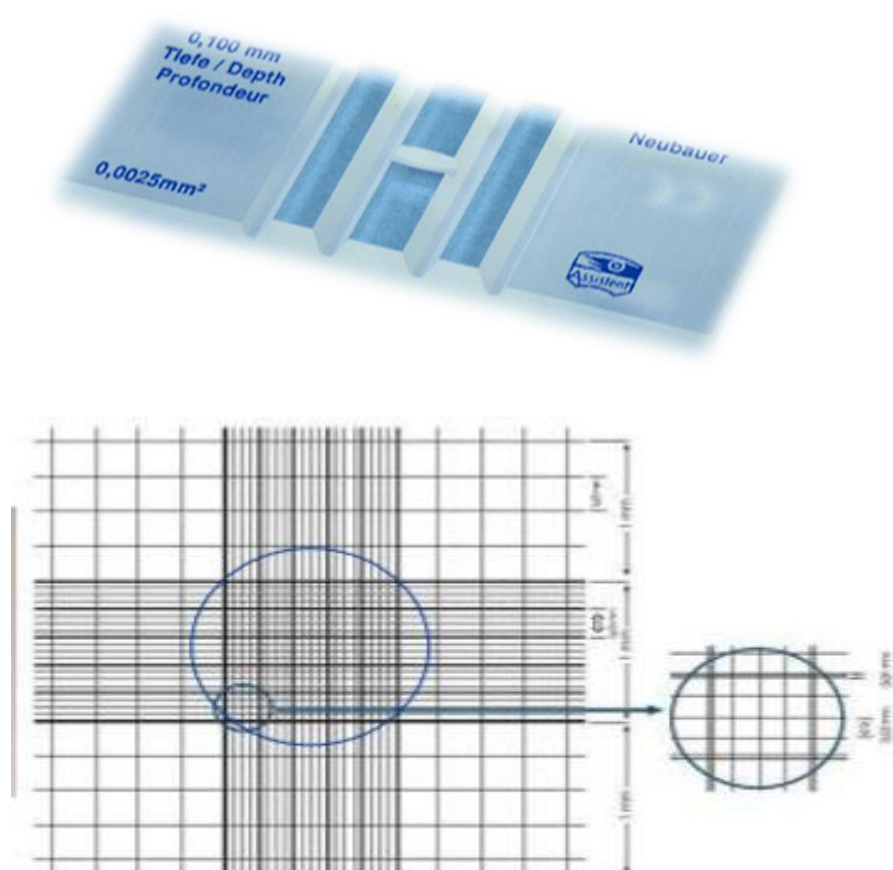
1) Ανάλογα με την εκτιμώμενη συγκέντρωση των κυττάρων, μεταφέρεται αντίστοιχος όγκος από το κυτταρικό εναιώρημα σε ένα από τα 96 φρεάτια μικροπλάκας.

2) Στη συνέχεια προστίθεται στο δείγμα κατάλληλος όγκος Trypan Blue, ώστε ο τελικός όγκος στο φρεάτιο να είναι 100 μL .

3) Αφού τοποθετηθεί η καλυπτρίδα στο αιματοκυτταρόμετρο Neubauer, γίνεται μεταφορά 10 μl δείγματος στην πλάκα και ακολουθεί παρατήρηση σε οπτικό μικροσκόπιο.

4) Η καταμέτρηση των κυττάρων γίνεται στα 25 κεντρικά τετράγωνα. Τα τετράγωνα αυτά περιβάλλονται περιφερειακά από τριπλή γραμμή. Καταμετρώνται τόσο τα ζωντανά, όσο και τα νεκρά κύτταρα.

5) Η βιωσιμότητα και ο αριθμός των κυττάρων υπολογίζεται ως εξής:
Αριθμός κυττάρων/ml δείγματος = αριθμός ζωντανών κυττάρων x συντελεστή αραιώσης x 10^4
% βιωσιμότητας = (αριθμός ζωντανών κυττάρων/ολικό αριθμό κυττάρων του δείγματος) x 100



Εικόνα 11: Αιματοκυτταρομέτρο Neubauer και το κεντρικό τετράγωνο εμβαδού 1mm^2 στο οποίο γίνεται η καταμέτρηση των ζωντανών και των νεκρών κυττάρων .

3.2.3 ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑΣ ΚΑΙ ΧΡΩΣΗΣ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΜΥΕΛΟΥ ΤΩΝ ΟΣΤΩΝ ΑΠΟ ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ AL ΑΜΥΛΟΕΙΔΩΣΗ ΓΙΑ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΕΥΝ ΜΕΣΩ ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΙΑΣ ΡΟΗΣ ΝΕΑΣ ΓΕΝΙΑΣ

- 1) Το δείγμα του μυελού συλλέγεται με πιπέτα όγκου 10 mL από το σωλήνα με EDTA και περνά από φίλτρο (Cell strainer) με πόρους διαμέτρου 70 μm, με σκοπό να γίνει η κατακράτηση πηγμάτων και συσσωματωμάτων προς ομαλή απομόνωση των κυττάρων του μυελού.
- 2) Το διήθημα του δείγματος μεταφέρεται σε σωληνάριο Falcon 50 mL, το οποίο γεμίζεται με διάλυμα PharmLyse, αραιωμένο με απεσταγμένο H₂O σε συγκέντρωση 1X. Τότε ακολουθεί λύση των ερυθροκυττάρων προκειμένου να ανακτηθούν και να συμπυκνωθούν στο μέγιστο τα εμπύρηντα κύτταρα του δείγματος. Επειδή το διάλυμα PharmLyse δεν περιέχει μονιμοποιητικές ουσίες, η λύση των ερυθροκυττάρων γίνεται σε χαμηλή συγκέντρωση χλωριούχου αμμωνίου.
- 3) Ακολουθεί καλή ανάμιξη και επώαση του δείγματος σε συσκευή ανάδευσης για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
- 4) Εν συνεχεία, ο σωλήνας φυγοκεντρείται στα 800 g στους 4 °C για 10 λεπτά. Το υπερκείμενο αφαιρείται με χρήση πιπέτας 10 mL, χωρίς να διαταραχθεί το ίζημα. Τυπικά, ο υπολειπόμενος όγκος στο σωλήνα πρέπει να είναι περίπου 300 μL.
- 5) Προστίθενται 2 mL PBS-0,5% FBS και το ίζημα επαναδιαλυτοποιείται με έντονη ανάδευση.
- 6) Έπειτα γίνεται συμπλήρωση του σωλήνα με PBS-0,5% FBS μέχρι τα 50 ml, καλή ανάδευση και φυγοκέντρωση στα 800 g για 5 λεπτά. Το υπερκείμενο αφαιρείται με προσοχή όπως στο παραπάνω βήμα με χρήση πιπέτας 10 mL.
- 7) Το ίζημα επαναδιαλυτοποιείται με την προσθήκη 2 mL PBS-0,5% FBS. Μετά από καλή ανάδευση, το περιεχόμενο του σωλήνα μεταφέρεται σε ειδικό σωληνάκι για κυτταρομετρία ροής (FACS tube).
- 8) Ο άδειος σωλήνας των 50 ml εκπλένεται με 2 mL PBS-0,5% FBS για να ανακτήσουμε όσα κύτταρα έχουν απομείνει και ο επιπλέον αυτός όγκος μεταφέρεται στο FACS tube.
- 9) Το δείγμα στο FACS tube φυγοκεντρείται στα 540 g και στους 4 °C για 5 λεπτά. Έπειτα, αφαιρείται το υπερκείμενο και ακολουθεί η επαναδιαλυτοποίηση του

ιζήματος με PBS-0,5% FBS ώστε ο τελικός όγκος να είναι περίπου 300 μL . Ο όγκος πρέπει να διατηρηθεί όσο το δυνατόν μικρότερος έτσι ώστε να είναι εύκολη η προσαρμογή της κατάλληλης συγκέντρωσης κυττάρων ανά σωληνάκι, κατά τα επόμενα βήματα.

10) Σε αυτό το στάδιο γίνεται προσδιορισμός του αριθμού και της βιωσιμότητας των συνολικών εμπύρηνων κυττάρων του δείγματος, χρησιμοποιώντας το πρωτόκολλο χρώσης με κυανούν του τρυπανίου (Trypan Blue). Μετά την μέτρηση των κυττάρων, η συγκέντρωση των εμπύρηνων κυττάρων του ολικού δείγματος προσαρμόζεται στα 10^5 κύτταρα/ μL .

11) Για κάθε FACS tube στο οποίο θα εφαρμοστεί το πρωτόκολλο της χρώσης με τα συζευγμένα με φθοριοχρώματα αντισώματα, χρησιμοποιούνται περίπου 100 μL (δηλαδή 10^7 κύτταρα) από το παραπάνω εναιώρημα. Η χρώση αυτού του μεγάλου αριθμού κυττάρων είναι απαραίτητη ώστε να επιτευχθούν υψηλά όρια ευαισθησίας, τα οποία απαιτούν την καταγραφή τουλάχιστον 5×10^6 κυτταρικών γεγονότων από κάθε σωληνάκι FACS με τον κατάλληλο συνδυασμό φθοριζόντων αντισωμάτων.

12) Αφού γίνει η προσθήκη 100 μL εναιωρήματος εμπύρηνων κυττάρων, προστίθεται και ο κατάλληλος όγκος από κάθε αντίσωμα και τέλος κατάλληλος όγκος διαλύματος PBS-0,5% FBS με σκοπό ο τελικός όγκος να είναι 200 μL . Έπειτα γίνεται καλή ανάμειξη του συνολικού διαλύματος. Στη φάση αυτή, γίνεται η προσθήκη των αντισωμάτων που έχουν ως στόχο μόνο τους επιφανειακούς δείκτες.

13) Τα FACS tubes επωάζονται για 30 λεπτά στον πάγο, προστατευόμενα από άμεση έκθεση σε φως.

14) Μετά την επώαση, ακολουθούνται ξεχωριστές διαδικασίες για τα FACS tubes που προορίζονται για ανίχνευση μόνο επιφανειακών δεικτών και για όσα προορίζονται για ανίχνευση συνδυασμού επιφανειακών και ενδοκυττάρων δεικτών.

3.2.4 ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΕΠΙΦΑΝΕΙΑΚΩΝ ΑΝΤΙΓΟΝΙΚΩΝ ΔΕΙΚΤΩΝ

1) Γίνεται προσθήκη 2 ml FACS Lysing Solution, αραιωμένου με απεσταγμένο H_2O σε συγκέντρωση 1X. Έπειτα από καλή ανάδευση, τα σωληνάκια επωάζονται για 10 λεπτά στον πάγο, προστατευόμενα από απευθείας έκθεση στο φως.

- 2) Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 5 λεπτά στα 540 g στους 4 °C. Μετά την φυγοκέντρηση γίνεται απόρριψη του υπερκειμένου αφήνοντας περίπου 100 µL υπολειμματικό όγκο σε κάθε FACS tube.
- 3) Εν συνεχεία, γίνεται προσθήκη 2 mL PBS-0,5% FBS στο κυτταρικό ίζημα, ανάδευση προς επαναδιαλυτοποίησή του και πάλι φυγοκέντρηση για 5 λεπτά στα 540 g.
- 4) Όταν ολοκληρωθεί η φυγοκέντρηση, αφαιρείται το υπερκείμενο και προστίθενται 500 µL PBS-0,5% FBS στο ίζημα για επαναδιαλυτοποίηση.

3.2.5 ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΕΠΙΦΑΝΕΙΑΚΩΝ ΚΑΙ ΕΝΔΟΚΥΤΤΑΡΙΩΝ ΑΝΤΙΓΟΝΙΚΩΝ ΔΕΙΚΤΩΝ

- 1) Μετά το πέρας της χρώσης με τα αντισώματα για τα επιφανειακά αντιγόνα, γίνεται προσθήκη 2 mL PBS-0,5% FBS στο FACS tube, καλή ανάδευση και φυγοκέντρηση στα 540 g για 5 λεπτά στους 4 °C.
- 2) Πραγματοποιείται απόρριψη υπερκειμένου αφήνοντας περίπου 100 µL υπολειμματικού όγκου σε κάθε FACS σωληνάκι και το ίζημα επαναδιαλυτοποιείται με ήπια ανάδευση.
- 3) Έπειτα γίνεται προσθήκη 100 µL από το Αντιδραστήριο A (Fix&Perm), το οποίο λειτουργεί ως μονιμοποιητικός παράγοντας, καλή ανάδευση και επώαση δειγμάτων για 15 λεπτά στον πάγο, προστατευόμενα από άμεση έκθεση στο φως.
- 4) Όταν ολοκληρωθεί η επώαση, προστίθενται 2 mL PBS-0,5% FBS και τα δείγματα φυγοκεντρούνται για 5 λεπτά στα 540 g. Στη συνέχεια, το υπερκείμενο αφαιρείται χωρίς να διαταραχθεί το κυτταρικό ίζημα και παράλληλα αφήνουμε 100 µL υπολειμματικό όγκο σε κάθε FACS tube.
- 5) Το ίζημα επαναδιαλυτοποιείται με έντονη ανάδευση και προστίθενται 100 µL από το Αντιδραστήριο B (Fix&Perm) το οποίο εξασφαλίζει τη διαπερατότητα των κυτταρικών μεμβρανών και τον κατάλληλο όγκο από τα φθορίζοντα αντισώματα έναντι κυτταροπλασματικών κ και λ ελαφριών αλυσίδων.
- 6) Ακολουθεί επώαση των δειγμάτων για 15 λεπτά στον πάγο, προστατευόμενα από απευθείας έκθεση σε φως.
- 7) Μετά την επώαση προστίθενται 2 mL PBS-0,5% FBS, γίνεται έντονη ανάδευση και φυγοκέντρηση για 5 λεπτά στα 540 g στους 4 °C. Το υπερκείμενο αφαιρείται

προσεκτικά χωρίς να διαταραχθεί το κυτταρικό ίζημα και τέλος προστίθενται 500 μ L PBS-0,5% FBS.

8) Τα κυτταρικά εναιωρήματα που είναι σημασμένα με τα φθορίζοντα αντισώματα αναλύονται με τη χρήση του κυτταρομέτρου ροής BD FACSCanto II και η περαιτέρω ψηφιακή τους καταγραφή γίνεται με το λογισμικό BD FACSDiva 7.0.

9) Τα αρχεία των καταγεγραμμένων δειγμάτων εξάγονται από το λογισμικό FACSDiva 7.0 με τη μορφή FCS αρχείων και εισάγονται για ανάλυση στο λογισμικό Infinicyt 1.8. Το λογισμικό αυτό προτείνεται από το EuroFlow για την ανάλυση κλινικών δειγμάτων ΠΚΡ, καθώς εκτός του ότι προσφέρει ένα περιβάλλον φιλικό προς το χρήστη, συνδυάζει τη δυνατότητα αξιόπιστης επεξεργασίας αρχείων μεγάλου αριθμού κυτταρικών γεγονότων (events) (έως 10×10^6) και την ταυτόχρονη οπτικοποίηση πολλών παραμέτρων, που είναι απαραίτητες για την ανίχνευση μικρού αριθμού συμβάντων, όπως απαιτείται για την ανίχνευση της EYN.

3.2.6 ΣΥΝΔΥΑΣΜΟΙ ΦΘΟΡΙΖΟΝΤΩΝ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΩΝ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΤΗΣ EYN

Τα εμπύρνηνα κύτταρα του μυελού των οστών σημάνθηκαν χρησιμοποιώντας δύο ανεξάρτητα πάνελ 8-χρωμάτων (**Πίνακας 5**):

Πίνακας 5: Συνδυασμοί φθορίζοντων αντισωμάτων ανά σωληνάκι (πάνελ) που χρησιμοποιήθηκαν για την ανίχνευση της EYN σε δείγματα ασθενών με AL αμυλοείδωση. Για κάθε αντίσωμα αναγράφεται ο κλώνος και το συζευγμένο φθοριόχρωμα.

ΦΘΟΡΙΟΧΡΩΜΑ	FITC	PErC P- Cy5.5	BV421(Pa- cific blue)	BV510 (AmCyan)	PE- Cy7	APC	APCC 750	PE
ΣΩΛΗΝΑΡΙΟ 1 (Επιφανειακό panel)	CD38 ^a MULTI- EPITOPE	CD45 ^b HI30	CD138 ^b MI15	CD27 ^c O323	CD19 ^d J3- 119	CD117 ^b 104D2	CD81 ^a M38	CD56 ^a C5.9
ΣΩΛΗΝΑΡΙΟ 2 (Ενδοκυττάριο panel)	CD38 ^a MULTI- EPITOPE	CD45 ^b HI30	CD138 ^b MI15	CD27 ^c O323	CD19 ^d J3- 119	cyIgk ^e polyclon al	cyIgl ^a polyclo nal	CD56 ^a C5.9

^aCytognos, ^bBecton Dickinson, ^cBiolegend, ^dBeckman Coulter, ^eDako

Σε κάθε σωληνάριο πραγματοποιήθηκε χρώση τουλάχιστον 10×10^6 κυττάρων και καταγραφή τουλάχιστον 5×10^6 «γεγονότων» ανά panel σε κάθε δείγμα MO για την ανίχνευση της EYN, χρησιμοποιώντας το κυτταρόμετρο FACSCantoII (BD Bioscience, San Jose, CA). Σε κάποιες περιπτώσεις ο αριθμός των κυττάρων ήταν περιορισμένος για αυτό και η καταγραφή συνεχιζόταν μέχρι να εξαντληθεί το δείγμα. Στην περίπτωση των διαγνώσεων, επειδή δεν υπήρξε ανάγκη για υψηλή ευαισθησία, γινόταν καταγραφή λιγότερων από 5×10^6 κυττάρων ανά σωληνάκι, με ελάχιστο αριθμό τα 10^6 κύτταρα. Οι βέλτιστες τάσεις των φωτοπολλαπλασιαστών (PMTs) του οργάνου ρυθμίστηκαν σύμφωνα με το EuroFlow SOP, ενώ η ημερήσια απόδοση του κυτταρομέτρου εκτιμήθηκε τόσο με CS & T (BD) όσο και με τα σφαιρίδια Rainbow (Spherotech Inc, Lake Forest, IL). Το όριο FSC ορίστηκε στα 10.000 και η απόκτηση δεδομένων πραγματοποιήθηκε εντός 1 ώρας μετά το τελικό στάδιο πλύσης.

Για τη διάκριση των ορίων αρνητικών και θετικών πληθυσμών χρησιμοποιήθηκαν εσωτερικοί πληθυσμοί ελέγχου. Ως αρνητικός πληθυσμός εσωτερικού ελέγχου ορίζεται το σύνολο των κυττάρων που δεν εκφράζει το αντιγόνο που στοχεύουμε και δεν σημαίνονται όπως ένας αντίστοιχος θετικός πληθυσμός μέσα σε ένα κυτταρικό εναιώρημα. Το πλεονέκτημα του αρνητικού πληθυσμού εσωτερικού ελέγχου είναι ότι τα κύτταρα αυτά έχουν εκτεθεί στις ίδιες συνθήκες με τον υπό μελέτη κυτταρικό πληθυσμό (Hulspas et al., 2009). Για να καθορίσουμε τα αρνητικά όρια για τα επιφανειακά αντιγόνα επιλέχθηκαν οι εξής αρνητικοί πληθυσμοί εσωτερικού ελέγχου (Rawstron et al., 2016) (Πίνακας 6).

Πίνακας 6: *Αρνητικοί πληθυσμοί εσωτερικού ελέγχου*

ΑΝΤΙΓΩΝΟ-ΣΤΟΧΟΣ	ΑΡΝΗΤΙΚΟΣ ΠΛΗΘΥΣΜΟΣ ΕΣΩΤΕΡΙΚΟΥ ΕΛΕΓΧΟΥ
CD138	19+38++ B ΠΡΟΔΡΟΜΑ ΚΥΤΤΑΡΑ
CD27	117+27- ΜΥΕΛΟΓΕΝΗ ΚΥΤΤΑΡΑ
CD38	45+SSChi ΚΟΚΚΙΟΚΥΤΤΑΡΑ
CD56	19+38++ B ΠΡΟΔΡΟΜΑ ΚΥΤΤΑΡΑ
CD45	45-SSClow ΕΡΥΘΡΟΒΛΑΣΤΕΣ
CD19	19-56+ NK ΚΥΤΤΑΡΑ
CD117	117-27+ ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΑ
CD81	45+SSChi ΚΟΚΚΙΟΚΥΤΤΑΡΑ

Σε κάθε περίπτωση, η καταγραφή δεδομένων κατά την ανίχνευση EYN ήταν επιτυχής. Στα EYN δείγματα, η καταγραφή των δεδομένων θεωρήθηκε επιτυχημένη όταν το δείγμα πληρούσε τα κριτήρια ποιότητας και όταν είχε υπάρξει καταγραφή του ελάχιστου απαιτούμενου αριθμού κυττάρων. Αν και εφόσον ανιχνευθεί η EYN τότε μπορεί να υποστηριχθεί ότι έχουμε επαρκή ποιότητα και ολικό αριθμό κυττάρων (Stetler-Stevenson et al., 2016).

Για την ανίχνευση του μικρότερου ομοιογενούς πληθυσμού με κυτταρομετρία ροής νέας γενιάς, τα 20 «συμβάντα» αποτελούν την τιμή αναφοράς ενώ για τον ποσοτικό προσδιορισμό ενός πληθυσμού αντιστοιχούν τα 40 κύτταρα. Το κατώτερο όριο ποσοτικοποίησης (Lower Limit of Quantification, LOQ) και το κατώτερο όριο ανίχνευσης (Lower Limit of Detection, LOD) εξαρτώνται από τον ολικό αριθμό των κυττάρων που αναλύουμε. Το LOD μπορεί να εκτιμηθεί ως 100×20 / συνολικό αριθμό εμπύρηνων ζωντανών κυττάρων που αναλύθηκαν σε μοναδιαίο επίπεδο ενώ αντίστοιχα το LOQ εκτιμάται ως 100×40 /συνολικό αριθμό εμπύρηνων κυττάρων που αναλύθηκαν (Arroz et al., 2016; Burgos and Paiva, 2018).

3.2.7 ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΤΗΣ EYN ΚΑΙ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΟΥ ΜΙΚΡΟΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ ΤΟΥ ΜΥΕΛΟΥ ΤΩΝ ΟΣΤΩΝ ΑΣΘΕΝΩΝ ΜΕ AL ΑΜΥΛΟΕΙΔΩΣΗ

Μετά την επεξεργασία και τη χρώση των δειγμάτων του MO 25 ασθενών με AL αμυλοείδωση, πραγματοποιήθηκε η ανάλυσή τους με Κυτταρομετρία Ροής Νέας Γενιάς προς αξιολόγηση της EYN πριν και μετά τη χορήγηση Δαρατουμουμάμπης. Ταυτόχρονα, πραγματοποιήθηκε και ο χαρακτηρισμός των κλωνικών πλασματοκυττάρων κατά τη διάγνωση, σύμφωνα με τις οδηγίες του Euroflow (Flores-Montero et al., 2017). Η χρώση των κυττάρων πραγματοποιήθηκε μέσω δύο ανεξάρτητων panel επιφανειακών και ενδοκυττάρων δεικτών, οι οποίοι αναφέρονται αναλυτικά στην προηγούμενη ενότητα (**Πίνακας 5**).

Έπειτα, έγινε η ανοσοφαινοτυπική αξιολόγηση των επιφανειακών δεικτών CD19, CD27, CD38, CD45, CD56, CD81, CD117, CD138 και των ενδοκυττάρων κ και λ αλυσίδων ως προς την παρουσία EYN. Εκτός από τα πλασματοκύτταρα, οι παραπάνω δείκτες επέτρεψαν την ταυτοποίηση και μετέπειτα ποσοτικοποίηση των

κυριότερων αιμοποιητικών πληθυσμών ΜΟ (Πίνακας 7) (Paiva, Cedena, et al., 2016) (Terpos et al., 2019). Έτσι, παράλληλα με την αξιολόγηση της EYN, αναλύθηκε και το προφίλ του μικροπεριβάλλοντος του μυελού των οστών για ασθενείς με ΜΟ δείγματα πριν και μετά από 4 κύκλους Δαρατουμουμάμπης. Αναλυτικά, τα υποσύνολα ΜΟ που αναλύθηκαν ήταν: ερυθροβλάστες ($CD45^{-}CD38^{-}SSC^{lo}$) και προγονικά ερυθροειδή κύτταρα ($CD117^{+}CD45^{dim/-}CD38^{dim/-}SSC^{lo}$), μονοκύτταρα ($SSC^{int}CD45^{+}CD38^{+}CD81^{+}$), ηωσινόφιλα ($SSC^{hi}CD45^{bright}CD81^{bright}$), βασεόφιλα ($CD45^{dim}CD38^{+}CD81^{-}$), ουδετερόφιλα ($SSC^{hi}CD45^{+/dim}CD81^{-}$), μαστοκύτταρα ($CD117^{bright}CD45^{dim}$) και προγονικά μυελοειδη κύτταρα ($CD117^{+}CD45^{dim}CD38^{+}SSC^{hi}$), Β κύτταρα ($CD19^{+}CD45^{+/dim}SSC^{lo}$), Τ κύτταρα ($CD45^{+}CD56^{-}CD19^{-}SSC^{lo}$) και σύνολο ΝΚ και ΝΚΤ κυττάρων ($CD45^{+}CD56^{+}CD19^{-}SSC^{lo}$). Τα Β κύτταρα υποδιαιρέθηκαν περαιτέρω σε προγονικά Β κύτταρα ($CD19^{+}CD45^{dim}CD38^{bright}CD27^{-}SSC^{lo}$), παρθένα Β κύτταρα ($CD19^{+}CD45^{+}CD38^{dim/-}CD27^{-}SSC^{lo}$) και Β κύτταρα μνήμης ($CD19^{+}CD45^{+}CD38^{dim/-}CD27^{+}SSC^{lo}$), ενώ επίσης αναλύθηκαν τα $CD27^{+}$ Τ και ΝΚ/ΝΚΤ κύτταρα, ($CD45^{+}CD56^{-}CD19^{-}CD27^{+}SSC^{lo}$ και $CD45^{+}CD56^{+}CD19^{-}CD27^{+}SSC^{lo}$), αντίστοιχα.

Όλοι οι γονικοί (parent) πληθυσμοί εκτιμήθηκαν ως το σχετικό ποσοστό των συνολικών εμπύρηνων ΜΟ κυττάρων, ενώ οι υποπληθυσμοί των τριών κύριων λεμφοειδών πληθυσμών αξιολογήθηκαν ως προς το σχετικό ποσοστό του αντίστοιχου γονικού πληθυσμού τους. Οι παραπάνω 17 αιμοποιητικοί πληθυσμοί αποτελούν συνδυαστικά το εξατομικευμένο ΜΟ μικροπεριβάλλον κάθε ασθενούς. Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε με το λογισμικό Infinicyt (Cytognos S. L., Salamanka, Spain), το οποίο επιτρέπει τη συγχώνευση των δύο ανεξάρτητων panels.

Πίνακας 7: Αιμοποιητικοί πληθυσμοί που αναλύθηκαν σε κάθε δείγμα πλιν των πλασματοκυττάρων

Πληθυσμοί	CD19	CD27	CD38	CD45	CD56	CD81	CD117	SSC
B κύτταρα	+			dim/+				low
Παρθένα B κύτταρα	+	-	-/dim	+				low
Προγονικά B κύτταρα	+	-	bright	dim				low
B κύτταρα μνήμης	+	+	-/dim	+				low
T κύτταρα	-			+	-			low
CD27 ⁺ T κύτταρα	-	+		+	-			low
NK & NKT κύτταρα	-			+	+			low
CD27 ⁺ NK & NKT κύτταρα	-	+		+	+			low
Βασεόφιλα			+	dim		-		
Ηωσινόφιλα				bright		bright		high
Ουδετερόφιλα				dim		-		high
Μονοκύτταρα			+	+		+		intermediate
Μαστοκύτταρα				dim			bright	
Προγονικά μυελοειδή κύτταρα			+	dim			+	high
Ερυθροβλάστες			-	-				low
Προγονικά ερυθροειδή κύτταρα			-/dim	-/dim			+	low

3.2.8 ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

Η στατιστική ανάλυση διενεργήθηκε με το στατιστικό πρόγραμμα GraphPad Prism έκδοση 8.0.2 (λογισμικό GraphPad, La Jolla, CA). Βάσει της κατανομής που ακολουθούν οι τιμές της εκάστοτε μεταβλητής, εξετάζονται για τον έλεγχο της κανονικότητας με τη χρήση του D'Agostino-Pearson test, ενώ οι διαφορές μεταξύ των ομάδων εξετάστηκαν με τη χρήση παραμετρικών ελέγχων όπως t-test ή paired t-test ή με μη παραμετρικούς ελέγχους όπως η δοκιμή των Mann-Whitney ή το test Wilcoxon (Wilcoxon matched-pair signed test). Πριν την οποιαδήποτε στατιστική αξιολόγηση των δεδομένων μας, οι ακραίες τιμές εξαιρέθηκαν με τη χρήση της μεθόδου ROUT (με Q = 1%). Όλες οι αναλύσεις ήταν αμφίπλευρες, ενώ το επίπεδο σημαντικότητας ορίστηκε βάσει $p < 0,05$.

4 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

4.1 ΣΤΡΑΤΗΓΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΜΥΕΛΟΥ ΤΩΝ ΟΣΤΩΝ ΑΣΘΕΝΩΝ ΜΕ AL ΓΙΑ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΕΥΝ ΜΕ NGF

Στο πρώτο στάδιο της ανάλυσης, χρησιμοποιούνται τα σκεδαστικά χαρακτηριστικά των κυττάρων που καταγράφηκαν προκειμένου να απομακρύνουμε τις διπλέτες (doublets) και τα κυτταρικά υπολείμματα (cellular debris). Η απομάκρυνση των υπολειμμάτων πραγματοποιείται μέσω της αφαίρεσης των «γεγονότων» που παρουσιάζουν χαμηλές FSC τιμές στο στικτόγραμμα FSC-A/SSC-A, ενώ οι διπλέτες αφαιρούνται με τη χρήση του στικτογράμματος FSC-A/FSC-H. Η απομάκρυνση των παραπάνω, είναι πολύ σημαντική προκειμένου να επιτύχουμε μια ορθή και ακριβή ποσοτικοποίηση σε όλους του κυτταρικούς πληθυσμούς του μυελού των οστών, συμπεριλαμβανομένων και των κλωνικών πλασματοκυττάρων.

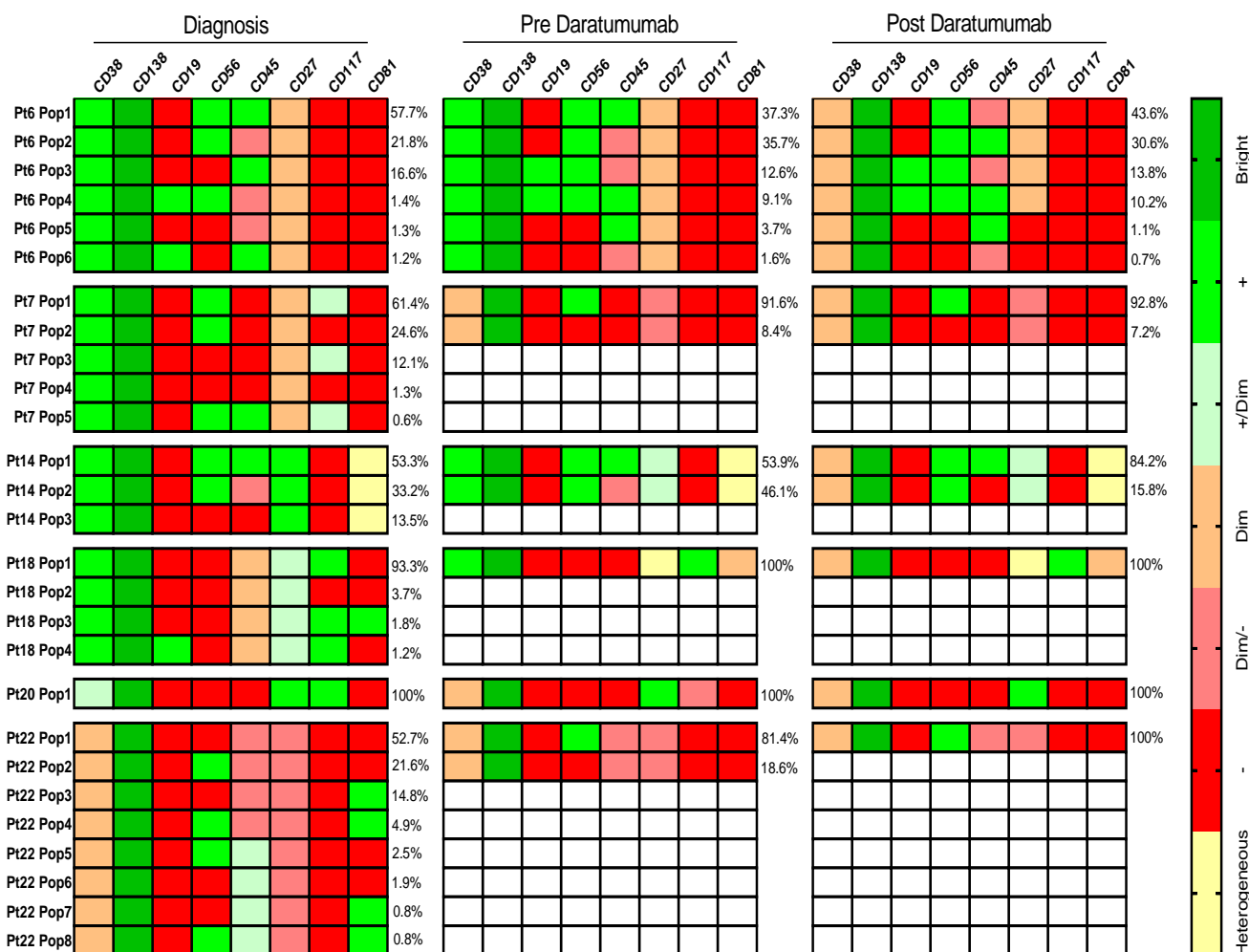
Εν συνεχεία, πραγματοποιείται η απομόνωση των πλασματοκυττάρων από το σύνολο των εμπύρηνων κυττάρων του μυελού, χρησιμοποιώντας τα διαγράμματα CD38/CD138 και CD38/CD45. Στο πρώτο διάγραμμα επιτυγχάνεται η ανάκτηση των περισσότερων πλασματοκυττάρων, ενώ στο δεύτερο γίνεται ο περαιτέρω περιορισμός που εξειδικεύει την επιλογή. Η εφαρμογή μιας AND Boolean gate θεωρείται κομβική κίνηση ως προς την στρατηγική μιας ανάλυσης, καθώς επιλέγει ως πλασματοκύτταρα τα γεγονότα που συναντώνται στην τομή των δύο περιοχών που επιλέγονται στα δύο παραπάνω διαγράμματα. Έτσι, ανακτάται ο μέγιστος αριθμός πλασματοκυττάρων, απομακρύνοντας ταυτόχρονα άλλους πληθυσμούς που λόγω μη ειδικής δέσμευσης φθοριζόντων αντισωμάτων και αυτοφθορισμού, παρουσιάζουν αυξημένη έκφραση στο δείκτη CD138.

Έπειτα, με βάση την έκφραση των CD19 και CD56 δεικτών, τα πλασματοκύτταρα διακρίνονται σε 4 υποπληθυσμούς (CD19+CD56⁻, CD19-CD56⁺, CD19+CD56⁺ και CD19-CD56⁻), οι οποίοι με τη σειρά τους αξιολογούνται περαιτέρω με βάση τόσο την έκφραση των επιφανειακών CD27, CD38, CD45, CD81 και CD117, όσο και του κλωνικού περιορισμού (λόγος κ/λ υπερβαίνει το 10 ή υπολείπεται της τιμής 1/10), ο οποίος εκτιμάται μέσω της έκφρασης των ενδοκυττάρων κ και λ ελαφριών αλυσίδων.

4.2 ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΤΗΣ ΕΥΝ ΚΑΙ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΟΥ ΜΙΚΡΟΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ ΤΟΥ ΜΥΕΛΟΥ ΤΩΝ ΟΣΤΩΝ ΑΣΘΕΝΩΝ ΜΕ AL ΑΜΥΛΟΕΙΔΩΣΗ ΠΡΙΝ ΚΑΙ ΜΕΤΑ ΤΗ ΧΟΡΗΓΗΣΗ ΔΑΡΑΤΟΥΜΟΥΜΑΜΠΗΣ

Αφού ελήφθησαν δείγματα ΜΟ από 25 ασθενείς με AL αμυλοείδωση κατά τη διάγνωση, μετά την ολοκλήρωση θεραπείας πρώτης γραμμής με βάση τη βορτεζομίμη και μετά από 4 κύκλους θεραπείας εδραίωσης με Δαρατουμουμάμπη, ακολούθησε η ανάλυση των δειγμάτων αυτών με Κυτταρομετρία Ροής Νέας Γενιάς. Αρχικός σκοπός της ανάλυσης αυτής ήταν η αξιολόγηση της ΕΥΝ πριν και μετά τη χορήγηση Δαρατουμουμάμπης. Πριν από τη χορήγηση του φαρμάκου, 20/22 ασθενείς βρέθηκαν ΕΥΝ⁺, ενώ μετά τη λήψη Δαρατουμουμάμπης η αντίστοιχη αναλογία ήταν 19/24. Από το σύνολο των ασθενών, 21 είχαν διαθέσιμο δείγμα ΜΟ πριν και μετά τη χορήγηση Δαρατουμουμάμπης. Δέκα εννιά από τους 21 ασθενείς βρέθηκαν ΕΥΝ⁺ πριν τη χορήγηση της Δαρατουμουμάμπης, ενώ 18/19 παρέμειναν θετικοί και μετά τη λήψη του φαρμάκου.

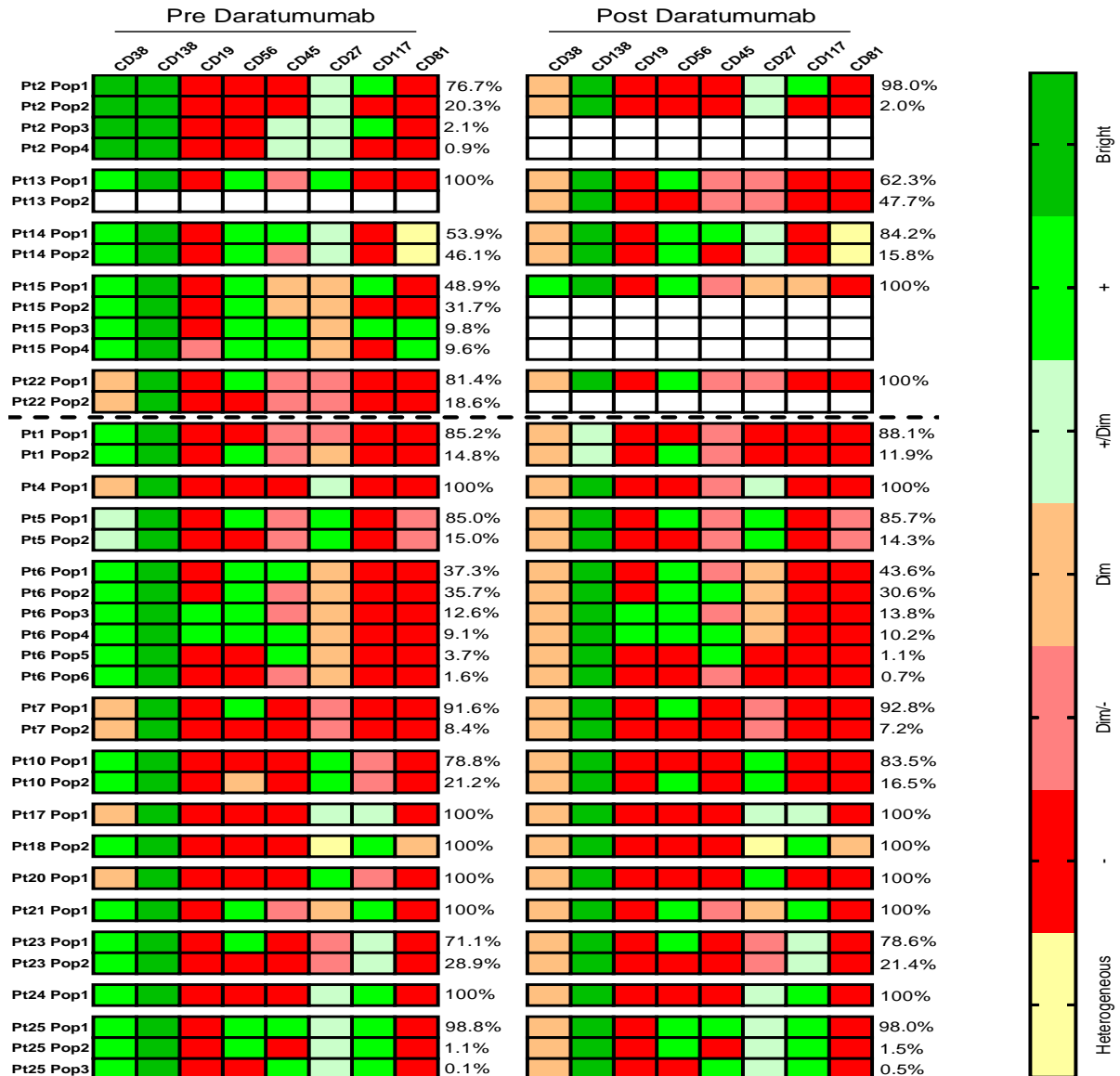
Παράλληλα με την ανίχνευση της ΕΥΝ, έγινε και ο χαρακτηρισμός των κλωνικών πλασματοκυττάρων σύμφωνα με το Euroflow, μέσω της ανοσοφαινοτυπικής αξιολόγησης των επιφανειακών δεικτών CD19, CD27, CD38, CD45, CD56, CD81, CD117, CD138 και των ενδοκυττάρων κάπα (κ) και λάμδα (λ) αλυσίδων στα δείγματα ΜΟ των ΕΥΝ⁺ ασθενών. Μάλιστα, ενδιαφέρον παρουσιάζουν 6 περιστατικά ασθενών, οι οποίοι παρέμειναν ΕΥΝ⁺ μετά από 4 κύκλους Δαρατουμουμάμπης. Αλλαγές παρατηρήθηκαν στη σύσταση του κλωνικού πλασματοκυτταρικού πληθυσμού και των 6 ασθενών μεταξύ των 3 φάσεων (διάγνωση, πριν και μετά τη χορήγηση Δαρατουμουμάμπης), αλλά ιδιαίτερα μετά από τη θεραπεία πρώτης γραμμής (**Εικόνα 12**).



Εικόνα 12: Ανοσοφαινότυπος των κλωνικών πλασματοκυττάρων κατά τη διάγνωση, πριν (pre) και μετά (post) τη θεραπεία με Δαρατουμουμάμπη (Daratumumab). Εμφανίζονται 6 ασθενείς (αριθμοί 6, 7, 14, 18, 20 και 22) που παρέμειναν EYN⁺ μετά από 4 κύκλους Δαρατουμουμάμπης. Κάθε «κουτί» (block) αντιπροσωπεύει το κλωνικό πλασματοκυτταρικό πληθυσμό ενός ασθενούς. Οι διαφορετικές σειρές απεικονίζουν την έκφραση των CD δεικτών σε φαινοτυπικά διακριτούς υποπληθυσμούς ανά ασθενή. Τα χρώματα του heatmap χαρτογραφήθηκαν γραμμικά όπως φαίνεται στο υπόμνημα (αρνητικό με κόκκινο, θετικό/bright με πράσινο). Τα ποσοστά που αναγράφονται δίπλα στις σειρές αναφέρονται στους κλωνικούς υποπληθυσμούς που ανιχνεύθηκαν στο παθολογικό πλασματοκυτταρικό διαμέρισμα (compartment). Pt, ασθενής; Pop, πληθυσμός.

Ακόμη, σε 17/18 EYN⁺ ασθενείς, η έκφραση του δείκτη CD38 επί των κλωνικών κυττάρων μετά τη λήψη Δαρατουμουμάμπης παρουσίασε μείωση. Σε 5/18 ασθενείς παρατηρήθηκαν κάποιες ακόμη αλλαγές στη σύσταση του παθολογικού πλασματοκυτταρικού πληθυσμού σχετικά με το ποσοστό των φαινοτυπικά διακριτών

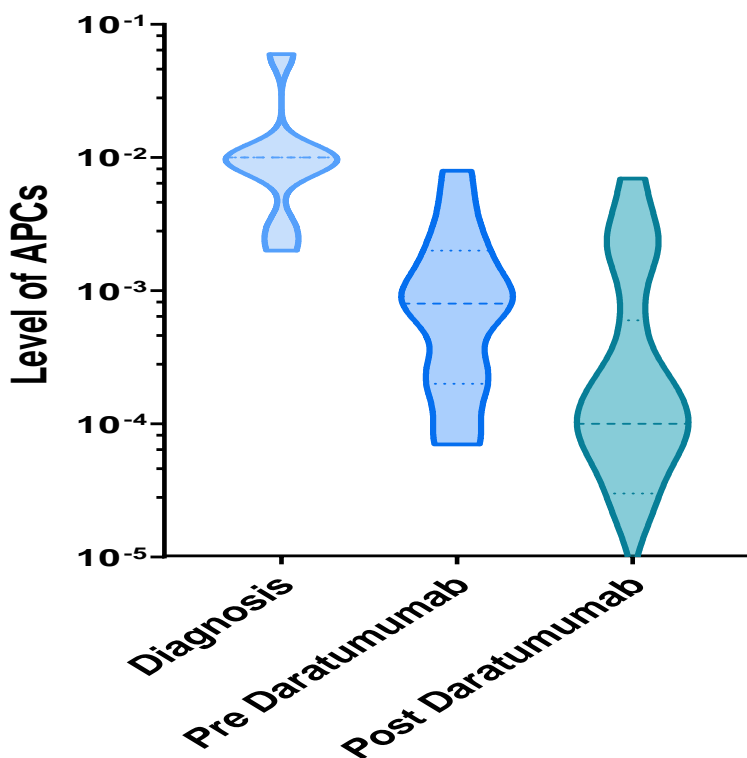
υποπληθυσμών επί του συνόλου των κλωνικών κυττάρων κάθε ασθενούς. Αυτοί παρουσιάζονται πάνω από τη διακεκομμένη γραμμή στην παρακάτω εικόνα (ασθενείς 2, 13,14, 15, 22) (Εικόνα 13).



Εικόνα 13: Ανοσοφαινότυποι των κλωνικών πλασματοκυττάρων πριν και μετά τη χορήγηση Δαρατουμουμάμπης στους 18 ασθενείς (1, 2, 4, 5, 6, 7, 10, 13, 14, 15, 17, 18, 20, 21, 22, 23, 24 και 25) που παρέμειναν EYN⁺ μετά από 4 κύκλους Δαρατουμουμάμπης. Κάθε παραλληλόγραμμο αναπαριστά έναν ασθενή και κάθε σειρά αφορά έναν φαινοτυπικά διακριτό κλωνικό πληθυσμό. Δίπλα από κάθε σειρά αναγράφεται το ποσοστό του εκάστοτε πληθυσμού επί του συνόλου των κλωνικών κυττάρων. Με διαφορετικά χρώματα δείχνονται τα διαφορετικά επίπεδα έκφρασης των δεικτών που μελετήθηκαν. Πάνω από τη διακεκομμένη γραμμή

βρίσκονται οι ασθενείς στους οποίους η χορήγηση Δαρατουμουμάμπης οδήγησε σε αλλαγές στη σύσταση του κλωνικού πληθυσμού. Pt, ασθενής; Pop, πληθυσμός.

Επιπλέον, σημαντικό είναι το γεγονός ότι η χορήγηση της Δαρατουμουμάμπης οδήγησε σε υποδεκαπλασιασμό του διάμεσου φορτίου της νόσου των ασθενών όπως παρουσιάζεται στο παρακάτω διάγραμμα (Εικόνα 14).



Εικόνα 14: Το ποσοστό των κλωνικών πλασματοκυττάρων (APCs) των 25 ασθενών που μελετήθηκαν κατά τη διάγνωση, πριν και μετά τη χορήγηση Δαρατουμουμάμπης. Οι διακεκομμένες γραμμές αναπαριστούν τις διαμέσους, ενώ οι στικτές γραμμές αφορούν το 1^ο και 3^ο εκατοστημόριο. Μετά από κάθε γραμμή θεραπείας, παρατηρείται υποδεκαπλασιασμός των διαμέσων.

Η αξιολόγηση των δεικτών μάς έδωσε επίσης τη δυνατότητα να μελετήσουμε το μικροπεριβάλλον του μυελού των οστών στους ασθενείς με διαθέσιμο δείγμα ΜΟ πριν και μετά τους 4 κύκλους θεραπείας με Δαρατουμουμάμπη. Έτσι, βασιζόμενοι στα FCS αρχεία που αποκτήσαμε από το πρωτόκολλο επεξεργασίας και χρώσης των δειγμάτων που αναλύθηκαν προς ανίχνευση της ΕΥΝ, ταυτοποιήσαμε και ποσοτικοποιήσαμε 17 διαφορετικούς αιμοποιητικούς κυτταρικούς πληθυσμούς του

ΜΟ, προσδιορίζοντας τα ποσοστά τους επί του συνόλου των εμπύρηνων κυττάρων του ΜΟ. Ακόμη, υπολογίσαμε τα ποσοστά 3 διαφορετικών υποπληθυσμών των Β κυττάρων επί του συνόλου των εμπύρηνων κυττάρων του ΜΟ, αλλά και επί των ολικών Β κυττάρων, καθώς και το ποσοστό των CD27⁺ Τ και NK & NKT κυττάρων, επί των ολικών Τ και NK & NKT κυττάρων, αντίστοιχα, αλλά και επί των ολικών εμπύρηνων κυττάρων του ΜΟ. Με βάση τα παραπάνω, κατασκευάσαμε το εξατομικευμένο ΜΟ προφίλ κάθε ασθενούς σε σχέση με τη χορήγηση Δαρατουμουμάμπης. Τα κυτταρικά υποσύνολα του μυελού των οστών που ταυτοποιήθηκαν έχουν αναφερθεί αναλυτικά σε προηγούμενη ενότητα. Στους πίνακες που ακολουθούν παρουσιάζονται τα κυτταρικά υποσύνολα ΜΟ που μελετήθηκαν, οι ανοσοφαινότυποί τους οι οποίοι προέκυψαν μέσα από την αξιολόγηση των δεικτών για την ανίχνευση της ΕΥΝ και η στατιστική σημαντικότητα της διαφοράς μεταξύ: **α)** του σχετικού ποσοστού των κυτταρικών πληθυσμών και υποπληθυσμών πριν και μετά τους 4 κύκλους Δαρατουμουμάμπης (**Πίνακας 8**) και **β)** των σχετικών ποσοστών των κυτταρικών πληθυσμών μεταξύ των ασθενών που ανιχνεύθηκαν ως ΕΥΝ⁺ και ΕΥΝ⁻ μετά από 4 κύκλους θεραπείας Δαρατουμουμάμπης (**Πίνακας 9**).

Πιο αναλυτικά:

Στην αρχή, ακολουθείται η στρατηγική ανάλυσης προς ανίχνευση της ΕΥΝ όπως περιγράφεται σε προηγούμενη ενότητα. Έπειτα, γίνεται ο προσδιορισμός: α) των ανοσοφαινοτυπικών χαρακτηριστικών των κλωνικών κυττάρων στα ΕΥΝ⁺ δείγματα και β) του φορτίου της νόσου. Στη συνέχεια, πραγματοποιείται η ταυτοποίηση και η ποσοτικοποίηση των υποσυνόλων στο ΜΟ με βάση τον ανοσοφαινότυπό τους. Τέλος, υπολογίζεται η μέση τιμή (mean) **α)** του ποσοστού κάθε κυτταρικού υποσυνόλου στο ΜΟ, επί του συνόλου των εμπύρηνων κυττάρων του μυελού των οστών και **β)** του ποσοστού των Β υποπληθυσμών, επί των ολικών Β στους ΕΥΝ θετικούς και αρνητικούς ασθενείς .

Πίνακας 8: Τα υποσύνολα στο ΜΟ που αναλύθηκαν με το πάνελ 8 χρωμάτων προς ανίχνευση της ΕΥΝ, ο ανοσοφαινότυπός τους και η στατιστική σημαντικότητα (p value) της διαφοράς μεταξύ του ποσοστού των ΜΟ υποσυνόλων πριν και μετά τους 4 κύκλους Δαρατουμουμάμπης.

BM Subsets	Immunophenotype	Pre Daratumumab Mean (±SD)	Post Daratumumab Mean (±SD)	P value
B cells*	CD19 ⁺ CD45 ^{dim} +SSC ^{lo}	1,371% (± 1.253%)	1,414% (± 1,146%)	ns
B cell precursors**	CD19 ⁺ CD45 ^{dim} CD38 ^{bright} CD27 ⁻	14,32% (± 11,75%)	34,76% (± 24,11%)	0,0004
Naïve B cells	CD19 ⁺ CD45 ⁺ CD38 ^{-dim} CD27 ⁻	68,58% (± 17,56%)	47,37% (± 22,66%)	0,0003
Memory B cells	CD19 ⁺ CD45 ⁺ CD38 ^{-dim} CD27 ⁺	12,99% (± 13,75%)	13,86% (± 13,74%)	ns
T cells	CD45 ⁺ CD56 ⁻ CD19 ⁻ SSC ^{lo}	6,435% (± 2,776%)	10,86% (± 6,407%)	0.0007
CD27 ⁺ T cells	CD45 ⁺ CD56 ⁻ CD19 ⁻ CD27 ⁺ SSC ^{lo}	63,82% (± 19,72%)	63,41% (± 21,08%)	ns
NK & NKT cells	CD45 ⁺ CD56 ⁺ CD19 ⁻ SSC ^{lo}	2,516% (± 1,716%)	2,152% (± 1,655%)	ns
CD27 ⁺ NK & NKT cells	CD45 ⁺ CD56 ⁺ CD19 ⁻ CD27 ⁺ SSC ^{lo}	15,65% (± 13,5%)	36,34% (± 24,43%)	0,0002
Basophils	CD38 ⁺ CD81 ⁻ CD45 ^{dim}	0,2786% (± 0,2117%)	0,4036% (± 0,2176%)	ns
Neutrophils	CD45 ^{dim} CD81 ⁺ SSC ^{hi}	75,51% (± 9,574%)	72,56% (± 6,882%)	ns
Eosinophils	CD45 ^{bright} CD81 ^{bright} SSC ^{hi}	0,45% (± 0,29%)	0,41% (± 0,29%)	ns
Monocytes	CD45 ⁺ CD81 ⁺ CD38 ⁺ SSC ^{int}	5,898% (± 3,584%)	6,400% (± 2,019%)	ns
Mast cells	CD117 ^{bright} CD45 ^{dim}	0,009222% (± 0,01226%)	0,01056% (± 0,01162%)	0.0020
Myeloid progenitors	CD117 ⁺ CD38 ⁺ CD45 ^{dim} SSC ^{hi}	0,84% (± 0,52%)	1,08% (± 0,72%)	ns
Erythroblasts	CD45 ⁺ CD38 ⁺ SSC ^{lo}	1,82% (± 0,97%)	2,41% (± 1,03%)	0,076
Erythroid progenitors	CD117 ⁺ CD38 ^{-dim} CD45 ^{-dim} SSC ^{lo}	0,24% (± 0,1%)	0,35% (± 0,19%)	ns

* Οι γονικοί πληθυσμοί υπολογίστηκαν ως το σχετικό ποσοστό των συνολικών εμπύρηνων κυττάρων του μυελού των οστών.

** Οι υποπληθυσμοί των γονικών πληθυσμών (με πλάγιους χαρακτήρες) υπολογίστηκαν ως το σχετικό ποσοστό του αντίστοιχου γονικού πληθυσμού. BM, μυελός των οστών; SD, τυπική απόκλιση; lo, χαμηλό; int, ενδιάμεσο; hi, υψηλό; ns, μη στατιστικά σημαντικό.

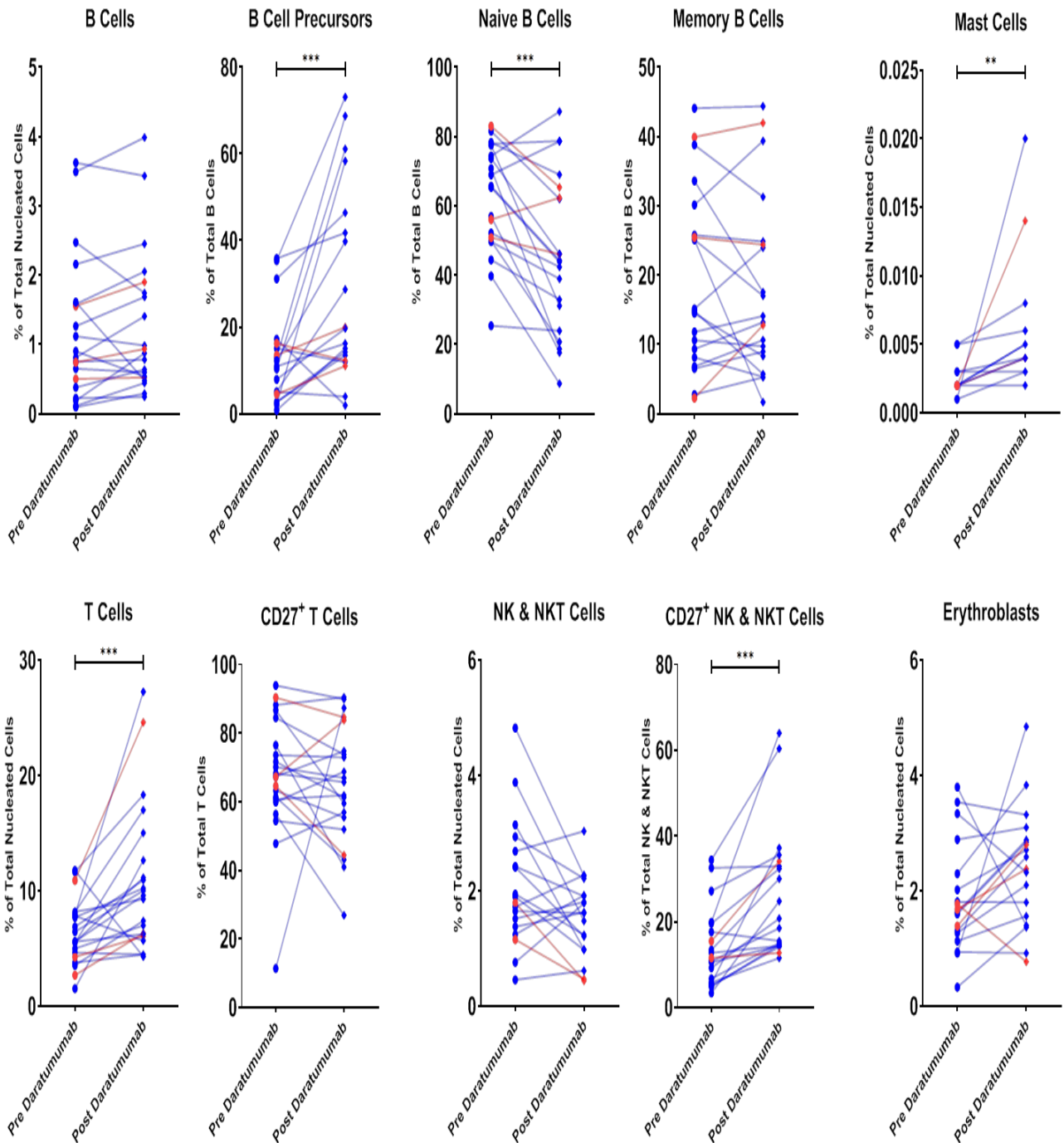
Πίνακας 9: Τα υποσύνολα του ΜΟ που αναλύθηκαν προς ανίχνευση EYN, ο ανοσοφαινότυπος τους και η στατιστική σημαντικότητα (p value) της διαφοράς των σχετικών ποσοτών μεταξύ των ασθενών που ανιχνεύθηκαν ως EYN⁺ και EYN⁻ μετά από 4 κύκλους θεραπείας Δαρατουμουμάμπης.

BM Subsets	Immunophenotype	MRD ⁺ Post Daratumumab Mean (±SD) (n=17)	MRD ⁻ Post Daratumumab Mean (±SD) (n=5)	P value
B cells*	CD19 ⁺ CD45 ^{dim/+} SSC ^{lo}	1,41% (± 1,06%)	0,97% (± 0,54%)	ns
B cell precursors**	CD19 ⁺ CD45 ^{dim} CD38 ^{bright} CD27 ⁻	38,62% (± 25,92%)	30,24% (± 23,79%)	ns
Naïve B cells	CD19 ⁺ CD45 ⁺ CD38 ^{-/dim} CD27 ⁻	44,35% (± 23,87%)	50,85% (± 17,26%)	ns
Memory B cells	CD19 ⁺ CD45 ⁺ CD38 ^{-/dim} CD27 ⁺	12,53% (± 14,28%)	18,37% (± 17,07%)	ns
T cells	CD45 ⁺ CD56 ⁻ CD19 ⁻ SSC ^{lo}	10,67% (± 6,25%)	10,78% (± 7,94%)	ns
CD27 ⁺ T cells	CD45 ⁺ CD56 ⁻ CD19 ⁻ CD27 ⁺ SSC ^{lo}	62,78% (± 17,12%)	70,85% (± 16,98%)	ns
NK & NKT cells	CD45 ⁺ CD56 ⁺ CD19 ⁻ SSC ^{lo}	1,67% (± 0,64%)	1,92% (± 2,44%)	ns
CD27 ⁺ NK & NKT cells	CD45 ⁺ CD56 ⁺ CD19 ⁻ CD27 ⁺ SSC ^{lo}	34,03% (± 19,84%)	37,05% (± 25,38%)	ns
Basophils	CD38 ⁺ CD81 ⁻ CD45 ^{dim}	0,28% (± 0,13%)	0,37% (± 0,22%)	ns
Neutrophils	CD45 ^{dim} CD81 ⁻ SSC ^{hi}	72,65% (± 5,69%)	70,96% (± 11,57%)	ns
Eosinophils	CD45 ^{bright} CD81 ^{bright} SSC ^{hi}	0,44% (± 0,14%)	0,52% (± 0,08%)	ns
Monocytes	CD45 ⁺ CD81 ⁺ CD38 ⁺ SSC ^{int}	7,24% (± 1,83%)	5,31% (± 2,28%)	ns
Mast cells	CD117 ^{bright} CD45 ^{dim}	0,0073% (± 0,0053%)	0,0120% (± 0,0112%)	ns
Myeloid progenitors	CD117 ⁺ CD38 ⁺ CD45 ^{dim} SSC ^{hi}	1,19% (± 0,73%)	1,32% (± 0,90%)	ns
Erythroblasts	CD45 ⁻ CD38 ⁻ SSC ^{lo}	2,57% (± 1,04%)	1,64% (± 0,89%)	0.1128
Erythroid progenitors	CD117 ⁺ CD38 ^{-/dim} CD45 ^{-/dim} SSC ^{lo}	0,39% (± 0,18%)	0,30% (± 0,27%)	ns

* Οι γονικοί πληθυσμοί υπολογίστηκαν ως το σχετικό ποσοστό των συνολικών εμπύρηνων κυττάρων του μυελού των οστών.

** Οι υποπληθυσμοί των γονικών πληθυσμών (με πλάγιους χαρακτήρες) υπολογίστηκαν ως το σχετικό ποσοστό του αντίστοιχου γονικού πληθυσμού. BM, μυελός των οστών; n, αριθμός δειγμάτων; lo, χαμηλό; int, ενδιάμεσο; hi, υψηλό; ns, μη στατιστικά σημαντικό.

Με βάση τα αποτελέσματα που παρατίθενται στον **Πίνακα 8**, φαίνεται πως η Δαρατουμουμάμπη μεταβάλλει το μικροπεριβάλλον του ΜΟ αφού παρατηρείται αύξηση του ποσοστού των Τ κυττάρων ($p=0.0007$), των CD27⁺ NK και NKT κυττάρων ($p=0.0002$), των προγονικών Β κυττάρων ($p=0.0004$), των μαστοκυττάρων ($p=0.0020$) αλλά και μία τάση προς αύξηση των ερυθροβλαστών ($p=0.076$). Αντίστοιχα, παρατηρείται μια στατιστικά σημαντική μείωση στο ποσοστό των παρθένων Β κυττάρων ($p=0.0003$) (**Εικόνα 15**).

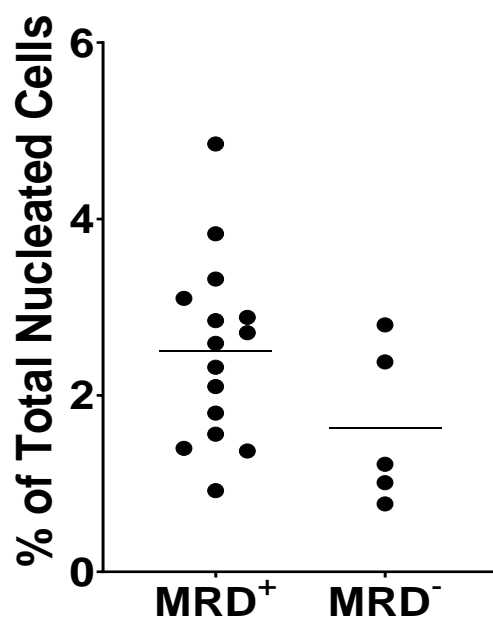


Εικόνα 15: Διαφορές στη μικροπεριβάλλον του μυελού των οστών πριν και μετά τη χορήγηση Δαρατουμουμάμπης. Η Δαρατουμουμάμπη συσχετίστηκε με: αύξηση του ποσοστού των προδρόμων B κυττάρων και αντίστοιχη μείωση των παρθένων B κυττάρων μεταξύ του συνολικού αριθμού των B κυττάρων που παρέμεινε σταθερός (A), αύξηση του ποσοστού των T κυττάρων (B), σαφή επικράτηση των κυτταρικών υποπληθυσμών CD27⁺ NK & NKT κυττάρων (C),· αύξηση του ποσοστού των μαστοκυττάρων (D), τάση αύξησης του ποσοστού των ερυθροβλαστών (E). Κάθε σημείο αντιπροσωπεύει έναν ασθενή. Με μπλε χρώμα αναπαρίστανται οι ασθενείς που παρέμειναν EYN⁺ μετά τη χορήγηση Δαρατουμουμάμπης ενώ με κόκκινο χρώμα όσοι χαρακτηρίστηκαν EYN⁻ μετά τη χορήγηση του φαρμάκου .***, p<0,001.

Με βάση τα διαγράμματα που παρουσιάζονται στην **Εικόνα 15**, φαίνεται πως οι τάσεις που παρατηρούνται είναι ανεξάρτητες της EYN και ότι πιθανά η παρουσία/απουσία της δεν επιδρά στο μικροπεριβάλλον του ΜΟ, λόγω του μικρού αριθμού EYN⁻ δειγμάτων.

Για κάθε κυτταρικό πληθυσμό και υποπληθυσμό ΜΟ που ταυτοποιήθηκε και ποσοτικοποιήθηκε, συγκρίθηκαν οι τιμές που αντιστοιχούσαν στους ασθενείς που παρέμειναν EYN⁺ και μετά τους 4 κύκλους Δαρατουμουμάμπης, καθώς και σε αυτούς που έγιναν EYN⁻ μετά τη θεραπεία. Τα αποτελέσματα έδειξαν πως δεν υπάρχει καμία στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των σχετικών ποσοστών των δύο ομάδων ασθενών σε κανέναν κυτταρικό πληθυσμό ή υποπληθυσμό ΜΟ. Εξάιρεση αποτέλεσαν οι ερυθροβλάστες (**Πίνακας 9, Εικόνα 16**), οι οποίοι ανέδειξαν μια τάση υπεροχής στους EYN⁺ ασθενείς (p=0.1128).

Erythroblasts Post Daratumumab



Εικόνα 16 : Σε ασθενείς που παρέμειναν EYN + σε σύγκριση με ασθενείς που έγιναν EYN⁻ μετά από 4 κύκλους Δαρατουμουμάμπης, παρατηρείται μία τάση προς υψηλότερα ποσοστά ερυθροβλαστών. Κάθε σημείο (point) αντιπροσωπεύει έναν ασθενή ενώ οι οριζόντιες γραμμές αντιπροσωπεύουν τις μέσες τιμές (means).

5 ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η AL αμυλοείδωση είναι μια αιματολογική κακοήθεια η οποία πλήττει το 70% των ασθενών που πάσχουν από κάποια μορφή αμυλοείδωσης και η επίπτωσή της αυξάνεται όσο μεγαλώνει η ηλικία (Vaxman and Gertz, 2019). Κατατάσσεται μεταξύ των πλασματοκυτταρικών δυσκρασιών, μίας ομάδας αιματολογικών παθήσεων οι οποίες χαρακτηρίζονται από τον ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό ενός κλωνικού πλασματοκυτταρικού πληθυσμού που παράγει μονοκλωνική ανοσοσφαιρίνη ή τμήματα αυτής (Soh et al., 2017). Η ασθένεια αυτή χαρακτηρίζεται από την εξωκυττάρια εναπόθεση μονοκλωνικών ελαφριών αλυσίδων με δομή β-φύλλου (FLC) τις οποίες παράγει ένας κακοήθης πλασματοκυτταρικός κλώνος στο μυελό των οστών (Eli Muchtar, Buadi, Dispenzieri, et al., 2016). Τόσο η εναπόθεση των αδιάλυτων ινιδίων, όσο και η άμεση τοξικότητα των ίδιων των FLCs (Thomas et al., 2019) οδηγούν σταδιακά σε σοβαρή δυσλειτουργία των οργάνων, όπως της καρδιάς και των νεφρών (Dittrich et al., 2017). Ωστόσο, η δυσκολία στην AL αμυλοείδωση συναντάται τόσο στην κλινική της εικόνα, η οποία ποικίλει και μπορεί να μιμηθεί κοινές ασθένειες του γήρατος, οδηγώντας σε καθυστερημένη ή και αδύνατη διάγνωση, όσο και στην ετερογένεια ως προς τον βαθμό προσβολής των οργάνων (Palladini and Merlini., 2019), αλλά και το επίπεδο της συνολικής επιβίωσης των ασθενών. Ενώ ένα ποσοστό AL ασθενών ζουν αρκετά μεγάλο χρονικό διάστημα έτσι ώστε να μπορούν να ολοκληρώσουν τη θεραπεία και μετέπειτα να αξιολογηθούν για την ανταπόκριση σε αυτή, το 20-30% καταλήγει σε 3-6 μήνες από την έναρξη της θεραπείας, καθώς συνήθως το στάδιο της νόσου είναι αρκετά προχωρημένο για να επιτρέψει οποιαδήποτε αιματολογική ανταπόκριση που θα βελτίωνε το ποσοστό της συνολικής επιβίωσης (Milani, Merlini, et al., 2018; Kastritis, Roussou, Ganviatoroulou, et al., 2015). Επιπλέον, υπάρχει και ένα σημαντικό ποσοστό ασθενών οι οποίοι επιτυγχάνουν βελτίωση της συνολικής επιβίωσης που σχετίζεται με καλή αιματολογική ανταπόκριση, αλλά δεν έχουν αντίστοιχη βελτίωση ως προς την οργανική ανταπόκριση, για αυτό και μερικοί από αυτούς υποτροπιάζουν.

Για το λόγο αυτό, η πλήρης αιματολογική ανταπόκριση θεωρείται απαραίτητη για τη βελτίωση της πρόγνωσης των AL ασθενών, απαιτείται όμως και η ανάπτυξη μεθόδων υψηλής ευαισθησίας για τον προσδιορισμό της βαθιάς κλωνικής απόκρισης στη θεραπεία της νόσου αυτής (Milani, Palladini, et al., 2018; Hwa et al., 2017).

Το CD38 είναι μια διαμεμβρανική γλυκοπρωτεΐνη τύπου II, που μεσολαβεί τη μεταγωγή σήματος σε λεμφοειδή και μυελοειδή κύτταρα και ανευρίσκεται σε υψηλά επίπεδα έκφρασης στα παθολογικά πλασματοκύτταρα ασθενών με AL αμυλοείδωση (Lisenko et al., 2016). Νεότερες θεραπείες, όπως το πολλά υποσχόμενο μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι του CD38 Δαρατουμουμάμπη (Daratumumab), μπορεί να επιτύχουν βαθύτερες ανταποκρίσεις σε ασθενείς με AL αμυλοείδωση. Ευρήματα διαφόρων πρόσφατων μελετών υποστηρίζουν ότι η Δαρατουμουμάμπη είναι μια καλά ανεκτή και αποτελεσματική θεραπεία που οδηγεί σε γρήγορες και βαθιές αιματολογικές αποκρίσεις, τόσο σε AL ασθενείς που έχουν υποβληθεί σε προηγούμενη θεραπεία (Santhorawala et al., 2018), όσο και σε ασθενείς που πάσχουν από υποτροπιάζουσα ή ανθεκτική AL αμυλοείδωση (Abeykoon et al., 2019; Lecumberri, Ramon et al., 2020).

Ωστόσο, υπάρχει ανάγκη ανάπτυξης βιοδεικτών για την ανίχνευση και την εκτίμηση της παρουσίας ελάχιστης υπολειμματικής νόσου (EYN), που επιβαρύνει τη λειτουργία οργάνων όπως η καρδιά και οι νεφροί, ακόμα και σε ασθενείς που βρίσκονται σε πλήρη ύφεση (CR). Μάλιστα, υποστηρίζεται ότι η μη πλήρης εξάλειψη των κλωνικών πλασματοκυττάρων μετά τη θεραπεία και ακολούθως η παρουσία EYN, είναι αυτή που εμποδίζει την ανάκαμψη της οργανικής λειτουργίας ασθενών με AL αμυλοείδωση, παρά την επίτευξη πλήρους αιματολογικής ανταπόκρισης (Staron et al., 2020). Η σημαντικότητα της EYN ως προγνωστικού δείκτη για την αιματολογική και οργανική ανταπόκριση αναδεικνύεται τα τελευταία χρόνια μέσα από ευρήματα μελετών φάσης 3 τα οποία αποκαλύπτουν ότι η επίτευξη της EYN αρνητικότητας σχετίζεται τόσο με βελτιωμένη επιβίωση ελευθέρως νόσου (PFS) ή / και συνολική επιβίωση (OS) σε ασθενείς με ΠΜ (Kothari et al., 2019) όσο και με βελτιωμένα ποσοστά καρδιακής ανταπόκρισης και βελτιωμένο PFS ακόμα και σε σύντομο χρονικό διάστημα παρακολούθησης ασθενών με AL αμυλοείδωση (Sidana, Surbhi et al., 2020). Ως εκ τούτου, η αναδυόμενου ενδιαφέροντος αξιολόγηση της EYN στην AL αμυλοείδωση μπορεί να αντιπροσωπεύει ένα πιθανά ισχυρό παράγοντα για την εκτίμηση της ανταπόκρισης σε τελικό σημείο, επιτρέποντας έτσι την ταχύτερη διεξαγωγή κλινικών δοκιμών (Milani, Merlini, et al., 2018).

Για την ανίχνευση της EYN χρησιμοποιούνται τεχνικές υψηλής ευαισθησίας, όπως η ASO-PCR, η NGS, η Πολυπαραμετρική Κυτταρομετρία Ροής (ΠΚΡ) και τα τελευταία χρόνια έχει αναδειχθεί η Κυτταρομετρία Ροής Νέας Γενιάς (NGF) την οποία και χρησιμοποιήσαμε ως βασική τεχνική στην παρούσα διπλωματική εργασία.

Η υπεροχή της NGF έγκειται στο γεγονός ότι χαρακτηρίζεται από υψηλή ευαισθησία και έχει εφαρμοσιμότητα που ξεπερνάει το 98%. Ακόμη, αποτελεί μια επικυρωμένη και πλήρως τυποποιημένη προσέγγιση κυτταρομετρίας ροής για την ποσοτικοποίηση της EYN στο ΠΜ σύμφωνα με το EuroFlow, έχει χαμηλό κόστος και λιγότερο χρόνο σε σύγκριση με άλλες τεχνικές όπως η NGS και μπορεί εύκολα να εφαρμοστεί σε διαγνωστικά εργαστήρια παγκοσμίως, προκειμένου να αξιολογήσει την κλωνικότητα και να βελτιώσει την πρόγνωση της κλινικής έκβασης του ασθενούς στην AL αμυλοείδωση (Juan Flores-Montero et al., 2016.; Paiva, Cedena, et al., 2017; Puig, Noemi et al., 2019).

Η παθοφυσιολογία της AL αμυλοείδωσης, όπως έχει αναλυθεί και στο εισαγωγικό κομμάτι της παρούσας εργασίας, βασίζεται στην παραγωγή ελαφριών αλυσίδων, οι οποίες χαρακτηρίζονται από ποικίλες σωματικές μεταλλάξεις που συμβαίνουν σε γονίδια που τις κωδικοποιούν συνήθως κατά τη διαδικασία διαφοροποίησης και ωρίμανσης των B λεμφοκυττάρων σε πλασματοκύτταρα (Merlini & Bellotti, 2003). Αποτέλεσμα κάποιων από τις μεταλλάξεις που συμβαίνουν στην μεταβλητή περιοχή της ελαφριάς αλυσίδας είναι να μειώνεται η σταθερότητα αναδίπλωσης της φυσιολογικής πρωτεΐνης και έτσι να εννοείται ενδοπρωτεόλυση και μετέπειτα η αμυλοείδωση (Morgan and Kelly, 2016). Η συσσωμάτωση των αμυλοειδογόνων ελαφριών αλυσίδων μπορεί να εμφανιστεί είτε λόγω της διαταραχής της εξωκυττάριας πρωτεόστασης είτε λόγω τις αλληλεπίδρασης των αλυσίδων με το ιστικό μικροπεριβάλλον. Η αλληλεπίδραση αυτή οδηγεί στο σχηματισμό ινιδίων αμυλοειδούς αν και εφόσον η συγκέντρωση των λανθασμένα αναδιπλωμένων πρωτεϊνών φτάσει σε ένα κομβικό σημείο που θα προωθήσει τη μετέπειτα συσσωμάτωση (Merlini, Dispenzieri, et al., 2018). Όσον αφορά τη γενετική βάση της AL αμυλοείδωσης, η χρωμοσωμική ανωμαλία που συναντάται πιο συχνά στον B κλώνο που παράγει τις ελαφριές αλυσίδες είναι η μετατόπιση t(11,14), η οποία συναντάται κατά κύριο λόγο στα αρχικά στάδια της ογκογένεσης στην AL αμυλοείδωση και εντοπίζεται στους κύριους κλώνους. Οι διαγραφές 8p21, 13q14 και 17p13 εμφανίζονται συνήθως σε υποκλώνους κατά την εξέλιξη της νόσου, καταδεικνύοντας μερικώς την ενδοκλωνική ετερογένεια που επικρατεί στην ασθένεια αυτή και επηρεάζει τόσο την κλωνική επιλογή κατά την χημειοθεραπεία, όσο και την επακόλουθη ανάπτυξη ανθεκτικών κλώνων που ενδεχομένως οδηγούν σε χημειοανθεκτικότητα (Bochtler, Hegenbart, Heiss, et al., 2011; Bochtler, Merz, et al., 2018).

Αν και το φορτίο της νόσου στην AL αμυλοείδωση είναι χαμηλό καθώς τα BMPCs κατά κύριο λόγο δεν ξεπερνούν το 10% στο μυελό των οστών και έχουν χαμηλό πολλαπλασιαστικό δείκτη σε σύγκριση με το ΠΜ, έχουν καταγραφεί κυτταρογενετικές ανωμαλίες όπως η διαγραφή του ογκογονιδίου p53 και η γονιδιακή ενίσχυση του *c-Myc* γεγονός που καταδεικνύει την επιρροή τους στον κυτταρικό μετασχηματισμό κατά την έναρξη της ογκογένεσης στην AL αμυλοείδωση (Arendt et al., 2008). Ωστόσο, το υψηλό ποσοστό διήθησης του μυελού των οστών (>10%) από πλασματοκύτταρα έχει αναδειχθεί ως δυσμενής προγνωστικός δείκτης στην AL αμυλοείδωση και σχετίζεται με αυξημένη συστηματική οργανική βλάβη (Tovar et al., 2018). Άλλα γονίδια που έχουν συσχετιστεί με την ασθένεια αυτή είναι το υψηλά εκφραζόμενο γονίδιο *TNFRSF7* (tumor necrosis factor 7) που ρυθμίζει την απόπτωση, καθώς και η χημειοκίνη *SDF1* (*CXCL12*), που είναι ένα ενδογενές σήμα για το μόριο *CXCR4*, η οποία εκφράζεται σε υψηλά επίπεδα στα AL πλασματοκύτταρα σε σύγκριση με τα αντίστοιχα κύτταρα στο ΠΜ (Abraham et al., 2005).

Ενδιαφέρον ακόμη παρουσιάζει η συνύπαρξη ενός μικρού ποσοστού AL ασθενών που παρουσιάζουν συμπτωματικό ΠΜ και πληρούν ένα ή περισσότερα από τα κριτήρια CRAB (Kourelis et al, 2013), καθώς και τα παρόμοια φαινοτυπικά πρότυπα που ακολουθούν τα κλωνικά AL πλασματοκύτταρα με τα αντίστοιχα στο ΠΜ. Ακόμη έρευνες υποστηρίζουν ότι τα κλωνικά πλασματοκύτταρα στην AL αμυλοείδωση αν και λιγότερο απορρυθμισμένα από αυτά στο ΠΜ (Paiva, Martinez-Lopez, et al., 2016), παρουσιάζουν ένα ενδιάμεσο πρότυπο μεταλλαγής μεταξύ της MGUS και του ΠΜ που έχουν μελετηθεί εκτενέστερα σε σχέση με την AL αμυλοείδωση (Rossi et al., 2017). Το γεγονός αυτό θα μπορούσε να βοηθήσει στη μελέτη και περαιτέρω κατανόηση τόσο της ογκογένεσης στην AL αμυλοείδωση, όσο και της αλληλεπίδρασής της με το μικροπεριβάλλον του μυελού των οστών, που σε ασθένειες όπως το ΠΜ έχει δείχθει ότι παίζει σημαντικό ρόλο στην εξέλιξη των μυελωματικών κυττάρων. Ο τομέας αυτός παραμένει ανεξερεύνητος στην AL αμυλοείδωση και θα μπορούσε να αποτελέσει σπουδαίο πεδίο έρευνας σχετικά με την ανάπτυξη νέων φαρμάκων που πιθανά να μπορούσαν να επηρεάσουν την ανάπτυξη της νόσου και να καθυστερήσουν την εξέλιξή της.

Αν και είναι γνωστό από τη βιβλιογραφία ότι το ΠΜ καταστέλλει τη φυσιολογική αιμοποίηση με διάφορους τρόπους, το αντίστοιχο πεδίο για την ασθένεια της AL αμυλοείδωσης παραμένει ακόμη αδιευκρίνιστο και ανεξερεύνητο

(Bouchnita et al., 2016; Dasanu, 2012; de Magalhães et al., 2013). Επιπλέον, το πώς επιδρά η EYN στην αιμοποίηση, είναι κάτι που χρήζει διερεύνησης, καθώς το αιμοποιητικό προφίλ των ασθενών μετά τη θεραπεία, πιθανώς να μπορεί να καθορίσει την κλινική πορεία τους, ως προγνωστικός δείκτης (Paiva, Cedena, et al., 2016).

Για το λόγο αυτό, σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας αποτέλεσε η ανάλυση του μικροπεριβάλλοντος του μυελού των οστών (ΜΟ) ασθενών με AL αμυλοείδωση σε σχέση με τη χορήγηση Δαρατουμουμάμπης, καθώς και την παρουσία ή την απουσία EYN, χρησιμοποιώντας Κυτταρομετρία ροής Νέας γενιάς (NGF). Σε συνεργασία με την Αιματολογική-Ογκολογική Κλινική της Ιατρικής Σχολής, ΕΚΠΑ, Γ.Ν.Α. «Αλεξάνδρα», συλλέχθηκαν δείγματα μυελού των οστών από ασθενείς με AL κατά τη διάγνωση, μετά την ολοκλήρωση θεραπείας πρώτης γραμμής και μετά από θεραπεία εδραίωσης με Δαρατουμουμάμπη. Μετά από κατάλληλη επεξεργασία και χρώση των κυττάρων μέσω δύο ανεξάρτητων panel επιφανειακών και ενδοκυττάρων δεικτών βάσει του πρωτοκόλλου που προτείνεται από το EuroFlow, τα δείγματα ΜΟ αναλύθηκαν με NGF και μετέπειτα τα δεδομένα επεξεργάστηκαν μέσω του λογισμικού Infinicyt. Βάσει της μεθόδου του EuroFlow για την ανίχνευση της EYN (Puig, Noemi et al., 2019), έγινε επιτρεπτός τόσο ο προσδιορισμός του ανοσοφαινοτύπου των κλωνικών πλασματοκυττάρων όσο και των 17 κυτταρικών πληθυσμών και υποπληθυσμών που καταφέραμε να ταυτοποιήσουμε και να ποσοτικοποιήσουμε, πριν και μετά τους 4 κύκλους Δαρατουμουμάμπης σε ασθενείς με AL αμυλοείδωση.

Τα αποτελέσματά μας κατέδειξαν μείωση στην έκφραση του δείκτη CD38 επί των κλωνικών κυττάρων σε 17/18 EYN⁺ AL ασθενείς μετά τη λήψη Δαρατουμουμάμπης. Το γεγονός αυτό πιθανά αποδίδεται στο ότι η Δαρατουμουμάμπη, ως μονοκλωνικό αντι-CD38 αντίσωμα μειώνει την έκφραση του υψηλά εκφραζόμενου CD38 στην κυτταρική επιφάνεια των κλωνικών AL πλασματοκυττάρων μέσω τρογοκυττάρωσης (trogoctosis). Η τρογοκυττάρωση είναι μια διαδικασία κατά την οποία τα Β, Τ και ΝΚ κύτταρα ανταλλάσσουν μεμβρανικό υλικό με αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα, και παρουσιάζουν στην επιφάνειά τους μόρια που έχουν αποκτήσει από τα κύτταρα αυτά μέσω της διαδικασίας που ονομάζεται 'ανοσολογική σύναψη'. Αυτό το αποτέλεσμα βασίζεται σε μια εναλλαγή (switch) που συμβαίνει μεταξύ του συμπλέγματος CD38-αντι-CD38 MoAb και των μη φυσιολογικών πλασματοκυττάρων, των μονοκυττάρων και των ουδετερόφιλων

και οδηγεί στην αναστολή της απελευθέρωσης εξωκυττάριας αδενοσίνης (ADO), η οποία προκαλείται μέσω της δράσης του CD38 και χαρακτηρίζεται από την ανασταλτική της επίδραση στο ανοσοποιητικό σύστημα (Roccatello et al., 2020).

Ακόμη, σε 5/18 ασθενείς, βρέθηκαν επιπλέον αλλαγές στη σύσταση του πληθυσμού των παθολογικών πλασματοκυττάρων. Τα στοιχεία αυτά καταδεικνύουν το γεγονός ότι η Δαρατουμουμάμπη επιδρά τόσο στον ανοσοφαινότυπο των κλωνικών κυττάρων όσο και στη σύσταση του κλωνικού πλασματοκυτταρικού πληθυσμού. Επιπλέον, η λήψη Δαρατουμουμάμπης φάνηκε να μειώνει σημαντικά το φορτίο της νόσου στην AL αμυλοείδωση, καθώς βάσει των αποτελεσμάτων, οδήγησε σε υποδεκαπλασιασμό του διάμεσου φορτίου της νόσου. Επιπρόσθετα, σημαντικό συμπέρασμα της παρούσας μελέτης είναι ότι η Δαρατουμουμάμπη μεταβάλλει ριζικά το μικροπεριβάλλον του ΜΟ, καθώς παρατηρήθηκε αύξηση του ποσοστού των Τ κυττάρων, των CD27⁺ NK και NKT κυττάρων, των προγονικών Β κυττάρων και των μαστοκυττάρων, αλλά και μείωση του ποσοστού των παρθένων Β κυττάρων. Επιπλέον, ιδιαίτερη σημασία έχει η τάση αύξησης του ποσοστού των ερυθροβλαστών ($p=0.1128$) που παρατηρήθηκε στους AL ασθενείς οι οποίοι παρέμειναν EYN⁺ σε σύγκριση με αυτούς που βρέθηκαν EYN⁻ μετά από 4 κύκλους Δαρατουμουμάμπης. Εντούτοις, η παρουσία/απουσία EYN δεν φάνηκε να επιδρά στο μικροπεριβάλλον του ΜΟ, πιθανότατα λόγω του μικρού αριθμού EYN⁻ δειγμάτων που διαθέταμε. Αν και το ποσοστό των παραπάνω κυτταρικών πληθυσμών παρουσιάζεται είτε αυξημένο (Τ, CD27⁺ NK και NKT, προγονικά Β κύτταρα, μαστοκύτταρα και ερυθροβλάστες) είτε μειωμένο (παρθένα Β κύτταρα) μετά τη λήψη Δαρατουμουμάμπης, φαίνεται να είναι ανεξάρτητο της παρουσίας EYN. Τα παθολογικά κύτταρα που έχουν διηθήσει τον ΜΟ οδηγούν στην πιθανή διαταραχή της ομοιοστατικής αλληλεπίδρασης μεταξύ των διαφόρων τμημάτων/κυττάρων του ΜΟ. Έτσι, πιθανά να προκλήθηκαν οι αλλαγές που παρατηρήσαμε στα ποσοστά των αιμοποιητικών κυτταρικών πληθυσμών που αναλύσαμε, υπέρ της μετανάστευσης, της διαφοροποίησης, της επιβίωσής τους και επίσης της επαγωγής αγγειογένεσης και της αντοχής στη θεραπεία οδηγώντας στην EYN θετικότητα κάποιων ασθενών μετά τη θεραπεία Δαρατουμουμάμπης (Lemaire et al., 2011). Παρόλα αυτά, το αίτιο που οδηγεί στην παρατηρηθείσα αυξητική τάση των ερυθροβλαστών στους AL ασθενείς οι οποίοι παρέμειναν EYN⁺ μετά τη λήψη του φαρμάκου δεν είναι γνωστός, αν και η σχετική βιβλιογραφία παρέχει κάποια στοιχεία που θα αναφερθούν στη συνέχεια.

Όπως έχει αναφερθεί και παραπάνω, στην παρούσα μελέτη παρατηρήθηκε και στατιστικά σημαντική αύξηση του κυτταρικού πληθυσμού των μαστοκυττάρων στους AL ασθενείς μετά τη χορήγηση Δαρατουμουμάμπης. Τα μαστοκύτταρα είναι κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος που ανήκουν στην έμφυτη ανοσία. Η δράση τους μεσολαβείται από μια σειρά κυτταροκινών, υποδοχέων και μορίων προσκόλλησης (Ribatti et al., 2006). Επίσης συμμετέχουν στην καταστολή των όγκων είτε σκοτώνοντας άμεσα τα καρκινικά κύτταρα, είτε επάγοντας ανοσολογικές αποκρίσεις μέσω των κυττάρων της επίκτητης ανοσίας (Zhang and Zhang, 2020). Τα μαστοκύτταρα αντιπροσωπεύουν έναν κυρίαρχο πληθυσμό στις πλασματοκυτταρικές κακοήθειες και ο βαθμός αύξησής τους σχετίζεται με τη σοβαρότητα της νόσου. Επιπλέον, τα κύτταρα αυτά αποτελούν πηγή διαφορετικών κυτταροκινών, συμπεριλαμβανομένων των ιντερλευκίνης-1, -2 και -6 (IL-1, IL-2, IL-6) και του παράγοντα βλαστικών κυττάρων (SCF), τα οποία με τη σειρά τους μπορούν να προκαλέσουν πλασματοκυτταρικό πολλαπλασιασμό (Ribatti et al., 2019). Ακόμη έχει υποστηριχθεί ότι τα μαστοκύτταρα προάγουν την ανάπτυξη των πλασματοκυτταρικών όγκων είτε μέσω της έκκρισης αγγειοποιητίνης-1 (Ang-1), η οποία με τη σειρά της διεγείρει την αγγειογένεση συνδυαστικά με τον αγγειακό ενδοθηλιακό αυξητικό παράγοντα VEGF που εκκρίνεται από τα κύτταρα του όγκου, είτε μέσω της έκκρισης ισταμίνης. Τόσο η αγγειογένεση στο ΜΟ όσο και ο αριθμός των μαστοκυττάρων έχει δείχθει πως αυξάνονται ταυτόχρονα στο ενεργό ΠΜ. Σημαντικό είναι επιπλέον το εύρημα ότι τα κύτταρα αυτά ασκούν ανοσοκαταστολή, απελευθερώνοντας τον παράγοντα νέκρωσης των όγκων α (TNF- α) και την IL-10, τα οποία είναι απαραίτητα για την προαγωγή της ανοσολογικής ανοχής που προκαλείται από ρυθμιστικά T κύτταρα (Tregs), και έτσι έμμεσα προάγουν την ανάπτυξη του όγκου. Ενδιαφέρον επίσης στην περίπτωση του ΠΜ παρουσιάζει το γεγονός ότι έχει διαπιστωθεί αύξηση του αριθμού των μαστοκυττάρων σε ασθενείς ως απόκριση στη θαλιδομίδη, η οποία έχει αντι-αγγειογόνο και ανοσορυθμιστική δράση (Domenico Ribatti et al., 2019; D. Ribatti et al., 2006). Με βάση όλα τα παραπάνω, η αύξηση του ποσοστού των μαστοκυττάρων μετά τη χορήγηση Δαρατουμουμάμπης πιθανά να αποτελεί δείκτη ανταπόκρισης στη θεραπεία προκειμένου να προαχθεί ο πολλαπλασιασμός των μη φυσιολογικών πλασματοκυττάρων και παράλληλα να προκληθεί ανοσοκαταστολή, καθιστώντας τα κλωνικά πλασματοκύτταρα ανθεκτικά στη θεραπεία.

Βασιζόμενοι και πάλι κατά κύριο λόγο στη βιβλιογραφία που υπάρχει για το ΠΜ, υποστηρίζεται ότι τα παθολογικά πλασματοκύτταρα που καταφέρνουν να διηθήσουν το μυελό των οστών, καταστέλλουν τη φυσιολογική διαδικασία της ερυθροποίησης (Bouchnita et al., 2016). Μια σχετικά πρόσφατη έρευνα για την επίδραση της EYN σε ασθενείς με ΠΜ σε παρατεταμένη πλήρη ύφεση μετά από θεραπεία πρώτης γραμμής, υποστήριξε ότι παρατηρήθηκε αυξημένο ποσοστό των κυτταρικών υποπληθυσμών των NK, CD8⁺ T, και NKT κυττάρων στο ΜΟ αυτών των ασθενών, υποδηλώνοντας ένα μηχανισμό ανοσολογικής επιτήρησης προκειμένου να ελέγχεται η παρεκκλίνουσα ανάπτυξη των κλωνικών πλασματοκυττάρων. Τα στοιχεία αυτά συμφωνούν με τα δικά μας αποτελέσματα τα οποία θα μπορούσαν πιθανά να εξηγηθούν και να οφείλονται στον ίδιο μηχανισμό που πιθανολογείται να ισχύει στην παραπάνω έρευνα. Ενδιαφέρον επίσης εύρημα της ίδιας έρευνας αποτέλεσε η αύξηση του ποσοστού των ερυθροβλαστών στους EYN⁻ ασθενείς με ΠΜ που μετατράπηκαν σε EYN⁺ κατά την παρακολούθησή τους, υπονοώντας ότι αυτό το κυτταρικό υποσύνολο μπορεί να εμπλέκεται με κάποιο τρόπο στην υποκείμενη βιολογία της EYN (Terpos et al., 2019). Επομένως, πιθανή εξήγηση βάσει αυτών των στοιχείων είναι ότι η αυξητική τάση των ερυθροβλαστών στη δική μας περίπτωση, οφείλεται στην ενδεχόμενη συμμετοχή των ερυθροβλαστών στην κλινική επιδείνωση των EYN⁺ ασθενών με AL αμυλοείδωση.

Η υπόθεση ότι το πρότυπο αιμοποίησης μετά από θεραπεία μπορεί ενδεχομένως να αποτελέσει προγνωστικό δείκτη αποδείχθηκε για πρώτη φορά σε έρευνα που αφορούσε άτομα μεγαλύτερης ηλικίας που έπασχαν από ΠΜ, τα οποία δεν μπορούσαν να υποβληθούν σε μεταμόσχευση ΜΟ. Ο διαχωρισμός των ασθενών βασίστηκε στο ποσοστό των ερυθροβλαστών, των προγονικών B κυττάρων, των παρθένων B κυττάρων και των B κυττάρων μνήμης στο ΜΟ ανεξαρτήτως της παρουσίας ή απουσίας EYN, μέσω PCA ανάλυσης (principal component analysis). Συγκεκριμένα, οι ασθενείς με υψηλό ποσοστό ερυθροβλαστών και προγονικών B κυττάρων, καθώς και χαμηλό ποσοστό παρθένων B κυττάρων και B κυττάρων μνήμης παρουσίασαν το χαμηλότερο OS. Αντιθέτως, οι ασθενείς που παρουσίασαν χαμηλό ποσοστό ερυθροβλαστών και προγονικών B κυττάρων και παράλληλα υψηλό ποσοστό παρθένων B κυττάρων και B κυττάρων μνήμης, χαρακτηρίστηκαν από υψηλότερο OS. Οι ασθενείς με ενδιάμεσα ποσοστά ως προς τους παραπάνω κυτταρικούς πληθυσμούς εμφάνισαν ενδιάμεσο OS. Ανάλογη τάση παρατηρήθηκε και στο χρονικό διάστημα που μεσολάβησε ως την υποτροπή (time-to-progression,

TTP), χωρίς όμως να είναι στατιστικά σημαντική (Paiva, Cedena, et al., 2016). Τα αποτελέσματά μας συμφωνούν εν μέρει με τα παραπάνω δεδομένα της έρευνας, καθώς παρατηρήσαμε μια αυξητική τάση στο ποσοστό των ερυθροβλαστών στους ασθενείς που μετά από 4 κύκλους Δαρατουμουάμπης παρέμειναν EYN⁺, γεγονός που τους κατατάσσει στη χειρότερη βαθμίδα πρόγνωσης. Τα αποτελέσματά μας συμφωνούν επίσης με τα στοιχεία αυτής της έρευνας ως προς τα υψηλά ποσοστά προγονικών B κυττάρων που παρατηρήθηκαν αλλά και το χαμηλό ποσοστό των παρθένων B κυττάρων που φάνηκαν να σχετίζονται με χαμηλότερο OS. Όπως και στα δεδομένα αυτά, έτσι και στη δική μας περίπτωση οι τάσεις φάνηκαν να είναι ανεξάρτητες της EYN, πιθανά λόγω του χαμηλού αριθμού EYN⁻ δειγμάτων που αναλύσαμε.

Σε μια άλλη ενδιαφέρουσα έρευνα που πραγματοποιήθηκε σε ασθενείς με ΠΜ, βρέθηκε ότι αν και EYN⁺, κατάφεραν να πετύχουν μακροχρόνιο έλεγχο της νόσου (long-term disease control, LTDC) λόγω μιας μοναδικής ανοσολογικής υπογραφής που ευνοεί τόσο την ανοσολογική κυτταροτοξικότητα όσο και την ανάκαμψη της παραγωγής B κυττάρων, υποδηλώνοντας έτσι βελτίωση της ανοσολογικής επιτήρησης. Πιο συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε αναπλήρωση των πρόδρομων B κυττάρων στο MO που είχε ως συνέπεια την αύξηση του αριθμού των ανώριμων και των παρθένων B κυττάρων στο περιφερικό αίμα. Η ανάκτηση της παραγωγής B κυττάρων στο MO που παρατηρήθηκε μετά τη χορήγηση θεραπείας, μπορεί να σχετίζεται με μειωμένο ανταγωνισμό μεταξύ των κλωνικών και των φυσιολογικών πλασματοκυττάρων στο MO (de Magalhães et al., 2013). Τα αποτελέσματά μας συμφωνούν εν μέρει με τα ευρήματα αυτής της έρευνας και ενδεχομένως η αύξηση των προγονικών B κυττάρων σε AL ασθενείς μετά τη χορήγηση Δαρατουμουάμπης να μπορεί να εξηγηθεί εν μέρει με βάση την παραπάνω υπόθεση, εφόσον λάβουμε επίσης υπόψη μας τη γενικότερη βιβλιογραφία που υπάρχει για τα B κύτταρα. Τα κύτταρα αυτά διαδραματίζουν κρίσιμο ρόλο τόσο στη χυμική όσο και στην κυτταρική ανοσία, αλλά και στην αντικαρκινική ανοσία, γιατί ως αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα ενεργοποιούν τα T κύτταρα ή αποκτούν κυτταροτοξική ικανότητα (Zhang and Zhang, 2020).

Τα T κύτταρα συγκαταλέγονται στους κυτταρικούς πληθυσμούς της προσαρμοστικής ανοσίας και δρουν ως ενορχηστρωτές και τελεστές της. Στα αρχικά στάδια ανάπτυξης ενός όγκου μεταναστεύουν στο μικροπεριβάλλον του και δρουν προστατευτικά εξαλείφοντας τα ανοσογονικά καρκινικά κύτταρα. Τα CD8⁺ T

κύτταρα είναι τα κύτταρα με την πιο σαφή αντικαρκινική δράση, ενώ τα CD4⁺ Th1 παρουσιάζουν μια ενδιάμεση αντικαρκινική απόκριση μέσω της έκκρισης κυτταροκινών όπως IL-2, TNF- α και της ιντερφερόνης γ (IFN- γ), προάγοντας την ενεργοποίηση των T κυττάρων και την κυτταροτοξικότητα των κυτταροτοξικών T λεμφοκυττάρων (CTLs). Η παρουσία μάλιστα των CD8⁺ T κυττάρων στο μικροπεριβάλλον του όγκου σχετίζεται με ευνοϊκή πρόγνωση όσον αφορά τη συνολική επιβίωση ασθενών με διαφόρων τύπων κακοήθειες (Gonzalez et al., 2018). Επιπρόσθετα, η έρευνα που έχει αναφερθεί παραπάνω σχετικά με τους EYN⁺ ασθενείς με ΠΜ που πέτυχαν μακροχρόνιο έλεγχο της νόσου (LTDC) έδειξε επίσης ότι τα CD8⁺ T κύτταρα παρουσίασαν και αυτά αύξηση, υποδεικνύοντας ενδεχομένως ότι η μετανάστευση αυτών των κυτταροτοξικών κυττάρων στο μικροπεριβάλλον του μυελού των οστών θα μπορούσε να αντικατοπτρίζει έναν ανοσολογικό μηχανισμό επιτήρησης που ελέγχει την ανάπτυξη του όγκου (de Magalhães et al., 2013). Άλλες μελέτες ακόμη έχουν καταδείξει στοιχεία όπως η επέκταση του πληθυσμού ολιγκλωνικών CD8⁺ T κυττάρων τόσο στο MGUS όσο και στο ΠΜ, που πιθανά συμβαίνουν στα πλαίσια μιας αντικαρκινικής ανοσοαπόκρισης. Επιπλέον στην περίπτωση του MGUS και του ΠΜ αρχικού σταδίου που χαρακτηρίζονται από χαμηλό ακόμη φορτίο νόσου, έχει δειχθεί ότι τα CD8⁺ T κύτταρα παρουσιάζουν αυξημένο ποσοστό (Korde and Maric, 2011). Ενδιαφέρον ακόμη παρουσιάζει ο διττός ρόλος των $\gamma\delta$ -T και των MAIT (mucosal associated invariant T) κυττάρων όπου μέσω της έκκρισης κυτταροκινών / χημειοκινών, μπορούν και καταστέλλουν ή διεγείρουν ανοσοαποκρίσεις σε σχέση με τον καρκίνο (Stolk et al., 2018).

Σημαντικό να αναφερθεί επιπλέον είναι ότι το CD38 εκφράζεται σε χαμηλότερη πυκνότητα και στα T κύτταρα γεγονός που θέτει αυτά τα κύτταρα υπό την επίδραση του μονοκλωνικού αντι-CD38 αντισώματος Δαρατουμουμάμπη, που λειτουργεί ως ρυθμιστής των ανοσοκυττάρων και μάλιστα αναγνωρίζεται από τα ενεργοποιημένα T κύτταρα. Η πιο ενδιαφέρουσα υπόθεση σχετικά με τον τρόπο που η Δαρατουμουμάμπη πυροδοτεί τον ενδεχόμενο πολλαπλασιασμό ή τη δράση των ανοσοκυττάρων βασίζεται στις λειτουργικές συνεργιστικές αλληλεπιδράσεις που μπορεί να συμβαίνουν μεταξύ των αντι-CD38 αντισωμάτων και των IgG Fc υποδοχέων τους που εκφράζονται σε διάφορα επίπεδα από μυελοειδείς και λεμφοειδείς κυτταρικούς πληθυσμούς (Roccatello et al., 2020). Με βάση όλα τα παραπάνω βιβλιογραφικά στοιχεία σχετικά με τη δράση της Δαρατουμουμάμπης και του ρόλου των T κυττάρων στο μικροπεριβάλλον του όγκου, η στατιστικά σημαντική

αύξηση των T κυττάρων που παρατηρήσαμε στη δική μας περίπτωση συμφωνεί εν μέρει με την παρούσα βιβλιογραφία και πιθανότατα προέκυψε από τη δράση του συγκεκριμένου φαρμάκου να επάγει την αντικαρκινική δράση των T κυττάρων έναντι της EYN, χωρίς όμως να υπάρχουν αρκετά δεδομένα για να μπορούμε να υποστηρίξουμε με βεβαιότητα αυτή την υπόθεση.

Το CD27 είναι μία γλυκοπρωτεΐνη τύπου I που εκφράζεται σε ορισμένα B κύτταρα και στην πλειονότητα των T και NK κυττάρων. Αποτελεί μέλος της TNF υπερικογένειας και η σηματοδότησή του στα λεμφοκύτταρα μεσολαβείται από τους TCRs και οδηγεί σε αύξηση του πολλαπλασιασμού, διαφοροποίηση και ενεργοποίηση (Agematsu et al., 2000). Τα NK κύτταρα ανήκουν στη λεμφοειδή κυτταρική σειρά της φυσικής ανοσίας (innate lymphoid cells) και αναγνωρίζουν τα μόρια-στόχους τους μέσω ενεργοποιητικών και κατασταλτικών υποδοχέων. Στους υποδοχείς αυτούς προσδένονται μόρια που σχετίζονται με το κυτταρικό στρες και τα HLA μόρια, αντίστοιχα. Ως εκ τούτου, τα NK κύτταρα έχουν την ικανότητα να πραγματοποιούν μη-ειδική αναγνώριση των στόχων τους, καθώς για την ενεργοποίησή τους δεν απαιτείται αναγνώριση συγκεκριμένου αντιγόνου και δεν υπόκεινται σε HLA περιορισμό (Godfrey and Benson, 2012). Τα NK κύτταρα λειτουργούν ως 'δολοφόνοι' έναντι ενός όγκου, αλλά και ως ρυθμιστές επηρεάζοντας την επίκτητη ανοσολογική απόκριση. Παράλληλα σε ένα παθολογικό μικροπεριβάλλον ενεργοποιούνται, πολλαπλασιάζονται και μέσω μεταγραφικών παραγόντων που σηματοδοτούν ενδογενή σήματα ωρίμανσης και λειτουργίας τους, διαφοροποιούνται σε ανασταλτικά NK κύτταρα (NK tolerant) μέσω ανασταλτικών σημάτων, καθώς και σε κυτταροτοξικά NK κύτταρα (NK cytotoxic) και ρυθμιστικά NK κύτταρα (NK regulatory) μέσω σημάτων ενεργοποίησης. Έτσι, διαμορφώνεται είτε η κυτταροτοξικότητά τους είτε η ικανότητά τους για ανοσορύθμιση (Fu et al., 2014). Τα NK-T κύτταρα αποτελούν έναν CD3+CD56+ ετερογενή υποπληθυσμό των T λεμφοκυττάρων, εκφράζουν αβ TCRs (T cell receptors) και είναι υπεύθυνα για την αναγνώριση αντιγόνων γλυκο-σφιγγολιπιδικής φύσης. Αν και κατά κύριο λόγο έχουν αντικαρκινική ιδιότητα, τα NK-T κύτταρα τύπου II, παρουσιάζουν κατασταλτικές ιδιότητες, καθώς προάγουν τις ανοσολογικές αποκρίσεις τύπου Th2 (Favreau et al., 2016).

Βάσει της βιβλιογραφίας, το CD27 είναι ένας σημαντικός δείκτης ωρίμανσης για τα υποσύνολα των ανθρώπινων NK κυττάρων και με βάση την έκφρασή του υποστηρίζεται ότι υπάρχει ποικιλομορφία ως προς τους υποδοχείς που εκφράζονται

στα κύτταρα αυτά ρυθμίζοντας μάλιστα τις διάφορες λειτουργίες τους. Ακόμη, έρευνα έχει δείξει ότι CD11b-CD27⁺ και CD11b⁺CD27⁺ NK κύτταρα που έχουν απομονωθεί από το μικροπεριβάλλον του όγκου, δείχνουν να έχουν την καλύτερη ικανότητα στο να εκκρίνουν κυτταροκίνες (Fu, Wang, et al., 2011;Fu, Tian, et al., 2014).

Το CD27 και το CD70 αποτελούν ένα ζεύγος υποδοχέων της TNF οικογένειας, με μεγάλη σημασία στη συνδιέγερση των T κυττάρων. Η σηματοδότηση του CD27 που ρυθμίζεται από την έκφραση του CD70, παρέχει συνδιεγερτικά σήματα στα κυτταροτοξικά T κύτταρα, αλλά και αυξάνει τη συχνότητα των ρυθμιστικών T κυττάρων στους συμπαγείς όγκους, προάγοντας την ανάπτυξή τους, ενώ η CD70-μεσολαβούμενη αντίστροφη σηματοδότηση στα NK κύτταρα συμβάλλει στον ανοσολογικό έλεγχο των B κυτταρικών κακοηθειών (Al Sayed et al., 2017;van de Ven et al., 2015). Επιπλέον, η CD27/CD70 συνδιέγερση προωθεί τόσο την κλωνική επέκταση των CD4⁺ και CD8⁺ T κυττάρων στα λεμφοειδή όργανα όσο και τη διαφοροποίηση των CD4⁺ T κυττάρων προς Th1-τύπου κύτταρα. Επίσης, φαίνεται να προωθεί την T και NK απόκριση, συμβάλλοντας στον έλεγχο του όγκου (van de Ven et al., 2015).

Όσον αφορά την δράση της Δαρατουμουμάμπης, έχει δείχθει πως προκαλεί εξαρτώμενη από αντίσωμα κυτταρική κυτταροτοξικότητα (antibody-dependent cellular cytotoxicity, ADCC), μέσω της απελευθέρωσης κυτταροτοξικών κυτταροκινών από τα NK κύτταρα. Το γεγονός αυτό καταδεικνύει το ρόλο αυτών των κυττάρων στο να ενισχύουν τη δράση της Δαρατουμουμάμπης. Ταυτόχρονα ενισχύεται η δική τους κυτταροτοξικότητα έναντι κυττάρων που εκφράζουν σε υψηλά επίπεδα το CD38. Ωστόσο, μετά τη θεραπεία με Δαρατουμουμάμπη έχει παρατηρηθεί παραδόξως μείωση των NK κυττάρων. Επίσης το συγκεκριμένο αντι-CD38 μονοκλωνικό αντίσωμα φαίνεται να πυροδοτεί αποτελεσματικά την ενεργοποίηση του κλασικού μονοπατιού του συμπληρώματος και να δρα σε μη παθολογικούς κυτταρικούς πληθυσμούς από τους οποίους αναγνωρίζεται, όπως τα ενεργοποιημένα T και τα NK κύτταρα όπως έχει αναφερθεί και παραπάνω (Roccatello et al., 2020).

Βασίζόμενοι συνδυαστικά στα δεδομένα περί δράσης της Δαρατουμουμάμπης και ρόλου των NK κυττάρων και του CD27 στο ανοσοποιητικό σύστημα και στο μικροπεριβάλλον ενός όγκου, μια πιθανή εξήγηση του αυξημένου ποσοστού CD27⁺ NK κυττάρων στους ασθενείς μετά τη θεραπεία με Δαρατουμουμάμπη που παρατηρήσαμε, είναι ότι η θεραπεία προώθησε μεν την κυτταροτοξική δράση των

κυττάρων αυτών και παράλληλα το ανοσοποιητικό σύστημα πιθανά προσπάθησε να ανταπεξέλθει στη μειωμένη έκφραση HLA μορίων τάξης I από τα καρκινικά κύτταρα, εφόσον έτσι επιτυγχάνεται η διαφυγή από τον ανοσολογικό έλεγχο (Hicklin et al., 1999). Η δε αύξηση των CD27⁺ NKT κυττάρων που παρατηρήθηκε σε EYN⁺ δείγματα προέκυψε εν μέρει λόγω της επιρροής που πιθανά ασκούν τα κύτταρα αυτά στην ανάπτυξη της EYN.

Τέλος, πέρα από την ανάλυση των πληθυσμών και υποπληθυσμών του μυελού των οστών, σε ορισμένους από τους ασθενείς (5/18) που παρέμειναν EYN⁺ μετά από 4 κύκλους Δαρατουμουμάμπης (**Εικόνα 13**), εντοπίστηκαν φαινοτυπικά διακριτοί πληθυσμοί κλωνικών πλασματοκυττάρων στους οποίους η χορήγηση Δαρατουμουμάμπης οδήγησε σε αλλαγές στη σύστασή τους. Τα στοιχεία αυτά αν συνδυαστούν με δεδομένα από δείγματα διάγνωσης, μπορούν ενδεχομένως να μας δώσουν σημαντικές πληροφορίες για τη βιολογία της AL αμυλοείδωσης, οι οποίες σχετίζονται τόσο με την κλωνική εξέλιξη της νόσου, όσο και με τη συσχέτιση μεταξύ ανοσοφαινοτύπου και χημειοανθεκτικότητας.

6 ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Abeykoon, Jithma P., et al. "Daratumumab-Based Therapy in Patients with Heavily-Pretreated AL Amyloidosis." *Leukemia*, 2019, doi:10.1038/s41375-018-0262-2.
2. Abraham, Roshini S., et al. "Functional Gene Expression Analysis of Clonal Plasma Cells Identifies a Unique Molecular Profile for Light Chain Amyloidosis." *Blood*, 2005, doi:10.1182/blood-2004-04-1424.
3. Adan, Aysun, et al. "Flow Cytometry: Basic Principles and Applications." *Critical Reviews in Biotechnology*, 2017, doi:10.3109/07388551.2015.1128876.
4. Agematsu, Kazunaga, et al. "CD27: A Memory B-Cell Marker." *Immunology Today*, 2000, doi:10.1016/S0167-5699(00)01605-4.
5. Al Sayed, Mohamad F., et al. "CD70 Reverse Signaling Enhances NK Cell Function and Immunosurveillance in CD27-Expressing B-Cell Malignancies." *Blood*, 2017, doi:10.1182/blood-2016-12-756585.
6. Arendt, Bonnie K., et al. "Biologic and Genetic Characterization of the Novel Amyloidogenic Lambda Light Chain-Secreting Human Cell Lines, ALMC-1 and ALMC-2." *Blood*, 2008, doi:10.1182/blood-2008-03-143040.
7. Arroz, Maria, et al. "Consensus Guidelines on Plasma Cell Myeloma Minimal Residual Disease Analysis and Reporting." *Cytometry Part B - Clinical Cytometry*, 2016, doi:10.1002/cyto.b.21228.
8. Banypersad, Sanjay M. "The Evolving Role of Cardiovascular Magnetic Resonance Imaging in the Evaluation of Systemic Amyloidosis." *Magnetic Resonance Insights*, 2019, doi:10.1177/1178623x19843519.
9. Birbrair, Alexander, and Paul S. Frenette. "Niche Heterogeneity in the Bone Marrow." *Annals of the New York Academy of Sciences*, 2016, doi:10.1111/nyas.13016.
10. Bochtler, Tilmann, Maximilian Merz, et al. "Cytogenetic Intraclonal Heterogeneity of Plasma Cell Dyscrasia in AL Amyloidosis as Compared with Multiple Myeloma." *Blood Advances*, 2018, doi:10.1182/bloodadvances.2018023200.
11. Bochtler, Tilmann, Ute Hegenbart, Christina Kunz, Axel Benner, et al. "Gain of Chromosome 1q21 Is an Independent Adverse Prognostic Factor in Light Chain Amyloidosis Patients Treated with Melphalan/Dexamethasone." *Amyloid*, 2014,

- doi:10.3109/13506129.2013.854766.
12. Bochtler, Tilmann, Ute Hegenbart, Christiane Heiss, et al. "Hyperdiploidy Is Less Frequent InAL Amyloidosis Compared with Monoclonal Gammopathy of Undetermined Significance and Inversely Associated with Translocation t(11;14)." *Blood*, 2011, doi:10.1182/blood-2010-02-268987.
 13. Bochtler, Tilmann, Ute Hegenbart, Christina Kunz, Martin Granzow, et al. "Translocation t(11;14) Is Associated with Adverse Outcome in Patients with Newly Diagnosed AL Amyloidosis When Treated with Bortezomib-Based Regimens." *Journal of Clinical Oncology*, 2015, doi:10.1200/JCO.2014.57.4947.
 14. Bouchnita, Anass, et al. "Bone Marrow Infiltration by Multiple Myeloma Causes Anemia by Reversible Disruption of Erythropoiesis." *American Journal of Hematology*, 2016, doi:10.1002/ajh.24291.
 15. Brambilla, Francesca, et al. "Changes in Tissue Proteome Associated with ATTR Amyloidosis: Insights into Pathogenesis." *Amyloid*, 2012, doi:10.3109/13506129.2012.674989.
 16. Brenner, Daniel A., et al. "Human Amyloidogenic Light Chains Directly Impair Cardiomyocyte Function Through an Increase in Cellular Oxidant Stress." *Circulation Research*, 2004, doi:10.1161/01.RES.0000126569.75419.74.
 17. Bryce, Alan H., et al. "Translocation t(11;14) and Survival of Patients with Light Chain (AL) Amyloidosis." *Haematologica*, 2009, doi:10.3324/haematol.13369.
 18. Caccialanza, Riccardo, et al. "Nutritional Status Independently Affects Quality of Life of Patients with Systemic Immunoglobulin Light-Chain (AL) Amyloidosis." *Annals of Hematology*, 2012, doi:10.1007/s00277-011-1309-x.
 19. Campana, Dario, et al. "CD38 in Hematopoiesis." *Chemical Immunology*, 2000, doi:10.1159/000058768.
 20. Campana, Dario, and Elaine Coustan-Smith. "Detection of Minimal Residual Disease in Acute Leukemia by Flow Cytometry." *Communications in Clinical Cytometry*, 1999, doi:10.1002/(SICI)1097-0320(19990815)38:4<139::AID-CYTO1>3.0.CO;2-H.
 21. Chaulagain, Chakra P., and Raymond L. Comenzo. "New Insights and Modern Treatment of AL Amyloidosis." *Current Hematologic Malignancy Reports*, 2013, doi:10.1007/s11899-013-0175-0.

22. Davies, D. R., et al. "Antibody-Antigen Complexes." *Annual Review of Biochemistry*, 1990, doi:10.1146/annurev.bi.59.070190.002255.
23. De Larrea, Carlos Fernández, et al. "A Practical Approach to the Diagnosis of Systemic Amyloidoses." *Blood*, 2015, doi:10.1182/blood-2014-11-609883.
24. de Magalhães, Roberto J. Pessoa., et al. "Analysis of the Immune System of Multiple Myeloma Patients Achieving Long-Term Disease Control by Multidimensional Flow Cytometry." *Haematologica*, 2013, doi:10.3324/haematol.2012.067272.
25. Deshmukh, M., et al. "Immunophenotype of Neoplastic Plasma Cells in AL Amyloidosis." *Journal of Clinical Pathology*, 2009, doi:10.1136/jcp.2009.065474.
26. Di Sabatino, Antonio, et al. "Post-Splenectomy and Hyposplenic States." *The Lancet*, 2011, doi:10.1016/S0140-6736(10)61493-6.
27. Diomedea, Luisa, et al. "Cardiac Light Chain Amyloidosis: The Role of Metal Ions in Oxidative Stress and Mitochondrial Damage." *Antioxidants and Redox Signaling*, 2017, doi:10.1089/ars.2016.6848.
28. Dispenzieri, Angela, David Dingli, et al. "Discordance between Serum Cardiac Biomarker and Immunoglobulin-Free Light-Chain Response in Patients with Immunoglobulin Light-Chain Amyloidosis Treated with Immune Modulatory Drugs." *American Journal of Hematology*, 2010, doi:10.1002/ajh.21822.
29. Dispenzieri, Angela, Morie A. Gertz, et al. "Serum Cardiac Troponins and N-Terminal pro-Brain Natriuretic Peptide: A Staging System for Primary Systemic Amyloidosis." *Journal of Clinical Oncology*, 2004, doi:10.1200/JCO.2004.03.029.
30. Dittrich, Tobias, et al. "AL Amyloidosis Patients with Low Amyloidogenic Free Light Chain Levels at First Diagnosis Have an Excellent Prognosis." *Blood*, 2017, doi:10.1182/blood-2017-02-767475.
31. Dubrey, Simon W., et al. "Amyloid Diseases of the Heart: Assessment, Diagnosis, and Referral." *Heart*, 2011, doi:10.1136/hrt.2009.190405.
32. Dudley, Darryll D., et al. "Mechanism and Control of V(D)J Recombination versus Class Switch Recombination: Similarities and Differences." *Advances in Immunology*, 2005, doi:10.1016/S0065-2776(04)86002-4.
33. Favreau, Mérédis, et al. "Does an NKT-Cell-Based Immunotherapeutic Approach Have a Future in Multiple Myeloma?" *Oncotarget*, 2016,

- doi:10.18632/oncotarget.7440.
34. Feederle, Regina, and Aloys Schepers. "Antibodies Specific for Nucleic Acid Modifications." *RNA Biology*, 2017, doi:10.1080/15476286.2017.1295905.
 35. Flores-Montero, J., et al. "Next Generation Flow for Highly Sensitive and Standardized Detection of Minimal Residual Disease in Multiple Myeloma." *Leukemia*, 2017, doi:10.1038/leu.2017.29.
 36. Foli, A., et al. "The Role of Minor Salivary Gland Biopsy in the Diagnosis of Systemic Amyloidosis: Results of a Prospective Study in 62 Patients." *Amyloid*, 2011, doi:10.3109/13506129.2011.574354.
 37. Franck, Caspar, et al. "Recurrent Diffuse Gastric Bleeding as a Leading Symptom of Gastrointestinal AL Amyloidosis." *Zeitschrift Fur Gastroenterologie*, 2017, doi:10.1055/s-0043-120924.
 38. Fu, Binqing, et al. "CD11b and CD27 Reflect Distinct Population and Functional Specialization in Human Natural Killer Cells." *Immunology*, 2011, doi:10.1111/j.1365-2567.2011.03446.x.
 39. Gertz, M. A., et al. "The Plasma Cell Labeling Index: A Valuable Tool in Primary Systemic Amyloidosis." *Blood*, 1989, doi:10.1182/blood.v74.3.1108.bloodjournal7431108.
 40. Gertz, Morie A., et al. "Utility of Subcutaneous Fat Aspiration for the Diagnosis of Systemic Amyloidosis (Immunoglobulin Light Chain)." *Archives of Internal Medicine*, 1988, doi:10.1001/archinte.1988.00380040169024.
 41. Godfrey, James, and Don M. Benson. "The Role of Natural Killer Cells in Immunity against Multiple Myeloma." *Leukemia and Lymphoma*, 2012, doi:10.3109/10428194.2012.676175.
 42. Gonzalez, Hugo, et al. "Roles of the Immune System in Cancer: From Tumor Initiation to Metastatic Progression." *Genes and Development*, 2018, doi:10.1101/GAD.314617.118.
 43. Hawkins, Philip N., et al. "Evaluation of Systemic Amyloidosis by Scintigraphy with 123I-Labeled Serum Amyloid P Component." *New England Journal of Medicine*, 1990, doi:10.1056/NEJM199008233230803.
 44. Hazenberg, Bouke P. C. "Amyloidosis. A Clinical Overview." *Rheumatic Disease Clinics of North America*, 2013, doi:10.1016/j.rdc.2013.02.012.
 45. Hicklin, Daniel J., et al. "HLA Class I Antigen Downregulation in Human Cancers: T-Cell Immunotherapy Revives an Old Story." *Molecular Medicine*

- Today*, 1999, doi:10.1016/S1357-4310(99)01451-3.
46. Hipp, Mark S., et al. "Proteostasis Impairment in Protein-Misfolding and -Aggregation Diseases." *Trends in Cell Biology*, 2014, doi:10.1016/j.tcb.2014.05.003.
 47. Hoscheit, Matthew, et al. "Gastroparesis in a Patient with Gastric AL Amyloidosis." *Case Reports in Gastroenterology*, 2018, doi:10.1159/000489297.
 48. Hulspas, Ruud, et al. "Considerations for the Control of Background Fluorescence in Clinical Flow Cytometry." *Cytometry Part B - Clinical Cytometry*, 2009, doi:10.1002/cyto.b.20485.
 49. Hwa, Yi L., et al. "Delineation of the Timing of Second-Line Therapy Post-Autologous Stem Cell Transplant in Patients with AL Amyloidosis." *Blood*, 2017, doi:10.1182/blood-2017-05-783415.
 50. Janeway, Charles A., et al. "Adaptive Immunity to Infection." *Immunobiology 5 : The Immune System in Health and Disease*, 2001.
 51. Jelinek, T., et al. "Current Applications of Multiparameter Flow Cytometry in Plasma Cell Disorders." *Blood Cancer Journal*, 2017, doi:10.1038/bcj.2017.90.
 52. Kastritis, Efstathios, Ioannis V. Kostopoulos, Evangelos Terpos, Bruno Paiva, et al. "Evaluation of Minimal Residual Disease Using Next-Generation Flow Cytometry in Patients with AL Amyloidosis." *Blood Cancer Journal*, 2018, doi:10.1038/s41408-018-0086-3.
 53. Kastritis, Efstathios, Ioannis Papassotiriou, Giampaolo Merlini, Paolo Milani, et al. "Growth Differentiation Factor-15 Is a New Biomarker for Survival and Renal Outcomes in Light Chain Amyloidosis." *Blood*, 2018, doi:10.1182/blood-2017-12-819904.
 54. Kastritis, Efstathios, Maria Roussou, Michalis Michael, et al. "High Levels of Serum Angiogenic Growth Factors in Patients with AL Amyloidosis: Comparisons with Normal Individuals and Multiple Myeloma Patients." *British Journal of Haematology*, 2010, doi:10.1111/j.1365-2141.2010.08288.x.
 55. Kastritis, Efstathios, Maria Roussou, Maria Gavriatopoulou, et al. "Long-Term Outcomes of Primary Systemic Light Chain (AL) Amyloidosis in Patients Treated Upfront with Bortezomib or Lenalidomide and the Importance of Risk Adapted Strategies." *American Journal of Hematology*, 2015, doi:10.1002/ajh.23936.

56. Kastritis, Efstathios, and Meletios A. Dimopoulos. "Prognosis and Risk Assessment in AL Amyloidosis – There and Back Again." *British Journal of Haematology*, 2017, doi:10.1111/bjh.14587.
57. ---. "Recent Advances in the Management of AL Amyloidosis." *British Journal of Haematology*, 2016, doi:10.1111/bjh.13805.
58. Korde, Neha, and Irina Maric. "Myelomagenesis: Capturing Early Microenvironment Changes." *Seminars in Hematology*, 2011, doi:10.1053/j.seminhematol.2010.11.004.
59. Kothari, Shalin, et al. "Determination of Minimal Residual Disease in Multiple Myeloma: Does It Matter?" *Current Hematologic Malignancy Reports*, 2019, doi:10.1007/s11899-019-0497-7.
60. Kourelis, Taxiarchis V., Shaji K. Kumar, Morie A. Gertz, et al. "Coexistent Multiple Myeloma or Increased Bone Marrow Plasma Cells Define Equally High-Risk Populations in Patients with Immunoglobulin Light Chain Amyloidosis." *Journal of Clinical Oncology*, 2013, doi:10.1200/JCO.2013.50.8499.
61. Kourelis, Taxiarchis V., Shaji K. Kumar, Ronald S. Go, et al. "Immunoglobulin Light Chain Amyloidosis Is Diagnosed Late in Patients with Preexisting Plasma Cell Dyscrasias." *American Journal of Hematology*, 2014, doi:10.1002/ajh.23827.
62. Kricun, Morrie E. "Red-Yellow Marrow Conversion: Its Effect on the Location of Some Solitary Bone Lesions." *Skeletal Radiology*, 1985, doi:10.1007/BF00361188.
63. Kuby. "Immunology 7th Edition." *Freeman and Company*, 2010, doi:10.1201/b13424.
64. Kumar, Shaji, Teresa Kimlinger, et al. "Immunophenotyping in Multiple Myeloma and Related Plasma Cell Disorders." *Best Practice and Research: Clinical Haematology*, 2010, doi:10.1016/j.beha.2010.09.002.
65. Kumar, Shaji, Angela Dispenzieri, Martha Q. Lacy, et al. "Revised Prognostic Staging System for Light Chain Amyloidosis Incorporating Cardiac Biomarkers and Serum Free Light Chain Measurements." *Journal of Clinical Oncology*, 2012, doi:10.1200/JCO.2011.38.5724.
66. Kumar, Shaji, Angela Dispenzieri, Jerry A. Katzmann, et al. "Serum Immunoglobulin Free Light-Chain Measurement in Primary Amyloidosis:

- Prognostic Value and Correlations with Clinical Features.” *Blood*, 2010, doi:10.1182/blood-2010-06-290668.
67. Kyle, R. A., and M. A. Gertz. “Primary Systemic Amyloidosis: Clinical and Laboratory Features in 474 Cases.” *Seminars in Hematology*, 1995.
 68. Kyle, Robert A., et al. “Long-Term Follow-up of Monoclonal Gammopathy of Undetermined Significance.” *New England Journal of Medicine*, 2018, doi:10.1056/NEJMoa1709974.
 69. Lee, H., et al. “Minimal Residual Disease (MRD) Assessment by Flow Cytometry after ASCT for AL Amyloidosis: Are We There Yet?” *Bone Marrow Transplantation*, 2017, doi:10.1038/bmt.2017.28.
 70. Lemaire, Miguel, et al. “The Microenvironment and Molecular Biology of the Multiple Myeloma Tumor.” *Advances in Cancer Research*, 2011, doi:10.1016/B978-0-12-386469-7.00002-5.
 71. Lilleness, Brian, et al. “Development and Validation of a Survival Staging System Incorporating BNP in Patients with Light Chain Amyloidosis.” *Blood*, 2019, doi:10.1182/blood-2018-06-858951.
 72. Lisenko, Katharina, et al. “Flow Cytometry-Based Characterization of Underlying Clonal B and Plasma Cells in Patients with Light Chain Amyloidosis.” *Cancer Medicine*, 2016, doi:10.1002/cam4.725.
 73. Liu, Junjia, et al. “Fluorophores and Their Applications as Molecular Probes in Living Cells.” *Current Organic Chemistry*, 2013, doi:10.2174/1385272811317060003.
 74. Lodish, Harvey, et al. “From Stem Cell to Erythroblast: Regulation of Red Cell Production at Multiple Levels by Multiple Hormones.” *IUBMB Life*, 2010, doi:10.1002/iub.322.
 75. Matsuda, M., et al. “Peripheral Nerve Involvement in Primary Systemic AL Amyloidosis: A Clinical and Electrophysiological Study.” *European Journal of Neurology*, 2011, doi:10.1111/j.1468-1331.2010.03215.x.
 76. Merlini, Giampaolo, David C. Seldin, et al. “Amyloidosis: Pathogenesis and New Therapeutic Options.” *Journal of Clinical Oncology*, 2011, doi:10.1200/JCO.2010.32.2271.
 77. Merlini, Giampaolo, Raymond L. Comenzo, et al. “Immunoglobulin Light Chain Amyloidosis.” *Expert Review of Hematology*, 2014, doi:10.1586/17474086.2014.858594.

78. Merlini, Giampaolo, Angela Dispenzieri, et al. "Systemic Immunoglobulin Light Chain Amyloidosis." *Nature Reviews Disease Primers*, 2018, doi:10.1038/s41572-018-0034-3.
79. Merlini, Giampaolo, Ashutosh D. Wechalekar, et al. "Systemic Light Chain Amyloidosis: An Update for Treating Physicians." *Blood*, 2013, doi:10.1182/blood-2013-01-453001.
80. Merlini, Giampaolo, and Vittorio Bellotti. "Molecular Mechanisms of Amyloidosis." *New England Journal of Medicine*, 2003, doi:10.1056/NEJMra023144.
81. Merlini, Giampaolo, and Marvin J. Stone. "Dangerous Small B-Cell Clones." *Blood*, 2006, doi:10.1182/blood-2006-03-001164.
82. Milani, Paolo, Giampaolo Merlini, et al. "Light Chain Amyloidosis." *Mediterranean Journal of Hematology and Infectious Diseases*, 2018, doi:10.4084/mjhid.2018.022.
83. Milani, Paolo, Giovanni Palladini, et al. "New Concepts in the Treatment and Diagnosis of Amyloidosis." *Expert Review of Hematology*, 2018, doi:10.1080/17474086.2018.1424534.
84. Milani, Paolo, Massa Margherita, et al. "Persistence of Minimal Residual Disease by Multiparameter Flow Cytometry Can Hinder Recovery of Organ Damage in Patients With AL Amyloidosis." *Clinical Lymphoma Myeloma and Leukemia*, 2017, doi:10.1016/j.clml.2017.03.041.
85. Milani, Paolo, Giampaolo Merlini, et al. "What Does Minimal Residual Disease Mean in AL Amyloidosis?" *Expert Opinion on Orphan Drugs*, 2018, doi:10.1080/21678707.2018.1549482.
86. Morgan, Gareth J., Grace A. Usher, et al. "Incomplete Refolding of Antibody Light Chains to Non-Native, Protease-Sensitive Conformations Leads to Aggregation: A Mechanism of Amyloidogenesis in Patients?" *Biochemistry*, 2017, doi:10.1021/acs.biochem.7b00579.
87. Morgan, Gareth J., Brian A. Walker, et al. "The Genetic Architecture of Multiple Myeloma." *Nature Reviews Cancer*, 2012, doi:10.1038/nrc3257.
88. Morgan, Gareth J., and Jeffery W. Kelly. "The Kinetic Stability of a Full-Length Antibody Light Chain Dimer Determines Whether Endoproteolysis Can Release Amyloidogenic Variable Domains." *Journal of Molecular Biology*, 2016, doi:10.1016/j.jmb.2016.08.021.

89. Morrison, Sean J., and Judith Kimble. "Asymmetric and Symmetric Stem-Cell Divisions in Development and Cancer." *Nature*, 2006, doi:10.1038/nature04956.
90. Muchtar, E., et al. "Immunoparesis in Newly Diagnosed AL Amyloidosis Is a Marker for Response and Survival." *Leukemia*, 2017, doi:10.1038/leu.2016.140.
91. Muchtar, Eli, Angela Dispenzieri, Nelson Leung, et al. "Depth of Organ Response in AL Amyloidosis Is Associated with Improved Survival: Grading the Organ Response Criteria." *Leukemia*, 2018, doi:10.1038/s41375-018-0060-x.
92. Muchtar, Eli, Francis K. Buadi, Angela Dispenzieri, et al. "Immunoglobulin Light-Chain Amyloidosis: From Basics to New Developments in Diagnosis, Prognosis and Therapy." *Acta Haematologica*, 2016, doi:10.1159/000443200.
93. Muchtar, Eli, Morie A. Gertz, Shaji K. Kumar, et al. "Improved Outcomes for Newly Diagnosed AL Amyloidosis between 2000 and 2014: Cracking the Glass Ceiling of Early Death." *Blood*, 2017, doi:10.1182/blood-2016-11-751628.
94. Muchtar, Eli, Angela Dispenzieri, Martha Q. Lacy, et al. "Overuse of Organ Biopsies in Immunoglobulin Light Chain Amyloidosis (AL): The Consequence of Failure of Early Recognition." *Annals of Medicine*, 2017, doi:10.1080/07853890.2017.1304649.
95. Muchtar, Eli, Shaji K. Kumar, Morie A. Gertz, et al. "Staging Systems Use for Risk Stratification of Systemic Amyloidosis in the Era of High-Sensitivity Troponin T Assay." *Blood*, 2019, doi:10.1182/blood-2018-10-875252.
96. Muchtar, Eli, Angela Dispenzieri, Dragan Jevremovic, et al. "Survival Impact of Achieving Minimal Residual Negativity by Multi-Parametric Flow Cytometry in AL Amyloidosis." *Amyloid*, 2020, doi:10.1080/13506129.2019.1666709.
97. Muchtar, Eli, Dragan Jevremovic, et al. "The Prognostic Value of Multiparametric Flow Cytometry in AL Amyloidosis at Diagnosis and at the End of First-Line Treatment." *Blood*, 2017, doi:10.1182/blood-2016-06-721878.
98. Nyström, Sofia N., and Gunilla T. Westermark. "AA-Amyloid Is Cleared by Endogenous Immunological Mechanisms." *Amyloid*, 2012, doi:10.3109/13506129.2012.711391.
99. Obici, Laura, and Giampaolo Merlini. "Amyloidosis in Autoinflammatory Syndromes." *Autoimmunity Reviews*, 2012, doi:10.1016/j.autrev.2012.07.016.
100. Paiva, Bruno, Maria Teresa Cedena, et al. "Minimal Residual Disease

- Monitoring and Immune Profiling in Multiple Myeloma in Elderly Patients.” *Blood*, 2016, doi:10.1182/blood-2016-03-705319.
101. Paiva, Bruno, Jacques J. M. Van Dongen, et al. “New Criteria for Response Assessment: Role of Minimal Residual Disease in Bmultiple Myeloma.” *Blood*, 2015, doi:10.1182/blood-2014-11-568907.
 102. Paiva, Bruno, Joaquin Martinez-Lopez, et al. “Phenotypic, Transcriptomic, and Genomic Features of Clonal Plasma Cells in Light-Chain Amyloidosis.” *Blood*, 2016, doi:10.1182/blood-2015-10-673095.
 103. Paiva, Bruno, Luis A. Corchete, et al. “Phenotypic, Transcriptomic and Genomic Characterization Of Clonal Plasma Cells (PCs) From Newly Diagnosed Patients With Light Chain Amyloidosis (AL).” *Blood*, 2013, doi:10.1182/blood.v122.21.1841.1841.
 104. Paiva, Bruno, María Belén Vidriales, et al. “The Clinical Utility and Prognostic Value of Multiparameter Flow Cytometry Immunophenotyping in Light-Chain Amyloidosis.” *Blood*, 2011, doi:10.1182/blood-2010-12-324665.
 105. Palladini, Giovanni, Sajitha Sachchithanatham, et al. “A European Collaborative Study of Cyclophosphamide, Bortezomib, and Dexamethasone in Upfront Treatment of Systemic AL Amyloidosis.” *Blood*, 2015, doi:10.1182/blood-2015-01-620302.
 106. Palladini, Giovanni, Ute Hegenbart, et al. “A Staging System for Renal Outcome and Early Markers of Renal Response to Chemotherapy in AL Amyloidosis.” *Blood*, 2014, doi:10.1182/blood-2014-04-570010.
 107. Palladini, Giovanni, Paola Russo, et al. “Identification of Amyloidogenic Light Chains Requires the Combination of Serum-Free Light Chain Assay with Immunofixation of Serum and Urine.” *Clinical Chemistry*, 2009, doi:10.1373/clinchem.2008.117143.
 108. Palladini, Giovanni, Angela Dispenzieri, et al. “New Criteria for Response to Treatment in Immunoglobulin Light Chain Amyloidosis Based on Free Light Chain Measurement and Cardiac Biomarkers: Impact on Survival Outcomes.” *Journal of Clinical Oncology*, 2012, doi:10.1200/JCO.2011.37.7614.
 109. Palladini, Giovanni, Carlo Campana, et al. “Serum N-Terminal pro-Brain Natriuretic Peptide Is a Sensitive Marker of Myocardial Dysfunction in AL Amyloidosis.” *Circulation*, 2003, doi:10.1161/01.CIR.0000068314.02595.B2.
 110. Palladini, Giovanni, and Giampaolo Merlini. “When Should Treatment of AL

- Amyloidosis Start at Relapse? Early, to Prevent Organ Progression.” *Blood Advances*, 2019, doi:10.1182/bloodadvances.2018021253.
111. Pardanani, Animesh, et al. “Circulating Peripheral Blood Plasma Cells as a Prognostic Indicator in Patients with Primary Systemic Amyloidosis.” *Blood*, 2003, doi:10.1182/blood-2002-06-1698.
 112. Peceliunas, Valdas, et al. “Six Color Flow Cytometry Detects Plasma Cells Expressing Aberrant Immunophenotype in Bone Marrow of Healthy Donors.” *Cytometry Part B - Clinical Cytometry*, 2011, doi:10.1002/cyto.b.20601.
 113. Pinney, Jennifer H., et al. “Outcome in Renal AL Amyloidosis after Chemotherapy.” *Journal of Clinical Oncology*, 2011, doi:10.1200/JCO.2010.30.5235.
 114. Pojero, Fanny, Alessandra Casuccio, et al. “Old and New Immunophenotypic Markers in Multiple Myeloma for Discrimination of Responding and Relapsing Patients: The Importance of ‘Normal’ Residual Plasma Cell Analysis.” *Cytometry Part B - Clinical Cytometry*, 2015, doi:10.1002/cyto.b.21218.
 115. Pojero, Fanny, Juan Flores-Montero, et al. “Utility of CD54, CD229, and CD319 for the Identification of Plasma Cells in Patients with Clonal Plasma Cell Diseases.” *Cytometry Part B - Clinical Cytometry*, 2016, doi:10.1002/cyto.b.21269.
 116. Poshusta, Tanya L., et al. “Mutations in Specific Structural Regions of Immunoglobulin Light Chains Are Associated with Free Light Chain Levels in Patients with AL Amyloidosis.” *PLoS ONE*, 2009, doi:10.1371/journal.pone.0005169.
 117. Prokaeva, Tatiana, et al. “Soft Tissue, Joint, and Bone Manifestations of AL Amyloidosis: Clinical Presentation, Molecular Features, and Survival.” *Arthritis and Rheumatism*, 2007, doi:10.1002/art.22959.
 118. Quarona, Valeria, et al. “CD38 and CD157: A Long Journey from Activation Markers to Multifunctional Molecules.” *Cytometry Part B - Clinical Cytometry*, 2013, doi:10.1002/cyto.b.21092.
 119. Quock, Tiffany P., et al. “Epidemiology of AL Amyloidosis: A Real-World Study Using US Claims Data.” *Blood Advances*, 2018, doi:10.1182/bloodadvances.2018016402.
 120. Rajkumar, S. Vincent, et al. “International Myeloma Working Group Updated Criteria for the Diagnosis of Multiple Myeloma.” *The Lancet Oncology*, 2014,

- doi:10.1016/S1470-2045(14)70442-5.
121. Rawstron, Andy C., et al. "Measuring Disease Levels in Myeloma Using Flow Cytometry in Combination with Other Laboratory Techniques: Lessons from the Past 20 Years at the Leeds Haematological Malignancy Diagnostic Service." *Cytometry Part B - Clinical Cytometry*, 2016, doi:10.1002/cyto.b.21271.
 122. Ribatti, D., et al. "Importance of the Bone Marrow Microenvironment in Inducing the Angiogenic Response in Multiple Myeloma." *Oncogene*, 2006, doi:10.1038/sj.onc.1209456.
 123. Ribatti, Domenico, et al. "Mast Cells and Angiogenesis in Human Plasma Cell Malignancies." *International Journal of Molecular Sciences*, 2019, doi:10.3390/ijms20030481.
 124. Robillard, Nelly, et al. "Immunophenotype of Normal and Myelomatous Plasma-Cell Subsets." *Frontiers in Immunology*, 2014, doi:10.3389/fimmu.2014.00137.
 125. Roccatello, Dario et al. "CD38 and Anti-CD38 Monoclonal Antibodies in AL Amyloidosis: Targeting Plasma Cells and beyond." *International journal of molecular sciences* vol. 21,11 4129. 10 Jun. 2020, doi:10.3390/ijms21114129
 126. Rossi, A., et al. "Mutational Landscape Reflects the Biological Continuum of Plasma Cell Dyscrasias." *Blood Cancer Journal*, 2017, doi:10.1038/bcj.2017.19.
 127. Rubinstein, Samuel, et al. "Novel Pathologic Scoring Tools Predict End-Stage Kidney Disease in Light Chain (AL) Amyloidosis." *Amyloid*, 2017, doi:10.1080/13506129.2017.1360272.
 128. Sachchithanatham, Sajitha, et al. "Use Of Plasma Cell Immunophenotype As Prognostic Markers In Patients With Systemic AL Amyloidosis." *Blood*, 2013, doi:10.1182/blood.v122.21.3120.3120.
 129. Sanchorawala, Vaishali, et al. "Safety, Tolerability and Response Rates of Daratumumab in Patients with Relapsed Light Chain (AL) Amyloidosis: Results of a Phase II Study." *Blood*, 2018, doi:10.1182/blood-2018-99-112991.
 130. Schatz, David G., and Patrick C. Swanson. "V(D)J Recombination: Mechanisms of Initiation." *Annual Review of Genetics*, 2011, doi:10.1146/annurev-genet-110410-132552.
 131. Schönland, Stefan O., et al. "Immunohistochemistry in the Classification of

- Systemic Forms of Amyloidosis: A Systematic Investigation of 117 Patients.” *Blood*, 2012, doi:10.1182/blood-2011-06-358507.
132. Selvanayagam, Joseph B., et al. “Evaluation and Management of the Cardiac Amyloidosis.” *Journal of the American College of Cardiology*, 2007, doi:10.1016/j.jacc.2007.08.028.
 133. Shi, Jianru, et al. “Amyloidogenic Light Chains Induce Cardiomyocyte Contractile Dysfunction and Apoptosis via a Non-Canonical P38 α MAPK Pathway.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2010, doi:10.1073/pnas.0912263107.
 134. Sidiqi, M. Hasib, et al. “Prognostic Significance of Stringent Complete Response after Stem Cell Transplantation in Immunoglobulin Light Chain Amyloidosis.” *Biology of Blood and Marrow Transplantation*, 2018, doi:10.1016/j.bbmt.2018.06.027.
 135. Sipe, Jean D., et al. “Nomenclature 2014: Amyloid Fibril Proteins and Clinical Classification of the Amyloidosis.” *Amyloid*, 2014, doi:10.3109/13506129.2014.964858.
 136. Soares, Sandra M., et al. “Bleeding Complications After Transcutaneous Kidney Biopsy in Patients With Systemic Amyloidosis: Single-Center Experience in 101 Patients.” *American Journal of Kidney Diseases*, 2008, doi:10.1053/j.ajkd.2008.05.022.
 137. Soh, Kah Teong, et al. “Diagnosis of Plasma Cell Dyscrasias and Monitoring of Minimal Residual Disease by Multiparametric Flow Cytometry.” *Clinics in Laboratory Medicine*, 2017, doi:10.1016/j.cll.2017.08.001.
 138. Staron, Andrew, et al. “Assessment of Minimal Residual Disease Using Multiparametric Flow Cytometry in Patients with AL Amyloidosis.” *Blood Advances*, 2020, doi:10.1182/bloodadvances.2019001331.
 139. Stetler-Stevenson, Maryalice, et al. “Consensus Guidelines for Myeloma Minimal Residual Disease Sample Staining and Data Acquisition.” *Cytometry Part B - Clinical Cytometry*, 2016, doi:10.1002/cyto.b.21249.
 140. Stolk, Dorian, et al. “Positive & Negative Roles of Innate Effector Cells in Controlling Cancer Progression.” *Frontiers in Immunology*, 2018, doi:10.3389/fimmu.2018.01990.
 141. Sucker, Christoph, et al. “Amyloidosis and Bleeding: Pathophysiology, Diagnosis, and Therapy.” *American Journal of Kidney Diseases*, 2006,

- doi:10.1053/j.ajkd.2006.03.036.
142. Teng, Jiamin, et al. "An Animal Model of Glomerular Light-Chain-Associated Amyloidogenesis Depicts the Crucial Role of Lysosomes." *Kidney International*, 2014, doi:10.1038/ki.2014.122.
 143. Terpos, Evangelos, et al. "Impact of Minimal Residual Disease Detection by Next-Generation Flow Cytometry in Multiple Myeloma Patients with Sustained Complete Remission after Frontline Therapy." *HemaSphere*, 2019, doi:10.1097/hs9.0000000000000300.
 144. Terrier, Benjamin, et al. "The Clinical Spectrum of IgM-Related Amyloidosis: A French Nationwide Retrospective Study of 72 Patients." *Medicine*, 2008, doi:10.1097/MD.0b13e31816c43b6.
 145. Thomas, Victoria E., et al. "Amyloidosis: Diagnosis and New Therapies for a Misunderstood and Misdiagnosed Disease." *Neurodegenerative Disease Management*, 2019, doi:10.2217/nmt-2019-0020.
 146. Thompson, Carrie A., et al. "Systemic AL Amyloidosis with Acquired Factor X Deficiency: A Study of Perioperative Bleeding Risk and Treatment Outcomes in 60 Patients." *American Journal of Hematology*, 2010, doi:10.1002/ajh.21603.
 147. Tovar, Natalia, et al. "Bone Marrow Plasma Cell Infiltration in Light Chain Amyloidosis: Impact on Organ Involvement and Outcome." *Amyloid*, 2018, doi:10.1080/13506129.2018.1443439.
 148. van Lochem, E. G., et al. "Immunophenotypic Differentiation Patterns of Normal Hematopoiesis in Human Bone Marrow: Reference Patterns for Age-Related Changes and Disease-Induced Shifts." *Cytometry*, 2004, doi:10.1002/cyto.b.20008.
 149. Vaxman, Iuliana, and Morie Gertz. "Recent Advances in the Diagnosis, Risk Stratification, and Management of Systemic Light-Chain Amyloidosis." *Acta Haematologica*, 2019, doi:10.1159/000495455.
 150. Vrana, Julie A., et al. "Classification of Amyloidosis by Laser Microdissection and Mass Spectrometry-Based Proteomic Analysis in Clinical Biopsy Specimens." *Blood*, 2009, doi:10.1182/blood-2009-07-230722.
 151. Wang, Annabel K., et al. "Patterns of Neuropathy and Autonomic Failure in Patients with Amyloidosis." *Mayo Clinic Proceedings*, 2008, doi:10.4065/83.11.1226.
 152. Wechalekar, Ashutosh D., Stefan O. Schonland, et al. "A European

- Collaborative Study of Treatment Outcomes in 346 Patients with Cardiac Stage III AL Amyloidosis.” *Blood*, 2013, doi:10.1182/blood-2012-12-473066.
153. Wechalekar, Ashutosh D., Helen J. Lachmann, et al. “AL Amyloidosis Associated with IgM Paraproteinemia: Clinical Profile and Treatment Outcome.” *Blood*, 2008, doi:10.1182/blood-2008-02-138156.
 154. Westermark, Gunilla T., et al. “Noncerebral Amyloidoses: Aspects on Seeding, Cross-Seeding, and Transmission.” *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 2018, doi:10.1101/cshperspect.a024323.
 155. Wood, Brent L. “Principles of Minimal Residual Disease Detection for Hematopoietic Neoplasms by Flow Cytometry.” *Cytometry Part B - Clinical Cytometry*, 2016, doi:10.1002/cyto.b.21239.
 156. Woolthuis, Carolien M., et al. “Aging of Hematopoietic Stem Cells: Intrinsic Changes or Micro-Environmental Effects?” *Current Opinion in Immunology*, 2011, doi:10.1016/j.coi.2011.05.006.
 157. Yang, Yang, et al. “Heparan Sulfate Regulates Targeting of Syndecan-1 to a Functional Domain on the Cell Surface.” *Journal of Biological Chemistry*, 2003, doi:10.1074/jbc.M209440200.
 158. Zhang, Yuanyuan, and Zemin Zhang. “The History and Advances in Cancer Immunotherapy: Understanding the Characteristics of Tumor-Infiltrating Immune Cells and Their Therapeutic Implications.” *Cellular & Molecular Immunology*, 2020, doi:10.1038/s41423-020-0488-6.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

6.1 ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

Despoina Avramopoulou

Aristoxenou 8, Pagrati, 11635, Greece
Tel: +302755031898, Mobile: +306983432052,
E-mail: despoina_94de@hotmail.com
Date of Birth: 22 January 1994

Objective	<p>09/2018-09/2020: Postgraduate student to the MSc in ‘<i>Applications of Biology to Medicine</i>’ at National and Kapodistrian University of Athens Excellent written and spoken communicative skills Particularly relevant educational and professional experience Very motivated, high academic, social and work standards</p>
Education	<p>09/2013-002/2018: BSc in Human Biology at the University of Nicosia, with final grade 2.685/4. Excellent performance in the relevant core modules General Biology, Chemistry, Calculus for the Life Sciences, Biostatistics, Human Anatomy and Physiology, Introduction to Microbiology and Virology, among others 09/2009-06/2012: Secondary Education studies at the General Lyceum of Astros Kynourias, Greece, having graduated with distinction, 18/20</p>
Professional Experience	<p>09/2019-06/2020:- I worked on my final year research project entitled, ‘Investigation of the relationship between oncogenicity and cellular metabolism as an immunoregulation target: The example of AL amyloidosis’, in National Kapodistrian University of Athens-</p> <ul style="list-style-type: none">- Collection and Analysis of BM samples from patients with AL amyloidosis during diagnosis, after first-line therapy and after consolidation therapy with Daratumumab, with the use of New Generation Flow cytometry (NGF)-Immunophenotypic assessment of the surface markers CD19, CD27, CD38, CD45, CD56, CD81, CD117, CD138 and intracellular κ and λ chains for the detection of Minimal Residual Disease (MRD)-Identification and quantification of 17 BM haematopoietic populations <p>09/2017-01/2018: Research Assistant in Epigenetics and miRNA Research Laboratory, Department of Life and Health Sciences, University of Nicosia. I worked on my final year project entitled, “Regulation of Human Ribosomal Proteins by miRNA” and I supervised a new graduate student, teaching him all laboratory techniques.</p> <p>06-08/2015, 2016, 2017, 2018, 2019: Pharmacy clerk and cashier at Pharmacy of my father, Dimitris Avramopoulos. My duties involved customer service and electronic prescriptions.</p> <p>Presentation of my final thesis with title ‘<i>Investigation of the relationship between oncogenicity and cellular metabolism as an immunoregulation target: The example of AL amyloidosis</i>’ as a poster, in 46th Annual Panhellenic Medical Conference- Congress World</p>
Posters	
Languages	<p>Greek : Native competence, English: Fluent knowledge, C2 IELTS certificate with final grade 6,5/9</p>

IT Skills	<p><i>French</i> : Good knowledge, B1</p> <p>ECDL - Good knowledge in all MS Office (Word, Excel, PowerPoint) and Windows</p>
Awards and Distinctions	<p>Elected president of my high school's ruling committee for 3 consecutive years</p> <p>Recipient of Greek Ministry of Education academic excellence awards in high school</p>
Conferences	<p>"Emotional Intelligence" Careers Office of the University of Nicosia, 11/2017</p> <p>"Multiple Sclerosis", Human Biology Society of the University of Nicosia, 02/2017</p> <p>"First Aids and Cardiopulmonary Recovery", Actionmed, 11/2011</p>
Extracurricular Activities and Memberships	<p>Keen on traditional and social dance and on photography</p> <p>Photography seminar: '<i>Introduction to photography technique - manipulation of the medium and basic principles of photography - composition-frame-rules</i>'</p> <p>Volunteer in several events of the Human Biology Society of the University of Nicosia and of the Cultural Association Club of Agios Andreas Kynourias, Greece</p> <p>Aficionado of the classical and modern European and American cinema</p>

6.2 ΣΥΝΕΔΡΙΑ

Η παρούσα διπλωματική εργασία έχει παρουσιαστεί με τη μορφή e-πόστερ στο 46ο Ετήσιο Πανελλήνιο Ιατρικό Συνέδριο, 2020.



 **ΙΑΤΡΙΚΗ ΕΤΑΙΡΕΙΑ ΑΘΗΝΩΝ**
ΕΤΟΣ ΙΔΡΥΣΕΩΣ 1835

46^ο
ΕΤΗΣΙΟ ΠΑΝΕΛΛΗΝΙΟ
ΙΑΤΡΙΚΟ ΣΥΝΕΔΡΙΟ



19-20
ΙΟΥΝΙΟΥ
2020

ΔΙΑΔΙΚΤΥΑΚΗ
ΑΠ' ΕΥΘΕΙΑΣ
ΠΑΡΟΥΣΙΑΣΗ

Πληροφορίες: **ΙΑΤΡΙΚΗ ΕΤΑΙΡΕΙΑ ΑΘΗΝΩΝ**, Μαιάνδρου 23, 115 28 Αθήνα
τηλ.: 210 7211845, 210 7243161 fax: 210 7215082 | email: iea@mednet.gr, mednet@mednet.gr
www.mednet.gr |  **Ιατρική Εταιρεία Αθηνών-Athens Medical Society**

ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΜΙΚΡΟΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ ΤΟΥ ΜΥΕΛΟΥ ΤΩΝ ΟΣΤΩΝ ΑΣΘΕΝΩΝ ΜΕ ΠΡΩΤΟΠΑΘΗ ΑΜΥΛΟΕΙΔΩΣΗ ΠΡΙΝ ΚΑΙ ΜΕΤΑ ΑΠΟ ΘΕΡΑΠΕΙΑ ΜΕ ΑΝΤΙ-CD38

Δ. Αβραμοπούλου^{1*}, Π. Ρουσάκης^{2*}, Ι.Β. Κωστόπουλος¹, Ο.Ε. Τσιτσώνη¹, Ε. Τέρπος², Μ.Α. Δημόπουλος², Ε. Καστρίτης²

¹Τομέας Φυσιολογίας Ζώων και Ανθρώπου, Τμήμα Βιολογίας, Εθνικό Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, ²Θεραπευτική Κλινική, Γ.Ν.Α. «Αλεξάνδρα», Ιατρική Σχολή, Εθνικό Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Αθήνα. (*Ισότιμη Συμμετοχή)

Εισαγωγή

Νεότερες θεραπείες, όπως το αντι-CD38 μονοκλωνικό αντίσωμα Δαρατουμουμάμπη (Daratumumab), μπορούν να επιτύχουν βαθύτερες ανταποκρίσεις σε ασθενείς με πρωτοπαθή συστηματική (AL) αμυλοείδωση. Ωστόσο, υπάρχει ανάγκη ανάπτυξης βιοδεικτών για την εκτίμηση της παρουσίας υπολεμιατικής νόσου, η οποία επιβαρύνει την λειτουργία οργάνων όπως η καρδιά και οι νεφροί, ακόμα και σε ασθενείς σε πλήρη ύφεση.

Σκοπός: Η ανάλυση του μικροπεριβάλλοντος του μυελού των οστών (ΜΟ) ασθενών με AL αμυλοείδωση σε σχέση με τη χορήγηση Δαρατουμουμάμπης, καθώς και την παρουσία ή την απουσία Ελάχιστης Υπολεμιατικής Νόσου (EYN).

Υλικά και Μέθοδοι

Δείγματα ΜΟ από 25 ασθενείς με AL αμυλοείδωση ελήφθησαν κατά τη διάγνωση, μετά την ολοκλήρωση θεραπείας πρώτης γραμμής και μετά από θεραπεία εδραίωσης με Δαρατουμουμάμπη. Τα δείγματα αναλύθηκαν με κυτταρομετρία ροής νέας γενιάς για την ανίχνευση της EYN, σύμφωνα με τις οδηγίες του EuroFlow. Η χρώση των κυττάρων πραγματοποιήθηκε μέσω δύο ανεξάρτητων panel επιφανειακών και ενδοκυττάρων δεικτών (Πίνακας 1). Για κάθε δείγμα καταγράφονταν τουλάχιστον 5x10⁶ «γεγονότα» ανά panel. Παράλληλα, ταυτοποιήθηκαν και ποσοτικοποιήθηκαν 17 αιμοποιητικοί πληθυσμοί (Πίνακας 2). Για την ανάλυση των δεδομένων χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό [InFlowcyt](#).

Πίνακας 1. Τα δύο panel που χρησιμοποιήθηκαν για την ανάλυση των δειγμάτων ασθενών με AL αμυλοείδωση.

	FITC	PE	PerCP-Cy5.5	Pacific Blue	AmCyan	PE-Cy7	APC	APC-Cy7
Panel 1 (Επιφανειακό)	CD38 ^a (MultiEpitope)	CD56 ^a	CD45 ^b	CD138 ^b	CD27 ^c	CD19 ^d	CD117 ^e	CD81 ^f
Panel 2 (Ενδοκυττάρια)	CD38 ^a (MultiEpitope)	CD56 ^a	CD45 ^b	CD138 ^b	CD27 ^c	CD19 ^d	Cy16 ^g	Cy16 ^h

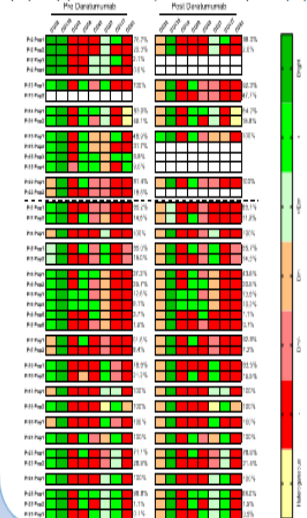
^aCytospas, ^bBecton Dickinson, ^cBiolegend, ^dBeckman Coulter, ^eUko

Πίνακας 2. Αιμοποιητικοί πληθυσμοί που αναλύθηκαν σε κάθε δείγμα, πλην των πλασματοκυττάρων.

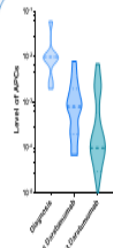
Πληθυσμοί	CD19	CD27	CD38	CD45	CD56	CD81	CD117	SSC
B κύτταρα	+			dim/+				low
Παρένενα B κύτταρα	+	-	-/dim	+				low
Προγονικά B κύτταρα	+	-	bright	dim				low
B κύτταρα μνήμης	+	+	-/dim	+				low
T κύτταρα	-			+	-			low
CD27 ⁺ T κύτταρα	-	+		+	-			low
NK & NKT κύτταρα	-			+	+			low
CD27 ⁺ NK & NKT κύτταρα	-	+		+	+			low
Βασεόφιλα			+	dim		-		
Ηωσινοφίλα				bright		bright		high
Ουδετερόφιλα				dim		-		high
Μονοκύτταρα			+	+		+		intermediate
Μαστοκύτταρα				dim			bright	
Προγονικά μυελοειδή κύτταρα			+	dim			+	high
Ερυθροβλάστες			-	-				low
Προγονικά ερυθροειδή κύτταρα			-/dim	-/dim				low

Αποτελέσματα

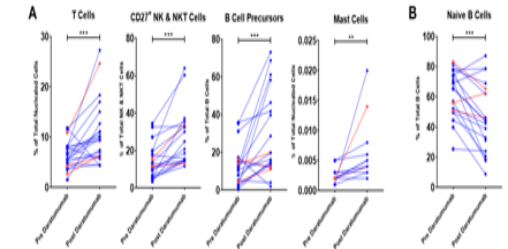
Πριν από τη χορήγηση Δαρατουμουμάμπης, 20/22 ασθενείς βρέθηκαν EYN*, ενώ η αντίστοιχη αναλογία μετά τη λήψη του φαρμάκου ήταν 19/24. Από τους 21 ασθενείς με διαθέσιμο δείγμα ΜΟ πριν και μετά τη χορήγηση Δαρατουμουμάμπης, οι 19 βρέθηκαν MRD* πριν τη χορήγηση του φαρμάκου. Από αυτούς, 18/19 παρέμειναν EYN* και μετά τη λήψη Δαρατουμουμάμπης. Σε 17/18 ασθενείς παρατηρήθηκε μειωμένη έκφραση του δείκτη CD38 επί των κλωνικών κυττάρων μετά τη λήψη Δαρατουμουμάμπης, ενώ σε 5/18 ασθενείς βρέθηκαν επιπλέον αλλαγές στη σύσταση του πληθυσμού των παθολογικών πλασματοκυττάρων (Εικόνα 1). Ωστόσο, είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι η χορήγηση της Δαρατουμουμάμπης οδήγησε σε υποδεκαπλασιασμό του διάμεσου φορτίου της νόσου των ασθενών (Εικόνα 2). Η Δαρατουμουμάμπη φάνηκε να μεταβάλλει το μικροπεριβάλλον του ΜΟ, μέσω αύξησης του ποσοστού των T κυττάρων, των CD27⁺ NK και NKT κυττάρων, των προγονικών B κυττάρων και των μαστοκυττάρων, αλλά και μείωσης του ποσοστού των παρένενων B κυττάρων (Εικόνα 3). Η παρουσία/απουσία EYN δεν φάνηκε να επιδρά στο μικροπεριβάλλον του ΜΟ, πιθανότατα λόγω του μικρού αριθμού EYN δειγμάτων.



Εικόνα 1. Ανοσοφαινότυποι των κλωνικών πλασματοκυττάρων πριν και μετά τη χορήγηση Δαρατουμουμάμπης στους 18 ασθενείς που παρέμειναν EYN* μετά τη λήψη του φαρμάκου. Κάθε παραλληλόγραμμο αναπαριστά έναν ασθενή και κάθε σειρά αφορά έναν φαινοτυπικά διακριτό κλωνικό πληθυσμό. Δεξιά από κάθε σειρά αναγράφεται το ποσοστό το εκάστοτε πληθυσμού επί του συνόλου των κλωνικών κυττάρων. Με διαφορετικά χρώματα δείχνονται τα διαφορετικά επίπεδα έκφρασης των δεικτών που μελετήθηκαν. Πάνω από τη διακεκομμένη γραμμή βρίσκονται οι ασθενείς, στους οποίους η χορήγηση Δαρατουμουμάμπης οδήγησε σε αλλαγές στη σύσταση του κλωνικού πληθυσμού. P1, ασθενής-Pop, πληθυσμός.



Εικόνα 2. Το ποσοστό των κλωνικών πλασματοκυττάρων (ALPCs) των 25 ασθενών που μελετήθηκαν κατά τη διάγνωση, πριν και μετά τη χορήγηση Δαρατουμουμάμπης. Η διακεκομμένη γραμμή αναπαριστά τη διάμεσο, ενώ οι στενές γραμμές αφορούν το 1^ο και 3^ο εκατοστημόριο.



Εικόνα 3. Οι κυτταρικοί πληθυσμοί του ΜΟ στον οποίο το ποσοστό παρατηρήθηκε σημαντική (Α) αύξηση και (Β) μείωση μετά τη χορήγηση Δαρατουμουμάμπης. Με μικρά χρώμα αναπαριστούν οι ασθενείς που παρέμειναν EYN* μετά τη λήψη του φαρμάκου, ενώ με κόκκινο όσοι χαρακτηρίστηκαν EYN. Φαίνεται πως οι τάσεις αυτές είναι ανεξάρτητες της EYN.

Συμπεράσματα

- Η μέθοδος του EuroFlow για την ανίχνευση της EYN στην AL αμυλοείδωση επιτρέπει ταυτοποίηση και ποσοτικοποίηση 17 πληθυσμών του ΜΟ.
- Η χορήγηση Δαρατουμουμάμπης σε ασθενείς με AL αμυλοείδωση επιδρά στη σύσταση του κλωνικού πληθυσμού και στον ανοσοφαινότυπο των κλωνικών κυττάρων.
- Η λήψη Δαρατουμουμάμπης μειώνει σημαντικά το φορτίο της νόσου στην AL αμυλοείδωση.
- Η Δαρατουμουμάμπη μεταβάλλει ριζικά το μικροπεριβάλλον του ΜΟ στην AL αμυλοείδωση.

Βιβλιογραφία

- Kastritis et al. Evaluation of minimal residual disease using next-generation flow cytometry in patients with AL amyloidosis. *Blood Cancer Journal*, 2018.
- Puig et al. Flow cytometry for fast screening of automated risk assessment in systemic light-chain amyloidosis. *Leukemia*, 2019.
- Paiva et al. Minimal residual disease monitoring and immune profiling in multiple myeloma in elderly patients. *Blood*, 2016.

Δηλώνω ρητά ότι το κείμενο της μεταπτυχιακής διπλωματικής εργασίας δεν αποτελεί προϊόν μερικής ή ολικής αντιγραφής, οι πηγές δε που χρησιμοποιήθηκαν περιορίζονται στις βιβλιογραφικές αναφορές και μόνον.

Υπογραφή μεταπτυχιακού φοιτητή

A handwritten signature in black ink, consisting of a stylized, cursive letter 'M' with a small flourish at the bottom left.