



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

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

**ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΚΥΚΛΟΦΟΡΟΥΝΤΩΝ ΚΑΡΚΙΝΙΚΩΝ
ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΣΤΗ ΜΑΚΡΟΣΦΑΙΡΙΝΑΙΜΙΑ ΤΟΥ WALDENSTRÖM**

ΣΤΑΜΑΤΙΑ ΣΚΟΥΡΤΗ
ΒΙΟΛΟΓΟΣ

ΑΘΗΝΑ 2022



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

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

**ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΚΥΚΛΟΦΟΡΟΥΝΤΩΝ ΚΑΡΚΙΝΙΚΩΝ
ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΣΤΗ ΜΑΚΡΟΣΦΑΙΡΙΝΑΙΜΙΑ ΤΟΥ WALDENSTRÖM**

ΣΤΑΜΑΤΙΑ ΣΚΟΥΡΤΗ
ΒΙΟΛΟΓΟΣ

ΑΘΗΝΑ 2022



ΕΘΝΙΚΟ & ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

ΤΟΜΕΑΣ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑΣ ΖΩΩΝ & ΑΝΘΡΩΠΟΥ

ΚΑΙ

Γ.Ν.Α. «ΑΛΕΞΑΝΔΡΑ»

ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ ΟΓΚΟΛΟΓΙΚΗ-ΑΙΜΑΤΟΛΟΓΙΚΗ ΜΟΝΑΔΑ

ΜΟΝΑΔΑ ΠΛΑΣΜΑΤΟΚΥΤΤΑΡΙΚΩΝ ΔΥΣΚΡΑΣΙΩΝ

**ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΚΥΚΛΟΦΟΡΟΥΝΤΩΝ ΚΑΡΚΙΝΙΚΩΝ
ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΣΤΗ ΜΑΚΡΟΣΦΑΙΡΙΝΑΙΜΙΑ ΤΟΥ WALDENSTRÖM**

ΣΤΑΜΑΤΙΑ ΣΚΟΥΡΤΗ
ΒΙΟΛΟΓΟΣ

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΜΕΛΟΣ ΔΕΠ: Ουρανία Τσιτσιλώνη, Καθηγήτρια Ανοσολογίας,
Τμήμα Βιολογίας, Εθνικό & Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗ ΚΑΘΟΔΗΓΗΣΗ: Ευστάθιος Καστρίτης, Καθηγητής
Θεραπευτικής-Παθολογίας/Ογκολογίας, Θεραπευτική Κλινική της Ιατρικής Σχολής,
Εθνικό & Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

- Ουρανία Τσιτσιλώνη, Καθηγήτρια Ανοσολογίας, Τμήμα Βιολογίας, Εθνικό & Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών
- Ευστάθιος Καστρίτης, Καθηγητής Θεραπευτικής-Παθολογίας/Ογκολογίας, Θεραπευτική Κλινική της Ιατρικής Σχολής, Εθνικό & Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών
- Ανδρέας Σκορίλας, Καθηγητής Κλινικής Βιοχημείας, Τμήμα Βιολογίας, Εθνικό & Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών

ΑΘΗΝΑ 2022

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η μακροσφαιριναιμία του Waldenström (WM) είναι ένα λεμφοπλασματοκυτταρικό λέμφωμα που χαρακτηρίζεται από τη διήθηση του μυελού των οστών (BM) από κλωνικό λεμφοπλασματοκυτταρικό πληθυσμό που παράγει μονοκλωνική ανοσοσφαιρίνη Μ (IgM). Η παρουσία συμπτωμάτων που συνδέονται με τη νόσο διακρίνει το συμπτωματικό WM από το ασυμπτωματικό (asymptomatic) WM, ενώ οι ασθενείς που έχουν παραπρωτεΐνη IgM στον ορό τους, απουσία συμπτωμάτων και απουσία διήθησης στον μυελό των οστών διαγιγνώσκονται με Μονοκλωνική Γαμμασφαιρινοπάθεια Αδιευκρίνιστης Σημασίας (Monoclonal Gammopathy of Undetermined Significance, MGUS). Η διάγνωση του WM απαιτεί ιστολογική ένδειξη διήθησης του μυελού των οστών από λεμφοπλασματοκυτταρικό λέμφωμα καθώς και την παρουσία μονοκλωνικής IgM γαμμαπάθειας.

Τα τελευταία χρόνια έχουν σημειωθεί σημαντικές πρόοδοι στη διάγνωση και τη θεραπεία του καρκίνου. Επεμβατικές διαδικασίες, όπως η κλασική βιοψία του όγκου ή η βιοψία του μυελού των οστών στις αιματολογικές κακοήθειες, αποτελούν τις πρότυπες μεθόδους αναφοράς (golden standard) για τη διάγνωση και την παρακολούθηση της νόσου. Ωστόσο, οι μέθοδοι αυτές έχουν σημαντικούς περιορισμούς. Μία νέα προσέγγιση έρχεται να υποστηρίξει και να συμπληρώσει τα κενά της επεμβατικής βιοψίας στην παρακολούθηση της εξέλιξης της νόσου σε πραγματικό χρόνο. Η υγρή βιοψία (liquid biopsy) αποτελεί μία μη-επεμβατική προσέγγιση που βασίζεται στην άντληση πληροφοριών μέσω ανάλυσης περιφερικού αίματος. Η προσέγγιση αυτή δίνει σημαντικές πληροφορίες για την βιολογία και την ετερογένεια του όγκου μέσω: α) ανίχνευσης και μοριακού χαρακτηρισμού κυκλοφορούντων καρκινικών κυττάρων (circulating tumor cells, CTCs), β) ανίχνευσης εξωκυττάρου κυκλοφορούντος καρκινικού DNA (circulating tumor DNA, ctDNA), γ) μελέτης κυκλοφορούντων miRNAs, και δ) απομόνωσης και μελέτης εξωκυτταρικών σωματιδίων (extracellular vesicles, EVs).

Τα τελευταία χρόνια, ο χαρακτηρισμός του ανοσοφαινοτύπου μέσω της ΠΚΡ θεωρείται απαραίτητος τόσο κατά τη διάγνωση, όσο και κατά την αξιολόγηση των αιματολογικών κακοηθειών, συμπεριλαμβανομένου και του WM. Στην παρούσα εργασία, έγινε προσδιορισμός των CTCs στο περιφερικό αίμα των ασθενών με WM με βάση το φαινοτυπικό τους προφίλ με την βοήθεια της Πολυπαραμετρικής Κυτταρομετρίας Ροής (ΠΚΡ), με σκοπό τον προσδιορισμό μοριακών αλλαγών μέσω της υγρής βιοψίας που θα έχουν σκοπό είτε να ανιχνεύσουν έγκαιρα την παρουσία υπολειμματικής νόσου, είτε να βοηθήσουν στην πρόβλεψη του θεραπευτικού αποτελέσματος.

SUMMARY

Waldenström macroglobulinemia (WM) is a lymphoplasmacytic lymphoma associated with a monoclonal immunoglobulin IgM protein and bone marrow (BM) infiltration by small lymphocytes. The presence of symptoms related to WM distinguishes symptomatic from asymptomatic WM while patients with an IgM monoclonal protein, absence of symptoms and absence of bone marrow infiltration by small lymphocytes are considered to have MGUS (Monoclonal Gammopathy of Undetermined Significance). WM diagnosis requires histological indication of bone marrow infiltration by lymphoplasmacytic lymphoma and the presence of IgM Monoclonal Gammopathy.

Remarkable progress has been made lately on cancer diagnosis and treatment. Invasive procedures like tumor biopsy or bone marrow biopsy in hematological malignancies are considered to be the golden standard for disease diagnosis and monitoring. These methods however have significant restrictions. A new approach is coming to support and complete the invasive biopsy in monitoring the disease progression in real time. Liquid biopsy is a non-invasive approach which counts on the analysis of the peripheral blood. This approach gives significant information about tumor biology and heterogeneity through: a) detection and molecular characterization of circulating tumor cells (CTCs), b) detection of extracellular circulating tumor DNA (ctDNA), c) analysis of circulating miRNAs and d) extraction and analysis of extracellular vesicles (EVs).

Recently, immunophenotypic characterization through multiparametric flow cytometry is considered necessary for both diagnosis and evaluation of hematological malignancies including WM. In this study, it was held detection of CTCs in the peripheral blood of patients with WM based on their immunophenotypic profile with the use of multiparametric flow cytometry. The aim of the study is the detection of molecular changes through liquid biopsy, which leads to early detection of minimal residual disease (MRD) and improves treatment prognosis.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Ευχαριστώ θερμά την καθηγήτρια Ανοσολογίας της Σχολής Θετικών Επιστημών του τμήματος Βιολογίας Ε.Κ.Π.Α., κυρία Ο. Τσιτσιλώνη, που μου έδωσε τη μοναδική ευκαιρία να δουλέψω στο εργαστήριο της, τη Μονάδα Κυτταρομετρίας Ροής του Πανεπιστημίου Αθηνών. Επίσης, θέλω να ευχαριστήσω τον καθηγητή Θεραπευτικής-Παθολογίας/Ογκολογίας της Ιατρικής Σχολής Ε.Κ.Π.Α., κύριο Ε. Καστρίτη, που με δέχτηκε στο ερευνητικό του εργαστήριο της Θεραπευτικής Κλινικής της Ιατρικής Σχολής. Παράλληλα, θέλω να εκφράσω τη βαθιά μου ευγνωμοσύνη στον καθηγητή της Ιατρικής Σχολής Ε.Κ.Π.Α., πρύτανη του Εθνικού & Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών και διευθυντή της Θεραπευτικής Κλινικής της Ιατρικής Σχολής, κύριο Μ.Α. Δημόπουλο, που με έκανε μέλος της κλινικής του.

Ευχαριστώ θερμά την ομάδα της κυρίας Τσιτσιλώνη, τους Ι. Κωστόπουλο Post-doctoral Researcher, που με μύησε στον κόσμο της Κυτταρομετρίας Ροής, Ν. Ωρολογά Post-doctoral Researcher, Π. Ρουσάκη MSc, Χ. Παντελή MSc και τα νέα μέλη του εργαστηρίου, για την ένθερμη υποδοχή και την εργαστηριακή καθοδήγηση.

Τέλος, ευχαριστώ θερμά την ερευνητική ομάδα του κυρίου Καστρίτη, τους Τ. Μπαγκρατούνη Post-doctoral Researcher, που με ενσωμάτωσε στο project της και μου επέτρεψε να αξιοποιήσω την βάση δειγμάτων της, Χ. Λιάκου MSc, Ν. Μαυριανού MSc, Δ. Πατσέα MSc και Α. Παπαδήμου BSc που με δέχτηκαν ως νέο μέλος, με καθοδήγησαν στη σωστή εφαρμογή των εργαστηριακών πρωτοκόλλων τους και με στηρίζουν καθημερινά.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1.	ΕΙΣΑΓΩΓΗ	1
1.1	Μακροσφαιριναιμία του Waldenström.....	1
1.1.1	Επιδημιολογία	1
1.1.2	Ταξινόμηση της νόσου σε στάδια	1
1.1.3	Κλινική Εικόνα	3
1.1.4	Διάγνωση.....	8
1.1.5	Ιστολογία	8
1.1.6	Κυτταρογενετική	9
1.1.7	Μοριακή Γενετική.....	10
1.1.8	Διαφοροποίηση των Β κυττάρων και εναρκτήρια γεγονότα του WM	14
1.1.9	Πολυπαραμετρική Κυτταρομετρία Ροής (ΠΚΡ) στις Αιματολογικές Κακοήθειες ..	18
1.1.10	Ανοσοφαινοτυπικά Χαρακτηριστικά.....	18
1.2	Υγρή βιοψία στις αιματολογικές κακοήθειες	24
1.2.1	Κυκλοφορούντα καρκινικά κύτταρα (CTCs).....	26
1.3	Σκοπός της εργασίας	28
2.	ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	29
2.1	Αναλώσιμα	29
2.2	Όργανα	29
2.3	Αντιδραστήρια.....	30
2.4	Λογισμικά Προγράμματα	30
2.5	Αντισώματα συζευγμένα με φθορίζουσες χρωστικές	31
2.6	Χαρακτηριστικά ασθενών και συλλογή δειγμάτων μυελού των οστών και περιφερικού αίματος.....	32
2.7	Προσδιορισμός βιωσιμότητας και αριθμού κυττάρων.....	35
2.8	Πρωτόκολλο επεξεργασίας και χρώσης δειγμάτων μυελού των οστών και περιφερικού αίματος από ασθενείς με WM για ανάλυση με ΠΚΡ	37
2.8.1	Για ανίχνευση επιφανειακών και ενδοκυττάρων αντιγονικών δεικτών.....	39

3.	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	42
3.1	Στρατηγική ανάλυσης των δειγμάτων μυελού των οστών και περιφερικού αίματος ασθενών με WM για ανοσοφαινοτυπικό χαρακτηρισμό των κυκλοφορούντων καρκινικών κυττάρων με ΠΚΡ.....	42
3.1.1	Ανάλυση δείγματος μυελού των οστών σε ασθενή με WM στο οποίο τα β-κύτταρα είναι κλωνικά με κάπα κλωνικό περιορισμό και δείγματος περιφερικού αίματος του ίδιου ασθενή στο οποίο τα CTCs είναι πολυκλωνικά.....	47
3.1.2	Ανάλυση δείγματος μυελού των οστών σε ασθενή με WM στο οποίο τα β-κύτταρα είναι πολυκλωνικά και δείγματος περιφερικού αίματος του ίδιου ασθενή στο οποίο τα CTCs είναι πολυκλωνικά	53
3.1.3	Ανάλυση δείγματος περιφερικού αίματος σε ασθενή με WM στο οποίο τα CTCs είναι κλωνικά με κάπα κλωνικό περιορισμό	58
4.	ΣΥΖΗΤΗΣΗ	66
5.	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	69

ΕΙΚΟΝΕΣ

Εικόνα 1: Προαποπτωτική σηματοδότηση διαμεσολαβούμενη από το μεταλλαγμένο MYD88.	11
Εικόνα 2: Σχηματική απεικόνιση της σηματοδότησης μέσω του CXCR4 υποδοχέα.	14
Εικόνα 3: Διαφοροποίηση των Β κυττάρων.	17
Εικόνα 4: Ανοσοφαινότυπος των φυσιολογικών και των καρκινικών κυττάρων στο WM. ...	23
Εικόνα 5: Μακροσκοπική εικόνα αιματοκυτταρομέτρου Neubauer (αριστερά), καθώς και η κεντρική περιοχή και λεπτομέρεια ενός εκ των 25 κεντρικών τετραγώνων όπου έγινε η καταμέτρηση των κυττάρων (δεξιά).	36
Εικόνα 6: Στρατηγική ανάλυσης δείγματος μυελού των οστών και περιφερικού αίματος σε ασθενή με WM προς ανίχνευση κλωνικών κυττάρων με ΠΚΡ.	46
Εικόνα 7: Ανάλυση αντιπροσωπευτικού δείγματος μυελού των οστών, στο οποίο απομονώθηκαν κλωνικά κάπα β-κύτταρα.	49
Εικόνα 8: Ανάλυση δείγματος περιφερικού αίματος του ίδιου ασθενή, στο οποίο δεν βρέθηκε κλωνικός πληθυσμός κυκλοφορούντων καρκινικών κυττάρων.	52
Εικόνα 9: Ανάλυση δείγματος μυελού των οστών, στο οποίο δεν βρέθηκε κλωνικός πληθυσμός.	55
Εικόνα 10: Ανάλυση δείγματος περιφερικού αίματος του ίδιου ασθενή, στο οποίο δεν βρέθηκε κλωνικός πληθυσμός κυκλοφορούντων καρκινικών κυττάρων.	56
Εικόνα 11: Ανάλυση δείγματος περιφερικού αίματος του ίδιου ασθενή, στο οποίο βρέθηκε κλωνικός πληθυσμός κυκλοφορούντων καρκινικών κυττάρων.	59
Εικόνα 12: Αριθμός των CTCs στο περιφερικό αίμα ασθενών με WM ως προγνωστικός δείκτης στην εξέλιξη της νόσου.	61
Εικόνα 13: Αριθμός των CTCs στο περιφερικό αίμα ασθενών με WM ως προγνωστικός δείκτης του καρκινικού φορτίου.	62
Εικόνα 14: Συσχέτιση του αριθμού των CTCs στο περιφερικό αίμα ασθενών με WM με τα κλωνικά κύτταρα στον μυελό των οστών των ίδιων ασθενών.	63
Εικόνα 15: Αριθμός των CTCs στο περιφερικό αίμα ασθενών με WM ως δείκτης εξέλιξης της νόσου και σοβαρότητας της νόσου.	64

ΠΙΝΑΚΕΣ

Πίνακας 1: Ταξινόμηση των λεμφοϋπερπλαστικών διαταραχών με μονοκλωνική IgM.....	2
Πίνακας 2: Μέσα στον μυελό των οστών: Ιστολογία, Ανοσοφαινότυπος και Μοριακά χαρακτηριστικά.....	3
Πίνακας 3: Εξωτερικά από τον μυελό των οστών: IgM σχετιζόμενες διαταραχές...	4-5
Πίνακας 4: Ανοσοφαινοτυπικές διαφορές μεταξύ του κλώνου των Β κυττάρων WM, των Β κυττάρων μνήμης και του λεμφώματος οριακής ζώνης (MZL).....	20
Πίνακας 5: Ανοσοφαινοτυπικές διαφορές μεταξύ των WM πλασματοκυττάρων, των φυσιολογικών πλασματοκυττάρων και των μυελωματικών πλασματοκυττάρων.....	21
Πίνακας 6: Κλινικά χαρακτηριστικά των ασθενών με WM.....	33-35
Πίνακας 7: Συνδυασμοί φθορίζοντων αντισωμάτων που χρησιμοποιούνται ανά σωληνάκι. Για κάθε αντίσωμα αναφέρεται το συζευγμένο φθοριόχρωμα και ο κλώνος.....	41
Πίνακας 8: Ανοσοφαινότυπος των κλωνικών CTCs σε ασθενείς με WM.....	61

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Μακροσφαιριναιμία του Waldenström

1.1.1 Επιδημιολογία

Η μακροσφαιριναιμία του Waldenström (WM) είναι μία νόσος με χαμηλή συχνότητα εμφάνισης, με σημαντικές ιδιαιτερότητες και προκλήσεις. Αποτελεί το 1% - 2% των αιματολογικών κακοηθειών [1, 2]. Εμφανίζεται κυρίως στους Καυκάσιους, με μέσο όρο ηλικίας τα 70 έτη [3]. Το WM είναι ένα λεμφοπλασματοκυτταρικό λέμφωμα που χαρακτηρίζεται από τη διήθηση του μυελού των οστών (BM) από κλωνικό λεμφοπλασματοκυτταρικό πληθυσμό που παράγει μονοκλωνική ανοσοσφαιρίνη Μ (IgM) [4]. Η νόσος εμφανίζει ετερογένεια ως προς την κλινική της εικόνα, καθώς οι επιπλοκές και τα συμπτώματα μπορεί να σχετίζονται με την κλωνική διήθηση του μυελού ή άλλων ιστών, την ποσότητα της μονοκλωνικής IgM, αλλά και τις ιδιαίτερες φυσικοχημικές ιδιότητες της IgM [1]. Ως εκ τούτου, η θεραπευτική προσέγγιση οφείλει να είναι εξατομικευμένη και βασίζεται στη βαρύτητα και το είδος των συμπτωμάτων, την ανάγκη για άμεσο έλεγχο της νόσου, τη δυνατότητα αυτόλογης μεταμόσχευσης αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων, την ηλικία, τις συνοσηρότητες, και τις προηγούμενες γραμμές θεραπείας [1].

7.1.1.2 Ταξινόμηση της νόσου σε στάδια

Οι ασθενείς με WM μπορεί να είναι ασυμπτωματικοί, δηλαδή να μην εμφανίζουν συμπτώματα που συνδέονται με τη νόσο για ένα μεγάλο χρονικό διάστημα προτού εμφανίσουν τη νόσο [3]. Η παρουσία συμπτωμάτων που συνδέονται με τη νόσο διακρίνει το συμπτωματικό WM από το ασυμπτωματικό (asymptomatic) WM, ενώ οι ασθενείς που έχουν παραπρωτεΐνη IgM στον ορό τους, απουσία συμπτωμάτων και απουσία διήθησης στον μυελό των οστών διαγιγνώσκονται με Μονοκλωνική Γαμμασφαιρινοπάθεια Αδιευκρίνιστης Σημασίας (Monoclonal Gammopathy of Undetermined Significance, MGUS) [5]. Το ασυμπτωματικό WM και το IgM – MGUS έχουν οριστεί ως πρόδρομα στάδια του συμπτωματικού WM [6]. Οι ασθενείς με IgM – MGUS εμφανίζουν 10,8 φορές υψηλότερο ρίσκο εμφάνισης WM [7]. Σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (WHO) οι ασθενείς με παραπρωτεΐνη IgM και διήθηση του μυελού των οστών από λεμφοπλασματοκυτταρικό πληθυσμό έχουν WM ανεξάρτητα από την συγκέντρωση της IgM στον ορό [8]. Επιπλέον, υπάρχει μια μικρή ομάδα ασθενών με τμήμα της παραπρωτεΐνης IgM και απουσία διήθησης του μυελού των οστών, που εμφανίζει συμπτώματα που οφείλονται στην πρωτεΐνη IgM. Αυτοί διαγιγνώσκονται με IgM - σχετιζόμενη διαταραχή [3]. Τέλος, υπάρχουν

κάποιοι μεμονωμένοι ασθενείς με τμήμα της παραπρωτεΐνης IgM και μερική διήθηση ιστού από λεμφοπλασματοκυτταρικό λέμφωμα όμως απουσία διήθησης του μυελού των οστών. Τέτοιοι ασθενείς διαγιγνώσκονται με λεμφοπλασματοκυτταρικό λέμφωμα (LPL) [3]. Τα παραπάνω συνοψίζονται στον Πίνακα 1 [3].

Πίνακας 1: Ταξινόμηση των λεμφοϋπερπλαστικών διαταραχών με μονοκλωνική IgM

	Συμπτώματα που οφείλονται στη διήθηση ιστού ^α	Συμπτώματα που οφείλονται στην IgM ^β	Διήθηση του μυελού των οστών ^γ	Ig μονοκλωνική ή πρωτεΐνη ^β
Συμπτωματικό WM	+	+	+	IgM
Ασυμπτωματικό WM	-	-	+	IgM
IgM-σχετιζόμενες διαταραχές ^δ	-	+ ^γ	- ^β	IgM
IgM MGUS	-	-	- ^β	IgM
Λεμφοπλασματοκυτταρικό λέμφωμα ^ε	+/-	+/-	+/-	IgM > IgG > IgA ή απύσα

Σημειώσεις: ^αΣυμπτώματα που οφείλονται στη διήθηση ιστού και περιλαμβάνουν: Κυτταροπενία και διήθηση οργάνων (όπως στο κεντρικό νευρικό σύστημα: σύνδρομο Bing – Neel). ^βΔεν υπάρχει ένα κατώφλι στη συγκέντρωση της IgM που να διαφοροποιεί το MGUS από τη WM. ^γΑσθενείς με διήθηση του μυελού των οστών από λεμφοπλασματοκυτταρικό λέμφωμα έχουν WM, ενώ ασθενείς χωρίς ένδειξη διήθησης έχουν MGUS. ^δΥπάρχουν ασθενείς που εμφανίζουν συμπτώματα που οφείλονται στην παραπρωτεΐνη IgM αλλά όχι διήθηση του ιστού από λεμφοπλασματοκυτταρικό λέμφωμα. Αυτοί οι ασθενείς μπορεί να εμφανίσουν περιφερική νευροπάθεια, σύνδρομο του Schnitzler, κρυοσφαιριναιμία, αμυλοείδωση. ^εΠαρουσιάζεται σε ασθενείς,

οι οποίοι εμφανίζουν βλάβη που οφείλεται στο λεμφοπλασματοκυτταρικό λέμφωμα και δεν πληρούν τα κριτήρια για WM [2].

1.1.3 Κλινική Εικόνα

Η κλινική εικόνα του WM ποικίλλει (Πίνακας 2 και Πίνακας 3). Τα συμπτώματα οφείλονται είτε στη διήθηση του μυελού από λέμφωμα είτε στις ανοσολογικές ή χημικές ιδιότητες της IgM [3].

Πίνακας 2: Ιστολογικά, Ανοσοφαινοτυπικά και Μοριακά χαρακτηριστικά των κυττάρων του WM στον μυελό των οστών,

Χαρακτηριστικά κυττάρων στον μυελό των οστών	Σχετικά Ευρήματα
Μορφολογικά	B κύτταρα σε διαφορετικά στάδια ωρίμανσης: B λεμφοκύτταρα με λεμφοπλασματοκυτταρική διαφοροποίηση με μικρό πληθυσμό κλωνικών πλασματοκυττάρων. Συχνή είναι η παρουσία μαστοκυττάρων.
Ανοσοφαινοτυπικά (με κυτταρομετρία ροής)	Πληθυσμός B κυττάρων: IgM+, CD19+, CD20+, CD22+, CD79+, CD25+, CD27+, FMC 7+, BCL-2 +, γύρω στο 10-20% των περιπτώσεων WM είναι CD5+, CD10+ ή CD23+ Πληθυσμός πλασματοκυττάρων: CD138+, CD38++, CD19+, CD45+, CD56-, CD117-
Μοριακά	<i>MYD88</i> L265P μετάλλαξη σε >90%. Η παρουσία της συγκεκριμένης μετάλλαξης υποστηρίζει την διάγνωση του WM.

	<i>CXCR4</i> μετάλλαξη σε 30-40%
Κυτταρογενετικά	Η πιο κοινή ανωμαλία στο 30-60% των ασθενών με WM είναι η έλλειψη του 6q21.
Ιστολογικά	Διάχυτη και οζώδης διήθηση από μικρά B λεμφοκύτταρα, λέμφωμα και πλασματοκύτταρα.

Πίνακας 3: Κλινικές εκδηλώσεις εκτός μυελού των οστών σε σχέση με τις αντίστοιχες IgM σχετιζόμενες διαταραχές.

Κλινικά Χαρακτηριστικά	IgM σχετιζόμενη διαταραχή
Πονοκέφαλοι, θολή όραση, ρινική αιμορραγία, απώλεια ακοής, εμβοές, νευρολογικές διαταραχές, αμφιβληστροειδοπάθεια	Σύνδρομο αυξημένου ιξώδους του αίματος
Ακροκυάνωση, πορφύρα, αρθραλγία, νεφρική ανεπάρκεια, κνίδωση	Κρυοσφαιριναιμία
Αγγειακή αιμολυτική αναιμία, φαινόμενο Raynaud, ακροκυάνωση	Νόσος των Ψυχροσυγκολλητινών
Επαναλαμβανόμενα θρομβωτικά επεισόδια	Αντιφωσφολιπιδικό Σύνδρομο
Περιφερικές νευροπάθειες συνδεδεμένες με δυσλειτουργία του αυτόνομου νευρικού συστήματος	Αμυλοείδωση AL
Χρόνια κνίδωση, πυρετός, αρθραλγία	Σύνδρομο του Schnitzler

1.1.3.1 Διήθηση του μυελού των οστών

Η διάγνωση του WM απαιτεί την παρουσία λεμφοπλασματοκυτταρικού λεμφώματος στον μυελό των οστών (Πίνακας 2), με ή χωρίς άλλη ιστολογική διήθηση. Το ποσοστό των B λεμφοκυττάρων και των πλασματοκυττάρων στο λεμφοπλασματοκυτταρικό λέμφωμα στον μυελό των οστών ποικίλλει στη διάγνωση του WM, αν και ανοσοϊστοχημικές αναλύσεις δείχνουν ότι τα B λεμφοκύτταρα επικρατούν των πλασματοκυττάρων [9]. Η διάγνωση πιστοποιείται με αναρρόφηση μυελού των οστών, οστεομυελική βιοψία, ανοσοφαινοτύπηση και γενετική ανάλυση. Έτσι είναι εφικτό να διακριθεί το WM από το IgM MGUS και από άλλα λεμφοϋπερπλαστικά σύνδρομα που εκκρίνουν IgM όπως το Λέμφωμα Οριακής Ζώνης (MZL) και η Χρόνια Λεμφοκυτταρική Λευχαιμία (CLL) [1, 10, 11]. Μια τυπική επίδραση της διήθησης του μυελού των οστών είναι η αναιμία, η οποία είναι και το πιο τυπικό σύμπτωμα της WM και η πιο κοινή αιτία έναρξης θεραπείας. Η έλλειψη σιδήρου είναι πολύ κοινή στο WM επειδή η εψιδίνη, ένας αρνητικός ρυθμιστής της απορρόφησης του σιδήρου, είναι αυξημένη στον ορό των ασθενών με WM, κάτι που πιθανώς σχετίζεται με τις μεταλλάξεις στο MYD88 [12, 13].

1.1.3.2 Εξωμυελική νόσος (EMD)

Στη διάγνωση του WM το 10-15% των ασθενών έχουν εξωμυελική νόσο EMD, εμφανίζουν δηλαδή λεμφαδενοπάθεια, ηπατοσπληνομεγαλία και πλευριτική συλλογή. Στην υποτροπή, το 60% των ασθενών με WM μπορεί να παρουσιάσουν αδеноπάθεια.

Το σύνδρομο Bing-Neel (BNS) είναι σπάνιο και παρατηρείται στο 1% των ασθενών με WM. Το BNS θα πρέπει να είναι μέρος της διαφορικής διάγνωσης σε ασθενείς με WM που εμφανίζουν νευρολογικά συμπτώματα, όπως διαταραχή της ισορροπίας, ανωμαλίες στη βάδιση, επιληπτικές κρίσεις, πονοκεφάλους και άτυπη περιφερική νευροπάθεια. Το χρυσό πρότυπο διάγνωσης του BNS είναι η ανίχνευση των κλωνικών κυττάρων της WM στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό με χρήση κυτταρομετρίας ροής και μοριακών τεχνικών, καθώς και η βιοψία του εγκεφάλου [14].

1.1.3.3 Συμπτώματα σχετιζόμενα με την IgM

Η παραπρωτεΐνη IgM μπορεί να προκαλέσει συγκεκριμένες διαταραχές που οφείλονται στις φυσικοχημικές της ιδιότητες, στην εναπόθεσή της σε ιστούς και στις μη ειδικές αλληλεπιδράσεις της με άλλες πρωτεΐνες.

1.1.3.4 Σύνδρομο αυξημένου ιξώδους του αίματος (HVS)

Το HVS συσχετιζόμενο με τα υψηλά επίπεδα της IgM είναι πυλώνας του συμπτωματικού WM. Έχει παρατηρηθεί σε περίπου 10-15% των περιπτώσεων με μεταβλητή κλινική εικόνα, η οποία περιλαμβάνει πονοκεφάλους, θολή όραση, σύγχυση και ρινική αιμορραγία [15]. Ο υψηλός κίνδυνος εμφάνισης συμπτωματικού HVS σε ασθενείς με ασυμπτωματικό WM υποστηρίζει την έναρξη θεραπευτικής αγωγής, προτού συμβεί μη αναστρέψιμη βλάβη. Αν παρατηρηθούν συμπτώματα, αυτά σπάνια παρατηρούνται σε ασθενείς με συγκέντρωση της IgM στον ορό μικρότερη από 3 g/dL ενώ είναι συχνά σε ασθενείς με συγκέντρωση της IgM στον ορό μεγαλύτερη από 6 g/dL [16]. Η πλασμαφαίρεση θα πρέπει να πραγματοποιείται σε ασθενείς με υψηλό κίνδυνο εμφάνισης HVS ως λύση έκτακτης ανάγκης [17].

1.1.3.5 Κρυσφαιρίνες

Η κρυσφαιριναιμία αναφέρεται στην παρουσία πρωτεϊνών στον ορό (ανοσοσφαιρίνες) με ετερογενείς αιτιοπαθογενετικές και ανοσοχημικές ιδιότητες, που καθιζάνουν σε θερμοκρασίες χαμηλότερες των 37°C και επαναδιαλυτοποιούνται στους 37°C. Οι κρυσφαιρίνες μπορούν να εναποτεθούν σε μεσαίου και μεγάλου μεγέθους αιμοφόρα αγγεία, οδηγώντας σε φλεγμονώδες σύνδρομο που χαρακτηρίζεται από κόπωση, αρθραλγία, πορφύρα και νευροπάθεια. Η κρυσφαιριναιμία ταξινομείται σε 3 υποομάδες ανάλογα με τη σύνθεση των κρυσφαιρινών από διαφορετικές ανοσοσφαιρίνες [18]. Η κρυσφαιριναιμία I είναι αυτή που συσχετίζεται με το WM. Χαρακτηρίζεται από το φαινόμενο Raynaud, ακροκυάνωση, πορφύρα και κνίδωση εκ ψύχους. Σε αντίθεση, στην κρυσφαιριναιμία II οι κρυσφαιρίνες συντίθενται από μίξη της μονοκλωνικής IgM με την πολυκλωνική IgG, συνήθως συσχετίζεται με λοίμωξη από τον ιό της ηπατίτιδας C και οδηγεί σε πορφύρα, νεφρική ανεπάρκεια, αρθραλγία και αισθητηριακή ανεπάρκεια [19]. Η κρυσφαιριναιμία III χαρακτηρίζεται από μίξη πολυκλωνικής IgM με πολυκλωνική IgG και δεν συσχετίζεται με την WM.

Συνεπώς, σε ασθενείς με WM που έχουν την υπόνοια παρουσίας κρυσφαιρινών, τα δείγματα ορού θα πρέπει να λαμβάνονται σε ζεστό υδατόλουτρο προς αποφυγή καθίζησης. Η πλασμαφαίρεση είναι μια πιθανή

στρατηγική θεραπείας σε ασθενείς με WM και σοβαρή κρυσφαιριναιμία. Κατά την πλασμαφαίρεση απαιτείται μία θερμαντική συσκευή αίματος για την αποφυγή καθίζησης των κρυσφαιρινών [18].

1.1.3.6 Πολυνευροπάθεια

Ο επιπολασμός της περιφερικής νευροπάθειας (PNP) στο WM στο στάδιο της διάγνωσης είναι 30% [20]. Αν και η περιφερική νευροπάθεια μπορεί να σχετίζεται με διήθηση των νευρικών ιών από λεμφοπλασματοκυτταρικό πληθυσμό, οφείλεται συχνότερα στην εναπόθεση της IgM, στην παρουσία αυτοαντισωμάτων, στην κρυσφαιριναιμία ή στην αμυλοείδωση [3].

Για να αξιολογηθεί αν η περιφερική νευροπάθεια επηρεάζει έναν ασθενή με WM εξετάζονται δύο σημεία. Αρχικά αξιολογείται αν η μονοκλωνική γαμμαπάθεια είναι η αιτία της περιφερικής νευροπάθειας και κατά δεύτερον αξιολογείται αν η περιφερική νευροπάθεια μπορεί να συσχετιστεί με συγκεκριμένη πλασματοκυτταρική δυσκρασία, όπως η πρωτοπαθής αμυλοείδωση, η οποία θα μπορούσε να έχει συγκεκριμένη προσέγγιση και θεραπεία [21].

Συνήθως, η περιφερική νευροπάθεια που συσχετίζεται με την IgM μονοκλωνική γαμμαπάθεια παρουσιάζεται ως περιφερική, επίκτητη, απομυελινωτική και συμμετρική νευροπάθεια με πρωτεΐνη M [21]. Έπειτα από τη διενέργεια δοκιμών αγωγιμότητας των περιφερικών νεύρων σε ασθενείς με WM, έχουν βρεθεί διαφορετικά μοτίβα νευρικών βλαβών όπως το απομυελινωτικό και το αξονικό. Αυτοί οι ασθενείς πρέπει να ελέγχονται για την ανάπτυξη αντισωμάτων έναντι της μυελίνης (anti-MAG antibodies). Μάλιστα, περίπου το 50% των ασθενών με απομυελινωτική περιφερική νευροπάθεια συσχετιζόμενη με την IgM αναπτύσσουν anti-MAG αντισώματα στην έναρξη του IgM-MGUS και του WM [21]. Αν οι ασθενείς με WM είναι αρνητικοί για anti-MAG αντισώματα, οι ασθενείς θα πρέπει να ελέγχονται για άλλους νευρολογικούς στόχους, όπως τα γαγγλιοσίδια [3]. Έχει βρεθεί ότι στο 30-40% των IgM συσχετιζόμενων απομυελινωτικών νευροπαθειών δεν αναπτύσσονται γνωστά αντισώματα [20]. Σε αυτές τις περιπτώσεις η κλινική αξιολόγηση αποτελεί μονόδρομο για την σύνδεση της IgM με την περιφερική νευροπάθεια. Είναι σημαντικό να αναγνωριστούν αυτές οι περιπτώσεις, ώστε να αποφευχθεί με την κατάλληλη θεραπεία η απομυελίνωση, που θα μπορούσε να οδηγήσει σε μη αναστρέψιμη αξονική βλάβη. Επιπλέον, πρέπει να αποκλειστούν και άλλες αιτίες περιφερικής νευροπάθειας, όπως ο διαβήτης και η δυσλειτουργία του θυρεοειδούς [17].

1.1.3.7 Αμυλοείδωση

Η πρωτοπαθής αμυλοείδωση από ελαφριές αλυσίδες των ανοσοσφαιρινών (AL amyloidosis) είναι μία σπάνια επιπλοκή του WM που προκαλείται από τη συσσώρευση μη αναδιπλωμένων πρωτεϊνών οι οποίες εναποτίθενται ως ινίδια σε διάφορα όργανα, όπως οι νεφροί, η καρδιά, τα περιφερικά νεύρα, το ήπαρ και ο γαστρεντερικός σωλήνας. Η AL αμυλοείδωση από μονοκλωνική IgM αποτελεί το 6% των AL αμυλοειδώσεων [22]. Η πρόγνωση των ασθενών με IgM σχετιζόμενη AL αμυλοείδωση είναι καλύτερη από τους ασθενείς με τις υπόλοιπες AL αμυλοειδώσεις [23].

1.1.4 Διάγνωση

Η διάγνωση του WM απαιτεί ιστολογική ένδειξη διήθησης του μυελού των οστών από λεμφοπλασματοκυτταρικό λέμφωμα καθώς και την παρουσία μονοκλωνικής IgM γαμμαπάθειας [8, 24].

1.1.5 Ιστολογία

Ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας (Π.Ο.Υ.) ορίζει το λεμφοπλασματοκυτταρικό λέμφωμα (LPL) ως ένα λεμφοειδές νεόπλασμα των B κυττάρων στο οποίο ανιχνεύονται μικρά B λεμφοκύτταρα και πλασματοκύτταρα, και σχετίζεται με τον μυελό των οστών κυρίως, τους λεμφαδένες και τον σπλήνα. Το LPL δεν πληροί τα κριτήρια των άλλων λεμφοειδών νεοπλασμάτων των B κυττάρων [25]. Επομένως, η διάγνωση του γίνεται μέσω αποκλεισμού, γιατί δεν υπάρχουν μοναδικά κλινικά χαρακτηριστικά που να χαρακτηρίζουν τα μικρά λεμφοειδή κύτταρα ή τα πλασματοκύτταρα [26].

1.1.6 Κυτταρογενετική

Για τη διάγνωση του WM δεν είναι υποχρεωτική η συμβατική καρυοτυπική ανάλυση, καθώς είναι δύσκολο να αποτυπωθούν τα καρκινικά κύτταρα στη φάση της μετάφασης in vitro. Η πιο κοινή χρωμοσωμική ανωμαλία που έχει ανιχνευθεί με φθορίζοντα in situ υβριδισμό [27] στο 30-60% των ασθενών με WM είναι μία έλλειψη στο μεγάλο βραχίονα του χρωμοσώματος 6, από τη θέση 21 έως τη θέση 23 (-6q21-6q23) [28-31]. Αυτές οι ελλείψεις έχουν συσχετιστεί με πιο επιθετικές IgM γαμμαπάθειες και υψηλή πιθανότητα εξέλιξης σε συμπτωματικό WM [29]. Αυτό εξηγείται από το ότι οι ελλείψεις στο 6q περιλαμβάνουν γονίδια τα οποία ελέγχουν τον πυρηνικό παράγοντα κ-B (NF-κB), την Bcl-2, την τυροσινική κινάση του Bruton (BTK), την απόπτωση και τη διαφοροποίηση. Άλλα γονίδια τα οποία εξηγούν τον υψηλό κίνδυνο εξέλιξης του ασυμπτωματικού σε συμπτωματικό WM είναι γονίδια με σημαντική ρυθμιστική λειτουργία, όπως τα *IBTK*, *HIVEP2* και *FOXO3* [32].

1.1.7 Μοριακή Γενετική

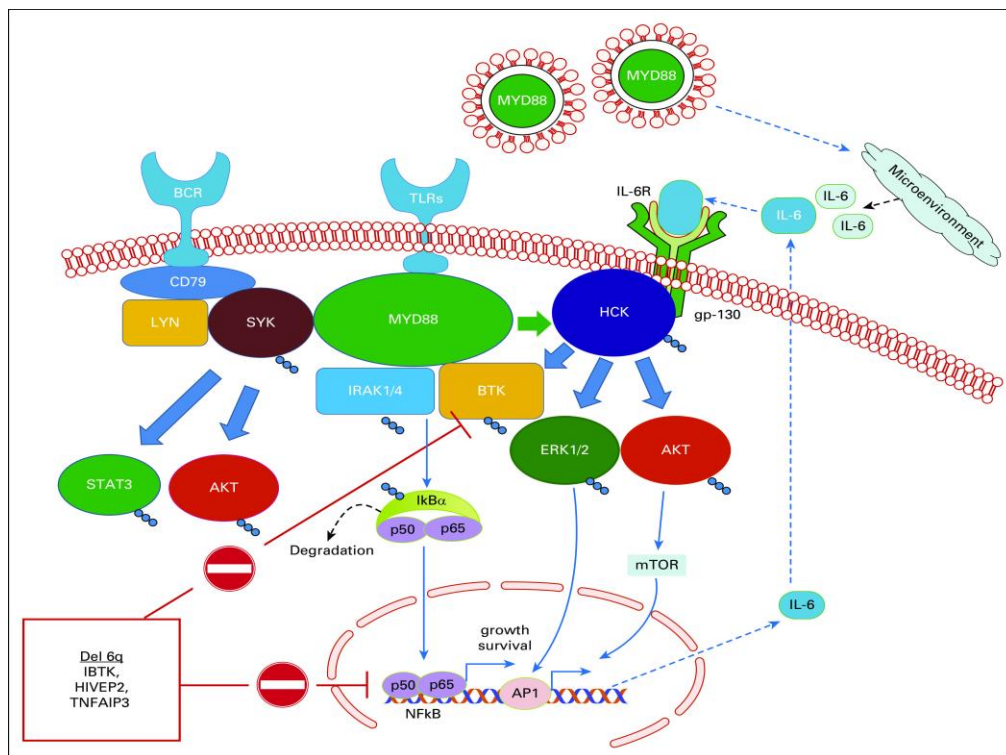
1.1.7.1 Μεταλλάξεις στο γονίδιο *MYD88*

Η αλληλούχηση όλου του γονιδιώματος βοήθησε στην ανακάλυψη πληθώρας σωματικών μεταλλάξεων στο WM [32]. Ωστόσο, μία μετάλλαξη στο γονίδιο *MYD88* και συγκεκριμένα η *MYD88*^{L265P} δηλαδή η αλλαγή του αμινοξέος λευκίνη από προλίνη στη θέση 265, θεωρείται χαρακτηριστική του WM καθώς ανιχνεύεται σε περισσότερο από το 90% των ασθενών [33]. Η πρωτεΐνη *MYD88* είναι μία πρωτεΐνη-προσαρμογέας που αλληλεπιδρά με τους υποδοχείς τύπου Toll (TLRs) και τον υποδοχέα της ιντερλευκίνης 1 (IL-1R) και διμερίζεται οδηγώντας στην ενεργοποίηση του υποδοχέα. Ο διμερισμός της *MYD88* οδηγεί στη στρατολόγηση άλλων πρωτεϊνών, προς σχηματισμό ενός συμπλόκου και ενεργοποιεί καθοδικά τη σηματοδότηση (Εικόνα 1) [34]. Οι κινάσες που σχετίζονται με τον υποδοχέα της IL-1 IRAK1/IRAK4 και η BTK συνθέτουν το σύμπλοκο και ενεργοποιούν τον NF-κΒ [27, 35, 36].

Πρόσφατα, έχει προταθεί ένας ρόλος για το μεταλλαγμένο *MYD88* ως ενεργοποιητή της διασταυρούμενης επικοινωνίας του μονοπατιού ενεργοποίησης του υποδοχέα των B κυττάρων (BCR). Συγκεκριμένα, στα μεταλλαγμένα *MYD88* καρκινικά κύτταρα έχει αναφερθεί η συγκρότηση του υπερσυμπλόκου *MYD88*-TLR9-BCR (IgM) υπερσύμπλοκο στα μεταλλαγμένα *MYD88* καρκινικά κύτταρα [37]. Υπάρχουν στοιχεία συνεχούς ενεργοποίησης της σηματοδότησης μέσω BCR στο WM [2, 5]. Η τυροσινική κινάση SYK, ένα μόριο του BCR μονοπατιού, είναι στην ενεργό μορφή της στο σύμπλοκο και ενεργοποιείται από μεταλλαγμένη *MYD88* πρωτεΐνη. Η ενεργοποίηση της SYK πυροδοτεί την σηματοδότηση μέσω των STAT3 και AKT [38]. Συμπερασματικά, η μεταλλαγμένη *MYD88* μπορεί να προκαλέσει σε πολλά προαποπτωτικά μονοπάτια την ενεργοποίηση των AKT, ERK, STAT3 και NF-κΒ στα κύτταρα ασθενών με WM. Τέλος, τα καρκινικά κύτταρα στο WM εκκρίνουν κυστίδια με μεταλλαγμένη πρωτεΐνη *MYD88*, με αποτέλεσμα την ανάπτυξη ενός προ-φλεγμονώδους μικροπεριβάλλοντος που ενισχύει την ανάπτυξη του όγκου [39].

Οι ασθενείς με WM που φέρουν το αλληλόμορφο άγριου τύπου *MYD88*^{WT} έχουν διαφορετικό γενωμικό προφίλ που δείχνει άλλες μεταλλάξεις που ενεργοποιούν τον NF-κΒ και εξασθενημένη επιδιόρθωση των DNA βλαβών (DDR). Αυτοί οι ασθενείς έχουν μικρότερες πιθανότητες επιβίωσης ειδικά αν φέρουν DDR μεταλλάξεις και μεγαλύτερο κίνδυνο μετατροπής σε διάχυτο λέμφωμα από μεγάλα B κύτταρα (DLBCL) συγκριτικά με τους ασθενείς με WM οι οποίοι φέρουν τη συμβατική *MYD88* μετάλλαξη [40].

Η συμβατική MYD88^{L265P} μετάλλαξη θεωρείται παθολογική στο WM, καθώς οδηγεί σε μία αμινοξική αλλαγή στην πρωτεΐνη MYD88 και είναι παρούσα στις περισσότερες περιπτώσεις WM. Είναι μία ενεργοποιητική μετάλλαξη που πυροδοτεί την αύξηση και τη σηματοδότηση μέσω της IRAK, της BTK και της κινάσης των αιμοποιητικών κυττάρων (HCK) [40]. Η ενεργοποιημένη HCK ενεργοποιεί το σηματοδοτικό μονοπάτι επιβίωσης των μεταλλαγμένων MYD88 κυττάρων μέσω της BTK, των PI3K/AKT, και των MAPK/ERK1/2. Οι BTK και HCK είναι στόχοι της ιμπρουτινίμπης (Ibrutinib), η οποία έχει δείξει τρομερή αποτελεσματικότητα σε ασθενείς WM με μεταλλαγμένο MYD88 [41, 42].



Εικόνα 1: Προαποπτωτική σηματοδότηση διαμεσολαβούμενη από το μεταλλαγμένο MYD88.

Το μεταλλαγμένο MYD88 πυροδοτεί το σχηματισμό του συμπλόκου, το οποίο περιλαμβάνει την ενεργοποιημένη BTK και τις IRAK4/IRAK1 που ενεργοποιούν τον NF-κB. Το μεταλλαγμένο MYD88 αυξάνει τη ρύθμιση και ενεργοποιεί μέσω της IL-6 την HCK που με τη σειρά της πυροδοτεί την ενεργοποίηση της BTK καθώς και των AKT και ERK. Το μεταλλαγμένο MYD88 διαμεσολαβεί τη διασταυρούμενη επικοινωνία μέσω της SYK που

ενεργοποιεί την STAT3 και AKT-μεσολαβούμενη προαποπτωτική σηματοδότηση. Ελλείψεις στο χρωμόσωμα 6 οδηγούν σε απώλεια σημαντικών ρυθμιστών της MYD88 σηματοδότησης, συμπεριλαμβανομένου του αναστολέα της BTK και των ρυθμιστών του NF-κB HIVEP2 και TNFAIP3. Τα καρκινικά κύτταρα του WM εκκρίνουν μεταλλαγμένη MYD88 μέσω κυστιδίων για να ενεργοποιήσουν μονοπάτια σηματοδότησης στα μακροφάγα, παρέχοντας ένα προ-φλεγμονώδες περιβάλλον.

m-TOR: στόχος της ραπαμυκίνης στα θηλαστικά [43].

1.1.7.2 Μεταλλάξεις στο γονίδιο *CXCR4*

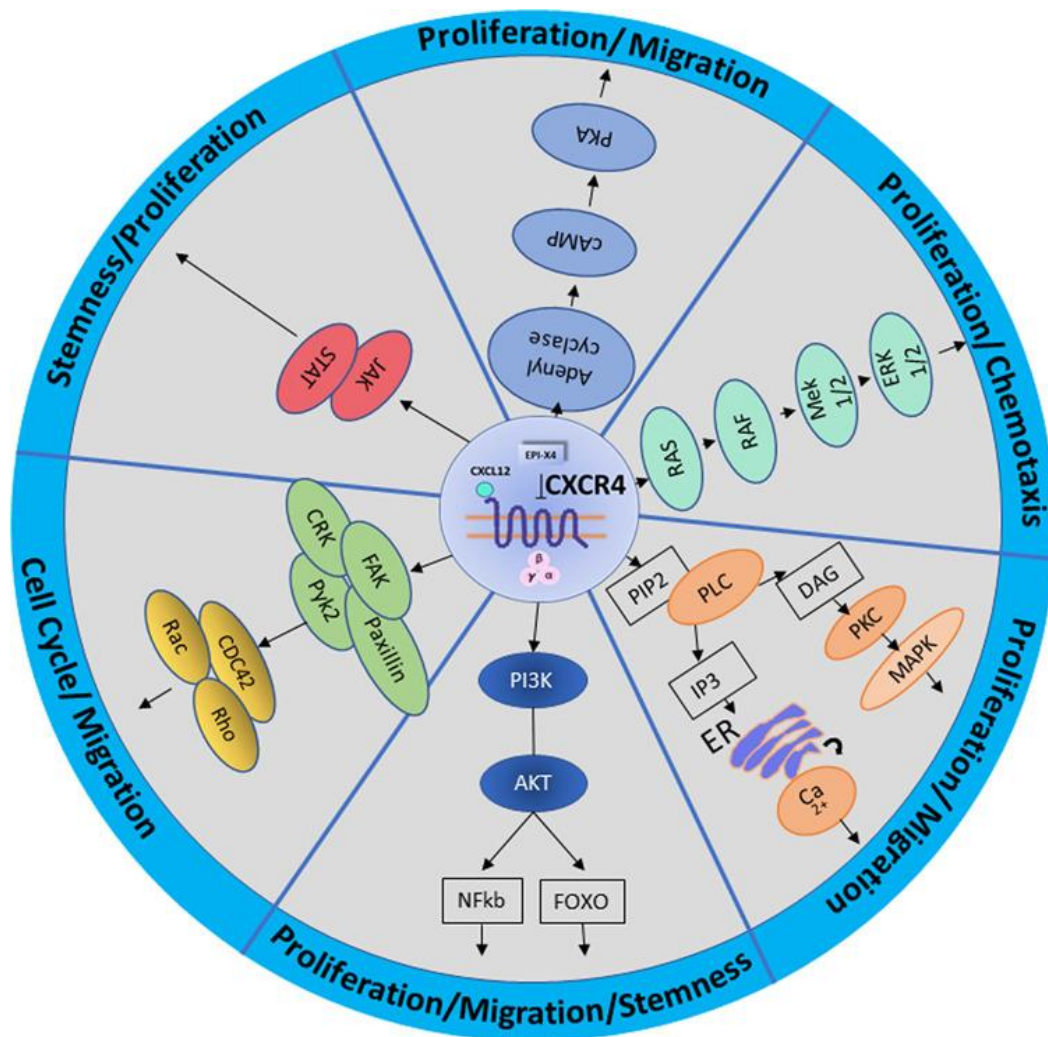
Στο 30-40% των ασθενών με WM τα καρκινικά κύτταρα φέρουν σωματικές μεταλλάξεις στο C-άκρο της επικράτειας του γονιδίου του υποδοχέα τύπου 4 της C-X χημειοκίνης (*CXCR4*). Οι μεταλλάξεις είναι μοναδικές για το WM με λίγες περιπτώσεις ανίχνευσής τους στο λέμφωμα οριακής ζώνης και στο DLBCL και είναι παρόμοιες με τις μεταλλάξεις χωρίς νόημα και τις πλαισιοτροποιητικές μεταλλάξεις των γαμετικών κυττάρων στο σύνδρομο WHIM [32, 44, 45]. Το γονίδιο *CXCR4* κωδικοποιεί για τον υποδοχέα *CXCR4* που είναι υποδοχέας συζευγμένος με G πρωτεΐνη, εδράζεται στο χρωμόσωμα 2 και έχει λειτουργία υποδοχέα των χημειοκινών.

Ο φυσικός προσδέτης του υποδοχέα *CXCR4*, ο *CXCL12*, όταν προσδέεται στον υποδοχέα πυροδοτεί ενδοκυττάρια σηματοδοτικά μονοπάτια που ελέγχουν τον χημειοτακτισμό, τον πολλαπλασιασμό και τη μετανάστευση [46]. Η πρόσδεση πυροδοτεί την ενεργοποίηση της υποομάδας G_{α} του ετεροτριμερούς των G πρωτεϊνών. Με ταυτόχρονη φωσφορυλίωση της διφωσφορικής γουανωσίνης GDP, η υπομονάδα α αποσυνδέεται από το ετεροτριμερές και προσδέεται στο GDP. Τόσο το GTP_{α} όσο και το διμερές $G\beta/\gamma$ αλληλεπιδρούν με διάφορα πρωτεϊνικά μόρια προκαλώντας την έναρξη μονοπατιών σηματοδότησης. Η οικογένεια των G_{α} δρα μέσω της φωσφολιπάσης C με σκοπό την υδρόλυση της διφωσφορικής φωσφατιδυλοϊνοσιτόλης σε δύο αγγελιαφόρους την τριφωσφορική ινοσιτόλη και τη διακυλογλυκερόλη. Οι δύο αυτοί αγγελιαφόροι κινητοποιούν τα κατιόντα ασβεστίου που είναι αποθηκευμένα στο εσωτερικό του κυττάρου και είναι ικανοί να ενεργοποιήσουν πολυάριθμες πρωτεϊνικές κινάσες όπως την PKC, ελέγχοντας τη μετανάστευση και τον πολλαπλασιασμό. Περαιτέρω ενεργοποίηση οδηγεί στην ενεργοποίηση των MAP κινασών όπως και της οικογένειας των γονιδίων Rho και Ras που εμπλέκονται στον χημειοτακτισμό

και στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου. Ο βασικός άξονας της PI3K εμπλέκεται στη διακίνηση των λεμφοκυττάρων, στον χημειοτακτισμό και στην κυτταρική επιβίωση μέσω της AKT, αλλά μπορεί να οδηγήσει στη φωσφορυλίωση πολλών προσδετών-ρυθμιστών όπως απεικονίζεται στην Εικόνα 2. Η σηματοδότηση ρυθμίζεται αυστηρά μέσω λυσοσωμικής αποικοδόμησης μέσω της αρρεστίνης, η οποία προσδένεται στον φωσφορυλιωμένο υποδοχέα και ξεκινάει την αποικοδόμηση (Εικόνα 2) [47].

Η πιο συχνά μεταλλαγμένη περιοχή (συχνότητα μετάλλαξης 50%) είναι στο αμινοξύ S338X στη θέση 1013, με νουκλεοτιδικές αλλαγές τις μεταστροφές C>G (αντικατάσταση της κυτοσίνης από γουανίνη) και C>A (αντικατάσταση της κυτοσίνης από αδενίνη), οδηγώντας σε κωδικόνιο λήξης. Έπειτα ακολουθούν περισσότερες από 40 πλαισιοτροποποιητικές μεταλλάξεις στο 21% των περιπτώσεων [47]. Οι περισσότερες από αυτές τις μεταλλάξεις εισάγουν ένα πρόωρο κωδικόνιο λήξης ή προκαλούν αλλαγή του πλαισίου ανάγνωσης που κόβει το άκρο της CXCR4 πρωτεΐνης, οδηγώντας σε ελάττωση του μεταβολισμού της και επομένως σε παράταση της δράσης της.

Αυτή η υπερλειτουργία της πρωτεΐνης CXCR4 εξηγεί γιατί οι ασθενείς με τέτοιες μεταλλάξεις έχουν υψηλότερο φορτίο νόσου στον μυελό των οστών και υψηλότερα επίπεδα ανοσοσφαιρίνης M στον ορό [48]. Οι ασυμπτωματικοί ασθενείς εμφανίζουν και αυτοί μεταλλάξεις στο γονίδιο CXCR4, αλλά αυτό το γεγονός μοιάζει να αυξάνει τον κίνδυνο εξέλιξης σε συμπτωματικό WM. Σε ασθενείς με WM που αντιμετωπίζονται θεραπευτικά με αναστολέα της BTK κινάσης η παρουσία μεταλλάξεων στο γονίδιο CXCR4 μειώνει τη θεραπευτική αποτελεσματικότητα [47]. Συμπερασματικά, οι μεταλλάξεις στο γονίδιο CXCR4 είναι μοριακή διαταραχή που πρέπει να λαμβάνεται υπόψη στο WM τόσο στη διάγνωση όσο και ως πιθανός θεραπευτικός στόχος.



Εικόνα 2: Σχηματική απεικόνιση της σηματοδότησης μέσω του CXCR4 υποδοχέα.

Απεικονίζονται τα μονοπάτια που εμπλέκονται στη σηματοδότηση CXCR4/CXCL12. Απεικονίζονται: η πρωτεϊνική κινάση Β (ΑΚΤ), η κινάση της 3 φωσφατιδυλινοσιτόλης (PI3K), ο NF-κB των ενεργοποιημένων Β κυττάρων, ο μεταγραφικός παράγοντας FOXO, η κινάση πρόσδεσης FAK, η κινάση πλούσια σε προλίνη-2 (Pyk-2), το μόριο-προσαρμογέας (CRK), η οικογένεια γονιδίων Rho και Ras, η πρωτεΐνη ελέγχου της κυτταρικής διαίρεσης 42 (CDC42), η κινάση JAK, ο ενεργοποιητής της μεταγραφής STAT, το κυκλικό μονοφωσφορικό μόριο της αδενοσίνης (cAMP), η πρωτεϊνική κινάση Α (PKA), η οικογένεια πρωτεϊνών Ras και Raf, η πρωτεϊνική κινάση σερίνης/θρεονίνης του πρωτο-ογκογονιδίου RAF, η διπλής ειδικότητας ενεργοποιημένη από μιτογόνα πρωτεϊνική κινάση (MEK), η κινάση ρύθμισης εξωκυττάριας σηματοδότησης (ERK), η διφωσφορική φωσφατιδυλινοσιτόλη (PIP2), η φωσφολιπάση C (PLC), η πρωτεϊνική κινάση C (PKC), η τριφωσφορική ινοσιτόλη (IP3), η διακυλογλυκερόλη (DAG), το ενδοπλασματικό δίκτυο (ER), η ενεργοποιημένη από μιτογόνα κινάση (MAPK), τα κατιόντα ασβεστίου (Ca²⁺), ο τύπου 4 C-X- υποδοχέας χημειοκίνης (CXCR4), ο προσδέτης χημειοκίνης 12 (CXCL12).

1.1.8 Διαφοροποίηση των Β κυττάρων και αναρκτήρια γεγονότα του WM

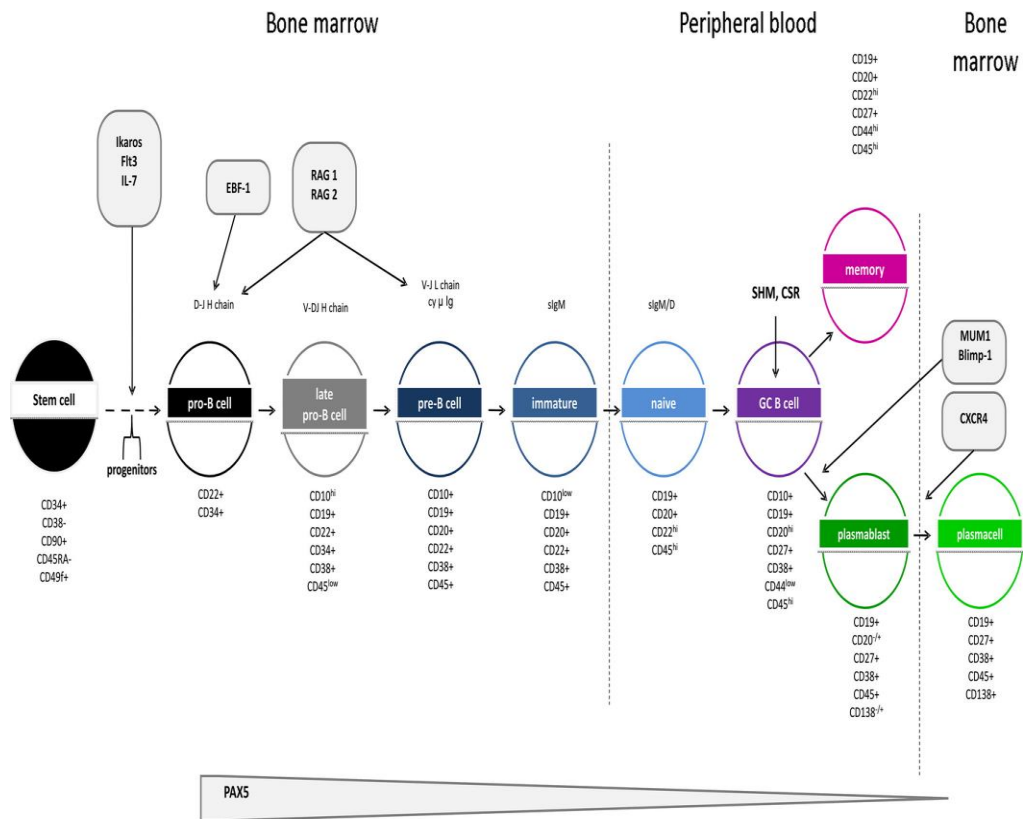
Η προέλευση των κακοηθειών των Β κυττάρων συνδέεται με τρία στάδια της διαφοροποίησης των Β κυττάρων:

- Οι Β λεμφοβλαστικές λευχαιμίες/λεμφοβλαστικά λεμφώματα ξεκινούν όταν τα αιμοποιητικά βλαστικά κύτταρα διαφοροποιούνται σε παρθένα Β κύτταρα στον μυελό των οστών
- Οι Β λεμφοϋπερπλαστικές διαταραχές συνδέονται με την αντιγονο-εξαρτώμενη διαφοροποίηση των παρθένων Β κυττάρων σε Β κύτταρα μνήμης σε δευτερογενείς λεμφοειδείς ιστούς (λεμφαδένες), στον μυελό των οστών και στον σπλήνα, και
- Οι μονοκλωνικές γαμμαπάθειες οφείλονται στα πλασματοκύτταρα που συσσωρεύονται στον μυελό των οστών

Τα καρκινικά κύτταρα του WM προέρχονται από Β κύτταρα κατά την διαφοροποίησή τους και δείχνουν μορφολογική ετερογένεια. Η διαφοροποίηση των Β κυττάρων ρυθμίζεται από πολλούς μεταγραφικούς παράγοντες και συνοδεύεται από ποικίλες ανοσοφαινοτυπικές αλλαγές. Τα διαφορετικά στάδια της διαφοροποίησης του Β κυττάρου από το προγονικό λεμφοκύτταρο (pro-B cell) στο πλασματοκύτταρο που συνθέτει αντισώματα, που χαρακτηρίζονται από ποικίλους ανοσοφαινοτυπικούς δείκτες και ρυθμιστές της διαφοροποίησης απεικονίζονται στην Εικόνα 3. Το πρώτο βήμα είναι η διαφοροποίηση των προδρόμων των Β κυττάρων από τα αιμοποιητικά βλαστικά κύτταρα (HSCs) σε παρθένα ώριμα Β κύτταρα στον μυελό των οστών. Ακολουθεί η ωρίμανσή τους σε κύτταρα μνήμης στα δευτερογενή λεμφικά όργανα, στον μυελό των οστών και στον σπλήνα. Κάθε υποπληθυσμός Β κυττάρων απαιτεί συγκεκριμένο μικροπεριβάλλον, το οποίο διαμορφώνεται από Τ κύτταρα και άλλα λευκοκύτταρα [9, 49].

Ο μυελός των οστών εκκρίνει κυτταροκίνες και χημειοκίνες που ενεργοποιούν σηματοδοτικά μονοπάτια που ρυθμίζουν την έκφραση μεταγραφικών παραγόντων που με την σειρά τους ελέγχουν γονίδια καθορίζοντας την ορθή διαφοροποίηση των Β κυττάρων. Συγκεκριμένα, ο IRF4 (interferon regulatory factor 4) ρυθμίζει αρνητικά την έκφραση του γονιδίου BCL6 (B cell lymphoma 6), επάγοντας τη μεταγραφή του γονιδίου PRMD1 (PR domain zinc finger protein 1). Η παραγόμενη πρωτεΐνη ονομάζεται BLIMP1 (B lymphocyte-induced maturation protein 1) και, με τη σειρά της, ρυθμίζει θετικά την παραγωγή της πρωτεΐνης XBP1 (X box-binding protein 1), αλλά επιδρά αρνητικά στην παραγωγή της πρωτεΐνης PAX5 (paired box gene 5). Οι μεταγραφικοί παράγοντες IRF4, BLIMP1 και XBP1 είναι απαραίτητοι για την επιβίωση των πλασματοκυττάρων, σε αντίθεση με τους παράγοντες BCL6 και PAX5 που εκφράζονται από τα Β κύτταρα κατά την είσοδο και την παραμονή τους στο βλαστικό κέντρο [50].

Έπειτα από την αναδιάταξη των ανοσοσφαιρινικών τους γονιδίων προς παραγωγή ενός λειτουργικού πρώιμου ανοσοσφαιρινικού υποδοχέα (B cell receptor, BCR), τα B κύτταρα μεταναστεύουν από το μυελό των οστών προς δευτερογενή λεμφικά όργανα, ως παρθένα B κύτταρα. Αφού έρθουν σε επαφή με το συγγενές προς τον BCR τους αντιγόνο, ενεργοποιούνται και μεταβαίνουν στα βλαστικά κέντρα. Στις θέσεις αυτές, τα B κύτταρα που εκφράζουν ένα λειτουργικό BCR υπόκεινται σε ωρίμανση συγγένειας, διαδικασία κατά την οποία λαμβάνουν χώρα δύο διαφορετικοί μοριακοί μηχανισμοί: η σωματική υπερμετάλλαξη και η μετάπτωση τάξεως. Η μετάπτωση τάξεως οδηγεί στην μετάπτωση της ανοσοσφαιρίνης τάξης IgM προς IgG, IgE ή IgA. Οι μηχανισμοί αυτοί αποσκοπούν στην παραγωγή κλώνων που συνθέτουν αντισώματα υψηλής συγγένειας προς το συγγενές τους αντιγόνο, αλλά και διαφορετικών ισοτύπων, αντίστοιχα. Τα κακοήθη κλωνικά κύτταρα προέρχονται από έναν κλώνο του προγονικού κυττάρου για αυτό έχουν την ίδια αναδιάταξη των γονιδίων του V(D)J γενετικού τόπου. Η απορρύθμιση της διαφοροποίησης των B κυττάρων και οι μεταλλάξεις σε διάφορα γονίδια των ώριμων B κυττάρων οδηγούν σε κακοήθη εξαλλαγή και ανάπτυξη του WM [9, 49].



Εικόνα 3: Διαφοροποίηση των Β κυττάρων.

Στην εικόνα απεικονίζεται ο συνδυασμός των μεταγραφικών παραγόντων και των προσδετών που ρυθμίζουν την διαφοροποίηση των Β κυττάρων. Οι κύριοι ρυθμιστές είναι η πρωτεΐνη Ikaros, η κινάση FLT3, η IL 7, οι πρωτεΐνες ενεργοποίησης του ανασυνδυασμού RAG-1 και RAG-2 ο μεταγραφικός παράγοντας της οικογένειας των ιντερφερονών MUM-1, ο μεταγραφικός καταστολέας BLIMP-1 και το γονίδιο CXCR4. Οι δείκτες CD διαφέρουν σε κάθε στάδιο της διαφοροποίησης και το χαρακτηρίζουν.

GC B cells: Β κύτταρα στα βλαστικά κέντρα

SHM: σωματική υπερμετάλλαξη

CSR: ανασυνδυασμός μετάπτωσης τάξεως

1.1.9 Πολυπαραμετρική Κυτταρομετρία Ροής (ΠΚΡ) στις Αιματολογικές Κακοήθειες

Τα τελευταία χρόνια, ο χαρακτηρισμός του ανοσοφαινοτύπου μέσω της ΠΚΡ θεωρείται απαραίτητος τόσο κατά τη διάγνωση, όσο και κατά την αξιολόγηση των αιματολογικών κακοηθειών. Το WM δεν αποτελεί εξαίρεση, καθώς η ΠΚΡ είναι πλέον μία καθιερωμένη τεχνική που επιτρέπει: (I) την πολυπαραμετρική αναγνώριση και χαρακτηρισμό κάθε μοναδιαίου κυττάρου, (II) τη διαφοροποίηση του WM από άλλες πλασματοκυτταρικές διαταραχές, (III) την ανίχνευση της Ελάχιστης Υπολειπόμενης Νόσου (EYN), (IV) την ταυτοποίηση ανοσοφαινοτυπικών χαρακτηριστικών με προγνωστική αξία, (V) την παροχή υψηλής ειδικότητας και ευαισθησίας της τάξης του 10^{-5} με 10^{-6} και (VI) την ταυτόχρονη εκτίμηση των επιπέδων έκφρασης επιφανειακών και ενδοκυττάρων δεικτών. Χρησιμοποιείται ευρέως στη διάγνωση γιατί δίνει τη δυνατότητα εμπεριστατωμένων και αξιόπιστων αποτελεσμάτων μέσα σε λίγες ώρες. Η ΠΚΡ παρέχει ακριβή αξιολόγηση της έκφρασης πολλαπλών δεικτών και της έντασης φθορισμού τους σε χιλιάδες μεμονωμένα κύτταρα και επιτρέπει τη σαφή διάκριση μεταξύ φυσιολογικών και κλωνικών κυττάρων, ακόμα και όταν υπάρχουν σε πολύ χαμηλές συχνότητες σε ένα δείγμα. Αυτά είναι μοναδικά χαρακτηριστικά της ΠΚΡ, καθώς οι κλασσικές μορφολογικές προσεγγίσεις αδυνατούν να διακρίνουν τα κλωνικά από τα φυσιολογικά κύτταρα και μοριακές τεχνικές εστιάζουν στην ανίχνευση συγκεκριμένων γενετικών δεικτών σε όλο τον μυελό των οστών και όχι σε συγκεκριμένα κύτταρα [49].

1.1.10 Ανοσοφαινοτυπικά Χαρακτηριστικά

Η ανοσοφαινοτυπική αξιολόγηση είναι πολύ σημαντική στη διαφοροδιάγνωση των λεμφοπλασματοκυτταρικών διαταραχών των B κυττάρων και πρέπει να πραγματοποιείται σε δείγματα μυελού των οστών (Πίνακας 2).

1.1.10.1 Ανοσοφαινότυπος του κλώνου των B κυττάρων στο WM

Το ανοσοφαινοτυπικό προφίλ των λεμφοπλασματοκυτταρικών κυττάρων στο WM σκιαγραφείται από την έκφραση των αντιγόνων των B κυττάρων CD19+, CD20+, CD22+low και CD79+, όπως επίσης και CD25+, CD27+ και η επιφανειακή IgM περιορισμένης ελαφριάς αλυσίδας [5, 51]. Συγκριτικά με τα

φυσιολογικά Β κύτταρα η έκφραση του CD22 στα κλωνικά κύτταρα είναι χαμηλότερη. Στον Πίνακα 4 συνοψίζονται οι φαινοτυπικές διαφορές μεταξύ των φυσιολογικών και των κλωνικών κυττάρων WM. Παρόλα αυτά η ένταση της έκφρασης των CD19 και CD20 των κλωνικών κυττάρων είναι χαμηλότερη συγκριτικά με την έκφραση των φυσιολογικών Β λεμφοκυττάρων [9]. Επιπλέον, χαρακτηρίζεται από έλλειψη της έκφρασης των αντιγόνων CD5, CD10, CD11c, CD23 και CD103 που έρχεται σε αντίθεση με τις άλλες λεμφοειδείς κακοήθειες με εξαίρεση το λέμφωμα οριακής ζώνης (MZL). Παρόλα αυτά, πολυάριθμες μελέτες έχουν δείξει ότι σε περίπου 10-20% των περιπτώσεων με WM, τα καρκινικά κύτταρα μπορούν να εκφράσουν CD5, CD23 ή CD10 [52-54] (Εικόνα 4). Επιπλέον, υπάρχει μονοκλωνική έκφραση των επιφανειακών ελαφριών αλυσίδων των ανοσοσφαιρινών με την κάπα (κ) ελαφριά αλυσίδα να επικρατεί έναντι της λάμδα (λ), με αναλογία κ:λ 3:1 [5].

Πίνακας 4: Ανοσοφαινοτυπικές διαφορές μεταξύ των κλωνικών Β κυττάρων WM, των Β κυττάρων μνήμης και του λεμφώματος οριακής ζώνης (MZL)

Αντιγόνα	B κύτταρα μνήμης	Κλωνικά B κύτταρα WM	MZL
CD5	-	-	-
CD10	-	-	-
CD11c	-	-	+/-
CD19	++	++	++
CD20	++	++	++
CD22	+	+low	+low
CD23	-	+/-	+/-
CD25	-/+	+	+/-
CD27	+/-	+/-	-
CD38	-/+	-/+	-/+

Έκφραση αντιγόνων: + θετική, ++ έντονα θετική, - αρνητική, +/- ετερογενής (από αρνητική έως θετική).

Επομένως, ο πιο κοινός ανοσοφαινότυπος των κλωνικών Β κυττάρων WM θα μπορούσε να περιγραφεί ως εξής: CD19+ CD22+low CD20+ CD25+ CD27+/- CD5- CD10- CD11c- CD38-/+ . Λαμβάνοντας υπόψιν αυτόν τον φαινότυπο, θα μπορούσαμε να πούμε ότι η προέλευση των κλωνικών WM κυττάρων είναι ένα Β κύτταρο, το οποίο έχει υποστεί σωματική υπερμετάλλαξη και έχει ωριμάσει αλλά δεν έχει υποστεί μετάπτωση τάξης,

ένα στάδιο διαφοροποίησης που τοποθετείται μετά τα Β κύτταρα στα βλαστικά κέντρα και πριν τα πλασματοκύτταρα [49].

1.1.10.2 Ανοσοφαινότυπος του κλώνου των πλασματοκυττάρων στο WM

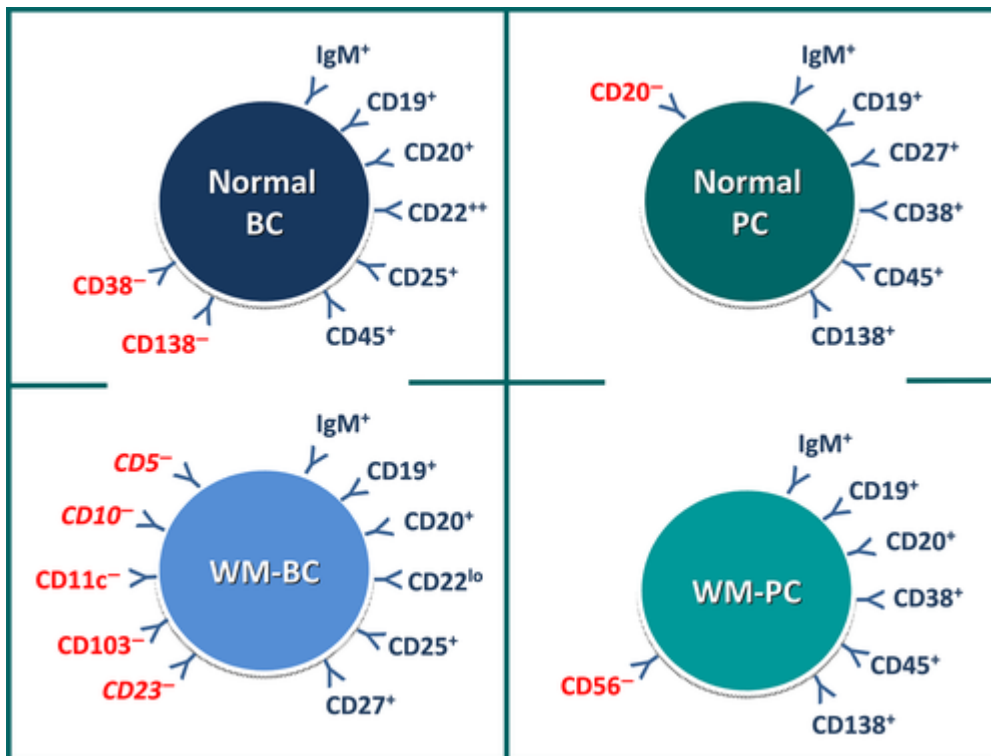
Η ΠΚΡ δείχνει την παρουσία μονοκλωνικών πλασματοκυττάρων που εκφράζουν την ίδια περιορισμένη ελαφριά αλυσίδα με τον λεμφοπλασματοκυτταρικό πληθυσμό [51]. Το αντιγονικό προφίλ αυτών των πλασματοκυττάρων δείχνει ένα φαινοτυπικό προφίλ παρόμοιο με αυτό των φυσιολογικών πλασματοκυττάρων και εμφανώς διαφορετικό από αυτό των μυελωματικών πλασματοκυττάρων: CD138++, CD19+, CD45+, CD38+, CD56- με πολλά πλασματοκύτταρα να φέρουν τον ίδιο περιορισμό ελαφριάς αλυσίδας με το τμήμα της IgM στον όρο [51] (Πίνακας 5). Τα περισσότερα πλασματοκύτταρα δεν εκφράζουν τα αντιγόνα των Β κυττάρων CD20 ή CD22 (Εικόνα 4).

Πίνακας 5: Ανοσοφαινοτυπικές διαφορές μεταξύ των WM πλασματοκυττάρων, των φυσιολογικών πλασματοκυττάρων και των μυελωματικών πλασματοκυττάρων

Αντιγόνα	Φυσιολογικά Πλασματοκύτταρα	Πλασματοκύτταρα WM	Πλασματοκύτταρα MM (Multiple Myeloma)
CD19	+	+	-(96%)
CD20	-	+(30%)	-/(17%)
CD27	++	+	-ή-/(68%)
CD45	+	+	-(80%)
CD56	-	-	+(60%)
CD81	+	+	-/+
CD117	-	-	+(32%)

Έκφραση αντιγόνων: + θετική, ++ έντονα θετική, - αρνητική, +/- ετερογενής αρνητική προς θετική. Στην παρένθεση αναγράφονται οι συχνότητες εμφάνισης των αντιγονικών μοτίβων.

Όταν συγκρίνονται με τα μυελωματικά πλασματοκύτταρα, τα WM πλασματοκύτταρα έχουν υψηλότερη έκφραση των δεικτών CD19 και CD45. Επιπρόσθετα, τα WM πλασματοκύτταρα έχουν μικρότερο μέγεθος από τα MM πλασματοκύτταρα σύμφωνα με την πρόσθια σκέδαση [55, 56]. Παράλληλα, βρέθηκε ότι το γονίδιο *PAX5*, του οποίου η έκφραση πρέπει να κατασταλεί για να επιτραπεί η διαφοροποίηση σε πλασματοκύτταρα έχει υψηλότερη έκφραση στα WM πλασματοκύτταρα συγκριτικά με τα φυσιολογικά πλασματοκύτταρα. Αντίθετα, τα γονίδια *BLIMP1* και *IRF4* τα οποία παίζουν βασικό ρόλο στην διαφοροποίηση των Β κυττάρων, υποεκφράζονται στα WM πλασματοκύτταρα σε σχέση με τα φυσιολογικά πλασματοκύτταρα [9].



Εικόνα 4: Ανοσοφαινότυπος των φυσιολογικών και των καρκινικών κυττάρων στο WM.

Στην εικόνα συμβολίζεται με + η έκφραση ενός δείκτη και με - η απουσία έκφρασης ενός δείκτη. Με το low συμβολίζεται η χαμηλή έκφραση.

BC: Β λεμφοκύτταρο, PC: πλάσματοκύτταρο [9]

1.2 Υγρή βιοψία στις αιματολογικές κακοήθειες

Τα τελευταία χρόνια έχουν σημειωθεί σημαντικές πρόοδοι στη διάγνωση και τη θεραπεία του καρκίνου. Παρόλα αυτά, επεμβατικές διαδικασίες, όπως η κλασική βιοψία του όγκου ή η βιοψία του μυελού των οστών στις αιματολογικές κακοήθειες, αποτελούν τις πρότυπες μεθόδους αναφοράς (golden standard) για τη διάγνωση και την παρακολούθηση της νόσου. Ωστόσο, οι μέθοδοι αυτές έχουν σημαντικούς περιορισμούς καθώς: 1. καθίστανται εξαιρετικά δύσκολες όταν η απόκτηση βιοπτικού υλικού δεν είναι εφικτή για πρακτικούς λόγους (π.χ. αδυναμία προσέγγισης ή ανάγκη επεμβατικών πράξεων υψηλού κινδύνου) [57] 2. Η λήψη βιοπτικού υλικού από μία μόνο περιοχή ή μία εστία της νόσου δεν είναι ικανή να αποδώσει την κλωνική ετερογένεια του νεοπλάσματος στις διάφορες εστίες της νόσου 3. Απαιτεί συνήθως δαπανηρές παρεμβάσεις, με κινδύνους επιπλοκών για τον ασθενή και ιδιαίτερα υψηλό κόστος 4. Δεν είναι εφικτή η συχνή επανάληψη για την παρακολούθηση και εκτίμηση της εξέλιξης της νόσου. Η σύλληψη ενός μόνο στιγμιότυπου της εξέλιξης της νεοπλασίας κατά τη βιοψία του μυελού των οστών, δεν είναι αντιπροσωπευτική, καθώς δεν συμπεριλαμβάνει την συνεχώς μεταβαλλόμενη κλωνική εξέλιξη της νόσου [58, 59]. Καθώς οι διάφοροι κλωνικοί υποπληθυσμοί αντιδρούν διαφορετικά στη θεραπεία, επηρεάζουν άμεσα την επιβίωση των ασθενών. Για αυτό το λόγο, υπάρχει μέγιστη ιατρική ανάγκη για την ταυτοποίηση εύκολα προσβάσιμων βιοδεικτών, οι οποίοι θα είναι ικανοί να αντικατοπτρίζουν την ετερογένεια του όγκου.

Μία νέα προσέγγιση έρχεται να υποστηρίξει και να συμπληρώσει τα κενά της επεμβατικής βιοψίας στην παρακολούθηση της εξέλιξης της νόσου σε πραγματικό χρόνο. Η υγρή βιοψία (liquid biopsy) αποτελεί μία μη-επεμβατική προσέγγιση που βασίζεται στην άντληση πληροφοριών μέσω ανάλυσης περιφερικού αίματος. Έτσι, δίνει τη δυνατότητα χαρακτηρισμού της εξέλιξης ενός νεοπλάσματος σε πραγματικό χρόνο, μέσω λεπτομερούς μοριακής ανάλυσης του κυκλοφορούντος γενετικού υλικού των καρκινικών κυττάρων στο περιφερικό αίμα. Η προσέγγιση αυτή δίνει σημαντικές πληροφορίες για την βιολογία και την ετερογένεια του όγκου μέσω: α) ανίχνευσης και μοριακού χαρακτηρισμού κυκλοφορούντων καρκινικών κυττάρων (circulating tumor cells, CTCs), β) ανίχνευσης εξωκυττάριου κυκλοφορούντος καρκινικού DNA (circulating tumor DNA, ctDNA), γ) μελέτης κυκλοφορούντων miRNAs, και δ) απομόνωσης και μελέτης εξωκυτταρικών σωματιδίων (extracellular vesicles, EVs). Το ctDNA έχει δείξει πως μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως μοριακός βιοδείκτης για την επιλογή θεραπείας, την ανταπόκριση σε θεραπεία, την ελάχιστη υπολειπόμενη νόσο (EYN) και την έγκαιρη ανίχνευση κλωνικής εξέλιξης και υποτροπής [60].

Οι αναλύσεις αυτές δίνουν άλλη διάσταση στην εξατομικευμένη θεραπεία, καθώς παρέχουν τη δυνατότητα χαρακτηρισμού της νεοπλασματικής νόσου σε μοριακό επίπεδο για την εκτίμηση της πρόγνωσης, καθώς και την πρόβλεψη ανταπόκρισης ή της ανάπτυξης αντίστασης σε στοχευμένες θεραπείες επιτρέποντας την εκτίμηση της νόσου σε χρονικό και χωρικό (πολυεστιακό) επίπεδο (temporal and spatial evaluation of the disease) [61].

Σύμφωνα με δεδομένα και από ασθενείς με ΠΜ, που υποδεικνύουν το ρόλο του ctDNA ως ενός γενικού δείκτη καρκινικού φορτίου με προγνωστική αξία [62-64], διερευνάται η πιθανότητα αντικατάστασης της βιοψίας ιστού (μυελού των οστών αλλά και εστιών εκτός του μυελού) από την «υγρή βιοψία» και την ανάλυση του ctDNA για τον καθορισμό της θεραπευτικής στρατηγικής και της κλωνικής ετερογένειας και εξέλιξης. Μια πρόσφατη μελέτη όπου εφαρμόστηκε ολική εξωμική αλληλούχηση (whole-exome sequencing) σε δείγματα ctDNA, CTCs και αντίστοιχες ιστικές βιοψίες από ασθενείς με ΠΜ, έδειξε συμφωνία κατά 99% στις κλωνικές σωματικές μεταλλάξεις και κατά 81% στις αλλαγές των αριθμητικών αντιγράφων (copy number alterations) μεταξύ υγρής και ιστικής βιοψίας, τονίζοντας τη χρησιμότητα της υγρής βιοψίας για την παρακολούθηση αυτών των ασθενών [63]. Υπό αυτό το πλαίσιο, για να αξιολογηθεί η σκοπιμότητα για την ανίχνευση σωματικών μεταλλάξεων στα γονίδια MYD88 και CXCR4 σε ctDNA δειγμάτων ασθενών με IgM μονοκλωνική γαμμαπάθεια, πρόσφατη μελέτη που πραγματοποιήθηκε στη Θεραπευτική Κλινική έδειξε την υψηλή συμφωνία (άνω του 90%) μεταξύ υγρής και ιστικής βιοψίας για μεταλλάξεις στα παραπάνω γονίδια [65]. Οι παραπάνω μελέτες αναδεικνύουν τις προοπτικές της συγκεκριμένης προσέγγισης στο πολλαπλούν μυέλωμα, και κατ'επέκταση στις υπόλοιπες πλασματοκυτταρικές δυσκρασίες/μονοκλωνικές γαμμαπάθειες, όπως η WM και η AL αμυλοείδωση.

Όσον αφορά στο κλινικό εργαστήριο, οι αναλύσεις υγρής βιοψίας δύναται να έχουν ένα ευρύ πεδίο εφαρμογών όπως η ανάπτυξη στοχευμένων διαγνωστικών δοκιμασιών (theranostics) και συνοδών διαγνωστικών εξετάσεων (companion diagnostics) για συγκεκριμένες στοχευμένες θεραπείες, η παρακολούθηση της εξέλιξης της νόσου, ενώ μπορούν να χρησιμοποιηθούν ακόμη και για την πρόωμη διάγνωση της νεοπλασίας. Η κλινική σημασία της ανάλυσης των μεταλλάξεων έχει ήδη φανεί στο πλάσμα ασθενών με συμπαγείς όγκους. Πρόσφατα, η ανίχνευση μεταλλάξεων του γονιδίου EGFR στο πλάσμα έλαβε έγκριση από τον FDA και είναι ιδιαίτερα χρήσιμη στην παρακολούθηση των ασθενών με μη μικροκυτταρικό καρκίνο πνεύμονα (NSCLC) κατά τη διάρκεια της θεραπείας. Η εξατομίκευση της θεραπείας με βάση το μοριακό προφίλ της κακοήθειας κάθε ασθενούς αποτελεί αναμφίβολα τη μεγαλύτερη πρόκληση για τη σύγχρονη Θεραπευτική στην Αιματολογία-Ογκολογία.

1.2.1 Κυκλοφορούντα καρκινικά κύτταρα (CTCs)

Τα κυκλοφορούντα καρκινικά κύτταρα (CTCs) περιγράφηκαν για πρώτη φορά το 1869. Λόγω της πρόσφατης ανάπτυξης κατάλληλων τεχνικών απομόνωσής τους που βασίζονται στις βιοχημικές ή βιοφυσικές ιδιότητές τους, τα CTCs έχουν μελετηθεί ως προγνωστικοί και προβλεπτικοί βιοδείκτες σε διάφορους μεταστατικούς και μη καρκίνους. Η ανάλυση των κυκλοφορούντων καρκινικών κυττάρων αποτελεί σήμερα ένα πολλά υποσχόμενο πεδίο για ασθενείς που βρίσκονται τόσο σε πρώιμο όσο και σε προχωρημένο στάδιο της νόσου και ο μοριακός χαρακτηρισμός τους προσφέρει τη δυνατότητα καλύτερης κατανόησης της μετάστασης του όγκου καθώς και την ανάπτυξη αντοχής σε εγκεκριμένες θεραπείες.

Στην κυκλοφορία του αίματος, τα CTCs έχουν μικρό χρόνο ημίσειας ζωής, και μόνο ένα μέρος τους επιβιώνει για να δώσει μεταστάσεις, λόγω βιολογικών μηχανισμών όπως η απόπτωση και η εξάλειψή από το ανοσοποιητικό σύστημα. Σύμφωνα με μία προτεινόμενη θεωρία τα καρκινικά κύτταρα τείνουν να συσσωρεύονται σε συγκεκριμένα όργανα αναζητώντας ιδανικές συνθήκες για την επιβίωση και την ανάπτυξη τους.

Τα CTCs μπορούν να υφίστανται μετασχηματισμό από επιθηλιακού τύπου κύτταρα σε μεσεγχυματικού τύπου κυττάρων (EMT), που οδηγεί σε καθοριστική αλλαγή στον κυτταρικό φαινότυπο μέσω μειορύθμισης των επιθηλιακών δεικτών και συσσώρευσης μεσεγχυματικών ιδιοτήτων όπως αυξημένη ικανότητα για μετανάστευση και διείσδυση προκαλώντας διαταραχές στην εξωκυττάρια μήτρα. Ο μετασχηματισμός EMT είναι μία θεμελιώδης διαδικασία στο μεταστατικό μονοπάτι καθώς επιτρέπει την αποκόλληση των κυκλοφορούντων καρκινικών κυττάρων από την πρωταρχική εστία. Είναι επίσης σημαντικός, καθώς η πλειοψηφία των αναλυτικών συστημάτων που ανιχνεύουν τα CTCs βασίζεται στην έκφραση του επιθηλιακού δείκτη EpCAM. Με αυτό τον τρόπο, τα CTCs τα οποία δεν εκφράζουν τον δείκτη EpCAM αλλά εκφράζουν μεσεγχυματικούς δείκτες μπορούν να μην ανιχνεύονται εκτός εάν, για την ανίχνευσή τους χρησιμοποιούνται δείκτες σχετιζόμενοι με τον EMT μετασχηματισμό, όπως ο TWIST και ο ALDH1. Τα μεσεγχυματικά CTCs έχουν συσχετιστεί με την πρόοδο της νόσου στον καρκίνο του μαστού ενώ η μετάθεσή τους στην επιθηλιακή φάση μέσω της αντίστροφης διαδικασίας (μεσεγχυματική-επιθηλιακή μετάθεση (MET)) επιτρέπει στα CTCs να εγκατασταθούν σε απομακρυσμένα όργανα και εγκαθιδρύει την μετάσταση. Η απομόνωση των CTCs γίνεται από το περιφερικό αίμα, παρόλο που η συγκέντρωσή τους είναι συνήθως μικρότερη του 1 κυττάρου/mL [66].

Η κλινική τους σημασία επικεντρώνεται: (I) στη χρήση τους ως υλικό υγρής βιοψίας, η οποία είναι λιγότερο επεμβατική, χρονοβόρα και δαπανηρή σε σύγκριση με τη συμβατική βιοψία, προς επιλογή του κατάλληλου θεραπευτικού σχήματος, (II) στην καταμέτρηση της μεταβολής του αριθμού τους στη συστηματική κυκλοφορία πριν και μετά την εφαρμογή θεραπευτικής παρέμβασης, όπου ο αριθμός των CTCs σε ορισμένες περιπτώσεις χρησιμοποιείται και ως προγνωστικός δείκτης, και (III) στη θεραπευτική στόχευση παραγόντων που σχετίζονται με τα CTCs ή τη μετάσταση της νόσου. Ωστόσο, η μελέτη των CTCs δεν έχει εγκριθεί ακόμα για ευρεία κλινική εφαρμογή, καθώς οι κλινικές δοκιμές φάσης II και III, οι περισσότερες στον καρκίνο του μαστού, είναι σε εξέλιξη ή μόλις έχουν ολοκληρωθεί.

1.3 Σκοπός της εργασίας

Σκοπός της συγκεκριμένης διπλωματικής εργασίας είναι η συσχέτιση των κυκλοφορούντων καρκινικών κυττάρων στο περιφερικό αίμα ασθενών με WM με την εξέλιξη της νόσου, το καρκινικό φορτίο καθώς και με την σοβαρότητα της νόσου σύμφωνα με τον ανοσοφαινοτυπικό τους προσδιορισμό με την χρήση ΠΚΡ 8 χρωμάτων.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Αναλώσιμα

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

2.2 Όργανα

- Ηλεκτροκίνητος επαναφορτιζόμενος ελεγκτής πιπέτας (pipette controller) (FastPette, Labnet, International Inc, NJ, USA)
- Κυτταρόμετρο BD FACSCanto II, εξοπλισμένο με 3 laser, 405 nm Violet/ 488 nm Blue/ 633 nm Red (BD Biosciences, NJ, USA)
- Οπτικό μικροσκόπιο (Optika microscopes, Italy)
- Πιπέτες Pipetman όγκου 2-20, 20-200, 200-1000 μL (Gilson, Middleton, WI, USA)
- Φυγόκεντρος HERMLE Z 300K με κεφαλές 200.I2 VO4 για σωλήνες Falcon, 200.50 VO6 για μικροπλάκες καλλιέργειας και 200.87 VO3 για σωλήνες erpendorf (Hernie Laborstechnik GmbH, Germany)
- Αιματοκυτταρόμετρο (Neubauer Bright Line Hematocytometer) (Sigma Chemical Co, St Louis, MO, USA)

2.3 Αντιδραστήρια

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

2.4 Λογισμικά Προγράμματα

- BD FACSDiva™ version 7.0 (BD Biosciences, NJ, USA)
- Infinicyt™ v1.8.0 (Cytognos, Salamanca, Spain)

2.5 Αντισώματα συζευγμένα με φθορίζουσες χρωστικές

- FITC Anti-Human Multi-Epitope CD25 (Cytognos, Salamanca, Spain)
- PE Mouse Anti-Human CD22, κλώνος HIB22 (BD Biosciences, NJ, USA)
- BD PerCPCy5.5 Mouse Anti-Human IgM, κλώνος HI30 (BD Biosciences, NJ, USA)
- BD Horizon™ BV421 Mouse Anti-Human CD5, κλώνος UCHT-2 (BD Biosciences, NJ, USA)
- PE-Cy7 Mouse Anti-Human CD19, κλώνος SC25C1 (Beckman Coulter, Nyon, Switzerland)
- APC Polyclonal Rabbit Anti-Human cyIgκ (Dako, Glostrup, Denmark)
- APCC750 Polyclonal Goat Anti-Human cyIgλ (Cytognos, Salamanca, Spain)

2.6 Χαρακτηριστικά ασθενών και συλλογή δειγμάτων μυελού των οστών και περιφερικού αίματος

Στην παρούσα εργασία επεξεργαστήκαμε συνολικά 57 δείγματα. Τα δείγματα συλλέχθηκαν από την Αιματολογική-Ογκολογική Κλινική της Ιατρικής Σχολής, ΕΚΠΑ, Γ.Ν.Α. «Αλεξάνδρα», ύστερα από παρακέντηση (για τον μυελό των οστών) και φλεβοκέντηση (για το περιφερικό αίμα), αποθηκεύτηκαν σε σωληνάκια με αντιπηκτικό EDTA και μεταφέρθηκαν άμεσα στο εργαστήριό μας, όπου πραγματοποιήθηκε η επεξεργασία τους. Ταυτόχρονα, από την Κλινική διατίθεντο τα κλινικά χαρακτηριστικά των ασθενών με WM τα οποία απεικονίζονται στον Πίνακα 6. Στα δείγματα που αναλύσαμε περιλαμβάνονται 27 ζεύγη δειγμάτων μυελού των οστών και περιφερικού αίματος και 3 δείγματα περιφερικού αίματος από συνολικά 30 ασθενείς με WM, τα οποία αναλύσαμε με ΠΚΡ προς ανοσοφαινοτυπικό χαρακτηρισμό των CTCs, συσχέτιση του αριθμού των CTCs με την πρόοδο της νόσου, καθώς και σύγκριση του μυελού των οστών με το περιφερικό αίμα. Από τα 27 ζεύγη δειγμάτων και τα τρία δείγματα περιφερικού αίματος, δηλαδή σύνολο 30 δείγματα περιφερικού αίματος, κυκλοφορούντα καρκινικά κύτταρα ανιχνεύθηκαν στα 13 (Πίνακας 8).

Πίνακας 6: Κλινικά χαρακτηριστικά των ασθενών με WM.

ΔΕΙΓΜΑ	ΦΥΛΟ	ΣΤΑΔΙΟ ΝΟΣΟΥ	ΔΙΗΘΗΣΗ ΣΤΟΝ ΜΥΕΛΟ ΤΩΝ ΟΣΤΩΝ ΑΠΟ ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΑ (%)	IgM ΣΤΟΝ ΟΡΟ ΤΩΝ ΑΣΘΕΝΩΝ (U/mL)
3551	A	Νέα Διάγνωση WM	45	3000
3452	Θ	Νέα Διάγνωση WM	60	8500
1704	Θ	Υποτροπή από ασυμπτωματικό WM	50-55	2000
3335	A	Νέα Διάγνωση WM	45	2500
3377	A	Νέα Διάγνωση WM	60	2300
3378	Θ	IgM-MGUS	5	284
3316	A	IgM-MGUS	1	256
784	Θ	WM υπό Ibrutinib	30	1570
3153	A	IgM-MGUS	5-7	2140
3146	Θ	WM υπό Mabthera-Dexamethasone-Endoxan	35	2140
746	A	WM υπό Mabthera-Dexamethasone-Endoxan	30	1030
3100	A	IgM-MGUS	3	199
3069	Θ	WM υπό Mabthera-Dexamethasone	45	7500

		ne-Endoxan		
650	Θ	Υποτροπή από ασυμπτωματι κό WM	40-45	3090
3067	Θ	IgM-MGUS	3-5	1380
3065	Θ	IgM-MGUS	3-5	711
3048	A	WM υπό Mabthera- Dexamethaso ne-Endoxan	15	1000
3043	Θ	Νεα διάγνωση WM	60	1000
3035	Θ	WM υπό Rituximab- Ibrutinib- Velcade	40	1340
2719	A	Ασυμπτωματι κό WM	10	1600
2708	A	IgM-MGUS	10	386
2187	A	Νεα διάγνωση WM	70	4580
750	A	Ασυμπτωματι κό WM	3	4700
2732	Θ	Υποτροπή από ασυμπτωματι κό WM	60	6850
655	A	Υποτροπή από ασυμπτωματι κό WM	40	2250
900	A	WM υπό Ibrutinib	20	1200
756	A	Υποτροπή από ασυμπτωματι	40	791

		κό WM		
--	--	-------	--	--

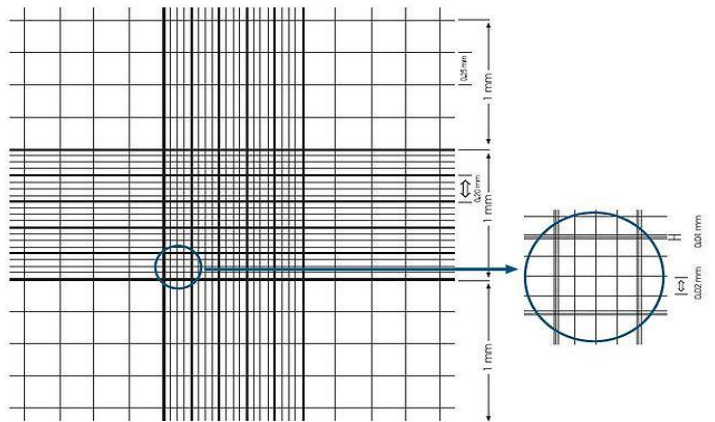
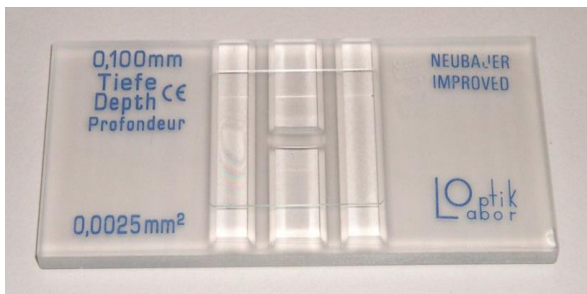
2.7 Προσδιορισμός βιωσιμότητας και αριθμού κυττάρων

Για τον υπολογισμό της συγκέντρωσης και του ποσοστού των ζωντανών κυττάρων σε ένα συνολικό δείγμα κυτταρικού εναιωρήματος χρησιμοποιήθηκαν πρωτόκολλα χρώσης με το κυανούν του τρυπανίου (Trypan Blue). Αρχή της συγκεκριμένης μεθόδου είναι η εκλεκτική διαπερατότητα της πλασματικής μεμβράνης των ζωντανών κυττάρων στη χρωστική. Συγκεκριμένα, η χρωστική δεν είναι δυνατό να περάσει στο εσωτερικό των ζωντανών κυττάρων, ενώ η απώλεια της ακεραιότητας της πλασματικής μεμβράνης των νεκρών κυττάρων οδηγεί σε χρώση του κυτταροπλάσματός τους με έντονο μπλε χρώμα. Η μέτρηση των κυττάρων γίνεται με αιματοκυτταρόμετρο Neubauer με χρήση οπτικού μικροσκοπίου (Εικόνα 5).

1. Από το κυτταρικό εναιώρημα μεταφέρεται σε φρεάτιο μικροπλάκας (96 φρεατίων) ορισμένος όγκος, ανάλογα με την εκτιμώμενη συγκέντρωση των κυττάρων (συνήθως 20 μL για σχετικά πυκνό δείγμα και 50 μL για πιο αραιό δείγμα). Το δείγμα αναμιγνύεται με κατάλληλο όγκο Trypan Blue, ώστε ο τελικός όγκος στο φρεάτιο να είναι 100 μL .
2. Το δείγμα μεταφέρεται σε αιματοκυτταρόμετρο Neubauer και γίνεται παρατήρηση σε οπτικό μικροσκόπιο.
3. Η καταμέτρηση των κυττάρων γίνεται στα 25 κεντρικά τετράγωνα, τα οποία περιβάλλονται περιφερειακά από τριπλή γραμμή. Καταμετρώνται τόσο τα ζωντανά, όσο και τα νεκρά κύτταρα.
4. Υπολογίζεται η συγκέντρωση και η βιωσιμότητα των κυττάρων από την παρακάτω σχέση:

Αριθμός κυττάρων/mL δείγματος = αριθμός ζωντανών κυττάρων x
συντελεστής αραιώσης x 10^4

% βιωσιμότητα = (αριθμός ζωντανών κυττάρων/ολικός αριθμός κυττάρων) x
100



Εικόνα 5: Μακροσκοπική εικόνα αιματοκυτταρομέτρου Neubauer (αριστερά), καθώς και η κεντρική περιοχή και λεπτομέρεια ενός εκ των 25 κεντρικών τετραγώνων όπου έγινε η καταμέτρηση των κυττάρων (δεξιά).

2.8 Πρωτόκολλο επεξεργασίας και χρώσης δειγμάτων μυελού των οστών και περιφερικού αίματος από ασθενείς με WM για ανάλυση με ΠΚΡ

1. Το δείγμα συλλέγεται με πιπέτα όγκου 10 mL από το σωληνάκι με EDTA και διηθείται από φίλτρο (Cell strainer), με πόρους διαμέτρου 70 μm , ώστε να κατακρατηθούν πήγματα και συσσωματώματα που μπορούν να επηρεάσουν την απομόνωση των κυττάρων του δείγματος.
2. Το διήθημα του δείγματος μεταφέρεται σε σωληνάριο Falcon 50 mL, το οποίο γεμίζεται με διάλυμα PharmLyse, αραιωμένο με απεσταγμένο νερό σε τελική αραιώση 1X. Στο στάδιο αυτό γίνεται λύση των ερυθροκυττάρων, ώστε να εξασφαλιστεί η μέγιστη δυνατή ανάκτηση και συμπύκνωση του εμπύρηνων κυττάρων του δείγματος. Το διάλυμα λύσης PharmLyse δεν περιέχει μονιμοποιητικές ουσίες και η λύση των ερυθροκυττάρων γίνεται σε χαμηλή συγκέντρωση χλωριούχου αμμωνίου.
3. Αναμιγνύουμε καλά και επωάζουμε το δείγμα σε συσκευή ανάδευσης για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
4. Στη συνέχεια, το σωληνάριο φυγοκεντρείται στα 800 g και στους 4 °C για 10 λεπτά. Το υπερκείμενο αφαιρείται με χρήση πιπέτας 10 mL, χωρίς να διαταραχθεί το ίζημα. Ο υπολειπόμενος όγκος στο σωληνάριο πρέπει να είναι περίπου 300 μL .
5. Προστίθενται 2 mL PBS-0,5% FBS και το ίζημα επαναδιαλυτοποιείται με έντονη ανάδευση.
6. Έπειτα συμπληρώνουμε το σωληνάριο μέχρι τα 50 mL με PBS-0,5% FBS, αναδεύουμε καλά και φυγοκεντρούμε στα 540 g και στους 4 °C για 5 λεπτά. Το υπερκείμενο αφαιρείται με προσοχή όπως στο παραπάνω βήμα, μέσω πιπέτας 10 mL.
7. Η επαναδιαλυτοποίηση του ιζήματος γίνεται με την προσθήκη 2 mL PBS-0,5% FBS. Μετά από καλή ανάδευση, το περιεχόμενο του σωληναρίου μεταφέρεται σε πλαστικό σωληνάκι ειδικό για κυτταρομετρία ροής (FACS tube).
8. Εκπλένουμε το άδειο σωληνάριο των 50 mL με επιπλέον 2 mL PBS-0,5% FBS, ώστε να ανακτηθούν όσο το δυνατόν περισσότερα εναπομείναντα κύτταρα και μεταφέρουμε και τον όγκο αυτό στο FACS tube.

9. Το σύνολο του δείγματος στο FACS tube φυγοκεντρείται στα 540 g και στους 4 °C για 5 λεπτά. Μετά το πέρας της φυγοκέντρωσης, αφαιρείται με προσοχή το υπερκείμενο και το ίζημα επαναδιαλυτοποιείται με PBS-0,5% FBS ώστε ο τελικός όγκος να είναι περίπου 300 μ L. Ο όγκος πρέπει να διατηρηθεί όσο το δυνατόν μικρότερος, ώστε να είναι εύκολη η προσαρμογή της κατάλληλης συγκέντρωσης κυττάρων ανά σωληνάκι, κατά τα επόμενα βήματα.
10. Στη φάση αυτή γίνεται προσδιορισμός του αριθμού και της βιωσιμότητας των συνολικών εμπύρηνων κυττάρων του δείγματος, χρησιμοποιώντας το πρωτόκολλο χρώσης με κυανού του τρυπανίου (Trypan Blue). Μετά την καταμέτρηση των κυττάρων, η συγκέντρωση των εμπύρηνων κυττάρων του δείγματος προσαρμόζεται στα 10^5 κύτταρα/ μ L.
11. Για κάθε FACS tube που θα εφαρμόσουμε το πρωτόκολλο της χρώσης με τα συζευγμένα με φθορίζουσες χρωστικές αντισώματα, θα χρησιμοποιηθούν περίπου 100 μ L (δηλαδή 10^7 κύτταρα) από το παραπάνω εναιώρημα. Η χρώση αυτού του μεγάλου αριθμού κυττάρων είναι απαραίτητη ώστε να επιτευχθούν υψηλά όρια ευαισθησίας, τα οποία απαιτούν την καταγραφή τουλάχιστον 5×10^6 κυτταρικών συμβάντων από κάθε FACS tube με τον κατάλληλο συνδυασμό φθορίζοντων αντισωμάτων.
12. Μετά την προσθήκη 100 μ L εναιωρήματος εμπύρηνων κυττάρων, προστίθεται ο κατάλληλος όγκος από κάθε φθορίζον αντίσωμα, καθώς και κατάλληλος όγκος διαλύματος PBS-0,5% FBS ώστε να φτάσουμε σε τελικό όγκο 200 μ L. Το συνολικό διάλυμα αναμιγνύεται καλά. Σημειώνεται πως αν και τα κατάλληλα αντισώματα που τοποθετούνται στα σωληνάκια προορίζονται για την ανίχνευση τόσο επιφανειακών, όσο και ενδοκυττάρων δεικτών, στο στάδιο αυτό προσθέτουμε μόνο τα αντισώματα που στοχεύουν επιφανειακά αντιγόνα-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.

2.8.1 Για ανίχνευση επιφανειακών και ενδοκυττάρων αντιγονικών δεικτών

1. Μετά το πέρας της χρώσης με τα αντισώματα για τα επιφανειακά αντιγόνα, προσθέτουμε 2 mL PBS-0,5% FBS στο FACS tube, αναδεύουμε καλά και φυγοκεντρούμε στα 540 g για 5 λεπτά και στους 4 °C.
2. Απορρίπτεται το υπερκείμενο, αφήνοντας περίπου 100 μL υπολειμματικού όγκου σε κάθε FACS tube και το ίζημα επαναδιαλυτοποιείται με ήπια ανάδευση.
3. Προσθέτουμε 100 μL από το Αντιδραστήριο A (Fix&Perm), που λειτουργεί ως μονιμοποιητικός παράγοντας, αναδεύουμε έντονα και επωάζουμε τα δείγματα για 15 λεπτά στον πάγο, προστατευόμενα από άμεση έκθεση στο φως.
4. Μετά την επώαση προσθέτουμε 2 mL PBS-0,5% FBS και φυγοκεντρούμε για 5 λεπτά στα 540 g και στους 4 °C. Απορρίπτουμε το υπερκείμενο, δίχως να διαταράξουμε το κυτταρικό ίζημα, αφήνοντας 100 μL υπολειμματικό όγκο σε κάθε FACS tube.
5. Το ίζημα επαναδιαλυτοποιείται με έντονη ανάδευση και προσθέτουμε 100 μL από το Αντιδραστήριο B (Fix&Perm), που λειτουργεί ως αντιδραστήριο που εξασφαλίζει τη διαπερατότητα των κυτταρικών μεμβρανών, και τον κατάλληλο όγκο από τα φθορίζοντα αντισώματα έναντι κυτταροπλασματικών κ και λ ελαφριών αλυσίδων.
6. Το δείγματα επωάζονται για 15 λεπτά στον πάγο, προστατευμένα από απευθείας έκθεση σε φως.
7. Μετά την επώαση προστίθενται 2 mL PBS-0,5% FBS, αναδεύουμε έντονα και φυγοκεντρούμε για 5 λεπτά στα 540 g και στους 4 °C. Το υπερκείμενο απορρίπτεται δίχως να διαταράσσεται το κυτταρικό ίζημα και προσθέτουμε 500 μL PBS-0,5% FBS.

Ακολουθεί η ανάλυση του δείγματος με κυτταρομετρία ροής, στάδιο που είναι κοινό και για τα 2 FACS tubes του κάθε δείγματος.

1. 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.
2. 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 είναι το προτεινόμενο από το EuroFlow για την ανάλυση κλινικών δειγμάτων ΠΚΡ, καθώς εκτός του ότι προσφέρει ένα περιβάλλον φιλικό προς το χρήστη, συνδυάζει τη δυνατότητα αξιόπιστης επεξεργασίας αρχείων μεγάλου αριθμού κυτταρικών συμβάντων (έως 10×10^6) και την ταυτόχρονη οπτικοποίηση πολλών παραμέτρων, που είναι απαραίτητες για την ανίχνευση μικρού αριθμού γεγονότων, όπως απαιτείται για την ανίχνευση των CTCs.

Οι συνδυασμοί των φθορίζοντων αντισωμάτων που χρησιμοποιήθηκαν για τη χρώση σε κάθε δείγμα παρουσιάζονται στον Πίνακα 7.

Πίνακας 7: Συνδυασμοί φθορίζοντων αντισωμάτων που χρησιμοποιούνται ανά σωληνάκι. Για κάθε αντίσωμα αναφέρεται το συζευγμένο φθοριόχρωμα και ο κλώνος.

Φθορίζουσα χρωστική	FITC	PE	PerCP-Cy5.5	BV421	PE-Cy7	APC	APCC750
Σωληνάκι	CD25 Multi-epitope	CD22 HIB22	IgM HI30	CD5 UCHT-2	CD19 SC25C1	cyIgκ polyclonal	cyIgλ polyclonal

Σε κάθε σωληνάκι έγινε χρώση τουλάχιστον 5×10^6 κυττάρων και καταγραφή 1×10^6 κυττάρων, εκτός από τις λίγες περιπτώσεις όπου ο αριθμός των κυττάρων δεν επαρκούσε και η καταγραφή συνεχίστηκε έως ότου εξαντλήθηκε όλο το δείγμα.

Η διάκριση των ορίων θετικών και αρνητικών πληθυσμών, όσον αφορά τα ανοσοφαινοτυπικά τους χαρακτηριστικά, έγινε μέσω της χρήσης αρνητικού μάρτυρα, που περιείχε εναιώρημα κυττάρων και όλα τα αντιδραστήρια πλην των φθορίζοντων αντισωμάτων.

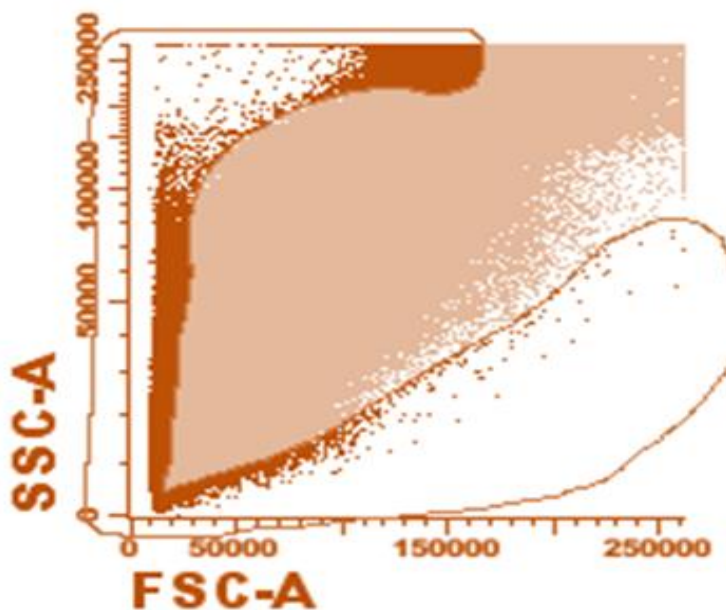
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 Στρατηγική ανάλυσης των δειγμάτων μυελού των οστών και περιφερικού αίματος ασθενών με WM για ανοσοφαινοτυπικό χαρακτηρισμό των κυκλοφορούντων καρκινικών κυττάρων με ΠΚΡ

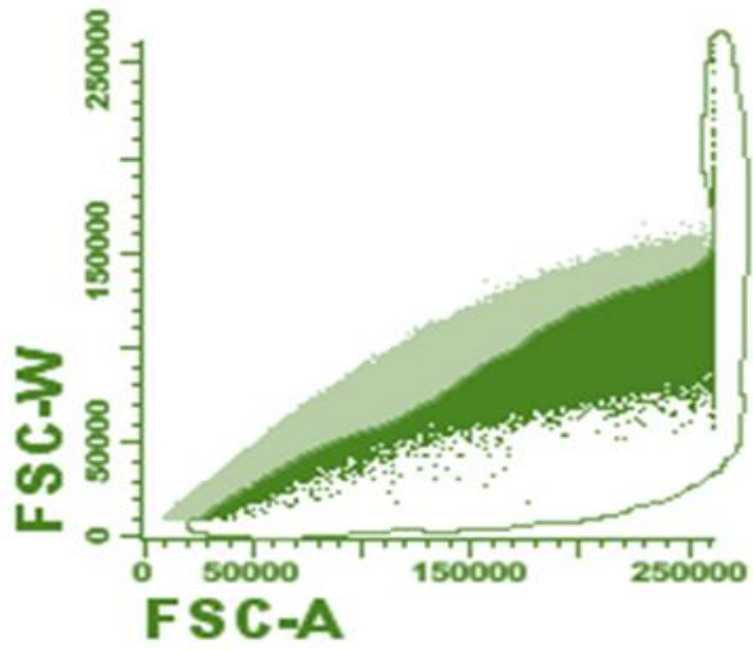
1. Το πρώτο βήμα είναι η χρήση των σκεδαστικών χαρακτηριστικών των καταγεγραμμένων κυττάρων προς απομάκρυνση κυτταρικών υπολειμμάτων (cellular debris) και διπλετών (doublets). Για την απομάκρυνση των κυτταρικών υπολειμμάτων αφαιρούνται τα συμβάντα με χαμηλές τιμές FSC από το στικτόγραμμα FSC-A/SSC-A, κάτι το οποίο είναι απαραίτητο για την ορθή ανάλυση, καθώς τα κυτταρικά υπολείμματα έχουν την πιθανότητα να δεσμεύουν με μη ειδικό τρόπο τα φθορίζοντα αντισώματα. Οι διπλέτες, η παρουσία των οποίων καταρρίπτει την ανάλυση σε επίπεδο μοναδιαίου κυττάρου που προσφέρει η κυτταρομετρία ροής, αφαιρούνται από τα δεδομένα με τη βοήθεια του στικτογράμματος FSC-A/FSC-H. Τα παραπάνω επιτρέπουν επίσης την ακριβή ποσοτικοποίηση, σε επίπεδο εμπύρηνων μοναδιαίων κυττάρων, όλων των πληθυσμών του μυελού των οστών, συμπεριλαμβανομένων και των κλωνικών πλασματοκυττάρων (Εικόνα 9 Α-Β).
2. Σε δεύτερο χρόνο γίνεται απομόνωση των Β λεμφοκυττάρων από τα υπόλοιπα εμπύρηννα κύτταρα του μυελού. Για τον σκοπό αυτό χρησιμοποιείται, το διάγραμμα CD19/SSC-A, στο οποίο γίνεται ανάκτηση των Β λεμφοκυττάρων τα οποία εκφράζουν CD19 (Εικόνα 9 Γ).
3. Στη συνέχεια από τα CD19 Β κύτταρα, απομονώνουμε τα IgM θετικά και CD5 αρνητικά με τη χρήση ενός διαγράμματος, του CD5/IgM, και ταυτόχρονα όσα εκφράζουν CD25 και CD22 με τη χρήση του διαγράμματος CD25/CD22 (Εικόνα 9 Δ-Ε).
4. Τέλος, σε αυτόν τον πληθυσμό ($CD19^+CD5^-IgM^+CD25^+CD22^+$) αξιολογείται ο κλωνικός περιορισμός, μέσω προσδιορισμού της έκφρασης των ενδοκυττάρων κάπα (κ) και λάμδα (λ) ελαφριών ανοσοσφαιρινικών αλυσίδων. Ως κλωνικός περιορισμός στα Β κύτταρα ορίζεται η παρουσία λόγου $\kappa:\lambda$ που υπερβαίνει την τιμή 3:1 ή υπολείπεται της τιμής 1:3.

Για καλύτερη κατανόηση της εφαρμογής της παραπάνω στρατηγικής στην ανάλυση δειγμάτων μυελού των οστών και περιφερικού αίματος ασθενών με WM προς ανίχνευση κλωνικών B κυττάρων και κυκλοφορούντων καρκινικών κυττάρων, θα αναλυθούν ενδεικτικά: 1) 1 δείγμα μυελού των οστών στο οποίο τα B κύτταρα αξιολογήθηκαν ως κλωνικά με κ κλωνικό περιορισμό και 1 δείγμα περιφερικού αίματος του ίδιου ασθενή στο οποίο τα CTCs είναι πολυκλωνικά, 2) 1 δείγμα μυελού των οστών στο οποίο τα B κύτταρα αξιολογήθηκαν ως πολυκλωνικά και 1 δείγμα περιφερικού αίματος του ίδιου ασθενή στο οποίο τα κυκλοφορούντα καρκινικά κύτταρα αξιολογήθηκαν επίσης ως πολυκλωνικά και 3) 1 δείγμα περιφερικού αίματος στο οποίο τα κυκλοφορούντα καρκινικά κύτταρα αξιολογήθηκαν ως κλωνικά με κ κλωνικό περιορισμό.

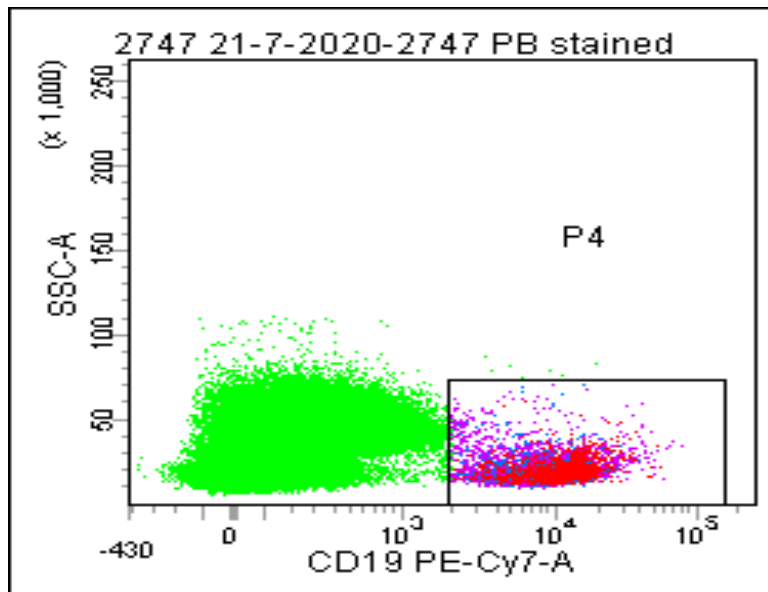
A



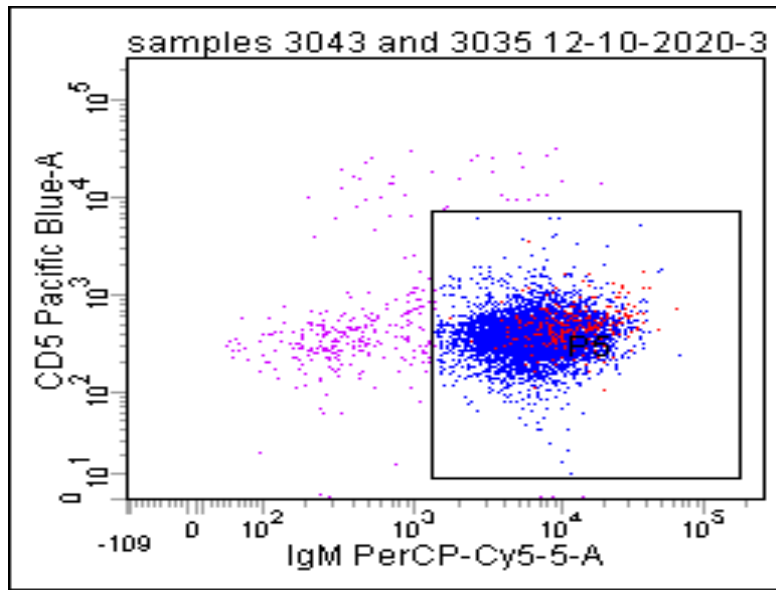
B



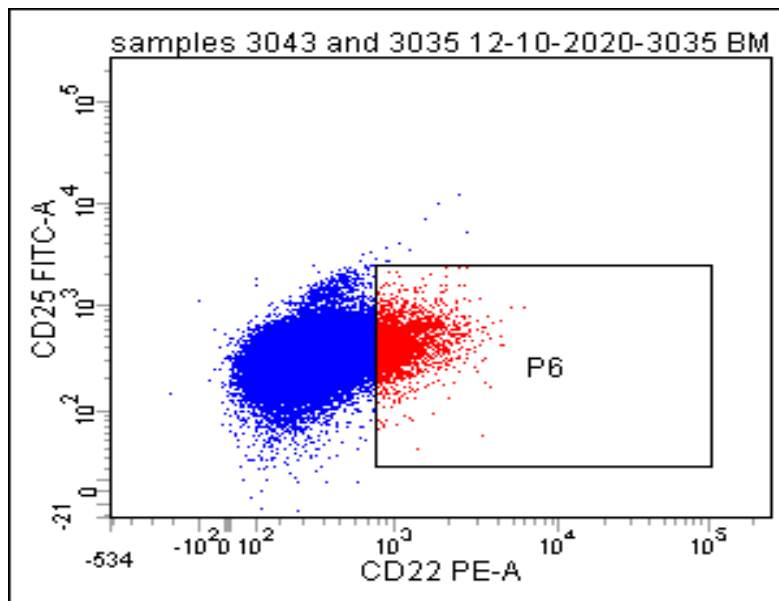
Γ



Δ



Ε



Εικόνα 6: Στρατηγική ανάλυσης δείγματος μυελού των οστών και περιφερικού αίματος σε ασθενή με WM προς ανίχνευση κλωνικών κυττάρων με ΠΚΡ.

Τα κυτταρικά υπολείμματα και οι διπλέτες αφαιρούνται από το σύνολο των κυττάρων του δείγματος, χρησιμοποιώντας τις σκεδαστικές παραμέτρους FSC και SSC. (Γ) Επιλογή των Β λεμφοκυττάρων με τη χρήση του στικτογράμματος CD19/SSC-A. (Δ-Ε) Επιλογή των κλωνικών Β κυττάρων με τη χρήση των στικτογραμμάτων CD5/IgM και CD25/CD22.

3.1.1 Ανάλυση δείγματος μυελού των οστών σε ασθενή με WM στο οποίο τα B κύτταρα είναι κλωνικά με κ κλωνικό περιορισμό και δείγματος περιφερικού αίματος του ίδιου ασθενή στο οποίο τα CTCs είναι πολυκλωνικά

3.1.1.1 Δείγμα μυελού των οστών

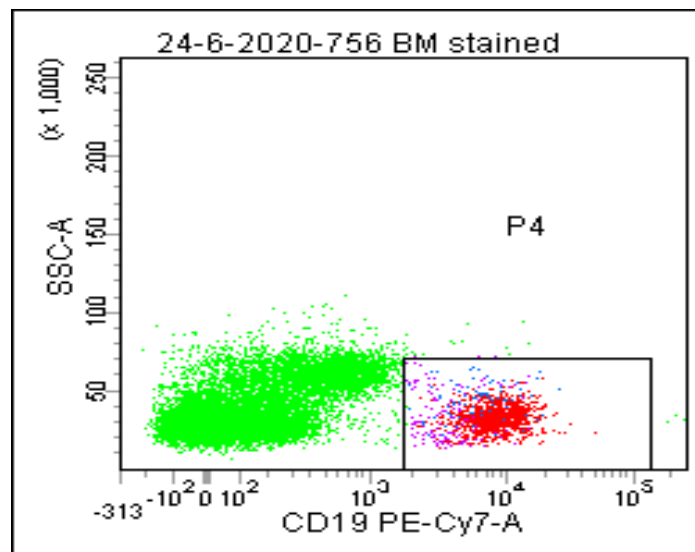
Τα CD19 B λεμφοκύτταρα που ανιχνεύθηκαν στο δείγμα αυτό συνιστούσαν το 8% επί του συνόλου των εμπύρηνων κυττάρων του μυελού των οστών. Στον υποπληθυσμό αυτό ανήκει και ο παθολογικός πληθυσμός. Στην ανάλυση αυτή εστιάζουμε στον παθολογικό πληθυσμό και για αυτό θα δοθεί ο φαινότυπος των κλωνικών κυττάρων.

Από τα CD19 B λεμφοκύτταρα το 75% εμφανίζει απουσία έκφρασης του CD5, υψηλή έκφραση της IgM, ενδιάμεση έκφραση του CD25 και ασθενή έκφραση του CD22. Τέλος τα κλωνικά κύτταρα εμφανίζουν κ κλωνικό περιορισμό (Εικόνα 10 Α-ΣΤ).

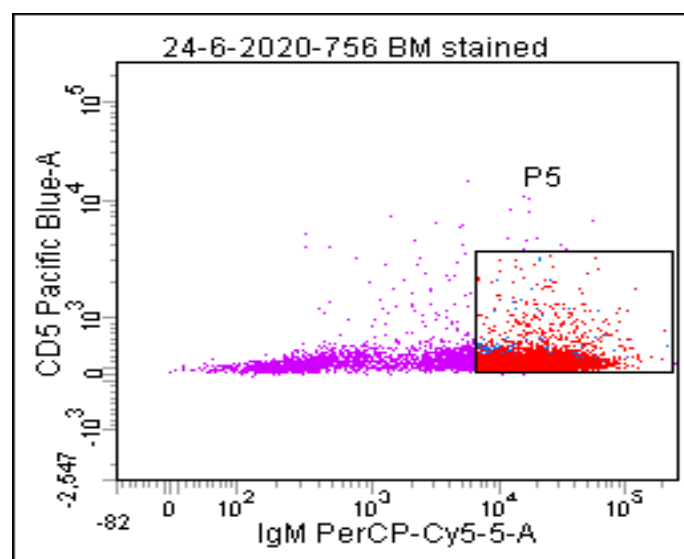
Επομένως, καταλήγουμε στο συμπέρασμα ότι ο παθολογικός πληθυσμός παρουσιάζει τον εξής ανοσοφαινότυπο:

CD19⁺CD5⁻IgM^{+/high}CD25^{dim}CD22⁺kappa

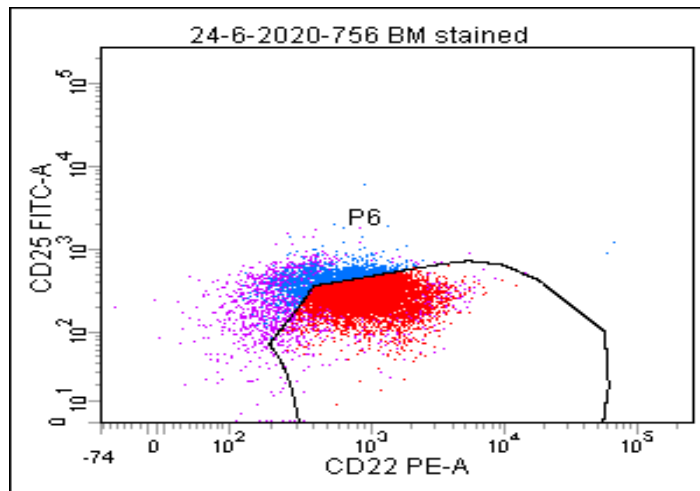
A



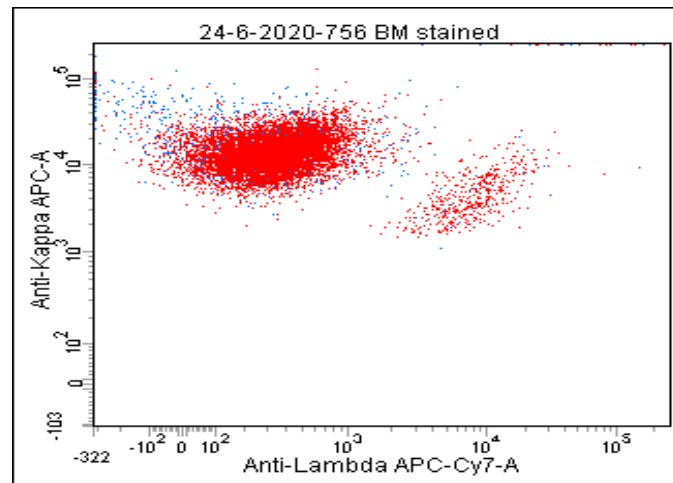
B



Γ



Δ



Εικόνα 7: Ανάλυση αντιπροσωπευτικού δείγματος μυελού των οστών, στο οποίο απομονώθηκαν κλωνικά κ Β κύτταρα.

Μετά την διάκριση των Β λεμφοκυττάρων με τη χρήση του στικτογράμματος CD19/SSC-A (Α) και εκτίμηση της έκφρασης των δεικτών CD5, IgM, CD25

και CD22 και του κλωνικού περιορισμού (B-Δ) ανιχνεύθηκαν κλωνικά B κύτταρα.

3.1.1.2 Δείγμα περιφερικού αίματος

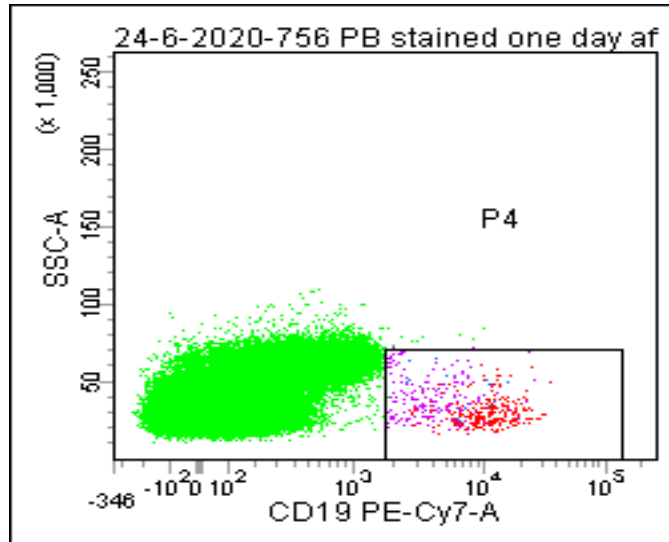
Τα CD19 B λεμφοκύτταρα που ανιχνεύθηκαν στο δείγμα αυτό συνιστούσαν το 0.2% επί του συνόλου των εμπύρηνων κυττάρων του περιφερικού αίματος.

Από τα CD19 B λεμφοκύτταρα το 50% εμφανίζει απουσία έκφρασης του CD5 (CD5⁻), υψηλή έκφραση της IgM (IgM^{+high}), ενδιάμεση έκφραση του CD25 (CD25^{dim}) και ασθενή έκφραση του CD22 (CD22⁺).

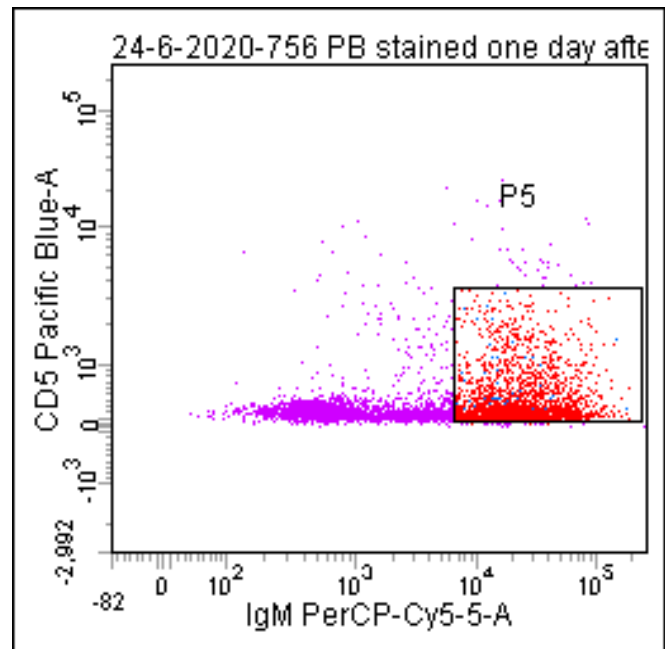
Σε αντίθεση με τον μυελό, στο περιφερικό αίμα παρατηρούμε ότι στα κυκλοφορούντα καρκινικά κύτταρα που ανιχνεύθηκαν:

- είναι λιγότερα από τα κλωνικά κύτταρα που απομονώθηκαν από τον μυελό στο σύνολο των εμπύρηνων κυττάρων και
- είναι πολυκλωνικά, δηλαδή δεν εμφανίζουν κλωνικό περιορισμό.

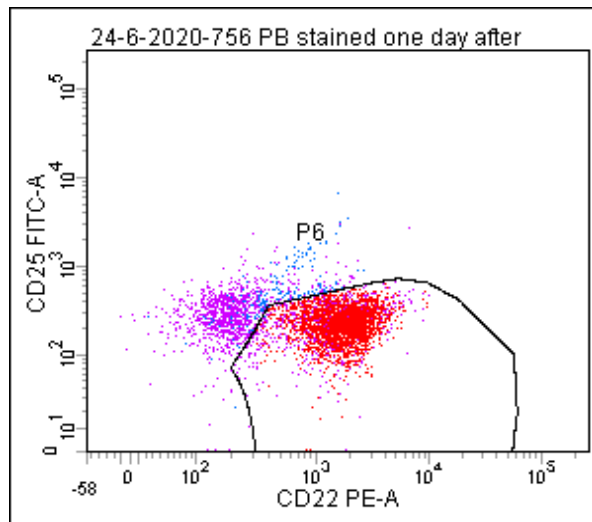
A



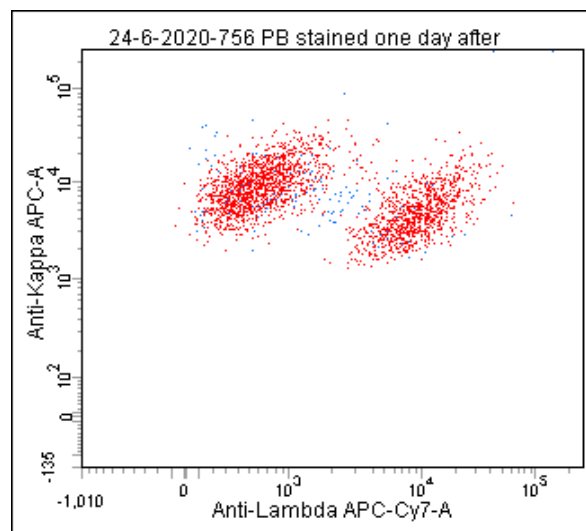
B



Γ



Δ



Εικόνα 8: Ανάλυση δείγματος περιφερικού αίματος του ίδιου ασθενή, στο οποίο δεν βρέθηκε κλωνικός πληθυσμός κυκλοφορούντων καρκινικών κυττάρων.

Μετά την διάκριση των B λεμφοκυττάρων με τη χρήση του στικτογράμματος CD19/SSC-A (A) και εκτίμηση της έκφρασης των δεικτών CD5, IgM, CD25 και CD22 και του κλωνικού περιορισμού (B-Δ) δεν ανιχνεύθηκαν κλωνικά CTCs.

3.1.2 Ανάλυση δείγματος μυελού των οστών σε ασθενή με WM στο οποίο τα B κύτταρα είναι πολυκλωνικά και δείγματος περιφερικού αίματος του ίδιου ασθενή στο οποίο τα CTCs είναι πολυκλωνικά

3.1.2.1 Δείγμα μυελού των οστών

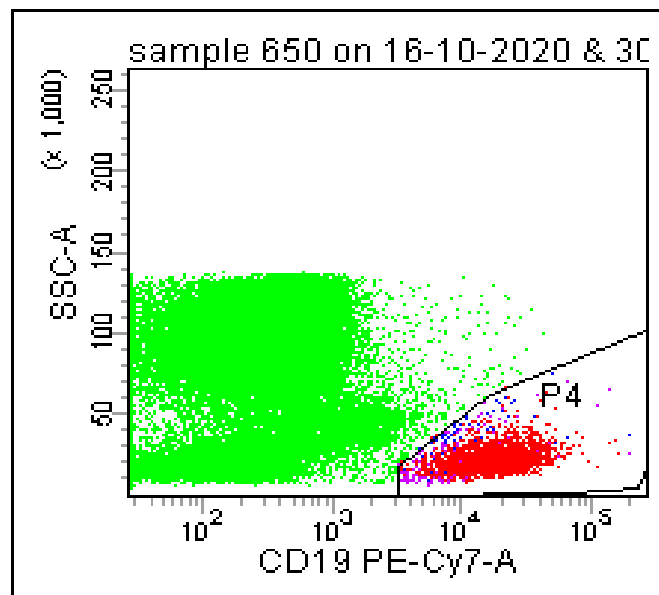
Τα CD19 B λεμφοκύτταρα που ανιχνεύθηκαν στο δείγμα αυτό συνιστούσαν το 3.75% επί του συνόλου των εμπύρηνων κυττάρων του μυελού των οστών.

Από τα CD19 B λεμφοκύτταρα το 90% εμφανίζει απουσία έκφρασης του CD5 (CD5⁻), υψηλή έκφραση της IgM (IgM^{+high}) και ενδιάμεση έκφραση του CD25 (CD25^{dim/+}).

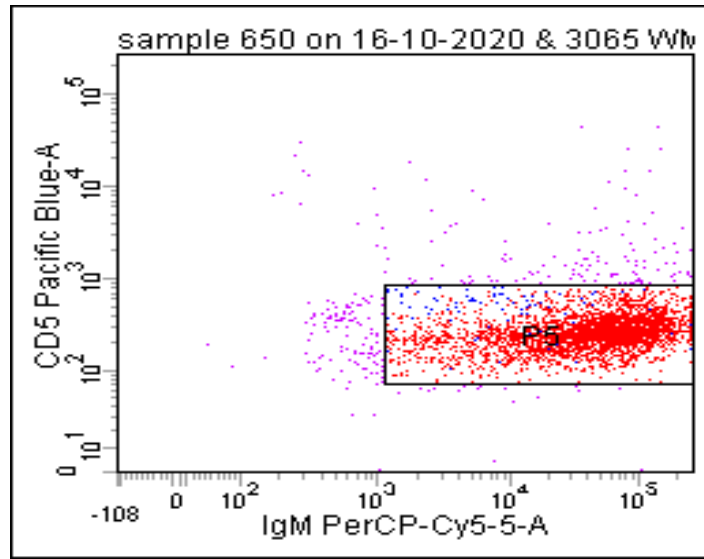
Ενδιαφέρον στη συγκεκριμένη ανάλυση αποτελεί η υψηλή έκφραση του CD22 από τον υπό μελέτη πληθυσμό.

Τέλος, παρατηρούμε απουσία κλωνικού περιορισμού στον υπό μελέτη πληθυσμό (Εικόνα 12 Α-Δ).

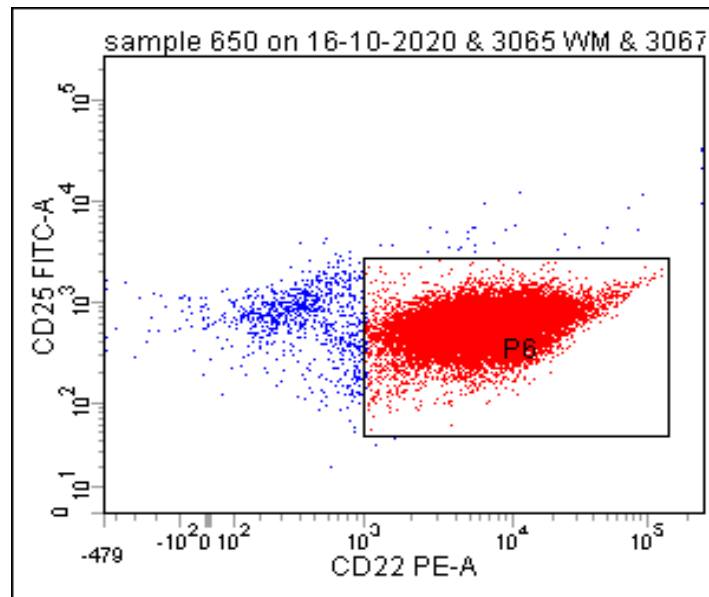
Α



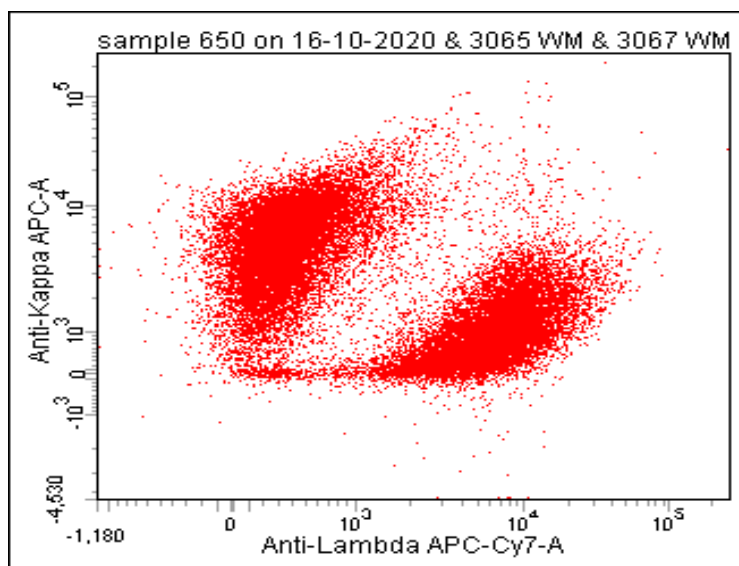
B



Γ



Δ



Εικόνα 9: Ανάλυση δείγματος μυελού των οστών, στο οποίο δεν βρέθηκε κλωνικός πληθυσμός.

Μετά την διάκριση των B λεμφοκυττάρων με τη χρήση του στικτογράμματος CD19/SSC-A (A) και εκτίμηση της έκφρασης των δεικτών CD5, IgM, CD25 και CD22 και του κλωνικού περιορισμού (B-Δ) δεν ανιχνεύθηκαν κλωνικά B κύτταρα.

3.1.2.2 Δείγμα περιφερικού αίματος

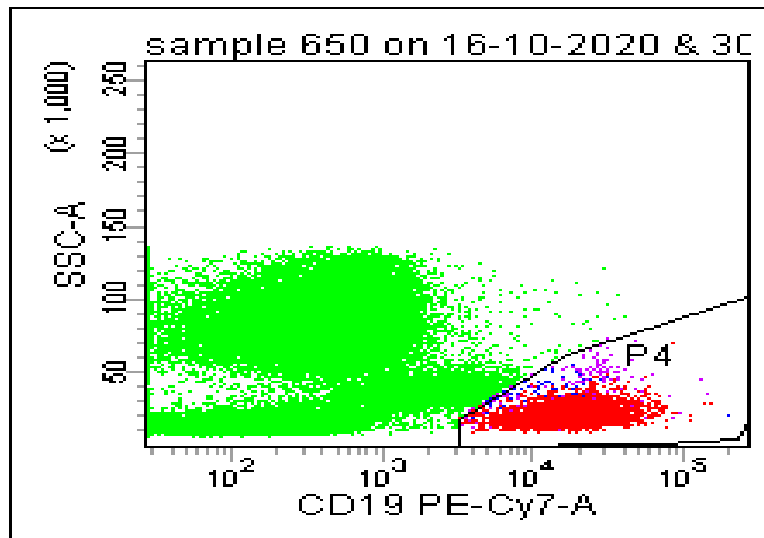
Τα CD19 B λεμφοκύτταρα που ανιχνεύθηκαν στο δείγμα αυτό συνιστούσαν το 5% επί του συνόλου των εμπύρηνων κυττάρων του περιφερικού αίματος.

Από τα CD19 B λεμφοκύτταρα το 90% εμφανίζει απουσία έκφρασης του CD5 ($CD5^-$), υψηλή έκφραση της IgM ($IgM^{+/high}$), και ενδιάμεση έκφραση του CD25 ($CD25^{dim}$).

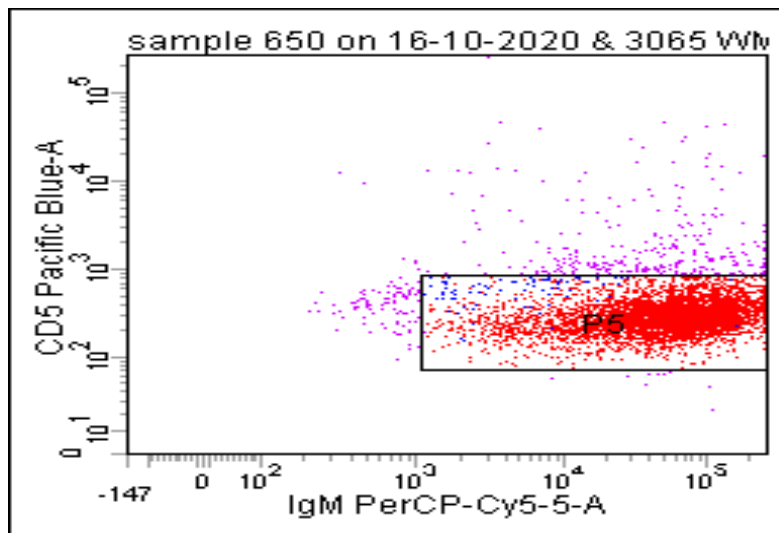
Όπως και στον μυελό του ασθενούς, ο υπό μελέτη πληθυσμός εμφανίζει υψηλή έκφραση του CD22.

Τέλος, ο υπό μελέτη πληθυσμός δεν εμφανίζει κλωνικό περιορισμό (Εικόνα 13 A-Δ).

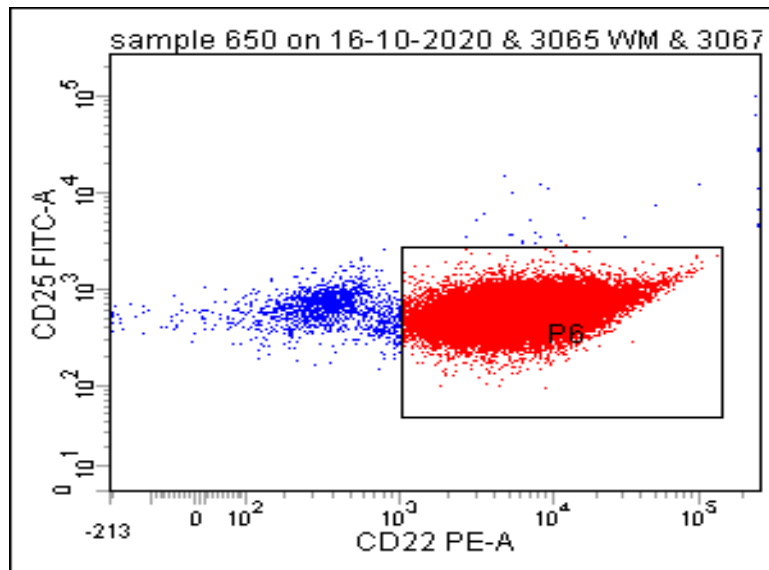
A



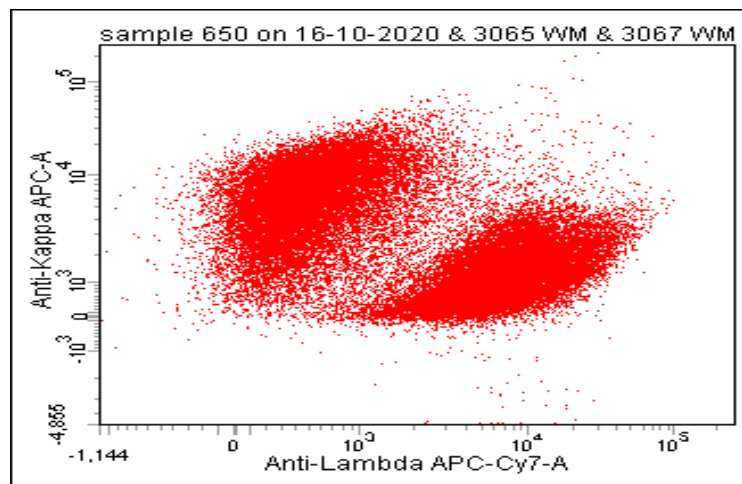
B



Γ



Δ



Εικόνα 10: Ανάλυση δείγματος περιφερικού αίματος του ίδιου ασθενή, στ οποίο δεν βρέθηκε κλωνικός πληθυσμός κυκλοφορούντων καρκινικών κυττάρων.

Μετά την διάκριση των Β λεμφοκυττάρων με την χρήση του σικτογράμματος CD19/SSC-A (Α) και εκτίμηση της έκφρασης των δεικτών CD5, IgM, CD25 και CD22 και του κλωνικού περιορισμού (Β-Δ) δεν ανιχνεύθηκαν κλωνικά CTCs.

3.1.3 Ανάλυση δείγματος περιφερικού αίματος σε ασθενή με WM στο οποίο τα CTCs είναι κλωνικά με κάπα κλωνικό περιορισμό

Τα CD19 B λεμφοκύτταρα που ανιχνεύθηκαν στο δείγμα αυτό συνιστούσαν το 0.4% επί του συνόλου των εμπύρηνων κυττάρων του περιφερικού αίματος. Στον υποπληθυσμό αυτό ανήκει και ο παθολογικός πληθυσμός. Στην ανάλυση αυτή εστιάζουμε στον παθολογικό πληθυσμό και για αυτό θα δοθεί ο φαινότυπος των κλωνικών κυττάρων.

Από τα CD19 B λεμφοκύτταρα το 25% εμφανίζει υψηλή έκφραση της IgM, ενδιάμεση έκφραση του CD25 και έκφραση του CD22.

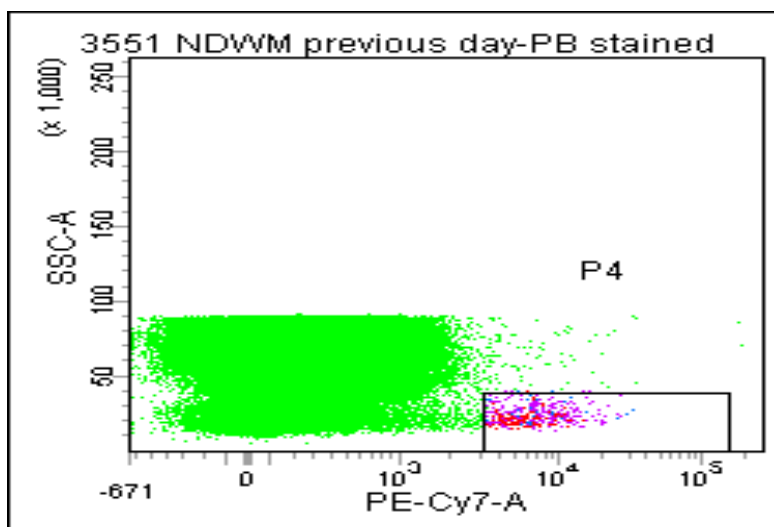
Ενδιαφέρον στη συγκεκριμένη ανάλυση αποτελεί το ότι τα κλωνικά CTCs εκφράζουν το μόριο CD5.

Τέλος τα κλωνικά κύτταρα εμφανίζουν κ κλωνικό περιορισμό (Εικόνα 14 Α-Δ).

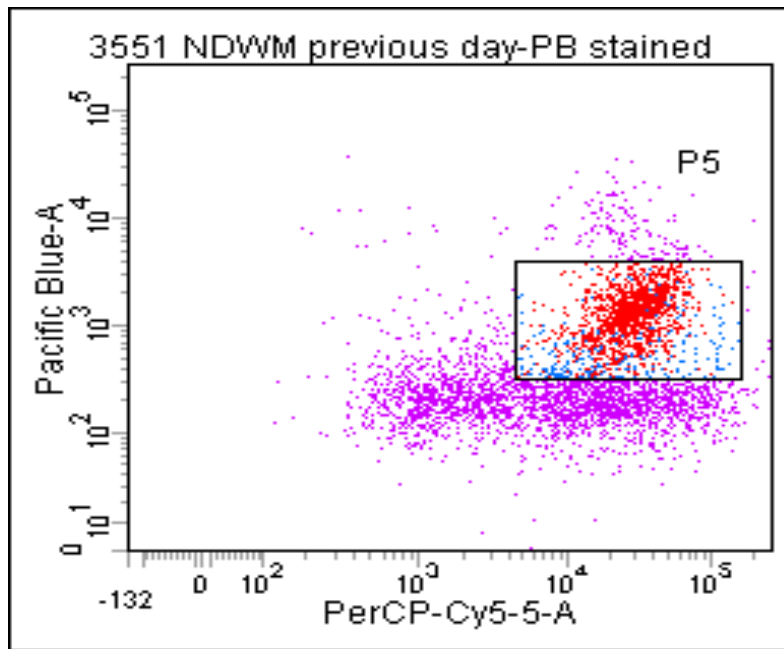
Επομένως, καταλήγουμε στο συμπέρασμα ότι τα κλωνικά CTCs παρουσιάζουν τον εξής ανοσοφαινότυπο:

CD19⁺CD5⁺IgM^{+/high}CD25^{dim}CD22⁺kappa

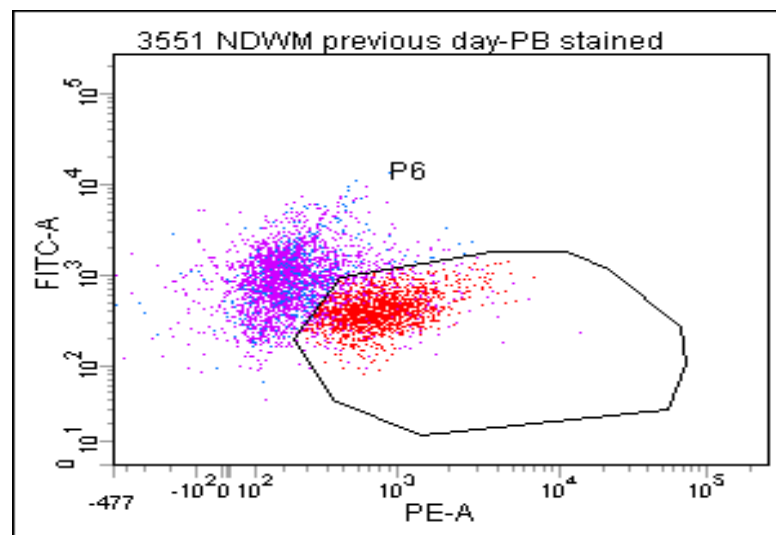
A



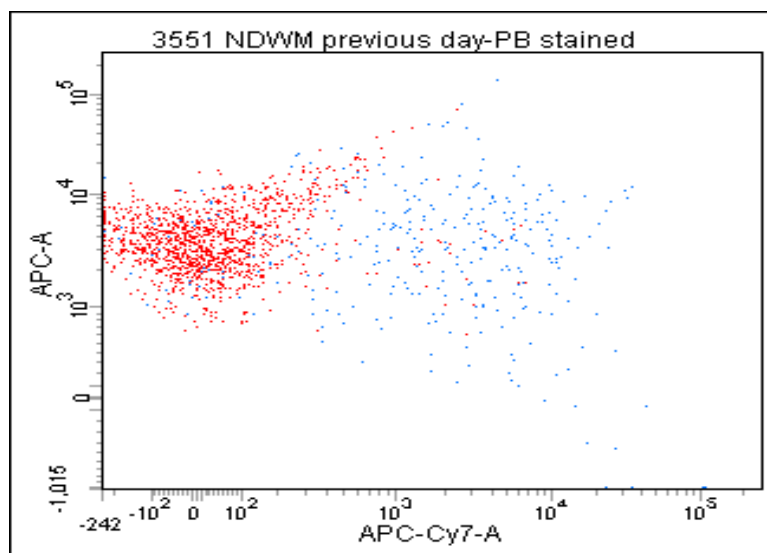
B



Γ



Δ



Εικόνα 11: Ανάλυση δείγματος περιφερικού αίματος του ίδιου ασθενή, στο οποίο βρέθηκε κλωνικός πληθυσμός κυκλοφορούντων καρκινικών κυττάρων.

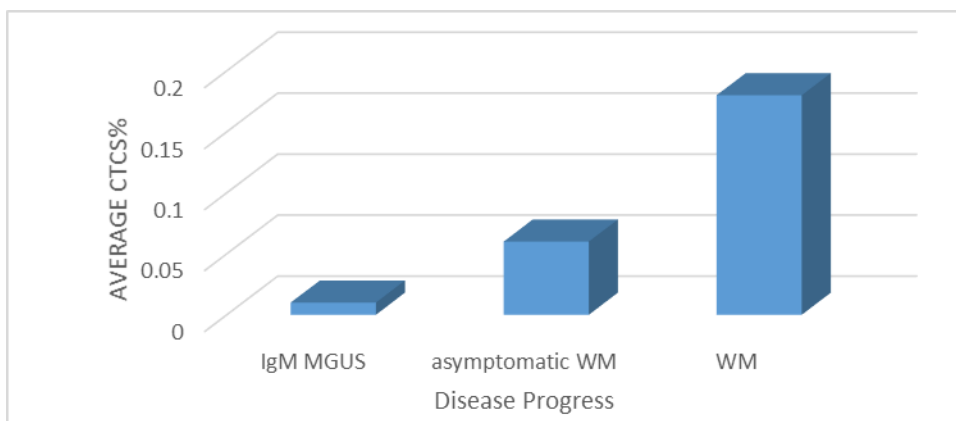
Μετά την διάκριση των Β λεμφοκυττάρων με την χρήση του στικτογράμματος CD19/SSC-A (A) και εκτίμηση της έκφρασης των δεικτών CD5, IgM, CD25 και CD22 και του κλωνικού περιορισμού (B-Δ) ανιχνεύθηκαν κλωνικά CTCs με κ κλωνικό περιορισμό.

Τα ανοσοφαινοτυπικά χαρακτηριστικά των κυκλοφορούντων καρκινικών κυττάρων που εμφάνισαν κλωνικό περιορισμό σε ασθενείς με WM συνοψίζονται στον Πίνακα 8.

Πίνακας 8: Ανοσοφαινότυπος των κλωνικών CTCs σε ασθενείς με WM

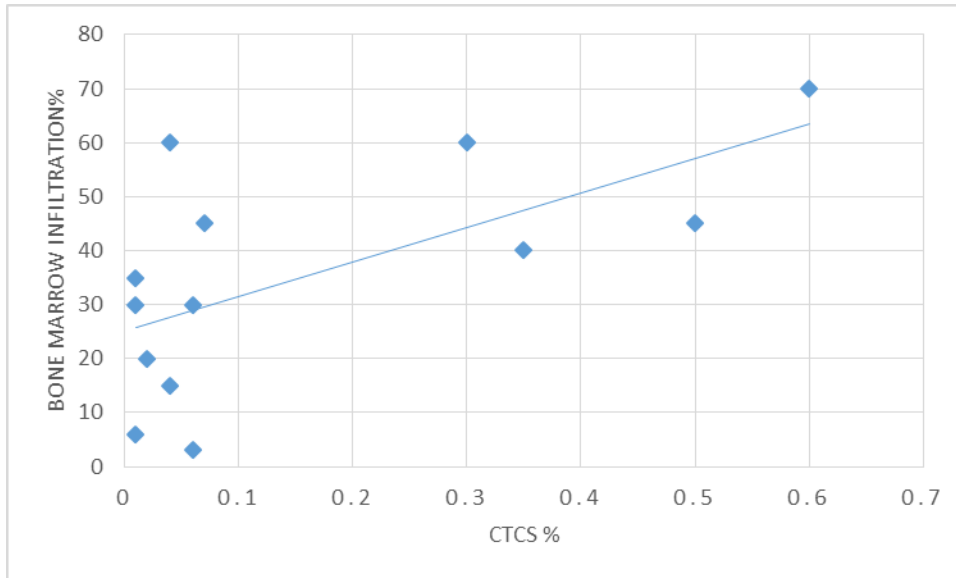
Δείγμα	CD19	CD5	IgM	CD25	CD22	cyIgκ	cyIgλ	% CTCs
3551	+	+	+/high	+	dim	+	-	0 .07
784	+	-	+/high	dim	-	+	-	0 .01
3146	+	-	+/high	dim	dim	+	-	0 .01
746	+	+	+/high	+	-	+	-	0 .06
3069	+	-	+/high	+/high	dim	-	+	0 .5
3048	+	-	+/high	dim/-	+	+	-	0 .04
3043	+	-	+/high	dim	+/high	+	-	0 .3
2187	+	-	+/high	dim	+	+	-	0 .6
750	+	+	+/high	dim	dim	+	-	0 .06
2732	+	-	+/high	dim/-	dim	-	+	0 .04
655	+	-	+/high	dim	dim	+	-	0 .35
900	+	-	+/high	-	dim	+	-	0 .02
3153	+	-	+/high	+	+	+	-	0 .01

Στην συγκεκριμένη εργασία αξιολογήθηκαν παράλληλα δείγματα από ασθενείς με IgM MGUS, ασθενείς με ασυμπτωματικό WM και ασθενείς με συμπτωματικό WM. Ο αριθμός των CTCs που ανιχνεύθηκαν στο περιφερικό αίμα των ασθενών αυτών, συσχετίστηκε με την πρόοδο της νόσου και τα αποτελέσματα απεικονίζονται στην Εικόνα 12.



Εικόνα 12: Αριθμός των CTCs στο περιφερικό αίμα ασθενών με IgM MGUS, ασυμπτωματικό WM και συμπτωματικό WM ως προγνωστικός δείκτης στην εξέλιξη της νόσου.

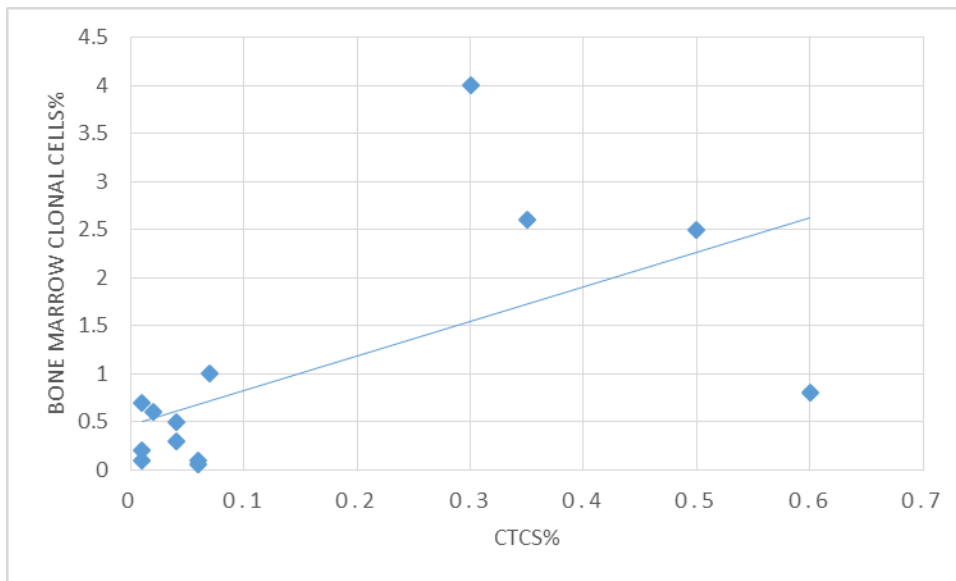
Παράλληλα, συσχετίστηκε ο αριθμός των κυκλοφορούντων καρκινικών κυττάρων που ανιχνεύθηκαν στο αίμα των ασθενών με WM με το ποσοστό διήθησης του μυελού των οστών των ασθενών αυτών από λεμφοπλασματοκυτταρικό λέμφωμα (Εικόνα 13). Η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε για την στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων είναι το t-test για δύο ανεξάρτητες μεταβλητές.



r^2	0 .610830634
N:	13
T statistic:	2 .439644494
DF:	11
p value	0 .029826857

Εικόνα 13: Αριθμός των CTCs στο περιφερικό αίμα ασθενών με WM ως προγνωστικός δείκτης του καρκινικού φορτίου.

Επιπρόσθετα, ο αριθμός των CTCs που ανιχνεύθηκαν στο αίμα ασθενών με WM συσχετίστηκε με τα κλωνικά κύτταρα στον μυελό των οστών (Εικόνα 14). Η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε για την στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων είναι το t-test για δύο ανεξάρτητες μεταβλητές.

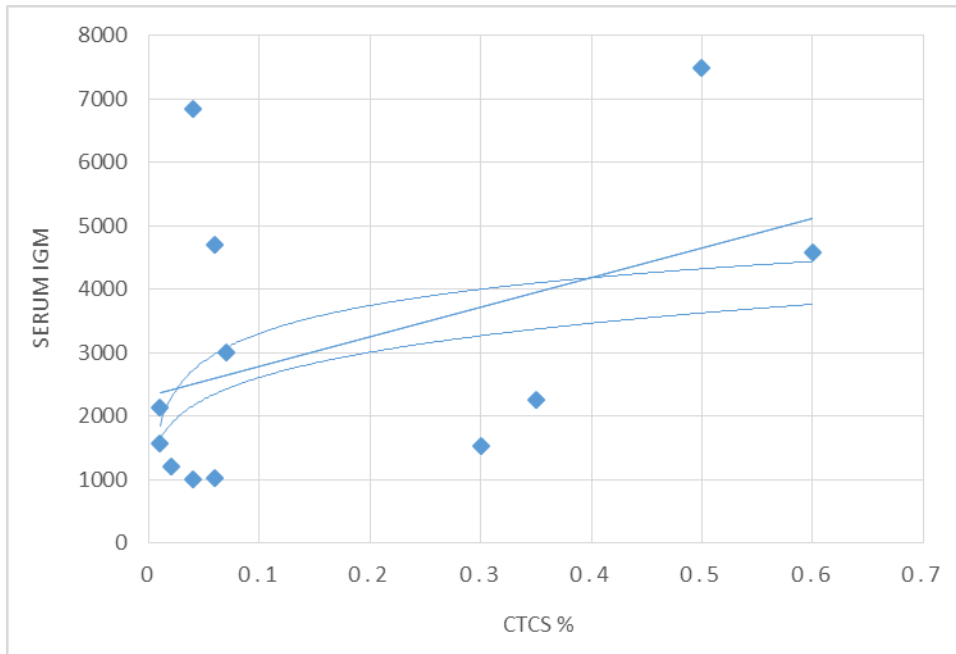


r^2	0 .603911
N:	13
T statistic:	2 .395999
DF:	11
p value:	0 .037572

Εικόνα 14: Συσχέτιση του αριθμού των CTCs στο περιφερικό αίμα ασθενών με WM με τα κλωνικά κύτταρα στον μυελό των οστών των ίδιων ασθενών.

Τέλος, ο αριθμός των CTCs συσχετίστηκε με τη συγκέντρωση της παραπρωτεΐνης IgM στον ορό των ασθενών με WM (Εικόνα 15). Η μέθοδος

που χρησιμοποιήθηκε για την στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων είναι το t-test για δύο ανεξάρτητες μεταβλητές.



r^2	0.430128961
N:	13
T statistic:	1.506686132
DF:	11
p value:	0.162810759

Εικόνα 15: Αριθμός των CTCs στο περιφερικό αίμα ασθενών με WM ως δείκτης εξέλιξης και σοβαρότητας της νόσου.

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η μακροσφαιριναιμία του Waldenström (WM) είναι μια λιγότερο συχνή νόσος με σημαντικές ιδιαιτερότητες και προκλήσεις. Πρόκειται για ένα λεμφοπλασματοκυτταρικό λέμφωμα που χαρακτηρίζεται από την διήθηση του μυελού των οστών από κλωνικό λεμφοπλασματοκυτταρικό πληθυσμό που παράγει μονοκλωνική ανοσοσφαιρίνη IgM. Χαρακτηρίζεται από την συνύπαρξη πολλαπλών κλώνων, καθένας από τους οποίους έχει συγκεκριμένο ρεπερτόριο συσσωρευμένων μεταλλάξεων. Η γενετική σύνθεση κάθε κλώνου μπορεί να καθορίσει την πρόοδο της νόσου καθώς και την ανταπόκριση στο επιλεγμένο θεραπευτικό σχήμα.

Η πρόοδος στην ανάλυση της υγρής βιοψίας δίνει τη δυνατότητα για μη επεμβατική παρακολούθηση της κλωνικής ετερογένειας. Ο χαρακτηρισμός των κυκλοφορούντων καρκινικών κυττάρων CTCs αντιπροσωπεύει μία μη επεμβατική μέθοδο για την ανίχνευση μεταλλάξεων σε κλώνους πλασματοκυττάρων, οδηγώντας σε αποφυγή της ιστικής βιοψίας του μυελού των οστών, η οποία είναι επίπονη και δεν μπορεί να επαναληφθεί πολλές φορές κατά τη διάρκεια χορήγησης του θεραπευτικού σχήματος [67].

Στον καρκίνο του προστάτη, έπειτα από αλληλούχηση του γονιδιώματος των CTCs βρέθηκε ότι το 70% των μεταλλάξεων στα CTCs ήταν παρούσες και στον αντίστοιχο ιστό [68]. Επιπλέον, μία πρόσφατη έρευνα στο πολλαπλό μυέλωμα έδειξε ότι το 100% των κλωνικών μεταλλάξεων στον μυελό των οστών των ασθενών με μυέλωμα ανιχνεύθηκαν και στα CTCs και το 99% των κλωνικών μεταλλάξεων στα CTCs ανιχνεύθηκαν και στον μυελό των οστών των ασθενών με μυέλωμα [69]. Επιπλέον, υπάρχουν μελέτες σε ασθενείς με πολλαπλό μυέλωμα που υποδεικνύουν τον ρόλο του ctDNA ως ενός γενικού δείκτη καρκινικού φορτίου με προγνωστική αξία.

Στη συγκεκριμένη εργασία με τη χρήση πολυπαραμετρικής κυτταρομετρίας ροής 8 χρωμάτων, προσδιορίστηκαν τα CTCs στο περιφερικό αίμα ασθενών με IgM MGUS, ασυμπτωματικό WM και συμπτωματικό WM και τα κλωνικά B κύτταρα στον μυελό των ίδιων ασθενών αντίστοιχα, σύμφωνα με γνωστά φαινοτυπικά πάνελ τα οποία μπορούν να διακρίνουν τον πληθυσμό των

κυττάρων που είναι θετικός για τους δείκτες CD19, IgM, CD22, CD25 και αρνητικός για το δείκτη CD5.

Παρατηρήσαμε ότι η εξέλιξη της νόσου από IgM MGUS σε ασυμπτωματικό WM και στη συνέχεια σε συμπτωματικό WM συνοδεύεται από αύξηση του αριθμού των κυκλοφορούντων καρκινικών κυττάρων που εντοπίζονται στο περιφερικό αίμα των ασθενών αυτών, γεγονός που δίνει μία ισχυρή βάση για τη χρήση της ανίχνευσης των CTCs στο περιφερικό αίμα ως προγνωστικό δείκτη της εξέλιξης της νόσου (Εικόνα 12).

Παράλληλα συσχετίστηκε ο αριθμός των CTCs που ανιχνεύθηκαν στο περιφερικό αίμα ασθενών με WM με τη διήθηση του μυελού των οστών από λεμφοπλασματοκυτταρικό λέμφωμα. Η συσχέτιση αυτή είναι θετική με συντελεστή συσχέτισης $r = 0.610830634$, κάτι που υποδεικνύει πως όσο μεγαλύτερη είναι η διήθηση του μυελού των οστών των ασθενών από λεμφοπλασματοκυτταρικό λέμφωμα τόσο περισσότερα κυκλοφορούντα καρκινικά κύτταρα ανιχνεύονται στο περιφερικό αίμα των ίδιων ασθενών και υποστηρίζει τη χρήση των CTCs και ως προγνωστικού μέσου αξιολόγησης του καρκινικού φορτίου. Έπειτα από τη χρήση του t-test για την στατιστική αξιολόγηση αυτής της συσχέτισης των δύο συνεχόμενων μεταβλητών, βρέθηκε ότι το $p \text{ value} = 0.029826857$, που είναι < 0.05 δηλαδή η συσχέτιση των δύο μεταβλητών δεν είναι τυχαία και απορρίπτεται η μηδενική υπόθεση.

Επιπρόσθετα, ο αριθμός των CTCs που ανιχνεύθηκαν στο αίμα ασθενών με WM συσχετίστηκε με τα κλωνικά κύτταρα στον μυελό των οστών. Η συσχέτιση είναι θετική με συντελεστή συσχέτισης $r = 0.603911$ και υποδεικνύει ότι όσο περισσότερα είναι τα κλωνικά κύτταρα που διηθούν τον μυελό, τόσο περισσότερα καρκινικά κύτταρα ανιχνεύονται και στο αίμα του ασθενούς, ενισχύοντας την αξιοπιστία της υγρής βιοψίας ως εργαλείο για τον καθορισμό της θεραπευτικής στρατηγικής και της παρακολούθησης της εξέλιξης της νόσου. Έπειτα από τη χρήση του t-test για τη στατιστική αξιολόγηση αυτής της συσχέτισης των δύο συνεχόμενων μεταβλητών, βρέθηκε ότι το $p \text{ value} = 0.037572$, που και πάλι είναι < 0.05 δηλαδή η συσχέτιση των δύο μεταβλητών δεν είναι τυχαία και απορρίπτεται η μηδενική υπόθεση.

Τέλος, ο αριθμός των CTCs συσχετίστηκε με τα επίπεδα της παραπρωτεΐνης IgM στον ορό των ασθενών με WM. Η συσχέτιση είναι ασθενώς θετική με συντελεστή συσχέτισης $r = 0.430128961$. Αυτό σημαίνει ότι η αυξημένη

συγκέντρωση της παραπρωτεΐνης IgM στον ορό των ασθενών με WM δεν υποδηλώνει και αυξημένη ανίχνευση CTCs στο περιφερικό αίμα αυτών των ασθενών και κατ' επέκταση δεν μπορεί η παραπρωτεΐνη IgM στον ορό να χρησιμοποιηθεί ως προβλεπτικός δείκτης της εξέλιξης της νόσου, ενισχύοντας έτσι την αξία των CTCs ως προγνωστικού δείκτη της εξέλιξης της νόσου και κατ' επέκταση την αξία της ΠΚΡ στον ανοσοφαινοτυπικό χαρακτηρισμό των CTCs. Έπειτα από την χρήση του t-test για την στατιστική αξιολόγηση αυτής της συσχέτισης των δύο συνεχόμενων μεταβλητών, βρέθηκε ότι το p value = 0.162810759, που είναι >0.05 , δηλαδή η συσχέτιση των δύο μεταβλητών είναι μάλλον τυχαία και δεν απορρίπτεται η μηδενική υπόθεση.

Ο στόχος αυτής της διερεύνησης είναι ο προσδιορισμός μοριακών αλλαγών μέσω της υγρής βιοψίας που θα έχουν σκοπό, είτε να ανιχνεύσουν έγκαιρα την παρουσία υπολειμματικής νόσου, είτε να βοηθήσουν στην πρόβλεψη του θεραπευτικού αποτελέσματος. Για αυτό το λόγο, μελλοντικό στόχο αποτελεί η απομόνωση των CTCs από περιφερικό αίμα ασθενών με WM και η αλληλούχηση του γονιδιώματός τους, με σκοπό την ανίχνευση των κλωνικών μεταλλάξεων που υπάρχουν σε αυτά και η σύγκρισή τους με τις αντίστοιχες μεταλλάξεις στα κλωνικά κύτταρα στον μυελό των οστών. Στόχος είναι η ταυτοποίηση των πιθανών διαφορών στον αριθμό αλλά και στο είδος των μεταλλάξεων μεταξύ των κλωνικών κυττάρων του μυελού των οστών και των CTCs του περιφερικού να μπορεί να μας δώσει πληροφορίες για τους μηχανισμούς επαγωγής ή/και κλωνικής εξέλιξης της νόσου, αλλά και να μας παρέχει νέους στόχους για την ανάπτυξη κλινικά πιο επιτυχημένων θεραπευτικών σχημάτων για το WM.

Επομένως, μετά τον ανοσοφαινοτυπικό χαρακτηρισμό των CTCs ακολουθεί η απομόνωση τους από το περιφερικό αίμα ασθενών με Waldenström. Από αυτά θα απομονωθεί DNA σύμφωνα με αυστηρά προτυποποιημένα βήματα. Στην συνέχεια, θα προσδιοριστούν οι μοριακές αλλαγές μέσω της υγρής βιοψίας. Τέλος, θα ακολουθήσει η ανάπτυξη και αναλυτική επικύρωση των καινοτόμων διαγνωστικών τεστ ανάλυσης βιοδεικτών υγρής βιοψίας βασισμένων σε μεθοδολογία πολλαπλής Droplet Digital PCR (ddPCR), που αποτελεί μία δυναμικά ανερχόμενη και εξελισσόμενη τεχνολογία στον τομέα της υγρής βιοψίας, καθώς χαρακτηρίζεται από ακριβέστερη ποσοτικοποίηση και μεγαλύτερη ευαισθησία από την real time PCR.

5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Dimopoulos, M.A. and E. Kastritis, *How I treat Waldenström macroglobulinemia*. Blood, 2019. **134**(23): p. 2022-2035.
2. Argyropoulos, K.V., et al., *Clonal B cells in Waldenström's macroglobulinemia exhibit functional features of chronic active B-cell receptor signaling*. Leukemia, 2016. **30**(5): p. 1116-25.
3. Askari, E., S. Rodriguez, and R. Garcia-Sanz, *Waldenström's Macroglobulinemia: An Exploration into the Pathology and Diagnosis of a Complex B-Cell Malignancy*. 2021. **12**: p. 795-807.
4. Monge, J., E. Braggio, and S.M. Ansell, *Genetic factors and pathogenesis of Waldenström's macroglobulinemia*. Curr Oncol Rep, 2013. **15**(5): p. 450-6.
5. Paiva, B., et al., *The cellular origin and malignant transformation of Waldenström macroglobulinemia*. Blood, 2015. **125**(15): p. 2370-80.
6. Mailankody, S. and O. Landgren, *Monoclonal gammopathy of undetermined significance and Waldenström's macroglobulinemia*. Best Pract Res Clin Haematol, 2016. **29**(2): p. 187-193.
7. Kyle, R.A., et al., *Long-Term Follow-up of Monoclonal Gammopathy of Undetermined Significance*. N Engl J Med, 2018. **378**(3): p. 241-249.
8. Owen, R.G., et al., *Clinicopathological definition of Waldenström's macroglobulinemia: consensus panel recommendations from the Second International Workshop on Waldenström's Macroglobulinemia*. Semin Oncol, 2003. **30**(2): p. 110-5.
9. Growková, K., et al., *Waldenström's macroglobulinemia: Two malignant clones in a monoclonal disease? Molecular background and clinical reflection*. Eur J Haematol, 2017. **99**(6): p. 469-478.
10. Sabattini, E., et al., *WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues in 2008: an overview*. Pathologica, 2010. **102**(3): p. 83-7.
11. Swerdlow, S.H., et al., *The many faces of small B cell lymphomas with plasmacytic differentiation and the contribution of MYD88 testing*. Virchows Arch, 2016. **468**(3): p. 259-75.
12. Ciccarelli, B.T., et al., *Hepcidin is produced by lymphoplasmacytic cells and is associated with anemia in Waldenström's macroglobulinemia*. Clin Lymphoma Myeloma Leuk, 2011. **11**(1): p. 160-3.
13. Samba-Mondonga, M., et al., *MyD88 Regulates the Expression of SMAD4 and the Iron Regulatory Hormone Hepcidin*. Front Cell Dev Biol, 2018. **6**: p. 105.
14. Castillo, J.J. and S.P. Treon, *How we manage Bing-Neel syndrome*. 2019. **187**(3): p. 277-285.
15. Gertz, M.A., *Acute hyperviscosity: syndromes and management*. Blood, 2018. **132**(13): p. 1379-1385.
16. Gustine, J.N., et al., *Serum IgM level as predictor of symptomatic hyperviscosity in patients with Waldenström macroglobulinaemia*. 2017. **177**(5): p. 717-725.
17. Castillo, J.J., et al., *Recommendations for the diagnosis and initial evaluation of patients with Waldenström Macroglobulinaemia: A Task Force from the 8th International Workshop on Waldenström Macroglobulinaemia*. Br J Haematol, 2016. **175**(1): p. 77-86.

18. Muchtar, E., H. Magen, and M.A. Gertz, *How I treat cryoglobulinemia*. 2017. **129**(3): p. 289-298.
19. Saadoun, D., et al., *Increased risks of lymphoma and death among patients with non-hepatitis C virus-related mixed cryoglobulinemia*. Arch Intern Med, 2006. **166**(19): p. 2101-8.
20. D'Sa, S., et al., *Investigation and management of IgM and Waldenström-associated peripheral neuropathies: recommendations from the IWWM-8 consensus panel*. Br J Haematol, 2017. **176**(5): p. 728-742.
21. Chaudhry, H.M., M.L. Mauermann, and S.V. Rajkumar, *Monoclonal Gammopathy-Associated Peripheral Neuropathy: Diagnosis and Management*. Mayo Clin Proc, 2017. **92**(5): p. 838-850.
22. Sidana, S., et al., *IgM AL amyloidosis: delineating disease biology and outcomes with clinical, genomic and bone marrow morphological features*. 2020. **34**(5): p. 1373-1382.
23. Sachchithanatham, S., et al., *European Collaborative Study Defining Clinical Profile Outcomes and Novel Prognostic Criteria in Monoclonal Immunoglobulin M-Related Light Chain Amyloidosis*. J Clin Oncol, 2016. **34**(17): p. 2037-45.
24. Kastritis, E., et al., *Waldenström's macroglobulinaemia: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up*. Ann Oncol, 2018. **29**(Suppl 4): p. iv270.
25. Swerdlow, S.H., et al., *The 2016 revision of the World Health Organization classification of lymphoid neoplasms*. 2016. **127**(20): p. 2375-90.
26. Lin, P., et al., *Lymphoplasmacytic lymphoma and other non-marginal zone lymphomas with plasmacytic differentiation*. Am J Clin Pathol, 2011. **136**(2): p. 195-210.
27. Ngo, V.N., et al., *Oncogenically active MYD88 mutations in human lymphoma*. Nature, 2011. **470**(7332): p. 115-9.
28. Braggio, E. and R. Fonseca, *Genomic abnormalities of Waldenström macroglobulinemia and related low-grade B-cell lymphomas*. Clin Lymphoma Myeloma Leuk, 2013. **13**(2): p. 198-201.
29. García-Sanz, R., et al., *6q deletion in Waldenström macroglobulinaemia negatively affects time to transformation and survival*. 2021. **192**(5): p. 843-852.
30. Ocio, E.M., et al., *6q deletion in Waldenström macroglobulinemia is associated with features of adverse prognosis*. Br J Haematol, 2007. **136**(1): p. 80-6.
31. Schop, R.F. and R. Fonseca, *Genetics and cytogenetics of Waldenström's macroglobulinemia*. Semin Oncol, 2003. **30**(2): p. 142-5.
32. Hunter, Z.R., et al., *The genomic landscape of Waldenström macroglobulinemia is characterized by highly recurring MYD88 and WHIM-like CXCR4 mutations, and small somatic deletions associated with B-cell lymphomagenesis*. Blood, 2014. **123**(11): p. 1637-46.
33. Treon, S.P., et al., *MYD88 L265P somatic mutation in Waldenström's macroglobulinemia*. N Engl J Med, 2012. **367**(9): p. 826-33.
34. Lin, S.C., Y.C. Lo, and H. Wu, *Helical assembly in the MyD88-IRAK4-IRAK2 complex in TLR/IL-1R signalling*. Nature, 2010. **465**(7300): p. 885-90.
35. Yang, G., et al., *A mutation in MYD88 (L265P) supports the survival of lymphoplasmacytic cells by activation of Bruton tyrosine kinase in Waldenström macroglobulinemia*. Blood, 2013. **122**(7): p. 1222-32.

36. Treon, S.P., L. Xu, and Z. Hunter, *MYD88 Mutations and Response to Ibrutinib in Waldenström's Macroglobulinemia*. *N Engl J Med*, 2015. **373**(6): p. 584-6.
37. Phelan, J.D., et al., *A multiprotein supercomplex controlling oncogenic signalling in lymphoma*. *Nature*, 2018. **560**(7718): p. 387-391.
38. Munshi, M., et al., *SYK is activated by mutated MYD88 and drives pro-survival signaling in MYD88 driven B-cell lymphomas*. 2020. **10**(1): p. 12.
39. Manček-Keber, M., et al., *Extracellular vesicle-mediated transfer of constitutively active MyD88(L265P) engages MyD88(wt) and activates signaling*. 2018. **131**(15): p. 1720-1729.
40. Hunter, Z.R., et al., *Insights into the genomic landscape of MYD88 wild-type Waldenström macroglobulinemia*. 2018. **2**(21): p. 2937-2946.
41. Treon, S.P., et al., *Ibrutinib in previously treated Waldenström's macroglobulinemia*. *N Engl J Med*, 2015. **372**(15): p. 1430-40.
42. Yang, G., et al., *HCK is a survival determinant transactivated by mutated MYD88, and a direct target of ibrutinib*. *Blood*, 2016. **127**(25): p. 3237-52.
43. Treon, S.P., et al., *Genomic Landscape of Waldenström Macroglobulinemia and Its Impact on Treatment Strategies*. *J Clin Oncol*, 2020. **38**(11): p. 1198-1208.
44. Schmidt, J., et al., *MYD88 L265P and CXCR4 mutations in lymphoplasmacytic lymphoma identify cases with high disease activity*. *Br J Haematol*, 2015. **169**(6): p. 795-803.
45. Hernandez, P.A., et al., *Mutations in the chemokine receptor gene CXCR4 are associated with WHIM syndrome, a combined immunodeficiency disease*. *Nat Genet*, 2003. **34**(1): p. 70-4.
46. Teicher, B.A. and S.P. Fricker, *CXCL12 (SDF-1)/CXCR4 pathway in cancer*. *Clin Cancer Res*, 2010. **16**(11): p. 2927-31.
47. Kaiser, L.M. and Z.R. Hunter, *CXCR4 in Waldenström's Macroglobulinemia: chances and challenges*. 2021. **35**(2): p. 333-345.
48. Treon, S.P., et al., *Somatic mutations in MYD88 and CXCR4 are determinants of clinical presentation and overall survival in Waldenström macroglobulinemia*. *Blood*, 2014. **123**(18): p. 2791-6.
49. Gascue, A., J. Merino, and B. Paiva, *Flow Cytometry*. *Hematol Oncol Clin North Am*, 2018. **32**(5): p. 765-775.
50. González, D., et al., *Immunoglobulin gene rearrangements and the pathogenesis of multiple myeloma*. *Blood*, 2007. **110**(9): p. 3112-21.
51. García-Sanz, R., et al., *Origin of Waldenström's macroglobulinaemia*. *Best Pract Res Clin Haematol*, 2016. **29**(2): p. 136-147.
52. Konoplev, S., et al., *Immunophenotypic profile of lymphoplasmacytic lymphoma/Waldenström macroglobulinemia*. *Am J Clin Pathol*, 2005. **124**(3): p. 414-20.
53. Morice, W.G., et al., *Novel immunophenotypic features of marrow lymphoplasmacytic lymphoma and correlation with Waldenström's macroglobulinemia*. *Mod Pathol*, 2009. **22**(6): p. 807-16.
54. San Miguel, J.F., et al., *Immunophenotypic analysis of Waldenström's macroglobulinemia*. *Semin Oncol*, 2003. **30**(2): p. 187-95.
55. Puig, N., et al., *Flow cytometry for fast screening and automated risk assessment in systemic light-chain amyloidosis*. *Leukemia*, 2019. **33**(5): p. 1256-1267.

56. Flores-Montero, J., et al., *Immunophenotype of normal vs. myeloma plasma cells: Toward antibody panel specifications for MRD detection in multiple myeloma*. *Cytometry B Clin Cytom*, 2016. **90**(1): p. 61-72.
57. Esposito, A., et al., *Monitoring tumor-derived cell-free DNA in patients with solid tumors: clinical perspectives and research opportunities*. *Cancer Treat Rev*, 2014. **40**(5): p. 648-55.
58. Hocking, J., et al., *Liquid biopsies for liquid tumors: emerging potential of circulating free nucleic acid evaluation for the management of hematologic malignancies*. *Cancer Biol Med*, 2016. **13**(2): p. 215-25.
59. Rogers, A., et al., *Relative increase in leukemia-specific DNA in peripheral blood plasma from patients with acute myeloid leukemia and myelodysplasia*. *Blood*, 2004. **103**(7): p. 2799-801.
60. Pantel, K. and C. Alix-Panabières, *Liquid biopsy and minimal residual disease - latest advances and implications for cure*. *Nat Rev Clin Oncol*, 2019. **16**(7): p. 409-424.
61. Lianidou, E. and K. Pantel, *Liquid biopsies*. *Genes Chromosomes Cancer*, 2019. **58**(4): p. 219-232.
62. Kis, O., et al., *Circulating tumour DNA sequence analysis as an alternative to multiple myeloma bone marrow aspirates*. 2017. **8**: p. 15086.
63. Manier, S., et al., *Whole-exome sequencing of cell-free DNA and circulating tumor cells in multiple myeloma*. 2018. **9**(1): p. 1691.
64. Guo, G., et al., *Genomic discovery and clonal tracking in multiple myeloma by cell-free DNA sequencing*. 2018. **32**(8): p. 1838-1841.
65. Bagratuni, T. and I. Ntanasis-Stathopoulos, *Detection of MYD88 and CXCR4 mutations in cell-free DNA of patients with IgM monoclonal gammopathies*. 2018. **32**(12): p. 2617-2625.
66. Cabel, L., et al., *Circulating tumor cells: clinical validity and utility*. *Int J Clin Oncol*, 2017. **22**(3): p. 421-430.
67. Lawrence, M.S., et al., *Discovery and saturation analysis of cancer genes across 21 tumour types*. *Nature*, 2014. **505**(7484): p. 495-501.
68. Lohr, J.G., et al., *Whole-exome sequencing of circulating tumor cells provides a window into metastatic prostate cancer*. 2014. **32**(5): p. 479-84.
69. Mishima, Y., et al., *The Mutational Landscape of Circulating Tumor Cells in Multiple Myeloma*. *Cell Rep*, 2017. **19**(1): p. 218-224.