



**ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΚΡΗΤΗΣ
ΑΙΜΑΤΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΟΥ ΝΟΣΟΚΟΜΕΙΟΥ ΗΡΑΚΛΕΙΟΥ**

**ΕΠΙΚΤΗΤΕΣ ΔΙΑΤΑΡΑΧΕΣ
ΤΩΝ ΜΟΡΙΩΝ ΠΡΟΣΚΟΛΛΗΣΗΣ ΚΑΙ ΤΟΥ CD43
ΣΕ ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ ΜΥΕΛΟΔΥΣΠΛΑΣΤΙΚΑ
ΣΥΝΔΡΟΜΑ
ΚΑΙ Η ΣΧΕΣΗ ΤΩΝ ΔΙΑΤΑΡΑΧΩΝ ΑΥΤΩΝ
ΜΕ ΤΗΝ ΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑ ΤΩΝ ΑΣΘΕΝΩΝ ΣΕ
ΛΟΙΜΩΞΕΙΣ**

**ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ
ΗΛΙΑ Σ. ΚΥΡΙΑΚΟΥ
ΑΙΜΑΤΟΛΟΓΟΥ**

**ΗΡΑΚΛΕΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
ΦΛΕΒΑΡΗΣ 2007**

"ΕΠΙΚΤΗΤΕΣ ΔΙΑΤΑΡΑΧΕΣ
ΤΩΝ ΜΟΡΙΩΝ ΠΡΟΣΚΟΛΛΗΣΗΣ ΚΑΙ ΤΟΥ CD43
ΣΕ ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ ΜΥΕΛΟΔΥΣΠΛΑΣΤΙΚΑ ΣΥΝΔΡΟΜΑ
ΚΑΙ Η ΣΧΕΣΗ ΤΩΝ ΔΙΑΤΑΡΑΧΩΝ ΑΥΤΩΝ
ΜΕ ΤΗΝ ΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑ ΤΩΝ ΑΣΘΕΝΩΝ ΣΕ ΛΟΙΜΩΞΕΙΣ "

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

	Σελίδες
Πίνακας περιεχομένων.....	3
Μέρος Α': Εισαγωγή	
1. Μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα	
i. Γενικά.....	5
ii. Ιστορία.....	5
iii. Ταξινόμηση.....	6
iv. Αιτιολογία.....	8
v. Παθογένεια.....	9
♦ Απόπτωση σε MDS ασθενείς.....	10
♦ Έκφραση της bcl-2 σε MDS ασθενείς.....	12
vi. Μοριακή βάση MDS.....	13
vii. Κλινική εικόνα	
♦ Συνήθεις κλινικές εκδηλώσεις.....	16
♦ Σπάνιες κλινικές εκδηλώσεις.....	16
viii. Εργαστηριακά ευρήματα	
♦ Στο αίμα.....	17
♦ Στη βιοχημεία του πλάσματος.....	18
♦ Στο μυελό.....	18
ix. Κυτταροκαλλιέργειες.....	19
x. Κυτταρογενετική.....	20
xi. Ανοσολογικές διαταραχές σε ασθενείς με MDS.....	23
xii. Low risk MDS	
♦ RARS.....	31
♦ RA.....	33
xiii. High risk MDS	
♦ RAEB.....	33
♦ RAEB-t.....	34
♦ CMML.....	34
xiv. Προγνωστικοί παράγοντες στα MDS.....	39
xv. Συστήματα score στα MDS.....	40
2. Βασικές αρχές της ανοσολογικής απάντησης	
i. Φυσική ανοσία.....	42
♦ Πρωτείνες συνδέσεως.....	42
♦ Συμπλήρωμα.....	42
♦ Πρωτείνες οξείας φάσεως.....	43
♦ Αγγειακή και ενδοθηλιακή απάντηση στη λοίμωξη.....	43
ii. Επίκτητη ανοσία	
♦ Κύτταρα φλεγμονής.....	44
♦ Ανοσολογική απάντηση.....	46
3. Μόρια προσκόλλησης	
i. Εισαγωγή.....	48
ii. Κατηγορίες μορίων προσκόλλησης.....	48
iii. Μόρια προσκόλλησης και φλεγμονή.....	50
iv. Ρύθμιση των κυτταρικών μορίων προσκόλλησης.....	51
4. Σιαλοφορίνη ή λευκοσιαλίνη (CD43)	
i. Γενικά.....	54
ii. CD43 και T-κύτταρα.....	56

iii.	CD43 και λευκοκύτταρα.....	60
iv.	CD43 και NK-κύτταρα.....	64
v.	CD43 και μαστοκύτταρα.....	65
vi.	CD43 και προγονικά αιμοποιητικά κύτταρα.....	66

Μέρος Β': Σκοπός της μελέτης - Ασθενείς - Μέθοδοι - Αποτελέσματα

1.	Σκοπός της μελέτης.....	70
2.	Ασθενείς της μελέτης.....	70
3.	Μέθοδοι της μελέτης	
i.	Απομόνωση λεμφομονοπύρηνων και πολυμορφοπύρηνων περιφερικού αίματος και μυελού.....	72
ii.	Σήμανση των κυττάρων με μονοκλωνικά αντισώματα και κυτταρομετρία ροής.....	72
iii.	Ανοσοϊστοχημική ανάλυση μυελού.....	75
iv.	Μαγνητικός διαχωρισμός CD34+ κυττάρων.....	75
v.	Απομόνωση DNA, RNA.....	78
vi.	Ανάλυση Northern Blot και υβριδισμός με CD43-cDNA-probe.....	81
vii.	Ανάλυση Western Blot.....	85
viii.	Ανάλυση μεταλλάξεων του CD43	
♦	PCR.....	90
♦	RT-PCR.....	92
♦	SSCP (Single strand conformation polymorphism).....	94
♦	DNA sequence analysis.....	95
ix.	Δοκιμασία συγκόλλησης.....	97
x.	Ανοσοενζυμική μέθοδος (ELISA).....	97
xi.	Στατιστική ανάλυση.....	98
4.	Αποτελέσματα	
i.	Φαινοτυπική ανάλυση μονοκυττάρων στους MDS ασθενείς.....	99
ii.	Δοκιμασία συγκόλλησης στα μονοκύτταρα.....	104
iii.	Φαινοτυπική ανάλυση ουδετερόφιλων στους MDS ασθενείς.....	105
iv.	Δοκιμασία συγκόλλησης στα ουδετερόφιλα.....	109
v.	Επίπεδα διαλυτού VCAM-1.....	109
vi.	Μοριακή ανάλυση.....	110
vii.	Ανοσοϊστοχημική ανάλυση μυελού.....	113
viii.	Ευαισθησία των ασθενών με χαμηλή έκφραση του CD43 σε λοιμώξεις.....	113

Μέρος Γ': Συζήτηση - Συμπεράσματα

1.	Συζήτηση.....	114
i.	Ρύθμιση της έκφρασης του CD43 στα κύτταρα ασθενών με MDS.....	115
ii.	CD43 και μονοκύτταρα στα MDS.....	115
iii.	CD43 και ουδετερόφιλα στα MDS.....	117
iv.	CD43 και συχνότητα λοιμώξεων.....	119
2.	Συμπεράσματα.....	120

Μέρος Δ': Βιβλιογραφικές αναφορές - Βιογραφικό σημείωμα συγγραφέα

1.	Βιβλιογραφικές αναφορές.....	121
2.	Βιογραφικό σημείωμα του συγγραφέα.....	136

ΜΕΡΟΣ Α΄: ΕΙΣΑΓΩΓΗ

ΜΥΕΛΟΔΥΣΠΛΑΣΤΙΚΑ ΣΥΝΔΡΟΜΑ

ΓΕΝΙΚΑ

Τα μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα (MDS) αποτελούν μια ετερογενή ομάδα επίκτητων κλωνικών διαταραχών του αιμοποιητικού συστήματος, που χαρακτηρίζονται από ποικίλου βαθμού πανκυτταροπενία, μορφολογικές και λειτουργικές διαταραχές των αιμοποιητικών κυττάρων και μη αποδοτική αιμοποίηση, καθώς και από αυξημένο κίνδυνο μετατροπής σε οξεία μυελοβλαστική λευχαιμία (ΟΜΛ)¹.

Στα MDS συνήθως εμφανίζονται ποιοτικές ανωμαλίες στη μορφή των κυττάρων, τα δομικά όργανα του κυττάρου, τις βιοχημικές οδούς και τη λειτουργικότητά του, μεγάλο είναι δε το φάσμα της κλινικής έκφρασης αυτών των διαταραχών. Έτσι, το MDS μπορεί να εμφανιστεί με τη μορφή αναιμίας με σχεδόν φυσιολογικό μυελό, έως και με τη μορφή σοβαρής πανκυτταροπενίας, υπερκυτταρικό μυελό και διαταραχές στη μορφή, το μέγεθος και τη λειτουργικότητα των αιμοποιητικών κυττάρων.

Η μυελοδυσπλασία είναι επομένως μια κλωνική νεοπλασματική διαταραχή². Όροι που έχουν χρησιμοποιηθεί εναλλακτικά είναι η προλευχαιμία (που καλύπτει ανωμαλίες που αφορούν κλωνικό πολλαπλασιασμό του πολυδύναμου αιμοποιητικού κυττάρου χωρίς βλαστικά κύτταρα στο αίμα ή στο μυελό) και η ολιγοβλαστική λευχαιμία (που καλύπτει ανωμαλίες που σχετίζονται με κλωνικό πολλαπλασιασμό των πολυδύναμων αιμοποιητικών κυττάρων με παρουσία στο αίμα ή/και το μυελό βλαστικών κυττάρων-->3%). Αν και οι ασθενείς με κλινική εικόνα MDS μπορεί να μην αναπτύξουν οξεία μυελοβλαστική λευχαιμία, ο κίνδυνος να γίνει αυτό είναι πολλές χιλιάδες φορές μεγαλύτερος από το γενικό πληθυσμό.

Στερητικές αναιμίες, δυσαιμοποίηση φαρμακευτικής αιτιολογίας, αλκοολισμός, μεταβολικές διαταραχές που συνοδεύουν τη χρόνια νεφρική και ηπατική ανεπάρκεια είναι καταστάσεις που πρέπει να αποκλειστούν για να τεθεί η διάγνωση του MDS³. Η επίπτωση των MDS είναι 3,5-12,6 περιπτώσεις /100.000 πληθυσμού κάθε έτος¹.

ΙΣΤΟΡΙΑ

Στο ξεκίνημα του 20^{ου} αιώνα άρχισαν να εμφανίζονται στην ιατρική βιβλιογραφία² καταστάσεις που συνοδεύονταν από κυτταροπενία και υψηλή θνητότητα που ήταν ανθεκτικές σε κάθε είδος των τότε θεραπειών. Οι Chevallier και συν. το 1942 συζητούν για τον όρο "odo-leukemia" από την Ελληνική λέξη "ουδός" (=odo) για να περιγράψουν διαταραχές που βρίσκονται στο "όριο της λευχαιμίας".

Το 1949 οι Hamilton-Paterson χρησιμοποίησαν τον όρο "προλευχαιμική αναιμία" για να περιγράψουν ασθενείς με ανθεκτική αναιμία προγενέστερη της εμφάνισης ΟΜΛ, και το 1953, οι Block και συν. περιέγραψαν καταστάσεις που ταιριάζουν με τις σύγχρονες απόψεις μας για τη δυσαιμοποιητική φάση που προηγείται της ΟΜΛ. Στα μέσα του 20^{ου} αιώνα, η σχέση των ιδιοπαθών κυτταροπενιών με τη μεταγενέστερη εμφάνιση ΟΜΛ γίνεται ευρέως αποδεκτή. Όροι όπως "αγγελιοφόρος κατάσταση λευχαιμίας", "ανθεκτική αναιμία", "σιδηροαχρηστική αναιμία", "ιδιοπαθής ανθεκτική σιδηροβλαστική αναιμία", "πανκυτταροπενία με υπερκυτταρικό μυελό", και πολλές άλλες έχουν χρησιμοποιηθεί για να περιγράψουν τις ποικίλες εκδηλώσεις της δυσαιμοποίησης που προαναγγέλλουν την εμφάνιση της ΟΜΛ.

ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ

Η ευρέως αποδεκτή σύγχρονη ταξινόμηση⁴ των Μυελοδυσπλαστικών συνδρόμων είναι αυτή κατά FAB (French-American-British cooperative group), που βασίστηκε στον αριθμό των βλαστών στο μυελό, στις δυσπλασίες μιας ή περισσότερων κυτταρικών σειρών, στην παρουσία δακτυλιοειδών σιδηροβλαστών, βλαστών στο περιφερικό αίμα, ραβδίων Auer στα πρόδρομα κοκκιοκύτταρα και στην απόλυτη μονοκυττάρωση. Η ταξινόμηση αυτή κατατάσσει τα MDS στις κάτωθι πέντε (5) υποκατηγορίες:

- (1) Ανθεκτική αναιμία (RA)
- (2) Ανθεκτική αναιμία με δακτυλιοειδείς σιδηροβλάστες (RARS)
- (3) Ανθεκτική αναιμία με περίσσεια βλαστών (RAEB)
- (4) Ανθεκτική αναιμία με περίσσεια βλαστών σε μετατροπή (RAEB-t)
- (5) Χρόνια μυελομονοκυτταρική λευχαιμία (CMML)

Αυτές οι κατηγορίες περιλαμβάνουν εκατοστιαία αναλογία βλαστών στο μυελό που κυμαίνεται από <2% (στην ανθεκτική αναιμία) μέχρι ~30% (στην ανθεκτική αναιμία με περίσσεια βλαστών σε μετατροπή). Στον πίνακα 1 αναφέρονται τα κριτήρια κατά FAB και στον πίνακα 2 η μέση επιβίωση των ασθενών ανάλογα με την κατά FAB ταξινόμηση του MDS.

ΠΙΝΑΚΑΣ 1 ΚΡΙΤΗΡΙΑ FAB ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗΣ³

	RA	RARS	RAEB	RAEB-t	CMML
ΑΙΜΑ					
Κυτταροπενία(-ες)	+	+	+	+	+
Μονοκύτταρα					≥1x10 ⁹ /L
Βλάστες (%)	<1	<1	<5	≥5	<5
ΜΥΕΛΟΣ					
Βλάστες* (%)	<5	<5	5-20	21-30	0-20
Σωμάτια Auer	-	-	-	+	-
Δυσαιμοποίηση	+	+	+	+	+
Δακτυλιοειδείς σιδηροβλάστες	≤15	>15			

*Οι βλάστες στα κριτήρια FAB είναι 2 τύπων: Ο τύπος I αποτελείται από άωρα κύτταρα χωρίς κοκκία και με ένα ή δύο πυρήνια. Ο τύπος II αποτελείται από ελαφρώς μεγαλύτερους βλάστες με τουλάχιστο ένα αζουρόφιλο κοκκίο. Μερικοί συγγραφείς προτείνουν έναν τρίτο τύπο βλαστών, αυτούς με περισσότερα από 20 αζουρόφιλα κοκκία στο κυτταρόπλασμα, χωρίς να είναι ορατό το σωμάτιο Golgi³.

ΠΙΝΑΚΑΣ 2 ΜΕΣΗ ΕΠΙΒΙΩΣΗ ΤΩΝ MDS ΑΣΘΕΝΩΝ ΑΝΑΛΟΓΑ ΜΕ ΤΗΝ ΚΑΤΑ FAB ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ ΤΟΥΣ⁵

ΚΑΤΗΓΟΡΙΑ	ΜΕΣΗ ΕΠΙΒΙΩΣΗ
RA, RARS	35 ΜΗΝΕΣ
CMML	12 ΜΗΝΕΣ
RAEB	18 ΜΗΝΕΣ
RAEB-t	6 ΜΗΝΕΣ

Τελευταία έχουν αναγνωρισθεί ορισμένες υποομάδες των MDS που διαχωρίζονται από τις γνωστές υποομάδες FAB³:

A) Τα υποκυτταρικά MDS, όπου οι ασθενείς έχουν κατά τη διάγνωση υποπλαστική εικόνα του μυελού

B) Τα MDS με παρουσία μυελοίνωσης στο μυελό

Γ) Η ανθεκτική αναιμία με δυσπλασία πολλών σειρών, όπου παρατηρείται δικυτταροπενία ή πανκυτταροπενία και δυσπλαστικές αλλοιώσεις σε περισσότερες της μιας σειρές, χωρίς βλάστες στο περιφερικό αίμα, ούτε αυξημένους βλάστες στο μυελό, με απουσία ραβδίων Auer και παρόμοιες με τη RAEB κυτταρογενετικές ανωμαλίες

Δ) Τα δευτεροπαθή MDS (μετά από ΧΜΘ), που αποτελούν περίπου το 15% του συνόλου των περιπτώσεων

E) Τα MDS στα παιδιά, όπου επικρατούν κυρίως η RAEB και η RAEB-t με πιο συχνή χρωμοσωμική ανωμαλία αυτή του χρωμοσώματος 7 και υψηλό δείκτη λευχαιμικής μετατροπής. Στα παιδιά αναγνωρίζεται μια ξεχωριστή επίσης νοσολογική οντότητα, η νεανική χρόνια μυελομονοκυτταρική λευχαιμία (JCML) ή νεανική μυελομονοκυτταρική λευχαιμία (JMML) που χαρακτηρίζεται από ηπατοσπληνομεγαλία, γενικευμένη λεμφαδενική διόγκωση, εξάνθημα προσώπου, θρομβοπενία, λευκοκυττάρωση με μονοκυττάρωση, εμπύρηνια ερυθρά στο περιφερικό αίμα, αυξημένη HbF, υπεργαμμασφαιριναιμία και κυτταρογενετική αναδιάταξη bcr/abl ή t(9;22)(q34;q11).

Η WHO ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ ΤΩΝ ΜΥΕΛΟΔΥΣΠΛΑΣΤΙΚΩΝ ΣΥΝΔΡΟΜΩΝ

Από το 2001 η WHO πρότεινε μια νέα ταξινόμηση^{117, 120} για τα μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα. Σύμφωνα με αυτή τα μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα χωρίζονται στις πιο κάτω κατηγορίες:

- 1) **Ανθεκτική αναιμία (RA)**
- 2) **Ανθεκτική αναιμία με δακτυλιοειδείς σιδηροβλάστες (RARS) (>15% δακτυλιοειδείς σιδηροβλάστες στο μυελό)**
- 3) **Ανθεκτική κυτταροπενία με πολυγραμμική δυσπλασία (RCMD) (δυσπλασία 2 ή περισσότερων σειρών σε ποσοστό >10%)**
- 4) **Ανθεκτική κυτταροπενία με πολυγραμμική δυσπλασία και δακτυλιοειδείς σιδηροβλάστες (RCMD-RS) (δυσπλασία 2 ή περισσότερων σειρών σε ποσοστό >10% και δακτυλιοειδείς σιδηροβλάστες σε ποσοστό >15%)**
- 5) **Ανθεκτική αναιμία με περίσσεια βλαστών-1 (RAEB-1, βλάστες στο μυελό 5-9%)**
- 6) **Ανθεκτική αναιμία με περίσσεια βλαστών-2 (RAEB-2, βλάστες στο μυελό 10-19%)**
- 7) **Αταξινόμητο μυελοδυσπλαστικό σύνδρομο**
- 8) **Σύνδρομο 5q**
- 9) **MDS σχετιζόμενο με προηγούμενη χημειοθεραπεία**
- 10) **Μυελοδυσπλαστικό/Μυελοϋπερπλαστικό σύνδρομο**

Είναι προφανές ότι ο αριθμός των βλαστών στο μυελό που θέτει τη διάγνωση της οξείας λευχαιμίας έπεσε στο 20%, καταργώντας την υποκατηγορία RAEB-t, αναγνωρίστηκαν νέες υποκατηγορίες για τη RA και τη RARS, ενώ η CMML ανήκει στην κατηγορία των MDS/MPD.

Οι ασθενείς που συμπεριελήφθησαν στην παρούσα μελέτη όμως ήταν ήδη ταξινομημένοι σύμφωνα με τα FAB κριτήρια, επομένως με βάση αυτά μελετήθηκαν και με βάση αυτά εξήχθησαν τα συμπεράσματα που θα αναφερθούν στη συνέχεια.

ΑΙΤΙΟΛΟΓΙΑ

Ποικίλοι παράγοντες έχουν ενοχοποιηθεί για την πιθανή αιτία¹ της αρχικής κλωνικής διαταραχής που οδηγεί στη μυελοδυσπλασία, και παρατίθενται πιο κάτω:

- (1) **Κληρονομικοί λόγοι** (Οικογενής Μυελοδυσπλασία)
- (2) **Απλαστική αναιμία(AA), Παροξυσμική Νυκτερινή Αιμοσφαιρινουρία(ΠΝΑ) και MDS:** Η AA και η ΠΝΑ μοιράζονται ένα σύνολο αιτιολογικών παραγόντων, οι οποίοι με την προσθήκη περαιτέρω γενετικών- ανοσολογικών μεταβολών οδηγούν στην εξέλιξη της AA σε ΠΝΑ και μετά σε MDS/OMΛ. Σε μια μελέτη, το 30% των ασθενών με AA εξελίχθηκαν σε ΠΝΑ και απ'αυτούς το 5% σε MDS.
- (3) **Ιονίζουσα ακτινοβολία-Χημειοθεραπευτικοί Παράγοντες:** Έχουν μελετηθεί περιπτώσεις δευτεροπαθούς MDS^{113,119} που εμφανίζεται 5-19 έτη μετά από θεραπεία για νόσο Hodgkin, NHL και πιο σπάνια για οξεία μυελογενή και οξεία λεμφοβλαστική λευχαιμία των παιδιών. Υπεύθυνοι παράγοντες είναι οι αλκυλιωτικοί, οι ανθρακυκλίνες, οι επιποδοφυλλοτοξίνες και άλλες, που προκαλούν διάφορες κυτταρογενετικές ανωμαλίες [μονοσωμίες 5/7, t(15;17), t(11q23)/t(21q22)]. Η σποραδική εμφάνιση υπερβολικής ή μη φυσιολογικής έκφρασης πρωτο-ογκογονιδίων (σωματική μετάλλαξη), που κωδικοποιούν τη σύνθεση πρωτεϊνών οι οποίες μπορούν να επηρεάσουν την κυτταρική διαφοροποίηση και τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, σχετίζονται με την ανθρώπινη λευχαιμιογένεση. Η οικογένεια π.χ. των RAS γονιδίων περιλαμβάνει τρία κυτταρικά πρωτο-ογκογονίδια: τα H-RAS, K-RAS και N-RAS, τα οποία έχουν βρεθεί συχνά σε ποικίλες κακοήθειες. Ιδιαίτερη προσοχή έχει εστιαστεί σε σημειακές μεταλλάξεις στα σημεία 12 και 13 του N-RAS γονιδίου σε ασθενείς με μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα, που μπορεί να συνεισφέρουν στη μετατροπή τους σε OMΛ. Οι μεταλλάξεις του γονιδίου RAS δε βρίσκονται σε όλες τις περιπτώσεις των μυελοδυσπλαστικών συνδρόμων, όμως μπορεί να παρουσιαστούν σε οποιοδήποτε σημείο κατά την πορεία του MDS, με τη CMML να κατέχει το υψηλότερο ποσοστό παρουσίας τέτοιων μεταλλάξεων.
- (4) **Περιβαλλοντικά καρκινογόνα-κάπνισμα-χρωμοβαφές**
- (5) **Βενζένιο:** Το βενζένιο αρχικά στον οργανισμό μεταβολίζεται μέσω του CYP 2E1 σε εποξειδίο του βενζενίου, το οποίο μπορεί απευθείας να δώσει το μιτογόνο παράγωγο μουκονικό οξύ, μπορεί όμως και να μεταβολιστεί σε φαινόλη και υδροκινόνη, η οποία μέσω της μυελοϋπεροξειδάσης των CD34+ μεταβολίζεται στο μιτογόνο παράγωγο p-βενζοκινόνη. Το μουκονικό οξύ και η p-βενζοκινόνη δρουν προκαλώντας γενετικές και μη γενετικές βλαπτικές επιδράσεις. Στις γενετικές περιλαμβάνονται οι χρωμοσωμικές βλάβες, οι μεταλλάξεις του ογκογονιδίου RAS και άλλες σωματικές μεταλλάξεις, ενώ στις μη γενετικές ο αυξημένος GM-CSF-εξαρτώμενος κυτταρικός πολλαπλασιασμός και η αύξηση της δραστηριότητας της πρωτεϊνοκινάσης C. Αυτές οι επιδράσεις οδηγούν σε μυελική απλασία ή μυελοδυσπλασία.
- (6) **Ιοί:** Είναι ευρέως αποδεκτό πως η εμφάνιση μυελοδυσπλασίας (όπως και λευχαιμίας), φαίνεται ότι μπορεί να σχετίζεται με τη δράση ρετροϊών ή/και με μεταλλάξεις κυτταρικών πρωτο-ογκογονιδίων. Τουλάχιστο δύο (2) ανθρώπινες κακοήθειες του λεμφικού ιστού, η T-λευχαιμία των ενηλίκων και μια μορφή του δερματικού T-λεμφώματος, είναι συνδεδεμένες αιτιολογικά με τη δράση ρετροϊών. Οι ιοί της οικογένειας των DNA-ερπητοϊών (όπως π.χ. ο CMV⁶) μπορεί επίσης να παίζουν κάποιο παθογενετικό ρόλο στην πρωταρχική εξαλλαγή του αρχέγονου στελεχιαίου αιμοποιητικού κυττάρου στα MDS.

ΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑ

Η μυελοδυσπλασία^{1,127} είναι το αποτέλεσμα μιας κλωνικής διαταραχής σε μια φάση εξέλιξης του πολυδύναμου αιμοποιητικού κυττάρου (stem cell). Η κλωνική διαταραχή στα MDS ακολουθεί τρία στάδια ογκογένεσης:

- 1) Την έναρξη, που περιλαμβάνει το πρωταρχικό γενετικό βλαπτικό αποτέλεσμα πάνω στα αρχέγονα αιμοποιητικά κύτταρα
- 2) Την αύξηση του όγκου μέσω κλωνικής επέκτασης του παθολογικού κλώνου που έχει αναπτυξιακό πλεονέκτημα
- 3) Την κακοήθη μετατροπή, που οδηγεί σε αύξηση των λευχαιμικών βλαστικών κυττάρων με -τελικώς- τη μετατροπή σε ΟΜΛ

Στα MDS μια μετάλλαξη οδηγεί στην κλωνική διαφοροποίηση της κοκκιοκυτταρικής, μονοκυτταρικής, ερυθράς και μεγακαρυοκυτταρικής σειράς, ενώ ακόμα παραμένει αμφίβολο εάν επίσης συμμετέχει στην κλωνική διαταραχή και η λεμφική σειρά. Είναι δηλαδή αντικείμενο μεγάλης συζήτησης εάν η πρωταρχική κλωνική μετάλλαξη στα MDS εμφανίζεται στο πλέον αρχέγονο κοινό αιμοποιητικό κύτταρο, ή σε ένα πολυδύναμο προγονικό κύτταρο μυελοειδούς διαφοροποίησης.

Η κλωνική αιτία² της προλευχαιμίας υποστηρίζεται από μελέτες γυναικών που ήταν ετεροζυγωτικές για τα ισοένζυμα A και B της γλυκοζο-6-φωσφορικής δεϋδρογενάσης (G6PD) και που είχαν προλευχαιμική διαταραχή. Τα αιμοποιητικά προγονικά κύτταρα και τα λεμφοκύτταρα αυτών των ασθενών είχαν μόνο ένα ισοένζυμο παρόν, διαπίστωση που στηρίζει την ιδέα της κλωνικής ανάπτυξης του παθολογικού stem cell. Επίσης κλωνικές μελέτες που χρησιμοποίησαν *περιορισμένους μήκους X-εξαρτώμενο πολυμορφισμό* ερευνώντας την φωσφογλυκερινική κινάση και την υποξανθίνη-φωσφοριβοζυλ-τρασφεράση επίσης υποστηρίζουν ως αιτία των ανωτέρω διαταραχών την κλωνική βλάβη του αρχέγονου stem cell.

Ο *in situ* υβριδισμός, όμως, με φλουορεσκείνη πληθυσμού αιμοποιητικών κυττάρων για τη μελέτη των χρωμοσωμάτων 7 ή 8 σε ασθενείς με μονοσωμία 7 ή τρισωμία 8 δείχνει ότι οι χρωμοσωμικές ανωμαλίες μπορεί να μην είναι παρούσες σε λεμφικό πληθυσμό. Μελέτες που ερευνούν το X χρωμόσωμα και τις ανακατατάξεις του γονιδίου που είναι υπεύθυνο για τη σύνθεση των βαρέων αλύσεων των ανοσοσφαιρινών, επίσης υποστηρίζουν την ίδια άποψη. Παρά ταύτα, σε δύο ασθενείς με ιδιοπαθή ανθεκτική σιδηροβλαστική αναιμία, κυτταρικοί πληθυσμοί που επώασθησαν με τον *in situ* Epstein-Barr εμφάνισαν ψευδοδιπλοειδία, κάτι που πιθανώς σημαίνει ότι τα B-λεμφοκύτταρα προέρχονται από τα βεβλαμμένα αρχέγονα κύτταρα των ασθενών αυτών.

Στα MDS ο παθολογικός κλώνος εμφανίζει διαταραχές, όπως η αναποτελεσματική αιμοποίηση, η κυτταρική δυσπλασία και δυσλειτουργία, καθώς και η ανεπαρκής ωρίμανση και διαφοροποίηση. Η ικανότητα των προγονικών κυττάρων της σειράς των κοκκιοκυττάρων-μακροφάγων (CFU-GM), ερυθροκυττάρων (CFU-E, BFU-E), μεγακαρυοκυττάρων (CFU-Meg) και πολλαπλών σειρών (CFU-GEMM) να σχηματίζουν κυτταρικές αποικίες είναι είτε μειωμένη ή απύσχα. Στον πίνακα 3 αναφέρονται οι σημαντικότερες κυτταρικές ανωμαλίες στα MDS.

ΠΙΝΑΚΑΣ 3

ΚΥΤΤΑΡΙΚΕΣ ΒΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΑΝΩΜΑΛΙΕΣ ΣΤΑ MDS¹

- 1) Κλωνική προέλευση όλων των αιμοποιητικών κυττάρων (εκτός αυτών της λεμφικής σειράς)
- 2) Φτωχή ανάπτυξη των προγονικών κυττάρων in vitro
- 3) Μειωμένος λόγος των αποικιών προς τα αθροίσματα (colony/cluster) των κυττάρων σε κυτταροκαλλιέργειες
- 4) Ανεπαρκής ωρίμανση των κυττάρων σε κυτταροκαλλιέργεια
- 5) Ανασταλτική δράση των μακροφάγων στην αιμοποίηση
- 6) Αντοχή των CFU-GM στην ανασταλτική δράση των μακροφάγων
- 7) Αυξημένα επίπεδα κυτοκινών (G-CSF, CSF-1, EPO, IL-6, TNF-α)
- 8) Απόπτωση που ευθύνεται για την αναποτελεσματική αιμοποίηση

Το χαρακτηριστικό σημείο της αναποτελεσματικής ερυθροποίησης και κοκκιοποίησης είναι η μικρή αναλογία κυττάρων στη φάση σύνθεσης του DNA στο μιτωτικό κύκλο και η αυξημένη αναλογία κυτταρικού θανάτου. Είναι γνωστό ότι κάτω από ορισμένες συνθήκες τα κύτταρα απαντούν με αυτοκτονία σε εσωτερικά ή εξωτερικά ερεθίσματα, φαινόμενο που είναι γνωστό ως προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος ή **απόπτωση**.

ΑΠΟΠΤΩΣΗ ΣΕ ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ MDS, ΔΙΑΦΟΡΕΣ ΜΕΤΑΞΥ MDS "ΚΑΛΗΣ" ΚΑΙ "ΚΑΚΗΣ" ΠΡΟΓΝΩΣΗΣ ΚΑΙ ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΩΝ ΣΧΕΤΙΖΟΜΕΝΩΝ ΜΕ ΤΗΝ ΑΠΟΠΤΩΣΗ ΓΟΝΙΔΙΩΝ

Με τη FAB ταξινόμηση, όπως ειπώθηκε, έχουν διαχωριστεί τα "καλής" πρόγνωσης MDS (RA, RARS) από τα "κακής" πρόγνωσης (RAEB, RAEB-t, CMML), με τα κακής πρόγνωσης να παρουσιάζουν μεγαλύτερη πιθανότητα εκτροπής σε ΟΜΛ. Η απόπτωση⁷ είναι ένας τύπος προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου -με χαρακτηριστική μορφή και εμφάνιση- που παίζει σημαντικό ρόλο στη φυσιολογική εμβρυϊκή ανάπτυξη, την καταστροφή των λεμφοκυττάρων που στρέφονται ενάντια σε κύτταρα του ίδιου του οργανισμού και τη διατήρηση σταθερού αριθμού κυττάρων σε ποικίλους ιστούς. Σε αρκετές μυελικές διαταραχές έχει προταθεί ο ρόλος της απόπτωσης, όταν συνυπάρχει υπερκυτταρικός μυελός και πανκυτταροπενία, δηλαδή αναποτελεσματική αιμοποίηση. Μια τέτοια διαταραχή είναι και η μυελοδυσπλασία, στην οποία τόσο τα μυελικά όσο και τα στρωματικά κύτταρα συμμετέχουν στην αποπτωτική διαδικασία.

Πολλά γονίδια έχει αναφερθεί ότι προάγουν ή αναστέλλουν την απόπτωση. Μεταξύ αυτών τα p53, c-myc και fas προάγουν και το bcl-2 αναστέλλει την απόπτωση. Μάλιστα ο βαθμός της αποπτωτικής διαδικασίας εξαρτάται κυρίως από το λόγο της έκφρασης c-myc/bcl-2 στα CD34+ κύτταρα.

Σε μελέτη που έγινε το 1999, δείχθηκε ότι ασθενείς με καλής πρόγνωσης MDS παρουσίασαν αυξημένη αποπτωτική διαδικασία (ιδιαίτερα οι ασθενείς με RARS) σε σχέση με ασθενείς με κακής πρόγνωσης MDS. Οι ασθενείς με αυξημένη απόπτωση είχαν παρόμοια ηλικία, επίπεδα Hb, λευκών και αιμοπεταλίων σε σχέση με αυτούς με χαμηλή απόπτωση, όμως οι πρώτοι είχαν αυξημένη μυελική κυτταρική πυκνότητα, μακρύτερο χρόνο επιβίωσης και μακρύτερη περίοδο ως τη μετατροπή του MDS σε ΟΜΛ.

Σε ασθενείς με έκφραση τουλάχιστο ενός εκ των c-myc ή p53 η απόπτωση ήταν παρούσα, ενώ δεν παρατηρείτο απόπτωση σε απουσία των παραπάνω γονιδίων. Αντίθετα χαμηλά επίπεδα bcl-2 συνυπήρχαν με υψηλά επίπεδα απόπτωσης και

αντιστρόφως. Σημαντικό ρόλο φαίνεται πως παίζει η ισορροπία μεταξύ αποπτωτικών και αντι-αποπτωτικών πρωτεϊνών-γονιδίων.

Επιπλέον, σε ασθενείς με MDS καλής πρόγνωσης, απόπτωση παρατηρήθηκε στο σύνολο των μυελικών κυττάρων αλλά και ξεχωριστά στα CD34+ και CD34- κύτταρα. Σε κακής πρόγνωσης MDS απόπτωση ήταν παρούσα σε υψηλά ποσοστά μόνο στα CD34+ κύτταρα.

Είναι γνωστό ότι η λευχαιμογένεση είναι πιο πιθανή όταν μια βλάβη στο DNA οδηγεί σε πολλαπλασιασμό και όχι σε απόπτωση των εμπλεκόμενων κυττάρων. Φαίνεται λοιπόν ότι στα MDS ισχύει η ακόλουθη υπόθεση: Στα πρώιμα στάδια της μυελοδυσπλασίας η απόπτωση αφορά τόσο στα CD34+ όσο και στα CD34- κύτταρα. Η αιμοποίηση σ' αυτό το στάδιο δεν είναι εξ ολοκλήρου κλωνική και σημαντικός αριθμός φυσιολογικών προγονικών κυττάρων συνεισφέρει παράλληλα με τα δυσπλαστικά κύτταρα. Σε πιο προχωρημένα στάδια (RAEB, RAEB-t) όλο και λιγότερα φυσιολογικά προγονικά κύτταρα επιζούν και δίνουν γένεση σε φυσιολογικά ώριμα κύτταρα. Τα μη-αποπτωτικά δυσπλαστικά κύτταρα παρουσιάζουν πλεονέκτημα στην επιβίωση και οι απόγονοί τους εποικίζουν σχεδόν αποκλειστικά το μυελό. Σ' αυτή τη φάση η απόπτωση παρουσιάζεται αποκλειστικά στα CD34+ κύτταρα, που αποτελούν μια μικρή αναλογία των συνολικών μυελικών κυττάρων. Όταν μάλιστα εμφανιστεί η εκτροπή σε ΟΜΛ, τα λευχαιμικά κύτταρα καταστέλλουν τη φυσιολογική αιμοποίηση, και η απόπτωση απουσιάζει καθολικά.

Τελικά, ο συνδυασμός υπερκυτταρικού μυελού και πανκυτταροπενίας σε προχωρημένα στάδια MDS εξηγείται καλύτερα όχι μόνο μέσω αυξημένης απόπτωσης των πρόδρομων μυελικών κυττάρων, αλλά μέσω αυξημένης παραμονής στο μυελό και αντίστασης στην απόπτωση των κυττάρων του επιβιώνοντος μυελοδυσπλαστικού κλώνου. Παρακάτω στον πίνακα 4 αναφέρονται τα κυριότερα γονίδια που σχετίζονται με την απόπτωση, ενώ στον πίνακα 5 τα κυριότερα ευρήματα που υποδηλώνουν αυξημένη απόπτωση στα MDS.

ΠΙΝΑΚΑΣ 4¹

ΓΟΝΙΔΙΑ/ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ ΣΧΕΤΙΖΟΜΕΝΑ ΜΕ ΤΗΝ ΑΠΟΠΤΩΣΗ

ΓΟΝΙΔΙΟ	ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ
bcl-2	Αναστέλλει την απόπτωση
caspase	Επάγει την απόπτωση
myc	Αυξάνει την απόπτωση
p53	Επάγει ευαισθησία στην απόπτωση
jun/fos	Σχετίζεται με την απόπτωση
fas/apo-1	Επάγει την απόπτωση
ras	Αναστέλλει την απόπτωση;
bax	Δρα όπως η bcl-2
bcl-x	Η x_L αναστέλλει, η x_S προωθεί την απόπτωση

ΠΙΝΑΚΑΣ 5¹

ΕΥΡΗΜΑΤΑ ΠΟΥ ΥΠΟΔΗΛΩΝΟΥΝ ΑΥΞΗΜΕΝΗ ΑΠΟΠΤΩΣΗ ΣΤΑ MDS

- 1) Ανεπιτυχής ανάπτυξη των CFU-GM προγονικών κυττάρων σε κυτταροκαλλιέργειες
- 2) Αυξημένη ευαισθησία των P39 MDS-προερχόμενων κυττάρων σε αποπτωτικά ερεθίσματα
- 3) Αυξημένη αναλογία κυττάρων με διασπάσεις στην αλυσίδα του DNA σε βιοψία μυελού
- 4) Υψηλή συχνότητα ανεύρεσης μακροφάγων που εγκολπώνουν αποπτωτικούς πυρήνες σε βιοψία μυελού
- 5) Αυξημένη απόπτωση σε βραχείες κυτταροκαλλιέργειες
- 6) Αυξημένα αποπτωτικά CD34+ κύτταρα, με αυξημένο λόγο c-myc/bcl-2
- 7) Αξιοσημείωτη μείωση των αποπτωτικών κυττάρων σε ασθενείς που απαντούν σε κυτοκίνες

Η ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΗΣ bcl-2 ΑΠΟ ΤΑ ΜΥΕΛΙΚΑ ΠΡΟΔΡΟΜΑ ΚΥΤΤΑΡΑ (EMP) ΣΤΑ MDS: Η ΣΧΕΣΗ ΤΗΣ ΜΕ ΤΗΝ ΠΡΟΟΔΟ ΤΗΣ ΝΟΣΟΥ

Η ογκοπρωτεΐνη bcl-2⁸ εκφράζεται ως γνωστόν σε φυσιολογικά λεμφοειδή κύτταρα, ενώ η υπερέκφρασή της είναι αποφασιστικής σημασίας στην παθογένεση των περισσότερων περιπτώσεων θυλακιώδους λεμφώματος, γιατί οδηγεί σε παρατεταμένη επιβίωση, μειωμένη απόπτωση και αυξημένο πολλαπλασιασμό των νεοπλασματικών κυττάρων. Επίσης, η bcl-2 εκφράζεται από φυσιολογικά πρόδρομα μυελικά κύτταρα σε επίπεδα που μειώνονται όσο τα κύτταρα αυτά ωριμάζουν, ενώ υπερεκφράζεται στους βλάστες των περισσότερων περιπτώσεων ΟΜΛ και σε ένα μικρό αριθμό ασθενών με MDS, στα οποία σχετίζεται και με κακή πρόγνωση.

Το 1998 τέθηκε η υπόθεση ότι η έκφραση της ογκοπρωτεΐνης bcl-2 σχετίζεται με τη συσσώρευση άωρων αιμοποιητικών κυττάρων που παρουσιάζουν αυξημένη δυναμική για λευχαιμική μετατροπή στα MDS. Μάλιστα επειδή οι αυξητικοί παράγοντες ελαττώνουν το βαθμό της απόπτωσης στους MDS ασθενείς, ελέγχθηκε η επίδραση του G-CSF στην έκφραση της bcl-2 ογκοπρωτεΐνης από τα προγονικά μυελικά κύτταρα αυτών των ασθενών.

Πράγματι, δείχθηκε ότι η έκφραση της bcl-2 στα EMP κύτταρα ήταν αξιοσημείωτα υψηλότερη σε μορφολογικά προχωρημένες περιπτώσεις MDS (RAEB, RAEB-t) από ό,τι σε πρώιμα στάδια (RA, RARS) και ήταν ακόμα υψηλότερη σε ΟΜΛ (είτε de novo είτε από μετατροπή). Η λευχαιμική μετατροπή μπορεί να εμφανιστεί μέσω της επικράτησης ενός κλώνου bcl-2+ βλαστών που παρουσιάζει μειωμένη απόπτωση. Επίσης βρέθηκε ότι τα επίπεδα έκφρασης της bcl-2 και η τάση τους να αυξάνονται κατά την πρόοδο του MDS δεν επηρεάζονταν εμφανώς από τη θεραπεία με G-CSF. Το τελευταίο ενισχύει την άποψη ότι η λευχαιμική μετατροπή μπορεί να οφείλεται σε μηχανισμούς άλλους από (ή πρόσθετους με) τη μείωση της απόπτωσης των πρόδρομων αιμοποιητικών κυττάρων εξαιτίας των αυξητικών παραγόντων. Η έκφραση της bcl-2, λοιπόν, φαίνεται να σχετίζεται με το στάδιο του MDS και τη μετατροπή του σε ΟΜΛ. Στον πίνακα 6 αναφέρονται οι πρωτεΐνες της οικογένειας bcl-2 και ο ρόλος τους στην απόπτωση.

ΠΙΝΑΚΑΣ 6:

ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ ΤΗΣ ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑΣ ΤΗΣ Bcl-2 ΚΑΙ Ο ΡΟΛΟΣ ΤΟΥΣ ΣΤΗΝ ΑΠΟΠΤΩΣΗ⁹

ΑΝΑΣΤΕΛΛΟΥΝ ΤΗΝ ΑΠΟΠΤΩΣΗ	ΠΡΩΩΘΟΥΝ ΤΗΝ ΑΠΟΠΤΩΣΗ
Bcl-2	Bax
BclX _L	BclX _S
Mcl-1	Bak
A-1	Bik
Bhfr-1 (Epstein-Barr virus)	Bad
p35 (Baculovirus)	
Ced-9 (Nematode)	

ΜΟΡΙΑΚΗ ΒΑΣΗ ΤΩΝ ΜΥΕΛΟΔΥΣΠΛΑΣΤΙΚΩΝ ΣΥΝΔΡΟΜΩΝ

Μελέτες στα MDS έχουν εστιαστεί σε δύο ομάδες γονιδίων⁵ που ενέχονται στην παθογένεση των κακοήθων διαταραχών: Τα πρωτο-ογκογονίδια και τα ογκο-κατασταλτικά γονίδια. Ενεργοποίηση των πρωτο-ογκογονιδίων εμφανίζεται σε χρωμοσωμικές μεταθέσεις, σημειακές μεταλλάξεις, ή γονιδιακές συγχωνεύσεις. Τα ογκο-κατασταλτικά γονίδια ενέχονται περισσότερο στην παθογένεση συμπαγών όγκων.

Τα γονίδια p53 και NF-1 έχει αναφερθεί ότι συμμετέχουν στην παθογένεια των MDS, όπως επίσης και σημειακές μεταλλάξεις του γονιδίου AML1/RUNX1¹⁰⁹. Το γονίδιο NF-1 (ογκοκατασταλτικό γονίδιο) ενεργοποιείται στη νευρινωμάτωση Von Recklinghausen (NF-1 disease). Το παράγωγο του γονιδίου NF-1 είναι μέλος της οικογένειας των πρωτεϊνών που ενεργοποιούν την GTPάση, υδρολύοντας το GTP σε GDP στις πρωτεΐνες των γονιδίων RAS.

Το γονίδιο-ρυθμιστής της ιντερφερόνης (IRF-1¹) επίσης ενέχεται στην παθογένεια των MDS. Το γονίδιο αυτό κωδικοποιεί το ρυθμιστικό παράγοντα της ιντερφερόνης οδηγώντας σε αρνητική επίδραση στην κυτταρική ανάπτυξη, εμφανίζει άρα αντι-ογκογόνο δράση, εδράζεται δε στο χρωμόσωμα 5q31.1. Το IRF-1 έχει φανεί ότι αποκόπτεται ως προς το ένα ή και τα δύο του αλληλία σε ασθενείς με ανωμαλίες του 5q. Επομένως, το IRF-1 είναι ένα υποψήφιο ογκο-κατασταλτικό γονίδιο, η απουσία του οποίου μπορεί να δίνει γένεση σε κάποιο νεοπλασματικό κλώνο στα MDS.

Το γονίδιο του ρετινοβλαστώματος (Rb) επίσης είναι ένα αντι-ογκογονίδιο, δομικές αλλοιώσεις του οποίου (ή της παραγόμενης από αυτό πρωτεΐνης) έχουν βρεθεί σε περιπτώσεις OMA και πιο σπάνια σε MDS.

Η οικογένεια των RAS γονιδίων έχει μελετηθεί πολύ στα MDS. Η ομάδα αυτή αποτελείται από 3 γονίδια που κωδικοποιούν τη σύνθεση πρωτεϊνών 21kDa, οι οποίες παίζουν σπουδαίο ρόλο στην μεταβίβαση σημάτων κυτταρικής ανάπτυξης και διαφοροποίησης. Ενεργοποίηση του προϊόντος p21RAS του γονιδίου RAS προκύπτει από την ανταλλαγή του συνδεδεμένου GDP με GTP. Μεταλλάξεις του RAS γονιδίου δίνουν γένεση στο προϊόν p21RAS που φέρει αποκλειστικά GTP λόγω αναστολής της υδρόλυσης του συνδεδεμένου GTP προς GDP. Μεταλλάξεις του RAS γονιδίου κυρίως παρατηρούνται στη CMM1 ή σε ασθενείς που εμφανίζουν μονοκυττάρωση. Επίσης υψηλή είναι η συχνότητα ανεύρεσης μεταλλάξεων του RAS γονιδίου σε OMA τύπου M4. Μάλιστα η συνύπαρξη ενεργοποίησης λόγω σημειακής μετάλλαξης του RAS γονιδίου και της μονοσωμίας 7 σε ασθενείς με MDS (αλλά όχι σε ασθενείς με de novo OMA) σημαίνει ότι οι ανωμαλίες αυτές πιθανώς συνεργάζονται στη διαδικασία της λευχαιμογένεσης. Πολύ στενή σχέση υφίσταται μεταξύ του p21RAS

και των πιο επιθετικών τύπων MDS, ενώ το προϊόν p21RAS υπερεκφράζεται γενικά σε υψηλή συχνότητα στα MDS.

Η γλουταθειόνη S-τρανσφεράση (GST) είναι ένα ένζυμο που μεσολαβεί στο μεταβολισμό ποικίλων κυτταροτοξικών και γονιδιοτοξικών παραγόντων, που περιλαμβάνουν κι αυτούς που ενέχονται στην παθογένεια των μυελοδυσπλαστικών συνδρόμων. Τα γονίδια τόσο της GSTM1 όσο και της GSTT1 παρουσιάζουν ένα παραλλαγμένο "μηδενικό" αλληλίο, όπου ολόκληρο το γονίδιο λείπει.

Είναι προφανές ότι στην περίπτωση των ομοζυγωτών με το μηδενικό αλληλίο του γόνου των GSTM1 και GSTT1 δεν παρατηρείται καμία φαινοτυπική ενζυμική δραστηριότητα. Ο μηδενικός αυτός γονότυπος για την GSTM1 παρουσιάζει μια συχνότητα 50% στους λευκούς και έχει συνδεθεί με αυξημένη συχνότητα καρκίνου του πνεύμονα και της ουροδόχου κύστης σε καπνιστές. Λιγότερα είναι γνωστά για τη σχέση μεταξύ της GSTT1 και του κινδύνου για νεοπλασματικά νοσήματα, αλλά άτομα με μηδενικό γονότυπο για την GSTT1 παρουσιάζουν μικρότερη ικανότητα να μεταβολίσουν τοξικά καρκινογόνα. Αντίθετα, τα άτομα που κληρονομούν κανονικά το γονίδιο αυτό και παρουσιάζουν φυσιολογική ενζυμική δραστηριότητα μετατρέπουν το διαλυτό διχλωρομεθάνιο σε μιτογόνους μεταβολίτες.

Σε μελέτη το 1996¹⁰ ελέγχθηκε εάν οι ασθενείς που είναι ομόζυγοι για το μηδενικό αυτό αλληλίο των GSTT1 και GSTM1 έχουν διαφορετικό κίνδυνο να εμφανίσουν MDS σε σχέση με το φυσιολογικό πληθυσμό. Στη μελέτη αυτή βρέθηκε αυξημένη συχνότητα του μηδενικού γονοτύπου της GSTT1 μεταξύ των MDS ασθενών συγκρινόμενων με τους υγιείς μάρτυρες. Τα άτομα με το μηδενικό αυτό γονότυπο είχαν 4,3 φορές περισσότερο κίνδυνο να αναπτύξουν MDS, ενώ η συχνότητα του μηδενικού γονοτύπου της GSTT1 ήταν αυξημένη σε σχέση με τους υγιείς μάρτυρες τόσο στην υποομάδα των RA/RARS ασθενών όσο και στην ομάδα των RAEB/RAEBt ασθενών. Αντίθετα καμία μεταβολή στο σχετικό κίνδυνο δεν παρατηρήθηκε σε άτομα με μηδενικό γονότυπο για την GSTM1. Βέβαια ελέγχθηκε η πιθανότητα η απουσία του γόνου της GSTT1 να είναι το αποτέλεσμα δευτερογενούς χρωμοσωμικής ανωμαλίας στο μυελό των ασθενών με μυελοδυσπλασία. Τα γονίδια των GSTT1 και GSTT2 εδράζονται στο χρωμόσωμα 22. Από τους ασθενείς της μελέτης, ελάχιστοι είχαν ανωμαλίες του χρωμοσώματος 22, και κανείς από αυτούς δεν παρουσίαζε το μηδενικό γονότυπο για την GSTT1. Τέλος, πρέπει να σκεφτεί κανείς ότι ο σχετικός κίνδυνος που προαναφέρθηκε εξαρτάται και από την έκθεση σε συγκεκριμένους χημικούς παράγοντες. Γενικά όμως, η κληρονομική έλλειψη του γονιδίου της GSTT1, άρα και του ενζυμικού μεταβολισμού τοξικών καρκινογόνων παραγόντων από αυτή, μπορεί να αποτελεί ένα σημαντικό αιτιοπαθογενετικό μηχανισμό για τα MDS.

Οι πρωτείνες myc είναι πυρηνικές πρωτείνες με μεγάλη συνάφεια με την απλή και διπλή έλικα του DNA. Οι πρωτείνες αυτές παίζουν το ρόλο μεταγραφικών παραγόντων. Έχει αποδειχθεί ότι οι πρωτείνες myc ασκούν θετική ρύθμιση στα γονίδια των Hsp-70, α-προθυμοκίνης, p53 και ορνιθίνης αποκαρβοξυλάσης, ενώ το αντίθετο συμβαίνει με τα γονίδια των HLA τύπου I και LFA-1. Έχει επίσης βρεθεί ότι αναπτυξιακοί παράγοντες που προάγουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό ενεργοποιούν το γονίδιο c-myc. Αντίθετα, παράγοντες που αναστέλλουν την κυτταρική ανάπτυξη ή προάγουν την κυτταρική διαφοροποίηση, αναστέλλουν το γονίδιο αυτό. Υπερέκφραση του c-myc μπορεί να οφείλεται είτε σε μια ανωμαλία του ενδογενούς γόνου, ή σε προσβολή από ένα εξωγενές γονίδιο. Στις περιπτώσεις αυτές η κυτταρική σειρά γίνεται αυτόνομη και ανεξάρτητη από αναπτυξιακούς παράγοντες. Φαίνεται όμως ότι ο ρόλος του c-myc είναι πιο σύνθετος, καθόσον η ενεργοποίηση του γονιδίου αυτού προάγει και την απόπτωση του κυττάρου. Σε ποικίλες κακοήθειες

η ενεργοποίηση του c-myc μπορεί να είναι το αποτέλεσμα μεταλλάξεων, χρωμοσωμικών μεταθέσεων, γονιδιακής επέκτασης ή σταθεροποίησης του c-myc mRNA. Επίσης το γονίδιο c-myc ενεργοποιείται σε οξείες λευχαιμίες.

Σε MDS ασθενείς μελετήθηκε το 1996¹¹ η έκφραση της ογκοπρωτεΐνης p67 του c-myc. Βρέθηκε ότι σε όλες σχεδόν τις περιπτώσεις ασθενών με MDS σε φάση έκδηλης ANLL (acute non-lymphocytic leukemia) η έκφραση της c-myc p67 είναι αυξημένη. Το ίδιο φαίνεται να συμβαίνει και σε μερικούς RAEB ασθενείς λίγες εβδομάδες πριν τη μετατροπή τους σε ANLL.

Το γονίδιο του υποδοχέα του c-FMS/CSF-1 εδράζεται στην περιοχή 5q31-33 και έχουν ως τώρα αναγνωριστεί δύο μεταλλάξεις του, τόσο στα MDS όσο και στην ΟΜΛ, σε συχνότητα αντιστοίχως 13-20% και 10-25%. Οι μεταλλάξεις αυτές συνήθως συνυπάρχουν με MDS τύπου CMML και ΟΜΛ τύπου M4 και M5.

Το γονίδιο EVI-1 κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη συνδεδεμένη με το DNA η οποία δεν εκφράζεται φυσιολογικά στα κύτταρα του περιφερικού αίματος ή του μυελού, αλλά σε λευχαιμίες και MDS με μεταθέσεις του χρωμοσώματος 3q26.

Επίσης στα MDS και την ΟΜΛ συχνά παρατηρείται η μετάθεση t(8;21)(q22;q22) η οποία οδηγεί σε συγχώνευση των γονιδίων ETO και AML1 και δημιουργία του χιμαιρικού AML1/ETO γονιδίου.

Στην περίπτωση της μετάθεσης t(5;12) παρατηρείται συγχώνευση του γονιδίου του υποδοχέα B του PDGF και του γονιδίου TEL που είναι μέλος της οικογένειας των ETS γονιδίων. Στα MDS όπου παρατηρείται αυτή η συγχώνευση επικρατεί η μονοκυττάρωση και η ηωσινοφιλία.

Στα MDS συχνή είναι επίσης η ανεύρεση μετάθεσης t(10;12)(q26;p13).

Στα μυελοειδή κύτταρα έχει περιγραφεί και αυτόνομη ανάπτυξη, ανεξάρτητη δηλαδή από την παρουσία αυξητικών παραγόντων. Αυτή η αυτονομία μπορεί να προκληθεί από την παρακρινή ή αυτοκρινή παραγωγή αυξητικών παραγόντων ή την απορύθμιση των υποδοχέων των αυξητικών παραγόντων. Το πρωτο-ογκογονίδιο c-KIT π.χ. κωδικοποιεί τον υποδοχέα τυροσίνη-κινάση του αυξητικού παράγοντα των στελεχειαίων κυττάρων και των μαστοκυττάρων.

Το γονίδιο TEC πρόσφατα χαρτογραφήθηκε στην περιοχή 4p12 και η υπερέκφραση του προϊόντος του (μιας πρωτεΐνης τυροσίνης-κινάσης τύπου μη-υποδοχέα) έχει παρατηρηθεί στα MDS. Η ανώμαλη έκφραση του γονιδίου αυτού πιθανώς να συνεισφέρει στην αναποτελεσματική αιμοποίηση που παρατηρείται στους ασθενείς αυτούς. Επιπλέον η αυξημένη δραστηριότητα της πρωτεΐνης τυροσίνης-κινάσης μπορεί να οδηγεί σε κακοήθη εκτροπή προς ΟΜΛ.

Η υπεροικογένεια των υποδοχέων των κυτοκινών περιλαμβάνει γονίδια που κωδικοποιούν τους υποδοχείς των IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-9, GM-CSF, G-CSF, ερυθροποιητίνης, LIF, ογκοστατίνης M, προλακτίνης και αυξητικής ορμόνης.

Το γονίδιο c-MPL κωδικοποιεί ένα νέο μέλος αυτής της ομάδας, τον υποδοχέα της θρομβοποιητίνης. Η έκφραση του c-MPL βρέθηκε αυξημένη στο ~50% των ασθενών με ΟΜΛ και στο ~33% των ασθενών με MDS σε μια μελέτη. Η έκφραση του γονιδίου αυτού φαίνεται να συνδέεται με φτωχή πρόγνωση και αυξημένη πιθανότητα λευχαιμικής εκτροπής στα MDS.

Στα MDS επίσης, μια μελέτη έδειξε ότι η υπερμεθυλίωση του γονιδίου της καλσιτονίνης ενέχεται στην παθογένεια της διαταραχής.

Στο σύνδρομο 5q- παρατηρούνται διαταραχές στην έκφραση γονιδίων των IL-3, IL-4, IL-5, IL-9 και GM-CSF που εδράζονται στην ως άνω περιοχή. Στην αποκοπή του 20q διαταράσσεται η έκφραση των γονιδίων της κινάσης των αιμοποιητικών κυττάρων, της φωσφολιπάσης C, της τοποϊσομεράσης 1 και της φωσφοτυροσουλφωσφατάσης 1B, τα οποία παίζουν σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της κυτταρικής ανάπτυξης.

Επίσης, γονίδια που εδράζονται στο χρωμόσωμα 8 (όπως τα MYC, LYN, PVT-1 και MOS) παρουσιάζουν ανωμαλίες στην έκφρασή τους σε βλάβες του χρωμοσώματος αυτού. Στην αποκοπή του 7q και στη μονοσωμία 7 τα γονίδια που βλάπτονται είναι το πρωτο-ογκογονίδιο MET, τα γονίδια της ερυθροποιητίνης, της p-γλυκοπρωτεΐνης και της πρωτεΐνης της υπεύθυνης για πολλαπλή αντοχή σε φάρμακα. Επίσης η έκφραση του γονιδίου EVI-1 (που παίζει σημαντικό ρόλο στην παθογένεια των MDS) διαταράσσεται σε ανωμαλίες του χρωμοσώματος 7 και του 3q26.

Η μελέτη εξάλλου των μεταλλάξεων του γονιδίου RAS, καθώς και η μελέτη της τρισωμίας 8, του συνδρόμου 5q- και της μονοσωμίας 7 χρησιμοποιούνται για την ανάδειξη του παθολογικού κλώνου στα MDS και για την μελέτη της κλωνικότητας της διαταραχής αυτής. Για τον ίδιο λόγο έχουν χρησιμοποιηθεί και τα γονίδια της HPRT (υποξανθινοφωσφοριβοζυλτρανσφεράσης) και PGK (φωσφογλυκερινικής κινάσης).

ΚΛΙΝΙΚΗ ΕΙΚΟΝΑ

ΣΥΝΗΘΕΙΣ ΚΛΙΝΙΚΕΣ ΕΚΔΗΛΩΣΕΙΣ

Η έναρξη της νόσου πριν την ηλικία των 50 ετών είναι σπάνια, εκτός από καταστάσεις που έχει προηγηθεί ακτινοβολία ή/και χημειοθεραπεία.

Μυελοδυσπλασία έχει παρατηρηθεί σε παιδιά ηλικίας από 5 μηνών έως και 15 ετών, αλλά οι περισσότερες περιπτώσεις αφορούν oligοβλαστικές λευχαιμίες με βέβαιη αλλά μικρή αναλογία βλαστών στο μυελό (5-20%). Συχνά υπάρχει μια υφέρπουσα πορεία πριν η κατάσταση εξελιχθεί σε ΟΜΛ.

Οι ασθενείς² μπορεί να είναι ασυμπτωματικοί, ή -εάν η αναιμία είναι πολύ βαρεία- μπορεί να εμφανίζουν ωχρότητα, αδυναμία, κακουχία και δύσπνοια. Μικρή αναλογία ασθενών εμφανίζουν λοιμώξεις σχετιζόμενες με την ουδετεροπενία ή αιμορραγία που σχετίζεται με τη θρομβοπενία κατά τη διάγνωση. Σπανιότερα οι ασθενείς μπορεί να εμφανίζουν πυρετό μη οφειλόμενο σε λοίμωξη. Σε πολλούς ασθενείς το πρωταρχικό σύμπτωμα είναι οι αρθραλγίες. Πολύ σπάνια, η κλινική εικόνα μπορεί να μοιάζει με νόσο του συνδετικού ιστού. Ηπατομεγαλία ή σπληνομεγαλία εμφανίζεται σε περίπου 5-10% των ασθενών.

ΣΠΑΝΙΕΣ ΚΛΙΝΙΚΕΣ ΕΚΔΗΛΩΣΕΙΣ

Ασθενείς με προλευχαιμική φάση της ΟΜΛ μπορεί να εμφανίσουν άποιο διαβήτη. Πολυουρία, πολυδιψία και μειωμένη libido μπορεί να οφείλεται σε υποθαλαμική επινέμηση της νόσου. Ανεπάρκεια του υποθαλάμου και της οπίσθιας υπόφυσης σε MDS έχει σχετισθεί με μονοσωμία 7 στα αιμοποιητικά κύτταρα.

Η οξεία ουδετεροφιλική δερματίτις (νόσος Sweet) είναι μια οξεία εμπύρετη κατάσταση με ερυθρηματώδεις κηλίδες στους ώμους, το πρόσωπο και τα κάτω άκρα που εξελίσσονται σε επώδυνες καφεοειδείς πλάκες, οι οποίες μπορεί να ξελκωθούν και να οδηγήσουν στο σχηματισμό μεγάλων νεκρωτικών περιοχών στο δέρμα. Η ιστοπαθολογία των βλαβών αυτών δείχνει πυκνές διηθήσεις του δέρματος από ουδετερόφιλα. Το σύνδρομο αυτό, που εμφανίζεται κύρια σε μεσήλικες γυναίκες, διαρκεί από 6 έως 10 εβδομάδες, συχνά συνοδεύει την ουδετεροφιλία στο αίμα, και μπορεί να υποτροπιάσει. Τουλάχιστο 10% των ασθενών με νόσο Sweet αναπτύσσουν ΟΜΛ ή άλλη νόσο του αιμοποιητικού stem cell, και μερικές περιπτώσεις συνδέονται με μονοκυττάρωση ή κυτταρογενετικές ανωμαλίες στα μυελικά κύτταρα που προηγούνται της εμφάνισης ΟΜΛ.

Ένα σύμπλεγμα συμπτωμάτων που μπορεί να μιμηθεί αυτοάνοσο νόσημα¹², π.χ. το συστηματικό ερυθρηματώδη λύκο (πυρετός, πλευρίτιδα, συμμετρική αρθρίτιδα, αντιπυρηνικά αντισώματα στο πλάσμα και πανκυτταροπενία με υπερκυτταρικό

μυελό), μπορεί να προηγείται της ΟΜΛ. Αρκετοί ασθενείς με σημεία ερυθρηματώδους λύκου έχουν αναφερθεί σε ανασκοπήσεις περιστατικών με MDS.

Η επίπτωση άλλων νεοπλασματικών καταστάσεων μπορεί να είναι αυξημένη σε ασθενείς με μυελοδυσπλασία.

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΑ ΕΥΡΗΜΑΤΑ

(1) ΣΤΟ ΑΙΜΑ

ΕΡΥΘΡΑ

Αναιμία² είναι παρούσα σε πάνω από το 85% των ασθενών. Ο μέσος όγκος ερυθρών (MCV) είναι συνήθως αυξημένος. Οι διαταραχές της μορφολογίας των ερυθροκυττάρων συνίστανται στην παρουσία στο περιφερικό επίχρισμα ωοειδών κυττάρων, ελλειπτοκυττάρων, σφαιροκυττάρων, δακρυοκυττάρων και κατακερματισμένων κυττάρων. Υπάρχει ένα μεγάλο φάσμα ευρημάτων σ'ότι αφορά στην ερυθρά σειρά. Μερικοί ασθενείς έχουν μόνο ήπια ανισοκυττάρωση. Μερικές φορές επικρατούν τα ελλειπτοκύτταρα. Η βασεόφιλη στίξη είναι συχνή. Εμπύρηνα ερυθρά ανευρίσκονται στο 10% των ασθενών. Επίσης, μπορεί να παρατηρηθεί αύξηση της αιμοσφαιρίνης F, μείωση της δραστηριότητας των ερυθροκυτταρικών ενζύμων (ειδικά της πυρουβικής κινάσης), αυξημένη ευαισθησία των μεμβρανών στο συμπλήρωμα, και διαφοροποίηση των αντιγόνων των ερυθροκυττάρων. Σε μερικές περιπτώσεις με ανεπάρκεια της πυρουβικής κινάσης, έχει εμφανιστεί αιμόλυση. Έχει περιγραφεί αιματολογική και ηλεκτροφορητική εικόνα επίκτητης αιμοσφαιρινοπάθειας H (μικροκυττάρωση, βασεόφιλη στίξη, δακρυοκύτταρα, στοχοκύτταρα), που οφείλεται σε καταστολή της σύνθεσης α-αλυσίδων αιμοσφαιρίνης, λόγω δράσης κάποιου μεταγραφικού παράγοντα. Στις περιπτώσεις αυτές παρατηρείται ενδοκυττάρια κατακρήμνιση τετραμερών των β-αλυσίδων, που παρατηρείται με τη μορφή εγκλείστων στους ερυθροβλάστες και τα ερυθρά.

ΚΟΚΚΙΟΚΥΤΤΑΡΑ ΚΑΙ ΜΟΝΟΚΥΤΤΑΡΑ

Ουδετεροπενία² είναι παρούσα σε περίπου 50% των ασθενών κατά τη διάγνωση. Η αναλογία των μονοκυττάρων² συχνά είναι αυξημένη, και η μονοκυττάρωση μπορεί να είναι η επικρατέστερη εκδήλωση της αιματολογικής ανωμαλίας για μήνες ή έτη. Μορφολογικές ανωμαλίες των ουδετερόφιλων μπορεί επίσης να εμφανιστούν, όχι σπάνια δε με την επίκτητη ανωμαλία Pelger-Huet. Στην κατάσταση αυτή τα ουδετερόφιλα έχουν πολύ συμπυκνωμένη χρωματίνη και μονόλοβο ή δίλοβο πυρήνα, που πολλές φορές μοιάζει με "ματογιάλια". Δακτυλιοειδείς πυρήνες μπορεί επίσης να εμφανιστούν στα ουδετερόφιλα αυτών των ασθενών. Η δραστηριότητα της αλκαλικής φωσφατάσης των ουδετερόφιλων σε μερικούς ασθενείς είναι μειωμένη, όπως μειωμένη είναι και η έκφραση των αντιγόνων επιφανείας των ουδετερόφιλων και των μονοκυττάρων, ενώ σε μερικές περιπτώσεις μπορεί να εμφανιστούν ανώμαλα αντιγόνα επιφανείας. Τα αντιγόνα αυτά μπορούν να αναγνωριστούν με μονοκλωνικά αντισώματα (βλ. ανοσολογικές ανωμαλίες). Η δράση της λυσοζύμης στο αίμα και η ουρία μπορεί να είναι αυξημένη, μια αντίδραση στην υπερπλασία των ουδετερόφιλων, την υψηλή μονοκυτταρική παραγωγή και την μονοκυτταρική καταστροφή.

Μελέτες στα ουδετερόφιλα των ασθενών με MDS έχουν δείξει ανωμαλίες στο περιεχόμενο των πρωτογενών και δευτερογενών κοκκίων. Η μεμβράνη των κοκκίων όμως παραμένει ακόμα μη επαρκώς μελετημένη, αν και ο ρόλος της στη δυναμική λειτουργία των κοκκίων είναι απαραίτητος. Σε μια μελέτη εξετάστηκαν οι γλυκοπρωτείνες της μεμβράνης των πρωτογενών και δευτερογενών κοκκίων του

περιφερικού αίματος και του μυελού ασθενών με MDS χρησιμοποιώντας μονοκλωνικά αντισώματα έναντι των γλυκοπρωτεϊνών. Εξετάστηκε επίσης η δραστικότητα της μυελοϋπεροξειδάσης, της ελαστάσης και της λακτοφερρίνης. Ανεπάρκεια των γλυκοπρωτεϊνών της μεμβράνης των κοκκίων ήταν πολύ κοινό εύρημα (στο 49% των ασθενών). Συμπεραίνει δηλαδή κανείς ότι στα MDS η ανεπάρκεια της μεμβράνης των κοκκίων μπορεί να είναι ένας κοινός μηχανισμός για πολλαπλές διαταραχές των κοκκίων και να εξηγεί τη δυσλειτουργία των κοκκιοκυττάρων¹³.

ΑΙΜΟΠΕΤΑΛΙΑ

Περίπου 25% των ασθενών μπορεί να εμφανίζουν ήπια έως και μέτρια θρομβοπενία² κατά τη διάγνωση. Ήπια θρομβοκυττάρωση μπορεί να υπάρχει επίσης. Τα αιμοπετάλια μπορεί να είναι μεγάλα, με φτωχή κοκκίωση, ή να έχουν μεγάλα τετηγμένα κεντρικά κοκκία. Η ανώμαλη λειτουργικότητα των αιμοπεταλίων μπορεί να συνεισφέρει στον παρατεταμένο χρόνο ροής, τις αυτόματες εκχυμώσεις ή και σε αθρόα πολλές φορές αιμορραγία. Μια συχνή ανωμαλία είναι και η μειωμένη συσσώρευση των αιμοπεταλίων σε απάντηση στο κολλαγόνο ή την επινεφρίνη.

ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΑ

Οι ασθενείς με προλευχαιμία μπορεί να έχουν στην περιφέρεια ελαττωμένο αριθμό NK κυττάρων (Natural Killers), όχι όμως και των μεγάλων κοκκιωδών λεμφοκυττάρων, ελαττωμένο αριθμό των Τ-βοηθητικών λεμφοκυττάρων και μείωση των υποδοχέων του ιού Epstein-Barr (CD21) στην επιφάνεια των Β-λεμφοκυττάρων τους². Φυσιολογική είναι η εξαρτώμενη από αντίσωμα κυτταροτοξικότητα. Μειωμένη είναι η ανάπτυξη και ωρίμανση της σειράς των Τ-λεμφοκυττάρων, όπως και της ενσωμάτωσης της θυμιδίνης μετά από μιτογόνο ερέθισμα. Τα λεμφοκύτταρα μπορεί να έχουν αυξημένη ευαισθησία στην ακτινοβολία. Σε μερικές περιπτώσεις οι διαταραχές της λεμφικής σειράς μπορεί να είναι το αποτέλεσμα των προλευχαιμικών ανωμαλιών στο πολυδύναμο αιμοποιητικό κύτταρο.

(2) ΣΤΗ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑ ΤΟΥ ΠΛΑΣΜΑΤΟΣ

Τα επίπεδα του σιδήρου, της τρανσφερρίνης και της φερριτίνης του πλάσματος μπορεί να είναι αυξημένα². Η γαλακτική δεϋδρογενάση (LDH) και το ουρικό οξύ αυξάνουν ως αποτέλεσμα της αυξημένης καταστροφής των προδρόμων μυελικών κυττάρων και της αναποτελεσματικής αιμοποίησης. Μονοκλωνική γαμμοπάθεια, πολυκλωνική υπεργαμμασφαιριναιμία και υπογαμμασφαιριναιμία μπορεί να εμφανιστούν, το καθένα με διαφορετική συχνότητα. Η συχνότητα παρουσίας αυτοαντισωμάτων ήταν αυξημένη σε μια μελέτη.

(3) ΣΤΟ ΜΥΕΛΟ

ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΤΗΤΑ

Η κυτταρικότητα² του μυελού είναι συνήθως φυσιολογική ή αυξημένη. Περιστασιακά μπορεί να είναι ελαττωμένη και μπορεί να υποδύεται υποπλαστική ή απλαστική αναιμία, αν και συνήθως είναι παρούσες νησίδες από δυσαιμοποιητικά κύτταρα, ιδιαίτερα άτυπα μεγακαρυοκύτταρα.

ΕΡΥΘΡΟΠΟΙΗΣΗ

Υπερπλασία² της ερυθράς σειράς είναι συχνό φαινόμενο και μπορεί να δει κανείς πολύ μεγάλους ή μικρούς ερυθροβλάστες, πυρηνική καταστροφή, στικτούς ερυθροβλάστες και φτωχή αιμοσφαιρινοποίηση. Οι προερυθροβλάστες μπορεί να επικρατούν και ο μυελός μπορεί να μην έχει φυσιολογικές νησίδες ή αθροίσματα ερυθροβλαστών. Οι ερυθροβλάστες μπορεί να μοιάζουν με μεγαλοβλάστες με

ασύγχρονη ωρίμανση πυρήνα-κυτταροπλάσματος ή κυτταροπλασματικά πυρηνικά κατάλοιπα. Αυτή η εικόνα αναφέρεται ως μεγαλοβλαστοειδής ερυθροποίηση. Παθολογικοί σιδηροβλάστες επίσης μπορεί να αναγνωριστούν στο μυελό. Αυτοί είναι ερυθροβλάστες με αυξημένο αριθμό και μέγεθος κοκκίων σιδήρου (κυτταροπλασματικά κοκκία που περιέχουν φερριτίνη) και αναφέρονται ως *ενδιάμεσοι σιδηροβλάστες*, ή ερυθροβλάστες με αυξημένη συγκέντρωση σιδήρου στα μιτοχόνδρια που παίρνει τη μορφή διακεκομμένου ή συνεχούς δακτυλιδιού από κοκκία σιδήρου στην περιφέρεια του πυρήνα και αναφέρονται ως *δακτυλιοειδείς σιδηροβλάστες*. Αυξημένος είναι και ο σίδηρος των μακροφάγων. Μερικοί πιστεύουν ότι οι δακτυλιοειδείς σιδηροβλάστες σχετίζονται με εκτροπή προς ΟΜΛ πιο σπάνια από ότι οι ενδιάμεσοι. Οι δακτυλιοειδείς σιδηροβλάστες συγκρινόμενοι με τους ενδιάμεσους είναι πολύ σπάνιοι ή εμφανίζονται σε πολύ μικρή αναλογία (<10%) στα MDS, αν εξαιρέσει κανείς βέβαια την επίκτητη ανθεκτική σιδηροβλαστική αναιμία.

ΚΟΚΚΙΟΠΟΙΗΣΗ

Η υπερπλασία² της κοκκιώδους σειράς είναι συχνή. Τα μονοκύτταρα στο μυελό μπορεί επίσης να είναι αυξημένα σε αριθμό. Οι ανωμαλίες στα κοκκιοκύτταρα περιλαμβάνουν μειωμένη κοκκίωση, μονοκυτταροειδή εμφάνιση των ουδετερόφιλων κοκκιοκυττάρων και παρουσία των κυττάρων Pelger-Huet. Τα μεταμυελοκύτταρα και τα μυελοκύτταρα μπορεί να είναι αυξημένα. Η οστεομυελική βιοψία μπορεί να δείξει έκτοπα ανώριμα προγονικά κύτταρα (ALIP), τα οποία είναι αθροίσματα άωρων μυελοειδών (βλαστικών;) κυττάρων που απαντούν μάλλον κεντρικά παρά κάτω από το ενδόστεο. Αυτά τα κύτταρα είναι παρόντα σχεδόν σε όλες τις περιπτώσεις των high risk MDS, που η αναλογία των βλαστικών κυττάρων στο μυελό είναι >3% των εμπύρηνων μυελικών κυττάρων (RAEB, RAEB-t, CMML) και σχεδόν στις μισές περιπτώσεις ασθενών με RA και RARS. Οι ασθενείς με αυτή την ανωμαλία είναι περισσότερο επιρρεπείς στο να αναπτύξουν ΟΜΛ. Τέλος, ο αριθμός των πλασματοκυττάρων μπορεί να είναι ήπια αυξημένος.

ΘΡΟΜΒΟΠΟΙΗΣΗ

Τα μεγακαρυοκύτταρα² είναι παρόντα σε φυσιολογικούς ή αυξημένους αριθμούς. Μπορεί να παρατηρηθούν μικρομεγακαρυοκύτταρα (τα μεγακαρυοκύτταρα dwarf). Τα μεγακαρυοκύτταρα με μονόλοβο ή δίλοβο πυρήνα μπορεί να είναι αυξημένα, ενώ μπορεί να παρουσιαστούν υπερκατάτμητα ή υποκατάτμητα μεγακαρυοκύτταρα. Δεν είναι σπάνιο να δει κανείς αθροίσματα μεγακαρυοκυττάρων. Τα μεγακαρυοκύτταρα, τέλος, μπορεί να απαντούν περιφερικότερα από τη συνήθη τους θέση.

ΙΝΩΣΗ

Συχνό φαινόμενο ιδιαίτερα στα high risk MDS είναι η αύξηση του δικτύου και των ινών κολλαγόνου στο μυελό². Η επονομαζόμενη υπερινωτική μυελοδυσπλασία μπορεί να μοιάζει με πρωτοπαθή μυελοϊνώση, σε αντίθεση όμως με την τελευταία, απουσιάζει η εκσεσημασμένη σπληνομεγαλία.

ΚΥΤΤΑΡΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ

Η κλωνική ανάπτυξη² των μυελικών προγονικών κυττάρων σε μαλακό άγαρ ή σε άλλα συστήματα κυτταροκαλλιέργειας συνήθως δεν είναι φυσιολογική σε ασθενείς με MDS. Οι περισσότερες αναφορές συμφωνούν πως η ανάπτυξη των πολυδύναμων προγονικών κυττάρων (CFU-GEMM) και των προγονικών κυττάρων της ερυθράς σειράς (BFU-E, CFU-E) στο αίμα ή στο μυελό είναι σημαντικά επηρεασμένη σε ασθενείς με MDS. Έχουν επίσης βρεθεί βιοχημικές ανωμαλίες των προγονικών κυττάρων της ερυθράς σειράς. Τα προγονικά κύτταρα για την κοκκιώδη και τη μονοκυτταρική σειρά (CFU-GM) είναι επίσης ελαττωμένα. Στις καλλιέργειες επικρατούν συχνά πολύ μικρές αποικίες ή κυτταρικά αθροίσματα με ελαττωματική ωρίμανση. Παθολογικά μικρά και σπάνια CFU-GM μπορεί να ανευρεθούν όταν ο

αριθμός των ουδετερόφιλων και των μονοκυττάρων του αίματος είναι σχεδόν φυσιολογικός. Περιστασιακά, η ανάπτυξη και διαφοροποίηση των προγονικών κυττάρων μπορεί να είναι αφθονότατη. Συνήθως τα αποτελέσματα των κυτταροκαλλιέργειών είναι περισσότερο παθολογικά, όσο περισσότερες είναι οι κυτταρικές ανωμαλίες στο περιφερικό αίμα. Στην OMA η ανάπτυξη του CFU-GM απουσιάζει. Μερικές μελέτες δείχνουν ότι η πολύ ανώμαλη ανάπτυξη των προγονικών αιμοποιητικών κυττάρων στις κυτταροκαλλιέργειες (ελαττωμένες αποικίες ή επικράτηση μικρών κυτταρικών αθροισμάτων) είναι φτωχό προγνωστικό σημείο και μπορεί να είναι προάγγελος OMA. Τα προγονικά κύτταρα των βλαστικών κυττάρων (CFU-BL) μπορεί να είναι αυξημένα σε ασθενείς με RAEB και RAEB-t. Ο κυκλοφορών CSF-1 είναι αυξημένος σε ορισμένους ασθενείς, όπως ακριβώς στην OMA και σε άλλες αιματολογικές κακοήθειες, για άγνωστο όμως λόγο. Τα επίπεδα της ιντερλευκίνης-1α (IL-1α) και του GM-CSF στους περισσότερους ασθενείς είναι μη ανιχνεύσιμα. Οι συγκεντρώσεις της ερυθροποιητίνης, του G-CSF και της ιντερλευκίνης-6 (IL-6) είναι μεταβαλλόμενες. Ο παράγων TNF (tumor necrosis factor) έχει σχέση αντιστρόφως ανάλογη προς τον αιματοκρίτη. Σε μερικούς ασθενείς ανευρίσκεται ελαττωμένος και ο παράγων SCF (stem cell factor), ένας πολυδύναμος αιμοποιητικός παράγοντας που δρα σε όλες τις κυτταρικές σειρές.

ΚΥΤΤΑΡΟΓΕΝΕΤΙΚΗ

Στο 30-70% των ασθενών με MDS αναγνωρίζονται κυτταρογενετικές ανωμαλίες, με τη συχνότητά τους να αυξάνεται με την αύξηση του κινδύνου από τη νόσο¹⁴. Είναι γνωστό ότι διαφορετικές κυτταρογενετικές ανωμαλίες μπορεί να παρατηρηθούν που είναι χαρακτηριστικές για τα MDS, όπως αποκοπή του 5q, μονοσωμία 7, αποκοπή του 7q, τρισωμία 8^{11,2}, αποκοπή του 11q, αποκοπή του 12p και αποκοπή του 20q¹⁵.

Η παρουσία καρυοτυπικών ανωμαλιών συνδέεται με την αυξημένη πιθανότητα μετατροπής του MDS σε OMA. Η επιβίωση των ασθενών με MDS που έχουν καρυοτυπικές ανωμαλίες (στα χρωμοσώματα 5,7 και 8) είναι μειωμένη, συγκρινόμενη με ασθενείς που έχουν φυσιολογικό καρυότυπο.

Είναι παντελώς άγνωστη η περίοδος μεταξύ της πρωταρχικής γενετικής διαταραχής και της εκδήλωσης της νόσου. Πάντως στα MDS που εμφανίζονται σε ασθενείς που νωρίτερα έλαβαν κυτταροτοξική χημειοθεραπεία για κακοήθεις όγκους υπάρχει υψηλότερη συχνότητα καρυοτυπικών ανωμαλιών. Η πλειονότητα των ανωμαλιών αυτών εδράζονται στα χρωμοσώματα 5 και 7. Επιπλέον, ασθενείς που έλαβαν χημειοθεραπεία "κρύβουν" στο περιφερικό τους αίμα μεταλλάξεις των ογκογονιδίων RAS και/ή FMS σε απουσία αιματολογικού νοσήματος, κάτι που μπορεί να αποτελεί την πρώτη εκδήλωση γενετικής βλάβης.

Βενζένιο, εντομοκτόνα και ακτινοβολία έχει βρεθεί ότι σχετίζονται με την ανάπτυξη MDS, μόνο το βενζένιο όμως είναι αιτιολογικά συνδεδεμένο στενά με τη μυελοδυσπλασία. In vitro το βενζένιο αυξάνει την απώλεια ή την αποκοπή του μακρού σκέλους των χρωμοσωμάτων 5 και 7 των κυκλοφορούντων λεμφοκυττάρων. Επίσης έχει βρεθεί ότι η έκθεση σε εντομοκτόνα και οργανικούς διαλύτες συνδέεται με ανωμαλίες στα χρωμοσώματα 5 και 7 σε ασθενείς με MDS και OMA.

Σε μια πρόσφατη μελέτη ασθενών με MDS οι συχνότερες κυτταρογενετικές ανωμαλίες ήταν η τρισωμία 8 και η απώλεια ή η αποκοπή του χρωμοσώματος 5 και 7. Το 35% των ασθενών που μελετήθηκαν είχαν κυτταρογενετικές ανωμαλίες. Οι ασθενείς με κυτταρογενετικές ανωμαλίες ήταν πιο ηλικιωμένοι, επικρατούσαν οι άνδρες, ενώ με την ταξινόμηση κατά FAB κατατάσσονταν στις κατηγορίες RAEB και RAEB-t, αλλά καμία από τις παρατηρήσεις αυτές δεν ήταν στατιστικά σημαντική. Οι ασθενείς με MDS της μελέτης που είχαν ιστορικό έκθεσης σε κάποιο παράγοντα

είχαν συχνότερα κυτταρογενετικές ανωμαλίες απ'ότι φυσιολογικό καρυότυπο. Σε ασθενείς με ανωμαλίες του χρωμοσώματος 5 βρέθηκε αυξημένη έκθεση σε ανόργανα αέρια, ενώ σε ασθενείς με ανωμαλίες του χρωμοσώματος 7 βρέθηκε αυξημένη έκθεση σε οργανικές και ανόργανες (άσβεστος, σιλικόνη, φορμάικα) σκόνες και ανόργανα αέρια. Οργανικές ενώσεις, μέταλλα (χαλκός, νικέλιο, χάλυβας και κασσίτερος), ημιμέταλλα (αρσενικό) και ακτινοβολία ήταν οι κύριοι παράγοντες έκθεσης ασθενών με ανωμαλίες του χρωμοσώματος 8.

Η ειδική σχέση των αλκυλιωτικών χημειοθεραπευτικών παραγόντων, καθώς και των περιβαλλοντικών παραγόντων (ανόργανα αέρια, σκόνες) με τις βλάβες των χρωμοσωμάτων 5 και 7 των ασθενών με MDS στηρίζει την άποψη ότι στα χρωμοσώματα αυτά υπάρχουν ογκοκατασταλτικά γονίδια που ρυθμίζουν την αιμοποίηση, απώλεια της λειτουργίας των οποίων σχετίζεται με την παθογένεση των MDS/OMΛ. Όσο για την περίπτωση της τρισωμίας 8, εκεί προτείνεται μια ανωμαλία των ρυθμιστών της κυτταρικής διαίρεσης¹⁴.

Σε μια άλλη μελέτη ασθενών με MDS, το 51% παρουσίασε κλωνικές καρυοτυπικές ανωμαλίες κατά τη διάγνωση. Οι πιο συχνές ανωμαλίες ήταν αποκοπή 5q, μονοσωμία 5, μονοσωμία 7/αποκοπή 7q, τρισωμία 8, αναστροφή του 11q, αποκοπή του 12p, αναστροφή του 12q, αναστροφή του 13q, αναστροφή του 17q, αποκοπή του 20q, απώλεια του Y. Οι ανωμαλίες αυτές βρέθηκαν είτε ως μόνες ή σε συνδυασμό με άλλες ανωμαλίες. Το 36% των ασθενών με ανωμαλίες είχε μία απλή μόνο χρωμοσωμική ανωμαλία. Σε 26% των ασθενών παρατηρήθηκαν πολλαπλές ανωμαλίες. Σύμφωνα και με τη FAB ταξινόμηση χρωμοσωμικές ανωμαλίες είχαν το 43% των ασθενών με RA, το 33% των ασθενών με RARS, το 61% των ασθενών με RAEB, το 70% των ασθενών με RAEB-t και το 42% των ασθενών με CMML. Στη RA οι πιο συχνές ανωμαλίες ήταν η αποκοπή του 5q, η τρισωμία 8, η απώλεια του Y και η αποκοπή του 20q, στη RAS ήταν η αποκοπή του 5q, η τρισωμία 8 και η αποκοπή του 20q, στη RAEB η αποκοπή του 5q, η μονοσωμία 7, η αποκοπή του 7q, η τρισωμία 8 και η αποκοπή του 12p, στη RAEB-t η αποκοπή του 5q, η μονοσωμία 7 και η τρισωμία 8 και στη CMML η τρισωμία 8 και η αποκοπή του 12p. Στην παραπάνω μελέτη οι κυτταρογενετικές ανωμαλίες είχαν μεγάλη επίδραση στην επιβίωση, καθώς και στον κίνδυνο της μετατροπής σε OMΛ. Οι ασθενείς με μη φυσιολογικό καρυότυπο είχαν βραχύτερη επιβίωση και υψηλότερο κίνδυνο μετατροπής σε OMΛ από εκείνους με φυσιολογικό καρυότυπο. Ο αριθμός των κυτταρογενετικών ανωμαλιών επίσης είχε αντίκτυπο στην εξέλιξη. Η ομάδα των ασθενών με σύμπλεγμα καρυοτυπικών ανωμαλιών είχε τη χειρότερη πρόγνωση, η ομάδα των φυσιολογικών καρυοτύπων είχε την καλύτερη εξέλιξη και η ομάδα των ασθενών με μία ή δύο καρυοτυπικές ανωμαλίες είχε ενδιάμεση πρόγνωση. Περιπτώσεις με αποκοπή του 5q, αποκοπή του 11q, αποκοπή του 12p, αποκοπή του 20q και απώλεια του Y εμφάνισαν μακρότερη επιβίωση από το σύνολο των ασθενών με ανωμαλίες, τη στιγμή που ασθενείς με αναστροφή του 1q, αποκοπή του 3q, μονοσωμία 7, τρισωμία 8, αποκοπή του 7q, απώλεια του -X και αποκοπή του 13q εμφάνισαν βραχύτερη επιβίωση. Συμπερασματικά στη μελέτη αυτή φάνηκε ότι οι ασθενείς με υπότυπο RAEB και RAEB-t παρουσίασαν το υψηλότερο ποσοστό κυτταρογενετικών ανωμαλιών, ενώ ασθενείς με RARS και CMML το χαμηλότερο. Οι πιο συχνές κυτταρογενετικές ανωμαλίες ήταν η αποκοπή του 5q, η τρισωμία 8, η μονοσωμία 7 και η αποκοπή του 7q, με την αποκοπή του 5q να είναι η πιο συχνή ανωμαλία όλων. Στην πιο πάνω μελέτη οι κυτταρογενετικές ανωμαλίες, η αναλογία βλαστών στο μυελό και η αιμοσφαιρίνη ήταν οι κύριοι προγνωστικοί παράγοντες για την επιβίωση, ενώ οι δύο πρώτοι παράγοντες μαζί με τον αριθμό των αιμοπεταλίων ήταν οι κύριοι προγνωστικοί παράγοντες για τη μετατροπή σε OMΛ¹⁵.

Η κυτταρογενετική με την ανάλυση Southern Blot¹⁶ από κοινού δίνουν πολλές πληροφορίες για τη συμμετοχή περισσότερων του ενός κλώνων στη παθογένεια των MDS, καθώς και για την κλωνική εξέλιξη στην πορεία της νόσου. Οι δύο αυτές μέθοδοι χρησιμοποιούμενες μαζί επιπλέον βοηθούν στην παρακολούθηση της πορείας της νόσου και στη μελέτη της απάντησης στη θεραπεία. Με τη βοήθεια της ανάλυσης Southern Blot οι πιο συχνές γονιδιακές ανακατατάξεις που παρατηρήθηκαν ήταν στα γονίδια Ig-JH, TcR-β, M-bcr, GM-CSF, G-CSF, IL-3. Η μοριακή απόδειξη της ύπαρξης μιας γονιδιακής αναδιάταξης, βέβαια, δε συνυπάρχει πάντα με την απόδειξη της ύπαρξης χρωμοσωμικής ανωμαλίας στο χρωμόσωμα που εδράζεται το αναδιαταχθέν γονίδιο.

ΣΥΝΔΡΟΜΟ 5q-

Οι ασθενείς με το σύνδρομο 5q-² έχουν ανθεκτική αναιμία και δυσπλαστικά κύτταρα στο μυελό, και κυτταρογενετική έλλειψη πλήρη ή μερική του μακρού βραχίονα του χρωμοσώματος 5 (5q-). Η ανθεκτική αναιμία αυτή που παρουσιάζεται συνηθέστερα σε ηλικιωμένες γυναίκες συνδέεται με δυσερυθροποίηση, πολυπύρρηνα ερυθρά και μεγακαρυοκύτταρα συχνά μικρά (dwarf) και με λίγους λοβούς.

Τα γονίδια που κωδικοποιούν τη σύνθεση των αυξητικών παραγόντων IL-3, GM-CSF, IL-4, IL-5, IL-9 εδράζονται στο τμήμα του χρωμοσώματος 5 που αποκόπτεται στο σύνδρομο 5q-, αν και η χαρτογράφηση των γονιδίων δείχνει ότι τα γονιδιακά αθροίσματα IL-3/GM-CSF και IL-4/IL-5 είναι πολύ κοντά αλλά έξω από την ανασυνδυασμένη περιοχή 5q31 που συνδέεται με την εμφάνιση μυελοβλαστικών λευχαιμιών. Το γονίδιο FMS που κωδικοποιεί τον υποδοχέα για τον CSF-1 όμως εδράζεται στο μακρύ βραχίονα του χρωμοσώματος 5 στην περιοχή που αποκόπτεται στο σύνδρομο 5q-. Τα γονίδια για τρεις επιπλέον αυξητικούς παράγοντες (IL-1, PDGF [platelet derived growth factor] και τον αυξητικό παράγοντα των ενδοθηλιακών κυττάρων) βρίσκονται επίσης στο χρωμόσωμα 5, αλλά όχι στην περιοχή που βλάπτεται στο σύνδρομο 5q-. Ο παθογενετικός ρόλος των γονιδίων που αποκόπτονται στο σύνδρομο αυτό δεν είναι γνωστός από τη στιγμή που μόνο ένα αλληλίο προσβάλλεται και τα μη προσβεβλημένα κύτταρα (T-λεμφοκύτταρα, ινοβλάστες, ενδοθηλιακά κύτταρα) μπορούν επίσης να παράγουν αναγνωρίσιμα επίπεδα αυξητικών παραγόντων.

Ένας αριθμός γονιδίων των αυξητικών παραγόντων όπως τα γονίδια EGR, CDC25C, και γονίδια που ρυθμίζουν την παραγωγή ιντερφερόνης επίσης εδράζονται στο χρωμόσωμα 5q. Ένα ογκοκατασταλτικό γονίδιο πιθανώς να βρίσκεται στην περιοχή 5q31, την μικρότερη περιοχή που αποκόπτεται σχεδόν σε όλες τις περιπτώσεις του συνδρόμου 5q. Το γονίδιο του ρυθμιστικού παράγοντα-1 της ιντερφερόνης (IRF-1) που κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη η οποία συνδέεται με ένα μόριο που προάγει την έκκριση IFN-α και IFN-β, αλλά και άλλα γονίδια ρυθμιστικά της ιντερφερόνης, εδράζονται επίσης στην περιοχή 5q31. Στο σχετικά καλόηθες σύνδρομο 5q μπορεί να δει κανείς πολύ κοντινές ρήξεις στην περιοχή 5q12 ως 5q15, που σχετίζονται με τη διατήρηση του αριθμού των κοκκιοκυττάρων και των αιμοπεταλίων σε φυσιολογικά επίπεδα, μειώνοντας έτσι την επίπτωση φλεγμονής και αιμορραγικών επιπλοκών. Οι ασθενείς με τη διαταραχή αυτή έχουν κίνδυνο να αναπτύξουν ΟΜΛ (15%) που μοιάζει με αυτόν των ασθενών με ανθεκτική αναιμία και μυελικά κύτταρα χωρίς 5q-.

ΜΟΝΟΣΩΜΙΑ 7

Η μονοσωμία 7² είναι η δεύτερη σε σειρά συχνότητας κυτταρογενετική ανωμαλία στα μυελικά κύτταρα των ασθενών με μυελοδυσπλασία. Συνήθως εμφανίζεται σε μυελικά κύτταρα ασθενών που εκτέθηκαν σε χημικά ή ακτινοβολία και φαίνεται να προδιαθέτει σε ταχεία εκτροπή προς ΟΜΛ. Τα σύνδρομα με μονοσωμία 7, εκτός του

ότι είναι δύσκολο να κατηγοριοποιηθούν, συνήθως δε συνδέονται με ιδιαίτερα κλινικά σύνδρομα σε ενήλικες, ενώ στα παιδιά ενέχονται σε ασυνήθιστη ευαισθησία στην εμφάνιση λοιμώξεων και ταχεία εκτροπή προς ΟΜΛ. Η μονοσωμία 7 επίσης εμφανίζεται και με μια οικογενή μορφή, καθώς και κατά τη διάρκεια εκτροπής προς ΟΜΛ του συνδρόμου Down και της αναιμίας Fanconi. Μια ποικιλία της μονοσωμίας 7 (μετάθεση 1;7) επίσης έχει παρατηρηθεί σε παιδιά και ενήλικες και μπορεί να προκαλείται από έκθεση σε κυτταροτοξική χημειοθεραπεία. Το γονίδιο ERB-B που κωδικοποιεί μια μορφή του υποδοχέα του αυξητικού παράγοντα της επιδερμίδας ενισχύεται στο σύνδρομο αυτό. Το χρωμόσωμα Philadelphia [t(9q+;22q-)] έχει επίσης αναφερθεί σε ασθενείς με μυελοδυσπλασία¹²⁴. Στον πίνακα 7 παρατίθενται οι συχνότερες κυτταρογενετικές ανωμαλίες, και στον πίνακα 8 ορισμένες σπάνιες αλλά σημαντικές τέτοιες ανωμαλίες.

ΠΙΝΑΚΑΣ 7
ΕΠΙΠΤΩΣΗ ΤΩΝ ΠΙΘ ΣΥΧΝΩΝ ΧΡΩΜΟΣΩΜΙΚΩΝ ΑΝΩΜΑΛΙΩΝ ΣΕ
ΠΡΩΤΟΠΑΘΕΣ MDS³

ΑΡΙΘΜΗΤΙΚΗ ΧΡΩΜΟΣΩΜΙΚΗ ΑΝΩΜΑΛΙΑ	ΜΕΤΑΘΕΣΗ	ΑΠΟΚΟΠΗ	ΑΛΛΗ
-7 (15%)	t (1;3) (1%)	5q (27%)	Inv3 (1%)
+7 (5%)	t (1;7) (2%)	7q (4%)	Iso17q (5%)
+8 (19%)	t (3;3) (1%)	11q (7%)	
	t (6;9) (<1%)	12q (5%)	
		13q (2%)	
		20q (5%)	
ΣΥΝΟΛΟ: 39%	ΣΥΝΟΛΟ: 5%	ΣΥΝΟΛΟ: 50%	ΣΥΝΟΛΟ: 6%

ΠΙΝΑΚΑΣ 8
ΣΠΑΝΙΟΤΕΡΕΣ ΚΥΤΤΑΡΟΓΕΝΕΤΙΚΕΣ ΑΝΩΜΑΛΙΕΣ³

- t(5;12)(q33;p13) και άλλες t(.....;12)(.....;p13)→Παρατηρείται κυρίως στη CMML, αλλά και σε άλλες MDS ανωμαλίες
- Τρισωμία 6→Χρήσιμη στη διαφορική διάγνωση μεταξύ απλαστικής αναιμίας και υποπλαστικού MDS
- t(Y;1)(q12;q12), t(1;15)(p11;p11), t(1;16)(q11;q11)
- Del(17)(p)→Στην ανωμαλία αυτή παρατηρείται μια ειδική μορφή δυσκοκκιοποίησης, με συνδυασμό ψευδο-Pelger-Huet υπολόβωση των πυρήνων και μικρών κενοτοπίων στα ουδετερόφιλα. Στην ανωμαλία αυτή παρατηρείται σημειακή μετάλλαξη του γονιδίου p53
- Ανακατατάξεις του 3q
- t(3;21)→Εμφανίζεται συνήθως μετά από θεραπεία με αλκυλιωτικούς παράγοντες, επιποδοφυλλοτοξίνες ή μετά από έκθεση σε οργανικούς διαλύτες

ΑΝΟΣΟΛΟΓΙΚΕΣ ΔΙΑΤΑΡΑΧΕΣ ΣΕ ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ MDS

Τα αντιγόνα επιφανείας των ώριμων αιμοποιητικών κυττάρων^{17,18} (όπως π.χ. των μονοκυττάρων και των ουδετερόφιλων) αποτελούν το βιολογικό αισθητήριο που επιτρέπει στα κύτταρα να αλληλεπιδρούν με άλλα κύτταρα ή με την εξωκυττάρια θεμέλια ουσία και έτσι να απαντούν σε ποικίλα ερεθίσματα. Πολλαπλοί μηχανισμοί ενέχονται στην ανώμαλη έκφραση των αντιγόνων επιφανείας στα μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα και περιλαμβάνουν: 1) την αναποτελεσματική κοκκιοποίηση, 2) την

ανεπαρκή ενδοκυττάρια αποθήκευση, 3) τις ανωμαλίες της μεμβράνης των κυτταροπλασματικών κοκκίων, και 4) τη δράση των υψηλών επιπέδων των κυτοκινών στο μυελό, όπως ο TNF- α και ο TGF- β .

Οι ανοσοφαινοτυπικές αλλαγές που παρατηρούνται στους ασθενείς με MDS συνηγορούν υπέρ της ύπαρξης αυξημένης κυτταρικής ενεργοποίησης σ' αυτούς. Η ενεργοποίηση *in vivo* και *in vitro* των μονοκυττάρων και των ουδετερόφιλων συνδέεται με μεταβολές στην έκφραση των μορίων επιφανείας τους. Στις λοιμώδεις νόσους τα μυελομονοκυτταρικά φαγοκύτταρα παρουσιάζουν χαρακτηριστικές ανοσοφαινοτυπικές αλλαγές όταν συγκρίνονται με υγιείς μάρτυρες. Αυτό ήταν το έναυσμα να διερευνηθεί εάν παρατηρούνται τέτοιου είδους ανοσοφαινοτυπικές αλλαγές στο μονοκύτταρο και τα ουδετερόφιλα των πασχόντων με μυελοδυσπλασία, στο βαθμό που οι λοιμώξεις στους ασθενείς αυτούς επηρεάζουν την κλινική πορεία και πρόγνυσή τους.

Η χρήση *in vitro* ποικιλίας κυτοκινών όπως π.χ. IFN- γ , GM-CSF έχει ως αποτέλεσμα τυπικές μεταβολές του μεμβρανικού ανοσοφαινότυπου. Τέτοιες αλλαγές μπορεί να παρατηρηθούν και κατά την ενεργοποίηση των κυττάρων που επισυμβαίνει με σύνδεση των συστατικών του συμπληρώματος με τους κυτταρικούς του υποδοχείς, σύνδεση ανοσοσυμπλεγμάτων με κυτταρικούς υποδοχείς (Fc γ R), ή σύνδεση με τους κυτταρικούς υποδοχείς συστατικών του μικροβιακού τοιχώματος, όπως οι λιποπολυσακχαρίτες.

In vivo η χρήση ανασυνδυσμένης IFN- γ αυξάνει τη έκφραση του Fc γ R (CD64) στα μυελομονοκύτταρα. Σε μελέτες που έγιναν σε ασθενείς με μη αιματολογικές κακοήθειες, παρατηρήθηκαν τα εξής: κατόπιν ενεργοποίησης με τις κυτοκίνες IFN- α , IFN- γ , GM-CSF, βρέθηκε αυξημένη έκφραση σε ουδετερόφιλα και/ή μονοκύτταρα των μορίων CD11b (υποδοχέας 3 του συμπληρώματος) και CD67 (πρωτεΐνη επιφανείας που συνδέεται με την ενεργοποίηση των ουδετερόφιλων). Το ίδιο αποτέλεσμα παρατηρήθηκε και για το μόριο ενεργοποίησης M5 (εκτός από τη χρήση GM-CSF στα μονοκύτταρα). Τα μόρια CD64 και CD35 (υποδοχέας 1 του συμπληρώματος) παρουσίασαν αυξημένη έκφραση μετά από ενεργοποίηση με IFN- γ και GM-CSF, αλλά όχι με IFN- α .

Οι λοιμώδεις και φλεγμονώδεις παθήσεις προκαλούν αλλαγές στον ανοσοφαινότυπο των μυελομονοκυττάρων παρόμοιες με αυτές που προκαλεί η *in vitro* και *in vivo* ενεργοποίηση των κυττάρων αυτών με κυτοκίνες. Στα κοκκιοκύτταρα βρέθηκε μεταβολή στην έκφραση των μορίων CD64, CD35, CD11b, CD11c (υποδοχέας 4 του συμπληρώματος), CD67, CD24, M5 (μόρια ενεργοποίησης), CD11a (συνδεόμενο με τη λειτουργία των λευκοκυττάρων-αντιγόνο 1) και CD31 (μόριο προσκόλλησης). Στα μονοκύτταρα παρατηρήθηκαν αξιοσημείωτες μεταβολές στην έκφραση των CD64, CD35, CD11b, CD31, M5, M6 και MHC τύπου II.

Σε ασθενείς με MDS, που όμως δεν πληρούσαν τα κλινικά κριτήρια φλεγμονής ή λοίμωξης, έγινε σε μια μελέτη προσπάθεια να καταγραφούν οι μεταβολές στον ανοσοφαινότυπο των κοκκιοκυττάρων και των μονοκυττάρων, τόσο υψηλού κινδύνου (RAEB, CMML, RAEB-t) όσο και σε χαμηλού κινδύνου (RA, RARS) μυελοδυσπλασία, και συγκρίθηκαν οι μεταβολές αυτές με υγιείς μάρτυρες.

Παρατηρήθηκε λοιπόν αύξηση της έκφρασης του CD11b στα κοκκιοκύτταρα ασθενών με υψηλού κινδύνου MDS και στα μονοκύτταρα ασθενών με υψηλού αλλά και χαμηλού κινδύνου MDS. Το CD35 βρέθηκε αυξημένο στα μονοκύτταρα των ασθενών με χαμηλού κινδύνου MDS και καμία μεταβολή της έκφρασής του δεν παρατηρήθηκε στα κοκκιοκύτταρα. Μάλιστα σ'ότι αφορά στο CD35 αυξημένη έκφρασή του παρατηρήθηκε μόνο σε περιπτώσεις μέτριας ενεργοποίησης, ενώ σε περιπτώσεις δυναμικής ενεργοποίησης φάνηκε η έκφρασή του να είναι μειωμένη,

πιθανώς λόγω απελευθέρωσης του μορίου από την κυτταρική επιφάνεια. Η *in vitro* ενεργοποίηση, εξάλλου, των μυελομονοκυττάρων με κυτοκίνες όπως η IFN- γ και η IL-8 αυξάνει την έκφραση των μορίων CD11b και CD35 στην κυτταρική επιφάνεια. Το CD64 βρέθηκε αυξημένο στα μονοκύτταρα ασθενών με υψηλού και χαμηλού κινδύνου MDS. Η έκφραση του CD64 στην επιφάνεια των μυελομονοκυττάρων αυξάνει με *in vitro* ενεργοποίηση με IFN- γ . Το CD67 είναι μια πρωτεΐνη ενεργοποίησης 100 kD (που συνδέεται με φωσφατιδυλοϊνοσιτόλη) και εκφράζεται αποκλειστικά στα κοκκιοκύτταρα. Ένα άλλο μέλος της οικογένειας των αντιγόνων ενεργοποίησης που συνδέονται με φωσφατιδυλοϊνοσιτόλη είναι και το M5. Στα MDS βρέθηκε αυξημένη έκφραση του M5 στα κοκκιοκύτταρα των ασθενών υψηλού κινδύνου σε σχέση με τους χαμηλού κινδύνου ασθενείς. Η έκφραση του CD67 στα κοκκιοκύτταρα βρέθηκε αυξημένη τόσο στους υψηλού, όσο και στους χαμηλού κινδύνου ασθενείς με MDS. Η έκφραση του μορίου αυτού στα κοκκιοκύτταρα αυξάνει μετά από ενεργοποίηση με IFN- γ , GM-CSF και TNF- α . Επίσης αυξημένη ήταν η έκφραση του M5 στα μονοκύτταρα τόσο των υψηλού όσο και των χαμηλού κινδύνου MDS ασθενών. Το CD44 είναι μια πρωτεΐνη επιφανείας που εκφράζεται από ένα μεγάλο φάσμα κυττάρων. Ειδικά μονοκλωνικά αντισώματα που συνδέουν το μόριο αυτό αναστέλλουν τη σύνδεση των λεμφοκυττάρων στο ενδοθήλιο των φλεβιδίων. Αυξημένη έκφραση του μορίου αυτού βρέθηκε σε κοκκιοκύτταρα των ασθενών με υψηλού κινδύνου MDS.

Όπως δηλαδή φάνηκε, οι ανοσοφαινοτυπικές αλλαγές είναι έκδηλες κυρίως στους ασθενείς με υψηλού κινδύνου μυελοδυσπλασία, όπου ακολουθούνται από ενεργοποίηση των μονοκυττάρων και των κοκκιοκυττάρων, ενώ στα χαμηλού κινδύνου MDS μόνο τα μονοκύτταρα -αλλά όχι και τα κοκκιοκύτταρα- ενεργοποιούνται. Τα μονοκύτταρα δηλαδή μπορεί να είναι πιο ευαίσθητα στην *in vitro* ενεργοποίηση από τα κοκκιοκύτταρα. Τα μόρια που προαναφέρθηκε ότι μεταβάλλουν την έκφρασή τους στην *in vitro* κυτταρική ενεργοποίηση σε ασθενείς με μυελοδυσπλασία είναι από μόνα τους ελκυστικοί υποψήφιοι για δείκτες πρόωμης διάγνωσης μιας αρχόμενης ή μιας λανθάνουσας λοίμωξης στους ασθενείς αυτούς. Πάντως, η ελαττωματική διαφοροποίηση και πολλαπλασιασμός των πρόδρομων μυελικών κυττάρων ασθενών με MDS μπορεί να είναι το αποτέλεσμα μειωμένης απάντησης σε αιμοποιητικούς αυξητικούς παράγοντες. Παρόλα αυτά, οι κυτοκίνες IL-3, GM-CSF, G-CSF και IL-6 έχουν βρεθεί αυξημένες σε ασθενείς με μυελοδυσπλαστικό σύνδρομο. Αυτό θα μπορούσε να συμβαίνει είτε ως αντισταθμιστικός μηχανισμός που στόχο θα είχε να διορθώσει τις κυτταροπενίες, είτε ως αυτοκρινής ή παρακρινής παραγωγή κυτοκινών λόγω του MDS, είτε στα πλαίσια μιας άνοσης απάντησης λόγω μιας φλεγμονής ή μιας λοίμωξης που λαμβάνει χώρα στους ασθενείς αυτούς. Παρατηρήθηκε όμως ότι η αύξηση στην παραγωγή των κυτοκινών και οι ανοσοφαινοτυπικές μεταβολές είναι γεγονότα μεταξύ τους ανεξάρτητα. Ειδικό ενδιαφέρον παρουσιάζει η IL-6, η οποία εκτός από την αιμοποίηση επιπλέον ρυθμίζει την άνοση απάντηση και την αντίδραση οξείας φάσης και παίζει κεντρικό ρόλο στην άμυνα του ξενιστή απέναντι σε φλεγμονές, λοιμώξεις και ιστικές καταστροφές.

Οι ανοσοφαινοτυπικές μεταβολές, λοιπόν, η αυξημένη παραγωγή κυτοκινών και η μειωμένη λειτουργική ικανότητα των μυελομονοκυττάρων των MDS ασθενών μπορεί να οφείλεται σε *in vitro* κυτταρική προενεργοποίηση, η οποία με τη σειρά της μπορεί να είναι το αποτέλεσμα των συχνών λοιμώξεων των ασθενών αυτών. Σε ασθενείς με χαμηλού κινδύνου MDS οι ανοσοφαινοτυπικές αλλαγές παρατηρούνται μόνο στα μονοκύτταρα των ασθενών αυτών, τη στιγμή που σε ασθενείς υψηλού κινδύνου η *in*

νίνο ενεργοποίηση επιφέρει αλλαγές στον ανοσοφαινότυπο τόσο των μονοκυττάρων όσο και των κοκκιοκυττάρων.

Ως γνωστόν, τα πολυμορφοπύρρηνα των MDS ασθενών είναι λειτουργικά ανεπαρκή και οι ασθενείς αντιμετωπίζουν υψηλό κίνδυνο λοιμώξεων απειλητικών για τη ζωή. Πράγματι, έχουν περιγραφεί ανωμαλίες στη χημειοταξία, την ενζυμική απελευθέρωση, την προσκόλληση και συσσώρευση των κοκκιοκυττάρων των ασθενών, γι' αυτό και οι τελευταίοι παρουσιάζουν αυξημένη επίπτωση βακτηριακών και μυκητιασικών λοιμώξεων. Οι λοιμώξεις αυτές παρουσιάζονται ακόμα και σε απουσία ουδετεροπενίας, κάτι που σημαίνει ότι το πλέον σημαντικό δεν είναι ο αριθμός, αλλά η λειτουργικότητα των ουδετερόφιλων.

Οι γλυκοπρωτείνες CD11a, CD11b, CD11c, CD18 ρυθμίζουν ως γνωστόν τη λευκοκυτταρική προσκόλληση, την κινητικότητα, τη διαπίδυση και την ιστική μετανάστευση. Αυτές οι γλυκοπρωτείνες υφίστανται ως διμερή που αποτελούνται από μια α υπομονάδα (CD11a, CD11b, CD11c) και μια β υπομονάδα (CD18). Σε μια πρόσφατη μελέτη¹⁹ δείχθηκε ότι τα κοκκιοκύτταρα των MDS ασθενών παρουσίαζαν μείωση στη χημειοτακτική ικανότητα όταν εκτέθηκαν σε καζείνη, FMLP, και ορό ενεργοποιημένο από E.Coli. Επίσης μειωμένη βρέθηκε να είναι και η συσσώρευση των κοκκιοκυττάρων. Παράλληλα εντοπίστηκε αξιοσημείωτα μειωμένη έκφραση των επιφανειακών γλυκοπρωτεϊνών CD11b/CD18 στα κοκκιοκύτταρα των MDS ασθενών. Τα επίπεδα έκφρασης των CD11a και CD11c δεν παρουσίασαν στατιστικά σημαντικές διαφορές σε σχέση με τους μάρτυρες. Πιθανώς τα ευρήματα αυτά να υποστηρίζουν την υπόθεση ότι οι μεμβρανικοί υποδοχείς είναι βασικοί παράγοντες για την ομοτυπική συσσώρευση και η μειωμένη έκφρασή τους συγγενεύει με τη μειωμένη προσκόλληση και χημειοταξία των ουδετερόφιλων στους MDS ασθενείς. Επίσης, είναι γνωστό ότι τα κοκκιοκύτταρα που παρουσιάζουν ανεπάρκεια των ειδικών κοκκίων δεν εκφράζουν το CD11b/CD18 στην επιφάνειά τους μετά τη διέγερσή τους, κάτι που σημαίνει ότι τα ειδικά κοκκία μπορεί να είναι η ενδοκυττάρια αποθήκη των αντιγόνων αυτών. Άλλωστε μετά τη λευκοκυτταρική διέγερση, τα κοκκία μετακινούνται προς την κυτταρική μεμβράνη προκειμένου να απελευθερώσουν το περιεχόμενό τους. Τέλος, ακόμα και τα επίπεδα του m-RNA -που μεταβιβάζει το σήμα για την παραγωγή του CD11b/CD18- μπορούν να επηρεάζουν τόσο την παραγωγή όσο και την έκφραση του μορίου στην κυτταρική επιφάνεια. Επομένως στα MDS η μειωμένη παραγωγή και αποθήκευση, όπως και η μειωμένη έκφραση τελικά του CD11b/CD18 στην επιφάνεια των κοκκιοκυττάρων μπορεί να είναι μία από τις αιτίες της λειτουργικής ανεπάρκειας των κυττάρων αυτών και να αντικατοπτρίζει την ευαισθησία των MDS ασθενών σε λοιμώξεις.

Στον παρακάτω πίνακα 9 αναφέρονται τα σημαντικότερα αντιγόνα επιφανείας, τα κύτταρα που τα εκφράζουν και η μεταβολή ή όχι της φυσιολογικής τους έκφρασης στα μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα²⁰.

ΠΙΝΑΚΑΣ 9

ΑΝΤΙΓΟΝΑ ΕΠΙΦΑΝΕΙΑΣ- ΑΝΩΜΑΛΙΕΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΟΥΣ ΣΤΑ MDS²⁰

ΑΝΤΙΓΟΝΟ ΕΠΙΦΑΝΕΙΑΣ	ΚΥΤΤΑΡΑ ΠΟΥ ΤΟ ΕΚΦΡΑΖΟΥΝ	ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΟΥ ΜΟΡΙΟΥ ΣΤΑ MDS
ΥΠΟΔΟΧΕΙΣ ΣΥΜΠΛΗΡΩΜΑΤΟΣ		
CD35 (CR1)	Ερυθρά, Β-λεμφοκύτταρα, μερικά Τ-λεμφοκύτταρα, μονοκύτταρα, ηωσινόφιλα, ουδετερόφιλα, θυλακιώδη δενδριτικά κύτταρα	Μειωμένη έκφραση στα ουδετερόφιλα, αυξημένη έκφραση στα μονοκύτταρα των low risk ασθενών
CD21 (CR2, EBVR)	Β-λεμφοκύτταρα, θυλακιώδη δενδριτικά κύτταρα	Μειωμένη έκφραση στα λεμφοκύτταρα σε 3 περιπτώσεις ασθενών με MDS
CD11b (CR3)	Ουδετερόφιλα, ηωσινόφιλα, βασεόφιλα, μονοκύτταρα, μερικά λεμφοκύτταρα, NK κύτταρα	Μειωμένη έκφραση στα κοκκιοκύτταρα του μυελού (συνυπάρχει με ανεπάρκεια του CD16), απουσία του από τους βλάστες, αυξημένη έκφραση σε μονοκύτταρα και ουδετερόφιλα στο περιφερικό αίμα των high risk ασθενών, συχνά μειωμένη έκφραση στα ουδετερόφιλα (συνυπάρχει με ανεπάρκεια του CD35)
CD11c (CR4, gp150/95)*	Μονοκύτταρα, μακροφάγα, κοκκιοκύτταρα, μερικά λεμφοκύτταρα	Φυσιολογική έκφραση
ΥΠΟΔΟΧΕΙΣ Fcγ		
CD64 (FcγRI)	Μονοκύτταρα	Αυξημένη έκφραση στα μονοκύτταρα
CD32 (FcγRII)	Ουδετερόφιλα, μονοκύτταρα, Β-λεμφοκύτταρα, αιμοπετάλια	Μειωμένη έκφραση στα ουδετερόφιλα
CD16 (FcγRIII)*	NK κύτταρα, μακροφάγα, ουδετερόφιλα	Απουσία του από τους βλάστες, μειωμένη έκφραση σε high risk MDS, αυξημένη έκφραση στο σύνολο των ασθενών, μειωμένη έκφραση στα ουδετερόφιλα των υποκυτταρικών MDS

ΜΟΡΙΑ ΣΧΕΤΙΖΟΜΕΝΑ ΜΕ ΤΗΝ ΠΡΟΣΚΟΛΛΗΣΗ		
CD62L (L-σελεκτίνη)	Κοκκιοκύτταρα, μονοκύτταρα, μερικά λεμφοκύτταρα, βασεόφιλα	Μειωμένη έκφραση
CD44	Κοκκιοκύτταρα, μονοκύτταρα, T-λεμφοκύτταρα, ερυθρά	Αυξημένη έκφραση στα κοκκιοκύτταρα των high risk ασθενών
CD11a/CD18 (LFA-1)	Λεμφοκύτταρα, κοκκιοκύτταρα, μονοκύτταρα	Μειωμένη ή φυσιολογική έκφραση
CD54 (ICAM-1)	Προγονικά κύτταρα μυελού, ώριμα μονοκύτταρα, B-λεμφοκύτταρα	Φυσιολογική έκφραση
ΔΕΙΚΤΕΣ ΚΟΚΚΙΟΚΥΤΤΑΡΩΝ-ΜΟΝΟΚΥΤΤΑΡΩΝ		
CD13 (αμινοπεπτιδάση)*	Μονοκύτταρα, βασεόφιλα, ουδετερόφιλα, ηωσινόφιλα	Υψηλότερη έκφραση σε high risk ασθενείς σε σχέση με τους low risk, αυξημένη έκφραση του μορίου στα μονοπύρηνα του μυελού
CD14 (υποδοχέας ενδοτοξίνης)	Μονοκύτταρα, μακροφάγα, βασεόφιλα, ουδετερόφιλα	Αυξημένη έκφραση στα μονοπύρηνα του μυελού των μη-CMML ασθενών, αυξημένη έκφραση στα ουδετερόφιλα, μειωμένη έκφραση στα μονοκύτταρα
CD15 (Lewis ^x)*	Κοκκιοκύτταρα, μονοκύτταρα	Απουσία του μορίου από τους βλάστες στα MDS, αυξημένη έκφραση στα μονοπύρηνα του μυελού, μειωμένη έκφραση στα ουδετερόφιλα, αυξημένη έκφραση στα μονοκύτταρα
CD33 (gp67)	Μονοκύτταρα, μυελοειδή προγονικά κύτταρα, μυελοβλάστες, προμυελοκύτταρα, μυελοκύτταρα	Αυξημένη έκφραση στα ουδετερόφιλα των RAEB και RAEB-t ασθενών, αυξημένη έκφραση στα κύτταρα του μυελού, ιδίως σε high risk ασθενείς
CD65	Κοκκιοκύτταρα, μονοκύτταρα	Φυσιολογική έκφραση
CD66a*	Κοκκιοκύτταρα, μακροφάγα	Αυξημένη έκφραση στα μονοπύρηνα του μυελού σε high risk ασθενείς

My8	Κοκκιοκύτταρα, μονοκύτταρα	Φυσιολογική έκφραση
NAT-9	Κοκκιοκύτταρα	Μειωμένη έκφραση
ΑΝΤΙΓΟΝΑ ΣΥΝΔΕΟΜΕΝΑ ΜΕ GPI		
CD24	Κοκκιοκύτταρα, πρόδρομα B-λεμφοκύτταρα	Φυσιολογική έκφραση
CD66b (CD67)*	Κοκκιοκύτταρα	Μειωμένη έκφραση σε υποκυτταρικά MDS, αυξημένη έκφραση στα ουδετερόφιλα του περιφερικού αίματος
CD87*	Κοκκιοκύτταρα, μονοκύτταρα	Αυξημένη έκφραση στα κοκκιοκύτταρα των high risk MDS, αυξημένη έκφραση στα μονοκύτταρα high και low risk MDS
ΑΝΤΙΓΟΝΑ ΣΤΕΛΕΧΙΑΙΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ		
CD34	Ενδοθηλιακά κύτταρα, στελεχιαία μυελικά κύτταρα	Αυξημένη έκφραση στα μονοπύρηνια του μυελού σε high risk MDS
ΥΠΟΔΟΧΕΙΣ ΚΥΤΟΚΙΝΩΝ		
CD116 (GM-CSF- receptor)	Ουδετερόφιλα, μονοκύτταρα	Μειωμένη έκφραση
CD117 (stem cell factor receptor)	<1% του συνόλου των μυελικών κυττάρων	Αυξημένη έκφραση σε μυελικά προγονικά κύτταρα, απουσία του από τους βλάστες
ΑΝΤΙΓΟΝΑ ΣΧΕΤΙΖΟΜΕΝΑ ΜΕ ΤΗΝ ΑΠΟΠΤΩΣΗ		
CD95 (APO-1, αντιγόνο fas)	Ουδετερόφιλα, μονοκύτταρα, ηωσινόφιλα, μνημονικά T-κύτταρα	Αυξημένη έκφραση στα κύτταρα του μυελού με MDS
Fas-ligand	Μονοπύρηνια του μυελού	Αυξημένη έκφραση
PS	Πρώιμος αποπτωτικός δείκτης	Αυξημένη έκφραση
ΙΣΟΜΟΡΦΑ ΤΟΥ CD45		
CD45RA	B-κύτταρα, ήρεμα T- κύτταρα, μονοκύτταρα, βλάστες, προμυελοκύτταρα	Αυξημένη έκφραση του CD45RA σε σχέση με το

CD45RO	Ενεργοποιημένα και μνημονικά T-κύτταρα, μονοκύτταρα, μακροφάγα, μερικά B-κύτταρα	CD45RO
HLA-DR	Αιμοποιητικά πρόδρομα κύτταρα	Αυξημένη έκφραση στα μονοπύρρηνα του μυελού σε RAEB και RAEB-t ασθενείς
P-glycoprotein	<1% των βλαστών του μυελού, μονοκύτταρα, λεμφοκύτταρα	Αυξημένη έκφραση στους βλάστες κυρίως των high risk ασθενών
ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΙΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ		
•ΔΕΙΚΤΕΣ T-ΚΥΤΤΑΡΩΝ		
CD2, CD3, CD4, CD8	T-κύτταρα	Μειωμένη έκφραση των CD2, CD3 και CD4 σε λεμφοπενία, μειωμένος ο λόγος CD4/CD8 σε high risk MDS, αυξημένη έκφραση των CD8+ και των CD8+/CD11a+, αυξημένος κίνδυνος λευχαιμικής μετατροπής σε χαμηλή έκφραση των CD3, CD8
•ΔΕΙΚΤΕΣ B-ΚΥΤΤΑΡΩΝ		
CD20, CD21	B-κύτταρα	Η έκφραση ποικίλει
•ΔΕΙΚΤΕΣ NK-ΚΥΤΤΑΡΩΝ		
CD16, CD56, CD57	NK κύτταρα	Η έκφραση ποικίλει
ΑΝΤΙΓΟΝΑ ΕΡΥΘΡΑΣ ΣΕΙΡΑΣ		
Γλυκοφορίνη A	Ερυθρά σειρά	Συχνά ανώμαλη έκφραση
CD71 (υποδοχέας τρανσφερρίνης)	Προγονικά κύτταρα της ερυθράς σειράς	Μειωμένη έκφραση
Υποδοχέας ερυθροποιητίνης	Ερυθρά σειρά	Φυσιολογική έκφραση
ΑΙΜΟΠΕΤΑΛΙΑΚΑ ΑΝΤΙΓΟΝΑ		
CD42a	Αιμοπετάλια, μεγακαρυοκύτταρα	Ανώμαλη έκφραση συνιστά μια οντότητα που μοιάζει με επίκτητο σύνδρομο Bernard-Soulier

* Η έκφραση του μορίου αυξάνει μετά την κυτταρική ενεργοποίηση

ΚΛΙΝΙΚΗ ΣΗΜΑΣΙΑ ΤΩΝ ΠΑΡΑΠΑΝΩ ΑΝΩΜΑΛΙΩΝ

Η ανεπάρκεια στην έκφραση των υποδοχέων συμπληρώματος, όπως π.χ. του CD11b, θα μπορούσε να υποδεικνύει συχνότερη εκτροπή σε ΟΜΛ και χειρότερη πρόγνωση. Παρομοίως, αυξημένη έκφραση δεικτών όπως οι CD13, CD33, CD34, HLA-DR στα κύτταρα του μυελού σημαίνει πιθανότατα χειρότερη πρόγνωση και αυξημένη πιθανότητα εξέλιξης σε high risk MDS ή εκτροπής σε ΟΜΛ. Η μειωμένη έκφραση στο περιφερικό αίμα των CD3, CD4, CD8 ή η υψηλή έκφραση στο περιφερικό αίμα του CD19 συνδέονται με μειωμένη επιβίωση, και αυξημένο κίνδυνο λοιμώξεων και εκτροπής σε ΟΜΛ.

LOW RISK MDS

•ΑΝΘΕΚΤΙΚΗ ΑΝΑΙΜΙΑ ΜΕ ΔΑΚΤΥΛΙΟΕΙΔΕΙΣ ΣΙΔΗΡΟΒΛΑΣΤΕΣ (RARS)

Δύο τύποι σιδηροβλαστικής αναιμίας έχουν αναγνωρισθεί³: Η αμιγής σιδηροβλαστική αναιμία (PSA) με δυσερυθροποίηση στο μυελό, χαμηλή πιθανότητα εκτροπής σε ΟΜΛ και σχετικά καλή πρόγνωση, και η ανθεκτική αναιμία με δακτυλοειδείς σιδηροβλάστες (RARS) με δυσερυθροποίηση, δυσκοκκιοποίηση και/ή δυσμεγακαρυοποίηση και υψηλό κίνδυνο λευχαιμικής μετατροπής.

ΚΛΙΝΙΚΗ ΕΙΚΟΝΑ

Η ασθένεια (RARS)² είναι σπάνια σε άτομα κάτω των 50 ετών, εκτός από περιπτώσεις που εμφανίζεται ως αποτέλεσμα προγενέστερης ακτινοθεραπείας ή χημειοθεραπείας ενός κακοήθους όγκου. Δεν υπάρχει διαφορά στην νόσηση ανάμεσα στα δύο φύλα, ενώ τα σημεία και τα συμπτώματα είναι εκείνα της αναιμίας: ωχρότητα, ελαφρά κόπωση, αδυναμία, δύσπνοια και ταχυκαρδία στην άσκηση. Στους περισσότερους ασθενείς η αναιμία ανακαλύπτεται τυχαία σε γενική εξέταση αίματος που εκτελείται για άλλο λόγο. Το ήπαρ μπορεί να είναι ήπια διογκωμένο, ενώ ο σπλήνας είναι ελαφρά διογκωμένος στο ~5% των ασθενών. Η ηπατική και η σπληνική διόγκωση δε συνυπάρχουν απαραίτητα, ενώ παραπάνω από ήπια διόγκωση σε κάποιο από αυτά τα όργανα είναι φαινόμενο ασυνήθιστο.

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΑ ΕΥΡΗΜΑΤΑ

Οι περισσότεροι από τους ασθενείς έχουν ήπια έως σοβαρή μακροκυτταρική αναιμία. Στο επίχρισμα του περιφερικού αίματος συχνά απαντά κανείς και πληθυσμό υπόχρωμων ερυθροκυττάρων (διμορφικά ερυθροκύτταρα). Ανισοκυττάρωση, βασεόφιλη στίξη και ποικιλοκυττάρωση είναι συχνά ευρήματα. Ο συνολικός αριθμός των λευκοκυττάρων και των αιμοπεταλίων είναι συνήθως φυσιολογικός, αλλά μπορεί κανείς να δει και ήπιες ανωμαλίες όπως λευκοπενία, θρομβοπενία ή θρομβοκυττάρωση. Περιστασιακά, ο αριθμός των λευκοκυττάρων και των αιμοπεταλίων μπορεί να είναι αξισημείωτα υψηλός και να εμφανίζονται στην περιφέρεια εμπύρηννα ερυθρά. Το ποσοστό των δικτυοερυθροκυττάρων (ΔΕΚ) κυμαίνεται συνήθως από 0.5-2%, ενώ ηπιώς αυξημένη μπορεί να ανευρεθεί η αιμοσφαιρίνη F.

Η κυτταρικότητα του μυελού συνήθως είναι αυξημένη ως αποτέλεσμα της ερυθροκυτταρικής υπερπλασίας. Ως απόδειξη της δυσερυθροποίησης, μπορεί να υπάρχουν μεγάλοι και μικροί ερυθροβλάστες, διπύρηννοι ερυθροβλάστες και ερυθροβλάστες με κενोटόπια. Η χρώση του μυελού με πρωσσικό κυανό αναδεικνύει παθολογικούς σιδηροβλάστες (>15%), είτε με κυκλοτερή περιπυρηνικό δακτύλιο από μπλε κυτταροπλασματικά κοκκία, είτε με πολυάριθμα μπλε κοκκία στο

κυτταρόπλασμα. Η κοκκιοποίηση και η θρομβοποίηση δεν αλλάζουν σημαντικά στα 2/3 των ασθενών. Στο υπόλοιπο 1/3, μπορεί να υπάρχει δυσκοκκιοποίηση (υποκοκκίωση, κύτταρα Pelger-Huet, υπερκατάμητοι πυρήνες ή ανωμαλίες των κοκκίων), ή δυσμεγακαρυοκυτταροποίηση (μικρομεγακαρυοκύτταρα, μεγάλα λοβώδη κύτταρα). Ο σίδηρος του μυελού είναι συχνά αυξημένος.

Ο κλωνικός χαρακτήρας της ασθένειας αποδεικνύεται από τις κυτταρογενετικές ανωμαλίες που απαντούν στο μυελό των ασθενών. Περίπου οι μισοί ασθενείς με RARS έχουν κάποια χρωμοσωμική ανωμαλία. Έχει αναφερθεί η συμμετοχή των χρωμοσωμάτων 8,11 και 20, η παρουσία του χρωμοσώματος Philadelphia, ενώ σε περιπτώσεις με θρομβοκυττάρωση έχει αναφερθεί η συμμετοχή του χρωμοσώματος 3. Η απουσία του χρωμοσώματος Y μόνο σε παθολογικούς σιδηροβλάστες (μωσαϊκό 45;X/46;XY) σε μια μελέτη, τεκμηριώνει τη διμορφική φύση της συμμετοχής της ερυθράς σειράς και εξηγεί τους υπόχρωμους και νορμόχρωμους ερυθροκυτταρικούς πληθυσμούς. Η συμμετοχή του X χρωμοσώματος (μια ρήξη στο Xq13) σε θήλεα με RAS είναι αξιοσημείωτη, επειδή ένας τύπος κληρονομικής σιδηροβλαστικής αναιμίας είναι εξαρτώμενος από το X χρωμόσωμα.

Τα επίπεδα του σιδήρου και ο κορεσμός της τρανσφερρίνης στο πλάσμα είναι αυξημένα, όπως αυξημένη είναι και η φερριτίνη, λόγω των αυξημένων αποθηκών σιδήρου στον οργανισμό. Η έμμεση χολερυθρίνη είναι πιθανώς αυξημένη, λόγω της αναποτελεσματικής ερυθροποίησης και της ενδομυελικής αιμόλυσης.

ΔΙΑΦΟΡΙΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ

Οι καταστάσεις που πρέπει πρώτες να αποκλειστούν είναι εκείνες στις οποίες η μειωμένη δικτυοερυθροκυτταρική αντίδραση συνδυάζεται με υπόχρωμα ερυθρά. Στη σιδηροπενική αναιμία σε αντιδιαστολή με τη σιδηροβλαστική ο σίδηρος του ορού είναι χαμηλός, ο κορεσμός της τρανσφερρίνης είναι <16%, η φερριτίνη χαμηλή και στο μυελό δεν υπάρχουν σιδηροβλάστες και σίδηρος στα μακροφάγα. Η ετερόζυγη θαλασσαιμία χαρακτηρίζεται από πολύ χαμηλό MCV, αυξημένη συγκέντρωση αιμοσφαιρίνης A₂ και παρουσία της νόσου σε γονείς, αδέρφια ή τέκνα. Η ανάδειξη δευτεροπαθών μορφών σιδηροβλαστικής αναιμίας απαιτεί εκτίμηση της έκθεσης σε μόλυβδο ή άλλους παράγοντες ή νόσους.

ΘΕΡΑΠΕΙΑ

Μερικοί ασθενείς δε χρειάζονται θεραπεία από τη στιγμή που η μείωση στη συγκέντρωση της αιμοσφαιρίνης είναι ανεκτή και δεν περιορίζει τη συνήθη δραστηριότητα. Ορισμένοι ασθενείς με χαμηλό φυλλικό οξύ πλάσματος και ερυθροκυττάρων μπορεί παροδικά να βελτιωθούν με τη χορήγηση φυλλικού οξέος (1 mg/day, per os). Λίγοι ασθενείς έχουν όφελος μετά τη χορήγηση πυριδοξίνης (200 mg/day, per os για τουλάχιστο 3 μήνες) ή δαναζόλης. Μια θεραπευτική αγωγή με φυλλικό οξύ και πυριδοξίνη μπορεί να προσφέρει αν η αναιμία είναι συμπτωματική, ακόμα κι αν ένα πολύ μικρό ποσοστό ασθενών απαντά. Αν η αναιμία είναι πολύ σοβαρή, ή συνυπάρχει στεφανιαία νόσος ή καρδιακή ανεπάρκεια, περιοδικές μεταγγίσεις με συμπυκνωμένα ερυθρά είναι απαραίτητες. Η ανασυνδυασμένη ανθρώπινη ερυθροποιητίνη γενικά δεν είναι χρήσιμη, εκτός και αν τα επίπεδα της ερυθροποιητίνης πλάσματος πριν την έναρξη της θεραπείας είναι χαμηλά, κάτι σπάνιο για αυτούς τους ασθενείς.

ΠΟΡΕΙΑ-ΠΡΟΓΝΩΣΗ

Σε πολλούς ασθενείς η διαταραχή αυτή διαρκεί πολλά χρόνια χωρίς πρόοδο της αναιμίας ή των συμπτωμάτων. Μικρή αναλογία των ασθενών μπορεί να αναπτύξουν μυελική ανεπάρκεια, βαρεία κυτταροπενία και θνητότητα από λοιμώξεις και

αιμορραγία. Η υπερφόρτωση με σίδηρο είναι συχνή και μερικοί ασθενείς μπορεί να αναπτύξουν αιμοχρωμάτωση. Στους ασθενείς που παρουσιάζουν υπερφόρτωση με σίδηρο, η παρουσία HLA-A₃ είναι υψηλότερη από το γενικό πληθυσμό. Η συχνότητα συγκρίνεται με αυτή που παρατηρείται στην κληρονομική αιμοχρωμάτωση, κάτι που πιθανότατα σημαίνει πως ο συνδυασμός γενετικής προδιάθεσης και σιδηροβλαστικής αναιμίας διευκολύνει την εκδήλωση της υπερφόρτωσης με σίδηρο σ'αυτούς τους ασθενείς. Η εμφάνιση αιμοχρωμάτωσης επιταχύνεται αν για πολλά έτη ο ασθενής μεταγγίζεται. Βελτίωση της αναιμίας και των παρενεργειών του σιδήρου στα παρεγχυματικά όργανα μπορεί να επιτευχθεί με θεραπεία με χηλικές ενώσεις (π.χ. δεσφερριόξαμίνη). Περίπου το 10% των ασθενών σε μια χρονική περίοδο πάνω από 10-15 χρόνια θα αναπτύξει ΟΜΛ. Η εξέλιξη σε ΟΜΛ συνδέεται με το βαθμό της δυσαιμοποίησης και τις ανωμαλίες και των τριών κυτταρικών σειρών. Έχει επίσης παρουσιαστεί και εκτροπή σε ΟΛΛ. Η επιβίωση είναι καλύτερη σε ασθενείς που δεν παρουσιάζουν ανωμαλίες σε άλλες σειρές εκτός από τη ερυθρά σειρά. Το τελευταίο αφορά και την ανθεκτική μη σιδηροβλαστική αναιμία (RA).

●ΑΝΘΕΚΤΙΚΗ ΑΝΑΙΜΙΑ ΜΗ ΣΙΔΗΡΟΒΛΑΣΤΙΚΗ (RA)

Μια μορφή MDS που μπορεί να μιμηθεί τη σιδηροβλαστική αναιμία χωρίς την παρουσία σιδηροβλαστών στο μυελό είναι η ανθεκτική αναιμία². Η αναιμία στους ασθενείς αυτούς είναι ήπια ως μέτρια, με μια τάση προς μακροκυττάρωση. Η λευκοπενία και η θρομβοπενία αν υπάρχουν είναι συνήθως ήπιες. Μπορεί να παρουσιαστούν υποκατάτμητα και υπερκατάτμητα ουδετερόφιλα, γιγαντιαία αιμοπετάλια και ανωμαλίες στη μορφή, το μέγεθος και την αιμοσφαιρίνη των ερυθρών. Ο μυελός είναι κυτταρικός και τα προγονικά κύτταρα μπορεί να παρουσιάζουν μορφολογικές αλλοιώσεις ενδεικτικές της δυσαιμοποίησης, κυρίως η ερυθρά σειρά, αλλά οι σιδηροβλάστες λείπουν ή αποτελούν λιγότερο από το 15% των κυττάρων της ερυθράς σειράς. Από τη στιγμή που επικρατεί η αναιμία και οι άλλες κυτταροπενίες είναι ήπιες, πρωταρχικά η πορεία μοιάζει με αυτή της σιδηροβλαστικής αναιμίας. Η αναλογία των ασθενών που εκτρέπονται σε ΟΜΛ καθώς και η μέση επιβίωσή τους είναι παρόμοια με αυτή της ανθεκτικής σιδηροβλαστικής αναιμίας, ιδιαίτερα περιπτώσεις με συνοδές διαταραχές στην κοκκιοποίηση και τη μεγακαρυοκυτταροποίηση. Οι κυτταροπενίες και οι μυελικές δυσπλαστικές αλλοιώσεις μπορεί να γίνουν πιο σοβαρές και η πορεία κι ο χειρισμός τέτοιων ασθενών μοιάζουν με την περίπτωση της πανκυτταροπενίας με υπερπλαστικό μυελό. Ο χειρισμός των ασθενών με υποπλαστικό MDS είναι αυτός της απλαστικής αναιμίας (συνδυασμός κυκλοσπορίνης και ATG ή ALG¹²¹).

HIGH RISK MDS

●ΑΝΘΕΚΤΙΚΗ ΑΝΑΙΜΙΑ ΜΕ ΠΕΡΙΣΣΕΙΑ ΒΛΑΣΤΩΝ (RAEB)

Οι περισσότεροι ασθενείς² είναι μεγαλύτεροι από 50 ετών. Άρρενες και θήλειες προσβάλλονται σχεδόν με την ίδια πιθανότητα. Συνήθως υπάρχουν αναιμία, ουδετεροπενία και/ή θρομβοπενία. Τα άωρα κύτταρα στο μυελό αποτελούν το 5-20% του συνόλου των εμπύρηνων μυελικών κυττάρων. Στα βλαστικά κύτταρα μπορεί να παρατηρηθούν ραβδία Auer, εύρημα που σχετίστηκε (σε μια μελέτη) με υψηλότερα ποσοστά πλήρους ύφεσης και μακρότερης επιβίωσης των ασθενών. Οι δυσπλαστικές αλλοιώσεις που εμφανίζονται στο μυελό ομοιάζουν με αυτές που εμφανίζονται στις

RA και RARS. Η κατάσταση αυτή εκτρέπεται σε ΟΜΛ σε περίπου 30-50% των περιπτώσεων. Η μέση επιβίωση στη RAEB είναι περίπου 5-10 μήνες, αν και υπάρχουν περιστασιακά ασθενείς που επιβιώνουν για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα.

●ΑΝΘΕΚΤΙΚΗ ΑΝΑΙΜΙΑ ΜΕ ΠΕΡΙΣΣΕΙΑ ΒΛΑΣΤΩΝ ΣΕ ΜΕΤΑΤΡΟΠΗ (RAEB-t)

Η διαφορά της υποκατηγορίας αυτής² με τη RAEB έγκειται στο ότι εδώ η αναλογία βλαστικών κυττάρων στο σύνολο των εμπύρηνων μυελικών κυττάρων είναι 20-30%. Ο διαχωρισμός των δύο αυτών κατηγοριών (RAEB και RAEB-t) είναι μάλλον δυσδιάκριτος και δεν υπάρχουν άλλες άξιες λόγου διαφορές ανάμεσα στους δύο αυτούς τύπους των ολιγοβλαστικών λευχαιμιών.

●ΧΡΟΝΙΑ ΜΥΕΛΟΜΟΝΟΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΛΕΥΧΑΙΜΙΑ (CMML)

Σήμερα αναγνωρίζονται δύο υπότυποι CMML³, η MDS-CMML (με αριθμό λευκών $<13 \times 10^9/L$) και η MPS-CMML (με αριθμό λευκών $\geq 13 \times 10^9/L$). Μεταξύ των δύο υποτύπων υπάρχουν κλινικές διαφορές (π.χ. βραχύτερη επιβίωση και υψηλότερος κίνδυνος μετατροπής σε ΟΜΛ στην MDS-CMML) και βιολογικές διαφορές (π.χ. υψηλότερα επίπεδα χολερυθρίνης, μεγαλύτερη συχνότητα παθολογικών καρυοτύπων στην MDS-CMML).

MDS-CMML

Οι περισσότεροι ασθενείς με MDS-CMML² είναι άνω των 50 ετών και περίπου το 75% των ασθενών είναι άνω των 60 ετών κατά τη διάγνωση. Βέβαια έχουν αναφερθεί και περιπτώσεις σε παιδιά, καθώς και περιπτώσεις που η MDS-CMML είναι επιπλοκή της αληθούς πολυκυτταραιμίας. Ενώ στο σύνολο των περιπτώσεων MDS ο λόγος ανδρών προς γυναίκες είναι 1,2:1, στην MDS-CMML ο λόγος αυτός είναι 1,5-3:1²⁵. Η εισβολή της νόσου είναι ύπουλη και αυτό που οδηγεί τους ασθενείς στο γιατρό είναι κυρίως η αδυναμία, η λοίμωξη ή η αθρόα αιμορραγία. Ηπατομεγαλία και σπληνομεγαλία απαντούν στο 40% περίπου των ασθενών με MDS-CMML. Η πάθηση χαρακτηρίζεται από αναιμία και μονοκυττάρωση (μονοκύτταρα πάνω από 1000/ μL). Ο αριθμός των λευκών αιμοσφαιρίων μπορεί να είναι ηπίως ελαττωμένος, φυσιολογικός ή μέτρια αυξημένος. Άωρα κοκκιοκύτταρα μπορεί να ανευρίσκονται στο περιφερικό αίμα και οι μυελοβλάστες μπορεί να λείπουν, ή -αν υπάρχουν- να μην ξεπερνούν το 10% του συνόλου των λευκών. Οι περισσότεροι ασθενείς παρουσιάζουν θρομβοπενία, χωρίς να αποκλείεται το ενδεχόμενο ο αριθμός των αιμοπεταλίων να είναι φυσιολογικός ή αυξημένος. Ο μυελός είναι υπερκυτταρικός ως αποτέλεσμα της κοκκιοκυτταρικής και μονοκυτταρικής υπερπλασίας. Τα κύτταρα που επικρατούν είναι τα μυελοκύτταρα. Η αναλογία των μυελοβλαστών και των προκοκκιοκυττάρων είναι αυξημένη, δεν ξεπερνά όμως το 20% του συνόλου των μυελικών κυττάρων. Τα προμονοκύτταρα είναι επίσης αυξημένα. Πολλές φορές η διάκριση μεταξύ μυελοκυττάρων με φτωχή κοκκίωση και προμονοκυττάρων με πρωτογενή κοκκία είναι δύσκολη. Μακρονορμοβλάστες και υπερ- ή υπο-κατάμμητα (Pelger-Huet) ουδετερόφιλα είναι συχνά. Παρά τη θρομβοπενία, τα μεγακαρυοκύτταρα είναι παρόντα στο μυελό. Η λυσοζύμη στο πλάσμα και στα ούρα είναι σχεδόν πάντα αυξημένη. Η MDS-CMML επίσης χαρακτηρίζεται από συχνές μεταλλάξεις του γονιδίου RAS. Σε μερικές περιπτώσεις παρατηρείται μια ομόζυγη αποκοπή των γονιδίων που κωδικοποιούν τον υποδοχέα του CSF-1.

Η μέση επιβίωση των ασθενών με CMML είναι περίπου 20 μήνες, με ένα εύρος από 10 έως 60 μήνες.

ΘΕΡΑΠΕΙΑ

Η θεραπεία² των high risk MDS πρέπει να εξατομικεύεται. Σε μερικές περιπτώσεις καμία θεραπεία δεν απαιτείται. Η περιοδική εκτίμηση της νόσου είναι απαραίτητη για να επισημανθεί η επιδείνωση της αιματολογικής και της κλινικής εικόνας. Οι περισσότεροι ασθενείς χρειάζονται θεραπεία σε εβδομάδες έως μήνες. Η απάντηση στην κυτταροτοξική θεραπεία είναι μικρή και ο προτιμότερος χειρισμός των ασθενών είναι η συμπτωματική αγωγή με μεταγγίσεις και αντιβιοτικά ανάλογα με τις ανάγκες, αν αυτή η προσέγγιση μπορεί να διατηρεί μια λογική ποιότητα ζωής στον ασθενή. Όταν είναι απαραίτητη η θεραπεία και αν ο ασθενής είναι σε καλή κατάσταση, είναι δικαιολογημένη μια επιθετική θεραπεία ως επί ΟΜΛ. Αν ο ασθενής είναι άνω των 70 ετών, μπορούν να χρησιμοποιηθούν χαμηλές δόσεις Aracytine. Αν η νόσος προχωρεί σε ΟΜΛ, ασθενείς άνω των 70 ετών μπορεί να αντιμετωπιστούν με μικρές δόσεις Daunomycine ή κάποιας άλλης ανθρακυκλίνης, μαζί με Aracytine ή Etoposide. Όμως οι υφέσεις είναι βραχείες ούτως ή άλλως. Ασθενείς κάτω των 45 ετών με ιστοσυμβατό δότη είναι υποψήφιοι για μεταμόσχευση μυελού των οστών.

• ΧΑΜΗΛΕΣ ΔΟΣΕΙΣ ARA-C

Κυτταροτοξικά φάρμακα που περιέχουν Aracytine (Ara-C) και Daunomycin οδηγούν σε ύφεση λιγότερο από το 20% των ασθενών με ολιγοβλαστική λευχαιμία. Μάλιστα μια μεγάλη αναλογία ασθενών χειροτερεύουν με τη χημειοθεραπεία. Η προχωρημένη ηλικία και η μεγάλη συχνότητα καρδιακής, νεφρικής και ανοσολογικής ανεπάρκειας καθώς και η προσβολή και άλλων οργάνων-συστημάτων στους περισσότερους ασθενείς είναι κυρίως υπεύθυνα για την πολύ φτωχή εξέλιξη. Ασθενείς που είναι μικρότεροι των 50 ετών έχουν ψηλότερους δείκτες ύφεσης και πρέπει να υποβάλλονται σε εντατική θεραπεία. Όμως, τέτοιες περιπτώσεις αντιπροσωπεύουν μόνο το 5-10% του συνόλου των ασθενών.

Χαμηλές δόσεις Ara-C (5-20 mg/m²/day sc σε δύο διαιρεμένες δόσεις για 8-16 εβδομάδες ή με συνεχή iv έγχυση) έχουν χρησιμοποιηθεί σαν υποκατάστατο της εντατικής χημειοθεραπείας. Αυτή η θεραπευτική προσέγγιση βασίζεται στο ότι οι χαμηλές δόσεις των φαρμάκων, εκτός του ότι είναι λιγότερο τοξικές, μπορεί να προάγουν την ωρίμανση των άωρων μυελικών κυττάρων σε λειτουργικά κύτταρα. Παρά το ότι αυτή η θεραπευτική προσέγγιση έχει οδηγήσει σε ύφεση το 20% των ασθενών, η μέση διάρκεια της ύφεσης είναι περίπου 10 μήνες. Επίσης η επιβίωση δεν επηρεάζεται ιδιαίτερα από την επιτυχία μιας ύφεσης. Επιπλέον, οι χαμηλές δόσεις Ara-C είναι συχνά κυτταροτοξικές προκαλώντας μυελική καταστολή και επιδεινώνοντας τις κυτταροπενίες στο 80% των ασθενών. Συχνά οι ασθενείς χρειάζονται Νοσοκομειακή νοσηλεία, μεταγγίσεις με συμπυκνωμένα ερυθρά και αντιβιοτική κάλυψη, στο βαθμό που αυτό απαιτείται και σε ασθενείς που λαμβάνουν εντατική χημειοθεραπεία για ΟΜΛ. Σε μερικές περιπτώσεις είναι πιθανή η εξωνοσοκομειακή θεραπεία με χρήση Ara-C sc από τον ίδιο τον ασθενή. Αν και σπάνιες περιπτώσεις ύφεσης μετά από χαμηλές δόσεις Ara-C συμφωνούν με την επίδραση της θεραπείας στην κυτταρική ωρίμανση, στους περισσότερους ασθενείς η καταστολή του κακοήθους κλώνου του αρχέγονου στελεχιαίου κυττάρου οδηγεί σε επανασύσταση του μυελού και σε πολυκλωνική αιμοποίηση. Συνδυασμοί χαμηλών δόσεων Ara-C με αυξητικούς παράγοντες δεν φαίνεται ότι έχουν ξεκάθαρο πλεονέκτημα σε σχέση με την Ara-C μόνο.

• ΑΛΛΑ ΚΥΤΤΑΡΟΤΟΞΙΚΑ ΦΑΡΜΑΚΑ

Παράγοντες όπως η υδροξουρία και χαμηλές δόσεις ετοποσίδης είναι χρήσιμοι στον έλεγχο του πολλαπλασιασμού των λευχαιμικών κυττάρων. Περιστασιακοί ασθενείς έχουν πετύχει υφέσεις με ετοποσίδα (50 mg iv στάγδην σε 2h, 2 ως 7 φορές την

εβδομάδα για 4 εβδομάδες ή 100 mg καθημερινά per os για 3 μέρες και μετά 50 mg δύο φορές την εβδομάδα). Σπάνιες περιπτώσεις με ύφεση έχουν αναφερθεί με συνεχή έγχυση 5-αζακυτιδίνης ή με ινταρουβικίνη.

- *ΡΕΤΙΝΟΕΙΔΗ, ΠΑΡΑΓΩΓΑ ΒΙΤΑΜΙΝΗΣ D, ΚΑΙ ΑΛΛΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΩΡΙΜΑΝΣΗΣ*

Γλυκοκορτικοειδή, ρετινοειδή, ανάλογα της βιταμίνης D, ανάλογα των πυριμιδινών, το διακεταμίδιο του εξαμεθυλενίου και οι ιντερφερόνες μεταξύ των άλλων μπορούν in vitro να προκαλέσουν ωρίμανση στα λευχαιμικά κύτταρα ποντικών και ανθρώπου. Η χρήση 20-100 mg/m² cis-ρετινοϊκού οξέος, 25mg/m² ισοτρετινοίνης ή 45 mg/m² trans-ρετινοϊκού οξέος, καθημερινά για 3 μήνες έχει οδηγήσει σε μια ήπια αναστρέψιμη (σε λίγες εβδομάδες) βελτίωση μιας μικρής αναλογίας ασθενών. Οι ανεπιθύμητες ενέργειες αυτών των βιταμινικών παραγώγων περιλαμβάνουν ξηροδερμία, χειλίτιδα, κνησμό, λήθαργο και αρθραλγίες που εξαφανίζονται με τη διακοπή της αγωγής. Ένα πρωτόκολλο που περιλαμβάνει διϋδροξυβιταμίνη D₃ 2,5 μg/d per os για τουλάχιστο 8 εβδομάδες δεν έχει ωφελήσει σημαντικά τους ασθενείς με ολιγοβλαστική λευχαιμία. Η υπερασβεστιαμία είναι ένας παράγοντας που μπορεί να περιορίσει την ως άνω δοσολογία. Ανάλογες ουσίες που δεν προκαλούν έκδηλη υπερασβεστιαμία, όπως η αλφακαλσιδόλη, έχουν κάποιο αποτέλεσμα στη μείωση των βλαστών και στην ωρίμανση των μονοκυτταροειδών κυττάρων, όταν άλλα φάρμακα δεν το καταφέρνουν. Συνδυασμός χαμηλών δόσεων Ara-C, ρετινοϊκού οξέος και 1,25-διϋδροξυβιταμίνης D₃ σε 44 ασθενείς με RAEB και RAEB-t μιας μελέτης είχε ανταπόκριση στο 50% των ασθενών, με μεγαλύτερη επιβίωση σ'αυτούς που ανταποκρίθηκαν σε σχέση μ'αυτούς που δεν ανταποκρίθηκαν. Το διακεταμίδιο του εξαμεθυλενίου σε δόση 20-24 g/m² καθημερινά iv για 10 μέρες ακολουθούμενο από μια περίοδο παρακολούθησης 18-75 ημερών μείωσε τα βλαστικά μυελικά κύτταρα και αύξησε τα επίπεδα των ουδετερόφιλων μόνο στους 4 από τους 16 ασθενείς με RAEB και RAEB-t σε μια άλλη μελέτη.

- *ΙΝΤΕΡΦΕΡΟΝΕΣ*

Οι ιντερφερόνες έχουν χρησιμοποιηθεί στη θεραπεία των high risk MDS. Οι δόσεις ιντερφερόνης-α (IFN-α) κυμαίνονται από 3X10⁶ IU/d έως 1X10⁶ IU/m² τρεις εβδομαδιαίως. Περιστασιακές απαντήσεις στην ως άνω θεραπεία σ'ότι αφορά στο ποσοστό των βλαστών ή στην ανάγκη για μεταγγίσεις έχουν παρατηρηθεί, με κόστος την βέβαιη τοξικότητα. Σε μερικούς ασθενείς εμφανίστηκε ΟΜΛ. IFN-γ σε δόσεις 0,01 mg ως 0,1 mg/m² τρεις εβδομαδιαίως βελτίωσε τα επίπεδα των ουδετερόφιλων και μείωσε το ποσοστό των βλαστικών κυττάρων στο 40% των 30 ασθενών με high risk MDS σε μια μελέτη. Η μέση επιβίωση δεν ήταν μεγαλύτερη από τους μη θεραπευθέντες μάρτυρες παλαιότερων μελετών, αν και ήταν μεγαλύτερη από τους μη θεραπευθέντες ασθενείς της ίδιας μελέτης.

Σε μια περίπτωση δευτεροπαθούς MDS (που προέκυψε μετά από χημειοθεραπεία και κατά τη διάρκεια της τρίτης πλήρους ύφεσης μιας ΟΛΛ), η ιντερλευκίνη-2 που δόθηκε υποδορίως σε μια δόση 2,5X10⁵ IU δις ημερησίως για 30 μέρες αύξησε τη δραστηριότητα των κυττάρων NK και μείωσε τους βλάστες στο μυελό.

- *ΕΡΥΘΡΟΠΟΙΗΤΙΝΗ, GM-CSF, G-CSF, ΚΑΙ IL-3*

Τυχαιοποιημένες διπλές τυφλές μελέτες δεν έχουν αποδείξει ότι οι κυτοκίνες παρατείνουν την επιβίωση ή μειώνουν τη θνητότητα των high risk MDS, αν και τα αποτελέσματα πρόσφατων μελετών δείχνουν ότι (1) η ερυθροποιητίνη σε κάποιες περιπτώσεις μπορεί να ελαττώσει τις ανάγκες για μεταγγίσεις, (2) οι GM-CSF και G-CSF μπορεί να αυξήσουν τα επίπεδα των ουδετερόφιλων και να βελτιώσουν τη λειτουργικότητά τους, και (3) η IL-3 μπορεί να αυξήσει τα επίπεδα των λευκοκυττάρων και πιο σπάνια των αιμοπεταλίων και των ερυθρών αιμοσφαιρίων.

Τέτοιες απαντήσεις έχουν παρατηρηθεί σε RAEB, RAEB-t και σε βαρείες ανθεκτικές αναιμίες. Δεν έχει αποδειχθεί ότι οι κυτοκίνες μπορούν να καθυστερήσουν την εμφάνιση ΟΜΛ. Αντίθετα αυξάνουν την εκατοστιαία αναλογία βλαστών στο μυελό σε κάποιο αριθμό ασθενών, κάτι που δεν αναστρέφεται πάντα με τη διακοπή της κυτοκίνης. Σε μια μελέτη, 22 από τους 83 ασθενείς με μυελοδυσπλασία που αντιμετωπίστηκαν με GM-CSF ή G-CSF παρουσίασαν αύξηση στην εκατοστιαία αναλογία βλαστών στο μυελό, ενώ οι 12 από τους 69 ασθενείς μιας άλλης μελέτης εμφάνισαν ΟΜΛ. Αυξημένο ποσοστό ανώμαλων μακροφάγων έχει επίσης αναφερθεί. Η χρήση τέτοιων παραγόντων χωρίς χημειοθεραπευτικά φάρμακα στα high risk MDS αυξάνει την πιθανότητα της εκτροπής σε ΟΜΛ.

- **ΝΕΩΤΕΡΕΣ ΘΕΡΑΠΕΙΕΣ**^{115,116,118,123,125}

Τα τελευταία χρόνια από πολλά κέντρα έχει μελετηθεί ο ρόλος νέων παραγόντων στην αντιμετώπιση των high risk MDS, όπως είναι:

- 1) Οι αναστολείς της φαρνεσουλ-τρανσφεράσης (tipifarnib)
- 2) Η αναστολείς της DNA-μεθυλίωσης (5-αζακυτιδίνη)
- 3) Οι αναστολείς της ιστόνης δεακετυλάσης (π.χ. βαλπροϊκό νάτριο)
- 4) Ανοσορρυθμιστικοί παράγοντες (θαλιδομίδη, λεναλιδομίδη)

- **ΜΕΤΑΜΟΣΧΕΥΣΗ ΜΥΕΛΟΥ ΤΩΝ ΟΣΤΩΝ**

Η μεταμόσχευση μυελού των οστών^{110,114,122,128} έχει χρησιμοποιηθεί στη θεραπεία ποικίλων μυελοδυσπλαστικών συνδρόμων σε ασθενείς ηλικίας από 1 ως 60 ετών. Οι παράγοντες που χρησιμοποιούνται για την προετοιμασία της μεταμόσχευσης είναι συνήθως ο συνδυασμός βουσουλφάνης και κυκλοφωσφαμίδης και ο συνδυασμός κυκλοφωσφαμίδης με ακτινοβολία. Οι περισσότεροι ασθενείς έχουν λάβει μυελό από ιστοσυμβατό αδερφό δότη, αν και υπάρχει αρκετή εμπειρία με συγγενή μη αδερφό ή μη συγγενικό δότη. Μια αντιπροσωπευτική μελέτη για τα αποτελέσματα αυτής της θεραπευτικής προσέγγισης είναι αυτή 93 ασθενών ηλικίας από 1 ως 60 ετών (μέση ηλικία τα 30 έτη) που είτε έλαβαν κυκλοφωσφαμίδη και υπεβλήθησαν σε ολόσωμη ακτινοβολία ή έλαβαν συνδυασμό κυκλοφωσφαμίδης και βουσουλφάνης και μεταμοσχεύτηκαν: με πανομοιότυπο δίδυμο δότη (3 ασθενείς), με HLA-πανομοιότυπο αδερφό δότη (62 ασθενείς), με HLA-συμβατό δότη-μέλος της οικογένειας (2 ασθενείς), με μέλος της οικογένειας και κατά 1 ως 3 αντιγόνα HLA μη συμβατό δότη (20 ασθενείς) και μη συγγενή δότη (6 ασθενείς). 29 ασθενείς ανήκαν στην κατηγορία της ανθεκτικής αναιμίας, 47 ασθενείς ανήκαν στην κατηγορία των RAEB και RAEB-t, ενώ οι υπόλοιποι παρουσίαζαν ποικίλες διαταραχές. Οι περισσότεροι ασθενείς έλαβαν αγωγή προφύλαξης από τη νόσο μοσχεύματος έναντι ξενιστή (graft-versus-host disease, GVHD) με μεθοτρεξάτη και κυκλοσπορίνη, με ή χωρίς πρεδνιζόνη. Τα πιο ενθαρρυντικά αποτελέσματα παρουσιάστηκαν σε ασθενείς που ήταν νεώτεροι των 40 ετών, με βραχύτερη διάρκεια της νόσου και χωρίς βλάστες στο μυελό. Αυτοί οι ασθενείς έχουν 4ετή επιβίωση ελεύθερη νόσου σε ποσοστό 62% και συνολική επιβίωση ελεύθερη νόσου σε ποσοστό 41%. Οι πιο ηλικιωμένοι ασθενείς παρουσίασαν υψηλότερη περιεταμοσχευτική θνητότητα και υψηλότερα ποσοστά υποτροπής. Η πιθανότητα υποτροπής εντός 4ετίας για όλη την ομάδα των ασθενών ήταν 28%, ενώ το ποσοστό αυτό ανεβαίνει στο 51% στους ασθενείς με αναλογία βλαστών στο μυελό μεγαλύτερη από 5%. Οι κυτταρογενετικές ανωμαλίες δεν φαίνεται να προδικάζουν το αποτέλεσμα. Τα αποτελέσματα της μεταμόσχευσης με δότη μη συγγενικό ήταν υποδεέστερα αυτής με συγγενικό δότη.

ΠΟΡΕΙΑ-ΠΡΟΓΝΩΣΗ

Η μέση επιβίωση² των ασθενών με high risk MDS σε δημοσιευμένες μελέτες ποικίλλει από 6 ως 36 μήνες, με όρια επιβίωσης από 1 ως 360 μήνες. Σε μια πολύ μεγάλη μελέτη που περιλάμβανε επίσης περιπτώσεις με ανθεκτική αναιμία, η μέση

επιβίωση ήταν 15 μήνες. Περίπου οι μισοί ασθενείς πέθαναν από λοίμωξη (που οφειλόταν στη βαρεία ουδετεροπενία ή στην παρουσία δυσλειτουργούντων ουδετερόφιλων και μονοκυττάρων) και 25% των ασθενών πέθαναν από τις αιμορραγικές επιπλοκές της θρομβοπενίας. Περίπου το 30% των περιπτώσεων εκδήλωσαν ΟΜΛ, ενώ η εκτροπή σε ΟΛΛ είναι σπανιότατη^{111,126}. Η διάρκεια της επιβίωσης μετά τη διάγνωση ασθενών με high risk MDS είναι αντιστρόφως ανάλογη με τη βαρύτητα των κυτταρογενετικών ανωμαλιών, την αναλογία βλαστικών κυττάρων στο μυελό, την παρουσία N-RAS μεταλλάξεων και τη βαρύτητα της ουδετεροπενίας και της θρομβοπενίας.

ΠΡΟΓΝΩΣΤΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΚΑΙ ΣΥΣΤΗΜΑΤΑ SCORE ΣΤΑ MDS

Πολλές προσπάθειες έχουν καταβληθεί προκειμένου να συσταθεί ένα κατά το δυνατόν ιδανικό σύστημα βαθμολόγησης του status²¹ του ασθενούς με MDS, βάσει του οποίου να προβλέπεται η πορεία και η επιβίωσή του, καθώς και ο κίνδυνος μετατροπής σε ΟΜΛ. Πιο κάτω παρατίθενται οι πίνακες 10,11 και 12 που παραθέτουν την αξία μεμονωμένων προγνωστικών παραγόντων στα MDS, καθώς και τα πιο έγκυρα συστήματα βαθμολόγησης χωρισμένα ανάλογα με το αν λαμβάνουν ή όχι υπόψη τον καρυότυπο του ασθενούς:

ΠΙΝΑΚΑΣ 10
ΜΕΜΟΝΩΜΕΝΟΙ ΠΡΟΓΝΩΣΤΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΣΕ MDS ΑΣΘΕΝΕΙΣ²¹

ΠΡΟΓΝΩΣΤΙΚΟΣ ΠΑΡΑΓΩΝ	ΔΥΣΜΕΝΗΣ ΧΑΡΑΚΤΗΡΑΣ
ΚΛΙΝΙΚΑ	
Ηλικία	>60
Φύλο	Άρρεν
ΑΙΜΑΤΟΛΟΓΙΚΑ	
<i>Στο περιφερικό αίμα</i>	
Αιμοπετάλια	Χαμηλά
Hb	Χαμηλή
Ουδετερόφιλα	Ουδετεροπενία
Λευκοκύτταρα	Λευκοπενία ή λευκοκυττάρωση
Βλάστες, εμπύρηννα ερυθρά	Παρουσία, υψηλό ποσοστό
<i>Στο μυελό</i>	
Βλάστες	Υψηλό ποσοστό
Μικρομεγακαρυοκύτταρα	Παρουσία
<i>Βαθμός δυσπλασίας</i>	Υψηλός
ΕΥΡΗΜΑΤΑ ΒΙΟΨΙΑΣ ΜΥΕΛΟΥ	
Κυτταρικότητα	Υπερκυτταρικότητα
ALIP	Παρουσία
Δυσθρομβοποίηση	Σοβαρή
Ίνωση	Παρουσία
ΚΥΤΤΑΡΟΓΕΝΕΤΙΚΗ	Μονοσωμία 7, 7q-, συνδυασμός
ΟΓΚΟΓΟΝΙΔΙΑ	
Μετάλλαξη N-RAS	Παρουσία
Αποκοπή p53	Παρουσία
ΒΙΟΧΗΜΙΚΕΣ ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΙ	
LDH	Παθολογικά υψηλή
ΑΝΟΣΟΦΑΙΝΟΤΥΠΟΣ	
CD34+ κύτταρα	Υψηλή αναλογία
Άωρα/ώριμα κύτταρα	Αυξημένο πηλίκο
ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ ΜΥΕΛΟΥ	
Αριθμός σειρών	Χαμηλός
Αριθμός αποικιών	Υψηλός
Πηλίκο σειρών/αποικίες	Χαμηλό
Λευχαιμικές μορφές	Παρουσία
FAB ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ	RAEB, RAEB-t
ΑΙΤΙΟΛΟΓΙΑ	MDS μετά από ΧΜΘ (δευτεροπαθές)

ΠΙΝΑΚΑΣ 11
ΠΡΟΓΝΩΣΤΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΕΠΙΒΙΩΣΗΣ ΚΑΙ ΣΥΣΤΗΜΑΤΑ
ΒΑΘΜΟΛΟΓΗΣΗΣ ΣΕ ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ MDS (ΔΕ ΛΑΜΒΑΝΕΤΑΙ ΥΠΟΨΗ Ο
ΚΑΡΥΟΤΥΠΟΣ)²¹

	ΒΑΘΜΟΙ			ΚΙΝΔΥΝΟΣ	SCORE
	0	1	2		
Bournemouth					
Hb(g/dl)	>10	≤10		Χαμηλός	0-1
Αιμοπετάλια(x10 ⁹ /L)	>100	<100		Ενδιάμεσος	2-3
Βλάστες μυελού(%)	<5	>5		Υψηλός	4
Ουδετερόφιλα(x10 ⁹ /L)	>2,5 & ≤16	≤2,5 & >16			
Spanish					
Ηλικία(έτη)	≤60	>60		Χαμηλός(A)	0-1
Αιμοπετάλια(x10 ⁹ /L)	≥100	51-100	≤50	Ενδιάμεσος(B)	2-3
Βλάστες μυελού(%)	<5	5-10	11-30	Υψηλός(C)	4-5
Goasguen					
Hb(g/dl)	>10	≤10		Χαμηλός	0
Αιμοπετάλια(x10 ⁹ /L)	>100	≤100		Ενδιάμεσος	1-2
Βλάστες μυελού(%)	<5	≥5		Υψηλός	3
Dusseldorf					
Hb(g/dl)	>9	≤9		Χαμηλός(A)	0
Αιμοπετάλια(x10 ⁹ /L)	>100	≤100		Ενδιάμεσος(B)	1-2
Βλάστες μυελού(%)	<5	≥5		Υψηλός(C)	3-4
LDH	≤200	>200			

ΠΙΝΑΚΑΣ 12
ΠΡΟΓΝΩΣΤΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΕΠΙΒΙΩΣΗΣ ΚΑΙ ΣΥΣΤΗΜΑΤΑ
ΒΑΘΜΟΛΟΓΗΣΗΣ ΣΕ ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ MDS (ΛΑΜΒΑΝΕΤΑΙ ΥΠΟΨΗ Ο
ΚΑΡΥΟΤΥΠΟΣ)²¹

	ΒΑΘΜΟΙ					ΚΙΝΔΥΝΟΣ	SCORE
	0	0.5	1	1.5	2		
Lille							
Βλάστες μυελού(%)	<5		5-10		11-30	Χαμηλός	0
Καρυότυπος*	Καλός		Κακός			Ενδιάμεσος	1-2
Αιμοπετάλια(x10 ⁹ /L)	>75		<75			Υψηλός	3-4
IPSS**							
Βλάστες μυελού(%)	<5	5-10		11-20	21-30	Χαμηλός	0
Καρυότυπος***	Καλός	Ενδιάμεσος	Κακός			Ενδιάμεσος 1	0,5-1
Κυτταροπενίες****	0-1	2-3				Ενδιάμεσος 2	1,5-2
						Υψηλός	2,5-3,5

- * Καλός: φυσιολογικός ή μία ανωμαλία
Κακός: >2 ανωμαλίες
 - ** Στο σύστημα IPSS η CMML διαχωρίζεται σε υπερπλαστικό και μη υπερπλαστικό τύπο. Οι ασθενείς με υπερπλαστικό τύπο CMML (π.χ. με λευκά >12x10⁹/L) αντιπροσωπεύουν περισσότερο μυελοϋπερπλαστική ανωμαλία παρά MDS, και γι'αυτό αποκλείονται. Οι προγνωστικοί παράγοντες στη CMML περιλαμβάνουν την αναλογία βλαστών στο περιφερικό αίμα και στο μυελό, το επίπεδο της αιμοσφαιρίνης και των αιμοπεταλίων, τον αριθμό των λευκοκυττάρων και των μονοκυττάρων, τη σπληνομεγαλία, τη λυσοζυμουρία και την παρουσία άωρων μυελοειδών ή ερυθροειδών πρόδρομων κυττάρων στο περιφερικό αίμα. Οι χρωμοσωμικές ανωμαλίες μπορεί να παίζουν προγνωστικό ρόλο, ενώ ο σημαντικότερος παράγοντας πρόγνωσης της μετατροπής σε OMA είναι η αναλογία βλαστών στο μυελό.
 - *** Καλός: φυσιολογικός, 5q- μόνο, 20q- μόνο, -Y μόνο
Ενδιάμεσος: Λοιπές ανωμαλίες
Κακός: >2 ανωμαλίες, ανωμαλίες του χρωμοσώματος 7
 - **** Hb <10g/dl, Plt <100x10⁹/L, ουδετερόφιλα <1,8x10⁹/L
- Σε μια άλλη μεγάλη μελέτη (international workshop)²³ βρέθηκε ότι η μετατροπή του MDS σε OMA εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από την ταξινόμηση κατά FAB, το ποσοστό βλαστών στο μυελό, τις χρωμοσωμικές ανωμαλίες και τον αριθμό των κυτταροπενιών. Η επιβίωση των ασθενών με MDS εξαρτάται από τα παραπάνω, αν προσθέσει κανείς την ηλικία και το φύλο.
- Νεώτεροι ασθενείς²⁴ τείνουν να εμφανίζουν υπότυπους MDS περισσότερο κακής πρόγνωσης (RAEB, RAEB-t), αυξημένο κίνδυνο μετατροπής σε OMA και υψηλό ρυθμό δυσμενών καρυοτυπικών ανωμαλιών (π.χ. μονοσωμία 7), παραδόξως όμως έχουν καλύτερη πρόγνωση, πιθανώς γιατί οι νεώτεροι ασθενείς λαμβάνουν ευκολότερα εντατική χημειοθεραπεία, παρά υποστηρικτική αγωγή μόνο.

ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ ΤΩΝ ΣΥΣΤΗΜΑΤΩΝ ΒΑΘΜΟΛΟΓΗΣΗΣ

Υπάρχουν βέβαια ορισμένες ατέλειες²¹ των πιο πάνω συστημάτων βαθμολόγησης, οι οποίες μπορούν να συνοψιστούν στα εξής:

- 1) Η επιλογή της αγωγής θα εξαρτηθεί από την ηλικία, τις παρεμπόπτουσες νοσηρές καταστάσεις και το performance status του ασθενή, παρά από την πρόγνωση του και μόνο.
- 2) Εκτός από το σύστημα βαθμολόγησης Dusseldorf και το IPSS, κανένα άλλο σύστημα δεν είναι αρκετά ικανό να διαχωρίσει την κατηγορία των ασθενών πολύ χαμηλού κινδύνου που σπάνια απαιτεί θεραπεία.
- 3) Η εμφάνιση ολοένα και πιο αποτελεσματικών θεραπειών μπορεί να καταστήσει απαρχαιωμένα αυτά τα συστήματα βαθμολόγησης
- 4) Η κυτταρογενετική μελέτη δεν είναι διαθέσιμη στο 30-50% των ασθενών. Σε μερικές περιπτώσεις επομένως μια ανωμαλία μπορεί να περάσει απαρατήρητη, ή επιπλέον μια απλή χρωμοσωμική ανωμαλία που σήμερα θεωρείται π.χ. ενδιάμεσης πρόγνωσης, στο άμεσο μέλλον να θεωρείται καλής ή κακής πρόγνωσης.
- 5) Η προγνωστική αξία του αριθμού και της σοβαρότητας των κυτταροπενιών είναι ελάχιστη π.χ. στους ασθενείς από την Ιαπωνία. Έτσι, η λήψη κλινικών αποφάσεων σε ασθενείς με MDS που προέρχονται από Δυτικές χώρες με τη χρήση των συστημάτων βαθμολόγησης μπορεί να είναι τελείως διαφορετική σε σχέση με τους Γιαπωνέζους ασθενείς.

ΒΑΣΙΚΕΣ ΑΡΧΕΣ ΤΗΣ ΑΝΟΣΟΛΟΓΙΚΗΣ ΑΠΑΝΤΗΣΗΣ

ΦΥΣΙΚΗ ΑΝΟΣΙΑ

Η φυσική αντίσταση⁹ του οργανισμού σε πολλά μικρόβια παρέχεται από ένζυμα και πρωτεΐνες τόσο στο περιφερικό αίμα, όσο και στους ιστούς και στην κατηγορία αυτή περιλαμβάνονται οι πρωτεΐνες συνδέσεως (βλ. πίνακα 13), το συμπλήρωμα και οι πρωτεΐνες οξείας φάσης.

Πίνακας 13: ΔΙΑΛΥΤΕΣ ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ ΤΗΣ ΦΥΣΙΚΗΣ ΑΝΟΣΙΑΣ

ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ	ΜΕΙΖΟΝΕΣ ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΟΙ ΣΤΟΧΟΙ	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ
Λυσοζύμη	Πεπτιδογλυκάνη κυτταρικού τοιχώματος του βακτηριδίου	Λύση του κυτταρικού τοιχώματος του μικροβίου
Πρωτεΐνη που συνδέεται με μαννόζη	Γλυκολιπίδια, γλυκοπρωτεΐνες υψηλής περιεκτικότητας σε μαννόζη	Οψωνινοποίηση και ενεργοποίηση του συμπληρώματος
C-αντιδρώσα πρωτεΐνη	Πολυσακχαρίτες και φωσφορυλχολίνη της επιφάνειας του μικροβίου	Οψωνινοποίηση και ενεργοποίηση του συμπληρώματος
Αμυλοειδής πρωτεΐνη Ρ του ορού	Υδατάνθρακες του κυτταρικού τοιχώματος του μικροβίου	Οψωνινοποίηση
Πρωτεΐνη που συνδέεται με LPS (λιποπολυσακχαρίτες)	LPS	Σύνδεση των LPS με το CD14
Διαλυτό CD14	LPS	Σύνδεση των LPS με τα κύτταρα του ξενιστή
Πρωτεΐνη C3 του συμπληρώματος	Υδατάνθρακες και πρωτεΐνες της επιφάνειας του μικροβίου	Οψωνινοποίηση, ενεργοποίηση του συμπληρώματος και πολλές άλλες δράσεις

ΣΥΜΠΛΗΡΩΜΑ

Το συμπλήρωμα⁹ είναι μια ομάδα πρωτεϊνών του ορού που αποτελείται από 20 διαλυτές πρωτεΐνες-κλάσματα με δραστηριότητα πρωτεΐνάσης. Οι πρωτεΐνες αυτές όταν ενεργοποιηθούν στην μεμβράνη του μικροβίου προκαλούνται 4 ειδών προστατευτικές για τον οργανισμό δράσεις:

- 1) Μερικά κλάσματα αθροίζονται στο μικροβιακό τοίχωμα όπου δημιουργούν οπές
- 2) Άλλα τμήματα επικαλύπτουν το μικροοργανισμό και αυξάνουν την καταστροφή του από κύτταρα του οργανισμού μέσω του οψωνισμού
- 3) Άλλα δρουν ως χημειοτακτικοί παράγοντες

4) Άλλα προκαλούν αμυντικές αντιδράσεις συνδεδεμένα με υποδοχείς γειτονικών κυττάρων

Το συμπλήρωμα ως γνωστό ενεργοποιείται διά μέσου 2 διαφορετικών οδών, της κλασσικής και της εναλλακτικής οδού.

ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ ΟΞΕΙΑΣ ΦΑΣΗΣ

Οι πρωτεΐνες αυτές⁹ που παράγονται από το ήπαρ κατά τη διάρκεια σοβαρών λοιμώξεων ως αποτέλεσμα μιας συνδυασμένης προστατευτικής αντίδρασης που ονομάζεται απάντηση οξείας φάσης, είναι κυρίως οι παράγοντες C3 και B του συμπληρώματος, η πρωτεΐνη που συνδέεται με μαννόζη, η C-αντιδρώσα πρωτεΐνη, η αμυλοειδής πρωτεΐνη P, η α2-μακροσφαιρίνη, το ινωδογόνο και η α1-αντιθρυψίνη.

ΑΓΓΕΙΑΚΗ ΚΑΙ ΕΝΔΟΘΗΛΙΑΚΗ ΑΠΑΝΤΗΣΗ ΣΤΗ ΛΟΙΜΩΞΗ

Η πρώτη αντίδραση των αγγείων⁹ στη φλεγμονή είναι η αγγειοδιαστολή που ακολουθείται από συστολή των ενδοθηλιακών κυττάρων στα μετατριχοειδικά φλεβίδια που αυξάνει τη διαβατότητα των αγγείων και συμβάλλει στην εξαγγείωση κυττάρων και πρωτεϊνών στον εξωκυττάριο χώρο. Αυτή η αγγειοδιαστολή προκαλείται από μεσολαβητές που απελευθερώνονται στην περιοχή της φλεγμονής (βλ. πίνακα 14) και ευθύνεται για τη σημειολογία της φλεγμονής (πόνος, ερυθρότητα, θερμότητα, οίδημα).

Στο ενδοθήλιο των αγγείων υπάρχουν ορισμένες κατηγορίες μορίων προσκόλλησης που είναι οι E- και P- σελεκτίνες και οι μουκίνες ICAM-1 (intracellular cell adhesion molecule-1) και VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule-1) που συνδέονται με ιντεγκρίνες ή με μουκίνες πάνω σε κύτταρα του αίματος, ευοδώνοντας έτσι την προσκόλληση, ενεργοποίηση και μετανάστευση των κυττάρων αυτών μέσω του ενδοθηλίου στους φλεγμαίνοντες ιστούς.

Πίνακας 14: Αγγειοδραστικοί μεσολαβητές της φλεγμονής

Μεσολαβητές που προκαλούν αγγειοδιαστολή
Ισταμίνη
Προσταγλανδίνες (ειδικά η PGD ₂)
Νιτρικό οξείδιο
Μεσολαβητές που αυξάνουν την αγγειακή διαπερατότητα
Ισταμίνη
Προσταγλανδίνες (ειδικά η PGD ₂)
PAF (platelet-activating factor)
Βραδυκινίνη
Λευκοτριένια (ειδικά τα LTC ₄ , LTD ₄ , LTE ₄)

ΕΠΙΚΤΗΤΗ ΑΝΟΣΙΑ

ΤΑ ΚΥΤΤΑΡΑ ΤΗΣ ΦΛΕΓΜΟΝΗΣ

Τρεις τύποι κυττάρων⁹ παίζουν σημαντικό ρόλο στη φλεγμονή. Τα ουδετερόφιλα, τα μονοκύτταρα-μακροφάγα και τα λεμφοκύτταρα. Τα δύο πρώτα είναι και τα κατεξοχήν φαγοκύτταρα του οργανισμού.

ΟΥΔΕΤΕΡΟΦΙΛΑ

Τα ουδετερόφιλα περιέχουν 3 είδη κοκκίων: α) Τα αζουρόφιλα κοκκία, που εμφανίζονται στο στάδιο του προμυελοκυττάρου και περιέχουν το αντιμικροβιακό ένζυμο μυελοϋπεροξειδάση, β) τα ειδικά ή δευτερογενή κοκκία, που εμφανίζονται στο στάδιο του μυελοκυττάρου και περιέχουν κυρίως λυσοζύμη και λακτοφερρίνη, και γ) τα κοκκία γελατινάσης, που εμφανίζονται στο στάδιο του μεταμυελοκυττάρου. Κάθε ουδετερόφιλο δηλαδή περιέχει ένα οπλοστάσιο προσχηματισμένων ενζύμων με αντιμικροβιακές ιδιότητες.

Η προσκόλληση των ουδετερόφιλων στο ενδοθήλιο ονομάζεται περιθωριοποίηση και λαμβάνει χώρα σε 3 φάσεις: Στην πρώτη τα ουδετερόφιλα κυλούν και κολλούν πάνω στο ενδοθηλιακό τοίχωμα με τη βοήθεια συνδέσεων μεταξύ των μορίων επιφάνειας που βρίσκονται στην επιφάνειά τους και στην επιφάνεια των ενδοθηλιακών κυττάρων. Στη σύνδεση αυτή τα μόρια PSGL-1, L-σελεκτίνη και CLA της επιφάνειας των ουδετερόφιλων συνδέονται αντίστοιχα με τα μόρια P-σελεκτίνη, CD34 και E-σελεκτίνη της επιφάνειας των ενδοθηλιακών κυττάρων. Ακολουθεί το δεύτερο στάδιο της ενεργοποίησης των ουδετερόφιλων από χημειοτακτικούς παράγοντες (χημειοκίνες, PAF, C5a) και το τρίτο στάδιο της δυναμικής προσκόλλησης των ουδετερόφιλων στο ενδοθήλιο μέσω της ισχυρής σύνδεσης των ιντεγκρινών Mac-1 (CD11b/CD18) και LFA-1 (ή CD11a/CD18) της επιφάνειας των ουδετερόφιλων με τα μόρια προσκόλλησης ICAM-1 και ICAM-2 του ενδοθηλίου αντίστοιχα. Στη συνέχεια τα ουδετερόφιλα διεισδύουν μεταξύ των ενδοθηλιακών κυττάρων και μεταναστεύουν στους φλεγμαίνοντες ιστούς με μια διαδικασία που ονομάζεται μετανάστευση. Στους φλεγμαίνοντες ιστούς ακολουθεί η φαγοκυττάρωση του ξένου σωματιδίου ή μικροβίου ή κατεστραμμένου κυτταρικού στοιχείου με τη συμβολή των ενζυμικών κοκκίων των κυττάρων αυτών που απελευθερώνουν το περιεχόμενό τους μέσα στο φαγόσωμα. Ορισμένα μικρόβια (κυρίως αυτά που φέρουν κάψα) φαγοκυτταρώνονται αφού επικαλυφθούν με πρωτεΐνες που ονομάζονται οψωνίνες, και οι οποίες είναι κλάσματα του συμπληρώματος και ανοσοσφαιρίνες.

ΜΟΝΟΚΥΤΤΑΡΑ-ΜΑΚΡΟΦΑΓΑ

Τα μονοκύτταρα που κυκλοφορούν στο αίμα όταν εγκατασταθούν στους περιφερικούς ιστούς μόνιμα αποτελούν τα ιστικά μακροφάγα ή ιστιοκύτταρα. Τα κύτταρα αυτά προσελκύονται στους φλεγμαίνοντες ιστούς με τρόπο παρόμοιο με τα ουδετερόφιλα χρησιμοποιώντας τα ίδια μόρια προσκόλλησης και χημειοταξίας. Τα διεγερμένα μακροφάγα στην περιοχή της φλεγμονής όχι μόνο φαγοκυτταρώνουν τα ξένα σώματα-εισβολείς αλλά εκκρίνουν μια τεράστια ποικιλία βιολογικά δραστικών ουσιών μέσω των οποίων ρυθμίζουν την ανοσολογική απάντηση. Ανάμεσα σ'αυτές τις δραστικές ουσίες (που υπολογίζονται πάνω από εκατό) σημαντικό ρόλο παίζουν οι ιντερφερόνες (IFN-α και IFN-β), οι αιμοποιητικές κυτοκίνες (GM-CSF, M-CSF, G-CSF και άλλες), οι ιντερλευκίνες (IL-1, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12), ο TNFα (tumor necrosis factor α), ο PAF (platelet activating factor), ο PDGF (platelet derived growth factor), οι χημειοκίνες και οι πρωτεΐνες του συμπληρώματος (C1-C9).

Σε περιπτώσεις που τα μικρόβια ή τα ξένα σωματίδια που προκαλούν τη φλεγμονή είναι ογκώδη, πολυάριθμα και ανθεκτικά στην πέψη από τα μακροφάγα, συναθροίζεται ένας μεγάλος αριθμός μακροφάγων γύρω από αυτά μαζί με λεμφοκύτταρα και ινοβλάστες και σχηματίζουν τα κοκκιώματα. Τα μακροφάγα των κοκκιωμάτων συχνά ονομάζονται επιθηλιοειδή κύτταρα.

ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΑ ΚΑΙ ΛΕΜΦΙΚΟΣ ΙΣΤΟΣ

Τα λεμφοκύτταρα είναι κύτταρα βραχύβια και προγραμματισμένα να πεθάνουν λίγες μέρες αφού εγκαταλείψουν το μυελό των οστών ή το θύμο αδέν. Αν όμως λάβουν σήματα που υποδηλώνουν την ύπαρξη μικροβίου ή άλλου ξένου σώματος στον οργανισμό απαντούν με ένα φαινόμενο που ονομάζεται ενεργοποίηση ή διέγερση, κατά το οποίο τα λεμφοκύτταρα υφίστανται διαδοχικές διαιρέσεις σε μια περίοδο αρκετών ημερών και στη συνέχεια ορισμένα από αυτά επιστρέφουν στην πρότερη ήρεμη κατάσταση και γίνονται μνημονικά λεμφοκύτταρα, ενώ κάποια άλλα διαφοροποιούνται προς δραστικά ή λειτουργικά λεμφοκύτταρα και φέρνουν σε πέρας αμυντικές δράσεις έναντι ξένων εισβολέων.

1) Τα T-λεμφοκύτταρα δεν εκφράζουν στην επιφάνειά τους ανοσοσφαιρίνες όπως τα B-λεμφοκύτταρα, αλλά επιφανειακές πρωτείνες που ονομάζονται υποδοχείς των T-κυττάρων (T-cell receptors, TCR), με τους οποίους ανιχνεύουν την παρουσία ξένων ουσιών. Οι υποδοχείς αυτοί μοιάζουν με τις ανοσοσφαιρίνες, αλλά ουδέποτε εκκρίνονται. Η ανίχνευση των ξένων ουσιών γίνεται όταν το T-λεμφοκύτταρο έρθει σε επαφή με ένα κύτταρο που μεταφέρει το αντιγόνο-μικροοργανισμό, και ονομάζεται αντιγονοπαρουσιαστικό κύτταρο (antigen presenting cell, APC). Τα κυριότερα APC είναι τα B-λεμφοκύτταρα, τα δενδριτικά κύτταρα (διαπλεκόμενα κύτταρα, δενδριτικά κύτταρα του αίματος και κύτταρα Langerhans της επιδερμίδας) και τα μακροφάγα. Η παρουσίαση του αντιγόνου στο T-κύτταρο γίνεται σε συνδυασμό με την παρουσία των αντιγόνων του μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας (MHC) που βρίσκονται και αυτά στην επιφάνεια του APC. Ως γνωστό τα T-κύτταρα περιλαμβάνουν (ανάλογα με τα αντιγόνα επιφανείας-CD που εκφράζουν στη επιφάνειά τους) τις υποομάδες CD4+CD8- (βοηθητικά T-κύτταρα, 70% των κυκλοφορούντων), CD4-CD8+ (κυτταροτοξικά T-κύτταρα, 25% των κυκλοφορούντων), CD4-CD8- (διπλοαρνητικά ή Tγδ κύτταρα, 4% των κυκλοφορούντων), CD4+CD8+ (άγνωστης λειτουργίας, 1% των κυκλοφορούντων). Εκτός του TCR, στην επιφάνεια των T-κυττάρων εκφράζονται και άλλα αντιγόνα που είναι εξίσου σημαντικά για τη λειτουργία τους και είναι τα CD2, CD3, CD4, CD5, CD7, CD8, CD25, CD28, CD29, CD40L, CD54, CD69, υποδοχείς για IL-1, IL-2, IL-6, TNFα, τρανσφερίνη, υποδοχείς για το Fc τμήμα των ανοσοσφαιρινών και μόρια προσκόλλησης (LFA-1, ICAM-1).

Ο όρος διέγερση των λεμφοκυττάρων υποδηλώνει μια σειρά γεγονότων κατά την οποία τα λεμφοκύτταρα ενεργοποιούνται όταν ειδικά μόρια σύνδεσης (ligands) συνδεθούν με υποδοχείς στη μεμβράνη τους. Το τελευταίο έχει ως αποτέλεσμα την εκσεσημασμένη αύξηση της δραστηριότητάς των ενδοκυττάρων τυροσινκινασών που καταλύουν τη φωσφορυλίωση της τυροσίνης σε άλλες πρωτείνες. Κατά τη διέγερση του κυττάρου ανιχνεύονται στον πυρήνα ειδικές πρωτείνες που ρυθμίζουν τον πολλαπλασιασμό του κυττάρου, όπως είναι το προϊόν του πρωτοογκογονιδίου c-myc. Το πρωτεύον σήμα για τη διέγερση ενός T-λεμφοκυττάρου είναι η σύνδεση του TCR με το αντιγονοπαρουσιαστικό κύτταρο. Αυτό όμως δεν αρκεί και συνήθως απαιτείται ένα δεύτερο σήμα, το οποίο ξεκινά από μόρια τα οποία ονομάζονται συνδιεγερτικά. Ένα τέτοιο μόριο είναι και το CD28 που εκφράζεται στην επιφάνεια όλων των βοηθητικών T-κυττάρων και στο περίπου 50% των κυτταροτοξικών T-κυττάρων. Το CD28 συνδέεται με δύο ξεχωριστά μόρια, τα B7.1 και B7.2 που

βρίσκονται στην επιφάνεια των αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων (B-λεμφοκυττάρων, μακροφάγων και δενδριτικών κυττάρων) και η σύνδεση αυτή ενεργοποιεί πλήρως τα T-κύτταρα. Επίσης τα T-κύτταρα εκφράζουν στην επιφάνειά τους μόρια όπως το LFA-1 (ή CD11a/CD18) και το CD2 που συνδέονται με μόρια σύνδεσης πάνω στα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα προάγοντας έτσι την επαφή T-κυττάρου και APC.

2) Τα B-λεμφοκύτταρα παράγονται και διαφοροποιούνται στο μυελό των οστών, όπου αρχικά ανιχνεύονται ως προγονικά ή pro-B (progenitor) κύτταρα, τα οποία μεταπίπτουν σταδιακά στη φάση των πρόδρομων ή pre-B (precursor) κυττάρων, των άωρων B-λεμφοκυττάρων και τελικά των ώριμων B-λεμφοκυττάρων. Τα ώριμα B-λεμφοκύτταρα όταν διεγερθούν διαφοροποιούνται σε πλασματοκύτταρα που παράγουν και εκκρίνουν αντισώματα, τα οποία με τη σειρά τους συμβάλλουν στη λύση της φλεγμονής.

3) Τα κύτταρα NK (natural killers ή φυσικοί φονιάδες) είναι μεγάλα λεμφοκύτταρα με κοκκία που καταστρέφουν κύτταρα στόχους χωρίς να απαιτούν έκθεση στο αντιγόνο. Τα περισσότερα είναι CD56+ και CD16+ (το τελευταίο είναι ένας υποδοχέας χαμηλής συγγένειας με το Fc τμήμα των ανοσοσφαιρινών IgG σε ανοσοσυμπλέγματα). Έτσι, τα NK κύτταρα εκτός από τη φυσική θανάτωση των κυττάρων, μπορούν να καταστρέψουν κύτταρα που έχουν αντίσωμα στην επιφάνειά τους. Αυτού του είδους η κυτταροτοξικότητα ονομάζεται ADCC (antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity). Τα NK κύτταρα παράγουν και διάφορες κυτοκίνες όπως η IFN γ , ο TNF α και ο GM-CSF, μέσω των οποίων ασκούν ανοσορυθμιστικές δράσεις, αποτελώντας έτσι τη γέφυρα μεταξύ της φυσικής και της επίκτητης ανοσίας.

Η ΑΝΟΣΟΛΟΓΙΚΗ ΑΠΑΝΤΗΣΗ

Οι τρεις κύριες ιδιότητες⁹ του ανοσολογικού συστήματος είναι:

- 1) Η ειδικότητα
- 2) Η μνήμη, και
- 3) Η ικανότητα διάκρισης του εαυτού από το μη εαυτό (self and non-self)

Η ανοσολογική απάντηση αρχίζει όταν ένα αντιγόνο εισβάλλει στον ανθρώπινο οργανισμό. Τα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα (APC) συλλαμβάνουν το αντιγόνο αυτό και το παρουσιάζουν στα βοηθητικά T-κύτταρα. Η σύνδεση των APC με τα T-βοηθητικά κύτταρα ενδυναμώνεται με τη βοήθεια των IL-1, IL-6, TNF που παράγονται από τα APC. Τα T-βοηθητικά κύτταρα διεγείρονται και με τη σειρά τους παράγουν IL-2, η οποία δρα: α) βοηθώντας στον πολλαπλασιασμό των ίδιων των T-βοηθητικών κυττάρων που παράγουν βοηθητικά T-κύτταρα μνήμης, β) διεγείροντας τα κυτταροτοξικά T-λεμφοκύτταρα (των οποίων ο ρόλος είναι αφενός η απευθείας λύση του προσβεβλημένου κυττάρου και αφετέρου ο πολλαπλασιασμός και η παραγωγή μνημονικών T-κυτταροτοξικών κυττάρων), και γ) διεγείροντας τα B-λεμφοκύτταρα (που είτε διαφοροποιούνται σε πλασματοκύτταρα τα οποία παράγουν και εκκρίνουν τα αντισώματα, ή πολλαπλασιάζονται και δημιουργούν τα B-κύτταρα μνήμης). Η διαφοροποίηση των B-λεμφοκυττάρων σε πλασματοκύτταρα γίνεται όταν συνδεθεί το μόριο CD40L της επιφάνειας των T-βοηθητικών κυττάρων με το μόριο CD40 της επιφάνειας των B-κυττάρων.

Οι ανοσολογικές αυτές διεργασίες σταματούν όταν το αντιγόνο εξαιρεθεί. Οι μηχανισμοί καταστροφής του αντιγόνου είναι συνοπτικά οι εξής:

- 1) Άμεση καταστροφή από τα διεγερμένα T-κυτταροτοξικά λεμφοκύτταρα,
- 2) Παραγωγή αντισωμάτων (από τα πλασματοκύτταρα) που λειτουργούν ως οψωνίνες επικαλύπτοντας τα αντιγόνα και προάγοντας τη φαγοκυττάρωση από μακροφάγα και ουδετερόφιλα,

- 3) Ενεργοποίηση του συμπληρώματος που πυροδοτείται από τη σύνδεση του αντιγόνου με το αντίσωμα και είτε λύση του κυττάρου, είτε οψωνισμός, είτε προσέλκυση των ουδετερόφιλων με χημειοτακτικό μηχανισμό,
- 4) Κυτταροτοξικότητα εξαρτώμενη από το αντίσωμα (IgG αντίσωμα συνδέεται με Fc υποδοχείς της επιφάνειας των NK κυττάρων, σύνδεση του IgG της επιφάνειας των NK κυττάρων με αντιγόνα-στόχους και καταστροφή του κυττάρου που φέρει το αντιγόνο-στόχο),
- 5) Αδρανοποίηση βακτηριακών τοξινών και δηλητηρίων εντόμων ή όφεων (με απευθείας σύνδεσή τους με το αντίστοιχο αντίσωμα),
- 6) Αδρανοποίηση ιών μέσω σύνδεσης αντισωμάτων με αντιγόνα-πρωτείνες στην επιφάνεια του ιού.

ΜΟΡΙΑ ΠΡΟΣΚΟΛΛΗΣΗΣ (CELL ADHESION MOLECULES-CAM)

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Τα μόρια προσκόλλησης²²⁻³⁵ (cellular adhesion molecules-CAM) είναι γλυκοπρωτείνες της κυτταρικής επιφάνειας που μεσολαβούν στη σύνδεση μεταξύ δύο κυττάρων (μέσω ομοτυπικών και ετεροτυπικών αλληλεπιδράσεων) ή μεταξύ κυττάρων και της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας. Τα μόρια αυτά είναι απαραίτητα συμπληρώματα στη διαδικασία της εμβρυογένεσης (εξασφαλίζουν την ιστική και οργανική "ειδικότητα" που εγγυάται την ακεραιότητα ολόκληρου του οργανισμού), της ιστικής επιδιόρθωσης και οργάνωσης, της φυσιολογικής αιμοποίησης, της μετανάστευσης και λειτουργικότητας των ώριμων αιμοποιητικών κυττάρων, της λειτουργίας και αποθήκευσης των λεμφοκυττάρων, καθώς και της καρκινικής μετάστασης, αποτελώντας το κεντρικό σημείο της αλληλεπίδρασης μεταξύ πρόδρομων αιμοποιητικών κυττάρων και μυελικού μικροπεριβάλλοντος και μεταξύ λευκών αιμοσφαιρίων-αιμοπεταλίων και αγγειακών ενδοθηλιακών κυττάρων. Τα CAM διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της άνοσης απάντησης στη φλεγμονή και ρυθμίζουν τη σύνθεση των κυτταροκινών. Σήμερα πιστεύεται ότι τα μόρια αυτά είναι σημειακοί αγγελιοφόροι που επηρεάζουν πολλές και ποικίλες κυτταρικές λειτουργίες.

Η κυτταρική προσκόλληση ρυθμίζεται από αλλαγές στον αριθμό των εκφραζόμενων στην κυτταρική επιφάνεια μορίων προσκόλλησης και από μετατροπές στη δομή τους, τόσο και τέτοιες ώστε να μεταβάλλεται η συγγένειά τους με τα μόρια σύνδεσής τους, καθώς και η δυναμική με την οποία επιτυγχάνεται κάτι τέτοιο. Οι λειτουργίες των μορίων προσκόλλησης μπορεί να τροποποιηθούν και από αλλαγές στη διαμόρφωσή τους και από τη συνάθροισή τους. Αυξημένη έκφραση επιτυγχάνεται με τη μετακίνηση των μορίων προσκόλλησης από τις ενδοκυττάρια αποθήκες τους στην κυτταρική επιφάνεια ή με τη σύνθεση νέων μορίων. Ένας αριθμός κυτοκινών και άλλων μεσολαβητών της φλεγμονής επηρεάζουν τον αριθμό και τη λειτουργία των μορίων προσκόλλησης στα κύτταρα, με την ειδικότητα να εξαρτάται τόσο από τον τύπο κυττάρου, όσο και από τον ίδιο το μεσολαβητή της φλεγμονής, ενώ συνδυασμός διαφορετικών κυτοκινών μπορεί να δράσει αθροιστικά, συνεργικά ή ανταγωνιστικά.

ΚΑΤΗΓΟΡΙΕΣ ΜΟΡΙΩΝ ΠΡΟΣΚΟΛΛΗΣΗΣ

Τα μόρια προσκόλλησης μπορούν να καταταγούν σε 4 (τέσσερις) κατηγορίες που καθεμία από αυτές περιλαμβάνει μόρια με κοινά χαρακτηριστικά και λειτουργίες. Οι κατηγορίες αυτές είναι : α) οι καντερίνες, β) οι ιντεγκρίνες, γ) οι σελεκτίνες, και δ) η υπεροικογένεια των ανοσοσφαιρινών. Επίσης έχουν τελευταία αναγνωριστεί και άλλα κυτταρικά μόρια προσκόλλησης που ενέχονται στις διακυτταρικές αλληλεπιδράσεις, την ενεργοποίηση των κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος και το λεμφοκυτταρικό αποικισμό, και δεν ανήκουν στις προαναφερθείσες κατηγορίες, όπως π.χ. το CD44, το VAP-1 (vascular adhesion protein-1), το CD34, το GlyCAM-1 (glycosylation-dependent cell adhesion molecule-1).

♦ ΚΑΝΤΕΡΙΝΕΣ

Τα μόρια αυτά είναι υποδοχείς της κυτταρικής προσκόλλησης που εξαρτώνται από το Ca⁺⁺ και συνδέονται με κύτταρα μέσω αιμοφιλικών αλληλεπιδράσεων. Έως τώρα έχουν βρεθεί και ταυτοποιηθεί 4 μέλη της κατηγορίας αυτής, οι N-(neural), E-(epithelial), P-(placental) καντερίνες και το κυτταρικό μόριο προσκόλλησης του

ήπατος (liver cell adhesion molecule, L-CAM). Το ενδοκυττάριο τμήμα των μορίων αυτών αλληλεπιδρά με τον κυτταρικό σκελετό μέσω των κατενινών. Οι καντερίνες είναι μόρια αποφασιστικής σημασίας στη ρύθμιση της μορφογένεσης και της οργάνωσης των ιστών, ενώ επίσης έχουν αναφερθεί και αλληλεπιδράσεις μεταξύ της E-καντερίνης των επιθηλιακών κυττάρων και της ιντεγκρίνης αEβ7 των T-λεμφοκυττάρων.

◆ ΙΝΤΕΓΚΡΙΝΕΣ

Οι ιντεγκρίνες είναι διαμεμβρανικές γλυκοπρωτείνες που αποτελούνται από δύο συνδεδεμένα ετεροδιμερή που ονομάζονται υπομονάδες α και β. Υπάρχουν τουλάχιστο 16 διαφορετικές α υπομονάδες και τουλάχιστο 8 διαφορετικές β υπομονάδες. Η οικογένεια των ιντεγκρινών χωρίζεται σε υποκατηγορίες ανάλογα με το είδος της β αλυσίδας που περιέχεται στο μόριο. Οι ιντεγκρίνες ρυθμίζουν αλληλεπιδράσεις μεταξύ των κυττάρων ή μεταξύ κυττάρων και εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας, και απαιτείται να ενεργοποιηθούν πριν τη σύνδεσή τους με τους αντι-υποδοχείς τους. Η σύνδεση αυτή των ιντεγκρινών εξασφαλίζει διεγερτικά ή ανασταλτικά σήματα για τα κύτταρα που εκφράζουν αυτά τα μόρια προσκόλλησης. Οι β1-ιντεγκρίνες (ή VLA-very late antigen) παίζουν ρόλο στην ιστική οργάνωση. Συνδέονται με την εξωκυττάρια θεμέλια ουσία πολλών ιστών και με τη βασική μεμβράνη μυών, ενδοθηλίου, επιθηλίου και νευρικού συστήματος. Το VLA-4 (α4β1, CD29/CD49d) λειτουργεί ως υποδοχέας της κυτταρικής θεμέλιας ουσίας, αλλά και ως υποδοχέας για ένα άλλο μόριο προσκόλλησης, το VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule-1). Το VLA-4 εκφράζεται στην επιφάνεια λεμφοκυττάρων, μονοκυττάρων, ηωσινόφιλων, όχι όμως και των ουδετερόφιλων.

Οι β2 ιντεγκρίνες είναι πιο γνωστές ως ιντεγκρίνες των λευκοκυττάρων από τη στιγμή που εκφράζονται αποκλειστικά στα λευκοκύτταρα. Οι β2 αλυσίδα (CD18) συνδέεται με 4 διαφορετικές α αλυσίδες και δημιουργεί τα πιο κάτω 4 μόρια: το αLβ2 (CD11a/CD18, LFA-1, leucocyte function associated antigen-1), το αMβ2 (CD11b/CD18, Mac-1, complement receptor 3), το αxβ2 (CD11c/CD18) και το αδβ2. Οι β2 ιντεγκρίνες είναι μεσολαβητές της σύνδεσης μεταξύ των λευκοκυττάρων και διαφορετικών κυττάρων-στόχων που εκφράζουν κάποιο από τα μόρια ICAM (ICAM-1, -2, -3). Κατά την ενεργοποίηση των λευκοκυττάρων οι β2 ιντεγκρίνες όχι μόνο παρουσιάζουν μια αύξηση της έκφρασής τους πάνω στην κυτταρική επιφάνεια, αλλά επίσης εμφανίζουν μια ποιοτική μετατροπή που οδηγεί σε αυξημένη ικανότητα σύνδεσης.

Άλλες ιντεγκρίνες που ενέχονται σε διακυτταρικές αλληλεπιδράσεις είναι η α4β7 (που εκφράζεται πάνω σε λευκοκύτταρα και αλληλεπιδρά με το μόριο MadCAM-1 (mucosal addressin cell adhesion molecule-1) ή με το VCAM-1, και οι ιντεγκρίνες αIIbβ3 (CD41/CD61) και ανβ3 (CD51/CD61) που υπάρχουν στην επιφάνεια των αιμοπεταλίων και ενέχονται στην αιμοπεταλιακή συσσώρευση και αλληλεπίδραση με τα ενδοθηλιακά κύτταρα.

◆ ΣΕΛΕΚΤΙΝΕΣ

Η οικογένεια των σελεκτινών αποτελείται από τρεις πρωτείνες: την E- (ενδοθηλιακή), P- (αιμοπεταλιακή) και L- (λευκοκυτταρική) σελεκτίνη. Η E-σελεκτίνη (CD62E) και η P-σελεκτίνη (CD62P) εκφράζονται από ενεργοποιημένα ενδοθηλιακά κύτταρα, ενώ η L-σελεκτίνη (CD62L) εκφράζεται αποκλειστικά στην επιφάνεια των λευκοκυττάρων. Αυτές οι μοριακές δομές ρυθμίζουν την αρχική φάση της σύνδεσης των λευκοκυττάρων με το αγγειακό ενδοθήλιο. Η κοινή δομή των σελεκτινών περιλαμβάνει μια κοντή κυτταροπλασματική καρβοξυτελική ουρά, ένα διαμεμβρανικό τμήμα, ένα αμινοτελικό εξωκυττάριο τμήμα που εξαρτάται από Ca⁺⁺

και συνδέεται με ποικίλους υδατάνθρακες (λεκτίνη), μια περιοχή που μοιάζει με τον αυξητικό παράγοντα της επιδερμίδας και μια περιοχή ποικίλου αριθμού αλληλουχιών που μοιάζουν με αυτές που εμφανίζονται στις πρωτείνες του συμπληρώματος.

Η P-σελεκτίνη εμφανίζεται στην ενδοθηλιακή κυτταρική επιφάνεια ταχύτητα κατόπιν ενεργοποίησης από ισταμίνη, θρομβίνη ή κυτοκίνες, ενώ η έκφραση της E-σελεκτίνης στην επιφάνεια των ενδοθηλιακών κυττάρων μεγιστοποιείται 2-6 ώρες μετά από ενεργοποίηση από κυτοκίνες. Η L-σελεκτίνη εκφράζεται πάνω στην επιφάνεια των λευκοκυττάρων, αλλά εξαφανίζεται εντός λίγων λεπτών από την ενεργοποίησή τους.

♦ ΥΠΕΡΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑ ΤΩΝ ΑΝΟΣΟΣΦΑΙΡΙΝΩΝ

Η υπεροικογένεια των ανοσοσφαιρινών αποτελείται από πρωτείνες της κυτταρικής επιφάνειας που ενέχονται στην αντιγονική αναγνώριση, την σύνδεση του συμπληρώματος και την κυτταρική προσκόλληση. Αυτές οι πρωτείνες χαρακτηρίζονται από ένα ποικίλο αριθμό εξωκυττάρων Ig-τύπου περιοχών. Τα μέλη της οικογένειας αυτής (που είναι υπεύθυνα για τις διακυτταρικές αλληλεπιδράσεις) είναι τα:

- ✓ ICAM-1 (intercellular cell adhesion molecule-1, CD54)
- ✓ ICAM-2 (intercellular cell adhesion molecule-2, CD102)
- ✓ ICAM-3 (intercellular cell adhesion molecule-3, CD50)
- ✓ VCAM-1 (CD106)
- ✓ LFA-3 (CD58)
- ✓ PECAM-1 (platelet-endothelial cell adhesion molecule-1, CD31)
- ✓ CD2
- ✓ MadCAM-1

Αυτά τα μόρια προσκόλλησης είναι πολύ σημαντικά στην αλληλεπίδραση μεταξύ ανοσοκυττάρων (π.χ. ICAM-1 με LFA-1, CD2 με LFA-3), στον ειδικό ανά ιστό εποικισμό των λεμφοκυττάρων (π.χ. MadCAM-1) και στην προσκόλληση των λευκοκυττάρων στα ενδοθηλιακά κύτταρα που οδηγεί στην μετανάστευσή τους στους φλεγμαίνοντες ιστούς (π.χ. ICAM-1 με LFA-1 ή Mac-1, VCAM-1 με VLA-4, PECAM-1 με PECAM-1).

Η έκφραση των VCAM-1 και ICAM-1 στα ενδοθηλιακά κύτταρα ενεργοποιείται από τον TNF- α και την IL-1 β . Η έκφραση ειδικά του ICAM-1 επίσης ενεργοποιείται από την INF- γ , ενώ η έκφραση ειδικά του VCAM-1 ενεργοποιείται από τις ιντερλευκίνες IL-4 και IL-13.

*Πρόσφατα έχει περιγραφεί ένα μόριο προσκόλλησης, η κυτοχεσίνη-1, η οποία φαίνεται ότι συνδέεται με το CD18 και με τις ενεργοποιημένες CD11/CD18 ιντεγκρίνες, και τους επιτρέπει να συνδεθούν με το ICAM-1.

Επίσης πρόσφατα έχουν αναφερθεί και τα: ICAM-4 (ή αντιγόνο Landsteiner-Wiener) που εκφράζεται αποκλειστικά στην επιφάνεια ερυθροκυττάρων ή πρόδρομων κυττάρων της ερυθράς σειράς, και ICAM-5 που εκφράζεται στη φαιά ουσία του τελεγκεφάλου και απουσιάζει από τη γέφυρα και την παρεγκεφαλίδα, ενώ φαίνεται να συνδέει την ιντεγκρίνη CD11a/CD18.

Τέλος, η νέα ιντεγκρίνη CD11d/CD18 βρέθηκε ότι εκφράζεται μαζί με το μόριο CD11b/CD18 στα αρθρικά μακροφάγα, ενώ η έκφρασή της στη ρευματοειδή αρθρίτιδα αυξάνει δυναμικά, όπως άλλωστε και το μόριο σύνδεσής της, το ICAM-3.

ΜΟΡΙΑ ΠΡΟΣΚΟΛΛΗΣΗΣ ΚΑΙ ΦΛΕΓΜΟΝΗ

Τα μόρια προσκόλλησης παίζουν αποφασιστικό ρόλο στην επικοινωνία μεταξύ διαφορετικών άνοσων κυττάρων και στη μετανάστευσή τους από το αίμα στους φλεγμαίνοντες ιστούς. Η συσσώρευση των λευκοκυττάρων είναι μια απαραίτητη διαδικασία για την εξουδετέρωση των λοιμοδών παραγόντων. Η εξαγωγή των

λευκοκυττάρων είναι μια διαδικασία πολλαπλών βημάτων που διαχωρίζεται: i) στην αρχική σύνδεση (tethering) και το κύλισμα (rolling) των λευκοκυττάρων πάνω στα ενδοθηλιακά κύτταρα, ii) την δυναμική προσκόλλησή τους (firm adhesion) στο ενδοθήλιο και iii) την τελική μετανάστευση (migration) μέσω των ενδοθηλιακών κυττάρων στην περιοχή της φλεγμονής. Αυτή η διαδικασία απαιτεί τη δράση των μορίων προσκόλλησης. Πολλές κυτοκίνες και άλλοι μεσολαβητές βοηθούν στην θετική ρύθμιση του αριθμού και της δομής των μορίων προσκόλλησης στις κυτταρικές επιφάνειες. Αλληλεπιδράσεις που βασίζονται στις σελεκτίνες αλλά και σε άλλα μόρια προσκόλλησης (π.χ. VLA-4 με VCAM-1, PECAM-1 με PECAM-1) μεσολαβούν στην αρχική αλληλεπίδραση μεταξύ λευκοκυττάρων και ενδοθηλίου, οδηγώντας στη μείωση της ταχύτητας των κυκλοφορούντων λευκοκυττάρων. Ακολουθεί η σύνδεση και το κύλισμα των λευκοκυττάρων στο ενδοθήλιο και η ενεργοποίηση των λευκοκυττάρων από κυτοκίνες, χημειοκίνες και αλληλεπιδράσεις μεταξύ των σελεκτινών και του PECAM-1. Αυτό οδηγεί στην αύξηση της έκφρασης καθώς και στην ενεργοποίηση των ιντεγκρινών πάνω στα λευκοκύτταρα. Μέσω των ιντεγκρινών αυτών τα λευκοκύτταρα αλληλεπιδρούν με κυτταρικά μόρια προσκόλλησης στη επιφάνεια των ενδοθηλιακών κυττάρων (π.χ. ICAM-1, ICAM-2, VCAM-1), με αποτέλεσμα την δυναμική τους προσκόλληση και τελικά τη διαπίδυση και την (μέσω χημειοκινών) μετανάστευση στη φλεγμαίνουσα περιοχή. Πολλές ασθένειες έχει αναφερθεί ότι οφείλονται σε δυσλειτουργία ή υπερέκφραση ορισμένων μορίων προσκόλλησης.

Οι ασθενείς που πάσχουν από ανεπάρκεια της λευκοκυτταρικής προσκόλλησης τύπου 1 (LAD-1) παρουσιάζουν αμελητέα έκφραση έως και απουσία έκφρασης των β2 ιντεγκρινών στην επιφάνεια των λευκοκυττάρων τους, ενώ οι ασθενείς με ανεπάρκεια της λευκοκυτταρικής προσκόλλησης τύπου 2 (LAD-2) παρουσιάζουν γενετικές μεταβολικές ανωμαλίες που οδηγούν σε αποτυχία της σύνθεσης μορίων σύνδεσης των σελεκτινών. Αυτοί οι ασθενείς υποφέρουν από επανειλημμένες λοιμώξεις που οφείλονται στην ανικανότητα των ουδετερόφιλων να διηθούνται στους φλεγμαίνοντες ιστούς.

Υπερέκφραση των κυτταρικών μορίων προσκόλλησης μπορεί να παρατηρηθεί σε πολλές ασθένειες όπου ενέχονται τα κύτταρα της φλεγμονής και της άνοσης απάντησης (π.χ. σήψη και σηπτικό shock, αρθρίτις, άσθμα, βλάβη από ισχαιμία και επαναιμάτωση, απόρριψη μοσχεύματος, φλεγμονώδεις παθήσεις του καρδιαγγειακού, του δέρματος, των νεφρών, του εγκεφάλου, του ήπατος και του γαστρεντερικού). Επίσης τα καρκινικά κύτταρα χρησιμοποιούν μόρια προσκόλλησης για να αναπτυχθούν και να διασπαρούν στους ιστούς και τα όργανα του ανθρώπου. Αυτές οι διαπιστώσεις υποδεικνύουν ότι η μείωση ή το μπλοκάρισμα της έκφρασης ή της λειτουργίας των μορίων προσκόλλησης θα μπορούσε να αποτελέσει θεραπευτική οδό προς την κατεύθυνση της μείωσης στη διήθηση ή την ενεργοποίηση των κυττάρων της άνοσης απάντησης και τελικά του περιορισμού της φλεγμονής. Αυτό βέβαια δυσχεραίνεται από το γεγονός ότι οι περισσότεροι τύποι μορίων προσκόλλησης εκφράζονται σε περισσότερα από ένα κύτταρα και τα περισσότερα κύτταρα εκφράζουν στην επιφάνειά τους περισσότερα από ένα μόρια προσκόλλησης.

ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΩΝ ΚΥΤΤΑΡΙΚΩΝ ΜΟΡΙΩΝ ΠΡΟΣΚΟΛΛΗΣΗΣ

Τα μόρια προσκόλλησης, όπως ελέγχθη, είναι απαραίτητα για την άμυνα του οργανισμού, ενώ η υπερβολική ενεργοποίηση αυτών των μορίων έχει ενοχοποιηθεί στη φλεγμονώδη ιστική καταστροφή. Υπάρχουν ποικίλες δυναμικές θέσεις στις οποίες μπορεί κανείς να μπλοκάρει την έκφραση και τη λειτουργία των μορίων προσκόλλησης.

- 1) Η αναστολή των φλεγμονωδών κυτοκινών και άλλων μεσολαβητών της φλεγμονής που συμβάλλουν στη θετική ρύθμιση της λειτουργίας της κυτταρικής προσκόλλησης και της έκφρασης (ποσοτικής και ποιοτικής) των μορίων προσκόλλησης, θα μπορούσε να οδηγήσει σε μείωση του αριθμού ή στην απενεργοποίηση των μορίων αυτών.
- 2) Ένας άλλος μηχανισμός θα μπορούσε να είναι η αναστολή της μεταγραφής και της μετάφρασης (σε επίπεδο αντίστοιχα DNA και mRNA) γονιδίων που κωδικοποιούν τα κυτταρικά μόρια προσκόλλησης (π.χ. με τη χρήση ολιγονουκλεοτιδίων που συνδέονται με συμπληρωματικές αλληλουχίες του DNA και του mRNA και μπλοκάρουν τις διαδικασίες μετατροπής των γενετικών σημάτων σε σύνθεση μορίων προσκόλλησης).
- 3) Το τρίτο επίπεδο αρνητικής ρύθμισης της λειτουργίας των μορίων κυτταρικής προσκόλλησης είναι η εξειδικευμένη αναστολή των μορίων αυτών ή των αντιϋποδοχέων τους με τη χρήση διαλυτών μορίων προσκόλλησης, μονοκλωνικών αντισωμάτων εναντίον τους, ή χαμηλού μοριακού βάρους συνθετικών πεπτιδίων και υδατανθράκων που μπλοκάρουν συγκεκριμένες δραστικές τους περιοχές.
- 4) Τέλος, πολλά αντιφλεγμονώδη φάρμακα (μεταξύ των οποίων και τα γλυκοκορτικοειδή) έχει αποδειχθεί ότι επηρεάζουν την κυτταρική προσκόλληση και την έκφραση των μορίων προσκόλλησης, πέρα από τη γνωστή τους δυνατότητα να αναστέλλουν τη σύνθεση και απελευθέρωση μεσολαβητών της φλεγμονής. Ειδικά τα γλυκοκορτικοειδή αναστέλλουν το ICAM-1 και την E-σελεκτίνη στο επίπεδο της γονιδιακής μεταγραφής, παράλληλα με την αναστολή της σύνθεσης και της απελευθέρωσης κυτοκινών και άλλων μεσολαβητών της φλεγμονής.

Πάντως, έως και σήμερα, πρακτική εφαρμογή των παραπάνω έχει αποτελέσει μόνο η χρήση μονοκλωνικού αντισώματος εναντίον του μορίου προσκόλλησης αIIbβ3 που αναστέλλει *in vivo* την αιμοπεταλιακή ενεργοποίηση, γιατί η ιντεγκρίνη αυτή εκφράζεται μόνο στη επιφάνεια των αιμοπεταλίων.

Έτσι κι αλλιώς όμως, πρέπει κανείς να συνυπολογίζει και το γεγονός ότι οποιαδήποτε αναστολή των μορίων προσκόλλησης μπορεί να επηρεάσει αρνητικά ακόμα και τις εντελώς απαραίτητες ανοσολογικές κυτταρικές λειτουργίες, κάτι που δυσχεραίνει ακόμα περισσότερο την μελλοντική αξιοποίηση των ανωτέρω αρχών για θεραπευτικούς σκοπούς.

Στον παρακάτω πίνακα 15 φαίνονται σχηματικά τα πιο σημαντικά μόρια προσκόλλησης και τα μόρια σύνδεσής τους (ligands):

Πίνακας 15: ΜΟΡΙΑ ΠΡΟΣΚΟΛΛΗΣΗΣ ΚΑΙ ΤΑ ΜΟΡΙΑ ΣΥΝΔΕΣΗΣ ΤΟΥΣ

ΜΟΡΙΟ ΠΡΟΣΚΟΛΛΗΣΗΣ	ΑΡΧΙΚΟ ΜΟΡΙΟ ΣΥΝΔΕΣΗΣ
Ιντεγκρίνες	
→β1 οικογένεια	
α1β1, α2β1, α6β1	Κολλαγόνο, λαμινίνη
α4β1(VLA-4 ή CD29/CD49d), α5β1	Φιμπρονεκτίνη, κολλαγόνο, λαμινίνη, VCAM-1
→β2 οικογένεια	
αLβ2 (LFA-1 ή CD11a/CD18)	Ινωδογόνο, ICAM-1, ICAM-2
αMβ2 (Mac-1 ή CD11b/CD18)	Ινωδογόνο, ICAM-1, C3b κλάσμα του συμπληρώματος
αXβ2 (gp150,95 ή CD11c/CD18)	Ινωδογόνο
αdβ2	
→β3 οικογένεια	
ανβ3 (CD51/CD61), αIIbβ3 (CD41/CD61)	Βιτρονεκτίνη, οστεοποντίνη, θρομβοσποντίνη
→β7 οικογένεια	
α4β7	MadCAM-1, VCAM-1
Σελεκτίνες	
→ L-σελεκτίνη	CD34, GlyCAM-1, MAdCAM-1
→ E-σελεκτίνη	CLA
→ P-σελεκτίνη	PSGL-I
Καντζερίνες	
→ N-cadherin	Μόρια αποφασιστικής σημασίας στη ρύθμιση της μορφογένεσης και της οργάνωσης των ιστών
→ E-cadherin	
→ P-cadherin	
→ L-CAM (liver cell adhesion molecule)	
Υπεροικογένεια των ανοσοσφαιρινών	
→ ICAM-1(intercellular cell adhesion molecule-1, CD54)	Mac-1, LFA-1
→ ICAM-2(intercellular cell adhesion molecule-2, CD102)	
→ ICAM-3(intercellular cell adhesion molecule-3, CD50)	
→ VCAM-1 (CD106)	VLA-4,α4β7
→ LFA-3 (CD58)	CD2
→ PECAM-1 (platelet-endothelial cell adhesion molecule-1, CD31)	PECAM-1
→ CD2	LFA-3
→ MadCAM-1	α4β7, L-σελεκτίνη
GlyCAM-1 (glycosylation-dependent cell adhesion molecule-1)	L-σελεκτίνη
VAP-1 (vascular adhesion protein-1)	
CD34	L-σελεκτίνη
CD44	Υαλουρονικό οξύ, κολλαγόνο, φιμπρονεκτίνη

ΣΙΑΛΟΦΟΡΙΝΗ Ή ΛΕΥΚΟΣΙΑΛΙΝΗ (CD43)

ΓΕΝΙΚΑ

Το CD43³⁶⁻⁴⁷ είναι μια μείζων διαμεμβρανική σιαλογλυκοπρωτεΐνη που εκφράζεται σε όλα τα αιμοποιητικά κύτταρα εκτός από τα ερυθρά και ένα πληθυσμό Β-λεμφοκυττάρων (στα Β-κύτταρα^{131,132} εκφράζεται σε όλα τα στάδια ωρίμανσης μέχρι το προ-Β στάδιο και επανεκφράζεται στα ενεργοποιημένα Β-κύτταρα). Τα πολυδύναμα αιμοποιητικά κύτταρα έχει βρεθεί επίσης ότι εκφράζουν το CD43 στην επιφάνειά τους.

Το γονίδιο του CD43 εδράζεται στο χρωμόσωμα 16 και στα κύτταρα που δεν το εκφράζουν το CD43 υποεκφράζεται μέσω μεθυλίωσης του DNA. Η αλληλουχία βάσεων του γόνου του CD43 είναι η παρακάτω:

```
1 aagcttgcta attagaggaa agtcaggaaa tgggaaccat tcaaagaaga aaataccccc
61 acctcctact ctcacctatc caaagacaat taggtgaatc ccttagtaga tatctttcca
121 gacggttttc catatagatt cccatattctg gccaggcgcg gtggctcaca cctgtaatcc
181 tagcgcttgg ggaggctgag gcggatggac cacctgaggt caggagtctg agaccagcct
241 gaccaacatg gagaaacctc gtctctacga aaaatacaaa attagccggg cacagtgggtg
301 caagcctgta atcccagcta ctcaggaggg cgaggcagga gaattgcttg aacctaggag
361 gcagacattg tgctgagccg agccaagatc atgccattgc actaaactcc gccttaaaaa
421 aaaaaaaaa agattcccac atctttacta gtttgagaa ataagatcct agcatatgca
481 gtgtgtagga accaccttgg tttagccacg tctctgtgac tggggggccac tgtggtgacc
541 cccagctccc cggacagagt caagagctca ccagcctgca aagggtttca cggcccccag
601 ccagactcgg gggcttcctc ttgcccctgt acttcctggg agctctgagg gcaggaaatg
661 gcgccactca gctcctggcc taacagcttg gggaccacaa atgcaaaagg aaccaccctc
721 ccctcccacc tcctcctctg cacccttgag ttctcaggct cacattccca ccaccaccct
781 ctgagcccag ccctccctag catcaccact tccatcccat tcctcagcca agagccagga
841 atcctgattc cagatcccac gcttcctctg ctccctcagg tgagcccccag acccccaggc
901 accccgctgg ccctgaagg agcagggtgat ggtgctgtct tcgccagca gctgtgggag
961 caggtcgggtg ggcaggatg gagggtggg tgggggtggg ggagccaggg cccacttcct
1021 ttccccttgg ggcctgtctc ttcccagctc tggcccagcc tcgggagggtg gtggagtgc
1081 ctggccccag tgctgcctcc ttatcagccg agccggtgaa aggggtgagac ttggtggggg
1141 aggggacctca gtgggacctg gaatgtgcct gtggcttga aagactctga cagggtatga
1201 tgggaagaga ttgggagcca ttgggctgca cagggtcagg gaagggccagg aggggtggtg
1261 cactgctgga atctaagctg ctgaggctgg agggagcctc aggatggggc tgatggggga
1321 gctgccagca tctgttcctc tgcatttct gataacagta aaagccagca tggaaaaaac
1381 cgttaaaccg caggttgggc ctggccgttg gcaggggaag tggcagaggg gaggcccccg
1441 caggtcgggtc gcaactccc gcgtgtctg ctctccggc tgcccactcg caggtccag
1501 ctcttgctcc tgctgtttg cctggaaatg gccacgcttc tccttctctc tggggtgctg
1561 gtgtaagcc cagacgctct ggggagcaca acagcagctg agacaccacc ctccggagag
1621 cctttggtct ctactagcga gccctgagc tcaaagatgt acaccacttc aataacaagt
1681 ccggaaccct cagacagcac tgggaccag acctcagccc tacctcctc aactccatc
1741 aatgagggat ccctctttg gacttccatt ggtgccagca ctgggtcccc ttacctgag
1801 ccaacaacct accaggaagt ttccatcaag atgtcatcag tggcccagga aaccctcat
1861 gcaaccagtc atcctgctgt tcccataaca gcaaaacttc taggatccca caccgtgaca
1921 ggtggaacca taacaacgaa ctctccagaa acctccagta ggaccagtgg agccctgtt
1981 accacggcag ctagctctct ggagacctcc agaggcactc ctggaccccc tcttaccatg
2041 gcaactgtct ctctggagac ttccaaaggc acctctggac cccctgttac catggcaact
2101 gactctctgg agacctccac tgggaccact ggaccccctg ttaccatgac aactggctct
2161 ctgggacctc ccagcggggc cagtggacc caggctctca gcgtaaaact atctacaatg
2221 atgtctccaa cgacctccac caacgcaagc actgtgccct tcgggaaccc agatgagaac
2281 tcacgaggca tgctgccagt ggctgtgctt gtggccctgc tggcggctcat agtccctctg
2341 gctctgctcc tgctgtggcg ccggcggcag aagcggcgga ctggggccct cgtgctgagc
2401 agaggcgcca agcgtaacgg ggtgggtggac gcctgggctg ggccagccca ggtccctgag
2461 gagggggccc tgacagtgc cgtgggaggg tccggggggc acaagggctc tgggttcccc
2521 gatggggagg ggtctagccg tcggcccacg ctaccactt tctttggcag acggaagtct
2581 cgccagggct ccctggcgat ggaggagctg aagtctgggt caggcccccag cctcaaaggg
2641 gaggagagc cactggtggc cagtgaggat ggggctgtgg acgcccagc tctgatgag
2701 cccgaagggg gagacggggc tgccccttaa gtgtcggtga atagtgggc tggagggcgg
2761 aatctcagcc agcctccagc acctccctc tcaccatccc actgcccctc cgctcccatg
2821 tttccaccgg gcaacctgat cctcaccgca atctcctttt tttttttctt ttgagacaga
2881 gtttgccttt gtgcgccagg ctggagtgca atgcaagatc tcagttcact gcaacctctg
2941 cctcctaagt tcaggcgatt ctctgcctc agcttcccga gtaactgaga ttacaggcac
3001 ccaccaccat gccagctgct tttttgtat ttttggtaga gatgggggtt caccatggtg
3061 gctaggctgg tctcaaacct ctgacctcag gtgatctacc tgcctcagcc tcccaggatg
3121 ctgagattac agacatgagc ctccggcctc tgctcctca cccacctctt cactctgaat
3181 cctcatgagg cttctcagcc ctggatttcc tgctgacctc ctaccaccagc accccaact
3241 agcgcctggg cagggcaggg ctggcacctc tcaacgtctg tggactgaat gaataaacc
3301 tcctcatcca ccctattta tctccatcac catttcccc tctttctgtg tctgggaaac
3361 ggctgctgag tctccatcgg ccaaacttat ctgcctctg atttctttga caattctct
```

3421 tttccccag aaccaccct ggggtgacca gagtctggga agaaggacaa gagaaccccg
3481 caaactccct cctaggatta actttgtaaa gcacccttgc cctgtagctg caagggctgt
3541 ggaactcttg gagcccccaa ccaccttag ctctgggccc cccaggccag cctggagcat
3601 ggctggggtg ggccaccagc ccactgctctc aggcgggccc gtgatcttcc ccagggcaca
3661 tggactgtag gctggccctg gccacaccca ccactctctc cccagccatg gacagaggca
3721 gccagaggcc tcacggtttc tcctccagag ttctggctgg gtgtagtctt cagaaacccc
3781 agtgccctgc tgtgtccact cgtgggtgtg gtttgtgtgc aagagctgag gatttggcga
3841 tgcttgggag gggtagttgt gggtagacagc ggtgtggggg tgggaagtgg tgcagagact
3901 gaagagggtc aacctgggca tgggggacac agggactgct gagaactgac gtgtcatctt
3961 tgctctgatg gggtagcat agcagaaaat ctaactctgt ctgtagcccc atacagaatg
4021 ccagggtgag cacagtggct ggtgccttta atocagcac tttggaaagt tgaggcagga
4081 ggatcgcttg agcccaggag ttccagctctg aagttagctg tgattgcacc actgcacttc
4141 agcctgggca acagagttag cccctgtctc aaaaaagaaa agaaaaagaa agccaggctt
4201 catggaaaaga tcgtatgtgt gacccaaata tgagttcttc agctcagcca tggtaatccc
4261 ttcttgaag tctccatttc tgcagtacac atgcatgtgc gctctctctc tctctctctc
4321 tctcacacac acacacacac acacacacac gcgcgcgcgc gcgcgcgcgc gcgcctctcc
4381 gcgaacagag gcagggggag aggggttgc cctggctctc gggactggct tggctggcgc
4441 ttccccactg cacgtttcca ggtttagttt gtctgtgtct cctcttccat cccaggggct
4501 gagcccctc catcctccaa gaggaaccag tgagagttag tgaaggaggg gcctggagcc
4561 agggacttcc cctgtggggc ctgggtggag agggggagaa tcaatggtgc tgcctttgag
4621 accagcccag ctacagccca ggagcacaca tggggcaggg cagttgggat tccccaggga
4681 caaagaggaa attttcaaa aggaagtgtg tgagttagag ctgtgcgtgg ctgagagcag
4741 acaggttag ctgcaaaaa agacagggga ggcattgtgag tgtgacagcc ctgctctgtg
4801 gcttgggca agatggggc aaagggctcag gtgggggatg ggtctgtgca gtgggagagg
4861 agacggagg agggagcggg aagggcttg cttagtgggt gggagagct gagctcggat
4921 ggaaccagct tctaccagcc aggcctgggca cccactgggc tgcattcgtt ggcctttct
4981 gattgctatt tggactcact gcagctgagc aatgacagag gccatgtcca aaatccctta
5041 gagacactgt tgtcttagag ttgttaaaat aagagccccc atatcaggtt tagaaaatac
5101 tgtcaccgaa cgaacgtcgc tgtcctcagc tccacctccc tttcctttga cagatatggt
5161 tgttttctaa gccaggactg gttttagtoa ggtcctgggc gaatcctgaa aaaaagagg
5221 agtacgggta aggaaggcac ccaacagggc tttcacaatc cagaaaatat caaaatataa
5281 ggtttaaag agaggcacag gcgggtgctg gtggctcacg cctgtaatgc cagcactttg
5341 ggagccaag gtggcagat catgaggtca ggagtttag accagcctgg ccaatagat
5401 gaaacccgct tctactaaa aatacaaaag ttagccaggc atgggtggtg gctcctgtaa
5461 tcccagctac ttagaggct gagggcagag aattgcttga accctggagt cagaggttgc
5521 agtgagccgg gatcatgcca ctgtactcca ggtgggtga caaagtgaga ctgtctcaaa
5581 aaataaaaat aaataaaaata aataaaaag aggcacaaac agtggtatga atgcaccaag
5641 gaaaatggtg cattcataac tctcaggtga agcctaccaa gccatgcgtg tgtgcacata
5701 tgtgtgtacg tgtgcatgtg cgtgcgtgca tgtgcgtgca tgcattgtgc tgtgtgtgta
5761 tgtgtgaca tgtgtgtgca tgtgtgtgca tgtgtgtgca tgtgtgtgca tgcattgtg
5821 ctcccatgca tgtgtactgt ggcaaggag actttgagga agagattcca gtggctgagc
5881 agaagggtc gcattgcct ggcaagggt tggaggctt cacctgagag tgtgtcgtg
5941 cctttgtcat atccactgct tgattcctt ctttaaaaat ttttttatt gtttctaca
6001 atgagaacc accacacctg gctaatttt gtattttttg tagagatggg gtttcacct
6061 gttgtcccgg ctggtctcaa actcccgggc acaagagatc cacctgcctc agcctcccaa
6121 aatgctggga ctataggcat gagccactgc acccagccac tgcttcatc ctggtggctg
6181 ctgtgcctgg catgtgtcag atcctccatg aatattgcat tgaatgaatg aatgaatgaa
6241 tgaatgaatg gagatgacgc ctacagatg ctttctttg agatgaggtc tcaatctgtc
6301 acccagacta gagggcagtg gtgcaatcac agctcaccac agcctcaacc tccctgggct
6361 cccaagtgc tgcgatcaca ggtgtgacac aacatgccc gctaattttt ttttaattt
6421 ttaatttgta cagacagggt cttgctgtgt tgcccaggct ggtctcgaac tccctgggct
6481 aagtggctct cccacctaag ctt

Από το παραπάνω γονίδιο, που περιέχει 6503 βάσεις, μεταγράφονται 2 διαφορετικά mRNA: ένα mRNA 1.9 kb (αλληλουχία 991..3314) και ένα mRNA 4.3 kb (αλληλουχία 991..5606). Η περιοχή αλληλουχίας που μεταφράζεται σε "σιαλοφορίνη" είναι η 1585..2727 και η αλληλουχία αμινοξέων της σιαλοφορίνης τελικά είναι:

MATLLLLLGVVVSPDALGSTTAVQTPTSSEPLVSTSEPLSSKMYTTSITSDPKADSTGDQTSALPPSTS INEGSPLWTSIGASTG
SPLPEPTTYQEVSIKMSVFPQETPHATSHPAVPI TANSLSGHTVTGGTITNSPETSSRTSGAPVTTAASSLETSGRGTSGPPLTMA
TVSLETSGTSGPVTMATDSLETSTGTTGPPVTMTTGSLEPSSGASGPVSSVKLSTMMSPPTTSTNASTVPPFRNPDENSRGMPLPV
AVLVALLAVIVLVALLLWRRRQKRRTGALVLSRGGKRVVDAWAGPAQVPEEGAVTVTVGGSGGDKSGSFPDGESSRRPPLTTF
FGRRRSRQSLAMEELKSGSGPSLKGEEPLVASEDGAVDAPAPDEPEGGDGAAP

Η δομή της εξωκυττάριας περιοχής του CD43 έχει περιγραφεί ως μια χαλαρή έλικα πιο εκτεταμένη από μια α-έλικα, που διατηρεί την εκτεταμένη αυτή δομή της εξαιτίας της βαρειάς Ο-γλυκοσυλίωσής της. Δύο γλυκομορφές του CD43 έχουν αναγνωριστεί από τα μονοκλωνικά αντισώματα S7 και 1B11, με το πρώτο να αναγνωρίζει μια γλυκομορφή 115-kD που μεταφέρει τετρασακχαρίτες και το δεύτερο να αναγνωρίζει μια γλυκομορφή 130-kD που μεταφέρει κλάδους γλυκανών που σχηματίζουν εξασακχαρίτες και εκφράζεται πρωταρχικά από μυελικά κύτταρα και ενεργοποιημένα

T-κύτταρα. Εάν η διαφορετική γλυκοσυλίωση του CD43 σχετίζονται με την εκάστοτε λειτουργία του δεν έχει πλήρως διευκρινιστεί ακόμα.

Μειωμένη έκφραση του μορίου έχει παρατηρηθεί στα λεμφοκύτταρα ασθενών με το φυλοσύνδετο σύνδρομο ανοσοανεπάρκειας Wiskott-Aldrich, καθώς και στη λοίμωξη από τον ιό HIV, όπου φαίνεται να συμμετέχει στην ανάπτυξη ανοσοανεπάρκειας, αφού αντι-CD43 αντισώματα έχουν βρεθεί σε HIV-ασθενείς.

Η σύνδεση του CD43 με μονοκλωνικά αντισώματα¹⁴⁰ έχει ποικίλες επιδράσεις στα κύτταρα. Ενεργοποίηση των μονοκυττάρων, συμμετοχή στον πολλαπλασιασμό¹³⁷, την προσκόλληση¹³⁴ και την ενεργοποίηση¹³⁶ των T-κυττάρων, αύξηση της δραστηριότητας των NK κυττάρων, αύξηση της απόπτωσης στα προγονικά αιμοποιητικά κύτταρα είναι μερικές από τις επιδράσεις αυτές. Τα ενδοκυττάρια συμβάντα που ακολουθούν τη σύνδεση του CD43 είναι η παραγωγή διακυλογλυκερόλης και φωσφορικής ινοσιτόλης, η κινητοποίηση του ασβεστίου, η ενεργοποίηση της πρωτεϊνικής κινάσης C (PKC)¹³³, η αύξηση της έκφρασης των ογκοκατασταλτικών πρωτεϊνών p53 και ARF¹³⁹ και η ενεργοποίηση οδών που εξαρτώνται από την τυροσινική κινάση στα T-κύτταρα.

Το CD43 είναι ένα αντιπροσωπευτικό μέλος της οικογένειας των μουκινών που εδράζονται στην κυτταρική επιφάνεια και χαρακτηρίζονται, όπως ειπώθηκε, από την παρουσία εκτεταμένων υποκατάστατων Ο-γλυκάνης. Το αρνητικό φορτίο του εξοκυττάριου τμήματος του CD43 μπορεί να δρα ως φράγμα απόθησης με αντιπροσκολλητικές ιδιότητες. Πράγματι ο αντιπροσκολλητικός ρόλος του μορίου αυτού έχει δείχθει σε πολλές μελέτες. Από την άλλη όμως, πολλές μουκίνες είναι αρκετά μακρές ώστε να εκτίθενται τα τελικά τους σάκχαρα και να αλληλεπιδρούν με ειδικούς υποδοχείς υδατανθράκων. Πολλές μουκίνες της κυτταρικής επιφάνειας είναι μόρια σύνδεσης των σελεκτινών (π.χ.οι GlyCAM, CD34, MadCAM, PSGL-1) και η αλληλεπίδραση με τις σελεκτίνες δίνει το έναυσμα στον καταρράκτη της προσκόλλησης των κυττάρων που βοηθά στη διεξόδυσή τους στους ιστούς. Το CD43 έχει βρεθεί ότι αποτελεί έναν αντι-υποδοχέα για τα μόρια ICAM-1, MHC class 1, C1q, E-σελεκτίνη^{129,130}, γκαλεκτίνη-1 και για ένα υποτιθέμενο ενδοκυττάριο μόριο σύνδεσης. Το CD43 επομένως μπορεί να λειτουργεί ως ένα μόριο προσκόλλησης από μόνο του, μεταφέροντας ενδοκυττάρια σήματα που οδηγούν σε ενίσχυση της δραστηριότητας άλλων μορίων προσκόλλησης.

Μελέτες επίσης έχουν δείξει ότι το CD43 παίζει πολύ σημαντικό μόριο στην ιϊκή κάθαρση.

Σε μια άλλη μελέτη αποδείχθηκε ότι και η κυτταροπλασματική περιοχή του CD43 είναι αναγκαία και ικανή για το αντι-προσκολλητικό αποτέλεσμα του μορίου αυτού, όπως επίσης και για το ανασταλτικό αποτέλεσμα του CD43 στον T-κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Η συμμετοχή της ενδοκυτταροπλασματικής περιοχής του CD43 στην αντιπροσκολλητική δράση του αντανάκλα είτε απευθείας μεταβίβαση σήματος από το μόριο, είτε μεσολάβηση αλληλεπιδράσεων του CD43 με τον κυτταρικό σκελετό.

Στη συνέχεια παρατίθενται οι πιο σημαντικές λειτουργίες του CD43, όπως αυτές έχουν ως σήμερα αποσαφηνιστεί.

CD43 ΚΑΙ T-ΚΥΤΤΑΡΑ

ΜΕΤΑΝΑΣΤΕΥΣΗ ΤΩΝ T-ΚΥΤΤΑΡΩΝ

Είναι γνωστή η προ-προσκολλητική δράση του CD43 μέσω μεταβίβασης ενδοκυττάριου σήματος που αυξάνει τη συνάφεια του LFA-1 για το ICAM-1. Η μετανάστευση των λεμφοκυττάρων από το αιμόφορο αγγείο προς τα περιφερικά

λεμφοειδή όργανα είναι μια διαδικασία που ρυθμίζεται μέσω προσκολλητικών αλληλεπιδράσεων. Η αρχική προσκόλληση και το κύλισμα των λεμφοκυττάρων πάνω στο ενδοθήλιο ρυθμίζεται από τη λεμφοκυτταρική L-σελεκτίνη που συνδέεται με την αντρεσσίνη των περιφερικών λεμφοαδένων.

Σε μια μελέτη⁴⁸ δείχθηκε ότι η μετανάστευση των CD43⁻ T-κυττάρων στους περιφερικούς λεμφικούς ιστούς ήταν περίπου 1,8 φορές μεγαλύτερη σε σχέση με τα CD43⁺ T-κύτταρα. Η ανεπάρκεια δηλαδή του CD43 επιταχύνει την ανακατανομή των T-κυττάρων από το αίμα στα περιφερικά λεμφοειδή όργανα. Η δράση αυτή του CD43 ήταν συνέπεια της αυξημένης δράσης της L-σελεκτίνης στην κυτταρική επιφάνεια. Η μετανάστευση δηλαδή των T-κυττάρων αυξάνει σε ανεπάρκεια του CD43 λόγω κυρίως των εντονότερων πρώιμων προσκολλητικών φαινομένων στα οποία συμμετέχουν οι σελεκτίνες και όχι οι ιντεγκρίνες. Επιπλέον παρατηρείται μια αντίστροφη σχέση μεταξύ του αντι-προσκολλητικού αποτελέσματος του CD43 και της αφθονίας των υποδοχέων της σελεκτίνης στο ενδοθήλιο.

ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ T-ΚΥΤΤΑΡΩΝ

Η ενεργοποίηση των T-κυττάρων⁴⁹ απαιτεί τη σύνδεση του TCR με το μόριο σύνδεσής του, που είναι το σύμπλοκο αντιγόνου-MHC. In vivo αυτό επιτυγχάνεται με τη σύνδεση του T-κυττάρου με ένα αντιγονοπαρουσιαστικό κύτταρο που φέρει ένα τάξης I ή τάξης II MHC πεπτίδιο. Μετά την αρχική προσκόλληση δημιουργείται μια στενή επαφή και εμφανίζονται πολλαπλές συνδέσεις μεταξύ του TCR και του μορίου σύνδεσής του. Η πιο πάνω διαδικασία υποβοηθείται από την παρουσία μορίων προσκόλλησης (π.χ. LFA-1/ICAM-1) ή συνδιεγερτικών μορίων (π.χ. B7/CD28).

Το εξωκυττάριο μήκος του CD43 πλησιάζει τα 45nm, σε αντίθεση με το μήκος του TCR που είναι μόνο 7 nm. Επίσης το CD43 είναι ένα πολύ γλυκοσυλιωμένο μόριο, με 80-90 περιοχές O-γλυκοσυλίωσης. Τα δύο αυτά δεδομένα επισημαίνουν ότι το CD43 μπορεί να αποτελεί φραγμό είτε λόγω του στερεοχημικού του τύπου, είτε λόγω του αρνητικού του φορτίου στην πιο πάνω προσκόλληση.

Σε πρόσφατη μελέτη δείχθηκε ότι τα ποντίκια που είναι CD43⁻ παρουσιάζουν in vivo και in vitro ευαισθησία των T-κυττάρων τους στην ενεργοποίηση αλλά και τον πολλαπλασιασμό, τόσο μέσω διέγερσης με τη σύνδεση TCR-CD3, όσο και μέσω ενεργοποίησης από το PMA (χωρίς την παρεμβολή του TCR). Επίσης στη μελέτη αυτή φάνηκε ότι πιο πολύπλοκοι μηχανισμοί παρεμβαίνουν στη μέσω CD43 ρύθμιση της T-κυτταρικής ενεργοποίησης^{133,135}, και όχι μόνο η στερεοχημική μορφή του μορίου και το αρνητικό του φορτίο. Στα CD43⁺ ποντίκια επιπλέον η ταυτόχρονη σύνδεση του CD3 και του CD43 είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση της T-κυτταρικής ενεργοποίησης και πολλαπλασιασμού μέσω αποκοπής του CD43 από τη επιφάνεια του T-κυττάρου (πιθανώς μέσω πρωτεολυτικού μηχανισμού).

Φαίνεται λοιπόν ότι το CD43 είναι ένα μόριο που ρυθμίζει αρνητικά την in vitro και in vivo T-κυτταρική ενεργοποίηση.

ΠΡΟΣΚΟΛΛΗΣΗ ΤΩΝ T-ΚΥΤΤΑΡΩΝ^{129,130,143}

Όπως ειπώθηκε, το κυρίαρχο μονοπάτι προσκόλλησης μεταξύ των T-λεμφοκυττάρων είναι αυτό που επάγεται με τη σύνδεση του LFA-1 με τον αντι-υποδοχέα του, το ICAM-1. Τα μονοκλωνικά αντισώματα που μπλοκάρουν τη σύνδεση των δύο πιο πάνω μορίων αναστέλλουν την ομοτυπική προσκόλληση¹⁴² και την T-κυτταροτοξικότητα. Γενετικές ανωμαλίες που οδηγούν σε ανεπάρκεια της β-υπομονάδας του LFA-1 έχουν ως συνέπεια ανοσοανεπάρκεια και επανειλημμένες βακτηριακές και απειλητικές για τη ζωή λοιμώξεις, καθώς επίσης και σοβαρές διαταραχές της λειτουργικότητας των λευκοκυττάρων που εξαρτάται από την προσκόλληση.

Έχουν περιγραφεί μηχανισμοί που επάγουν τη σύνδεση του LFA-1 με το ICAM-1 και προωθούν αλληλεπιδράσεις μεταξύ διαφορετικών τύπων λεμφοκυττάρων και μεταξύ λεμφοκυττάρων και μη άνοσων κυττάρων. Της προσκόλλησης των λεμφοκυττάρων στα ενδοθηλιακά κύτταρα προηγείται η έκθεση του ενδοθηλίου στις κυτοκίνες της φλεγμονής, κάτι που οδηγεί πιθανώς στην ποσοτικά αυξημένη έκφραση του ICAM-1 στην επιφάνεια των ενδοθηλιακών κυττάρων. Ταυτόχρονα η ενεργοποίηση των T-κυττάρων μέσω της σύνδεσης του TCR οδηγεί σε αξιοσημείωτη και αναστρέψιμη αύξηση της συνάφειας του LFA-1 για το ICAM-1, χωρίς τα επίπεδα έκφρασης του LFA-1 να αυξάνονται.

Σε μια μελέτη⁵⁰ ελέγχθηκε η επίδραση του CD43 στη σύνδεση των T-κυττάρων προς τα CD43⁺ ή τα CD43⁻ HeLa κύτταρα. Τα HeLa κύτταρα φυσιολογικά εκφράζουν ICAM-1 και LFA-3 στην επιφάνειά τους, τα οποία αντιστοίχως είναι μόρια σύνδεσης των LFA-1 και CD2 των T-κυττάρων. Η πρώτη παρατήρηση της μελέτης ήταν ότι η προσκόλληση των T-κυττάρων στα CD43⁺ HeLa κύτταρα ήταν μειωμένη σε σχέση με αυτή στα CD43⁻ HeLa κύτταρα.

Η δεύτερη παρατήρηση ήταν ότι η πλειοψηφία των προσκολλητικών αλληλεπιδράσεων μεταξύ των T-κυττάρων και των HeLa κυττάρων προάγεται από τη σύνδεση LFA-1 και ICAM-1. Αντίθετα η χρήση αντι-CD2 μονοκλωνικού αντισώματος TS2-18 δεν επηρέαζε την προσκόλληση των T-κυττάρων στα HeLa κύτταρα.

Το PMA ενεργοποιεί τα T-λεμφοκύτταρα και αυξάνει ως γνωστό την ομοτυπική τους προσκόλληση, αυξάνοντας τη συνάφεια του LFA-1 με το ICAM-1. Η τρίτη παρατήρηση ήταν ότι το CD43 εμποδίζει τη σύνδεση LFA-1 και ICAM-1 ανεξάρτητα από τη συνάφεια αυτών των μορίων μεταξύ τους.

Τέλος, η χρήση νευραμινιδάσης στα HeLa κύτταρα (που αποσπά τα μόρια σιαλικού οξέος από το CD43) αύξησε σημαντικά την T-κυτταρική προσκόλληση στα CD43⁺ HeLa κύτταρα. Αυτό σημαίνει ότι τα μόρια σιαλικού οξέος του CD43 είναι σημαντικά υπεύθυνα για την παρεμπόδιση της σύνδεσης LFA-1 με το ICAM-1. Αυτό γίνεται είτε λόγω της στερεοτακτικής δομής του CD43 (που εκτείνεται 45nm πέραν της κυτταρικής μεμβράνης, ενώ η σύνδεση LFA-1 με ICAM-1 απαιτεί μέγιστη διακυτταρική απόσταση <25-30nm), είτε λόγω του αρνητικού φορτίου που δημιουργούν τα σιαλικά υπολείμματα στην κυτταρική επιφάνεια, το οποίο δρα ως απωθητικός διακυτταρικός φραγμός.

Σε ορισμένες μελέτες έχει δείχθει ότι το CD43 μπορεί να λειτουργεί ως μόριο σύνδεσης (ligand) του ICAM-1, αποκτώντας "προ-προσκολλητικές" ιδιότητες, έχοντας επομένως διττό ρόλο (όπως π.χ. και το NCAM). Το ποια δράση του CD43 θα υπερισχύσει κάθε φορά in vivo εξαρτάται πιθανότατα από το βαθμό σιαλίωσης του μορίου και την παρουσία του στους ιστούς. Έτσι σε υποσιαλιωμένες μορφές CD43 (π.χ. σε θυμοκύτταρα και σε ενεργοποιημένα κεντροβλαστικά B κύτταρα) μπορεί να προωθεί την κυτταρική προσκόλληση σε γειτονικά κύτταρα ή στο στρώμα, ενώ η σιαλιωμένη μορφή του που εκφράζεται από ώριμα T-κύτταρα μπορεί να λειτουργεί ως αντιπροσκολλητικό μόριο.

ΣΥΝΔΕΣΕΙΣ ΤΩΝ Τ-ΚΥΤΤΑΡΩΝ

Η φυσιολογική σύνδεση των T-κυττάρων⁴⁴ με άλλα κύτταρα είναι μια διαδικασία που απαιτείται για την έναρξη της T-κυτταρικής ενεργοποίησης και αποτελεί το πρώτο βήμα για τη δράση των T-κυττάρων. Η διαδικασία αυτή χωρίζεται σε δύο γεγονότα: Το πρώτο συμβαίνει όταν το σύμπλεγμα αντιγόνου-MHC αναγνωρίζεται από τον TCR. Αυτή η διαδικασία επιτρέπει στα T-κύτταρα να "σαρώσουν" την επιφάνεια των αντιγονοπαρουσιαστικών (APC) κυττάρων ψάχνοντας τα μόρια σύνδεσης του TCR

τους. Η σύνδεση του TCR με το σύμπλεγμα αντιγόνου/MHC επάγει την ενεργοποίηση των μορίων προσκόλλησης της επιφάνειας των T-κυττάρων που σταθεροποιεί το σχηματισμό σύνδεσης του T-κυττάρου με το APC ή το κύτταρο-στόχο.

Τα μη ενεργοποιημένα T-κύτταρα είναι πιο επιλεκτικά από τα ενεργοποιημένα T-κύτταρα στη δυνατότητά τους να αλληλεπιδρούν με άλλα κύτταρα και να σχηματίζουν συνδέσεις, γιατί τα μόρια προσκόλλησης των μη ενεργοποιημένων T-κυττάρων βρίσκονται σε μια κατάσταση "χαμηλής τάσης προς σύνδεση". Τα μη ενεργοποιημένα T-κύτταρα μπορούν να σχηματίζουν δεσμούς σύνδεσης με τα δενδριτικά (DC) και τα λεμφοβλαστοειδή B-βλαστικά κύτταρα (LCL).

Είναι γνωστό ότι μεταξύ T-κυττάρου και APC πολλές συνδέσεις μεταξύ μορίων προσκόλλησης συνεισφέρουν στο σχηματισμό δεσμού, όπως CD2(LFA-2)/CD58(LFA-3), LFA-1(CD11a/CD18)/ICAM-1,2,3, CD28/B7(CD80). Κανένα όμως από τα παραπάνω μόρια προσκόλλησης δεν μπορεί πλήρως να εξηγήσει την επιλεκτικότητα των μη ενεργοποιημένων T-κυττάρων στη σύνδεσή τους με συγκεκριμένα APC.

Σε μια μελέτη προτάθηκε μια αντίδραση προσκόλλησης μεταξύ CD43 των T-κυττάρων και MHC-1 των DC ή LCL κυττάρων, η οποία μπορεί να προωθεί τη σύνδεση των T-κυττάρων με δύο τρόπους: είτε άμεσα με τη σύνδεση CD43/MHC-1, είτε με μεταβίβαση σήματος που οδηγεί σε αυξημένη συνάφεια του CD2 για το CD58.

Στα T-κύτταρα υπάρχουν 2 πρωτότυποι αντιϋποδοχείς των MHC-1 μορίων: το CD8 και ο TCR- α/β . Και οι δύο αυτοί αντιϋποδοχείς όμως δεν είναι υπεύθυνοι για τα προσκολλητικά φαινόμενα μεταξύ των T-κυττάρων και των DC ή LCL. Αντίθετα, μόριο σύνδεσης του MHC-1 φαίνεται να είναι το CD43 του T-κυττάρου, και η σύνδεση CD43/MHC-1 φαίνεται να επάγει τη σύνδεση CD2/CD58.

Δηλαδή οι συνδέσεις CD43/MHC-1 και CD2/CD58 μεσολαβούν και επάγουν τη σύνδεση των T-κυττάρων με τα APC και η μία μοριακή σύνδεση ισχυροποιεί την άλλη και αντιστρόφως.

ΥΠΟΕΚΦΡΑΣΗ ΤΟΥ CD43 ΣΕ ΘΕΤΙΚΗ ΘΥΜΟΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΕΠΙΛΟΓΗ

Τα θυμοκύτταρα που εκφράζουν TCR και που δυναμικά αλληλεπιδρούν με εξωγενή αντιγόνα -που παρουσιάζονται μέσω του συστήματος MHC- ωριμάζουν μέσα από μια διαδικασία θετικής επιλογής⁵¹, τη στιγμή που αρνητική επιλογή υφίστανται όσα θυμοκύτταρα εκφράζουν TCR και αλληλεπιδρούν με αυτο-αντιγόνα. Η θετική αυτή επιλογή εξαρτάται από την αλληλεπίδραση του TCR που εκφράζεται από τα άωρα CD4+CD8+ θυμοκύτταρα με τα μόρια MHC των θυμικών επιθηλιακών κυττάρων. Ως γνωστόν το CD43 εκφράζεται με δύο γλυκομορφές, την 115kDa και την 130kDa. Το CD43 115kDa εκφράζεται σε όλα τα T-κύτταρα, ενώ το CD43 130kDa εκφράζεται σε όλα τα CD8+ T-κύτταρα, αλλά μόνο στο 10-15% των CD4+ T-κυττάρων. Μετά από in vivo ανοσοδιέγερση, τα CD4+ κύτταρα υπερεκφράζουν το CD43 115 και 130kDa, ενώ τα CD8+ υπερεκφράζουν το CD43 130kDa και υποεκφράζουν το CD43 115kDa.

Αποτέλεσμα της θετικής επιλογής των θυμοκυττάρων είναι η αύξηση της παραγωγής των CD4+ και CD8+ T-κυττάρων, η αύξηση της έκφρασης των TCR, CD69 και CD5 και η υποέκφραση του CD43 130kDa στα CD4+CD8+ θυμοκύτταρα που φέρουν υποδοχέα TCR ικανό να συνδέεται με MHC I.

CD43 ΚΑΙ ΛΕΥΚΟΚΥΤΤΑΡΑ

ΑΠΟΚΟΠΗ ΤΟΥ CD43 ΑΠΟ ΤΗΝ ΕΠΙΦΑΝΕΙΑ ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΜΕΝΩΝ ΟΥΔΕΤΕΡΟΦΙΛΩΝ

Κατά τη μετανάστευση των ουδετερόφιλων⁵², μερικά μόρια της μεμβράνης τους εξαφανίζονται και την ίδια στιγμή εμφανίζονται νέοι μεμβρανικοί υποδοχείς. Έτσι π.χ. η L-σελεκτίνη που ενέχεται στην πρωτογενή προσκόλληση των ουδετερόφιλων στο ενδοθήλιο αποκόπτεται ταχύτατα από την κυτταρική επιφάνεια και ταυτόχρονα εμφανίζεται δυναμικά σ' αυτή η ιντεγκρίνη CD11b/CD18. Αυτές οι μεμβρανικές ανακατατάξεις οδηγούν στον τερματισμό της ροής των ουδετερόφιλων, στη δυναμική τους προσκόλληση στο ενδοθήλιο και εν τέλει στη διείσδυση και εξαγγείωσή τους μέσω του ενδοθηλίου του αγγείου προς τους φλεγμαίνοντες ιστούς.

Η λειτουργία του CD43 στα ουδετερόφιλα¹³⁸ δεν έχει διευκρινιστεί πλήρως: πιθανώς να συμμετέχει στην προσκόλληση των ουδετερόφιλων (ως μόριο σύνδεσης του ICAM-1), ενώ λόγω του αρνητικού του φορτίου, δημιουργεί στην κυτταρική επιφάνεια ένα απωθητικό φράγμα που εμποδίζει την επαφή μεταξύ των λευκοκυττάρων, διατηρώντας μια ικανή απόσταση του ενός από το άλλο. Το CD43 είναι ανθεκτικό στις πρωτεάσες σερίνης όπως η θρυψίνη και η χυμοθρυψίνη, αλλά εξαιρετικά ευαίσθητο στη λευκοκυτταρική ελαστάση και σε μικρότερο βαθμό στην καθεψίνη G.

Σε μια μελέτη αποδείχθηκε ότι η έκφραση του CD43 στην επιφάνεια των ουδετερόφιλων μειώνεται μετά την ενεργοποίηση από το PMA. Η υποέκφραση του CD43 είναι προοδευτική και ολοκληρώνεται σε 60 min, ενώ βαίνει αντιπαράλληλα με την ταυτόχρονη υπερέκφραση της ιντεγκρίνης CD11b/CD18.

Ποικίλοι κυτταρικοί ενεργοποιητές των πολυμορφοπύρηνων ελέγχθηκαν για την ικανότητά τους να μειώνουν την έκφραση του CD43 στην κυτταρική επιφάνεια. Ως πιο ισχυρός τέτοιος βρέθηκε ότι είναι το PMA, καθώς και ο συνδυασμός FMLP και κυτοχλασίνης B. Βρέθηκε ότι το CD43 αποκόπτεται από την κυτταρική επιφάνεια των ενεργοποιημένων ουδετερόφιλων μέσω ενός μηχανισμού που απαιτεί τη δράση πρωτεϊνών σερίνης. Οι τελευταίες απελευθερώνονται από τα αζουρόφιλα κοκκία των ουδετερόφιλων (τα οποία ως γνωστόν αποκοκκιώνονται μετά την ενεργοποίησή τους). Μάλιστα αναστολείς τέτοιων πρωτεϊνών (π.χ. οι DFP και PMSF) αναστέλλουν την αποκοπή του CD43 μετά την ενεργοποίηση των κυττάρων με PMA. Επίσης η αποκοπή του μορίου από την κυτταρική επιφάνεια συμπίπτει ποιοτικά και χρονικά με την ομοτυπική συσσώρευση των ουδετερόφιλων μετά την PMA-ενεργοποίηση.

Η αυξημένη ομοτυπική κυτταρική προσκόλληση που ακολουθεί την κυτταρική ενεργοποίηση είναι αποτέλεσμα τόσο της μείωσης του αρνητικού φορτίου στην κυτταρική επιφάνεια (λόγω της αποκοπής του CD43), όσο και στην αυξημένη δράση άλλων μορίων προσκόλλησης της κυτταρικής επιφάνειας που -λόγω του στερεοδομικού εμποδίου που δημιουργούσε η παρουσία του CD43- δεν μπορούσαν προηγουμένως να συνδεθούν με τα μόρια σύνδεσής τους. Την άποψη αυτή στηρίζει και το γεγονός ότι η νευραμινιδάση που εξουδετερώνει το αρνητικό φορτίο του CD43 στην κυτταρική επιφάνεια έχει βρεθεί ότι αυξάνει την προσκόλληση των ουδετερόφιλων στο ενδοθήλιο.

Η αποκοπή, τέλος, του CD43 από την κυτταρική επιφάνεια θα μπορούσε να επιφέρει στον κύτταρο και αποπτωτικές αλλαγές, οδηγώντας στην εκκαθάρισή του από τα μακροφάγα.

ΚΙΝΗΤΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ ΛΕΥΚΟΚΥΤΤΑΡΩΝ

Αν και έχει αποδειχθεί πλέον η συμμετοχή του CD43 στις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των λευκοκυττάρων, ο ακριβής του ρόλος σ'αυτές παραμένει ακόμη αβέβαιος. Σε μελέτη⁵³ που έγινε σε ποντίκια με ανεπάρκεια του CD43 βρέθηκε ότι τα CD43⁻ ποντίκια παρουσίαζαν αυξημένη ικανότητα των λευκοκυττάρων τους να προσκολλώνται στο αγγειακό ενδοθήλιο μετά από τη χημειοτακτική διέγερση σε σχέση με τα φυσιολογικά ποντίκια. Παρά την παρατήρηση αυτή όμως, αποκαλύφθηκε στη συνέχεια μια μειωμένη ικανότητα των λευκοκυττάρων των CD43⁻ ποντικίων να διηθούν τους φλεγμαίνοντες ιστούς.

Η κινητοποίηση των λευκοκυττάρων από την κυκλοφορία στους φλεγμαίνοντες ιστούς ρυθμίζεται από μια αλληλουχία αλληλεπιδράσεων μεταξύ των κυττάρων αυτών και του ενδοθηλίου. Αρχικά τα λευκοκύτταρα δένονται και κυλούν πάνω στα ενδοθηλιακά κύτταρα και στη συνέχεια ενεργοποιούνται και προσκολλώνται δυναμικά πάνω σ'αυτά μεταναστεύοντας διαμέσου των ενδοθηλιακών κυττάρων προς τους ιστούς. Τα γεγονότα αυτά ευοδώνονται με τη βοήθεια των ποικίλων κυτταρικών μορίων προσκόλλησης: οι σελεκτίνες είναι υπεύθυνες για τη σύνδεση και το κύλισμα των λευκοκυττάρων στο ενδοθήλιο, ενώ οι β2 ιντεγκρίνες και τα μόρια της υπεροικογένειας των ανοσοσφαιρινών για την ισχυρή προσκόλλησή τους στο ενδοθήλιο και τη μετανάστευσή τους στους ιστούς.

Αντίθετα, πολύ λίγα είναι γνωστά για την ύπαρξη πιθανών αντι-προσκολλητικών μηχανισμών που μπορεί να ρυθμίζουν την απάντηση στη φλεγμονή. Τέτοιος δυνητικός μηχανισμός θα μπορούσε να είναι ο παθητικός λειτουργικός φραγμός που εμποδίζει τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ λευκοκυττάρων και ενδοθηλιακών κυττάρων μέσω είτε στεροτακτικών δομών ή απωθητικού ηλεκτρικού φορτίου και ένας τέτοιος φραγμός μπορεί να εξασφαλίζεται από την παρουσία στην επιφάνεια των λευκοκυττάρων του CD43. Αυτό θα μπορούσε να συμβαίνει ως εξής: Α) Η δομή του μορίου αυτού αποτελεί ένα φραγμό, από τη στιγμή που η εξωκυττάρια δομή του εκτείνεται 45nm από την κυτταρική μεμβράνη. Μέσω της στερεοδομής του το CD43 θα μπορούσε να εμποδίζει μόρια προσκόλλησης (όπως π.χ. η L-σελεκτίνη) να αλληλεπιδρούν με τα μόρια σύνδεσής τους. Β) Το CD43 περιέχει μόρια σιαλικού οξέος, τα οποία δημιουργούν ένα δίκτυο αρνητικού φορτίου στην κυτταρική επιφάνεια και αυτό εμποδίζει την αλληλεπίδραση μεταξύ των κυττάρων. Η αποσιαλίωση των λευκοκυττάρων εξάλλου έχει συνδεθεί με τη μείωση του αρνητικού αυτού φορτίου στην επιφάνειά τους και επομένως στην αύξηση της προσκολλητικότητας, της ομοτυπικής συσσώρευσης και της διασποράς τους στους ιστούς. Γ) Το CD43 μετά την κυτταρική ενεργοποίηση αποκόπτεται από τη κυτταρική επιφάνεια με πρωτεολυτικό μηχανισμό, "εκθέτοντας" τα κυτταρικά μόρια προσκόλλησης και μειώνοντας τις απωθητικές δυνάμεις.

Τα αποτελέσματα της ανωτέρω μελέτης κατέδειξαν ότι το κύλισμα και η προσκόλληση των λευκοκυττάρων πάνω στο ενδοθήλιο -που ακολουθεί τη διέγερση από χημειοτακτικούς παράγοντες- είναι αυξημένη σε CD43⁻ ποντίκια, αλλά απροσδόκητα υπάρχει μια αδυναμία των λευκοκυττάρων (ουδετερόφιλων και μονοκυττάρων) στα ποντίκια αυτά να μεταναστεύουν έξω από τα αγγεία προς την περιοχή της φλεγμονής. Αυτό θα μπορούσε να εξηγηθεί μέσω αυξημένων διακυτταρικών αλληλεπιδράσεων έξω από τα αγγεία, αυξημένη απόπτωση, ή καταστροφή των ουδετερόφιλων μέσω των μακροφάγων των ιστών.

Τα αποτελέσματα αυτά προτείνουν ότι το CD43 εκτός της λειτουργίας του ως απωθητικός φραγμός που εμποδίζει την κυτταρική προσκόλληση, μπορεί να δρα ως μόριο που βοηθά την λευκοκυτταρική μετανάστευση μέσω του ενδοθηλίου στους

φλεγμαινόντες ιστούς. Είναι πιθανό ότι σε απουσία του CD43 οι αυξημένες προσκολλητικές δυνάμεις μπορεί να εμποδίζουν τη διαδοχική προσκόλληση και αποκόλληση των κυττάρων που απαιτείται για την κυτταρική μετανάστευση. Επίσης είναι γνωστό ότι το CD43 αποκόπτεται από την επιφάνεια των ενεργοποιημένων κυττάρων με πρωτεολυτικό μηχανισμό και η υποέκφραση του CD43 εμφανίζεται ταυτόχρονα με τη λευκοκυτταρική διαπίδυση μέσω του ενδοθηλίου. Η αποκοπή όμως δεν είναι πλήρης. Το 50% του μορίου παραμένει στην κυτταρική επιφάνεια του προσκολλημένου κυττάρου υποβοηθώντας τη μετανάστευση των κυττάρων αυτών στους ιστούς, αλλά και μειώνοντας τις αλληλεπιδράσεις κυττάρων-ενδοθηλίου κατά τη διαδικασία της μετανάστευσης αυτής. Εναλλακτικά το CD43 μπορεί επίσης να αποτρέπει την προσκόλληση νέων λευκοκυττάρων στο ενδοθήλιο, τα οποία θα μπορούσαν να συνδέονται με τα μεταναστεύοντα κύτταρα και να επιβραδύνουν τη μεταναστευτική τους πορεία.

ΠΟΛΙΚΟΤΗΤΑ ΚΑΙ ΚΙΝΗΤΙΚΟΤΗΤΑ ΤΩΝ ΟΥΔΕΤΕΡΟΦΙΛΩΝ

Τα μεταναστεύοντα ουδετερόφιλα³⁶ εμφανίζουν επίκτητη μια πολικότητα¹⁴⁴ στην οποία το κορυφαίο τμήμα όπου επικρατούν τα ελασματοπόδια διαφοροποιείται από την ουραία περιοχή όπου επικρατούν τα ουροπόδια. Κατά τη μετακίνηση των ουδετερόφιλων η κορυφαία περιοχή εκτείνεται προς την κατεύθυνση της μετανάστευσης. Αυτή η μεμβρανική έκταση συνδέεται με τον πολυμερισμό της F-ακτίνης. Η σύσπαση του ουροποδίου πιθανώς με μια διαδικασία που εξαρτάται από τη μυοσίνη II μπορεί επίσης να τραβά το κύτταρο προς το κορυφαίο του άκρο. Η μετακίνηση του κυττάρου απαιτεί επιτυχή προσκόλληση και απόσπασή του από το υπόστρωμα και ελέγχεται από την κυτταρική προσκολλητικότητα. Μαζί η προσκόλληση του κορυφαίου τμήματος και η απελευθέρωση του ουραίου τμήματος του κυττάρου ρυθμίζει την κυτταρική μορφολογία και κινητικότητα. Τα μόρια προσκόλλησης ρυθμίζουν την προσκόλληση του κυττάρου στο υπόστρωμα κατά τη διάρκεια της κυτταρικής μετακίνησης. Οι ιντεγκρίνες που βρίσκονται στο κορυφαίο τμήμα του κυττάρου συνδέουν τον κυτταρικό σκελετό με την εξωκυττάρια θεμέλια ουσία και έτσι παράγονται οι δυνάμεις που απαιτούνται για τη μετακίνησή του. Οι ιντεγκρίνες παραμένουν προσκολλημένες με το υπόστρωμα όσο το κύτταρο προχωρεί προς τα εμπρός και το έργο τους σταματά όταν μετακινηθεί και το ουραίο τμήμα του κυττάρου. Αυτή η σύνδεση του ουραίου τμήματος του κυττάρου με τις ιντεγκρίνες πρέπει να ελευθερωθεί και να δημιουργηθούν καινούριες θέσεις σύνδεσης στο κορυφαίο τμήμα για να διασφαλιστεί η συνέχιση της κυτταρικής μετακίνησης. Στη διαδικασία αυτή συμμετέχουν αφενός μεν η αποδόμηση της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας, αφετέρου δε η ανακύκλωση και απελευθέρωση των ιντεγκρινών. Η συμβολή των μεμβρανικών πρωτεϊνών (αντι-προσκολλητικά μόρια) -που εδράζονται στο ουροπόδιο του κυττάρου- στην απελευθέρωση του ουραίου τμήματος του κυττάρου δεν έχει διερευνηθεί.

Η σύνδεση του CD43 με αντισώματα αυξάνει την ανακατανομή του CD43 στην κυτταρική επιφάνεια, καθώς και την πολικότητα των ουδετερόφιλων (σε εναιώρημα), με την εμφάνιση ενός ελασματοποδίου πλούσιου σε F-ακτίνη και ενός ουροποδίου πλούσιου σε μυοσίνη, κάτι που όπως ειπώθηκε συμβαίνει και με τα μετακινούμενα προς τη φλεγμονώδη περιοχή ουδετερόφιλα. Το CD43 φαίνεται επίσης να ανακατανέμεται προς την ουραία περιοχή του λεμφοκυττάρου όταν αυτό έρπει πάνω σε ένα στρώμα από ενδοθηλιακά κύτταρα ή σε μια επιφάνεια που καλύπτεται από πρωτεϊνικό στρώμα. Όταν η παραπάνω διαδικασία είναι σε εξέλιξη, το ενδοκυττάριο τμήμα του CD43 αλληλεπιδρά με πρωτεϊνικά μόρια που συνδέονται με την F-ακτίνη και είναι μέλη της οικογένειας των εζρίνης/ραντιζίνης/μυοσίνης (ERM).

Επιπλέον βάσει μελετών έχει καταδειχθεί ότι η σύνδεση του CD43 με αντισώματα όχι μόνο αυξάνει την πολικότητα και τη μετακίνηση των ουδετερόφιλων, αλλά αυτό γίνεται με την ανακατανομή του μορίου προς το ουραίο τμήμα του πολωμένου ουδετερόφιλου λευκοκυττάρου. Μάλιστα, από την ομάδα ERM, η μυσίνη -και όχι η α-ακτινίνη- συνεδράζεται με το CD43 στην ουρά του λευκοκυττάρου και αυτό επιβεβαιώνει την πιθανή λειτουργία της μυσίνης ως το μόριο σύνδεσης του ενδοκυττάρου τμήματος του CD43 με το δίκτυο της F-ακτίνης.

Συμπερασματικά, λοιπόν, έχει φανεί ότι:

A) Σε εναιώρημα ουδετερόφιλων λευκοκυττάρων, η σύνδεση του CD43 με αντίσωμα οδηγούσε σε ανακατανομή του μορίου στην κυτταρική επιφάνεια, μετακίνησή του στο ουραίο τμήμα του κυττάρου και εμφάνιση πολικότητας στο 15-25% των κυττάρων.

B) Η πολικότητα είναι απαραίτητη για την κινητοποίηση και είναι άρρηκτα συνδεδεμένη με τη μετανάστευση του CD43 στο ουραίο τμήμα του κυττάρου.

Γ) Όταν τα ουδετερόφιλα εκτεθούν σε χημειοτακτική διέγερση, το μεγαλύτερο ποσοστό από αυτά (~75%) πολώνονται και το CD43 μετακινείται προς το πίσω μέρος του κυττάρου (ουροπόδιο).

Δ) Η συσσώρευση του CD43 στο ουροπόδιο δεν είναι αποτέλεσμα της αποκοπής του μορίου από το κορυφαίο τμήμα του κυττάρου, αλλά της μετακίνησής του προς το ουραίο τμήμα.

Ε) Η μυσίνη, μια πρωτεΐνη της οικογένειας των ERM πρωτεϊνών είναι ο συνδετικός κρίκος του ενδοκυττάρου τμήματος του CD43 με την F-ακτίνη. Πράγματι, CD43 και μυσίνη ακολουθούν κοινή πορεία ανακατανομής προς το ουραίο τμήμα του κυττάρου με τη χημειοτακτική διέγερση του ουδετερόφιλου.

Δύο υποθέσεις που βασίζονται στη σχέση CD43 και κυτταρικής κινητικότητας πρέπει να γίνουν:

- 1) Το απωθητικό ουροπόδιο απελευθερώνει τη προσκόλληση του ουραίου τμήματος του κυττάρου (αντι-προσκολλητική θεωρία),
- 2) Το προσκολλητικό ουροπόδιο επιτρέπει στο κύτταρο να ρέπει προς το υπόστρωμα, σταθεροποιώντας τη θέση του κυττάρου, βοηθώντας προς την κατεύθυνση της δημιουργίας νέων συνδέσεων του κορυφαίου τμήματος και σπρώχνοντας το κύτταρο προς τα εμπρός (προσκολλητική θεωρία).

ΠΡΟΣΚΟΛΛΗΣΗ ΤΩΝ ΜΟΝΟΚΥΤΤΑΡΩΝ ΣΤΟ ΕΝΔΟΘΗΛΙΟ ΣΤΗ ΦΛΕΓΜΟΝΗ ΚΑΙ ΤΗΝ ΑΘΗΡΟΓΕΝΕΣΗ

Το μονοκλωνικό αντίσωμα L11 έναντι του CD43⁵⁴ αναστέλλει τη σύνδεση των T-λεμφοκυττάρων με το ενδοθήλιο των λεμφαδένων, καθώς και την εξαγγείωση των T-λεμφοκυττάρων από το αίμα προς τους οργανωμένους δευτερογενείς λεμφικούς ιστούς. Σε μια μελέτη αποδείχθηκε ότι η σύνδεση του L11 με το CD43 μπλοκάρει τη προσκόλληση των μονοκυττάρων στο φλεβικό ενδοθήλιο των φλεγμαινόντων λεμφαδένων, αναστέλλει δε την κινητοποίηση μονοκυττάρων και ουδετερόφιλων προς τις περιοχές της φλεγμονής *in vivo*. Αυτό σημαίνει ότι το CD43 ρυθμίζει τις αλληλεπιδράσεις μονοκυττάρων-ενδοθηλιακών κυττάρων και την κινητοποίηση των μονοκυττάρων τόσο στη φλεγμονή, όσο και στη διαδικασία της αθηρογένεσης.

CD43 ΚΑΙ NK ΚΥΤΤΑΡΑ

ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ NK ΚΥΤΤΑΡΩΝ

Τα NK κύτταρα (CD56bright και CD56dim) εκφράζουν διαφορετικές σιαλικές μορφές του CD43². Η ενεργοποίηση των NK κυττάρων³⁹ είναι το αποτέλεσμα μιας ισορροπίας θετικών και αρνητικών σημάτων που μεταβιβάζονται από μεμβρανικούς υποδοχείς. Σε μια μελέτη αναφέρθηκε ενεργοποίηση των NK κυττάρων μέσω του CD43. Πράγματι, η σύνδεση του μορίου αυτού με μονοκλωνικό αντίσωμα διέγειρε την έκκριση των κυτταροκινών RANTES, MIP-1α και MIP-1β, αύξησε την κυτταροτοξική δράση των NK κυττάρων και ενεργοποίησε την τυροσίνη-κινάση στα NK κύτταρα. Ανάμεσα στις τυροσινοκινάσες που ενεργοποιήθηκαν με τη διέγερση των NK κυττάρων μέσω CD43 αναγνωρίστηκε και η PYK-2.

Τα NK κύτταρα είναι ως γνωστόν απαραίτητα στοιχεία της φυσικής ανοσίας του ανθρώπινου οργανισμού καταστρέφοντας κύτταρα-στόχους και εκκρίνοντας κυτοκίνες που ρυθμίζουν την επίκτητη άμυνα του οργανισμού. Τη λειτουργία τους ρυθμίζουν μια σειρά από αντίθετα σήματα που είτε αναστέλλουν ή ενεργοποιούν τις λειτουργίες τους. Οι ανασταλτικοί υποδοχείς δρουν μέσω κυτταροπλασματικών αλληλουχιών που ονομάζονται ITIMs (immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motifs). Λιγότερα είναι ξεκαθαρισμένα για τους υποδοχείς που είναι υπεύθυνοι για την ενεργοποίηση των κυττάρων αυτών. Πάντως η διαδικασία ενεργοποίησης περιλαμβάνει ποικίλους διαλυτούς παράγοντες όπως οι κυτταροκίνες α/β interferons, TNF-α, IL-2, IL-5, και σήματα ενεργοποίησης που μεταβιβάζονται μέσω μεμβρανικών υποδοχέων, όπως οι CD16(FcγRIII), CD2, CD28, CD44, CD69, καθώς και το CD40-ligand. Οι υποδοχείς ενεργοποίησης των NK κυττάρων μεταβιβάζουν θετικά σήματα στα κύτταρα αυτά μέσω ενεργοποίησης της πρωτεΐνης κινάσης, τη στιγμή που οι ανασταλτικοί υποδοχείς δρουν μέσω ενεργοποίησης της τυροσίνης φωσφατάσης. Η σύνδεση δε των CD2, CD16 έχει αναφερθεί ότι ενεργοποιεί τις τυροσινοκινάσες της ομάδας Src.

Η PYK-2 (proline-rich tyrosine kinase 2) που αλλιώς ονομάζεται RAFTK (related adhesion focal tyrosine kinase), CAKβ (cell adhesion kinase β) και CadTK (cell adhesion dependent tyrosine kinase) είναι μια 115kD πρωτεΐνη-μέλος της οικογένειας των FAK τυροσινοκινάσων -του τύπου των μη υποδοχέων. Η PYK-2 εκφράζεται από διάφορα αιμοποιητικά κύτταρα και έχει την ιδιότητα να φωσφορυλιώνεται τάχιστα ως απάντηση σε ερεθίσματα που κινητοποιούν το ασβέστιο και ενεργοποιούν την PKC. Επιπλέον η PYK-2 έχει λειτουργική σχέση με τις ιντεγκρίνες β1, β2 και β3 και ενεργοποιείται όταν οι ιντεγκρίνες αυτές αλληλεπιδρούν με τα μόρια σύνδεσής τους. Έχει αποδειχθεί λοιπόν ότι:

- 1) Η σύνδεση του CD43 αυξάνει την έκκριση των κυτταροκινών από τα NK κύτταρα και την κυτταροτοξικότητα των NK κυττάρων. Πράγματι τα NK κύτταρα εκκρίνουν διάφορες κυτταροκίνες, όπως οι RANTES, MIP-1α, MIP-1β και λεμφοτακτίνη, που δίνουν το έναυσμα για την μετανάστευση των NK κυττάρων, ρυθμίζουν την κυτταρική πολικότητα και την ανακατανομή των μορίων προσκόλλησης, διεγείρουν την κινητοποίηση του ενδοκυττάριου ασβεστίου και την απελευθέρωση των κυτταρικών κοκκίων και αυξάνουν την κυτταροτοξικότητα των NK κυττάρων. Η σύνδεση του CD43 οδήγησε στην έκκριση από τα NK κύτταρα των ανωτέρω κυτταροκινών και στην αύξηση της κυτταροτοξικότητάς τους.
- 2) Η μεταβίβαση σημάτων μέσω του CD43 περιλαμβάνει την ενεργοποίηση πρωτεϊνοκινάσων στα NK κύτταρα.

- 3) Η σύνδεση του CD43 αυξάνει την ενεργοποίηση της τυροσινοκινάσης PYK-2 στα NK κύτταρα, μέσω φωσφορυλίωσης της τυροσίνης. Μάλιστα το αποτέλεσμα ήταν το ίδιο όταν αντί του πλήρους αντι-CD43 μονοκλωνικού αντισώματος χρησιμοποιήθηκε μόνο το F(ab')₂ τμήμα του.

CD43 ΚΑΙ ΜΑΣΤΟΚΥΤΤΑΡΑ (HMC-1)

ΑΠΟΚΟΠΗ ΤΟΥ CD43 ΑΠΟ ΤΗΝ ΕΠΙΦΑΝΕΙΑ ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΜΕΝΩΝ HMC-1 ΚΥΤΤΑΡΩΝ

Η λευκοσιαλίνη αποκόπτεται από την επιφάνεια των ουδετερόφιλων όταν αυτά ενεργοποιούνται από PMA (οξεική μυριστική φορβόλη). Αυτό δε συμβαίνει με τα λεμφοκύτταρα του αίματος, συμβαίνει όμως με τα ανθρώπινα μαστοκύτταρα^{43,55} (HMC-1). Το PMA προκαλεί απελευθέρωση μιας διαλυτής λευκοσιαλίνης (123 kD) κατά την ενεργοποίηση των μαστοκυττάρων. Το μοριακό βάρος της διαλυτής αυτής λευκοσιαλίνης μοιάζει με αυτό της συνδεδεμένης με την κυτταρική μεμβράνη λευκοσιαλίνης, κάτι που πιθανολογεί την αποκοπή της λευκοσιαλίνης από την επιφάνεια του HMC-1 κατά την ενεργοποίηση με PMA.

ΜΕΤΑΒΙΒΑΣΗ ΣΗΜΑΤΟΣ ΜΕΣΩ CD43 ΣΤΑ ΑΝΘΡΩΠΙΝΑ ΛΕΥΧΑΙΜΙΚΑ ΜΑΣΤΟΚΥΤΤΑΡΑ HMC-1

Οι ώριμες μορφές των μαστοκυττάρων διαμένουν αποκλειστικά στους ιστούς, αλλά οι άωρες πρόδρομες μορφές τους προέρχονται από τα CD34⁺ αιμοποιητικά στελεχιαία κύτταρα, τα οποία εισδύουν στους ιστούς όπου διαφοροποιούνται κάτω από την επίδραση ποικίλων περιβαλλοντικών αναπτυξιακών παραγόντων. Πολύ λίγα έχουν ξεκαθαριστεί για το στάδιο ωρίμανσης κατά το οποίο συμβαίνει η εξαγγελίωση των πρόδρομων μαστοκυττάρων, καθώς και για τους μηχανισμούς που παίζουν ρόλο στη διαδικασία της διαπίδυσης, πάντως στη διαδικασία αυτή ρόλο-κλειδί διαδραματίζουν τα μόρια προσκόλλησης. Οι προσκολλητικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των κυττάρων επίσης συμμετέχουν στην εξαγγελίωση των πρόδρομων μορφών των μαστοκυττάρων. Τα μόρια προσκόλλησης που εκφράζονται στην επιφάνεια των μαστοκυττάρων μεσολαβούν σε ποικίλες αλληλεπιδράσεις μεταξύ των κυττάρων αυτών και των ιστών ή άλλων κυττάρων της φλεγμονής.

Αν και το CD43 εκφράζεται από λευχαιμικά (HMC-1) μαστοκύτταρα όπως ακριβώς και από τα ώριμα ανθρώπινα μαστοκύτταρα που εδράζονται σε διάφορες ανατομικές θέσεις, ο ρόλος του στην ενεργοποίηση των μαστοκυττάρων δεν έχει ακόμα τεκμηριωθεί. Πάντως η σύνδεση του CD43 με μονοκλωνικά αντισώματα είναι ικανή να προκαλέσει ομοτυπική συσσώρευση στα κύτταρα HMC-1.

Σε πρόσφατη μελέτη έχει αποδειχθεί⁵⁶:

- 1) Η συμμετοχή του CD43 στην ενεργοποίηση των μαστοκυττάρων μέσω υποκυτταρικών αντιδράσεων μεταβίβασης σήματος. Η ενεργοποίηση που συμβαίνει μέσω της σύνδεσης του CD43 με αντίσωμα οδηγεί σε συσσώρευση των HMC-1 κυττάρων και περιλαμβάνει ένα καταρράκτη σημειακών μεταβιβάσεων που εξαρτώνται από την πρωτεϊνοκινάση C.
- 2) Ο λειτουργικός ρόλος του CD43 στη ρύθμιση της ίδιας του της έκφρασης στην επιφάνεια των μαστοκυττάρων, καθώς και στην έκκριση κυτταροκινών από τα μαστοκύτταρα.
- 3) Ότι το CD43 δε συμμετέχει στην απελευθέρωση αποθηκευμένων ή νεοσυντιθέμενων μεσολαβητών από το μαστοκύτταρο, όπως η ισταμίνη, η τρυπτάση και ο παράγων LTC₄.

Στην ως άνω μελέτη δείχθηκε ότι η δράση της πρωτεϊνοκινάσης C έχει κεντρική σημασία στην ομοτυπική συσσώρευση των HMC-1 κυττάρων μέσω CD43, ενώ φάνηκε μια παροδική υποέκφραση του μορίου στην επιφάνεια των ενεργοποιημένων HMC-1 κυττάρων οφειλόμενη σε ένα μηχανισμό πρωτεολυτικής αποκοπής του μορίου.

Η ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ ΡΕΤΙΝΟΪΚΟΥ ΟΞΕΟΣ ΣΤΗΝ ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΟΥ CD43 ΣΤΗΝ ΕΠΙΦΑΝΕΙΑ ΤΩΝ HMC-1 ΚΥΤΤΑΡΩΝ

Το ρετινοϊκό οξύ⁵⁷ -ένας μεταβολίτης της βιταμίνης A- είναι ένας παράγοντας με αντιφλεγμονώδεις, αντιπολλαπλασιαστικές και ανοσορυθμιστικές ικανότητες. Τις λειτουργίες του αυτές τις πραγματοποιεί μέσω σύνδεσής του με ειδικές κυτταροπλασματικές πρωτείνες και πυρηνικούς υποδοχείς που ενεργοποιούν ή καταστέλλουν τη μεταγραφή συνδεδεμένοι με μόρια που επηρεάζουν το DNA. Σε μελέτη που έγινε το 1997 βρέθηκε ότι το all-trans και το 13-cis-ρετινοϊκό οξύ αυξάνει την έκφραση του CD43 στην επιφάνεια των HMC-1 κυττάρων, και το τελευταίο οδηγεί στην αύξηση της μέσω αντι-CD43 επαγόμενης ομοτυπικής συσσώρευσης των HMC-1 κυττάρων. Φαίνεται μάλιστα ότι η αύξηση της συσσώρευσης των HMC-1 κυττάρων χρησιμοποιεί το μονοπάτι της κυτταρικής προσκόλλησης που εξαρτάται από τη σύνδεση LFA-1/ICAM-1. Το ρετινοϊκό οξύ προκαλεί επίσης αύξηση της έκφρασης του CD43 στην επιφάνεια τόσο των δερματικών μαστοκυττάρων, όσο και των μονοκυττάρων.

CD43 ΚΑΙ ΠΡΟΓΟΝΙΚΑ ΑΙΜΟΠΟΙΗΤΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ

Η ΣΥΝΔΕΣΗ ΤΟΥ CD43 ΡΥΘΜΙΖΕΙ ΤΗ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ ΤΩΝ ΙΝΤΕΓΚΡΙΝΩΝ ΣΤΑ ΠΡΟΓΟΝΙΚΑ ΑΙΜΟΠΟΙΗΤΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ

Σε μελέτη που έγινε το 1999⁵⁸ βρέθηκε ότι η σύνδεση του CD43 αυξάνει την προσκόλληση των ανθρώπινων CD34⁺ αιμοποιητικών κυττάρων -μέσω ενεργοποίησης των ιντεγκρινών α4β1 (very late antigen[VLA]-4) και α5β1 (VLA-5). Τα κύτταρα που απαντούν στη διέγερση μέσω CD43 ήταν τα CD34⁺CD38^{hi} και όχι τα CD34⁺CD38^{low}. Αυτό σημαίνει ότι τα ευαίσθητα κύτταρα στην ενεργοποίηση της ιντεγκρίνης μέσω CD43 ήταν τα διαιρούμενα κύτταρα και όχι τα στελεχειαία κύτταρα και οι πιο άωρες αιμοποιητικές βαθμίδες. Επίσης η σύνδεση του CD43 αυξάνει τη φωσφορυλίωση πολλών ενδοκυττάρων μορίων όπως η τυροσινική κινάση Syk, η φωσφολιπάση C (PLC)-γ2 και το προϊόν Cbl ενός πρωτο-ογκογονιδίου. Τέλος, ο αναστολέας της τυροσινικής κινάσης ερμπιμυκίνη A καθώς και ο αναστολέας της PLC-γ2 U73122 μπλόκαραν την ανωτέρω αύξηση της κυτταρικής προσκόλλησης στην ινωδονεκτίνη που προάγεται από το CD43. Αυτά τα αποτελέσματα υποδεικνύουν ότι τα σήματα που μεταβιβάζονται από το CD43 αυξάνουν τη συνάφεια της ιντεγκρίνης με τη ινωδονεκτίνη μέσω μιας οδού που εξαρτάται από την ενεργοποίηση της τυροσινικής κινάσης και της PLC-γ στα πρόδρομα αιμοποιητικά κύτταρα.

Το CD43 επίσης έχει αναφερθεί ότι μεταβιβάζει σήματα που οδηγούν σε αυξημένη απόπτωση ενεργοποιημένων από κυτταροκίνες διαιρούμενων CD34⁺ κυττάρων. Αυτό δε συμβαίνει σε μη διαιρούμενα (CD34⁺CD38⁻) κύτταρα. Φαίνεται ότι η ίδια ισομορφή του CD43 μεσολαβεί τόσο στην κυτταρική απόπτωση, όσο και στην ενεργοποίηση των ιντεγκρινών, άρα ρυθμίζει τόσο την κυτταρική προσκόλληση, όσο και την κυτταρική επιβίωση στο μικροπεριβάλλον του μυελού των οστών.

Η ΣΥΝΔΕΣΗ ΤΟΥ CD43 ΠΡΟΑΓΕΙ ΤΗΝ ΑΠΟΠΤΩΣΗ ΤΩΝ ΑΝΘΡΩΠΙΝΩΝ ΠΡΟΓΟΝΙΚΩΝ ΑΙΜΟΠΟΙΗΤΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

Η αιμοποίηση^{59,60} που λαμβάνει χώρα στο μυελικό μικροπεριβάλλον και στηρίζεται στα αιμοποιητικά προγονικά κύτταρα (HPC) είναι μια ρυθμιζόμενη διαδικασία. Η επαφή των αιμοποιητικών κυττάρων με το μικροπεριβάλλον αυτό ευοδώνεται από τα κυτταρικά μόρια προσκόλλησης, που στηρίζουν τη σύνδεση των κυττάρων αυτών με το μυελικό στρώμα και μεταβιβάζουν σήματα τα οποία ενέχονται στη ρύθμιση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού.

Οι ειδικοί ρόλοι του καθενός από τα κυτταρικά μόρια προσκόλλησης δεν είναι απόλυτα ξεκάθαροι. Τα μόνα μόρια προσκόλλησης που ο ρόλος τους στην αιμοποίηση έχει αποσαφηνιστεί είναι το CD44 και η ιντεγκρίνη CD49d/CD29 (α4β1). Μονοκλωνικά αντισώματα που αναγνωρίζουν αυτά τα μόρια αναστέλλουν την αιμοποίηση σε κυτταροκαλλιέργειες *in vitro*. Παραμένει όμως άγνωστο αν το τελευταίο συμβαίνει είτε λόγω αναστολής της κυτταρικής προσκόλλησης και της μεταβίβασης σημάτων που προωθούν την κυτταρική ανάπτυξη ή λόγω αναστολής της παθητικής κυτταρικής επαφής που ευθύνεται για τη διατήρηση των αιμοποιητικών κυττάρων στο κατάλληλο περιβάλλον προκειμένου να αναπτυχθούν. Πάντως για την αναστολή της αιμοποίησης μέσω σύνδεσης με μονοκλωνικό αντίσωμα των CD44 και CD49d/CD29 απαραίτητος είναι ο ρόλος και άλλων κυττάρων, όπως π.χ. των μακροφάγων.

Τα πιο γνωστά μεμβρανικά μόρια που μεταβιβάζουν αποπτωτικά σήματα στα αιμοποιητικά κύτταρα περιλαμβάνουν τον υποδοχέα των T-κυττάρων στα T-κύτταρα, τον υποδοχέα Ig στα B-κύτταρα και μόρια-μέλη της υπερικογένειας του υποδοχέα του TNF (TNF-receptor, CD30, Fas/Apo-1).

Σε μελέτες που έγιναν χρησιμοποιήθηκε το μονοκλωνικό αντίσωμα MEM-59 για τη σύνδεση του CD43 και βρέθηκε ότι η σύνδεση αυτή μεταβιβάζει σήματα που αυξάνουν την απόπτωση¹⁴¹ στα αιμοποιητικά προγονικά κύτταρα και αναστέλλουν τον πολλαπλασιασμό τους.

Πράγματι, στα CD34⁺ κύτταρα η έκφραση του CD43 ποικίλλει. Μελετήθηκε λοιπόν η επίδραση της σύνδεσης του MEM-59 με το CD43 στον πολλαπλασιασμό των αιμοποιητικών προγονικών κυττάρων με υψηλή έκφραση του CD43 και μηδαμινή έκφραση δεικτών που συνδέονται με ιδιαίτερες αιμοποιητικές σειρές (CD34^{hi}LIN⁻).

Πράγματι βρέθηκε ότι ο εξαρτώμενος από κυτοκίνες πολλαπλασιασμός των κυττάρων αυτών ελαττώθηκε με τη σύνδεση CD43 με το MEM-59. Αυτή η μείωση του πολλαπλασιασμού μπορεί να σημαίνει είτε αναστολή της κυτταρικής διαίρεσης, ή έναρξη της διαδικασίας της απόπτωσης. Έτσι, μετά τη σύνδεση του CD43 παρατηρήθηκε ότι μια αξιοσημείωτη αναλογία των κυττάρων ήταν σε προχωρημένο στάδιο απόπτωσης, εμφανίζοντας χαρακτηριστικές για την αποπτωτική διαδικασία μορφές, όπως κυτταρική συρρίκνωση, πυρηνικός κατατεμαχισμός, φυσαλλίδες στη μεμβράνη, δημιουργία κύστεων κ.ο.κ. Βρέθηκε λοιπόν ότι τα BFU-E και CFU-GEMM ανεστάλησαν σε μεγαλύτερο βαθμό από τα CFU-GM μετά τη σύνδεση του CD43 με το MEM-59. Ο κυτταρικός θάνατος δε που προκλήθηκε από την ως άνω σύνδεση ήταν μεγαλύτερος σε παρουσία κυτοκινών. Τα κύτταρα που καλλιεργήθηκαν για πάνω από 7 ημέρες και έχασαν την έκφραση του CD34 από την επιφάνειά τους, εκφράζοντας ακολούθως τα CD14 και CD15 (μυελοειδής διαφοροποίηση), έχασαν και την ευαισθησία τους στη σύνδεση CD43 και MEM-59.

Το μονοκλωνικό αντίσωμα MEM-59 αναγνώριζε σε κάθε περίπτωση έναν επίτοπο πάνω στο CD43 πλούσιο σε σιαλικό οξύ. Τέλος, η σύνδεση του CD43 με το MEM-59 δεν προκαλούσε την έναρξη απόπτωσης σε όλα τα κύτταρα που ήταν CD34^{hi}LIN⁻.

Μια μικρή μειοψηφία κυττάρων επιβίωσε από την αποπτωτική διαδικασία που

εκκινείται μέσω του CD43 και αυτά τα κύτταρα είχαν τα χαρακτηριστικά των στελεχιαίων κυττάρων (stem cells).

Η απόπτωση δηλαδή που ξεκινά με τη σύνδεση του CD43 με το μονοκλωνικό αντίσωμα MEM-59 αφήνει ανεπηρέαστα τα στελεχιαία κύτταρα, τα διαφοροποιημένα μυελοειδή κύτταρα και τα περιφερικά ώριμα λεμφοκύτταρα.

ΚΟΙΝΟ ΜΟΝΟΠΑΤΙ ΜΕΤΑΒΙΒΑΣΗΣ ΣΗΜΑΤΟΣ ΣΤΑ ΑΩΡΑ ΑΙΜΟΠΟΙΗΤΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ ΜΕ ΤΗ ΣΥΝΔΕΣΗ ΤΩΝ ΣΙΑΛΟΜΟΥΚΙΝΩΝ CD34 ΚΑΙ CD43

Το CD34 ως γνωστόν είναι μια βαρεία Ο-γλυκοσυλιωμένη διαμεμβρανική σιαλομουκίνη που εκλεκτικά εκφράζεται στην επιφάνεια των αρχέγονων στελεχιαίων αιμοποιητικών κυττάρων και των αγγειακών ενδοθηλιακών κυττάρων. Το ενδοκυττάριο τμήμα του φέρει μια περιοχή φωσφορυλίωσης της τυροσίνης και δύο δυναμικές περιοχές- στόχους της πρωτεϊνοκινάσης C, αλλά στερείται ενζυμικών περιοχών. Το φυσικό μόριο σύνδεσης του μορίου αυτού δεν έχει ακόμα βρεθεί, αλλά το CD34 που βρίσκεται στην επιφάνεια των ενδοθηλιακών κυττάρων των φλεβιδίων των λεμφαδένων μπορεί να λειτουργεί ως μόριο σύνδεσης της L-σελεκτίνης. Τα μονοκλωνικά αντισώματα που συνδέουν το CD34 είναι χρήσιμα στη απομόνωση των προγονικών στελεχιαίων αιμοποιητικών κυττάρων στο μυελό των οστών, καθώς και στην ανάλυση των κινητοποιημένων προγονικών αιμοποιητικών κυττάρων στη λευχαιμία, τη μυελική μεταμόσχευση και τη γονιδιακή θεραπεία. Η σύνδεση του CD34 με αντίσωμα αυξάνει την προσκόλληση των αιμοποιητικών κυττάρων που το εκφράζουν, ενώ η έκφραση αυτή αναστέλλει τη διαφοροποίηση των αιμοποιητικών κυττάρων.

Σε μελέτη το 1999⁴⁵ ερευνήθηκαν οι λειτουργίες του CD34 και του CD43 που συνεκφράζονται στα αρχέγονα αιμοποιητικά κύτταρα. Βρέθηκε λοιπόν ότι η διέγερση των αιμοποιητικών κυττάρων KG1a (της αδιαφοροποίητης οξείας μυελοβλαστικής λευχαιμίας) με μονοκλωνικά αντισώματα αντι-CD34 και αντι-CD43 αύξησε την κυτταρική προσκόλληση μέσω σχηματισμού καλύπτρας μακράς διάρκειας από τα μόρια αυτά, που φάνηκε να συνεδράζονται με την F-ακτίνη. Επίσης η ανωτέρω διέγερση αύξησε την φωσφορυλίωση της τυροσίνης των πρωτεϊνών Lyn, Syk, pp60, pp69 και pp77 στην περιοχή της καλύπτρας. Μάλιστα το μπλοκάρισμα της καλύπτρας αυτής με τη χρήση κυτοχάλασίνης D ή NaF οδήγησε στην αναστολή της φωσφορυλίωσης της τυροσίνης και της κυτταρικής προσκόλλησης. Επιπλέον και τα φυσιολογικά CD34+ κύτταρα μετά από διέγερση εμφάνισαν σχηματισμό καλύπτρας από CD34 και CD43. Τούτο σημαίνει ότι η σύνδεση των μορίων CD34 και CD43 με μονοκλωνικό αντίσωμα ενεργοποιεί το ίδιο μονοπάτι σημειακής μεταβίβασης στη διαδικασία της κυτταρικής προσκόλλησης -μέσω τυροσινוקινασών Lyn και Syk- στην αιμοποίηση(βλ. σχήμα 1).

Σχήμα 1:

Σύνδεση των CD34 και CD43 με μονοκλωνικά αντισώματα

← **inh** Naf

Φωσφορυλίωση της τυροσίνης των Lyn, pp60 και pp69 **↑**

← **inh** Κυτοχλασίνη D

Πόλωση του κυττάρου (σχηματισμός καλύπτρας-ουροποδίου)

Φωσφορυλίωση της τυροσίνης των Syk και pp77 **↑**

Κυτταρική
Προσκόλληση

Κυτταρική
Κινητοποίηση

ΜΕΡΟΣ Β΄:
ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ-
ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ-
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Σκοπός της μελέτης μας είναι να διερευνηθεί η έκφραση των μορίων προσκόλλησης και ιδιαίτερα του CD43 στην επιφάνεια των κυττάρων του παθολογικού κλώνου των ασθενών με MDS και η αποσαφήνιση του μηχανισμού ρύθμισης της έκφρασης αυτής. Ιδιαίτερα για το CD43 θα μελετηθούν:

- 1) Η μειωμένη ή αυξημένη σύνθεση του μορίου σε επίπεδο μεταγραφής-μετάφρασης
- 2) Η πιθανή στερεοδομική αλλαγή του μορίου
- 3) Η πιθανή εσωτερίκευση του μορίου (internalization)
- 4) Η πιθανή πρωτεολυτική αποκοπή του μορίου από την κυτταρική επιφάνεια (cleavage).

Επίσης, σκοπός είναι να μελετηθεί η συσχέτιση των διαταραχών έκφρασης του CD43 με την κατάσταση της άμυνας των ασθενών και την ευαισθησία που παρουσιάζουν σε λοιμώξεις.

ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Στη μελέτη συμπεριλήφθηκαν 78 ασθενείς, οι οποίοι στο σύνολό τους προέρχονταν από το Αιματολογικό Τμήμα του Βενιζελείου-Πανανείου Γεν. Νοσ. Ηρακλείου και την Αιματολογική Κλινική του Περιφερειακού Πανεπιστημιακού Γεν. Νοσ. Ηρακλείου. Από τους ασθενείς οι 57 ήταν άνδρες και οι 21 γυναίκες και οι ηλικίες τους κυμαίνονταν από 33 έως 88 έτη (μέση ηλικία τα 73 έτη, διάμεση ηλικία τα 73,5 έτη). Οι ασθενείς κατηγοριοποιήθηκαν σύμφωνα με τα κριτήρια FAB και: 32 είχαν ανθεκτική αναιμία (RA), 17 είχαν ανθεκτική αναιμία με δακτυλιοειδείς σιδηροβλάστες (RARS), 9 είχαν ανθεκτική αναιμία με περίσσεια βλαστών (RAEB), 9 είχαν ανθεκτική αναιμία με περίσσεια βλαστών σε μετατροπή (RAEB-t) και 11 είχαν χρόνια μυελομονοκυτταρική λευχαιμία (CMML).

Η διάγνωση ετίθετο με την κλινική εικόνα, την εικόνα του περιφερικού αίματος και τη μορφολογική αξιολόγηση του μυελογράμματος και της οστεομυελικής βιοψίας. Η διάρκεια της νόσου πριν τη μελέτη κυμαινόταν από 1 έως 149 μήνες (μέση τιμή 42 μήνες). Κανένας από τους ασθενείς δεν είχε λάβει κανένα είδος θεραπείας τους τελευταίους 2 μήνες πριν τη μελέτη, εκτός από περιστασιακές μεταγγίσεις ερυθρών ή/και αιμοπεταλίων. Τις τελευταίες δύο εβδομάδες πριν τη μελέτη δεν είχε μεταγγιστεί κανένας από τους 78 ασθενείς. Επίσης οι ασθενείς που εισήχθησαν στη μελέτη δεν παρουσίαζαν λοίμωξη με κλινικά και εργαστηριακά κριτήρια. Ως μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν στη μελέτη 20 υγιή άτομα ηλικίας 30-85 ετών (11 άνδρες και 9 γυναίκες).

Πιο κάτω παρατίθεται ένας πίνακας με ορισμένα επιδημιολογικά, κλινικά και εργαστηριακά στοιχεία των ασθενών που συμπεριλήφθηκαν στη μελέτη (πίνακας 16).

ΠΙΝΑΚΑΣ 16: ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΚΑ, ΚΛΙΝΙΚΑ ΚΑΙ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΤΩΝ ΑΣΘΕΝΩΝ ΠΟΥ ΜΕΛΕΤΗΘΗΚΑΝ

<i>ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΟ</i>	<i>RA</i>	<i>RAS</i>	<i>RAEB</i>	<i>RAEB-t</i>	<i>CMML</i>
Αριθμός ασθενών	32	17	9	9	11
Φύλο					
Άνδρες (Α)	21	13	8	6	9
Γυναίκες (Γ)	11	4	1	3	2
Λόγος Α/Γ (~)	1,9/1	3,25/1	8/1	2/1	4,5/1
Μέση Ηλικία (σε έτη)	74 (55-88)	75 (33-88)	73 (58-81)	67 (55-81)	72 (63-83)
Μέση Ηλικία (Α)	74	75	73	67	72
Μέση Ηλικία (Γ)	74	74	76	62	73
Μέση διάρκεια νόσου (σε μήνες)	47 (2-125)	59 (18-149)	20 (8-29)	22 (2-53)	38 (1-88)
Hb (g/dl)	8,4±1,1 (6,9-11,5)	9±1,5 (7-10,9)	8±1,5 (6-11)	9±1,8 (7-10,8)	9.5±0,9 (7-12,9)
Λευκά (/μl)	3338±852 (1500-6800)	6900±852 (5300-10500)	1601±201 (1300-3100)	7160±4316 (2540-36400)	16400±9350 (5400-56300)
Ουδετερόφιλα (/μl)	1694±544 (87-5968)	3315±893 (2520-5985)	1477±599 (35-6090)	4432±2625 (264-15300)	10493±7129 (1134-31528)
Λεμφοκύτταρα (/μl)	1213±155 (27-2173)	1436±769 (38-2835)	1050±534 (6-4060)	1614±436 (800-4224)	1493±1129 (934-5315)
Μονοκύτταρα (/μl)	465±129 (43-1219)	485±162 (190-1890)	291±132 (3-1711)	392±196 (127-561)	6426±4818 (517-20831)
Βλάστες (/μl)	12±6 (0-80)	8±7 (0-23)	153±78 (25-512)	609±289 (196-990)	515±282 (0-1260)
Plt (x10 ³ /μl)	106±19 (6-327)	235±36 (166-338)	85±14 (23-152)	48±28 (7-119)	132±32 (58-194)
Αυτοάνοσα φαινόμενα*	8	1	2	0	2
HCV (+)	1	0	0	0	0
Χρωμοσωμικές ανωμαλίες	0	0	2	2	0
Λοιμώξεις ανά έτος	0,6	0,5	4	3	1
Μεταγγίσεις ανά μήνα	1	1	2	3	1
Υπογαμμασφαιριναιμία	0	0	0	0	0
Σπληνεκτομή	0	0	0	0	0

* Ως αυτοάνοσα φαινόμενα χαρακτηρίστηκαν η αυτοάνοση αιμολυτική αναιμία, η αυτοάνοση θρομβοπενία ή η παρουσία διαφόρων αυτό-αντισωμάτων (αντιθυρεοειδικά, αντιπυρηνικά, αντιμιτοχονδριακά, αντι-DNA, αντισώματα έναντι λείων μυϊκών ινών, αντιλευκοκυτταρικά κλπ.).

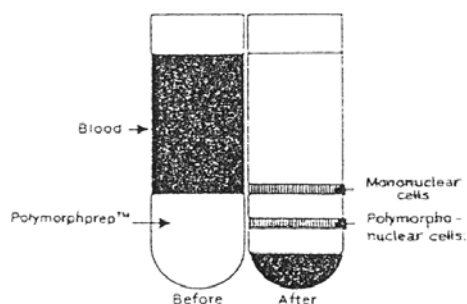
ΜΕΘΟΔΟΙ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

1) ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΛΕΜΦΟΜΟΝΟΠΥΡΗΝΩΝ ΚΑΙ ΠΟΛΥΜΟΡΦΟΠΥΡΗΝΩΝ ΠΕΡΙΦΕΡΙΚΟΥ ΑΙΜΑΤΟΣ ΚΑΙ ΜΥΕΛΟΥ

Η απομόνωση των κυττάρων αυτών έγινε με τη χρήση διαλύματος Sodium Metrizoate 13.8% και Dextran 500 8.0% (Polymorphprep, Nycomed)⁶¹. Η διαδικασία αυτή έχει ως εξής: Χρησιμοποιείται ολικό αίμα τοποθετημένο σε αντιπηκτικό (π.χ. EDTA) διατηρημένο στους 18-22⁰C και εντός 2 ωρών από τη λήψη του από τον ασθενή ή το μάρτυρα. Αραιώνεται το αίμα με ίσο όγκο PBS και επιστοιβάζεται πάνω σε ίσο όγκο Polymorphprep σε σωληνάριο των 50 ml, χωρίς να γίνει ανάμειξη αίματος-υγρού. Στη συνέχεια φυγοκεντρούνται τα σωληνάκια στα 450xg και για 35 min στους 18-22⁰C. Μετά τη φυγοκέντρηση 2 στιβάδες κυττάρων είναι ορατές: Η κορυφαία στιβάδα (κοντά στη μεσότητα του δείγματός μας) των λεμφομονοπύρηνων και η κατώτερη στιβάδα των πολυμορφοπύρηνων. Τα ερυθρά δημιουργούν ένα ίζημα στον πυθμένα του σωληναρίου. Τα λεμφομονοκύτταρα και τα πολυμορφοπύρηνια συλλέγονται με τη βοήθεια πιπέτας Παστέρ (εικόνα 1). Το κλάσμα των πολυμορφοπύρηνων αραιώνεται με την προσθήκη ενός όγκου διαλύματος PBS+2%FCS για να αποκατασταθεί η φυσιολογική ωσμωτικότητα.

2) ΣΗΜΑΝΣΗ ΤΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΜΕ ΜΟΝΟΚΛΩΝΙΚΑ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΑ ΚΑΙ ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΙΑ ΡΟΗΣ

Η κυτταρομετρία ροής επιτρέπει την ταυτόχρονη ανάλυση πολλαπλών φυσικών και ανοσολογικών χαρακτηριστικών των μεμονωμένων κυττάρων⁶². Το σύστημα μεταφοράς αποτελείται από ένα σύστημα πεπιεσμένου υγρού που οδηγεί το δείγμα που περιέχει τα κύτταρα μέσα στον κυτταρομετρητή. Εκεί, τα κύτταρα καθοδηγούνται μέσω ενός γραμμικού υγρού ρεύματος και εστιάζονται στο κέντρο από υδροστατικές δυνάμεις, οι οποίες παράγονται από ένα περιβάλλον δεύτερο υγρό που ονομάζεται "sheath" (περίβλημα). Αυτό απλά βεβαιώνει ότι κάθε σωματίδιο



Before and after centrifugation

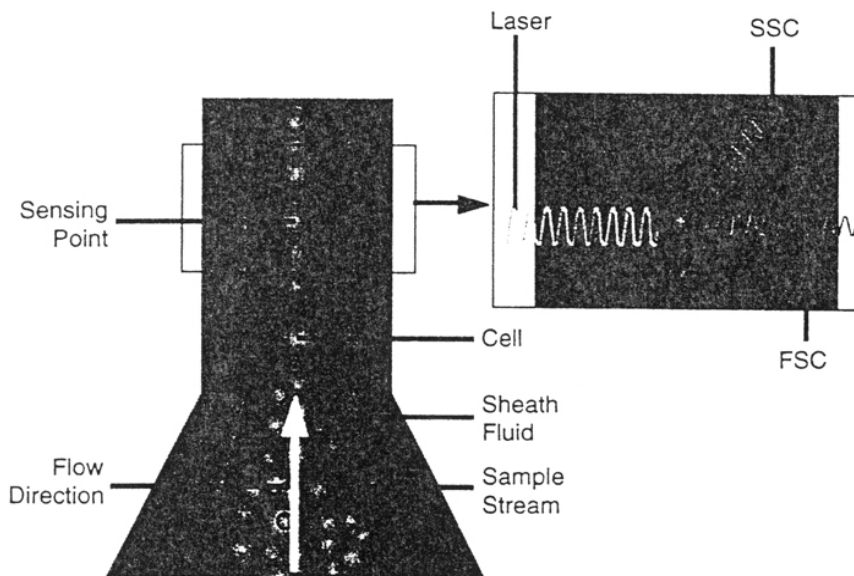
ΕΙΚΟΝΑ 1: Συσκευή διαχωρισμού Polymorphprep των λεμφομονοπύρηνων και των πολυμορφοπύρηνων του περιφερικού αίματος και του μυελού.

(κύτταρο) περνά από μια φωτεινή πηγή (η οποία είναι μια πηγή LASER) στο σημείο της ανάλυσης.

Η ακτίνα laser που προσπίπτει πάνω στο διερχόμενο κύτταρο εν μέρει απορροφάται, και εν μέρει ανακλάται και επανεκπέμπεται από τα κύτταρα. Τα σήματα του φωτός που σκεδάζεται εστιάζονται πάνω σε ανιχνευτές, φωτοπολλαπλασιαστές και φωτοδιόδους, για τη μέτρηση της έντασής τους, η οποία και μετασχηματίζεται σε ηλεκτρονικό σήμα. Όλα τα αναλογικά ηλεκτρονικά σήματα ενισχύονται, μετασχηματίζονται σε ψηφιακή πληροφορία και έπειτα αναλύονται από ηλεκτρονικό υπολογιστή που χρησιμοποιεί προγράμματα software. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται με τη μορφή νεφελογράμματος.

Η ένταση του σκεδασμένου φωτός που μετρείται κατά μήκος του άξονα του x του νεφελογράμματος (διάθλαση) αναφέρεται ως forward scatter (FSC), ενώ η ένταση του φωτός που σκεδάζεται σε γωνία 90° σε σχέση με την πηγή laser και μετρείται στο άξονα του y του νεφελογράμματος (διάθλαση και ανάκλαση) καλείται side scatter (SSC). Το σήμα FSC επιτρέπει στον κυτταρομετρητή να αναγνωρίσει πότε ένα κύτταρο είναι ακριβώς μπροστά στην πηγή laser, ενώ επιπλέον η ένταση του σήματος αυτού σχετίζεται με το σχετικό μέγεθος του κυττάρου. Η ένταση του SSC αντίθετα είναι περισσότερο υπεύθυνη για την κυτταρική πυκνότητα και πολυπλοκότητα (εικόνα 2).

ΕΙΚΟΝΑ 2: Διάγραμμα που απεικονίζει την αρχή της λειτουργίας του κυτταρομετρητή ροής.



Παράλληλα με την ανάδειξη των παραμέτρων που αφορούν το ανέπαφο κύτταρο, η κυτταρομετρία ροής δίνει και περαιτέρω πληροφορίες, που αφορούν πρωτεΐνες-αντιγόνα του κυττάρου, ενδοκυττάρια ή επιφανειακά. Για το σκοπό αυτό, τα κύτταρα σημαίνονται με φθορίζουσα ουσία ή με μονοκλωνικά αντισώματα συνδεδεμένα με φθορίζουσα ουσία. Κατά την επαφή των κυττάρων αυτών με το laser, το φθορίζοντα σώματα απορροφούν ενέργεια από τη φωτεινή πηγή. Η ενέργεια αυτή αργότερα απελευθερώνεται μέσω εκπεμπόμενων φωτονίων μεγαλύτερου μήκους κύματος (φθορισμός). Ο συνδυασμός απορρόφησης και εκπομπής ακτινοβολίας διαφόρων μηκών κύματος από τα φθορίζοντα σώματα επιτρέπει ταυτόχρονη πολυχρωματική ανάλυση ξεχωριστών κυτταρικών επιτόπων, κάτι που αποτελεί και το μείζον πλεονέκτημα αυτής της πολυπαραμετρικής τεχνικής.

Στη δική μας μελέτη, τα αντιγόνα της κυτταρικής επιφάνειας αναδεικνύονταν με τη βοήθεια του άμεσου ανοσοφθορισμού και της κυτταρομετρίας ροής, ως εξής: Τα λευκοκύτταρα σημαίνονταν με τα παρακάτω μονοκλωνικά αντισώματα: α) Για τα μονοκύτταρα τα anti-CD11b, anti-CD18, anti-CD35, anti-CD38, anti-CD69 (Immunotech, Marseilles, France), anti-CD43 (Serotec, Oxford, GB), και anti-CD44 (Caltag, Burlingame, CA), ενώ β) για τα ουδετερόφιλα τα anti-CD11b, anti-CD35, anti-CD69, anti-CD53, anti-CD67 (Immunotech, Marseilles, France), anti-CD43 (Serotec, Oxford, GB), και anti-CD44 (Caltag, Burlingame, CA). Όλα τα παραπάνω μονοκλωνικά αντισώματα ήταν συνδεδεμένα με φλουορεσκεΐνη (Fluorescence Isothiocyanate, FITC). Για να αποφευχθεί η *in vitro* διέγερση των κυττάρων χρησιμοποιήθηκε ολικό αίμα, η σήμανση των κυττάρων με μονοκλωνικό αντίσωμα γινόταν μέσα σε 1h από τη λήψη του αίματος, οι χειρισμοί περιορίστηκαν στο ελάχιστο και η επώαση γινόταν στους 4⁰C. Χρησιμοποιήθηκαν 20μl από τα μονοκλωνικά αντισώματα anti-CD11b, anti-CD18, anti-CD35, anti-CD38, anti-CD69, anti-CD53, anti-CD67 και anti-CD43, και 5μl από το μονοκλωνικό anti-CD44, σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Οι παραπάνω ποσότητες μονοκλωνικού αντισώματος προστίθεντο σε 100μl ολικού αίματος και το μείγμα επωαζόταν στον πάγο (4⁰C) για 60 min. Στη συνέχεια το μείγμα πλενόταν με 3 ml παγωμένο PBS (phosphate buffered saline)+2% FCS (fetal calf serum, ορός εμβρύου βοός). Ακολούθως το μείγμα περνούσε από το σύστημα Q-PREP (της Coulter Electronics), που προκαλούσε ρήξη στα ερυθρά, αναδεύοντας και μονιμοποιώντας ταυτόχρονα τα υπόλοιπα κύτταρα. Στη συνέχεια το μείγμα τοποθετείτο στον κυτταρομετρητή ροής, όπου τα μονοκύτταρα εντοπιζόνταν στο νεφελόγραμμα μετά σήμανσή τους με το μονοκλωνικό αντίσωμα anti-CD14 και επιτυγχάνετο 90% καθαρότητα. Τα ουδετερόφιλα προσδιορίζονταν στο νεφελόγραμμα με σήμανσή τους με το μονοκλωνικό anti-CD15 (Cytotech-Coulter) ή το anti-CD16 (Immunotech). Η μέση ένταση φθορισμού (fMCV, fluorescence mean channel value) -ως δείκτης της έντασης της αντιγονικής έκφρασης- εκφραζόταν σε λογαριθμική κλίμακα στον κυτταρομετρητή ροής (Coulter Epics Elite). Ο μη ειδικός ανοσοφθορισμός καθοριζόταν με τη χρήση των μονοκλωνικών αντισωμάτων ελέγχου, και προσδιοριζόταν η fMCV ελέγχου (control). Η σχετική ένταση φθορισμού (Related Fluorescence Intensity, RFI) υπολογιζόταν με αφαίρεση της fMCV ελέγχου από την ολική fMCV.

Για την καθημερινή ρύθμιση και λειτουργία του κυτταρομετρητή ροής και τη σύγκριση των αναλύσεων μέρα προς μέρα, χρησιμοποιήθηκαν 3 αντιδραστήρια (microbeads) μεγέθους κυττάρου και σημασμένα με φλουορεσκεΐνη, τα οποία είχαν προκαθορισμένη ένταση φθορισμού. Επίσης χρησιμοποιήθηκαν αντιδραστήρια (microbeads) με προκαθορισμένες αντιγονικές θέσεις σύνδεσης στην επιφάνειά τους για τη δημιουργία καμπύλης αναφοράς που θα βοηθούσε στον υπολογισμό του αριθμού των αντιγόνων που συνδέονται με μονοκλωνικό αντίσωμα στην κυτταρική επιφάνεια (Combo-kit).

Τα μονοκύτταρα και τα ουδετερόφιλα περνώντας από τον κυτταρομετρητή ροής και ανάλογα με τη σύνθεση και τον όγκο τους προσδιορίζονταν στο νεφελόγραμμα μεταξύ των 0⁰ και των 90⁰ (αντιστοίχως μεταξύ του οριζόντιου άξονα διασποράς x που μετράει τον όγκο -forward scatter και του κάθετου άξονα διασποράς y που μετράει την πυκνότητα -side scatter). Παρόλο ότι στους ασθενείς με MDS ορισμένα μονοκύτταρα δεν εκφράζουν το CD14 (ομοίως ορισμένα ουδετερόφιλα δεν εκφράζουν το CD15), μειώνοντας τον αριθμό των θετικών κυττάρων των πληθυσμών του νεφελογράμματος του κυτταρομετρητή, στη μελέτη λήφθηκαν οι RFI από τα αρχικά ιστογράμματα και αγνοήθηκε η μη αναγνώριση του μικρού ποσοστού των

αρνητικών κυττάρων του κάθε πληθυσμού που προαναφέρθηκε. Σε κάθε περίπτωση αναλύθηκαν 10^5 θετικά σήματα στον κυτταρομετρητή (αντίστοιχα 10^5 μονοκύτταρα και 10^5 ουδετερόφιλα). Για να μελετηθεί η πιθανή εσωτερίκευση του CD43 της επιφάνειας του κυττάρου, εκτελέστηκε η παραπάνω διαδικασία πριν και μετά την αύξηση της διαπερατότητας της κυτταρικής μεμβράνης με τη χρήση SDS (Sodium Dodecyl Sulfate) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή (Coulter), ώστε να επιτευχθεί διείσδυση του σημασμένου μονοκλωνικού αντισώματος και στο εσωτερικό του κυττάρου και να ελεγχθεί η περίπτωση εσωτερίκευσης του μορίου.

3) ΑΝΟΣΟΪΣΤΟΧΗΜΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΟΥ ΜΥΕΛΟΥ ΤΩΝ ΟΣΤΩΝ

Για την ανοσοϊστοχημική ανάλυση⁶³ του μυελού χρησιμοποιήσαμε αντικειμενοφόρους πλάκες τύπου APTEC. Αμέσως μετά τη λήψη του μυελού, τα παρασκευάσματα αφέθηκαν να στεγνώσουν και φυλάχθηκαν στους -80°C . Μετά την απόψυξή τους, τα παρασκευάσματα μονιμοποιήθηκαν σε ακετόνη για 10 min και ενυδατώθηκαν εκ νέου σε διάλυμα TBS (Tris Buffer Saline). Τα δείγματα αρχικά επώαστηκαν με ανθρώπινο φυσιολογικό ορό για να αποφευχθεί η μη-ειδική σύνδεση του μονοκλωνικού αντισώματος. Στη συνέχεια επώαστηκαν για 30 min σε θερμοκρασία δωματίου με anti-CD43 mouse anti-human μονοκλωνικό αντίσωμα στην επιθυμητή αραίωση και σύμφωνα με τις οδηγίες της παρασκευάστριας εταιρίας (Caltag). Αφού ακολούθησε έκπλυση με TBS για 10 min, τα δείγματα επώαστηκαν για 15 min με rabbit anti-mouse ανοσοσφαιρίνη συνδεδεμένη με APAAP (αλκαλική φωσφατάση- αντι-αλκαλική φωσφατάση) (Dakko-pats, Denmark) σε αραίωση 1:50. Τέλος, οι αντικειμενοφόροι πλάκες επώαστηκαν με το υπόστρωμα της αλκαλικής φωσφατάσης για 20 min για την παραγωγή έγχρωμου προϊόντος. Ακολούθησαν πλύσεις με TBS τρεις φορές και οι πλάκες βάφτηκαν με Giemsa, εκπλύθηκαν σε διάλυμα TBS με 30% γλυκερόλη και εξετάστηκαν από δύο ερευνητές σε φωτεινό μικροσκόπιο ορατού φωτός. Τα CD43+ κύτταρα εκτιμήθηκαν ως το ποσοστό των θετικών κυττάρων ανά χίλια μετρηθέντα κύτταρα καθώς η πλάκα σαρωνόταν από τη μια άκρη ως την άλλη. Σε κάθε περίπτωση χρησιμοποιήθηκε mouse anti-mouse μονοκλωνικό αντίσωμα ως αντίσωμα ελέγχου και τα θετικά κύτταρα με το αντίσωμα ελέγχου αφαιρέθηκαν από τον τελικό αριθμό των θετικών κυττάρων.

4) ΜΑΓΝΗΤΙΚΟΣ ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΣ CD34+ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

Ο μαγνητικός διαχωρισμός⁶⁴ των CD34+ κυττάρων έγινε με τη βοήθεια του συστήματος μαγνητικού διαχωρισμού κυττάρων της εταιρίας Miltenyi Biotec και χρησιμοποιήθηκε το Anti-FITC Multisort Kit (Macs).

Το kit αυτό περιέχει 2 ml anti-FITC αντισώματος συνδεδεμένου με μαγνητικά μικροσφαιρίδια (microbeads), 1 ml αντιδραστηρίου απελευθέρωσης και 2 ml αντιδραστηρίου τερματισμού της αντίδρασης. Το αντιδραστήριο απελευθέρωσης είναι ένα ένζυμο που διασπά τα μικροσφαιρίδια από το anti-FITC αντίσωμα και το αντιδραστήριο τερματισμού της αντίδρασης τερματίζει την ως άνω διάσπαση για να επιτρέψει περαιτέρω χειρισμούς.

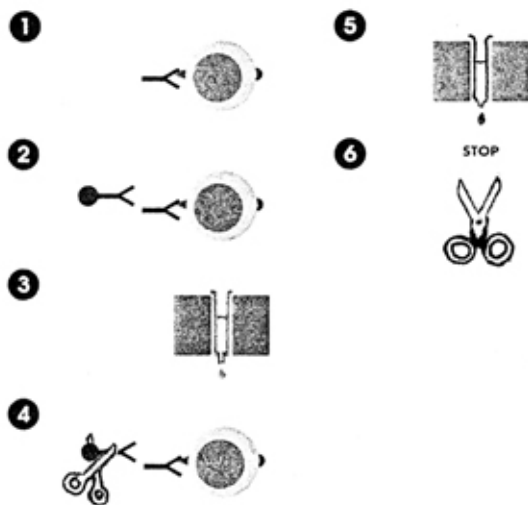
Η μέθοδος του μαγνητικού διαχωρισμού των κυττάρων, που είναι από πριν συνδεδεμένα με μονοκλωνικό αντίσωμα+φλουορεσκεΐνη (FITC), επιτυγχάνεται με τη σύνδεσή τους με αντίσωμα έναντι της FITC συνδεδεμένο με τα μαγνητικά μικροσφαιρίδια (microbeads). Το σύμπλεγμα "κύτταρο+μονοκλωνικό αντίσωμα-FITC+anti-FITC-microbead" περνά μέσα από ένα μαγνητικό διαχωριστή κυττάρων

τύπου MiniMACS, ο οποίος περιέχει μια στήλη θετικής κυτταρικής επιλογής τύπου MS+. Τα κύτταρα που φέρουν συνδεδεμένο το μικροσφαιρίδιο κατακρατώνται στη στήλη και σε δεύτερη φάση απελευθερώνονται από τη στήλη με την προσθήκη ειδικού διαλύματος. Στη συνέχεια με ειδική επεξεργασία με το αντιδραστήριο απελευθέρωσης αποκόπτεται το μικροσφαιρίδιο (παραμένει όμως το αντίσωμα anti-FITC) και η διαδικασία αποκοπής σταματά με τη χρήση του αντιδραστηρίου τερματισμού.

Στη δική μας μελέτη, έγινε μαγνητικός διαχωρισμός των CD34+ κυττάρων από τα κύτταρα του μυελού, ως εξής:

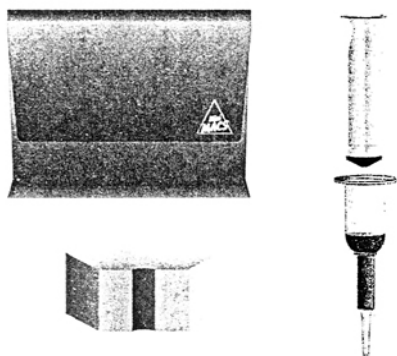
- (a) Απομονώθηκε αρχικά το κυτταρικό εναιώρημα με την ειδική μέθοδο προετοιμασίας που προαναφέρθηκε (Polymorphprep) και στη συνέχεια για να απομακρυνθούν τα κυτταρικά αθροίσματα το εναιώρημα διήλθε μέσα από πλέγμα nylon 30μm. Τα νεκρά κύτταρα απομακρύνθηκαν με ειδική φυγοκέντρηση διαβάθμισης πυκνότητας (Ficoll-Paque).
- (b) Τα κύτταρα σημάθηκαν -με επώαση 5 min- με μονοκλωνικό αντίσωμα anti-CD34 συνδεδεμένο με φλουορεσκεΐνη.
- (c) Τα κύτταρα πλύθηκαν προσεκτικά, το υπερκείμενο απομακρύνθηκε πλήρως και το ίζημα τοποθετήθηκε σε 90μl ρυθμιστικού διαλύματος που περιέχει φυσιολογικό ορό με διάλυμα φωσφορικών (PBS), εμπλουτισμένο με 0,5% βόεια αλβουμίνη και 2mM EDTA (pH_{υγρού}=7,2).
- (d) Στη συνέχεια τα κύτταρα αυτά επώασθηκαν για 15 min στους 6⁰-12⁰C με 10μl μονοκλωνικό αντίσωμα anti-FITC συνδεδεμένου με μαγνητικά microbeads και έπειτα πλύθηκαν εκ νέου.
- (e) Τα κύτταρα μετά τοποθετήθηκαν σε 500-1000μL του ως άνω ρυθμιστικού διαλύματος.
- (f) Αρχικά η στήλη θετικής επιλογής MS+ του μαγνητικού διαχωριστή MiniMACS (η οποία κατακρατά μέχρι 10⁷ θετικά κύτταρα) ξεπλύθηκε με 500μL του ρυθμιστικού διαλύματος και στη συνέχεια τοποθετήθηκε μέσα το έτοιμο κυτταρικό εναιώρημα. Τέθηκε σε λειτουργία ο μαγνητικός διαχωρισμός και η στήλη κατακράτησε τα κύτταρα που ήταν συνδεδεμένα με microbeads, δηλαδή τα CD34+ κύτταρα, και άφησε να περάσουν ελεύθερα τα υπόλοιπα κύτταρα. Έπειτα η στήλη ξεπλύθηκε 3 φορές με 500μL ρυθμιστικού διαλύματος κάθε φορά.
- (g) Στη συνέχεια η στήλη απομακρύνθηκε από το μαγνητικό διαχωριστή και τοποθετήθηκε σε ειδικό συλλεκτικό σωληνάριο. Τα κύτταρα από τη στήλη συλλέχθηκαν μετά από προσθήκη του ως άνω ρυθμιστικού διαλύματος. Ένα δείγμα από τα κύτταρα λήφθηκε για να ελεγχθεί η καθαρότητα του κυτταρικού διαχωρισμού στον κυτταρομετρητή ροής.
- (h) Επόμενο βήμα ήταν η επώαση των σημασμένων και διαχωρισμένων CD34+ κυττάρων με 20μL αντιδραστήριο απελευθέρωσης MACS Multisort ανά ml κυτταρικού εναιωρήματος, για 10 min στους 6⁰-12⁰C, για να αποκοπούν τα microbeads.
- (i) Τα κύτταρα έπειτα ξεπλύθηκαν, απομακρύνθηκε το υπερκείμενο πλήρως και το ίζημα επανατοποθετήθηκε στο ρυθμιστικό διάλυμα σε τελικό όγκο 50μL για κάθε 10⁷ κύτταρα.
- (j) Για κάθε 10⁷ κύτταρα (50μL) προστέθηκαν 30μL από το αντιδραστήριο τερματισμού MACS Multisort και το νέο διάλυμα αναδεύτηκε καλά, για να σταματήσει η διαδικασία της αποκοπής των microbeads από τα anti-FITC.

Στην **εικόνα 3** φαίνεται βήμα προς βήμα η ως άνω διαδικασία και στην **εικόνα 4** φαίνεται η συσκευή MiniMACS. Στην **εικόνα 5** φαίνονται τα αμιγή (πλέον) CD34+ κύτταρα στο νεφελόμετρο του κυτταρομετρητή ροής.

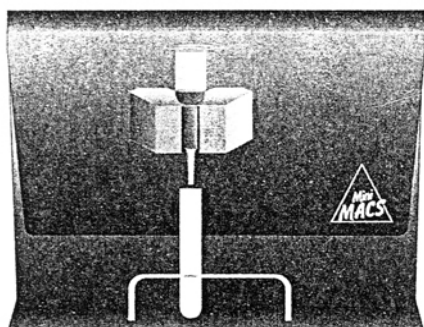


ΕΙΚΟΝΑ 3: Βήμα προς βήμα ο μαγνητικός διαχωρισμός των CD34+ κυττάρων με anti-FITC Multisort kit.

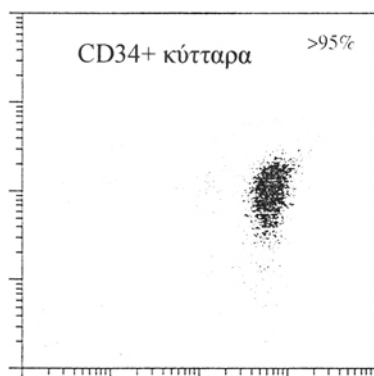
Set-up



Assembly



ΕΙΚΟΝΑ 4: Η συσκευή μαγνητικού διαχωρισμού κυττάρων MiniMACS.



ΕΙΚΟΝΑ 5: Απομονωμένα CD34+ κύτταρα με μαγνητικό διαχωρισμό.

5) ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ DNA ΚΑΙ RNA (EXTRACTION)

→ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ DNA

Η μέθοδος αυτή⁶⁵ έχει ως εξής:

A. Προετοιμάζονται τα κύτταρα με τον παρακάτω τρόπο:

Τα κύτταρα του περιφερικού αίματος ή του μυελού των οστών που απομονώθηκαν με Polymoiphreper πλένονται τρεις φορές σε παγωμένο ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (PBS) και επαναδιαλύονται σε μια συγκέντρωση που προσεγγίζει τα 5×10^7 κύτταρα ανά ml παγωμένου διαλύματος DNA extraction.

Διάλυμα DNA extraction
 0,1M EDTA (pH 8,0)
 0,01M Tris-HCl (pH 7,6)
 0,01M NaCl
 0.5% Nonidet P-40 (NP-40)

B. Προστίθεται όγκος διαλύματος πρωτεΐνάσης ισοδύναμος με αυτόν του διαλύματος "DNA extraction". Αναδεύεται το μείγμα ήπια και μεταφέρεται σε ένα σωλήνα προπυλενίου.

Διάλυμα πρωτεΐνάσης
 0.2 M Tris.Cl (pH 8,0)
 25mM EDTA (pH 8,0)
 0.3 M NaCl
 2% SDS

Προστίθεται πρωτεΐνάση K σε τελική συγκέντρωση 200μg/ml. Ανακατεύεται καλά το διάλυμα και επωάζεται για 60 min στους 37⁰C.

Γ. Απομακρύνονται οι πρωτεΐνες με επεξεργασία με ισοδύναμο όγκο phenol:chloroform (24:1).

Δ. Διαχωρίζονται οι υδαρείς και οι οργανικές ουσίες με φυγοκέντρηση στις 5000 στροφές για 10 min σε θερμοκρασία δωματίου. Μεταφέρονται οι υδατοδιαλυτές ουσίες (υδατική φάση) σε νέο σωλήνα και προστίθενται 2,5 όγκοι παγωμένης

αιθανόλης. Αναμειγνύεται καλά το διάλυμα και ψύχεται για 1 ώρα στους 0°C. Τα νουκλεϊνικά οξέα μετουσιώνονται και καθιζάνουν.

Ε. Αφαιρείται το DNA με φυγοκέντρηση στις 5000 στροφές για 10 min στους 0°C. Πετιέται το υπερκείμενο και το ίζημα πλένεται καλά με 70% αιθανόλη. Με τη βοήθεια πιπέττας αφαιρείται όσο περισσότερη αιθανόλη είναι εφικτό και μετά αφήνεται το ίζημα να ξεραθεί σε θερμοκρασία δωματίου για λίγα λεπτά.

ΣΤ. Επαναδιαλύεται το ίζημα σε μικρό όγκο (200μl για κάθε 10⁷ κύτταρα) 50mM Tris.Cl (pH 7,8), 1mM EDTA (pH 8,0).

→ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ RNA

Η μέθοδος αυτή⁶⁵ έχει ως εξής:

Αρχικά απομονώνεται το ολικό RNA με τον πιο κάτω τρόπο:

Α. Λύση των κυττάρων: Τα κύτταρα του περιφερικού αίματος ή του μυελού που απομονώθηκαν με το Polymorphprep πλένονται 3 φορές με διάλυση σε 10 όγκους παγωμένου PBS που στερείται ιόντων Mg⁺⁺ και Ca⁺⁺. Με τη βοήθεια πιπέττας τα κύτταρα διασκορπίζονται ήπια αλλά πλήρως κάθε φορά. Τα κύτταρα στη συνέχεια επαναδιαλύονται σε 10-20 όγκους διαλύματος "RNA extraction".

Προστίθεται όγκος διαλύματος πρωτεΐνωσης ισοδύναμος με αυτόν του διαλύματος "RNA extraction". Ανακατεύεται το μείγμα στο Vortex, χύνεται το κυτταρόλυμα σε μια σύριγγα στην οποία έχει εφαρμοστεί βελόνη Νο 21 και μετά ρίχνεται το περιεχόμενο σε ένα σωλήνα προπυλενίου.

Επαναλαμβάνεται η διαδικασία 3-4 φορές ώστε να κοπεί το κυτταρικό DNA.

Προστίθεται πρωτεΐνάση K σε τελική συγκέντρωση 200μg/ml. Ανακατεύεται καλά το διάλυμα και επωάζεται για 60 min στους 37°C.

Διάλυμα "RNA extraction"

0.14 M NaCl

1.5 mM MgCl₂

10 mM Tris.Cl (pH 8,6)

0.5% Nonidet P-40 (NP-40)

1 mM dithiotreitol

1000 U/ml αναστολέας RNAάσης πλακούντα ή

20mM συμπλέγματα vanadyl-ribonucleoside

Β. Απομακρύνονται οι πρωτεΐνες με επεξεργασία με ισοδύναμο όγκο phenol:chloroform (24:1).

Γ. Διαχωρίζονται οι υδαρείς και οι οργανικές ουσίες με φυγοκέντρηση στις 5000 στροφές για 10 min σε θερμοκρασία δωματίου. Μεταφέρονται οι υδατοδιαλυτές ουσίες (υδατική φάση) σε νέο σωλήνα και προστίθενται 2,5 όγκοι παγωμένης αιθανόλης. Αναμειγνύεται καλά το διάλυμα και ψύχεται για 1 ώρα στους 0°C. Τα νουκλεϊνικά οξέα μετουσιώνονται και καθιζάνουν.

Δ. Αφαιρείται το RNA με φυγοκέντρηση στις 5000 στροφές για 10 min στους 0°C. Πετιέται το υπερκείμενο και το ίζημα πλένεται καλά με 70% αιθανόλη που περιέχει 0.1 M sodium acetate (pH 5,2). Με τη βοήθεια πιπέττας αφαιρείται όσο περισσότερη αιθανόλη είναι εφικτό και μετά αφήνεται το ίζημα να ξεραθεί σε θερμοκρασία δωματίου για λίγα λεπτά.

Ε. Επαναδιαλύεται το ίζημα σε μικρό όγκο (200μl για κάθε 10⁷ κύτταρα) 50mM Tris-HCl (pH 7,8), 1mM EDTA (pH 8,0).

ΣΤ. Προστίθεται MgCl₂ και dithiotreitol σε τελικές συγκεντρώσεις των 10mM και 0.1mM αντιστοίχως και μετά προστίθεται αναστολέας RNAάσης πλακούντα ή

συμπλέγματα vanadyl-ribonucleoside σε τελικές συγκεντρώσεις των 1000U/ml ή 10mM αντιστοίχως.

Z. Προστίθεται "RNA-ase-free DNA-ase" παγκρέατος σε τελική συγκέντρωση 2μg/ml. Επωάζεται το μείγμα στους 37⁰C για 1 ώρα.

H. Προστίθεται EDTA και SDS σε τελικές συγκεντρώσεις των 10mM και 0.2% αντιστοίχως.

Θ. Το διάλυμα αποσπάται με επεξεργασία με ισοδύναμο όγκο phenol:chloroform (24:1).

I. Διαχωρίζονται οι υδαρείς και οι οργανικές ουσίες με φυγοκέντρηση στις 5000 στροφές για 10 min σε θερμοκρασία δωματίου και οι υδαρείς ουσίες μεταφέρονται σε καινούριο σωλήνα. Προστίθενται 3M sodium acetate (pH 5,2) σε τελική συγκέντρωση 0.3M. Προστίθενται 2,5 όγκοι παγωμένης αιθανόλης, αναδεύεται καλά το διάλυμα και ψύχεται στον πάγο για 2 ώρες.

IA. Το RNA συλλέγεται με φυγοκέντρηση στις 12000 στροφές για 5 min στους 4⁰C.

IB. Απομακρύνεται όλη η αιθανόλη. Αφήνεται ο ανοιχτός σωλήνας σε πάγο για λίγα λεπτά ώστε να εξατμιστεί η υπόλοιπη αιθανόλη.

II. Επαναδιαλύεται το ίζημα σε 200μl TE (pH 7,6). Προστίθενται 500μl αιθανόλης και φυλάσσεται το παρασκεύασμα στους -70⁰C μέχρι να χρησιμοποιηθεί.

Στη συνέχεια επιλέγεται το poly(A)⁺RNA (mRNA) ως εξής:

A. Διαλύουμε 0.5-1.0 g ολιγο(dT)-κυτταρίνης σε 0.1N NaOH.

B. Ρίχνουμε την ολιγο(dT)-κυτταρίνη σε αποστειρωμένη στήλη. Πλένουμε τη στήλη με 3 ίσους όγκους αποστειρωμένο νερό (DEPC-treated).

Γ. Πλένουμε τη στήλη με αποστειρωμένο διάλυμα "1 x column-loading buffer" μέχρι το pH του τελικού διαλύματος να είναι κάτω από 8,0.

<p style="text-align: center;"><u>1 x column-loading buffer</u> 20mM Tris.Cl 0.5mM NaCl 1mM EDTA (ph 8,0) 0.1% sodium lauryl sarcosinate</p>
--

Δ. Διαλύουμε το RNA σε αποστειρωμένο νερό (DEPC-treated) και θερμαίνουμε το διάλυμα στους 65⁰C για 5 min. Ψύχουμε το διάλυμα σε θερμοκρασία δωματίου γρήγορα και μετά προσθέτουμε ισοδύναμη ποσότητα "2 x column-loading buffer". Προσθέτουμε το διάλυμα στη στήλη και αρχίζουμε αμέσως να συλλέγουμε το έκπλυμα σε αποστειρωμένο σωλήνα. Όταν όλο το διάλυμα του RNA έχει περάσει στη στήλη, προσθέτουμε όγκο ίσο με μία στήλη διαλύματος "1 x column-loading buffer" και συνεχίζουμε να συλλέγουμε το έκπλυμα.

Ε. Όταν όλο το διάλυμα έχει εκπλυθεί, θερμαίνουμε το έκπλυμα στους 65⁰C για 5 min και επανατοποθετούμε το έκπλυμα στην κορυφή της στήλης, συλλέγοντας και πάλι το υλικό που περνάει μέσα από αυτή.

ΣΤ. Πλένουμε τη στήλη με όγκο 5-10 στηλών διαλύματος "1 x column-loading buffer", συλλέγοντας κλάσματα 1-ml. Διαβάζουμε την απορρόφηση στα 260nm κάθε κλάσματος που συλλέχθηκε από τη στήλη. Αρχικά η OD₂₆₀ (απορρόφηση) θα είναι πολύ υψηλή, αφού περνάει από τη στήλη το μη-πολυαδενυλικό RNA. Τα τελευταία κλάσματα θα πρέπει να έχουν πολύ μικρή ή καθόλου απορρόφηση στα 260nm. Το διάλυμα που έχει OD₂₆₀=1 περιέχει περίπου 40μg/ml RNA.

Z. Αφαιρείται το poly(A)⁺RNA από την ολιγο(dT)-κυτταρίνη με έκλυση με 2-3 όγκους αποστειρωμένου RNAase-free "elution buffer".

Elution buffer
 10mM Tris.Cl
 1mM EDTA (pH 8,0)
 0.05% SDS

Συλλέγουμε τα κλάσματα σε μέγεθος 1/3 έως 1/2 του όγκου της στήλης.

H. Μετράμε την απορρόφηση του διαλύματος στα 260nm και συλλέγουμε τα κλάσματα που περιέχουν RNA που έχει εκλουσθεί από τη στήλη.

Θ. Στο poly(A)⁺RNA που έχει εκλουσθεί από τη στήλη ολιγο(dT)-κυτταρίνης προσθέτουμε 3M sodium acetate (pH5,2) σε τελική συγκέντρωση 0.3M.

Ανακατεύουμε καλά και προσθέτουμε 2.5 όγκους παγωμένης αιθανόλης.

Ανακατεύουμε και φυλάσσουμε το διάλυμα για τουλάχιστο 30 min στον πάγο.

I. Αφαιρούμε το poly(A)⁺RNA με φυγοκέντρηση στις 10000 στροφές για 15 min στους 4⁰C. Προσεκτικά πετάμε το υπερκείμενο και πλένουμε το ίζημα (το οποίο συχνά είναι αόρατο) με αιθανόλη 70%. Επαναφυγοκεντρούμε και αφήνουμε το ίζημα του νουκλεϊκού οξέος να ξεραθεί στον αέρα.

IA. Επαναδιαλύουμε το ίζημα σε λίγο νερό. Μετράμε την απορρόφηση του διαλύματος στα 260nm.

IB. Μεταφέρουμε το διάλυμα του poly(A)⁺RNA σε σωλήνα πολυπροπυλενίου, προσθέτουμε 3 όγκους αιθανόλης, ανακατεύουμε καλά και αποθηκεύουμε στους -70⁰C μέχρι να χρησιμοποιηθεί. Η ποσότητα poly(A)⁺RNA που απέφεραν 10⁷ κύτταρα των ασθενών μας ήταν 1-5μg. Συνήθως 1-2% του ολικού RNA που ρίχνουμε στη στήλη είναι poly(A)⁺RNA.

6) ΑΝΑΛΥΣΗ NORTHERN BLOT (RNA) ΚΑΙ ΥΒΡΙΔΙΣΜΟΣ ΜΕ CD43-cDNA-probe

Με τη μέθοδο του υβριδισμού Northern Blot⁶⁵ προσδιορίζεται το μέγεθος και η ποσότητα ορισμένων μορίων mRNA σε παρασκευάσματα ολικού ή poly(a)⁺ RNA. Το RNA διαχωρίζεται ανάλογα με το μέγεθος με ηλεκτροφόρηση διά μέσου ενός gel αγαρόζης και στη συνέχεια μεταφέρεται σε μεμβράνες από νάυλον. Το RNA που μας ενδιαφέρει εντοπίζεται έπειτα με υβριδισμό με ραδιοσημασμένο DNA ή RNA και το αποτέλεσμα "διαβάζεται" με τη βοήθεια της αυτοραδιογραφίας.

A) Ηλεκτροφόρηση του RNA έπειτα από μετουσίωση με Glyoxal και Dimethyl Sulfoxide (DMSO)

i- Σε αποστειρωμένα σωληνάρια αναμειγνύουμε:

6M glyoxal	5.4μl
DMSO	16.0μl
0.1M φωσφορικό νάτριο (pH 7,0)	3.0μl
RNA (έως και 10μg)	5.4μl

ii- Κλείνουμε τα σωληνάρια και επωάζουμε τα διαλύματα RNA για 1 ώρα στους 50⁰C. Ψύχουμε στη συνέχεια τα δείγματα σε παγωμένο νερό και μετά τα φυγοκεντρούμε για 5 sec για να συγκεντρωθεί όλο το υγρό στη βάση των σωληναρίων.

iii- Ενώ επωάζουμε το RNA στους 50⁰C, απλώνουμε ένα οριζόντιο gel αγαρόζης 1%. Τα gel της αγαρόζης αφήνονται να τρέξουν σε 10mM φωσφορικό νάτριο

(pH 7,0). Μετά τη διάλυση της αгарόζης στο φωσφορικό νάτριο, το διάλυμα ψύχεται στους 70⁰C και προστίθεται στερεό ιωδοακετικό νάτριο σε τελική συγκέντρωση 10mM (για να απενεργοποιηθούν οι RNAάσες). Το διάλυμα ψύχεται στους 50⁰C και μετά το gel απλώνεται και αφήνεται να σταθεί για τουλάχιστο 30 min πριν απλωθεί το RNA.

- iv- Ψύχουμε τα δείγματα του RNA στους 0⁰C και προσθέτουμε 4μl αποστειρωμένου Glyoxal/DMSO gel-loading buffer.

Glyoxal/DMSO gel-loading buffer

50% Glycerol

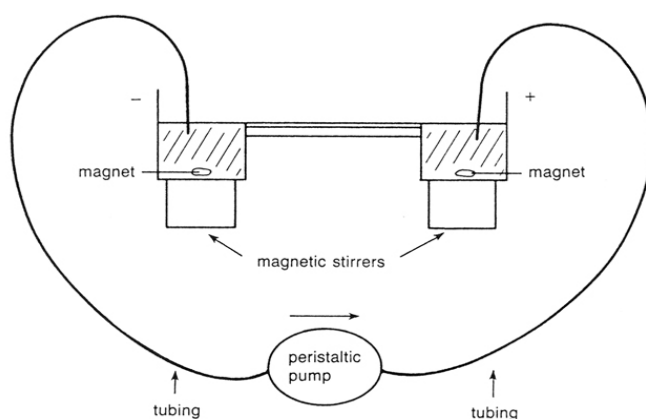
10mM φωσφορικό νάτριο (pH 7,0)

0.25% bromophenol blue

0.25% xylene cyanol FF

Αμέσως μετά ρίχνουμε τα δείγματα μέσα στο gel. Ως δείκτες μοριακού βάρους χρησιμοποιούμε γλυοξυλιωμένα RNA γνωστού μεγέθους (π.χ. rRNA 18S και 28S). Τα μεγέθη των παραπάνω RNA είναι αντίστοιχα 6333 και 2366 νουκλεοτίδια. Οι δείκτες συνήθως τοποθετούνται στις εξωτερικές σειρές του gel έτσι ώστε να μπορούν να κοπούν από το gel μετά την ηλεκτροφόρηση και να βαφούν με ethidium bromide. Εάν είναι εφικτό αφήνουμε ένα κενό μεταξύ των δεικτών και των δειγμάτων μας που έπειτα θα μεταφέρουμε σε μεμβράνες νάυλον.

- v- Ηλεκτροφορούμε το gel βυθισμένο σε 10mM φωσφορικού νατρίου σε 3-4 V/cm. Η συνεχής κυκλοφορία είναι απαραίτητη για να διατηρεί το pH σε αποδεκτά όρια (**εικόνα 6**).



ΕΙΚΟΝΑ 6: Η ανακύκλωση του ρυθμιστικού διαλύματος κατά την ηλεκτροφόρηση του RNA κατά τη μέθοδο Northern Blot.

- vi- Στο τέλος της ηλεκτροφόρησης (όταν το bromophenol blue έχει προχωρήσει περίπου 8cm) οι σειρές που περιέχουν τους δείκτες κόβονται από το gel και βάφονται με ethidium bromide (0.5μg/ml σε 0.1M ακετικό αμμώνιο) για 30-45min. Ευθειάζουμε με το gel ένα διαφανή χάρακα και φωτογραφίζουμε το gel και το χάρακα με υπεριώδη φωτισμό. Χρησιμοποιούμε τη φωτογραφία για να

μετρήσουμε την απόσταση από το σημείο εκκίνησης της ηλεκτροφόρησης μέχρι την κάθε μία από τις ζώνες του RNA. Δημιουργούμε μια καμπύλη που συνδέει την κάθε μία από τις αποστάσεις αυτές με το δεκαδικό λογάριθμο του μεγέθους του αντίστοιχου κομματιού RNA και χρησιμοποιούμε την καμπύλη για να υπολογίσουμε τα μεγέθη των ειδών RNA που μεταφέρονται από το gel στη μεμβράνη νάυλον.

vii- Το RNA μεταφέρεται από το gel αγαρόζης σε μεμβράνη νάυλον.

B) Μεταφορά του μετουσιωμένου RNA από το gel σε μεμβράνες νάυλον

Αρχικά τα gel που περιέχουν φορμαλδεύδη πρέπει να ξεπλυθούν με άφθονο νερό για να αφαιρεθεί η φορμαλδεύδη πριν τη μεταφορά. Επειδή οι θετικά φορτισμένες μεμβράνες νάυλον συγκρατούν τα νουκλεϊκά οξέα σε αλκαλικό διάλυμα, το γλυοξυλιωμένο RNA πρέπει να εκπλυθεί από το gel αγαρόζης με 7.5mN NaOH.

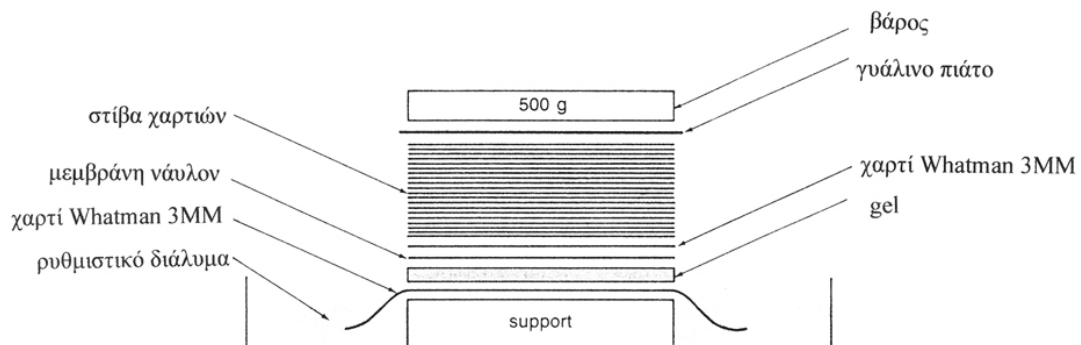
Εάν το gel περιέχει αγαρόζη πάνω από 1% ή είναι πάνω από 0.5cm παχύ, ή το RNA που πρόκειται να μεταφερθεί είναι μακρύτερο σε μήκος από 2.5kb, τότε το gel διαποτίζεται για 20min με 0.05N NaOH. Αυτό υδρολύει το RNA και βελτιώνει την αποτελεσματικότητα της μεταφοράς. Έπειτα ξεπλένεται το gel με νερό που δεν περιέχει RNAάσες και διαποτίζεται για 45min με 20xSSC. Το gel έπειτα έρχεται σε επαφή με τη μεμβράνη νάυλον για να μεταφερθεί το RNA σε στερεό υλικό, ως εξής:

- i) Το gel μεταφέρεται σε δίσκο από ανθεκτικό στη θέρμανση γυαλί και αποκόπτουμε τις αχρησιμοποίητες περιοχές του gel με μια ξυριστική λεπίδα. Αποκόπτουμε επίσης την κάτω-αριστερή γωνία του gel (αυτό βοηθά στον προσανατολισμό του gel κατά τη διάρκεια των χειρισμών).
- ii) Τοποθετούμε ένα κομμάτι χαρτιού Whatman 3MM πάνω σε ένα κομμάτι Plexiglas ώστε να δημιουργήσουμε ένα στήριγμα που είναι μακρύτερο και πλατύτερο από το gel. Τοποθετούμε το στήριγμα αυτό μέσα σε ένα μεγάλο δοχείο κλιβάνου και γεμίζουμε το δοχείο με 7.5mN NaOH έως το επίπεδο του υγρού να φτάσει σχεδόν ως την κορυφή του στηρίγματος. Όταν το χαρτί στην κορυφή του στηρίγματος είναι τελείως υγρό, απομακρύνουμε τις φυσαλλίδες αέρα με μία γυάλινη ράβδο.
- iii) Χρησιμοποιώντας ένα χαρτοκόπτη, κόβουμε ένα κομμάτι μεμβράνης νάυλον περίπου 1mm μεγαλύτερη από το gel και ως προς τις δύο διαστάσεις. Για το χειρισμό της μεμβράνης χρησιμοποιούμε γάντια και λαβίδες με αμβλέα άκρα.
- iv) Απλώνουμε τη μεμβράνη νάυλον στην επιφάνεια ενός δοχείου που περιέχει απιονισμένο νερό έως ότου υγρανθεί πλήρως και μετά εμβαπτίζουμε τη μεμβράνη σε 7.5mN NaOH για τουλάχιστο 5min. Χρησιμοποιώντας μια λεπίδα, κόβουμε μια γωνία της μεμβράνης ώστε να αντιστοιχεί στην κομμένη γωνία του gel.
- v) Τοποθετούμε το gel πάνω στο στερεό στήριγμα ώστε να καταλαμβάνει το κέντρο του υγρού χαρτιού.
- vi) Περιβάλλουμε το gel με Parafilm για να δημιουργήσουμε ένα φράγμα που θα εμποδίζει την άμεση δίοδο υγρού από τη δεξαμενή προς τη στήλη των χαρτιών που θα τοποθετήσουμε πάνω στο gel.
- vii) Τοποθετούμε την υγρή μεμβράνη νάυλον στην κορυφή του gel, ώστε να ευθυγραμμίζονται οι κομμένες τους γωνίες.
- viii) Βρέχουμε σε 7.5mN NaOH δύο κομμάτια χαρτιού Whatman 3MM στο μέγεθος του gel αυτή τη φορά και τα τοποθετούμε πάνω στη μεμβράνη νάυλον.
- ix) Τοποθετούμε μια στήλη (5-8cm ψηλή) από χαρτιά -μόλις μικρότερα από τα 3MM- πάνω στα δύο βρεγμένα χαρτιά 3MM. Στην κορυφή της στήλης

τοποθετούμε ένα κομμάτι γυαλί και πιέζουμε από πάνω προς τα κάτω με ένα βάρος (περίπου 500g). Σκοπός μας είναι να μετακινήσουμε μια ποσότητα υγρού από τη δεξαμενή διαμέσου του gel και της μεμβράνης νάυλον, έτσι ώστε τα μόρια του RNA να εκπλυθούν από το gel και να εγκατασταθούν στη μεμβράνη νάυλον.

- x) Αφήνουμε τη διαδικασία να συνεχιστεί για 6-18 ώρες. Η στήλη των χαρτιών αντικαθίσταται όταν αυτά βρέχονται.
- xi) Αφού η διαδικασία τελειώσει, απομακρύνουμε τη στήλη χαρτιών και τα χαρτιά 3MM και αναποδογυρίζουμε το gel και τη μεμβράνη και τα αφήνουμε πάνω σε ένα χαρτί 3MM. Σημειώνουμε τα αποτυπώματα του gel πάνω στη μεμβράνη με ένα μολύβι.
- xii) Αποχωρίζουμε το gel από τη μεμβράνη. Για 5 min εμβαπτίζουμε τη μεμβράνη σε 6xSSC σε θερμοκρασία δωματίου. Αυτό απομακρύνει υπολείμματα αгарόζης από τη μεμβράνη. Απομακρύνουμε τη μεμβράνη από το SSC και την αφήνουμε να στεγνώσει πάνω σε χαρτί για τουλάχιστο 30 min σε θερμοκρασία δωματίου.
- xiii) Τοποθετούμε τη στεγνή μεμβράνη μεταξύ δύο κομματιών χαρτιού 3MM και τοποθετούμε τη μεμβράνη σε κλίβανο UV (cross linker) για 20 sec σε θερμοκρασία δωματίου για να μονιμοποιηθεί το RNA πάνω στη μεμβράνη.
- xiv) Πριν τον υβριδισμό, απομακρύνουμε το glyoxal από το RNA πλένοντας τη μεμβράνη με 20mM Tris-HCl (pH 8,0) στους 65⁰C.
- xv) Εάν η μεμβράνη δεν πρόκειται να χρησιμοποιηθεί αμέσως, πρέπει να τυλιχθεί σε αλουμινόχαρτο και να φυλαχθεί σε κενό και σε θερμοκρασία δωματίου.

Στην **εικόνα 7** φαίνεται παραστατικά η συσκευή μεταφοράς του RNA από το gel σε νάυλον μεμβράνη κατά την ως άνω περιγραφείσα διαδικασία.



ΕΙΚΟΝΑ 7: Μεταφορά του RNA από το gel σε μεμβράνες νάυλον στη μέθοδο Northern Blot.

Γ) Σύνθεση ραδιοσημασμένων ανιχνευτών DNA

Χρησιμοποιήθηκε ως ανιχνευτής τμήμα του CD43-cDNA από το 3'-UTR που ήταν κοινό και για τα δύο mRNA του γονιδίου. Το τμήμα αυτό παρασκευάστηκε με PCR με τη χρήση του ζεύγους των primers CD43F4-CD43R2. Αυτό το τμήμα σημάνθηκε με ραδιενεργό ATP-³²P, ως εξής:

- i) Σε ένα σωληνάριο των 0,5 ml αναμειγνύουμε 200ng διπλόκλωνου DNA (σε όγκο 1μl) με 75ng τυχαίων primers. Εμβαπτίζουμε το σωληνάριο σε βραστό νερό για 3 λεπτά και στη συνέχεια ψύχουμε αμέσως στους 0⁰C.

- ii) Εν τω μεταξύ, στο σωληνάριο που φυλάσσεται σε πάγο προσθέτουμε:
- 1μl 20mM dithiothreitol,
 - 1μl διάλυμα dGTP, dCTP, dTTP (το καθένα σε συγκέντρωση 5mM),
 - 1μl 10xRP buffer,
 - 1μl H₂O, και
 - 3μl [α -³²P]dATP (ειδική δραστικότητα >3000 Ci/mmol, 10μCi/μl).

10xRP buffer
 900mM HEPES (ρυθμισμένο σε pH 6,6 με 4N NaOH)
 100mM MgCl₂

- iii) Προσθέτουμε 5 μονάδες από την Klenow DNA πολυμεράση και αναμειγνύουμε τα συστατικά χτυπώντας ελαφρά με το δάκτυλο το εξωτερικό του σωλήνα. Φυγοκεντρούμε στις 12000 στροφές για 1-2 sec για να μετακινήσουμε τα υγρά συστατικά στον πυθμένα. Επιάζουμε το αντιδραστήριο για τουλάχιστο 3 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου.
- iv) Προσθέτουμε στο αντιδραστήριο 10μl από το Buffer A για τον τερματισμό της αντίδρασης και φυλάσσουμε το ραδιοσημασμένο ανιχνευτή στους -20⁰C έως ότου χρειαστεί να χρησιμοποιηθεί.

Buffer A
 50mM Tris.Cl (pH 7,5)
 50mM NaCl
 5mM EDTA (pH 8,0)
 0.5% SDS

Δ) Υβριδισμός και αυτοραδιογραφία

Αρχικά προϋβριδίζουμε τη μεμβράνη νάυλον σε:

50% φορμαμίδη
 5 x SSPE
 2 x αντιδραστήριο Denhardt's
 0.1% SDS

Προσθέτουμε το μετουσιωμένο ραδιοσημασμένο ανιχνευτή στο υγρό που προαναφέρθηκε. Επιάζουμε για 16-24 ώρες και μετά πλένουμε τη μεμβράνη για 20min σε θερμοκρασία δωματίου με 1xSSC, 0.1% SDS. Ακολουθούν 3 πλύσεις 20min η κάθε μία στους 68⁰C σε 0.2xSSC, 0.1% SDS. Προχωρούμε σε αυτοραδιογραφία εκθέτοντας τη μεμβράνη για 24-48 ώρες σε film ακτίνων x στους -70⁰C με μια ενισχυτική οθόνη (screen) και εμφανίζουμε το film.

7) ΑΝΑΛΥΣΗ WESTERN BLOT

Η μέθοδος Western Blot⁶⁵ χρησιμοποιείται για την αναγνώριση και ποσοτικοποίηση συγκεκριμένων πρωτεϊνών σε μείγματα πρωτεϊνών και αδρά λαμβάνει χώρα στα παρακάτω στάδια:

1. ΛΥΣΗ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΠΕΡΙΦΕΡΙΚΟΥ ΑΙΜΑΤΟΣ ΚΑΙ ΜΥΕΛΟΥ ΚΑΙ ΛΗΨΗ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ

Τα κύτταρα πλένονται με PBS στους 0°C και μετά από φυγοκέντρηση στις 3000 στροφές για 5min στους 4°C εκτιμούμε τον όγκο του ιζήματος και μετακινούμε το υπερκείμενο χρησιμοποιώντας πιπέττα συνδεδεμένη με κενό για να επιτύχουμε να μετακινήσουμε και τα τελευταία σταγονίδια υγρού που παραμένουν προσκολλημένα στα τοιχώματα του φυγοκεντρικού σωληναρίου. Διαλύουμε τα κύτταρα σε 5 όγκους παγωμένου suspension buffer.

Suspension buffer

0.1M NaCl
0.01M Tris'Cl (pH 7,6)
0.001M EDTA (pH 8,0)
1µg/ml aprotinin
100µg/ml phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF)

Αμέσως μετά προσθέτουμε ισοδύναμο όγκο 2xSDS gel loading buffer.

2 x SDS gel-loading buffer

100mM Tris.Cl (pH 6,8)
200mM dithiotreitol
4% SDS
0.2% bromophenol blue
20% glycerol

Μετά τη λύση των κυττάρων, τοποθετούμε τα δείγματα σε βρασμένο νερό για 10min. Αποκόπτουμε το χρωμοσωμικό DNA με ειδική συσκευή υπερήχων. Φυγοκεντρείται το δείγμα στις 10000 στροφές για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Μετακινείται το υπερκείμενο σε καθαρό σωληνάριο και πετιέται το ίζημα. Το υπερκείμενο περιέχει το πρωτεϊνικό μείγμα που θα χρησιμοποιηθεί στη συνέχεια στη μέθοδο Western Blot.

2. ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΤΩΝ GEL SDS-ΠΟΛΥΑΚΡΙΛΑΜΙΔΗΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ

Σχεδόν όλες οι πρωτεϊνικές ηλεκτροφορήσεις γίνονται σε gel πολυακριλαμίδης που βοηθά στη διάσπαση των πρωτεϊνών στις πολυπεπτιδικές τους υποομάδες. Πριν τη διάλυσή τους στο gel πολυακριλαμίδης, μάλιστα, για την πρωτεϊνική διάσπαση χρησιμοποιείται το ισχυρά ανιονικό απορρυπαντικό SDS μαζί με ένα παράγοντα διάσπασης και το βρασμό. Τα μετουσιωμένα πολυπεπτίδια φορτίζονται αρνητικά με τη σύνδεσή τους με το SDS και το σύμπλεγμα SDS-πολυπεπτίδιο ηλεκτροφορείται στο gel ανάλογα με το μέγεθος του πολυπεπτιδίου. Μάλιστα χρησιμοποιώντας δείκτες γνωστού μοριακού βάρους, μπορεί έπειτα κανείς να προσδιορίσει το μέγεθος της πολυπεπτιδικής αλύσου που ηλεκτροφορήθηκε σε ορισμένο σημείο του gel. Το μείγμα SDS-πολυπεπτίδιο διαλύεται στο gel της πολυακριλαμίδης και μετακινείται σ'αυτό μέσω ηλεκτρικού ρεύματος που παράγεται από τους αντίθετους πόλους δύο ηλεκτροδίων.

Για την προετοιμασία των gel χρησιμοποιούνται:

- ▶ 29% Acrylamide και 1% N,N'-methylenebisacrylamide
- ▶ 10% Sodium Dodecyl Sulphate (SDS)
- ▶ Ρυθμιστικά διαλύματα Tris για την προετοιμασία των διαχωριστικών gel (separating gel) και gel εκκίνησης (stacking gel)

- ▶ *TEMED* (N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine) που χρησιμοποιείται για τον πολυμερισμό της acrilamide και της bisacrilamide
- ▶ Ammonium persulfate, που εξασφαλίζει τις ελεύθερες ρίζες που βοηθούν στον ως άνω πολυμερισμό
- ▶ Ρυθμιστικό διάλυμα Tris-glycine για την ηλεκτροφόρηση

3. ΑΠΛΩΜΑ ΤΩΝ GEL

Ρίχνουμε το διάλυμα του gel της πολυακρυλαμίδης στο χάσμα μεταξύ των γυάλινων πιάτων που έχουν από πριν συναρμολογηθεί σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή, αφήνοντας επαρκή χώρο για την τοποθέτηση και του gel εκκίνησης. Ρίχνουμε το gel εκκίνησης πάνω στην επιφάνεια του πολυμερισμένου διαχωριστικού gel. Στη συνέχεια τοποθετούμε μέσα στο gel εκκίνησης μια καθαρή κτένα από Teflon χωρίς να παγιδεύσουμε φυσαλίδες αέρα. Φροντίζουμε να καλύψουμε τα κενά ανάμεσα στα δόντια της κτένας με gel εκκίνησης και περιμένουμε να πολυμεριστεί. Στη συνέχεια προετοιμάζουμε τα μείγματα των πρωτεϊνών βράζοντάς τα στους 100°C για 3 min μέσα σε 1xSDS gel-loading buffer για τη μετουσίωση των πρωτεϊνών.

1 x SDS gel-loading buffer
 50mM Tris.Cl (pH 6,8)
 100mM dithiotreitol
 2% SDS
 0.1% bromophenol blue
 10% glycerol

Αφού περάσουν 30 min ώστε να ολοκληρωθεί ο πολυμερισμός των gel, απομακρύνουμε την κτένα Teflon και πλένουμε την κορυφή του gel για την απομάκρυνση της μη πολυμερισμένης πολυακρυλαμίδης. Τοποθετούμε τα gel στη συσκευή της ηλεκτροφόρησης, προσθέτοντας Tris-Glycine electrophoresis buffer στην κορυφαία και βασική δεξαμενή της.

Tris-Glycine electrophoresis buffer
 25mM Tris
 250 mM Glycine (pH 8,3)
 0.1% SDS

Τοποθετούμε έως και 50μl από τα δείγματά μας σε προκαθορισμένη σειρά στη βάση των καλουπιών μας. Θέτουμε σε λειτουργία την ηλεκτροφορητική συσκευή αρχικά με 8V/cm. Όταν η χρωστική φτάσει στο διαχωριστικό gel αυξάνουμε την τάση στα 15V/cm. Κλείνουμε τη συσκευή όταν η bromophenol blue φτάσει στη βάση του διαχωριστικού gel (περίπου 4 ώρες μετά). Έπειτα μετακινούμε τις γυάλινες πλάκες που περιέχουν τα gel από την ηλεκτροφορητική συσκευή σε μια στήλη χαρτιών. Μαρκάρουμε τον προσανατολισμό των gel κόβοντας μια γωνία από τη βάση τους.

4. ΒΑΦΗ ΤΩΝ GEL ME COOMASSIE BRILLIANT BLUE

Τα πολυπεπίδια που διαχωρίστηκαν με την ηλεκτροφόρηση στο gel πολυακρυλαμίδης πρέπει να βαφτούν με Coomassie Brilliant Blue R250 (ή αλλιώς Acid Blue 83). Τα gel εμβαπτίζονται για αρκετές ώρες σε διάλυμα της βαφής που περιέχει μεθανόλη και ακετικό οξύ και η περίσσεια της βαφής αφήνεται να διαχυθεί

από το gel κατά τη διάρκεια μιας παρατεταμένης περιόδου εκβαφής. Μετά τη βαφή, τα gel φυλάσσονται σε νερό που περιέχει 20% γλυκερόλη.

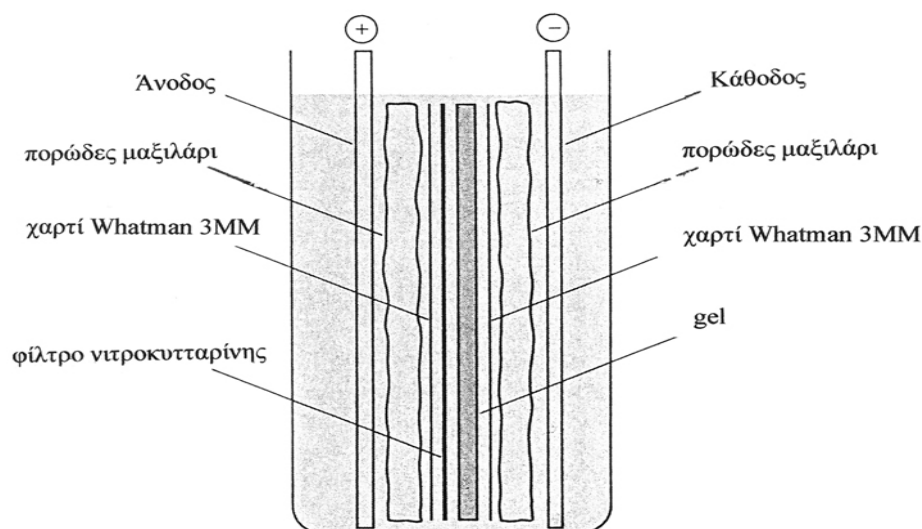
5. ΣΤΕΓΝΩΜΑ ΤΩΝ GEL

Τα gel πολυακρυλαμίδης πρέπει έπειτα να στεγνώσουν. Τα προβλήματα που δημιουργούνται στη φάση αυτή είναι η συρρίκνωση και παραμόρφωση των gel και το σπάσιμό τους. Το πρώτο πρόβλημα λύνεται με τη χρήση χαρτιών Whatman που έρχεται σε επαφή με το gel πριν το τελευταίο αρχίσει να στεγνώνει. Για την αποφυγή της παραμόρφωσης δεν υπάρχει ιδανική λύση, τα παχύτερα gel όμως παραμορφώνονται πιο δύσκολα. Το σπάσιμο των gel συμβαίνει κυρίως κατά τη μεταφορά του gel από τη συσκευή στεγνώματος πριν αυτό στεγνώσει τελείως.

6. ΜΕΤΑΦΟΡΑ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΑΠΟ ΤΟ GEL ΣΕ ΣΤΕΡΕΟ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑ

Η μεταφορά αυτή γίνεται για να μπορέσουμε να ανιχνεύσουμε τις πρωτεΐνες που επιθυμούμε με τη βοήθεια συγκεκριμένων αλληλουχιών αμινοξέων. Στη μέθοδο Western Blot αυτές οι αλληλουχίες αμινοξέων είναι αντισώματα που αντιδρούν απευθείας με τις πρωτεΐνες που έχουν ηλεκτροφορηθεί και μεταφερθεί από το gel σε στερεό υπόστρωμα.

Μεγάλος αριθμός στερεών υποστρωμάτων έχει χρησιμοποιηθεί στη μέθοδο Western Blot, μεταξύ των οποίων η νιτροκυτταρίνη και η μεμβράνη νάυλον που χρησιμοποιήθηκε στη μελέτη μας. Σ'αυτά τα στερεά υποστρώματα οι πρωτεΐνες μεταφέρονται και στερεώνονται δυνατά. Η συσκευή ηλεκτροφόρησης έχει ως εξής: Το gel έρχεται σε επαφή με τη μία μεριά του με φίλτρο νάυλον. Αμέσως μετά gel και φίλτρο καλύπτονται δίκην σάντουιτς και από μέσα προς τα έξω με χαρτί 3MM Whatman, 2 πορώδη μαξιλάρια και 2 πλαστικά στηρίγματα. Το σύστημα έπειτα εμβαπτίζεται σε μια δεξαμενή ηλεκτροφόρησης με ηλεκτρόδια λευκόχρυσου και Tris-glycine electrophoresis buffer σε pH 8,3. Το φίλτρο νάυλον τοποθετείται προς την άνοδο. Για 12 ώρες εφαρμόζεται ηλεκτρικό ρεύμα και οι πρωτεΐνες μεταναστεύουν από το gel προς την άνοδο και κολλούν στο φίλτρο νάυλον (στην **εικόνα 8** απεικονίζεται η συσκευή μεταφοράς των πρωτεϊνών από το gel σε φίλτρο νιτροκυτταρίνης).



ΕΙΚΟΝΑ 8: Η συσκευή μεταφοράς των πρωτεϊνών από το gel σε φίλτρο νιτροκυτταρίνης στη μέθοδο Western Blot.

7. ΒΑΦΗ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΣΤΑ ΦΙΛΤΡΑ ΝΑΪΛΟΝ

Η βαφή των πρωτεϊνών που έχουν μεταφερθεί πάνω στο φίλτρο νάυλον γίνεται με Ponceau S, μια χρωστική χρώματος ροζ-μωβ. Η βαφή ξεκινά όταν το φίλτρο έχει στεγνώσει εντελώς. Τότε, το φίλτρο τοποθετείται σε ένα διάλυμα της χρωστικής, που περιέχει:

2g Ponceau S
30g trichloroacetic acid
30g sulfosalicylic acid
H₂O ως τα 100ml

Όταν οι ζώνες των ηλεκτροφορημένων πρωτεϊνών γίνουν ορατές, ξεπλένεται το φίλτρο με απιονισμένο νερό σε θερμοκρασία δωματίου. Μαρκάρουμε τις πρωτεϊνικές θέσεις των δεικτών γνωστού μοριακού βάρους που χρησιμοποιήθηκαν με μαύρο αδιάβροχο μελάνι. Προχωρούμε στην πρωτεϊνική ανίχνευση με τη χρήση αντισωμάτων έναντι των πρωτεϊνών που ηλεκτροφορήθηκαν.

8. ΕΠΩΑΣΗ ΤΟΥ ΦΙΛΤΡΟΥ ΜΕ ΤΟ ΠΡΩΤΕΥΟΝ ΑΝΤΙΣΩΜΑ ΕΝΑΝΤΙ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ-ΣΤΟΧΟΥ

Αρχικά μειώνουμε την πιθανότητα το αντίσωμα να συνδεθεί με το φίλτρο με τον ίδιο τρόπο που συνδέθηκαν και οι πρωτεΐνες. Για να πετύχουμε τη μείωση αυτής της μη ειδικής σύνδεσης, μπλοκάρουμε τις ισχυρές αυτές δεσμευτικές θέσεις με άσχετες πρωτεΐνες, ως εξής:

Τοποθετούμε το φίλτρο σε μια πλαστική σακκούλα και προσθέτουμε 0.1ml blocking solution για κάθε τετραγωνικό εκατοστό του φίλτρου.

Blocking solution

5% (w/v) άπαχο αποξηραμένο γάλα

0.01% antifoam A

0.02% sodium azide σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών

Στη συνέχεια σφραγίζουμε τη σακκούλα, αφήνοντας όσο λιγότερες φυσαλλίδες αέρα είναι δυνατό. Επωάζουμε το φίλτρο για 1-2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου με ήπιες αναδεύσεις του. Στη συνέχεια ανοίγουμε τη σακκούλα και πετάμε το διάλυμα.

Αμέσως επωάζουμε το φίλτρο με αντίσωμα που δεσμεύει την πρωτεΐνη-στόχο. Αυτό γίνεται ως εξής:

Σε μια πλαστική σακκούλα τοποθετούμε το φίλτρο, 0.1ml του blocking solution που περιγράφηκε πιο πάνω ανά τετραγωνικό εκατοστό φίλτρου και την απαραίτητη ποσότητα του αντισώματος (mouse anti-human anti-CD43- DFT-1). Σφραγίζουμε τη σακκούλα αφήνοντας όσο λιγότερες φυσαλλίδες αέρα γίνεται και επωάζουμε το φίλτρο για 2 ώρες στους 4⁰C με ήπιες αναδεύσεις του. Έπειτα ανοίγουμε τη σακκούλα, πετάμε το διάλυμα και το αντίσωμα και πλένουμε καλά το φίλτρο 3 φορές (10min τη φορά) με 250 ml PBS.

9. ΕΠΩΑΣΗ ΜΕ ΤΟ ΔΕΥΤΕΡΕΥΟΝ ΡΑΔΙΟΣΗΜΑΣΜΕΝΟ ΑΝΤΙΣΩΜΑ Ή ΑΝΤΙΣΩΜΑ ΣΥΝΔΕΔΕΜΕΝΟ ΜΕ ΕΝΖΥΜΟ

Το φίλτρο στη συνέχεια επωάζεται με ένα δεύτερο αντιδραστήριο, το οποίο είναι αντι-αντίσωμα και το οποίο είναι συνδεδεμένο με το ένζυμο υπεροξειδάση. Μετά τις διαδικασίες αυτές, το σύμπλεγμα πρωτεΐνη-αντίσωμα-αντίσωμα εντοπίζεται με ενζυμικές αντιδράσεις.

Σύνδεση με το δευτερεύον αντίσωμα που είναι συνδεδεμένο με ένζυμο
Μεταφέρεται το φίλτρο σε δοχείο που περιέχει 200ml από 150mM NaCl και 50mM Tris-HCl (pH 7,5). Επωάζουμε το φίλτρο για 10 min σε θερμοκρασία δωματίου με ήπιες αναδεύσεις. Έπειτα μεταφέρουμε το φίλτρο σε μια πλαστική σακκούλα που περιέχει 0.1ml Phosphate-free, azide-free blocking solution ανά τετραγωνικό εκατοστό του φίλτρου.

<p><u>Phosphate-free, azide-free blocking solution</u> 5% (w/v) άπαχο αποξηραμένο γάλα 150mM NaCl 50mM Tris-HCl (pH 7,5)</p>
--

Προσθέτουμε το δευτερεύον αντίσωμα που είναι συνδεδεμένο με το ένζυμο (horseradish peroxidase) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή και σφραγίζουμε τη σακκούλα. Συνιστάται αραιώση του δευτερεύοντος αντιδραστηρίου 1:200 έως 1:2000 για να πετύχουμε τελική συγκέντρωση 0.5-5μg/ml. Επωάζουμε το φίλτρο σε θερμοκρασία δωματίου για 1 ώρα με ήπιες αναδεύσεις του. Μεταφέτουμε το φίλτρο σε δοχείο που περιέχει 200ml από 150mM NaCl και 50mM Tris-HCl (pH 7,5). Επωάζουμε για 10min σε θερμοκρασία δωματίου με ήπιες αναδεύσεις. Επαναλαμβάνουμε το βήμα αυτό 3 φορές ακόμα χρησιμοποιώντας φρέσκο διάλυμα κάθε φορά. Το φίλτρο έπειτα είναι έτοιμο να επωασθεί με χρωμοπαραγωγό υπόστρωμα. Το υπόστρωμα αυτό για την υπεροξειδάση είναι η 3,3'-diaminobenzidine.

Η 3,3'-diaminobenzidine επώαστηκε με το φίλτρο νάυλον το οποίο περιείχε την πρωτεΐνη-στόχο, το συνδεδεμένο πρωτεύον αντίσωμα και το δευτερεύον αντίσωμα που ήταν συνδεδεμένο με υπεροξειδάση. Το τελευταίο κατέλυσε τη μετατροπή του υποστρώματος σε χρωστική ουσία, η οποία φωτογραφίστηκε και εντοπίστηκε η πρωτεΐνη-στόχος. Η διαδικασία αναλυτικά έγινε ως εξής:

Διαλύσαμε 6mg τετραϋδροχλωρικής διαμινοβενζιδίνης σε 9ml διαλύματος 0.01M Tris-HCl (pH 7,6). Προσθέσαμε 1 ml 0,3% NiCl₂ ή CoCl₂. Το διάλυμα φιλτραρίστηκε με ένα φίλτρο Whatman No1 για να μετακινηθούν ιζήματα που πιθανώς να σχηματίστηκαν. Προσθέσαμε 10μl 30% H₂O₂. Ανακατέψαμε καλά και χρησιμοποιήσαμε αμέσως το διάλυμα. Μεταφέραμε το φίλτρο σε ένα δοχείο, προσθέσαμε 0.1ml από το ως άνω διάλυμα ανά τετραγωνικό εκατοστό του φίλτρου και επώασαμε σε θερμοκρασία δωματίου με ήπιες αναδεύσεις. Παρακολουθώντας την πορεία της αντίδρασης, όταν οι ζώνες ήταν της επιθυμητής πυκνότητας (~2-3min) πλύναμε το φίλτρο με νερό και το μεταφέραμε σε δοχείο που περιείχε 250ml PBS. Τέλος, το φίλτρο φωτογραφήθηκε για να ληφθεί μόνιμο αντίγραφο του πειράματος.

8) ΑΝΑΛΥΣΗ ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΩΝ ΤΟΥ CD43 (cDNA ΚΑΙ DNA)

A) PCR, RT-PCR

i) PCR

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (polymerase chain reaction-PCR)⁶⁵ χρησιμοποιείται για να ενισχύσει και να πολλαπλασιάσει ένα τμήμα του DNA που βρίσκεται μεταξύ δύο περιοχών γνωστής αλληλουχίας βάσεων. Δύο ολιγονουκλεοτίδια χρησιμοποιούνται ως εκκινητές (primers) για μια σειρά συνθετικών αντιδράσεων που καταλύονται από την πολυμεράση αυτή. Τα ολιγονουκλεοτίδια είναι συμπληρωματικά ως προς τις αλληλουχίες βάσεων των περιοχών του DNA που περιβάλλουν την περιοχή που πρόκειται να πολλαπλασιαστεί, το ένα δε από αυτά είναι συμπληρωματικό της αντίθετης αλυσίδας του DNA.

Η δομή του DNA αρχικά μετουσιώνεται με θέρμανση παρουσία μεγάλης μοριακής περιόσεως καθενός από τα δύο ολιγονουκλεοτίδια (primers) και των τεσσάρων dNTP (δεοξυνουκλεοσιδίων). Το μείγμα που προκύπτει από την παραπάνω αντίδραση έπειτα ψύχεται σε θερμοκρασία που επιτρέπει στους primers να συνδεθούν με τις συμπληρωματικές τους αλληλουχίες βάσεων πάνω στο DNA και μετά απ'αυτό οι συνδεδεμένοι primers αρχίζουν να εκτείνονται με τη βοήθεια της DNA-πολυμεράσης. Ο κύκλος της μετουσίωσης, της σύνδεσης και της επέκτασης των primers επαναλαμβάνεται πολλές φορές. Επειδή τα προϊόντα κάθε κύκλου πολλαπλασιασμού χρησιμεύουν ως καλούπια για τα επόμενα προϊόντα, κάθε επιτυχημένος κύκλος πολλαπλασιασμού απαραίτητα διπλασιάζει τον αριθμό των επιθυμητών προϊόντων του DNA.

Το μείζον προϊόν αυτής της αντίδρασης είναι ένα τμήμα του διπλού κλώνου του DNA, του οποίου τα άκρα ορίζονται από το 5' άκρο των primers και του οποίου το μήκος καθορίζεται από την απόσταση μεταξύ των 2 primers. Επιπρόσθετα, μακρύτερα μόρια DNA μπορούν να παραχθούν από την αντίδραση αυτή. Για παράδειγμα, τα προϊόντα ενός επιτυχημένου πρώτου κύκλου πολλαπλασιασμού είναι μόρια DNA με ετερογενές μέγεθος, των οποίων το μήκος μπορεί να υπερβαίνει την απόσταση μεταξύ των συνδετικών θέσεων των δύο primers. Στο δεύτερο κύκλο αυτά τα μόρια παράγουν DNA καθορισμένου μήκους το οποίο θα αρχίσει να συσσωρεύεται με γεωμετρική πρόοδο στα τελευταία στάδια της PCR, σχηματίζοντας τα επικρατή μόρια της αντίδρασης. Αν και μακρύτερα μόρια συνεχίζουν να παράγονται από το αρχικό καλούπι του DNA σε κάθε κύκλο, αυτά συσσωρεύονται με γραμμικό ρυθμό και επομένως δε συνεισφέρουν σημαντικά στην τελική ποσότητα των αλληλουχιών-στόχων.

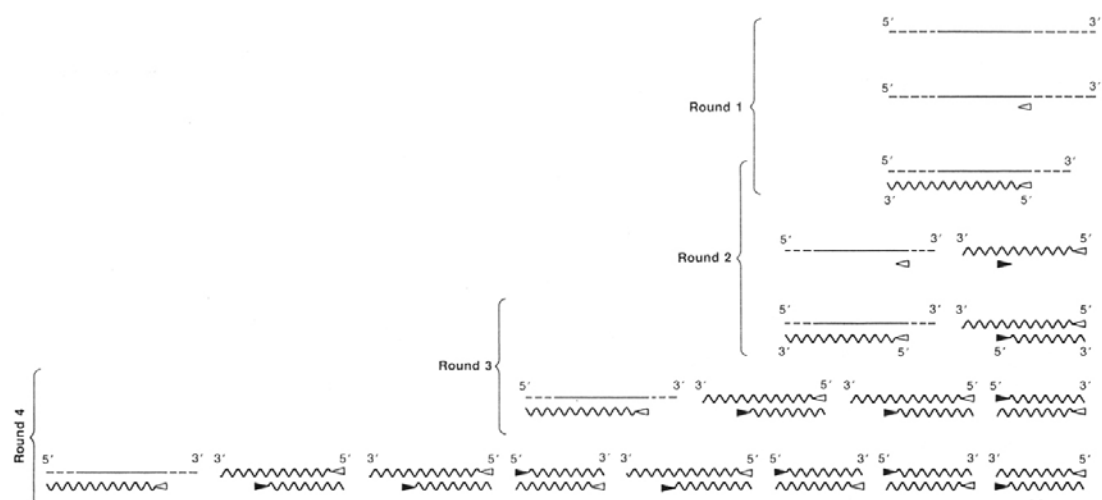
Τα αρχικά πρωτόκολλα της PCR χρησιμοποιούσαν το τμήμα Klenow της DNA πολυμεράσης I της *E. Coli* ως καταλύτη της αντίδρασης επέκτασης των primers που εχρησιμοποιούντο. Επειδή το ένζυμο αυτό απενεργοποιείται στις θερμοκρασίες που απαιτούνται για τη μετουσίωση της δομής του DNA, κάθε κύκλος σύνθεσης απαιτούσε καινούρια ποσότητα ενζύμου. Αν και οι αντιδράσεις αυτές γενικά δούλεψαν ικανοποιητικά για τον πολλαπλασιασμό μικρών τμημάτων DNA (<200 bp), τα αποτελέσματα με μεγαλύτερα τμήματα DNA ήταν απογοητευτικά. Συχνά, το αποτέλεσμα της συγκομιδής ήταν φτωχό, και τα προϊόντα ήταν ετερογενή ως προς το μέγεθος, προφανώς γιατί στις θερμοκρασίες που χρησιμοποιούνταν για την καταλυτική επέκταση των primers εμφανίζονταν σφάλματα εκκίνησης. Επιπλέον, κάποια από τα προϊόντα ήταν "ανακατεμένα" και αποτελούνταν από διαφορετικά αλληλία των αλληλουχιών-στόχων.

Τα προβλήματα αυτά λύθηκαν με την είσοδο της θερμοανθεκτικής DNA-πολυμεράσης που απομονώνεται από το θερμοφιλο βακτηρίδιο *Thermus aquaticus*. Το ένζυμο αυτό, που επιβιώνει ακόμα και σε παρατεταμένη επώαση στους 95°C, δεν απενεργοποιείται στο στάδιο της μετουσίωσης με θέρμανση και δε χρειάζεται να αντικατασταθεί σε κάθε κύκλο πολλαπλασιασμού. Επιπλέον, επειδή η σύνδεση και επέκταση των primers μπορεί να εκτελεστεί σε υψηλές θερμοκρασίες, δεν παρατηρούνται σφάλματα εκκίνησης. Αυτό οδήγησε σε ουσιαστική βελτίωση στην ειδικότητα, τη συγκομιδή, καθώς και το επιθυμητό μήκος του προϊόντος. Για παράδειγμα, μεταξύ 0.5 και 1μg επιθυμητού τμήματος DNA έως και 2kb σε μήκος μπορούν να παραχθούν από 30-35 κύκλους πολλαπλασιασμού με μόνο 10⁻⁶ μg αρχικού DNA.

Αν και εξαιρετικά αποδοτικός, ο γεωμετρικός πολλαπλασιασμός των αλληλουχιών-στόχων δεν είναι μια ατέρμονη διαδικασία. Κάτω από φυσιολογικές συνθήκες, το ποσό της πολυμεράσης περιορίζεται μετά από 25-30 κύκλους πολλαπλασιασμού. Εάν

απαιτείται περαιτέρω πολλαπλασιασμός, ένα δείγμα του DNA μπορεί να αραιωθεί 1000 έως και 10000 φορές και να χρησιμοποιηθεί ως καλούπι για επιπλέον κύκλους πολλαπλασιασμού σε μια νέα αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης. Με τον τρόπο αυτό, σε 60 κύκλους μετουσίωσης, σύνδεσης και επέκτασης των primers, μπορεί το πολλαπλασιαστικό αποτέλεσμα να προσεγγίσει το 10^9 - 10^{10} . Στην **εικόνα 9** φαίνεται σχηματικά ο τρόπος με τον οποίο πολλαπλασιάζονται οι αλληλουχίες-στόχοι στην PCR.

Στη δική μας μελέτη χρησιμοποιήθηκαν CD43-ειδικά primers: CD43F2= 5'-gcg-tgt-tct-gct-tct-ccg-gct-gcc-3', CD43R2= 5'-gag-act-cag-cag-ccg-ttt-cca-agg-a-3', CD43F4= 5'-att-ggt-gcc-agc-act-ggt-tcc-c-3', CD43R1= 5'-tct-gga-gag-ttc-gtt-gtt-atg-g-3'. Τα primers αυτά έδωσαν μετά από 35 κύκλους προϊόν 181bp. Σκοπός μας ήταν η δημιουργία ανιχνευτή (probe), που μετά από σήμανση θα εχρησιμοποιείτο στη μέθοδο του υβριδισμού για την ανίχνευση παρουσίας CD43-mRNA.



ΕΙΚΟΝΑ 9: Παράδειγμα αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR). Οι primers απεικονίζονται με τα σύμβολα ► και ◄.

ii) RT-PCR

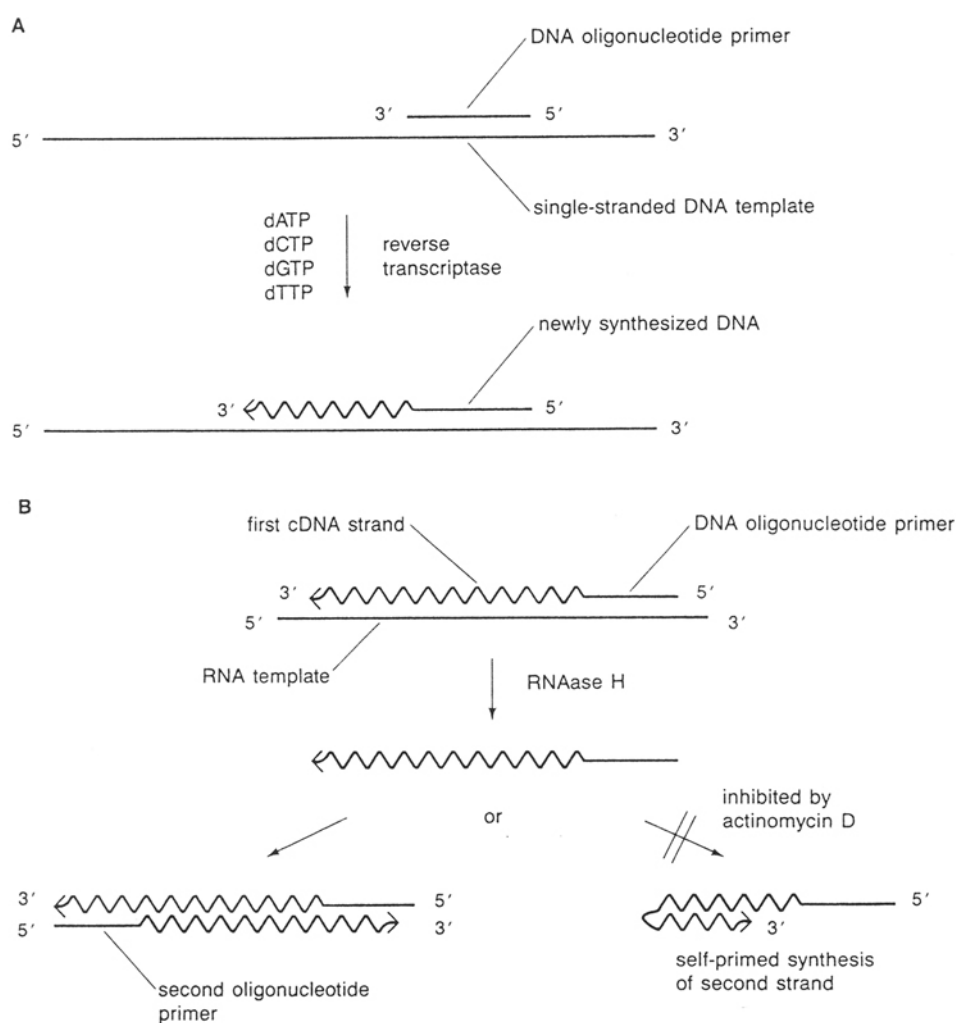
Η RT-PCR⁶⁵ (reverse transcriptase- polymerase chain reaction) είναι μια αντίδραση που χρησιμοποιείται για τη ανάστροφη μεταγραφή mRNA σε διπλόκλωνο cDNA, ή για τη μεταγραφή μονόκλωνου DNA ή RNA σε μονόκλωνους ή διπλόκλωνους ανιχνευτές που χρησιμοποιούνται σε πειράματα υβριδισμού (**εικόνα 10**). Η αντίδραση αυτή χρησιμοποιεί ένα ένζυμο (αντίστροφη τρανσκριπτάση) με δραστηριότητα 5'→3' DNA πολυμεράσης, και 3 τύπους primers:

A) Ολιγο(dT)₁₂₋₁₈, που συνδέεται με την poly(A) περιοχή του 3' άκρου του mRNA του θηλαστικού και εκκινεί τη σύνθεση του πρώτου κλώνου του cDNA.

B) Ολιγονουκλεοτίδια τυχαίας αλληλουχίας. Εδώ σκοπός είναι να χρησιμοποιηθεί ένας πληθυσμός ολιγονουκλεοτιδίων των οποίων η ποικιλία αλληλουχιών είναι τόσο μεγάλη, ώστε τουλάχιστο κάποια ολιγονουκλεοτίδια θα ενωθούν με το καλούπι και να χρησιμεύσουν ως primers για την RT-PCR. Επειδή διαφορετικά ολιγονουκλεοτίδια θα συνδεθούν σε διαφορετικές θέσεις αλληλουχιών, μια μεγάλη αναλογία αλληλουχιών θα αντιγραφούν από την RT-PCR και αν όλοι οι primers είναι παρόντες σε ίσες συγκεντρώσεις, τότε όλες οι αλληλουχίες θα αντιγραφούν σε ίση συχνότητα.

Γ) Ολιγονουκλεοτίδια ορισμένης αλληλουχίας: Αυτά τα ολιγονουκλεοτίδια χρησιμοποιούνται για την εκκίνηση σύνθεσης cDNA από ένα συγκεκριμένο mRNA. Στη δική μας μελέτη χρησιμοποιήθηκαν ολιγο-(dT) primers για την ανάστροφη μεταγραφή του mRNA σε cDNA.

Δύο μορφές RT-PCR είναι διαθέσιμες στο εμπόριο: αυτή που απομονώνεται από τον ιό της μυελοβλάστωσης των πτηνών (AMV) και αυτή που απομονώνεται από ένα είδος E.Coli που εκφράζει ένα κλωνοποιημένο αντίγραφο γονιδίου RT-PCR του ιού της λευχαιμίας Moloney των ποντικών (Mo-MLV). Τα δύο αυτά ένζυμα διαφέρουν σε μερικά σημεία: i) Το ένζυμο των πτηνών αποτελείται από 2 πολυπεπτιδικές αλυσίδες που αμφότερες κουβαλούν δραστικότητα πολυμεράσης και RNAάσης H. Το ένζυμο των ποντικών αποτελείται από μία πεπτιδική αλυσίδα που παρουσιάζει έντονη δραστικότητα πολυμεράσης και ήπια δραστικότητα RNAάσης H, με το τελευταίο να αποτελεί πλεονέκτημα όταν κανείς προσπαθεί να συνθέσει cDNA από μακρύ mRNA. ii) Το ένζυμο των πτηνών δουλεύει στους 42⁰C, όπου τον ένζυμο των ποντικών απενεργοποιείται τάχιστα. Τα RNA που έχουν δευτεροταγή δομή επομένως αντιγράφονται πιο ικανοποιητικά από το ένζυμο των πτηνών παρά από το ένζυμο των ποντικών. iii) Το ένζυμο των πτηνών δουλεύει πιο αποτελεσματικά σε pH 8,3 παρά σε pH 7,6 όπου δουλεύει καλύτερα το ένζυμο των ποντικών.



ΕΙΚΟΝΑ 10: Παράδειγμα της μεθόδου RT-PCR στην παραγωγή ανιχνευτών χρησιμοποιώντας ως καλούπια (A) DNA και (B) RNA.

B) SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism) ⁶⁶

Η ανάλυση SSCP⁶⁶ είναι μια από τις πιο ευρέως χρησιμοποιούμενες μεθόδους ανάδειξης μεταλλάξεων στη μοριακή εργαστηριακή πρακτική. Η πιθανότητα ανάδειξης μεταλλάξεων με την SSCP αγγίζει το 80%.

Η ανάλυση SSCP βασίζεται στην ήπια μετουσίωση των μορίων του DNA, έτσι ώστε οι δύο κλώνοι να διαχωρίζονται μεταξύ τους από τη μια, από την άλλη όμως να διατηρούν τη δευτεροταγή και τριτοταγή δομή τους και έτσι να διαχωρίζονται όχι με βάση το φορτίο τους, αλλά με βάση το μέγεθος και τη μορφή τους.

Στη μέθοδο αυτή τα gel που χρησιμοποιούνται για την ηλεκτροφόρηση των τμημάτων του DNA αποτελούνται κυρίως από 12% ακριλαμίδη και οι ιδεώδεις θερμοκρασίες ηλεκτροφόρησης στα gel αυτά κυμαίνονται μεταξύ 4⁰C και 20⁰C. Η προσθήκη ουδέτερων συστατικών στο gel (π.χ. Γλυκερόλη 50-150 mL/L) δίνει στο υλικό μεγαλύτερη δυνατότητα ηλεκτροφορητικού διαχωρισμού. Πρόσφατα περιγράφηκε η προσθήκη πολυαιθυλενικής γλυκόλης (PEG) στα gel ακριλαμίδης της κλασσικής SSCP, βελτιώνοντας την απλότητα και την πολλαπλή χρησιμότητα της μεθόδου και επιτρέποντας το διαχωρισμό μεγαλύτερων δειγμάτων DNA (μέχρι και 400-500 αλληλουχιών, σε σχέση με τις 200-300 της απλής SSCP). Η PEG αυξάνει τη γλοιότητα του gel και επιτρέπει καλύτερο διαχωρισμό με μικρότερη απόσταση διαδρομής των δειγμάτων κατά την ηλεκτροφόρηση.

Η μέθοδος SSCP έχει ως εξής:

1) Προετοιμασία των gel πολυακριλαμίδης και των ρυθμιστικών διαλυμάτων

Για την παρασκευή 500g/L PEG διαλύουμε 50g PEG 6000 (Sigma, Deisenhofen, Germany) σε 100ml απιονισμένου νερού και προσθέτουμε 0,01g αζίδιο νατρίου. Η σύσταση του gel είναι 12% acrylamide με N,N'-methylenebisacrylamide και 5g/L τελική συγκέντρωση PEG.

Το ρυθμιστικό διάλυμα του gel αποτελείται από 60mmol/L φορμικό οξύ και 1mol/L διαλύματος Tris (pH 9,0).

Το ρυθμιστικό διάλυμα μεταφοράς αποτελείται από 0,5mol/L διαλύματος Tris και 50mmol/L γλυκίνη ή αλανίνη (pH 8,3-8,6).

2) Προετοιμασία των δειγμάτων

Αφού απομονώθηκε το RNA από τα CD43+ και τα CD43- κύτταρα του ίδιου ασθενούς και έγινε μετατροπή με RT-PCR σε cDNA, ελήφθησαν με PCR τμήματα του CD43-cDNA μεγέθους 300-500bp καθόλο το μήκος του cDNA με αλληλοεπικάλυψη. Τα δείγματα αραιώθηκαν με ισοδύναμο όγκο διαλύματος με 10mmol/L EDTA και 1g/L SDS. Τα αραιωμένα δείγματα μετουσιώθηκαν με βαφή φορμαμίδης σε τελικό όγκο 20μL.

Βαφή φορμαμίδης
980 mL/L φορμαμίδη
10mmol/L EDTA
0,25g/L xylene cyanol FF
0,25g/L bromophenol blue

Στη συνέχεια τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε βραστό νερό για 3 min και μετά ψύχθηκαν στον πάγο πριν τοποθετηθούν στο gel πολυακριλαμίδης για την ηλεκτροφόρηση.

3) Ηλεκτροφόρηση

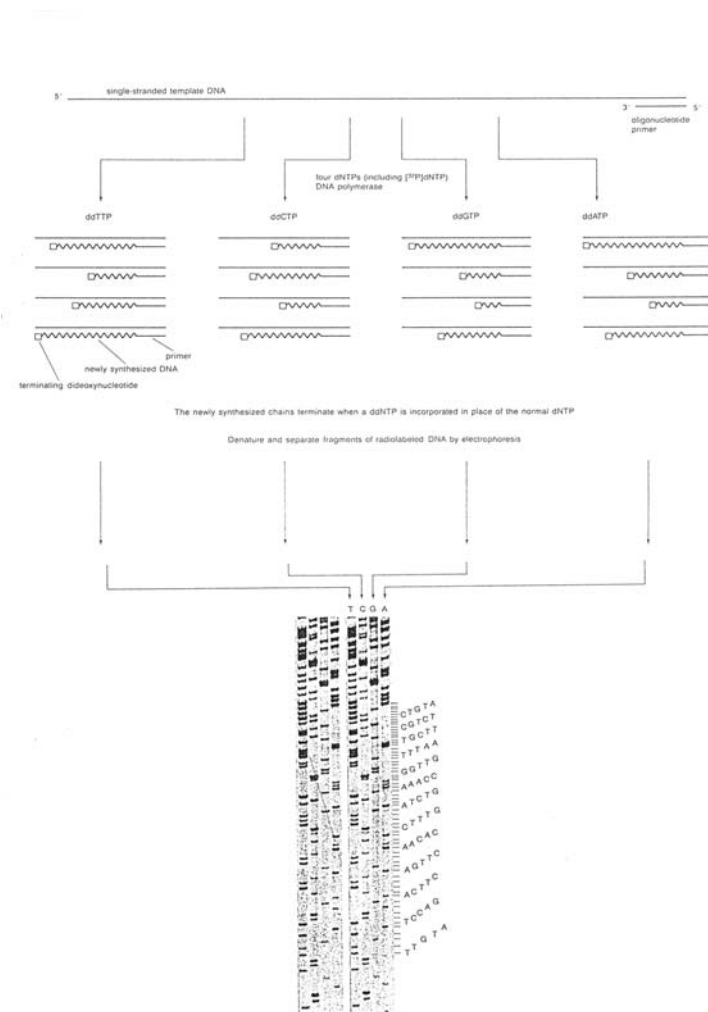
Για την ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων χρησιμοποιείται η συσκευή MightySmall SE 250 (Hoefler Scientific Instruments, San Fransisco, CA). Στη συσκευή -που περιέχει

το ρυθμιστικό διάλυμα μεταφοράς- τοποθετούνται κατακόρυφα πλάκες του gel μεγέθους 80 x 70 x 0,75mm και η ηλεκτροφόρηση γίνεται με συνεχές ρεύμα ισχύος 5W. Ο χρόνος ολοκλήρωσης της ηλεκτροφορητικής διαδικασίας ήταν 3 ώρες. Μετά την ολοκλήρωση της ηλεκτροφόρησης, τα gel βάφτηκαν με χρώση αργύρου και αφέθηκαν να στεγνώσουν για να μελετηθεί το αποτέλεσμα της ηλεκτροφόρησης. Σε κάθε ασθενή συγκρίθηκε η απόσταση που διένυσε το CD43-cDNA των CD43+ με αυτό των CD43- κυττάρων. Η πιθανότητα μεταλλάξεων υπάρχει όταν ένα τμήμα DNA βρεθεί σε διαφορετική απόσταση από το αντίστοιχο φυσιολογικό μετά την ολοκλήρωση της ηλεκτροφορητικής διαδικασίας.

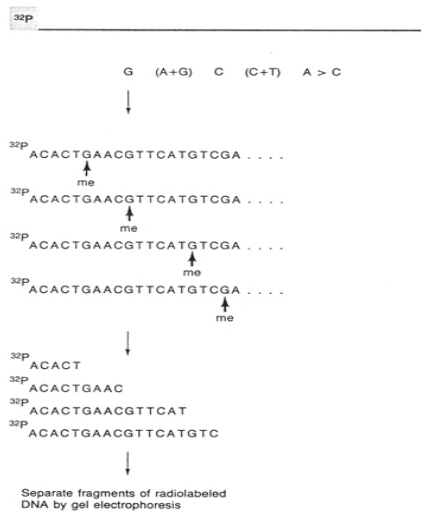
Γ) DNA SEQUENCE ANALYSIS

Οι πιο συχνά χρησιμοποιούμενες τεχνικές για την ανάλυση της αλληλουχίας (sequence)⁶⁵ του DNA σήμερα είναι η ενζυμική μέθοδος των Sanger et al (1977) και η μέθοδος της χημικής διάσπασης των Maxam και Gilbert (1977). Αν και στις αρχές τους διαφέρουν πολύ, αυτές οι δύο μέθοδοι διαχωρίζουν πληθυσμούς ραδιοσημασμένων ολιγονουκλεοτιδίων που ξεκινούν από ένα καθορισμένο σημείο τερματίζουν τυχαία σε μία καθορισμένη αλληλουχία ή συνδυασμό αλληλουχιών. Επειδή κάθε βάση του DNA κατέχει ισοδύναμη πιθανότητα να αποτελεί το τελικό άκρο του μορίου, κάθε πληθυσμός αποτελείται από ένα μείγμα ολιγονουκλεοτιδίων των οποίων τα μήκη καθορίζονται από τη θέση της ειδικής βάσης (της σημασμένης) κατά μήκος του αρχικού DNA, στην οποία και σταματά η επέκταση του νεοσχηματιζόμενου ολιγονουκλεοτιδίου. Οι πληθυσμοί αυτοί των ολιγονουκλεοτιδίων έπειτα διαχωρίζονται με ηλεκτροφόρηση κάτω από συνθήκες που επιτρέπουν τη διάκριση μεταξύ των διαφόρων DNA που διαφέρουν σε μήκος ακόμα και κατά ένα νουκλεοτίδιο. Όταν οι πληθυσμοί των ολιγονουκλεοτιδίων τοποθετούνται σε παρακείμενες σειρές του gel, η σειρά των νουκλεοτιδίων κατά μήκος του DNA μπορεί να διαβαστεί άμεσα με μια αυτοραδιογραφική εικόνα του gel. →Η μέθοδος Sanger et al περιέγραψε πρώτη (1) τη χρήση ειδικών εκκινητών (primers) και επέκτασή τους με DNA πολυμεράση, (2) τον τερματισμό μιας αλύσου σε μια ειδική βάση, και (3) τη χρήση gel πολυακρυλαμίδης για τη διάκριση μεταξύ μονόκλωνων αλύσεων DNA που διαφέρουν ως προς το μέγεθος ακόμα και σε επίπεδο ενός νουκλεοτιδίου. Η μέθοδος αυτή γνώρισε σπουδαία εφαρμογή και γενική αποδοχή όταν εισήχθησαν σ'αυτή τα τριφωσφορικά διδεοξυνουκλεοσίδια (ddNTPs). Τα τελευταία διαφέρουν από τα τριφωσφορικά δεοξυνουκλεοσίδια (dNTPs) στο ότι στη θέση 3' της δεοξυριβόζης στερούνται ενός -OH υπολείμματος. Κατά την επέκταση ενός primer με τη βοήθεια μιας DNA πολυμεράσης που χρησιμοποιεί τέτοια διδεοξυνουκλεοσίδια, όταν ένα τέτοιο ddNTP ενσωματωθεί στον νεοσχηματιζόμενο κλώνο, η αντίδραση επέκτασης σταματά λόγω αποτυχίας σχηματισμού φωσφοδιεστερικού δεσμού μεταξύ ddNTP και του συμπληρωματικού του dNTP στον απλό κλώνο του DNA-καλουπιού. Έτσι, όταν μια DNA πολυμεράση χρησιμοποιεί ένα ddNTP ανάμεσα στα 4 dNTPs, τότε θα παράγονται ολιγονουκλεοτίδια που θα έχουν διαφορετικό κάθε φορά μήκος (ακόμα και κατά μία βάση), ανάλογα με το ποιο ddNTP ενσωματώθηκε κάθε φορά στο νεοσχηματιζόμενο κλώνο και πού τερματίστηκε η αντίδραση επέκτασης. Η μέθοδος Sanger λοιπόν χρησιμοποιεί 4 ξεχωριστές ενζυμικές αντιδράσεις, με διαφορετικό ddNTP στην κάθε μία, και τα παραγόμενα ολιγονουκλεοτίδια ηλεκτροφορούνται σε gel πολυακρυλαμίδης. Επειδή έχει προηγηθεί σήμανση των νουκλεοσιδίων με ³⁵S, λαμβάνεται μια αυτοραδιογραφική εικόνα και έτσι μπορεί να "διαβάζεται" τελικά η αλληλουχία βάσεων του τμήματος του DNA που ξεκινά μετά τον αρχικό primer (εικόνα 11).

→ Αντίθετα με τη μέθοδο Sanger, η μέθοδος Maxam-Gilbert περιλαμβάνει τη χημική διάσπαση του αρχικού DNA. Κατά τη μέθοδο αυτή ένα τμήμα του DNA ραδιοσημαίνεται στο ένα του άκρο και σταδιακά κόβεται μέσω 5 διαδοχικών ενζυμικών αντιδράσεων, κάθε μία από τις οποίες είναι ειδική για μια συγκεκριμένη βάση ή τύπο βάσης. Αρχικά οι ειδικές αυτές βάσεις ή τύποι βάσεων υφίστανται μια ενζυμική τροποποίηση και στη συνέχεια η τροποποιημένη βάση απομακρύνεται από το σάκχαρό της και διασπάται ο φωσφοδιεστερικός δεσμός 5' και 3'. Αυτό δημιουργεί 5 πληθυσμούς ραδιοσημασμένων μορίων που εκτείνονται από ένα συγκεκριμένο σημείο (προκαθορισμένο λόγω της σήμανσης) ως το σημείο της ενζυμικής αποκοπής. Το μήκος αυτών των 5 ραδιοσημασμένων μορίων καθορίζεται από την τοποθεσία της ειδικής βάσης στο αρχικό DNA στην οποία έγινε η ενζυμική αποκοπή. Οι πληθυσμοί αυτοί στη συνέχεια διαχωρίζονται με ηλεκτροφόρηση σε gel πολυακρυλαμίδης, και τα ραδιοσημασμένα μόρια εμφανίζονται με αυτοραδιογραφία. Η αλληλουχία των βάσεων του DNA μπορεί έπειτα να διαβαστεί με τη σύγκριση των περιοχών G, A+G, C+T, C και A>C. Η μέθοδος Maxam-Gilbert γενικά χρησιμοποιείται λιγότερο από τη μέθοδο Sanger, και λειτουργεί ιδανικά για αλληλουχίες DNA που εκτείνονται σε μήκος λιγότερο από 250 αλληλουχίες βάσεων από το ραδιοσημασμένο άκρο του DNA (εικόνα 12).



ΕΙΚΟΝΑ 11: Παράδειγμα ελέγχου αλληλουχίας DNA με τη μέθοδο DNA sequence analysis τύπου SANGER.



ΕΙΚΟΝΑ 12: Παράδειγμα ελέγχου αλληλουχίας DNA με τη μέθοδο DNA sequence analysis τύπου MAXAM-GILBERT.

9) ΔΟΚΙΜΑΣΙΑ ΣΥΓΚΟΛΛΗΣΗΣ (AGGREGATION ASSAY)

Οι ποσοτικές δοκιμασίες συγκόλλησης⁵⁷ εκτελέστηκαν σε μικροπλάκα ιστικών καλλιέργειών 96 θηκών (Costar, Cambridge, USA). Αρχικά διαχωρίστηκαν τα μονοκύτταρα και τα πολυμορφοπύρηνια του περιφερικού αίματος των ασθενών και των μαρτύρων με τη βοήθεια διαλύματος sodium metrizoate/dextran που προαναφέρθηκε (polymorphprep-Nycomed Pharma, Oslo) και στη συνέχεια αραιώθηκαν σε διάλυμα με 10% ορό εμβρύου βοός + RPMI-1640 (καλλιεργητικό υλικό). Η αραιώση ήταν τέτοια ώστε τελικά να πετύχουμε διάλυμα 5×10^5 κυττάρων/ml. Κατόπιν στα κύτταρα προστέθηκε αντι-CD43 μονοκλωνικό αντίσωμα DF-T1 (που συνδέεται με την 115kDa ισομορφή του CD43) 10μg/ml και 100μl από το τελικό διάλυμα επώασθη για 1-72 ώρες στους 37°C. Κάθε 3 ώρες γινόταν έλεγχος της συγκόλλησης μέσω καταμέτρησης των μη συγκολλημένων κυττάρων. Αυτό γινόταν με τη βοήθεια μιας πλάκας καταμέτρησης τύπου Neubauer, στην οποία μεταφερόταν δείγμα του καθενός από τα πιο πάνω διαλύματα των ασθενών και των μαρτύρων (αφού αναδευόταν πάνω-κάτω 20 φορές με τη βοήθεια πιπέττας). Το ποσοστό της συγκόλλησης υπολογιζόταν με τη βοήθεια του τύπου:

$$\left\{ 1 - \frac{\text{αριθμός μη συγκολλημένων κυττάρων}}{\text{συνολικός αριθμός κυττάρων}} \right\} \times 100 (\%).$$

Η χρώση των κυττάρων με κυανό του μεθυλενίου βοηθούσε στην αναγνώριση των διαφόρων κυτταρικών πληθυσμών. Σε όλες τις περιπτώσεις υπολογιζόταν η τυχαία συγκόλληση με την επώαση κυττάρων σε καλλιεργητικό υλικό χωρίς την παρουσία μονοκλωνικού αντισώματος ή με επώαση των κυττάρων με ανοσοσφαιρίνη mouse anti-mouse.

10) ΑΝΟΣΟΕΝΖΥΜΙΚΗ ΜΕΘΟΔΟΣ (ELISA)

Χρησιμοποιήθηκε μια ευαίσθητη ανοσοενζυμική μέθοδος sandwich⁶⁷ προκειμένου να μετρηθούν το διαλυτό (soluble) μόριο sVCAM ως δείκτη της ενεργοποίησης των ενδοθηλιακών κυττάρων. Χρησιμοποιήθηκαν τα kits ELISA (R & D) σύμφωνα με τις

κατασκευαστικές οδηγίες. Λήφθηκαν 100μl ορού από τους ασθενείς και τους μάρτυρες και επωάσθηκαν για 1 ώρα στους 37⁰C στις 96 θήκες των ειδικών μικροπλακών (12 σειρές x 8 θήκες η καθεμία) των kits, τα οποία προηγουμένως είχαν επικαλυφθεί με το μονοκλωνικό αντίσωμα ποντικού anti-sVCAM. Για τη δημιουργία μιας καμπύλης αναφοράς είχαν χρησιμοποιηθεί προηγουμένως συγκεκριμένες συγκεντρώσεις ανθρώπινων ανασυνδυασμένων sVCAM με διαδοχικές αραιώσεις. Αφού ακολούθως το περιεχόμενο κάθε θέσης πλύθηκε 3 φορές, προστέθηκαν 100μl πολυκλωνικού anti-sVCAM προβάτου συνδεδεμένου αυτή τη φορά με υπεροξειδάση, και επωάσθηκε για 1 ώρα. Ακολούθησαν ακόμα 3 πλύσεις και προστέθηκε το ειδικό υπόστρωμα για 30 min. Τέλος, προστέθηκαν 100μl από το διάλυμα τερματισμού της αντίδρασης και το παραγόμενο -από το υπόστρωμα- χρώμα μετρήθηκε στα 480nm.

11) ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

Τα δεδομένα αναλύθηκαν⁶⁸ χρησιμοποιώντας το παραμετρικό **Unpaired Student's t-test** και το μη-παραμετρικό **Wilcoxon Whitney-Mann test**. Οι παραμετρικοί συντελεστές συσχέτισης **Pearsons** και οι μη παραμετρικοί **Spearman's rho** χρησιμοποιήθηκαν για να αναδείξουν τη συσχέτιση μεταξύ των ποικίλων παραμέτρων που μελετήθηκαν. Η παραμετρική μέθοδος ανάλυσης της μεταβλητότητας μιας κατεύθυνσης (**ANOVA**) και οι μη παραμετρικές μέθοδοι **Kruskal-Wallis test** και **post-hoc test πολλαπλής σύγκρισης** χρησιμοποιήθηκαν για να αναγνωρίσουν διαφορές μεταξύ των διαφόρων ομάδων. Από τη στιγμή που και με τις δύο μεθόδους εξασφαλίστηκαν παρόμοια αποτελέσματα, η παρουσίαση των αποτελεσμάτων θα γίνει με τις παραμετρικές μεθόδους.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

ΦΑΙΝΟΤΥΠΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΩΝ ΜΟΝΟΚΥΤΤΑΡΩΝ ΣΤΟΥΣ MDS ΑΣΘΕΝΕΙΣ

Τα αποτελέσματα φαίνονται αναλυτικά στον πίνακα 17.

ΠΙΝΑΚΑΣ 17: Αποτελέσματα φαινοτυπικής ανάλυσης των μονοκυττάρων των ασθενών με MDS (ανά κατηγορία FAB) και των μαρτύρων- Οι τιμές παρουσιάζονται ως: μέση τιμή ± SD

ΑΝΤΙΓΟΝΑ	RA	RARS	RAEB	RAEB-t	CMML	ΜΑΡΤΥΡΕΣ	ΣΥΝΟΛΟ MDS
CD11b-RFI	3,15±1,53	3,70±1,81	3,83±1,50	2,84±0,45	2,73±0,73	2,05±0,46	3,32±1,15
	P=0,007	P=0,001	P<0,001	NS	NS		P=0,001
CD11b⁺ %	63,52±30,44	74,04±14,9	60,18±21,52	91±8,49	70,80±23,89	73,04±17,59	67,83±23,96
	NS	NS	NS	NS	NS		NS
CD18-RFI	2,8±0,86	2,95±0,55	2,97±1,17	3,65±0,75	4,08±0,70	2,42±0,86	3,01±0,9
	NS	NS	NS	P<0,001	P<0,001		P=0,018
CD18⁺ %	79±17,48	87,22±15,31	72,55±12,26	82±4,24	79,94±18,14	88,38±9,67	79,89±15,69
	NS	NS	NS	NS	NS		P=0,04
CD35-RFI	2,63±0,90	3,24±1,40	3,22±1,18	2,49±0,37	2,48±0,93	1,85±0,40	2,84±1,08
	P=0,007	P<0,001	P<0,001	NS	NS		P=0,001
CD35⁺ %	65,86±29,73	50,28±24,61	45,65±29,77	49,75±66,82	64,20±29,07	50,11±26,44	56,61±29,90
	NS	NS	NS	NS	NS		NS
CD38-RFI	2,70±0,81	2,9±1,15	3,16±1,03	2,71±0,14	3,41±1,19	2,18±0,49	2,88±0,95
	P=0,05	P=0,029	P=0,007	NS	P=0,006		P=0,004
CD38⁺ %	49,11±23,10	55,9±24,17	75,25±17,92	48,50±28,99	38,40±24,40	58,39±22,91	68,42±19,73
	NS	NS	NS	NS	NS		NS
CD44-RFI	17,56±7,90	17,25±7,34	17,99±9,51	15,07±4,10	14,01±6,51	23,59±6,32	17,03±7,75
	P=0,008	P=0,019	P=0,046	P=0,033	P=0,003		P=0,001
CD44⁺ %	73,18±19,20	69,38±24,65	77,03±23,84	64±25,46	67,54±29,69	91,51±6,71	71,83±22,33
	P=0,012	P=0,007	P=0,02	P=0,001	P=0,017		P=0,001
CD69-RFI	2,12±0,88	2,52±0,98	2,72±1,03	2,17±0,88	2,26±0,64	1,85±0,40	2,33±0,91
	P<0,001	P<0,001	P<0,001	P<0,003	P<0,001		P<0,001
CD69⁺ %	32,63±14,99	31,66±23,81	32,50±16,74	31,75±18,03	38,92±15,67	4,34±1,78	33,17±17,24
	P<0,001	P<0,001	P<0,001	P<0,001	P<0,001		P<0,001
CD43-RFI	4,40±1,75	4,47±2,17	3,71±1,99	3,29±1,97	4,45±1,80	5,88±1,03	4,23±1,89
	P=0,005	P=0,025	P=0,001	P=0,003	NS		P=0,001
CD43⁺ %	66,18±18,92	70,32±20,87	66,51±22,91	88,5±12,02	65,80±19,07	81,22±12,80	54,93±24,58
	NS	NS	NS	NS	NS		P=0,006

NS: μη στατιστικά σημαντικό αποτέλεσμα

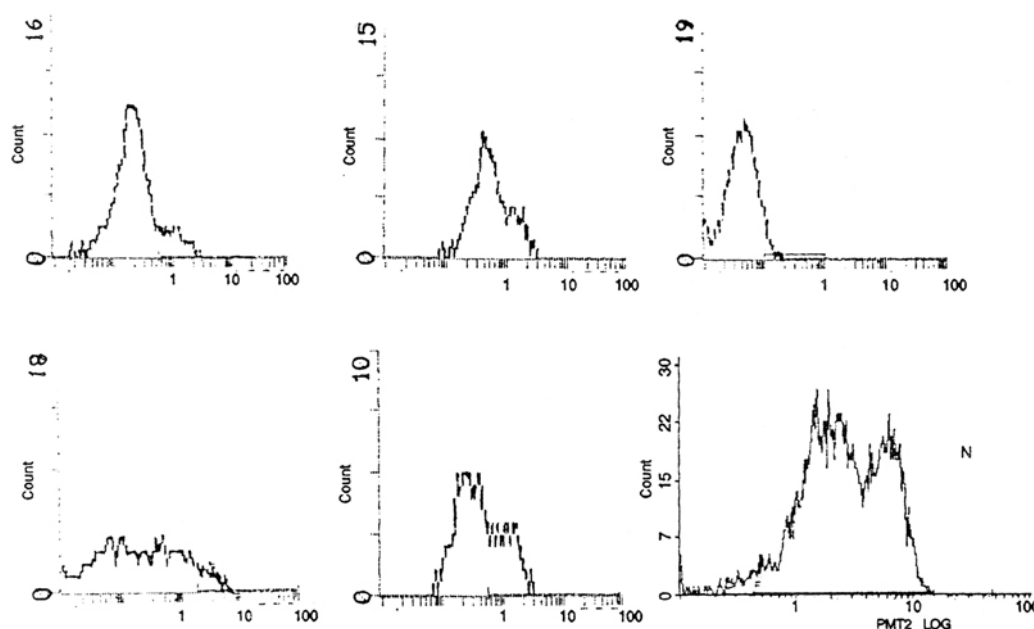
%: Ποσοστό θετικών κυττάρων για κάθε αντιγόνο επιφανείας

RFI: σχετική ένταση φθορισμού

p: επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας μεταξύ ασθενών της κάθε ομάδας και των μαρτύρων

Συνοπτικά:

•Το CD43 βρέθηκε να υποεκφράζεται στους ασθενείς με MDS σε σχέση με τους μάρτυρες. Η υποέκφραση του μορίου περιλάμβανε την εκατοστιαία αναλογία των CD43+ κυττάρων, η οποία ήταν χαμηλότερη στους ασθενείς σε σχέση με τους μάρτυρες ($p=0,006$), καθώς και την RFI, η οποία ήταν επίσης χαμηλότερη στους ασθενείς σε σχέση με τους μάρτυρες ($p=0,001$) (εικόνα 13).



ΕΙΚΟΝΑ 13: Μερικές ενδιαφέρουσες καμπύλες φθορισμού που παρατηρήθηκαν κατά τον έλεγχο των μονοκυττάρων ασθενών με MDS που είχαν προηγουμένως επωασθεί με anti-CD43 DF-T1 μονοκλωνικό αντίσωμα. Η καμπύλη του φυσιολογικού μάρτυρα απεικονίζεται με N. Η CD43-fMCV είναι χαμηλή στις περισσότερες περιπτώσεις. Φυσιολογικά παρατηρεί κανείς δύο πληθυσμούς μονοκυττάρων: ένα πληθυσμό CD43-high και ένα CD43-low. Στα MDS ο πληθυσμός CD43-high εξαφανίζεται, ενώ ελαττώνεται η fMCV του CD43-low.

Τα αποτελέσματα του post hoc test πολλαπλής σύγκρισης έδειξαν ότι οι ασθενείς με RA, RARS, RAEB και RAEB-t είχαν σε στατιστικά σημαντικό βαθμό χαμηλότερη τιμή RFI σε σχέση με τους ασθενείς με CMML και με τους μάρτυρες. Η εκατοστιαία αναλογία των CD43+ κυττάρων δε διέφερε μεταξύ των διαφόρων MDS ομάδων. Επίσης παρατηρήθηκε αρνητική συσχέτιση μεταξύ της έκφρασης του CD43 και των CD11b ($r=-0,605$, $p<0,001$), CD35 ($r=-0,3991$, $p<0,001$) και CD69 ($r=-0,3869$, $p=0,0001$) και θετική συσχέτιση μεταξύ της έκφρασης του CD43 και του CD44 ($r=0,328$, $p<0,001$) (εικόνα 14).

•Οι υποδοχείς 1 (CD35) και 3 (CD11b) του συμπληρώματος βρέθηκε να υπερεκφράζονται στους ασθενείς με MDS. Η RFI ήταν αυξημένη σε στατιστικά σημαντικό βαθμό στους ασθενείς σε σχέση με τους μάρτυρες ($p=0,001$ και $0,001$ αντίστοιχα), ενώ η εκατοστιαία αναλογία CD35+ και CD11b+ κυττάρων δε διέφερε σημαντικά μεταξύ των διαφόρων MDS ομάδων και των μαρτύρων, αυξημένη ήταν όμως η αναλογία των CD11b+ κυττάρων στο σύνολο των MDS ασθενών σε σχέση με τους μάρτυρες ($p=0,04$). Οι ασθενείς με RA, RARS και RAEB είχαν σε στατιστικά σημαντικό βαθμό υψηλότερα επίπεδα CD35-RFI σε σχέση με τους μάρτυρες ($p=0,007$, $<0,001$, $<0,001$ αντίστοιχα), και CD11b-RFI σε σχέση με τους μάρτυρες ($p=0,007$, $=0,001$, $=0,001$ αντίστοιχα), ενώ οι ασθενείς με RAEB-t και CMML δε

διέφεραν σημαντικά ως προς την RFI από τους μάρτυρες. Θετική συσχέτιση βρέθηκε μεταξύ της έκφρασης του CD11b και των CD35 ($r=0,871$, $p<0,001$), CD38 ($r=0,272$, $p=0,044$) και CD69 ($r=0,690$, $p<0,001$) και αρνητική συσχέτιση μεταξύ της έκφρασης του CD11b και του CD44 ($r= -0,545$, $p<0,001$) (**εικόνα 14**).

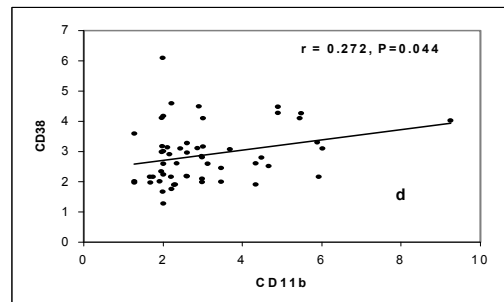
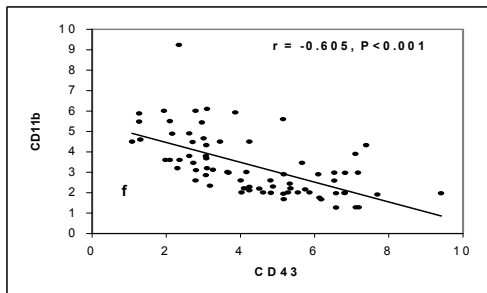
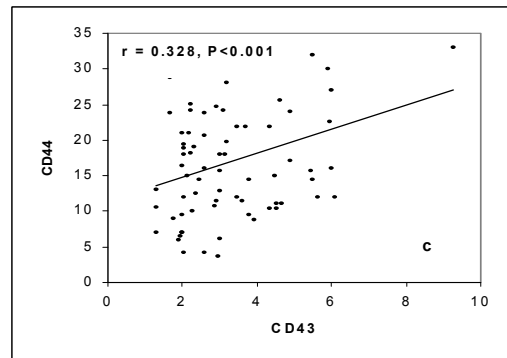
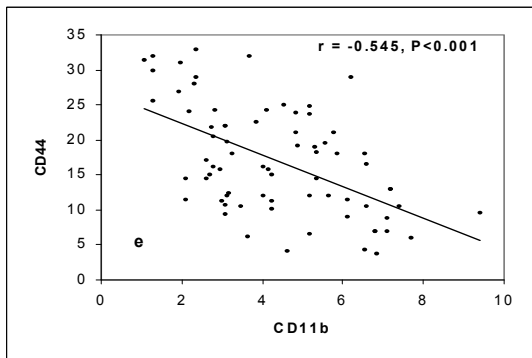
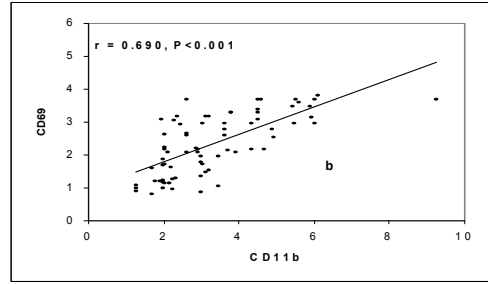
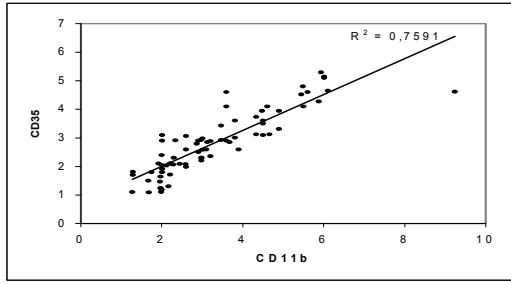
•Αυξημένη έκφραση του CD18 βρέθηκε επίσης στα μονοκύτταρα των ασθενών με MDS στη μελέτη μας, με ιδιαίτερα αυξημένα επίπεδα RFI στο σύνολο των ασθενών σε σχέση με τους μάρτυρες ($p=0,018$) και στους ασθενείς με RAEB-t και CMML σε σχέση με τους μάρτυρες ($p<0,001$), σε αντίθεση με τους ασθενείς των υπόλοιπων MDS κατηγοριών που δε διέφεραν από τους μάρτυρες. Η αναλογία των CD18+ κυττάρων δεν παρουσίαζε στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των ασθενών των διαφόρων MDS υποομάδων και των μαρτύρων.

•Στα μονοκύτταρα των ασθενών με MDS βρέθηκε επίσης αυξημένη έκφραση του μορίου πρώιμης ενεργοποίησης (του CD69). Τα CD69+ κύτταρα ήταν σε στατιστικά σημαντικό βαθμό υψηλότερα στους ασθενείς σε σχέση με τους μάρτυρες ($p<0,001$), ενώ η RFI ήταν επίσης υψηλότερη σε στατιστικά σημαντικό βαθμό στους ασθενείς σε σχέση με τους μάρτυρες ($p<0,001$). Η τιμή της RFI ήταν σε στατιστικά σημαντικό βαθμό υψηλότερη σε κάθε μια από τις MDS υποκατηγορίες σε σχέση με τους μάρτυρες ($p<0,001$ για RA, RARS, RAEB, CMML, $p<0,003$ για RAEB-t).

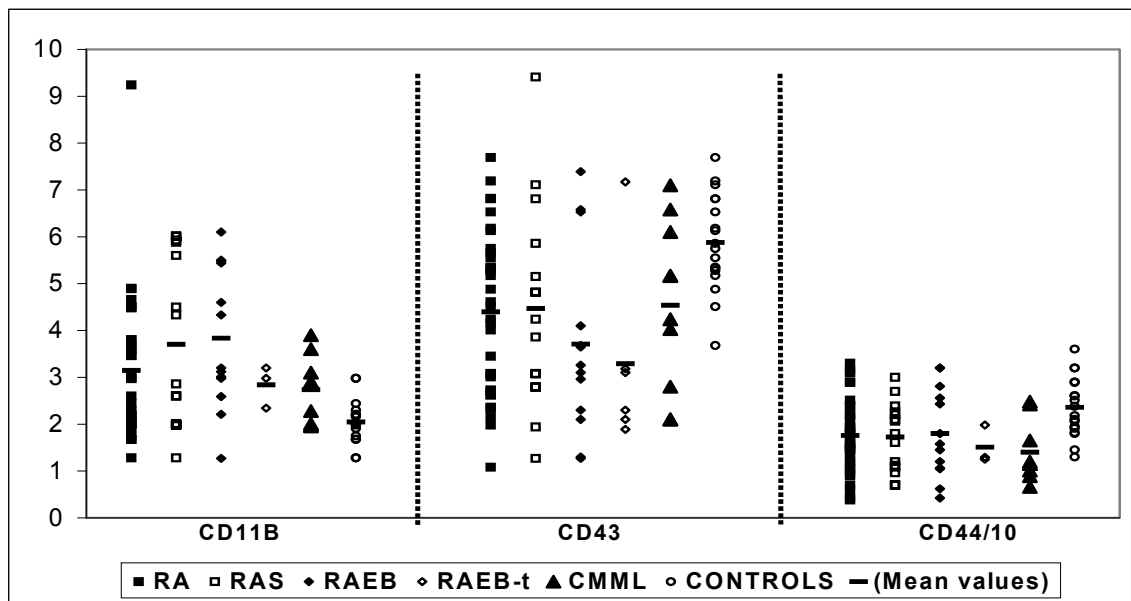
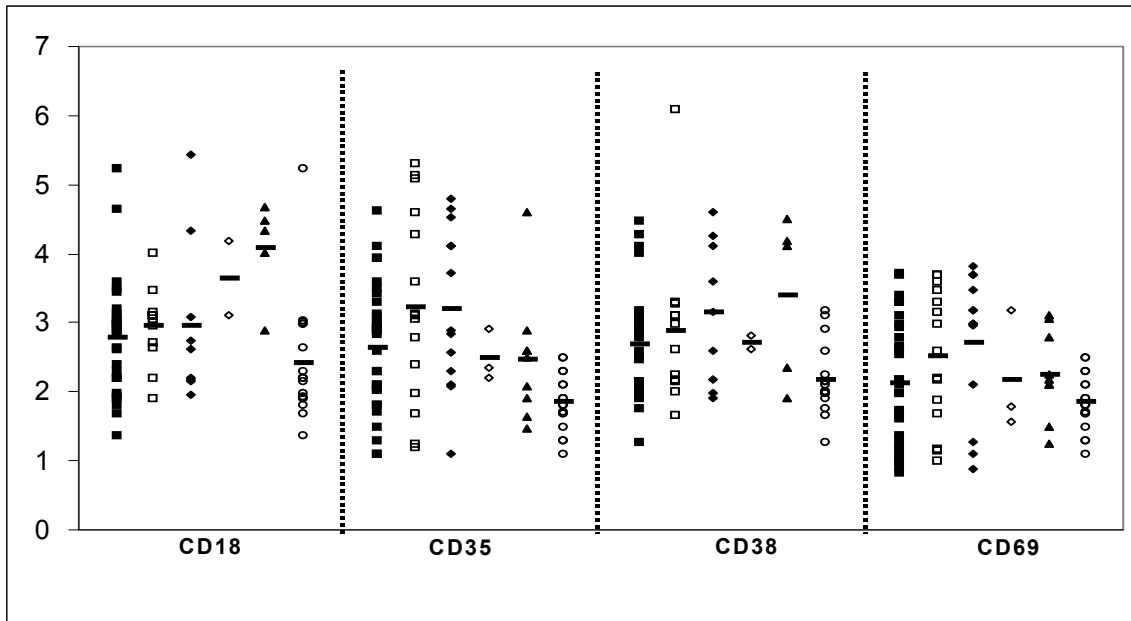
•Αυξημένη ήταν και η έκφραση του μορίου ενεργοποίησης CD38 σ'ό,τι αφορά στην RFI ($p=0,004$), ενώ η αναλογία των CD38+ κυττάρων δεν παρουσίαζε στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των ασθενών των διαφόρων MDS ομάδων και των μαρτύρων. Η ομάδα των RAEB-t ασθενών δε διέφερε σημαντικά από τους μάρτυρες ως προς την RFI, κάτι που συνέβαινε για κάθε μία από τις υπολοίπες MDS υποομάδες ξεχωριστά.

•Το αντιγόνο CD44 (leukocyte homing receptor) βρέθηκε να υποεκφράζεται στους MDS ασθενείς της μελέτης μας σε σχέση με τους μάρτυρες. Η αναλογία των CD44+ κυττάρων των ασθενών ήταν χαμηλότερη σε σχέση με τους μάρτυρες, τόσο στο σύνολο των MDS ασθενών ($p=0,001$) όσο και σε κάθε μία από τις υποομάδες MDS ξεχωριστά. Η RFI των ασθενών ήταν επίσης χαμηλότερη από τους μάρτυρες, τόσο στο σύνολο των MDS ασθενών ($p=0,001$) όσο και σε κάθε μία από τις υποομάδες MDS ξεχωριστά.

Στην **εικόνα 15** φαίνονται σε διαγράμματα οι RFI των αντιγόνων επιφανείας που ελέγχθηκαν στα μονοκύτταρα των MDS ασθενών.



ΕΙΚΟΝΑ 14: Η αρνητική συσχέτιση μεταξύ της έκφρασης του CD11b και των CD44 και CD43 και η θετική συσχέτιση μεταξύ της έκφρασης του CD11b και των CD69, CD35 και CD38 και μεταξύ της έκφρασης του CD43 και του CD44 στα μονοκύτταρα των ασθενών με MDS.



ΕΙΚΟΝΑ 15: Απεικόνιση των RFI των αντιγόνων επιφανείας που μελετήθηκαν στα μονοκύτταρα των ασθενών με MDS. Οι τιμές για το CD44 έχουν διαιρεθεί με το 10.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑ ΔΟΚΙΜΑΣΙΑΣ ΣΥΓΚΟΛΛΗΣΗΣ ΣΤΑ ΜΟΝΟΚΥΤΤΑΡΑ

Η τυχαία συγκόλληση στους ασθενείς ήταν 2 φορές αυξημένη σε σχέση με τους μάρτυρες ($5 \pm 1,2\%$ και $2,1 \pm 1,09\%$ αντίστοιχα, $p < 0,05$) ενώ η επαγόμενη με anti-CD43 συγκόλληση ήταν 25% μειωμένη στους ασθενείς σε σχέση με τους μάρτυρες (9% στους ασθενείς και 12% στους μάρτυρες) (εικόνα 16).



ΕΙΚΟΝΑ 16: Απεικόνιση της τυχαίας και της μέσω anti-CD43 επαγόμενης συγκόλλησης (στις 72h) των μονοκυττάρων των ασθενών με MDS και των μαρτύρων.

ΦΑΙΝΟΤΥΠΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΩΝ ΟΥΔΕΤΕΡΟΦΙΛΩΝ ΣΤΟΥΣ MDS ΑΣΘΕΝΕΙΣ

Τα αποτελέσματα φαίνονται αναλυτικά στον πίνακα 18.

ΠΙΝΑΚΑΣ 18: Αποτελέσματα φαινοτυπικής ανάλυσης των ουδετερόφιλων των ασθενών με MDS (ανά κατηγορία FAB) και των μαρτύρων- Οι τιμές παρουσιάζονται ως: μέση τιμή ± SD

ΑΝΤΙΓΟΝΑ	RA	RARS	RAEB	RAEB-t	CMML	ΜΑΡΤΥΡΕΣ	ΣΥΝΟΛΟ MDS
CD11b⁺ %	84,4±18,46	81,76±7,60	80,63±17,39	92,33±6,66	81,83±12,34	87,06±10,04	83,07±13,83
	NS	NS	NS	NS	NS		NS
CD11b-RFI	6,6±3,99	5,97±2,91	6,81±3,65	8,69±6,55	6,24±4,3	1,36±0,40	6,50±3,69
	P<0,001	P<0,001	P<0,01	NS	NS		P<0,001
CD43⁺ %	73,67±25,29	77,82±16,61	72,38±26,31	53,67±43,47	66,33±23,62	95,94±3,47	72,79±23,56
	NS	NS	NS	NS	NS		NS
CD43-RFI	3,55±1,98	3,50±1,91	3,28±1,07	2,71±0,54	3,07±0,87	6,05±1,29	3,38±1,64
	P<0,001	P<0,001	P<0,001	P<0,001	P<0,001		P<0,001
CD44⁺ %	94,91±3,76	93,85±3,93	96,5±3,71	94,83±3,75	94,03±2,71	95,44±1,78	94,69±3,68
	NS	NS	NS	NS	NS		NS
CD44-RFI	8,31±3,91	6,55±2,35	7,86±3,04	5,67±0,70	5,64±2,35	10,48±3,86	7,16±3,07
	NS	P<0,01	NS	P<0,001	P<0,05		P<0,01
CD69⁺ %	15,28±10,01	17,53±9,86	20,38±12,99	21,67±6,51	16,73±11,27	2,44±2	17,42±10,26
	NS	P<0,05	NS	NS	NS		P<0,001
CD69-RFI	2,42±1,19	2,42±1,21	2,49±0,95	3,03±1,10	1,99±0,75	1,82±0,44	2,42±1,09
	P<0,001	P<0,001	P<0,001	P<0,01	NS		P<0,001
CD53⁺ %	88,69±13,37	94±4,83	89,13±3,94	93,33±3,21	84,00±13,59	95,33±4,38	90,28±9,75
	NS	NS	P=0,05	NS	NS		NS
CD53-RFI	3,54±1,47	3,44±1,50	3,86±1,89	2,83±1,30	3,35±1,52	9,27±2,35	3,49±1,50
	P<0,001	P<0,001	P<0,001	P<0,001	P<0,001		P<0,001
CD18⁺ %	89,25±8,86	90,06±8,92	89,68±9,83	87±6,24	89,00±6,99	86,28±8,99	89,43±8,42
	NS	NS	NS	NS	NS		NS
CD18-RFI	4,71±1,19	5,12±1,22	11,06±1,62	9,97±0,9	8,67±1,50	4,29±0,79	6,65±2,82
	P<0,01	P<0,001	P<0,001	NS	P<0,001		P<0,001
CD35⁺ %	89,63±7,53	84,12±9,48	92,38±4,96	80,67±8,39	88,50±10,58	91,39±7,76	87,52±8,76
	NS	NS	NS	NS	NS		NS
CD35-RFI	3,34±0,78	3,09±0,52	4,95±0,75	5,43±0,35	4,80±0,49	3,21±0,48	3,81±1,06
	P<0,05	P<0,001	P<0,001	P<0,001	P<0,001		P<0,001

NS: μη στατιστικά σημαντικό αποτέλεσμα

%: Ποσοστό θετικών κυττάρων για κάθε αντιγόνο επιφανείας

RFI: σχετική ένταση φθορισμού

p: επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας μεταξύ ασθενών της κάθε ομάδας και των μαρτύρων

Συνοπτικά:

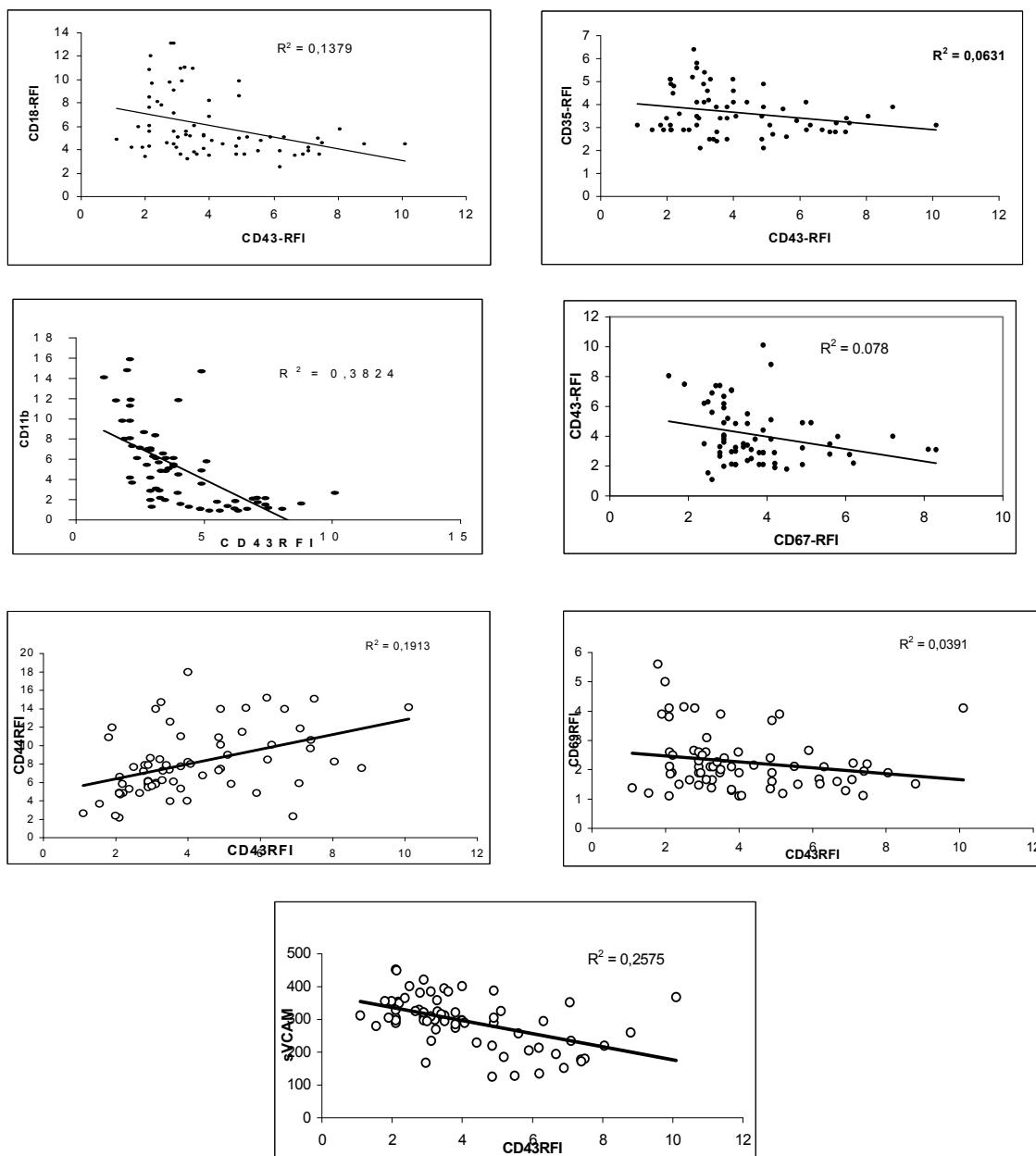
•Στα ουδετερόφιλα των MDS ασθενών το CD43 βρέθηκε να υποεκφράζεται, αφού η RFI ήταν χαμηλότερη σε στατιστικά σημαντικό βαθμό στο σύνολο των ασθενών σε σχέση με τους μάρτυρες (p<0,001). Η RFI ήταν επίσης σε στατιστικά σημαντικό βαθμό χαμηλότερη και σε κάθε μια από τις 5 υποομάδες των MDS ασθενών (p<0,001). Η εκατοστιαία αναλογία των CD43+ κυττάρων δεν παρουσίαζε σημαντικές διαφορές ανάμεσα σε MDS ασθενείς και μάρτυρες. Στους ασθενείς μας δεν ανακαλύφθηκε συσχέτιση μεταξύ της έκφρασης του CD43 και του αριθμού των ουδετερόφιλων.

Αφού παρατηρήθηκε το φαινόμενο αυτό, ελέγχθηκε η πιθανότητα η υποέκφραση του CD43 να σχετίζεται με την παρουσία ενεργοποιημένου φαινοτύπου στα ουδετερόφιλα των MDS ασθενών. Επιλέχθηκαν λοιπόν να ελεγχθούν τα: CD11b, CD35, CD18, CD69, CD44 και CD53. Ο έλεγχος των αντιγόνων αυτών έγινε προ και μετά το διαχωρισμό των κυττάρων με Polymorpher, για να ελεγχθεί μήπως ο διαχωρισμός επηρεάζει το φαινότυπό τους, κάτι που δεν απεδείχθη τελικά.

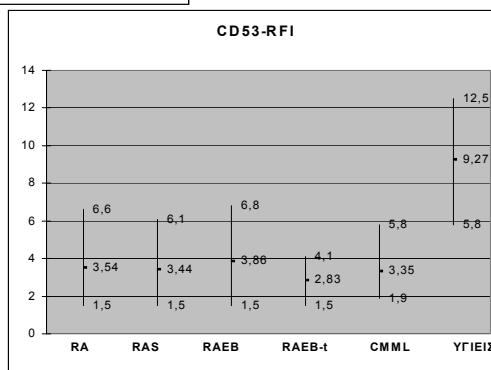
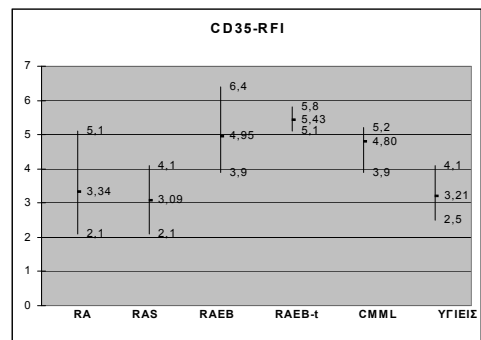
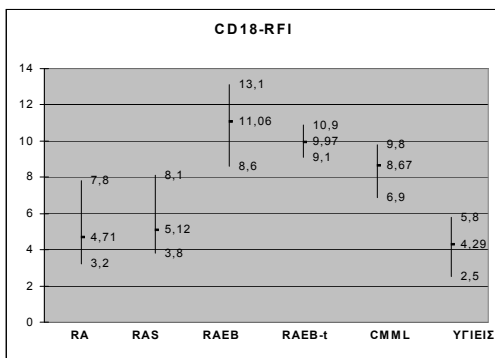
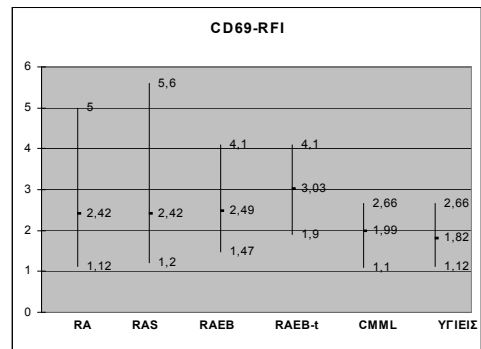
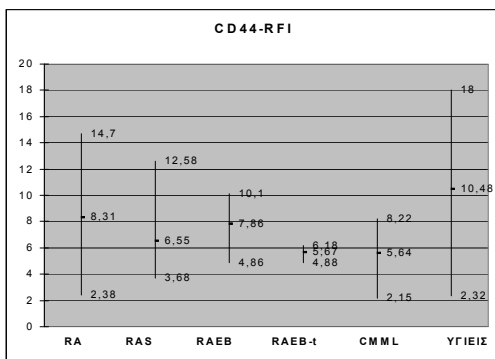
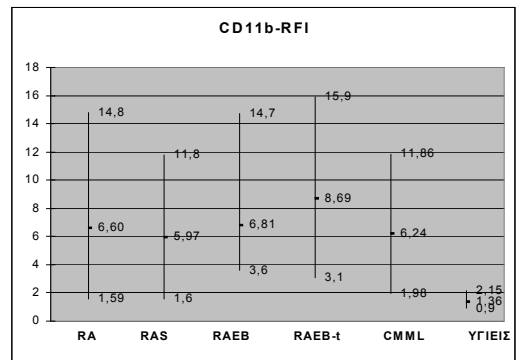
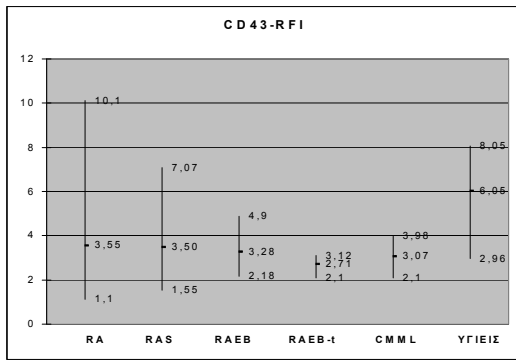
- Η έκφραση του υποδοχέα 3 του συμπληρώματος (CD11b) ήταν σημαντικά αυξημένη στους ασθενείς με MDS σε σχέση με τους μάρτυρες. Στο σύνολο των ασθενών η RFI ήταν σημαντικά υψηλότερη σε σχέση με τους μάρτυρες ($p < 0,001$), ενώ υψηλότερη ήταν η RFI στους ασθενείς με RA, RARS και RAEB ($p < 0,001$, $< 0,001$, $< 0,01$ αντίστοιχα) σε σχέση με τους μάρτυρες, ενώ η RFI των ασθενών με CMML και RAEB-t δε διέφερε σημαντικά από αυτή των μαρτύρων. Η εκατοστιαία αναλογία των CD11b+ κυττάρων δεν παρουσίαζε σημαντικές διαφορές ανάμεσα σε ασθενείς και μάρτυρες.
- Η έκφραση του υποδοχέα 1 του συμπληρώματος (CD35) βρέθηκε επίσης αυξημένη στους ασθενείς με MDS. Η RFI ήταν υψηλότερη σε στατιστικά σημαντικό βαθμό στο σύνολο των ασθενών σε σχέση με τους μάρτυρες ($p < 0,001$), αλλά και σε κάθε μία υποομάδα MDS (στη RA, RARS, RAEB, RAEB-t, CMML αντίστοιχα $p < 0,05$, $< 0,001$, $< 0,001$, $< 0,001$, $< 0,001$). Η εκατοστιαία αναλογία των CD35+ κυττάρων δεν παρουσίαζε στατιστικά σημαντικές διαφορές ανάμεσα στους ασθενείς και τους μάρτυρες.
- Αυξημένη ήταν η έκφραση του CD18 στους ασθενείς με MDS της μελέτης μας. Η RFI ήταν σημαντικά υψηλότερη στο σύνολο των ασθενών σε σχέση με τους μάρτυρες ($p < 0,001$), ενώ δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές στην εκατοστιαία αναλογία των CD18+ κυττάρων ανάμεσα σε ασθενείς και μάρτυρες. Η RFI ήταν υψηλότερη στις υποομάδες RA, RARS, RAEB, CMML (αντίστοιχα $p < 0,01$, $< 0,001$, $< 0,001$, $< 0,001$), ενώ στην υποομάδα RAEB-t οι διαφορές στην RFI μεταξύ ασθενών και μαρτύρων δεν ήταν στατιστικά σημαντικές.
- Αυξημένη ήταν η έκφραση του CD69 στους ασθενείς με MDS της μελέτης μας. Η RFI στο σύνολο των ασθενών ήταν υψηλότερη σε σχέση με τους μάρτυρες ($p < 0,001$), κάτι που συνέβαινε ξεχωριστά και στις υποομάδες RA, RARS, RAEB, RAEB-t (αντίστοιχα $p < 0,001$, $< 0,001$, $< 0,001$, $< 0,01$), όχι όμως και στη CMML, όπου οι διαφορές δεν ήταν στατιστικά σημαντικές. Η εκατοστιαία αναλογία των CD69+ κυττάρων ήταν αυξημένη στο σύνολο των ασθενών σε σχέση με τους μάρτυρες ($p < 0,001$).
- Αντίθετα, η έκφραση του CD44 στους ασθενείς της μελέτης μας ήταν μειωμένη σε σχέση με τους μάρτυρες. Πράγματι, η RFI στο σύνολο των ασθενών ήταν χαμηλότερη των μαρτύρων σε στατιστικά σημαντικό βαθμό ($p < 0,01$), κάτι που συνέβαινε ξεχωριστά και στις υποομάδες RARS, RAEB-t, CMML (αντίστοιχα $p < 0,01$, $< 0,001$, $< 0,05$), όχι όμως και στις υποομάδες RA και RAEB όπου οι διαφορές που παρατηρήθηκαν δεν ήταν στατιστικά σημαντικές. Η εκατοστιαία αναλογία των CD44+ κυττάρων δε διέφερε σε στατιστικά σημαντικό βαθμό ανάμεσα σε ασθενείς και μάρτυρες.
- Ομοίως μειωμένη ήταν η έκφραση του CD53 στους MDS ασθενείς, με την RFI στο σύνολο των ασθενών αλλά και σε κάθε μια υποομάδα MDS ξεχωριστά να είναι σε στατιστικά σημαντικό βαθμό χαμηλότερη σε σχέση με τους μάρτυρες ($p < 0,001$). Η εκατοστιαία αναλογία CD53+ κυττάρων ήταν χαμηλότερη σε στατιστικά σημαντικό βαθμό στους ασθενείς με RAEB σε σχέση με τους μάρτυρες ($p < 0,05$), κάτι που δε συνέβαινε όμως στις υπόλοιπες υποομάδες MDS αλλά και στο σύνολο των MDS ασθενών.

• Η υποέκφραση του CD43 παρουσίαζε θετική συσχέτιση με την υποέκφραση του CD44 ($r = 0,4374$, $p < 0,001$) και του CD53 ($r = 0,7906$, $p < 0,001$) και αρνητική συσχέτιση με την υπερέκφραση του CD11b ($r = -0,6184$, $p < 0,001$). Αρνητική συσχέτιση επίσης βρέθηκε να υπάρχει μεταξύ της υποέκφρασης του CD43 και της υπερέκφρασης των CD18 ($r = -0,3713$, $p < 0,01$), CD69 ($r = -0,1977$, $p < 0,05$) και CD35 ($r = -0,2512$, $p < 0,05$). Η έκφραση του CD43 παρουσίαζε επίσης αρνητική συσχέτιση με την ηλικία ($r = -0,3805$, $p < 0,05$) (**εικόνα 17**).

Στην **εικόνα 18** φαίνονται σε διαγράμματα οι RFI των αντιγόνων επιφανείας που ελέγχθηκαν στα ουδετερόφιλα των ασθενών με MDS.



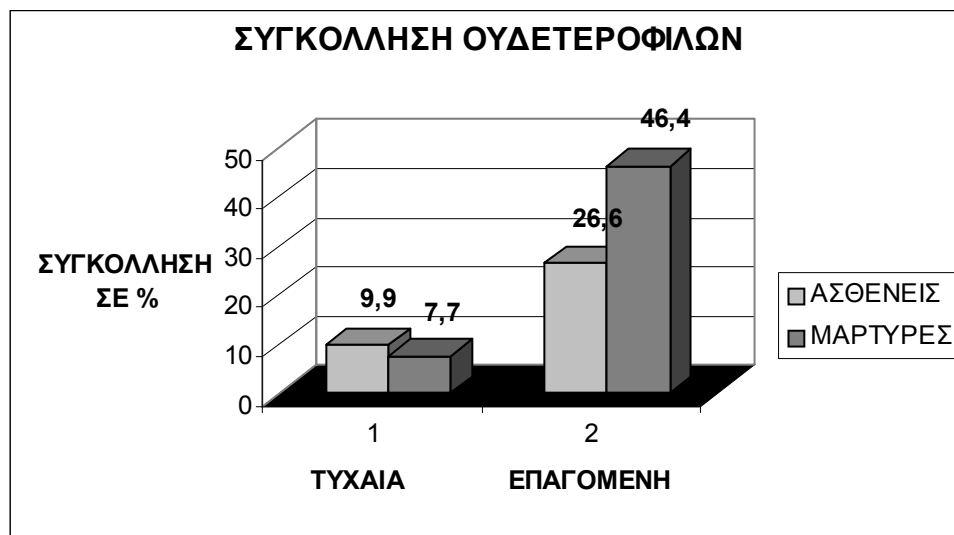
ΕΙΚΟΝΑ 17: Η αρνητική συσχέτιση μεταξύ της έκφρασης του CD43 και των CD18, CD69, CD11b και CD35 και η θετική συσχέτιση μεταξύ της έκφρασης του CD43 και του CD44 στα ουδετερόφιλα των ασθενών με MDS. Η αρνητική συσχέτιση μεταξύ της έκφρασης του CD43 στα κύτταρα ασθενών με MDS και των επιπέδων του sVCAM.



ΕΙΚΟΝΑ 18: Απεικόνιση της κατανομής των RFI των αντιγόνων επιφανείας που μελετήθηκαν στα ουδετερόφιλα των ασθενών με MDS. Σε κάθε υποομάδα FAB αναγράφεται η ανώτερη, κατώτερη και μέση τιμή RFI του αντίστοιχου αντιγόνου.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑ ΔΟΚΙΜΑΣΙΑΣ ΣΥΓΚΟΛΛΗΣΗΣ ΣΤΑ ΟΥΔΕΤΕΡΟΦΙΛΑ

Η τυχαία συγκόλληση στα απομονωμένα ουδετερόφιλα ήταν $10,2\pm 4,2\%$ για τους ασθενείς με υψηλού κινδύνου MDS (RAEB, RAEB-t, CMML), $9,8\pm 2,7\%$ για τους ασθενείς με χαμηλού κινδύνου MDS (RA, RARS), $9,9\pm 3,1\%$ για το σύνολο των MDS ασθενών και $7,7\pm 1,7\%$ για τους μάρτυρες ($p=0,028$). Η επαγόμενη μέσω anti-CD43 συγκόλληση ήταν αντίστοιχα $22,4\pm 10,3\%$, $28,8\pm 15,4\%$, $26,6\pm 13,7\%$ και $46,4\pm 13,4\%$ ($p<0,001$) (εικόνα 19).



ΕΙΚΟΝΑ 19: Απεικόνιση της τυχαίας και της μέσω anti-CD43 επαγόμενης συγκόλλησης (στις 72h) των ουδετερόφιλων των ασθενών με MDS και των μαρτύρων.

ΕΠΙΠΕΔΑ ΔΙΑΛΥΤΟΥ VCAM-1

Τα επίπεδα του sVCAM-1 όπως αυτά προσδιορίστηκαν με τη μέθοδο ELISA βρέθηκαν να είναι $330,82\pm 47,84$ στους ασθενείς και $194,11\pm 45,48$ στους μάρτυρες. Υπήρχε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των δύο ομάδων ($p<0,001$) και τα επίπεδα του διαλυτού VCAM-1 παρουσίαζαν αρνητική συσχέτιση με την εκατοστιαία αναλογία των CD43+ κυττάρων ($r=-0,5074$) (εικόνα 17).

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ

Η κυτταρομετρία ροής έδειξε ότι στους ασθενείς με MDS παρατηρείται σε στατιστικά σημαντικό βαθμό μια υποέκφραση του CD43 στην επιφάνεια των μονοκυττάρων και των ουδετερόφιλων του περιφερικού αίματος, και η υποέκφραση αυτή συνδέεται με την παρουσία ενεργοποιημένου φαινότυπου στα κύτταρα των ασθενών αυτών, αφού παρατηρείται ταυτόχρονα υπερέκφραση των αντιγόνων CD11b, CD35, CD69, CD53, CD38, CD18.

Στην προσπάθεια να διερευνηθεί αν το φαινόμενο της υποέκφρασης αυτής οφείλεται σε αρνητική ρύθμιση του γονιδίου της σιαλοφορίνης (CD43) ή αν οφείλεται στην αποκοπή του μορίου από την κυτταρική επιφάνεια ή στην εσωτερίκευσή του, χρησιμοποιήθηκαν αρχικά οι μοριακές τεχνικές που αναλύθηκαν πιο πριν, με σκοπό: να απομονωθεί το DNA και το RNA των κυττάρων σε πρώτη φάση και στη συνέχεια με τη μέθοδο RT-PCR και Northern Blot να ελεγχθεί η μεταγραφή του γόνου σε mRNA και με τη μέθοδο Western Blot να ελεγχθεί η μετάφραση του γονιδίου σε πρωτεΐνη, δηλαδή η παραγωγή της πρωτεΐνης της σιαλοφορίνης (ή λευκοσιαλίνης). Με τις μεθόδους PCR, DNA sequence analysis και SSCP ελέγχθηκαν πιθανές μεταλλάξεις του γονιδίου της σιαλοφορίνης και της ρυθμιστικής περιοχής του, που μπορεί να επηρέαζαν τη μεταγραφή και τη μετάφραση του γονιδίου.

Σε 3 από τους ασθενείς που μελετήθηκαν με την κυτταρομετρία ροής (και οι οποίοι έπασχαν 1 από RAEB και 2 από RAEB-t), το ποσοστό των CD43+

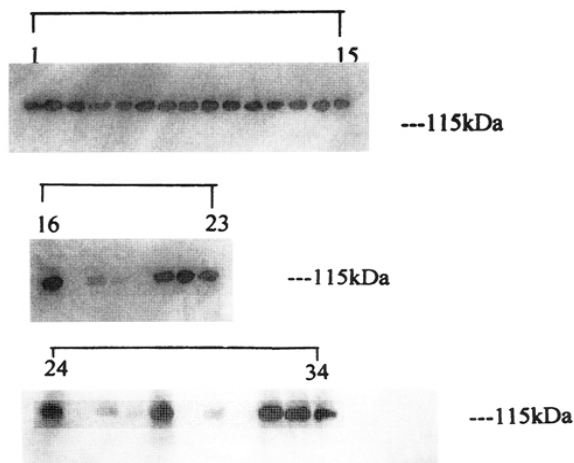
"λεμφομονοπύρηνων" του περιφερικού τους αίματος (PBMNC) ήταν εξαιρετικά χαμηλό (αντίστοιχα 3,8%, 6% και 9,9%). Στους ασθενείς αυτούς βρήκαμε πολύ μικρά ποσά RT-PCR-προϊόντων (**εικόνα 23**) και πολύ μικρές ποσότητες CD43-mRNA με τη μέθοδο Northern Blot (**εικόνα 22**), όπως επίσης και πολύ μικρές ποσότητες της πρωτεΐνης του CD43 με τη μέθοδο Western Blot (**εικόνα 20**).

Στη συνέχεια απομονώσαμε τα "λεμφομονοπύρηνια" του περιφερικού αίματος και του μυελού των 3 αυτών ασθενών (αντίστοιχα PBMNC και BMMNC), τα οποία και διαχωρίσαμε σε CD43+ και CD43-. Στα CD43- κύτταρα δεν αναδείχθηκαν ούτε CD43-mRNA, ούτε CD43-πρωτεΐνη με τις Northern Blot και Western Blot αντιστοίχως (**εικόνες 20, 22, 23**). Η RT-PCR στα CD43- κύτταρα δεν έδωσε καθόλου προϊόν, σε αντίθεση με τα CD43+ κύτταρα που έδωσε άφθονο προϊόν (**εικόνα 21**).

Στη συνέχεια, έγινε μαγνητικός διαχωρισμός των CD34+ κυττάρων των ασθενών και τα CD34+ κύτταρα (των 3 ασθενών που είχαν εξαιρετικά μικρό ποσοστό CD43+ κυττάρων στην κυτταρομετρία) μελετήθηκαν με RT-PCR και έδωσαν πολύ μικρά ποσά προϊόντος του γονιδίου της σιαλοφορίνης (**εικόνα 21**), σε αντίθεση με τα κύτταρα που ήταν CD34+CD43+, τα οποία και έδωσαν φυσιολογικά ποσά προϊόντος γονιδίου της σιαλοφορίνης με την ίδια μέθοδο (**εικόνα 21**). Ταυτόχρονα στα CD34+ κύτταρα η μέθοδος Western Blot έδωσε πολύ μικρά ποσά πρωτεΐνης του CD43, σε αντίθεση με τα CD34+CD43+ κύτταρα (**εικόνες 20**).

Για να διερευνηθεί στη συνέχεια αν η μειωμένη παραγωγή του mRNA και της πρωτεΐνης του CD43 σχετιζόταν με μια επίκτητη μετάλλαξη του γονιδίου του CD43, χρησιμοποιήσαμε τις μεθόδους DNA sequence analysis και SSCP για να αναλύσουμε την αλληλουχία του CD43-cDNA και της ρυθμιστικής περιοχής του CD43.

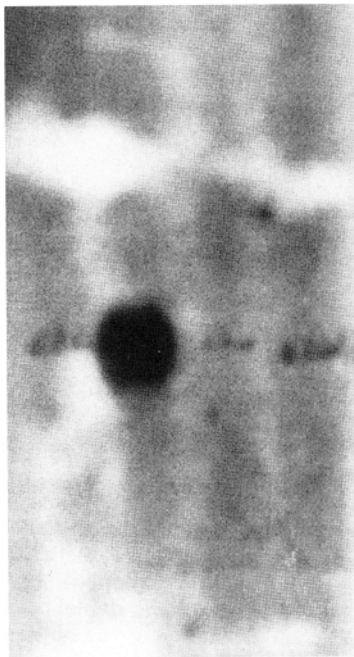
Χρησιμοποιήθηκε DNA που απομονώθηκε από τα CD34+CD43+ και CD34+CD43- κύτταρα των 3 ασθενών. Με τις μεθόδους αυτές δε βρέθηκε καμία διαφορά στην αλληλουχία μεταξύ των CD43+ και των CD43- κυττάρων του κάθε ασθενούς (**εικόνα 24**). Συγκρίθηκαν CD43+ και CD43- κύτταρα του ίδιου ασθενούς κάθε φορά, για την πιθανότητα παρουσίας πολυμορφισμού μεταξύ των διαφόρων ασθενών.



ΕΙΚΟΝΑ 20: Ανάλυση Western Blot των κυτταρικών μεμβρανών των BMMNC ασθενών με MDS. Τα φίλτρα υβριδίστηκαν με μονοκλωνικό αντίσωμα DF-T1 anti-CD43 που αναγνωρίζει την 115kDa ισομορφή του μορίου. Σειρές 1-15, 21-23, 32-34: BMMNC ασθενών που δεν περιέχουν πληθυσμό CD43- κυττάρων. Σειρά 16: CD43+ BMMNC του ασθενούς A μετά από μαγνητικό διαχωρισμό. Σειρά 17: CD43- BMMNC του ασθενούς A μετά από μαγνητικό διαχωρισμό. Σειρά 18: Ολικά BMMNC. Σειρά 19: Ολικά CD34+ κύτταρα του μυελού του ασθενούς A. Ισοδύναμη ποσότητα πρωτεΐνης ηλεκτροφορήθηκε σε όλες τις σειρές. Σειρές 24-27: CD43+ BMMNC, CD43- BMMNC, ολικά BMMNC και ολικά CD34+ BMMNC του ασθενούς B. Σειρές 28-31: CD43+ BMMNC, CD43- BMMNC, ολικά BMMNC και ολικά CD34+ BMMNC του ασθενούς C.



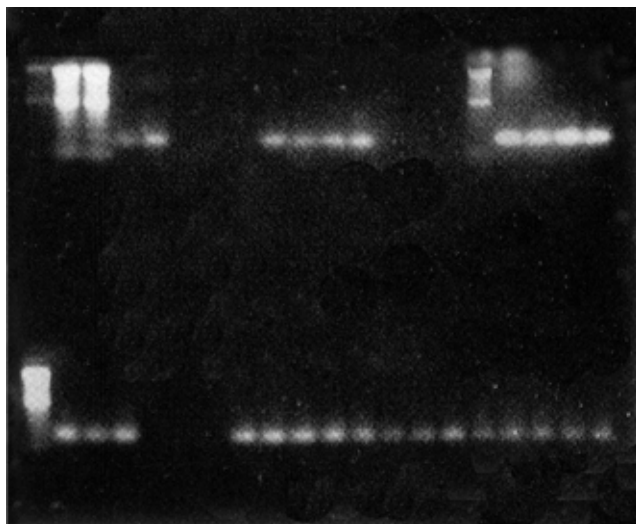
ΕΙΚΟΝΑ 21: RT-PCR από τον ασθενή A. Σειρές 1 και 7: Αλληλουχία DNA 100bp. Σειρές 2 και 3: 2 ασθενείς με RA χωρίς πληθυσμό CD43- κυττάρων στο μυελό. Σειρά 4: CD43+ BMMNC που απομονώθηκαν με μαγνητικό διαχωρισμό από τον ασθενή A. Σειρά 5: CD43- BMMNC κύτταρα. Σειρά 6: CD34+ BMMNC κύτταρα. Το προϊόν του CD43 είναι μεγέθους 187bp και ο γόνος της β2-μικροσφαιρίνης που παράχθηκε ταυτόχρονα είναι μεγέθους 370bp. Η σχέση της έντασης ανάμεσα στις ζώνες CD43 και β2-μικροσφαιρίνης είναι για τις σειρές 2-6 αντίστοιχα: 2.75, 2.83, 2.092, 0.073 και 0.278.



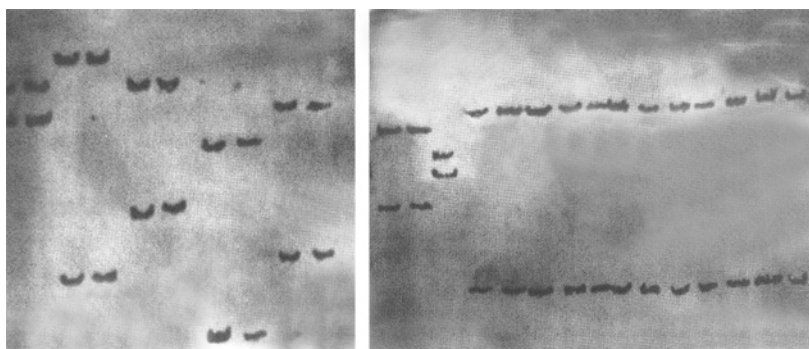
4.3 kb

1.9 kb

ΕΙΚΟΝΑ 22: Ανάλυση Northern Blot στους ασθενείς με MDS. Το RNA απομονώθηκε από τα ολικά BMMNC. Σε κάθε σειρά ηλεκτροφορήθηκαν ισοδύναμες ποσότητες RNA όπως μπορεί να υπολογιστεί από τη ζώνη 18S. Ο υβριδισμός έγινε με ανιχνευτή CD43-187bp. Σειρές 1,3,4: ολικό RNA από τα BMMNC τριών ασθενών. Σειρά 2: CD43+ κύτταρα που απομονώθηκαν με μαγνητικό διαχωρισμό. Στην ιδιαίτερη αυτή περίπτωση τα CD43+ κύτταρα εκφράζουν κλωνικά μόνο το 4,3bp αντίγραφο.



ΕΙΚΟΝΑ 23: RT-PCR σε ασθενείς με MDS. Σειρές 20, 25, 37, 38: Αλληλουχία DNA 100bp. Σειρές 1-12, 17-23, 29-31, 35, 36: Ασθενείς με MDS χωρίς πληθυσμό CD43- κυττάρων ανάμεσα στα BMMNC. Σειρές 13, 24, 32: CD43+ BMMNC από τους ασθενείς A, B και C αντίστοιχα. Σειρές 14, 26, 33: CD43- BMMNC αντίστοιχα των ασθενών A, B και C. Σειρές 15, 27, 34: ολικά BMMNC των ασθενών A, B και C. Σειρές 16, 28 35: CD34+ κύτταρα από τους ασθενείς A, B και C. Χρησιμοποιήθηκε εκκινητής (primer) που απέδωσε προϊόν CD43 187bp.



ΕΙΚΟΝΑ 24: Ανάλυση SSCP: ποικίλα τμήματα του γονιδίου του CD43 παράγονται από τα CD43+ και τα CD43- κύτταρα και "τρέχουν" ταυτόχρονα μαζί σε ζεύγη. Σειρές 14-21: Το πρώτο εξόνιο που παράχθηκε με τη χρήση primers DNA από τα ολικά BMMNC κύτταρα ασθενών με υψηλή έκφραση του γόνου του CD43. Σειρές 22-25: Το ίδιο εξόνιο από το DNA υγιών μαρτύρων.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑ ΑΝΟΣΟΪΣΤΟΧΗΜΙΚΗΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΜΥΕΛΟΥ

Με σκοπό τη μελέτη του τρόπου κατανομής του CD43 στο μυελό των ασθενών με MDS, χρησιμοποιήσαμε την ανοσοϊστοχημική μελέτη του μυελού σε όλους τους ασθενείς. Στους 3 ασθενείς που είχαν στην κυτταρομετρία ροής πολύ μικρά ποσοστά CD43+ κυττάρων στο περιφερικό τους αίμα, βρήκαμε αντίστοιχα μικρά ποσοστά CD43+ κυττάρων ανάμεσα στα πρόδρομα μυελικά κύτταρα (αντίστοιχα 4%, 7% και 9%).

ΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑ ΤΩΝ ΑΣΘΕΝΩΝ ΜΕ ΧΑΜΗΛΗ ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΟΥ CD43 ΣΕ ΛΟΙΜΩΞΕΙΣ

Έγινε καταγραφή των λοιμώξεων που εμφάνισαν οι ασθενείς της μελέτης μας κατά τη διάρκεια ενός έτους πριν και μετά την αιμοληψία για τη μελέτη, καταγράφηκαν οι αιτιολογικοί παράγοντες των λοιμώξεων αυτών και επελέγησαν να μελετηθούν μόνο οι μικροβιακές και οι μυκητιασικές λοιμώξεις των ασθενών. Στη συνέχεια χωρίστηκαν οι ασθενείς της μελέτης μας σε ασθενείς με υψηλή έκφραση του CD43 και σε ασθενείς με χαμηλή έκφραση του CD43 ανάλογα με την CD43-RFI (θεωρήσαμε ότι ένας ασθενής είχε χαμηλή έκφραση του CD43 εάν η CD43-RFI του ήταν μικρότερη από την τιμή $\{[CD43-RFI-control]-2 SD\}$). Έγινε καταγραφή του αριθμού των μικροβιακών και μυκητιασικών λοιμώξεων που εμφάνιζαν οι ασθενείς με χαμηλή έκφραση του CD43 και αυτοί με υψηλή έκφραση του CD43 στην ανωτέρω περίοδο και έγινε στατιστική σύγκριση των αποτελεσμάτων. Οι ασθενείς που είχαν χαμηλή έκφραση του CD43 παρουσίαζαν πιο συχνά λοιμώξεις σε στατιστικά σημαντικό βαθμό σε σχέση με τους ασθενείς με υψηλή έκφραση του CD43 και αυτό συνέβαινε τόσο στο σύνολο των ασθενών ($p<0,05$), όσο και στους ασθενείς με RA ($p<0,05$).

ΜΕΡΟΣ Γ': ΣΥΖΗΤΗΣΗ-ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Το CD43 έχει δειχθεί ότι καλύπτει περίπου το 19% της επιφάνειας των θυμοκυττάρων⁶⁹. Η εκτεταμένη ραβδόμορφη εξωκυττάρια δομή του μορίου και το αρνητικό του φορτίο μπορεί να οδηγεί σε στερεοδομική και ηλεκτρική παρεμπόδιση της δράσης των υποδοχέων προσκόλλησης ή των μορίων σύνδεσής τους. Η πρόσβαση σ'αυτές τις μεμβρανικές δομές αποκαθίσταται δραματικά μετά την αποκοπή του 40-80% του μορίου CD43 από την κυτταρική επιφάνεια κατά την κυτταρική ενεργοποίηση^{69,52}. Παλαιότερες μελέτες έχουν αποδείξει ότι το CD43 -όταν εκφράζεται από αντίθετα κύτταρα- λειτουργεί ως αντι-προσκολλητικό μόριο. Επειδή η προσκόλληση που ρυθμίζεται μέσω του μορίου LFA-1 αποτελεί το επικρατέστερο μονοπάτι στα λεμφοκύτταρα⁷⁰⁻⁷³, έχει προταθεί ότι το CD43 συνδέεται με το σύμπλεγμα του TCR και ρυθμίζει την T-κυτταρική ενεργοποίηση μέσω ενός μονοπατιού ανεξάρτητου από το μόριο CD28⁷¹. Μια άλλη πιθανή λειτουργία του CD43 είναι και η συμμετοχή του σε ένα μακρομοριακό σύμπλεγμα πρωτεΐνης που εκφράζεται από τα μονοκύτταρα μαζί με το LMP2 (που σχετίζεται με τη σύνδεση του C1q)⁷². Επίσης η συνεντόπισή του με τα μέλη της οικογένειας εζρίνης/ραντιξίνης /μοεσίνης σημαίνει ότι το μόριο μπορεί να καθορίζει κυτταρικές λειτουργίες όπως η κίνηση, η κυτταρική διαίρεση, η κυτταρική προσκόλληση, η αγκυροβόληση και ο σχηματισμός μικρολαχνών⁷⁴. Μέσω ενός άγνωστου μηχανισμού το CD43 ενέχεται στη μείωση της καθήλωσης των κυττάρων στη G1 φάση του κυτταρικού κύκλου και στην καθυστέρηση της αποπτωτικής διαδικασίας στα κύτταρα WEHI⁷⁰. Συνοπτικά, λοιπόν, οι ως τώρα γνωστές λειτουργίες του CD43 περιλαμβάνουν την προσκόλληση, την αντι-προσκόλληση, τη μετάδοση σήματος και τις κυτταροσκελετικές αλληλεπιδράσεις⁷⁵. Η αντιπροσκολλητική λειτουργία του μορίου οφείλεται στην εξωκυττάρια δομή του και το αρνητικό ηλεκτρικό του φορτίο. Τα επίπεδα της έκφρασης του μορίου εγκαθιστούν έναν ουδό το οποίο οι προσκολλητικές δυνάμεις πρέπει να ξεπεράσουν για να προωθήσουν τις προσκολλητικές κυτταρικές αλληλεπιδράσεις. Η προσκολλητική λειτουργία του CD43 προέρχεται από την αλληλεπίδρασή του με τον υποδοχέα του ή από την υποβοήθηση των αλληλεπιδράσεων άλλων μορίων με τους υποδοχείς τους. Η σύνδεση του CD43 με τον υποδοχέα του μπορεί να δημιουργεί μονοπάτια κυτταρικής διαμεταβίβασης σήματος, ενώ το μόριο από μόνο του περιλαμβάνει 3 περιοχές φωσφορυλίωσης της πρωτεϊνοκινάσης C. Επιπρόσθετα η αλληλεπίδραση του CD43 με τις κυτταροσκελετικές πρωτεΐνες μπορεί είτε να μετακινεί τον εξωκυττάριο απωθητικό ηλεκτρικό φραγμό ή να αυξάνει τη δυναμική της σύνδεσης του CD43 με τον υποδοχέα του. Στα ουδετερόφιλα έχει αναφερθεί ότι το CD43 αποκόπτεται με την κυτταρική ενεργοποίηση και έτσι μπορεί να αποκαλύπτει μόρια προσκόλλησης που ήταν μέχρι πρότινος κρυμμένα, προωθώντας μεταξύ τους αλληλεπιδράσεις⁵². Διαταραχή στην έκφραση του CD43 έχει αναφερθεί στο σύνδρομο Wiskott-Aldrich⁷⁶.

A) ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΟΥ CD43 ΣΤΑ ΚΥΤΤΑΡΑ ΑΣΘΕΝΩΝ ΜΕ MDS

Σε μια προσπάθεια να αναγνωρίσουμε επίκτητες διαταραχές των μορίων προσκόλλησης στην κυτταρική επιφάνεια ασθενών με MDS, ανακαλύψαμε ότι το CD43 υφίσταται αρνητική γονιδιακή ρύθμιση σε 3 από 32 ασθενείς μας (1 με RAEB και 2 με RAEB-t) στο περιφερικό αίμα και στο μυελό των οστών. Το φαινόμενο αυτό αποδείχθηκε τόσο σε επίπεδο πρωτεΐνης, όσο και σε επίπεδο RNA με τη βοήθεια των αναλύσεων Western Blot, Northern Blot και RT-PCR. Όταν απομονώσαμε κύτταρα CD43(+) και CD43(-) από τους ασθενείς αυτούς, δε βρήκαμε καμία μετάλλαξη που να σχετίζεται με τον CD43(-) πληθυσμό κυττάρων των ασθενών μας. Οι υπόλοιποι 29 ασθενείς που μελετήθηκαν εξέφραζαν το CD43 σε υψηλά επίπεδα και το ποσοστό των CD43(+) κυττάρων ήταν υψηλό (50-100%). Η μέθοδος RT-PCR από τους ασθενείς αυτούς έδωσε ένα έντονο PCR προϊόν. Οι υποπληθυσμοί των λεμφοκυττάρων των ασθενών δε διέφεραν σημαντικά από εκείνους των υγιών μαρτύρων στην έκφραση του CD43. Η έκφραση του μορίου στα ουδετερόφιλα των 3 αυτών ασθενών ήταν πολύ χαμηλή, τη στιγμή που σε όλους τους άλλους MDS ασθενείς που μελετήθηκαν ήταν υψηλή (40-100%) όπως φάνηκε στην κυτταρομετρία ροής.

Υπάρχουν μερικές λογικές εξηγήσεις του πιο πάνω φαινομένου που συνδέεται με τη ρύθμιση της έκφρασης του γόνου του CD43. Έχει περιγραφεί ότι η αρνητική ρύθμιση του γονιδίου του CD43 επιτυγχάνεται με τη μεθυλίωση του DNA. Πιθανή λοιπόν παρεμπόδιση του μηχανισμού της μεθυλίωσης και αυτού της μεθυλτρανσφεράσης θα πρέπει να μελετηθούν. Είναι επίσης γνωστό ότι ο Sp1 δρα στη ρυθμιστική περιοχή (promoter) του γόνου της σιαλοφορίνης. Ο πιο πάνω μεταγραφικός παράγοντας και η δράση του πρέπει επίσης να μελετηθούν. Μια άλλη πιθανότητα είναι η παρουσία και άλλων ρυθμιστικών παραγόντων που δρουν στον παραπάνω ή και σε άλλους μηχανισμούς και επηρεάζουν τη γονιδιακή έκφραση του CD43. Η υποέκφραση του CD43 έχει περιγραφεί ότι συνδέεται με αυξημένη τυχαία συγκόλληση σε μερικές κυτταρικές σειρές⁷⁷. Το φαινόμενο αυτό δεν παρατηρήθηκε στα "λεμφομονοπύρηνια" του περιφερικού αίματος (PBMNC) των ασθενών μας. Η τυχαία αυτή συγκόλληση δε διέφερε σε σημαντικό βαθμό ανάμεσα σε CD43(+) και CD43(-) ασθενείς, τη στιγμή που η συγκόλληση που επαγόταν με το αντι-CD43 μονοκλωνικό αντίσωμα ήταν αξιοσημείωτα χαμηλότερη στις πιο πάνω 3 περιπτώσεις ασθενών. Αυτό μπορεί να σημαίνει ότι και άλλοι παράγοντες μπορεί να επηρεάζουν την τυχαία-αυτόματη συγκόλληση των κυττάρων μεταξύ τους, εκτός του CD43.

Είναι γνωστό ότι στα μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα αναγνωρίζεται ένας ή περισσότεροι κλώνοι δυσπλαστικών κυττάρων ταυτόχρονα με τα φυσιολογικά αιμοποιητικά κύτταρα, τουλάχιστο σε κάποιο στάδιο προόδου της νόσου. Συνήθως, τα προγονικά κύτταρα της λεμφικής σειράς "γλιτώνουν" από τον παθολογικό αυτό κλώνο. Στο μέλλον θα πρέπει να γίνει προσπάθεια να απαντηθεί αν η αρνητική ρύθμιση του γονιδίου του CD43 περιορίζεται στα προ-λευχαιμικά κύτταρα ή όχι και ποια από τα προγονικά αιμοποιητικά κύτταρα παρουσιάζουν αυτό το φαινόμενο.

B) CD43 ΚΑΙ ΜΟΝΟΚΥΤΤΑΡΑ ΣΤΑ MDS

Όπως ειπώθηκε, η σιαλοφορίνη είναι μέλος της οικογένειας των μουκινών και μοιράζεται μ'αυτές παρόμοιες δομικές και λειτουργικές ιδιότητες. Η οικογένεια περιλαμβάνει (εκτός του CD43) τα μόρια GlyCAM, MadCAM, PSGL-1, CD68,

CD34, CD96, και CD45RA⁷⁸. Τα μόρια αυτά συνδέονται με σελεκτίνες και ενέχονται στην κυτταρική ενεργοποίηση, προσκόλληση και μετανάστευση^{53,79-83}. Αν και το φυσικό μόριο σύνδεσης του CD43 δεν έχει ακόμα αναγνωριστεί, το ίδιο το CD43 μπορεί να συνδεθεί με σελεκτίνες^{53,79,84}.

Είναι γνωστό ότι τα φυσιολογικά ανθρώπινα μονοκύτταρα εκφράζουν CD43 σε διάφορα επίπεδα. Χαρακτηριστικά, αναγνωρίζεται ένας υποπληθυσμός με χαμηλή έκφραση του CD43 (CD43-low) και ένας υποπληθυσμός με υψηλή έκφραση του CD43 (CD43-high), που δημιουργούν στα διαγράμματα φλουορεσκείνης μια αμφίκυκλη καμπύλη. Αυτοί οι δύο υποπληθυσμοί εκφράζουν τα ίδια επίπεδα CD14, CD45 και CD54, αλλά ο υποπληθυσμός CD43-low υπερεκφράζει τα CD11b και CD18, ενώ ο υποπληθυσμός CD43-high εκφράζει τις βαρύτερα σιαλωμένες μορφές του CD43⁸⁵.

Στη μελέτη αυτή παρατηρήθηκε μειωμένη έκφραση του CD43 στα μονοκύτταρα του περιφερικού αίματος 78 ασθενών με MDS. Δύο μηχανισμοί σημαντικής ρύθμισης του CD43 έχουν αναφερθεί: στην ενεργοποίηση των ουδετερόφιλων παρατηρείται πρωτεολυτική αποκοπή του μορίου από την κυτταρική επιφάνεια⁸⁶, ενώ στα T-κύτταρα με την ενεργοποίηση το μόριο υπερεκφράζεται, ενώ παράλληλα παρατηρείται αλλαγή της ισομορφής του (από την 115kDa στην 130kDa)^{87,88}. Η τελευταία πιθανότητα στους δικούς μας ασθενείς δεν υπάρχει, γιατί τα ίδια αποτελέσματα παρατηρήθηκαν με τη χρήση των μονοκλωνικών αντισωμάτων DFT-1 (DAKO) και 1Ig10 (Becton Dickinson) που αναγνωρίζουν επίτοπους του CD43 που εξαρτώνται από τη δομή των γλυκανών του.

Η σύνδεση του CD43 με το DFT-1 αύξησε την ικανότητα των μονοκυττάρων του περιφερικού αίματος (PBMC) να συναθροίζονται. Ποικίλες μελέτες έχουν δείξει ότι τα αντισώματα εναντίον του CD43 επάγουν την ομοτυπική και ετεροτυπική προσκόλληση των μονοκυττάρων⁸⁸⁻⁹². Από την άλλη μεριά, υπάρχουν ορισμένες ενδείξεις ότι το CD43 κατέχει ορισμένες προ-προσκολλητικές ιδιότητες μέσω της σύνδεσής του με το ICAM-1⁹³. Επομένως τίθεται η υπόθεση ότι η υποέκφραση του μορίου CD43 στην κυτταρική μεμβράνη, μπορεί να εξαλείφει τον απωθητικό φραγμό που το ίδιο το CD43 δημιουργεί και να οδηγεί σε πιο αποτελεσματική σύνδεση των κυττάρων μεταξύ τους μέσω των μορίων προσκόλλησης⁹⁴. Πρόσφατα έχει περιγραφεί ένας περιορισμένος ρόλος του σιαλικού οξέος στην παρουσίαση αντιγόνου από τα μονοκύτταρα στα ήρεμα T-κύτταρα⁹⁴. Τα αντι-CD43 μονοκλωνικά αντισώματα επίσης έχει βρεθεί ότι δίνουν το έναυσμα για τον T-κυτταρικό πολλαπλασιασμό με τρόπο που εξαρτάται από τα μονοκύτταρα^{95,96}. Τέλος, το σιαλικό οξύ και το ίδιο το CD43 ελαττώνουν τη ευαισθησία στην κυτταρόλυση μέσω των T-κυττάρων⁹⁷, ενώ άλλες μελέτες επισημαίνουν το ρόλο του CD43 ως υποδοχέα που μεταβιβάζει ενδοκυττάρια σήματα^{80,81,98}.

Είναι ευρέως γνωστό ότι τα μονοκύτταρα του περιφερικού αίματος όταν απομονωθούν περιλαμβάνουν έναν αριθμό αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων⁸². Η μειωμένη έκφραση του CD43 αυξάνει την επαφή κυττάρου με κύτταρο, την τυχαία συγκόλληση στους ασθενείς με MDS και την μεταβίβαση σημάτων ενεργοποίησης. Η υποέκφραση του CD43 επίσης εκθέτει άλλα μόρια προσκόλλησης και έτσι ενεργοποιεί την προσκόλληση και τη μετανάστευση. Στους ασθενείς της μελέτης μας η υποέκφραση του CD43 σχετιζόταν με την αυξημένη έκφραση μορίων ενεργοποίησης στα μονοκύτταρα αυτών των ασθενών, που παρουσίαζαν έτσι έναν ενεργοποιημένο φαινότυπο¹⁷. Πιθανώς ποικίλοι ερεθιστικοί παράγοντες ενεργοποιούν τα μονοκύτταρα στους ασθενείς αυτούς. Δεν είναι γνωστό αν η υποέκφραση του CD43 προηγείται της έκφρασης των μορίων ενεργοποίησης ή συμβαίνει μετά. Όταν εξετάσαμε τον ανοσοφαινότυπο των κυττάρων μετά την επεξεργασία τους με triton-x

0.1% (διαδικασία διάτρησης της κυτταρικής μεμβράνης), δε βρήκαμε διαφορές στην έκφραση του CD43, αποκλείοντας την εσωτερίκευση του μορίου. Από την άλλη μεριά όμως, έχει ήδη παρατηρηθεί η αποκοπή του CD43 από τη κυτταρική επιφάνεια κατά την ενεργοποίηση των μονοκυττάρων⁸⁸. Αυτός είναι και ο πιο πιθανός μηχανισμός υποέκφρασης του CD43 στα μονοκύτταρα των ασθενών της μελέτης μας. Η σημασία αυτού του αποτελέσματος δεν είναι πλήρως αποσαφηνισμένη. Φαίνεται ότι ποικίλα ερεθίσματα (ιοί, βακτήρια, νεοπλασματικοί παράγοντες, κυτοκίνες κλπ) δρουν πάνω στα μονοκύτταρα και αυξάνουν την έκφραση των μορίων CD69, CD18, CD35, HLA-DR, και CD44. Αυτά τα μονοκύτταρα παρουσιάζουν μεγαλύτερη ικανότητα να προσκολλώνται στο ενδοθήλιο και αναμένεται ότι εξαγγειώνονται πιο εύκολα, οδηγώντας σε μείωση των αποθεμάτων τους από το περιφερικό αίμα. Μειωμένη ικανότητα μετανάστευσης στους περιφερικούς ιστούς έχει αναφερθεί για τα CD43(-) κύτταρα^{53,79,99}, και αυτό θα μπορούσε να οδηγεί σε αυξημένη ευαισθησία στις λοιμώξεις που παρατηρούνται στους ασθενείς αυτούς. Το CD44 αποκόπτεται από την κυτταρική επιφάνεια με τον ίδιο μηχανισμό με το CD43. Στη μελέτη μας το CD44 βρέθηκε και αυτό να υποεκφράζεται στην επιφάνεια των μονοκυττάρων των ασθενών με MDS.

Γ) CD43 ΚΑΙ ΟΥΔΕΤΕΡΟΦΙΛΑ ΣΤΑ MDS

ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΜΕΝΟΣ ΦΑΙΝΟΤΥΠΟΣ ΤΩΝ ΟΥΔΕΤΕΡΟΦΙΛΩΝ

Οι λοιμώδεις και μη λοιμώδεις νόσοι οδηγούν γενικά σε ενεργοποίηση των ουδετερόφιλων, προσκόλλησή τους στο αγγειακό ενδοθήλιο, εξαγγείωση και μετανάστευσή τους στις περιοχές της φλεγμονής¹⁰⁰. Στους ασθενείς με MDS οι βακτηριακές και ιογενείς λοιμώξεις είναι πολύ συχνές και επηρεάζουν την κλινική πορεία. Μάλιστα πολλές φορές οι λοιμώξεις εμφανίζονται ακόμη και σε απουσία σοβαρής ουδετεροπενίας, κάτι που σημαίνει ότι τα ουδετερόφιλα στους ασθενείς με MDS παρουσιάζουν ανεπαρκή και αναποτελεσματική λειτουργία^{19,101}. Στη μελέτη αναλύθηκαν τα ουδετερόφιλα 78 ασθενών με MDS και έγινε προσπάθεια να εξηγηθούν οι μηχανισμοί των ανοσολογικών διαταραχών αυτών των ασθενών. Σ' ό,τι αφορά στο CD43, αναφέρθηκε πιθανή γονιδιακή καταστολή σε ορισμένες περιπτώσεις, αλλά στην πλειοψηφία των περιπτώσεων η υποέκφρασή του σχετίζεται με την ενεργοποίηση των ουδετερόφιλων στους MDS ασθενείς, αν και την περίοδο των αιμοληψιών δεν παρουσίαζαν έκδηλη λοίμωξη (σύμφωνα με κλινικά κριτήρια και τα επίπεδα της CRP), ούτε είχαν μεταγγιστεί πρόσφατα, ούτε είχαν λάβει κανενός είδους θεραπεία. Αυτή η ενεργοποίηση των ουδετερόφιλων συνιστά παρουσία ενός χρόνιου αντιγονικού ερεθισμού¹⁰⁰. Η στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων αποκάλυψε διαφορές στην έκφραση των μορίων CD18, CD35 και CD53 μεταξύ των ασθενών με MDS χαμηλού και MDS υψηλού κινδύνου, δεν παρατηρήθηκαν όμως τέτοιες διαφορές για τα υπόλοιπα μόρια επιφανείας που χρησιμοποιήθηκαν στη μελέτη μας (κάτι που έχει αναφερθεί από άλλους ερευνητές)¹⁷.

Το CD69 είναι ένα μόριο πρώιμης ενεργοποίησης που ενέχεται στη διαμεταβίβαση σήματος και εκφράζεται από όλα τα λευκοκύτταρα του περιφερικού αίματος¹⁰²⁻¹⁰⁴. Τα CD69+ κύτταρα καθώς και η πυκνότητα των μορίων επιφανείας CD69 στα κύτταρα αυτά ήταν αυξημένα στα ουδετερόφιλα των MDS ασθενών, υποδηλώνοντας ένα χρόνιο αντιγονικό ερεθισμό. Παράλληλα δεν υπήρχε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των MDS χαμηλού και υψηλού κινδύνου.

Το CD67 είναι ένα μόριο 100kDa συνδεόμενο με φωσφατιδυλο-ινοσιτόλη που εκλεκτικά εκφράζεται στα ανθρώπινα κοκκιοκύτταρα. Σε φλεγμονώδεις νόσους έχει παρατηρηθεί αύξηση της έκφρασης του μορίου αυτού¹⁰⁵. Στους ασθενείς της δικής μας μελέτης το CD67 βρέθηκε να παρουσιάζει αυξημένη έκφραση στα ουδετερόφιλα

των MDS ασθενών σε σχέση με τους υγιείς μάρτυρες, χωρίς και πάλι να παρατηρείται στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ MDS χαμηλού και υψηλού κινδύνου. Η σημασία του ευρήματος αυτού είναι μέχρι στιγμής άγνωστη. Τα μόρια CD11b και CD35 είναι μεμβρανικοί υποδοχείς του C3 κλάσματος του συμπληρώματος και συμμετέχουν στη φαγοκυττάρωση και την ομοτυπική και ετεροτυπική προσκόλληση¹⁰⁶. Σε κυτταροκαλλιέργειες η μέσω PMA ενεργοποίηση των ουδετερόφιλων οδηγεί σε ταχεία αύξηση της έκφρασης του CD11b που συνδέεται με την παράλληλη μείωση της έκφρασης του CD43⁵⁷. Σε χρόνιες λοιμώξεις νόσους το CD11b έχει βρεθεί να υπερεκφράζεται. Στη μελέτη μας βρέθηκε αυξημένη έκφραση του μορίου αυτού στα ουδετερόφιλα των ασθενών με MDS, παρά το ότι σε άλλες διεθνείς μελέτες η έκφρασή του έχει αναφερθεί ελαττωμένη¹⁷ ή αυξημένη¹⁹. Οι διάφορες ομάδες ασθενών με MDS που αναφέρθηκαν νωρίτερα δεν είναι ομοιογενείς (αν υπολογίσει κανείς την ηλικία, τη συχνότητα των μεταγίσεων, τη συχνότητα των λοιμώξεων, τη βαρύτητα των δυσπλαστικών ανωμαλιών, την ύπαρξη και σοβαρότητα άλλων υποκείμενων νοσημάτων κλπ.) και αυτό μπορεί να οδηγεί σε διαφορετικό στάδιο ενεργοποίησης των ουδετερόφιλων και διαφορετική βαρύτητα αυτής της ενεργοποίησης. Το CD11b είναι ένα μόριο αποφασιστικής σημασίας για τις λειτουργίες που εξαρτώνται από την κυτταρική προσκόλληση και η υποέκφρασή του στους ασθενείς με MDS μπορεί να εξηγήσει την προδιάθεσή τους σε λοιμώξεις, εξαιτίας της ελάττωσης της χημειοτακτικής ικανότητας των ουδετερόφιλων και των συγκολλητικών τους λειτουργιών¹⁷. Η υποέκφραση του μορίου αυτού στην κυτταρική επιφάνεια μπορεί να οφείλεται σε ανωμαλία στην παραγωγή ή σε αυξημένη κινητοποίηση του μορίου από τις ενδοκυττάρειες αποθήκες του^{106,107}. Η τελευταία εκδοχή απαντά στην τελική φάση της ενεργοποίησης των ουδετερόφιλων, όπου οι αποθήκες τους έχουν εξαντληθεί.

Η ΣΧΕΣΗ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΟΥ CD43 ΜΕ ΤΑ ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΜΕΝΑ ΟΥΔΕΤΕΡΟΦΙΛΑ

Από τη στιγμή που παρατηρήθηκε μειωμένη έκφραση του CD43 στους ασθενείς με MDS -συγκρινόμενοι με τους υγιείς μάρτυρες- εξετάστηκε η πιθανότητα αιτία της υποέκφρασης του CD43 να είναι η ενεργοποίηση των ουδετερόφιλων. Τα αποτελέσματα της RT-PCR δεν απέδειξαν ότι η μειωμένη παραγωγή του CD43 είναι ο κανόνας. Έχει αναφερθεί ότι τόσο το CD43 όσο και τα CD44 και CD53 αποκόπτονται με πρωτεολυτικό τρόπο από την επιφάνεια των ουδετερόφιλων μέσω πρωτεασών σερίνης και απελευθερώνονται κατά τη διάρκεια της ενεργοποίησης των ουδετερόφιλων⁵². Η αποκοπή του CD43 εμφανίζεται τελευταία κατά τη διάρκεια της ενεργοποίησης αυτής, αμέσως πριν τη μετανάστευση⁹⁹. Φαίνεται ότι τα ουδετερόφιλα στους ασθενείς αυτούς βρίσκονται σε διάφορους βαθμούς ενεργοποίησης και οι παράγοντες που επηρεάζουν αυτό το γεγονός, αλλά και η σημασία του απομένει να μελετηθούν. Πιθανώς αυτή είναι η αιτία που άλλοι μελετητές παλαιότερα είχαν αναφέρει αυξημένη ή μειωμένη έκφραση του CD44 ανάλογα με την ήπια ή την έντονη ενεργοποίηση των ουδετερόφιλων¹⁷. Αν και παρατηρήθηκαν διαφορές στην έκφραση στα ουδετερόφιλα των CD18, CD35 και CD53 μεταξύ MDS υψηλού και MDS χαμηλού κινδύνου, δεν υπήρχε καμία διαφορά στην έκφραση του CD43 ανάμεσα στις δύο αυτές ομάδες. Αντίθετα, διαφορές μεταξύ ασθενών με χαμηλού και υψηλού κινδύνου MDS παρατηρήθηκαν στην CD43-RFI στα μονοκύτταρα των MDS ασθενών. Όπως έχει αναφερθεί, στα ποντίκια με ανεπάρκεια του CD43 έχει περιγραφεί πρόσφατα ένα παράδοξο φαινόμενο: τα ουδετερόφιλα που είναι CD43(-) κυλούν και προσκολλώνται στο αγγειακό ενδοθήλιο, αλλά παρουσιάζουν ελαττωμένη ικανότητα μετανάστευσης στις περιοχές της φλεγμονής. Αυτό πιθανότατα θα

μπορούσε να εξηγήσει την αναποτελεσματική απάντηση των ασθενών με MDS στις λοιμώξεις¹⁹.

ΣΧΕΣΗ ΤΗΣ ΥΠΟΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΟΥ CD43 ΣΤΑ ΟΥΔΕΤΕΡΟΦΙΛΑ ΜΕ ΤΗΝ ΗΛΙΚΙΑ

Στη δική μας ομάδα ασθενών με MDS βρέθηκε μειωμένη έκφραση του CD43 στα ουδετερόφιλα των ηλικιωμένων ασθενών σε σχέση με τους νεότερους ασθενείς. Είναι γνωστό ότι οι ηλικιωμένοι ασθενείς ακόμα και σε απουσία λοίμωξης παρουσιάζουν στο περιφερικό τους αίμα ενεργοποιημένα λεμφοκύτταρα¹⁰⁸, δεν έχει όμως κάτι τέτοιο αναφερθεί για τα ουδετερόφιλα. Κανένα από τα μόρια ενεργοποίησης που μελετήθηκαν στο σύνολο των ασθενών μας δεν βρέθηκε να υπερεκφράζεται στους ηλικιωμένους ασθενείς. Παραμένει να μελετηθεί ο μηχανισμός και η σημασία του παραπάνω ευρήματος.

ΣΥΓΚΟΛΛΗΣΗ ΟΥΔΕΤΕΡΟΦΙΛΩΝ

Τα μόρια CD43, CD44, CD11b και CD18 ενέχονται στη συγκολλητική δράση των ουδετερόφιλων και πιθανότατα συνεργάζονται γι' αυτή τη δράση. Το τελικό αποτέλεσμα της διαφοροποιημένης έκφρασης των μορίων αυτών στους ασθενείς με MDS επηρεάζει την ως άνω προσκολλητική δράση των ουδετερόφιλων, και φαίνεται παραστατικά στην εικόνα 19. Η τυχαία συγκόλληση ήταν αυξημένη ($p=0.028$) και η συγκόλληση που επαγόταν από το CD43 ήταν μειωμένη ($p<0.001$) στους ασθενείς συγκρινόμενους με τους υγιείς μάρτυρες. Ο βαθμός της μεταβολής στο συγκολλητικό αποτέλεσμα ήταν μικρότερος από αυτόν που έχει αναφερθεί για κάθε μόριο -που παρουσιάζει διαταραχή της έκφρασής του- χωριστά^{17,19}.

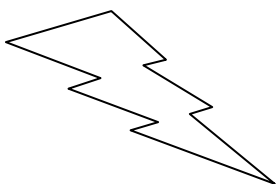
Δ) CD43 ΚΑΙ ΣΥΧΝΟΤΗΤΑ ΛΟΙΜΩΞΕΩΝ

Στο σύνολο των ασθενών με MDS αλλά και στους ασθενείς με ανθεκτική αναιμία (RA) βρέθηκε ότι η μειωμένη έκφραση του CD43 σχετίζεται με αυξημένη συχνότητα μικροβιακών και μυκητιασικών λοιμώξεων. Οι λοιμώξεις -όπως προαναφέρθηκε- αποτελούν αιτίες κυτταρικής ενεργοποίησης, κατά την οποία λαμβάνει χώρα πρωτεολυτική αποκοπή του CD43 από την επιφάνεια των μονοκυττάρων και των ουδετερόφιλων. Φαίνεται δηλαδή ότι οι λοιμώξεις είναι η αιτία της μειωμένης έκφρασης του CD43 στην κυτταρική επιφάνεια των ασθενών αυτών, χωρίς προς το παρόν να υπάρχουν ενδείξεις για το αντίστροφο. Οι ασθενείς με MDS υψηλού κινδύνου παρουσίαζαν συχνότερα λοιμώξεις από τους ασθενείς με MDS χαμηλού κινδύνου, ανεξάρτητα από την έκφραση του CD43 στην επιφάνειά τους. Αυτό πιθανώς σημαίνει ότι οι λοιμώξεις στους ασθενείς αυτούς είναι περισσότερο αποτέλεσμα των συχνών και βαρειών κυτταροπενιών που παρουσιάζουν. Η μειωμένη έκφραση του CD43 σ' αυτούς δε σχετιζόταν με αυξημένη συχνότητα λοιμώξεων, πιθανώς επειδή η παρουσία ενεργοποιημένων κυττάρων -άρα και αποκοπής του CD43 από την κυτταρική επιφάνεια με πρωτεολυτικό μηχανισμό- στους ασθενείς με υψηλού κινδύνου MDS είναι αποτέλεσμα και άλλων παραγόντων εκτός των λοιμώξεων, και οι παράγοντες αυτοί μπορεί να είναι η ίδια η νόσος, αλλά και οι θεραπείες που κατά καιρούς αυτοί οι ασθενείς λαμβάνουν.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Τα συμπεράσματα από τη μελέτη μας μπορούν να συνοψισθούν στα παρακάτω:

- 1) Οι 3 από τους ασθενείς της μελέτης μας βρέθηκε να παρουσιάζουν πολύ μικρή αναλογία CD43+ κυττάρων στο περιφερικό τους αίμα και στο μυελό. Στους ασθενείς αυτούς η μειωμένη έκφραση του CD43 οφειλόταν σε αρνητική ρύθμιση του γονιδίου της σιαλοφορίνης (downregulation), χωρίς όμως να παρατηρηθούν μεταλλάξεις του πιο πάνω γονιδίου με τη μέθοδο SSCP. Μένει επομένως να μελετηθεί περαιτέρω ο μηχανισμός με τον οποίο αυτή η αρνητική ρύθμιση συμβαίνει.
- 2) Η μειωμένη έκφραση του CD43 που παρατηρήθηκε στα ουδετερόφιλα και τα μονοκύτταρα στο σύνολο των ασθενών της μελέτης μας σε σχέση με τους μάρτυρες σχετίζεται με την παρουσία ενεργοποιημένων ουδετερόφιλων και μονοκυττάρων στο περιφερικό αίμα των ασθενών αυτών. Επιπλέον, τα κύτταρα αυτά παρουσιάζουν διαφορετικό βαθμό ενεργοποίησης στους ασθενείς με MDS χαμηλού κινδύνου (RA, RAS) σε σχέση με τους ασθενείς με MDS υψηλού κινδύνου (RAEB, RAEB-t, CMML).
- 3) Στο σύνολο των ασθενών, καθώς και στους ασθενείς με ανθεκτική αναιμία (RA) η μειωμένη έκφραση του CD43 στα ουδετερόφιλα και στα μονοκύτταρα σχετιζόταν με αυξημένη συχνότητα λοιμώξεων. Πράγματι, οι ασθενείς με μειωμένη έκφραση του CD43 παρουσίαζαν πιο συχνά λοιμώξεις κατά την περίοδο της μελέτης μας. Δεν υπάρχουν αρκετές ενδείξεις ότι η μειωμένη έκφραση της σιαλοφορίνης προδιαθέτει στην εμφάνιση τέτοιων λοιμώξεων, φαίνεται όμως ότι οι συχνές λοιμώξεις είναι η αιτία της παρουσίας ενεργοποιημένων κυττάρων στους πιο πάνω ασθενείς, και η ενεργοποίηση των κυττάρων είναι η αιτία της πρωτεολυτικής αποκοπής του CD43 από την επιφάνεια των κυττάρων αυτών.
- 4) Στους ασθενείς με MDS υψηλού κινδύνου η αυξημένη συχνότητα λοιμώξεων δε σχετιζόταν με τη μειωμένη έκφραση του CD43, κι αυτό υποδηλώνει πιθανώς ότι οι συχνές λοιμώξεις των ασθενών αυτής της κατηγορίας είναι αποτέλεσμα πρωταρχικά των συχνότερων και βαρύτερων κυτταροπενιών που εμφανίζουν. Επιπλέον, στους ασθενείς της κατηγορίας αυτής φαίνεται να υπάρχουν και άλλοι παράγοντες πλην των λοιμώξεων -όπως π.χ. η ίδια η νόσος, οι θεραπείες που λαμβάνουν αυτοί οι ασθενείς- που αποτελούν αιτίες κυτταρικής ενεργοποίησης και αποκοπής του CD43 από την κυτταρική επιφάνεια.
- 5) Η αυξημένη έκφραση των μορίων προσκόλλησης (CD11b, CD44, sVCAM) μπορεί να σημαίνει αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης θρομβοεμβολικών επεισοδίων στους ασθενείς με MDS, ενώ φαίνεται να υπάρχει διαφορά στην μοριακή έκφραση μεταξύ ασθενών με υψηλού κινδύνου MDS και ασθενών με χαμηλού κινδύνου MDS (σε υψηλού κινδύνου MDS βρέθηκε αυξημένη έκφραση των μορίων CD35, CD18, CD67 σε σχέση με τα χαμηλού κινδύνου MDS) και αυτή η διαπίστωση μπορεί να σημαίνει ότι η έκφραση των μορίων αυτών έχει δυναμικά διαφοροδιαγνωστική αξία στους ασθενείς αυτούς.



BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΑΝΑΦΟΡΕΣ

1) Aul C, Bowen DT, Yoshida Y.

Pathogenesis, etiology and epidemiology of myelodysplastic syndromes.

Haematologica. 1998 Jan;83(1):71-86. Review.

2) Lichtman MA, Brennan JK

Myelodysplastic disorders

Williams Hematology *fifth edition* 1995:257-272

3) Vallespi T, Imbert M, Mecucci C, Preudhomme C, Fenaux P.

Diagnosis, classification, and cytogenetics of myelodysplastic syndromes.

Haematologica. 1998 Mar;83(3):258-75. Review.

4) Masey JA.

The myelodysplastic syndromes.

Br J Biomed Sci. 1997 Mar;54(1):65-70. Review

5) Gallagher A, Darley RL, Padua R.

The molecular basis of myelodysplastic syndromes.

Haematologica. 1997 Mar-Apr;82(2):191-204. Review.

6) Raza A.

Initial transforming event in myelodysplastic syndromes may be viral: case for cytomegalovirus.

Med Oncol. 1998 Sep;15(3):165-73.

7) Tsoplou P, Kouraklis-Symeonidis A, Thanopoulou E, Zikos P, Orphanos V, Zoumbos NC.

Apoptosis in patients with myelodysplastic syndromes: differential involvement of marrow cells in 'good' versus 'poor' prognosis patients and correlation with apoptosis-related genes.

Leukemia. 1999 Oct;13(10):1554-63.

8) Davis RE, Greenberg PL.

Bcl-2 expression by myeloid precursors in myelodysplastic syndromes: relation to disease progression.

Leuk Res. 1998 Sep;22(9):767-77.

9) Stites D, Terr A, Parslow T

Medical Immunology

Edition 9th, 1997

10) Chen H, Sandler DP, Taylor JA, Shore DL, Liu E, Bloomfield CD, Bell DA.

Increased risk for myelodysplastic syndromes in individuals with glutathione transferase theta 1 (GSTT1) gene defect.

Lancet. 1996 Feb 3;347(8997):295-7.

- 11) Kyriakou D, Eliopoulos AG, Alexandrakis M, Kalokyri I, Eliopoulos GD.
Increased expression of c-myc p67 oncoprotein in patients with myelodysplastic syndromes in transformation to acute leukaemia.
Haematologia (Budap). 1996;28(1):1-7.
- 12) Enright H, Miller W.
Autoimmune phenomena in patients with myelodysplastic syndromes.
Leuk Lymphoma. 1997 Feb;24(5-6):483-9. Review.
- 13) Elghetany MT, Peterson B, MacCallum J, Nelson DA, Varney JF, Sullivan AK, Silverman LR, Schiffer CA, Davey FR, Bloomfield CD.
Deficiency of neutrophilic granule membrane glycoproteins in the myelodysplastic syndromes: a common deficiency in 216 patients studied by the Cancer and Leukemia Group B.
Leuk Res. 1997 Sep;21(9):801-6.
- 14) West RR, Stafford DA, White AD, Bowen DT, Padua RA.
Cytogenetic abnormalities in the myelodysplastic syndromes and occupational or environmental exposure.
Blood. 2000 Mar 15;95(6):2093-7.
- 15) Sole F, Espinet B, Sanz GF, Cervera J, Calasanz MJ, Luno E, Prieto F, Granada I, Hernandez JM, Cigudosa JC, Diez JL, Bureo E, Marques ML, Arranz E, Rios R, Martinez Climent JA, Vallespi T, Florensa L, Woessner S.
Incidence, characterization and prognostic significance of chromosomal abnormalities in 640 patients with primary myelodysplastic syndromes.
Br J Haematol. 2000 Feb;108(2):346-56.
- 16) Schmetzer HM, Poleck B, Duell T, Gerhartz HH, Mittermuller J.
Cytogenetic and Southern blot analysis to demonstrate clonality and to estimate prognosis in patients with myelodysplastic syndromes.
Ann Hematol. 2000 Jan;79(1):20-9.
- 17) Felzmann T, Gisslinger H, Krieger O, Majdic O, Ludwig H, Koller U.
Immunophenotypic characterization of myelomonocytic cells in patients with myelodysplastic syndrome.
Br J Haematol. 1993 Jul;84(3):428-35.
- 18) Felzmann T, Gisslinger H, Ludwig H.
Immunological findings in patients with myelodysplastic syndrome.
Leuk Lymphoma. 1994 Oct;15(3-4):201-8. Review.
- 19) Mazzone A, Ricevuti G, Pasotti D, Fossati G, Mazzucchelli I, Cavigliano P, Notario A.
The CD11/CD18 granulocyte adhesion molecules in myelodysplastic syndromes.
Br J Haematol. 1993 Feb;83(2):245-52.

- 20) Elghetany MT.
Surface marker abnormalities in myelodysplastic syndromes.
Haematologica. 1998 Dec;83(12):1104-15. Review.
- 21) Sanz GF, Sanz MA, Greenberg PL.
Prognostic factors and scoring systems in myelodysplastic syndromes.
Haematologica. 1998 Apr;83(4):358-68. Review.
- 22) Gonzalez-Amaro R, Sanchez-Madrid F.
Cell adhesion molecules: selectins and integrins.
Crit Rev Immunol. 1999;19(5-6):389-429. Review.
- 23) Fabbri M, Bianchi E, Fumagalli L, Pardi R.
Regulation of lymphocyte traffic by adhesion molecules.
Inflamm Res. 1999 May;48(5):239-46. Review.
- 24) Parent C, Eichacker PQ.
Neutrophil and endothelial cell interactions in sepsis. The role of adhesion molecules.
Infect Dis Clin North Am. 1999 Jun;13(2):427-47, x. Review.
- 25) Gonzalez-Amaro R, Diaz-Gonzalez F, Sanchez-Madrid F.
Adhesion molecules in inflammatory diseases.
Drugs. 1998 Dec;56(6):977-88. Review.
- 26) Cavenagh JD, Cahill MR, Kelsey SM.
Adhesion molecules in clinical medicine.
Crit Rev Clin Lab Sci. 1998 Sep;35(5):415-59. Review.
- 27) Winn R, Vedder N, Ramamoorthy C, Sharar S, Harlan J.
Endothelial and leukocyte adhesion molecules in inflammation and disease.
Blood Coagul Fibrinolysis. 1998 Apr;9 Suppl 2:S17-23. Review.
- 28) Henricks PA, Nijkamp FP.
Pharmacological modulation of cell adhesion molecules.
Eur J Pharmacol. 1998 Feb 26;344(1):1-13. Review.
- 29) Joseph-Silverstein J, Silverstein RL.
Cell adhesion molecules: an overview.
Cancer Invest. 1998;16(3):176-82. Review.
- 30) Shanley TP, Warner RL, Ward PA.
The role of cytokines and adhesion molecules in the development of inflammatory injury.
Mol Med Today. 1995 Apr;1(1):40-5. Review.
- 31) Simmons PJ, Levesque JP, Zannettino AC.
Adhesion molecules in haemopoiesis.
Baillieres Clin Haematol. 1997 Sep;10(3):485-505. Review.

- 32) Penberthy TW, Jiang Y, Graves DT.
Leukocyte adhesion molecules.
Crit Rev Oral Biol Med. 1997;8(4):380-8. Review.
- 33) Gahmberg CG.
Leukocyte adhesion: CD11/CD18 integrins and intercellular adhesion molecules.
Curr Opin Cell Biol. 1997 Oct;9(5):643-50. Review.
- 34) Chothia C, Jones EY.
The molecular structure of cell adhesion molecules.
Annu Rev Biochem. 1997;66:823-62. Review.
- 35) Elangbam CS, Qualls CW Jr, Dahlgren RR.
Cell adhesion molecules--update.
Vet Pathol. 1997 Jan;34(1):61-73. Review.
- 36) Seveau S, Keller H, Maxfield FR, Piller F, Halbwachs-Mecarelli L.
Neutrophil polarity and locomotion are associated with surface redistribution of leukosialin (CD43), an antiadhesive membrane molecule.
Blood. 2000 Apr 15;95(8):2462-70.
- 37) Aguado E, Santamaria M, Gallego MD, Pena J, Molina IJ.
Functional expression of CD43 on human natural killer cells.
J Leukoc Biol. 1999 Dec;66(6):923-9.
- 38) Rosenstein Y, Santana A, Pedraza-Alva G.
CD43, a molecule with multiple functions.
Immunol Res. 1999;20(2):89-99. Review.
- 39) Nieto M, Rodriguez-Fernandez JL, Navarro F, Sancho D, Frade JM, Mellado M, Martinez-A C, Cabanas C, Sanchez-Madrid F.
Signaling through CD43 induces natural killer cell activation, chemokine release, and PYK-2 activation.
Blood. 1999 Oct 15;94(8):2767-77.
- 40) Tkaczuk J, Al Saati T, Escargueil-Blanc I, Salvayre A, Horejsi V, Durand M, de Preval C, Ohayon E, Delsol G, Abbal M.
The CBF.78 monoclonal antibody to human sialophorin has distinct properties giving new insights into the CD43 marker and its activation pathway.
Tissue Antigens. 1999 Jul;54(1):1-15.
- 41) Walker J, Green JM.
Structural requirements for CD43 function.
J Immunol. 1999 Apr 1;162(7):4109-14.
- 42) Skubitz KM, Campbell KD, Skubitz AP.
CD43 is associated with tyrosine kinase activity in human neutrophils.
J Leukoc Biol. 1998 Dec;64(6):800-2.

- 43) Lopez S, Seveau S, Lesavre P, Robinson MK, Halbwachs-Mecarelli L.
CD43 (sialophorin, leukosialin) shedding is an initial event during neutrophil migration, which could be closely related to the spreading of adherent cells.
Cell Adhes Commun. 1998 Mar;5(2):151-60.
- 44) Stockl J, Majdic O, Kohl P, Pickl WF, Menzel JE, Knapp W.
Leukosialin (CD43)-major histocompatibility class I molecule interactions involved in spontaneous T cell conjugate formation.
J Exp Med. 1996 Nov 1;184(5):1769-79.
- 45) Tada J, Omine M, Suda T, Yamaguchi N
A common signaling pathway via Syk and Lyn tyrosine kinases generated from capping of the sialomucins CD34 and CD43 in immature hematopoietic cells
Blood 1999 Jun 1;93(11):3723-35
- 46) Fukuda M, Tsuboi S
Mucin-type O-glycans and leukosialin
Biochim Biophys Acta 1999 Oct 8;1455(2-3):205-17
- 47) Carlow DA, Ardman B, Ziltener HJ
A novel CD8 T cell-restricted CD45RB epitope shared by CD43 is differentially affected by glycosylation
J Immunol 1999 Aug 1;163(3):1441-8
- 48) Stockton BM, Cheng G, Manjunath N, Ardman B, Von Andrian UH
Negative regulation of T cell homing by CD43
Immunity 1998 Mar;8(3):373-81
- 49) Thurman EC, Walker J, Jayaraman S, Manjunath N, Ardman B, Green JM
Regulation of in vitro and in vivo T cell activation by CD43
Int Immunol 1998 May;10(5):691-701
- 50) Ardman B, Sikorski MA, Staunton DE.
CD43 interferes with T-lymphocyte adhesion.
Proc Natl Acad Sci U S A. 1992 Jun 1;89(11):5001-5.
- 51) Ellies LG, Tao W, Fellingner W, Teh HS, Ziltener HJ.
The CD43 130-kD peripheral T-cell activation antigen is downregulated in thymic positive selection.
Blood. 1996 Sep 1;88(5):1725-32.
- 52) Rieu P, Porteu F, Bessou G, Lesavre P, Halbwachs-Mecarelli L.
Human neutrophils release their major membrane sialoprotein, leukosialin (CD43), during cell activation.
Eur J Immunol. 1992 Nov;22(11):3021-6.

53) Woodman RC, Johnston B, Hickey MJ, Teoh D, Reinhardt P, Poon BY, Kubes P
The functional paradox of CD43 in leukocyte recruitment: a study using CD43-deficient mice

J Exp Med 1998 Dec 7;188(11):2181-6

54) McEvoy LM, Jutila MA, Tsao PS, Cooke JP, Butcher EC
Anti-CD43 inhibits monocyte-endothelial adhesion in inflammation and atherogenesis

Blood 1997 Nov 1;90(9):3587-94

55) Weber S, Babina M, Hermann B, Henz BM
Leukosialin (CD43) is proteolytically cleaved from stimulated HMC-1 cells

Immunobiology 1997 Jun;197(1):82-96

56) Babina M, Weber S, Mammeri K, Henz BM
Signal transduction via CD43 (leukosialin, sialophorin) and associated biological effects in human mast cell line (HMC-1)

Biochem Biophys Res Commun 1998 Feb 4;243(1):163-9

57) Babina M, Weber S, Henz B
CD43 (leukosialin, sialophorin) expression is differentially regulated by retinoic acids.

Eur J Immunol 1997;27:1147-1151

58) Anzai N, Gotoh A, Shibayama H, Broxmeyer HE
Modulation of integrin function in hematopoietic progenitor cells by CD43 engagement: possible involvement of protein tyrosine kinase and phospholipase C- γ

Blood 1999 May 15;93(10):3317-26

59) Bazil V, Brandt J, Chen S, Roeding M, Luens K, Tsukamoto A, Hoffman R
A monoclonal antibody recognizing CD43 (leukosialin) initiates apoptosis of human hematopoietic progenitor cells but not stem cells

Blood 1996 Feb 15;87(4):1272-81

60) Bazil V, Brandt J, Tsukamoto A, Hoffman R
Apoptosis of human hematopoietic progenitor cells induced by crosslinking of surface CD43, the major sialoglycoprotein of leukocytes

Blood 1995 Jul 15;86(2): 502-11

61) Nycomed
Polymorphprep prod.no.221710, 1990

62) Gutensohn K, Kuehnl P
The role of flow cytometry in improving biocompatibility in transfusion medicine.

Transfus Sci 1998 Mar;19(1):17-25

- 63) Kyriakou D, Karkavitsas N, Eliopoulos G, Spandidos D
Immunohistochemical analysis of the ras p21 oncoprotein in Hashimoto's thyroiditis
Anticancer Res 1992;12:1189
- 64) Miltenyi Biotec
Instruments and reagents for magnetic cell sorting.
1997: p3.5,p3.6,p5.2,p5.3
- 65) Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T
Molecular cloning
Edition 2nd, 1989, 5.52-5.56, 6.53-6.54, 7.6-7.9, 7.26-7.29, 7.37-7.42, 10.13-10.15, 13.6-13.12, 14.2-14.4, 18.47-18.75
- 66) Markoff A, Savov A, Vladimirov V, Bogdanova N, Kremensky I, Ganey V
Optimization of single stranded conformational polymorphism analysis in the presence of polyethylene glycol.
Clin Chem 1997;43(1):30-33
- 67) Kyriakou D, Papadaki H, Katrinakis G, Eliopoulos AG, Eliopoulos GD
Serum soluble IL-6 receptor concentration correlate with stages of multiple myeloma defined by serum b2-microglobulin and c-reactive protein.
Int J Hematol 1997;66(3):367-371
- 68) Τριχόπουλος Δ
Ιατρική Στατιστική: Αρχές και Βασικές Μέθοδοι Βιο-ιατρικής Στατιστικής
Έκδοση 1975:43-63, 116-122, 127-145, 150-163
- 69) Cyster JC, Williams AF
The importance of cross-linking in the homotypic aggregation of lymphocytes induced by anti-leukosialin (CD43) antibodies.
Eur J Immunology 1992;22(10):2565-2572
- 70) Misawa Y, Nagaoka H, Kimoto H, Ishii Y, Kitamura Y, Tsunetsugu-Yokota Y, Shibuya M, Takemori T
CD43 expression in a B cell lymphoma, WEHI 231, reduces susceptibility to G1 arrest and extends survival in culture upon serum depletion.
Eur J Immunol 1996;26:2573-2581
- 71) Sperling AI, Green JM, Mosley RL, Smith PL, Di Paolo RJ, Bluestone JA, Thompson CB
CD43 is a murine T-cell costimulatory receptor that functions independently of CD28.
J Exp Med 1995;182:139-146
- 72) Alvarado M, Klassen C, Cerny J, Horejsi VH, Schmidt RE
MEM-59 monoclonal antibody detects a CD43 epitope involved in lymphocyte activation.
Eur J Immunol 1995;25:1051-1055

- 73) Yonemura S, Magafuchi A, Sato N, Tsukita S
Concentration of an integral membrane protein CD43 (leukosialin, sialophorin) in the cleavage furrow through the interaction of its cytoplasmic domain with actin-based cytoskeletons.
J Cell Biol 1993;120:437-449
- 74) Yonemura S, Hirao M, Doi Y, Takahashi N, Kondo T, Tsukita S
Ezrin/radixin/moesin (ERM) proteins bind to a positively charged amino acid cluster in the juxta-membrane cytoplasmic domain of CD44, CD43 and ICAM-1.
J Cell Biol 1998;140(4):885-895
- 75) Ostberg RJ, Barth KR, Frelinger GJ
The Roman god Janos: a paradigm for the function of CD43.
Immunol Today 1998;19(12):546-550
- 76) Rosenstein Y, Park JK, Hahn WC, Rosen FS, Bierer BE, Burakoff SJ
CD43, a molecule defective to Wiskott-Aldrich syndrome, binds ICAM-1.
Nature 1991;354(6350):233-235
- 77) Axelson B, Youseffi-Etemad R, Hammarstrom S, Perlmann P
Induction of aggregation and enhancement of proliferation and IL-2 secretion in human T cells by antibodies to CD43.
J Immunol 1988;141(9):2912-2917
- 78) Zannettino CWA, Buhning H-J, Niuitta S, Watt MS, Benton AM, Simmons JP
The sialomucin CD164 (MGC-24v) is an adhesive glycoprotein expressed by human hemopoietic progenitors and bone marrow stromal cells that serves as a potent negative regulator of hemopoiesis.
Blood 1998;92(8):2613-2628
- 79) Brown TJ, Shuford WW, Wang WC, Nadler SG, Bailey TS, Marquardt H, Mittler RS
Characterization of a CD43-mediated pathway for inducing apoptosis in human T-lymphoblastoid cells.
J Biol Chem 1996 Nov, 271(44):277686-277695
- 80) Wong CK, Remold-O'Donnell E, Vercelli D, Sancho J, Terhorst C, Rosen ZF, Geha R, Chatila T
Signal transduction via leukocyte antigen CD43 (sialophorin): Feedback regulation by protein kinase C.
J Immunol 1990;144:1455-60
- 81) Silverman LB, Wong CK, Remold-O'Donnell E, Vercelli D, Sancho J, Terhorst C, Rosen ZF, Geha R, Chatila T
Mechanism of mononuclear cell activation by an anti-CD43 agonistic antibody
J Immunol 1990;142:4194-4200
- 82) Steinman RM
The dendritic cell system and its role in immunogenicity.
Annu Rev Immunol 1991;9:271-96

- 83) O'Doberty U, Steiman RM, Peng M, Cameron CU, Gezelter S, Kopeloff I, Swiggard WJ, Pope M, Bhardwaj N
Dendritic cells freshly isolated from human blood express CD4 and mature into typical immunostimulatory dendritic cells after culture in monocyte-conditioned medium.
J Exp Med 1993;178:1067-76
- 84) Varki A
Selectin ligands.
Proc Natl Acad Sci USA 1994;91:7390-7
- 85) Ahuja N, Miller SE, Howell DN
Identification of rat monocytes expressing disparate molecular forms and quantities of CD43.
Cell Immunol 1995 June;163(1):59-69
- 86) Remold O'Donnell E, Parent D
Two proteolytic pathways for down-regulation of the barrier molecule CD43 of human neutrophils.
J Immunol 1994;152:3595-605
- 87) Jones AT, Federspiel B, Ellies LG, Williams MJ, Burfener R, Duronio V, Smith CA, Takei F, Ziltener HJ
Characterization of the activation isoform of CD43 on murine T-lymphocytes
J Immunol 1994;153:3426-39
- 88) Scriba A, Schneider M, Grau V, Van Der Meide PH, Steininger B
Rat monocytes upregulate NKR-P1A and downmodulate CD4 and CD43 during activation in vivo: monocyte subpopulation in normal and IFN-gamma-treated rats.
J Leukoc Biol 1997 Dec;62(6):741-52
- 89) Belasio-Fanales E, Zambruno G, Cavani A, Girolomoni G
Antibodies against sialophorin (CD43) enhance the capacity of dendritic cells to cluster and activate T-lymphocytes.
The J Immunol 1997;159:2203-2211
- 90) Manjunath N, Johnson RS, Staunton DE, Pasqualini R, Ardman B
Targeted disruption of CD43 genes enhances T-lymphocyte adhesion.
J Immunol 1993;151:1528-34
- 91) Vargas-Cortes M, Axelson B, Larsson A, Berzins T, Perlman P
Enhancement of human spontaneous cell-mediated cytotoxicity by a monoclonal antibody against the large sialoglycoprotein (CD43) on peripheral blood lymphocytes.
Scand J Immunol 1988;27:661-71

- 92) De Smet W, Walter H, Van Hove L
A new CD43 monoclonal antibody induces homotypic aggregation of human leukocyte through a CD11a/CD18-dependent and independent mechanism.
Immunol 1993;79:46-54
- 93) Rosenstein Y, Park JK, Hahn WC, Rosen FS, Bierer BE, Burakoff SJ
CD43, a molecule defective in Wiskott-Aldrich syndrome, binds ICAM-1.
Nature 1991;354:233-5
- 94) Kapsenberg ML, Stiekema FEM, Kallan A, Bos JD, Roozmond RC
The restrictive role of sialic acid in antigen presentation to a subset of human peripheral CD4+ lymphocytes that require antigen presenting dendritic cells.
Eur J Immunol 1989;19:1829-34
- 95) Hauss P, Selz F, Cavazzana-Calvo M, Fisher A
Characterization of antigen-independent and antigen-dependent interaction of dendritic cells with CD4+ cells.
Immunol 1995;25:2285-94
- 96) Mentzer SJ, Remold-O'Donnell E, Crimmins MAV, Bierer BE, Rosen FS, Burakoff SJ
Sialophorin, a surface sialoglycoprotein defective in the Wiskott-Aldrich syndrome, is involved in human T-lymphocyte proliferation.
J Exp Med 1987;165:1383-92
- 97) McFarland TA, Ardman B, Manjunath N, Farby JA, Lieberman J
CD43 diminishes susceptibility to lymphocyte-mediated cytotoxicity.
J Immunol 1995;154:1097-1104
- 98) Manjunath N, Ardman B
CD43 regulates tyrosine kinase phosphorylation of a 93kDa protein in T-lymphocytes.
Blood 1995;86:4194-8
- 99) Lopez S, Seveau S, Lesavre P, Robinson MK, Halbwachs-Mecarelli L
CD43 shedding is an initial event during neutrophil migration, which could be closely related to the spreading of adherent cells.
Cell Adhes Commun 1998;5(2):151-60
- 100) Felzmann T, Gadd S, Majdic O, Petera P, Smolen J, Knapp W
Analysis of function-associated receptor molecules on peripheral blood and synovial fluid granulocytes from patients with rheumatoid and reactive arthritis.
Clin Immunol 1991;11:205-12
- 101) Hastl R, Nilson I, Widell S, Ost A
Diagnostic significance of dysplastic features of peripheral blood polymorphs in myelodysplastic syndromes.
Leuk Res 1998;13:173-178

- 102) Hernandez-Garcia C, Fernandez-Gutierrez B, Morado IC, Banares AA, Jover JA
The CD69 activation pathway in rheumatoid arthritis synovial fluid T cells.
Arthr Reum 1996 Aug;39(8):1277-86
- 103) Tassone P, Turco MC, Tuccillo F, Bonelli P, Morrone G, Cecco L, Cerra M, Bond H, Di Nicola M, Gianni AM, Venuta S
CD69 expression on primitive progenitor cells and hematopoietic malignancies.
Tissue Antigens 1996 Jul;48(1):65-8
- 104) Castellanos MC, Munoz C, Montoya MC, Lara-Pezi E, Lopez-Cabrera M, De Landazuri MO
Expression of the leukocyte early activation antigen CD69 is regulated by the transcription factor AP-1.
J Immunol 1997 Dec 1;159(11):5463-73
- 105) Fisher GF, Majdic O, Gadd S, Knapp W
Signal transduction in lymphocytic and myeloid cells via CD24, a new member of phosphoinositol-anchored membrane molecules.
J Immunol 1990;144:638-641
- 106) Ross GD, Medoff ME
Membrane receptors specific for bound fragments of C3.
Advances in Immunol 1985;37:217-235
- 107) Arnaout MA, Spits H, Terhorst C, Pitt J, Todd RF 3rd
Deficiency of a leukocyte surface glycoprotein (LFA-1) in two patients with Mo1 deficiency. Effects of cell activation on Mo1/LFA-1 surface expression in normal and deficient leukocytes.
J Clin Invest 1984 Oct;74(4):1291-1300
- 108) Arnaout MA
Structure and function of the leukocyte adhesion molecules CD11/CD18.
Blood 1990;75:1037-1045
- 109) Harada H, Harada Y.
Point mutations in the AML1/RUNX1 gene associated with myelodysplastic syndrome.
Crit Rev Eukaryot Gene Expr. 2005;15(3):183-96. Review.
- 110) Scott BL, Deeg HJ.
Hemopoietic cell transplantation for the myelodysplastic syndromes.
Arch Immunol Ther Exp (Warsz). 2005 Jul-Aug;53(4):297-307. Review.
- 111) Disperati P, Ichim CV, Tkachuk D, Chun K, Schuh AC, Wells RA.
Progression of myelodysplasia to acute lymphoblastic leukaemia: implications for disease biology.
Leuk Res. 2006 Feb;30(2):233-9. Epub 2005 Jul 25. Review.

- 112) Beyer V, Muhlematter D, Parlier V, Cabrol C, Bougeon-Mamin S, Solenthaler M, Tobler A, Pugin P, Gregor M, Hitz F, Hess U, Chapuis B, Laurencet F, Schanz U, Schmidt PM, van Melle G, Jotterand M.
Polysomy 8 defines a clinico-cytogenetic entity representing a subset of myeloid hematologic malignancies associated with a poor prognosis: report on a cohort of 12 patients and review of 105 published cases.
Cancer Genet Cytogenet. 2005 Jul 15;160(2):97-119. Review.
- 113) Ogasawara T, Yasuyama M, Kawauchi K.
Therapy-related myelodysplastic syndrome with monosomy 5 after successful treatment of acute myeloid leukemia (M2).
Am J Hematol. 2005 Jun;79(2):136-41. Review.
- 114) Giralt S.
Bone marrow transplant in myelodysplastic syndromes: new technologies, same questions.
Curr Hematol Rep. 2005 May;4(3):200-7. Review.
- 115) Feldman EJ.
Farnesyltransferase inhibitors in myelodysplastic syndrome.
Curr Hematol Rep. 2005 May;4(3):186-90. Review.
- 116) Sekeres MA, List A.
Lenalidomide (Revlimid, CC-5013) in myelodysplastic syndromes: is it any good?
Curr Hematol Rep. 2005 May;4(3):182-5. Review.
- 117) Komrokji RS, Bennett JM.
The clinical implications of the World Health Organization's classification of myelodysplastic syndromes.
Curr Hematol Rep. 2005 May;4(3):175-81. Review.
- 118) Kaminskas E, Farrell AT, Wang YC, Sridhara R, Pazdur R.
FDA drug approval summary: azacitidine (5-azacytidine, Vidaza) for injectable suspension.
Oncologist. 2005 Mar;10(3):176-82. Review.
- 119) Su YW, Chang MC, Chiang MF, Hsieh RK.
Treatment-related myelodysplastic syndrome after temozolomide for recurrent high-grade glioma.
J Neurooncol. 2005 Feb;71(3):315-8. Review.
- 120) Hofmann WK, Koeffler HP.
Myelodysplastic syndrome.
Annu Rev Med. 2005;56:1-16. Review.

121) Ogata M, Ohtsuka E, Imamura T, Ikewaki J, Ogata Y, Kohno K, Nakayama T, Ono K, Saburi Y, Kikuchi H, Nasu M.

Response to cyclosporine therapy in patients with myelodysplastic syndrome: a clinical study of 12 cases and literature review.

Int J Hematol. 2004 Jul;80(1):35-42. Review.

122) Komrokji R, Ifthikharuddin JJ, Felgar RE, Abboud CN, Wedow LA, Connaughton A, Bennett JM.

Donor cell myelodysplastic syndrome after allogeneic stem cell transplantation responding to donor lymphocyte infusion: case report and literature review.

Am J Hematol. 2004 Aug;76(4):389-94. Review.

123) Faderl S, Kantarjian HM.

Novel therapies for myelodysplastic syndromes.

Cancer. 2004 Jul 15;101(2):226-41. Review.

124) Keung YK, Beaty M, Powell BL, Molnar I, Buss D, Pettenati M.

Philadelphia chromosome positive myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukemia-retrospective study and review of literature.

Leuk Res. 2004 Jun;28(6):579-86. Review.

125) Suwanawiboon B, Sumida KN.

5-azacitidine: An alternative treatment of myelodysplastic syndromes in patient with refractory response to hematopoietic growth factor, a case report and review of literatures.

Hawaii Med J. 2004 Jan;63(1):14-6, 25. Review.

126) Sato N, Nakazato T, Kizaki M, Ikeda Y, Okamoto S.

Transformation of myelodysplastic syndrome to acute lymphoblastic leukemia: a case report and review of the literature.

Int J Hematol. 2004 Feb;79(2):147-51. Review.

127) Valent P, Wimazal F, Schwarzinger I, Sperr WR, Geissler K.

Pathogenesis, classification, and treatment of myelodysplastic syndromes (MDS).

Wien Klin Wochenschr. 2003 Aug 14;115(13-14):515-36. Review.

128) Benesch M, Deeg HJ.

Hematopoietic cell transplantation for adult patients with myelodysplastic syndromes and myeloproliferative disorders.

Mayo Clin Proc. 2003 Aug;78(8):981-90. Review.

129) Matsumoto M, Atarashi K, Umemoto E, Furukawa Y, Shigeta A, Miyasaka M, Hirata T.

CD43 functions as a ligand for E-Selectin on activated T cells.

J Immunol. 2005 Dec 15;175(12):8042-50.

130) Fuhlbrigge RC, King SL, Sackstein R, Kupper TS.

CD43 is a ligand for E-selectin on CLA+ human T cells.

Blood. 2006 Feb 15;107(4):1421-6. Epub 2005 Nov 3.

- 131) Lee PS, Beneck D, Weisberger J, Gorczyca W.
Coexpression of CD43 by benign B cells in the terminal ileum.
Appl Immunohistochem Mol Morphol. 2005 Jun;13(2):138-41.
- 132) Tsao L, Colovai AI, Jiang JG, Bhagat G, Alobeid B.
Characterizing CD43 expression in haematogones using multicolor flow cytometric analysis.
Br J Haematol. 2005 Mar;128(6):820-3.
- 133) del Rio R, Rincon M, Layseca-Espinosa E, Fierro NA, Rosenstein Y, Pedraza-Alva G.
PKCtheta is required for the activation of human T lymphocytes induced by CD43 engagement.
Biochem Biophys Res Commun. 2004 Dec 3;325(1):133-43.
- 134) Ziprin P, Alkhamesi NA, Ridgway PF, Peck DH, Darzi AW.
Tumour-expressed CD43 (sialophorin) mediates tumourmesothelial cell adhesion.
Biol Chem. 2004 Aug;385(8):755-61.
- 135) Mattioli I, Dittrich-Breiholz O, Livingstone M, Kracht M, Schmitz ML.
Comparative analysis of T-cell costimulation and CD43 activation reveals novel signaling pathways and target genes.
Blood. 2004 Nov 15;104(10):3302-4. Epub 2004 Jul 27.
- 136) Fernandez-Cabezudo MJ, Vijayasarathy C, Pflugh DL, Bothwell AL, al-Ramadi BK.
Evidence for a dual pathway of activation in CD43-stimulated Th2 cells: differential requirement for the Lck tyrosine kinase.
Int Immunol. 2004 Aug;16(8):1215-23. Epub 2004 Jul 5.
- 137) Kyoizumi S, Ohara T, Kusunoki Y, Hayashi T, Koyama K, Tsuyama N.
Expression characteristics and stimulatory functions of CD43 in human CD4+ memory T cells: analysis using a monoclonal antibody to CD43 that has a novel lineage specificity.
J Immunol. 2004 Jun 15;172(12):7246-53.
- 138) Nusbaum P, Laine C, Seveau S, Lesavre P, Halbwachs-Mecarelli L.
Early membrane events in polymorphonuclear cell (PMN) apoptosis: membrane blebbing and vesicle release, CD43 and CD16 down-regulation and phosphatidylserine externalization.
Biochem Soc Trans. 2004 Jun;32(Pt3):477-9. Review.
- 139) Kadaja L, Laos S, Maimets T.
Overexpression of leukocyte marker CD43 causes activation of the tumor suppressor proteins p53 and ARF.
Oncogene. 2004 Apr 1;23(14):2523-30. Erratum in: Oncogene. 2004 Aug 19;23(37):6326.

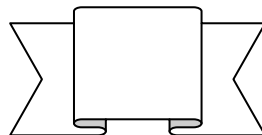
140) Park WS, Chae JS, Jung KC, Choi WJ, Kook MC, Bae Y.
Production and the characterization of monoclonal antibody against CD43, K06.
Tissue Antigens. 2004 Jan;63(1):46-53.

141) Eda S, Yamanaka M, Beppu M.
Carbohydrate-mediated phagocytic recognition of early apoptotic cells undergoing transient capping of CD43 glycoprotein.
J Biol Chem. 2004 Feb 13;279(7):5967-74. Epub 2003 Nov 12.

142) Cho JY, Chain BM, Vives J, Horejsi V, Katz DR.
Regulation of CD43-induced U937 homotypic aggregation.
Exp Cell Res. 2003 Oct 15;290(1):155-67.

143) Layseca-Espinosa E, Pedraza-Alva G, Montiel JL, del Rio R, Fierro NA, Gonzalez-Amaro R, Rosenstein Y.
T cell aggregation induced through CD43: intracellular signals and inhibition by the immunomodulatory drug leflunomide.
J Leukoc Biol. 2003 Dec;74(6):1083-93. Epub 2003 Sep 12.

144) Dehghani Zadeh A, Seveau S, Halbwachs-Mecarelli L, Keller HU.
Chemotactically-induced redistribution of CD43 as related to polarity and locomotion of human polymorphonuclear leucocytes.
Biol Cell. 2003 Jul;95(5):265-73.



ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ:

ΗΛΙΑΣ ΣΠ. ΚΥΡΙΑΚΟΥ

Αιματολόγος

Γεννήθηκα στη Λαμία Φθιώτιδας στις 25/12/1972 όπου και τελείωσα την υποχρεωτική 12ετή σχολική εκπαίδευσή μου το 1990, έχοντας βαθμό άριστα σε όλες τις τάξεις του Δημοτικού, Πειραματικού Γυμνασίου και Γενικού Λυκείου, αποκτώντας παράλληλα πτυχία στην Αγγλική γλώσσα και στις Μουσικές σπουδές. Συμμετείχα στις Πανελλαδικές Γενικές εξετάσεις του 1990, μέσω των οποίων εισήχθη με υποτροφία στην Ιατρική σχολή του Πανεπιστημίου της Αθήνας, όπου και εγγράφηκα το Σεπτέμβριο του ίδιου έτους.

Παρακολούθησα τα μαθήματα της Ιατρικής σχολής μέχρι τον Ιούλιο του 1996, οπότε και αποφοίτησα με βαθμό "λίαν καλώς", συμμετέχοντας με επιτυχία στις θεωρητικές, εργαστηριακές και κλινικές εκδηλώσεις της σχολής. Ως φοιτητής συμμετείχα σε εργασιακές ομάδες και εκπαιδευτικά συνέδρια, ενώ η πτυχιακή μου εργασία στην Γ' Πανεπιστημιακή Παθολογική Κλινική του Πανεπιστημίου Αθηνών με θέμα *"Πρωτοπαθής χολική κίρρωση- Αυτοάνοση χολαγγειίτιδα: Διαφορική διάγνωση με αφορμή μιας κλινικής περίπτωσης"* έτυχε μνείας από τον Καθηγητή Παθολογίας κ. Θ. Μουντοκαλάκη.

Από το καλοκαίρι του 1996 και επί 4μηνο παρακολούθησα ως άμισθος Ιατρός τις εργασίες της Αιματολογικής Κλινικής του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ηρακλείου, υπό τη Διεύθυνση του Καθηγητή Κου Γεώργιου Ηλιόπουλου, αποκτώντας τις πρώτες μου κλινικοεργαστηριακές εμπειρίες και αναλαμβάνοντας στοιχειώδες εκπαιδευτικό έργο σε 4ετείς φοιτητές της Ιατρικής.

Από το χειμώνα του 1996 ως το φθινόπωρο του 1998 εκπλήρωσα την Υπηρεσία Υπαίθρου στο Κέντρο Υγείας Χάρακα Νομού Ηρακλείου.

Από το φθινόπωρο του 1998 ως το φθινόπωρο του 2000 εργάστηκα επί 2ετία ως βοηθός ειδικευόμενος Ιατρός Παθολογίας στην Α' Παθολογική Κλινική του Βενιζελείου Γενικού Νοσοκομείου Ηρακλείου, υπό τη διεύθυνση αρχικά της Κας Α. Μόραλη και στη συνέχεια του Κου Στ. Κορτσιδάκη. Κατά τη διάρκεια αυτών των 2 ετών, όντας αποσπασμένος επί 9μηνο στο Αιματολογικό Τμήμα του Βενιζελείου Γ.Ν.Α., υπό τη Διεύθυνση του Κου Π. Ηλιάκη, είχα την ευκαιρία να αποκτήσω κλινικοεργαστηριακή εμπειρία στην Αιματολογία.

Από το Μάρτιο του 2001 έως το Μάρτιο του 2002 εκπλήρωσα τη 12μηνη στρατιωτική μου θητεία ως οπλίτης ιατρός του Στρατού Ξηράς.

Από τον Απρίλιο του 2002 έως τον Απρίλιο του 2006 εργάστηκα ως βοηθός ειδικευόμενος ιατρός Αιματολογίας στο Αιματολογικό Τμήμα της Α' Προπαιδευτικής Παθολογικής Κλινικής του Λαϊκού Νοσοκομείου Αθηνών υπό τη διεύθυνση του Καθηγητή Παθολογίας Κου Ν.Κατσιλάμπρου και υπό την εποπτεία του Επίκ. Καθηγητή Αιματολογίας Κου Π.Παναγιωτίδη και της Λέκτορος Αιματολογίας Κας Μ. Χ. Κυρτσώνη. Κατά τη διάρκεια της 4ετίας, εκπαιδεύτηκα στην Κλινική και Εργαστηριακή Αιματολογία, εργάστηκα επί 6μηνο στο Κέντρο Αιμοδοσίας και Αιμορροφιλικών, ενώ απέκτησα στοιχειώδη εμπειρία στην Αυτόλογη και Αλλογενή Μεταμόσχευση Μυελού των Οστών, αποσπασμένος επί 6μηνο στην Αιματολογική Κλινική και Λεμφωμάτων του Νοσοκομείου "Ευαγγελισμός", υπό τη Διεύθυνση του Κου Εμμ. Νικηφοράκη και την εποπτεία των Κων Ν. Χαρχαλάκη, Ι. Μπαλταδάκη, Δ. Καρακάση και Ι.Αποστολίδη.

Από τον Ιούνιο του 2006 κατέχω την ειδικότητα του Αιματολόγου και με την ιδιότητα του επιστημονικού συνεργάτη στο Αιματολογικό τμήμα της Α΄ΠΠΚ του Λαϊκού Νοσοκομείου Αθηνών ανέλαβα ως τον Οκτώβρη του 2006 κλινικοεργαστηριακές, ερευνητικές και εκπαιδευτικές αρμοδιότητες.

Από τον Οκτώβριο του 2006 εργάζομαι ως επικουρικός Αιματολόγος στην Αιμοδοσία του Νοσοκομείου ΚΑΤ υπό τη διεύθυνση της κας Ι. Σπηλιωτοπούλου.

Από τις αρχές του 1997 εκπονώ τη διδακτορική μου διατριβή στο Πανεπιστήμιο Ηρακλείου με θέμα " Επίκτητες διαταραχές των μορίων προσκόλλησης και του CD43 σε ασθενείς με Μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα και η επαγόμενη ευαισθησία των ασθενών αυτών σε λοιμώξεις". Η διδακτορική μου διατριβή τη στιγμή αυτή ευρίσκεται στο στάδιο της υποστήριξής της.

Από τον Οκτώβριο του 2002 είμαι παντρεμένος με την Ειδικευόμενη Παιδιάτρο Κα Κωνσταντίνα Α. Πατσιά, με την οποία έχω αποκτήσει μία κόρη.

Κατά την τελευταία 11ετία που ασκώ το ιατρικό λειτούργημα, έχω συμμετάσχει στις παρακάτω εργασίες που είτε δημοσιεύτηκαν ή τελούν υπό δημοσίευση σε περιοδικά είτε ανακοινώθηκαν σε Πανελλήνια ή Διεθνή συνέδρια:

- 1) Aberrant expression of the major sialoglycoprotein (CD43) on the monocytes of patients with myelodysplastic syndromes.
Kyriakou D, Liapi D, Kyriakou E, Alexandrakis M, Vlachonikolis IG, Mavromanolakis M, Eliakis P, Eliopoulos GD
Ann Hematol 2000 Apr;79(4):198-205
- 2) Reduced CD43 expression on the neutrophils of MDS patients correlates with an activated phenotype of these cells.
Kyriakou D, Alexandrakis M, Kyriakou E, Liapi D, Kourelis T, Mavromanolakis M, Vlachonikolis I, Eliakis P
Int J Hematol 2001 Jun;73(4):483-91
- 3) Activated peripheral blood and endothelial cells in thalassemia patients.
D.Kyriakou, M.Alexandrakis, E.Kyriakou, D.Liapi, T.Kourelis, F.Passam, A.Papadakis
Ann Hematol 2001 Oct;80(10):577-83
- 4) Alterations of CD43 expression in transfusion-dependent myelodysplastic syndromes.
E.Kyriakou et al
(Υπό δημοσίευση στο περιοδικό Annals of Hematology)
- 5) Έλεγχος εμβολιασμών στα παιδιά ηλικίας 4-18 χρόνων κατά το σχολικό έτος 1996-97, της περιοχής του Κ.Υ. Χάρακα Νομού Ηρακλείου
Ε.Παπαδάκης, Ν.Δρακωνάκης, Ρ.Αλεξανδράκη, Ε.Παπαδάκη, Δ.Μπρίμης, Ν.Χαλκιαδάκης, Κ.Σεραφειμίδη, Η.Κυριάκου, Ε.Σταυρακάκη, Π.Παρασύρης†, Γ.Ξηρουχάκης, Γ.Παπαδόπουλος
9^ο ΠΑΓΚΡΗΤΙΟ ΙΑΤΡΙΚΟ ΣΥΝΕΔΡΙΟ, ΗΡΑΚΛΕΙΟ, 1998
- 6) Μειωμένη έκφραση της σιαλοφορίνης (CD43) στα μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα
Δ.Κυριάκου, Μ.Αλεξανδράκης, Δ.Λιάπη, Η.Κυριάκου, Γ.Ηλιόπουλος
10^ο ΠΑΝΕΛΛΗΝΙΟ ΑΙΜΑΤΟΛΟΓΙΚΟ ΣΥΝΕΔΡΙΟ, ΡΟΔΟΣ, 1999

- 7) Δείκτες θνησιμότητας σε πληθυσμό της περιοχής ευθύνης του Κ.Υ. Χάρακα Νομού Ηρακλείου
ΓΖ Παπαδόπουλος, Δ Μπρίμης, Ν Δρακωνάκης, Ρ Αλεξανδράκη, Η Κυριάκου, Γ Πατεράκης, Κ Χαμαλάκης, Κ Σεραφειμίδη, Ε Σταυρακάκη, Ζ Τρουλάκη
 11^ο ΠΑΝΕΛΛΗΝΙΟ ΣΥΝΕΔΡΙΟ ΓΕΝΙΚΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ, ΚΕΡΚΥΡΑ, 1999
- 8) Οι επιπλοκές του οξέος αγγειακού εγκεφαλικού επεισοδίου
Δ.Φραγκάκης, Ε.Κυριακάκης, Ε.Μαρκατσέλλα, Α.Ιερωνυμίδη, Μ.Λουλακάκη, Η.Κυριάκου
 3^ο ΠΑΝΔΩΔΕΚΑΝΗΣΙΑΚΟ ΙΑΤΡΙΚΟ ΣΥΝΕΔΡΙΟ, ΡΟΔΟΣ, 1999
- 9) Ψυχολογική υποστήριξη σε πάσχοντες με HIV/AIDS στην Ελλάδα
Φ.Γαβαλάκη, Π.Βύρας, Ε.Πάλλης, Η.Κυριάκου
 16^ο ΠΑΝΕΛΛΗΝΙΟ ΣΥΝΕΔΡΙΟ ΨΥΧΙΑΤΡΙΚΗΣ, ΚΥΠΡΟΣ, 2000
- 10) Επιλογή ευθανασίας από ασθενείς με HIV/AIDS
Π.Βύρας, Ν.Ξηρουχάκης, Η.Κυριάκου, Ε.Πάλλης
 16^ο ΠΑΝΕΛΛΗΝΙΟ ΣΥΝΕΔΡΙΟ ΨΥΧΙΑΤΡΙΚΗΣ, ΚΥΠΡΟΣ, 2000
- 11) Decreased expression of sialoporphin on the neutrophils of patients with MDS
Ε Κυριακου, Δ Λιαπi, ΤV Kourelis, Μ Alexandrakis, Ρ Eliakis, Ε Mavraki, Δ Κυριακου
 5^ο ΠΑΝΕΥΡΩΠΑΪΚΟ ΑΙΜΑΤΟΛΟΓΙΚΟ ΣΥΝΕΔΡΙΟ, BIRMINGHAM, 2000
- 12) Activated peripheral blood cells circulate in patients with homozygous β-thalassaemia
Ε Κυριακου, Δ Λιαπi, Μ Alexandrakis, Α Papadakis, ΤV Kourelis, Ρ Eliakis, Δ Κυριακου
 5^ο ΠΑΝΕΥΡΩΠΑΪΚΟ ΑΙΜΑΤΟΛΟΓΙΚΟ ΣΥΝΕΔΡΙΟ, BIRMINGHAM, 2000
- 13) Καταγραφή περιστατικών αιμορραγίας πεπτικού στην Α΄ Παθολογική του Β.Π.Γ.Ν.Η. από 1/3/99 έως 31/5/00
Η.Κυριάκου, Δ.Φραγκάκης, Κ.Διαφωνίδης, Γ.Πασπάτης, Δ.Αρετουλάκη, Ε.Κυριακάκης
 10^ο ΠΑΓΚΡΗΤΙΟ ΙΑΤΡΙΚΟ ΣΥΝΕΔΡΙΟ, ΡΕΘΥΜΝΟ, 2000
- 14) Καταγραφή του επιπολασμού του Helicobacter Pylori σε ασθενείς με αιμορραγία ανωτέρου πεπτικού στην Α΄ Παθολογική του Β.Π.Γ.Ν.Η. από 1/3/99 έως 31/5/00
Η.Κυριάκου, Δ.Φραγκάκης, Κ.Διαφωνίδης, Γ.Πασπάτης, Δ.Αρετουλάκη, Ε.Κυριακάκης
 10^ο ΠΑΓΚΡΗΤΙΟ ΙΑΤΡΙΚΟ ΣΥΝΕΔΡΙΟ, ΡΕΘΥΜΝΟ, 2000
- 15) Ενδοεγκεφαλική αιμορραγία σε ασθενή με χρόνια μυελογενή λευχαιμία υπό αγωγή με ιντερφερόνη-α.
Δ.Λιάπη, Α.Χατζηβασίλη, Η.Κυριάκου, Π.Ηλιάκης
 10^ο ΠΑΓΚΡΗΤΙΟ ΙΑΤΡΙΚΟ ΣΥΝΕΔΡΙΟ, ΡΕΘΥΜΝΟ, 2000
- 16) Υπέρταση και κληρονομικότητα- Επιδημιολογική έρευνα
Δ.Φραγκάκης, Ν.Τζαγκαράκης, Η.Κυριάκου, Κ.Διαφωνίδης, Ε.Μαρκατσέλλα, Β.Κισσαμιτάκη, Ε.Κυριακάκης
 6^ο ΠΑΝΕΛΛΗΝΙΟ ΣΥΝΕΔΡΙΟ ΠΑΘΟΛΟΓΙΑΣ, ΑΘΗΝΑ, 2000
- 17) Επίπεδα διαλυτού υποδοχέα τρανσφερρίνης στη σιδηροπενική αναιμία και την αναιμία χρονίου νοσήματος
Δ.Λιάπη, Ε.Φαρσαράκη, Φ.Αθουσάκη-Νεονάκη, Α.Χατζηβασίλη, Ν.Τζαγκαράκης, Γ.Χατζηδάκης, Η.Κυριάκου, Π.Ηλιάκης
 11^ο ΠΑΝΕΛΛΗΝΙΟ ΑΙΜΑΤΟΛΟΓΙΚΟ ΣΥΝΕΔΡΙΟ, ΘΕΣ/ΝΙΚΗ 2000

- 18) Μειωμένη έκφραση της σιαλοφορίνης στα μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα
Η.Κυριάκου, Δ.Λιάπη, Τ.Β.Κουρέλης, Μ.Αλεξανδράκης, Π.Ηλιάκης, Δ.Κυριάκου
10ο ΠΑΓΚΡΗΤΙΟ ΙΑΤΡΙΚΟ ΣΥΝΕΔΡΙΟ, ΡΕΘΥΜΝΟ, 2000
- 19) Θρομβοαιμορραγικές επιπλοκές σε ασθενείς με ιδιοπαθή θρομβοκυτταραιμία
Δ.Λιάπη, Α.Χατζηβασίλη, Η.Κυριάκου, Π.Ηλιάκης
13ο ΠΑΝΕΛΛΗΝΙΟ ΑΙΜΑΤΟΛΟΓΙΚΟ ΣΥΝΕΔΡΙΟ, ΠΑΤΡΑ 2002
- 20) Hemophagocytic syndrome presented as FUO in cytopenic AML patients
Dimou M, Georgiou G, Kyriakou E, Grecka P, Zouvelou C, Chrysochoou S, Panayiotidis P, Poppis E
6th INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON FEBRILE NEUTROPENIA, BRUSSELS, BELGIUM, 2003
- 21) Gastrointestinal Mucormycosis in a neutropenic patient with AML (M5)
Dimou M, Nikiteas N, Zouvelou C, Kyriakou E, Kokkinos A, Revenas K, Toskas A, Panayiotidis P, Petrikkos G
6th INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON FEBRILE NEUTROPENIA, BRUSSELS, BELGIUM, 2003
- 22) Οξεία διφαινοτυπική λευχαιμία σε ασθενείς με HIV λοίμωξη
Χ.Ζούβελου, Α.Κουραμπά, Ο.Κατσαρού, Σ.Χρυσόχου, Μ.Δήμου, Η.Κυριάκου, Π.Γκρέκα, Κ.Ρεβένας, Π.Παναγιωτίδης, Α.Καραφουλίδου
14ο ΠΑΝΕΛΛΗΝΙΟ ΑΙΜΑΤΟΛΟΓΙΚΟ ΣΥΝΕΔΡΙΟ, ΑΛΕΞΑΝΔΡΟΥΠΟΛΗ 2003
- 23) Σύνδρομο Evans ως πρώτη εκδήλωση HIV λοίμωξης
Χ.Ζούβελου, Π.Γκρέκα, Σ.Χρυσόχου, Μ.Δήμου, Η.Κυριάκου, Γ.Γεωργίου, Κ.Ρεβένας, Π.Παναγιωτίδης, Ε.Πόππης
14ο ΠΑΝΕΛΛΗΝΙΟ ΑΙΜΑΤΟΛΟΓΙΚΟ ΣΥΝΕΔΡΙΟ, ΑΛΕΞΑΝΔΡΟΥΠΟΛΗ 2003
- 24) Μεταλλάξεις του FLT3 γονιδίου σε ασθενείς με ΟΜΛ ή ΜΔΣ
Β.Καραλή, Γ.Γεωργίου, Μ.Δήμου, Η.Κυριάκου, Χ.Ζούβελου, Ε.Δημητριάδου, Ε.Βερβεσού, Σ.Δαφωινιάτης, Ε.Πόππης, Η.Ξεφτέρη, Π.Παναγιωτίδης
14ο ΠΑΝΕΛΛΗΝΙΟ ΑΙΜΑΤΟΛΟΓΙΚΟ ΣΥΝΕΔΡΙΟ, ΑΛΕΞΑΝΔΡΟΥΠΟΛΗ 2003
- 25) Αιμοφαγοκυτταρικό σύνδρομο σε ασθενείς με ΟΜΛ
Δήμου Μ, Γεωργίου Γ, Κυριάκου Η, Γκρέκα Π, Ζούβελου Χ, Χρυσόχου Σ, Ντουφεζής Δ, Πόππης Ε, Παναγιωτίδης Π
15ο ΠΑΝΕΛΛΗΝΙΟ ΑΙΜΑΤΟΛΟΓΙΚΟ ΣΥΝΕΔΡΙΟ, ΑΘΗΝΑ 2004
- 26) Επιθετικά και δυνητικά επιθετικά λεμφώματα. Βιολογία και γενετική
Η.Κυριάκου, Γ.Γεωργίου, Π.Παναγιωτίδης
Haema 2005; ΣΥΜΠΛΗΡΩΜΑ 97-102
- 27) Μεταλλάξεις του γονιδίου FLT3 σε ασθενείς με ΜΔΣ-Συσχέτιση με εξέλιξη σε ΟΜΛ
Γ.Γεωργίου, Β.Κάραλη, Η.Κυριάκου, Σ.Χρυσόχου, Μ.Δήμου, Δ.Ντουφεζής, Χ.Ζούβελου, Π.Γκρέκα, Ε.Βερβεσού, Θ.Καρανάνος, Π.Παναγιωτίδης
16ο ΠΑΝΕΛΛΗΝΙΟ ΑΙΜΑΤΟΛΟΓΙΚΟ ΣΥΝΕΔΡΙΟ, ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗ 2005
- 28) Αυτοάνοση Θρομβοπενία: Ανταπόκριση ασθενών στη χορήγηση Δαναζόλης ως θεραπεία πρώτης γραμμής και ως θεραπεία ανθεκτικής νόσου
Η.Κυριάκου, Μ.Δήμου, Σ.Χρυσόχου, Χ.Ζούβελου, Π.Γκρέκα, Δ.Ντουφεζής, Γ.Γεωργίου, Α.Ευθυμίου, Π.Παναγιωτίδης
16ο ΠΑΝΕΛΛΗΝΙΟ ΑΙΜΑΤΟΛΟΓΙΚΟ ΣΥΝΕΔΡΙΟ, ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗ 2005

- 29) Η χορήγηση IDA/NOVA-FLAG ως σχήμα διάσωσης σε ασθενείς με οξεία λευχαιμία
Μ.Δήμου, Η.Κυριάκου, Σ.Χρυσόχοου, Δ.Ντουφεξής, Π.Γκρέκα, Χ.Ζούβελου, Γ.Γεωργίου, Χ.Κυρτσώνη, Π.Παναγιωτίδης
 16^ο ΠΑΝΕΛΛΗΝΙΟ ΑΙΜΑΤΟΛΟΓΙΚΟ ΣΥΝΕΔΡΙΟ, ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗ 2005
- 30) Εσωτερικός σε σειρά διπλασιασμός (ITD) των εξωνίων 14/15 του γονιδίου FLT3 συνδυάζεται με επιπλέον μεταλλάξεις της ίδιας περιοχής του γονιδίου σε ασθενείς με ΟΜΛ/ΜΔΣ
Γ.Γεωργίου, Β.Κάραλη, Π.Γκρέκα, Χ.Ζούβελου, Η.Κυριάκου, Μ.Δήμου, Σ.Χρυσόχοου, Δ.Ντουφεξής, Ε.Βερβεσού, Θ.Καραντάνος, Π.Παναγιωτίδης
 16^ο ΠΑΝΕΛΛΗΝΙΟ ΑΙΜΑΤΟΛΟΓΙΚΟ ΣΥΝΕΔΡΙΟ, ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗ 2005
- 31) Alterations in CD43 expression in transfusion-dependent MDS
Ε.Κυριακού, Α.Υ.Καραδοντά, Κ.Καράκουσις, Γ.Καρράς, Μ.Αλεξανδράκης, Δ.Κυριακού, Ν.Σταθάκης
 XV International Society of Blood Transfusion, Regional Congress Europe, Athens 2005
- 32) Serial determination of FLT3 mutations in MDS patients at diagnosis, follow up or AML transformation: incidence and their prognostic significance
Georgiou G, Karali V, Zouvelou C, Kyriakou E, Dimou M, Chrisochoou S, Greka P, Dufexis D, Vervesou E, Dimitriadou E, Efthymiou A, Petrikkos L, Dima K, Lilakos K, Panayiotidis P
 Br J Hematol. 2006 Jun 20; [Epub ahead of print]
- 33) Serial determination of FLT3 mutations in MDS patients at diagnosis, follow up or AML transformation: FLT3 ITD/Asp 835 mutations incidence and their prognostic significance
Georgiou G, Karali V, Zouvelou C, Kyriakou E, Dimou M, Chrisochoou S, Greka P, Efthymiou A, Lilakos K, Petrikkos L, Dima K, Basta E, Panayiotidis P
 11^ο ΠΑΝΕΥΡΩΠΑΪΚΟ ΑΙΜΑΤΟΛΟΓΙΚΟ ΣΥΝΕΔΡΙΟ, AMSTERDAM, 2006
- 34) Efficacy and toxicity of Ida/NovaFLAG regimen as salvage treatment for patients with acute leukemia (AL). Five-year-experience of a single center
Dimou M, Kyriakou E, Chrisochoou S, Zouvelou C, Georgiou G, Greka P, Doufexis D, Kyrtsionis MC, Panayiotidis P
 11^ο ΠΑΝΕΥΡΩΠΑΪΚΟ ΑΙΜΑΤΟΛΟΓΙΚΟ ΣΥΝΕΔΡΙΟ, AMSTERDAM, 2006
- 35) Autoimmune thrombocytopenia: clinical and hematological outcome of patients after danazol administration as first line or refractory disease treatment
Kyriakou E, Chrisochoou S, Dimou M, Greka P, Zouvelou C, Georgiou G, Doufexis D, Kyrtsionis MC, Panayiotidis P
 11^ο ΠΑΝΕΥΡΩΠΑΪΚΟ ΑΙΜΑΤΟΛΟΓΙΚΟ ΣΥΝΕΔΡΙΟ, AMSTERDAM, 2006

Αθήνα, 14/2/2007