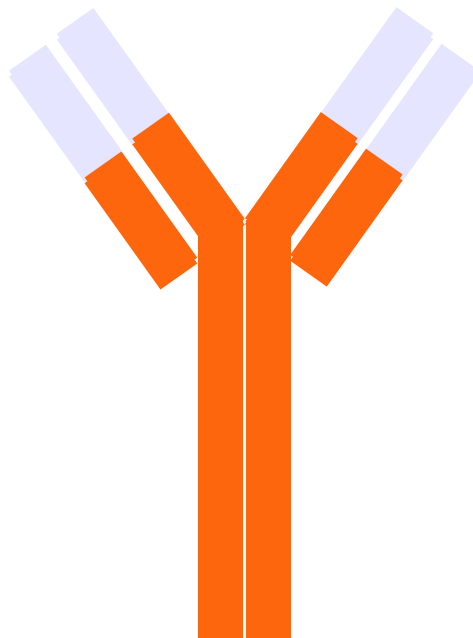


**ΙΑΤΡΙΚΟ ΤΜΗΜΑ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΚΡΗΤΗΣ
ΑΙΜΑΤΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ**

**Μελέτη της αποτελεσματικότητας του αντι-TNF α
χμαιρικού αντισώματος cA2 (Infliximab) στη
θεραπεία ασθενών με μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα**

**Άννα Μπουλά
Αιματολόγος**

Διδακτορική Διατριβή



Δεκέμβριος 2006, Ηράκλειο Κρήτης

**Μελέτη της αποτελεσματικότητας του αντι-TNFα
χμαιορικού αντισώματος cA2 (Infliximab) στη
θεραπεία ασθενών με μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα**

Τριμελής επιτροπή

Ελένη Παπαδάκη
Επίκουρη Καθηγήτρια Αιματολογίας
Γεώργιος Ηλιόπουλος
Ομότιμος Καθηγητής Αιματολογίας
Γεώργιος Κολιός
Επίκουρος Καθηγητής Γαστρεντερολογίας

Επταμελής επιτροπή

Ελένη Παπαδάκη
Επίκουρη Καθηγήτρια Αιματολογίας
Γεώργιος Σαμώνης
Καθηγητής Παθολογίας
Γεώργιος Κολιός
Επίκουρος Καθηγητής Γαστρεντερολογίας
Δημήτριος Μπούμπας
Καθηγητής Παθολογίας
Ηλίας Κουρούμαλης
Καθηγητής Γαστρεντερολογίας
Αριστείδης Ηλιόπουλος
Αναπληρωτής Καθηγητής Μοριακής Βιολογίας
Μιχάλης Αλεξανδράκης
Επίκουρος Καθηγητής Αιματολογίας

Αντί προλόγου

Η εκπόνηση της διδακτορικής διατριβής είναι εξαιρετικά ενδιαφέρουσα διαδικασία. Σ' αυτήν είχα πολύτιμους συμπαραστάτες. Θα ήθελα να ευχαριστήσω την επιβλέπουσα της παρούσας εργασίας Επίκουρη Καθηγήτρια κ. Ελένη Παπαδάκη, χωρίς την ουσιαστική βοήθεια της οποίας σε όλα τα στάδια η πραγματοποίηση της μελέτης δεν θα ήταν δυνατή. Θερμές ευχαριστίες οφείλω στον Ομότιμο Καθηγητή κ. Γεώργιο Ηλιόπουλο, για την καθοδήγησή του στο σχεδιασμό της εργασίας. Ευχαριστώ ιδιαίτερα το προσωπικό του εργαστηρίου της Αιματολογικής κλινικής, την κ. Αθηνά Δαμιανάκη, κ. Ελένη Κουταλά και την κ. Κλαυδία Γεμετζή για την υποστήριξη στο τεχνικό μέρος. Ευχαριστώ επίσης τον κ. Μιχάλη Βουλγαρέλη Επίκουρο Καθηγητή Αιματολογίας του τμήματος Παθοφυσιολογίας του Πανεπιστημίου Αθηνών και την κ. Φωτεινή Μαρκίδου, Διευθύντρια της Αιματολογικής κλινικής του Γενικού Νοσοκομείου Χανίων για την παραχώρηση ιστορικών και δειγμάτων αίματος και μυελού των οστών ασθενών που συμπεριλήφθησαν στην μελέτη μας, καθώς και τους Επιμελητές της Αιματολογικής κλινικής του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ηρακλείου κ. Ειρήνη Ξυλούρη, κ. Γεώργιο Κατρινάκη, κ. Ανδρέα Φουντουλάκη για τη συμβολή τους στην παρακολούθηση των αρρώστων.

Άννα Μπουλά

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Αντί προλόγου.....	Σελίδα	iii
Περιεχόμενα.....	»	iv
Μέρος Πρώτο: ΜΥΕΛΟΔΥΣΠΛΑΣΤΙΚΑ ΣΥΝΔΡΟΜΑ.....	»	1
1. Εισαγωγή.....	»	1
1.1 Ορισμός.....	»	1
1.2 Επιδημιολογία.....	»	1
1.3 Ταξινόμηση.....	»	2
1.4 Προγνωστικά συστήματα.....	»	6
2. Παθογένεια των μυελοδυσπλαστικών συνδρόμων.....	»	7
2.1 Μη αποδοτική αιμοποίηση.....	»	7
2.2 Η απόπτωση στα μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα.....	»	7
2.3 Μηχανισμός απόπτωσης.....	»	9
2.3.1 Προαποπτωτικά ερεθίσματα.....	»	10
2.3.2 Ρύθμιση της απόπτωσης.....	»	15
2.4 Ο ρόλος του μικροπεριβάλλοντος.....	»	15
3. Ο παράγοντας νέκρωσης του όγκου (TNFα).....	»	17
3.1 Προέλευση του TNFα.....	»	18
3.2 Υποδοχείς του TNFα.....	»	19
3.3 Ο ρόλος του TNFα στα μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα.....	»	22
3.4 Μελέτες αναστολής του TNFα.....	»	24
3.4.1 Πεντοξιφυλλίνη-σιπροφλοξασίνη-δεξαμεθαζόνη.....	»	24
3.4.2 Θαλιδομίδη.....	»	26
3.4.3 Etanercept.....	»	27
3.5 Infliximab.....	»	29
3.5.1 Φαρμακοκινητική.....	»	29
3.5.2 Φαρμακοδυναμική.....	»	31
3.5.3 Ασφάλεια στη χορήγησή του.....	»	32
3.6 Infliximab και μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα.....	»	36
Μέρος Δεύτερο: ΤΟ ΕΡΩΤΗΜΑ ΠΡΟΣ ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ.....	»	38
1. Σκοπός της μελέτης.....	»	38
2. Το προς επίλυση ερώτημα.....	»	40
Μέρος Τρίτο: ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	»	42

1. Ασθενείς και θεραπευτικό πρωτόκολλο..... »	42
2. Σχεδιασμός της μελέτης.....»	45
3. Κριτήρια κλινικής ανταπόκρισης..... »	49
4. Μυελός των οστών..... »	50
4.1 Κυτταρογενετική ανάλυση μυελού των οστών..... »	51
4.2 Απομόνωση των CD34 ⁺ κυττάρων..... »	52
4.3 Εφεδρείες του μυελού σε προγονικά και πρόδρομα κύτταρα..... »	54
4.4 Μελέτη της απόπτωσης..... »	55
4.5 Κλωνογονικές μέθοδοι »	61
4.5.1 LTC-ICs..... »	61
4.5.2 Αποικίες της ερυθράς και της κοκκιώδους σειράς..... »	64
4.5.3 Αποικίες της μεγακαρυοκυτταρικής σειράς..... »	66
4.6 Εκτίμηση της λειτουργίας των στρωματικών κυττάρων του μυελού των οστών »	70
4.6.1 Κλασσικές μακρόχρονες καλλιέργειες μυελικών κυττάρων (LTBMCs)..... »	70
4.6.2 Μέτρηση κυτταροκινών στα υπερκείμενα μακρόχρονων καλλιεργειών..... »	73
4.6.3 Ανατροφοδοτημένες LTBMCs.....»	75
5. Υποπληθυσμοί λεμφοκυττάρων μυελού των οστών και περιφερικού αίματος »	76
6. Στατιστική ανάλυση..... »	77
Μέρος Τέταρτο: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ..... »	78
1. Εφεδρείες και χαρακτηριστικά επιβίωσης των προγονικών και πρόδρομων κυττάρων του μυελού των οστών..... »	79
2. Κλωνογόνα προγονικά κύτταρα..... »	85
3. Λειτουργία των στρωματικών κυττάρων του μυελού των οστών..... »	88
4. Υποπληθυσμοί λεμφοκυττάρων στο περιφερικό αίμα και τον μυελό των οστών..... »	92
5. Εκτίμηση της ανταπόκρισης..... »	95
Μέρος Πέμπτο: ΣΥΖΗΤΗΣΗ-ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ..... »	96
1. Συζήτηση..... »	96
2. Συμπεράσματα.....»	103
3. Σύνοψη..... »	104

Βιβλιογραφία.....»	105
Περίληψη στα Αγγλικά»	119
Περίληψη στα Ελληνικά»	121

Μέρος Πρώτο

ΜΥΕΛΟΔΥΣΠΛΑΣΤΙΚΑ ΣΥΝΔΡΟΜΑ

1. Εισαγωγή

1.1 Ορισμός

Τα μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα (ΜΔΣ) είναι μια ετερογενής ομάδα επίκτητων κλωνικών διαταραχών, που χαρακτηρίζεται από το συνδυασμό περιφερικών κυτταροπενιών στο αίμα με υπερκυτταρικό μυελό στο 90% των περιπτώσεων και σημαντικό κίνδυνο εξέλιξης σε οξεία μυελογενή λευχαιμία. Η διαταραχή αφορά στο αρχέγονο αιμοποιητικό κύτταρο και μπορεί να εκδηλώνεται ως βλάβη μιας σειράς, αλλά συχνότερα δύο ή τριών σειρών.

1.2 Επιδημιολογία

Εμφανίζονται συνήθως σε ηλικιωμένα άτομα, με διάμεση ηλικία τα 69 έτη, μπορούν ωστόσο να εμφανιστούν σε οποιαδήποτε ηλικία. Η ετήσια επίπτωση είναι 4/100000 στο γενικό πληθυσμό, αυξάνεται όμως από 0,5/100000 σε ηλικία <50 ετών μέχρι 89/100000 σε ηλικία ≥ 80 ετών.

Προδιαθεσικοί παράγοντες θεωρούνται:

- 1) Η ηλικία

2) Η αντικαρκινική θεραπεία: είτε προηγηθείσα χημειοθεραπεία με αλκυλιωτικούς παράγοντες (χλωραμβουκίλη, κυκλοφωσφαμίδη, μελφαλάνη, με μέγιστη συχνότητα εμφάνισης στα 4-10 χρόνια από την θεραπεία) ή επιποδοφυλλοτοξίνες (ετοποσίδη και τενιποσίδη με μέγιστη συχνότητα εμφάνισης μέχρι 5 χρόνια από την θεραπεία), είτε προηγηθείσα ακτινοθεραπεία

3) Περιβαλλοντικές τοξίνες, όπως το βενζένιο και άλλοι οργανικοί διαλύτες, το κάπνισμα, τα παράγωγα του πετρελαίου, τα λιπάσματα. Έχει σημασία η ένταση και η διάρκεια της έκθεσης.

4) Γενετικοί παράγοντες, όπως σπάνια οικογενή σύνδρομα (Schwachman-Diamond, αναιμία Fanconi, νευροϊνωμάτωση τύπου 1)[1, 2, 3]

1.3. Ταξινόμηση

Παρά το ότι περιγραφές της νόσου υπάρχουν εδώ και 60 χρόνια, η ταξινόμησή της είναι σχετικά πρόσφατη. Το 1982 η ομάδα FAB (French American British Cooperative Group) διέκρινε πέντε υποτύπους μυελοδυσπλαστικών συνδρόμων, με βάση την μορφολογία του περιφερικού αίματος και του μυελού των οστών καθώς και την κυτταροχημική χρώση σιδήρου. Οι υπότυποι αυτοί φαίνονται στον πίνακα 1.

Στην κατηγορία της ανθεκτικής αναιμίας (Refractory anaemia, RA) ανήκουν το 30-40% των ασθενών με ΜΔΣ, στην κατηγορία της ανθεκτικής αναιμίας με δακτυλιοειδείς σιδηροβλάστες (Refractory anaemia with ringed sideroblasts, RARS) το 15-25% των ασθενών με ΜΔΣ, σ' αυτήν της ανθεκτικής αναιμίας με περίσσεια βλαστών (Refractory anaemia with excess of blasts, RAEB) το 15-25% των ασθενών, σ' αυτήν της χρόνιας μυελομονοκυτταρικής λευχαιμίας (Chronic myelomonocytic leukaemia, CMML) το 15% των ασθενών, ενώ στην κατηγορία της ανθεκτικής αναιμίας με περίσσεια

βλαστών σε μετατροπή (Refractory anaemia with excess of blasts in transformation, RAEB-T) το 5-10% των ασθενών με ΜΔΣ.

Πίνακας 1: Ταξινόμηση των ΜΔΣ κατά FAB

Κατηγορία	Περιφερικό αίμα		Μυελός των οστών
Ανθεκτική αναιμία(RA) ή ανθεκτική κυτταροπενία (Refractory cytopenia, RC)	Αναιμία*, βλάστες \leq 1%, μονοκύτταρα \leq 1000/μl	ΚΑΙ	Βλάστες < 5%, δακτυλιοειδείς σιδηροβλάστες \leq 15% των ερυθροβλαστών
Ανθεκτική αναιμία με δακτυλιοειδείς σιδηροβλάστες (RARS)	Αναιμία, βλάστες \leq 1%, μονοκύτταρα \leq 1000/μl	ΚΑΙ	Βλάστες < 5%, δακτυλιοειδείς σιδηροβλάστες > 15% των ερυθροβλαστών
Ανθεκτική αναιμία με περίσσεια βλαστών (RAEB)	Αναιμία, βλάστες > 1% και \leq 5%, μονοκύτταρα \leq 1000/μl	Ή ΚΑΙ	Βλάστες \geq 5% ΑΛΛΑ Βλάστες \leq 20%
Χρονία μυελομονοκυτταρική λευχαιμία (CMML)	Μονοκύτταρα >1000/μl, κοκκιοκύτταρα συχνά αυξημένα, βλάστες <5%		Βλάστες μέχρι 20%, προμονοκύτταρα συχνά αυξημένα
Ανθεκτική αναιμία με περίσσεια βλαστών σε μετατροπή (RAEB-T)	Βλάστες \geq 5%	Ή ραβδία Auer στο περιφερικό αίμα ή στο μυελό των οστών	Ή Βλάστες >20% ΑΛΛΑ Βλάστες <30%

*Η στην περίπτωση της κυτταροπενίας λευκοπενία ή θρομβοπενία

Η ταξινόμηση κατά FAB έγινε ευρέως αποδεκτή. Συνέβαλε σημαντικά στον σαφή καθορισμό κατηγοριών των ΜΔΣ, εξασφαλίζοντας στους αιματολόγους κοινή γλώσσα επικοινωνίας. Επίσης επέτρεπε αδρά την εκτίμηση της πρόγνωσης των ασθενών με ΜΔΣ : ασθενείς με RA έχουν προσδόκιμο επιβίωσης 27-32 μήνες,

ασθενείς με RARS 42-45 μήνες, ασθενείς με CMML 13-15 μήνες, ασθενείς με RAEB 9-19 μήνες, ασθενείς με RAEB-T 5-11 μήνες. [1, 4, 7]

Με το πέρασμα των χρόνων διάφορα προβλήματα αναδύθηκαν, γεγονός που οδήγησε στις αρχές της δεκαετίας του 2000 σε μια νέα ταξινόμηση, την κατά WHO ταξινόμηση. Η ταξινόμηση αυτή περιλαμβάνει πολλά από τα κριτήρια της FAB. Συγκριτικά με την ταξινόμηση κατά FAB, στην ταξινόμηση κατά WHO [8] : **1)** το ποσοστό των βλαστών στο μυελό των οστών, που χρησιμεύει ως κριτήριο για την διάκριση ανάμεσα στα ΜΔΣ και την οξεία μυελογενή λευχαιμία είναι το 20% και όχι το 30% και έτσι δεν χρησιμοποιείται πια η κατηγορία RAEB-T **2)** αναγνωρίζεται μια ιδιαίτερη ομάδα διαταραχών με χαρακτηριστικά τόσο μυελοδυσπλαστικού όσο και μυελοϋπερπλαστικού συνδρόμου (MDS/MPD). Στην ομάδα αυτή ανήκει η CMML **3)** εισάγεται μια νέα κατηγορία η ανθεκτική κυτταροπενία με πολυγραμμική δυσπλασία **4)** διαχωρίζεται η RAEB σε 1 και 2 ανάλογα με τον αριθμό των βλαστών **5)** ταυτοποιείται μυελοδυσπλαστικό σύνδρομο με ειδική κυτταρογενετική ανωμαλία (5q-). Αναλυτικά η ταξινόμηση αυτή φαίνεται στον πίνακα 2.

Η ταξινόμηση κατά WHO δίνει απαντήσεις σε αρκετά ερωτήματα. Ωστόσο ήδη και με αυτήν έχουν προκύψει κάποια προβλήματα, όπως το ότι υπάρχουν βιολογικές διαφορές μεταξύ οξείας μυελογενούς λευχαιμίας και μυελοδυσπλαστικών συνδρόμων και η διάκριση μεταξύ τους δεν μπορεί να γίνεται με ασφάλεια αν μόνο κριτήριο είναι το ποσοστό των βλαστών. Επίσης οι κατηγορίες ανθεκτική κυτταροπενία με πολυγραμμική δυσπλασία ή αταξινομήτο ΜΔΣ είναι αόριστες και χωρίς συγκεκριμένη βιολογική, κλινική και γενετική βάση. Παρ'όλα αυτά χωρίς αμφιβολία η ταξινόμηση κατά WHO είναι σημαντική. Μένει να κριθεί στη δοκιμασία του χρόνου. [2, 5, 6]

Πίνακας 2: Ταξινόμηση των ΜΔΣ κατά WHO

Νόσος	Περιφερικό αίμα	Μυελός των οστών
Ανθεκτική αναιμία (RA)	Αναιμία, σπάνια βλάστες και οπωσδήποτε <1%	Δυσπλασία μόνο στην ερυθρά σειρά, <5% βλάστες, <15% δακτυλοειδείς σιδηροβλάστες
Ανθεκτική αναιμία με δακτυλοειδείς σιδηροβλάστες (RARS)	Αναιμία, όχι βλάστες	Δυσπλασία μόνο στην ερυθρά σειρά, <5% βλάστες, ≥15% δακτυλοειδείς σιδηροβλάστες
Ανθεκτική κυτταροπενία με πολυγραμμική δυσπλασία (Refractory cytopenia with multilineage dysplasia, RCMD)	Κυτταροπενίες (διπενία ή πανκυτταροπενία), καθόλου ή σπάνιοι βλάστες, όχι ραβδία Auer, μονοκύτταρα <1000/μl	Δυσπλασία σε ≥10% κυττάρων δύο ή περισσότερων κυτταρικών σειρών, <5% βλάστες, <15% δακτυλοειδείς σιδηροβλάστες, όχι ραβδία Auer
Ανθεκτική κυτταροπενία με πολυγραμμική δυσπλασία και δακτυλοειδείς σιδηροβλάστες (Refractory cytopenia with multilineage dysplasia and ringed sideroblasts, RCMD-RS)	Κυτταροπενίες (διπενία ή πανκυτταροπενία), καθόλου ή σπάνιοι βλάστες, όχι ραβδία Auer, μονοκύτταρα <1000/μl	Δυσπλασία σε ≥10% κυττάρων δύο ή περισσότερων κυτταρικών σειρών, <5% βλάστες, ≥15% δακτυλοειδείς σιδηροβλάστες, όχι ραβδία Auer
Ανθεκτική αναιμία με περίσσεια βλαστών-1 (RAEB-1)	Κυτταροπενίες, <5% βλάστες, όχι ραβδία Auer, <1000/μl μονοκύτταρα	Μονογραμμική ή πολυγραμμική δυσπλασία, 5-9% βλάστες, όχι ραβδία Auer
Ανθεκτική αναιμία με περίσσεια βλαστών-2 (RAEB-2)	Κυτταροπενίες, 5-19% βλάστες, ραβδία Auer ±, <1000/μl μονοκύτταρα	Μονογραμμική ή πολυγραμμική δυσπλασία, 10-19% βλάστες, ραβδία Auer ±
Αταξινόμητο μυελοδυσπλαστικό σύνδρομο (MDS unclassified, MDS-U)	Κυτταροπενίες, καθόλου ή σπάνιοι βλάστες, όχι ραβδία Auer	Μονογραμμική δυσπλασία, <5% βλάστες, όχι ραβδία Auer
Μυελοδυσπλαστικό σύνδρομο με μεμονωμένη del(5q)	Αναιμία, βλάστες <5%, αιμοπετάλια φυσιολογικά ή αυξημένα	Μεγακαρυοκύτταρα φυσιολογικά ή αυξημένα σε αριθμό, αλλά με υπολοβωμένο πυρήνα, <5% βλάστες, όχι ραβδία Auer, 5q-ως η μόνη κυτταρογενετική ανωμαλία

[8]

1.4. Προγνωστικά συστήματα

Προκειμένου να διευκολυνθούν οι γιατροί στην κλινική πράξη, αναπτύχθηκαν διάφορα προγνωστικά συστήματα για τα ΜΔΣ. Ένα από τα σημαντικότερα, που χαίρει ευρείας αποδοχής, είναι το Διεθνές Προγνωστικό Σύστημα Βαθμολόγησης (International Prognostic Scoring System, IPSS) [9]. Σύμφωνα με αυτό προγνωστική σημασία έχουν ο αριθμός των βλαστών στον μυελό των οστών, ο καρυότυπος και ο αριθμός των περιφερικών κυτταροπενιών. Αναλυτικά φαίνεται στους πίνακες 3 και 4

Πίνακας 3

Βαθμοί					
Προγνωστικές μεταβλητές	0	0,5	1,0	1,5	2,0
Βλάστες μυελού των οστών %	<5	5-10	-	11-20	21-30
Καρυότυπος	Καλός	Ενδιάμεσος	Κακός		
Κυτοπενίες	0/1	2/3			

Καρυότυπος: Καλός: φυσιολογικός, -Y, del(20q), del(5q). Κακός: σύνθετος (≥ 3 ανωμαλίες) ή ανωμαλίες του χρωμοσώματος 7. Ενδιάμεσος: άλλες ανωμαλίες. Κυτοπενίες: Hb <10g/dL, ουδετερόφιλα <1,8x10⁹/L, αιμοπετάλια <100 x 10⁹ / L.

Πίνακας 4

Κίνδυνος κατά IPSS	Συνολικοί βαθμοί	Διάμεση επιβίωση	25% εξέλιξη σε ΟΜΛ
Χαμηλός	0	5,7 έτη	9,4 έτη
Ενδιάμεσος-1	0,5-1,0	3,5 έτη	3,3 έτη
Ενδιάμεσος-2	1,5-2,0	1,2 έτη	1,1 έτη
Υψηλός	>2,5	0,4 έτη	0,2 έτη

2. Παθογένεια των μυελοδυσπλαστικών συνδρόμων

2.1. Μη αποδοτική αιμοποίηση

Ο συνδυασμός περιφερικών κυτταροπενιών και υπερπλαστικού μυελού των οστών, με ελαττωματική ωρίμανση των προγονικών κυττάρων του μυελού των οστών, αναφέρεται συχνά με τον όρο ‘μη αποδοτική αιμοποίηση’ σε αντιδιαστολή προς την ‘υποπλαστική αιμοποίηση’, όπου συνυπάρχουν οι περιφερικές κυτταροπενίες με υποπλαστικό μυελό των οστών. Η αυξημένη ενδομυελική απόπτωση έχει ενοχοποιηθεί για το παράδοξο αυτό φαινόμενο, την αναντιστοιχία δηλαδή στην κυτταροβρίθεια ανάμεσα στο αίμα και τον μυελό των οστών.

2.2. Η απόπτωση στα μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα

Αρκετές μελέτες ανίχνευσαν αυξημένη απόπτωση στα κύτταρα του μυελού των οστών στους ασθενείς με ΜΔΣ. Οι μέθοδοι που χρησιμοποιήθηκαν στις περισσότερες περιπτώσεις περιλάμβαναν την εκτίμηση της μορφολογίας, την ανοσοϊστοχημεία, την ανίχνευση του κατακερματισμού του DNA με κυτταρομετρία ροής ή με την κλασική μέθοδο της ηλεκτροφόρησης του DNA (DNA fragmentation ladder), την in situ σήμανση (In situ end-labelling, ISEL), την ανίχνευση της παρουσίας ή της ενεργοποίησης πρωτεϊνών που σχετίζονται με την απόπτωση και την κυτταρομετρία ροής (ανεξίτη V). Επίσης σε καλλιέργειες κυττάρων από ασθενείς με ΜΔΣ οι πρόδρομες μορφές των αιμοποιητικών κυττάρων έδειξαν προβληματική ανάπτυξη και αυξημένη ενεργοποίηση κασπασών (πρόκειται για ενδοκυττάρια πρωτεάσες ειδικές της ασπαρτικής κυστεΐνης) και συνεπώς αυξημένη απόπτωση, ενώ κυτταρικές σειρές

που προέρχονταν από ασθενείς με ΜΔΣ είχαν αυξημένη ευαισθησία σε αποπτωγόνα ερεθίσματα [10, 11].

Υπάρχει ασυμφωνία ως προς την έκταση του φαινομένου, τους τύπους και το επίπεδο ωρίμανσης των κυττάρων που περιλαμβάνει. Για παράδειγμα οι πρώτες μελέτες δεν ανέδειξαν αυξημένη απόπτωση στα CD34⁺ κύτταρα, πράγμα που αντέκρουσαν μεταγενέστερα στοιχεία. Αυτή η εικόνα αλλάζει ακόμα περισσότερο όταν μελετώνται ασθενείς με πιο προχωρημένη νόσο ή χειρότερης πρόγνωσης, στους οποίους παρατηρείται αυξημένη απόπτωση στη μεγάλη πλειοψηφία των CD34⁺ κυττάρων. Η ασυμφωνία αυτή οφείλεται κυρίως σε μεθοδολογικά προβλήματα. Χρειάζεται πολύ μεγάλη προσοχή ώστε να ελαχιστοποιείται ο κυτταρικός θάνατος, λόγω διάφορων χειρισμών. Το γεγονός πάντως ότι η αυξημένη απόπτωση επηρεάζει και τις τρεις κυτταρικές σειρές συνηγορεί υπέρ του ότι το αρχέγονο αιμοποιητικό κύτταρο είναι ο πιθανός στόχος των προαποπτωτικών ερεθισμάτων. Υπάρχουν επίσης ενδείξεις ότι η απόπτωση αφορά και σε φυσιολογικά αρχέγονα κύτταρα, τουλάχιστον στα πρώιμα ΜΔΣ, ενώ οι διάφορες μελέτες ανέδειξαν αυξημένη απόπτωση τόσο στα στρωματικά όσο και στα αιμοποιητικά κύτταρα [6, 12].

Ένα ενδιαφέρον φαινόμενο, άγνωστης μέχρι στιγμής σημασίας, είναι η συνύπαρξη αυξημένης απόπτωσης και αυξημένου κυτταρικού πολλαπλασιασμού στους μυελούς των οστών των ασθενών αυτών. Ονομάζεται αντιφατική σήμανση (signal antonymy) και σχετίστηκε με αλλοιωμένη έκφραση του παράγοντα μεταγραφής E2F1. Τα ΜΔΣ, ιδιαίτερα τα πρώιμα, είναι μια έντονα υπερπλαστική διαταραχή, στην οποία παρατηρείται ταυτόχρονα πολύ αυξημένη απόπτωση [3].

Πολλοί ερευνητές έχουν ασχοληθεί με τη συσχέτιση της απόπτωσης με τις υποομάδες των ΜΔΣ. Οι περισσότεροι συμφωνούν ότι τα ΜΔΣ καλύτερης πρόγνωσης (RA+RARS) χαρακτηρίζονται από εντονότερη απόπτωση σε σχέση με εκείνα κακής

πρόγνωσης και ότι η πρόοδος της νόσου, ιδιαίτερα η εξέλιξη σε οξεία λευχαιμία, οφείλεται σε μείωση της απόπτωσης και όχι σε αύξηση του ρυθμού του κυτταρικού πολλαπλασιασμού. Στις περισσότερες προχωρημένες μορφές της νόσου τα ποσοστά των αποπτωτικών κυττάρων είναι χαμηλότερα από αυτά των φυσιολογικών ατόμων και είναι παρόμοια με αυτά που παρατηρούνται σε ασθενείς με ΟΜΛ [10,13].

Ανεξάρτητα από την ακριβή σημασία της απόπτωσης στην παθογένεια των ΜΔΣ φαίνεται ότι το φαινόμενο αυτό είναι χαρακτηριστικό της νόσου και η χρήση του αποπτωτικού δείκτη (ποσοστό των αποπτωτικών κυττάρων στο σύνολο των κυττάρων στο μυελό των οστών) έχει προταθεί ως ένα χρήσιμο διαγνωστικό εργαλείο σε αμφιλεγόμενες περιπτώσεις. Ολοένα και περισσότερο γίνεται εμφανές ότι παρά τις ομοιότητες με την ΟΜΛ στην οποία συχνά εξελίσσονται, τα ΜΔΣ είναι βιολογικά και κλινικά ιδιαίτερες νοσολογικές οντότητες και όχι απλά προλευχαιμικές καταστάσεις[6].

2.3. Μηχανισμός απόπτωσης

Η φυσιολογική αιμοποίηση εξαρτάται από την ακριβή ρύθμιση σύνθετων οδών μετάδοσης σημάτων που καθοδηγούν τα κύτταρα είτε να πολλαπλασιαστούν, είτε να διαφοροποιηθούν, είτε να μουν στην διαδικασία της απόπτωσης. Η απόπτωση είναι μια αυστηρά ελεγχόμενη μορφή κυτταρικού θανάτου, που πραγματοποιείται μέσω ενός ενδογενούς μηχανισμού αυτοκαταστροφής του κυττάρου. Καταλήγει στη συρρίκνωση του κυττάρου, την απώλεια της ασυμμετρίας των φωσφολιπιδίων της κυτταρικής μεμβράνης, την συμπύκνωση της χρωματίνης και τον κατακερματισμό του DNA. Η δημιουργία προσεκβολών της κυτταρικής μεμβράνης οδηγεί στην απελευθέρωση αποπτωτικών σωματίων συνδεδεμένων με την μεμβράνη. Η φωσφατιδυλοσερίνη, που φυσιολογικά βρίσκεται στην εσωτερική επιφάνεια της κυτταρικής μεμβράνης,

εκτίθεται στην εξωτερική επιφάνεια αυτής και αποτελεί σημείο αναγνώρισης από τα μακροφάγα, τα οποία προχωρούν σε φαγοκυττάρωση.

2.3.1. Προαποπρωτικά ερεθίσματα

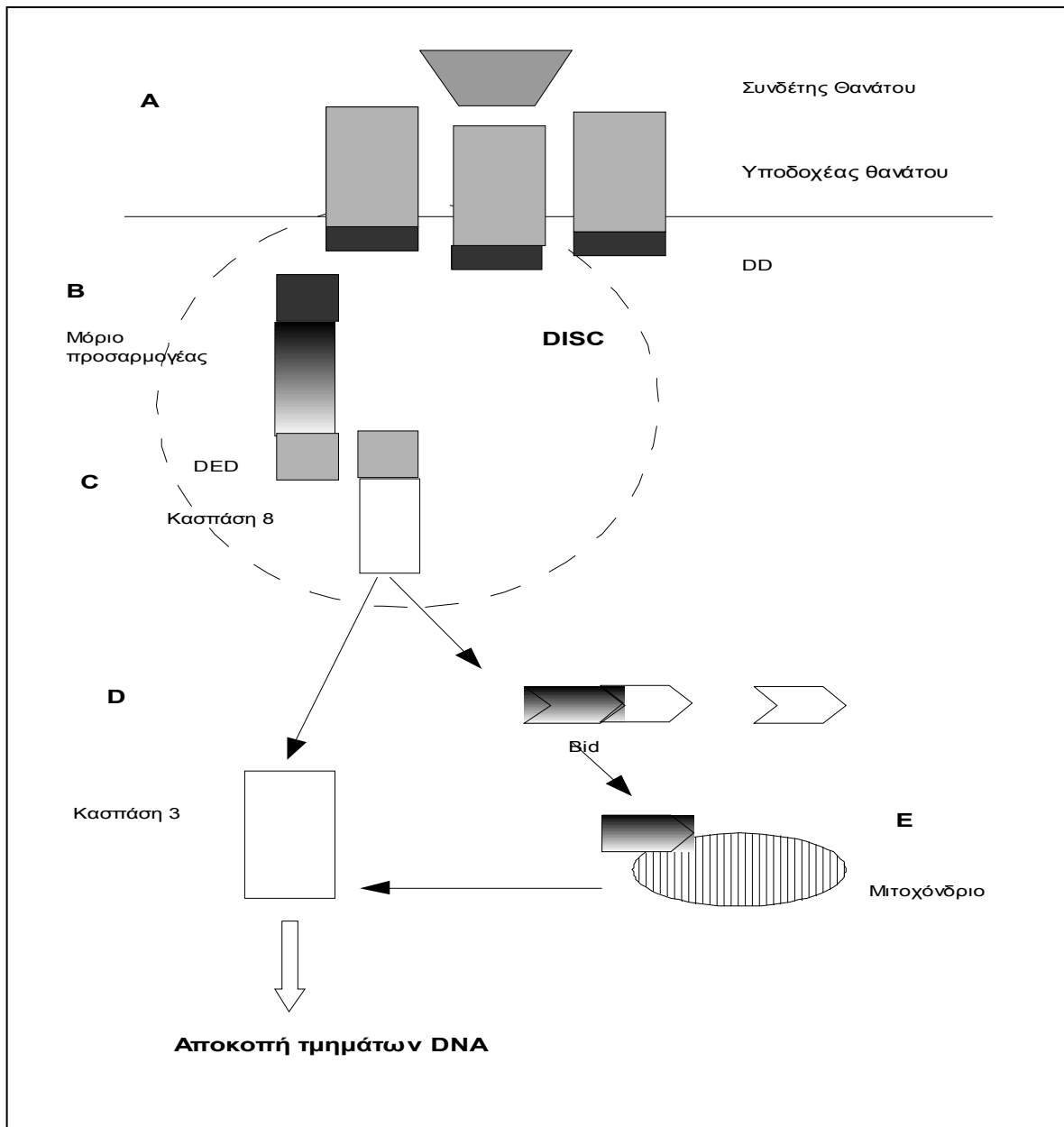
Η απόπτωση μπορεί να επάγεται από:

1) εξωγενή ερεθίσματα, όπως η σύνδεση μορίων που οδηγούν στον κυτταρικό θάνατο, όταν συνδέονται σε κατάλληλους υποδοχείς της κυτταρικής μεμβράνης (συνδέτες θανάτου) ή η απελευθέρωση ειδικών ενζύμων (granzyme) από κυτταροτοξικά λεμφοκύτταρα. Στους συνδέτες θανάτου ανήκουν ο συνδέτης του Fas (Fasligand), ο TNF α , ο συνδέτης που προκαλεί απόπτωση που συνδέεται με τον TNF α (TNF-related apoptosis inducing ligand, TRAIL), ο ασθενής επαγωγέας της απόπτωσης που μοιάζει με τον TNF (TNF-like weak inducer of apoptosis, TWEAK). Όλοι αυτοί οι συνδέτες συνδέονται με διαμεμβρανικούς υποδοχείς που μοιάζουν δομικά μεταξύ τους και οδηγούν σε τριμερισμό τους, γεγονός που οδηγεί με την σειρά του στην αλλαγή της στερεοδομής ενός κυτταροπλασματικού τμήματος του υποδοχέα, του τομέα θανάτου (Death Domain, DD). Ο τομέας θανάτου έρχεται σε άμεση συσχέτιση με διάφορα μόρια «προσαρμογείς» (FADD- fas associated death domain-τομέας θανάτου που σχετίζεται με τον fas- και TRADD- TNF receptor associated death domain, τομέας θανάτου που σχετίζεται με τον υποδοχέα του TNF-), ώστε να σχηματίσουν συμπλέγματα που επάγουν τον κυτταρικό θάνατο (Death effector domains), ενεργοποιώντας την προκασπάση 8. Αυτή με την σειρά της, είτε ενεργοποιεί άμεσα ένα καταρράκτη από κασπάσες (κασπάσες-3,-6,-7) με αποτέλεσμα την αποδόμηση πρωτεϊνών σημαντικών για την κυτταρική επιβίωση, είτε αποδομεί την πρωτεΐνη Bid, που σχετίζεται με την Bcl-2. Η αποδομημένη Bid μεταναστεύει στην εξωτερική

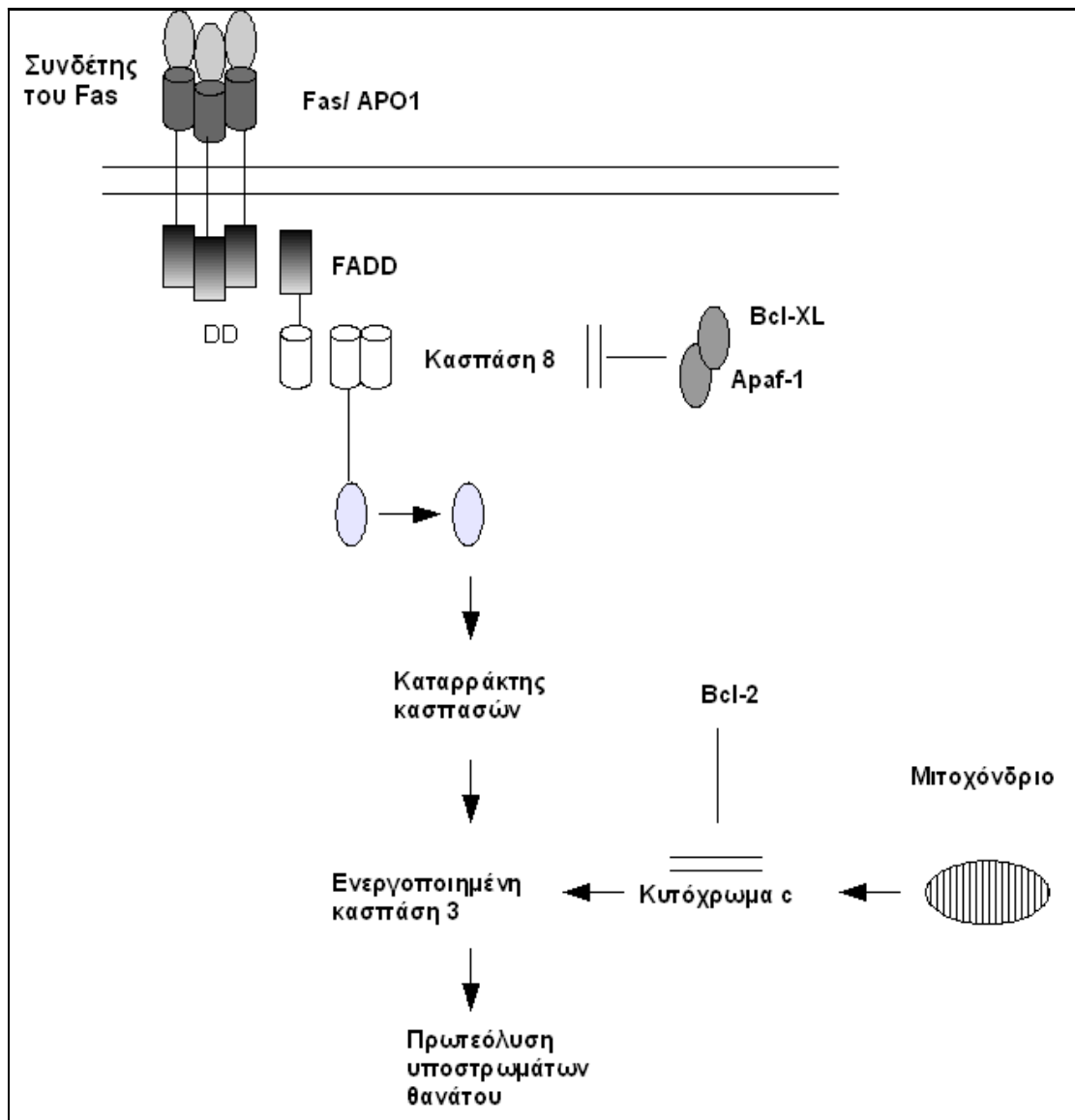
επιφάνεια της μιτοχονδριακής μεμβράνης και προκαλεί την ενεργοποίηση δραστικών κασπασών μέσω του μιτοχονδρίου. (Σχήματα 1 και 2).

Δύο είναι οι κυριότεροι υποδοχείς που συνδέονται οι λεγόμενοι συνδέτες θανάτου, ο υποδοχέας του TNF α (TNFR1) και ο υποδοχέας Fas (CD95). Και οι δύο ανήκουν στην οικογένεια των υποδοχέων TNF.

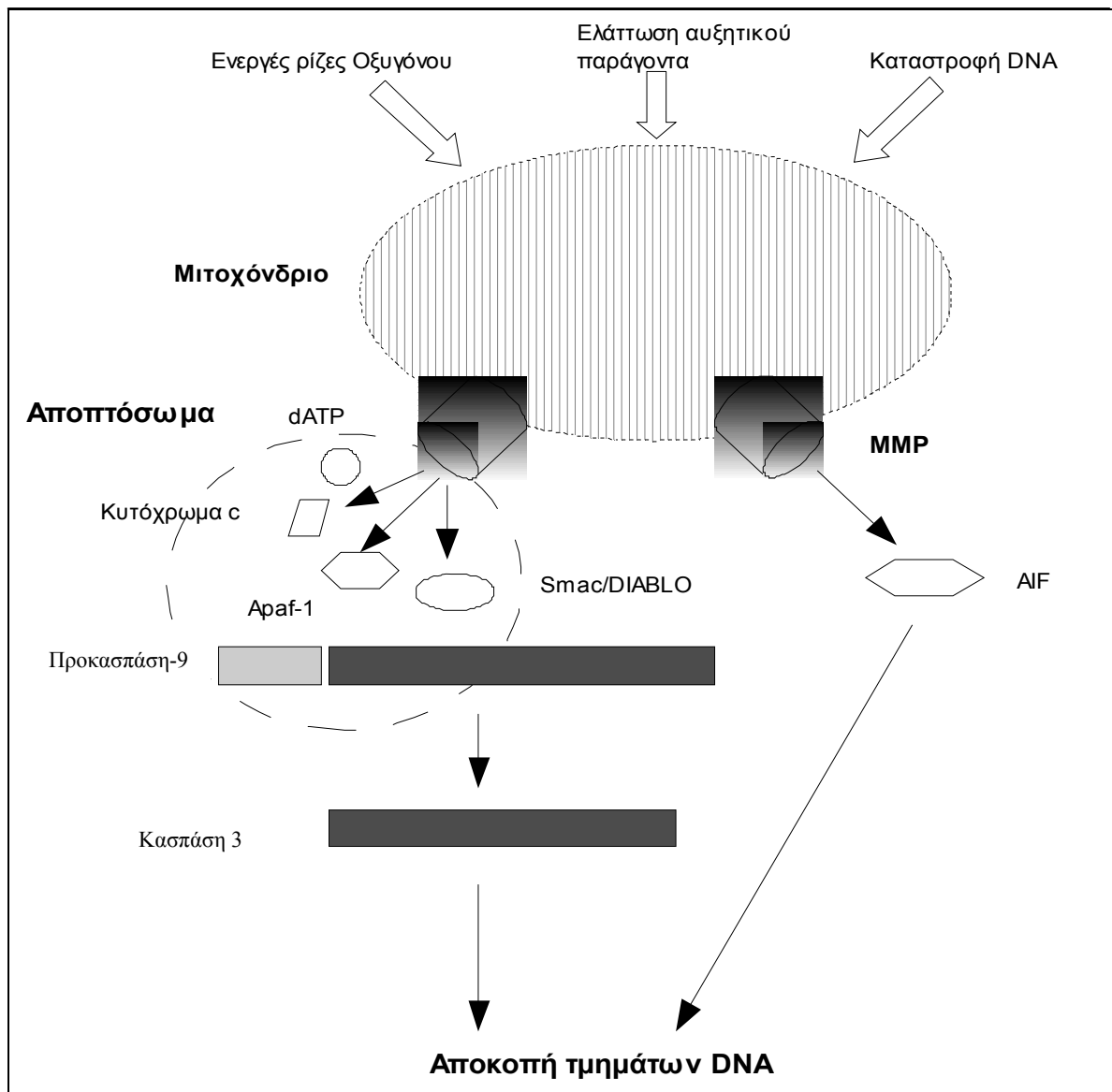
2) ενδογενή ερεθίσματα, τα οποία παράγονται συνήθως μετά από κυτταρικό stress όπως η απομάκρυνση σημάτων που προάγουν την επιβίωση, η έκθεση στην ακτινοβολία, χημικές ουσίες ή ιογενείς λοιμώξεις. Τα ερεθίσματα αυτά επιδρούν πάνω στην μεμβράνη των μιτοχονδρίων και την κάνουν διαπερατή (Mitochondrial membrane permeabilization, MMP), με αποτέλεσμα την απελευθέρωση αρκετών προαποπτωτικών μορίων από το χώρο ανάμεσα στις δύο μεμβράνες των μιτοχονδρίων. Τα μόρια αυτά οδηγούν στην απόπτωση είτε μέσω της ενεργοποίησης των κασπασών και ιδιαίτερα της κασπάσης 9, είτε ανεξάρτητα από αυτές. (Σχήμα 3) [10].



Σχήμα 1: Η εξωγενής αποπτωτική οδός. Οι συνδέτες θανάτου συνδέονται με διαμεμβρανικούς υποδοχείς, με αποτέλεσμα τον τριμερισμό του υποδοχέα και την αλλαγή της στερεοδομής του κυτταροπλασματικού τομέα θανάτου (DD). (A). Μόρια προσαρμογείς στρατολογούνται μέσω των DDs τους και φτιάχνουν ένα σύμπλεγμα που στέλνει σήματα που επάγουν τον θάνατο (death-inducing signaling complex, DISC). (B). Μέσω των τομέων τους που επάγουν τον θάνατο (death-effector domains, DEDs) τα μόρια προσαρμογείς ενεργοποιούν την προκασπάση-8. (C). Η κασπάση 8 ενεργοποιεί άμεσα την κασπάση 3. (D). Η ίδια μπορεί να ενεργοποιήσει έμμεσα τον καταρράκτη των κασπασών αποκόπτοντας το Bid, το οποίο στη συνέχεια μετακινείται στην εξωτερική επιφάνεια του μιτοχονδρίου.



Σχήμα 2: Η απόπτωση μέσω του συστήματος Fas-συνδέτη του Fas. Η σύνδεση του Fas με τον συνδέτη του επάγει τον τριμερισμό του υποδοχέα και αλλάζει τη στερεοδομή των ενδοκυτταρίων τομέων θανάτου του (DD), επιτρέποντας την αλληλεπίδραση με τον FADD (Fas associated death domain). Μέσα σε αυτό το σύμπλεγμα ο FADD έρχεται σε επαφή με την κασπάση-8 και την ενεργοποιεί. Η ενεργοποιημένη κασπάση-8 ενεργοποιεί με την σειρά της ένα καταρράκτη κασπασιών, που καταλήγει στην συσσώρευση της κασπάσης-3. Η τελευταία αδρανοποιεί υποστρώματα θανάτου. Η Bcl-XL καταστέλλει τα αποπτωγόνα ερεθίσματα μέσω της Apaf-1 (apoptotic protease-activating factor1), η οποία διατηρεί κάποιες κασπάσες στην αδρανή τους μορφή, ενώ η bcl-2 αναστέλλει την ενεργοποίηση της κασπάσης-3, πιθανώς αναστέλλοντας την απελευθέρωση κυτοχρώματος c από το μιτοχόνδριο.



Σχήμα 3: Η ενδογενής αποπτωτική οδός. Στρεσογόνα ερεθίσματα επιδρούν στα μιτοχόνδρια και επάγουν την αύξηση της διαπερατότητας της μεμβράνης (MMP: mitochondrial-membrane permeabilization). Τα αποπτωγόνα μόρια, που απελευθερώνονται με τον τρόπο αυτό από τον ενδομεμβρανικό χώρο του μιτοχονδρίου, μπορούν να εκκινήσουν αποπτωτικές οδούς εξαρτώμενες και μη από τις κασπάσες. Το απελευθερούμενο κυτόχρωμα c και ο Araf-1 αλληλεπιδρούν με την προκασπάση-9 του κυτταροπλάσματος και dATP και φτιάχνουν το αποπτόσωμα, μέσα στο οποίο η προκασπάση-9 ενεργοποιείται. Ο μιτοχονδριακός παράγοντας που επάγει την απόπτωση (AIF, mitochondrial apoptosis-inducing factor) προσπερνά το σύστημα των κασπασών, συνδέεται άμεσα με το DNA και αποκόπτει τμήματά του.

2.3.2. Ρύθμιση της απόπτωσης

Η ρύθμιση της απόπτωσης γίνεται κατ'αρχήν από μια επεκτεινόμενη οικογένεια δομικά συγγενών πρωτεϊνών, την οικογένεια Bcl-2. Τα μέλη της οικογένειας αυτής επιταχύνουν ή αναστέλλουν την απόπτωση αποκρινόμενα σε μια ποικιλία ερεθισμάτων, με την αναλογία των προ- και των αντιαποπτωτικών μορίων να καθορίζει την ευαισθησία του κυττάρου στα μηνύματα θανάτου. Η ρυθμιστική δράση των πρωτεϊνών της οικογένειας αυτής στην απόπτωση ασκείται με την επίδρασή τους στην εξωτερική επιφάνεια της μεμβράνης των μιτοχονδρίων. Συγκεκριμένα με την μορφή ομοδιμερών και ετεροδιμερών σχηματίζουν κανάλια διέλευσης ιόντων στην μεμβράνη των μιτοχονδρίων, ρυθμίζοντας έτσι την διαπερατότητα της μεμβράνης αυτής και την απελευθέρωση αποπτωγόνων παραγόντων όπως το κυτόχρωμα c και ο παράγοντας που επάγει την απόπτωση (apoptosis-inducing factor, AIF). Στα ζωντανά κύτταρα τα προαποπτωτικά μόρια της οικογένειας Bcl-2, βρίσκονται σε λανθάνουσα μορφή είτε στο κυτταρόπλασμα (Bax, Bid, Bad) είτε συνδεδεμένα χαλαρά με την εξωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων (Bak). Οι αντιαποπτωτικές πρωτεΐνες της οικογένειας αυτής είναι οι Bcl-2 και Bcl-X_L. Ασκούν τη δράση τους μέσω διαφόρων μηχανισμών, όπως παρεμποδίζοντας το σχηματισμό καναλιών στην μιτοχονδριακή μεμβράνη, ή απομονώνοντας αποπτωγόνα μόρια (κυτόχρωμα c) [10, 14].

2.4. Ο ρόλος του μικροπεριβάλλοντος

Η αυξημένη απόπτωση έχει αποδοθεί σε ενδογενείς ατέλειες στους κλωνικούς πληθυσμούς, όπως μιτοχονδριακή δυσλειτουργία ή ανωμαλίες στην μεταβίβαση του σήματος στα κύτταρα, στον κυτταρικό κύκλο ή τον μηχανισμό επιδιόρθωσης του DNA. Το γεγονός όμως ότι αδικαιολόγητος αποπτωτικός θάνατος συμβαίνει και στα

φυσιολογικά αιμοποιητικά πρόδρομα κύτταρα του μυελού στα ΜΔΣ, είναι ενδεικτικό του πιθανού προαποπτωτικού ρόλου του μικροπεριβάλλοντος του μυελού [3, 14, 98].

Το αιμοποιητικό μικροπεριβάλλον ρυθμίζει την ανάπτυξη και την διαφοροποίηση των αιμοποιητικών κυττάρων μέσω της άμεσης επαφής μεταξύ κυττάρων και της έκκρισης κυτταροκινών και αυξητικών παραγόντων. Ανωμαλίες του μικροπεριβάλλοντος πιστεύεται ότι συμβάλλουν σε έναν αριθμό αιματολογικών διαταραχών και μπορούν να εξηγήσουν την αυξημένη απόπτωση στα πρώιμα ΜΔΣ. Το στρώμα των ασθενών επηρεάζεται από την αυξημένη απόπτωση με πρόιμη απώλεια πολλών στρωματικών κυττάρων, ενώ παράλληλα χαρακτηρίζεται από αδυναμία να υποστηρίξει τον πολλαπλασιασμό και την διαφοροποίηση φυσιολογικών $CD34^+$ κυττάρων σε μακρόχρονες καλλιέργειες κυττάρων του μυελού των οστών.

Αναλυτικότερα, μελέτες έχουν δείξει ότι το στρώμα ασθενών με ΜΔΣ προάγει την απόπτωση μέσω των ακόλουθων μηχανισμών:

- 1) αλλοιωμένες αλληλεπιδράσεις προσκόλλησης μεταξύ των αιμοποιητικών και των στρωματικών κυττάρων (πιθανότατα συμμετέχουν ιντεγκρίνες)
- 2) μειωμένα σήματα επιβίωσης, δηλαδή μειωμένη παραγωγή αιμοποιητικών κυτταροκινών όπως ο παράγοντας που προάγει την ανάπτυξη των αρχέγονων κυττάρων (stem cell factor, SCF), ο αυξητικός παράγοντας των ουδετερόφιλων κοκκιοκυττάρων (granulocyte-colony stimulating factor, G-CSF) και κοκκιοκυττάρων-μακροφάγων (granulocyte-macrophage stimulating factor GM-CSF). Αυτή μπορεί να οφείλεται είτε σε αυξημένη απόπτωση και λειτουργικές διαταραχές των στρωματικών

κυττάρων είτε σε μειωμένη παραγωγή των αυξητικών παραγόντων από τα μονοκύτταρα/μακροφάγα

- 3) αυξημένα σήματα θανάτου, δηλαδή αυξημένη έκφραση του TNF α (πρωτεΐνη και mRNA) καθώς και του υποδοχέα του, του TRAIL και των υποδοχέων του και του συστήματος Fas/Fasligand
- 4) δράση T-κυττάρων . Τα κύτταρα αυτά δεν προέρχονται από τον παθολογικό δυσπλαστικό κλώνο, αλλά πιθανότατα ενεργοποιούνται στα πλαίσια μιας συγκροτημένης ανοσολογικής αντίδρασης είτε απέναντι στον κλώνο είτε ακόμα και απέναντι στο ίδιο το φαινόμενο της απόπτωσης.

Η μειωμένη απόπτωση στην προχωρημένη νόσο μπορεί να προέρχεται από επίκτητες διαταραχές στον αποπτωτικό μηχανισμό, επαγωγή των αρνητικών ρυθμιστών της απόπτωσης, κατάργηση της δράσης των κυτταροτοξικών T-κυττάρων που κατευθύνονται από τον δυσπλαστικό κλώνο ή τέλος επίδραση του κλώνου στο αιμοποιητικό μικροπεριβάλλον, ώστε αυτό να διευκολύνει την ανάπτυξή του [10, 15].

3. Ο παράγοντας νέκρωσης του όγκου (TNF α)

Μεταξύ των κυτταροκινών που αναστέλλουν την ανάπτυξη στα ΜΔΣ, ο παράγοντας νέκρωσης του όγκου (TNF α) έχει αναφερθεί να διαδραματίζει εξέχοντα ρόλο στην ενδομυελική απόπτωση άμεσα και/ή έμμεσα . Οι κυτταροκίνες είναι πρωτεϊνικοί μεσολαβητές ή σηματοδοτικά μόρια που παράγονται από τα κύτταρα του ενεργοποιημένου ανοσολογικού συστήματος. Ανάμεσα σε αυτές περιλαμβάνονται προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες όπως ιντερφερόνες, ιντερλευκίνες και ο TNF α . Ο TNF α είναι ο σημαντικότερος και ισχυρότερος μεσολαβητής της φλεγμονής.

Η υπερπαραγωγή του TNFα μπορεί να είναι οξεία και έντονη ή χρόνια και λιγότερο έντονη: σε κάθε περίπτωση υπάρχουν ιδιαίτερες εκδηλώσεις. Στην πρώτη περίπτωση, η οποία περιλαμβάνει ασθενείς που εμφανίζουν οξεία σηπτική καταπληξία, η εξαιρετικά μεγάλη παραγωγή TNFα έχει ως βραχυπρόθεσμη συνέπεια την έναρξη του καταρράκτη των κυτταροκινών και ως αώτερο αποτέλεσμα την βλάβη σε όργανα-στόχους, που τόσο συχνά αποδεικνύεται μη αναστρέψιμη και μοιραία. Είναι ακόμα πιο δυσνόητες, ωστόσο, οι ηπιότερες επιπτώσεις της χρόνιας, χαμηλού βαθμού αύξησης των επιπέδων της κυτταροκίνης αυτής σε νοσήματα όπως η ρευματοειδής αρθρίτιδα, η σκλήρυνση κατά πλάκας, η απλαστική αναιμία, το σύνδρομο επίκτητης ανοσοανεπάρκειας των ενηλίκων και τα μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα.

3.1. Προέλευση του TNFα

Μια μεγάλη ποικιλία ερεθισμάτων μπορούν να επάγουν την παραγωγή του TNFα: ενδοτοξίνες, gram-αρνητικά βακτήρια, gram-θετικά βακτήρια, καρκινικά κύτταρα, ιοί όπως ο ανθρώπινος ιός της ανοσοανεπάρκειας (Human Immunodeficiency virus, HIV), ιονίζουσα ακτινοβολία, κυτταροκίνες όπως η ιντερλευκίνη-1 (IL-1) και η ιντερφερόνη γ (INT-γ), καθώς και διάφορες απαντήσεις σε stress. Το γονίδιο του TNFα είναι ένα από τα πρώτα γονίδια που εκφράζονται από τα T- και τα B λεμφοκύτταρα, αφού αυτά τα κύτταρα ενεργοποιηθούν μέσω των αντιγονικών υποδοχέων τους. Είναι ενδιαφέρον ότι ο ίδιος ο TNFα επάγει αυτοκρινώς την σύνθεσή του. Λαμβάνοντας υπόψιν την ποικιλία των ερεθισμάτων που επάγουν την έκφραση του TNFα και τις πολλαπλές δράσεις του, γίνεται εύκολα κατανοητή η ποικιλία των νοσημάτων που έχουν συνδεθεί με αυξημένη παραγωγή του.

Ο TNFα φαίνεται ότι παράγεται από τα ενεργοποιημένα μακροφάγα και τα Τ κύτταρα ως μια διαμεμβρανική πρωτεΐνη 26-kDa και απελευθερώνεται στην κυκλοφορία μετά από επεξεργασία από πρωτεολυτικά ένζυμα ως μια πρωτεϊνική υπομονάδα 17-kDa. Αυτά τα μονομερή σχηματίζουν ομοτριμερή 51 kDa που είναι η ενεργός μορφή του διαλυτού TNFα. Υπό φυσιολογικές συνθήκες ευνοείται ο σχηματισμός τριμερών. Ένα ενδιαφέρον ερώτημα, το οποίο δεν έχει ακόμα απαντηθεί, είναι το αν τα μακροφάγα που παράγουν τον TNFα σε ασθενείς με ΜΔΣ προέρχονται από τον κλώνο ή είναι φυσιολογικά κύτταρα που προσπαθούν να εξαλείψουν τον παθολογικό κλώνο [16, 17].

Ιδιαίτερη φαίνεται να είναι η σημασία της αγγειογένεσης. Η πυκνότητα των μικρών αγγείων είναι αυξημένη σε ασθενείς με ΜΔΣ και σχετίζεται άμεσα με το ποσοστό των μυελοβλαστών, γεγονός που υποδεικνύει ότι οι μυελοβλάστες αυτοί καθ'αυτοί είναι η κυριότερη πηγή των αγγειογενετικών μορίων. Πρόσφατα στοιχεία δείχνουν ότι τα CD34⁺ κύτταρα στους ασθενείς με ΜΔΣ παράγουν αγγειακό ενδοθηλιακό αυξητικό παράγοντα (Vascular endothelial growth factor, VEGF), ο οποίος διεγείρει τα επιθηλιακά κύτταρα και τα μακροφάγα να παράγουν TNFα και άλλες προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες, συμβάλλοντας έτσι στην μη αποδοτική αιμοποίηση [13].

3.2. Υποδοχείς του TNFα

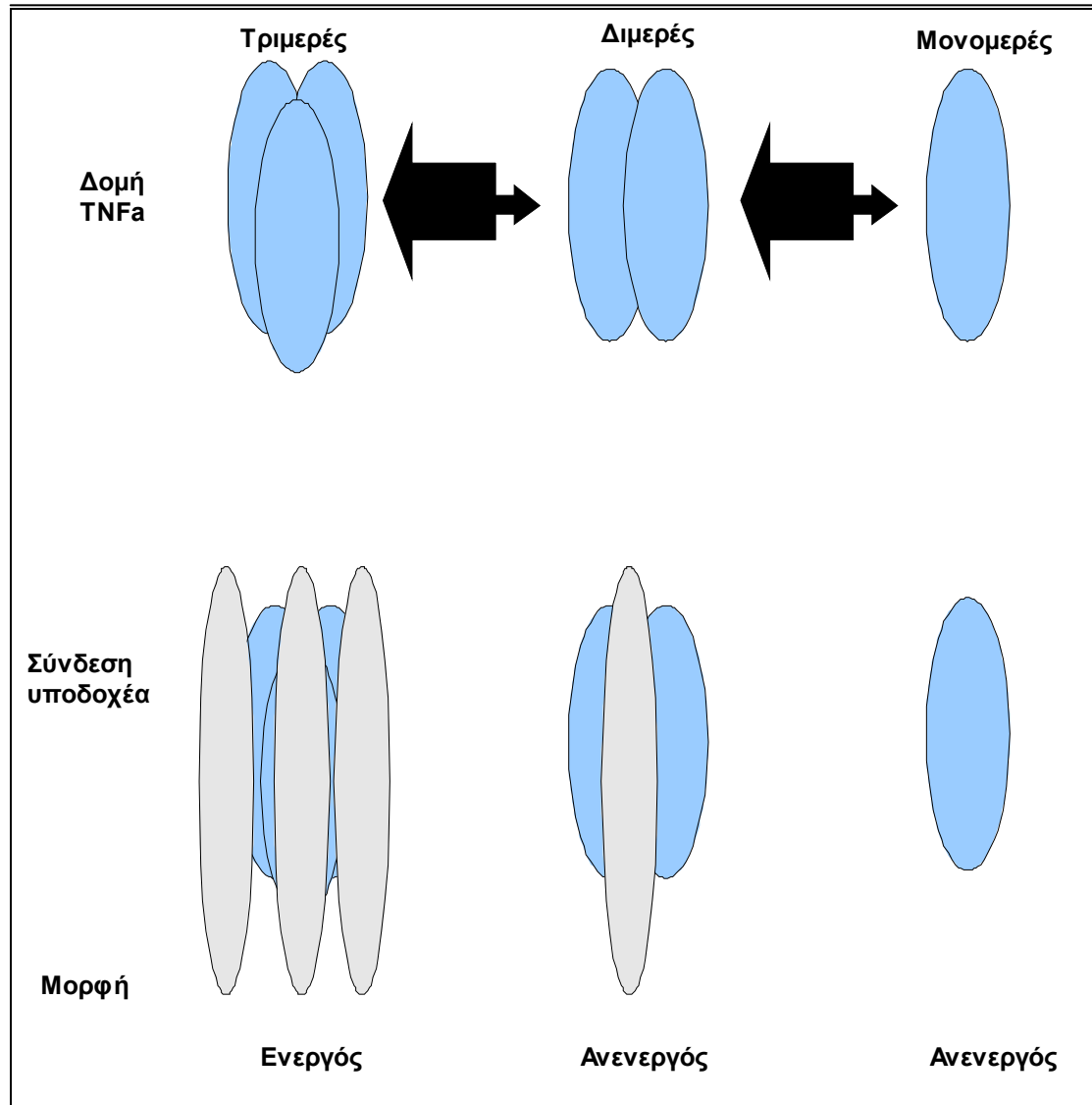
Ο TNFα και οι άλλες κυτταροκίνες δρουν ως μεσολαβητές συνδεδεμένοι με ειδικούς υποδοχείς πάνω στα κύτταρα. Έχουν αναγνωριστεί δύο υποδοχείς για τον TNFα, ο τύπος I με μοριακό βάρος 55 kDa, p55 υποδοχέας (TNF-RI) και ο τύπος II με μοριακό βάρος 75 kDa, p75 υποδοχέας (TNF-RII). Ο πρώτος εκφράζεται σε όλους σχεδόν τους τύπους των κυττάρων, ενώ ο δεύτερος κυρίως σε κύτταρα του

αιμοποιητικού ιστού, του λεμφικού ιστού και ενδοθηλιακά κύτταρα. Οι υποδοχείς αυτοί φαίνεται να μεταφέρουν μηνύματα μέσω διαφορετικών οδών. Η ενεργοποίηση του TNF-RI είναι σημαντική για την άμυνα του ξενιστή και οδηγεί σε φλεγμονή, ιστική καταστροφή και κυτταροτοξικότητα. Αντίθετα η ενεργοποίηση του TNF-RII, τουλάχιστον σε ασθενείς με ρευματοειδή αρθρίτιδα, οδηγεί σε πολλαπλασιασμό και αυξημένη απόπτωση των T κυττάρων και ανοσοκαταστολή, γεγονός σημαντικό για τον τρόπο με τον οποίο ο οργανισμός αντιμετωπίζει την σύνθετη διαδικασία της νόσου. Σε συμφωνία με τα παραπάνω κάποιοι ερευνητές πιστεύουν ότι θα ήταν προτιμότερο να ανταγωνιστεί κανείς με κατάλληλες ουσίες εκλεκτικά τον TNF-RI, και όχι και τον TNF-RII. [18]

Οι υποδοχείς αυτοί βρίσκονται στην επιφάνεια του κυττάρου ως τριμερή. Υπό συνθήκες κυτταρικής διέγερσης αποκόπτονται με πρωτεόλυση και απελευθερώνονται τοπικά στο κυτταρικό μικροπεριβάλλον ως διαλυτά μόρια (soluble), που ονομάζονται sTNF-RI και sTNF-RII αντίστοιχα. Ο ρόλος τους δεν είναι πλήρως διευκρινισμένος, ενδέχεται να έχουν και αντιφλεγμονώδη δράση, δεσμεύοντας τις αντίστοιχες κυτταροκίνες. Είναι σημαντικό να αναγνωρίσει κανείς ότι η δράση του TNF α εξαρτάται από μια δυναμική ισορροπία ανάμεσα στην συγκέντρωσή του, την συγκέντρωση των διαλυτών υποδοχέων του, καθώς και των υποδοχέων του που βρίσκονται συνδεδεμένοι με την κυτταρική μεμβράνη και την συγγένεια του TNF α με κάθε ένα τύπο υποδοχέα. Επιπλέον η βιολογική δράση των εξωγενώς χορηγούμενων διαλυτών υποδοχέων μπορεί να διαφέρει από αυτή των ενδογενών μορφών.

Μελέτες έδειξαν ότι οι υποδοχείς συνδέονται με τα τριμερή του TNF α στα μεσοδιαστήματα μεταξύ δύο γειτονικών υπομονάδων του τριμερούς αυτού. Φαίνεται ότι η σύνδεση του τριμερούς του TNF α με τους κυτταρικούς υποδοχείς οδηγεί σε

ενδοκυττάρια μεταβίβαση του μηνύματος μόνο μέσω της διασύνδεσης δύο ή τριών υποδοχέων. Το αποτέλεσμα είναι η επαγωγή της έκφρασης διαφόρων γονιδίων και της παραγωγής των προϊόντων τους (Σχήμα 4).



Σχήμα 4: Σχηματική απεικόνιση της συσχέτισης του TNFα με τον υποδοχέα του. Τα μονομερή του TNFα σχηματίζουν δι- και τριμερή. Δραστικά είναι μόνο τα τριμερή. Τα διπλά βέλη είναι ασύμμετρα για να δείξουν ότι υπό φυσιολογικές συνθήκες ευνοείται ο σχηματισμός τριμερών. Η σύνδεση του υποδοχέα γίνεται ανάμεσα στις υπομονάδες των μονομερών του TNFα

Συγκεκριμένα ο TNFα μπορεί να επάγει διάφορα γονίδια όπως α) μεταγραφικών παραγόντων (Nuclear factor kappa B, NF-kB) β) μορίων προσκόλλησης (Intercellular adhesion molecule 1, ICAM-1) γ) κυτταροκινών (Interleukin-1, Interleukin-6, Interleukin-8, IL-1, IL-6, IL-8) δ) υποδοχέων κυτταροκινών (υποδοχέας IL-1 και IL-6) ε) διαφόρων μεσολαβητών της φλεγμονής (πρωτεΐνη C3 του συμπληρώματος, κολλαγενάση). Επίσης μπορεί να μειώσει την έκφραση διαφόρων γονιδίων, όπως αυτό του κολλαγόνου [17, 18].

3.3. Ο ρόλος του TNFα στα ΜΔΣ

Ο TNFα έχει αναφερθεί να διαδραματίζει εξέχοντα ρόλο στην ενδομυελική απόπτωση. Συγκεκριμένα, μελέτη που συνέκρινε στρωματικούς ινοβλάστες του μυελού των οστών και μακροφάγα από ασθενείς με ΜΔΣ και υγιείς μάρτυρες έδειξε αυξημένη έκκριση του TNFα στους ασθενείς. Το αποτέλεσμα αυτό επιβεβαιώθηκε από πολλές άλλες μελέτες, χωρίς ωστόσο να έχει βρεθεί συσχέτιση ανάμεσα στα επίπεδα του TNFα και τα κλινικά χαρακτηριστικά των ασθενών. Πολύ υψηλά επίπεδα της κυτταροκίνης αυτής βρέθηκαν σε ποσοστό 30% των ασθενών [19]. Αυξημένα επίπεδα TNFα βρέθηκαν στο μυελό των οστών κοντά σε κύτταρα που υπόκειντο σε προγραμματισμένο θάνατο, ενώ η συσχέτιση μεταξύ επιπέδων TNFα και απόπτωσης ήταν στατιστικώς πολύ σημαντική [20, 21]. Είναι γνωστό ότι το αποπτωτικά τμήματα DNA έχουν το ίδιο μήκος, αλλά διαφορετικά άκρα, είτε ειδικά του ιστού που υφίσταται την απόπτωση είτε ειδικά της ουσίας-επαγωγέα της απόπτωσης. Έχει διαπιστωθεί στα ΜΔΣ η παρουσία αποπτωτικών τμημάτων DNA, με τελικές αλληλουχίες που παρατηρούνται στις περιπτώσεις δράσης του TNFα, γεγονός που υποστηρίζει την συμμετοχή του στην παθογένεια αυτών των νοσημάτων [21]. Το mRNA του TNFα βρέθηκε αυξημένο στο μυελό των οστών ασθενών με

ΜΔΣ. Ο TNFα αυξάνει την έκφραση του υποδοχέα του Fas (CD95), που όπως προαναφέρθηκε αποτελεί μεμβρανικό υποδοχέα που επάγει την απόπτωση μετά την σύνδεσή του με τον Fas-ligand. Η έκφραση του Fas/Fas-ligand ήταν αυξημένη στο μυελό των οστών των ασθενών με ΜΔΣ, χωρίς αυτό να σχετίζεται με κλινικές παραμέτρους [22-24].

Επίσης αυξημένα επίπεδα της κυτταροκίνης αυτής διαπιστώθηκαν στον ορό ασθενών με ΜΔΣ σε άλλες μελέτες, όπου φάνηκε να σχετίζονται με το βαθμό της αναιμίας [25] και την μη ανταπόκριση στην ερυθροποιητίνη [26, 27]. Μελέτες σε ποντίκια έδειξαν ότι η χρόνια έκθεση στον TNFα οδηγεί κυρίως σε αναστολή της ερυθροποίησης και όχι σε ουδετεροπενία. Η αυξημένη έκφραση της κυτταροκίνης αυτής σχετίζεται επίσης με τη σοβαρότητα της νόσου [28] και την συνολική επιβίωση [29].

Υπάρχουν ενδείξεις ότι ο TNFα στους ασθενείς με ΜΔΣ έχει διπλό ρόλο. Έχει αποδειχθεί ότι στον μυελό των οστών με ΜΔΣ υπάρχει υπερπλαστική δραστηριότητα, καθώς πάρα πολλά κύτταρα βρίσκονται σε φάση σύνθεσης DNA. Ταυτόχρονα στο περιφερικό αίμα τους παρατηρούνται κυτταροπενίες ως αποτέλεσμα ενδομυελικής απόπτωσης. Μια από τις παρατηρήσεις της ομάδας της Raza το 1996 [12] ήταν ότι τα κύτταρα του μυελού των οστών των ασθενών με ΜΔΣ που υφίσταντο απόπτωση ήταν τα περισσότερο διαφοροποιημένα κύτταρα και των τριών κυτταρικών σειρών, ενώ αντίθετα οι μυελοβλάστες σπάνια ήταν αποπτωτικοί. Διατυπώθηκε έτσι η άποψη ότι ο TNFα από την μια προκαλεί την απόπτωση των ώριμων κυττάρων (CD34⁻) ενώ ταυτόχρονα διεγείρει τις προγονικές τους μορφές σε πολλαπλασιασμό (CD34⁺) [12, 30]. Εάν αυτή η υπόθεση είναι σωστή τότε και η χορήγηση αντι-TNFα θεραπείας θα έπρεπε να έχει διπλή δράση. Αφ'ενός θα έπρεπε να οδηγεί σε ανιχνεύσιμη μείωση του βαθμού της απόπτωσης στο μυελό των οστών

με ταυτόχρονη βελτίωση των κλινικών παραμέτρων και αφ'ετέρου θα έπρεπε να οδηγεί σε μείωση του παθολογικού κλώνου των αρχέγονων κυττάρων, αφού ο παράγοντας διέγερσής τους δεν θα υπάρχει πια. Παρά το ότι τα περισσότερα ερευνητικά δεδομένα σήμερα συνηγορούν υπέρ αυξημένης απόπτωσης κυρίως στο διαμέρισμα των CD34⁺, οι παρατηρήσεις αυτές υπογράμμισαν την μεγάλη σημασία του TNFα στην παθογένεια των ΜΔΣ και οδήγησαν στην θεώρηση της κυτταροκίνης αυτής ως θεραπευτικού στόχου.

3.4. Μελέτες αναστολής του TNFα.

Οι προσπάθειες να εξουδετερωθεί ή να κατασταλεί ο TNFα περιλάμβαναν κατ'αρχήν ουσίες με ανοσορρυθμιστικές ιδιότητες. Οι μελέτες στα ΜΔΣ ήταν η συνέχεια άλλων, που αφορούσαν σε χρόνια φλεγμονώδη και αυτοάνοσα νοσήματα όπως είναι η ρευματοειδής αρθρίτιδα και οι φλεγμονώδεις νόσοι του εντέρου, η σήψη και η νόσος του μοσχεύματος έναντι του ξενιστή (GVHD). Στα παραπάνω νοσήματα η *in vivo* εξουδετέρωση του TNFα οδήγησε σε θεαματικά αποτελέσματα, με συνέπεια οι ουσίες αυτές να συμπεριληφθούν στην θεραπεία τους [17, 32-37, 101].

3.4.1. Πεντοξιφυλλίνη-σιπροφλοξασίνη-δεξαμεθαζόνη

Αρχικά χρησιμοποιήθηκε ένα μη ειδικό φάρμακο η πεντοξιφυλλίνη σε συνδυασμό με σιπροφλοξασίνη και δεξαμεθαζόνη. Η πεντοξιφυλλίνη αλληλεπιδρά με τις σηματοδοτικές οδούς διαφόρων κυτταροκινών, συμπεριλαμβανομένου και του TNFα, της IL-1β και του TGF-β (transforming growth factor beta) ενώ παράλληλα μειώνει και την έκφραση του mRNA του TNFα. Η σιπροφλοξασίνη χρησιμοποιήθηκε ταυτόχρονα, διότι μειώνει τον ηπατικό μεταβολισμό της

πεντοξυφυλλίνης, αλληλεπιδρώντας με το σύστημα της P450 ρεδοκτάσης. Η δεξαμεθαζόνη χρησιμοποιήθηκε με στόχο να ενισχύσει ακόμα περισσότερο την καταστολή του TNFα καθώς μειώνει την μετάφραση του mRNA.

Οι πρώτες κλινικές μελέτες έγιναν το 1998 και οδήγησαν σε ανταπόκριση σε ποσοστό 40%, χωρίς αυτή να είναι πλήρης. Οι ασθενείς, που ανταποκρίθηκαν μερικώς, βελτιώθηκαν ως προς τις κυτταροπενίες τους. Το εντυπωσιακό ωστόσο ήταν ότι σε κάποιες περιπτώσεις εξαφανίστηκε ο δυσπλαστικός κλώνος. Το γεγονός αυτό υποδεικνύει έμμεσα ότι οι κλώνοι εξαρτώνται από την παρουσία μιας κυτταροκίνης, στην προκειμένη περίπτωση τον TNFα, η απουσία του οποίου οδηγεί σε μείωση ή και εξάλειψη τους. Στη συνέχεια προστέθηκε ο κυτταροπροστατευτικός παράγοντας αμιφοστίνη στο παραπάνω σχήμα, γεγονός που οδήγησε σε ανταπόκριση το 60% των ασθενών.

Και στις δύο περιπτώσεις ήταν αδύνατον να προσδιοριστεί ακριβώς ο μηχανισμός βελτίωσης των αιματολογικών δεικτών, καθώς κάθε φορά χρησιμοποιούνταν πολλά φάρμακα και κανένα δεν είχε ειδική δράση. Παρόλα αυτά οι μελέτες αυτές έδειξαν ότι η δράση των φαρμάκων ήταν εξαρτημένη από τις κυτταροκίνες, καθώς παρατηρήθηκε δραματική μείωση στα επίπεδα του TNFα. Σύντομα έγινε φανερό ότι η αποτελεσματικότητα της αντιTNFα θεραπείας στην εξάλειψη των κυτταροπενιών σε ασθενείς με ΜΔΣ θα μπορούσε να μελετηθεί μόνο με την χορήγηση φαρμάκων που θα στόχευαν αποκλειστικά τον TNFα. Ωστόσο οι πρώτες αυτές μελέτες ήταν πρωτοποριακές διότι εισήγαγαν ένα καινούριο τρόπο θεραπευτικής προσέγγισης των ΜΔΣ, την ρύθμιση των κυτταροκινών [13, 38, 39].

3.4.2. Θαλιδομίδη

Εκτός από την αυξημένη ενδομυελική απόπτωση των αιμοποιητικών κυττάρων που εξαρτάται από τις κυτταροκίνες, στο μυελό των ασθενών με ΜΔΣ παρατηρείται και αυξημένη αγγειογένεση, με αυξημένα επίπεδα VEGF. Χρησιμοποιήθηκε λοιπόν η θαλιδομίδη, επειδή έχει ιδιότητες αφ' ενός αντιαγγειογενετικές και αφ' ετέρου κατασταλτικές για τον TNFα, αλλά και για άλλες κυτταροκίνες . Οι ασθενείς έλαβαν θαλιδομίδη ως μονοθεραπεία σε δόση που άρχιζε από τα 100mg και έφθανε μέχρι τα 400mg. Η θεραπεία έγινε καλά ανεκτή και οι μισοί περίπου ασθενείς έδειξαν ανταπόκριση σε κάποια από τις τρεις σειρές. Ωστόσο δεν αποδείχθηκε να υπάρχει συσχέτιση ανάμεσα στην παρατηρούμενη μείωση του TNFα ή της αγγειογένεσης με την κλινική ανταπόκριση. Με άλλα λόγια παρά το ότι υπάρχει μια τάση να μειώνονται τα επίπεδα του TNFα και η πυκνότητα των νεοαγγείων μετά την θεραπεία, αυτά τα βιολογικά αποτελέσματα δεν μεταφράζονται σε κλινικό αποτέλεσμα. Αξίζει ωστόσο να σημειωθεί ότι παρατηρήθηκαν κάποιες καθυστερημένες αποκρίσεις, κάτι που παρατηρήθηκε και μετά από χορήγηση αντιλεμφοκυτταρικού ορού στους ασθενείς με ΜΔΣ: δεν αποκλείεται τα δύο αυτά φάρμακα να έχουν κοινό μηχανισμό δράσης, μέσω καταστολής των T-κυττάρων [39, 40].

Η χορήγηση του φαρμάκου αυτού είχε πολλές παρενέργειες, με αποτέλεσμα λίγοι ασθενείς να μπορούν να ανεχθούν μακροχρόνια θεραπεία, απαραίτητη προϋπόθεση για την όποια ανταπόκριση. Παράγωγα της θαλιδομίδης με λιγότερες παρενέργειες έχουν ήδη χρησιμοποιηθεί. Το CC5013 (Lenalidomide, Revlimid TM Celgene Inc) είναι ένα ισχυρό ανοσοτροποποιητικό, παράγωγο της θαλιδομίδης, χωρίς τις νευρολογικές της ανεπιθύμητες ενέργειες. Οι ασθενείς που έχουν μελετηθεί είναι λίγοι (36), αλλά τα ποσοστά ανταπόκρισης, που αφορούν κυρίως στην ερυθρά

σειρά, είναι σημαντικά (67%), ενώ έχει παρατηρηθεί σε σημαντικό ποσοστό και κυτταρογενετική ύφεση (65% >50% μείωση των ανώμαλων μεταφάσεων, 50% πλήρης κυτταρογενετική ύφεση). Θα πρέπει ωστόσο να αναφερθεί ότι η ευεργετική δράση της λεναλιδομίδης αφορά κυρίως σε ασθενείς με 5q- [41, 44].

3.3.3. Etarnecept

Στη συνέχεια ακολούθησαν μελέτες στις οποίες χρησιμοποιήθηκαν ουσίες που αναστέλλουν τον TNFα άμεσα. Μια απ' αυτές είναι το Etarnecept (Enbrel, Immunex, Seattle, WA, USA), μια διμερής πρωτεΐνη εκ συντήξεως, που αποτελείται από το εξωκυττάριο τμήμα του ανθρώπινου 75KD (p75) υποδοχέα του TNFα, και το Fc τμήμα ανθρώπινης IgG1 (sTNF-RII). Αυτό το μόριο αποτελείται από δύο σκέλη, με εκείνο το σκέλος που συνδέεται με το μεγαλύτερου μοριακού βάρους Fc τμήμα να διατηρεί καλύτερα τον υποδοχέα στην κυκλοφορία. Ο διαλυτός αυτός υποδοχέας συνδέεται με τον TNFα και παρεμποδίζει την αλληλεπίδρασή του και με τους δύο τύπους υποδοχέα TNFα στην κυτταρική επιφάνεια. Μελέτες σε πειραματόζωα και σε συστήματα *in vitro* έδειξαν ότι χαμηλές συγκεντρώσεις διαλυτών υποδοχέων TNFα σταθεροποιούν την δομή του TNFα, ενώ υψηλότερες συγκεντρώσεις αναστέλλουν την σύνδεσή του με τους υποδοχείς του στην επιφάνεια του κυττάρου. Ανάλογα δε με την συγγένεια του συνδέτη για τον διαλυτό υποδοχέα είναι δυνατό οι διαλυτοί υποδοχείς να απελευθερώνουν τους συνδέτες τους στους ιστούς-στόχους.

Η πρώτη μελέτη χορήγησης του etarnecept σε ασθενείς με ΜΔΣ δημοσιεύτηκε το 1999 [39] και περιλάμβανε 18 ασθενείς στους οποίους το φάρμακο χορηγήθηκε υποδορίως δύο φορές την εβδομάδα για 12 εβδομάδες. Ακολούθησαν άλλες μελέτες στις οποίες το φάρμακο χορηγήθηκε σε αντίστοιχο αριθμό ασθενών (διάμεσος αριθμός ασθενών 14), στις οποίες το φάρμακο χορηγήθηκε υποδορίως είτε δύο φορές

την εβδομάδα για 12 εβδομάδες, είτε αρχικά δύο φορές την εβδομάδα για 8 εβδομάδες και επί μη ανταποκρίσεως τρεις φορές την εβδομάδα για άλλες 3 εβδομάδες. Τα αποτελέσματα ήταν αμφιλεγόμενα. Σε δύο μελέτες [31, 39] παρατηρήθηκαν μερικές αποκρίσεις σε 10 από τους 18 ασθενείς και σε 5 από τους 12 ασθενείς αντίστοιχα, που αφορούσαν κυρίως στην ερυθρά αλλά και στην μεγακαρυοκυτταρική και σπανιότερα στην κοκκιώδη σειρά. Σε μία άλλη μελέτη [19] ωστόσο παρατηρήθηκε μερική παροδική (διάρκειας 3 μηνών) ύφεση στην ερυθρά σειρά σε έναν μόνο από τους 16 ασθενείς που πήραν μέρος, παρά το ότι οι ασθενείς όλων των μελετών είχαν παρόμοια κλινικά χαρακτηριστικά. Ενθαρρυντικά ήταν τα αποτελέσματα από την χορήγηση συνδυασμού ανοσοκατασταλτικής θεραπείας με αντιλεμφοκυτταρικό ορό και αναστολής του TNFα με etanercept [42]: 5 από τους 13 ασθενείς που ολοκλήρωσαν την θεραπεία έδειξαν μερική ανταπόκριση στην ερυθρά σειρά (ανεξαρτησία από τις μεταγγίσεις διάρκειας μέχρι και 3 χρόνων) και 3 από αυτούς και στην μεγακαρυοκυτταρική σειρά.

Η μικρή αποτελεσματικότητα του etanercept στα ΜΔΣ μπορεί να ερμηνευθεί από το ότι η ουσία ενδέχεται να μην είναι κατάλληλη για την εξουδετέρωση του TNFα στο περιβάλλον του μυελού των οστών. Είναι πιθανό παράγοντες, όπως η συγγένεια του φαρμάκου με την κυτταροκίνη και η χρονική διάρκεια εξουδετέρωσης της, να επηρεάζουν τα αποτελέσματα. Μελέτες ωστόσο είχαν δείξει σημαντική αύξηση στο σχηματισμό αποικιών από προγονικά αιμοποιητικά κύτταρα του μυελού των οστών σε ασθενείς με ΜΔΣ, τα οποία υποβλήθηκαν σε *in vitro* εξουδετέρωση του TNFα [22]. Το γεγονός αυτό κατευθύνει στην χρήση παραγόντων που εξουδετερώνουν την κυτταροκίνη αυτή.

3.5. Infliximab

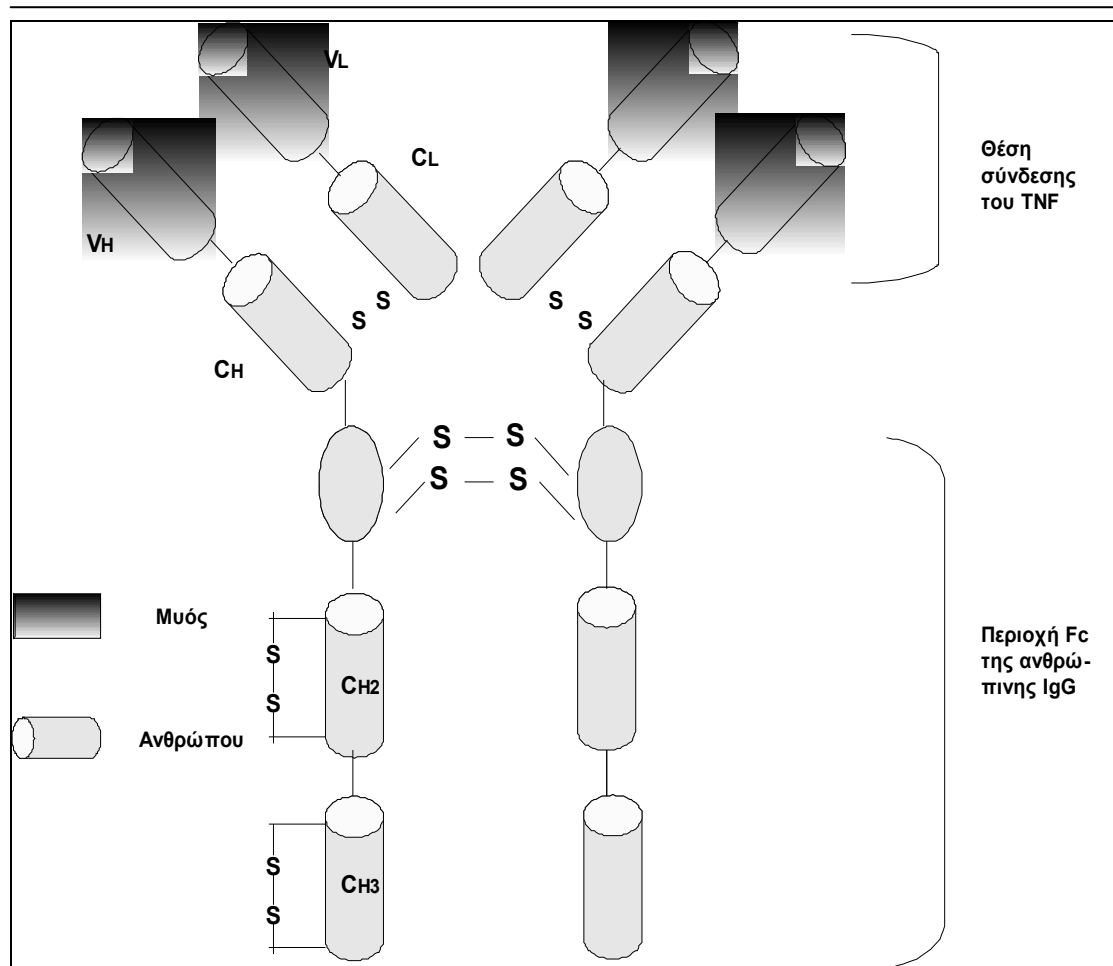
Μία από τις στρατηγικές που αναπτύχθηκαν για την εξουδετέρωση της αρνητικής δράσης του TNFα βασίστηκε στην τεχνολογία παραγωγής μονοκλωνικών αντισωμάτων και οδήγησε στην παραγωγή ουσιών που συνδέονται με το αντιγόνο με υψηλή ειδικότητα και συγγένεια. Η πρόοδος στην τεχνολογία του υβριδώματος επέτρεψε την παραγωγή τους σε μεγάλες ποσότητες. Αρχικά τα μονοκλωνικά αντισώματα προέρχονταν αποκλειστικά από ποντίκια, για να παραχθούν στην συνέχεια εξανθρωποποιημένα αντισώματα, που ήταν πολύ λιγότερο ανοσογονικά και διατηρούσαν την ικανότητα να εξουδετερώνουν το αντιγόνο-στόχο τους.

Η Centocor ανέπτυξε με την τεχνολογία της γενετικής μηχανικής μια μορφή του μονοκλωνικού αντισώματος A2 από ποντικό, που είναι ειδικό για τον ανθρώπινο TNFα. Οι σταθερές περιοχές τόσο των ελαφρών όσο και των βαριών αλύσεων αντικαταστάθηκαν από ανθρώπινα ανάλογα, με αποτέλεσμα το χμαιοικό μόριο cA2 που προέκυψε, να είναι περισσότερο συμβατό με το ανθρώπινο ανοσολογικό σύστημα, να έχει μια γλυκοζυλιωμένη IgG1 δομή με μοριακό βάρος κατά προσέγγιση 150000 Da και τις φαρμακοδυναμικές ιδιότητες μιας ανθρώπινης ανοσοσφαιρίνης. Το εμπορικό του όνομα είναι Remicade (Σχήμα 5) [17]

3.5.1 Φαρμακοκινητική

Η δράση του Infliximab πραγματοποιείται με την αναστολή της σύνδεσης του TNFα, τόσο του διαμεμβρανικού όσο και του διαλυτού, με τον υποδοχέα του. Η ουσία αυτή φάνηκε κατ'αρχήν να δρα σε μια μεγάλη ποικιλία πειραμάτων, σε κυτταρικές σειρές. Η φαρμακοκινητική της μοιάζει με αυτήν της ανθρώπινης ανοσοσφαιρίνης IgG1 και είναι πιθανό να μεταβολίζεται μέσω της ίδιας οδού. Οι παράμετροι της μέγιστης συγκέντρωσης στον ορό (maximum concentration, C_{max}) και της περιοχής κάτω από την καμπύλη (area under the curve, AUC) φαίνεται να

αυξάνονται γραμμικά και να εξαρτώνται από τη δόση του χορηγούμενου ενδοφλέβια φαρμάκου. Αντίθετα ο όγκος κατανομής (apparent volume of distribution, V_{dss}) και η κάθαρση ήταν σχετικά ανεξάρτητα από την χορηγούμενη δόση και οδήγησαν στο συμπέρασμα ότι το φάρμακο κατανέμεται κυρίως στο αγγειακό διαμέρισμα. . Επίσης το Infliximab έχει παρατεταμένο χρόνο ημίσειας ζωής 9,5 ημερών, που είναι συγκρίσιμος με αυτόν της ανθρώπινης ανοσοσφαιρίνης. Δεν υπάρχουν ενδείξεις άθροισης του φαρμάκου μετά από επαναλαμβανόμενες δόσεις τις εβδομάδες 0, 2, 6.



Σχήμα 5: Infliximab. Αυτό το προϊόν γενετικής μηχανικής, ένα χιμαϊρικό μονοκλωνικό αντίσωμα στοχεύει τον TNF α . Η περιοχή σύνδεσης με το αντιγόνο προέρχεται από ποντικό και συνδέεται με το τμήμα Fc της ανθρώπινης ανοσοσφαιρίνης IgG1

3.5.2. Φαρμακοδυναμική

Φαρμακοδυναμικές μελέτες έδειξαν ότι το Infliximab συνδέεται με το στόχο του (TNF α) in vivo και ανταγωνίζεται τις ποικίλες δράσεις του. Μειώνει την διήθηση από κύτταρα φλεγμονής και την παραγωγή του TNF α στις φλεγμαίνουσες περιοχές του εντέρου στη νόσο του Crohn. Οι ασθενείς αυτοί μετά την θεραπεία, έχουν μειωμένα επίπεδα IL-6 και C-αντιδρώσας πρωτεΐνης σε σχέση με τις τιμές αναφοράς [17]. Επίσης στις αρθρώσεις ασθενών με ρευματοειδή αρθρίτιδα παρατηρούνται υψηλοί αριθμοί CD4+ T κυττάρων και μακροφάγων που είναι γνωστό ότι εκφράζουν TNF α . Φαίνεται ότι η χορήγηση του cA2 οδηγεί στην αποτελεσματική καταστροφή τους μέσω κυτταρικής τοξικότητας εξαρτώμενης από αντισώματα (Antibody dependent cellular cytotoxicity, ADCC) [43].

Οι κλινικές μελέτες της χρήσης του cA2 στη ρευματοειδή αρθρίτιδα έδειξαν σημαντική βελτίωση της ενεργού νόσου μετά τη θεραπεία, είτε ως μονοθεραπεία είτε σε συνδυασμό με μεθοτρεξάτη [18, 32, 33]. Υπάρχουν αυξανόμενες ενδείξεις ότι εκτός από το κλινικό όφελος και την αναστολή της προόδου της καταστροφής των αρθρώσεων, η θεραπεία με το cA2 μπορεί να βοηθήσει στη βελτίωση των συστηματικών εκδηλώσεων της νόσου, όπως είναι η αναιμία της χρόνιας νόσου. Ειδικότερα έχει φανεί ότι η χορήγηση του cA2 αυξάνει το επίπεδο της αιμοσφαιρίνης, γεγονός που ενισχύει την άποψη ότι ο TNF α έχει καθοριστικό ρόλο στην παθογένεια της αναιμίας χρόνιας νόσου [45].

Η αναιμία που σχετίζεται με τη ρευματοειδή αρθρίτιδα χρησιμοποιήθηκε ως μοντέλο αναιμίας χρόνιας νόσου. Τα παραπάνω αποτελέσματα από την χορήγηση του cA2 στους ασθενείς αυτούς και η καλύτερη κατανόηση της φαρμακοδυναμικής αυτής της αντιTNF α ουσίας θα μπορούσε να διευκολύνει το σχεδιασμό θεραπευτικών

στρατηγικών για την αντιμετώπιση νοσημάτων ή έστω συμπτωμάτων που αποδίδονται στη δράση του TNFα.

3.5.3. Ασφάλεια στην χορήγηση του Infliximab

Κλινικές μελέτες με μακροχρόνια παρακολούθηση των ασθενών που έλαβαν Infliximab έδειξαν ότι το φάρμακο είναι γενικά ασφαλές. Η ανάλυση της σχέσης κινδύνου από ανεπιθύμητες ενέργειες - οφέλους συνηγορεί υπέρ της χρήσης του φαρμάκου, εφ'όσον υπάρχει ένδειξη, καθώς οι παρατηρούμενες παρενέργειες είναι ήπιες έως μέτριες και η θεραπεία γίνεται καλά ανεκτή από τους ασθενείς σε περιβάλλον εξωτερικού ιατρείου. Αυτό υποστηρίχθηκε τόσο από την αμερικανική όσο και από την ευρωπαϊκή επιτροπή για την ασφάλεια των φαρμάκων (United States Food and Drug Administration FDA/European Medicines Agency EMEA) [46, 47].

Μετά τα πρώτα χρόνια χορήγησης του infliximab φάνηκε ότι θα πρέπει να έχει κανείς υπόψη του 7 διαφορετικούς τύπους ανεπιθύμητων ενεργειών:

- 1) λοιμώξεις συμπεριλαμβανομένης της σήψης και της φυματίωσης
- 2) αντιδράσεις υπερευαισθησίας και αντιδράσεις σχετιζόμενες με την έγχυση του φαρμάκου.
- 3) ανάπτυξη αυτοαντισωμάτων και αυτοάνοσων φαινομένων
- 4) κακοήθειες όπως την ανάπτυξη λεμφωμάτων
- 5) επιδείνωση συμφορητικής καρδιακής ανεπάρκειας
- 6) απομυελινωτικές διαταραχές / νευροπάθεια
- 7) άλλες αιματολογικές διαταραχές όπως αναιμία και πανκυτταροπενία

Από τις παραπάνω ανεπιθύμητες ενέργειες οι συχνότερες είναι οι πρώτες δύο, με κυριότερη τις λοιμώξεις. [48] Σοβαρές λοιμώξεις, όπως διάσπαρτη φυματίωση και ευκαιριακές λοιμώξεις έχουν παρατηρηθεί σε ασθενείς με ρευματοειδή αρθρίτιδα που

θεραπεύτηκαν με infliximab [50-59]. Παρ'όλα αυτά συγκρίνοντας τα δεδομένα των λοιμώξεων συνολικά σε ασθενείς με ρευματοειδή αρθρίτιδα με αυτά των ασθενών με την ίδια νόσο που έλαβαν infliximab, δεν φαίνεται η χορήγηση του φαρμάκου να αυξάνει την συχνότητα των λοιμώξεων.

Ειδικότερα όσον αφορά την φυματίωση τον Φεβρουάριο του 2002 είχαν αναφερθεί 181 περιπτώσεις φυματίωσης παγκοσμίως σε σύνολο 271152 ασθενών, που έλαβαν το φάρμακο. Οι εκδηλώσεις της νόσου δεν ήταν πάντοτε οι συνήθεις καθ'ότι παρατηρήθηκε αυξημένη συχνότητα εξωπνευμονικής ή ακόμα και διάσπαρτης νόσου. Το γεγονός υποδεικνύει σημαντική ανοσοκαταστολή, η οποία σε πολλές περιπτώσεις καθυστέρησε την διάγνωση. Ο διάμεσος χρόνος εμφάνισης της φυματίωσης ήταν σχετικά μικρός, 12 εβδομάδες με εύρος 1 έως 52 εβδομάδες.

Η αιτία της αυξημένης εμφάνισης φυματίωσης στους ασθενείς που θεραπεύτηκαν με infliximab φαίνεται ότι ήταν κυρίως η αναζωπύρωση νόσου και λιγότερο συχνά η εμφάνιση πρωτολοίμωξης. Έχει επίσης αναφερθεί και νόσος σε πρόσφατα εμβολιασμένους ασθενείς. Μελέτες των λοιμώξεων σε ποντίκια που δεν είχαν TNFα έδειξαν ότι σε συμβατικό περιβάλλον αυτά είχαν την ίδια συχνότητα επιβίωσης με ποντίκια μάρτυρες, αλλά σε περιβάλλον με μυκοβακτηρίδια ήταν πολύ περισσότερο ευαίσθητα. Φαίνεται ότι ο TNFα είναι απαραίτητος για τη μη ειδική δράση των μακροφάγων έναντι των μυκοβακτηριδίων και το σχηματισμό του κοκκιώματος.

Προκειμένου να αντιμετωπιστεί το πρόβλημα αυτό έχουν προταθεί οδηγίες για την πρόληψη και την θεραπεία της φυματίωσης σε ασθενείς που θεραπεύονται με infliximab. Αναγνωρίζονται οι ασθενείς που είναι σε αυξημένο κίνδυνο για αναζωπύρωση της νόσου ή ασθενείς με λανθάνουσα φυματίωση με τη βοήθεια του ιστορικού, της ακτινογραφίας θώρακος, της φυματινοαντίδρασης Mantoux. Σε

αυτούς δίνεται χημειοπροφύλαξη σε διάφορα σχήματα, με έναρξη τουλάχιστον 3 εβδομάδες πριν την πρώτη έγχυση του infliximab [49].

Έχουν αναφερθεί και άλλοι τύποι λοιμώξεων στους ασθενείς που θεραπεύονται με infliximab. Η συχνότερη εντόπιση είναι το αναπνευστικό σύστημα. Σε αυτές περιλαμβάνονται περιπτώσεις με σοβαρή πνευμονία, σήψη, ιστοπλάσμωση, ασπεργίλλωση, λοιμώξεις με λιστέρια, πνευμονοκύστη καρίνη, κοκκιδιομύκωση, καντιντίαση, χωρίς όμως το ποσοστό των σοβαρών λοιμώξεων στους θεραπευόμενους ασθενείς να ξεπερνά το αντίστοιχο ποσοστό των μαρτύρων.

Οι αντιδράσεις κατά την έγχυση του φαρμάκου είναι οι αντιδράσεις που συμβαίνουν κατά τη διάρκεια της έγχυσης και μία ώρα μετά. Τέτοιες αντιδράσεις παρατηρήθηκαν στο 20% των ασθενών, με κυριότερες τη ναυτία, τη ζάλη και την κεφαλαλγία, ενώ σοβαρές αντιδράσεις παρατηρήθηκαν σε ποσοστό 0,9% και οδήγησαν σε διακοπή του φαρμάκου στο 2,6% των ασθενών [62-64].

Η θεραπεία με infliximab σχετίζεται με την ανάπτυξη αυτοαντισωμάτων. Αντιπυρηνικά αντισώματα αναπτύσσονται σε σημαντικό ποσοστό (55%), αλλά επίσης αρνητικοποιούνται σε σημαντικό ποσοστό σε σχέση με τις προ θεραπείας τιμές (36%). Η ανάπτυξη αυτοάνοσων νοσημάτων, όπως φαρμακευτικού λύκου ή συνδρόμου που προσομοιάζει με λύκο, αναφέρεται σε πολύ μικρή συχνότητα (0,4%). Η ανάπτυξη αντιπυρηνικών ή αντιDNA αντισωμάτων δεν προβλέπει την ανάπτυξη τέτοιων συμπτωμάτων. Επίσης εξετάστηκαν ασθενείς για την ανάπτυξη αντισωμάτων έναντι του infliximab (anti-chimeric antibodies HACA) και βρέθηκε ότι αυτά αναπτύσσονται σε ποσοστό 8,5%, γεγονός που ίσως μεταφράζεται σε μικρή τάση ανόδου του ποσοστού των ανεπιθύμητων αντιδράσεων κατά την έγχυση.

Η ανάπτυξη λεμφοϋπερπλαστικών νοσημάτων σε ασθενείς που λαμβάνουν infliximab αναφέρεται, αλλά μέχρι στιγμής δεν ξεπερνάει τα αναμενόμενα ποσοστά

δεδομένου ότι α) οι ασθενείς αυτοί πάσχουν από νοσήματα (φλεγμονώδεις νόσοι του εντέρου, ρευματοειδή αρθρίτιδα) με αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης κακοηθειών και ειδικότερα λεμφωμάτων και β) οι περισσότεροι έχουν υποβληθεί επί μακρόν σε άλλου είδους ανοσοκατασταλτική θεραπεία. Απαιτείται μακροχρόνια παρατήρηση του φαινομένου σε προοπτικές μελέτες, οι οποίες είναι ήδη σε εξέλιξη, ώστε να εξαχθούν ασφαλή συμπεράσματα [65-67].

Η ύπαρξη ιστορικού συμφορητικής καρδιακής ανεπάρκειας είναι απαγορευτική για τη χορήγηση αντιTNFα παράγοντα, καθώς αυξάνεται η πιθανότητα θανάτου από επιδείνωση της καρδιακής ανεπάρκειας στους ασθενείς αυτούς. Επίσης έχει αναφερθεί επιδείνωση σε δύο ασθενείς με σκλήρυνση κατά πλάκας που έλαβαν infliximab, καθώς και δύο περιπτώσεις με πανκυτταροπενία.

Συνοψίζοντας, οι ασθενείς που περιλαμβάνονται στις κλινικές μελέτες που γίνονται για την εκτίμηση της αποτελεσματικότητας και της ασφάλειας του infliximab είναι ασθενείς με χρόνιες φλεγμονώδεις νόσους που έχουν ήδη λάβει επί μακρόν ανοσοκατασταλτική αγωγή. Έχουν συνεπώς, προδιάθεση ανάπτυξης λοιμώξεων, αυτοάνοσων διαταραχών, κακοηθειών και ως εκ τούτου έχουν αυξημένη θνητότητα. Η χορήγηση του συγκεκριμένου αντιTNFα παράγοντα δεν φαίνεται να αυξάνει την συχνότητα εμφάνισης των παραπάνω ανεπιθύμητων ενεργειών, ενώ το φάρμακο γίνεται καλά ανεκτό σε περιβάλλον εξωτερικού ιατρείου καθώς οι αντιδράσεις κατά την έγχυση είναι ήπιες έως μέτριες, αναστρέψιμες με την κατάλληλη αγωγή και σπάνια οδηγούν στην διακοπή χορήγησης του φαρμάκου. Ιδιαίτερη προσοχή χρειάζεται μόνο στο θέμα των λοιμώξεων και μάλιστα στην πιθανότητα αναζωπύρωσης φυματίωσης. Οι ασθενείς που είναι σε θεραπεία με τον παράγοντα αυτό θα πρέπει να είναι ενημερωμένοι, ώστε να αναζητούν ιατρική βοήθεια με τα πρώτα συμπτώματα λοίμωξης και να αντιμετωπίζονται με αντιβιοτικά

ακόμα και με την υποψία λοίμωξης. Οποσδήποτε θα πρέπει να ακολουθούνται οι διεθνείς οδηγίες για την πρόληψη και την θεραπεία τυχόν αναζωπύρωσης φυματίωσης.

3.6. Infliximab και Μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα

Το Infliximab χορηγήθηκε σε ασθενείς με ΜΔΣ στα πλαίσια δύο μελετών. Στην πρώτη [68] χορηγήθηκε σε δύο ασθενείς με χαμηλού και ενδιάμεσου-1 κινδύνου ΜΔΣ, σε δόση αντίστοιχη με αυτήν που χρησιμοποιείται σε ασθενείς με ρευματοειδή αρθρίτιδα, δηλαδή 3 mg/Kg βάρους σώματος για 6 εγχύσεις (ημέρες 0, 2, 6, 14, 22, 30). Οι ασθενείς είχαν ανταπόκριση στην ερυθρά σειρά, ο ένας μείζονα και ο άλλος ελάσσονα, που παρατηρήθηκαν μετά την 6η εβδομάδα (τρίτη δόση του Infliximab) και διατηρήθηκαν για 20 εβδομάδες στον πρώτο και 17 στον δεύτερο. Στην δεύτερη μελέτη [69], η οποία δημοσιεύτηκε δύο χρόνια μετά την πρώτη, χορηγήθηκε το φάρμακο σε 28 ασθενείς χαμηλού και ενδιάμεσου-1 κινδύνου, οι οποίοι χωρίστηκαν σε δύο ομάδες : στην πρώτη ομάδα το φάρμακο χορηγήθηκε σε δόση 5 mg/Kg κάθε 4 εβδομάδες για 4 κύκλους και στην δεύτερη ομάδα σε δόση 10 mg/Kg κάθε 4 εβδομάδες για 4 κύκλους. Όσοι ασθενείς είχαν σταθερή νόσο, ελάσσονα ή μείζονα ανταπόκριση έλαβαν το φάρμακο για 1 χρόνο συνολικά, διαφορετικά διέκοπταν στις 16 εβδομάδες. Από τους 28 ασθενείς ανταποκρίθηκαν κλινικά οι 8 : ένας ασθενής ανταποκρίθηκε και ως προς τις τρεις σειρές, ένας ανταποκρίθηκε ως προς την ερυθρά και την μεγακαρυοκυτταρική, ένας είχε ελάσσονα ανταπόκριση στην ερυθρά σειρά, δύο ασθενείς βελτίωσαν τα ουδετερόφιλα τους, δύο είχαν ελάσσονα κυτταρογενετική απόκριση και ένας μείωσε το ποσοστό των βλαστών.

Ο στόχος των παραπάνω μελετών ήταν η εκτίμηση της κλινικής ανταπόκρισης κυρίως όσον αφορά την βελτίωση των περιφερικών κυτταροπενιών και την εξάρτηση από τις μεταγγίσεις. Τα αποτελέσματα, όπως είναι φανερό, ποικίλλουν. Θα ήταν ενδιαφέρον να γνωρίζουμε το μηχανισμό αυτής της ανταπόκρισης, ώστε να μπορούμε στο μέλλον αφ' ενός να προεπιλέγουμε τους ασθενείς που θα ανταποκριθούν καλύτερα και αφ' ετέρου να καθορίσουμε την κατάλληλη δόση και το κατάλληλο χρονικό διάστημα χορήγησης του φαρμάκου. Άλλωστε αφού η θεραπεία με το Infliximab είναι καλά ανεκτή, θα μπορούσε να συζητηθεί η χορήγηση του σε συνδυασμό με άλλα φάρμακα, όπως τοποτεκάνη, τριοξειδίο του αρσενικού αναστολείς της φαρνεσυλτρανσφεράσης, με στόχο τόσο το αιμοποιητικό μικροπεριβάλλον όσο και άμεσα το δυσπλαστικό κλώνο.

Μέρος Δεύτερο

ΤΟ ΕΡΩΤΗΜΑ ΠΡΟΣ ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ

1. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Στην προσπάθεια θεραπευτικής αντιμετώπισης ασθενών με ΜΔΣ ανακύπτουν πολλά διλήμματα, γεγονός που οφείλεται στην πολυπαραγοντική παθογένεια της νόσου, στους διαφορετικούς τύπους με τα ποικίλλοντα χαρακτηριστικά, αλλά και στην συνήθως προχωρημένη ηλικία των ασθενών. Οι θεραπευτικοί στόχοι περιλαμβάνουν τον έλεγχο των συμπτωμάτων και την βελτίωση των αιματολογικών παραμέτρων με χαμηλής έντασης σχήματα, αλλά και την προσπάθεια αλλαγής της πορείας της νόσου με υψηλής έντασης σχήματα, συμπεριλαμβανομένης της εντατικής χημειοθεραπείας και της μεταμόσχευσης του μυελού των οστών. Η επιλογή της θεραπείας βασίζεται στην προγνωστική υποκατηγορία κατά IPSS, την ηλικία και την κατάσταση ικανότητας του ασθενούς και φυσικά στις προσωπικές του προτιμήσεις.

Τα χαμηλής έντασης σχήματα, εκτός από τα ήπια χημειοθεραπευτικά, περιλαμβάνουν ουσίες που τροποποιούν την βιολογική απόκριση (biologic response modifiers) και που μπορούν να χορηγηθούν σε περιβάλλον εξωτερικού ιατρείου ταυτόχρονα με την συμπτωματική υποστήριξη (χορήγηση παραγώγων αίματος). Σ' αυτούς συμπεριλαμβάνονται αυξητικοί παράγοντες, αντιαγγειογενετικές ουσίες (ουσίες που ανταγωνίζονται τον VEGF, θαλιδομίδη), υπομεθυλιωτικοί παράγοντες (5-αζακυτιδίνη, δεσιταμπίνη), ανοσοκατασταλτικές ουσίες (κυκλοσπορίνη, αντιθυμοκυτταρική σφαιρίνη), αλλά και ουσίες που ανταγωνίζονται τον TNFα. Πολλοί από αυτούς τους παράγοντες, χορηγούνται στα πλαίσια κάποιας κλινικής μελέτης, καθώς υπάρχουν περιορισμένες πληροφορίες σχετικά με την γενικότερη

αποτελεσματικότητά τους, τις κατάλληλες δόσεις, την τοξικότητα ή την επιλογή των κατάλληλων ασθενών. Αξίζει να σημειωθεί ότι το FDA έχει εγκρίνει την χορήγηση της 5-αζακυτιδίνης, της δεσιταμπίνης καθώς και της λεναλιδομίδης σε συγκεκριμένες ομάδες ασθενών, ενώ για την αποτελεσματικότητα της ερυθροποιητίνης υπάρχουν πολλά στοιχεία που επιτρέπουν την χρήση της εκτός κλινικών μελετών.

Σύμφωνα με όσα ήδη έχουν λεχθεί, στους ασθενείς με ΜΔΣ η αυξημένη ενδομυελική απόπτωση φαίνεται να συνδέεται άμεσα με τις περιφερικές κυτταροπενίες που παρατηρούνται, τουλάχιστον σε κάποιους από αυτούς. Είναι λογικό λοιπόν να προσπαθήσει κανείς να παρέμβει θεραπευτικά, καταστέλλοντας την απόπτωση, που πραγματοποιείται μέσω κυτταροκινών. Ο TNFα είναι, σύμφωνα με την βιβλιογραφία, η κυτταροκίνη που οδηγεί στην ενεργοποίηση ενός καταρράκτη άλλων προφλεγμονωδών παραγόντων, με αποτέλεσμα την αυξημένο κυτταρικό θάνατο. Μια σειρά από ουσίες με αντιTNFα ιδιότητες έχουν χρησιμοποιηθεί από διάφορους μελετητές με ποικίλλοντα βαθμό επιτυχίας. Το πρόβλημα με τις περισσότερες από αυτές είναι ότι έχουν μεγάλο εύρος δράσης και σίγουρα η αντιTNFα δράση τους δεν είναι η μόνη υπεύθυνη για τον όποιο βαθμό ανταπόκρισης.

Η ουσία με την περισσότερο ειδική αντιTNFα δράση είναι το χιμαιρικό μονοκλωνικό αντίσωμα cA2, Infliximab. Όπως προαναφέρθηκε έχει χορηγηθεί σε περιορισμένο αριθμό ασθενών με άλλοτε άλλο βαθμό επιτυχίας. Ο στόχος των μελετών με την συγκεκριμένη ουσία ήταν η εκτίμηση κατά βάση της κλινικής ανταπόκρισης. Θα ήταν πολύ σημαντικό να γνωρίζαμε τον ακριβή μηχανισμό δράσης της, ώστε να καθορίσουμε την κατάλληλη δόση αλλά και το χρονικό διάστημα στο οποίο πρέπει να χορηγείται, όπως και να διευκρινίσουμε το βαθμό συμμετοχής της στην ανταπόκριση, όπου αυτή παρατηρείται. Το cA2 θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί και σε συνδυασμό με άλλους βιολογικούς τροποποιητές αλλά και

χημειοθεραπευτικά φάρμακα. Ωστόσο η επίδραση της θεραπείας αυτής στα χαρακτηριστικά της επιβίωσης των αιμοποιητικών κυττάρων και στη λειτουργία των στρωματικών κυττάρων του μυελού δεν έχει μελετηθεί. Αυτό ακριβώς αποτέλεσε τη βάση της παρούσας εργασίας.

2. Το προς επίλυση ερώτημα

Το ερώτημα που τέθηκε για διερεύνηση και αποτέλεσε το αντικείμενο της παρούσας μελέτης είναι το **‘ποια είναι η επίδραση της θεραπείας με το χημειοθεραπευτικό μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι του TNF α , cA2, στην επιβίωση των αιμοποιητικών κυττάρων του μυελού και την υποστηρικτική λειτουργία των κυττάρων του στρώματος και κατά συνέπεια ποια είναι η αποτελεσματικότητά του αντισώματος σε ασθενείς με μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα’**. Όπως ήδη έχει αναφερθεί η επί του θέματος βιβλιογραφία είναι ακόμη πολύ φτωχή.

Μελετήθηκαν ασθενείς με RA, (RARS) και (RAEB) στους οποίους χορηγήθηκε το χημειοθεραπευτικό μονοκλωνικό αντίσωμα cA2. Η μελέτη αυτή περιλαμβάνει την εκτίμηση, πριν και μετά την χορήγηση του φαρμάκου των παρακάτω παραμέτρων:

1) Του αριθμού και των αποπτωτικών χαρακτηριστικών των προγονικών και πρόδρομων κυττάρων του μυελού των οστών.

2) Του αριθμού των πολύ άωρων αιμοποιητικών κυττάρων (Long-Term Culture Initiating Cells, LTCICs)

3) Της ικανότητας των στρωματικών κυττάρων του μυελού να στηρίζουν την αιμοποίηση με χρήση μακρόχρονων μυελικών καλλιιεργειών (Long-Term Bone Marrow Cultures, LTBMCS)

4) Των πιθανών αλλαγών στον αριθμό και την κατάσταση ενεργοποίησης των λεμφοκυτταρικών υποπληθυσμών στο περιφερικό αίμα και τον μυελό των οστών, προκειμένου έτσι να διευκρινισθεί περαιτέρω ο μηχανισμός δράσης του cA2 στα ΜΔΣ, καθώς η θεραπεία με την ουσία αυτή έχει αναφερθεί να δρα και έναντι των Τ λεμφοκυττάρων.

5) Της κλινικής ανταπόκρισης των ασθενών.

Πρόκειται για την πρώτη μελέτη που διερευνά την δράση του cA2 όχι μόνο σε κλινικό αλλά και σε βιολογικό επίπεδο, με σημαντικές προεκτάσεις στην καλύτερη κατανόηση των παθογενετικών μηχανισμών που διέπουν τη νόσο.

Μέρος Τρίτο

ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

1. Ασθενείς και θεραπευτικό πρωτόκολλο

Στην μελέτη συμπεριλήφθησαν αρχικά δώδεκα λευκοί ασθενείς με πρωτοπαθές ΜΔΣ, 7 γυναίκες και 5 άνδρες, ηλικίας 60 και 80 ετών (διάμεση ηλικία 71 έτη). Η διάγνωση του ΜΔΣ βασίστηκε στις χαρακτηριστικές μορφολογικές ανωμαλίες στο μυελό, την(ις) κυτταροπενία(ες) στο περιφερικό αίμα και/ή την παρουσία κυτταρογενετικών ανωμαλιών. Όλοι οι ασθενείς έδωσαν έγγραφη συγκατάθεση σύμφωνα με το πρωτόκολλο του Ελσίνκι και η μελέτη εγκρίθηκε από την Επιτροπή Δεοντολογίας του Νοσοκομείου και τον Εθνικό Οργανισμό Φαρμάκων με αριθμό έγκρισης 0-565/11/3-6-2002. Η μελέτη χρηματοδοτήθηκε από την Ένωση για την Διεθνή Αντικαρκινική Έρευνα (Association of International Cancer Research, AICR). Συμπεριλήφθησαν ασθενείς με RA, RARS και RAEB, εφόσον ήταν εξαρτημένοι από μεταγγίσεις συμπυκνωμένων ερυθρών και αιμοπεταλίων και/ή είχαν αιμοσφαιρίνη <10g/dl, αιμοπετάλια κάτω από $100 \times 10^9 /L$ και απόλυτο αριθμό πολυμορφοκυττάρων κάτω από $1,5 \times 10^9 /L$.

Τα κριτήρια αποκλεισμού περιελάμβαναν κατάσταση ικανότητας κατά Karnofsky κάτω από 60%, ηπατική και νεφρική δυσλειτουργία όπως αυτή καθορίζεται από επίπεδα χολερυθρίνης και κρεατινίνης στον ορό μεγαλύτερα του 2mg/dl και 2mg/dl αντίστοιχα, κλάσμα εξώθησης χαμηλότερο του 45%, θετικό

ατομικό αναμνηστικό για φυματίωση ή θετική δοκιμασία φυματίνης και πρόσφατη λοίμωξη.

Συγκεκριμένα στην μελέτη συμπεριελήφθησαν 5 ασθενείς με RA, 3 ασθενείς με RARS και 4 με RAEB, οι οποίοι ήταν εξαρτημένοι από μεταγγίσεις συμπτωκνωμένων ερυθρών. Η διάμεση τιμή του χρόνου παρακολούθησης των ασθενών αυτών ήταν 27 μήνες. Ο λιγότερο εξαρτημένος ασθενής είχε χρειαστεί 1 μονάδα συμπτωκνωμένων ερυθρών το τελευταίο εξάμηνο πριν την έναρξη της θεραπείας, ενώ ο περισσότερο εξαρτημένος 21 μονάδες συμπτωκνωμένων ερυθρών, με διάμεση τιμή αναγκών σε μεταγγίσεις 8 μονάδες συμπτωκνωμένων ερυθρών. Η ομάδα κινδύνου κατά το Διεθνές Προγνωστικό Σύστημα IPSS ήταν χαμηλού κινδύνου (Low) για τέσσερις ασθενείς, ενδιάμεσου κινδύνου 1 (INT-1) για πέντε ασθενείς και ενδιάμεσου κινδύνου 2 (INT-2) για τρεις ασθενείς. Οι 6 ασθενείς είχαν φυσιολογικό καρυότυπο, ενώ 4 ασθενείς είχαν τρισωμία 8 και 4 ασθενείς είχαν έλλειψη του 5q. Δεν υπήρχαν ασθενείς με σύνθετες καρυοτυπικές ανωμαλίες (>3). Η κυτταροβρίθεια του μυελού ήταν αυξημένη στους 10 ασθενείς, ενώ ήταν φυσιολογική στους υπόλοιπους δύο. Η διάμεση τιμή αιμοσφαιρίνης ήταν 8,9 g/dl, λευκών αιμοσφαιρίων $4.25 \times 10^9/L$, πολυμορφοπύρηνων $2 \times 10^9/L$, PLT 217000/ μL , ενώ η διάμεση τιμή των βλαστών στο μυελό ήταν 1,415% .

Οι επιλεγμένοι ασθενείς έλαβαν 3 mg/kg cA2 (Remicade, Infliximab; Schering-Plough, Greece) σε ενδοφλέβια έγχυση διάρκειας 2 ωρών τις εβδομάδες 0, 2, 6, 12, χωρίς να διακόψουν την θεραπεία με ερυθροποιητίνη, εφ'όσον λάμβαναν. Η χορηγούμενη δόση του φαρμάκου αραιωνόταν σε 250ml NaCl 0.9% και πριν την χορήγησή του δινόταν προθεραπεία με αντιισταμινικό (διμενθιδίνη) 4mg ενδοφλεβίως, παρακεταμόλη 600mg ενδοφλεβίως και υδροκορτιζόνη 50 mg ενδοφλεβίως.

2. Σχεδιασμός της μελέτης

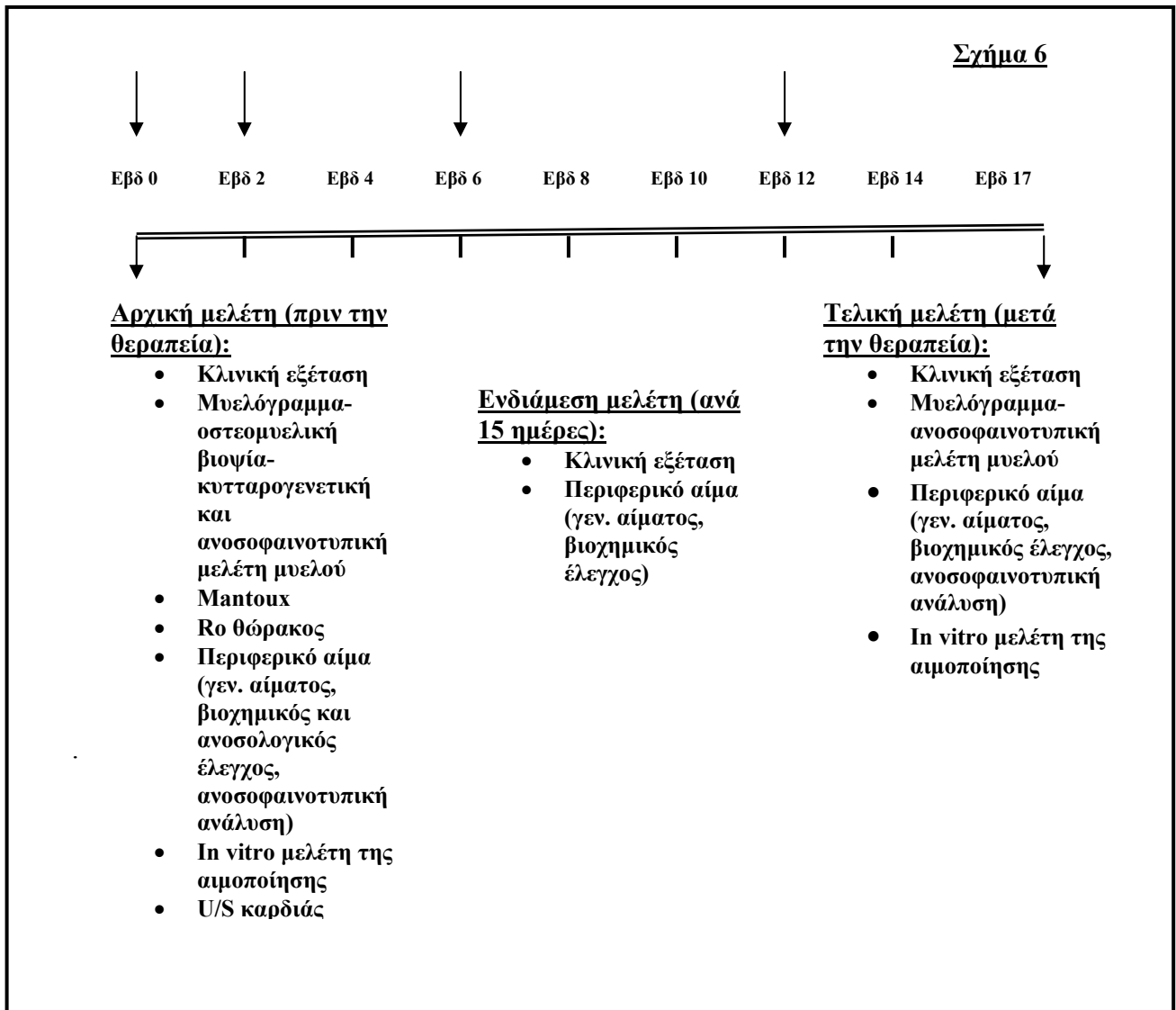
Ο σχεδιασμός της μελέτης, τόσο πριν την έναρξη όσο και μετά το τέλος της θεραπείας την 17^η εβδομάδα περιλάμβανε, εκτός από την κλινική εξέταση: 1) γενική αίματος και δικτυοερυθροκύτταρα 2) ταχύτητα καθίζησης ερυθρών 3) ανοσοφαινοτυπική ανάλυση περιφερικού αίματος (CD2, CD3, CD4, CD8, CD19, CD16, CD56, CD14, CD57, CD34, CD33, CD13, DR, στα λεμφοκύτταρα, μονοκύτταρα και ουδετερόφιλα), 4) βιοχημικές εξετάσεις (σάκχαρο, ουρία, κρεατινίνη, ασπαρτική τρανσαμινάση (SGOT), τρανσαμινάση της αλανίνης (SGPT), γGT, γαλακτική δευδρογενάση (LDH), αλκαλική φωσφατάση (ALP), φερριτίνη, B12, φυλλικό, ολικά λευκώματα, αλβουμίνη), 6) μυελόγραμμα για μορφολογική και ανοσοφαινοτυπική ανάλυση δείγματος μυελού των οστών 7) in vitro μελέτη της αιμοποίησης. Επιπλέον στην αρχή της μελέτης, πριν την έναρξη της θεραπείας, γινόταν έλεγχος με α) ακτινογραφία θώρακος, β) φυματινοαντίδραση Mantoux, γ) υπερηχογράφημα καρδιάς, δ) κυτταρογενετική ανάλυση δείγματος μυελού των οστών και οστεομυελική βιοψία, ε) ανοσολογικό έλεγχο (ποσοτικό προσδιορισμό ανοσοσφαιρινών IgG, IgM, IgA, κλάσματα του συμπληρώματος C3 και C4, C-αντιδρώσα πρωτεΐνη (CRP), ρευματοειδή παράγοντα (RF), αντισώματα ορού και συγκεκριμένα αντιπυρηνικά (ANA), αντιτοιχωματικά (PCA), αντιθυρεοειδικά αντισώματα έναντι θυρεοσφαιρίνης (Anti-Tg) και αντιμικροσωμακά (Anti-Ms), Άμεση Coombs).

Προκειμένου να γίνουν οι παραπάνω εξετάσεις, φλεβικό αίμα τοποθετούνταν σε αποστειρωμένα σωληνάρια με EDTA (για την γενική αίματος, Άμεση Coombs και ανοσοφαινοτυπική ανάλυση), αλλά και σε αποστειρωμένα σωληνάρια χωρίς αντιπηκτικό, όπου μετά το σχηματισμό θρόμβου (παραμονή σε θερμοκρασία δωματίου για 30 λεπτά), φυγοκεντρούνταν σε θερμοκρασία δωματίου για 15 λεπτά

στις 3500 στροφές το λεπτό. Με τον τρόπο αυτό λαμβανόταν ορός που χρησιμοποιούνταν για την μέτρηση των ήδη αναφερθέντων βιοχημικών και ανοσολογικών παραμέτρων.

Καθ'όλη τη διάρκεια της θεραπείας οι ασθενείς ελέγχονταν κλινικά αλλά και εργαστηριακά με γενική αίματος, επίχρισμα περιφερικού αίματος και βιοχημικά ανά δύο εβδομάδες. Όσοι παρουσίαζαν θρομβοπενία και/ή αναιμία λάμβαναν μεταγγίσεις αιμοπεταλίων και/ή ερυθρών ανάλογα με τις ανάγκες ώστε να διατηρούνται τα αιμοπετάλια πάνω από $10 \times 10^9/L$ και Hgb πάνω από 7 g/dl. (Σχήμα 6)

Από τους επιλεγμένους ασθενείς , 10 έλαβαν όλες τις προγραμματισμένες δόσεις ενώ δύο ασθενείς διέκοψαν την θεραπεία μετά την πρώτη δόση λόγω ανεπιθύμητων ενεργειών. Συγκεκριμένα ένας ασθενής ανέπτυξε ένα ήπιο δερματικό εξάνθημα, ενώ ένας άλλος εμφάνισε πυρετό αγνώστου αιτιολογίας χωρίς ουδετεροπενία. Τα λεπτομερή χαρακτηριστικά των ασθενών, που μπόρεσαν να ολοκληρώσουν τη θεραπεία, φαίνονται στον Πίνακα 6.



Σχήμα 6. Θεραπευτικό πρωτόκολλο

3. Κριτήρια κλινικής ανταπόκρισης

Η εκτίμηση της κλινικής ανταπόκρισης βασίστηκε σε ήδη δημοσιευμένα κριτήρια από τους Cheson et al [70]. Συγκεκριμένα στην παρούσα μελέτη ο στόχος ήταν η βελτίωση της αιματολογικής εικόνας των ασθενών και κατ'επέκταση της ποιότητας ζωής τους.

Σύμφωνα με τα παραπάνω κριτήρια, οποιαδήποτε βελτίωση στην αιματολογική εικόνα θα πρέπει να διαρκεί τουλάχιστον 2 μήνες, απουσία θεραπείας. Η ανταπόκριση στην ερυθρά σειρά ορίζεται ως πλήρης εφ'όσον σε ασθενείς με αιμοσφαιρίνη λιγότερη του 11 g/dl πριν τη θεραπεία επιτυγχάνεται αύξηση μεγαλύτερη των 2 g/dl, είτε σε ασθενείς που πριν τη θεραπεία ήταν εξαρτημένοι από τις μεταγγίσεις, μετά τη θεραπεία γίνονται ανεξάρτητοι από αυτές. Η ανταπόκριση στην ερυθρά σειρά ορίζεται ως μερική εφ'όσον παρατηρείται αύξηση της αιμοσφαιρίνης κατά 1-2 g/dl, είτε μείωση των αναγκών σε μεταγγίσεις κατά 50%.

Η ανταπόκριση στην μεγακαρουκυτταρική σειρά ορίζεται ως πλήρης όταν σε ασθενείς με τιμές αιμοπεταλίων προ θεραπείας μικρότερες των $100000/\text{mm}^3$ παρατηρείται αύξηση κατά $30000/\text{mm}^3$ ή περισσότερο, είτε όταν σε ασθενείς εξαρτημένους από μεταγγίσεις αιμοπεταλίων παρατηρείται σταθεροποίηση των τιμών των αιμοπεταλίων σε επίπεδα τέτοια που να μην απαιτούνται μεταγγίσεις. Η ανταπόκριση στην μεγακαρουκυτταρική σειρά ορίζεται ως μερική όταν παρατηρείται αύξηση της τιμής των αιμοπεταλίων κατά 50% με απόλυτη αύξηση μεγαλύτερη των $10000/\text{mm}^3$ αλλά μικρότερη των $30000/\text{mm}^3$.

Η ανταπόκριση στην κοκκιοκυτταρική σειρά ορίζεται ως πλήρης όταν σε απόλυτο αριθμό ουδετεροφίλων πριν την θεραπεία μικρότερο των $1500/\text{mm}^3$ παρατηρείται αύξηση κατά 100%, ή απόλυτη αύξηση του αριθμού των ουδετεροφίλων μεγαλύτερη από $500/\text{mm}^3$, όποιο είναι μεγαλύτερο. Η ανταπόκριση

ορίζεται ως μερική όταν παρατηρείται αύξηση του αριθμού των ουδετεροφίλων κατά 100% αλλά σε απόλυτο αριθμό μικρότερη των 500/mm³ .

4. Μυελός των οστών

Επιχρίσματα του μυελού των οστών των ασθενών εκτιμήθηκαν μορφολογικά μετά από χρώση May Grunwald-Giemsa.

Δείγματα μυελού των οστών που ελήφθησαν από την οπίσθια άνω λαγόνια άκανθα των ασθενών αραιώθηκαν σε Iscove's modified Dubecco's θρεπτικό υλικό (IMDM; GibcoBRL, Life Technologies, Palsley, Scotland), εμπλουτισμένο με 100IU/mL πενικιλίνη-στρεπτομυκίνη (PS; Gibco BRL, Life Technologies), 10% ορό εμβρύου βοός (FBS), 10% ίππειο ορό (HS), 10⁻⁶mol υδροκορτιζόνη (HSS, Hydrocortisone Sodium Succinate) και 10 IU/mL ηπαρίνη ελεύθερη συντηρητικών (Sigma, St Louis, MO) σε αναλογία 1:1. Τα αραιωμένα δείγματα του μυελού φυγοκεντρήθηκαν σε Histopaque 1077(Sigma, Aldrich Chemie, Gmbh, Germany, πυκνότητα 1,077g/cm³) στις 1800 στροφές το λεπτό για μισή ώρα, προκειμένου να διαχωρισθούν τα μονοπύρηνια κύτταρα (Bone Marrow Mononuclear Cells, BMMCs). Αφού απομονώσαμε τη στιβάδα των μονοπυρήνων κυττάρων του μυελού των οστών, τα πλύναμε με IMDM, και στη συνέχεια φτιάξαμε εναιώρημα κυττάρων σε IMDM εμπλουτισμένο όπως περιγράφεται παραπάνω.

Ο αριθμός και η βιωσιμότητα των κυττάρων εκτιμήθηκαν μετά από χρώση με κυανούν του τρυπανίου (trypan blue) σε πλάκα Neubauer. Η μέθοδος στηρίζεται στην αρχή ότι τα ζωντανά κύτταρα δεν προσλαμβάνουν την χρωστική, ενώ τα νεκρά κύτταρα την προσλαμβάνουν. Αναλυτικά, φτιάχτηκαν εναιωρήματα κυττάρων σε εμπλουτισμένο IMDM , όπως περιγράφηκε παραπάνω. Στη συνέχεια αναμίχθηκαν 10μl διαλύματος κυανούν του τρυπανίου 0,4% και 10μl του εναιωρήματος των

κυττάρων (συντελεστής διάλυσης =2). Τοποθετήσαμε την καλυπτρίδα στη θέση της και με μια πιπέτα Pasteur μεταφέραμε μικρή ποσότητα του διαλύματος στους δύο θαλάμους της πλάκας. Η πλήρωση των θαλάμων βασίστηκε στο τριχοειδικό φαινόμενο. Μετρήσαμε τα ζωντανά κύτταρα που βρίσκονταν στο κεντρικό τετράγωνο, το οποίο αντιπροσώπευε 10^{-4}cm^3 εφ'όσον είχε τοποθετηθεί η καλυπτρίδα. Ο αριθμός των κυττάρων που μετρήσαμε διπλασιάστηκε και το αποτέλεσμα αντιστοιχούσε σε αριθμό κυττάρων $\times 10^4/\text{ml}$.

4.1. Κυτταρογενετική ανάλυση μυελού των οστών

Η κυτταρογενετική ανάλυση πραγματοποιήθηκε είτε στο Ινστιτούτο Ερευνας της Αθήνας 'Δημόκριτος', είτε στο 'Αθηναϊκό Κέντρο Κυτταρογενετικής'. Η συμμετοχή στη μελέτη προϋπέθετε την ανάλυση τουλάχιστον 10 μεταφάσεων κυττάρων του μυελού των οστών. Προκειμένου να πραγματοποιηθεί καρυότυπος και κυτταρογενετική ανάλυση κατόπιν καλλιέργειας κυττάρων 24, 48, 72 και 96 ωρών, δείγματα μυελού των οστών των ασθενών συλλέχθηκαν σε αποστειρωμένα σωληνάκια με ηπαρίνη. Με βάση την κυτταρογενετική ανάλυση και την μορφολογική εκτίμηση του μυελού των οστών οι ασθενείς ταξινομήθηκαν στις τρεις ομάδες κινδύνου σύμφωνα με το Διεθνές Προγνωστικό Σύστημα Βαθμολόγησης (IPSS).

4.2. Απομόνωση των CD34⁺ κυττάρων

Τα CD34⁺ κύτταρα απομονώθηκαν από τα BMMCs με ανοσομαγνητικό διαχωρισμό (Magnetic activated cell sorting, MACS MS⁺ Miltenyi Biotec GmbH, Γερμανία) σύμφωνα με το πρωτόκολλο του κατασκευαστή.



Εικόνα 1: Σύστημα απομόνωσης MACS

Η απομόνωση των αιμοποιητικών προγονικών κυττάρων, με την μέθοδο αυτή, πραγματοποιείται με θετική επιλογή των κυττάρων που εκφράζουν το CD34. Τα κύτταρα αυτά συνδέονται με ένα πρωτογενές (primary) μονοκλωνικό αντίσωμα αντιCD34 συνδεδεμένο με παραμαγνητικά σφαιρίδια (MACS MicroBeads). Με τον τρόπο αυτό τα κύτταρα υφίστανται έμμεσα μαγνητική σήμανση και εμπλουτίζονται σε στήλες θετικής επιλογής μέσα στο μαγνητικό πεδίο του MiniMACS (μαγνήτες ειδικοί για το μέγεθος της χρησιμοποιούμενης στήλης). Οι στήλες έχουν υδρόφιλο περίβλημα που επιτρέπει την γρήγορη πλήρωσή τους και είναι διαθέσιμες σε διάφορα μεγέθη ανάλογα με την πυκνότητα του εναιωρήματος των κυττάρων που θέλει κανείς να απομονώσει. Τοποθετούνται ανάμεσα στους πόλους του μαγνήτη, πάνω από ένα σωληνάριο όπου συλλέγονται με την σειρά πρώτα τα μη σημασμένα κύτταρα και στην συνέχεια τα σημασμένα κύτταρα. Στην δική μας μελέτη χρησιμοποιήθηκαν στήλες MS οι οποίες μπορούν να επιλέξουν μέχρι 10^7 θετικά σημασμένα με μικροσφαιρίδια κύτταρα από ένα σύνολο μέχρι 1×10^8 κυττάρων. Το

χρησιμοποιούμενο ρυθμιστικό διάλυμα (MACS buffer) αποτελείται από PBS (phosphate buffered saline), συμπληρωμένο με 0,5% αλβουμίνη από βόειο ορό (BSA) και 0,6% ACD (acid-citrate-dextrose) στις ακόλουθες αναλογίες: 50ml ACD, 25ml BSA, 20ml NaHCO₃ και 405ml PBS. Τα μη σημασμένα κύτταρα εκλούνται ως αρνητικό κλάσμα. Τα θετικά σημασμένα κύτταρα εκλούνται εύκολα όταν απομαγνητιστεί η στήλη.

Αναλυτικά, εναιώρημα 10^8 μονοπύργων κυττάρων μυελού των οστών το μέγιστο, φυγοκεντρήθηκε για 8 λεπτά στις 1700 στροφές το λεπτό. Απομακρύνθηκε το υπερκείμενο και τα κύτταρα πλύθηκαν με το ρυθμιστικό διάλυμα που αναφέρεται παραπάνω και στη συνέχεια φυγοκεντρήθηκαν στις 1700 στροφές για 8 λεπτά στους 4°C. Η διαδικασία αυτή επαναλήφθηκε και για δεύτερη φορά. Τα κύτταρα αραιώθηκαν με ρυθμιστικό διάλυμα μέχρι του όγκου των 500μl. Στη συνέχεια προστέθηκε αφ' ενός 100μl αντιδραστηρίου A, το οποίο μπλοκάρει τον υποδοχέα Fc ώστε να αποφευχθεί η μη ειδική σύνδεση των αντιCD34 μικροσφαιριδίων σε κύτταρα που δεν είναι CD34⁺ και αφ' ετέρου 100μl αντιδραστηρίου B (αντιCD34 συνδεδεμένο με παραμαγνητικά μικροσφαιρίδια). Ακολούθησε επώαση για 30 λεπτά σε θερμοκρασία 4°C. Κατόπιν τα κύτταρα πλύθηκαν μια φορά με το ρυθμιστικό διάλυμα, φυγοκεντρήθηκαν στις 1700 στροφές το λεπτό για 8 λεπτά και αραιώθηκαν σε ρυθμιστικό διάλυμα μέχρι του όγκου των 500μl. Στη συνέχεια τα κύτταρα πέρασαν από τη στήλη. Ακολούθησε πλύσιμο της στήλης με 500μl ρυθμιστικό διάλυμα για 4 φορές, ώστε να εξασφαλιστεί η έκλυση όλων των μη σημασμένων κυττάρων σε ένα σωληνάριο. Κατόπιν η στήλη απομακρύνθηκε από τον μαγνήτη, τοποθετήθηκε πάνω από ένα καινούριο σωληνάριο και με σταθερή εφαρμογή πίεσης μέσω ενός κατάλληλου εμβόλου πλύθηκε με 1 ml ρυθμιστικό διάλυμα ώστε να απομακρυνθούν όλα τα μαγνητικώς σημασμένα κύτταρα. Η διαδικασία αυτή

επαναλήφθηκε για μια δεύτερη φορά ώστε να εξασφαλιστεί η μέγιστη δυνατή καθαρότητα του κλάσματος των CD34⁺ κυττάρων.

Σε κάθε πείραμα, η καθαρότητα των CD34⁺ κυττάρων ήταν μεγαλύτερη από 96% όπως εκτιμήθηκε με κυτταρομετρία ροής. Επίσης τα κύτταρα μετρούνταν σε πλάκα Neubauer όπως περιγράφηκε παραπάνω.

4.3. Εφεδρείες του μυελού σε προγονικά και πρόδρομα κύτταρα

Η κυτταρομετρία ροής χρησιμοποιήθηκε για την μέτρηση των CD34⁺ προγονικών κυττάρων του μυελού και τους υποπληθυσμούς τους. 1×10^6 BMMCs ανά σωληνάριο πλύθηκαν με ρυθμιστικό διάλυμα που περιείχε phosphate buffered saline (PBS)-1% ορό εμβρύου βοός (FBS; Gibco)-0.05% αζίδιο του νατρίου, φυγοκεντρήθηκαν στις 1600 στροφές το λεπτό για 7 λεπτά στους 4°C και επώαστηκαν για 10 λεπτά με ανθρώπινη γ-σφαιρίνη (Human antiglobulin, HAG) στον πάγο. Στη συνέχεια επώαστηκαν για 20 λεπτά με αντι-ανθρώπινο CD34 μονοκλωνικό αντίσωμα (mAb) συνδεδεμένο με φυκοερυθρίνη (PE) (QBEND-10; Beckman Coulter, Marseille France) και αντι-CD33 (D3HL60-251) ή αντι-CD71 (YDJ1.2.2) ή αντι-CD61 (SZ21) mAbs) συνδεδεμένα με ισοθειοκυανική φλουορεσκεΐνη (FITC) (Beckman Coulter). IgG αντισώματα μύος κατάλληλου ισότύπου συνδεδεμένα με PE- ή FITC χρησίμευσαν ως αρνητικοί μάρτυρες. Ακολούθως τα κύτταρα πλύθηκαν δύο φορές με το παραπάνω ρυθμιστικό διάλυμα και μονιμοποιήθηκαν σε 500 μL διαλύματος 2% παραφορμαλδεύδης (PFA; Sigma). Η ανάλυση έγινε σε 500000 γεγονότα χρησιμοποιώντας ένα κυτταρομετρητή ροής Epics Elite (Coulter, Miami, FL). Η εκτίμηση των CD34⁺/CD33⁺, CD34⁺/CD71⁺ και CD34⁺/CD61⁺, που αντιπροσωπεύουν τα δεσμευμένα προγονικά κύτταρα για την μυελική, ερυθρά και μεγακαρυοκυτταρική σειρά αντίστοιχα, πραγματοποιήθηκε στο

παράθυρο των κυττάρων με ιδιότητες χαμηλού ορθογώνιου (FSC) και χαμηλού πλάγιου σκεδασμού (SSC) [71].

Προκειμένου να μετρηθούν τα πρόδρομα κύτταρα της ερυθράς σειράς στο μυελό των οστών, δείγματα 100μl κυττάρων ολικού μυελού των οστών σημάνθηκαν είτε με μονοκλωνικό αντίσωμα μύος έναντι γλυκοφορίνης A (GlycoA)(11E4B7.6; Immunotech) συνδεδεμένο με φυκοερυθρίνη (PE) και με μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι του CD36 συνδεδεμένου με ισοθειοκυανική φλουορεσκεΐνη (FITC) (FA6.152; Immunotech), είτε με IgG μύος συνδεδεμένο με PE και με FITC και επώαστηκαν για 20 λεπτά σε πάγο. Μετά από δύο πλυσίματα όπως περιγράφηκε παραπάνω, πραγματοποιήθηκε λύση των ερυθρών με 0,12% φορμικό οξύ και μονιμοποίηση των κυττάρων σε 0.2% παραφορμαλδεύδη, χρησιμοποιώντας το σύστημα αντιδραστηρίων Q-prep (Coulter, Luton, England). Η συλλογή των δεδομένων έγινε όπως παραπάνω προκειμένου να ταυτοποιηθούν τα $CD36^+/GlycoA^+$ και $CD36^-/GlycoA^+$ πρώιμα και ώριμα πρόδρομα κύτταρα της ερυθράς σειράς, αντίστοιχα, στο παράθυρο των κυττάρων με ιδιότητες χαμηλού FSC και χαμηλού SSC [73, 74].

4.4. Μελέτη της απόπτωσης

Η κυτταρομετρία ροής και η χρώση με την 7-αμινο-ακτινομυκίνη (7AAD) χρησιμοποιήθηκε για την μελέτη της απόπτωσης στους υποπληθυσμούς των κυττάρων του μυελού των οστών.

Η 7-αμινο-ακτινομυκίνη D (7-amino-actinomycin-D, 7-AAD) είναι μια φθορίζουσα χρωστική (μέγιστο μήκος κύματος εκπομπής 660nm) με δυνατότητα πρόσδεσης στο DNA διπλής έλικας αποπτωτικών και νεκρών κυττάρων και συγκεκριμένα σε περιοχές πλούσιες σε γουανίνη-κυτοσίνη. Ο ακριβής τρόπος δράσης του δεν είναι γνωστός, φαίνεται όμως ότι η χρωστική εισέρχεται στο κύτταρο

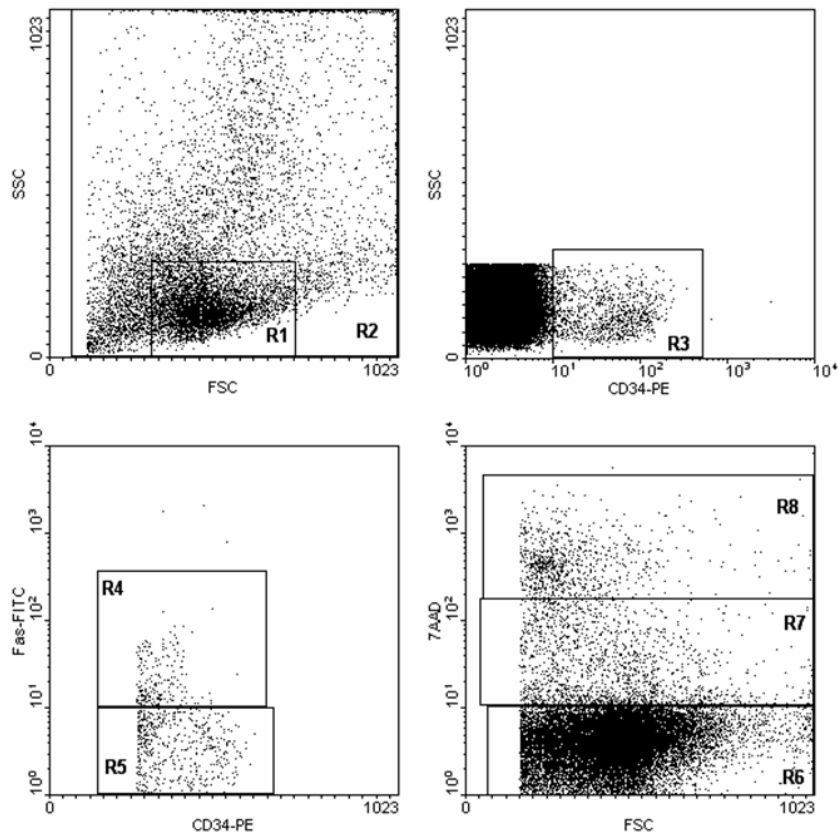
λόγω των αλλαγών που υφίσταται η κυτταρική μεμβράνη κατά την απόπτωση. Με την μέθοδο του 7-AAD μπορούμε να ξεχωρίσουμε τρεις κυτταρικούς πληθυσμούς, τα ζώντα κύτταρα (live) που δεν προσλαμβάνουν καθόλου την χρωστική (7-AAD negative), τα αποπτωτικά κύτταρα σε πρώιμη φάση (early apoptotic) που διατηρούν κάποια ακεραιότητα στην κυτταρική τους μεμβράνη (7-AAD dim) και τα αποπτωτικά σε όψιμη φάση και νεκρά κύτταρα (late apoptotic-dead) στα οποία έχει χαθεί εντελώς η ακεραιότητα της κυτταρικής μεμβράνης και η χρωστική έχει διεισδύσει πλήρως στα κύτταρα (7-AAD bright). Το μεγάλο πλεονέκτημα αυτής της τεχνικής είναι ότι εξ αιτίας του φάσματος εκπομπής της η χρωστική αυτή μπορεί να συνδυασθεί με φθορίζοντα μονοκλωνικά αντισώματα, όπως με αντισώματα συνδεδεμένα με φλουορεσκεΐνη (FITC) ή /και φυκοερυθρίνη (PE), επιτρέποντας έτσι την μελέτη της απόπτωσης σε συγκεκριμένους κυτταρικούς υποπληθυσμούς. Η τεχνική του 7-AAD είναι επίσης φθηνή και ταχεία, με μοναδικό ίσως μειονέκτημα την αναγκαιότητα ανάλυσης των δειγμάτων εντός μιας ώρας από της προσθήκης της χρωστικής, ακριβώς λόγω της προοδευτικής βλάβης της μεμβράνης και αύξησης της σύνδεσης της χρωστικής στο DNA [75].

Για την μελέτη της απόπτωσης στον υποπληθυσμό των CD34⁺, δείγματα 1x10⁶ μονοπύρηνων κυττάρων του μυελού των οστών σημασμένα με τα μονοκλωνικά αντισώματα αντι-CD34-PE (QBEND-10; Immunotech, Marseille, France) και με αντι-Fas-FITC (CD95) (LOB 3/17; Serotec, UK) με τον τρόπο που περιγράφεται παραπάνω, πλύθηκαν δύο φορές με το ρυθμιστικό διάλυμα και φυγοκεντρήθηκαν. Απομακρύναμε το υπερκείμενο και προσθέσαμε 400μl PBS και 100 μL 7AAD (200μg/ml)(7AAD; Calbiochem-Novabiochem, La Jolla, CA). Στη συνέχεια επώαστηκαν σε πάγο για 15 λεπτά προστατευμένα από το φως. Ακολούθησε φυγοκέντρηση, απομάκρυνση του υπερκειμένου, χωρίς να μεσολαβεί πλύσιμο και

τελικά μονιμοποίηση σε 500μl 2% παραφορμαλδεύδη Ως αρνητικό control χρησιμοποιήθηκαν τα μονιμοποιημένα με παραφορμαλδεύδη κύτταρα χωρίς 7AAD. Η ανοσοφαινοτυπική ανάλυση πραγματοποιήθηκε εντός 30 λεπτών από την μονιμοποίηση των κυττάρων που είχαν σημανθεί με 7AAD, χρησιμοποιώντας 5 παραμέτρους: FSC, SSC και ανοσοφθορισμό τριών φθοριοχρωμάτων από FITC, PE, 7AAD. Η αλληλοεπικάλυψη ενός φθορισμού με τους ανιχνευτές του άλλου αντιρροπούνταν ηλεκτρονικά λαμβάνοντας υπόψιν τον φθορισμό που είχαν κύτταρα σημασμένα μόνο με ένα μονοκλωνικό αντίσωμα συνδεδεμένο με ένα φθοριόχρωμα ή με 7AAD.

Η ανάλυση έγινε ως εξής : Φτιάχτηκε ένα νεφελόγραμμα από τη συσχέτιση πλάγιου σκεδασμού και CD34 φθορισμού στο παράθυρο των κυττάρων με ιδιότητες χαμηλού FSC και SSC και ένα δεύτερο νεφελόγραμμα από τη συσχέτιση φθορισμού CD34 και Fas στο παράθυρο των CD34⁺ κυττάρων. Τέλος φτιάχτηκε ένα διάγραμμα από την συσχέτιση FSC με φθορισμό 7AAD προκειμένου να μετρηθούν τα 7AAD-αρνητικά (ζωντανά), -ασθενώς θετικά (αποπτωτικά σε πρώιμη φάση), και -ισχυρά θετικά (αποπτωτικά σε όψιμη φάση και νεκρά) κύτταρα στο μη περιφραγμένο κλάσμα (ολικά κύτταρα μυελού των οστών), στο παράθυρο των CD34⁺ κυττάρων και στο παράθυρο των ολικών κυττάρων του μυελού από το οποίο έχουν εξαιρεθεί τα CD34⁺ κύτταρα. (Εικόνα 2)

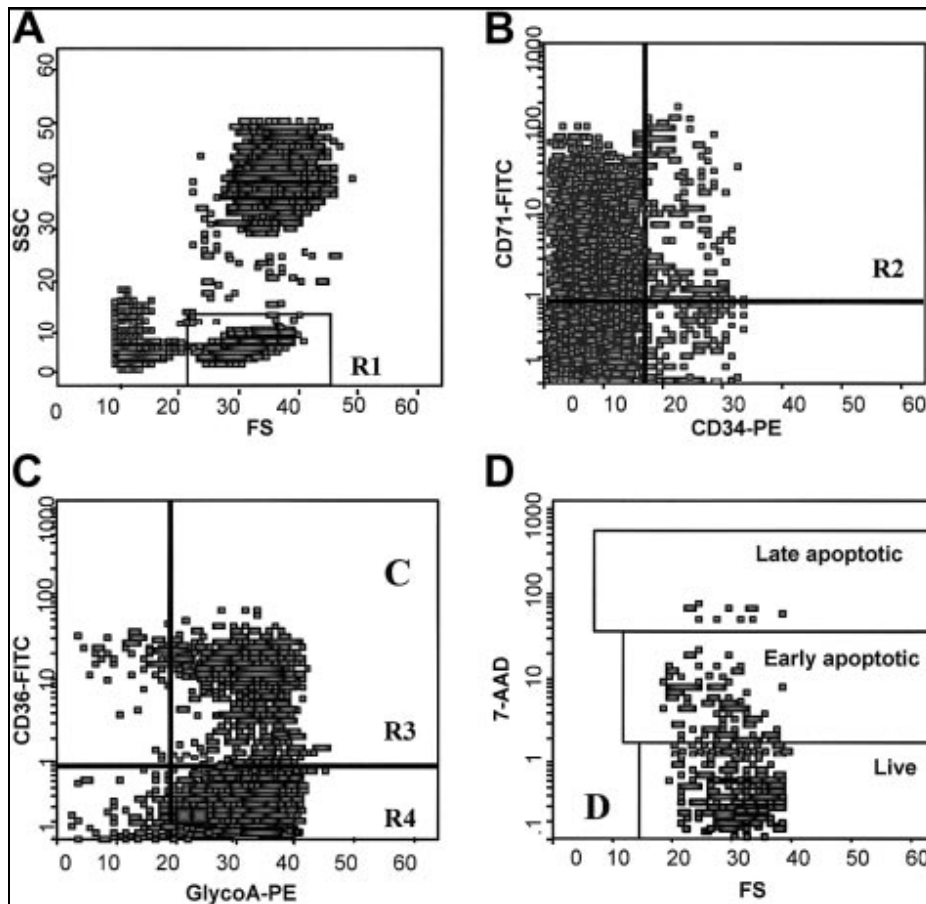
Figure 1



Εικόνα 2. Ανάλυση με κυτταρομετρία ροής των κυττάρων του μυελού των οστών. (Α) Διάγραμμα του FSC προς SSC, ώστε να απομονωθούν τα μονοπύρρηνα κύτταρα του μυελού των οστών (BMMCs, με ιδιότητες χαμηλού FSC και χαμηλού SSC) (R1). **(Β)** Διάγραμμα αντι-CD34 φθορισμού έναντι SSC περιγεγραμμένο στο R1, ώστε να απομονωθούν τα CD34⁺ κύτταρα. **(Γ)** Διάγραμμα του αντι-CD34 έναντι του αντι-Fas φθορισμού περιγεγραμμένου στο R3, ώστε να αναδειχθούν τα Fas⁺ (R4) και τα Fas⁻ (R5) CD34⁺ κύτταρα. **(Δ)** Διάγραμμα του FSC έναντι 7AAD φθορισμού περιγεγραμμένου στο σύνολο των κυττάρων του μυελού των οστών (R2), που δείχνει τα ζώντα (R6), πρώιμα και όψιμα αποπτωτικά κύτταρα (R7 και R8 αντίστοιχα). Παρόμοια διαγράμματα περιγράφηκαν στα CD34⁺ (R3), στο σύνολο των κυττάρων του μυελού των οστών αν εξαιρεθούν τα CD34⁺ κύτταρα (R2 μείον R1), στα CD34⁺/Fas⁺ (R3 συν R4) και CD34⁺/Fas⁻ (R3 συν R5) κύτταρα.

Για την μελέτη της απόπτωσης στους υποπληθυσμούς των κυττάρων της ερυθράς σειράς, ακολουθήθηκε η παρακάτω διαδικασία: δείγματα πλύθηκαν δύο φορές με ρυθμιστικό διάλυμα που περιείχε PBS-1%FCS-0.05% αζίδιο και επώαστηκαν με 40μl ανθρώπινη γ-σφαιρίνη για 10 λεπτά στον πάγο. Τα κύτταρα στη συνέχεια σημάνθηκαν είτε με ανθρώπινο αντιCD34 μονοκλωνικό αντίσωμα μύς συνδεδεμένο με φυκοερυθρίνη (PE) (Q-BEND 10; Immunotech, Marseille , France), είτε με το μονοκλωνικό αντίσωμα μύς έναντι ανθρώπινου υποδοχέα έναντι τρανσφερρίνης, το CD71, συνδεδεμένο με ισοθειοκυανική φλουορεσκεΐνη (FITC) (YDJ1.2.2; Immunotech) είτε με PE-συνδεδεμένη αντιανθρώπινη γλυκοφορίνη A (glyco A) μύς είτε με FITC-συνδεδεμένο μονοκλωνικό αντίσωμα μύς έναντι ανθρώπινου CD36 (FA6.152) και επώαστηκαν για 20 λεπτά στον πάγο. Μετά από δύο πλυσίματα με το ρυθμιστικό διάλυμα που ήδη έχει περιγραφεί και πριν την μονιμοποίηση, τα κύτταρα σημάνθηκαν επιπλέον με 100μl 7AAD . Στη συνέχεια αραιώθηκαν σε 0,5ml PBS και επώαστηκαν για 15 λεπτά στον πάγο, προστατευμένα από το φως. Μετά την φυγοκέντρηση το υπερκείμενο απομακρύνθηκε και πραγματοποιήθηκε λύση των ερυθρών με 0,12% φορμικό οξύ και μονιμοποίηση των κυττάρων σε 0.2% παραφορμαλδεύδη, χρησιμοποιώντας το σύστημα αντιδραστηρίων Q-prep (Coulter, Luton, England). Κύτταρα μονιμοποιημένα και σημασμένα με ιστοτυπικό αντίσωμα ελέγχου αλλά όχι 7AAD χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρες.

Η μέτρηση των ζωντανών, πρώιμων και όψιμων αποπτωτικών κυττάρων πραγματοποιήθηκε στα παράθυρα των $CD34^+/CD71^+$, $CD36^+/GlycoA^+$, $CD36^-/GlycoA^+$ κυτταρικών πληθυσμών. (Εικόνα 3)



Εικόνα 3: Ανάλυση με κυταρομετρία ροής των κυττάρων της ερυθράς σειράς του μυελού των οστών. (A) Νεφελόγραμμα FSC προς SSC σκεδασμό, ώστε να απομονωθούν τα κύτταρα με ιδιότητες χαμηλού FSC και SSC, όπου περιλαμβάνονται και τα κύτταρα της ερυθράς σειράς (R1). (B) Νεφελόγραμμα του αντι-CD34 φθορισμού έναντι του αντι-CD71 στο παράθυρο R1, ώστε να απομονωθούν τα CD34⁺/CD71⁺ προγονικά κύτταρα της ερυθράς σειράς (R2) (C) Νεφελόγραμμα του αντι-glycoA φθορισμού έναντι του αντι-CD36 φθορισμού στο παράθυρο R1, ώστε να απομονωθούν τα CD36⁺/glycoA⁺ (R3) και τα CD36⁻/glycoA⁺ κύτταρα (R4) που αντιπροσωπεύουν τις πρώιμες και όψιμες πρόδρομες μορφές της ερυθράς σειράς αντίστοιχα. (Δ) Νεφελόγραμμα FSC έναντι 7AAD φθορισμού στο παράθυρο R2, που δείχνει τα 7AAD^{bright} (όψιμα αποπτωτικά), 7AAD^{dim} (πρώιμα αποπτωτικά) και τα 7AAD⁻ (ζωντανά) κύτταρα.

Αφού σχεδιάστηκε η περιοχή (παράθυρο) των κυττάρων με ιδιότητες χαμηλού FSC και χαμηλού SSC, όπου περιλαμβάνονται μεταξύ άλλων οι προγονικές και οι

πρόδρομες μορφές της ερυθράς σειράς, φτιάχτηκαν δύο νεφελογράμματα από την συσχέτιση του φθορισμού του CD34 με τον φθορισμό του CD71 και του glycoA με αυτόν του CD36. Τέλος φτιάχτηκε ένα νεφελόγραμμα από την συσχέτιση του FSC με τον φθορισμό του 7AAD, ώστε να μετρηθούν τα 7AAD-αρνητικά (ζωντανά), -ασθενώς θετικά (πρώιμα αποπτωτικά) και -ζωηρά θετικά (όψιμα αποπτωτικά) κύτταρα στα παράθυρα των $CD34^+/CD71^+$, $CD36^+/glycoA^+$, $CD36^-/glycoA^+$ [45, 73]

4.5 Κλωνογονικές μέθοδοι

4.5.1. LTC-ICs

Χρησιμοποιήθηκε μια μέθοδος περιοριστικής αραίωσης για την μέτρηση των LTC-ICs (κύτταρα που δίνουν γένεση σε μακρόχρονες καλλιέργειες κυττάρων) μέσα στο κλάσμα των $CD34^+$ κυττάρων. Επτά αραιώσεις ενός εναιωρήματος $CD34^+$ κυττάρων εναποτέθηκαν σε προσχηματισμένο τάπητα από MS-5 στρωματικά κύτταρα ποντικού σε συγκεντρώσεις που κυμαίνονται από 10 μέχρι 1000 κύτταρα ανά βοθρίο σε καλλιεργητικές πλάκες με 96 βοθρία .

Τα MS-5 στρωματικά κύτταρα ποντικού επωάζονται στους 37°C σε υγρό επωαστικό κλίβανο με $5\%\text{CO}_2$ και κατά διαστήματα ανακαλλιεργούνται. Αναλυτικά, προκειμένου να φτιαχτεί ο τάπητας που θα χρησίμευε ως στρώμα για την ανάπτυξη των προγονικών κυττάρων στο πείραμά μας, τα MS5 αποκολλήθηκαν από την φλάσκα με την προσθήκη 5-10ml τρυψίνης αραιωμένης 1:10 σε διάλυμα RPMI χωρίς ορό με πενικιλίνη, στρεπτομυκίνη και γλουταμίνη (R[-]) ανά 75cm^3 φλάσκα. Στη συνέχεια φτιάξαμε ένα εναιώρημα κυττάρων σε 30ml θρεπτικό υλικό που αποτελούνταν από RPMI1640, 10% ορό εμβρύου βοός (FCS), 10% ίππειο ορό (HS), πενικιλίνη, στρεπτομυκίνη, γλουταμίνη. Παράλληλα ανά ασθενή χρησιμοποιήσαμε ένα σετ 7 καλλιεργητικών πλακών των 96 βοθρίων. Προσθέσαμε 100μl

αποστειρωμένο νερό στα εξωτερικά βοθρία χρησιμοποιώντας ένα άκρο 5ml στην πιπέτα (36 βοθρία). Στη συνέχεια προετοιμάσαμε τη ζελατίνη, αραιώνοντας σε αναλογία 1: 4 με R[-] διάλυμα και αναμιγνύοντάς την καλά. Προσθέσαμε 100μl δείγμα από το διάλυμα της ζελατίνης σε κάθε βοθρίο σε τρεις σειρές των 10 βοθρίων (από τις 8 σειρές που έχει κάθε καλλιεργητική πλάκα A-H, στις C, E, G, 30 βοθρία ανά ασθενή και πλάκα, συνολικά 210 βοθρία ανά ασθενή). Ακολούθως αφαιρέσαμε τη ζελατίνη με πιπέτα 1000ml gilson, προσθέσαμε 100μl MS5 ανά βοθρίο και επώασαμε μια νύχτα στους 37°C.

Την επόμενη μέρα υπολογίσαμε τον όγκο εναιωρήματος CD34⁺ κυττάρων του ασθενούς που θα περιείχε $0,11 \times 10^6$ κύτταρα, το φυγοκεντρήσαμε και αραιώσαμε τα κύτταρα σε 11ml IMDM-340. Φτιάξαμε 7 διαφορετικές αραιώσεις των CD34⁺ κυττάρων ώστε ο τελικός όγκος κάθε διαλύματος να είναι 4ml. Συγκεκριμένα στο πρώτο σωληνάριο τοποθετήθηκαν 4 ml εναιωρήματος κυττάρων, στο δεύτερο αναμίχθηκαν 3 ml εναιωρήματος κυττάρων και 1 ml θρεπτικό υλικό, στο τρίτο σωληνάριο 2 ml εναιωρήματος κυττάρων και 2 ml θρεπτικό υλικό, στο τέταρτο σωληνάριο 800 μl εναιωρήματος κυττάρων και 3,2 ml θρεπτικό υλικό, στο πέμπτο σωληνάριο 400μl εναιωρήματος κυττάρων και 3,6 ml θρεπτικό υλικό, στο έκτο σωληνάριο 80μl κύτταρα και 3,92 ml θρεπτικό υλικό και στο έβδομο σωληνάριο 40 μl εναιωρήματος κυττάρων και 3,96 ml θρεπτικό υλικό. Ανακατέψαμε πολύ καλά τα σωληνάρια και με επαναληπτική πιπέτα, αρχίζοντας από την τελευταία πλάκα, βάλαμε 100 μl ανά βοθρίο. Επώασαμε τις πλάκες στους 33°C σε 5%CO₂.

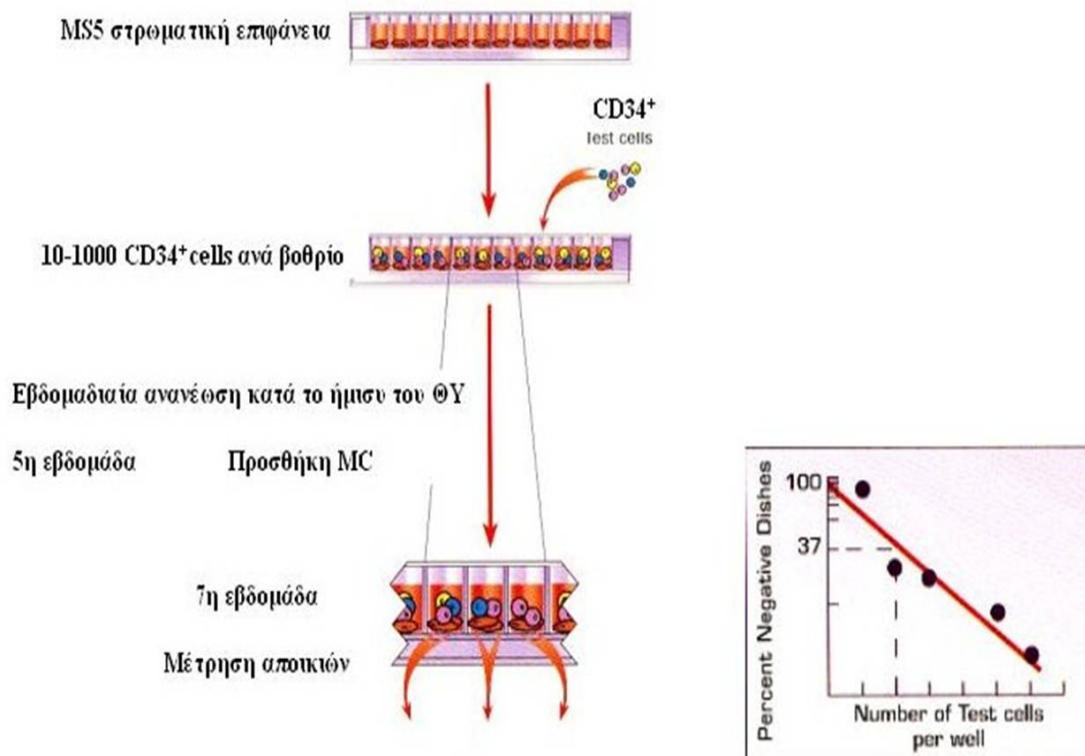
Ανά εβδομάδα γινόταν αλλαγή του μισού θρεπτικού υλικού της καλλιέργειας με νέο θρεπτικό υλικό της ίδιας σύνθεσης με το προηγούμενο. Πέντε εβδομάδες μετά αναμίξαμε μεθυλοκυτταρίνη (0.9%) (StemCell Technologies Inc, Vancouver, Canada) μαζί με καλλιεργητικό μέσο (IMDM απλό) συμπληρωμένο με αυξητικούς

παράγοντες: συγκεκριμένα σε 1 ml IMDM, 5ng αυξητικό παράγοντα μονοκυττάρων-κοκκιοκυττάρων (GM-CSF; R&D Systems, Minneapolis, MN), 50ng ιντερλευκίνης-3 (IL-3; R&D Systems) και 2 IU ερυθροποιητίνη (Janssen-Ciliag, Athens, Greece) [71]

Συγκεκριμένα είχαμε προπαρασκευάσει μίγμα μεθυλοκυτταρίνης σε δείγματα 2,4ml που φυλάσσονταν στους -20°C σε σωληνάρια. Σε κάθε συσκευασία μεθυλοκυτταρίνης (4100) 40ml, προσθέταμε 30ml FCS, 10ml BSA (4°C), 1ml διτανθρακικά, 1 ml L-γλουταμίνης, 100μl β-μερκαπτοαιθανόλης αραιωμένης σε αναλογία 1:10 με θρεπτικό υλικό IMDM . Ανακατεύαμε πολύ καλά για να μην υπάρχουν φυσαλίδες, αφού το φιλτράραμε με φίλτρο σύριγγας $0,22\mu\text{m}$. Μοιράσαμε με σύριγγα 2,4ml του μίγματος σε κάθε σωληνάριο. Σε κάθε τέτοιο σωληνάριο προσθέταμε τους αυξητικούς παράγοντες (45μl) και 600μl IMDM

Οι καλλιεργητικές πλάκες φυγοκεντρήθηκαν για 13 λεπτά στις 800 στροφές το λεπτό στους 20°C . Αφαιρέθηκε προσεκτικά το υπερκείμενο και προστέθηκε με σύριγγα ινσουλίνης και βελόνα 19G 100μl μίγματος μεθυλοκυτταρίνης και καλλιεργητικού μέσου με τους αυξητικούς παράγοντες ανά βοθρίο. Οι πλάκες επώαστηκαν για 14 μέρες σε υγρό επωαστικό κλίβανο στους 37°C και σε 5% CO_2 . Τέλος μετρήθηκαν οι σχηματιζόμενες αποικίες στο μικροσκόπιο. (Σχήμα 7).

Η συχνότητα των LTC-ICs υπολογίστηκε καθορίζοντας την αραιώση εκείνη των CD34+ κυττάρων που δίνει λιγότερο από 37% μικροβοθρία αρνητικά για αποικίες [76].



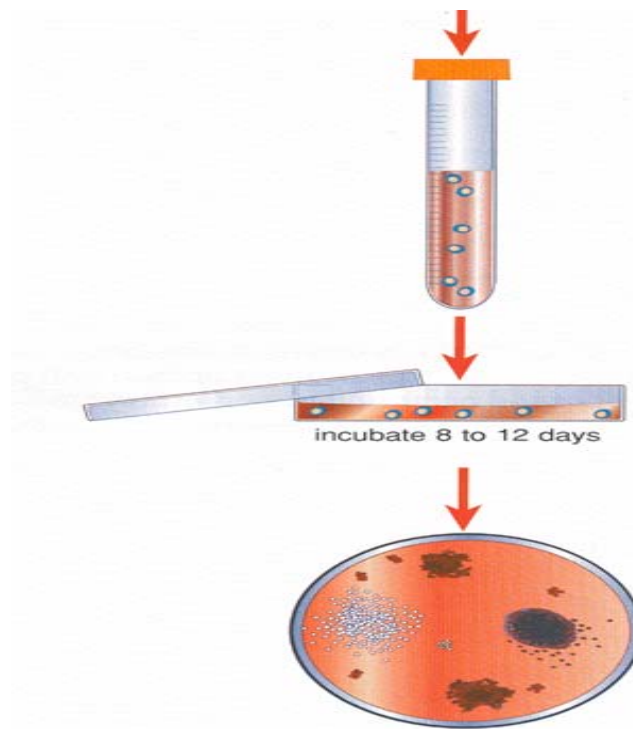
Σχήμα 7: Long-term culture initiating cells (LTC-ICs)

4.5.2 Αποικίες της ερυθράς και της κοκκιώδους σειράς.

Προκειμένου να μετρήσουμε τις αποικίες της ερυθράς και της κοκκιώδους σειράς (βραχύχρονες καλλιέργειες) καλλιεργήσαμε 10^5 BMMCs ή 3×10^3 κεκαθαρμένα $CD34^+$ κύτταρα, αντίστοιχα, σε τρυβλία Petri 35mm σε 1ml καλλιεργητικό μέσο IMDM με 0.9% μεθυλοκυτταρίνη (Stem cell Technologies, Vancouver, BC, Canada) συμπληρωμένο με 30% FBS, 1% αλβουμίνη ορού βοός (Gibco), 10^{-4} M μερκαπτοαιθανόλη (Sigma), 0.075% διττανθρακικό νάτριο (Gibco), 2mM L-γλουταμίνη (Sigma) και με αυξητικούς παράγοντες 5ng GM-CSF, 50ng IL-3, και 2 IU EPO.

Για κάθε ασθενή φτιάξαμε δύο τρυβλία Petri τα οποία τοποθετήθηκαν μαζί με ένα τρίτο τρυβλίο Petri που περιείχε 3 ml απεσταγμένο νερό σε ένα μεγαλύτερο τρυβλίο, το οποίο καλύφθηκε και στη συνέχεια τοποθετήθηκε στον κλίβανο. Μετά

από επώαση 14 ημερών στους 37°C σε υγρό επωαστικό κλίβανο με 5%CO₂ οι αποικίες μετρήθηκαν και ταξινομήθηκαν ως αποικίες της ερυθράς σειράς (Burst Forming Units erythroid, BFU-E), της κοκκιώδους σειράς (Colony Forming Units granulocyte, CFU-G), της μονοκυτταρικής σειράς (Colony Forming Units monocyte, CFU-M) και διδύναμες της κοκκιώδους και μονοκυτταρικής σειράς (Colony Forming Units granulocyte/monocyte, CFU-GM). Τα αποτελέσματα τελικά εκφράστηκαν ως BFU-E και ολικό CFU-GM (CFU-G και CFU-M και CFU-GM) ενώ το σύνολο χαρακτηρίστηκε ως κύτταρα που σχηματίζουν αποικίες in vitro (Colony Forming Cells, CFCs). (Σχήμα 8)



Σχήμα 8: Βραχύχρονες καλλιέργειες ερυθράς και κοκκιώδους σειράς, σε τρυβλία Petri για 14 μέρες

Για τις βραχύχρονες καλλιέργειες χρησιμοποιήσαμε προπαρασκευασμένο μίγμα μεθυλοκυτταρίνης σε δείγματα 2,4μl που φυλάσσονταν στους -20°C σε σωληνάρια, όπως περιγράφεται αναλυτικά παραπάνω. Σε κάθε τέτοιο σωληνάριο

προσθέταμε 3×10^5 BMMCs ή 10^4 CD34⁺ κύτταρα αραιωμένα σε IMDM ώστε να φτάνουν σε συγκέντρωση τα 600μl. Από κάθε τέτοιο σωληνάριο μίγματος μεθυλοκυτταρίνης φτιάχναμε δύο τρυβλία Petri 35mm.

4.5.3. Αποικίες της μεγακαρυοκυτταρικής σειράς

Προκειμένου να μετρήσουμε τις προβαθμίδες της μεγακαρυοκυτταρικής σειράς (Colony Forming Units megakaryocyte, CFU-Meg) καλλιεργήσαμε 0.5×10^6 μονοπύρηννα αιμοποιητικά κύτταρα ή 2.5×10^4 κεκαθαρμένα CD34⁺ ανά τρυβλίο σε διπλά ειδικά τρυβλία (double chamber slide), χρησιμοποιώντας ένα καλλιεργητικό σύστημα διαθέσιμο στο εμπόριο (MegaCult-C StemCell Technologies Inc, Vancouver, Canada), όπως έχει ήδη περιγραφεί από τους Cox et al [77]. Το Megacult-C είναι ένα σύστημα βασισμένο στο κολλαγόνο, το οποίο είναι κατάλληλο για την άριστη ανάδειξη των προγονικών κυττάρων των μεγακαρυοκυττάρων από εναιωρήματα κυττάρων από CD34⁺ μυελικά κύτταρα ή μονοπύρηννα μυελικά κύτταρα. Το κολλαγόνο μπορεί εύκολα να αφυδατωθεί και στην συνέχεια να χρησιμοποιηθεί για ανοσοϊστοχημική χρώση με διατήρηση της μορφολογίας των κυττάρων. Περιέχει επίσης ένα καθορισμένο υποκατάστατο ορού το οποίο ελαχιστοποιεί τις ανασταλτικές δράσεις παραγόντων όπως ο TGF-β1 που μπορούν να βρεθούν στον ορό και επιπρόσθετα περιέχει ανασυνδυασμένες ανθρώπινες κυτταροκίνες IL-3, IL-6 και TPO. Προκειμένου να χρησιμοποιηθεί ως καλλιεργητικό μέσο εμπλουτίζεται περαιτέρω με 1.1 ng/mL κολλαγόνο, 1% αλβουμίνη βόειου ορού (BSA), 0.01mg/mL ινσουλίνη βόειου παγκρέατος, 0.2 mg/mL ανθρώπινη τρανσφερρίνη (κορεσμένη με σίδηρο), 50ng/mL θρομβοποιητίνη, 10 ng/mL IL-3 και 10 ng/mL IL-6, σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

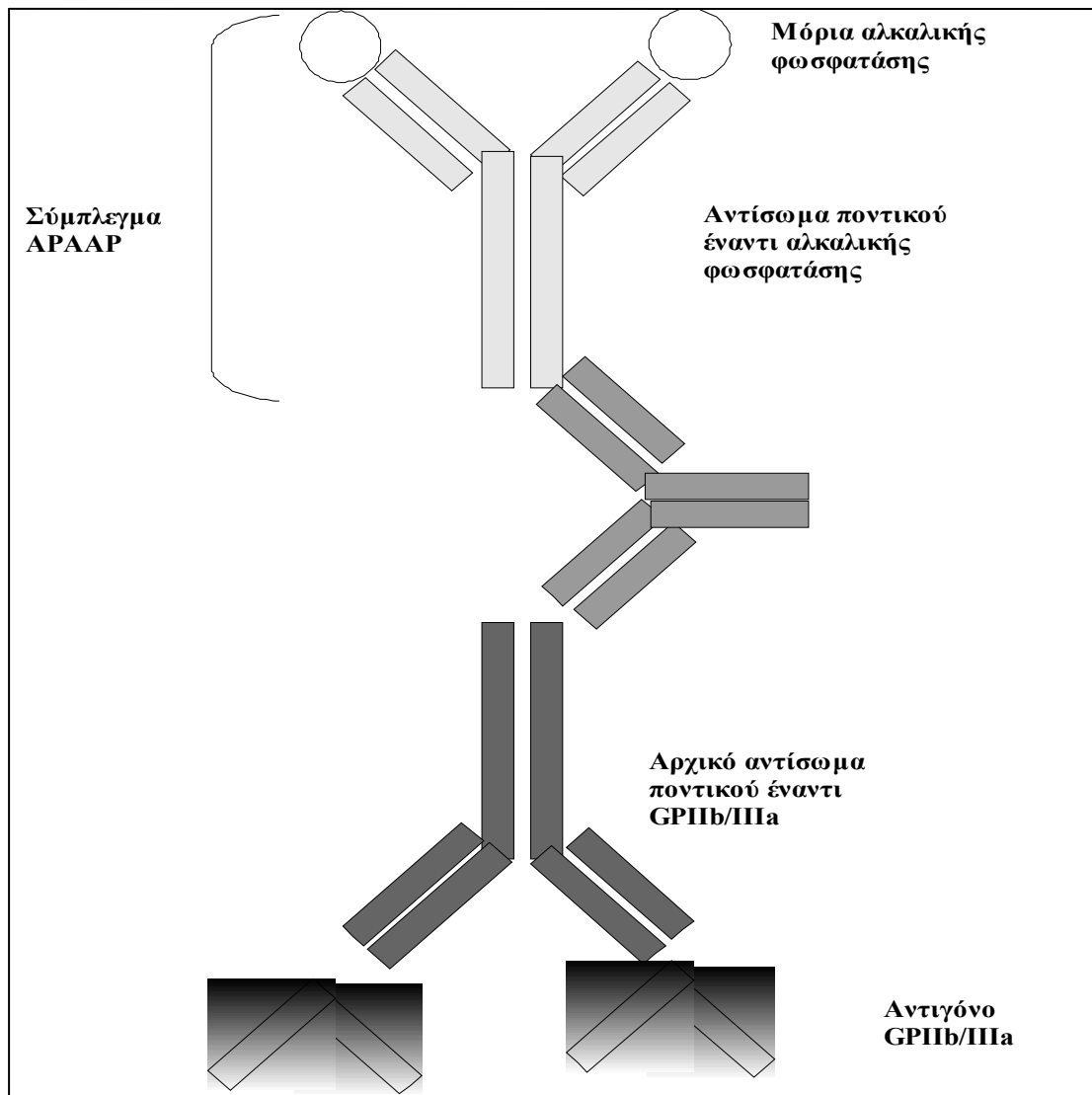
Συγκεκριμένα το καλλιεργητικό μέσο αποψύχθηκε από τους -20°C σε θερμοκρασία δωματίου και μοιράστηκε σε δύο σωληνάρια για να τοποθετηθεί στη συνέχεια ξανά στον πάγο. Τοποθετήσαμε τα διπλά ειδικά τρυβλία σε ένα τρυβλίο Petri διαμέτρου 100mm μαζί με ένα ανοιχτό μικρότερο τρυβλίο διαμέτρου 35mm. Πλώναμε 1×10^6 BMMCs σε IMDM, αφαιρέσαμε το υπερκείμενο και προσθέσαμε 50μl IMDM. Με μια αποστειρωμένη πιπέτα 2ml, μεταφέραμε το ειδικό καλλιεργητικό μέσο στο σωληνάριο με τα κύτταρα μέχρι τελικής συγκέντρωσης 1,6ml και τα αναμίξαμε πολύ καλά. Με την ίδια πιπέτα μεταφέραμε το μίγμα στα δύο διαμερίσματα του καλλιεργητικού τρυβλίου, φροντίζοντας να απλωθεί σε όλη την επιφάνεια των διαμερισμάτων. Αφαιρέσαμε προσεκτικά τις φυσαλίδες και προσθέσαμε 3ml απεσταγμένο νερό στο ανοιχτό τρυβλίο Petri. Οι πλάκες μεταφέρθηκαν στον κλίβανο στους 37°C . Μία ώρα μετά είχε σχηματιστεί γέλη. Οι πλάκες επώαστηκαν 10-12 ημέρες στους 37°C σε υγρό επωαστικό κλίβανο με 5%CO₂ και στη συνέχεια αποξηράνθηκαν, μονιμοποιήθηκαν για 20 λεπτά με 1:3 μεθανόλη/ακετόνη και αποθηκεύθηκαν τυλιγμένες σε αλουμινόχαρτο μέχρι ένα μήνα στους 4°C .

Οι μεγακαρυοκυτταρικές αποικίες μετρήθηκαν μετά από μονιμοποίηση και χρώση των καλλιεργητικών πλακών με μονοκλωνικό αντίσωμα ποντικού έναντι ανθρώπινου CD41 (GPIIb/IIIa)(5B12; Dako, Glostrup, Denmark) με την μέθοδο αλκαλικής φωσφατάσης αντι-αλκαλικής φωσφατάσης (APAAP).

Η τεχνική της APAAP αποτελεί διαδικασία τριών σταδίων. Στο πρώτο στάδιο το αρχικό αντίσωμα, το οποίο είναι ένα μονοκλωνικό anti-human GPIIb/IIIa αντίσωμα ποντικού, αναγνωρίζει το κυτταρικό αντιγόνο GPIIb/IIIa και συνδέεται μαζί του. Στην συνέχεια το αρχικό αντίσωμα αναγνωρίζεται από ένα μονοκλωνικό αντίσωμα κουνελιού (anti-mouse), σε ένα δεύτερο στάδιο επώασης. Το τελευταίο

αντίσωμα χρησιμοποιείται σε περίσσεια έτσι ώστε να εξασφαλισθεί ότι μόνο η μία από τις δύο Fab θέσεις του θα συνδεθεί με το αρχικό αντίσωμα αφήνοντας την άλλη θέση διαθέσιμη για τη σύνδεση του αντισώματος με το ανοσοενζυμικό σύμπλεγμα της αλκαλικής φωσφατάσης, αντι-αλκαλικής φωσφατάσης (APAAP complexes). Το σύμπλεγμα APAAP αποτελείται από δύο μόρια αλκαλικής φωσφατάσης και ένα αντίσωμα. Το στάδιο αυτό αποτελεί το τρίτο στάδιο της διαδικασίας. Η επανάληψη της διαδικασίας σύνδεσης του αντισώματος έναντι του αντισώματος του ποντικίου και του συμπλέγματος APAAP προκαλεί μια αξιοσημείωτη αύξηση του ποσού της αλκαλικής φωσφατάσης που ενώνεται με αποτέλεσμα την αύξηση της έντασης της τελικής αντίδρασης. Η αντίδραση του ενζύμου της αλκαλικής φωσφατάσης αναπτύσσεται σε αζωτούχο -αναγωγικό κυτταροχημικό υπόστρωμα στο οποίο το Fast red είναι με τη μορφή διαζωτούχου άλατος. Το αποτέλεσμα της αντίδρασης αυτής είναι ένα ζωηρό κόκκινο χρώμα με το οποίο χρωματίζονται τα GPIIb/IIIa θετικά κύτταρα, και το οποίο δημιουργεί αντίθεση με τη χρώση της αιματοξυλίνης με την οποία χρωματίζονται τα GPIIb/IIIa αρνητικά κύτταρα, με αποτέλεσμα τα GPIIb/IIIa θετικά να γίνονται εύκολα ορατά κάτω από το οπτικό μικροσκόπιο (Σχήμα 9).

Συγκεκριμένα, οι πλάκες έμειναν σε θερμοκρασία δωματίου για 30 λεπτά και μονιμοποιήθηκαν για 80 δευτερόλεπτα. Οι πλάκες πλύθηκαν σε κάθε ένα από τα παραπάνω στάδια με TBS (0,05M Tris/NaCl pH 7.6). Το αντίσωμα ποντικού έναντι ανθρώπινου GPIIb/IIIa (CD41) αραιώθηκε κατά 1:5 σε TBS και προστέθηκε για 30 λεπτά. Το αντίσωμα κουνελιού έναντι του αντισώματος μύος (αραιώση 1:10 TBS) με 4% φυσιολογικό ανθρώπινο ορό και η χρωστική APAAP (αραιώση 1:10 TBS) προστέθηκαν για 30 λεπτά και αυτές οι επωάσεις επαναλήφθηκαν για 10 λεπτά η κάθε μια. Ετοιμάσαμε ένα διάλυμα υποστρώματος με 100mg ASN Napthol Mix



Σχήμα 9: Σχηματική απεικόνιση των σταδίων της APAAP

phosphate (Sigma), 200μl NN-Dimethylphormamide (Sigma), 9,8ml ρυθμιστικό διάλυμα Tris Buffer με pH 8.2, 60μl λεβαμιζόλη (1,024g/5ml, Sigma), 200mg άλας fast red (Sigma). Αυτό φιλτραρίστηκε και ρίχθηκε πάνω από τις πλάκες για 30 λεπτά. Στη συνέχεια οι πλάκες πλύθηκαν με απεσταγμένο νερό και βάφτηκαν με αντιχρώση αιματοξυλίνη για 10 λεπτά. Οι πλάκες βυθίστηκαν στο νερό, πλύθηκαν για 5 λεπτά και αφέθηκαν να στεγνώσουν.

Οι μεγακαρυοκυτταρικές αποικίες αναγνωρίστηκαν με το μικροσκόπιο. Ταυτοποιήθηκαν τρεις κατηγορίες: οι αμιγείς μεγακαρυοκυτταρικές αποικίες, οι

μικτές (διακρίνονται από την παρουσία μέσα στην ίδια αποικία και κυττάρων που δεν ανήκουν στην μεγακαρυοκυτταρική σειρά) και μη μεγακαρυοκυτταρικές αποικίες. Ο Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν ως ολικές CFU-Meg αποικίες (αμιγείς CFU-Meg + μικτές CFU-Meg).

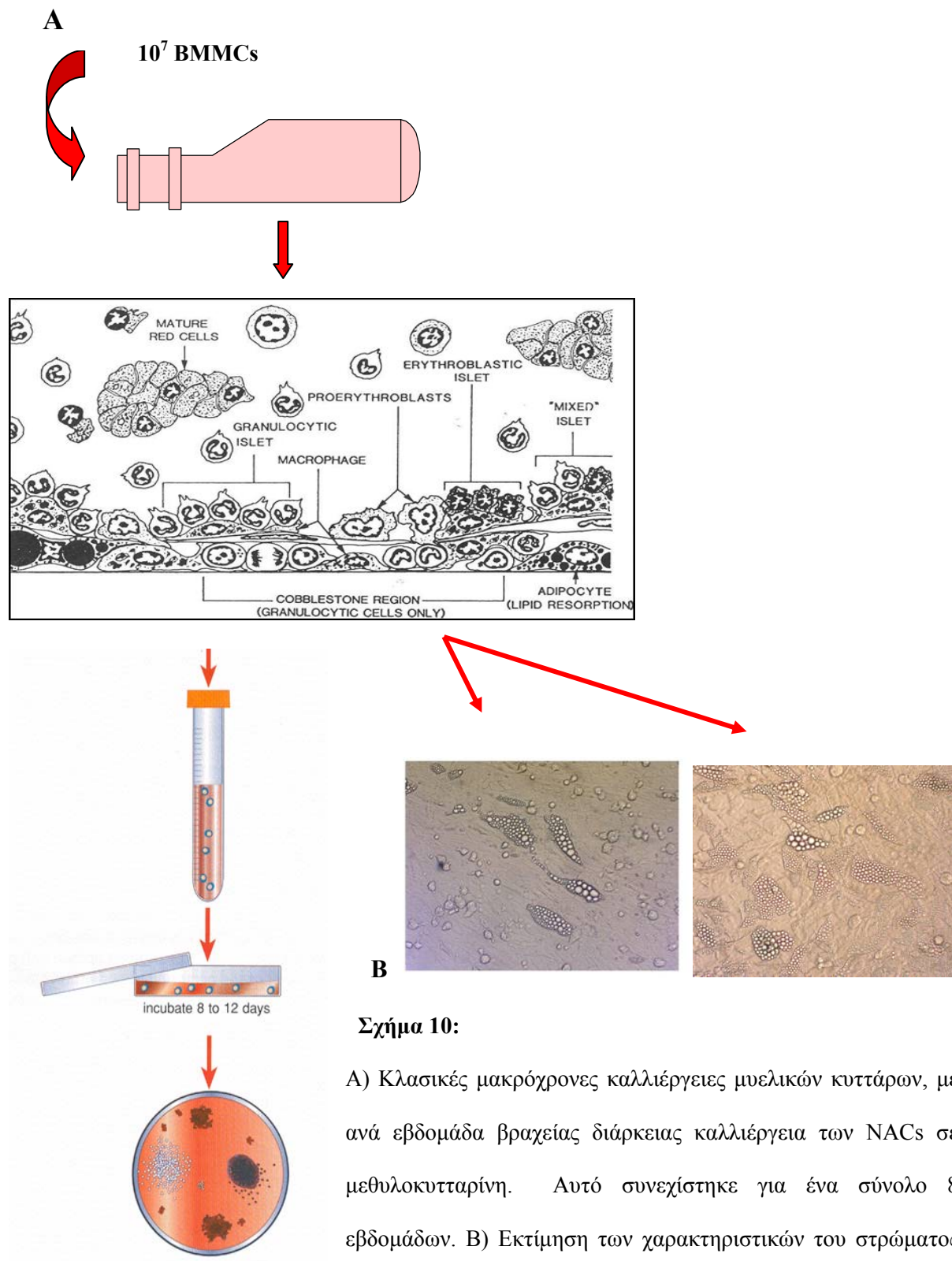
4.6. Εκτίμηση της λειτουργίας των στρωματικών κυττάρων του μυελού των οστών

Σε κάθε ασθενή αντιστοιχούσαν δύο φλάσκες 25cm³. Η μια χρησιμοποιήθηκε για: 1) κλασικές μακρόχρονες μυελικές καλλιέργειες (Long-Term Bone Marrow Cultures, LTBMCs) με ανά εβδομάδα καλλιέργεια σε μεθυλοκυτταρίνη των υπερκειμένων κυττάρων. Αυτό συνεχίστηκε για ένα σύνολο 8 εβδομάδων. 2) εκτίμηση των χαρακτηριστικών του στρώματος (επάρκεια, κύτταρα, δομή) 3) κατάψυξη του υπερκειμένου όταν το στρώμα γινόταν επαρκές, ώστε να μετρηθούν κυτταροκίνες. Η άλλη φλάσκα χρησιμοποιήθηκε για να καλλιεργηθούν στο στρώμα των ασθενών (όταν αυτό γινόταν επαρκές) φυσιολογικά CD34⁺ κύτταρα

4.6.1. Κλασικές μακρόχρονες καλλιέργειες μυελικών κυττάρων (LTBMCs)

10⁷ BMBCs καλλιεργήθηκαν σύμφωνα με την κλασική τεχνική που δημοσιεύτηκε από τους Coutinho et al [111] σε φλάσκες 25cm³, σε 10 ml IMDM εμπλουτισμένου με 10% FBS, 10% ίππειο ορό (Gibco), 100 IU/mL πενικιλίνη-στρεπτομυκίνη (PS), 2 mmol L-γλουταμίνη και 10⁻⁶ mol σουκινική νατριούχο υδροκορτιζόνη (Sigma) και επώαστηκαν σε υγρό επωαστικό κλίβανο στους 33°C-5%CO₂. Το θρεπτικό υλικό με ωσμωτικότητα 340, θα αναγράφεται στο εξής IMDM-340. Κάθε εβδομάδα οι φλάσκες απομακρύνονταν από τον κλίβανο και εξετάζονταν

κατ'αρχήν στο μικροσκόπιο. Παρατηρούσαμε την εμφάνιση και τα κύτταρα του στρώματος, καθώς και τα μη προσκολλημένα κύτταρα. Ανακινούσαμε κάθε φιάσκα απαλά ώστε να κατανέμονται ομοιόμορφα τα μη προσκολλημένα κύτταρα. Αφαιρούσαμε 5ml του θρεπτικού υλικού και τα φυγοκεντρούσαμε στις 1700 στροφές το λεπτό για 8 λεπτά. Προσθέταμε 5ml φρέσκου θρεπτικού υλικού (IMDM340) σε κάθε φιάσκα και την επανατοποθετούσαμε στον κλίβανο. Αραιώναμε την στιβάδα των μη προσκολλημένων κυττάρων (Non adherent cells, NACs) σε 200μl-1ml θρεπτικού υλικού ανάλογα με το μέγεθός της. Μετρούσαμε τα κύτταρα σε πλάκα Neubauer, όπως έχει ήδη περιγραφεί. Φτιάχναμε βραχύχρονες καλλιέργειες κυττάρων όπως έχει περιγραφεί παραπάνω, ώστε να μετρήσουμε 14 ημέρες μετά τις μονοκύτταρες αποικίες της κοκκιώδους και της ερυθράς σειράς. Αυτή η διαδικασία επαναλήφθηκε κάθε εβδομάδα μέχρι οι μακρόχρονες καλλιέργειες να κλείσουν 6 εβδομάδες (Σχήμα 10) [78].



Σχήμα 10:

A) Κλασικές μακρόχρονες καλλιέργειες μυελικών κυττάρων, με ανά εβδομάδα βραχείας διάρκειας καλλιέργεια των NACs σε μεθυλοκυτταρίνη. Αυτό συνεχίστηκε για ένα σύνολο 8 εβδομάδων. B) Εκτίμηση των χαρακτηριστικών του στρώματος (επάρκεια, κύτταρα, δομή)

4.6.2. Μέτρηση κυτταροκινών στα υπερκείμενα των μακρόχρονων καλλιέργειών.

Υπερκείμενα ελεύθερα κυττάρων (μετά από φυγοκέντρηση) από μακρόχρονες καλλιέργειες στις οποίες είχε σχηματιστεί τάπητας κατά 80-100% (3-4^η εβδομάδα) πριν και μετά την θεραπεία με cA2 καταψύχθηκαν στους -70°C για να γίνει μέτρηση του TNFα με την μέθοδο της ELISA (Enzyme-linked immunosorbent Assay, ELISA). Σύμφωνα με τον κατασκευαστή η ευαισθησία της μεθόδου είναι 0.09pg/mL (Biosource International Inc, California, USA) . Πρόκειται για μια ανοσοενζυμική μέθοδο στερεάς φάσης, στην οποία τα βοθρία των πλακών καλύπτονται από ένα αντίσωμα ειδικό για τον ανθρώπινο TNFα. Δείγματα, συμπεριλαμβανομένων δειγμάτων ελέγχου γνωστής συγκέντρωσης σε TNFα και μαρτύρων καθώς και ασθενών, μεταφέρονται με πιπέτα στα βοθρία. Κατά τη διάρκεια της πρώτης επώασης ο TNFα του δείγματος συνδέεται αφ' ενός με το ακινητοποιημένο στα βοθρία αντίσωμα και στη συνέχεια προστίθεται ένα αντι-TNFα αντίσωμα, συνδεδεμένο με βιοτίνη. Μετά την απομάκρυνση της περίσσειας του δεύτερου αντισώματος, προστίθεται ένα ένζυμο η στρεπταβιδίνη-υπεροξειδάση. Αυτή συνδέεται μέσω της βιοτίνης με το αντίσωμα που βρίσκεται σε υγρή φάση, ώστε να σχηματιστεί ένα 'σάντουιτς' τεσσάρων μελών (αντιTNFα ακινητοποιημένος στα βοθρία ♦ hTNFα ♦ αντιTNFα.συνδεδεμένος με βιοτίνη ♦ στρεπταβιδίνη-υπεροξειδάση). Μετά από μια δεύτερη επώαση και πλύσιμο ώστε να απομακρυνθεί όλο το ελεύθερο ένζυμο, προστίθεται υπόστρωμα σε μορφή διαλύματος , πάνω στο οποίο δρά το συνδεδεμένο ένζυμο ώστε να παραχθεί χρώμα. Η ένταση του χρώματος αυτού του χρωματισμένου προϊόντος είναι ευθέως ανάλογη της συγκέντρωσης του ανθρώπινου TNFα στο αρχικό δείγμα.

Χρησιμοποιήσαμε 2 βοθρία για κάθε άρρωστο. Προσθέσαμε 50μl από το ρυθμιστικό διάλυμα επώασης σε όλα τα βοθρία, εκτός από αυτά που χρησίμευσαν ως ‘τυφλό’ (blank) για το χρωμογόνο. Στη συνέχεια προσθέσαμε 100μl από το ρυθμιστικό διάλυμα, που χρησιμοποιείται για την παρασκευή δειγμάτων με συγκεκριμένες αραιώσεις TNFα (standard diluent buffer), στα βοθρία που χρησίμευσαν ως μηδέν (zero wells). Προσθέσαμε 100μl από δείγματα με συγκεκριμένες αραιώσεις του παράγοντα (standards: 32pg/ml, 16pg/ml, 8pg/ml, 4pg/ml, 2pg/ml, 1pg/ml, 0.5pg/ml, 0pg/ml). Τέλος για όλα τα δείγματα των ασθενών πριν και μετά την χορήγηση θεραπείας με το Infliximab, προσθέσαμε 50μl ρυθμιστικού διαλύματος (standard diluent buffer) σε κάθε βοθρίο και στη συνέχεια 50μl δείγματος (αραιώση 1:2). Ανακατέψαμε ελαφρά τα διαλύματα. Στη συνέχεια προσθέσαμε 50μl από το διάλυμα του αντισώματος αντι-TNFα (Biotin Conjugate) σε όλα τα βοθρία, εκτός από το ‘τυφλό’ και τα αναμίξαμε προσεκτικά. Καλύψαμε τις πλάκες και τις επώασαμε για 2 ώρες στους 37°C.

Ακολούθως αναρροφήσαμε προσεκτικά το υπερκείμενο από τα βοθρία και τα πλύναμε 4 φορές. Προσθέσαμε 100μl διάλυμα στρεπταβιδίνης-υπεροξειδάσης σε όλα τα βοθρία εκτός από το τυφλό. Επώασαμε τις πλάκες για μισή ώρα σε θερμοκρασία δωματίου, αφού τις σκεπάσαμε με το ειδικό κάλυμμα. Αφαιρέσαμε το υπερκείμενο και πλύναμε πολύ προσεκτικά 4 φορές. Προσθέσαμε 100μl σταθεροποιημένο χρωμογόνο και επώασαμε τις πλάκες για μισή ώρα σε θερμοκρασία δωματίου και σε σκοτάδι. Προσθέσαμε 100μl από το διάλυμα που σταματάει την αντίδραση (stop solution) σε κάθε βοθρίο. Ανακατέψαμε το διάλυμα και μετρήσαμε την απορρόφηση σε κάθε βοθρίο στα 450nm χρησιμοποιώντας ως ‘τυφλό’ ένα βοθρίο στο οποίο είχαν αναμιχθεί 100μl από χρωμογόνο και 100μl από το διάλυμα που σταματάει την αντίδραση (stop solution). Στη συνέχεια μεταφέραμε σε λογαριθμικό χαρτί την

απορρόφηση που είχαν τα δείγματα standards και τις συγκεντρώσεις του TNF-a στα δείγματα αυτά. Φτιάξαμε την καλύτερη δυνατή καμπύλη που να ενώνει αυτά τα σημεία (standard curve, καμπύλη αναφοράς). Βρήκαμε τη συγκέντρωση του TNF-a για κάθε δείγμα ασθενή με βάση την εξίσωση που προκύπτει από την καμπύλη αναφοράς. Η τιμή που προκύπτει διπλασιάζεται για να διορθώσουμε την αραιώση 1:2 που έγινε παραπάνω.

4.6.3. Ανατροφοδοτημένες LTBMCS.

Προκειμένου να ελέγξουμε την ικανότητα των στρωματικών κυττάρων των LTBMCS να υποστηρίζουν την αιμοποίηση ανεξάρτητα από τα αυτόλογα κύτταρα, χρησιμοποιήσαμε μια καλλιεργητική διαδικασία δύο σταδίων όπως έχει προηγούμενα περιγραφεί.

Συγκεκριμένα, τάπητες από στρωματικά κύτταρα LTBMCS από ασθενείς και υγιείς μάρτυρες ακτινοβολήθηκαν (10 Gy) όταν το στρώμα ήταν επαρκές (είχε δηλαδή σχηματιστεί τάπητας κατά 80-100%). Αυτό έπρεπε να γίνει 24 ώρες (με μέγιστο τις 48 ώρες) πριν την ανατροφοδότηση των καλλιεργείων. Την επόμενη μέρα φτιάξαμε μια βραχείας διάρκειας καλλιέργεια με $0,01 \times 10^6$ $CD34^+$ κύτταρα /ανά σωληνάριο μεθυλοκυτταρίνης 2,4 ml συμπληρωμένο με αυξητικούς παράγοντες και θρεπτικό υλικό, η ακριβής σύνθεση του οποίου περιγράφεται στην περιγραφή των LTC-ICs ή $3,3 \times 10^3$ $CD34^+$ κύτταρα ανά τρυβλίο Petri 35mm. Αυτό χρησίμευε ως εβδομάδα 0 για όλες τις ανατροφοδοτημένες φλάσκες. Στη συνέχεια πλύναμε τα υπόλοιπα $CD34^+$ κύτταρα με IMDM-340 και τα αραιώσαμε σε μια συγκέντρωση 5×10^3 /ml IMDM. Αφαιρέσαμε όλο το παλιό θρεπτικό υλικό από τις ακτινοβολημένες φλάσκες και προσθέσαμε 10 ml από το παραπάνω εναιώρημα που περιείχε τα $CD34^+$ κύτταρα (έτσι ώστε κάθε φλάσκα να περιέχει 5×10^4 φυσιολογικά $CD34^+$).

Κρατήσαμε τις καλλιέργειες για 5 εβδομάδες. Κάθε εβδομάδα ανανεώναμε το θρεπτικό υλικό αφαιρώντας 5 ml και προσθέτοντας 5 ml φρέσκο IMDM-340. Φυγοκεντρώσαμε το υπερκείμενο και επαναιωρούσαμε τη στοιβάδα των μη προσκολλημένων κυττάρων σε IMDM. Μετρούσαμε τα κύτταρα σε πλάκα Neubauer και φτιάχναμε βραχείας διάρκειας καλλιέργειες με $0,02 \times 10^6$ κύτταρα ανά φλάσκα την πρώτη εβδομάδα, $0,04 \times 10^6$ την δεύτερη, $0,1 \times 10^6$ την τρίτη, $0,3 \times 10^6$ την τέταρτη και την πεμπτη εβδομάδα. Καταγράψαμε την επάρκεια του στρώματος για κάθε εβδομάδα.

Σε κάθε πείραμα, οι φλάσκες ανατροφοδοτήθηκαν εις τριπλούν και CD34⁺ από τον ίδιο υγιή μάρτυρα χρησιμοποιήθηκαν για να ελέγξουν τις καλλιέργειες των υγιών και των μαρτύρων. Οι καλλιέργειες παρακολουθούνταν ανά εβδομάδα ώστε να καθορίζεται ο αριθμός των CFCs στο κλάσμα των NACs [79, 80].

5. Υποπληθυσμοί λεμφοκυττάρων μυελού των οστών και περιφερικού αίματος

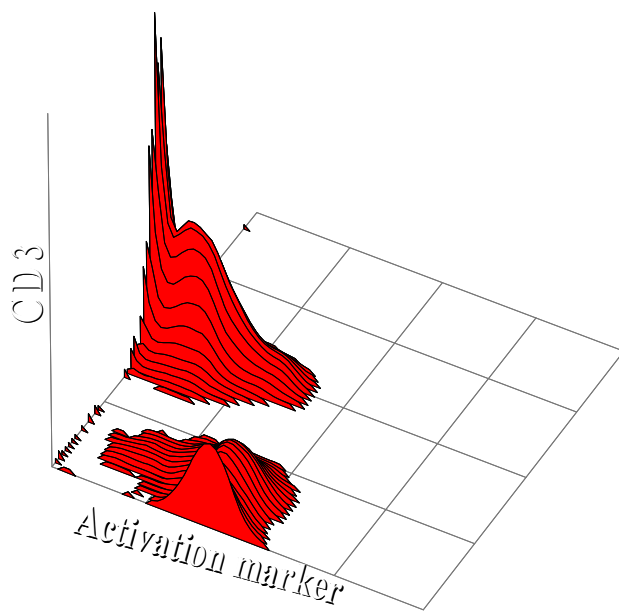
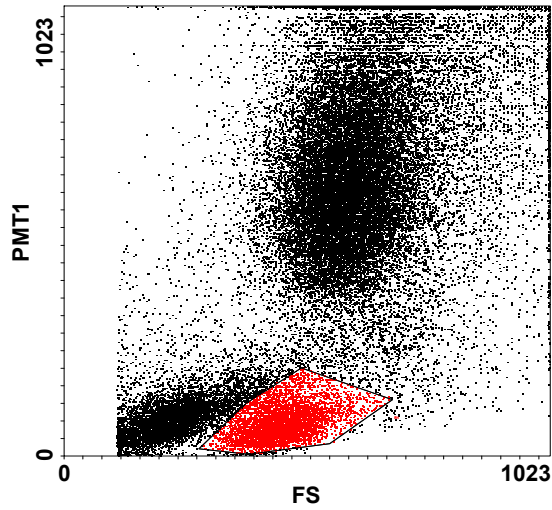
Για την ανάλυση των υποπληθυσμών μυελού και περιφερικού αίματος χρησιμοποιήθηκε κυτταρομετρία ροής δύο χρωμάτων. Εν συντομία, δείγματα 100μl αραιωμένου μυελού των οστών και περιφερικού αίματος σε αντιπηκτικό αιθυλενοδιαμινο-τετραοξικό οξύ (EDTA) σημάνθηκαν όπως περιγράφηκε προηγουμένα με ένα συνδυασμό μονοκλωνικών αντισωμάτων συνδεδεμένων με PE ή FITC (Beckman Coulter). Συγκεκριμένα τα μονοκλωνικά αντισώματα αντι-CD3 (UCHT1) ή αντι-CD8 (B9.11) ή αντι-CD4 (13B8.2) συνδυάστηκαν με κάθε ένα από τα ακόλουθα μονοκλωνικά αντισώματα που είναι δείκτες ενεργοποίησης των T-κυττάρων: αντι-

HLA-DR (B8.12.2), αντι-CD25 (υποδοχέας της IL-2, B1.49.9), αντι-CD95 (υποδοχέας Fas; UB2), αντι-CD38 (T16) και αντι-CD69 (TP1.55.3). Παρομοίως το μονοκλωνικό αντίσωμα αντι-CD19 (J4.119) συνδυάστηκε με αντι-CD23 (9P25) ή αντι-CD69 που είναι δείκτες ενεργοποίησης των B κυττάρων. Επίσης άλλα δείγματα σημάνθηκαν με κάθε ένα από τα ακόλουθα μονοκλωνικά αντισώματα: αντι-CD2-PE (39C1.5), αντι-CD16-PE (3G8), αντι-CD56-PE (N901), αντι-CD57-PE (NC1). IgG μύς κατάλληλου ισοτύπου συνδεδεμένα με PE ή FITC χρησίμευσαν ως αρνητικό control. Η ανάλυση έγινε στο 'gate' των λεμφοκυττάρων. Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν ως ποσοστά κυττάρων που εκφράζουν το μονοκλωνικό αντίσωμα. Επιπροσθέτως διαιρώντας τις αναλογίες των διπλών θετικών κυττάρων χρησιμοποιώντας τους συνδυασμούς των μονοκλωνικών αντισωμάτων που περιγράφηκαν παραπάνω με τα ποσοστά των ολικών CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺ ή CD19⁺ κυττάρων και πολλαπλασιάζοντας x100 υπολογίσαμε τις αναλογίες των ενεργοποιημένων κυττάρων μέσα σε κάθε λεμφοκυτταρικό υποπληθυσμό. (Εικόνα 4)

[81]

6. Στατιστική ανάλυση

Τα στοιχεία αναλύθηκαν με το GraphPAD στατιστικό πρόγραμμα υπολογιστή (PC) (GraphPAD Software, San Diego, CA). The Student's t-test κατά ζεύγη (paired t-test) χρησιμοποιήθηκε για να προσδιορίσει διαφορές πριν και μετά την θεραπεία με cA2. Το κλασικό τεστ ανάλυσης της μεταβλητότητας κατά δύο διευθύνσεις (2-way ANOVA) χρησιμοποιήθηκε για να προσδιορίσει διαφορές μεταξύ ασθενών και μαρτύρων στον αριθμό των CFCs στις ανατροφοδοτούμενες καλλιέργειες. Τα συνολικά στοιχεία εκφράζονται ως μέση τιμή \pm 1 σταθερά απόκλιση (SD).



Εικόνα 4: Μελέτη των λεμφοκυτταρικών υποπληθυσμών με προσδιορισμό δεικτών διέγερσης (για τα T-κύτταρα CD38, CD25, HLA-DR, Fas και για τα B- κύτταρα CD23, CD69)

Μέρος Τέταρτο

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

1. Εφεδρείες και χαρακτηριστικά επιβίωσης των προγονικών και πρόδρομων κυττάρων του μυελού των οστών

Η ανάλυση με κυτταρομετρία ροής των προγονικών και πρόδρομων κυτταρικών υποπληθυσμών των ασθενών πριν και μετά την χορήγηση του cA2 παρουσιάζεται στον πίνακα 7.

Το ποσοστό των συνολικών CD34⁺ δεν άλλαξε μετά την θεραπεία με cA2 σε σύγκριση με τις προ-θεραπείας τιμές ($P=0.8195$). Από τους υποπληθυσμούς των CD34⁺ κυττάρων, σημαντική αύξηση παρατηρήθηκε στα δεσμευμένα CD34⁺/CD33⁺ μυελικά κύτταρα μετά την θεραπεία σε σύγκριση με τις προ-θεραπεία τιμές ($P=.0192$). Ωστόσο οι αναλογίες των CD34⁺/CD61⁺ και CD34⁺/CD71⁺ προγονικών κυττάρων της μεγακαρυοκυτταρικής και της ερυθράς σειράς αντίστοιχα δεν άλλαξαν

μετά την θεραπεία σε σύγκριση με τις προ-θεραπεία τιμές ($P = .7768$ και $P = .3536$ αντίστοιχα), ούτε η αναλογία των ολικών GlycoA⁺ πρόδρομων κυττάρων της ερυ-

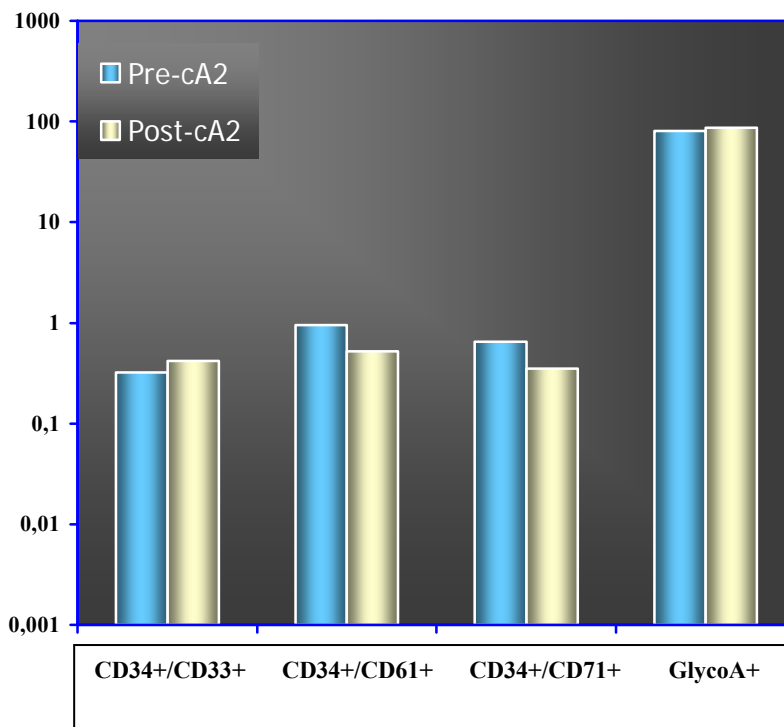
Πίνακας 7. Ανάλυση με κυτταρομετρία ροής των προγονικών και πρόδρομων κυττάρων του ΜΟ

	Προ θεραπείας με cA2 (n=10)	Μετά θεραπεία με cA2 (n=10)	Τιμή του P^*
% του συνόλου CD34⁺ κυττάρων	1.75 ± 2.56 [#]	1.79 ± 1.48	0.8195
Διάμεση τιμή (εύρος)	0.70 (0.20-8.30)	1.20 (0.20-4.30)	
% CD34⁺/CD33⁺ κυττάρων	0.32 ± 0.42	0.56 ± 0.50	0.0192
Διάμεση τιμή (εύρος)	0.15 (0.00-1.30)	0.40 (0.10-1.60)	
% CD34⁺/CD61⁺ κυττάρων	0.95 ± 1.65	0.75 ± 0.77	0.7768
Διάμεση τιμή (εύρος)	0.45 (0.00-5.50)	0.45 (0.10-2.20)	
% CD34⁺/CD71⁺ κυττάρων	0.65 ± 0.63	0.73 ± 0.84	0.3536
Διάμεση τιμή (εύρος)	0.45 (0.10-1.90)	0.45 (0.10-2.90)	
% total GlycoA⁺ κυττάρων	80.55 ± 9.81	86.85 ± 10.74	0.3536
Διάμεση τιμή (εύρος)	82.10 (67.70-93.30)	91.90 (67.70-95.90)	
% CD36⁺/GlycoA⁺ κυττάρων	36.51 ± 10.17	41.11 ± 16.47	0.5032
Διάμεση τιμή (εύρος)	34.30 (18.30-57.90)	35.65 (19.50-70.00)	
% CD36⁺/GlycoA⁺ κυττάρων	44.25 ± 12.36	41.68 ± 14.81	0.7407
Διάμεση τιμή (εύρος)	47.80 (22.80-67.60)	39.90 (22.80-62.60)	

*Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με το κατά ζεύγη Student's t-test. Τιμή του $P \leq 0.05$ θεωρούνταν στατιστικά σημαντική.

[#]Όλες οι τιμές εκφράζονται ως μέση τιμή ± SD (σταθερά απόκλιση)

θράς σειράς και οι υποπληθυσμοί $CD36^+/GlycoA^+$ και $CD36^-/GlycoA^+$ έδειξαν στατιστικά σημαντική διαφορά μετά την χορήγηση του cA2 σε σχέση με τις προ-θεραπείας ($P= .3536$, $P= .5032$, $P= .7407$ αντίστοιχα). (Σχήμα 11)



Σχήμα 11: Μεταβολή του ποσοστού των προγονικών αιμοποιητικών προβαθμίδων μετά την θεραπεία με το cA2

Τα χαρακτηριστικά επιβίωσης των προγονικών κυττάρων του μυελού των οστών πριν και μετά την θεραπεία παρουσιάζονται επίσης στον Πίνακα 8.

Πίνακας 8. Μελέτη της απόπτωσης στα κύτταρα του ΜΟ πριν και μετά την χορήγηση του cA2

	Προ θεραπείας με cA2 (n=10)	Μετά θεραπεία με cA2 (n=10)	Τιμή του P *
Σύνολο κυττάρων ΜΟ			
% 7AAD ⁺ κυττάρων	16.27 ± 11.81 [#]	8.08 ± 5.12	0.0168
Διάμεση τιμή (εύρος)	14.35 (4.20-42.20)	7.20 (4.10-22.20)	
Κύτταρα ΜΟ πλην τα CD34⁺ κύτταρα			
% 7AAD ⁺ κυττάρων	13.44 ± 11.57	6.93 ± 6.09	0.0582
Διάμεση τιμή (εύρος)	9.90 (3.10-38.00)	3.70 (3.10-22.20)	
CD34⁺ κυτταρικό κλάσμα			
% 7AAD ⁺ κυττάρων	35.60 ± 20.97	20.54 ± 12.69	0.0215
Διάμεση τιμή (εύρος)	31.70 (8.50-75.70)	20.60 (5.50-36.40)	
Fas ⁺ κύτταρα	34.95 ± 16.13	18.43 ± 10.62	0.0344
Διάμεση τιμή (εύρος)	43.10 (7.10-56.10)	16.60 (4.50-42.60)	
CD34⁺/Fas⁺ κυτταρικό κλάσμα			
% 7AAD ⁺ κυττάρων	43.88 ± 12.65	23.36 ± 24.50	0.0076
Διάμεση τιμή (εύρος)	41.35 (27.00-64.20)	10.55 (5.40-66.70)	
CD34⁺/Fas⁻ κυτταρικό κλάσμα			
% 7AAD ⁺ κυττάρων	19.14 ± 15.25	12.90 ± 9.01	0.2352
Διάμεση τιμή (εύρος)	13.40 (3.60-44.70)	13.60 (1.10-30.10)	

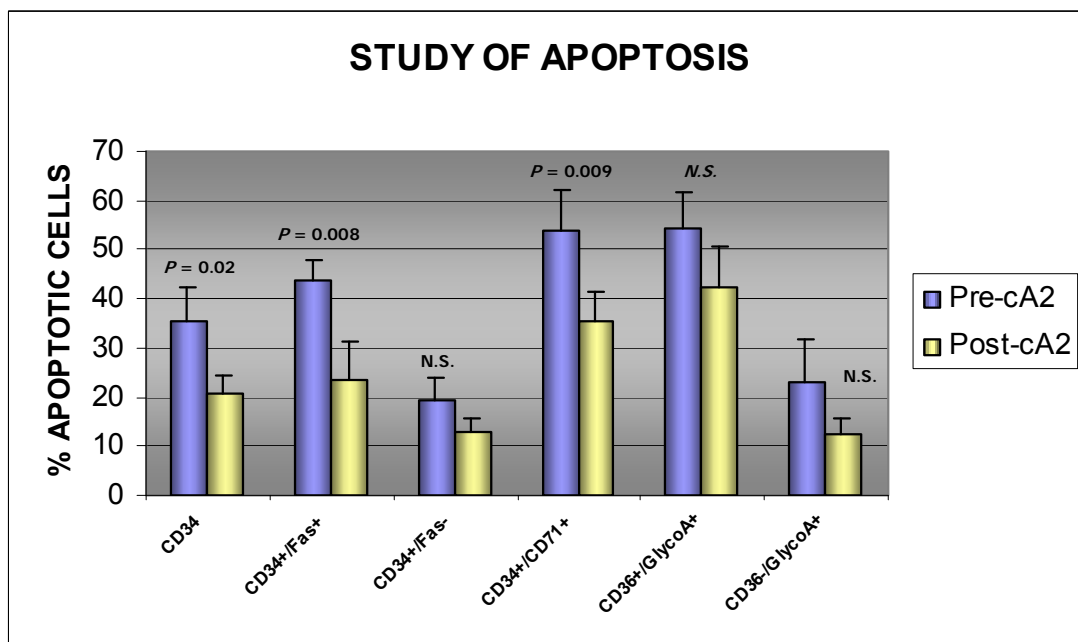
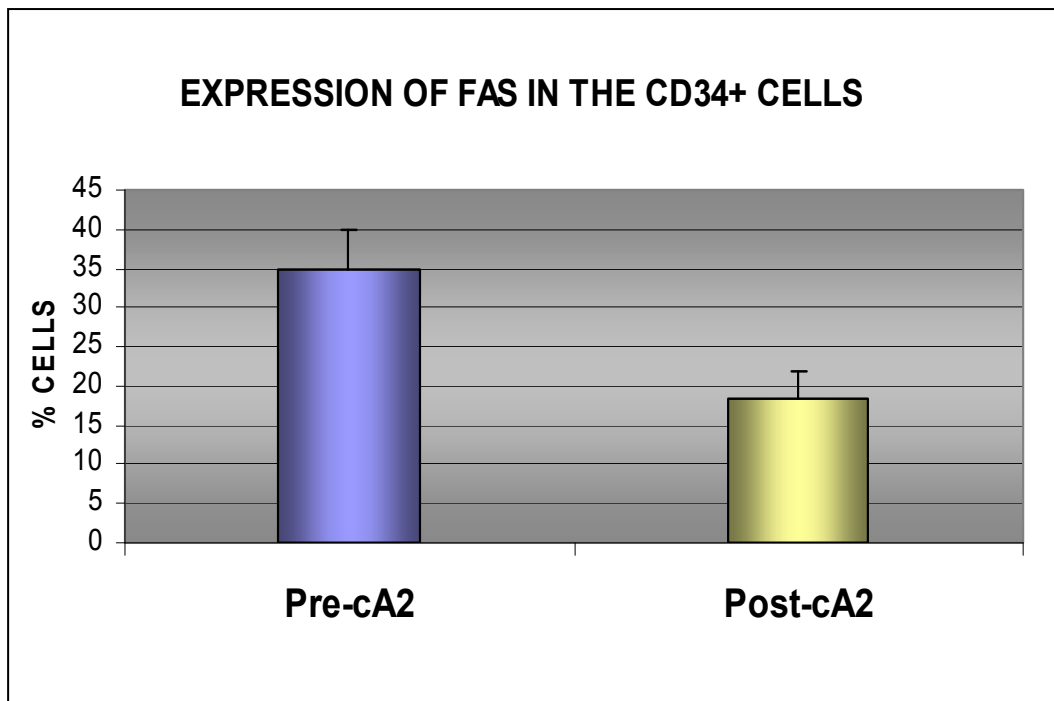
*Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με το κατά ζεύγη Student's t-test. Τιμή του $P \leq 0.05$ θεωρούνταν στατιστικά σημαντική.

[#]Όλες οι τιμές εκφράζονται ως μέση τιμή ± SD (σταθερά απόκλιση)

Η αναλογία των αποπτωτικών κυττάρων (7AAD^{bright} και 7AAD^{dim}) στο σύνολο των κυττάρων του μυελού μειώθηκε σημαντικά μετά την θεραπεία με cA2 σε σύγκριση με τις προ-θεραπεία τιμές ($P = .0168$). Αυτή η μείωση οφειλόταν κυρίως

στο χαμηλότερο ποσοστό των αποπτωτικών κυττάρων στο διαμέρισμα των CD34⁺ μετά την θεραπεία σε σύγκριση με τις προ-θεραπεία τιμές ($P= .0215$), αφού δεν βρέθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά στην αναλογία των αποπτωτικών κυττάρων στο διαμέρισμα των ολικών κυττάρων του μυελού όταν αποκλείστηκαν τα CD34⁺ κύτταρα, πριν και μετά την θεραπεία ($P=.0582$) Η μείωση στο ποσοστό των αποπτωτικών κυττάρων στο διαμέρισμα των CD34⁺ μετά την θεραπεία σχετίστηκε με σημαντική μείωση στην αναλογία των Fas⁺ σ' αυτό το διαμέρισμα μετά την θεραπεία ($P=.0344$). Γενικά η μείωση της απόπτωσης στο διαμέρισμα των CD34⁺ μετά την θεραπεία οφειλόταν στην μείωση που επιτεύχθηκε στην αναλογία των αποπτωτικών κυττάρων μέσα στον υποπληθυσμό CD34⁺/Fas⁺ σε σχέση με τις τιμές αναφοράς ($P=.0076$) αφού δεν βρέθηκαν στατιστικώς σημαντικές διαφορές στην αναλογία των αποπτωτικών κυττάρων που ανιχνεύθηκαν στον υποπληθυσμό των CD34⁺/Fas⁻ πριν και μετά την θεραπεία ($P=.2352$).

Όσον αφορά τα κύτταρα της ερυθράς σειράς του μυελού των οστών, σημαντική μείωση επιτεύχθηκε στην αναλογία των αποπτωτικών κυττάρων στο διαμέρισμα των CD34⁺/CD71⁺ προγονικών κυττάρων μετά την θεραπεία (35.47 ± 18.64) σε σύγκριση με τις προ-θεραπεία τιμές ($54.06\pm$; $P= .0095$) ενώ δεν βρέθηκε σημαντική διαφορά στους CD36⁺/GlycoA⁺ ($P= .0617$) ή CD36⁻/GlycoA⁺ ($P= .0962$) πληθυσμούς πρόδρομων κυττάρων. Αυτά τα ευρήματα επιβεβαιώνουν τα παραπάνω δεδομένα και αποδεικνύουν μείωση στην αναλογία των αποπτωτικών κυττάρων στο διαμέρισμα των CD34⁺ αλλά όχι των μη-CD34⁺ κυττάρων του ΜΟ μετά την θεραπεία (Σχήμα 12).

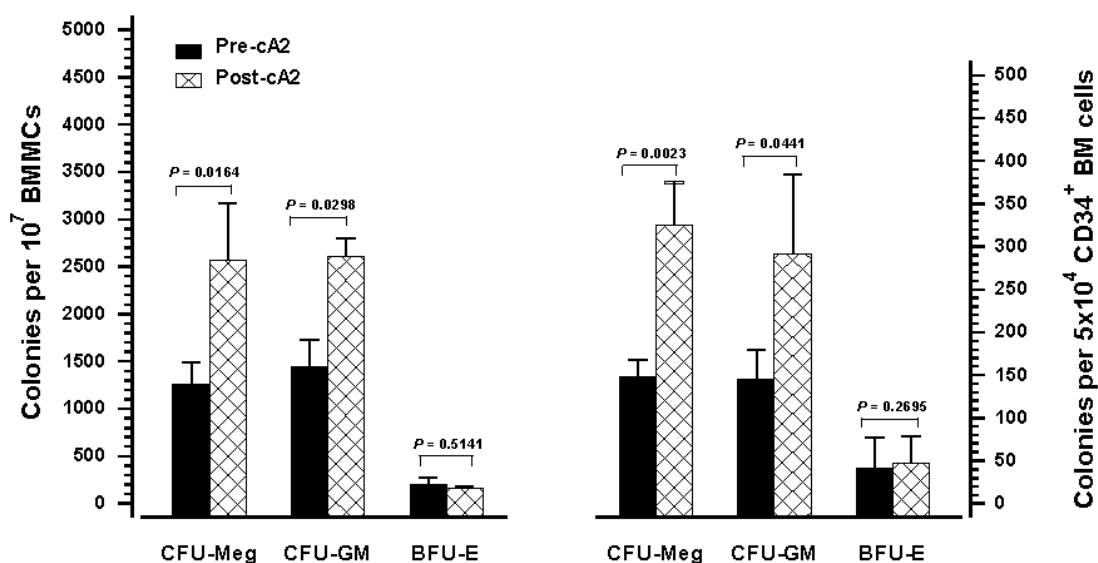


Σχήμα 12: Μείωση της απόπτωσης στα προγονικά αιμοποιητικά κύτταρα μετά την θεραπεία με cA2

2. Κλωνογόνα προγονικά κύτταρα

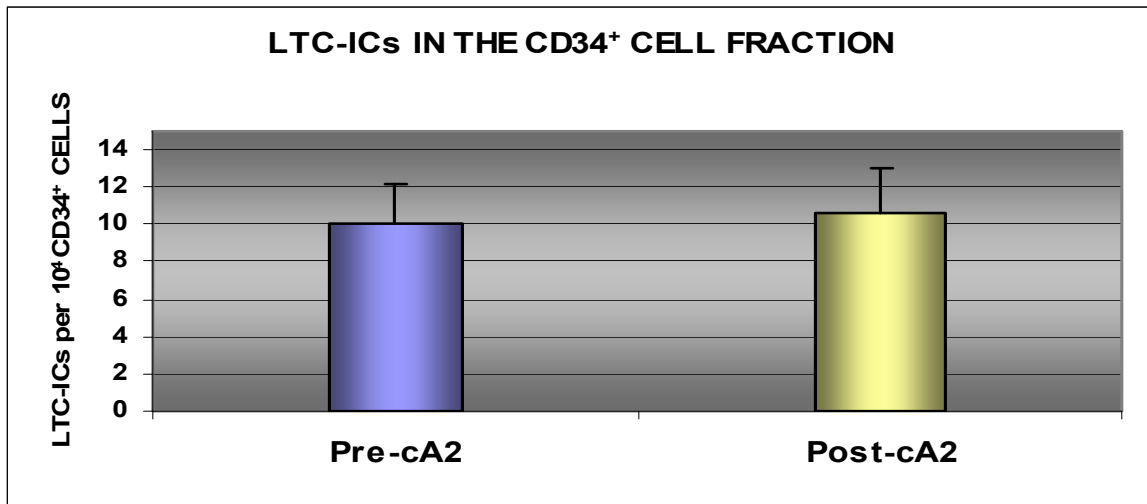
Ο αριθμός των LTC-ICs που αντιπροσωπεύουν την καλύτερη διαθέσιμη προσέγγιση των αρχέγονων προγονικών κυττάρων στον ανθρώπινο μυελό των οστών δεν άλλαξε σημαντικά στους ασθενείς με ΜΔΣ μετά την θεραπεία με cA2 (10.61 ± 7.45 ανά 10^4 CD34⁺ κύτταρα) σε σχέση με τις προ-θεραπεία τιμές ($10.11 \pm 6,51$ ανά 10^4 CD34⁺ κύτταρα; $P = .7893$). Σημαντική αύξηση, όμως, παρατηρήθηκε στον αριθμό των κυττάρων που σχηματίζουν αποικίες (CFCs) τα οποία προέρχονται από τα BMMCs και τα CD34⁺ κύτταρα μετά από τη θεραπεία (2770 ± 1547 ανά 10^7 BMMCs και 338 ± 385 ανά 5×10^4 CD34⁺ κύτταρα) σε σύγκριση με τις προ-θεραπεία τιμές (1651 ± 985 ανά 10^7 BMMCs και 186 ± 213 ανά 5×10^4 CD34⁺ κύτταρα) ($P = .0399$ και $P = .0304$, αντίστοιχα). Αυτή η αύξηση οφειλόταν στην βελτίωση των αριθμών των CFU-GM (2610 ± 1558 ανά 10^7 BMMCs και 292 ± 290 ανά 5×10^4 CD34⁺ κύτταρα μετά την θεραπεία έναντι 1447 ± 900 ανά 10^7 BMMCs και 146 ± 109 ανά 5×10^4 CD34⁺ κύτταρα πριν την θεραπεία · $P = .0298$ και $P = .0441$, αντίστοιχα) καθώς δεν υπήρχε σημαντική διαφορά στο σχηματισμό των BFU-E αποικιών (160 ± 70 ανά 10^7 BMMCs και 47 ± 100 ανά 5×10^4 CD34⁺ κύτταρα μετά την θεραπεία έναντι 204 ± 222 ανά 10^7 BMMCs και 41 ± 113 ανά 5×10^4 CD34⁺ κύτταρα πριν την θεραπεία · $P = .514$ και $P = .270$, αντίστοιχα). Επίσης σημαντική αύξηση παρατηρήθηκε στον αριθμό των CFU-Meg μετά την θεραπεία (129 ± 94 ανά 5×10^5 BMMCs και 162 ± 80 ανά $2,5 \times 10^4$ CD34⁺ κύτταρα) σε σύγκριση με τις τιμές αναφοράς (63 ± 36 ανά 5×10^5 BMMCs και 74 ± 32 ανά $2,5 \times 10^4$ CD34⁺ κύτταρα) ($P = .016$ και $P = .002$, αντίστοιχα). (Σχήματα 13, 14, 15)

Figure 2

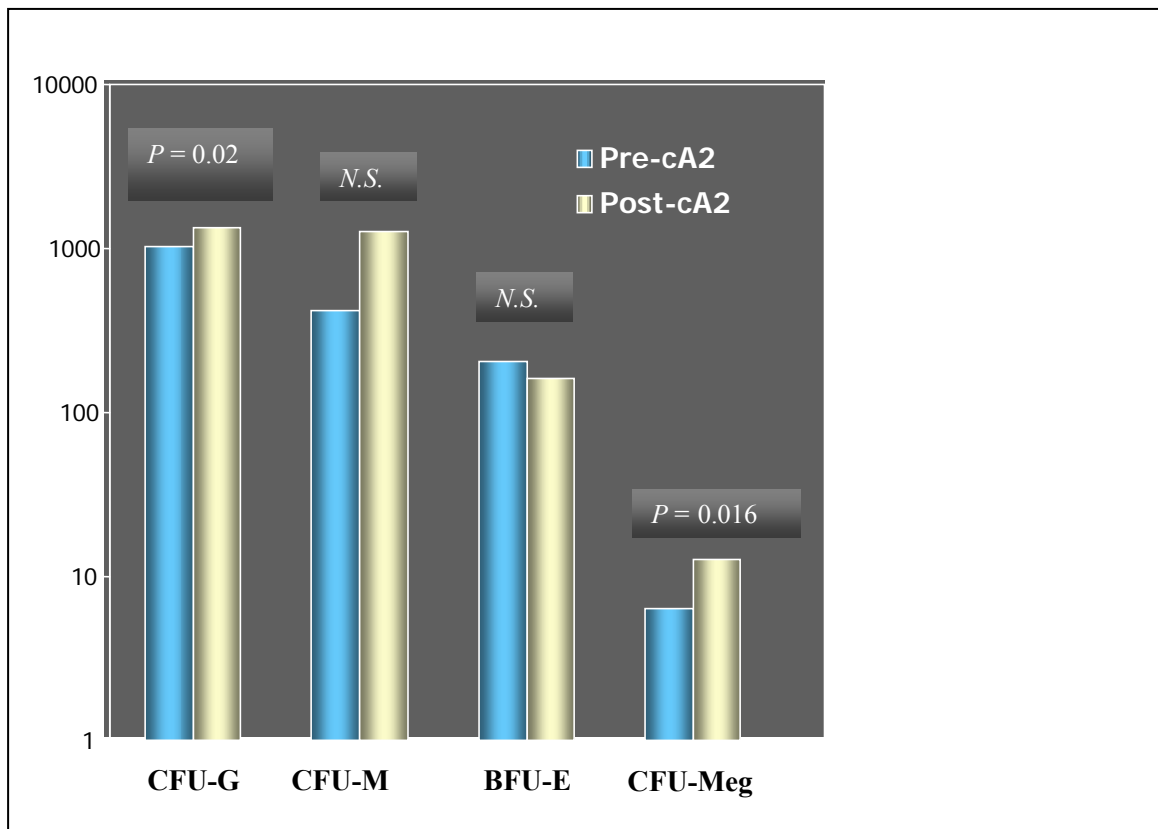


Σχήμα 13: Κλωνογόνα προγονικά κύτταρα πριν και μετά την χορήγηση του cA2.

Οι αριστερές στήλες αντιπροσωπεύουν τον μέσο αριθμό (\pm SEM) των CFU-Meg, CFU-GM και BFU-E που προκύπτει από 10^7 BMMCs με την χρήση κλωνογόνων μεθόδων σε ασθενείς πριν και μετά την θεραπεία με cA2. Οι δεξιές στήλες αντιπροσωπεύουν τις μέσες τιμές (\pm SEM) των αποικιών που αποκτώνται από 5×10^4 απομονωθέντα με ανοσομαγνητικό διαχωρισμό CD34⁺ κύτταρα των ασθενών πριν και μετά την θεραπεία. Οι συγκρίσεις μεταξύ των τιμών πριν και μετά την θεραπεία έγιναν με το κατά ζεύγη Student's t-test.



Σχήμα 14: Μεταβολή των LTC-ICs μετά την θεραπεία με cA2



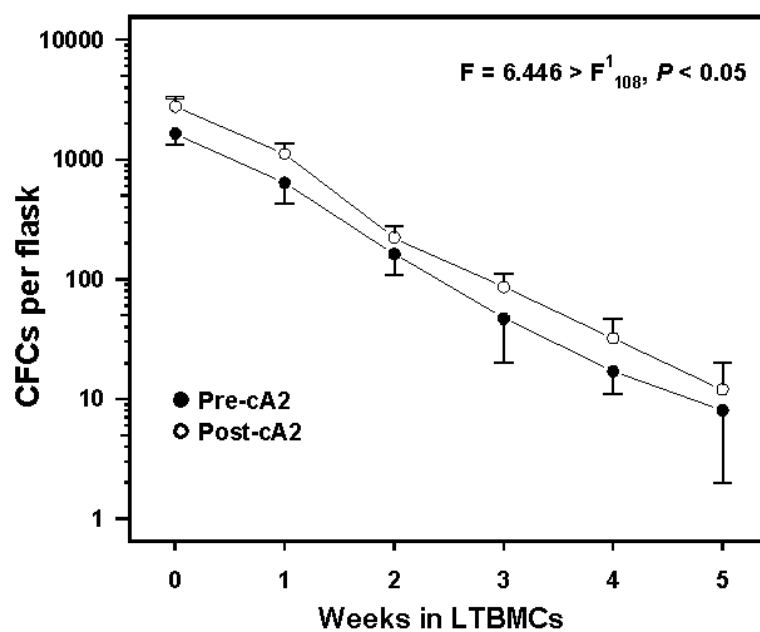
Σχήμα 15: Αύξηση της κλωνογονικής ικανότητας των κοκκιο- και μεγακαρυοκυτταρικών προβαθμίδων μετά την θεραπεία με cA2

3. Λειτουργία των στρωματικών κυττάρων του μυελού των οστών

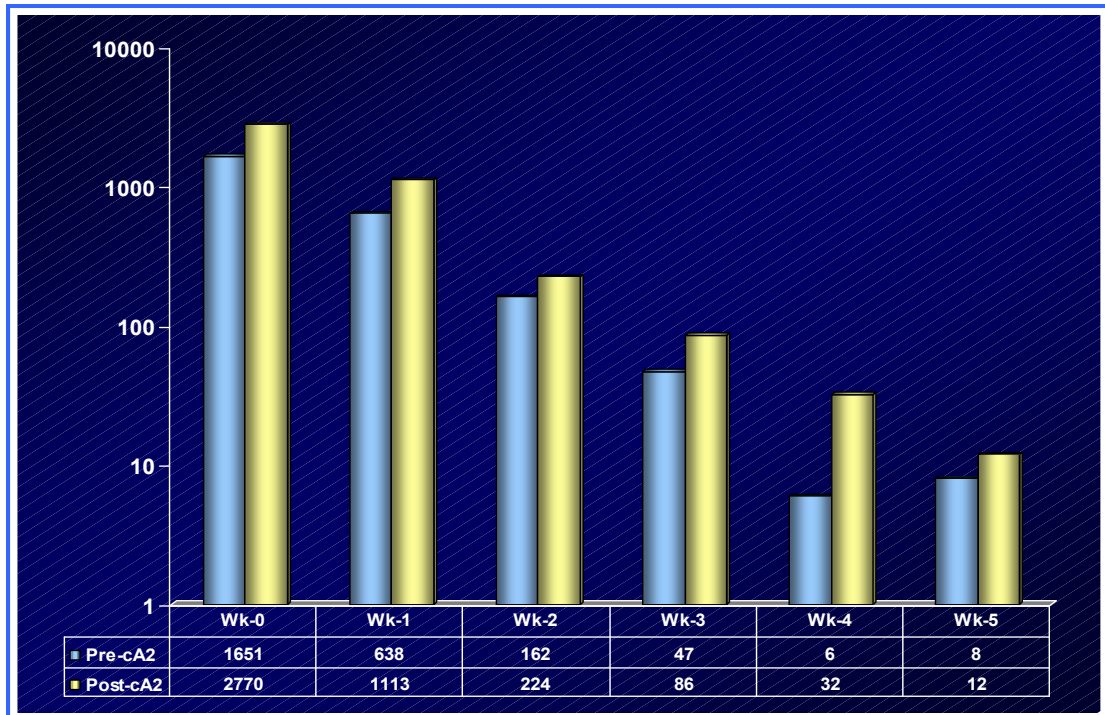
Στις μακρόχρονες καλλιέργειες των ασθενών πριν και μετά την θεραπεία, τις πρώτες 3-4 εβδομάδες σχηματιζόταν τυπικό επαρκές στρώμα, μιμούμενο το μικροπεριβάλλον του μυελού των οστών και αποτελούμενο από κύτταρα αιμοποιητικής και μεσεγχυματικής προέλευσης. Ο αριθμός των CFCs στο κλάσμα των NACs αυξήθηκε σημαντικά μετά την χορήγηση cA2 σε σύγκριση με τις προ-θεραπεία τιμές ($P < .05$), σε μια περίοδο 5 εβδομάδων καλλιέργειας (Σχήμα 16).

Αυτή η αύξηση μπορεί να αντανακλά την ήδη περιγραφείσα βελτίωση στον αριθμό και την κλωνογονική ικανότητα των προγονικών κυττάρων της μυελικής σειράς μετά την θεραπεία, αλλά επίσης μπορεί να σημαίνει βελτίωση στην ικανότητα των προσκολλημένων κυττάρων των LT BMC να υποστηρίζουν την αιμοποίηση μετά την θεραπεία. Προκειμένου να διερευνήσουμε αυτήν την υπόθεση, εκτιμήσαμε την ικανότητα των ακτινοβολημένων στρωμάτων LT BMC από ασθενείς να υποστηρίζουν την ανάπτυξη φυσιολογικών CD34⁺ κυττάρων πριν και μετά την θεραπεία. Πριν την χορήγηση του cA2 η επαγωγή του σχηματισμού CFCs από τα NACs ήταν σημαντικά χαμηλότερη στους ασθενείς σε σύγκριση με τους μάρτυρες, ($F = 5.144 > F^1_{90}$, $P < 0.05$) γεγονός ενδεικτικό της ελαττωματικής υποστήριξης της αιμοποίησης από τα στρωματικά κύτταρα των ασθενών. Μετά την θεραπεία, ωστόσο, ο αριθμός των CFCs στο κλάσμα των NACs δεν διέφερε σημαντικά μεταξύ ασθενών και υγιών μαρτύρων ($F = 0.534 < F^1_{90}$, $P > 0.05$), γεγονός ενδεικτικό της σημαντικής βελτίωσης στην ικανότητα των στρωμάτων των ασθενών να υποστηρίζουν την αιμοποίηση. (Σχήμα 17)

Figure 3

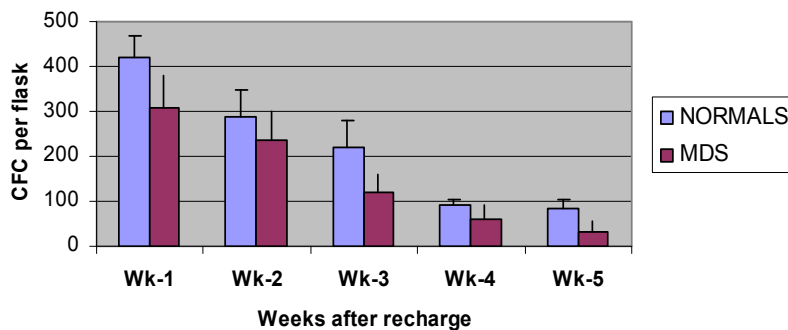


Σχήμα 16: Κύτταρα που σχηματίζουν (CFCs) αποικίες σε μακρόχρονες καλλιέργειες πριν και μετά την θεραπεία. Τα σημεία αντιπροσωπεύουν την μέση συχνότητα των CFCs (\pm SEMs) που ανιχνεύονται ανά εβδομάδα στα μη προσκολλούμενα κύτταρα των ασθενών σε μακρόχρονες καλλιέργειες LTBMCS πριν και μετά την χορήγηση του cA2. Η σύγκριση του αριθμού των αποικιών πριν και μετά την θεραπεία στην διάρκεια του χρόνου έγινε με το 2-way ANOVA.

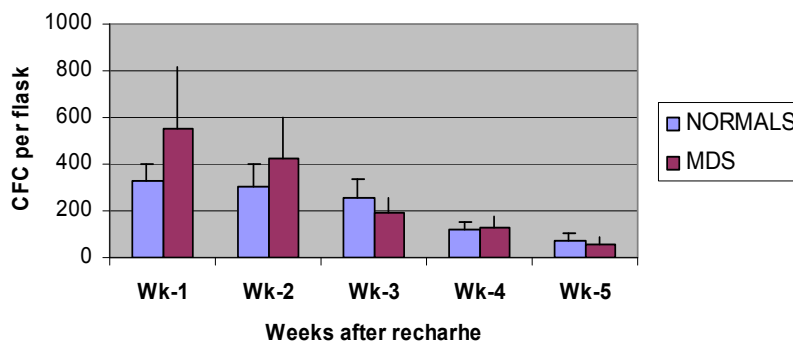


Σχήμα 17: Βελτίωση της λειτουργίας του στρώματος μετά την θεραπεία με cA2

RECHARGED LTBMCS PRE-cA2

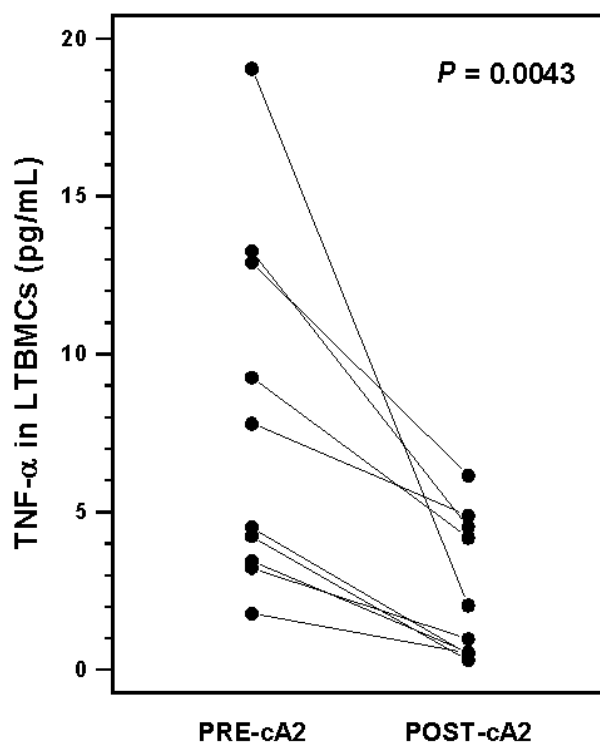


RECHARGED LTBMCS POST-cA2



Σε συμφωνία με τα στοιχεία από τα CFC ήταν η σημαντική μείωση στα επίπεδα του TNF α στα υπερκείμενα των LTBMCS των ασθενών μετά την θεραπεία (2,46 pg/ml \pm 2.23 pg/ml) σε σύγκριση με τις προ-θεραπεία τιμές (7,96 pg/ml \pm 5,60 pg/ml; $P = .0043$). Τα επίπεδα TNF α πριν και μετά την θεραπεία για κάθε ασθενή παρουσιάζονται στο σχήμα 18.

Figure 4



Σχήμα 18: Επίπεδα TNF α στα υπερκείμενα μακρόχρονων καλλιεργειών μυελού των οστών πριν και μετά την θεραπεία. Τα σημεία αντιπροσωπεύουν τα επίπεδα του TNF α ανά ασθενή στα υπερκείμενα των LTBMCS, τα οποία συλλέχθηκαν όταν ο πάτητας ήταν επαρκής (εβδομάδες 3-4), πριν και μετά την θεραπεία με cA2. Η σύγκριση έγινε με το κατά ζεύγη Student's t-test.

4. Υποπληθυσμοί λεμφοκυττάρων στο περιφερικό αίμα και το μυελό των οστών

Έχει αναφερθεί ότι η θεραπεία με το cA2 μπορεί να έχει και ανοσορυθμιστική επίδραση στους υποτύπους των λεμφοκυττάρων στο περιφερικό αίμα των ασθενών με ρευματικές νόσους [82, 83]. Επειδή τα ενεργοποιημένα T-λεμφοκύτταρα έχουν ενοχοποιηθεί ως συμμετέχοντα στην παθογένεια των ΜΔΣ [84], μελετήσαμε την έκφραση των δεικτών ενεργοποίησης στους υποτύπους των T-λεμφοκυττάρων στο περιφερικό αίμα και το μυελό των οστών πριν και μετά την θεραπεία με cA2. Τα αποτελέσματα φαίνονται στον Πίνακα 9.

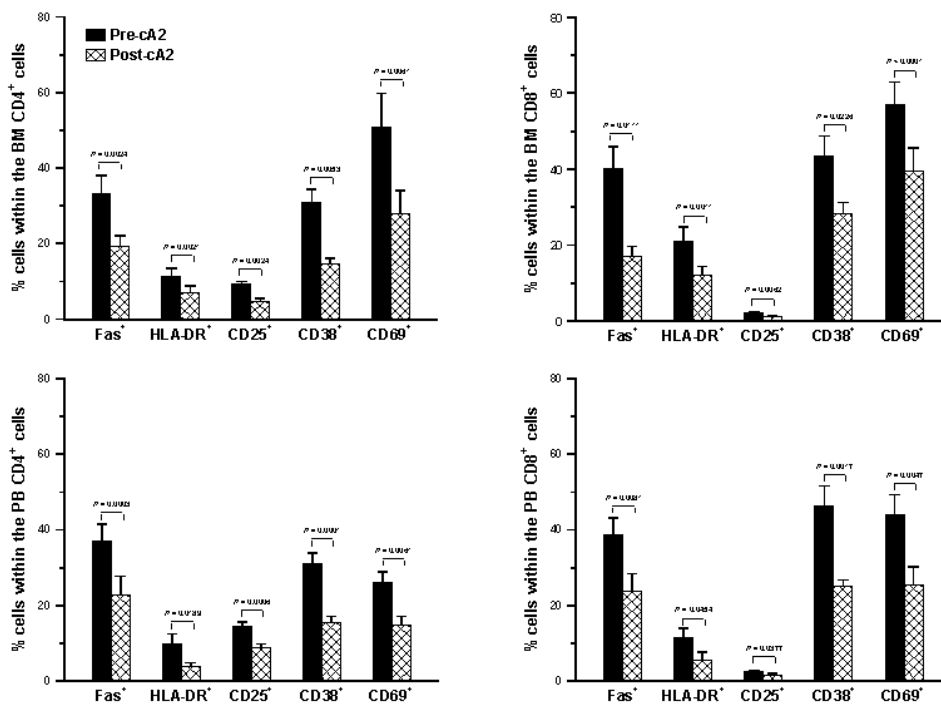
Πίνακας 9. Ανάλυση με κυτταρομετρία ροής των υποπληθυσμών των λεμφοκυττάρων του μυελού των οστών και του περιφερικού αίματος*

	Πριν την θεραπεία με cA2	Μετά την θεραπεία με cA2	Τιμή του P ^{&}
Κλάσμα των CD3⁺ κυττάρων του μυελού των οστών			
% Fas ⁺ κυττάρων	37.62 ± 11.07	19.95 ± 12.36	.0002
Διάμεση τιμή (εύρος)	39.37 (25.44 – 57.70)	18.48 (3.80 – 47.40)	
% HLA-DR ⁺ κυττάρων	17.64 ± 7.42	11.57 ± 9.68	.0020
Διάμεση τιμή (εύρος)	16.41 (6.32 – 29.53)	8.66 (2.10 – 27.09)	
% CD25 ⁺ κυττάρων	10.64 ± 1.84	5.37 ± 3.70	< .0001
Διάμεση τιμή (εύρος)	9.84 (9.13 – 15.00)	4.30 (2.33 – 12.70)	
% CD38 ⁺ κυττάρων	30.47 ± 6.78	20.12 ± 4.41	.0004
Διάμεση τιμή (εύρος)	33.80 (18.00 – 35.16)	19.73 (11.70 – 26.18)	
% CD69 ⁺ κυττάρων	48.27 ± 12.30	35.11 ± 15.05	.0002
Διάμεση τιμή (εύρος)	54.60 (29.87 – 66.02)	34.38 (14.60 – 61.80)	
Κλάσμα των CD3⁺ κυττάρων του περιφερικού αίματος			
% Fas ⁺ κυττάρων	47.12 ± 13.76	27.75 ± 7.35	.0015
Διάμεση τιμή (εύρος)	44.21 (26.1-65.4)	29.24 (14.69-38.50)	
% HLA-DR ⁺ κυττάρων	12.38 ± 3.80	6.27 ± 4.21	.0014
Διάμεση τιμή (εύρος)	12.30 (2.97-16.27)	7.72 (1.25-13.03)	
% CD25 ⁺ κυττάρων	9.58 ± 1.96	6.44 ± 2.65	.0022
Διάμεση τιμή (εύρος)	9.17 (7.64-13.70)	5.80 (1.97-11.87)	
% CD38 ⁺ κυττάρων	32.14 ± 9.30	20.40 ± 9.86	< .0001
Διάμεση τιμή (εύρος)	30.10 (18.42-52.33)	15.45 (11.71-41.43)	
% CD69 ⁺ κυττάρων	36.45 ± 14.30	18.17 ± 6.13	.0022
Διάμεση τιμή (εύρος)	32.90 (19.21-53.80)	17.80 (8.78-28.12)	

Η αναλογία των CD3⁺ κυττάρων στο μυελό των οστών δεν άλλαξε σημαντικά μετά την θεραπεία (70,68% ± 9,43%) σε σύγκριση με τις τιμές αναφοράς (66,89 ± 7,02; $P = .323$). Ούτε οι αναλογίες των CD4⁺ και CD8⁺ κυττάρων έδειξαν σημαντικές διαφορές μετά την θεραπεία ($P = .228$ και $P = .715$) Ωστόσο οι αναλογίες των ενεργοποιημένων T-κυττάρων μειώθηκαν σημαντικά μετά την θεραπεία όπως φάνηκε από το ποσοστό των Fas⁺ ($P = .0002$), HLA-DR⁺ ($P = .0020$), CD25⁺ ($P < .0001$), CD38⁺ ($P = .0004$) και CD69⁺ ($P = .0002$) κυττάρων επί του συνόλου των CD3⁺ κυττάρων. Η μείωση στην έκφραση των δεικτών ενεργοποίησης αφορούσε τόσο στους CD4⁺ όσο και στους CD8⁺ υποπληθυσμούς (Σχήμα 19)

Σε συμφωνία με τα δεδομένα από το μυελό των οστών ήταν και τα ευρήματα από την ανοσοφαινοτυπική ανάλυση του περιφερικού αίματος. Ειδικότερα η αναλογία των CD3⁺ κυττάρων δεν άλλαξε σημαντικά μετά την θεραπεία (70,05% ± 6,76%) σε σύγκριση με τις τιμές αναφοράς (70,17 ± 7,21; $P = .970$). Ωστόσο η αναλογία των ενεργοποιημένων CD3⁺ κυττάρων μειώθηκε σημαντικά μετά την θεραπεία όπως φάνηκε από την έκφραση των Fas⁺ ($P = .0015$), HLA-DR⁺ ($P = .0014$), CD25⁺ ($P < .0022$), CD38⁺ ($P < .0001$) και CD69⁺ ($P = .0021$) δεικτών και αυτή η μείωση αφορούσε τόσο στα CD4⁺ όσο και στα CD8⁺ κύτταρα.

Figure 5



Σχήμα 19: Ενεργοποιημένα λεμφοκύτταρα στο μυελό των οστών και το περιφερικό αίμα ασθενών με ΜΑΣ πριν και μετά την θεραπεία με το cA2. Οι στήλες αντιπροσωπεύουν την μέση αναλογία (\pm SEM) των κυττάρων που εκφράζουν δείκτες ενεργοποίησης μέσα στο μυελό (άνω διαγράμματα) και το περιφερικό αίμα (κάτω διαγράμματα) στα CD4⁺ και CD8⁺ κυτταρικά κλάσματα των ασθενών με ΜΑΣ πριν και μετά την θεραπεία με cA2. Οι συγκρίσεις έγιναν με το κατά ζεύγη Student's t-test.

5. Εκτίμηση της ανταπόκρισης

Η αιματολογική βελτίωση εκτιμήθηκε σύμφωνα με τα καθορισμένα κριτήρια [70]. Ο ασθενής #7 έδειξε ελάσσονα ανταπόκριση στην ερυθρά σειρά, καθώς οι απαιτήσεις σε μονάδες συμπυκνωμένων ερυθρών τους τελευταίους έξι μήνες μετά την πρώτη δόση του cA2 μειώθηκαν από 19 πριν την θεραπεία, σε 9 μετά την θεραπεία. Ο ασθενής #9 έδειξε ελάσσονα ανταπόκριση στα αιμοπετάλια καθώς ο αριθμός αιμοπεταλίων του αυξήθηκε από 8000/μl στις 19000 /μl σε αρκετές γενικές αίματος. Η ανταπόκριση διήρκεσε τουλάχιστον 2 μήνες μετά την τελευταία δόση cA2. Οι υπόλοιποι ασθενείς είχαν σταθερή νόσο όσον αφορά στα ερυθρά, στα αιμοπετάλια και στον απόλυτο αριθμό ουδετεροφίλων καθώς και στις ανάγκες για μεταγγίσεις. Κανένας από τους ασθενείς δεν είχε αύξηση στον αριθμό των βλαστών, πρόοδο σε RAEBt ή εξέλιξη σε οξεία μυελογενή λευχαιμία

Μέρος Πέμπτο

ΣΥΖΗΤΗΣΗ-ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

1. Συζήτηση

Η παθογένεια και η θεραπεία των μυελοδυσπλαστικών συνδρόμων παραμένουν ακόμα ένα πρόβλημα. Παρά το ότι η ανθεκτική αναιμία και τα δυσπλαστικά μορφολογικά χαρακτηριστικά είναι παρόντα σχεδόν σε όλους τους ασθενείς, η κλινική εικόνα, η πορεία της νόσου και η ανταπόκριση στη θεραπεία ποικίλλουν σημαντικά ακόμα και ανάμεσα σε ασθενείς που ανήκουν στην ίδια προγνωστική κατηγορία. Καθώς το ανώτερο όριο επιβίωσης στον πληθυσμό αυξάνει, ολοένα και περισσότεροι ηλικιωμένοι πάσχουν από μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα, γεγονός που αναδεικνύει ακόμα περισσότερο το πρόβλημα ότι δεν υπάρχει ουσιαστικά θεραπεία των ασθενών αυτών. Η μεταμόσχευση μυελού των οστών μπορεί θεωρητικά να οδηγήσει στην ίαση, αλλά είναι εφαρμόσιμη σε λίγους ασθενείς λόγω της προχωρημένης ηλικίας τους.

Όπως ήδη έχει εκτενώς αναφερθεί, στους περισσότερους ασθενείς η παθογένεια δεν περιορίζεται στην ύπαρξη ενός δυσπλαστικού κυτταρικού κλώνου, που πολλαπλασιάζεται ανεξέλεγκτα και ταυτόχρονα υπόκειται σε αυξημένη απόπτωση, αλλά συνυπάρχει ένα προβληματικό μικροπεριβάλλον στο μυελό των οστών, με αυξημένη νεοαγγειογένεση, διαταραχή στην παραγωγή των κυτταροκινών και ανοσολογική δυσλειτουργία. Η κατανόηση της πολυπλοκότητας της παθογένειας

της νόσου οδήγησε στην ανάπτυξη καινούριων θεραπευτικών στόχων, που προστέθηκαν στη συμβατική προσπάθεια εξάλειψης του δυσπλαστικού κλώνου. Αυτές οι θεραπείες περιλαμβάνουν τους αναστολείς της DNA μεθυλτρανσφεράσης, της φαρνεσυλτρανσφεράσης και τους αναστολείς της δεακετυλάσης της ιστόνης, το τριοξείδιο του αρσενικού, διαφοροποιητικούς παράγοντες, ανοσοτροποποιητικά και ανοσοκατασταλτικά φάρμακα, αντι-αγγειογενετικούς και αντι-αποπτωτικούς παράγοντες μόνους ή σε συνδυασμούς [39, 43, 44, 85].

Η αυξημένη ενδομυελική απόπτωση που οδηγεί στην μη αποδοτική αιμοποίηση των μυελοδυσπλαστικών συνδρόμων, οφείλεται κατ'αρχήν στην ενεργοποίηση ενός καταρράκτη προφλεγμονωδών κυτοκινών, όπου ο TNF α παίζει εξέχοντα ρόλο. Αυτό αποτέλεσε και τη βάση για τη διερεύνηση της αποτελεσματικότητας παραγόντων που τον εξουδετερώνουν άμεσα, όπως η διαλυτή πρωτεΐνη εξ συντήξεως του υποδοχέα του TNF α etanercept [19, 31, 86, 87]. Τα αποτελέσματα από σχετικά περιορισμένο αριθμό κλινικών μελετών, που ερευνούσαν την ασφάλεια και την αποτελεσματικότητα του etanercept στην θεραπεία των ΜΔΣ έδειξαν μέτρια ανταπόκριση, που μπορεί να αυξανόταν λίγο όταν χορηγούνταν σε συνδυασμό με αντιθυμοκυτταρική σφαιρίνη.

Η χρήση του αντι-TNF α αντισώματος cA2 είναι πολύ περιορισμένη. Μια πρώτη αναφορά [68] έδειξε αξιόλογη ανταπόκριση στην ερυθρά σειρά σε δύο ασθενείς με ΜΔΣ χαμηλού-ενδιάμεσου κινδύνου 1 κατά IPSS μετά από 6 δόσεις cA2 ενώ ακολούθησε μια δεύτερη [69], που περιλάμβανε 28 ασθενείς με ΜΔΣ χαμηλού-ενδιάμεσου κινδύνου 1 και έδειξε αξιόλογη βελτίωση σε όλες τις σειρές, μέχρι και κυτταρογενετικές αποκρίσεις σε σημαντική αναλογία ασθενών μετά από τέσσερις κύκλους θεραπείας. Η βιολογική επίδραση του cA2 στα λειτουργικά χαρακτηριστικά των κυττάρων του μυελού των ασθενών, ωστόσο, δεν είχε διερευνηθεί. Τα στοιχεία

αυτά σε συνδυασμό με το ότι η θεραπεία είναι καλά ανεκτή από τους ασθενείς σε περιβάλλον εξωτερικού ιατρείου, αλλά και η ασφάλεια στην χορήγησή της αποτέλεσαν το έναυσμα για την έναρξη μιας μελέτης με στόχο την ανίχνευση της αποτελεσματικότητας του cA2 στους ασθενείς με ΜΔΣ, σε επίπεδο αφ'ενός κλινικό και αφ'ετέρου βιολογικό.

Στην παρούσα μελέτη χορηγήσαμε το Infliximab σε τέσσερις δόσεις των 3mg/Kg βάρους σώματος σε μια ομάδα 10 ασθενών με μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα, από τους οποίους οι 4 ανήκαν στην κατηγορία χαμηλού προγνωστικού κινδύνου κατά IPSS, και από 3 στις κατηγορίες προγνωστικού κινδύνου ενδιάμεση 1 και ενδιάμεση 2 αντίστοιχα. Μελετήσαμε κατ'αρχήν την επίδραση της θεραπείας στα αιμοποιητικά κύτταρα των ασθενών αυτών, μετρώντας με κυτταρομετρία ροής τα CD34⁺ προγονικά κύτταρα του μυελού και τους υποπληθυσμούς τους και μετά από χρώση με 7AAD την απόπτωση στους πληθυσμούς αυτούς. Επίσης μετρήσαμε με την μέθοδο της περιοριστικής αραίωσης τα LTC-ICs, αλλά και την ανάπτυξη αποικιών της κοκκιώδους, ερυθράς και μεγακαρυοκυτταρικής σειράς.

Βρήκαμε ότι η θεραπεία δεν επηρεάζει την συχνότητα των LTC-ICs, την αναλογία των ολικών CD34⁺ κυττάρων ή το ποσοστό των προγονικών και πρόδρομων κυττάρων της ερυθράς σειράς στο μυελό των ασθενών. Ωστόσο η θεραπεία με cA2 αύξησε σημαντικά την κλωνογονική ικανότητα των προγονικών κυττάρων της μυελικής και μεγακαρυοκυτταρικής σειράς στα BMMCs και το κλάσμα των CD34⁺ κυττάρων. Η ευεργετική επίδραση του cA2 στον σχηματισμό CFU-GM και CFU-Meg αποικιών στους ασθενείς μας σχετίστηκε με σημαντική βελτίωση στα χαρακτηριστικά επιβίωσης των κυττάρων μέσα στο κυτταρικό διαμέρισμα των CD34⁺ κυττάρων. Ειδικότερα, μετά την θεραπεία παρατηρήθηκε σημαντική μείωση στην αναλογία των αποπτωτικών κυττάρων που ανιχνεύονταν στο κλάσμα των

CD34⁺ κυττάρων, η οποία συνοδευόταν με σημαντική μείωση του Fas στο συγκεκριμένο κυτταρικό διαμέρισμα. Είναι ενδιαφέρον ότι η μείωση της απόπτωσης παρατηρήθηκε στο κλάσμα των CD34⁺/Fas⁺ και όχι στο κλάσμα των CD34⁺/Fas⁻ κυττάρων, τονίζοντας με τον τρόπο αυτό τον εξέχοντα ρόλο του Fas στην απόπτωση των αιμοποιητικών προγονικών κυττάρων στα ΜΔΣ [22]. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι δεν διαπιστώθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά στην αναλογία των αποπτωτικών κυττάρων που ανιχνεύθηκε στο κλάσμα των μη CD34⁺ κυττάρων του μυελού των οστών μετά την θεραπεία σε σχέση με τις τιμές αναφοράς, γεγονός που δείχνει ότι η αντιαποπτωτική επίδραση του cA2 αφορά ειδικά στα CD34⁺ κύτταρα.

Σε συμφωνία με το εύρημα αυτό ήταν η επίδραση του cA2 στα χαρακτηριστικά επιβίωσης των κυττάρων της ερυθράς σειράς του μυελού των οστών. Όπως αναμενόταν με βάση την παραπάνω περιγραφείσα αντιαποπτωτική επίδραση του cA2 στα CD34⁺ κύτταρα, σημαντική μείωση παρατηρήθηκε στο ποσοστό των αποπτωτικών κυττάρων στο κλάσμα των CD34⁺/CD71⁺ που περιλαμβάνει τα προγονικά κύτταρα της ερυθράς σειράς. Ωστόσο δεν παρατηρήθηκε σημαντική διαφορά μετά την θεραπεία στην αναλογία των αποπτωτικών κυττάρων που ανιχνεύθηκαν στο διαμέρισμα των Glyco⁺ κυττάρων που αντιπροσωπεύει τα πιο ώριμα στάδια στην ανάπτυξη της ερυθράς σειράς. Αντίστοιχα με τα χαρακτηριστικά επιβίωσης των Glyco⁺ κυττάρων που δεν άλλαξαν μετά την θεραπεία, ο σχηματισμός αποικιών της ερυθράς σειράς από τα BMMCs ή τα CD34⁺ κύτταρα δεν έδειξε καμία σημαντική αλλαγή σε σχέση με τις τιμές αναφοράς.

Τα ευρήματά μας όσον αφορά την αντιαποπτωτική επίδραση του cA2 στα CD34⁺ κύτταρα είναι σε συμφωνία με τα ευρήματα των Stasi & Amadori [68] οι οποίοι επίσης παρατήρησαν μια αξιοσημείωτη μείωση στο ποσοστό των αποπτωτικών (ανεξίτη V-θετικών) CD34⁺ κυττάρων του μυελού των οστών στους

δύο ασθενείς με ΜΔΣ που θεραπεύθηκαν με cA2. Ωστόσο ο αριθμός των ασθενών ήταν πολύ μικρός για να εξάγει κανείς στατιστικώς σημαντικά αποτελέσματα.

Μελετήσαμε στη συνέχεια την επίδραση του Infliximab στο αιμοποιητικό μικροπεριβάλλον του μυελού των οστών στους ασθενείς με ΜΔΣ, με απλές, αλλά και ανατροφοδοτημένες μακρόχρονες καλλιέργειες αιμοποιητικών κυττάρων και μετρώντας τον TNFα στα υπερκείμενα των καλλιιεργειών αυτών. Διαπιστώσαμε μια σημαντική μείωση στα επίπεδα του TNFα στα υπερκείμενα των μακρόχρονων καλλιιεργειών μετά την θεραπεία, γεγονός που είναι ενδεικτικό σημαντικής μείωσης στην παραγωγή κυτταροκινών από τα κύτταρα του μικροπεριβάλλοντος του μυελού των οστών. Αυτή η μείωση στη συγκέντρωση του TNFα στα υπερκείμενα συνδυάστηκε με βελτίωση στην ικανότητα των προσκολλημένων κυττάρων (τάπητες) των μακρόχρονων καλλιιεργειών να υποστηρίζουν την ανάπτυξη τόσο των αυτόλογων όσο και των φυσιολογικών αιμοποιητικών προγονικών κυττάρων μετά την θεραπεία. Αξίζει να σημειωθεί ότι μείωση στην παραγωγή του TNFα από το στρώμα των μακρόχρονων καλλιιεργειών μετά την χορήγηση cA2 έχει αναφερθεί και σε ασθενείς με ενεργό ρευματοειδή αρθρίτιδα και σχετίστηκε με μια σημαντική βελτίωση στην λειτουργία των στρωματικών κυττάρων του μυελού των οστών των ασθενών [73].

Αναλύσαμε με κυτταρομετρία ροής τους υποπληθυσμούς των λεμφοκυττάρων των ασθενών με ΜΔΣ στο περιφερικό αίμα και το μυελό. Διαπιστώσαμε σημαντική μείωση στις αναλογίες των ενεργοποιημένων T κυττάρων στο μυελό των οστών και το περιφερικό αίμα. Η μείωση στην έκφραση των δεικτών ενεργοποίησης αφορούσε τόσο στα CD4⁺ όσο και στα CD8⁺ κύτταρα.

Έχει αναφερθεί από τους Scallon et al [43] ότι το cA2 μπορεί να εξουδετερώσει όχι μόνο την διαλυτή αλλά και την διαμεμβρανική μορφή του TNFα στα κύτταρα που παράγουν την κυτταροκίνη και επομένως μπορεί να ενεργοποιήσει

τόσο τους εξαρτώμενους από το αντίσωμα όσο και τους εξαρτώμενους από το συμπλήρωμα κυτταροτοξικούς μηχανισμούς που οδηγούν στην λύση των κυττάρων που παράγουν/εκφράζουν TNFα, κυρίως τα ενεργοποιημένα μακροφάγα. Αυτός ο τρόπος δράσης του cA2 μπορεί να εξηγήσει την μείωση της παραγωγής του TNFα από τους τάπητες των μακρόχρονων καλλιεργειών των ασθενών που αποτελούνται σε σημαντική αναλογία από μονοκύτταρα/μακροφάγα και μπορεί επίσης να εξηγήσει την σημαντική μείωση στους υποπληθυσμούς των ενεργοποιημένων T-λεμφοκυττάρων του μυελού των οστών και του περιφερικού αίματος μετά την θεραπεία. Ειδικότερα η πιθανή, μέσω του cA2, εξάλειψη των ενεργοποιημένων μονοκυττάρων/μακροφάγων μπορεί να οδηγήσει σε αρνητική ρύθμιση την διαδικασία παρουσίασης αντιγόνου και συνεπώς δυνητικά και τις ανοσολογικές απαντήσεις που παράγουν ενεργοποιημένα T-κύτταρα. Αξίζει να σημειωθεί ότι μια πιο γενική ανοσορρυθμιστική δράση του cA2 που δεν αποδίδεται στην καταστολή του TNF-α μόνο αλλά και σε μια έμμεση, αλλά ακόμα αδιευκρίνιστη, δράση στην λειτουργία των T-λεμφοκυττάρων έχει αναφερθεί από τους Ehrestein et al, [88] σε ασθενείς με ρευματοειδή αρθρίτιδα που θεραπεύτηκαν με το αντίσωμα. Ωστόσο επίδραση στην κατάσταση ενεργοποίησης των T-κυττάρων των ασθενών που έλαβαν cA2 δεν έχει μέχρι τώρα αναφερθεί.

Παρά την ευεργετική επίδραση του cA2 στα χαρακτηριστικά επιβίωσης και την λειτουργία των προγονικών αιμοποιητικών κυττάρων και των κυττάρων του μικροπεριβάλλοντος του μυελού των οστών στους ασθενείς μας, η συνολική κλινική ανταπόκριση ήταν χαμηλή, αν και κατά την διάρκεια της θεραπείας δεν παρατηρήθηκε πρόοδος νόσου.

Τα στοιχεία μας όσον αφορά στην κλινική ανταπόκριση έρχονται σε αντίθεση με προηγούμενες αναφορές που δείχνουν σημαντική αιματολογική βελτίωση μετά την

χορήγηση του αντισώματος. Συγκεκριμένα οι Stasi & Amadori [68] παρατήρησαν ανταπόκριση στην ερυθρά σειρά και στους δύο ασθενείς που θεράπευσαν, ενώ οι Raza et al [69] παρατήρησαν αιματολογική ανταπόκριση στο 20% των ασθενών που έλαβαν το cA2 σε δόση 5 mg/Kg βάρους σώματος και στο 38% αυτών που έλαβαν την θεραπεία σε δόση 10 mg/Kg βάρους σώματος.

Είναι πιθανό αυτή η ασυμφωνία να οφείλεται στο διαφορετικό φάσμα ασθενών καθώς στην μελέτη μας συμπεριλάβαμε, σε αντίθεση με προηγούμενες μελέτες, ασθενείς που ανήκουν στην ομάδα ενδιάμεσου-2 κινδύνου. Ένας άλλος λόγος μπορεί να είναι η διαφορετική δοσολογία και συχνότητα της χορήγησης του cA2. Ειδικότερα, οι Stasi & Amadori [68] χορήγησαν έξι δόσεις των 3 mg/kg (εβδομάδες 0, 2, 6, 14, 22, 30), ενώ ο Raza et al [69] τέσσερις δόσεις των 5mg/kg ή 10mg/kg κάθε τέσσερις εβδομάδες. Είναι πιθανό αυτά τα θεραπευτικά σχήματα να είναι καταλληλότερα για την επίτευξη κλινικών απαντήσεων.

Βρίσκεται ήδη σε εξέλιξη μια τυχαιοποιημένη μελέτη του Ευρωπαϊκού Οργανισμού για την Έρευνα και την Θεραπεία του Καρκίνου (EORTC), η EORTC-06023 στην οποία οι ασθενείς ομαδοποιούνται ανάλογα με τις καρυοτυπικές τους ανωμαλίες, τους συνολικούς βαθμούς τους κατά IPSS και το συμμετέχον κέντρο. Στη συνέχεια τυχαιοποιούνται να λάβουν Infliximab σε δόση είτε 3mg/Kg βάρους σώματος είτε 5mg/Kg βάρους σώματος για 8 συνολικά δόσεις εφ'όσον δεν διαπιστωθεί τοξικότητα ή εξέλιξη της νόσου. Η συγκεκριμένη μελέτη στοχεύει να ξεκαθαρίσει το αν θεραπεία μεγαλύτερης διάρκειας με τον συγκεκριμένο παράγοντα θα οδηγεί σε μακροχρόνιο κλινικό όφελος, ποιές είναι οι πιθανές μακροχρόνιες παρενέργειες στους ασθενείς ανεξάρτητα από την πορεία της βασικής νόσου και ποιος είναι ο πιθανός ρόλος των επιπέδων του TNF- α του ορού στην πρόβλεψη της ανταπόκρισης [13].

2. Συμπεράσματα

Ερευνήσαμε τις βιολογικές και ανοσορρυθμιστικές επιδράσεις της θεραπείας με το αντι-TNF α μονοκλωνικό αντίσωμα cA2 στους ασθενείς με ΜΔΣ. Αποδείξαμε ότι :

- η θεραπεία με cA2 μειώνει την απόπτωση μέσω Fas των CD34⁺ κυττάρων του μυελού των οστών,
- αυξάνει την κλωνογονική ικανότητα των προγονικών κυττάρων της μυελικής και της μεγακαρυοκυτταρικής σειράς,
- καταστέλλει την παραγωγή του TNF α από το αιμοποιητικό μικροπεριβάλλον, βελτιώνοντας την ικανότητα του στρώματος του μυελού των οστών να υποστηρίζει την αιμοποίηση,
- η θεραπεία με cA2 φαίνεται να μειώνει σημαντικά την αναλογία των ενεργοποιημένων T-λεμφοκυττάρων τόσο στο μυελό των οστών όσο και στο περιφερικό αίμα.

3. Σύνοψη

Ο TNFα έχει σημαντικό ρόλο στην παθογένεια των μυελοδυσπλαστικών συνδρόμων. Στην παρούσα μελέτη διαπιστώσαμε ότι η χορήγηση της αντιTNFα θεραπείας (cA2), που μειώνει την απόπτωση στα CD34⁺ κύτταρα, αυξάνει την κλωνογονική ικανότητα των προγονικών κυττάρων της κοκκιδώδους και της μεγακαρυοκυτταρικής σειράς, μειώνει τον TNFα και μειώνει την αναλογία των ενεργοποιημένων T λεμφοκυττάρων στο μυελό και το περιφερικό αίμα των ασθενών αυτών.

Από κλινικής πλευράς η θεραπεία αυτή διατήρησε σταθερή τη νόσο και σε περιορισμένο βαθμό επέφερε αιματολογική ανταπόκριση. Τα ενθαρρυντικά βιολογικά αποτελέσματα από αυτήν την μελέτη μπορεί να φανούν χρήσιμα στη διενέργεια κλινικών μελετών χρησιμοποιώντας το cA2 είτε μόνο του είτε σε συνδυασμό με άλλους παράγοντες σε προεπιλεγμένους ασθενείς με ΜΔΣ, ιδιαίτερα σε αυτούς με κλινικά και/ή εργαστηριακά στοιχεία υπέρ ανοσολογικού τύπου αναστολής της αιμοποίησης.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- [1] Lichtman M.A., Brennan J.K. Myelodysplastic syndromes (Indolent clonal myeloid diseases and oligoblastic leukemia). Williams Hematology. The McGraw Hill Companies; 2001:1029-1046.
- [2] Alessandrino E.P., Amadori S., Cazzola M. et al. Myelodysplastic syndromes: recent advances. Haematologica. 2001;86:1124-1157.
- [3] Zoumbos N.C. The pathogenesis of the myelodysplastic syndromes. Haema. 2001;4:151-157.
- [4] Bain B. Myelodysplastic syndromes. Leukemia diagnosis. Blackwell Sciences (UK); 2003:144-179.
- [5] Steensma D.P., Tefferi A. Millenium review. The myelodysplastic syndrome(s): a perspective and review highlighting current controversies. Leukemia Research. 2003;27:95-120.
- [6] Albitar M., Manshouri T., Shen Y. et al. Myelodysplastic syndrome is not merely "preleukemia". Blood. 2002;100:791-798.
- [7] Bennett J.M., Catovsky D., Daniel M.T. Proposals for the classification of the myelodysplastic syndromes. British Journal of Haematology. 1982;51:189-199.

- [8] Harris N.L., Jaffe E.S., Diebold J et al. The World Health Organization Classification of Neoplasms of the Hematopoietic and Lymphoid Tissues: Report of the Clinical Advisory Committee Meeting - Airlie House, Virginia, November 1997. *The Hematology Journal*. 2000;1:53-66.
- [9] Greenberg P., Cox C., LeBeau M.M. et al. International scoring system for evaluating prognosis in myelodysplastic syndromes. *Blood*. 1997;89:2079-2088.
- [10] Parker, Mufti G. The myelodysplastic syndromes: a matter of life or death. *Acta Haematologica*. 2004;111:78-99.
- [11] Yoshida Y., Anzai N., Kawabata H. Apoptosis in myelodysplasia: a paradox or paradigm. *Leukemia Research*. 1995;19:887-891.
- [12] Raza A., Mundle S., Shetty V. et al. Novel insights into the biology of myelodysplastic syndromes: excessive apoptosis and the role of cytokines. *International Journal of Hematology*. 1996;63:265-278.
- [13] Stasi R, Amadori S., Newland A, Provan D. Infliximab chimeric antitumor necrosis factor- α monoclonal antibody as potential treatment for myelodysplastic syndromes. *Leukemia and Lymphoma*. 2005;46:509-516.
- [14] Parker, Mufti G. Ineffective haemopoiesis and apoptosis in myelodysplastic syndromes. *British Journal of Haematology*. 1998;101:220-230.
- [15] Ζούμπος Ν, Παππά Β., Παρχαρίδου Α, Συμεωνίδης Α. Η Παθογένεια των Μυελοδυσπλαστικών συνδρόμων. In: Ελληνική Αιματολογική Εταιρεία Τμήμα Μυελοδυσπλαστικών Συνδρόμων, ed. 2003:33-84.

- [16] Raza A., Mundle S., Shetty V. et al. Novel insights into the biology of myelodysplastic syndromes: excessive apoptosis and the role of cytokines. *International Journal of Hematology*. 1996;63:265-278.
- [17] Hitraya H, Schaible T. Anti-tumor necrosis factor therapies in Crohn's disease and Rheumatoid arthritis. In: Ciliberto G, Savino R, eds. *Cytokine inhibitors*. Dekker M; 2001:97-132.
- [18] Arend W.P. The mode of action of cytokine inhibitors. *The Journal of Rheumatology*. 2002;29:16-21.
- [19] Maciejewski J, Ristiano A.M., Sloand E.M. et al. A pilot study of the recombinant soluble human tumour necrosis factor receptor (p75)-Fc fusion protein in patients with myelodysplastic syndrome. *British Journal of Haematology*. 2002;117:119-126.
- [20] Shetty V., Mundle S., Alvi S et al. Measurement of apoptosis, proliferation and three cytokines in 46 patients with myelodysplastic syndromes. *Leukemia Research*. 1996;20:891-900.
- [21] Mundle S., Ali A., Cartlidge J. et al. Evidence for involvement of Tumor necrosis factor- α in apoptotic death of bone marrow cells in myelodysplastic syndromes. *American Journal of Hematology*. 1999;60:36-47.
- [22] Gersuk G.M., Beckham C., Loken M.R. et al. A role for tumour necrosis factor- α , Fas and Fas-Ligand in marrow failure associated with myelodysplastic syndrome. *British Journal of Haematology*. 1998;103:176-188.

- [23] Gersuk G.M., Lee J.W., Beckham C., Anderson J.E., Deeg H.J. Fas (CD95) receptor and fas-ligand expression in bone marrow cells from patients with myelodysplastic syndromes. *Blood*. 1996;88:1122-1123.
- [24] Maciejewski J, Selleri C, Anderson J.E., Young N.S. Fas antigen expression on CD34+ human marrow cells is induced by interferon γ and tumor necrosis factor α and potentiates cytokine-induced hematopoietic suppression in vitro. *Blood*. 1995;85:3183-3190.
- [25] Verhoef G.E., De Schouwer P, Ceuppens JL et al. Measurement of serum cytokine levels in patients with myelodysplastic syndromes. *Leukemia*. 1992;6:1268-1272.
- [26] Musto P, Matera R, Minervini MM. Low serum levels of tumor necrosis factor and interleukin-1 β in myelodysplastic syndromes responsive to recombinant erythropoietin. *Haematologica*. 1994;79:265-268.
- [27] Stasi R, Brunetti M, Bussa S. Serum levels of tumour necrosis factor- α predict response to recombinant human erythropoietin in patients with myelodysplastic syndrome. *Clinical and Laboratory Haematology*. 1997;19:197-201.
- [28] Koike M., Ishiyama T, Tomoyasu S, Tsuruoka N. Spontaneous cytokine overproduction by peripheral blood mononuclear cells from patients with myelodysplastic syndromes and aplastic anemia. *Leukemia Research*. 1995;1995:639-644.
- [29] Alexandrakis M, Coulocheri S, Xylouri I. Elevated serum TNF α concentrations are predictive of shortened survival in patients with high-risk myelodysplastic syndromes. *Hematologia (Budap)*. 1998;29:13-24.

- [30] Mufti G. Pathobiology, classification and diagnosis of myelodysplastic syndromes. *Best Practice and Research Clinical Haematology*. 2004;17:543-557.
- [31] Deeg H.J., Gotlib J., Beckham C. et al. Soluble TNF receptor fusion protein (etarnecept) for the treatment of myelodysplastic syndrome: A pilot study. *Leukemia*. 2002;16:162-164.
- [32] Kremer J.M. Rational use of new and existing disease-modifying agents in rheumatoid arthritis. *Annals of Internal Medicine*. 2001;134:695-706.
- [33] Shanahan J.C., Clair E.W.St. Tumor Necrosis Factor- α blockade: a novel therapy for rheumatic disease. *Clinical Immunology*. 2002;103:231-242.
- [34] Hanauer S.B., Feagan B.G., Lichtenstein G.R. et al. Maintenance infliximab for Crohn's disease: the ACCENT I randomised trial. *The Lancet*. 2002;359:1541-1549.
- [35] Ardizzone S., Colombo E., Maconi G. et al. Infliximab in treatment of Crohn's disease: the Milan experience. *Digestion and Liver Disease*. 2002;34:411-418.
- [36] Cohen R.D., Tsang J.F., Hanauer S.B. Infliximab in Crohn's Disease: First anniversary clinical experience. *The American Journal of Gastroenterology*. 2000;95:3469-3477.
- [37] Targan S., Hanauer S.B., Van Deventer S.J.H. et al. A short-term study of chimeric monoclonal antibody cA2 to tumor necrosis factor- α for Crohn's disease. *The New England Journal of Medicine*. 1997;337:1029-1035.
- [38] List A.F. New approaches to the treatment of myelodysplasia. *The Oncologist*. 2002;7(suppl 1):39-49.

- [39] Raza A. Anti-TNF therapies in Rheumatoid arthritis, Crohn's disease, sepsis and myelodysplastic syndromes. *Microscopy Research and Technique*. 2000;50:229-235.
- [40] Raza A., Meyer P., Dutt D. et al. Thalidomide produces transfusion independence in long-standing refractory anemias of patients with myelodysplastic syndromes. *Blood*. 2001;98:958-965.
- [41] Sekkeres Mikkael, List A.F. Alternative treatments for MDS. *Seminars in Hematology*. 2005;42:32-37.
- [42] Deeg H.J., Jiang P.Y.Z., Holmberg L. et al. Hematologic responses of patients with MDS to antithymocyte globulin plus etanercept correlate with improved flow scores of marrow cells. *Leukemia Research*. 2004;28:1177-1180.
- [43] Scallon B.J., Moore M.A., Trinh H., Knight D.M., Ghayeb J. Chimeric anti-TNF- α monoclonal antibody cA2 binds recombinant transmembrane TNF- α and activates immune effector functions. *Cytokine*. 1995;7:251-259.
- [44] List AF, Vardiman J, Issa JP. Myelodysplastic syndromes. *Hematology (Am Soc Hematol Educ Program)*. 2004;297-317.
- [45] Papadaki H.A., Kritikos H.D., Valatas V, Boumpas D.T., Eliopoulos GD. Anemia of chronic disease in rheumatoid arthritis is associated with increased apoptosis of bone marrow erythroid cells: improvement following anti-tumor necrosis factor- α antibody therapy. *Blood*. 2002;100:474-482.
- [46] Hanauer S.B. Review article : safety of infliximab in clinical trials. *Aliment Pharmacol Ther*. 1999;13:16-22.

- [47] Daniel C.L., Moreland L.W. Infliximab: Additional safety data from an open label study. *The Journal of Rheumatology*. 2002;29:647-649.
- [48] Antoni C., Braun J. Side effects of anti-TNF therapy. *Clinical and Experimental Rheumatology*. 2002;20 (Supplement 28):S152-S157.
- [49] Salmon D., on behalf of the GTI and AFSSAPS. Recommendations about the prevention and management of tuberculosis in patients taking infliximab. *Joint Bone Spine*. 2002;69:170-172.
- [50] Mayordomo L., Marengo J.L., Gomez-Mateos J., Rejon E. Pulmonary miliary tuberculosis in a patient with anti-TNF-alpha treatment. *Scandinavian Journal of Rheumatology*. 2002;31:44-45.
- [51] Martinez O.N., Noiseux C.R., Martin J.A.C., Lara V.G., Maranon H.G.U.G. Reactivation tuberculosis in a patient with anti-TNF-a treatment. *The American Journal of Gastroenterology*. 2001;96:1665-1666.
- [52] Wagner T.E., Huseby E.S, Huseby J.S. Exacerbation of Mycobacterium tuberculosis enteritis masquerading as Crohn's disease after treatment with a tumor necrosis factor-a inhibitor. *The American Journal of Medicine*. 2002;112:67-69.
- [53] Keane J., Gershon S., Pharm.D. et al. Tuberculosis associated with infliximab, a tumor necrosis factor a -neutralizing agent. *The New England Journal of Medicine*. 2001;345:1098-1104.
- [54] Tai T.L., O'Rourke K.P., McWeeny M. et al. Pneumocystis carinii pneumonia following a second infusion of infliximab. *Rheumatology*. 2002;41:951-952.

- [55] Harney S., O'Shea F.D., FitzGerald O. Peptostreptococcal pericarditis complicating anti-tumour necrosis factor a treatment in rheumatoid arthritis. *Annals of Rheumatic Disease*. 2002;61:653-654.
- [56] Marotte H., Charrin J.E., Miossec P. Infliximab aseptic meningitis. *The Lancet*. 2001;358:1784.
- [57] Morelli J., Wilson F.A. Does administration of infliximab increase susceptibility to Listeriosis? *The American Journal of Gastroenterology*. 2000;95:841-842.
- [58] Warris A., Bjornekleit A., Gaustad P. Invasive pulmonary aspergillosis associated with infliximab therapy. *The New England Journal of Medicine*. 2001;344:1099-1100.
- [59] Mann D.L. Tumor Necrosis Factor and viral myocarditis. The fine line between innate and inappropriate immune responses in the heart. *Circulation*. 2001;103:626-629.
- [60] Lankarani K.B. Mortality associated with infliximab. *The Journal of Clinical Gastroenterology*. 2001;33:255-256.
- [61] Shergy W.J., Isern R.A., Cooley D.A. et al. Open label study to assess infliximab safety and timing of onset of clinical benefit among patients with rheumatoid arthritis. *The Journal of Rheumatology*. 2002;29:667-677.
- [62] O'Connor M., Buchman A., Marshall G. Anaphylaxis-like reaction to infliximab in a patient with Crohn's disease. *Digestive Diseases and Sciences*. 2002;47:1323-1325.

- [63] Kugathasan S., Levy M., Saeian K. et al. Infliximab retreatment in adults and children with Crohn's disease: risk factors for the development of delayed severe systemic reaction. *The American Journal of Gastroenterology*. 2002;97:1408-1414.
- [64] Soykan I., Ertan C., Ozden A. Severe anaphylactic reaction to infliximab: report of a case. *The American Journal of Gastroenterology*. 2000;95:2395-2396.
- [65] Aithal G.P., Mansfield J.C. Review article: The risk of lymphoma associated with inflammatory bowel disease and immunosuppressive treatment. *Aliment Pharmacol Ther*. 2001;15:1101-1108.
- [66] Bickston S.J., Lichtenstein G.R., Arseneau K.O., Cohen R.B., Cominelli F. The relationship between infliximab treatment and lymphoma in Crohn's disease. *Gastroenterology*. 1999;117:1433-1437.
- [67] Brown S.L., Greene M.H., Gershon S., Edwards E.T., Braun M.M. Tumor necrosis factor antagonist therapy and lymphoma development. Twenty-six cases reported to the Food and Drug Administration. *Arthritis and Rheumatism*. 2002;46:3151-3158.
- [68] Stasi R., Amadori S. Infliximab chimaeric anti-tumour necrosis factor alpha monoclonal antibody treatment for patients with myelodysplastic syndromes. *British Journal of Haematology*. 2002;116:334-337.
- [69] Raza A., ., Candoni A. et al. Remicade as TNF suppressor in patients with myelodysplastic syndromes. *Leukemia and Lymphoma*. 2004;45:2099-2104.

- [70] Cheson B.D., Bennett J.M., Kantarjian H.M. et al. Report of an international working group to standardize response criteria for myelodysplastic syndromes. *Blood*. 2000;96:3671-3674.
- [71] Papadaki HA, Eliopoulos AG, Kostas T et al. Impaired granulopoiesis in patients with chronic idiopathic neutropenia is associated with increased apoptosis of bone marrow myeloid progenitor cells. *Blood*. 2003;101:2591-2600.
- [72] Shimamoto T., Ohyashiki K. Immunosuppressive Treatments for myelodysplastic syndromes. *Leukemia and Lymphoma*. 2003;44:593-604.
- [73] Papadaki H.A. Kritikos H.D., Gemetzi C., Koutala H., Marsh J.C.W., Boumpas D.T., Eliopoulos G. D. Bone marrow progenitor cell reserve and function and stromal cell function are defective in rheumatoid arthritis: evidence for a tumor necrosis factor alpha-mediated effect. *Blood*. 2002;99:1610-1619.
- [74] Loken M.R., Shah VO., Dattilio KL, Civin CL. Flow cytometric analysis of human bone marrow. I. Normal erythroid development. *Blood*. 1987;69:255-263.
- [75] Philpott NJ, Turner AJ, Scopes J. The use of 7-amino actinomycin D in identifying apoptosis: simplicity of use and broad spectrum of application compared with other techniques. *Blood*. 1996;87:2244-2251.
- [76] Weaver A, Ryder WDJ, Testa NJ. Measurement of long-term culture initiating cells (LTC-ICs) using limiting dilution: comparison of end points and stromal cell support. *Experimental Hematology*. 1997;25:1333-1338.

- [77] Cox C., Killick SB, Patel S et al. In vitro proliferation and differentiation of megakaryocytic progenitors in patients with aplastic anemia, paroxysmal nocturnal hemoglobinuria and the myelodysplastic syndromes. *Stem cells*. 2000;18:428-434.
- [78] Coutinho L.H, Gilleece M.H., De Wynter E.A., Will A, Testa N.G. Clonal and long-term cultures using human bone marrow. In: Testa N.G, Molineux G, eds. *Haemopoiesis. A practical approach*. Oxford: Oxford University Press; 1993:75-106.
- [79] Papadaki H.A., Gibson FM, Rizzo S, Gordon-Smith EC, Marsh JCW. Assessment of bone marrow stem cell reserve and function and stromal cell function in patients with autoimmune cytopenias. *Blood*. 2000;96:3272-3275.
- [80] Papadaki H.A., Gibson FM, Psyllaki M et al. Assessment of bone marrow stem cell reserve and function and stromal cell function in patients with severe congenital neutropenia. *European Journal of Haematology*. 2001;67:245-251.
- [81] Papadaki H.A., Stamatopoulos K, Damianaki A. Activated T-lymphocytes with myelosuppressive properties in patients with chronic idiopathic neutropenia. *British Journal of Haematology*. 2005;128:863-876.
- [82] Zou J, Rudwaleit M, Brandt J et al. Down-regulation of the nonspecific and antigen-specific T cell cytokine response in ankylosing spondylitis during treatment with infliximab. *Arthritis and Rheumatism*. 2003;48:780-790.
- [83] De Miguel S, Jover JA, Vadilo C et al. B cell activation in rheumatoid arthritis patients under infliximab treatment. *Clinical and Experimental Rheumatology*. 2003;21:726-732.

- [84] Dunbar CE, Sauntharajah Y. Myelodysplastic syndromes. In: Young NS, ed. Bone marrow failure syndromes. Philadelphia: W.B. Saunders Company; 2000:69-98.
- [85] Candoni A, Silvestri F., Buonamici S et al. Targeted therapies in Myelodysplastic syndromes. ASH 2003 Review. Seminars in Hematology. 2004;41:13-20.
- [86] Greenberg P. Treatment of myelodysplastic syndrome with agents interfering with inhibitory cytokines. Annals of Rheumatic Disease. 2001;60:iii41-iii42.
- [87] Rosenfeld C.S., Bedell C. Pilot study of recombinant human soluble tumor necrosis factor receptor (TNFR:Fc) in patients with low risk myelodysplastic syndrome. Leukemia Research. 2002;26:721-724.
- [88] Ehrenstein M.R., Evans J.G, Singh A. Compromised function of regulatory T cells in rheumatoid arthritis and reversal by anti-TNF alpha therapy. Journal of Experimental Medicine. 2004;277-285.
- [89] Fennaux P. Myelodysplastic syndromes: From pathogenesis and prognosis to Treatment. Seminars in Hematology. 2004;41(suppl 4):6-12.
- [90] Cilloni D., Francesca M., Carturan S et al. Myelodysplastic syndromes. Annals New York Academy of Sciences. 2004;1028:400-408.
- [91] Rigolin G M, Della Porta M., Ciccone M et al. In patients with myelodysplastic syndromes response to rHuEPO and G-CSF treatment is related to an increase of cytogenetically normal CD34+ cells. British Journal of Haematology. 2004;126:501-507.

- [92] List A.F., Beran M., DiPersio J et al. Opportunities for Trisenox (arsenic trioxide) in the treatment of myelodysplastic syndromes. *Leukemia*. 2003;17:1499-1507.
- [93] Bellamy W.T., Richter L., Sirjani D. et al. Vascular endothelial cell growth factor is an autocrine promoter of abnormal localized immature myeloid precursors and leukemia progenitor formation in myelodysplastic syndromes. *Blood*. 2001;97:1427-1434.
- [94] Mantovani L., Lentini G., Hentschel B. et al. Treatment of anaemia in myelodysplastic syndromes with prolonged administration of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor and erythropoietin. *British Journal of Haematology*. 2000;109:367-375.
- [95] Negrin R.S., Stein R., Vardiman J. et al. Treatment of the anemia of myelodysplastic syndromes using recombinant human granulocyte colony-stimulating factor in combination with erythropoietin. *Blood*. 1993;82:737-743.
- [96] Catalano L., Selleri C, Callifano C. et al. Prolonged response to cyclosporin-A in hypoplastic refractory anemia and correlation with in vitro studies. *Haematologica*. 2000;85:133-138.
- [97] Hellstrom-Lindberg E. Treatment of adult myelodysplastic syndromes. *International Journal of Hematology*. 1999;70:141-154.
- [98] Aizawa S., Nakano M., Iwase O. et al. Bone marrow stroma from refractory anemia of myelodysplastic syndrome is defective in its ability to support normal CD34-positive cell proliferation and differentiation in vitro. *Leukemia Research*. 1999;23:239-246.

- [99] Hellstrom-Lindberg E., Negrin R.S., Stein R. et al. Erythroid response to treatment with G-CSF plus erythropoietin for the anemia of patients with myelodysplastic syndromes: proposal for a predictive model. *British Journal of Haematology*. 1997;99:344-351.
- [100] Hellstrom-Lindberg E., Ahlgren T., Beguin Y. et al. Treatment of anemia in myelodysplastic syndromes with granulocyte colony-stimulating factor plus erythropoietin: results from a randomized phase II study and long-term follow-up of 71 patients. *Blood*. 1998;92:68-75.
- [101] Kobbe G., Schneider P., Rohr U. et al. Treatment of severe steroid refractory acute graft-versus-host disease with infliximab, a chimeric human/mouse antiTNF α antibody . *Bone Marrow Transplantation*. 2001;28:47-49.
- [102] Ricart E., Panaccione R., Loftus E.V., Tremaine W.J, Sandborn W.J. Infliximab for Crohn's disease in clinical practice at the Mayo clinic: The first 100 patients. *The American Journal of Gastroenterology*. 2001;96:722-729.
- [103] Parker J.E., Mufti G., Rasool F. et al. The role of apoptosis, proliferation , and the Bcl-2 related proteins in the myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemia secondary to MDS. *Blood*. 2000;96:3932-3938.
- [104] Aguayo A, Kantarjian H.M., Manshour T et al. Angiogenesis in acute and chronic leukemias and myelodysplastic syndromes. *Blood*. 2000;96:2240-2245.

Abstract

Study of the effect of anti-TNF α chimeric monoclonal antibody cA2 (Infliximab) therapy on hematopoiesis of patients with myelodysplastic syndromes

By Anna Boula
(Thesis)

Department of Hematology of the University of Crete School of Medicine, University Hospital of Heraklion, P.O. Box 1352, Heraklion, Crete, Greece.

Tumor necrosis factor- α (TNF- α) plays a prominent role in the pathophysiology of myelodysplastic syndromes (MDS). The aim of this study was to explore the biological and immunoregulatory effect of the treatment with the anti-tumor necrosis factor- α monoclonal antibody cA2 on bone marrow (BM) progenitor/precursor and stromal cells and lymphocyte subsets, as well as the clinical response in MDS patients.

Ten low, intermediate-1, -2 risk MDS patients received i.v. cA2 (3 mg/kg) at weeks 0, 2, 6, and 12. The number, survival, and clonogenic potential of BM progenitor/precursor cells, the hematopoiesis-supporting capacity of BM stromal cells, and the lymphocyte activation status were investigated in the patients at baseline and following treatment using flow cytometry, clonogenic assays, and long-term BM cultures (LTBMC). Clinical response was evaluated according to standardized criteria.

cA2 administration reduced the proportion of apoptotic and Fas+ cells in the CD34+ cell compartment ($P = 0.0215$ and $P = 0.0344$, respectively) and increased the clonogenic potential of BM mononuclear and CD34+ cells ($P = 0.0399$ and $P = 0.0304$, respectively) compared with baseline. The antibody reduced tumor necrosis factor- α levels in LTBM supernatants ($P = 0.0043$) and significantly improved the hematopoiesis-supporting capacity of LTBM adherent cells. The proportion of activated peripheral blood and BM T-lymphocytes decreased significantly after treatment, suggesting an immunomodulatory effect of cA2. Two patients displayed minor hematologic responses whereas the remaining patients displayed stable disease with no disease progression.

The encouraging biological insights from cA2 administration may be useful in conducting further clinical trials using cA2 for selected MDS patients, particularly those with evidence of immune-mediated inhibition of hematopoiesis.

Περίληψη

Μελέτη της αποτελεσματικότητας του αντι-TNF α χημειοθεραπευτικού αντισώματος cA2 στη θεραπεία ασθενών με μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα

Άννα Μπουλά
(Διδακτορική Διατριβή)

Αιματολογικό τμήμα του τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου της Κρήτης,
Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Ηρακλείου, Τ.Κ. 1352, Ηράκλειο, Κρήτη, Ελλάδα

Ο παράγοντας νέκρωσης των όγκων α (TNF α) διαδραματίζει εξέχοντα ρόλο στην παθοφυσιολογία των μυελοδυσπλαστικών συνδρόμων (ΜΔΣ). Ο σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν να ερευνηθεί η βιολογική και ανοσορυθμιστική επίδραση της θεραπείας με το μονοκλωνικό αντίσωμα cA2 έναντι του παράγοντα νέκρωσης των όγκων στα προγονικά/πρόδρομα και στρωματικά κύτταρα του μυελού των οστών (ΜΟ), τους λεμφοκυτταρικούς υποπληθυσμούς, καθώς και την κλινική ανταπόκριση των ασθενών με ΜΔΣ.

Δέκα ασθενείς με ΜΔΣ χαμηλού, ενδιάμεσου-1 και -2 κινδύνου έλαβαν cA2 ενδοφλεβίως σε δόση 3mg/kg βάρους σώματος τις εβδομάδες 0, 2, 6 και 12. Ο αριθμός, η επιβίωση, και η κλωνογονική ικανότητα των προγονικών/πρόδρομων κυττάρων, η ικανότητα των στρωματικών κυττάρων του ΜΟ να υποστηρίξουν την

αιμοποίηση και η κατάσταση ενεργοποίησης των λεμφοκυττάρων μελετήθηκαν στους ασθενείς προ και μετά θεραπείας με κυτταρομετρία ροής, κλωνογονικές δοκιμασίες και μακρόχρονες μυελικές καλλιέργειες (LTBMC). Η κλινική ανταπόκριση εκτιμήθηκε με βάση προκαθορισμένα κριτήρια.

Η χορήγηση του cA2 μείωσε την αναλογία των αποπτωτικών και Fas⁺ κυττάρων στο διαμέρισμα των CD34⁺ κυττάρων (P = 0.0215 και P = 0.0344 αντίστοιχα) και αύξησε την κλωνογονική ικανότητα των μονοπύρηνων μυελικών και CD34⁺ κυττάρων (P = 0.0399 and P = 0.0304 αντίστοιχα) σε σύγκριση με τις προ θεραπείας τιμές. Το αντίσωμα μείωσε τα επίπεδα του TNFα στα υπερκείμενα των LTBMC (P = 0.0043) και βελτίωσε σημαντικά την ικανότητα των προσκολλημένων κυττάρων των LTBMC να υποστηρίζουν την αιμοποίηση. Η αναλογία των ενεργοποιημένων T-λεμφοκυττάρων του περιφερικού αίματος και του ΜΟ μειώθηκε σημαντικά μετά τη θεραπεία, καταδεικνύοντας την ανοσορυθμιστική δράση του cA2. Δύο ασθενείς εμφάνισαν ελάχισονα αιματολογική ανταπόκριση ενώ οι υπόλοιποι διατήρησαν σταθερή τη νόσο, χωρίς καμμία εξέλιξη.

Τα ενθαρρυντικά βιολογικά αποτελέσματα από την χορήγηση του cA2 μπορεί να φανούν χρήσιμα στον σχεδιασμό περαιτέρω κλινικών μελετών που θα το χρησιμοποιούν στην θεραπεία επιλεγμένων ασθενών με ΜΔΣ, ιδιαίτερα αυτών με στοιχεία αναστολής της αιμοποίησης μέσω ανοσολογικών μηχανισμών.

Πίνακας 5. Κλινικά και εργαστηριακά χαρακτηριστικά των ασθενών που συμπεριλήφθηκαν αρχικά στην μελέτη*

A/a	Ηλικία/ Φύλο	Διάρκεια (μήνες)	FAB	IPSS	MO Καρνότυπος	MO Βλά- στες (%)	Περιφερικό Αίμα						MO Κυτταρο- βρίθεια	Εξάρτηση από μεταγγίσεις#
							Hgb (g/dL)	WBCs (x10 ⁹ /L)	Neutro (x10 ⁹ /L)	Lympho (x10 ⁹ /L)	Mono (x10 ⁹ /L)	Plts (x10 ⁹ /L)		
1	72/A	28	RARS	Low	46XY	1.3	10.2	8.6	4.9	3.0	0.4	186	Αυξημένη	0
2	75/A	73	RARS	Low	46XY	0.45	8.2	3.8	2.1	1.2	0.3	225	Αυξημένη	9
3	79/F	40	RA	INT-1	47XX, +8 [3], 46XX, del(5q)[2]	0.45	10.0	3.2	1.9	1.0	0.1	223	Increased	12
4	60/Θ	23	RARS	Low	46XX	1.43	8.9	8.8	4.8	2.9	0.8	398	Αυξημένη	0
5	63/A	6	RA	INT-1	46XX	2.22	8.3	4.5	2.5	1.8	0.1	99	Αυξημένη	6
6	70/F	4.5	RA	INT-1	46XX	0.4	10.6	4.0	0.8	2.9	0.3	8	Increased	4
7	80/Θ	74	RA	INT-1	46XX[25]/ 46XX,del(5)(13q33)[2]/ 46XX,del(5q)(q:)[3]	1.3	10.2	2.4	1.4	0.7	0.2	329	Αυξημένη	1
8	73/Θ	6	RAEB	INT-2	47XX, +8 [3]	4.99	8.9	5.1	2.3	1.5	1.3	14	Φυσιολογική	7
9	77/Θ	26	RAEB	Low	46XX[8]/ 46XX,del(5)(q13q33)[12]	2	7.7	18.4	11.0	2.0	0.9	583	Φυσιολογική	19
10	67/Θ	89	RAEB	INT-2	46XX[6]/ 46XX, del(5)(q13q33)[13]/ 47XX, +8[1]	4	6.6	2.4	1.3	0.9	0.2	166	Αυξημένη	6
11	70/A	17	RA	INT-1	46XY	1.4	7	2.2	1.3	0.6	0.2	8	Αυξημένη	21
12	65/A	6	RAEB	INT-2	46XY[17]/ 47XY, +8 [3]	8	8.9	4.6	0.8	2.2	1.5	211	Αυξημένη	19

Συντμήσεις: A/a, αύξων αριθμός ασθενούς· FAB, Γαλλο-Γερμανο-Αγγλική ταξινόμηση· IPSS, Διεθνές Προγνωστικό Σύστημα Βαθμολόγησης· Hgb, αιμοσφαιρίνη· WBC, λευκά αιμοσφαίρια· Neutro, ουδετερόφιλα· Lympho, λεμφοκύτταρα· Mono, μονοκύτταρα· Plts, αιμοπετάλια · MO, μυελός των οστών

* Την μέρα της αναρρόφησης του MO, πριν την χορήγηση του cA2

Μονάδες συμπτωκνωμένων ερυθρών που απαιτήθηκαν τους τελευταίους 6 μήνες

Πίνακας 6. Κλινικά και εργαστηριακά χαρακτηριστικά των ασθενών που ολοκλήρωσαν την θεραπεία*

A/a	Ηλικία/ Φύλο	Διάρκεια (μήνες)	FAB	IPSS	MO Καρνότυπος	MO Βλά- στες (%)	Περιφερικό Αίμα					MO Κυτταρο- βρίθεια	Εξάρτηση από μεταγγίσεις#	
							Hgb (g/dL)	WBCs (x10 ⁹ /L)	Neutro (x10 ⁹ /L)	Lympho (x10 ⁹ /L)	Mono (x10 ⁹ /L)			Plts (x10 ⁹ /L)
1	72/A	28	RARS	Low	46XY	1.3	10.2	8.6	4.9	3.0	0.4	186	Αυξημένη	0
2	75/A	73	RARS	Low	46XY	0.45	8.2	3.8	2.1	1.2	0.3	225	Αυξημένη	9
4	60/Θ	23	RARS	Low	46XX	1.43	8.9	8.8	4.8	2.9	0.8	398	Αυξημένη	0
5	63/A	6	RA	INT-1	46XX	2.22	8.3	4.5	2.5	1.8	0.1	100	Αυξημένη	6
6	70/F	4.5	RA	INT-1	46XX	0.4	10.6	4.0	0.8	2.9	0.3	8	Increased	4
8	73/Θ	6	RAEB	INT-2	47XX, +8 [3]	4.99	8.9	5.1	2.3	1.5	1.3	14	Φυσιολογική	7
9	77/Θ	26	RAEB	Low	46XX[8]/ 46XX,del(5)(q13q33)[12]	2	7.7	18.4	11.0	2.0	0.9	583	Φυσιολογική	19
10	67/Θ	89	RAEB	INT-2	46XX[6]/ 46XX, del(5)(q13q33)[13]/ 47XX, +8[1]	4	6.6	2.4	1.3	0.9	0.2	166	Αυξημένη	6
11	70/A	17	RA	INT-1	46XY	1.4	7	2.2	1.3	0.6	0.2	8	Αυξημένη	21
12	65/A	6	RAEB	INT-2	46XY[17]/ 47XY, +8 [3]	8	8.9	4.6	0.8	2.2	1.5	211	Αυξημένη	19

Συντμήσεις: A/a, αύξων αριθμός ασθενούς· FAB, Γαλλο-Γερμανο-Αγγλική ταξινόμηση· IPSS, Διεθνές Προγνωστικό Σύστημα Βαθμολόγησης· Hgb, αιμοσφαιρίνη· WBC, λευκά αιμοσφαίρια· Neutro, ουδετερόφιλα· Lympho, λεμφοκύτταρα· Mono, μονοκύτταρα· Plts, αιμοπετάλια · MO, μυελός των οστών

* Την μέρα της αναρρόφησης του MO, πριν την χορήγηση του cA2

Μονάδες συμπυκνωμένων ερυθρών που απαιτήθηκαν τους τελευταίους 6 μήνες