



ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

**Μελέτη της *in vitro* κυτταρολυτικής δραστηρότητας των
NK κυττάρων ασθενών πασχόντων από Μυελικές Κακοήθειες**

**ΜΑΡΙΑ Λ. ΤΣΙΡΟΓΙΑΝΝΗ
ΙΑΤΡΟΣ
ΑΙΜΑΤΟΛΟΓΟΣ**

ΑΘΗΝΑ, ΑΠΡΙΛΙΟΣ 2019

Ημερομηνία αίτησης διδακτορικής διατριβής και ορισμού 3μελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής: 08/ 12/ 2010

Ημερομηνία ορισμού 3μελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής: 05/ 07/ 2011

Μέλη 3μελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:

Καφιμάλη Βιολέττα, Καθηγήτρια Μικροβιολογίας Ε.Κ.Π.Α.
Παπαγεωργίου Ευστάθιος, Καθηγητής Αιματολογίας Ε.Κ.Π.Α.
Τσιριγώτης Παναγιώτης, Καθηγητής Αιματολογίας Ε.Κ.Π.Α.

Ημερομηνία ορισμού θέματος διδακτορικής διατριβής: 30/ 09/ 2011

"Η έγκριση διδακτορικής διατριβής από τη Σχολή Θετικών Επιστημών δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνώμων του συγγραφέα"
(Άρθρο 202, Παρ. 2, Ν. 5343/32).

Η προσπάθεια για τη μελέτη αυτή αφιερώνεται
στον Γιάννη και στην Αφροδίτη με την ευχή
να προσπαθούν πάντα υπομονετικά και όσο χρειάζεται
για τους στόχους τους
και να καταφέρνουν πάντα ότι προσπάθησαν.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Για τη διεκπεραίωση της παρούσας διατριβής, θα ήθελα να ευχαριστήσω την τριμελή επιτροπή των Καθηγητών και ιδιαίτερα τον καθηγητή κ.Τσιριγώτη Παναγιώτη για τη συνεχή ακάματη συνεργασία μας και την πολύτιμη και καθοριστική συμβολή του στην ολοκλήρωσή της.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Περίληψη

Abstract

Μεταφράσεις όρων από την Αγγλική

Κατάλογος συντμήσεων

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

σελ. 1

A. Γενικό Μέρος

Κεφάλαιο 1. Οι υπό μελέτη Αιματολογικές Κακοήθειες

Μυελοδυσπλαστικό Σύνδρομο - Οξεία Μυελογενής Λευχαιμία

σελ. 3

1.1 Μυελοδυσπλαστικό Σύνδρομο (ΜΔΣ)

σελ. 3

1.2 Οξεία Μελογενής Λευχαιμία (ΟΜΛ)

σελ. 7

Κεφάλαιο 2. Ανοσορρυθμιστικά κύτταρα και Αιματολογικές

Κακοήθειες (ΜΔΣ-ΟΜΛ)

σελ. 10

2.1 Ανοσολογική δράση των Κυττάρων Φυσικών Φονέων

σελ. 10

2.1.1 NK κύτταρα και Αιματολογικές κακοήθειες (ΜΔΣ-ΟΜΛ)

σελ. 14

2.2 Ανοσολογική δράση των Μυελικών Κατασταλτικών κυττάρων

σελ. 19

2.2.1 MDSCs και Αιματολογικές κακοήθειες (ΜΔΣ-ΟΜΛ)

σελ. 21

2.3 Ανοσολογική δράση των Τ-ρυθμιστικών κυττάρων (Tregs)

σελ. 22

2.3.1 Tregs και Αιματολογικές κακοήθειες (ΜΔΣ-ΟΜΛ)

σελ. 23

2.4 Το ανοσοδραστικό μικροπεριβάλλον του μυελού των οστών στις

Αιματολογικές κακοήθειες (ΜΔΣ-ΟΜΛ)

σελ. 24

Κεφάλαιο 3. Η 5-Αζασυτιδίνη στη θεραπευτική της Οξείας Μυελογενούς Λευχαιμίας και του Μυελοδυσπλαστικού συνδρόμου	σελ. 26
3.1 Η επίδραση της 5-Αζασυτιδίνης στα ανοσορρυθμιστικά κύτταρα	σελ. 29
3.1.1 Η επίδραση της 5-Αζασυτιδίνης στην NK λειτουργικότητα	σελ. 30
3.1.2 Η επίδραση της 5-Αζασυτιδίνης στη λειτουργικότητα των MDSCs και των Tregs	σελ. 31

B. Ειδικό μέρος

Κεφάλαιο 1. Ασθενείς και Μέθοδοι	σελ. 33
1.1 Σκοποί της μελέτης	σελ. 33
1.2 Ασθενείς	σελ. 34
1.2.1 Κριτήρια επιλογής και αποκλεισμού ασθενών και υγιών μαρτύρων	σελ. 34
1.2.2 Καταγραφή κλινικών χαρακτηριστικών των ασθενών και υγιών μαρτύρων	σελ. 35
1.3 Υλικά – Όργανα πειραμάτων	σελ. 38
1.3.1 Υλικά – Όργανα πειραμάτων ελέγχου της NK-κυτταροτοξικότητας	σελ. 38
1.3.2 Υλικά – Όργανα πειραμάτων ελέγχου των υποπληθυσμών ανοσορρυθμιστικών κυττάρων με κυτταρομετρία ροής	σελ. 40
1.4 Εργαστηριακές μέθοδοι	σελ. 43
1.4.1 Απομόνωση των NK κυττάρων περιφερικού αίματος	σελ. 43
1.4.1.1 Προσδιορισμός απόλυτου αριθμού NK κυττάρων δείγματος με τεχνική κυτταρομετρίας ροής και εκτίμηση της έκφρασης στην επιφάνεια των NK κυττάρων των αντιγόνων CD ¹⁶⁻⁵⁶	σελ. 43
1.4.1.2 Απομόνωση των μονοπύρηνων κυττάρων με τεχνική διαβαθμισμένης πυκνότητας από το δείγμα περιφερικού αίματος ασθενών και υγιών μαρτύρων	σελ. 46
1.4.1.3 Προσδιορισμός του απόλυτου αριθμού των απομονωμένων μονοπύρηνων κυττάρων και εκτίμηση της βιωσιμότητάς τους	σελ. 47
1.4.1.4 Ανοσομαγνητικός διαχωρισμός των NK κυττάρων	σελ. 51
1.4.2 Έλεγχος της NK-κυτταροτοξικότητας	σελ. 56

1.4.2.1 Κύτταρα - 'στόχοι' κατά τον έλεγχο της NK-κυτταροτοξικότητας	σελ. 56
1.4.2.2 Διατήρηση κυτταρικών καλλιιεργειών μακράς διάρκειας	σελ. 57
1.4.2.3 Κρυοσυντήρηση κυτταρικών σειρών και απομονωμένων PMNCs ή NK κυττάρων	σελ. 59
1.4.2.4 Απόψυξη κρυοσυντηρημένων κυτταρικών σειρών και επανακαλλιέργειά τους	σελ. 62
1.4.2.5 Δοκιμασία ελέγχου NK-κυτταροτοξικότητας in vitro	σελ. 64
1.4.3 Έλεγχος των υποπληθυσμών ανοσορρυθμιστικών κυττάρων στο περιφερικό αίμα με τεχνική κυτταρομετρία ροής	σελ. 72
1.5 Στατιστικές μέθοδοι που εφαρμόστηκαν	σελ. 85

Κεφάλαιο 2. Αποτελέσματα

2.1 Χαρακτηριστικά Ασθενών - Υγιών μαρτύρων	σελ. 86
2.2 Προσδιορισμός της NK-κυτταροτοξικότητας	σελ. 89
2.3 Πληθυσμοί ανοσορρυθμιστικών κυττάρων	σελ. 99
2.4 Η NK-κυτταροτοξικότητα ως προγνωστικός δείκτης	σελ. 103

Κεφάλαιο 3. Συζήτηση

σελ. 107

Παράρτημα: Έντυπα ενημέρωσης, συναίνεσης και καταγραφής ασθενών και υγιών μαρτύρων	σελ. 112
---	----------

Κατάλογος πινάκων	σελ. 119
--------------------------	----------

Κατάλογος εικόνων	σελ. 120
--------------------------	----------

Κατάλογος γραφημάτων	σελ. 122
-----------------------------	----------

Βιβλιογραφικές αναφορές	σελ. 123
--------------------------------	----------

Δημοσίευση

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στην παρούσα προοπτική μελέτη εκτιμήθηκε η συσχέτιση μεταξύ της NK κυτταροτοξικής δραστηριότητας, των Μυελικών Κατασταλτικών κυττάρων (Myeloid Derived Suppressor cells - MDSCs) και των T-ρυθμιστικών κυττάρων (T-Regulatory cells – Tregs), ως προς τη διάρκεια της ανταπόκρισης και την ολική επιβίωση, ασθενών πασχόντων από υψηλού κινδύνου Μυελοδυσπλαστικό σύνδρομο (ΜΔΣ) ή ολιγοβλαστική Οξεία Μυελογενή Λευχαιμία (ΟΜΛ) που λάμβαναν θεραπεία με τον υπομεθυλιωτικό παράγοντα 5-Αζασυτιδίνη. Ο απώτερος σκοπός της μελέτης ήταν η αναγνώριση πρώιμων βιοδεικτών με προγνωστική σημασία ως προς την συνολική ανταπόκριση των ασθενών αυτών στη χορηγούμενη θεραπεία.

Οι ασθενείς που συμμετείχαν στην παρούσα μελέτη είχαν ήδη λάβει τουλάχιστον τρεις κύκλους θεραπείας με τον υπομεθυλιωτικό παράγοντα 5-Αζασυτιδίνη. Η *in vitro* προσδιορισμένη NK-κυτταροτοξικότητα σε αυτή την ομάδα των ασθενών έχει προγνωστική αξία ως προς τη διάρκεια της ανταπόκρισης και ως προς την ολική επιβίωση, οι ασθενείς που επιδείκνυαν υψηλή NK-κυτταροτοξικότητα παρουσίαζαν μακρύτερη επιβίωση και μακρύτερη διάρκεια ανταπόκρισης σε σύγκριση με τους ασθενείς που επιδείκνυαν χαμηλή NK-κυτταροτοξικότητα. Οι πληθυσμοί των ανοσορρυθμιστικών κυττάρων MDSCs και Tregs στο περιφερικό αίμα ασθενών μετά βραχεία έκθεση σε 5-Αζασυτιδίνη, δε διέφεραν στατιστικώς σημαντικά σε σύγκριση με τον πληθυσμό των υγιών μαρτύρων.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της μελέτης μας, η θεραπευτική δράση της 5-Αζασυτιδίνης διενεργείται, τουλάχιστον μερικώς, μέσω ανοσορρυθμιστικής επίδρασης του παράγοντα αυτού. Με βάση την πρόσφατη αναζήτηση της βιβλιογραφίας, η μελέτη αυτή αποτελεί την πρώτη δημοσιευμένη μελέτη που καταγράφει θετική συσχέτιση μεταξύ της NK-κυτταροτοξικότητας και της ολικής επιβίωσης ασθενών υπό 5-Αζασυτιδίνη.

ΘΕΜΑΤΙΚΗ ΠΕΡΙΟΧΗ: Ανοσοτροποποιητική δράση της 5-Αζασυτιδίνης

ΛΕΞΕΙΣ ΚΛΕΙΔΙΑ: Κύτταρα φυσικοί φονείς, NK κυτταροτοξικότητα,

Αζασυτιδίνη, Μυελοδυσπλαστικό σύνδρομο,

Οξεία Μυελογενής Λευχαιμία

ABSTRACT

In our study, we prospectively examined the correlation between NK-cytotoxic activity, Myeloid-derived Suppressor cells (MDSCs) and T-Regulatory cells (Tregs), with the duration of response (DOR) and the overall survival (OS) of patients with high-risk myelodysplastic syndrome (MDS) and oligoblastic acute myeloid leukaemia (AML) treated with 5-Azacytidine (AZA), with the aim to identify early biomarkers predictive of the final outcome. Patients enrolled at the study had already received at least three cycles of 5-Azacytidine treatment. Peripheral blood NK-cytotoxicity at completion of chemotherapy is predictive of DOR and OS; AZA-treated patients with high NK-cytotoxicity survived longer and response to treatment was sustained for a longer period than patients with low NK-cytotoxicity. In contrast, numbers of MDSCs and Tregs in the peripheral blood (PB) of patients after a short exposure to 5-Azacytidine were not significantly different from normal donors. The results of our study suggest that the therapeutic activity of 5-Azacytidine is at least partly mediated by an immunomodulatory effect. To our knowledge, this is the first study that shows a positive correlation between NK-cytotoxicity and OS of AZA-treated patients.

SUBJECT AREA: Immunomodulatory effect of 5-Azacytidine

KEYWORDS: Natural killer cell, NK-cytotoxicity, 5-Azacytidine, myelodysplastic syndrome, acute myeloid leukaemia

ΜΕΤΑΦΡΑΣΕΙΣ ΟΡΩΝ ΑΠΟ ΤΗΝ ΑΓΓΛΙΚΗ

Adaptive Tregs: Προσαρμοσμένα Τ-Ρυθμιστικά κύτταρα

Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity: Κυτταροτοξικότητα σχετιζόμενη με το αντίσωμα

Anti-leukemia Cytolytic Activity: Ειδική αντιλευχαιμική κυτταρολυτική δραστηριότητα

Anti-thymocyte globulin: Αντιθυμοκυτταρική σφαιρίνη

Area Under the Curve: Επιφάνεια κάτω από την καμπύλη

Best supportive care: Βέλτιστη υποστηρικτική περίθαλψη

Cells: Κύτταρα

Clonal Hematopoiesis of Indeterminate Potential: Κλωνική Αιμοποίηση Αδιευκρίνιστου Δυναμικού

Cytotoxicity: Κυτταροτοξικότητα

Debris: Κυτταρικά συντρίμματα

DNA-Methyltransferase: DNA-Μεθυλοτρανσφεράση

Domain: Πεδίο

Driver Mutations: Μεταλλάξεις Οδηγοί

Endogenous Retrovirus: Ενδογενής Ρετροϊός

Gating: Οριοθέτηση

Graft versus Host disease: Δράση Μοσχεύματος έναντι Ξενιστή

Graft versus Leukemia effect: Δράση Μοσχεύματος έναντι Λευχαιμίας

Granulocytic MDSC: Πολυμορφοπυρηνικός τύπος MDSC

Immune Tyrosine-based Inhibitory Motif: Προσδέτης Τυροσίνης με Ανασταλτικό Ερέθισμα

Intermediate-1: Ενδιαμέσου-1

International Prognostic Scoring System: Διεθνές Σύστημα

Βαθμολόγησης Πρόγνωσης

IPSS-Revised: Αναθεωρημένο IPSS

Killer immunoglobulin (Ig) - like receptors: Φονικοί υποδοχείς προσομοιάζοντες στην ανοσοσφαιρίνη

Laminar air flow hood: Θάλαμος καθέτου νηματικής ροής

MDS- Excess Blasts: ΜΔΣ με Περίσσεια Βλαστών

MDS-Excess blasts in Transformation: ΜΔΣ με περίσσεια βλαστών σε εκτροπή

MDS-Multilineage Dysplasia: ΜΔΣ με Πολυγραμμική Δυσπλασία

MDS-Ring Sideroblasts: ΜΔΣ με Δακτυλιοειδείς Σιδηροβλάστες

MDS-Single Lineage Dysplasia: ΜΔΣ με Μονογραμμική Δυσπλασία

MDS-Unclassified: ΜΔΣ- Αταξινόμητο

Myeloid Derived Suppressor cells: Μυελογενή Κατασταλτικά Κύτταρα

Monocytic MDSC: Μονοκυτταρικός τύπος MDSC

Natural Cytotoxicity Receptors: Υποδοχείς Φυσικής Κυτταροτοξικότητας

Natural Tregs: Φυσικά Τ-Ρυθμιστικά κύτταρα

Nitric Oxide: Μονοξείδιο του Αζώτου

Performance Status: Κατάσταση Ικανότητας

Peripheral Mononuclear cells: Περιφερικά Μονοπύρρηνα κύτταρα

Primed NK cells: Ενεργοποιημένα NK κύτταρα

Receiver Operating Curve: Καμπύλη Λειτουργίας Δέκτη

Resting NK cells: Αδρανή NK κύτταρα

Signal-transducing Proteins: Πρωτεΐνες μεταγωγής σήματος

Transcription Factors: Μεταγραφικοί Παράγοντες

T Regulatory cells: Τ Ρυθμιστικά Λεμφοκύτταρα

TNF-Related Apoptosis Inducing Ligand: Προσδέτης ενεργοποίησης

απόπτωσης σχετιζόμενης με τον TNF

Tumor Necrosis Factor: Παράγοντας Νέκρωσης των Όγκων

Two Ig Domains and Long Cytoplasmic Tail 1: Δύο πεδία
Ανοσοσφαιρίνης και Μακρά Ενδοκυτταροπλασματική ουρά

Unpaired t-test : t-test μεταξύ ανεξαρτήτων δειγμάτων

World Health Organisation: Παγκόσμια Οργάνωση Υγείας

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΥΝΤΜΗΣΕΩΝ

(Συντμήσεις και ανάπτυξή τους)

Ελληνικοί όροι

ΑΒ: Αιματολογική Βελτίωση

ΑΦ: Ανοσοφαινότυπος

ΜΔΣ: Μυελοδυσπλαστικό σύνδρομο

ΜΣΙ: Μείζον Σύμπλεγμα Ιστοσυμβατότητας

ΜΥ: Μερική Ύφεση

ΟΜΛ: Οξεία Μυελογενής Λευχαιμία

ΠΑ: Πλήρες αίμα

ΠΥ: Πλήρης Ύφεση

Αγγλικοί όροι

ADCC: Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity

ARG1: Arginase-1

ATG: Anti-thymocyte globulin

AUC: Area Under the Curve

BSC: Best Supportive Care

CALGB: Cancer and Leukemia Group B

CEBPA: CCAAT/enhancer binding protein α gene

Cs: Cells

CHIP: Clonal Hematopoiesis of Indeterminate Potential

DNMT: DNA-Methyltransferase

ERV: Endogenous Retrovirus

FasL: Fas Ligand

FITC: Fluorescein Isothiocyanate

FLT3-ITD: FMS-like Tyrosine Kinase-3 Internal Tandem Duplication

FLT3-TKD: FMS-like Tyrosine Kinase-3 Tyrosine Kinase Domain

FoxP3: Forkhead box P3

FSC: Forward-Scattered light

GvHD: Graft versus Host Disease

GvL Effect: Graft versus Leukemia Effect

HBsAg: Hepatitis B surface Antigen

HBSS: Hanks' Balanced Salt Solution

HCV: Hepatitis C Virus

HIV: Human Immunodeficiency Virus

iNOS-2: Nitric Oxide Synthase-2

INT-1: Intermediate-1

IPSS: International Prognostic Scoring System

IPSS-R: IPSS Revised

ITIM: Immune Tyrosine-based Inhibitory Motif

IWG: International Working Group

KIR: Killer Immunoglobulin (Ig) - like Receptors

KIR2DL1: Killer Immunoglobulin (Ig) - like Receptors with Two Ig
Domains and Long Cytoplasmic tail 1

LCA: Anti-leukemia Cytolytic Activity

MDSCs: Myeloid Derived Supressor Cells

MDS-EB: MDS-Excess Blasts

MDS-EB-T: MDS - Excess Blasts in Transformation

MDS-MLD: MDS-Multilineage Dysplasia

MDS-RS: MDS-Ring Sideroblasts

MDS-SLD: MDS-Single Lineage Dysplasia

MDS-U: MDS-Unclassified

MLL-PTD: Mixed-Lineage Leukemia gene Partial Tandem Duplication

NCR: Natural Cytotoxicity Receptors

NK: Natural Killer cells

NMP1: Nucleophosmin 1 gene

NO: Nitric Oxide

nTregs: natural Tregs

PBS: Phosphate-Buffered Saline

PE: Phycoerythrin

PML-RARA: Promyelocytic Leukemia/Retinoic acid Receptor Alpha

PMNCs: Peripheral Mononuclear Cells

pNKcs: primed NK cells

rNKcs: resting NK cells

ROC: Receiver Operating Curve

RPMI: Roswell Park Memorial Institute

RAEB-II: Refractory Anemia with Excess Blasts

SSC: Side-Scattered light

TB: Trypan Blue

TGF-b: Transforming Growth Factor-b

TNF: Tumor Necrosis Factor

Tox: Cytotoxicity

TRAIL: TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand

Tregs: T-regulatory cells

WHO: World Health Organisation

Wt1: Wilms' tumor 1 gene

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Τα κύτταρα φυσικοί φονείς (Natural Killer cells - NKcs) έχουν πλέον αναγνωριστεί ως ισχυροί διαμεσολαβητές της αυτόλογης ανοσολογικής αντίδρασης έναντι των νεοπλασματικών κυττάρων στόχων και αποτελούν δυνητικό πεδίο για την μελλοντική ανάπτυξη και εφαρμογή της NK-διαμεσολαβούμενης αντινεοπλασματικής κυτταρικής ανοσοθεραπείας. Επιπρόσθετα και άλλα ανοσορρυθμιστικά κύτταρα όπως τα Ρυθμιστικά Τ κύτταρα -T Regulatory Cells (Tregs) καθώς και τα Μυελικά Κατασταλτικά κύτταρα - Myeloid Derived Suppressor cells (MDSCs), συμμετέχουν δραστικά στην ενδογενή ανοσοεπιτήρηση και προστασία έναντι των νεοπλασματικών νοσημάτων γενικά και ειδικά έναντι των αιματολογικών κακοηθειών.

A. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

Οι υπό μελέτη Αιματολογικές κακοήθειες

Μυελοδυσπλαστικό Σύνδρομο - Οξεία Μυελογενής Λευχαιμία

1.1 Μυελοδυσπλαστικό Σύνδρομο

Το Μυελοδυσπλαστικό σύνδρομο (ΜΔΣ) αποτελεί κλωνική αιματολογική κακοήθεια του προγονικού αιμοποιητικού κυττάρου και χαρακτηρίζεται κύρια από την μη αποδοτική αιμοποίηση και από τον αυξημένο ρυθμό απόπτωσης των κυττάρων του μυελού. Το ΜΔΣ περιλαμβάνει ένα σχετικά ευρύ φάσμα κλινικών και εργαστηριακών εκδηλώσεων. Τα μείζονα κλινικά προβλήματα που σχετίζονται με την εκδήλωση του ΜΔΣ προκαλούνται από τις προκύπτουσες κυτταροπενίες αλλά και από την δυνητική εξέλιξη της νόσου σε Οξεία Μυελογενή Λευχαιμία (ΟΜΛ). Στον γενικό πληθυσμό η επίπτωση του ΜΔΣ προσδιορίζεται σε 4,9 ασθενείς ανά 100000 άτομα, ανά έτος. Η νόσος είναι σπάνια στην ομάδα των νεαρών ενηλίκων, εφήβων και παιδιών, ωστόσο στην ομάδα των ατόμων ηλικίας μεταξύ 70-79 ετών παρουσιάζει επίπτωση 30,2 ασθενείς ανά 100000 άτομα, ενώ αυξάνει ακόμη περισσότερο σε άτομα ηλικίας μεγαλύτερης των 80 ετών, όπου φθάνει τους 59,8 ασθενείς ανά 100000 άτομα ανά έτος.

Χρειάστηκαν δεκαετίες έρευνας προκειμένου να αναγνωριστούν οι γενετικές διαταραχές που σχετίζονται παθοφυσιολογικά με την ανάπτυξη της νόσου και σήμερα είμαστε σε θέση να γνωρίζουμε, εν πολλοίς, το πεδίο των μεταλλάξεων αυτών. Τα σχετιζόμενα μεταλλαγμένα γονίδια ταξινομούνται ανάλογα με το μόριο που κωδικοποιούν στις εξής κατηγορίες μεταλλαγμένων μορίων: πρωτεΐνες μεταγωγής σήματος (Signal-Transducing Proteins), μεταγραφικούς παράγοντες (Transcription Factors), στοιχεία για τη σύζευξη του RNA, πρωτεΐνες που συμμετέχουν στη διαίρεση του κυττάρου καθώς και επιγενετικούς τροποποιητές. Όλες αυτές οι κατηγορίες γονιδίων διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην παθογένεια του ΜΔΣ.[1-9] Αρχικά συμβαίνει μια εναρκτήρια μετάλλαξη που προσδίδει πολλαπλασιαστικό προβάδισμα

στο μεταλλαγμένο προγονικό αιμοποιητικό κύτταρο έναντι των φυσιολογικών, ευνοώντας δυνητικά την κλωνική έκπτυξη του παθολογικού κυττάρου. Η αρχική αυτή βλάβη δεν είναι ικανή να προκαλέσει εκδήλωση νόσου καθώς κυτταρογενετικές αναλύσεις σε υγιείς μάρτυρες αποκάλυψαν την παρουσία κλωνικής αιμοποίησης λόγω σωματικών μεταλλάξεων σε ποσοστό 10% των ατόμων ηλικίας >65 ετών και σε >20% προκειμένου για άτομα ηλικίας >90 ετών. Η ανεύρεση κλωνικής αιμοποίησης με σύγχρονη απουσία αιματολογικής κακοήθειας ορίζεται ως "Κλωνική Αιμοποίηση Αδιευκρίνιστου Δυναμικού" (Clonal Hematopoiesis of Indeterminate Potential - CHIP) και η ανεύρεσή της συνοδεύεται από αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης αιματολογικού νοσήματος μελλοντικά.[10–13] Οι συνήθεις μεταλλάξεις που ανιχνεύονται στη διαταραχή CHIP, αφορούν τα γονίδια DNMT3A, ASXL1, TET2, τα οποία αποκαλούνται "μεταλλάξεις οδηγό" (Driver Mutations) και αποτελούν πρώιμα γενετικά συμβάντα που ευνοούν ή διευκολύνουν την επιγενετική απορρύθμιση με αποτέλεσμα ακόλουθες αθροιζόμενες γενετικές μεταλλάξεις, που οδηγούν τελικά στην εκδήλωση του ΜΔΣ/ΟΜΛ.[13–16] Στοχευμένη ανάλυση αλληλουχιών γενετικού υλικού σε περιορισμένο αριθμό γονιδίων αποκάλυψε μεταλλάξεις σε ποσοστό 80-90% των ασθενών με ΜΔΣ, οι συνηθέστερες δε είναι οι SF3B1, TET2, SRSF2, ASXL1, DNMT3A, RUNX1, U2AF1, TP53, και EZH2.5.

Προκειμένου να τεθεί η διάγνωση του ΜΔΣ απαιτείται εργαστηριακή τεκμηρίωση κυτταροπενίας σε εξέταση περιφερικού αίματος, σταθερής επί τουλάχιστον έξι μήνες ή επί δύο μήνες σε περίπτωση συνυπάρχουσας ειδικής καρυοτυπικής ανωμαλίας ή αναγνώριση διγραμμικής τουλάχιστον δυσπλασίας σε κύτταρα μυελού των οστών. Επιπρόσθετα η διάγνωση ΜΔΣ απαιτεί να πληρείται ένα τουλάχιστον από τα έξης τρία κριτήρια:

- 1) αναγνώριση δυσπλασίας σε τουλάχιστον 10% των κυττάρων μιας ή περισσότερων εκ των τριών κύριων κυτταρικών μυελικών σειρών,
- 2) παρουσία βλαστικών μυελικών κυττάρων σε ποσοστό 5-19% και

3) ανάδειξη μιας τουλάχιστον ειδικής καρυοτυπικής ανωμαλίας όπως del(5q), -7/del(7q), del(20q) και +8 (στην περίπτωση των ανωμαλιών del(20q) και +8 θα πρέπει να συνυπάρχουν μορφολογικές διαταραχές ως επί ΜΔΣ κατά την εξέταση του μυελικού επιχρίσματος).

Συνυπάρχοντα κριτήρια συμβάλλουν στην ενίσχυση της διάγνωσης του ΜΔΣ όπως είναι η παθολογική έκφραση ανοσοφαινοτύπου μυελικών κυττάρων με εξέταση κυτταρομετρίας ροής, η έκτοπη έκφραση του αντιγόνου επιφανείας CD34, η παθολογική ιστολογική εικόνα μυελού των οστών (ίνωση ή παθολογικά ευρήματα εξέτασης ανοσοιστοχημείας, παρουσία δυσπλαστικών μεγακαρυοκυττάρων ή έκτοπη θέση άωρων προγονικών κυττάρων μυελού των οστών). Τα παραπάνω κριτήρια διάγνωσης ΜΔΣ συνοψίζονται στις συστάσεις της πρόσφατης Διεθνούς Συνεργατικής Ομάδας Εργασίας. [17]

Σύμφωνα με την πρόσφατη (2016) ανανεωμένη ταξινόμηση της Παγκόσμιας Οργάνωσης Υγείας (WHO) αναγνωρίζονται έξι οντότητες ΜΔΣ: ΜΔΣ Μονογραμμικής Δυσπλασίας (MDS-Single Lineage Dysplasia / MDS-SLD), ΜΔΣ με Δακτυλιοειδείς Σιδηροβλάστες (MDS-Ring Sideroblasts / MDS-RS), ΜΔΣ με Πολυγραμμική Δυσπλασία (MDS-Multilineage Dysplasia / MDS-MLD), ΜΔΣ με Περίσσεια Βλαστών (MDS-Excess Blasts / MDS-EB), ΜΔΣ με Μονήρη Βλάβη del(5q) και ΜΔΣ Αταξινόμητο (MDS-Unclassified / MDS-U) [18]. Η ομάδα MDS-EB διακρίνεται περαιτέρω με κριτήριο των αριθμό των βλαστικών κυττάρων κατά την ιστολογική εξέταση του μυελού των οστών ή κατά την μικροσκοπική εξέταση επιχρίσματος αίματος σε MDS-EB-1 όταν τα βλαστικά κύτταρα δεν ξεπερνούν το 10% στον μυελό και προσδιορίζονται σε 2-4% στο αίμα και σε MDS-EB-2 όταν κυμαίνονται μεταξύ 10-19% στον μυελό και σε 5-19% στην εξέταση του αίματος.

Αναγνωρισμένες προγνωστικές παράμετροι που κύρια επηρεάζουν τη δυναμική εξέλιξης της νόσου σε ΟΜΛ, είναι το πλήθος των κυτταροπενιών, ο αριθμός των βλαστικών κυττάρων στην εξέταση μυελού των οστών καθώς και οι υπάρχουσες κυτταρογενετικές ανωμαλίες. Επιπρόσθετα των προηγούμενων παραμέτρων, προγνωστική σημασία για την επιβίωση των ασθενών έχει το φύλο και η

ηλικία. Η εκδήλωση της κυτταροπενίας ανά σειρά ορίστηκε με βάση τα παρακάτω όρια: επίπεδα $Hgb \leq 10 \text{ gr/dl}$, επίπεδα απόλυτου αριθμού ουδετεροφίλων $\leq 1800/\mu\text{L}$ και επίπεδα απόλυτου αριθμού αιμοπεταλίων $\leq 100000/\mu\text{L}$. Κυτταρογενετικές βλάβες ευνοϊκής πρόγνωσης θεωρούνται ο φυσιολογικός καρυότυπος, η μονήρης απουσία του "Y" χρωμοσώματος και οι μονήρεις ελλείψεις των 5q και 20q. Δυσμενούς πρόγνωσης κυτταρογενετική ανωμαλία είναι η παρουσία σύνθετου καρυότυπου με τουλάχιστον τρεις ή περισσότερες ανωμαλίες στον ίδιο κλώνο κυττάρων καθώς και οι βλάβες που αφορούν το χρωμόσωμα 7, ενώ ενδιάμεσης πρόγνωσης θεωρείται κάθε άλλη κυτταρογενετική βλάβη.

Ο συνδυασμός των προγνωστικών παραμέτρων που αναφέρθηκαν διαμόρφωσε ένα προγνωστικό μοντέλο, το Διεθνές Σύστημα Προγνωστικού σκορ (IPSS), που διακρίνει τους ασθενείς σε τέσσερις υποομάδες ανάλογα με το διάμεσο χρόνο εξέλιξης της νόσου σε ΟΜΛ του 25% των ασθενών έκαστης ομάδας: Χαμηλού κινδύνου (31% των ασθενών), με διάμεσο χρόνο εξέλιξης τα 9,4 έτη; Ενδιάμεσου κινδύνου-1 (Intermediate-1/INT-1) (39% των ασθενών), με διάμεσο χρόνο εξέλιξης τα 3,3 έτη; Ενδιάμεσου κινδύνου-2 (Intermediate-2/INT-2) (22% των ασθενών), με διάμεσο χρόνο εξέλιξης το 1,1 έτος; και Υψηλού κινδύνου (8% των ασθενών), με διάμεσο χρόνο εξέλιξης τους 2,4 μήνες. Το προγνωστικό αυτό μοντέλο επιτυγχάνει και την διαστρωμάτωση των ασθενών σε αντίστοιχες τέσσερις υποομάδες ως προς τη διάμεση επιβίωσή τους: Χαμηλού κινδύνου με διάμεση επιβίωση 5,7 έτη, INT-1 με διάμεση επιβίωση 3,5 έτη, INT-2 1,2 έτη και υψηλού κινδύνου 4,8 μήνες αντίστοιχα.[19] Στο διάστημα που παρήλθε από τον αρχικό σχεδιασμό και την υλοποίηση της παρούσας μελέτης, αναπτύχθηκε η ανανεωμένη έκδοση του προγνωστικού αυτού σκορ (IPSS-Revised / IPSS-R), όπου διαμορφώνονται πέντε αντί για τέσσερις ομάδες προγνωστικού κινδύνου με βελτίωση της διαστρωμάτωσης του κυτταρογενετικού προγνωστικού κινδύνου καθώς και της προγνωστικής σημασίας του αριθμού των μυελικών βλαστικών κυττάρων, ενώ το όριο

της ουδετεροπενίας ως έκφραση κυτταροπενίας λαμβάνεται χαμηλότερο.
[20]

Η χορηγούμενη θεραπεία εκτιμάται με βάση την ταξινόμηση του ασθενούς σύμφωνα με το IPSS σκορ, συνυπολογίζοντας την ηλικία του ασθενούς, την κατάσταση ικανότητάς του και τη συνυπάρχουσα συνοσηρότητα που εκδηλώνει. Όλοι οι ασθενείς λαμβάνουν υποστηρικτικά μέτρα ενώ με βάση την ταξινόμησή τους, χορηγείται θεραπεία για μεν τους χαμηλού κινδύνου ασθενείς και τους ασθενείς INT-1 με σκοπό την βελτίωση των αιματολογικών παραμέτρων, ενώ για τους ασθενείς INT-2 και υψηλού κινδύνου η θεραπεία αποσκοπεί στην ανατροπή της δυσμενούς πορείας της νόσου. Σε χαμηλού κινδύνου ασθενείς (\leq INT-1) συστήνεται χορήγηση αυξητικών παραγόντων της ερυθράς σειράς, μεταγγίσεις παραγώγων αίματος και αποσιδήρωση όταν απαιτείται. Ανοσοκατασταλτικοί παράγοντες όπως η Κυκλοσπορίνη, η Αντιθυμοκυτταρική σφαιρίνη (ATG), καθώς και ο ανοσοτροποποιητικός παράγοντας Λεναλιδομίδη, συστήνονται σε χαμηλού κινδύνου υποπλαστικό ΜΔΣ. Στους ασθενείς προγνωστικού κινδύνου INT-2 καθώς και στους υψηλού κινδύνου, χορηγούνται υπομεθυλιωτικοί παράγοντες (5-Αζασυτιδίνη, Ντεσιταμπίνη), χημειοθεραπευτικοί παράγοντες (Ινταρουμπικίνη, Αρασυτίνη, Φλουνταραμπίνη, Τοποτεκάμη) και στους ασθενείς ηλικίας \leq 70 ετών, ικανούς να ανεχθούν αποτελεσματικά ισχυρή θεραπεία συστήνεται αλλογενής μεταμόσχευση αιμοποιητικών προγονικών κυττάρων, η οποία αποτελεί και τη μόνη θεραπευτική πρακτική ικανή να επιφέρει ίαση του νοσήματος.

1.2 Οξεία Μυελογενής Λευχαιμία (ΟΜΛ)

Η Οξεία Μυελογενής Λευχαιμία (ΟΜΛ) χαρακτηρίζεται γενικά από βαριά πρόγνωση κύρια δε για τους ασθενείς ηλικίας μεγαλύτερης των 60 ετών οι οποίοι αποτελούν και την πλειονότητα των πασχόντων από τη νόσο αυτή. Σύμφωνα με την ανανεωμένη ταξινόμηση της Παγκόσμιας Οργάνωσης Υγείας (WHO-2016),[18] προκειμένου να τεθεί η διάγνωση

της νόσου το ποσοστό των μυελοβλαστών σε δείγμα μυελού των οστών ή αίματος θα πρέπει να υπερβαίνει το 20%, ενώ η παρουσία χαρακτηριστικών δομικών κυτταρογενετικών ανωμαλιών όπως είναι οι: $t(8;21)$, $inv(16)$ ή $t(16;16)$ και $t(15;17)$, θέτουν τη διάγνωση της νόσου ανεξάρτητα από το ποσοστό των μυελοβλαστών.

Η πρόγνωση της νόσου προσδιορίζεται κύρια από τις υπάρχουσες κυτταρογενετικές και μοριακές διαταραχές, την αδυναμία επίτευξης πλήρους ύφεσης μετά τον πρώτο κύκλο χημειοθεραπείας εφόδου και από τον υψηλό αρχικό αριθμό λευκών ($\geq 40000/\mu\text{L}$).

Η θεραπεία θα πρέπει να εξατομικεύεται σύμφωνα με τα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά του ασθενούς όπως είναι η ηλικία, η συνοσηρότητα και η κατάσταση ικανότητας. Σημαντική συμβολή στην απόφαση του είδους της προτεινόμενης θεραπείας έχει η πιθανή προϋπάρχουσα λήψη χημειοθεραπείας και το πιθανά προϋπάρχον μυελοδυσπλαστικό σύνδρομο. Η θεραπευτική προσέγγιση της ΟΜΛ βασίζεται σε χημειοθεραπευτικά πρωτόκολλα θεραπείας εφόδου και ακόλουθης θεραπείας εδραίωσης της ανταπόκρισης λόγω της υψηλής πιθανότητας υποτροπής της νόσου, με τους υψηλού κινδύνου ασθενείς να λαμβάνουν ισχυρότερα και τοξικότερα σχήματα θεραπειών. Η αλλογενής μεταμόσχευση αποτελεί μέχρι σήμερα την κύρια ικανή θεραπεία να επιφέρει ίαση στους πάσχοντες από ΟΜΛ, κατά κύριο λόγο μέσω της ανοσολογικής δράσης του μοσχεύματος έναντι των λευχαιμικών κυττάρων (Graft versus Leukaemia Effect- GvL Effect). Τα τελευταία 40 έτη ελάχιστα έχει διαφοροποιηθεί ο βασικός σκελετός της χημειοθεραπευτικής προσέγγισης της νόσου που απαρτίζεται κύρια από Ανθρακυκλίνη σε συνδυασμό με Αρασιτίνη. Ηλικιωμένοι ασθενείς, ασθενείς με σημαντική συνοσηρότητα ή όσοι εκφράζουν άρνηση να λάβουν ισχυρή χημειοθεραπεία, μπορούν να λάβουν υπομεθυλιωτικούς παράγοντες (5-Αζασυτιδίνη ή Ντεσιταμπίνη), χαμηλές δόσεις Αρασιτίνης ή μόνο υποστηρικτικά μέτρα με Υδροξουρία.

Στην ανανεωμένη ταξινόμηση των αιματολογικών κακοηθειών της Παγκόσμιας Οργάνωσης Υγείας του 2016,[18] σημειώνεται ότι οι ασθενείς που διαγιγνώσκονται ως πάσχοντες από ΟΜΛ με διαταραχές

προσομοιάζουσες με αυτές Μυελοδυσπλαστικού συνδρόμου και αριθμό βλαστικών κυττάρων μυελού των οστών που κυμαίνεται μεταξύ 20-29%, παρουσιάζουν ομαλότερη πορεία συμβατή περισσότερο με ΜΔΣ και η νόσος ορίζεται ως ΜΔΣ-με περίσσεια βλαστών σε εκτροπή (MDS–Excess Blasts in Transformation, MDS-EB-T). Οι ασθενείς αυτοί δύνανται να αντιμετωπισθούν είτε ως ασθενείς πάσχοντες από ΟΜΛ, είτε ως ασθενείς πάσχοντες από ΜΔΣ, συνεκτιμώντας παραμέτρους που αφορούν τόσο τον ασθενή όσο και τη φυσική πορεία της νόσου.

Σε τυχαίοποιημένη διεθνή μελέτη φάσεως III σε ασθενείς πάσχοντες από υψηλού κινδύνου ΜΔΣ όπου συμπεριλήφθηκε και ομάδα ασθενών με διάγνωση ολιγοβλαστικής ΟΜΛ (ποσοστό βλαστών 20-30%), αναγνωρίστηκε η στατιστικά σημαντική υπεροχή του υπομεθυλιωτικού παράγοντα 5-Αζασυτιδίνη σε αυτή την ομάδα των ασθενών, έναντι των συχνά εφαρμοζόμενων θεραπειών. [21-22]

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

Ανοσορρυθμιστικά κύτταρα και Αιματολογικές κακοήθειες

(ΜΔΣ-ΟΜΛ)

2.1 Ανοσολογική δράση των Κυττάρων Φυσικών Φονέων

(Natural Killer cells-NKcs)

Τα NK κύτταρα αναγνωρίζουν και λύουν τα κύτταρα στόχους τους ανεξάρτητα από την παρουσία ειδικού αντιγόνου σε αυτά και ανεξάρτητα από την έκφραση των αντιγόνων του Μείζονος Συμπλέγματος Ιστοσυμβατότητας (ΜΣΙ). Αποτελώντας το 10-15% των περιφερικών λεμφοκυττάρων του αίματος τα ώριμα NK κύτταρα αναγνωρίζονται ανοσοφαινοτυπικά από την έκφραση στην επιφάνειά τους του αντιγόνου CD56 και από την σύγχρονη απουσία έκφρασης του αντιγόνου CD3.

Ο ρόλος των NK κυττάρων στους μηχανισμούς ανοσοεπιτήρησης έναντι της ανάπτυξης νεοπλασματικών κυττάρων είναι πλέον εδραιωμένος. Ο ανοσολογικά διαμεσολαβούμενος έλεγχος της Οξείας Μυελογενούς Λευχαιμίας (ΟΜΛ) μετά από τη χορήγηση αλλογενούς μοσχεύματος μέσω της καλούμενης "Δράσης Μοσχεύματος έναντι Λευχαιμίας " (Graft versus Leukemia - GvL) και η διερεύνηση των υπεύθυνων για αυτόν λεμφοκυτταρικών υποπληθυσμών, ανέδειξε τον σημαντικό ρόλο των NK κυττάρων. Το ενδιαφέρον για την αντιλευχαιμική δράση των NK κυττάρων ολοένα και αυξάνεται, εστιάζοντας κύρια στην δράση τους έναντι των υπολειπόμενων λευχαιμικών κυττάρων μετά από τη δράση της χημειοθεραπείας.

Η λειτουργία των NK κυττάρων ρυθμίζεται από ένα πλήθος υποδοχέων της κυτταρικής τους μεμβράνης, ενεργοποιητικών και ανασταλτικών, καθώς επίσης και από τα αντίστοιχα μόρια πρόσδεσης σε αυτούς. Μέχρι σήμερα έχουν αναγνωριστεί τρεις κύριες ομάδες NK κυτταρικών υποδοχέων στα ανθρώπινα NK κύτταρα: οι προσομοιάζοντες με ανοσοσφαιρίνη φονικοί υποδοχείς (Killer Immunoglobulin Like Receptors - KIR) οι οποίοι αναγνωρίζουν τα κλασικά μόρια του

Μείζονος Συμπλέγματος Ιστοσυμβατότητας - ΜΣΙ τάξεως Ι, οι υποδοχείς τύπου C-λεκτίνης (ετεροδιμερή CD94/NKG2) οι οποίοι αναγνωρίζουν τα μη κλασσικά μόρια του ΜΣΙ τάξεως Ι ή προσομοιάζοντα προς αυτά μόρια και οι υποδοχείς φυσικής κυτταροτοξικότητας (Natural Cytotoxicity Receptors-NCR) των οποίων οι προσδέτες ελάχιστα έχουν αναγνωρισθεί.[23-25]

Τα γονίδια των KIR υποδοχέων είναι πολυμορφικά με υψηλή ομολογία και εδράζονται στο χρωμόσωμα 19q13.4. Οι υποδοχείς KIR ταξινομούνται ανάλογα με τον αριθμό των εξωκυττάρων ανοσοσφαιρινικών πεδίων που διαθέτουν (2 Domains – 2D, 3 Domains – 3D) και ανάλογα με το μήκος της ενδοκυτταροπλασματικής τους απόληξης, αν είναι μακριά (Long-L) ή βραχεία (Short-S). Οι KIR πρωτεΐνες με μακριά ενδοκυτταροπλασματική απόληξη (KIR2DL, KIR3DL) διαμεσολαβούν ανασταλτικά σήματα μετά την πρόσδεσή τους με προσδέτη τυροσίνης με προκαλούμενο ανασταλτικό ερέθισμα (Immune Tyrosine-based Inhibitory Motif – ITIM) στη δράση των NK κυττάρων, ενώ οι KIR υποδοχείς με βραχεία ενδοκυτταροπλασματική απόληξη (KIR-DS) διαμεσολαβούν ενεργοποιητικά σήματα. Αξίζει να σημειωθεί ότι οι KIR υποδοχείς αναγνωρίζουν ομάδες μορίων του ΜΣΙ και όχι μεμονωμένα αντιγόνα.[23-25] Η έκφραση των KIR υποδοχέων είναι ανεξάρτητη της έκφρασης των αντιγόνων του ΜΣΙ κάθε ατόμου ενώ έχουν αναγνωρισθεί σε ανθρώπους κλώνοι NK κυττάρων που παρουσιάζουν απόλυτη απουσία έκφρασης ανασταλτικών KIR υποδοχέων συμβατών με τα ιδιοτυπικά μόρια ΜΣΙ του αυτού ατόμου.[26]

Τέσσερεις τύποι υποδοχέων της οικογένειας NKG2 έχουν αναγνωρισθεί, οι NKG2A (και η παραλλαγή του NKG2B), NKG2C, NKG2E (και η παραλλαγή του NKG2H), και ο NKG2F. Από τους υποδοχείς αυτούς μόνο ο CD94/NKG2A (και η παραλλαγή του NKG2B) έχει ανασταλτική δράση, ενώ οι υπόλοιποι μεταφέρουν σήματα ενεργοποίησης. Οι επιμέρους NK κλώνοι φέρουν αποκλειστικά είτε ανασταλτικούς CD94/NKG2 υποδοχείς είτε ενεργοποιητικούς, ενώ υπάρχουν και υποκλώνοι με συνέκφραση αυτών. Ο NKG2D αποτελεί μη

τυπικό ενεργοποιητικό υποδοχέα αυτής της οικογένειας που οι προσδέτες του είναι μόρια προσομοιάζοντα προς τα τάξεως I μόρια ΜΣΙ και περιλαμβάνουν τους προσδέτες MICA και MICB. Τα μόρια MICA/B αρχικά θεωρούνταν ότι εκφράζονταν αποκλειστικά στα επιθηλιακά κύτταρα, σήμερα ωστόσο έχουν αναγνωριστεί σε πολλαπλούς τύπους νεοπλασματικών κυττάρων συμπεριλαμβανομένων λευχαιμικών και λεμφωματικών κυτταρικών σειρών. [23-25]

Οι υποδοχείς φυσικής κυτταροτοξικότητας (NCR) τέλος, θεωρούνται οι κύριοι ρυθμιστές των ενεργοποιητικών σημάτων των NK κυττάρων. Μέχρι σήμερα έχουν αναγνωριστεί τρεις, οι NKp30, NKp44 και NKp46. Οι NKp30 και NKp46 εκφράζονται τόσο σε ενεργοποιημένα όσο και σε μη ενεργοποιημένα κύτταρα ενώ η έκφραση του NKp44 περιορίζεται μόνο στα ενεργοποιημένα NK κύτταρα. [23-25]

Η πρόσδεση ενεργοποιητικών ή ανασταλτικών υποδοχέων των NK κυττάρων με τους αντίστοιχους προσδέτες τους στα κύτταρα στόχους, προκαλεί την μεταφορά αντίστοιχων ενεργοποιητικών ή ανασταλτικών ενδοκυττάρων σημάτων, ώστε τελικά η δράση του NK κυττάρου έναντι του κυττάρου στόχου να παριστάνει την απόλυτη αθροιστική συνέργεια αυτών των σημάτων μέσα από σύνθετους συσχετισμούς.[27]

Όταν ένα κύτταρο στόχος με τα κατάλληλα αντιγόνα επιφανείας προκαλεί την ενεργοποίηση του NK κυττάρου και στη συνέχεια πυροδοτεί την έναρξη της κυτταρολυτικής του δράσης, απελευθερώνονται ενδοκυττάρια περφορίνη και granzyme B με αποτέλεσμα την απόπτωση του κυττάρου. Τα ενεργοποιημένα NK κύτταρα μπορούν να επιφέρουν επίσης απόπτωση των κυττάρων στόχων τους μέσω έκκρισης του FasL και ακόλουθης αλληλεπίδρασης με τον Fas στην επιφάνεια του NK κυττάρου, καθώς και μέσω έκκρισης του προσδέτη ενεργοποίησης απόπτωσης σχετιζόμενης με τον TNF (TNF-Related Apoptosis Inducing Ligand -TRAIL). Τα NK κύτταρα τέλος, διαθέτουν και εξαρτώμενη από το αντίσωμα κυτταροτοξική δράση (Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity-ADCC) εκφράζοντας στην πλειονότητά τους τον υποδοχέα FcγRIII -CD16, ο οποίος συνδέεται με το Fc τμήμα των ανοσοσφαιρινών.

Σήμερα γνωρίζουμε ότι τα "αδρανή" NK κύτταρα (resting NK cells – rNKcs) διέρχονται από διεργασία προετοιμασίας δύο σταδίων προκειμένου να καταστούν δραστικά: "priming"- "ενεργοποιητική" και "triggering"- "ερεθιστική". Η προετοιμασία αυτή των αδρανών NK κυττάρων προκαλείται μέσω της συνεργατικής αλληλεπίδρασης του υποδοχέα CD16 με τους υποδοχείς DNAM-1, CD2 και 2B4. Τα NK-ευαίσθητα νεοπλασματικά κύτταρα ευοδώνουν και τις δύο διεργασίες. Τα NK-ανθεκτικά νεοπλασματικά κύτταρα διαφεύγουν της NK-κυτταρολυτικής δράσης κύρια μέσω αδυναμίας να προκαλέσουν το στάδιο του "priming" των NK κυττάρων.[28]

Πρόσφατα αναγνωρίστηκε νεοπλασματική σειρά, η CTV-1, ικανή να επιφέρει "ενεργοποίηση" των αδρανών NK κυττάρων, μη ικανή ωστόσο να "ερεθίσει" περαιτέρω την εκδήλωση κυτταρολυτικής δραστικότητας. Η NK "ενεργοποίηση" από τα νεοπλασματικά κύτταρα προκαλείται κύρια μέσω πρόσδεσης στο CD2 ενός προσδέτη στην περιοχή του CD15 της επιφάνειας του νεοπλασματικού κυττάρου. Η NK-ανθεκτική νεοπλασματική σειρά Raji καθίσταται NK-ευαίσθητη με μεταφορά στην επιφάνεια της του CD15. Ο αποκλεισμός του CD15 στην ιδιαίτερα NK-ευαίσθητη νεοπλασματική σειρά K562, αναστέλλει σημαντικά την NK-κυτταρόλυση, όπως και ο αποκλεισμός του CD2 στα αδρανή NK κύτταρα.[28]

Ο αποκλεισμός των υποδοχέων τύπου-C λεκτίνης καταστέλλει σημαντικά την μέσω νεοπλασματικών κυττάρων ενεργοποίηση των NK κυττάρων, ενώ ο αποκλεισμός των υποδοχέων που προσομοιάζουν με ανοσοσφαιρίνη (KIR) δεν επηρεάζει την ενεργοποίηση των NK κυττάρων, η οποία συμβαίνει ανεξάρτητα από την έκφραση των αντιγόνων MΣΙ. Η ενεργοποίηση των NK κυττάρων μέσω της αλληλεπίδρασης με νεοπλασματικά κύτταρα επιφέρει σταθερά ενεργοποιημένη κατάσταση των NK κυττάρων που διατηρείται και ανακτάται ακόμη και μετά την κρυοκατάψυξή τους. 28,29]

Μέχρι σήμερα αρκετές δημοσιεύσεις έχουν αναφέρει τη δυνατότητα ex vivo ενεργοποίησης και έκπτυξης ανθρώπινων NK κυττάρων με εφαρμογή διαφόρων πρωτοκόλλων που έχουν ως βάση την επίδραση

κυτταροκινών (IL2, IL12, IL15). Η ex vivo επίδραση των κυτταροκινών προκαλεί ενίσχυση της κυτταροτοξικής δράσης των NK κυττάρων έναντι νεοπλασματικών κυττάρων στόχων σε σύγκριση με μη επεξεργασμένα NK κύτταρα, πιθανά μέσω τροποποίησης του φαινοτύπου των NK κυττάρων ή της εκκριτικής τους λειτουργίας.[30,31]

2.1.1 NK κύτταρα και Αιματολογικές κακοήθειες (ΜΔΣ-ΟΜΛ)

Σήμερα γνωρίζουμε ότι η πλειονότητα των λευχαιμικών κυττάρων παρουσιάζει μειωμένη έκφραση των αντιγόνων επιφανείας του ΜΣΙ-τάξεως I τύπου A και από τα αλληλία τύπου B τα αντιγόνα της ομάδας Bw6, ενώ διατηρούν ανεπηρέαστη την έκφραση των αλληλίων της ομάδας Bw4, περιορίζοντας την κυτταροτοξική δράση των NK-κυττάρων αλλά και των κυτταροτοξικών T-λεμφοκυττάρων.[33]

Ειδική NK-αντιλευχαιμική κυτταρολυτική δραστηριότητα στην ΟΜΛ

Τα απομονωθέντα μονοπύρνα κύτταρα του περιφερικού αίματος (Peripheral Blood Mononuclear cells – PBMC) ασθενών πασχόντων από ΟΜΛ σε φάση ύφεσης της νόσου επιδεικνύουν ειδική αντιλευχαιμική κυτταρολυτική δραστηριότητα (Anti-leukemia Cytolytic Activity - LCA) έναντι των αυτόλογων λευχαιμικών βλαστών,[34] τόσο μετά από Αυτόλογη Μεταμόσχευση Αιμοποιητικών κυττάρων όσο και μετά από συμβατική χημειοθεραπεία.[35-37] Η LCA φαίνεται να διενεργείται αποκλειστικά από τον υποπληθυσμό των CD56⁺/CD8α⁺/CD3⁻ κυττάρων, δηλαδή από τα NK κύτταρα.[35-37] Τα NK κύτταρα στο περιφερικό αίμα ασθενών κατά την διάγνωση της ΟΜΛ βρίσκονται σε φυσιολογικά επίπεδα και υποστηρίζεται πως η ανάπτυξη αυτών των κυττάρων δεν επηρεάζεται από τη νόσο.[34] Επιπρόσθετα τα NK κύτταρα ασθενών με ΟΜΛ δε φέρουν τις κυτταρογενετικές βλάβες των αντίστοιχων λευχαιμικών βλαστών.[34] Όπως ήδη αναφέρθηκε η NK κυτταρολυτική δράση αποτελεί το αθροιστικό αποτέλεσμα των αλληλεπιδράσεων των επιφανειακών υποδοχέων τους με τους αντίστοιχους προσδέτες τους στα κύτταρα στόχους. Λύση του κυττάρου στόχου επέρχεται όταν η

επίδραση των διεγερμένων ενεργοποιητικών υποδοχέων υπερισχύει έναντι ασθενέστερων σημάτων από την διέγερση ανασταλτικών υποδοχέων. Αυτό θα μπορούσε να προκύπτει από την επαυξημένη έκφραση ενεργοποιητικών υποδοχέων ή των αντίστοιχων προσδετών τους ώστε τα ενδοκυττάρια σήματα που μεταφέρονται να υπερέχουν των αντίστοιχων ανασταλτικών.[39] Ωστόσο σύμφωνα με την ανάλυση του φαινοτύπου NK κυττάρων προερχόμενων από ασθενείς πάσχοντες από ΟΜΛ κατά τη διάγνωση της νόσου, ως προς την έκφραση αναγνωρισμένων λειτουργικών υποδοχέων, δεν υπήρξαν σημαντικές διαφορές σε σύγκριση με τα NK κύτταρα υγιών ατόμων. Στην ανάλυση αυτή συμπεριλήφθηκαν δείκτες ωρίμανσης και ενεργοποίησης των NK κυττάρων όπως οι CD16, CD161, CD69 και CD94, ανασταλτικοί KIR υποδοχείς (CD158a`KIR2DL1, CD158b`KIR2DL2/3) καθώς επίσης και ενεργοποιητικοί υποδοχείς όπως οι NKG2D και NKp46.[34]

Οι Lowdell και συν. απέδειξαν πως στους ασθενείς με ΟΜΛ που υποβλήθηκαν σε Αυτόλογη Μεταμόσχευση Αιμοποιητικών κυττάρων υπάρχει συσχέτιση μεταξύ της διενεργούμενης από τα αυτόλογα CD56⁺/8wk⁺ NK κύτταρα ειδικής κυτταρολυτικής δραστηριότητας και της κλινικής τους πορείας.[35] Ακολούθως η ίδια ομάδα απέδειξε πως ο βαθμός της NK-κυτταροτοξικής δράσης έναντι αυτόλογων λευχαιμικών βλαστών σε πάσχοντες από ΟΜΛ μετά ολοκλήρωση της χημειοθεραπείας, θα μπορούσε να αποτελεί προγνωστικό δείκτη του κινδύνου ακόλουθης υποτροπής.[36] Η παρουσία LCA <12,2% διαμεσολαβούμενη από τα NK κύτταρα σε φάση ύφεσης της νόσου αποτελεί προγνωστικό δείκτη ακόλουθης υποτροπής στα επόμενα δύο έτη με ευαισθησία 100% και ειδικότητα 77%.[36] Η διατήρηση ανοσολογικής αντίδρασης αυτολόγου ή αλλογενούς προέλευσης έναντι των υπολειπόμενων λευχαιμικών κυττάρων αποτελεί τον παράγοντα κλειδί για την συντήρηση της όποιας επιτευχθείσας ανταπόκρισης της νόσου ή ακόμη και για την επίτευξη ίασης αυτής.

Η ενίσχυση της κυτταροτοξικής δράσης των NK κυττάρων έναντι νεοπλασματικών κυττάρων, μέσω της επίδρασης IL-2 αποτέλεσε ερευνητικό πεδίο στην αντιμετώπιση των αιματολογικών κακοηθειών. Η

εξωγενής (ex vivo) μέσω IL2 ενεργοποίηση NK κυττάρων ασθενών με ΟΜΛ συμβάλλει στην ενίσχυση της κυτταροτοξικής λειτουργίας τους έναντι των βλαστικών κυττάρων, τόσο κατά την ύφεση της νόσου όσο και κατά τη διάγνωση, ενώ ο ενεργοποιημένος αυτός πολυκλωνικός πληθυσμός NK κυττάρων δε διαφέρει ως προς την επιφανειακή έκφραση υποδοχέων (NKG2D και NKp46) σε σύγκριση με τα NK κύτταρα υγιών μαρτύρων.[34,37] Η ενδοφλέβια χορήγηση ενδιάμεσων δόσεων IL-2 φαίνεται να ακολουθείται από σημαντική αύξηση του πληθυσμού των NK και T κυττάρων, κύρια ωστόσο του πληθυσμού των NK κυττάρων με ισχυρή έκφραση του επιφανειακού αντιγόνου CD56 (τα οποία διαθέτουν κύρια ρυθμιστική παρά κυτταροτοξική δραστηριότητα), καθώς και από ενισχυμένη NK κυτταρολυτική δράση.[40,41] Οι σχετικές αναφορές, ωστόσο, δεν μπορούν να υποστηρίξουν ιδιαίτερα ελπιδοφόρα κλινικά αποτελέσματα με αυτή την θεραπευτική προσέγγιση.

Έχει ήδη καταδειχθεί πως η παρουσία λευχαιμικών βλαστών ανθεκτικών σε NK κύτταρα αυτόλογα ή αλλογενή συσχετίζεται με αυξημένη πιθανότητα επικείμενης υποτροπής. Ωστόσο δεν είναι γνωστό αν η απουσία NK κυτταροτοξικής δράσης σχετίζεται αποκλειστικά με τα NK κύτταρα ή με τους λευχαιμικούς βλάστες ή προκύπτει από την μεταξύ τους αλληλεπίδραση. Θα μπορούσε να υποθέσει κανείς πως η αυξημένη ή η ελαττωμένη έκφραση ενεργοποιητικών ή ανασταλτικών υποδοχέων αντίστοιχα στα ενεργοποιημένα NK κύτταρα θα προκαλούσε ενίσχυση της NK κυτταρολυτικής δράσης.

Σε δημοσιευμένη μελέτη οι Lowdell και συν. έδειξαν ότι τα ανθρώπινα NK κύτταρα ενεργοποιούνται (primed) σε συνεαπώαση με τη νεοπλασματική κυτταρική σειρά CTV-1, παρουσιάζοντας ενισχυμένη κυτταρολυτική δραστηριότητα έναντι άλλων νεοπλασματικών κυττάρων ακόμη και αν αυτά φέρουν ανασταλτικούς προσδέτες. Η κυτταρική σειρά CTV-1 διαφεύγει της λύσης λόγω έλλειψης αντιγόνων επιφανείας απαραίτητων να πυροδοτήσουν τη κυτταρολυτική δράση των ενεργοποιημένων NK κυττάρων (triggering), γεγονός που καθιστά τη σειρά αυτή επίσης ανθεκτική και στα ενεργοποιημένα NK κύτταρα υπό την επίδραση κυτταροκινών.[38] Στη μελέτη αυτή φάνηκε επίσης πως η δράση των

primed-NKcs(pNKcs) δεν επηρεάζεται από τα τυχόν ανασταλτικά σήματα που μεταφέρουν οι KIR υποδοχείς.[38] Επιπρόσθετα σε περιορισμένο αριθμό ασθενών με ΟΜΛ ελέγχθηκε η κυτταροτοξική δράση των pNKcs έναντι των αυτόλογων βλαστικών κυττάρων και βρέθηκε ενισχυμένη σε ποικίλο βαθμό.[38]

Κλινική μελέτη φάσεως I διενεργήθηκε με σκοπό τη διερεύνηση της κλινικής δράσης απλοταυτόσημων αλλογενών NK-κυττάρων ενεργοποιημένων εξωγενώς μέσω νεοπλασματικών κυττάρων. Η ex vivo ενεργοποίηση των απομονωμένων NK κυττάρων (pNKcs) πραγματοποιούνταν με χρήση λυσίνης από τη νεοπλασματική σειρά CTV-1, ικανή να επιφέρει το πρώτο στάδιο ενεργοποίησης των NK-κυττάρων μετά συνεπώασή τους. Ακολουθούσε έκπτυξη και επανέγχυση των ενεργοποιημένων NK κυττάρων. Στην μελέτη εντάχθηκαν υψηλού κινδύνου ηλικιωμένοι (>60ετών) ασθενείς πάσχοντες από ΟΜΛ σε 1η και 2η πλήρη ύφεση ή σε 1η μερική ύφεση καθώς και νεώτεροι ασθενείς σε πολλαπλή πλήρη ύφεση μη δυνάμενοι να υποβληθούν σε αλλογενή μεταμόσχευση. Σύμφωνα με το σχεδιασμό της μελέτης οι ασθενείς έλαβαν απλοταυτόσημα pNKcs μετά από προετοιμασία με χαμηλής δόσης ολοσωματική ακτινοβολία και μικρή δόση φλουνταραμπίνης. Μετά από διάστημα παρακολούθησης έξι μηνών, τρεις ασθενείς που είχαν ήδη επιτύχει πλήρη ύφεση νόσου διατήρησαν την ανταπόκριση, ένας ασθενής που ήταν σε μερική ύφεση νόσου πέτυχε πλήρη ύφεση νόσου, δύο ασθενείς υποτροπίασαν και ένας απεβίωσε. Ένα έτος μετά τη χορήγηση των κυττάρων ένας ασθενής παρέμεινε σε πλήρη ύφεση νόσου. Τέσσερεις ασθενείς παρέμειναν σε πλήρη ύφεση για διάστημα μεγαλύτερο από το διάστημα της αμέσως προηγούμενης πλήρους ύφεσης. Μετά διάστημα παρακολούθησης δύο ετών, έξι από τους επτά ασθενείς απεβίωσαν με διάμεση ολική επιβίωση 400 ημερών μετά την έγχυση των pNKcs (εύρος 141–910 ημέρες). Η έγχυση των κυττάρων δε συνοδεύτηκε από τοξικότητα ή εκδηλώσεις GvHD, σημειώθηκε όμως παρατεταμένη κυτταροπενία (διάμεσο διάστημα ουδετεροφιλικής ανάπλασης 55 ημέρες), με συνέπεια οι ασθενείς να τίθενται σε υψηλό κίνδυνο λοιμώξεων καθώς και σε παρατεταμένη ανάγκη μεταγγίσεων.

Αυτή ήταν η πρώτη κλινική μελέτη NK κυτταρικής ανοσοθεραπείας χωρίς τη χορήγηση IL-2 ή άλλης κυτταροκίνης. Τα ΜΣΙ-ασύμβατα NK κύτταρα επιβίωσαν και εκπύχθηκαν in vitro χωρίς ανάγκη παράλληλης ανοσοκατασταλτικής αγωγής και εκδήλωσαν αντιλευχαιμική δράση σε 4/7 ασθενείς.[42]

Σύμφωνα με δημοσιευμένα αποτελέσματα αυτόλογα ενεργοποιημένα NK κύτταρα-primed NK cells(pNKcs) ασθενών με ΟΜΛ παρουσιάζουν έναντι αυτόλογων λευχαιμικών βλαστών ανάλογη κυτταροτοξική δραστηριότητα συγκρινόμενη με αυτή αλλογενών pNK κυττάρων [38], λαμβάνοντας ωστόσο υπόψη τον περιορισμένο αριθμό των μελετηθέντων ατόμων. Το μήνυμα είναι ιδιαίτερα ελπιδοφόρο καθώς σημαίνει πως πιθανά ανάλογο θεραπευτικό αποτέλεσμα με αυτό της προαναφερθείσας μελέτης θα μπορούσε να επιτευχθεί με τη χορήγηση αυτόλογων pNK κυττάρων, αποφεύγοντας την ανάγκη χημειοθεραπευτικών σχημάτων προετοιμασίας και τις πιθανές συνεπαγόμενες ανεπιθύμητες ενέργειές τους.

Η διατήρηση της αυτόλογης NK αντιλευχαιμικής κυτταρολυτικής δραστηριότητας μετά την χημειοθεραπεία πέραν ενός ορίου με τη χορήγηση παθητικής κυτταρικής ανοσοθεραπείας με εξωγενώς ενεργοποιημένα αυτόλογα NK κύτταρα, πιθανά μπορεί να παρατείνει τη φάση ύφεσης αποτελώντας δραστική συμπληρωματική θεραπεία ιδιαίτερα χρήσιμη για τους ασθενείς υψηλού κινδύνου χωρίς δυνατότητα αλλογενούς μεταμόσχευσης.

NK- κυτταρολυτική δραστηριότητα στο ΜΔΣ

Συγκριτικά με υγιείς μάρτυρες αναλόγου ηλικίας οι ασθενείς με ΜΔΣ παρουσιάζουν σημαντικά ελαττωμένο αριθμό CD7⁺ λεμφοκυττάρων, NK-κυττάρων καθώς και σημαντικό περιορισμό στην έκφραση του CD16. Τα NK-κύτταρα αυτών των ασθενών παρουσιάζουν περιορισμένη τόσο την κυτταροτοξική τους δράση όσο και την έκφραση κυτταροκινών.[32] Υπάρχουν αναφορές για συμμετοχή των NK κυττάρων στον παθολογικό κλώνο του ΜΔΣ μέσω αναγνώρισης των ίδιων κυτταρογενετικών

ανωμαλιών.[75] Σε *in vitro* μελέτη τα NK κύτταρα ασθενών πασχόντων από ΜΔΣ επέδειξαν περιορισμένη NK κυτταροτοξική δραστικότητα συνεπεία της μειωμένης έκκρισης IFN- γ και TNF- α , υπό ενεργοποίηση με Ιντερλευκίνη-2.[75] Τα λειτουργικά ελλείμματα που παρουσιάζουν τα NK κύτταρα αποδίδονται, τουλάχιστον μερικώς, στην περιορισμένη έκφραση ενεργοποιητικών υποδοχέων στην κυτταρική μεμβράνη των κυττάρων, όπως οι NKp30, NKG2D, DNAM-1.[74-77] Σύμφωνα ωστόσο με άλλη παρατήρηση οι συμπαράγοντες ενεργοποίησης των NK-κυττάρων DNAM-1, CD2 και 2B4 δεν παρουσιάζουν διαφοροποίηση μεταξύ ασθενών με ΜΔΣ και υγιών μαρτύρων.[32]

2.2 Ανοσολογική δράση των Μυελικών Κατασταλτικών κυττάρων (MDSCs)

Τα Μυελικά Κατασταλτικά κύτταρα - Myeloid Derived Suppressor cells (MDSCs) περιγράφηκαν αρχικά τη δεκαετία του 1970 ως κατασταλτικά κύτταρα ικανά να αναστέλλουν τον πολλαπλασιασμό των βοηθητικών T-λεμφοκυττάρων υπό τη δράση μιτογόνων και διαφόρων αλλοαντιγόνων. Εξ' αρχής τέθηκε η υποψία για τη σημαντική συμβολή τους στην ανοσοκαταστολή και την επαγωγή ανοχής που επέρχεται κατά την ανάπτυξη των νεοπλασιών. Ωστόσο τεχνικοί ερευνητικοί περιορισμοί επιβράδυναν τη μελέτη τους και η ακριβής αναγνώριση του ρόλου τους έγινε εφικτή στα τέλη του '90 και έκτοτε η σχετική έρευνα είναι συνεχής και εξελισσόμενη.

Τα μυελικά κατασταλτικά κύτταρα καταστέλλουν την ενεργοποίηση των T-λεμφοκυττάρων κατά τις οξείες ή χρόνιες λοιμώξεις ή τις ιστικές βλάβες, προστατεύοντας από την μη ελεγχόμενη ανοσολογική διέγερση ή από την ανάπτυξη αυτοανόσων αντιδράσεων έναντι ιστικών αντιγόνων. Τα MDSCs προέρχονται από μυελική κυτταρική σειρά και αποτελούν μια ετερογενή ομάδα κυττάρων αποτελούμενη από προγονικά μυελικά κύτταρα, πρόδρομα κύτταρα των πολυμορφοπυρήνων, μακροφάγα και δενδριτικά κύτταρα. Τα MDSCs παίζουν πρωταρχικό ρόλο στη διαμόρφωση της ανοσολογικής

απάντησης και στην πλαστικότητα των CD4⁺ T-λεμφοκυττάρων. Κυτταροκίνες και διάφοροι διαλυτοί παράγοντες που εκλύονται σε διάφορες παθολογικές καταστάσεις όπως νεοπλασίες, λοιμώξεις, τραύματα, αυτοάνοσα νοσήματα, μεταμόσχευση μυελού των οστών, προκαλούν πολλαπλασιασμό των άωρων κυττάρων της μυελικής αυτής σειράς, μερική αναστολή της διαφοροποίησής τους και παραγωγή των δύο κύριων υποτύπων αυτών των κυττάρων, των κοκκιοκυτταρικών (Granulocytic/G-MDSCs) και των μονοκυτταρικών (Monocytic/M-MDSCs), τα οποία ακολούθως μεταναστεύουν σε ιστούς και δευτερογενή λεμφικά όργανα όπου ασκούν την ανοσορυθμιστική τους δράση. Η συχνότητα έκφρασης των δύο αυτών κύριων υποτύπων, των πολυμορφοπυρηνικών/G-MDSCs και των μονοκυτταρικών/M-MDSCs, διαφέρει στους διάφορους ιστούς. Στους νεοπλασματικούς ασθενείς ο κυρίαρχος υπότυπος είναι ο πολυμορφοπυρηνικός (70-80% των MDSCs).[43-49] Σύμφωνα με νεώτερα δεδομένα αυτοί οι δύο υπότυποι δεν είναι απόλυτα διακριτοί πλήρως διαφοροποιημένοι μυελικοί πληθυσμοί, αλλά αναπαριστούν δύο διαφορετικά στάδια διαφοροποίησης του αυτού πληθυσμού.[50] Στον άνθρωπο τα MDSCs ανοσοφαινοτυπικά αναγνωρίζονται ως CD11b⁺,CD33⁺, HLA-DR^{-/low}. Ο πολυμορφοπυρηνικός υπότυπος G-MDSC χαρακτηρίζεται από την έκφραση CD14⁻,CD15⁺, ενώ ο μονοκυτταρικός υπότυπος M-MDSC από την έκφραση CD14⁺,CD15^{low/-}. [51]

Η ανοσοκατασταλτική δράση των MDSCs διενεργείται έμμεσα και άμεσα. Η ενεργοποίησή τους διαμεσολαβείται από μεταγραφικούς παράγοντες και επιφέρει αυξημένη έκφραση ανοσοκατασταλτικών παραγόντων όπως οι Arginase-1 (ARG1) και Nitric Oxide Synthase-2 (iNOS2), ενίσχυση της δράσης του συμπλέγματος NADPH οξειδάσης και αύξηση της σύνθεσης NO, ROS, RNS και κυττοκινών (Interleukin-10, Transforming Growth Factor-b / TGF-b). Οι έμμεσοι μηχανισμοί περιλαμβάνουν την προαγωγή και έκπτυξη ανοσορυθμιστικών υποπληθυσμών όπως είναι τα T-Ρυθμιστικά κύτταρα (T-Regulatory cells / Tregs). Κατά την ενεργοποίησή τους τα MDSCs εκφράζουν υψηλά επίπεδα του ενζύμου Αργινάση 1, το οποίο καταναλώνοντας την L-

Αργινίνη αναστέλλει την έκφραση της f-αλυσίδας του συμπλέγματος CD3 των T-λεμφοκυττάρων επιδρώντας στη δράση τους. Η f-αλυσίδα του συμπλέγματος CD3 των T-λεμφοκυττάρων είναι ο κύριος διαμεσολαβητής του συμπλέγματος TCR και απαραίτητο δομικό συστατικό του συμπλέγματος. Η έλλειψη L-Αργινίνης επιφέρει αναστολή του κυτταρικού κύκλου των T-λεμφοκυττάρων, διατηρώντας τα στη φάση G0-G1.[52-54] Το ένζυμο Nitric Oxide Synthase-2 (iNOS2) οξειδώνει την L-Αργινίνη σε Μονοξειδίο του Αζώτου (Nitric Oxide-NO) ασκώντας άμεση προαποπτωτική δράση στα T-λεμφοκύτταρα, μέσω συσσώρευσης του p53.[55,56] Τα ενεργοποιημένα MDSCs παρουσιάζουν αυξημένη παραγωγή IL-2 ενώ εκφράζουν και άλλους πρώιμους ενεργοποιητικούς δείκτες. Τα MDSCs ανταγωνίζονται τα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα ως προς την κατανάλωση εξωκυττάριας κυστεΐνης. Περιορίζοντας την εξωκυττάρια δεξαμενή κυστεΐνης αποστερούν τα T-λεμφοκύτταρα από το απαραίτητο αυτό συστατικό για την ενεργοποίησή τους αλλά και για τη λειτουργία τους.[57]

Στη σύγχρονη θεραπευτική θα ήταν πολύ σημαντική η ανάπτυξη της δυνατότητας ελέγχου της δράσης των MDSCs είτε προς την κατεύθυνση της ενίσχυσης της αντινεοπλασματικής ανοσολογικής απόκρισης είτε προς την κατεύθυνση του περιορισμού της ανοσολογικής αντίδρασης στις αυτοάνοσες νόσους ή και κατά τον χειρισμό απόρριψης αλλογενών μοσχευμάτων.

2.2.1 MDSCs και Αιματολογικές κακοήθειες (ΜΔΣ-ΟΜΛ)

Ασθενείς πάσχοντες από ΜΔΣ αναφέρεται ότι εμφανίζουν σημαντικά αυξημένα ποσοστά των ανοσοκατασταλτικών CD33⁺ MDSCs, τα οποία παρουσιάζουν αρνητική συσχέτιση με τους υποπληθυσμούς λεμφοκυττάρων και τον περιορισμό του υποδοχέα CD16 των NK κυττάρων.[32] Στο αίμα ασθενών πασχόντων από ΜΔΣ διαπιστώνεται στατιστικώς σημαντική αύξηση του αριθμού των MDSCs στην ομάδα των ασθενών προγνωστικού κινδύνου INT-2/Υψηλού έναντι της ομάδας INT-1/Χαμηλού, υποδηλώνοντας τη σημαντική συμβολή των κυττάρων

αυτών στην απορρύθμιση της ανοσοεπιτήρησης στην εξέλιξη του νοσήματος αυτού. Επίσης ασθενείς με λιγότερα από 5% βλαστικά κύτταρα στον μυελό φάνηκε να έχουν στατιστικά αυξημένο αριθμό MDSCs σε σύγκριση με υγιείς μάρτυρες.[58] Παρόμοια ευρήματα έχουν καταγραφεί και σε άλλες αιματολογικές κακοήθειες όπως σε ασθενείς πάσχοντες από ΧΜΛ.[54]

2.3 Ανοσολογική δράση των T-ρυθμιστικών κυττάρων (Tregs)

Τα T-ρυθμιστικά κύτταρα (T-Regulatory cells/Tregs) συμβάλλουν δραστικά στην ανοσοεπιτήρηση των νεοπλασματικών νοσημάτων. Ο περιορισμός της λειτουργικότητάς τους παίζει σημαντικό ρόλο στην εκδήλωση των αυτοανόσων νοσημάτων, ενώ η έκπτυξή τους κατά την εκδήλωση των νεοπλασματικών νοσημάτων περιορίζει σημαντικά την αντιγονοεξαρτώμενη αντινεοπλασματική ανοσολογική αντίδραση. Τα Tregs παρουσιάζονται αυξημένα σε μικροκυτταρικό καρκίνωμα πνεύμονα, καρκίνο ωοθήκης, μαστού, παγκρέατος και κόλου.

Τα Tregs είναι T-λεμφοκύτταρα που διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση ή την καταστολή άλλων κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος. Τα κύτταρα αυτά ρυθμίζουν την ανοσιακή απόκριση προς αυτό- ή άλλο-αντιγόνα και προλαμβάνουν την εκδήλωση αυτοανόσων παθήσεων. Τα Tregs που παράγονται στο θύμο ονομάζονται "φυσικά" (natural Tregs/nTregs), ενώ τα Tregs που προκύπτουν μετά από διαφοροποίηση εκτός του θύμου στην περιφέρεια ονομάζονται "προσαρμοσμένα" (adaptive Tregs/aTregs). Τα φυσικά Tregs χαρακτηρίζονται από την έκφραση του CD4 T-κυτταρικού υποδοχέα και του CD25 που αποτελεί συστατικό του υποδοχέα της IL-2. Η έκφραση του πυρηνικού μεταγραφικού παράγοντα Forkhead box P3 (FoxP3) είναι καθοριστική και ορίζει τόσο τη διαφοροποίηση όσο και τη λειτουργία των Tregs. Ο παράγοντας FoxP3 είναι απαραίτητος για την καταστολή του ανοσοποιητικού. Τα nTregs ενεργοποιούνται σε απάντηση προς αυτο-αντιγόνα που παρουσιάζονται από τα μόρια ΜΣΙ-τάξης II.[59-61] Τα ενεργοποιημένα Tregs ελέγχουν τα δραστικά T-

λεμφοκύτταρα που έχουν διαφύγει από τον κεντρικό μηχανισμό ανοσοεπιτήρησης και δρουν έναντι αυτο-αντιγόνων.[62-63] Τα Tregs καταστέλλουν την ενεργοποίηση, τον πολλαπλασιασμό και την παραγωγή κυτοκινών τόσο των CD4⁺ όσο και των CD8⁺ T-λεμφοκυττάρων, ενώ θεωρείται ότι ασκούν κατασταλτική δράση και έναντι των B-λεμφοκυττάρων και των δενδριτικών κυττάρων. Η δράση τους αυτή ασκείται μέσω διαλυτών ουσιών με κατασταλτική δράση όπως οι TGF-beta, IL-10 και η αδενοσίνη. Ανοσοφαινοτυπικά τα Tregs τυποποιούνται ως CD4⁺/CD25^{high}/Foxp3⁺/CD27⁺/CD45RO⁻ προκειμένου για τα φυσικά nTregs και ως CD4⁺/CD25^{high}/Foxp3⁺/CD27⁺/CD45RO⁺ προκειμένου για τα "προσαρμοσμένα" (adaptive) Tregs. Μετά τη διαφοροποίηση τους τα Tregs παραμένουν στα δευτερογενή λεμφικά όργανα και στο αίμα, ενώ ο πληθυσμός τους διατηρείται σε στενά όρια απόλυτου αριθμού, η ανατροπή του οποίου συνοδεύεται από παθολογικές επιπτώσεις.

2.3.1 Tregs και Αιματολογικές κακοήθειες (ΜΔΣ-ΟΜΛ)

Πειραματικά δεδομένα δηλώνουν πως η έκπτυξη των Tregs συμβάλλει στην ανοσοδιαφυγή από την ανοσοεπιτήρηση των νεοπλασματικών κυττάρων και παρατηρείται σε ασθενείς με ΜΔΣ υψηλού κινδύνου καθώς και σε εξέλιξη της νόσου.

Τα CD4⁺Tregs παρουσιάζουν πολυκλωνικότητα στο ΜΔΣ και το ποσοστό των nTregs βρέθηκε σημαντικά υψηλότερο σε ασθενείς πάσχοντες από ΜΔΣ υψηλού κινδύνου (p=0,032) σε σύγκριση με ασθενείς χαμηλού κινδύνου καθώς και με υγιείς μάρτυρες συγκρινόμενου ηλικιακού προφίλ. Συγκεκριμένα σε ασθενείς πάσχοντες από ΜΔΣ βρέθηκε στατιστικώς σημαντική συσχέτιση μεταξύ αυξημένου απόλυτου αριθμού CD4⁺ nTregs αίματος και αυξημένου ποσοστού μυελικών βλαστικών κυττάρων $\geq 5\%$ (P < .001), υψηλού σκορ IPSS (P < .001) και εξέλιξης νόσου, ενώ δεν υπήρξε συσχέτιση μεταξύ του απόλυτου αριθμού CD8⁺ TRegs αίματος και οποιονδήποτε προγνωστικών παραμέτρων της νόσου.[64] Τα "προσαρμοσμένα"

(adaptive) Tregs δεν παρουσίασαν στατιστική διαφοροποίηση στους συγκρινόμενους πληθυσμούς. Τα ευρήματα αυτά υποστηρίζουν την υπόθεση ότι η περιφερική έκπτυξη του πληθυσμού των Tregs αναστέλλει τη δραστική ανοσολογική απάντηση έναντι του δυσπλαστικού κλώνου, ευνοώντας την εξέλιξη της νόσου, ενώ ο περιορισμένος πληθυσμός Tregs που ανευρίσκεται σε ΜΔΣ χαμηλού κινδύνου ευνοεί την ανάπτυξη αυτο-αντιδραστικών T-κυτταρικών κλώνων, αναχαιτίζοντας την εξέλιξη του νοσήματος, με παράλληλη συνέπεια την παρατηρούμενη μυελική υποπλασία.[64]

2.4 Το ανοσοδραστικό μικροπεριβάλλον του μυελού των οστών στις Αιματολογικές κακοήθειες ΜΔΣ-ΟΜΛ

Παρά το γεγονός πως η παθοφυσιολογική αρχή του ΜΔΣ παραμένει άγνωστη, υπάρχουν ενδείξεις πως στη νόσο συμβάλλει και φλεγμονώδης διεργασία του μυελού των οστών. Πολλαπλές μελέτες αναφέρουν αυξημένη παραγωγή κυτταροκινών τόσο στον μυελό όσο και στο αίμα όπως οι TNF-α, IFN γ , IL-1, IL-6, IL-17, TGF β . [65-70] Τα CD4⁺ λεμφοκύτταρα με συνεργική κυτταροτοξική δράση συμμετέχουν στην εκδήλωση της κυτταροπενίας. Τα MDSCs (Myeloid Derived Suppressor cells) κατασταλτικά κύτταρα αναφέρονται αυξημένα ενώ συσχετίζονται και με παραγωγή κυτταροτοξικών κυτταροκινών.[71] Ο πληθυσμός των B-λεμφοκυττάρων και των πρόδρομων μορφών τους εμφανίζεται ισχυρά μειωμένος αλλά δεν αποδεικνύεται δυσπλασία αυτών των κυττάρων ή παθολογική παραγωγή ανοσοσφαιρινών.[72] Τα T-λεμφοκύτταρα παρουσιάζουν επιλεκτικά το προφλεγμονώδες προφίλ Th17 και Th22, τουλάχιστον στα προχωρημένα στάδια της νόσου.[68]

Η ανοσολογική αντίδραση προστατεύει έναντι της εξέλιξης της νόσου

Η παρουσία μη φυσιολογικών ανοσοφαινοτυπικά κυτταρικών κλώνων ενεργοποιεί ειδική ανοσολογική αντίδραση, προσελκύονται T λεμφοκύτταρα στον μυελό και έχουν αναγνωριστεί κυτταροτοξικά CD8⁺ T λεμφοκύτταρα με περιορισμένη ποικιλία T κυτταρικού υποδοχέα V β ,

προφίλ ενεργοποιημένου κυττάρου και αυξημένο περιεχόμενο κυτταροτοξικών πρωτεϊνών.[73]

Η ελλειμματική ανοσοεπιτήρηση ευνοεί την ανάπτυξη της νόσου

Ο πληθυσμός των NK κυττάρων ανευρίσκεται μειωμένος στο 20% των ασθενών ανεξάρτητα από την παρουσία T λεμφοπενίας. Η NK κυτταρική ανεπάρκεια παρατηρείται κύρια στον δυσμενούς πρόγνωσης υπότυπο του ΜΔΣ που χαρακτηρίζεται από περίσσεια βλαστικών κυττάρων.[74] Πειραματικά δεδομένα καταγράφουν επίσης επηρεασμένη NK λειτουργικότητα που παρατηρείται κύρια σε υψηλού κινδύνου ΜΔΣ.[75-77] Τα T-ρυθμιστικά κύτταρα (Treg) παρουσιάζουν επίσης αύξηση σε ΜΔΣ με περίσσεια βλαστικών κυττάρων, πιθανά σχετιζόμενα με εξέλιξη της νόσου.[78]

Η αλλογενής μεταμόσχευση αποτελεί μέχρι σήμερα την κύρια ικανή θεραπεία να επιφέρει ίαση στους πάσχοντες από ΟΜΛ, κατά κύριο λόγο μέσω της ανοσολογικής δράσης του μοσχεύματος έναντι των λευχαιμικών κυττάρων (Graft versus Leukaemia effect-GvL effect). Ακριβώς αυτή η δράση (GvL) καθώς και η παρατήρηση πως οι αλλογενείς μεταμοσχεύσεις με μοσχεύματα καθηρημένα από τα T-κύτταρα του δότη συνοδεύονται από αυξημένο κίνδυνο υποτροπής της ΟΜΛ, έθεσαν τη βάση για την αναγνώριση των T κυττάρων ως σημαντικών διαμεσολαβητών της αντιλευχαιμικής δράσης των αλλογενών μοσχευμάτων. Ωστόσο ένα σημαντικό ποσοστό των ασθενών με ΟΜΛ αποκλείονται από την δυνατότητα υποβολής τους σε αλλογενή μεταμόσχευση για ποικίλους λόγους (ηλικία, συνοσσηρότητα, απουσία κατάλληλου δότη) καθιστώντας επιτακτική την ανάγκη εύρεσης νέων εναλλακτικών ανοσοδιαμεσολαβούμενων θεραπευτικών στρατηγικών.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

Η 5-Αζασυτιδίνη στη θεραπευτική της Οξείας Μυελογενούς Λευχαιμίας και του Μυελοδυσπλαστικού συνδρόμου

Η αναγνώριση προ 40 ετών της DNA υπερμεθυλίωσης τόσο στο ΜΔΣ όσο και στην ΟΜΛ στα πλαίσια της παθοφυσιολογικής αρχής αυτών των νοσημάτων, αποτέλεσε τη βάση για την κλινική εφαρμογή αναστολέων του ενζύμου DNA-Μεθυλοτρανσφεράσης (DNA-Methyltransferase/DNMT), με πρώτη in vitro μελέτη αυτή των Jones και Taylor.[79]

Η 5-Αζασυτιδίνη και η Ντεσιταμπίνη είναι ανάλογα κυτοσίνης που αναπτύχθηκαν αρχικά ως αντιμεταβολικοί κυτταροστατικοί παράγοντες, ιδιότητα που εκδηλώνουν όταν χορηγούνται σε υψηλές δόσεις. Χορηγούμενοι οι παράγοντες αυτοί σε χαμηλότερες δόσεις ενσωματώνονται στο DNA κατά τη διάρκεια της φάσης S του κυτταρικού κύκλου και αναστέλλουν την DNA-μεθυλοτρανσφεράση άμεσα και μη αναστρέψιμα.[79-83] Η 5-Αζασυτιδίνη σε αντίθεση με την Ντεσιταμπίνη ενσωματώνεται και στο RNA διενεργώντας έτσι την κυτταροτοξική της δραστηριότητα.[81] Οι υπομεθυλιωτικοί παράγοντες επενεργούν στο γενετικό υλικό με ποικίλους μηχανισμούς τόσο στα κακοήθη όσο και στα μη-κακοήθη κύτταρα. Οι κύριοι μηχανισμοί μέσω των οποίων διενεργείται η αντινεοπλασματική τους δραστηριότητα περιλαμβάνουν μέσω αναστολής της υπερμεθυλίωσης την επανενεργοποίηση ογκοκατασταλτικών γονιδίων που είχαν αδρανοποιηθεί, γονιδίων επιδιορθωτικών του DNA, γονιδίων που επιδρούν στην αναστολή της ανάπτυξης, στην διαφοροποίηση και στην απόπτωση των κυττάρων καθώς.[83,84] Πρόσφατα έχει αναγνωρισθεί ότι οι υπομεθυλιωτικοί παράγοντες ενισχύουν ενδογενή μετάγραφα ρετροϊών (ERV), τα οποία με τη σειρά τους σχηματίζουν ενδοκυτταροπλασματικό δίκλωνο RNA και επιφέρουν απόπτωση.[85,86] Επιπρόσθετα ως προς την επιγενετική δράση που ασκεί η 5-Αζασυτιδίνη, ενισχύει την έκφραση ειδικών νεοπλασματικών αντιγόνων όπως είναι τα αντιγόνα που σχετίζονται με την νεοπλασία του όρχεως (Cancer-Testis Antigens-CTA), ενισχύοντας

την αναγνώριση των νεοπλασματικών κυττάρων. Το μόνο CTA που έχει βρεθεί ότι εκφράζεται σε ένα σημαντικό ποσοστό ασθενών πασχόντων από ΟΜΛ είναι το PRAME. Η χορήγηση 5-Αζασυτιδίνης σε ασθενείς με ΟΜΛ ακολουθείται από αυξημένη έκφραση του PRAME αλλά και του αντιγόνου SSX-2, όπως επίσης και του NY-ESO-1, ευνοώντας την αναγνώρισή των νεοπλασματικών κυττάρων από τα CD8⁺ Τ-λεμφοκύτταρα.[87-89]

Η 5-Αζασυτιδίνη εφαρμόζεται στη θεραπευτική του Μυελοδυσπλαστικού συνδρόμου, της Οξείας Μυελογενούς Λευχαιμίας με ολιγοβλαστική έκφραση καθώς και της Χρόνιας Μυελομονοκυτταρικής Λευχαιμίας. Η ανταπόκριση στον υπομεθυλιωτικό αυτό παράγοντα είναι βραδεία θέτοντας την υποψία της δράσης το μέσω ανοσοδιαμεσολαβούμενων μηχανισμών, καθώς αυτοί έχουν βραδύτερη έναρξη δράσης συγκριτικά με την άμεση δράση των κυτταροτοξικών παραγόντων. [90-93]

Η έγκριση της 5-Αζασυτιδίνης στη θεραπευτική του ΜΔΣ βασίστηκε σε δύο κλινικές μελέτες φάσεως III. Η μελέτη της Cancer and Leukemia Group B (CALBG) ήταν μια τυχαιοποιημένη μελέτη φάσεως III που περιλάμβανε 191 ασθενείς με σκοπό τη σύγκριση της χορήγησης της 5-Αζασυτιδίνης έναντι της βέλτιστης υποστηρικτικής φροντίδας των ασθενών με ΜΔΣ.[90] Η 5-Αζασυτιδίνη χορηγήθηκε υποδορίως σε δόση 75mg/m²/d επί επτά ημέρες σε κύκλους των 28 ημερών. Η καταγεγραμμένη συνολική ανταπόκριση ήταν 60%, εκ των οποίων 7% των ασθενών είχαν επιτύχει Πλήρη Ύφεση-ΠΥ νόσου, 16% είχαν επιτύχει Μερική Ύφεση-ΜΥ νόσου και 37% είχαν βελτιώσει την εκδήλωση των κυτταροπενιών στο περιφερικό αίμα. Στο σκέλος των ασθενών που αντιμετωπίστηκαν μόνο υποστηρικτικά, η μόνη ανταπόκριση που παρατηρήθηκε ήταν αιματολογική βελτίωση στο 5%. Ο διάμεσος χρόνος για την εκτροπή της νόσου σε ΟΜΛ ήταν 21 μήνες στο θεραπευτικό σκέλος της 5-Αζασυτιδίνης έναντι 13 μηνών προκειμένου για την υποστηρικτική αντιμετώπιση (P< 0.01). Βελτίωση στατιστικά σημαντική σημείωσαν και οι ασθενείς που μετά τους πρώτους τέσσερεις μήνες άλλαζαν θεραπευτικό σκέλος, ενέργεια που επέτρεπε ο

αρχικός σχεδιασμός της μελέτης. Η μελέτη AZA-001 σχεδιάστηκε ώστε να τεκμηριώσει πλεονέκτημα ως προς την ολική επιβίωση των ασθενών που λαμβάνουν 5-Αζασουτιδίνη. Συμπεριλήφθηκαν 358 ασθενείς πάσχοντες από ΜΔΣ-Int II και υψηλού κινδύνου και οι ασθενείς τυχαιοποιήθηκαν να λάβουν 5-Αζασουτιδίνη ή συμβατική θεραπευτική αντιμετώπιση και ως τέτοια θεωρήθηκε η βέλτιστη υποστηρικτική φροντίδα, η χορήγηση χαμηλής δόσης Αρασιτίνης και η εντατική χημειοθεραπεία των ασθενών με ΜΔΣ.[91] Μετά πάροδο διάμεσου χρονικού διαστήματος 21 μηνών η διάμεση ολική επιβίωση των ασθενών που έλαβαν 5-Αζασουτιδίνη ήταν σημαντικά διευρυμένη σε σύγκριση με τους ασθενείς που αντιμετωπίστηκαν συμβατικά (24.5 vs.15 μήνες, $P < 0.01$). Η ποιότητα ζωής των ασθενών υπό 5-Αζασουτιδίνη επίσης βρέθηκε σημαντικά βελτιωμένη και στις δύο μελέτες που αναφέρθηκαν. Μεταξύ των ασθενών που μετείχαν στις δύο μελέτες αυτές, το 30% έπασχε από ΟΜΛ με την εφαρμογή των κριτηρίων της WHO (2002), εύρημα που οδήγησε σε ακόλουθη ανάλυση αυτών των 113 ασθενών οι οποίοι διατήρησαν το πλεονέκτημα ως προς την ολική επιβίωση όταν λάμβαναν 5-Αζασουτιδίνη (24.5 vs. 16 months, $P < 0.01$).[94] Τα ενθαρρυντικά αυτά αποτελέσματα οδήγησαν σε τυχαιοποιημένη διεθνή μελέτη φάσεως III όπου συγκρίθηκε η δράση της 5-Αζασουτιδίνης με τη συμβατική θεραπεία όπως ορίστηκε ανωτέρω, σε ηλικιωμένους ασθενείς με νεοδιαγνωσθείσα ΟΜΛ. Σε αυτή την ομάδα των ασθενών τεκμηριώθηκε στατιστικώς σημαντική διαφορά ως προς την ολική επιβίωση, μόνο όταν αποκλείστηκαν από την ανάλυση όσοι έλαβαν και άλλες ακόλουθες θεραπείες μετά τη διακοπή της μελέτης. Σε αυτή την ομάδα ασθενών η διάμεση ολική επιβίωση ήταν 12.1 μήνες για τους ασθενείς που έλαβαν 5-Αζασουτιδίνη έναντι 6.9 μήνες για τους υπόλοιπους ασθενείς ($P= 0.02$). [95]

Η χορήγηση 5-Αζασουτιδίνης σε ασθενείς πάσχοντες από ΟΜΛ συνοδεύεται επίσης από σημαντική ανταπόκριση, επιτυγχάνοντας συνολική ανταπόκριση σε ποσοστό 33% μετά από διάμεσο αριθμό θεραπειών έξι κύκλων (περιλαμβάνοντας ΠΥ,ΠΥ με μερική ανάπλαση και ΜΥ), και διετή ολική επιβίωση σε ποσοστό 51% προκειμένου για

τους ανταποκρινόμενους ασθενείς.[96] Δυσμενή προγνωστική σημασία στη θεραπεία της ΟΜΛ με 5-Αζασυτιδίνη διατηρούν το δυσμενές κυτταρογενετικό προφίλ, ο υψηλός αριθμός λευκών ($\geq 15000/\mu\text{l}$) καθώς και η επηρεασμένη κατάσταση ικανότητας (Performance Status ≥ 2), ενώ ούτε η ηλικία ούτε το ποσοστό των βλαστικών κυττάρων φαίνεται να επηρεάζουν την πρόγνωση αυτών των ασθενών.[96]

Η 5-Αζασυτιδίνη είναι καλά ανεκτή σε αυτό τον πληθυσμό των συνηθέστερα ηλικιωμένων ασθενών και η κύρια σοβαρή τοξικότητα που εκδηλώνεται, με συνέπεια το θάνατο ή την ανάγκη διακοπής του φαρμάκου, αφορά τις συνέπειες της αιματολογικής τοξικότητας με αποτέλεσμα σήψη ή αιμορραγικά επεισόδια. Στους πρώτους δύο μήνες θεραπείας η συχνότητα θανάτου που καταγράφεται είναι 13%.[96]

Παρότι δεν έχει τεκμηριωθεί η προγνωστική αξία του προφίλ μεθυλίωσης για τη θεραπεία με 5-Αζασυτιδίνη στο ΜΔΣ ή στην ΟΜΛ, η παρουσία μεταλλάξεων του DNMT3A,[97] η έκφραση του microRNA miR-29b μη κωδικοποιημένου μορίου που σχετίζεται με τη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης [98] και η παρουσία μεταλλάξεων του ενζύμου TET2,[99] συσχετίζονται με την ολική ανταπόκριση και τη συνολική επιβίωση στη θεραπευτική με υπομεθυλιωτικούς παράγοντες, αποτελέσματα που μένει να επιβεβαιωθούν από μεγαλύτερης κλίμακας μελέτες. Οι σωματικές μεταλλάξεις του DNMT3A, γονιδίου που κωδικοποιεί μια DNA μεθυλοτρανσφεράση, σχετίζονται με δυσμενή πρόγνωση στην ΟΜΛ, αλλά η σταθερότητα αυτών των μεταλλάξεων κατά την κλινική πορεία της νόσου είναι έως τώρα άγνωστη.[100-102]

3.1 Η επίδραση της 5-Αζασυτιδίνης στα ανοσορρυθμιστικά κύτταρα

Είναι απαραίτητο να αντιληφθούμε την επίδραση της 5-Αζασυτιδίνης στους διεγερτικούς και ανασταλτικούς ανοσολογικούς μηχανισμούς που επηρεάζουν την αντίδραση έναντι των λευχαιμικών κυττάρων.

3.1.1 Η επίδραση της 5-Αζασουτιδίνης στην NK λειτουργικότητα

Η έκφραση της ομάδας των ανασταλτικών KIR υποδοχέων των NK κυττάρων ρυθμίζεται κύρια επιγενετικά μέσω της μεθυλίωσης ή απομεθυλίωσης των αντίστοιχων γονιδίων. Σε κάθε NK κύτταρο το αρχικό τμήμα κάθε KIR γονιδίου που ορίζει την έναρξη της μεταγραφής βρίσκεται μονίμως μεθυλιωμένο προκειμένου για τα μη εκφραζόμενα γονίδια και μονίμως απομεθυλιωμένο για τα εκφραζόμενα γονίδια. Τα αποτελέσματα *in vitro* μελετών ως προς την επίδραση της 5-Αζασουτιδίνης στην NK-κυτταροτοξικότητα δεν είναι σε συμφωνία και τα αναφερόμενα αποτελέσματα δηλώνουν άλλοτε ενίσχυση της δράσης, άλλοτε περιορισμό αυτής και άλλοτε μη διαφοροποίησή της. Η *in vivo* δράση ωστόσο της 5-Αζασουτιδίνης επί των NK κυττάρων, δεν έχει έως τώρα μελετηθεί.

Η *in vitro* DNA-απομεθυλίωση μέσω επεξεργασίας των NK κυττάρων με 5-Αζασουτιδίνη προκαλεί ταχεία και σταθερή μεταγραφή και κυτταρική έκφραση όλων των προγενέστερα μη εκφρασμένων KIR υποδοχέων, τόσο σε NK κυτταρικές σειρές όσο και σε πρόσφατα απομονωμένα NK κύτταρα περιφερικού αίματος, ενώ δε σημειώθηκε παρόμοια ανταπόκριση σε άλλους τύπους κυττάρων.[103]

Σε *in vitro* μελέτες έχει φανεί πως η 5-Αζασουτιδίνη επιδρά στη λειτουργικότητα των NK κυττάρων ενισχύοντας την έκφραση ανασταλτικών υποδοχέων, περιορίζοντας τη σύνθεση κυτταροκινών (granzyme B και περφορίνης) και αυξάνοντας την απόπτωση των NK κυττάρων.[104-105] Σε άλλη *in vitro* μελέτη της επίδρασης της 5-Αζασουτιδίνης στον πληθυσμό των NK-κύτταρων μετά τρεις κύκλους θεραπείας δεν τεκμηριώθηκε περιορισμός του πληθυσμού αλλά ούτε επίδραση στη λειτουργικότητά τους, η οποία εκτιμήθηκε με βάση την εξωκυττάρια έκφραση του CD107a.[106] Ωστόσο παρατηρήθηκε τάση μείωσης του απόλυτου αριθμού των NK-κυττάρων ($p=0.061$) καθώς και σημαντική μείωση του πληθυσμού που εκφράζει τον ανασταλτικό υποδοχέα CD158b ($p=0.05$), ενώ δε σημειώθηκε καμία μεταβολή στον πληθυσμό που εξέφραζε τον ενεργοποιητικό υποδοχέα CD158d.[106]

3.1.2 Η επίδραση της 5-Αζασυτιδίνης στη λειτουργικότητα των MDSCs και Tregs

Πολύ περιορισμένα είναι μέχρι σήμερα τα βιβλιογραφικά δεδομένα σχετικά με την επίδραση του υπομεθυλιωτικού παράγοντα 5-Αζασυτιδίνη στον πληθυσμό των Tregs και των MDSCs in vivo. Σε in vivo μελέτη της επίδρασης της 5-Αζασυτιδίνης στον πληθυσμό των MDSCs και των Tregs κυττάρων μετά τρεις κύκλους θεραπείας δεν τεκμηριώθηκε περιορισμός του πληθυσμού των κυττάρων αυτών.[106] Σε άλλη ωστόσο in vivo μελέτη ασθενών μετά αλλογενή μεταμόσχευση προγονικών αιμοποιητικών κυττάρων που έλαβαν θεραπεία με 5-Αζασυτιδίνη, αναφέρεται αυξημένος ο αριθμός των Tregs.[107] Πειραματικά αποτελέσματα μελέτης της χορήγησης 5-Αζασυτιδίνης σε ινδικά χοιρίδια με προκλητή φλεγμονή των πνευμόνων και με προκλητό αλλεργικό βρογχικό άσθμα, αναφέρουν πως η χορήγηση της 5-Αζασυτιδίνης επέφερε αυξημένη έκφραση του Foxp3, αύξηση του πληθυσμού των Tregs, ενεργοποιημένη κατάσταση αυτών, κατασταλτικό φαινότυπο και ενίσχυση του πολλαπλασιασμού τους, με τελικό αποτέλεσμα τον περιορισμό της φλεγμονώδους αντίδρασης των αεραγωγών.[108,109]

Β.ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

Ασθενείς και Μέθοδοι

1.1 Σκοποί της μελέτης

Η παρούσα μελέτη φιλοδοξεί να συμβάλλει στην ανάδειξη νέων στοιχείων εστιάζοντας στη συμμετοχή των NK κυττάρων στη πολυπαραγοντική ανοσολογική αντίδραση έναντι των λευχαιμικών κυττάρων. Η παρούσα μελέτη καταγράφει την *in vitro* NK κυτταροτοξική δραστηριότητα και συγχρόνως τους πληθυσμούς ανοσορρυθμιστικών κυττάρων περιφερικού αίματος, σε ασθενείς πάσχοντες από Μυελοδυσπλαστικό σύνδρομο ή ολιγοβλαστική Οξεία Μυελογενή Λευχαιμία κατά τη διάγνωση, μετά από βραχείας διάρκειας θεραπεία με τον υπομεθυλιωτικό παράγοντα 5-Αζασυτιδίνη, καθώς και σε υγιείς μάρτυρες, με σκοπό:

- i) να μελετηθεί η NK κυτταροτοξική δραστηριότητα καθώς και οι υπό μελέτη κυτταρικοί πληθυσμοί (NK, Tregs, MDSCs), στην ομάδα αυτή των ασθενών υπό την επίδραση του υπομεθυλιωτικού αυτού παράγοντα και
- ii) να αναγνωριστούν "πρώιμοι" βιοδείκτες με προγνωστική ισχύ ως προς την πρόβλεψη της ανταπόκρισης και της συνολικής έκβασης αυτής της ομάδας των ασθενών που λαμβάνουν θεραπεία με 5-Αζασυτιδίνη.

1.2 Ασθενείς

Στην μελέτη συμπεριλήφθηκαν ασθενείς που πληρούσαν τα κριτήρια που αναλυτικά περιγράφονται παρακάτω και αντίστοιχα αποκλείστηκαν ασθενείς που παρουσίαζαν τα κριτήρια αποκλεισμού όπως περιγράφονται στη συνέχεια.

1.2.1 Κριτήρια επιλογής και αποκλεισμού ασθενών και υγιών μαρτύρων

Κριτήρια επιλογής ασθενών

Ασθενείς πάσχοντες από ΟΜΛ (με αριθμό βλαστικών κυττάρων μυελού των οστών που κυμαίνεται μεταξύ 20-29%) ή ΜΔΣ τύπου RAEB II σύμφωνα με την ταξινόμηση κατά WHO-2008,[110] οι οποίοι:

- 1) είναι ηλικίας ≥ 18 ετών
- 2) λαμβάνουν 5-Αζασυτιδίνη ως πρώτης ή ακόλουθης γραμμής θεραπεία και έχουν ολοκληρώσει τουλάχιστον 3 κύκλους θεραπείας, καθώς και ασθενείς που δεν έχουν λάβει ακόμη οποιαδήποτε θεραπεία
- 3) στην εξέταση της γενικής αίματος παρουσιάζουν επαρκή αριθμό λεμφοκυττάρων ($\geq 1 \times 10^6/\text{ml}$)
- 4) συναινούν εγγράφως για τη συμμετοχή τους στην μελέτη αφού πληροφορηθούν σχετικά με αυτή σύμφωνα με τη διακήρυξη του Ελσίνκι.(Παράρτημα I, Έντυπα 1,2)

Κριτήρια αποκλεισμού ασθενών

- 1) Ασθενείς πάσχοντες από Οξεία Προμυελοκυτταρική Λευχαιμία (με έκφραση PML-RARA) σύμφωνα με την ταξινόμηση κατά WHO
- 2) Ασθενείς θετικοί ορολογικά στον έλεγχο για HCV/HbsAg/HIV
- 3) Ασθενείς με συνυπάρχοντα αυτοάνοσα νοσήματα.

Κριτήρια επιλογής υγιών μαρτύρων

- 1) Ενήλικες ηλικίας ≥ 18 ετών με ελεύθερο ατομικό ιστορικό υγείας
- 2) Υγιείς ενήλικες που συναινούν εγγράφως για τη συμμετοχή τους στην μελέτη αφού πληροφορηθούν σχετικά με αυτή σύμφωνα με τη διακήρυξη του Ελσίνκι.(Παράρτημα I, Έντυπα 1,3)

1.2.2 Καταγραφή κλινικών χαρακτηριστικών των ασθενών και υγιών μαρτύρων

Οι ασθενείς και υγιείς μάρτυρες που πληρούσαν τα κριτήρια συμμετοχής στην μελέτη, εγγράφηκαν στο αρχείο που δημιουργήθηκε για το σκοπό αυτό στο Αιματολογικό τμήμα του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου «ΑΤΤΙΚΟΝ». Για κάθε ασθενή ή υγιή μάρτυρα που συμπεριλήφθηκε στην μελέτη καταγράφηκαν τα δημογραφικά του χαρακτηριστικά, για τους ασθενείς δε καταγράφηκαν και τα ιδιαίτερα στοιχεία εκδήλωσης της νόσου σε ειδικό έντυπο εγγραφής του ασθενούς που τηρείται στο αρχείο που δημιουργήθηκε στο Αιματολογικό τμήμα του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου «ΑΤΤΙΚΟΝ» (Παράρτημα Ι, Έντυπα 4,5).

Τα κλινικά χαρακτηριστικά των ασθενών που καταγράφηκαν είναι:

- Η ηλικία
- Ο τύπος ΜΔΣ ή ΟΜΛ σύμφωνα με την ταξινόμηση κατά WHO-2008
- Οι Κυτταρογενετικές ανωμαλίες των παθολογικών κυττάρων σύμφωνα με το αποτέλεσμα του καρυοτυπικού ελέγχου σε δείγμα μυελού των οστών
- Οι Μοριακές γενετικές διαταραχές που πιθανά ανευρέθηκαν κατά τον μοριακό έλεγχο του δείγματος μυελού των οστών κατά τη διάγνωση του ασθενούς. Καταγράφηκαν οι μεταλλάξεις με τεκμηριωμένη κλινική σημασία: μεταλλάξεις του KIT, FLT3-ITD, FLT3-TKD, MLL-PTD, μεταλλάξεις του CEBPA, μεταλλάξεις του NMP1, μεταλλάξεις του Wt1
- Προκειμένου για ασθενείς πάσχοντες από ΜΔΣ, ο προγνωστικός κίνδυνος σύμφωνα με το IPSS [19]
- Οι προγενέστερες θεραπείες που πιθανά είχαν λάβει οι ασθενείς
- Η ημερομηνία έναρξης θεραπείας με 5-Αζασυτιδίνη και ο συνολικός αριθμός κύκλων αυτής της θεραπείας που είχε λάβει ο ασθενής κατά τη χρονική στιγμή συλλογής του δείγματος

-Η ανταπόκριση που είχε επιδείξει ο ασθενής κατά τη συλλογή του δείγματος σύμφωνα με τα κριτήρια IWG-2006[111] (αναλύονται παρακάτω)

-Η κλινική έκβαση της νόσου κατά το χρόνο παρακολούθησης του ασθενούς και έως τη λήξη της μελέτης.

Ως ανταπόκριση εκτιμήθηκε η ανταπόκριση που καταγράφηκε μετά από 3 κύκλους θεραπείας και ως μέγιστη ανταπόκριση η ανταπόκριση σε ασθενείς με περαιτέρω βελτίωση κατά τη συνεχιζόμενη αγωγή μέχρι και την τελευταία καταχώρηση.

Κριτήρια ανταπόκρισης για ασθενείς πάσχοντες από ΟΜΛ

Πλήρης ύφεση (ΠΥ):

Απαιτείται παρουσία βλαστικών κυττάρων σε μυελικό δείγμα < 5% χωρίς στοιχεία ενδεικτικά δυσπλασίας και αποκατάσταση των παραμέτρων της γενικής αίματος: Hb \geq 11gr/dl (χωρίς λήψη ερυθροποιητίνης), Αιμοπετάλια \geq 100000/μl, Πολυμορφοπύρηνα \geq 1000/μl.

Αποτυχία θεραπείας:

Θάνατος κατά τη διάρκεια της θεραπείας ή εξέλιξη της νόσου με επιδείνωση των κυτταροπενιών ή αύξηση του ποσοστού των μυελικών βλαστικών κυττάρων σε σύγκριση με την προ έναρξης θεραπείας περίοδο.

Κριτήρια ανταπόκρισης για ασθενείς πάσχοντες από ΜΔΣ (IWG-2006)

Πλήρης ύφεση (ΠΥ):

Απαιτείται παρουσία βλαστικών κυττάρων σε μυελικό δείγμα < 5% χωρίς στοιχεία ενδεικτικά δυσπλασίας και αποκατάσταση των παραμέτρων της γενικής αίματος: Hb \geq 11gr/dl (χωρίς λήψη ερυθροποιητίνης), Αιμοπετάλια \geq 100000/μl, Πολυμορφοπύρηνα \geq 1000/μl.

Μερική ύφεση (ΜΥ):

Πρέπει να πληρούνται τα κριτήρια της Πλήρους Ύφεσης ως προς τις παραμέτρους της γενικής αίματος αν ήταν επηρεασμένες προ της

έναρξης θεραπείας, ενώ οι μυελικοί βλάστες θα πρέπει να έχουν μειωθεί κατά $\geq 50\%$ σε σύγκριση με τα προθεραπευτικά επίπεδα ή ο ασθενής να κατατάσσεται σε πρωϊμότερο στάδιο ΜΔΣ (κατά IPSS) σε σύγκριση με την κατάταξή του προ έναρξης της θεραπείας.

Σταθερή νόσος:

Ορίζεται ως η αδυναμία επίτευξης τουλάχιστον Μερικής Ύφεσης, ωστόσο διατήρηση σταθερής νόσου για ≥ 8 εβδομάδες.

Αποτυχία θεραπείας:

Θάνατος κατά τη διάρκεια της θεραπείας ή εξέλιξη της νόσου με επιδείνωση των κυτταροπενιών ή αύξηση του ποσοστού των μυελικών βλαστικών κυττάρων ή εξέλιξη σε περισσότερο προχωρημένο στάδιο ΜΔΣ (κατά IPSS) σε σύγκριση με την προ έναρξης θεραπείας περίοδο.

Κλινικά σημαντική Αιματολογική Ανταπόκριση:

i) Ανταπόκριση ερυθρών: αύξηση Hb $\geq 1.5\text{g/dL}$ όταν η προ έναρξης θεραπείας τιμή ήταν $< 11\text{ g/dL}$ ή σχετική μείωση των απαιτούμενων μεταγγιζόμενων μονάδων ερυθρών κατά 4 ανά 8 εβδομάδες σε σύγκριση με τις προηγούμενες 8 εβδομάδες (κατά την εκτίμηση των αναγκών σε μεταγγίσεις μετρώνται μόνο οι μεταγγίσεις που χορηγούνται όταν Hb $< 9\text{ gr/dl}$)

ii) Ανταπόκριση αιμοπεταλίων: απόλυτη αύξηση του αριθμού των αιμοπεταλίων $> 30000/\mu\text{l}$ για ασθενείς με αρχική τιμή $>20000/\mu\text{l}$, ή αύξηση τιμής αιμοπεταλίων $> 20000/\mu\text{l}$ ή $< 20000/\mu\text{l}$ αλλά κατά 100% όταν η αρχική τιμή είναι $< 20000/\mu\text{l}$

iii) Ανταπόκριση ουδετεροφίλων: αύξηση κατά 100% και κατά απόλυτη τιμή $> 500/\mu\text{l}$ όταν η αρχική τιμή είναι $< 1000/\mu\text{l}$.

Τα έντυπα εγγραφής των ασθενών και των υγιών μαρτύρων παρατίθενται στο Παράρτημα Ι.

1.3 Υλικά – Όργανα πειραμάτων

1.3.1 Υλικά – Όργανα πειραμάτων ελέγχου της NK-κυτταροτοξικότητας

I. ΣΥΣΚΕΥΕΣ - ΟΡΓΑΝΑ

- Οπτικό μικροσκόπιο
- Θάλαμος καθέτου νηματικής ροής (Laminar Flow)
- Ψυχόμενη επιτραπέζια φυγόκεντρος
- Κυτταρομετρητής ροής, Coulter FC500 (Beckman Coulter - BC)
- Λογισμικό, CXP analysis 2.2
- Αιμοκυτταρόμετρο - πλάκα Neubauer (Sigma-Aldrich)
- Μαγνητική στήλη BD IMagnet™ - Cat. No. 552311
- Μηχανικός αναδευτήρας (Vortex, Axion)
- Επωαστικός κλίβανος με σταθερή θερμοκρασία περιβάλλοντος (37°C), κατάλληλα σταθερά επίπεδα CO² (5%) και σταθερές συνθήκες υγρασίας

II. ΚΥΤΤΑΡΙΚΕΣ ΣΕΙΡΕΣ

- Κυτταρική σειρά Raji (DSMZ No.:ACC 319)
- Κυτταρική σειρά K562 (DSMZ No.:ACC 10)

III. ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

- Μονοκλωνικά αντισώματα συζευγμένα με φθορίζουσες ουσίες:
 - CD3-FITC/CD(16+56)-PE (Beckman Coulter Cat.No.210000719)
- Μονοκλωνικά αντισώματα συζευγμένα με φθορίζουσες χρωστικές:

- PKH 67 Πράσινη φθοριοχρωστική κυτταρικής μεμβράνης (Sigma-Aldrich Cat.No. MIDI67-1KT)
- 7AAD Κόκκινη φθοριοχρωστική νουκλεϊκού Οξέος (BD Pharmingen Cat. No. 559925)
- Flow-Count Fluorospheres (Beckman Coulter Cat.No. PN 7547053)
- Χρωστική Trypan Blue 0,4% (Sigma-Aldrich Cat. No. T8154)
- Diluent-C Διάλυμα ενίσχυσης χρωστικής PKH-67
(περιλαμβάνεται στη συσκευασία της χρωστικής PKH-67)
- Καλλιεργητικό υλικό πλούσιο σε φώσφορο RPMI 1640W/GLUTAMAX-I (Gibco - Cat. No. 61870-010)
- Ρυθμιστικό Διάλυμα αλάτων HBSS-W/O CA-MG-PH RED (Gibco - Cat. No. 14175-053)
- Ρυθμιστικό Διάλυμα διαχωρισμού κυτάρων PBS (Gibco-Cat.No. 13151014)
- Διάλυμα FBS – θερμοαπενεργοποιημένο (Gibco - Cat. No. 10500064)
- Αντιβιοτικά κυτταροκαλλιιεργειών Pen/Strep 5000U/ml (Invitrogen Cat. No. 15070-063)
- Κλασσική ηπαρίνη 5000IU/ml χωρίς συντηρητικά
- Histopaque (Sigma Aldrich Cat. No. 10771): υλικό για τη βαθμίδωση πυκνότητας μέσω φυγοκέντρωσης προκειμένου να γίνει διαχωρισμός των μονοπύρηνων κυττάρων από το περιφερικό αίμα
- Human NK Cell Enrichment Set DM (BD Biosciences Cat. No. 557987)
- Αιθανόλη 70%

IV. ΑΝΑΛΩΣΙΜΑ ΥΛΙΚΑ

- Σωληνάρια κωνικά τύπου Falcon με επίπεδο βιδωτό καπάκι περιεκτικότητας 15ml και 50 ml

- Σωληνάρια στρογγυλού πυθμένα, τύπου falcon, πολυπροπυλενίου, αποστειρωμένα, με βιδωτό καπάκι 12×75mm, περιεκτικότητας 5 ml
- Σωληνάρια τύπου Eppendorf 1.5ml
- Σωληνάρια τύπου Bijou
- Ακρυλικές πιπέτες μετρήσεως αποστειρωμένες, όγκου 10ml και 25ml
- Ρύγχη Μικροπιπέτας Gilson Pipettman P20, P200
- Φλάσκες κυτταροκαλλιέργειας με αεριζόμενο πώμα 25cm² όγκου 50ml
- Φλάσκες κυτταροκαλλιέργειας με αεριζόμενο πώμα 75cm² όγκου 250ml

1.3.2 Υλικά – Όργανα πειραμάτων ελέγχου των υποπληθυσμών ανοσορρυθμιστικών κυττάρων με κυτταρομετρία ροής

I. ΣΥΣΚΕΥΕΣ - ΟΡΓΑΝΑ

- Κυτταρομετρητής ροής FACSCanto II (Becton Dickinson)
- Λογισμικό FACSDiva (BD Biosciences)
- Φυγόκεντρος (Heraeus)
- Μηχανικός αναδευτήρας (Vortex, Axion)

II. ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΙΑΣ ΡΟΗΣ

1. Αντιδραστήρια κυτταρομετρητή ροής

- BD FACSTFlow™ sheath fluid: περιέχει NaCl, KCl, KH₂PO₄, Na₂HPO₄, C₈H₁₀O₂ NaF, H₂O
- BDTM FACSClean: απορρυπαντικό διάλυμα με πρωτεολυτικό ένζυμο
- BD FACSTM Shutdown solution: περιέχει H₂O και συντηρητικά

2. Μονοκλωνικά αντισώματα συνδεδεμένα με φθορίζουσες ουσίες

Στη μελέτη χρησιμοποιήθηκαν μονοκλωνικά αντισώματα συνδεδεμένα με φθορίζουσες ουσίες από την εταιρεία BD Biosciences (Πίνακας 1).

Πίνακας 1. Μονοκλωνικά αντισώματα, κλώνοι και φθορίζουσες ουσίες που χρησιμοποιήθηκαν στη μελέτη.

α/α	Μονοκλωνικά αντισώματα		Φθορίζουσα ουσία
	Ανοσοφαινοτυπικός δείκτης	Κλώνος	
1	CD3	HIT3a	FITC
2	CD4	RPA-T4	APC
3	CD11b	ICRF44	PE
4	CD14	M5E2	APC
5	CD15	HI98	PerCP-Cy TM 5.5
6	CD16	B73.1	APC
7	CD25	M-A251	PE-Cy TM 7
8	CD33	P67.6	PE-Cy TM 7
9	CD45	2D1	APC-H7
10	CD45	HI30	PerCP-Cy TM 5.5
11	CD56	B159	PE
12	CD127	HIL-7R-M21	PE
13	HLA-DR	G46-6	FITC

3. Αντιδραστήρια επεξεργασίας δειγμάτων

- BD FACSTM lysing solution (BD Biosciences): αντιδραστήριο για τη λύση των ερυθρών σε ολικό αίμα
- LymphoprepTM: υλικό για τη βαθμίδωση πυκνότητας μέσω φυγοκέντρησης προκειμένου να γίνει διαχωρισμός των μονοπυρήνων κυττάρων από το περιφερικό αίμα
- Ρυθμιστικό Διάλυμα φωσφορικών αλάτων: Phosphate Buffered Saline, PBS.
- Παραφολμαλδεΐδη: Paraformaldehyde, PFA (διάλυμα 1% σε PBS)

III. Αναλώσιμα Υλικά

- Πλαστικές πιπέτες τύπου Pasteur

- Ρύγχη για πιπέτες όγκου 10μL, 20μL, 100μL, 1000μL
- Πλαστικά σωληνάρια των 5 mL ειδικά για τον κυτταρομετρητή ροής
- Πλαστικά σωληνάρια 10 mL
- Πλαστικά σωληνάρια των 50mL τύπου Falcon
- Αυτόματες πιπέτες ακριβείας ρυθμιζόμενου όγκου 10/100/1000μL

1.4 Εργαστηριακές μέθοδοι

Από όλους τους συμμετέχοντες στην μελέτη ασθενείς και υγιείς μάρτυρες λήφθηκε δείγμα περιφερικού αίματος 50 ml. Όλα τα απαραίτητα δείγματα των ασθενών λήφθηκαν κατά τις τακτικές και προγραμματισμένες εξετάσεις τους με βάση το θεραπευτικό πρωτόκολλο που ακολουθούσε η εκάστοτε κλινική όπου παρακολουθούνταν και δεν επιβαρύνθηκαν επιπρόσθετα οι ασθενείς με οιονδήποτε τρόπο.

- Συλλογή 50ml περιφερικού αίματος από ασθενείς και υγιείς μάρτυρες σε σωληνάριο Falcon 50ml που περιέχει 300IU κλασσικής ηπαρίνης.
- Κάθε δείγμα ορίζεται από τετραψήφιο κωδικό που συνίσταται από τα δύο αρχικά γράμματα του μικρού ονόματος και του επιθέτου του ασθενούς ή του υγιούς μάρτυρα.

1.4.1 Απομόνωση των NK κυττάρων περιφερικού αίματος

1.4.1.1 Προσδιορισμός του απόλυτου αριθμού NK-κυττάρων δείγματος με τεχνική κυτταρομετρίας ροής και εκτίμηση της έκφρασης στην επιφάνεια των NK-κυττάρων των αντιγόνων CD¹⁶⁻⁵⁶

- Σε δοκιμαστικό σωληνάριο εισάγεται ο απαιτούμενος για την τυποποίηση των NK-κυττάρων συνδυασμός των μονοκλωνικών αντισωμάτων συνδεδεμένων με φθορίζουσες ουσίες [CD3-FITC/CD(16+56)-PE]. Οι όγκοι που χρησιμοποιούνται είναι οι προτεινόμενοι από τον κατασκευαστή του μονοκλωνικού αντισώματος (15μl) και λαμβάνονται με πιπέτες ακριβείας.
- Σε κάθε σωληνάριο προστίθενται 100 μL δείγματος περιφερικού αίματος από το αρχικό δείγμα που περιέχει περίπου 1×10^6 κύτταρα και γίνεται ανάδευση του μίγματος σε ανακινητήρα σωληναρίων (vortex).
- Ακολουθεί επώαση των κυττάρων με τα μονοκλωνικά αντισώματα σε θερμοκρασία δωματίου (20-25 °C) για 10 λεπτά στο σκοτάδι.
- Μετά την πάροδο των 10 λεπτών το κυτταρικό διάλυμα αναδεύεται εκ νέου σε ανακινητήρα σωληναρίων (vortex)

- Στην συνέχεια γίνεται λύση των ερυθροκυττάρων με κατάλληλο διάλυμα του εμπορίου (NH_4Cl), προσθέτοντας 2 mL NH_4Cl στο σωληνάριο, γίνεται ανάδευση του μίγματος σε ανακινητήρα σωληναρίων (vortex) και ακολουθεί επώαση σε θερμοκρασία δωματίου (20-25 °C) για 15 λεπτά στο σκοτάδι.
- Τέλος, προστίθενται 100 μ L σφαιριδίων Flow-Count FluorospheresTM, γίνεται εκ νέου ανάδευση του μίγματος σε ανακινητήρα σωληναρίων (vortex) και το σωληνάριο είναι έτοιμο προς μέτρηση.

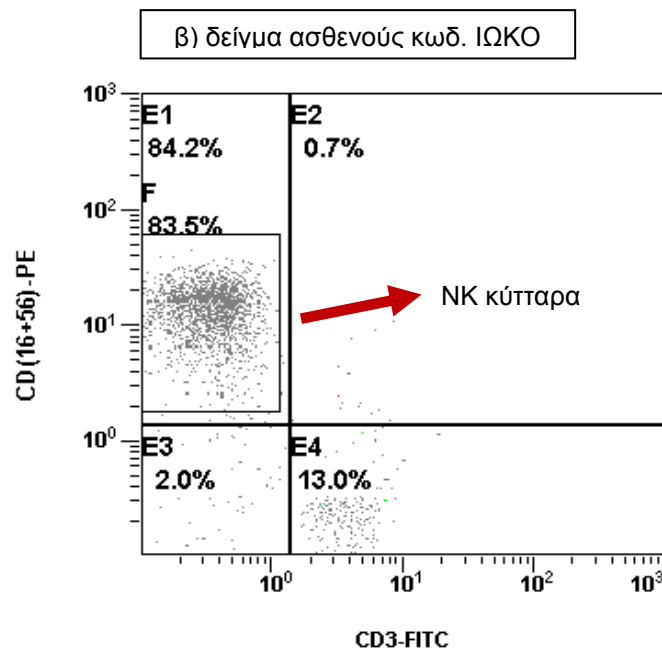
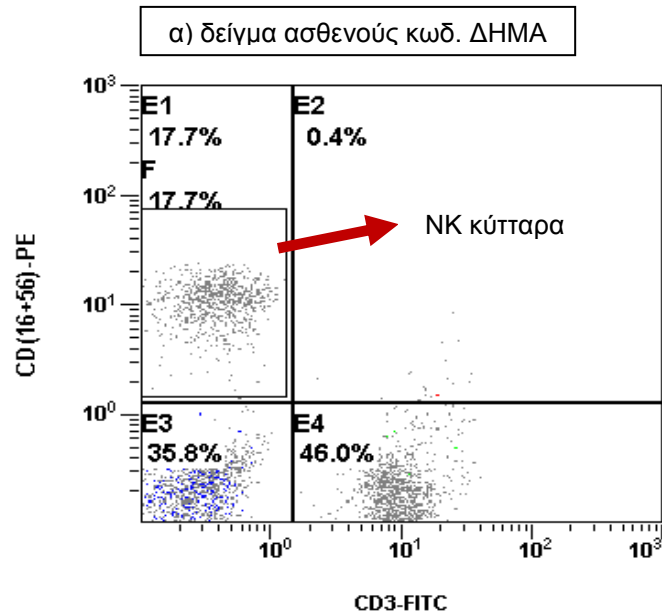
Η πορεία ανάλυσης και μελέτης των επιφανειακών δεικτών για τα NK κύτταρα έχει ως εξής:

- Για κάθε δείγμα συλλέγονται από τον κυτταρομετρητή περίπου 12000 events. Στο πρώτο στικτόγραμμα (dot plot) απομονώνονται τα λεμφοκύτταρα βάσει της συσχέτισης του πρόσθιου (FSC) και πλάγιου σκεδασμού (SSC).
- Κατόπιν σε δεύτερο στικτόγραμμα (dot plot) γίνεται μελέτη των λεμφοκυττάρων ως προς δύο παραμέτρους ταυτόχρονα το CD3 και το CD16/56, το οποίο χωρίζεται σε 4 ορθογώνιες περιοχές ανάλυσης. Οι δύο περιοχές περιέχουν κύτταρα που είναι θετικά στον ένα δείκτη και αρνητικά στον άλλο, ενώ οι άλλες δύο περιοχές περιέχουν τα διπλά θετικά κύτταρα και τα διπλά αρνητικά κύτταρα. Ως γνωστόν, τα NK κύτταρα ανοσοφαινοτυπικά χαρακτηρίζονται ως $CD3^-$ ($CD16^+$ και/ή $CD56^+$) κύτταρα. Έτσι, γίνεται η οριοθέτηση και ο προσδιορισμός του απόλυτου αριθμού των NK κυττάρων*. (Εικ.1)

Με τη διαδικασία αυτή επιβεβαιώνεται ότι το εκάστοτε δείγμα διαθέτει αναγνωρίσιμα ανοσοφαινοτυπικά NK-κύτταρα και πως ο συνολικός απόλυτος αριθμός τους είναι $\geq 2 \times 10^6$, αριθμός που επιτρέπει την ομαλή ολοκλήρωση του πειράματος.

**[Ορισμός Μέτρησης: Ολικά NK κύτταρα σε δείγμα πλήρους αίματος (ΠΑ) με τεχνική κυτταρομετρίας ροής (καταγραφή ανοσοφαινοτύπου-ΑΦ) : NKcs-ΠΑ/ΑΦ]*

Εικόνα 1. Ανοσοφαινοτυπική απεικόνιση των NK κυττάρων σε περιφερικό αίμα και προσδιορισμός του απολύτου αριθμού τους. Παρατίθενται δύο δείγματα από τους ασθενείς που ελέγχθηκαν (α,β).



1.4.1.2 Απομόνωση των μονοπύρηνων κυττάρων (Peripheral Mononuclear Cells - PMNCs) με τεχνική διαβαθμισμένης πυκνότητας από το δείγμα περιφερικού αίματος ασθενών και υγιών μαρτύρων

Οι ακόλουθες διαδικασίες πραγματοποιούνται σε θάλαμο καθέτου νηματικής ροής αέρος (Laminar Flow Hood) στην οποία πραγματοποιείται φιλτράρισμα του αέρα, προς επίτευξη άσηπτων συνθηκών προκειμένου να αποφευχθεί η πιθανή μόλυνση των κυτταρικών διαλυμάτων. Πριν από κάθε ενέργεια σχετική με τα σωληνάρια θα πρέπει ο χώρος εργασίας και τα υλικά να αποστειρώνονται με ψεκασμό με διάλυμα 70% αιθανόλης ενώ είναι απαραίτητη η χρήση γαντιών.

- Αραιώνουμε το δείγμα περιφερικού αίματος (50ml) με αποστειρωμένο ρυθμιστικό διάλυμα διατήρησης κυττάρων HBSS σε αναλογία 1:1. Αναδεύουμε ομαλά το διάλυμα με αναστροφή του σωληναρίου.
- Σε καθένα από τρία σωληνάρια Falcon των 50ml προσθέτουμε 15ml διαλύματος Histopaque.
- Χρησιμοποιώντας ακρυλική πιπέτα μεταβλητού όγκου των 10ml, εναποθέτουμε με πολύ βραδεία απορροή 35ml του διαλύματος αίματος-HBSS σε καθένα από τα τρία σωληνάρια με το Histopaque. Απαιτείται ιδιαίτερη προσοχή στην αποφυγή ανάμειξης των δύο διαλυμάτων και προς τούτου το σωληνάριο που φέρει το Histopaque καλό είναι να κρατάτε σε γωνία 45° ως προς τον πάγκο εργασίας. Με τον τρόπο αυτό αυξάνεται η επιφάνεια του Histopaque αφενός, αφετέρου δε επιτρέπεται στο διάλυμα του αίματος να κυλά αργά ακουμπώντας αρχικά στα τοιχώματα του σωληναρίου. Αφού ολοκληρωθεί η εργασία αυτή και αφού τοποθετηθούν τα καπάκια των σωληναρίων, αυτά μεταφέρονται στη συσκευή φυγοκέντρησης με προσοχή ώστε να αποφευχθεί η ανάμειξη. Φυγοκεντρούντε για χρονικό διάστημα 30' σε 1300rpm.
- Μετά το τέλος της φυγοκέντρησης τα σωληνάρια μεταφέρονται με προσοχή, ώστε να μην αναταραχθεί η ενδιάμεση στοιβάδα των κυττάρων, στον θάλαμο καθέτου νηματικής ροής αέρος.

- Χρησιμοποιώντας μια πιπέτα τύπου 'pasteur' αναρροφώνται και από τρία σωληνάρια οι στοιβάδες των μονοπύρηνων κυττάρων και συγκεντρώνονται σε νέο σωληνάριο τύπου falcon 50ml. Στο σωληνάριο προστίθεται διάλυμα HBSS έως τελικό όγκο 50ml και φυγοκεντρείται για 5 λεπτά σε 1300rpm.
- Μετά εκχύλιση του υγρού γίνεται επαναιώρηση της πελέτας των κυττάρων με 15ml διαλύματος HBSS και μεταφορά του κυτταρικού διαλύματος σε σωληνάριο falcon 15ml. Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 5' σε 1300rpm και επαναιώρηση σε 10ml διαλύματος HBSS (σε 20ml αν η πελέτα των κυττάρων φαίνεται αρκετά πυκνή).

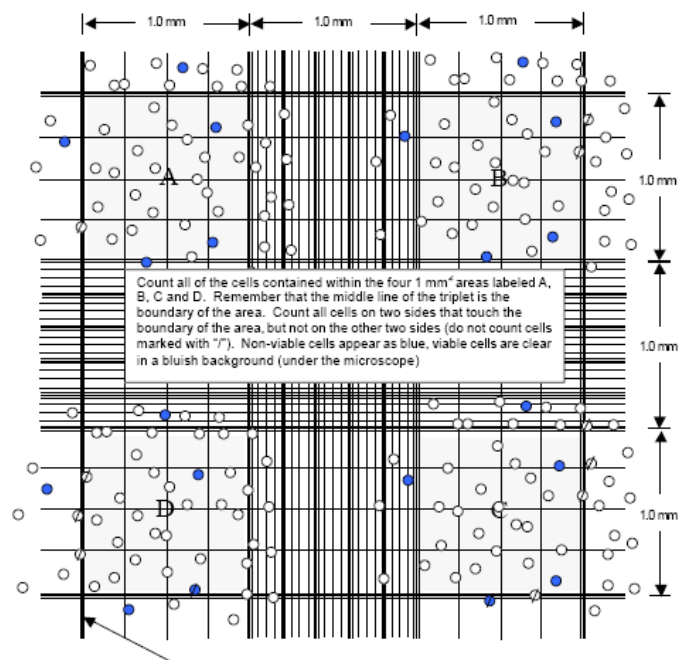
1.4.1.3 Προσδιορισμός του απολύτου αριθμού των απομονωμένων μονοπύρηνων κυττάρων (PMNCs) και εκτίμηση της βιωσιμότητάς τους

Η συγκέντρωση των απομονωμένων μονοπύρηνων κυττάρων προσδιορίζεται με τεχνική στηριζόμενη στη χρήση του αιμοκυτταρομέτρου (πλάκα Neubauer), η χρήση του οποίου είναι άμεση, απλή και οικονομική. Το ποσοστό των βιώσιμων κυττάρων στον κυτταρικό πληθυσμό των μονοπύρηνων κυττάρων που απομονώθηκε προσδιορίζεται με τη χρήση της χρωστικής Trypan Blue. Η χρωστική αυτή διέρχεται από την κυτταρική μεμβράνη μόνο όταν αυτή έχει υποστεί βλάβη, έτσι τα "εν ζωή" κύτταρα δεν προσλαμβάνουν τη χρωστική Trypan blue εν αντιθέσει με τα νεκρά κύτταρα που την προσλαμβάνουν. [112-113]

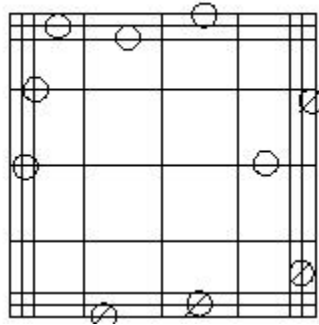
Το αιμοκυτταρόμετρο είναι μια τροποποιημένη αντικειμενοφόρος πλάκα που έχει δύο κατάλληλα επεξεργασμένες λείες επιφάνειες. Κάθε μια από αυτές διαθέτει ένα τετραγωνισμένο πλέγμα, το οποίο αποτελείται από 9 κύρια τετράγωνα με μήκος πλευράς 1mm (εμβαδόν 1mm²). Το κάθε ένα από αυτά τα τετράγωνα ορίζεται από τρεις παράλληλες ισαπέχουσες γραμμές (απέχουν μεταξύ τους 2.5 μm), με βάση τις οποίες καθορίζεται εάν τα κύτταρα βρίσκονται εντός ή εκτός του τετραγώνου. Επίσης κάθε ένα από τα κύρια τετράγωνα διαιρείται σε δεκαέξι μικρότερα τετράγωνα ώστε να διευκολύνεται η μέτρηση των κυττάρων κατά την παρατήρηση στο μικροσκόπιο. Το επίπεδο του διαβαθμισμένου πλέγματος βρίσκεται

0.1 mm χαμηλότερα από δύο παράλληλες προεξοχές, τις «ράχες» του αιμοκυτταρόμετρου, στις οποίες στηρίζεται η καλυπτρίδα. Ανάμεσα στην εξωτερική πλευρά της τετραγωνισμένης λείας επιφάνειας και στις «ράχες» όπου στηρίζεται η καλυπτρίδα, υπάρχει μια κοίλη επιφάνεια στην οποία εισάγεται το κυτταρικό εναιώρημα και απλώνεται με τριχοειδικό φαινόμενο στην διαβαθμισμένη επιφάνεια του αιμοκυτταρομέτρου (Εικ.2α). Παρατηρώντας τα κύτταρα στο οπτικό μικροσκόπιο υπολογίζουμε τον αριθμό τους μετρώντας τα στα διαβαθμισμένα πεδία A,B,C,D, προσέχοντας να μετράμε από τα κύτταρα που βρίσκονται στην περιφέρεια των τετραγώνων μόνο όσα αγγίζουν την ενδιάμεση γραμμή της κορυφαίας και αριστερής εξωτερικής περιφερικής πλευράς τους.(Εικ.2β)

Εικόνα 2α. Η διαβαθμισμένη επιφάνεια του αιμοκυτταρομέτρου. Μετρώνται τα κύτταρα που βρίσκονται στα διαβαθμισμένα πεδία A,B,C,D.



Εικόνα 2β. Τεχνική μέτρησης των κυττάρων στο οπτικό μικροσκόπιο με τη μέθοδο του αιμοκυτταρομέτρου.



Επειδή ο όγκος που καταλαμβάνει το κυτταρικό εναιώρημα σε καθένα από τα εννέα τετράγωνα είναι 1 mm^3 ή 10^{-4} cm^3 και καθώς 1 cm^3 είναι ίσο περίπου με 1ml, ο υπολογισμός της συγκέντρωσης των κυττάρων γίνεται με τους ακόλουθους υπολογισμούς:

$$\text{Κύτταρα/ml} = [\text{μέση τιμή αριθμού κυττάρων /πεδίο μέτρησης (A,B,C,D)}] \times (\text{συντελεστής αραίωσης}) \times 10^4$$

Παράδειγμα: ας θεωρήσουμε ότι μετρήθηκαν 45 κύτταρα ως μέση τιμή αριθμού κυττάρων /πεδίο μέτρησης (A,B,C,D) και πως το δείγμα προήλθε από αρχικό όγκο δ /τος 10ml.

$$\text{Κύτταρα/ml: } (45 \text{ κύτταρα}) \times (5) \times (10^4) = 2.25 \times 10^6 \text{ κύτταρα/ml}$$

Απόλυτος συνολικός αριθμός κυττάρων = κύτταρα/ml \times αρχικός όγκος κυτταρικού δ /τος σε ml

$$\text{Παράδειγμα: Απόλυτος αριθμός κυττάρων} = 2.25 \times 10^6 \times 10 \text{ ml} = 2.25 \times 10^7$$

Προκειμένου να υπολογίσουμε το ποσοστό των βιώσιμων κυττάρων μετρούμε σύμφωνα με την παραπάνω τεχνική ξεχωριστά τα βιώσιμα και τα μη βιώσιμα κύτταρα. Τα μη βιώσιμα "νεκρά" κύτταρα φαίνονται κεχρωσμένα μπλε λόγω της εισχώρησης της χρωστικής Trypan Blue.

Βιωσιμότητα κυττάρων (%) = (συνολικός αρ. βιώσιμων κυττάρων ÷ συνολικός αρ. κυττάρων) x 100

Συνολικός αριθμός βιώσιμων κυττάρων = βιώσιμα κύτταρα/ml x αρχικός όγκος δ/τος (ml)

Παράδειγμα: μέση τιμή αρ. βιώσιμων κυττάρων/πεδίο μέτρησης (A,B,C,D) = 37.5

Βιώσιμα κύτταρα/ml = (37.5 x 5) x 10⁴ = 1.875 x 10⁶

Απόλυτος συνολικός αρ. βιώσιμων κυττάρων = (1.875 x 10⁶) x 10 ml = 1.875 x 10⁷

Βιωσιμότητα κυττάρων (%) = (1.875 x 10⁷) ÷ (2.25 x 10⁷) x 100 = 83%

Η τεχνική μέτρησης των μονοπύρηνων κυττάρων (PMNCs) :

- Σε ένα σωληνάριο erpendorf 1.5ml προσθέτουμε 20μL χρωστικής Trypan Blue και 20μL του κυτταρικού διαλύματος με HBSS μετά το δεύτερο πλύσιμο, και αναδεύουμε με τη χρήση της μικροπιπέτας.
- Αφήνουμε το διάλυμα να επωαστεί για 5 λεπτά αλλά όχι για περισσότερα από 15 λεπτά, καθώς μετά από αυτό το διάστημα η χρωστική δύναται να χρώσει και τα βιώσιμα κύτταρα με τον ίδιο τρόπο που χρώζει τα νεκρά κύτταρα.
- Μεταφέρουμε 10μl από το εναιώρημα χρησιμοποιώντας μικροπιπέτα P20 gilson στην κοίλη επιφάνεια του αιμοκυτταρομέτρου, ακουμπώντας με ιδιαίτερη προσοχή την καλυπτρίδα και αφήνοντας το εναιώρημα να διαχυθεί χωρίς να υπερπληρωθεί ή να υποπληρωθεί η κοίλη επιφάνεια του αιμοκυτταρομέτρου.
- Μετρούμε τα κύτταρα μεταφέροντας την πλάκα του αιμοκυτταρομέτρου στο οπτικό μικροσκόπιο ακολουθώντας τα βήματα που αναλύθηκαν παραπάνω*.
- Σε περίπτωση που τα κύτταρα είναι άφθονα και είναι δυσχερής η καταμέτρησή τους, το κυτταρικό διάλυμα αραιώνεται σε αναλογία 1/10 με ρυθμιστικό διάλυμα PBS. Παράδειγμα 10μl κυτταρικού δ/τος +90μl PBS προστίθενται σε σωληνάριο erpendorf και αναμειγνύονται. Ακολούθως

10ml αυτού του δ/τος αναμειγνύονται με 10ml Trypan blue χρωστικής και ακολουθεί η διαδικασία μέτρησης που προαναφέρθηκε*.

- Πριν από κάθε μέτρηση το αιμοκυτταρόμετρο και η καλυπτρίδα πρέπει να ξεπλένονται με νερό, να ψεκάζονται με διάλυμα αιθανόλης 70% και να στεγνώνονται προσεχτικά.
- Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 5' σε 1300rpm, εκχύλιση του υπερκειμένου υγρού και επαναιώρηση των κυττάρων με προσθήκη ρυθμιστικού δ/τος PBS όγκου τόσου ώστε σύμφωνα με τη μέτρηση των PMNCs η τελική συγκέντρωση των PMNCs να είναι 10×10^6 cells/ml.

**[Ορισμός Μέτρησης: Ολικά PMNCs κύτταρα σε δείγμα πλήρους αίματος (ΠΑ) με τεχνική Trypan Blue (TB) και προσδιορισμός βιωσιμότητας (%) – PMNCs-ΠΑ/TB και PMNCs-ΠΑ/TB-βιωσ. (%)]*

1.4.1.4 Ανοσομαγνητικός διαχωρισμός των NK κυττάρων

Η απομόνωση των NK κυττάρων πραγματοποιήθηκε με την τεχνική του ανοσομαγνητικού διαχωρισμού με αρνητική επιλογή των NK κυττάρων από το διάλυμα των απομονωμένων PMNCs, χρησιμοποιώντας το σκεύασμα BD IMag™ Human NK Cell Enrichment Set – DM.

Το Biotinylated Human NK Cell Enrichment Cocktail περιέχει μονοκλωνικά αντισώματα τα οποία αναγνωρίζουν αντιγόνα που εκφράζουν τα ερυθροκύτταρα, τα αιμοπετάλια και τα περιφερικά λευκοκύτταρα εκτός των NK κυττάρων. Ακολούθως προστίθενται στο κυτταρικό διάλυμα νανοσφαιρίδια ομοιοπολικά συζευγμένα με streptavidin τα οποία δεσμεύονται από τα κύτταρα που φέρουν στην επιφάνειά τους τα μονοκλωνικά αντισώματα. Η streptavidin συμβάλλει ώστε να αποφεύγεται η ανεπιθύμητη ενεργοποίηση των NK κυττάρων καθώς τα συστατικά αυτά δεν δεσμεύονται άμεσα στα NK κύτταρα.

Το σκεύασμα NK Cell Enrichment Cocktail που χρησιμοποιήθηκε περιλαμβάνει τα ακόλουθα μονοκλωνικά αντισώματα:

Anti-human CD3, clone UCHT1

Anti-human CD19, clone HIB19

Anti-human CD36, clone CB38 (NL07)

Anti-human CD41a, clone HIP8

Anti-human CD66b, clone G10F5

Anti-human CD123 (IL-3 Receptor α chain), clone 9F5

Anti-human CD235a (Glycophorin A), clone GA-R2 (HIR2)

Anti-human IgE, clone G7-26

Συνοπτικά η αρχή της εφαρμογής της μεθόδου βασίζεται στη δέσμευση των αντίστοιχων αντιγονικών κυτταρικών θέσεων αφού το σκεύασμα προστεθεί στο κυτταρικό διάλυμα. Όταν το σημασμένο κυτταρικό διάλυμα τοποθετηθεί στο μαγνητικό πεδίο που διαθέτει η κατασκευάστρια εταιρεία (BD IMagnet™ - Cat. No. 552311), τα σημασμένα κύτταρα μετακινούνται και προσκολλώνται επάνω στη μαγνητική στήλη (θετική επιλογή), ενώ τα μη σημασμένα NK κύτταρα παραμένουν στο διάλυμα και μπορούν πλέον να ληφθούν ανεξάρτητα ως ένα κυτταρικό διάλυμα απομονωμένων NK κυττάρων. Η καθαρότητα δε του διαλύματος ελέγχεται ακολούθως με την τεχνική της κυτταρομετρίας ροής.

Η διαδικασία αρνητικού ανοσομαγνητικού διαχωρισμού των NK κυττάρων, αναλυτικά ακολουθεί τα παρακάτω βήματα:

- Προσθέτουμε 5μl του διαλύματος Biotinylated Human NK Cell Enrichment Cocktail ανά 1×10^6 κύτταρα PMNCs, αναδεύουμε με την πιπέτα (πάνω - κάτω) και επωάζουμε το διάλυμα σε θερμοκρασία δωματίου για 15' σε σκοτεινό θάλαμο.
- Τα σημασμένα κύτταρα πλένονται με προσθήκη 10ml ρυθμιστικού διαλύματος PBS και το διάλυμα φυγοκεντρείται σε 1200rpm για 7'.

- Με μεγάλη προσοχή αναρροφάται το υπερκείμενο και με ελαφρύ κτύπημα του πυθμένα του σωληναρίου επιχειρείται η διάσπαση της στοιβάδας των κυττάρων.
 - Από το φιαλίδιο που περιέχει τα νανοσφαιρίδια (BD IMag™ Streptavidin Particles Plus – DM) αφότου αυτό ανακινηθεί έντονα σε ανακινητήρα σωληναρίων (vortex), προσθέτουμε 5μl ανά 1×10^6 συνολικού αριθμού κυττάρων. Αναμειγνύουμε και το διάλυμα επωάζεται σε θερμοκρασία δωματίου για 30'.
 - Προσθέτουμε ρυθμιστικό διάλυμα PBS μέχρι ο συνολικός όγκος του κυτταρικού διαλύματος να φθάσει το 1 ml, διαμορφώνοντας τη συγκέντρωση των σημασμένων κυττάρων σε $20-80 \times 10^6$ cells/ml.
 - Το κυτταρικό αυτό διάλυμα των σημασμένων κυττάρων μεταφέρεται σε σωληνάριο κυτταρομετρίας (διαστάσεις: 12 x 75 mm) και τοποθετείται στην ειδική θέση στη συσκευή BD IMagnet™ η οποία έχει τοποθετηθεί σε οριζόντια θέση. Το σωληνάριο παραμένει στη θέση αυτή 6-8'.
- Σε περίπτωση που ο απόλυτος αριθμός PMNCs είναι μεγάλος και αναλογικά ο όγκος του διαλύματος υπερβαίνει το 1 ml, απαιτείται σωληνάριο διαστάσεων 17 x 100 mm. Ο όγκος του κυτταρικού διαλύματος δε θα πρέπει να υπερβαίνει τα 3 ml. Στην περίπτωση αυτή το σωληνάριο τοποθετείται στην ειδική θέση στη συσκευή BD IMagnet™ η οποία έχει τοποθετηθεί τώρα σε κάθετη θέση, όπου παραμένει για 8'.*
- Από το σωληνάριο που παραμένει στην ειδική θέση στη μαγνητική στήλη BD IMagnet™, αναρροφούμε με ιδιαίτερη προσοχή με αποστειρωμένη μικροπιπέτα 200μl, το διάλυμα που περιέχει τα μη ελκυσόμενα από το μαγνητικό πεδίο κύτταρα (εμπλουτισμένο κλάσμα) και το μεταφέρουμε σε κενό αποστειρωμένο σωληνάριο κυτταρομετρίας.
 - Απομακρύνουμε το σωληνάριο που περιέχει τα σημασμένα κύτταρα από τον μαγνήτη BD IMagnet™, αραιώνουμε το θετικό αυτό κλάσμα κυττάρων με προσθήκη 3 ml PBS αναμειγνύοντας με την πιπέτα (πάνω-κάτω επί 10-15 φορές) και το επανατοποθετούμε στην ειδική θέση του σωληναρίου στη μαγνητική στήλη για διάστημα 6-8'.
- Στην περίπτωση που χρησιμοποιούμε το σωληνάριο διαστάσεων 17 x 100 mm, αυτό παραμένει στο μαγνητικό πεδίο επί 8'.*

- Από το σωληνάριο που παραμένει στην ειδική θέση στη μαγνητική στήλη BD IMagnet™, αναρροφούμε και πάλι με ιδιαίτερη προσοχή με νέα αποστειρωμένη μικροπιπέτα 200μl το διάλυμα που περιέχει τα μη ελκυσόμενα από το μαγνητικό πεδίο κύτταρα (εμπλουτισμένο κλάσμα) και το μεταφέρουμε σε κενό αποστειρωμένο σωληνάριο κυτταρομετρίας.

- Επαναλαμβάνουμε για μία τελευταία φορά τα βήματα αυτά. Απομακρύνουμε και πάλι το σωληνάριο που περιέχει τα σημασμένα κύτταρα από τη μαγνητική στήλη BD IMagnet™, αραιώνουμε το θετικό αυτό κλάσμα κυττάρων με προσθήκη 3 ml PBS αναμειγνύοντας με την πιπέτα (πάνω-κάτω επί 10-15 φορές) και το επανατοποθετούμε στην ειδική θέση του σωληναρίου στη μαγνητική στήλη για διάστημα 6-8'.

Στην περίπτωση που χρησιμοποιούμε το σωληνάριο διαστάσεων 17 x 100 mm παραμένει στο μαγνητικό πεδίο επί 8'.

- Αφού αναρροφήσουμε εκ νέου το εμπλουτισμένο κλάσμα κυττάρων θα έχουμε 3 σωληνάρια (όγκου έκαστο: 1ml+3ml+3ml), τα οποία περιέχουν κλάσμα κυττάρων εμπλουτισμένο ως προς τα NK κύτταρα ενώ θα πρέπει να μην περιέχονται σε αυτό προσδεμένα αντισώματα ή μαγνητικά νανοσφαιρίδια.

- Προσκειμένου να επιτευχθεί περαιτέρω καθαρότητα του κλάσματος αυτού των NK κυττάρων κατά $\geq 5\%$, τοποθετούμε τα τρία αυτά σωληνάρια στο μαγνητικό πεδίο για ακόμη 6-8'.

Στην περίπτωση που χρησιμοποιούμε το σωληνάριο διαστάσεων 17 x 100 mm παραμένει στο μαγνητικό πεδίο επί 8'.

- Μετά πάροδο του διαστήματος αυτού αναρροφούμε με μεγάλη προσοχή το διπλά εμπλουτισμένο κλάσμα μη σημασμένων κυττάρων και το μεταφέρουμε σε ένα σωληνάριο.

- Το αρνητικά επιλεγμένο αυτό κυτταρικό διάλυμα ακολούθως ελέγχεται ως προς την ανοσοφαινοτυπική έκφραση των NK κυττάρων, τον απόλυτο αριθμό τους καθώς και τη βιωσιμότητά τους με εφαρμογή κυτταρομετρίας ροής και με εφαρμογή της τεχνικής αιμοκυτταρομέτρου και της χρωστική Trypan blue.

- Από το αρνητικά επιλεγμένο αυτό κυτταρικό διάλυμα 7ml αναρροφούμε 200μl, προσθέτουμε 15μl του συνδυασμού μονοκλωνικών αντισωμάτων CD3-FITC /CD(16+56)-PE, αναδεύουμε και διατηρούμε το

διάλυμα για 10' σε σκοτεινό θάλαμο. Μετά την πάροδο των 10' το κυτταρικό διάλυμα αναδεύεται εκ νέου σε ανακινητήρα σωληναρίων (vortex), προσθέτουμε 500μl δ/τος RPMI και 100μl φθοριοσφαιρίδια (Flow-Count Fluorospheres) και το διάλυμα αναδεύεται εκ νέου σε ανακινητήρα σωληναρίων (vortex).

- Ακολούθως μετράται το κυτταρικό διάλυμα στον κυτταρομετρητή. Στο στικτόγραμμα απεικόνισης των σημασμένων κυττάρων ελέγχεται η έκφραση των αντιγόνων CD16-56, ενώ προσδιορίζεται ο απόλυτος αριθμός των αρνητικά επιλεγμένων NK-κυττάρων.
- Από το αρνητικά επιλεγμένο κυτταρικό διάλυμα 7ml αναρροφούμε επίσης 20μl και εφαρμόζουμε την τεχνική μέτρησης και προσδιορισμού βιωσιμότητας των κυττάρων με τη χρωστική Trypan blue όπως περιγράφηκε ανωτέρω*.

**[Ορισμός Μέτρησης: Ολικά απομονωμένα NK κύτταρα με τεχνική Trypan Blue (TB) και προσδιορισμός βιωσιμότητας (%) – NKcs/TB και NKcs /TB-βιωσ.(%)]*

- Το NK κυτταρικό διάλυμα ακολούθως φυγοκεντρείται σε 1200rpm για διάστημα 5' και με βάση το αποτέλεσμα της μέτρησης του απολύτου αριθμού NK κυττάρων που προσδιορίστηκε με την τεχνική του αιμοκυτταρομέτρου, επαναιωρείται με καλλιεργητικό μέσο** τόσο ούγκου ώστε η συγκέντρωση των NK κυττάρων να είναι 1×10^6 /ml.
- Το κυτταρικό αυτό διάλυμα των απομονωμένων NK κυττάρων τοποθετείται στον επωαστήρα προκειμένου να χρησιμοποιηθεί στη συνέχεια.

*** Το θρεπτικό υλικό (καλλιεργητικό μέσο) που χρησιμοποιήθηκε για τη διατήρηση των κυττάρων σε όλα τα στάδια των πειραμάτων, παρασκευάζεται μέσα σε θάλαμο καθέτου νηματικής ροής αέρος προς αποφυγή επιμόλυνσης, με ανάμειξη 450 ml καλλιεργητικού υλικού πλούσιου σε φώσφορο RPMI 1640 + GlutaMax και 50 ml 10% FBS (Fetal Bovine Serum). Προκειμένου δε για το θρεπτικό υλικό που χρησιμοποιήθηκε για τη συντήρηση των κυτταρικών καλλιεργειών μακράς διάρκειας, στο διάλυμα προσθέτουμε και 6,5ml αντιβιοτικών*

στρεπτομυκίνης και πενικιλίνης (Pen/Strep 5000U/ml) προς περιορισμό της πιθανότητας βακτηριακών μολύνσεων. Το διάλυμα FBS πρέπει να είναι θερμοαπενεργοποιημένο με διατήρησή του επί 1 ώρα σε θερμοκρασία 56°C σε συσκευή κλιβάνου.

1.4.2 Έλεγχος της NK-κυτταροτοξικότητας

1.4.2.1 Κύτταρα – ‘στόχοι’ κατά τον έλεγχο της NK-κυτταροτοξικότητας

Όλα τα δείγματα απομονωμένων NK κυττάρων ελέγχθηκαν ως προς την κυτταροτοξική ισχύ τους έναντι της NK-ανθεκτικής κυτταρικής σειράς Raji και έναντι της NK-ευαίσθητης κυτταρικής σειράς K562.

Οι συνεχείς κυτταρικές σειρές αποτελούνται από αθάνατα καρκινικά κύτταρα που έχουν ληφθεί απευθείας από έναν πάσχοντα οργανισμό ή από καλλιεργούμενα κύτταρα που έχουν υποστεί κάποια αλλαγή με αποτέλεσμα να συμπεριφέρονται ως καρκινικά κύτταρα (μετασχηματισμένα, transformed). Αυτά τα κύτταρα πολλαπλασιάζονται πολύ γρήγορα και κύριο χαρακτηριστικό τους είναι η παρουσία του ενζύμου τελομεράση σε ενεργή μορφή κατά την διάρκεια της κυτταρικής διαίρεσης, η οποία εμποδίζει την βράχυνση των τελομερών. Με τον τρόπο αυτό, τα κύτταρα αυτά μπορούν να ξεπεράσουν τον αριθμό των κυτταρικών διαιρέσεων που τα περισσότερα φυσιολογικά κύτταρα μπορούν να υποστούν προτού εκφυλιστούν.

Η κυτταρική σειρά Raji προέρχεται από ανθρώπειο Non Hodgkin λέμφωμα τύπου Burkitt και λήφθηκε από εντοπισμένη βλάβη της αριστερής γνάθου ενός 12χρονου αγοριού Αφρικανικής καταγωγής το 1963. Αποτελεί την πρώτη συνεχή ανθρώπινη αιμοποιητική κυτταρική σειρά που αναγνωρίσθηκε.[116] Αποτελείται από σφαιρικά κύτταρα που διατηρούνται σε εναιώρημα μεμονωμένα με μερική ανάπτυξη αθροίσεων. Ανοσοφαινοτυπικά εκφράζουν τα αντιγόνα CD10⁺, CD19⁺, CD20⁺, CD37⁺, CD38⁺, cyCD79a⁺, CD80⁺, HLA-DR⁺, cyIgM⁺. Η

κυτταρική σειρά Raji εκφράζει σταθερά και τις δύο ομάδες αλληλίων μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας (ΜΣΙ) - τύπου C που αποτελούν κύριο προσδέτη των ανασταλτικών KIR υποδοχέων των NK κυττάρων, χαρακτηριστικό που την καθιστά ιδιαίτερα ανθεκτική στην NK-κυτταρόλυση.

Η κυτταρική σειρά K562 αποτελείται από ανθρώπινα κύτταρα Χρόνιας Μυελογενούς Λευχαιμίας σε φάση βλαστικής κρίσης της νόσου και απομονώθηκε από κύτταρα πλευριτικής συλλογής 53-χρονης ασθενούς το 1970. Αποτελείται από σφαιρικά κύτταρα που διατηρούνται σε εναιώρημα ως μεμονωμένα κύτταρα και δε σχηματίζουν αθροίσεις. Τα κύτταρα αυτά φέρουν το χιμαιρικό γονίδιο BCR-ABL1 e14-a2 (b3-a2) και ανοσοφαινοτυπικά εκφράζουν τα αντιγόνα επιφανείας CD15⁺, CD33⁺, CD71⁺, CD235a⁺. Ο συγκεκριμένος υποκλώνος αυτού του πληθυσμού δεν εκφράζει τα αντιγόνα ΜΣΙ -τύπου C, χαρακτηριστικό που καθιστά την κυτταρική αυτή σειρά ιδιαίτερα ευαίσθητη στην NK-κυτταρόλυση.

Οι κυτταρικές αυτές σειρές μπορούν να διατηρούνται σε συνεχή πολλαπλασιασμό σε κυτταροκαλλιέργεια μακράς διάρκειας ή να διατηρούνται σε συνθήκες κρυοκατάψυξης σε δεξαμενή υγρού αζώτου (Θερμ.: -196°C έως -156°C), απ'όπου παραλαμβάνονται και αποψύχονται για να τεθούν και πάλι σε καλλιέργεια.

1.4.2.2 Διατήρηση κυτταρικών καλλιεργειών μακράς διάρκειας

Τα κύτταρα κάθε κυτταρικής σειράς προστίθενται σε κατάλληλο για έκαστη κυτταρική σειρά καλλιεργητικό υλικό και αναπτύσσονται σε κατάλληλα δοχεία κυτταροκαλλιέργειας (φλάσκες T-75cm² ή T-25 cm²), που τοποθετούνται σε επωαστικό κλίβανο με σταθερή θερμοκρασία περιβάλλοντος (37°C), κατάλληλα επίπεδα CO² (5%) και κατάλληλες συνθήκες υγρασίας. Το καλλιεργητικό υλικό περιέχει διάφορα θρεπτικά υλικά για το κύτταρο όπως αμινοξέα, γλυκόζη, βιταμίνες και άλλα ανόργανα συστατικά για τη ρύθμιση του pH ενώ ο ορός εμβρύου βοοειδούς (FBS) παρέχει στα κύτταρα αυξητικούς παράγοντες και

ορμόνες για την ενίσχυση των μηχανισμών κυτταρικής διαίρεσης. Η παρασκευή του καλλιεργητικού υλικού που χρησιμοποιήθηκε περιγράφηκε παραπάνω (σελ.55). Τα κύτταρα μετά από 3-4 ημέρες καλλιέργειας φθάνουν στην λογαριθμική ή εκθετική φάση ανάπτυξης, η οποία χαρακτηρίζεται από έντονο πολλαπλασιασμό, αφού μετά από κάθε διαίρεση των κυττάρων (χρόνος γενεάς) ο αριθμός τους διπλασιάζεται. Κατά τη διάρκεια της φάσης αυτής τα κύτταρα μπορούν να υποστούν αλλαγές στο μέγεθος ενώ στο τέλος της φάσης παρατηρείται αναστολή της ανάπτυξης λόγω εξάντλησης του καλλιεργητικού υλικού και λόγω συγκέντρωσης στο υλικό προϊόντων ανταλλαγής της ύλης, βλαπτικών για τον περαιτέρω πολλαπλασιασμό των κυττάρων. Όταν τα κύτταρα φθάσουν στην φάση αυτή καλύπτουν περίπου το 80% της διαθέσιμης επιφάνειας, και τότε κρίνεται απαραίτητη η πραγματοποίηση της ανακαλλιέργειας. Αυτό γίνεται για να εξασφαλιστεί η απομάκρυνση των τοξικών προϊόντων του μεταβολισμού καθώς και για την προσθήκη θρεπτικών συστατικών για την διατήρηση του αριθμού των κυττάρων σε επιθυμητά επίπεδα, αφού η υπέρμετρη αύξηση του αριθμού τους μπορεί να δράσει ανασταλτικά στην ανάπτυξη επάγοντας μηχανισμούς απόπτωσης. Το πρωτόκολλο καλλιέργειας περιλαμβάνει τον έλεγχο της συγκέντρωσης των κυττάρων καθώς και της βιωσιμότητάς τους 2 έως 3 φορές την εβδομάδα με βάση την τεχνική του αιμοκυτταρομέτρου και της χρήσης Trypan blue χρωστικής, με ανάλογη ανανέωση του καλλιεργητικού υλικού ώστε να επιτυγχάνεται κατάλληλη συγκέντρωση των κυττάρων για την καλύτερη δυνατή ανάπτυξή τους, σύμφωνα με τα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά ανάπτυξης της εκάστοτε κυτταρικής σειράς.

Κατά την καλλιέργεια των κυττάρων υπάρχει πιθανότητα να προκύψουν προβλήματα που περιλαμβάνουν την ανάπτυξη βακτηρίων, μυκήτων ή ζυμών που ωστόσο μπορούν να εντοπιστούν εύκολα με γυμνό μάτι μέσω της παρατήρησης των αλλοιώσεων που προκαλούν στην κυτταροκαλλιέργεια. Αντίθετα, τυχόν μόλυνση από ιούς ή μυκόπλασμα, δεν είναι ορατή και για αυτό απαιτούνται ειδικές μέθοδοι ανίχνευσης, όπως η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase

Chain Reaction, PCR). Έτσι λοιπόν, για να αποφευχθούν τυχόν μολύνσεις των κύτταρων από μικροοργανισμούς θα πρέπει ο χειρισμός των κυττάρων να γίνεται σε άσηπτες συνθήκες. Για την επίτευξη άσηπτων συνθηκών χρησιμοποιείται εστία καθέτου νηματικής ροής (Laminar Flow) στην οποία πραγματοποιείται φιλτράρισμα του αέρα. Επίσης θα πρέπει ο χώρος εργασίας και τα υλικά να είναι αποστειρωμένα με 70% αιθανόλη ενώ είναι απαραίτητη η χρήση γαντιών μιας χρήσης που επίσης ψεκάζονται με διάλυμα αιθανόλης.

Χαρακτηριστικά διατήρησης κυτταρικής καλλιέργειας κυτ. σειράς Raji

Το χρονικό διάστημα που απαιτείται για διπλασιασμό του πληθυσμού της κυτ. σειράς Raji έχει υπολογιστεί σε 24-36 ώρες και άρα απαιτείται ανακαλλιέργεια δύο έως τρεις φορές την εβδομάδα με αραιώση του όγκου του κυτταρικού διαλύματος κατά 1:4 - 1:8, ώστε να διατηρείται η συγκέντρωση των κυττάρων σε 0.5×10^6 κύτταρα/ml. Η μέγιστη ανεκτή συγκέντρωση προς αποφυγή απόπτωσης των κυττάρων είναι 1×10^6 κύτταρα/ml.

Χαρακτηριστικά διατήρησης κυτταρικής καλλιέργειας κυτ. σειράς K562

Το χρονικό διάστημα που απαιτείται για διπλασιασμό του πληθυσμού της κυτ. σειράς K562 έχει υπολογιστεί σε 30-40 ώρες και άρα απαιτείται ανακαλλιέργεια δύο έως τρεις φορές την εβδομάδα με αραιώση του όγκου του κυτταρικού διαλύματος κατά 1:3 - 1:5, ώστε να διατηρείται η συγκέντρωση των κυττάρων σε $0.3-0.5 \times 10^6$ κύτταρα/ml. Η μέγιστη ανεκτή συγκέντρωση προς αποφυγή απόπτωσης των κυττάρων είναι $1 - 1.5 \times 10^6$ κύτταρα/ml.

1.4.2.3 Κρυοσυντήρηση κυτταρικών σειρών και απομονωμένων PMNCs ή NK κυττάρων

Η κρυοσυντήρηση είναι μία διαδικασία που επιτρέπει την συντήρηση βιώσιμων κυττάρων κατά την αποθήκευσή τους για μεγάλο χρονικό διάστημα σε θερμοκρασίες -70°C έως -80°C σε υπερκαταψύκτες ή και

μέχρι τους -196°C σε υγρό άζωτο. Όταν τα κύτταρα ψύχονται αναπτύσσονται ενδοκυτταρικά κρύσταλλοι πάγου. Καθώς η ψύξη συνεχίζεται, τα κύτταρα συντρίβονται μέσα σε θυλάκια πυκνού αλατούχου διαλύματος. Το τελευταίο είναι αποτέλεσμα της πύκνωσης του αρχικού υδατικού διαλύματος καθώς το νερό μετατρέπεται σε πάγο και απομακρύνεται. Επομένως η ψύξη ουσιαστικά συντρίβει τα κύτταρα καταστρέφοντας τις μεμβράνες, μπορεί δε να προκαλέσει αύξηση της συγκέντρωσης των διαλυμένων ουσιών (λόγω της δέσμευσης μορίων νερού στο πάγο), με συνέπεια δυνητικά καταστροφική για το κύτταρο.

Αντίθετα αν επιτευχθεί προοδευτική μείωση της θερμοκρασίας του εξωκυττάριου υγρού, το κύτταρο δυνητικά προφυλάσσεται και αυξάνονται οι πιθανότητες επιβίωσής του κατά την απόψυξη μετά από κρυοσυντήρηση κυτταρικών διαλυμάτων επί μακρύ χρονικό διάστημα. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιούνται διάφορες κρυοπροστατευτικές ουσίες.

Το διμεθυλοσουλφοξειδίο (dimethylsulfoxide, DMSO) αποτελεί μια εξαιρετική κρυοπροστατευτική ουσία, η οποία έχει το πλεονέκτημα ότι μπορεί να διέρχεται με μεγάλη ταχύτητα μέσω των κυτταρικών μεμβρανών ενώ ταυτόχρονα δεν εμφανίζει κυτταρική τοξικότητα. Τα υδατικά διαλύματα κρυοπροστατευτικών ουσιών καθιστούν δυνατή την ψύξη του νερού χωρίς να σχηματίζει κρυστάλλους οι οποίοι θα κατέστρεφαν τα κύτταρα. Η διαδικασία αυτή ονομάζεται υαλοποίηση (vitrification). Έτσι, καθώς η θερμοκρασία μειώνεται, τα υδατικά διαλύματα κρυοπροστατευτικών ουσιών καθίστανται σταδιακά πιο πυκνόρρευστα μέχρι πλήρους στερεοποίησης. Με αυτό τον τρόπο, μπορούν να καταψυχθούν σταδιακά στους -80°C και να στερεοποιηθούν σε μια πλήρως υαλοποιημένη κατάσταση χωρίς την εμφάνιση κρυστάλλων. Όσο βραδύτερος είναι ο ρυθμός ψύξης μέχρι την επίτευξη της υαλοποίησης, τόσο ελαχιστοποιούνται οι βλάβες στα ψυχωμένα κύτταρα.

Η κρυοσυντήρηση πραγματοποιείται όταν τα κύτταρα βρίσκονται σε εκθετική φάση ανάπτυξης, δηλαδή προκειμένου για τις κυτταρικές σειρές που καλλιεργούνται, πριν να γίνει η ανακαλλιέργειά τους. Η εργασία

αυτή πραγματοποιείται μέσα σε θάλαμο κάθετης νηματικής ροής αέρος με την ακόλουθη μεθοδολογία:

- Μεταφέρουμε το περιεχόμενο της φλάσκας (προκειμένου για κυτταρικές σειρές) ή το περιεχόμενο του σωληναρίου (προκειμένου για PMNCs ή NK απομονωμένα κύτταρα) σε σωληνάριο τύπου falcon 50ml και προσθέτουμε ρυθμιστικό διάλυμα HBSS μέχρι πλήρωσης του σωληναρίου.
- Το σωληνάριο φυγοκεντρείται σε 1200rpm για 10'.
- Μετά εκχύλιση του υπερκειμένου, η πελέτα των κυττάρων επαναιωρείται σε 5ml HBSS και το κυτταρικό διάλυμα μεταφέρεται σε σωληνάριο των 15ml.
- Ακολουθεί προσδιορισμός του απόλυτου αριθμού κυττάρων και εκτίμηση της βιωσιμότητάς τους με τις τεχνικές του αιμοκυτταρομέτρου και της χρωστικής Trypan blue όπως περιγράφηκαν αναλυτικά παραπάνω (σελ.47).
- Προστίθεται στο σωληνάριο διάλυμα HBSS μέχρι πληρώσεως και φυγοκεντρείται σε 1300rpm για 5'.
- Ακολούθως η πελέτα των κυττάρων επαναιωρείται σε καλλιεργητικό υλικό χωρίς προσθήκη αντιβιοτικών τόσο όγκου ώστε μετά την ακόλουθη προσθήκη κρυοπροστατευτικής ουσίας (DMSO), η αναλογία καλλιεργητικού υλικού/κρυοπροστατευτικής ουσίας να είναι 1/1 και η τελική συγκέντρωση των κυττάρων να είναι 10×10^6 κύτταρα/ml. Για παράδειγμα αν ο απόλυτος αριθμός των κυττάρων είναι 40×10^6 κύτταρα θα πρέπει να προστεθούν 2ml θρεπτικού υλικού και 2ml κρυοπροστατευτικής ουσίας.
- Αφού προστεθεί ο κατάλληλος όγκος καλλιεργητικού υλικού το σωληνάριο τοποθετείται σε επιφάνεια πάγου για 15'.
- Η κρυοπροστατευτική ουσία που χρησιμοποιήθηκε συνίσταται κατά 80% από διάλυμα FBS και κατά 20% από διάλυμα DMSO. Παρασκευάζουμε και αποθηκεύουμε για μελλοντική χρήση σωληνάρια με διάλυμα κρυοπροστατευτικής ουσίας τα οποία διατηρούνται σε καταψύκτη. Σε σωληνάριο των 50ml προσθέτουμε 40ml FBS και το τοποθετούμε σε επιφάνεια πάγου ώστε να διατηρείται ψυχρό.

Ακολούθως χρησιμοποιώντας πιπέτα των 10ml προσθέτουμε στο σωληνάριο που περιέχει FBS 10ml DMSO ενώ κατά την προσθήκη του το αναμειγνύουμε συνεχώς με ανάδευση του διαλύματος "πάνω-κάτω". Μοιράζουμε αυτό το υλικό, που στο εξής θα καλείται μέσο κρυοσυντήρησης, σε 10 σωληνάρια των 15ml και τα διατηρούμε σε θερμοκρασία -80°C για 6 μήνες.

- Χρησιμοποιούμε ένα από τα αποθηκευμένα σωληνάρια μέσου κρυοσυντήρησης αφού αποψυχθεί και φθάσει σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Το σωληνάριο αυτό αφού ψεκασθεί με διάλυμα αιθανόλης 70%, τοποθετείται σε επιφάνεια πάγου μέσα στο θάλαμο καθέτου νηματικής ροής αέρος όπου διατηρείται και το κυτταρικό διάλυμα που σκοπεύουμε να προετοιμάσουμε για κρυοσυντήρηση.
- Προσθέτουμε στο κυτταρικό διάλυμα τον κατάλληλο όγκο μέσου κρυοσυντήρησης όπως αναφέρθηκε ανωτέρω, με πολύ αργό ρυθμό και με συνεχή ανάδευση έτσι ώστε να αποφευχθεί το ωσμωτικό σοκ και να ελαχιστοποιηθεί η αύξηση της θερμοκρασίας που προκαλείται από την διάλυση του DMSO. Όλα τα διαλύματα διατηρούνται ψυχρά με συνεχή επαφή του πυθμένα των σωληναρίων με την επιφάνεια πάγου.
- Χωρίς καθυστέρηση το κυτταρικό διάλυμα με το μέσο κρυοσυντήρησης μοιράζεται σε κατάλληλα φιαλίδια κρυοσυντήρησης (cryovials), που επίσης είναι σε επαφή με την επιφάνεια πάγου, τοποθετώντας 1 ml διαλύματος σε καθένα από αυτά.
- Τα φιαλίδια κρυοσυντήρησης μεταφέρονται άμεσα σε θερμοκρασία -30°C , όπου φυλάσσονται για 20' και ακολούθως σε καταψύκτη θερμοκρασίας -80°C όπου διατηρούνται μέχρι την επόμενη ημέρα, οπότε και μεταφέρονται για μακρά φύλαξη σε δοχείο υγρού αζώτου στους -190°C .

1.4.2.4 Απόψυξη κρυοσυντηρημένων κυτταρικών σειρών και επανακαλλιέργειά τους

Η πιθανότητα επιβίωσης των κυττάρων μετά από μακρά περίοδο κρυοσυντήρησης δεν καθορίζεται μόνο από τον ρυθμό ψύξης τους, αλλά και από τον ρυθμό απόψυξής τους που θα πρέπει να είναι βραδύς. Η

απόψυξη των κρυοσυντηρημένων κυτταρικών σειρών πριν από τη διενέργεια των πειραμάτων ελέγχου NK-κυτταροτοξικότητας έγινε με την εξής μέθοδο:

- Το φιαλίδιο κρυοσυντήρησης που περιέχει το κατεψυγμένο κυτταρικό διάλυμα, μεταφέρεται με δοχείο με πάγο σε υδατόλουτρο στους 37°C, όπου αναδεύεται ήπια μέχρι την πλήρη τήξη του θρεπτικού μέσου (συνήθως χρειάζονται 1-2'). Η διαδικασία γίνεται όσο το δυνατόν ταχύτερα, προκειμένου να αποφευχθεί ο σχηματισμός ενδοκυτταρικών κρυστάλλων κατά τη διαδικασία της ενυδάτωσης των κυττάρων.
- Ακολούθως το φιαλίδιο κρυοσυντήρησης μεταφέρεται ταχύτατα μέσα στο θάλαμο καθέτου νηματικής ροής και με αποστειρωμένη πιπέτα τύπου Pasteur παραλαμβάνεται και μεταφέρεται το κυτταρικό διάλυμα σε σωληνάριο των 15ml. Προκειμένου να αραιωθεί το DMSO προστίθενται 10ml διαλύματος προθερμασμένου καλλιεργητικού υλικού με σύγχρονη συνεχή ανάδευση.
- Ακολούθως και σε διάστημα μικρότερο των 10' από την έναρξη της διαδικασίας απόψυξης, το σωληνάριο φυγοκεντρείται σε 1200rpm για 10'.
- Μετά εκχύλιση του υπερκλειμένου, προστίθενται 10ml καλλιεργητικού υλικού και διενεργείται, με τις τεχνικές αιμοκυτταρομέτρου και εφαρμογή της τεχνικής με χρήση χρωστικής Trypan blue, προσδιορισμός του απολύτου αριθμού κυττάρων καθώς και της βιωσιμότητάς τους.
- Ακολουθεί νέο πλύσιμο των κυττάρων με φυγοκέντρηση και επαναιώρηση ώστε η συγκέντρωση των κυττάρων να είναι 1×10^6 /ml.
- Το διάλυμα μεταφέρεται σε φλάσκα κυτταροκαλλιέργειας T25 (όγκου 50ml) και η φλάσκα τοποθετείται σε θάλαμο επώασης.
- Σε περίπτωση που η βιωσιμότητα των κυττάρων προσδιοριστεί μικρότερη από 60%, προτιμάται η μη συνέχιση της καλλιέργειας και η απόψυξη άλλου κρυοσυντηρημένου σωληναρίου κυττάρων της αυτής κυτταρικής σειράς.

1.4.2.5 Δοκιμασία ελέγχου NK-κυτταροτοξικότητας *in vitro*

Όλα τα δείγματα απομονωμένων NK κυττάρων ελέγχθηκαν ως προς την κυτταροτοξική τους ισχύ έναντι των επιλεγμένων κυτταρικών σειρών-στόχων, της ανθεκτικής ως προς τα NK κύτταρα σειράς Raji και της ευαίσθητης ως προς τα NK κύτταρα σειράς K562. Οι δοκιμασίες κυτταρόλυσης στα σωληνάρια πραγματοποιήθηκαν με διαμόρφωση αναλογίας δραστικών κυττάρων έναντι κυττάρων στόχων 5:1. Τα κύτταρα στόχοι προήλθαν ή από τις διατηρημένες στον επωαστήρα μακράς διάρκειας καλλιέργειες ή μετά απόψυξη κρυοσυντηρημένων κυττάρων και καλλιέργειά τους για περίοδο τουλάχιστον μιας εβδομάδας. Η κυτταροτοξικότητα των NK κυττάρων έναντι των κυττάρων στόχων εκτιμήθηκε με υπολογισμό της βιωσιμότητας των κυττάρων στόχων μετά τετράωρη συνεπώαση δραστικών κυττάρων και κυττάρων στόχων σε αναλογία 5:1 στον θάλαμο επώασης σε θερμοκρασία 37°C. Η κυτταρική βιωσιμότητα των κυττάρων στόχων προσδιορίστηκε με την τεχνική της κυτταρομετρίας ροής μετά χρώση των κυττάρων με τη χρωστική 7AAD.

Η χρωστική 7AAD (7-Amino-Actinomycin D) είναι μια εξαιρετικά αποδοτική και λειτουργική χρωστική νουκλεϊκού οξέος που προσλαμβάνει στην κόκκινη περιοχή του φάσματος της κυτταρομετρίας (650 nm) και χρησιμοποιείται για την αναγνώριση κυττάρων σε λύση. Το σημαντικό χαρακτηριστικό της χρωστικής αυτής είναι ότι μπορεί να χρησιμοποιηθεί ταυτόχρονα με την παρουσία σημασμένων μονοκλωνικών αντισωμάτων με τις χρωστικές φυκοερυθρίνη (phycoerythrin -PE) καθώς και τη φθορίζουσα ισοθειακυανική (fluorescein isothiocyanate-FITC), επιτρέποντας ελάχιστη αλληλοεπικάλυψη μεταξύ των τριών αυτών χρωστικών.

Η κυτταροτοξικότητα κάθε συνδυασμού κυττάρων ελέγχθηκε σε διπλά δείγματα και υπολογίσθηκε η μέση τιμή NK-κυτταροτοξικότητας. Τουλάχιστον 5000 σήματα/κύτταρα στόχοι ανά δείγμα καταγράφηκαν προς προσδιορισμό του ποσοστού των 7AAD⁺ κυττάρων στόχων, τα οποία αποτελούσαν τα μη βιώσιμα κύτταρα ως δείκτη της κυτταρολυτικής δραστηριότητας των NK κυττάρων μετά τη συνεπώασή τους με τα κύτταρα στόχους. Τα κύτταρα στόχοι καθίσταται

αναγνωρίσιμα ανοσοφαινοτυπικά με την προ ανάμειξης με τα δραστικά κύτταρα, χρώση τους με τη χρωστική PKH-67. Η χρωστική PKH-67 είναι μια πράσινη φθορίζουσα χρωστική που προσδένεται σταθερά στις λιπιδικές περιοχές της κυτταρικής μεμβράνης. Η χρώση ενισχύεται από ένα υδατικό διάλυμα, το Diluent C, το οποίο στερείται διαλυτών και αλάτων και συμβάλλει στην ενίσχυση της διαλυτότητας της χρωστικής και στην αποδοτικότερη χρώση. Η χρωστική αυτή διαθέτοντας μια μακρά αλειφατική καρβονική ουρά περιορίζει την διαμεμβρανική μεταφορά της χρωστικής ενώ είναι κατάλληλη για χρήση σε συνδυασμό με τη χρωστική 7AAD σε δοκιμασίες κυτταροτοξικότητας.

Καταγράφηκε παράλληλα και το ποσοστό των κυτάρων στόχων που αποπίπτουν αυτόματα κατά τη διάρκεια της τετράωρης παραμονής τους στο θάλαμο του επωαστήρα στις ίδιες συνθήκες απουσία δραστικών NK κυτάρων (αυτόματη λύση κυτάρων στόχων). Η NK διαμεσολαβούμενη κυτταροτοξικότητα έναντι των κυτάρων στόχων υπολογίστηκε ως το ποσοστό των κυτάρων στόχων σε απόπτωση ($7AAD^+$ κύτταρα) μετά τη δοκιμασία συνεπτώσεως με τα δραστικά NK-κύτταρα, αφού αφαιρεθεί το ποσοστό των κυτάρων στόχων σε απόπτωση συνεπεία αυτόματης λύσης. Όλες οι δοκιμασίες πραγματοποιήθηκαν σε διπλά δείγματα και προσδιορίστηκε η μέση τιμή κυτάρων σε απόπτωση κάθε φορά.


- Το κυτταρικό διάλυμα NK απομονωμένων κυτάρων έχει διαμορφωθεί ώστε να παρουσιάζει συγκέντρωση $1 \times 10^6/ml$ σε καλλιεργητικό υλικό χωρίς πρόσμειξη αντιβιοτικών.
- Οι καλλιέργειες των κυτταρικών σειρών – στόχων θα πρέπει να έχουν ανακαλλιεργηθεί με αντικατάσταση κατά το ήμισυ του καλλιεργητικού υλικού την προηγούμενη ημέρα της δοκιμασίας ελέγχου NK-κυτταροτοξικότητας.
- Λαμβάνουμε 5ml από κάθε κυτταρική σειρά σε σωληνάριο των 15 ml και προετοιμάζουμε κυτταρικό διάλυμα συγκέντρωσης $1 \times 10^6/ml$ αφού χρώσουμε τα κύτταρα στόχους με τη φθοριοχρωστική της κυτταρικής μεμβράνης PKH67.
- Το σωληνάριο με το δείγμα των 5ml από κάθε κυτταρική σειρά πλένεται δύο φορές με το ρυθμιστικό διάλυμα HBSS και ακολούθως


φυγοκεντρείται σε 1200rpm για 10', ώστε να αφαιρεθεί από τα κύτταρα ο ορός FBS.

Από τη χρονική αυτή στιγμή και μετέπειτα η εργασία μπορεί να πραγματοποιείται εκτός του θαλάμου συνεχούς καθέτου νηματικής ροής αέρος.

- Μετά και τη δεύτερη φυγοκέντρωση η πελέτα των κυττάρων επαναιωρείται σε 500ml Diluent C και γίνεται ανάδευση με την πιπέτα (πάνω-κάτω).
- Προετοιμάζεται η χρωστική PKH-67 με προσθήκη 1μl χρωστικής σε 500ml Diluent C, το διάλυμα αναμειγνύεται με χρήση συσκευής vortex και προστίθεται στο κυτταρικό διάλυμα (ποσότητα για ένα σωληνάριο). Αν η πελέτα των κυττάρων φαίνεται μεγάλη για να εξασφαλίσουμε επαρκή χρώση τους, αναμειγνύουμε 4μl χρωστικής σε 1ml Diluent C.
- Το διάλυμα αφήνεται για 3-5 λεπτά και ακολούθως προστίθενται 500μl FBS και παραμένει για ακόμη ένα λεπτό.
- Αφού ανακινήσουμε το σωληνάριο με ελαφρύ κτύπημα της βάσης του, προσθέτουμε 10ml καλλιεργητικού υλικού και το διάλυμα φυγοκεντρείται σε 1200rpm για 10'.
- Τα κύτταρα στόχοι κάθε κυτταρικής σειράς επαναιωρούντε σε 2ml καλλιεργητικού υλικού.
- Λαμβάνεται ένα δείγμα 100μl σε σωληνάριο κυτταρομετρίας ώστε να ελεγχθεί η ισχύς της πράσινης φθοριοχρωστικής PKH-67 ανοσοφαινοτυπικά, δηλαδή η επιτυχής χρώση των κυττάρων στόχων.
- Λαμβάνεται ένα δεύτερο δείγμα 100μl σε σωληνάριο τύπου erpendorf ώστε να ελεγχθεί η βιωσιμότητα και ο απόλυτος αριθμός των κυττάρων κάθε κεχρωσμένης κυτταρικής σειράς με χρήση του αιμοκυτταρομέτρου και της χρωστικής Trypan blue.
- Σύμφωνα με το αποτέλεσμα της παραπάνω μέτρησης τα κύτταρα επαναιωρούντε σε καλλιεργητικό υλικό ώστε η συγκέντρωσή τους να είναι 1×10^6 /ml.

- Ακολουθως λαμβάνουμε 4 αποστειρωμένα σωληνάρια των 5ml που διαθέτουν πώμα και αφού τα ονοματίσουμε (NK κύτταρα), προσθέτουμε 500μl NK κυτταρικού διαλύματος που διατηρείται στο θάλαμο επώασης (αρχική συγκέντρωση 1×10^6 /ml), ώστε σε κάθε σωληνάριο να περιέχονται 5×10^5 NK κύτταρα /σωληνάριο.
- Τα σωληνάρια αυτά στη συνέχεια φυγοκεντρούντε σε 1200rpm για 10' αφού αφαιρεθούν τα πώματα.
- Μετά τη φυγοκέντρωση προστίθενται σε κάθε σωληνάριο 300μl καλλιεργητικό υλικό χωρίς πρόσμειξη αντιβιοτικών και 100μl από έναστο κυτταρικό διαλύματα των κυττάρων στόχων (1×10^5 κύτταρα K562 ή Raji) διαμορφώνοντας έτσι δύο σωληνάρια που περιέχουν ως κύτταρα στόχους την κυτταρική σειρά K562 και δύο σωληνάρια που περιέχουν την κυτταρική σειρά Raji. Σε όλα τα σωληνάρια η αναλογία δραστικών κυττάρων:κύτταρα στόχοι (κυτταρικές σειρές) είναι διαμορφωμένη σε 5:1 (5×10^5 δραστικά NK κύτταρα και 1×10^5 κύτταρα στόχοι σε τελικό όγκο 400μl).
- Προκειμένου να ελεγχθεί η αυτόματη λύση των κυττάρων στόχων, προσθέτουμε 100μl από το διάλυμα της κυτταρικής σειράς K562 σε δύο αποστειρωμένα σωληνάρια και 100μl από το διάλυμα της κυτταρικής σειράς Raji σε δύο άλλα και συμπληρώνουμε με 300μl καλλιεργητικό υλικό σε καθένα, ώστε σε όλα ο τελικός όγκος να είναι 400μl.
- Το περιεχόμενο των σωληναρίων σε κάθε πείραμα NK κυτταροτοξικότητας ανά ασθενή ή υγιή μάρτυρα ελέγχου, θα έχει στο τέλος διαμορφωθεί σχηματικά ως εξής:


x2 (NK vs K562^{PKH-67})
 300μl NK κυτταρικό δ/μα (NK κύτταρα 5×10^5)
 + 100μl K562^{PKH-67} κυτταρικό δ/μα (K562 κύτταρα 1×10^5)
 – τελικός όγκος 400μl


x2 (NK vs Raji^{PKH-67})
 300μl NK κυτταρικό δ/μα (NK κύτταρα 5×10^5)
 + 100μl Raji^{PKH-67} κυτταρικό δ/μα (Raji κύτταρα 1×10^5)
 – τελικός όγκος 400μl

□ **x2 (K562^{PKH-67})**
100μl K562^{PKH-67} κυτταρικό δ/μα (K562 κύτταρα 1×10^5)
+300 μl καλλιεργητικό υλικό
– τελικός όγκος 400μl

□ **x2 (Raji^{PKH-67})**
100μl Raji^{PKH-67} κυτταρικό δ/μα (Raji κύτταρα 1×10^5)
+300 μl καλλιεργητικό υλικό
– τελικός όγκος 400μl

- Τα σωληνάρια αυτά τοποθετούνται σε θάλαμο επωαστήρα και επωάζονται για χρονικό διάστημα τεσσάρων ωρών σε θερμοκρασία 37°C και σε συνθήκες 5% CO₂.
- Μετά την ολοκλήρωση του διαστήματος επώασης τεσσάρων ωρών, προσθέτουμε σε κάθε ένα από τα σωληνάρια 5 μl (0.25 μg) διαλύματος 7AAD και επωάζουμε τα σωληνάρια για 10'.

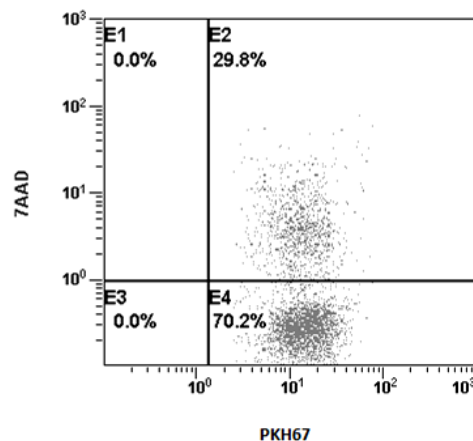
Η πορεία μελέτης και παρουσίασης της κυτταροτοξικότητας των NK κυττάρων ενός ασθενούς ή υγιούς μάρτυρα έναντι των κυττάρων-στόχων των δύο κυτταρικών σειρών:

- Για κάθε δείγμα συλλέγονται από τον κυτταρομετρητή περίπου 5000 σήματα και απομονώνονται όλα τα βιώσιμα κύτταρα βάσει της συσχέτισης του οριζόντιου (FSC) και κάθετου σκεδασμού (SSC), στο πρώτο στικτόγραμμα (dot plot).
- Κατόπιν, στο δεύτερο στικτόγραμμα (dot plot) γίνεται διάκριση των κυττάρων στόχων της εκάστοτε κυτταρικής σειράς βάσει της συσχέτισης του κάθετου σκεδασμού (SSC) και της θετικής έκφρασης της χρωστικής PKH-67 με την οποία είχαν σημανθεί προ της ανάμειξής τους με τα δραστικά NK-κύτταρα. Έτσι, προσδιορίζονται τα κύτταρα-στόχοι.
- Ακολούθως, γίνεται μελέτη των κυττάρων στόχων της εκάστοτε κυτταρικής σειράς ως προς δύο παραμέτρους ταυτόχρονα το 7AAD και το PKH-67, που αντιστοιχούν στους άξονες ενός σημειακού

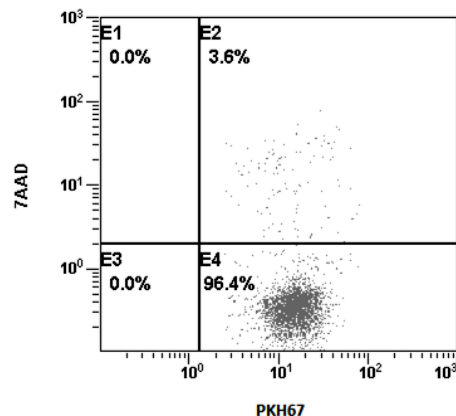
διαγράμματος, το οποίο χωρίζεται σε 4 ορθογώνιες περιοχές ανάλυσης. Οι δύο περιοχές περιέχουν κύτταρα που είναι θετικά στον ένα δείκτη και αρνητικά στον άλλο, δηλαδή 7AAD⁻/ PKH-67⁺ (βιώσιμα κύτταρα στόχοι) και 7AAD⁺/ PKH-67⁻, ενώ οι άλλες δύο περιοχές περιέχουν τα διπλά αρνητικά κύτταρα (7AAD⁻/ PKH-67⁻) και τα διπλά θετικά κύτταρα (7AAD⁺/ PKH-67⁺). Τα διπλά θετικά κύτταρα στόχοι (7AAD⁺/ PKH-67⁺) είναι ακριβώς το ποσοστό (%) που αναζητούμε που αποδίδει το ποσοστό των κυττάρων στόχων που η αλληλοεπίδραση με τα NK-δραστικά κύτταρα κατά την τετράωρη συνεπώασή τους προκάλεσε τη λύση τους. (Εικ.3)

Εικόνα 3: Ανοσοφαινοτυπική μέτρηση της NK-κυτταροτοξικότητας κατά τη συνεπώαση κυττάρων στόχων με NK-δραστικά κύτταρα.

3α. NK-κυτταροτοξικότητα έναντι της κυτταρικής σειράς K562 (δείγμα ασθενούς)



3β. NK-κυτταροτοξικότητα έναντι της κυτταρικής σειράς Raji (δείγμα ασθενούς)

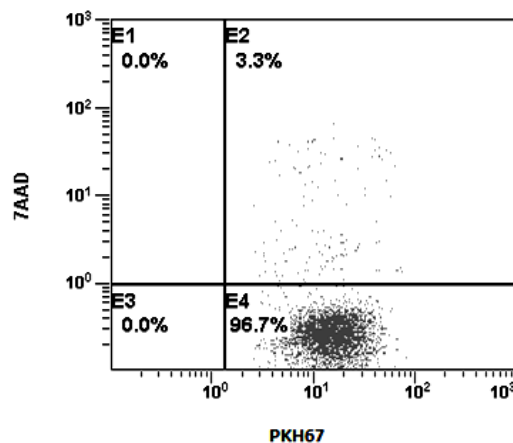


Η NK-κυτταροτοξικότητα εκφράζεται ως ποσοστό(%) των διπλά θετικών κυττάρων στόχων (Πληθυσμός E2: 7AAD⁺/ PKH-67⁺). Στην Εικ.3α. απεικονίζεται η NK-κυτταροτοξικότητα έναντι της κυτταρικής σειράς K562 (πείραμα του ασθενούς με κωδικό ΙΩΚΟ) και στην Εικ.3β. απεικονίζεται η NK-κυτταροτοξικότητα έναντι της κυτταρικής σειράς Raji (πείραμα του ασθενούς με κωδικό ΙΩΚΟ).

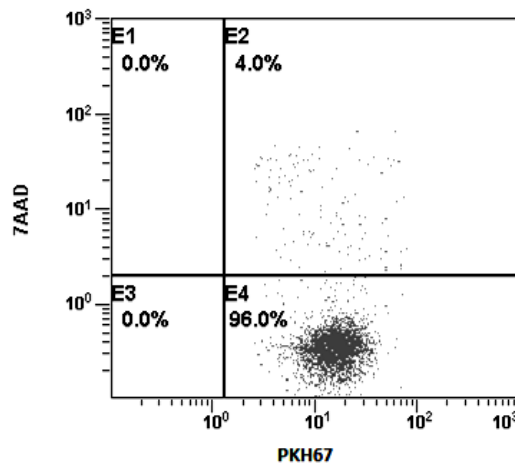
- Η ίδια μέθοδος χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό της αυτόματης λύσης των κυττάρων στόχων που επώαστηκαν παράλληλα χωρίς πρόσμειξη NK-δραστικών κυττάρων. Τα κύτταρα αυτά προέρχονταν από το ίδιο ακριβώς αρχικό δείγμα κυτταροκαλλιέργειας και παρουσίασαν αυτόματη λύση στις ίδιες συνθήκες επώασης. (Εικ.4)

Εικόνα 4: Ανοσοφαινοτυπική μέτρηση της αυτόματης λύσης των κυττάρων στόχων.

4α. Αυτόματη λύση - Κυτταρική σειρά K562



4β. Αυτόματη λύση - Κυτταρική σειρά Raji



Η αυτόματη λύση των κυττάρων στόχων, χωρίς συνεπώαση με NK-δραστικά κύτταρα, εκφράζεται ως ποσοστό(%) των διπλά θετικών κυττάρων στόχων (Πληθυσμός E2: 7AAD⁺/ PKH-67⁺). Στην Εικ.4α. απεικονίζεται πληθυσμός της κυτταρικής σειράς K562 (πείραμα του ασθενούς με κωδικό ΙΩΚΟ) και στην Εικ.4β. απεικονίζεται πληθυσμός της κυτταρικής σειράς Raji (πείραμα του ασθενούς με κωδικό ΙΩΚΟ).

▪ Σε κάθε πείραμα δείγματος ασθενούς ή υγιούς μάρτυρα προσδιορίστηκε η μέση τιμή των 7AAD⁺ κυττάρων στόχων (K562 ή Raji) σε επί τοις % ποσοστιαία έκφραση, μετά συνεπώασή τους με τα NK δραστικά κύτταρα έκαστου δείγματος ασθενούς ή μάρτυρα, σύμφωνα με τους υπολογισμούς των διπλών δοκιμασιών και το αποτέλεσμα ορίζονταν από τον τετραψήφιο κωδικό του δείγματος ¹. Επίσης σε κάθε πείραμα υπολογίστηκε η μέση τιμή αυτόματης λύσης των κυττάρων στόχων (K562 ή Raji) που επωάζονταν παράλληλα επίσης σε επί τοις % ποσοστιαία έκφραση ². Με βάση αυτούς τους υπολογισμούς προσδιορίστηκε η "καθαρή " NK κυτταροτοξικότητα - cytotoxicity (Tox) κάθε δείγματος έναντι έκαστης κυτταρικής σειράς στόχου³ ως η διαφορά της μέσης τιμής 7AAD⁺ κυττάρων στόχων μετά συνεπώαση με τα δραστικά – NK κύτταρα κάθε δότη και της μέσης τιμής 7AAD⁺ κυττάρων στόχων προερχόμενα από αυτόματη λύση της αυτής κυτταρικής σειράς.

Ορισμός Μετρήσεων:

¹Τετραψήφιος κωδικός δείγματος - 7AAD⁺ NK vs K562 ^{PKH-67} (%) και

¹Τετραψήφιος κωδικός δείγματος - 7AAD⁺ NK vs Raji ^{PKH-67} (%),

² 7AAD⁺ K562 ^{PKH-67} (%) και 7AAD⁺ Raji ^{PKH-67} (%),

³ Τετραψήφιος κωδικός δείγματος - NK vs K562 ^{PKH-67} Tox (%) και

Τετραψήφιος κωδικός δείγματος - NK vs Raji ^{PKH-67} Tox (%).

Σχηματικά:

(Τετραψήφιος κωδικός δείγματος - NK vs K562 ^{PKH-67}) Tox =

(Τετραψήφιος κωδικός δείγματος - 7AAD⁺ NK vs K562 ^{PKH-67}) – (7AAD⁺ K562 ^{PKH-67})

και

(Τετραπήφιος κωδικός δείγματος - NK vs Raji^{PKH-67}) Tox =
(Τετραπήφιος κωδικός δείγματος-7AAD⁺ NK vs Raji^{PKH-67}) – (7AAD⁺
Raji^{PKH-67})

- Αν κατά την απομόνωση των NK κυττάρων ο αριθμός απομονωμένων NK κυττάρων υπερέβαινε τον απαιτούμενο για την ολοκλήρωση του πειράματος όπως περιγράφηκε παραπάνω, τα NK κύτταρα που δεν χρησιμοποιήθηκαν, απομονώνονταν σύμφωνα με τις οδηγίες κρυοσυντήρησης που περιγράφηκαν για τις κυτταρικές σειρές και συντηρούνται επί μακρόν σε συνθήκες υγρού αζώτου για μελλοντική χρήση.

1.4.3 Έλεγχος των υποπληθυσμών ανοσορρυθμιστικών κυττάρων στο περιφερικό αίμα με τεχνική κυτταρομετρία ροής

Η μελέτη του πληθυσμού των NK λεμφοκυττάρων, NKT κυττάρων, των CD4⁺T λεμφοκυττάρων, των Tregs και των MDSCs έγινε στο περιφερικό αίμα ασθενών με ΜΔΣ και ολιγοβλαστική ΟΜΛ πριν και μετά από χορήγηση Αζασυτιδίνης καθώς και των υγιών μαρτύρων και βασίστηκε στην ανοσοφαινοτυπική τους ταυτότητα όπως αυτή προσδιορίστηκε με την κυτταρομετρία ροής.

- Συλλογή 25ml περιφερικού αίματος από ασθενείς και υγιείς μάρτυρες σε σωληνάριο Falcon 50ml που περιέχει 200IU κλασσικής ηπαρίνης.

Η επεξεργασία των δειγμάτων ολοκληρωνόταν μέσα στο πρώτο εικοσιτετράωρο από τη λήψη τους.

I. Παρασκευή βιολογικών δειγμάτων

Για τον προσδιορισμό των NK, NKT, CD4⁺ T λεμφοκυττάρων και των Tregs χρησιμοποιήθηκε ολικό περιφερικό αίμα, το οποίο μελετήθηκε ανοσοφαινοτυπικά με δύο πρωτόκολλα των τεσσάρων και πέντε

μονοκλωνικών αντισωμάτων, αντιστοίχως. Για την μελέτη των MDSCs χρησιμοποιήθηκε πρωτόκολλο έξι μονοκλωνικών αντισωμάτων [114,115]. Οι συνδυασμοί των πρωτοκόλλων φαίνονται στον πίνακα 2.

Η επεξεργασία των δειγμάτων για τη μελέτη των NK Λεμφοκυττάρων, NK CD56^{bright}, CD4⁺ T Λεμφοκυττάρων και των Tregs:

- Σε δοκιμαστικό σωληνάριο των 5mL τοποθετείται ο κατάλληλος όγκος μονοκλωνικών αντισωμάτων και 100μL δείγματος περιφερικού αίματος (Πίνακας 2.).
- Το διάλυμα αναδεύεται σε συσκευή vortex και επώάζεται στο σκοτάδι σε θερμοκρασία δωματίου για 15'.
- Προστίθεται 1mL διαλύματος FACS lysing σε αραιώση 1:10, ακολουθεί ανάδευση σε συσκευή vortex και επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 15'.
- Προστίθεται 1mL PBS και το διάλυμα φυγοκεντρείται σε 900rpm για 5'.
- Απορρίπτεται το υπερκείμενο, προστίθενται 2mL PBS και ακολουθεί φυγοκέντρηση στα 900rpm για 5'.
- Απορρίπτεται το υπερκείμενο, προστίθενται 500μL παραφορμαλδεΐδης και ακολουθεί μέτρηση του δείγματος στον κυτταρομετρητή.

Η επεξεργασία των δειγμάτων για τη μελέτη των MDSCs:

- Το δείγμα περιφερικού αίματος αραιώνεται με διπλάσια ποσότητα PBS σε σωλήνες τύπου Falcon και ακολουθεί ήπια ανάδευση.
- Σε πλαστικά σωληνάρια των 10mL τοποθετούνται 3mL Lymphoprep και 6mL αραιωμένου αίματος με πολύ αργές και απαλές κινήσεις.
- Τα σωληνάρια φυγοκεντρούντε σε 1200rpm για 30'.
- Συγκεντρώνεται η στιβάδα των μονοπύρηνων από όλα τα σωληνάρια σε ένα καινούργιο σωληνάριο και προστίθεται PBS μέχρι τα 10mL. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στα 1200rpm για 5'.

- Απορρίπτεται το υπερκείμενο και το σωληνάριο αναδεύεται σε συσκευή vortex.
- Προστίθεται PBS μέχρι τα 10mL και ακολουθεί φυγοκέντρηση στα 1200rpm για 5'. Απορρίπτεται το υπερκείμενο και αναδεύεται σε συσκευή vortex. Προστίθεται 1mL PBS.
- Σε περίπτωση παρουσίας ερυθρών:
 - γίνεται λύση με 2mL διαλύματος FACS lysing σε αραιώση 1:10. Το σωληνάριο αναδεύεται σε συσκευή vortex και επωάζεται στο σκοτάδι σε θερμοκρασία δωματίου για 15'.
 - Προστίθεται 1mL PBS και φυγοκεντρείται στα 1200rpm για 5'.
 - Απορρίπτεται το υπερκείμενο, προστίθεται 1mL PBS και το εναιώρημα των κυττάρων είναι έτοιμο.
- Σε δοκιμαστικό σωληνάριο των 5mL τοποθετούνται ο κατάλληλος όγκος μονοκλωνικών αντισωμάτων και 100μL εναιωρήματος κυττάρων από την επιστοίβαση (Συνδυασμός 3 στον Πίνακα 2.).
- Επωάζεται στο σκοτάδι σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για 15'.
- Προστίθενται 2mL PBS και το σωληνάριο φυγοκεντρείται στα 1200rpm για 5' δύο φορές.
- Προστίθενται 500μL παραφορμαλδεΐδης και το διάλυμα κυττάρων είναι έτοιμο για μέτρηση στη συσκευή κυτταρομετρητή.

Πίνακας 2. Συνδυασμοί μονοκλωνικών αντισωμάτων για τον προσδιορισμό των NK-κυττάρων, των NK-CD56^{bright}, των CD4⁺ T-λεμφοκυττάρων, των Tregs και των MDSCs.

α/α	Συνδυασμοί μονοκλωνικών αντισωμάτων
1	CD3 FITC/CD56 PE/CD16 APC/CD45 PerCP-Cy5.5
2	CD3 FITC/CD127 PE/CD4 APC/CD45 PerCP-Cy5.5 CD25 PE Cy7
3	HLADR-FITC CD11b-PE/CD14-APC/CD15 PerCP-Cy5.5/CD33-PE Cy7 / CD45-APC Cy7

II. Ανοσοφαινοτυπική μελέτη δειγμάτων – Στρατηγική ανάλυσης

Μετά την ολοκλήρωση του παρασκευαστικού μέρους ακολουθεί η μέτρηση του δείγματος στον κυτταρομετρητή ροής. Στόχος είναι η συλλογή 15.000 - 20.000 λεμφοκυττάρων στους συνδυασμούς για τη μελέτη των NK και των Tregs και 100.000 CD45⁽⁺⁾ κυττάρων στο συνδυασμό για τη μελέτη των MDSCs.

Σε κάθε έναν από τους τρεις συνδυασμούς που εφαρμόστηκαν για την ανοσοφαινοτυπική μελέτη, χρησιμοποιήθηκε ο σκεδασμός του φωτός σε στικτόγραμμα FSC-Height vs FSC-Area, προκειμένου να εξαιρεθούν οι διπλέτες των κυττάρων.

Προκειμένου να μελετηθούν τα NK κύτταρα, τα NK-CD56^{bright}, τα CD4⁺ T-λεμφοκύτταρα και τα Tregs στους αντίστοιχους συνδυασμούς μονοκλωνικών αντισωμάτων, γίνεται οριοθέτηση (gating) της περιοχής των λεμφοκυττάρων σε στικτόγραμμα SS vs CD45, με βάση τον πλάγιο σκεδασμό (SS) και το κοινό λευκοκυτταρικό αντιγόνο (CD45).

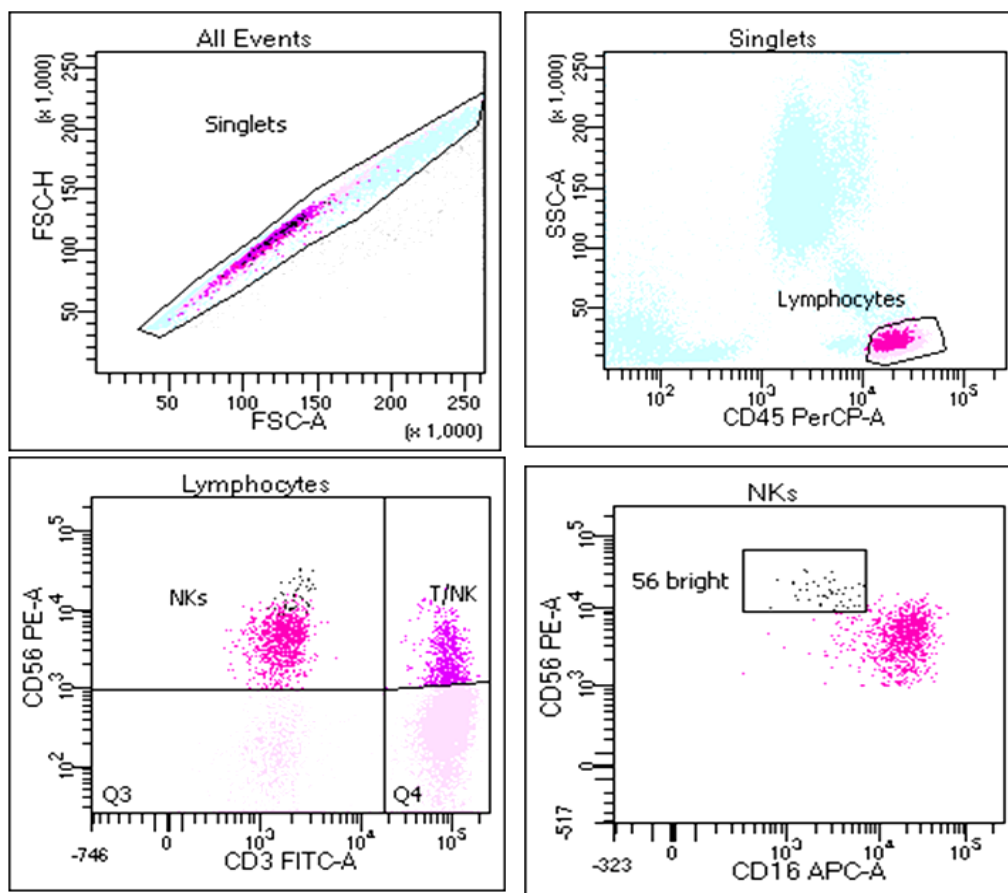
Στο συνδυασμό για τη μελέτη των NK λεμφοκυττάρων και NK-CD56^{bright}, απεικονίζονται αρχικά τα T και NK λεμφοκύτταρα σε στικτόγραμμα CD56 vs CD3, από όπου και προσδιορίζεται ο πληθυσμός των NK λεμφοκυττάρων ως ο πληθυσμός ο οποίος εμφανίζει αρνητικό CD3 και θετικό CD56. Ακολουθεί στικτόγραμμα CD56 vs CD16 απ' όπου προσδιορίζονται τα NK λεμφοκύτταρα με έντονη έκφραση του CD56. Στις Εικόνες 5α, 6α και 7α παραθέτονται παραδείγματα αυτών των στικτογραμμμάτων αντίστοιχα σε δείγμα υγιούς μάρτυρα, όπως και σε δείγμα ασθενούς προ της χορήγησης 5-Αζασουτιδίνης και μετά χορήγηση 5-Αζασουτιδίνης.

Στο συνδυασμό για τη μελέτη των Tregs, γίνεται αρχικά διαχωρισμός των T λεμφοκυτταρικών πληθυσμών σε στικτόγραμμα CD4 vs CD3. Η αναγνώριση των CD3⁽⁺⁾/CD4⁽⁺⁾ T λεμφοκυττάρων βασίστηκε στη συνέκφραση των δεικτών CD3 και CD4. Σε επόμενο στικτόγραμμα, CD127 vs CD25 προσδιορίζονται τα Tregs ως τα κύτταρα με αρνητική έκφραση του CD127 και έντονο CD25. Στις Εικόνες 5β, 6β και 7β παραθέτονται παραδείγματα αυτών των στικτογραμμμάτων αντίστοιχα σε

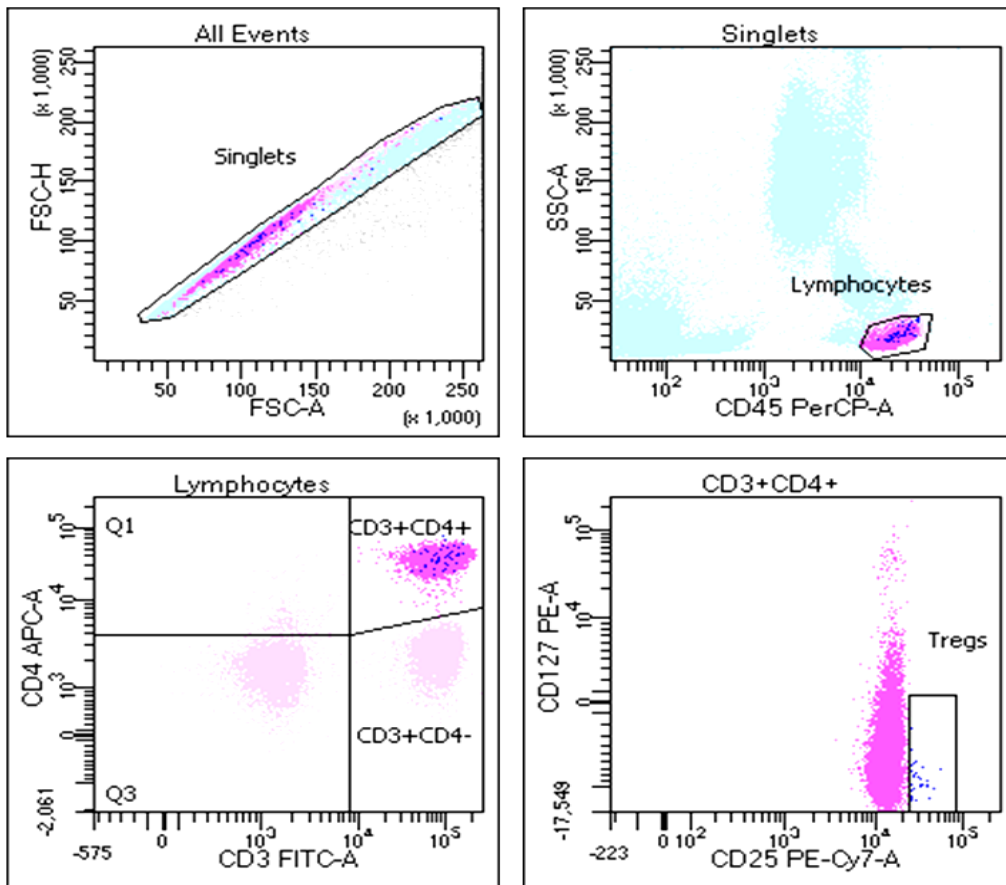
δείγμα υγιούς μάρτυρα όπως και σε δείγμα ασθενούς προ της χορήγησης 5-Αζασυτιδίνης και μετά χορήγηση 5-Αζασυτιδίνης.

Στο συνδυασμό για τη μελέτη των MDSCs γίνεται αρχικά στικτόγραμμα SS vs CD45 για την εξαίρεση των κυτταρικών συντριμμάτων (debris). Στη συνέχεια σε στικτόγραμμα SS vs CD33, γίνεται οριοθέτηση των κυττάρων με έντονη έκφραση του CD33 (*μονοκύτταρα*) και ακολουθεί στικτόγραμμα CD14 vs HLADR απ' όπου γίνεται η οριοθέτηση των CD14⁽⁺⁾/HLADR^{low} MDSCs κυττάρων. Ακολουθούν στικτογράμματα CD15 vs CD11b, CD15 vs CD14 και CD11b vs CD14 με τα οποία προσδιορίζεται η ανοσοφαινοτυπική ταυτότητα των MDSCs ως CD11b⁽⁺⁾, CD15⁽⁻⁾. Στις Εικόνες 5γ, 6γ και 7γ παραθέτονται παραδείγματα αυτών των στικτογραμμάτων αντίστοιχα σε δείγμα υγιούς μάρτυρα, ασθενούς προ της χορήγησης 5-Αζασυτιδίνης και μετά χορήγηση 5-Αζασυτιδίνης.

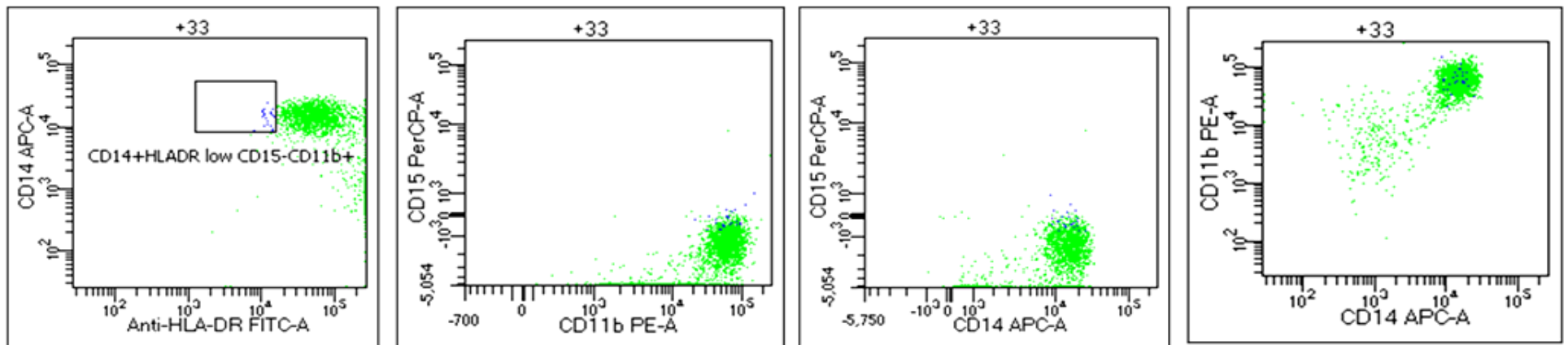
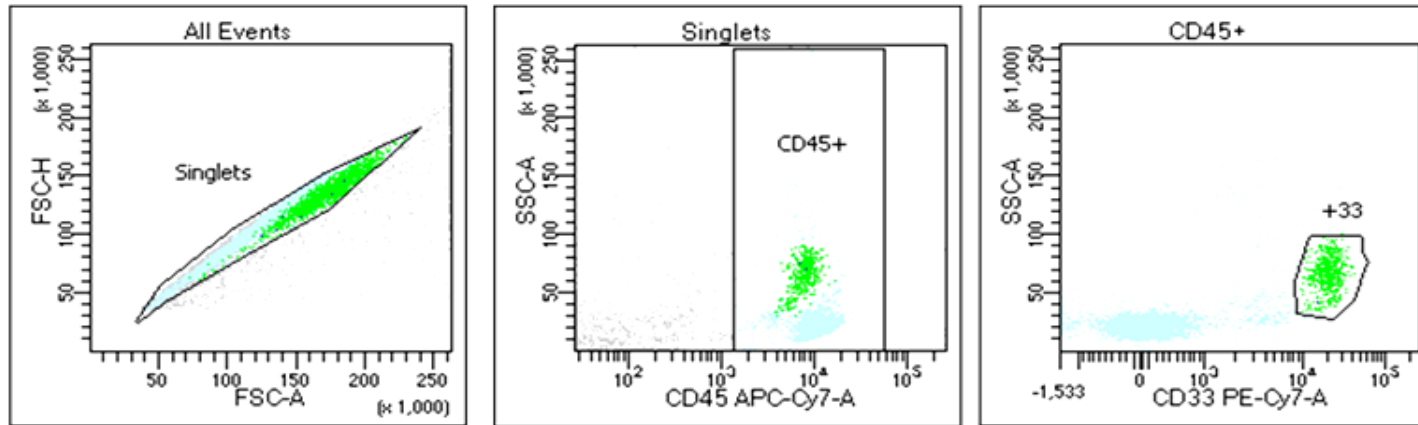
Εικόνα 5α: Ανοσοφαινοτυπική μελέτη των πληθυσμών NK και NK-CD56^{bright} σε δείγμα περιφερικού αίματος υγιούς μάρτυρα.



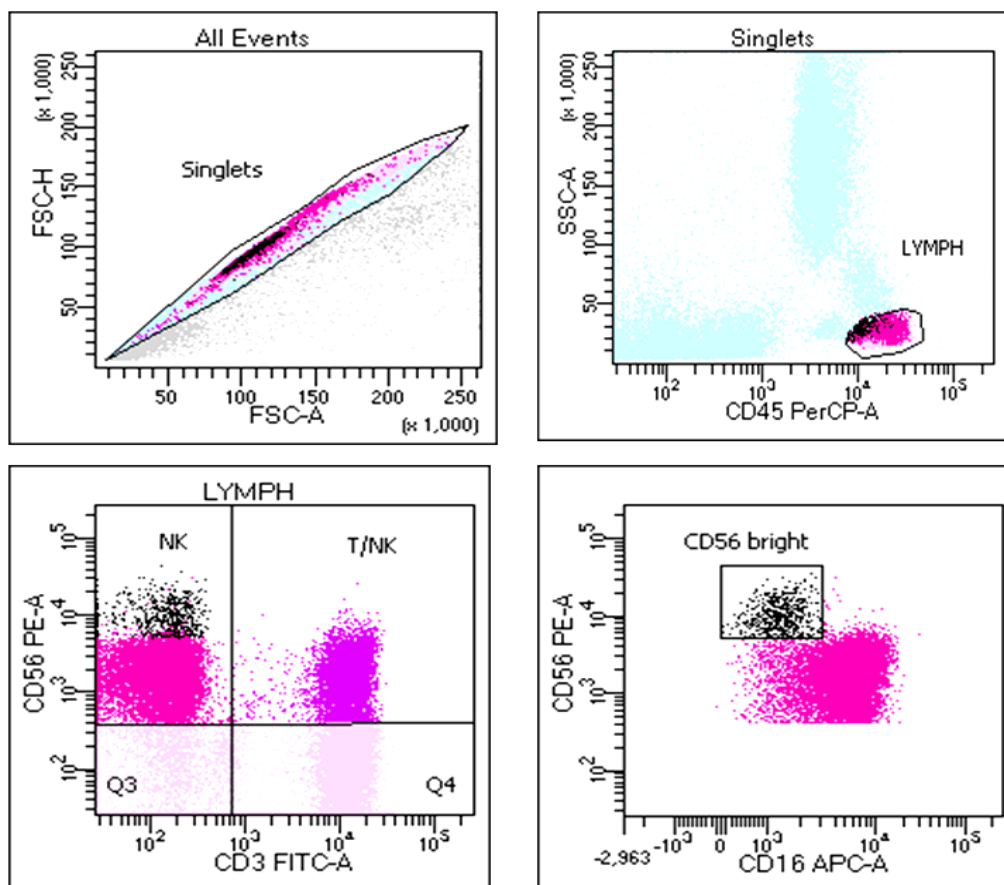
Εικόνα 5β: Ανοσοφαινοτυπική μελέτη των πληθυσμών CD4⁺ T-λεμφοκυττάρων και των Tregs κυττάρων σε δείγμα περιφερικού αίματος υγιούς μάρτυρα.



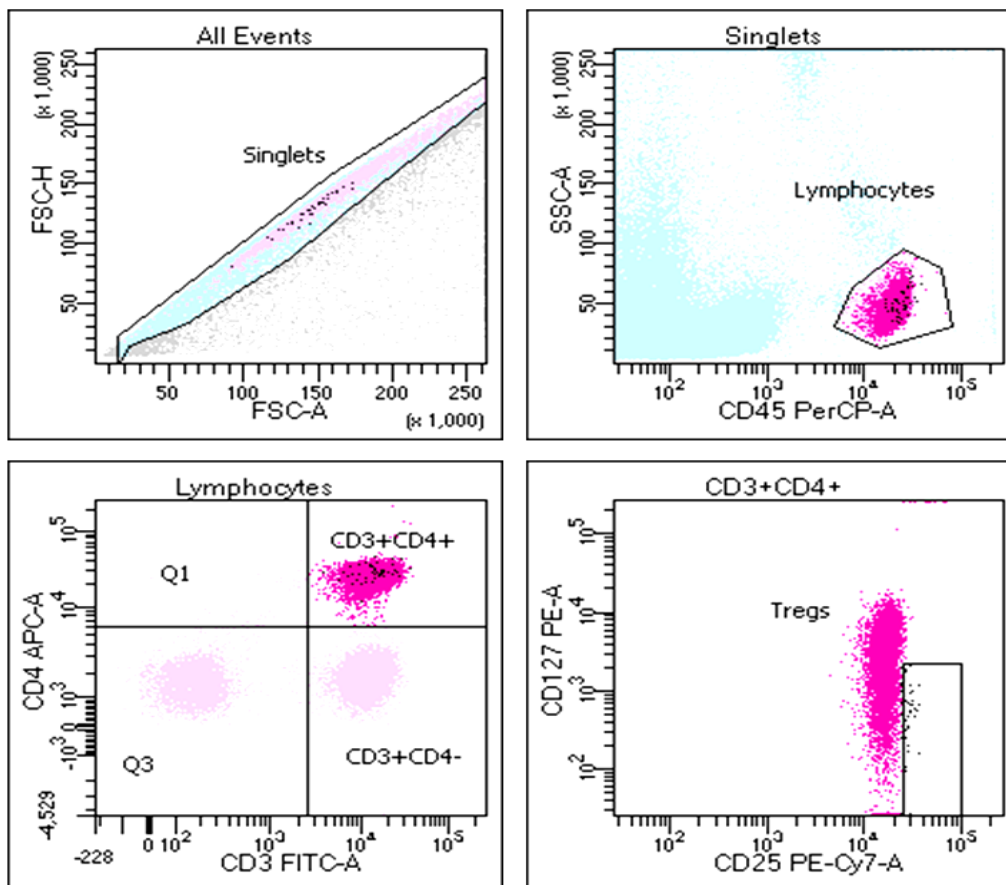
Εικόνα 5γ: Ανοσοφαινοτυπική μελέτη του πληθυσμού των MDSCs κυττάρων σε δείγμα περιφερικού αίματος υγιούς μάρτυρα.



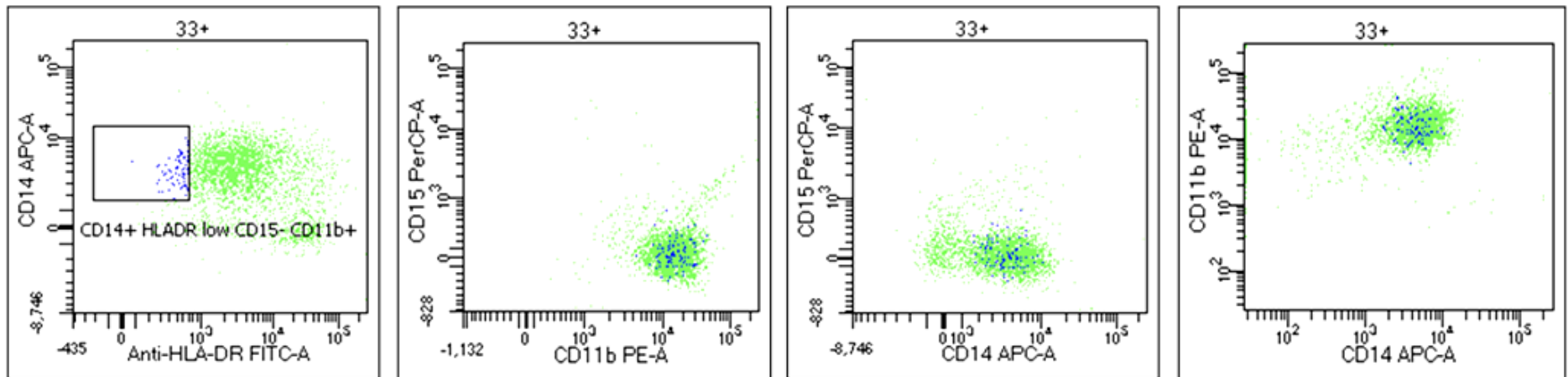
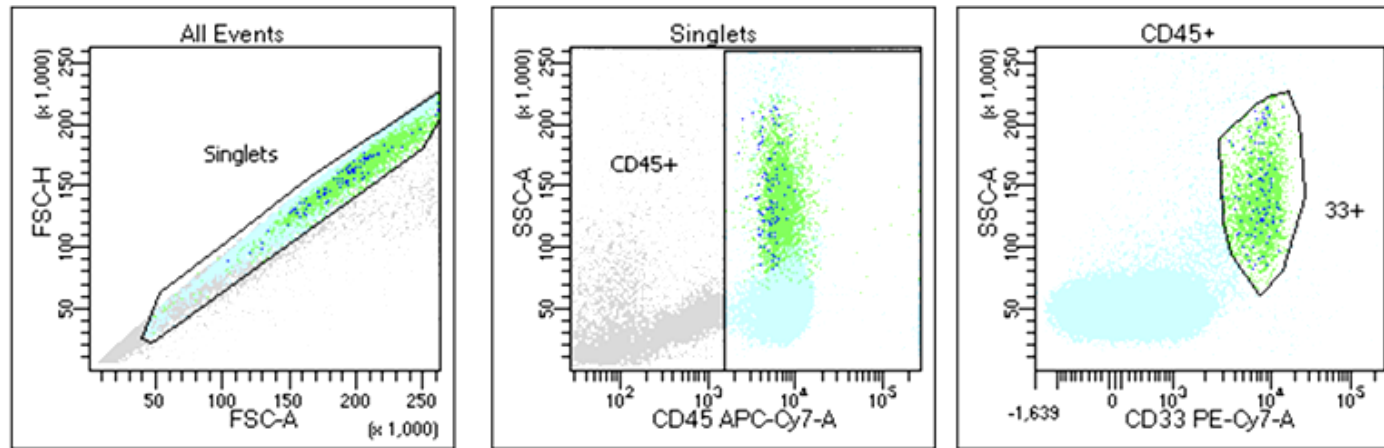
Εικόνα 6α: Ανοσοφαινοτυπική μελέτη των πληθυσμών NK και NK-CD56^{bright} κυττάρων σε δείγμα περιφερικού αίματος ασθενούς πριν τη χορήγηση 5-Αζασουτιδίνης.



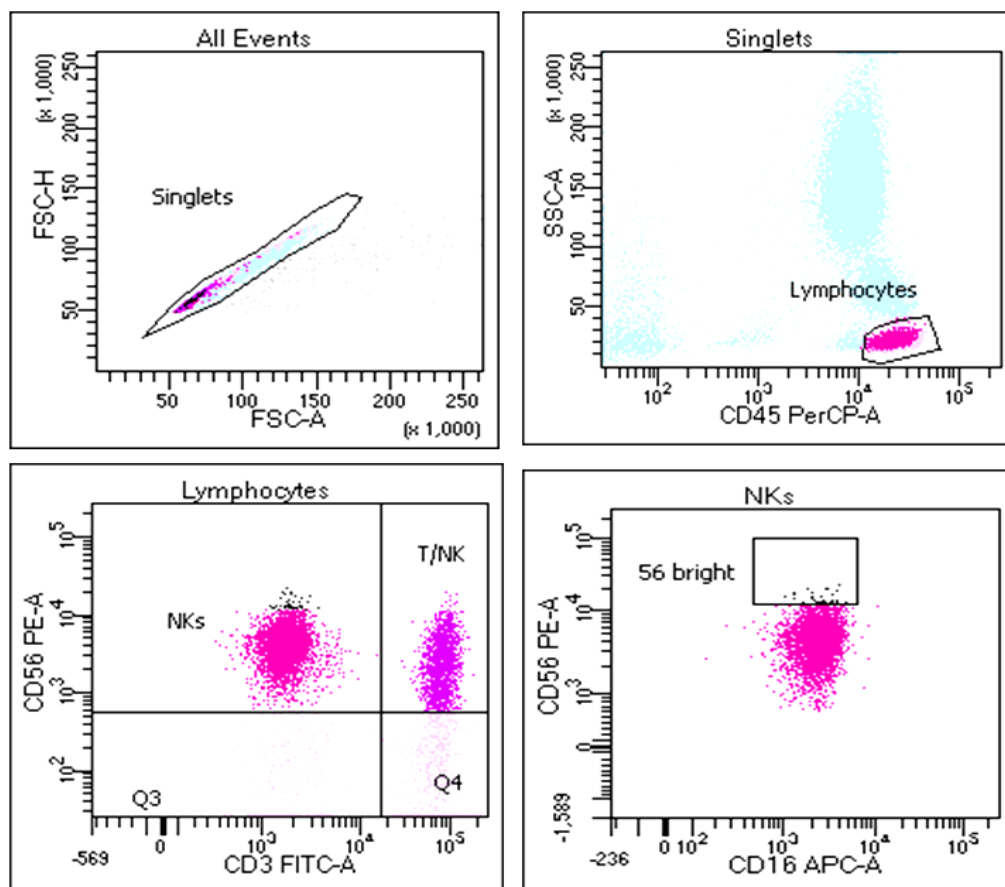
Εικόνα 6β: Ανοσοφαινοτυπική μελέτη των πληθυσμών CD4⁺ T-λεμφοκυττάρων και των Tregs κυττάρων σε δείγμα περιφερικού αίματος ασθενούς πριν τη χορήγηση 5-Αζασυτιδίνης.



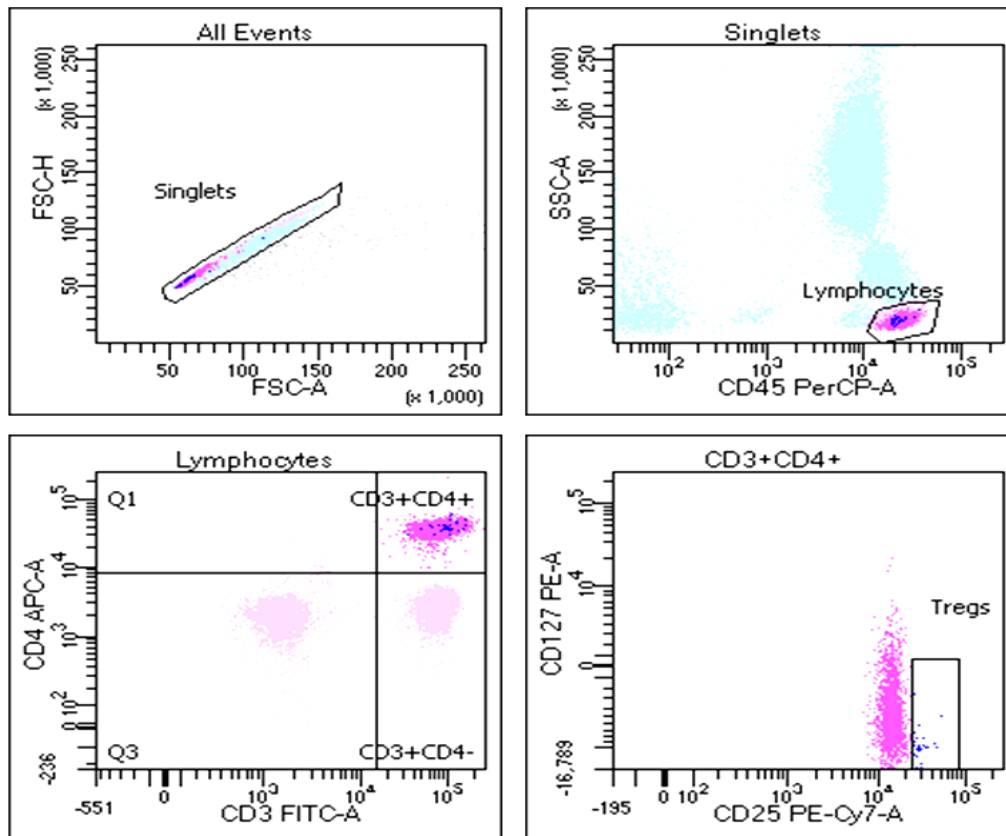
Εικόνα 6γ: Ανοσοφαινοτυπική μελέτη του πληθυσμού MDSCs κυττάρων σε δείγμα περιφερικού αίματος ασθενούς πριν τη χορήγηση 5-Αζασυτιδίνης.



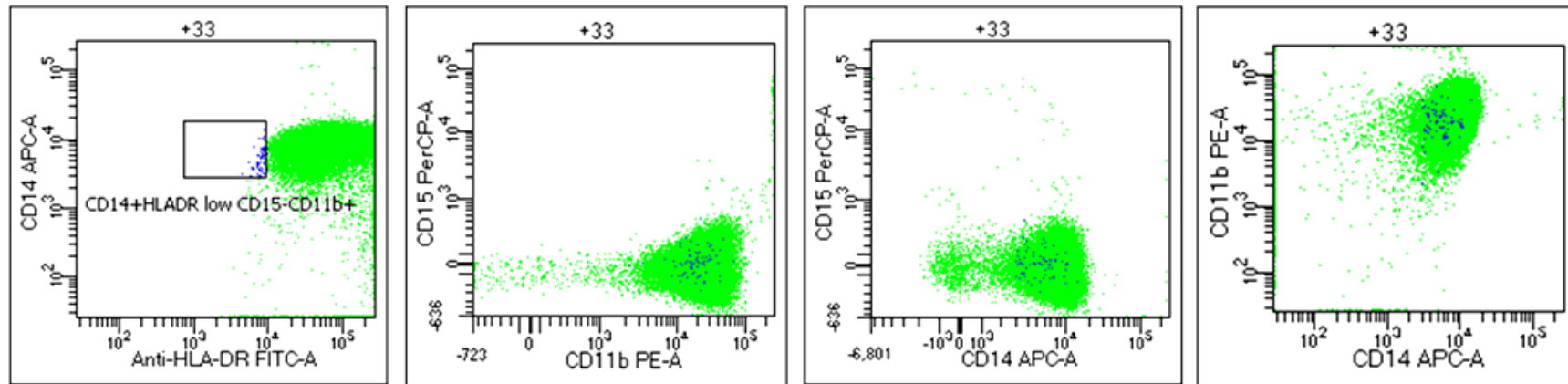
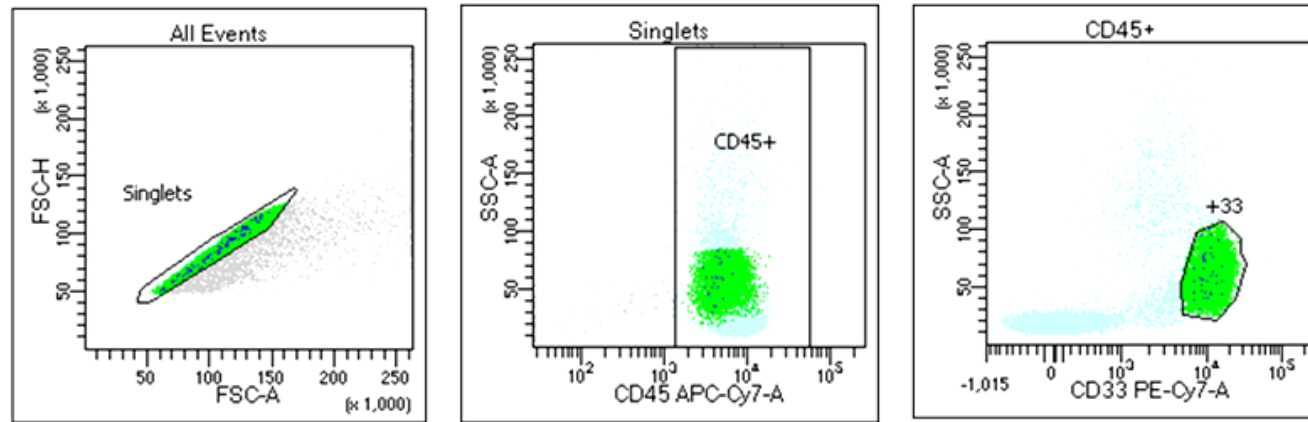
Εικόνα 7α: Ανοσοφαινοτυπική μελέτη των πληθυσμών NK και NK-CD56^{bright} κυττάρων σε δείγμα περιφερικού αίματος ασθενούς μετά τη χορήγησης 5-Αζασουτιδίνης.



Εικόνα 7β: Ανοσοφαινοτυπική μελέτη των πληθυσμών CD4⁺ T-λεμφοκυττάρων και των Tregs κυττάρων σε δείγμα περιφερικού αίματος ασθενούς μετά τη χορήγηση 5-Αζασυτιδίνης.



Εικόνα 7γ: Ανοσοφαινοτυπική μελέτη του πληθυσμού MDSCs κυττάρων σε δείγμα περιφερικού αίματος ασθενούς μετά τη χορήγηση 5-Αζασουιδίνης.



1.5 Στατιστικές μέθοδοι που εφαρμόστηκαν

Στην ανάλυση των αποτελεσμάτων των μετρήσεων εφαρμόστηκαν οι στατιστικές μέθοδοι:

- το παραμετρικό t-test μεταξύ ανεξάρτητων δειγμάτων (unpaired t-test) για σύγκριση των παραμετρικών μετρήσεων μεταξύ των τριών ομάδων και με την προϋπόθεση ότι οι αναλυόμενες παράμετροι είχαν ελεγχθεί επιτυχώς ως προς την κανονική κατανομή των αποτελεσμάτων - κατανομή κατά Gauss.
- οι μέθοδοι Kaplan-Meier και log rank test χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό της ολικής επιβίωσης καθώς και της επίδρασης διάφορων παραμέτρων στην επιβίωση σε μονοπαραγοντική και πολυπαραγοντική ανάλυση
- η ανάλυση ROC (Receiver Operating Curve) εφαρμόστηκε για την εκτίμηση της προγνωστικής αξίας διαφορών μελετηθέντων παραμέτρων ως προς την διετή ολική επιβίωση των ασθενών της μελέτης που λάμβαναν 5-Αζασουτιδίνη ως πρώτης ή ακόλουθης γραμμής θεραπεία.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

2.1 Χαρακτηριστικά Ασθενών - Υγιών μαρτύρων

Κατά την χρονική περίοδο από τον Ιανουάριο του 2016 έως τον Ιούλιο του 2016, δεκαοχτώ ασθενείς μελετήθηκαν ως προς την παρουσία των υπό μελέτη υποπληθυσμών λεμφοκυττάρων και ανοσορρυθμιστικών κυττάρων και ως προς την κυτταροτοξική δράση των NK κυττάρων τους, σύμφωνα με τη μεθοδολογία που αναλυτικά περιγράφηκε στο προηγούμενο κεφάλαιο. Κατά την ίδια χρονική περίοδο εννέα υγιείς μάρτυρες μελετήθηκαν ως προς τις ίδιες παραμέτρους. Κατά την πρώτη ανάλυση των αποτελεσμάτων, διαπιστώθηκε η ανάγκη μελέτης της παρουσίας των υποπληθυσμών των λεμφοκυττάρων και των ανοσορρυθμιστικών κυττάρων και σε έναν πληθυσμό ασθενών με τα ίδια κριτήρια ένταξης και αποκλεισμού, αλλά με βασική διαφορά να αποτελούν νεοδιαγνωσθέντες ασθενείς στους οποίους να μην έχει χορηγηθεί καμία θεραπεία για το αιματολογικό τους νόσημα αλλά και να μην λαμβάνουν οποιαδήποτε άλλη αγωγή με δυνητική ανοσοτροποποιητική δράση. Για το σκοπό αυτό κατά τη χρονική περίοδο από τον Μάρτιο του 2017 έως και τον Φεβρουάριο του 2018, μελετήθηκαν οχτώ νεοδιαγνωσθέντες ασθενείς ως προς την παρουσία υποπληθυσμών λεμφοκυττάρων και ανοσορρυθμιστικών κυττάρων.

Η διάμεση ηλικία των υγιών μαρτύρων ήταν 53 έτη με διακύμανση από 34 έως 58 έτη. Από τους εννέα υγιείς μάρτυρες οι έξι ήταν γυναίκες και οι τρεις άνδρες.

Στην ομάδα των ασθενών που λάμβαναν θεραπεία με 5-Αζασυτιδίνη η διάμεση ηλικία ήταν 70 έτη με διακύμανση από 59 έως 86 έτη. Έντεκα εξ αυτών ήταν άνδρες και επτά γυναίκες. Τα δημογραφικά στοιχεία καθώς και τα κλινικά χαρακτηριστικά των ασθενών που λάμβαναν θεραπεία με 5-Αζασυτιδίνη, παρουσιάζονται στον πίνακα 3. Οι δέκα ασθενείς έπασχαν από ΜΔΣ τύπου RAEB II ενώ οι οχτώ παρουσίαζαν ΟΜΛ με ολιγοβλαστική έκφραση. Σύμφωνα με συμβατική καρυοτυπική ανάλυση,

οι ασθενείς χαρακτηρίζονταν ως προς τα χαρακτηριστικά της νόσου από ευνοϊκής πρόγνωσης κυτταρογενετικά χαρακτηριστικά, σε ποσοστό 61% (11/18 ασθενείς) με την πλειοψηφία να εκφράζει φυσιολογικό καρυότυπο. Δυσμενείς κυτταρογενετικές ανωμαλίες παρουσίαζε μόλις το 17% (3/18 ασθενείς) και ενδιαμέσου κινδύνου το 22% (4/18 ασθενείς). Σύμφωνα με το εδραιωμένο Διεθνές Σύστημα Προγνωστικού Κινδύνου (IPSS) [19] που εφαρμόζεται σε ασθενείς πάσχοντες από ΜΔΣ και θεωρώντας ως υψηλού κινδύνου τους πάσχοντες από ΟΜΛ, υψηλό προγνωστικό σκορ παρουσίαζαν οι 12/18 ασθενείς(67%) και προγνωστικό σκορ ενδιαμέσου βαθμού 2 οι 6/18 (33%). Στην ομάδα αυτή των ασθενών, οι δεκατρείς (72%) λάμβαναν 5-Αζασυτιδίνη ως 1^η θεραπευτική επιλογή, οι τέσσερεις (22%) ως δεύτερης γραμμής και σε έναν ασθενή χορηγούταν ως 3^{ης} γραμμής θεραπευτική επιλογή. Ο διάμεσος αριθμός θεραπευτικών κύκλων με 5-Αζασυτιδίνη που είχαν λάβει οι ασθενείς κατά τη χρονική στιγμή του ελέγχου τους, ήταν 10 (εύρος 3-32). Εφαρμόζοντας τα διεθνή κριτήρια ελέγχου ανταπόκρισης των ασθενών (IWG) [111] ,κατά τη χρονική στιγμή του ελέγχου των ασθενών οι δώδεκα (67%) παρουσίαζαν κάποιου βαθμού ανταπόκριση στη χορηγούμενη θεραπεία και συγκεκριμένα 22%(4/18 ασθενείς) παρουσίαζαν αιματολογική βελτίωση (ΑΒ), 22%(4/18 ασθενείς) μερική ύφεση (ΜΥ), 22%(4/18 ασθενείς) πλήρη ύφεση (ΠΥ), ενώ 33%(6/18 ασθενείς) ήταν απόλυτα ανθεκτικοί στην χορηγούμενη θεραπεία. Συγκεκριμένα για τους ασθενείς που βρίσκονταν σε πλήρη ύφεση της νόσου ο μέσος αριθμός χορηγηθέντων θεραπευτικών κύκλων που απαιτήθηκαν για επίτευξη πλήρους ύφεσης νόσου ήταν τέσσερεις. Το διάμεσο διάστημα παρακολούθησης και καταγραφής της κλινικής έκβασης των ασθενών ήταν 25.5 μήνες (εύρος 7-53 μήνες).

Κατά το χρονικό διάστημα παρακολούθησης των ασθενών εξέλιξη του νοσήματος, δηλαδή υποτροπή ή περαιτέρω επιδείνωση της κλινικής του έκφρασης, παρουσίασαν οι 9/18 ασθενείς (50%). Το διάμεσο διάστημα από την έναρξη της θεραπείας με 5-Αζασυτιδίνη μέχρι την καταγραφή της εξέλιξης της νόσου για τους ασθενείς που είχαν επιδείξει κάποιου βαθμού ανταπόκριση, ήταν 22.5 μήνες (εύρος 11-53 μήνες). Κατά τον τελευταίο έλεγχο παρακολούθησης των ασθενών, οι μισοί ασθενείς

παρέμεναν "εν ζωή". Η διάμεση ολική επιβίωση των ασθενών υπό θεραπεία με 5-Αζασυτιδίνη, προσδιορίστηκε σε 30 μήνες σύμφωνα με την καμπύλη Kaplan Meyer (Γράφημα 1).

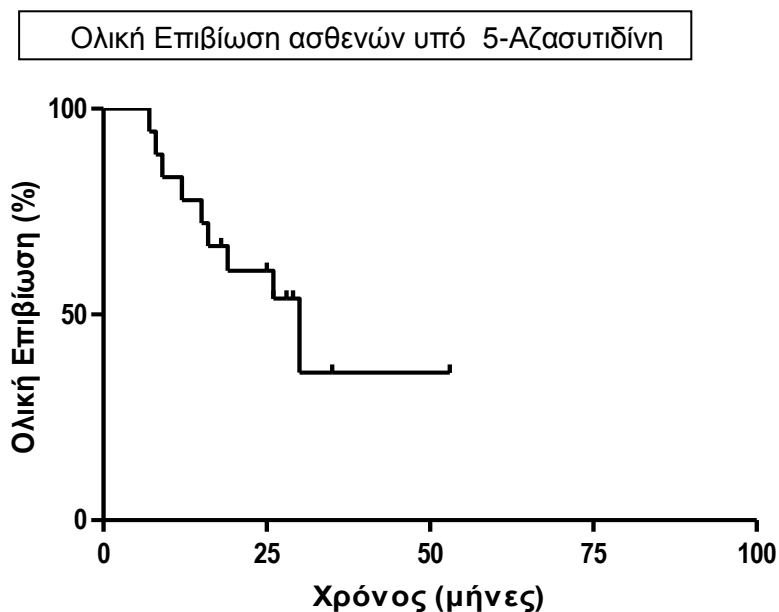
Η ομάδα των οχτώ νεοδιαγνωσθέντων ασθενών παρουσίαζε διάμεση ηλικία 81 έτη (εύρος 71-91 έτη). Οι έξι ασθενείς έπασχαν από ΜΔΣ τύπου RAEB II ενώ οι δύο παρουσίαζαν ΜΔΣ σε φάση εξέλιξης σε ΟΜΛ.

Πίνακας 3. Τα χαρακτηριστικά των υπό μελέτη ασθενών που λάμβαναν θεραπεία με 5-Αζασυτιδίνη

No	Ηλικία (έτη)	Φύλο	Κυτταρογενετική ανάλυση	Διάγνωση (WHO)	IPSS	Ανταπόκριση σε Αζασυτιδίνη	Εξέλιξη νόσου (μήνες)	Ασθενείς Εν ζωή	Διάστημα Παρακολούθησης (μήνες)
1	76	Άρρεν	add18	ΜΔΣ RAEB-II	Υψηλό	AB	Ναι (11)	Όχι	16
2	70	Άρρεν	-7	ΜΔΣ RAEB-II	Υψηλό	AB	Ναι (13)	Όχι	19
3	63	Θήλυ	-17p	ΜΔΣ RAEB-II	Υψηλό	ΜΥ	Ναι (20)	Ναι	+26
4	86	Άρρεν	46ΧΨ	ΜΔΣ RAEB-II	Ενδιάμ-2	Όχι	---	Όχι	26
5	61	Άρρεν	46ΧΨ	ΟΜΛ	Υψηλό	AB	Ναι (12)	Όχι	15
6	81	Θήλυ	-5	ΜΔΣ RAEB-II	Ενδιάμ-2	ΠΥ	Όχι	Ναι	+53
7	75	Άρρεν	46ΧΨ	ΟΜΛ	Υψηλό	ΠΥ	Όχι	Ναι	+28
8	71	Άρρεν	-5	ΜΔΣ RAEB-II	Ενδιάμ-2	Όχι	---	Ναι	+28
9	78	Θήλυ	-11q	ΜΔΣ RAEB-II	Ενδιάμ-2	ΠΥ	Όχι	Ναι	+26
10	75	Άρρεν	46ΧΨ	ΟΜΛ	Υψηλό	ΜΥ	Ναι (24)	Ναι	+29
11	59	Άρρεν	+8	ΟΜΛ	Υψηλό	Όχι	---	Όχι	12
12	67	Άρρεν	Σύνθετος	ΜΔΣ RAEB-II	Υψηλό	ΜΥ	Ναι (21)	Ναι	+25
13	70	Θήλυ	46ΧΨ	ΜΔΣ RAEB-II	Ενδιάμ-2	Όχι	---	Όχι	9
14	76	Θήλυ	46ΧΨ	ΟΜΛ	Υψηλό	Όχι	---	Όχι	8
15	70	Θήλυ	46ΧΨ	ΟΜΛ	Υψηλό	AB	Ναι (16)	Ναι	+18
16	68	Άρρεν	Σύνθετος	ΟΜΛ	Υψηλό	Όχι	---	Όχι	7
17	69	Άρρεν	46ΧΨ	ΜΔΣ RAEB-II	Ενδιάμ-2	ΜΥ	Ναι (30)	Ναι	+35
18	71	Άρρεν	46ΧΨ	ΟΜΛ	Υψηλό	ΠΥ	Ναι (26)	Όχι	30

Σύνθετη κυτταρογενετική ανάλυση: όταν υπάρχουν ≥ 3 κυτταρογενετικές ανωμαλίες στον ίδιο κλώνο, Ενδιάμ.:Ενδιάμεσο, ΠΥ: Πλήρης Ύφεση, ΜΥ: Μερική Ύφεση, AB: Αιματολογική βελτίωση
Οι ασθενείς που ήταν εν ζωή κατά την τελευταία καταγραφή της παρακολούθησης φέρουν το σύμβολο "+" πριν το συνολικό διάστημα παρακολούθησης.

Γράφημα 1: Ολική επιβίωση των ασθενών που λάμβαναν θεραπεία με 5-Αζασυτιδίνη.
Διάμεση ολική επιβίωση: 30 μήνες.



2.2 Προσδιορισμός της NK-κυτταροτοξικότητας

Στο κεφάλαιο Υλικά-Μέθοδοι (σελ.56) αναλύθηκαν με πολύ λεπτομερή περιγραφή όλες οι διαδικασίες που ακολουθήθηκαν με τελικό στόχο τον προσδιορισμό της NK-κυτταροτοξικότητας, όπως αυτή καταγράφηκε σε *in vitro* λυτικές δοκιμασίες ελέγχου κυτταροτοξικότητας έναντι κυτάρων που προήλθαν από μακράς διάρκειας καλλιέργειες των κυτταρικών σειρών K562 και Raji. Η NK-κυτταροτοξικότητα προσδιορίστηκε σε δείγματα ασθενών υπό θεραπεία με 5-Αζασυτιδίνη καθώς και σε δείγματα υγιών μαρτύρων.

Στον πίνακα 4. που ακολουθεί συνοψίζονται τα πειραματικά δεδομένα που προέκυψαν κατά τον χειρισμό των δειγμάτων ηπαρινισμένου αίματος ασθενών υπό θεραπεία και υγιών μαρτύρων, κατά την προετοιμασία των λυτικών δοκιμασιών ελέγχου της NK-κυτταροτοξικότητας των εκάστοτε δειγμάτων. Ο ορισμός των

παραμέτρων που αναφέρονται έχει ήδη προσδιοριστεί στο κεφάλαιο Εργαστηριακές Μέθοδοι (σελ. 43).

Στον πίνακα 4. αναφέρονται οι μετρήσεις που προέκυψαν κατά:

- ✓ τον προσδιορισμό του απόλυτου αριθμού NK-κυττάρων δείγματος περιφερικού αίματος, με τεχνική κυτταρομετρίας ροής και εκτίμηση έκφρασης στην επιφάνεια των NK-κυττάρων των αντιγόνων CD¹⁶⁻⁵⁶, ώστε να επιβεβαιωθεί ότι το εκάστοτε δείγμα διαθέτει αναγνωρίσιμα ανοσοφαινοτυπικά NK-κύτταρα και πως ο συνολικός απόλυτος αριθμός τους είναι $\geq 2 \times 10^6$ (σελ.43)
- ✓ την αρχική απομόνωση των μονοπύρηνων κυττάρων (Peripheral Mononuclear Cells-PMNCs) από το δείγμα περιφερικού αίματος με τεχνική διαβαθμισμένης πυκνότητας. Η συγκέντρωση των απομονωμένων μονοπύρηνων κυττάρων προσδιορίστηκε με τεχνική στηριζόμενη στη χρήση του αιμοκυτταρόμετρου (πλάκα Neubauer) και το ποσοστό των βιώσιμων κυττάρων στον κυτταρικό πληθυσμό των μονοπύρηνων κυττάρων που απομονώθηκε, προσδιορίστηκε με τη χρήση της χρωστικής Trypan blue (σελ.47)
- ✓ τη διαδικασία αρνητικού ανοσομαγνητικού κυτταρικού διαχωρισμού των NK κυττάρων (σελ.51).

Κρυοσυντηρούμενα απομονωμένα NK κύτταρα για πιθανή μελλοντική χρήση, διατηρούνται από πέντε μόνο ασθενείς των οποίων ο αριθμός των κυττάρων το επέτρεπε.

Υπήρξαν δείγματα (ενός υγιούς μάρτυρα και τριών ασθενών) που είτε λόγω χαμηλού αριθμού NK κυττάρων είτε λόγω τεχνικών δυσκολιών κατά την απομόνωση των NK κυττάρων, δεν απομονώθηκε ο απαιτούμενος ελάχιστος απόλυτος αριθμός ($\geq 2 \times 10^6$ NK κύτταρα). Στις περιπτώσεις αυτές οι λυτικές δοκιμασίες ελέγχου NK κυτταροτοξικότητας πραγματοποιήθηκαν σε μονά και όχι σε διπλά δείγματα.

Πίνακας 4: Αποτελέσματα μετρήσεων απόλυτου αριθμού NK-κυττάρων περιφερικού αίματος με τεχνική κυτταρομετρίας ροής, απόλυτου αριθμού PMNCs περιφερικού αίματος με τεχνική αιμοκυτταρομέτρου και απόλυτου αριθμού NK κυττάρων μετά απομόνωσή τους με τεχνική αρνητικού ανοσομαγνητικού κυτταρικού διαχωρισμού. Μετρήσεις της βιωσιμότητας των PMNCs και των απομονωμένων NKcs με τεχνική Trypan blue.

Κωδικός δείγματος	Αρχικός όγκος δείγματος ml	PMNCs- ΠΑ/ΤΒ	PMNCs – ΠΑ/ΤΒ βιωσιμότητα (%)	NKcs- ΠΑ/ΑΦ	Απομονωμένα NKcs/ΤΒ	Απομονωμένα NKcs/ΤΒ βιωσιμότητα (%)
Δείγματα υγιών μαρτύρων						
ΜΑΤΣ	44	57×10 ⁶		1×10 ⁶	1,3×10 ⁶	
ΚΛΔΑ	17	22,1×10 ⁶	>90%	7,14×10 ⁶	2,52×10 ⁶	97%
ΡΕΓΡ	37	65×10 ⁶	99,6%		8,75×10 ⁶	99%
ΤΣΑΛ	39	53×10 ⁶	98%	7,8×10 ⁶	4,7×10 ⁶	100%
ΓΙΣΤ	26	44,5×10 ⁶	100%	3×10 ⁶	3×10 ⁶	100%
ΦΙΓΙ	38	39×10 ⁶	98%	7,6×10 ⁶	7,6×10 ⁶	99%
ΜΠΓΙ	37	49×10 ⁶	99%	5×10 ⁶	4,8×10 ⁶	100%
ΕΛΚΑ	20	29×10 ⁶	98%	19,6×10 ⁶	3,2×10 ⁶	97%
ΠΙΚΟ	40	34×10 ⁶	100%	5,4×10 ⁶	2,9×10 ⁶	100%
Δείγματα ασθενών που λαμβάνουν θεραπεία με 5-Αζασυτιδίνη						
ΜΑΑΣ	40	40×10 ⁶	99%	8×10 ⁶	8×10 ⁶	90%
ΝΙΚΩ	40	45×10 ⁶	99%	12×10 ⁶	1,8×10 ⁶	
ΜΗΚΩ	40	42×10 ⁶	100%		2,5×10 ⁶	
ΛΕΠΑ	40	69×10 ⁶	99%	7,16×10 ⁶	5,25×10 ⁶	98%
ΟΡΝΕ	40	25×10 ⁶	100%	12,96×10 ⁶	9,5×10 ⁶	100%
ΜΑΔΗ	36	43×10 ⁶	99%	6,84×10 ⁶	5,5×10 ⁶	100%
ΜΠΕΛ	40	53×10 ⁶	100%	5,7×10 ⁶	3,7×10 ⁶	100%
ΕΥΜΗ	35	58×10 ⁶	99,8%	8,73×10 ⁶	6,4×10 ⁶	100%
ΙΩΚΟ	41	65×10 ⁶	99%	5,74×10 ⁶	5,7×10 ⁶	100%
ΜΙΠΑ	40	133×10 ⁶	100%	13,88×10 ⁶	6×10 ⁶	100%
ΔΗΜΑ	40	47×10 ⁶	100%	11,76×10 ⁶	5×10 ⁶	98%
ΛΙΜΠ	39	20×10 ⁶	99%	5,1×10 ⁶	1,75×10 ⁶	100%
ΝΙΚΑ	35	24×10 ⁶	99%	6,37×10 ⁶	2,4×10 ⁶	100%
ΓΙΑΛ	50	44×10 ⁶	100%	1,05×10 ⁶	0,7×10 ⁶	100%
ΦΡΑΝ	20	240×10 ⁶	100%		6,4×10 ⁶	100%
ΛΙΜΑ	40	65,5×10 ⁶	100%		8,9×10 ⁶	100%
ΧΡΟΥ	40	80,5×10 ⁶	99%	2,04×10 ⁶	2×10 ⁶	100%
<p><i>Ορισμοί Μετρήσεων:</i></p> <p><i>PMNCs-ΠΑ/ΤΒ: Ολικά PMNCs κύτταρα σε δείγμα πλήρους αίματος (ΠΑ) με τεχνική Trypan Blue (ΤΒ)</i></p> <p><i>PMNCs-ΠΑ/ΤΒ-βιωσ.(%): Εκτίμηση της βιωσιμότητας σε PMNCs κύτταρα σε δείγμα πλήρους αίματος (ΠΑ) με τεχνική Trypan Blue (ΤΒ)</i></p> <p><i>NKcs-ΠΑ/ΑΦ: Ολικά NK κύτταρα σε δείγμα πλήρους αίματος (ΠΑ) με τεχνική κυτταρομετρίας ροής και καταγραφή ανοσοφαινοτύπου (ΑΦ)</i></p> <p><i>NKcs/ΤΒ: Ολικά απομονωμένα NK κύτταρα μετά αρνητικό ανοσομαγνητικό διαχωρισμό, με τεχνική Trypan Blue (ΤΒ)</i></p> <p><i>NKcs /ΤΒ-βιωσ.(%): Εκτίμηση της βιωσιμότητας σε απομονωμένα NK κύτταρα μετά αρνητικό ανοσομαγνητικό διαχωρισμό, με τεχνική Trypan Blue (ΤΒ)</i></p>						

Όπως έχει ήδη αναλυθεί, σε κάθε πείραμα ελέγχου NK-κυτταροτοξικότητας δείγματος ασθενούς ή υγιούς μάρτυρα, προσδιορίστηκε η μέση τιμή των 7AAD⁺ κυττάρων στόχων (K562 ή Raji) μετά συνεπώασή τους με NK δραστικά κύτταρα, σύμφωνα με τους υπολογισμούς των διπλών δοκιμασιών και το αποτέλεσμα ορίζονταν από τον τετραψήφιο κωδικό του δείγματος. Επίσης σε κάθε πείραμα υπολογίστηκε η μέση τιμή αυτόματης λύσης των κυττάρων στόχων (K562 ή Raji) που επωάζονταν παράλληλα. Με βάση αυτούς τους υπολογισμούς προσδιορίστηκε η "καθαρή " NK κυτταροτοξικότητα-cytotoxicity (Tox) κάθε δείγματος έναντι έκαστης κυτταρικής σειράς στόχου ως η διαφορά της μέσης τιμής 7AAD⁺ κυττάρων στόχων μετά συνεπώαση με τα δραστικά – NK κύτταρα κάθε δότη και της μέσης τιμής 7AAD⁺ κυττάρων στόχων προερχόμενα από αυτόματη λύση της αυτής κυτταρικής σειράς στις ίδιες συνθήκες.

Στους πίνακες 5α,β καταγράφονται τα πειραματικά δεδομένα αυτών των λυτικών δοκιμασιών ελέγχου NK κυτταροτοξικότητας υγιών μαρτύρων και ασθενών αντίστοιχα, έναντι της κυτταρικής σειράς K562 και Raji. Να σημειωθεί ότι υπήρξαν δοκιμασίες που για τεχνικούς λόγους (μικρότερος του απαιτούμενου αριθμός NK κυττάρων, κακή ποιότητα δειγμάτων, τεχνικά ατυχήματα) δεν μπόρεσαν να ολοκληρωθούν δύο φορές όπως όριζε η μεθοδολογία και καταγράφεται μία μόνο τιμή μέτρησης.

Στις εικόνες 8α,β,γ,δ φαίνονται παραδείγματα ανοσοφαινοτυπικής μέτρησης της NK κυτταροτοξικότητας ως ποσοστό(%) των διπλά θετικών κυττάρων στόχων (Πληθυσμός E2: 7AAD⁺/ PKH-67⁺), σε δείγματα υγιών μαρτύρων και ασθενών, έναντι των κυτταρικών σειρών-στόχων K562 και Raji.

Πίνακας 5^α: NK κυτταροτοξικότητα υγιών μαρτύρων έναντι των κυτταρικών σειρών K562 και Raji.

Τετραψήφιος κωδικός δείγματος	7AAD ⁺ NK vs K562 ^{PKH-67} (%)			7AAD ⁺ K562 ^{PKH-67} (%)			*NK vs K562 ^{PKH-67} Tox (%)	7AAD ⁺ NK vs Raji ^{PKH-67} (%)			7AAD ⁺ Raji ^{PKH-67} (%)			*NK vs Raji ^{PKH-67} Tox(%)
	δοκ.1	δοκ.2	Μέση τιμή	δοκ.1	δοκ.2	Μέση τιμή		δοκ.1	δοκ.2	Μέση τιμή	δοκ.1	δοκ.2	Μέση τιμή	
ΜΑΤΣ	41.9			1.2			40.7	2.6			2.6			0
ΚΛΔΑ	62			2.3			59.7	7,2			0,6			6,6
ΡΕΓΡ	13.2	15.4	14.3	2.7	2.1	2.4	11.9	6.3	4.4	5.35	4.8	5.9	5.35	0
ΤΣΑΛ	46.1	50.6	48.35	2.6	1.9	2.25	46.1							
ΓΙΣΤ	16.6	15.9	16.25	6.2	7	6.6	9.65	7.6	5.6	6.6	1.7	2.3	2	4.6
ΦΙΛΙ	63.9	52.7	58.3	3.7	5.9	4.8	53.5	12.8	7.7	10.25	5.9	6.1	6	4.2
ΜΠΓΙ	41.5	43.8	42.65	6.1	4.8	5.45	37.2	6.1	7.6	6.85	4.6	3.5	4	2.85
ΕΛΚΑ	48.6	52.3	50.45	2.9			47.55	4.1	5.5	4.8	2.7			2.1
ΠΙΚΟ	39.4	46.6	43	6.2	7	6.6	36.4	8.6	7.8	8.2	1.7	2.2	1.95	6.25

*Η "καθαρή " NK-κυτταροτοξικότητα (Tox) προσδιορίζεται από την διαφορά της NK λυτικής δράσης έναντι των κυττάρων στόχων (7AAD⁺) και της αυτόματης λύσης των κυττάρων στόχων χωρίς την επίδραση NK δραστικών κυττάρων.

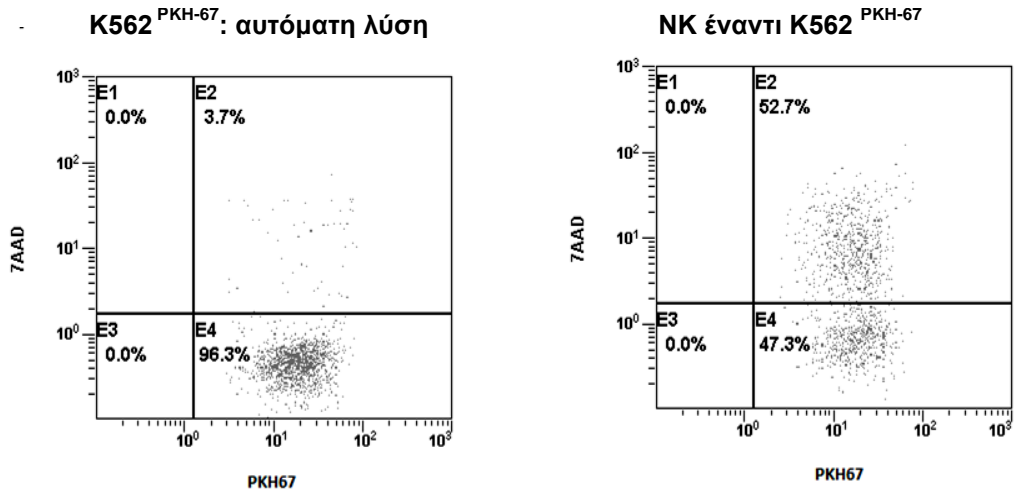
Πίνακας 5β: NK κυτταροτοξικότητα ασθενών υπό θεραπεία με 5-Αζαουτιδίνη έναντι των κυτταρικών σειρών K562 και Raji.

Τετραψήφιος κωδικός δείγματος	7AAD ⁺ NK vs K562 ^{PKH-67} (%)			7AAD ⁺ K562 ^{PKH-67} (%)			*NK vs K562 ^{PKH-67} Tox(%)	7AAD ⁺ NK vs Raji ^{PKH-67} (%)			7AAD ⁺ Raji ^{PKH-67} (%)			*NK vs Raji ^{PKH-67} Tox(%)
	δοκ.1	δοκ.2	Μέση τιμή	δοκ.1	δοκ.2	Μέση τιμή		δοκ.1	δοκ.2	Μέση τιμή	δοκ.1	δοκ.2	Μέση τιμή	
ΜΑΑΣ	11	14.6	12.8	3.3	0.8	2.05	10.75							
ΝΙΚΩ	9.7			5	4.6	4.8	4.9	7.3			1.5	1.7	1.6	5.7
ΜΗΚΟ	15.2			8.5			6.7	4.9	4.8	4.85	3.6			1.25
ΛΕΠΑ	42.6	42.5	42.5	6.7			35.8	11.3	11.3	11.3	3.2			8.1
ΟΡΝΕ	12.4	13.6	13	4.5			8.5	3.4	3.8	3.6	3.3			0.3
ΜΑΔΗ	39.2	36	37.6	6			31.6	10.8	9	9.9	7.5			2.4
ΜΠΕΛ	36.2	14.6	25.4	5.9	2.3	4.1	21.3	6.8	7.2	7	1.9	4.6	3.25	3.75
ΕΥΜΗ	19.4	15.8	17.6	3.1	2.3	2.7	14.9	4.7	4.4	4.55	3.2	3.3	3.25	1.3
ΙΩΚΟ	29.8	25.7	27.7	3.3	0.7	2	25.7	4	3.2	3.6	3.6	2.7	3.15	0.25
ΜΙΠΑ	43.3	46.9	45.1	3.7	4.1	3.9	41.2	8.1	6.5	7.3	5.4	3.7	4.55	2.75
ΔΗΜΑ	24.2	28.4	26.3	3.7	4.1	3.9	22.4	6.6	7.9	7.25	5.4	3.7	4.55	2.7
ΛΙΜΠ	16.6			5.2	5.4	5.3	11.3	4.5			2.4	3	2.7	1.8
ΝΙΚΑ	26.8	26.1	26.4	1.7	1.5	1.6	24.8	6.7	6.8	6.7	3.4	2.9	3.15	3.5
ΓΙΑΛ	23.9			2.5	2.4	2.4	21.5							
ΦΡΑΝ	5.4	5.3	5.3	2.4	2.5	2.4	2.9	3.4	3	3.2	2.6	2.9	2.7	0.5
ΛΙΜΑ	7.5	7.7	7.6	6.7	7.3	7	0.6	8.6	7.3	7.95	3.6	4.8	4.2	3.75
ΧΡΟΥ	14.3	16.2	15.25	8.6	7.3	7.95	7.3	7	6.1	6.5	3.4	4.8	4.2	2.3

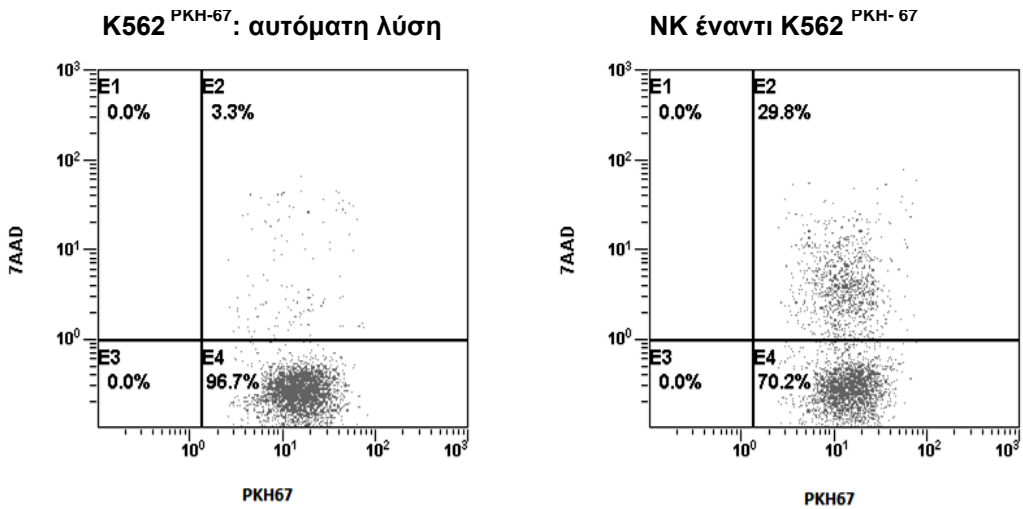
* Η "καθαρή" NK-κυτταροτοξικότητα (Tox) προσδιορίζεται από την διαφορά της NK λυτικής δράσης έναντι των κυττάρων στόχων (7AAD+) και της αυτόματης λύσης των κυττάρων στόχων χωρίς την επίδραση NK δραστικών κυττάρων.

Εικόνα 8α,β: Ανοσοφαινοτυπική απεικόνιση μέτρησης NK-κυτταροτοξικότητας έναντι της κυτταρικής σειράς K562 σε δείγματα υγιών μαρτύρων (α) και ασθενών υπό 5-Αζασουτιδίνη (β), με τις αντίστοιχες μετρήσεις της αυτόματης λύσης των κυττάρων στόχων.

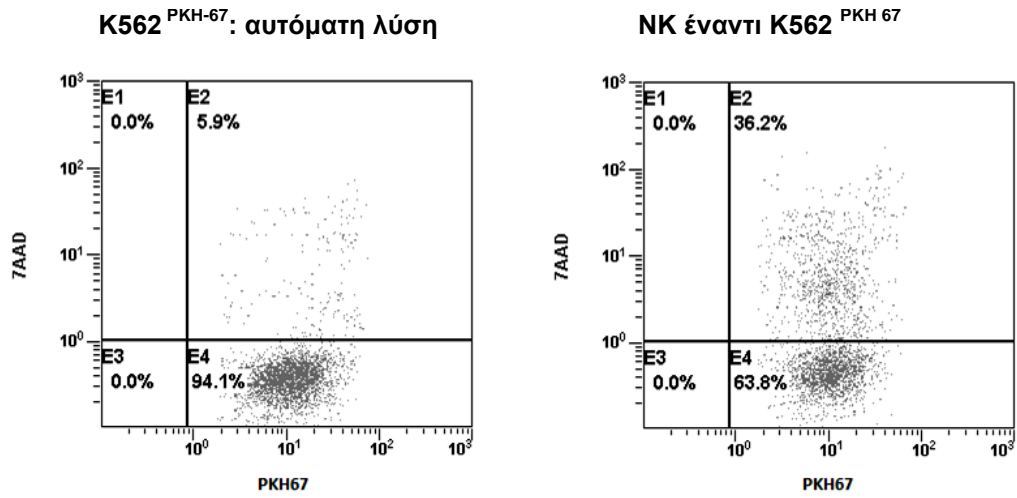
α) NK κυτταροτοξικότητα έναντι K562 – υγιής μάρτυρας (ΦΙΛΙ)



β) NK κυτταροτοξικότητα έναντι K562 – ασθενής (ΙΩΚΟ)

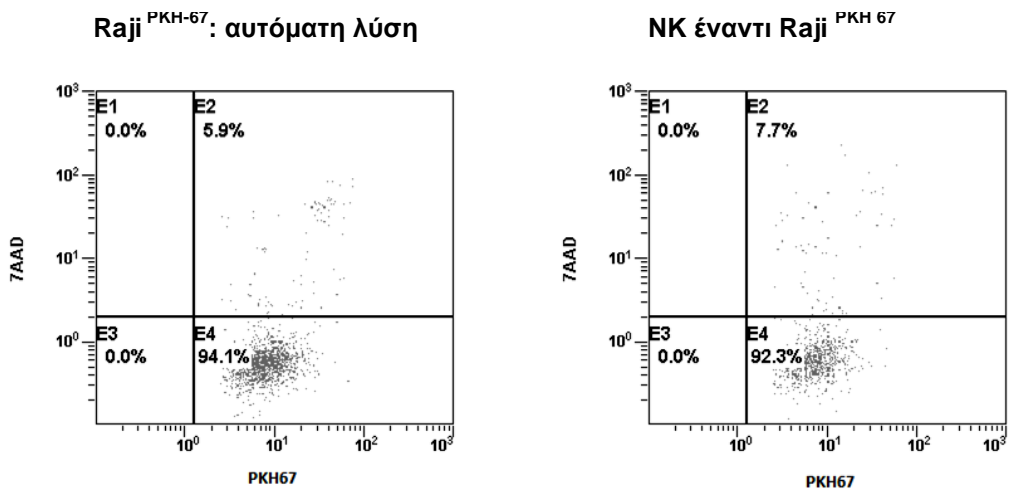


β) NK κυτταροτοξικότητα έναντι K562 – ασθενής (ΜΠΕΛ)



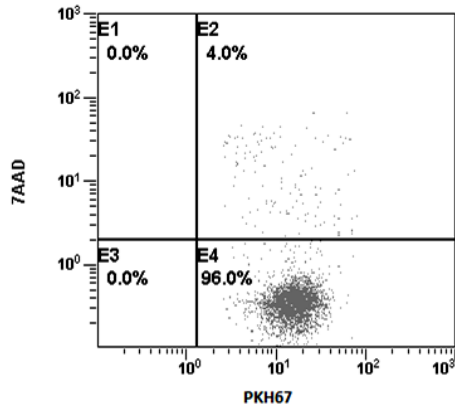
Εικόνα 8γ,δ:Ανοσοφαινοτυπική απεικόνιση μέτρησης NK-κυτταροτοξικότητας έναντι της κυτταρικής σειράς Raji σε δείγματα υγιών μαρτύρων (γ) και ασθενών (δ), με τις αντίστοιχες μετρήσεις της αυτόματης λύσης των κυττάρων στόχων.

γ) NK κυτταροτοξικότητα έναντι Raji – υγιής μάρτυρας (ΦΙΛΙ)

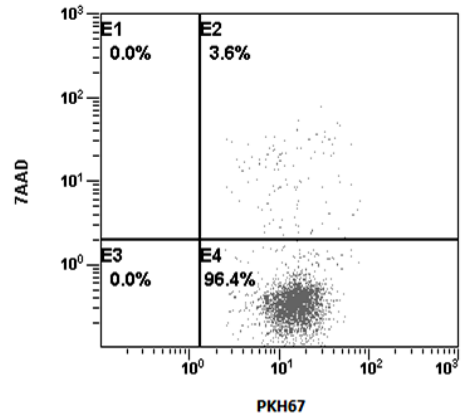


δ) NK κυτταροτοξικότητα έναντι Raji – ασθενής (ΙΩΚΟ)

Raji: αυτόματη λύση

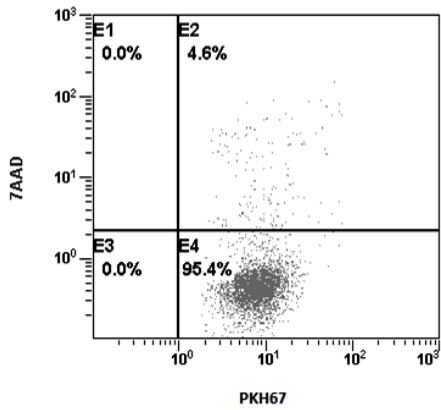


NK έναντι Raji^{PKH 67}

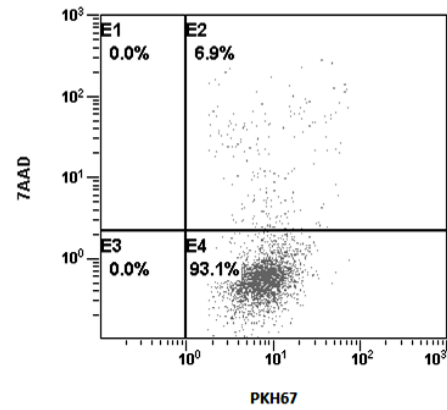


δ) NK κυτταροτοξικότητα έναντι Raji – ασθενής (ΜΠΕΛ)

Raji: αυτόματη λύση

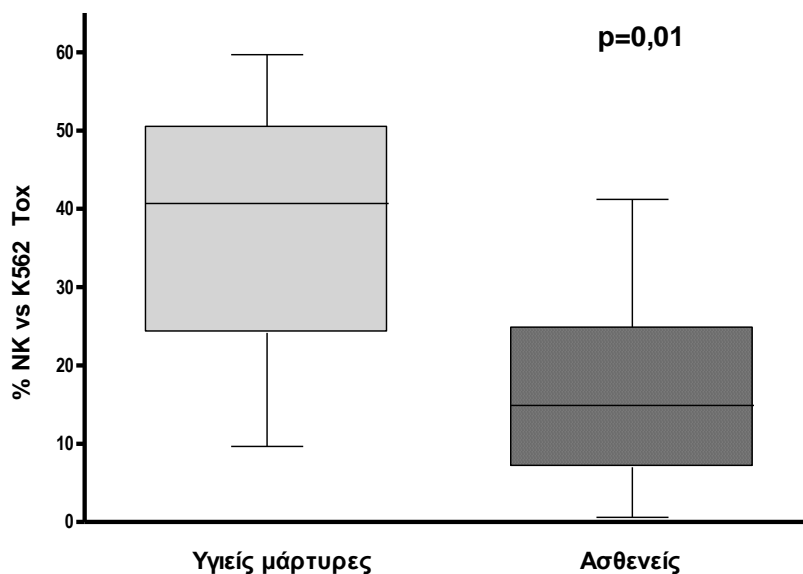


NK έναντι Raji^{PKH 67}



Η διάμεση τιμή της μετρημένης NK κυτταροτοξικότητας έναντι της κυτταρικής σειράς K562 που προσδιορίστηκε στα δείγματα υγιών μαρτύρων και ασθενών ήταν αντίστοιχα 38,08% (95% CI 24,8 - 51,29) και 17,23% (95% CI 11,3 – 23,42). Ασθενείς πάσχοντες από ΜΔΣ ή ΟΜΛ μετά από βραχείας διάρκειας έκθεση σε 5-Αζασουτιδίνη φαίνεται να έχουν περιορισμένη NK-κυτταροτοξικότητα έναντι των κυττάρων της NK-ευαίσθητης σειράς K562 σε σύγκριση με τους υγιείς μάρτυρες, σε στατιστικώς σημαντικό βαθμό ($p=0,01$) (Γράφημα 2).

Γράφημα 2: NK κυτταροτοξικότητα έναντι της κυτταρικής σειράς K562, υγιών μαρτύρων και ασθενών υπό θεραπεία με 5-Αζασουτιδίνη



Η κυτταρική σειρά Raji όπως αναμένονταν ήταν ιδιαίτερα ανθεκτική στην προκαλούμενη από τα NK κύτταρα κυτταρόλυση. Η διάμεση τιμή της μετρημένης NK κυτταροτοξικότητας έναντι της κυτταρικής σειράς Raji που προσδιορίστηκε στα δείγματα υγιών μαρτύρων και ασθενών υπό θεραπεία με 5-Αζασουτιδίνη ήταν αντίστοιχα 3,5% (95% CI 1,19 – 5,45) και 2,4% (95% CI 1,51 – 3,82), και η μεταξύ τους διαφορά βρέθηκε στατιστικώς μη σημαντική.

2.3 Πληθυσμοί ανοσορρυθμιστικών κυττάρων

Σε αντίθεση με τη δραστικότητα των NK κυττάρων, η ποσοστιαία παρουσία NK κυττάρων σε υγιείς μάρτυρες και ασθενείς ανεξάρτητα από τη χορήγηση ή όχι 5-Αζασυτιδίνης, δεν παρουσίασε στατιστικώς σημαντική διαφορά. Στον πίνακα 6. αναφέρεται η μέση τιμή του ποσοστού όλων των υπό μελέτη υποπληθυσμών ανοσορρυθμιστικών κυττάρων στις τρεις ομάδες που ελέγχθηκαν, δηλαδή σε υγιείς μάρτυρες, σε ασθενείς πάσχοντες από ΜΔΣ/ΟΜΛ υπό θεραπεία με 5-Αζασυτιδίνη και σε ασθενείς πριν την έναρξη οποιασδήποτε θεραπείας, καθώς και το εύρος διακύμανσης των τιμών αυτών. Στο γράφημα 3. οι στήλες αναπαριστούν ακριβώς αυτές τις μέσες τιμές των υπό μελέτη ανοσορρυθμιστικών κυττάρων. Έχοντας ελέγξει το πρότυπο κατανομής όλων των υπό μελέτη παραμέτρων -τιμές ποσοστιαίας παρουσίας υποπληθυσμών ανοσορρυθμιστικών κυττάρων- ως προς την κανονικότητα ή μη της κατανομής τους και εφόσον όλες οι ελεγμένες παράμετροι πληρούσαν το κριτήριο της κανονικής κατανομής (κατανομή κατά Gauss), έγινε στατιστική σύγκρισή τους μεταξύ των υπό μελέτη ομάδων υποκειμένων εφαρμόζοντας το παραμετρικό t-test μεταξύ ανεξαρτήτων δειγμάτων (unpaired t-test) (πίνακας 7).

Η μέση ποσοστιαία παρουσία των T-λεμφοκυττάρων μεταξύ των υγιών μαρτύρων και των ασθενών υπό θεραπεία με 5-Αζασυτιδίνη, δεν παρουσίασε στατιστικώς σημαντική διαφορά. Στατιστικώς σημαντική ήταν η διαφορά της μέσης ποσοστιαίας παρουσίας των T-λεμφοκυττάρων μεταξύ υγιών μαρτύρων και ασθενών πριν την έναρξη οποιασδήποτε θεραπείας, καθώς οι τελευταίοι παρουσίαζαν αύξηση του πληθυσμού των T-λεμφοκυττάρων ($p=0,022$). Επίσης στατιστικώς σημαντική ήταν η διαφορά ως προς τη μέση ποσοστιαία παρουσία των T-λεμφοκυττάρων μεταξύ ασθενών πριν την έναρξη οποιασδήποτε θεραπείας και ασθενών υπό θεραπεία με 5-Αζασυτιδίνη, καθώς οι πρώτοι παρουσίαζαν αύξηση του πληθυσμού των T-λεμφοκυττάρων ($p=0,0025$) (Πίνακες 6,7, Γράφημα 3).

Η μέση ποσοστιαία παρουσία NK λεμφοκυττάρων καθώς και της υποομάδας των CD56^{bright} δεν βρέθηκε να διαφέρει σημαντικά μεταξύ των υπό μελέτη ομάδων υποκειμένων.

Το ποσοστό των CD4⁺ T-λεμφοκυττάρων βρέθηκε σημαντικό μειωμένο στην ομάδα των ασθενών υπό θεραπεία με 5-Αζασυτιδίνη τόσο ως προς την ομάδα των υγιών μαρτύρων ($p=0,02$), όσο και ως προς την ομάδα των ασθενών πριν την έναρξη οποιασδήποτε θεραπείας ($p=0,0016$) (Πίνακες 6,7, Γράφημα 3). Δε βρέθηκε στατιστικώς σημαντική διαφοροποίηση της παρουσίας της υποομάδας των Tregs κυττάρων μεταξύ των ομάδων των ασθενών και των υγιών μαρτύρων.

Η μέση τιμή του ποσοστού των MDSCs εκφρασμένου ως ποσοστό των CD33⁺ μονοκυττάρων του περιφερικού αίματος στους υγιείς μάρτυρες ήταν 0,82% (95% CI, 0,3-1,3) και στις ομάδες των ασθενών πριν την έναρξη θεραπείας και μετά θεραπεία με 5-Αζασυτιδίνης αντίστοιχα, ήταν 1,68% (95% CI, 0,83-2,52) και 0,76% (95% CI, 0,33-1,2), χωρίς να παρουσιάζουν στατιστικώς σημαντική διαφορά κατά τη σύγκριση μεταξύ τους. Κατά τη σύγκριση ωστόσο της μέσης ποσοστιαίας έκφρασης των MDSCs μεταξύ των δύο ομάδων ασθενών, η διαφορά βρέθηκε στατιστικώς σημαντική καθώς η έκφραση τους ήταν αυξημένη στην ομάδα των ασθενών πριν τη χορήγηση οποιασδήποτε θεραπείας ($p=0,024$) (Πίνακες 6,7, Γράφημα 3).

Πίνακας 6: Ανοσορρυθμιστικά κύτταρα περιφερικού αίματος υγιών μαρτύρων και ασθενών πριν την έναρξη οποιασδήποτε θεραπείας και υπό θεραπεία με 5-Αζασουτιδίνη

	Υγιείς Μάρτυρες (n=9)			Ασθενείς πριν την έναρξη οποιασδήποτε θεραπείας (n=8)			Ασθενείς υπό θεραπεία με 5-Αζασουτιδίνη (n=18)		
Υποπληθυσμοί ανοσορρυθμιστικών κυττάρων	Μέση τιμή	±95% CI της μέσης τιμής	εύρος	Μέση τιμή	±95% CI της μέσης τιμής	εύρος	Μέση τιμή	±95% CI της μέσης τιμής	εύρος
CD3⁺ λεμφοκύτταρα	61%	53-69%	47-79%	74,71%	65,13-84,3%	66,4-93,4%	54%	44-62%	19-74%
NK κύτταρα (CD3⁺/CD16⁺/CD56⁺)	15%	7,6-22%	6-36%	11,6%	4,26-18,94%	0,01-22%	19%	14-24%	5,1-33%
NK κύτταρα CD56^{bright}	4,03%	1,8-6,27%	1,6-8,9%	2,2%	0,12-4,27%	1,1-6,2%	6,5%	3,52-9,48%	0,1-20,8%
CD3⁺/CD4⁺ λεμφοκύτταρα	40%	31-50%	13-53%	51,1%	32,84-69,36%	27-83,3%	29%	24-34%	12-48%
Tregs (CD3⁺/CD4⁺/CD25⁺/CD127^{low/-})	1,3%	0,008-2,6%	0,2-51%	0,4%	0,007-0,79%	0,1-1,3%	0,79%	0,43-1,2%	0,1-2,5%
MDSCs (CD33⁺/CD11b⁺/CD14⁺/HLADR^{low/-})	0,82%	0,3-1,3%	0,27-2,2%	1,68	0,83-2,52%	0,13-3,07%	0,76%	0,33-1,2%	0,09-3,5%

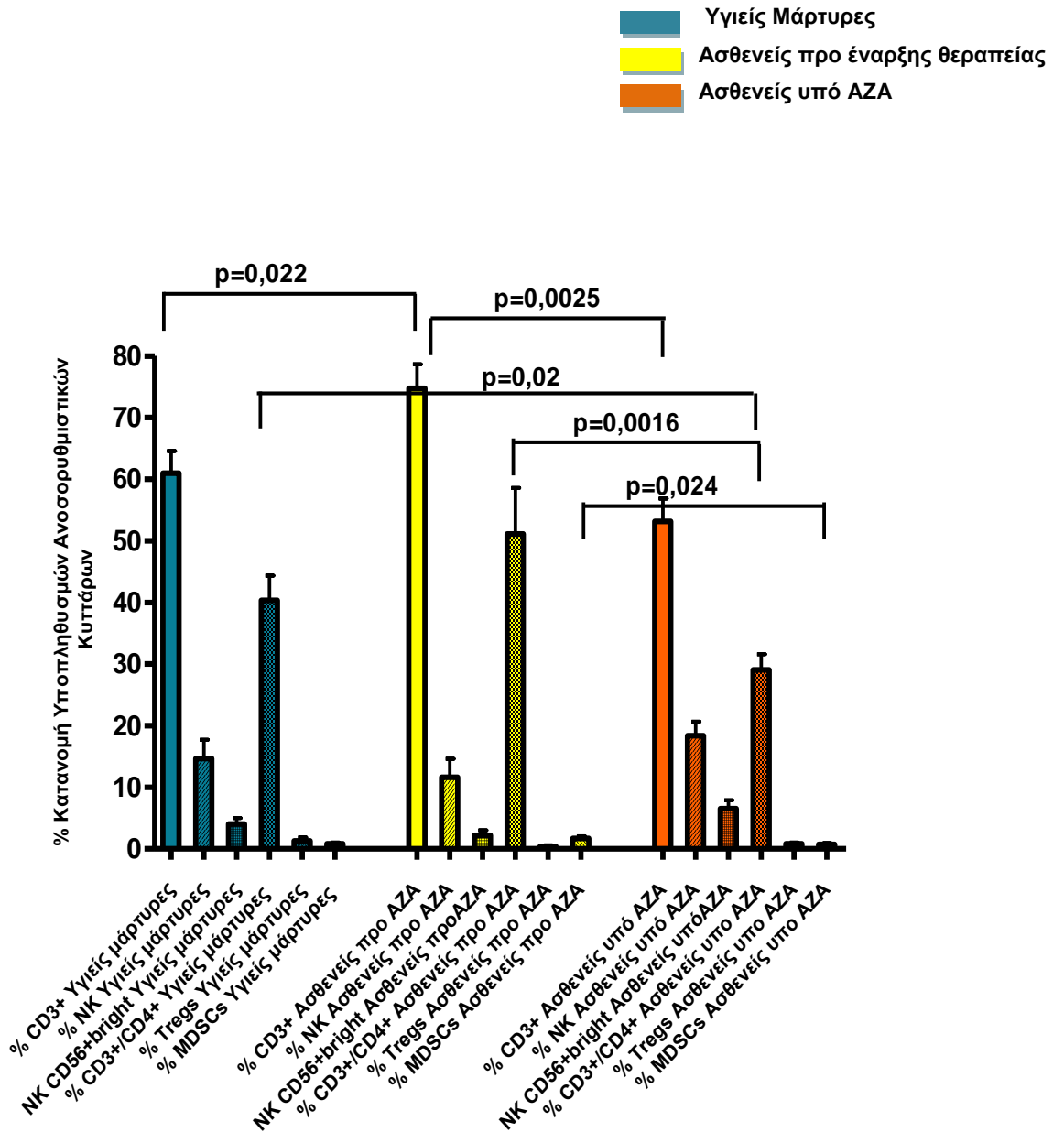
Το ποσοστό των CD3⁺, NK και CD3⁺/CD4⁺ λεμφοκυττάρων προσδιορίστηκε επί του συνόλου των λεμφοκυττάρων.

Το ποσοστό των NK κυττάρων CD56^{bright}, προσδιορίστηκε επί του συνόλου των NK κυττάρων.

Το ποσοστό των Tregs προσδιορίστηκε επί του συνόλου των CD4⁺ λεμφοκυττάρων.

Το ποσοστό των MDSCs προσδιορίστηκε επί του συνόλου των CD33⁺ μονοπύρηνων.

Γράφημα 3: Ποσοστιαία κατανομή των υπο μελέτη υποπληθυσμών των ανοσορρυθμιστικών κυττάρων στο περιφερικό αίμα υγιών μαρτύρων, ασθενών πριν την έναρξη οποιασδήποτε θεραπείας και ασθενών υπο θεραπεία με 5-Αζασουτιδίνη.



Πίνακας 7: Σύγκριση της ποσοστιαίας κατανομής των υποπληθυσμών των ανοσορρυθμιστικών κυττάρων που μελετήθηκαν μεταξύ των ομάδων υγιών μαρτύρων και ασθενών

Υποπληθυσμοί λεμφοκυττάρων	Σύγκριση μεταξύ :		
	Υγιών μαρτύρων και Ασθενών πριν την έναρξη θεραπείας	Υγιών μαρτύρων και Ασθενών υπό χορήγηση 5-Αζασυτιδίνης	Ασθενών πριν την έναρξη θεραπείας και Ασθενών υπό χορήγηση 5-Αζασυτιδίνης
CD3 ⁺ Λεμφοκύτταρα	p=0,022	p=0,31	p=0,0025
NK κύτταρα (CD3 ⁺ /CD16 ⁺ /CD56 ⁺)	p=0,49	p=0,25	p=0,1
NK κύτταρα CD56 ^{bright}	p=0,18	p=0,26	p=0,09
CD3 ⁺ /CD4 ⁺ Λεμφοκύτταρα	p=0,19	p=0,02	p=0,0016
TRegs CD3 ⁺ /CD4 ⁺ /CD25 ⁺ /CD127 ^{low/-}	p=0,19	p=0,92	p=0,15
MDSCs CD33 ⁺ /CD11b ⁺ /CD14 ⁺ /HLADR ^{low/-}	p=0,054	p=0,55	p=0,024

2.4 Η NK-Κυτταροτοξικότητα ως προγνωστικός δείκτης

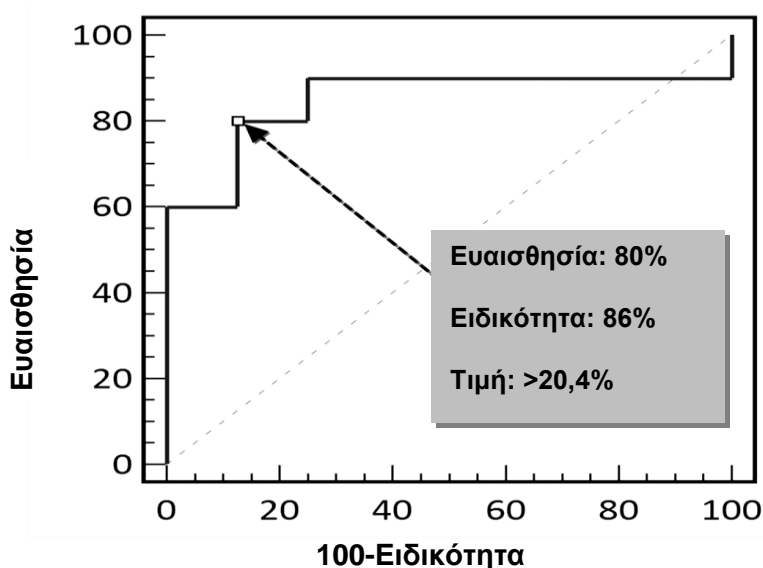
Για τους ασθενείς πάσχοντες από ΜΔΣ/ολιγοβλαστική ΟΜΛ που λαμβάνουν θεραπεία με 5-Αζασυτιδίνη η NK-κυτταροτοξικότητα αποτελεί προγνωστικό δείκτη ανταπόκρισης ως προς τη διάρκεια της ανταπόκρισης και ως προς την ολική επιβίωση των ασθενών.

Εφαρμόζοντας την ανάλυση ROC (Receiver Operating Curve) εκτιμήθηκε η προγνωστική ισχύς διαφορών μελετηθέντων παραμέτρων ως προς την διετή ολική επιβίωση των ασθενών που λαμβάνουν 5-Αζασυτιδίνη ως πρώτης ή ακόλουθης γραμμής θεραπεία. Οι παράμετροι που μελετήθηκαν ήταν η ποσοστιαία παρουσία των υποπληθυσμών των ανοσορρυθμιστικών κυττάρων στο περιφερικό αίμα των ασθενών καθώς και η *in vitro* NK-κυτταροτοξική δραστηριότητα έναντι της κυτταρικής σειράς K562. Η *in vitro* NK-κυτταροτοξική δραστηριότητα έναντι της κυτταρικής σειράς K562 αναγνωρίστηκε ως η μόνη παράμετρος, από όσες αναλύθηκαν, με προβλεπτική αξία ως προς τη διατήρηση μακράς ανταπόκρισης (>12 μήνες) στην 5-Αζασυτιδίνη (Area Under the Curve, AUC=0.850, 95% CI, 0.605 – 0.969, p=0.0002) (Γράφημα 4). Η τιμή NK-

κυτταροτοξικής δραστηριότητας > 20,4% προσδιορίστηκε ως η τιμή με την υψηλότερη ευαισθησία και ειδικότητα, 80% και 86% αντίστοιχα, ως προς την πρόβλεψη της ελεύθερης νόσου επιβίωσης κατά τη θεραπεία αυτών των ασθενών με 5-Αζασυτιδίνη (Γράφημα 4).

Γράφημα 4: Η προβλεπτική αξία της NK-κυτταροτοξικής δραστηριότητας ως προς την μακρά διατήρηση της ανταπόκρισης στους ασθενείς με ΜΔΣ-ΟΜΛ(ολιγοβλαστική) που λαμβάνουν 5-Αζασυτιδίνη (ανάλυση ROC)

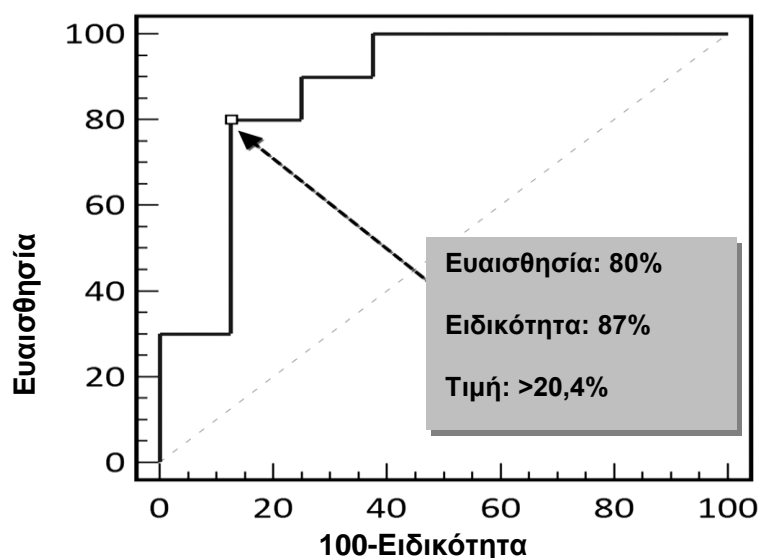
NK-κυτταροτοξικότητα / Διατήρηση Ανταπόκρισης Ασθενών υπο σε 5-Αζασυτιδίνη



Η in vitro NK-κυτταροτοξική δραστηριότητα έναντι της κυτταρικής σειράς K562 αναγνωρίστηκε ως η μόνη παράμετρος, μεταξύ όσων αναλύθηκαν, με προβλεπτική αξία ως προς την επίτευξη μακράς επιβίωσης (άνω των δύο ετών) των ασθενών που πάσχουν από ΜΔΣ/ολιγοβλαστική ΟΜΛ και λαμβάνουν θεραπεία με 5-Αζασυτιδίνη (AUC=0.875, 95% CI, 0.635 – 0.979, $p < 0.0001$) (Γράφημα 5). Η τιμή NK-κυτταροτοξικής δραστηριότητας >20,4% προσδιορίστηκε ως η τιμή με την υψηλότερη ευαισθησία και ειδικότητα, 80% και 87% αντίστοιχα, ως προς την πρόβλεψη της μακράς ολικής επιβίωσης κατά τη θεραπεία αυτών των ασθενών με 5- Αζασυτιδίνη (Γράφημα 5).

Γράφημα 5: Η προβλεπτική αξία της NK-κυτταροτοξικής δραστηριότητας ως προς την μακρά ολική επιβίωση (>2 ετών), στους ασθενείς που λαμβάνουν 5-Αζασουτιδίνη (ανάλυση ROC)

NK-Κυτταροτοξικότητα/Μακρά Ολική Επιβίωση Ασθενών υπό 5-Αζασουτιδίνη



Οι μέθοδοι Kaplan-Meier και log rank test χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό της ολικής επιβίωσης των ασθενών υπό θεραπεία με 5-Αζασουτιδίνη αναλόγως της NK-κυτταροτοξικότητας που επιδεικνύουν *in vitro* έναντι της σειράς K562 (Γράφημα 6) και την μελέτη της επίδρασης διάφορων παραμέτρων στην ολική επιβίωση των ασθενών αυτών (ηλικία, φύλο, προγνωστικός κίνδυνος IPSS, NK-κυτταροτοξικότητα έναντι K562). Στην πολυπαραγοντική ανάλυση η τιμή NK-κυτταροτοξικής δραστηριότητας έναντι K562 μεγαλύτερη ή ίση με 20,4%, αναγνωρίστηκε ως η μόνη παράμετρος σχετιζόμενη με στατιστικώς σημαντικά βελτιωμένη ολική επιβίωση των ασθενών αυτών υπό θεραπεία με 5-Αζασουτιδίνη (HR=0.08, 95% CI, 0.01 – 0.67, p=0.019) (Πίνακας 8).

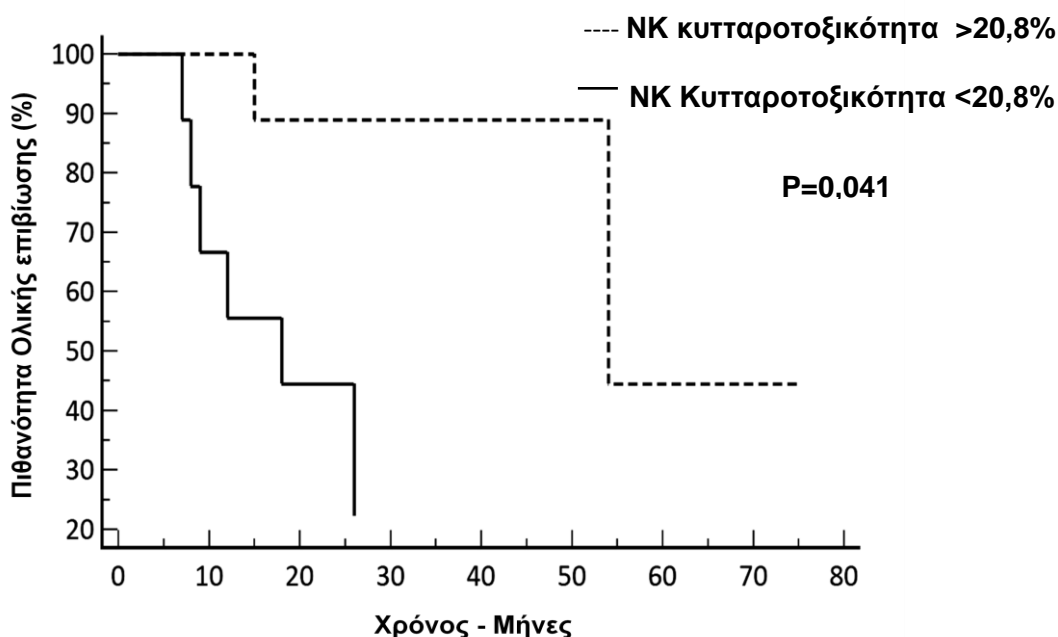
Πίνακας 8: Εκτίμηση της επίδρασης παραμέτρων στην ολική επιβίωση των ασθενών υπό θεραπεία με 5-Αζασουτιδίνη

Παράμετροι	Hazard ratio	95% CI	p-value
Μονοπαραγοντική ανάλυση			
Ηλικία (Μεγαλύτερη vs μικρότερη της διάμεσης)	1.91	0.5 – 7.17	p = ns
Φύλο (Άρρεν vs Θήλυ)	0.63	0.16 – 2.71	p = ns
Προγνωστικό σκορ νόσου ^Δ (Υψηλό vs Ενδιάμεσο 2)	0.38	0.1 – 1.62	p = ns
Νόσος (ΜΔΣ-RAEB II vs ΟΜΛ)	0.44	0.1 – 1.66	p = ns
NK-κυτταροτοξικότητα (Υψηλή vs Χαμηλή)*	0.14	0.03 – 0.49	p = 0.003
Πολυπαραγοντική ανάλυση			
NK-κυτταροτοξικότητα έναντι K562 (Υψηλή vs Χαμηλή)*	0.08	0.01-0.67	p = 0.019

^ΔΠρογνωστικό σκορ σύμφωνα με IPSS ,
* Υψηλή NK-κυτταροτοξικότητα έναντι K562 ορίζεται η τιμή > 20,4%

Γράφημα 6: Η Υψηλή NK-κυτταροτοξική δραστηριότητα (>20,85%) σχετίζεται με στατιστικά σημαντικά αυξημένη ολική επιβίωση (HR=0.10, 95% CI, 0.01 – 0.90, p=0.041).

Ολική Επιβίωση



ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στην παρούσα μελέτη διερευνήθηκε προοπτικά η συσχέτιση μεταξύ της ολικής επιβίωσης ασθενών πασχόντων από υψηλού κινδύνου ΜΔΣ ή ολιγοβλαστική ΟΜΛ που λαμβάνουν τον υπομεθυλιωτικό παράγοντα 5-Αζασουτιδίνη (τουλάχιστον μετά τρεις κύκλους θεραπείας) και διαφόρων παραμέτρων όπως είναι η *in vitro* NK-κυτταροτοξική δραστηριότητα και η ποσοστιαία παρουσία υποπληθυσμών ανοσορρυθμιστικών κυττάρων του περιφερικού αίματος. Ο σκοπός αυτής της διερεύνησης ήταν η ανάδειξη βιοδεικτών με προβλεπτική αξία ως προς την ανταπόκριση των ασθενών με υψηλού κινδύνου ΜΔΣ ή ολιγοβλαστική ΟΜΛ που λαμβάνουν θεραπεία με 5-Αζασουτιδίνη.

Διαπιστώθηκε περιορισμένη NK-κυτταροτοξικότητα στους ασθενείς υπό θεραπεία με 5-Αζασουτιδίνη σε σύγκριση με την ομάδα των υγιών μαρτύρων, εύρημα που συμφωνεί με δημοσιευμένα αποτελέσματα προγενέστερων μελετών. Η διάμεση τιμή της μετρημένης NK κυτταροτοξικότητας έναντι της κυτταρικής σειράς K562 που προσδιορίστηκε στα δείγματα υγιών μαρτύρων και ασθενών ήταν αντίστοιχα 38,08% (95% CI 24,8 - 51,29) και 17,23% (95% CI 11,3 - 23,42). Ασθενείς πάσχοντες από ΜΔΣ ή ΟΜΛ μετά από βραχείας διάρκειας έκθεση στον υπομεθυλιωτικό παράγοντα 5-Αζασουτιδίνη φαίνεται να έχουν περιορισμένη NK-κυτταροτοξικότητα έναντι των κυττάρων της NK-ευαίσθητης σειράς K562 σε σύγκριση με τους υγιείς μάρτυρες, σε στατιστικώς σημαντικό βαθμό ($p=0,01$).

Τα NK κύτταρα ασθενών πασχόντων από ΜΔΣ υψηλού κινδύνου είναι λειτουργικά επηρεασμένα, με ισχυρά περιορισμένη κυτταροτοξική δραστηριότητα και παραγωγή κυτταροκινών. Η ελλειμματική δε αυτή λειτουργικότητα αποδίδεται, όπως ήδη αναφέρθηκε, στην περιορισμένη έκφραση ενεργοποιητικών υποδοχέων και στην ελαττωματική έκκριση IFN- γ και TNF- α . [74-78] Ωστόσο ο ακριβής παθογενετικός μηχανισμός της ελαττωματικής δραστηριότητας των NK κυττάρων στις παθήσεις ΜΔΣ και ΟΜΛ παραμένει συνολικά άγνωστος.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης η ποσοστιαία παρουσία NK κυττάρων καθώς και της υποομάδας των CD56^{bright} σε υγιείς μάρτυρες και ασθενείς ανεξάρτητα από τη χορήγηση ή όχι 5-Αζασυτιδίνης, δεν παρουσίασε στατιστικώς σημαντική διαφορά. Σύμφωνα με δημοσιευμένα αποτελέσματα το ποσοστό καθώς και ο απόλυτος αριθμός των NK κυττάρων αναφέρονται σχετικά μειωμένα σε ασθενείς πάσχοντες από ΜΔΣ σε σύγκριση με τον πληθυσμό υγιών μαρτύρων, ωστόσο σημαντική ελάττωση του πληθυσμού των NK κυττάρων αναφέρεται προκειμένου για ασθενείς πάσχοντες από ΜΔΣ υψηλού κινδύνου ή με υψηλό ποσοστό βλαστικών κυττάρων. [74]

Οι Miller και συν. υποστήριξαν την κατασταλτική επίδραση των MDSCs στην NK-κυτταροτοξικότητα σε ασθενείς με ΜΔΣ, στηριζόμενοι στη διαπίστωση αρνητικής συσχέτισης μεταξύ του πληθυσμού των MDSCs και της NK έκφρασης του CD16. [32] Μια αξιολογημένη μελέτη των Chen και συν. έδειξε πως ο πληθυσμός των MDSCs σε δείγματα μυελού ασθενών πασχόντων από ΜΔΣ είναι αυξημένος σε σύγκριση με δείγματα υγιών εθελοντών.[117] Το εύρημα αυτό σε δείγματα περιφερικού αίματος υποστηρίζεται από αρκετές μελέτες με μεγαλύτερη διαφορά να παρουσιάζουν τα δείγματα ασθενών με νόσο υψηλού κινδύνου.[58] Αξίζει να σημειωθεί ότι οι ασθενείς με ΜΔΣ που έλαβαν Ντεσιταμπίνη και ανταποκρίθηκαν, παρουσίασαν παράλληλα σημαντική ελάττωση του πληθυσμού των περιφερικών MDSCs σε σύγκριση με τους μη-ανταποκριθέντες ασθενείς.[118] Στην παρούσα μελέτη ο πληθυσμός των MDSCs στους ασθενείς με ΜΔΣ προ έναρξης οποιασδήποτε θεραπείας προσμετράται αυξημένος σε σύγκριση με τους ασθενείς υπό 5-Αζασυτιδίνη, επιδεικνύοντας στατιστικώς σημαντική διαφορά ($p=0,024$) σε συμφωνία με τις αναφερθείσες μελέτες. Ωστόσο δεν τεκμηριώθηκε στατιστικώς σημαντική διαφορά στην ποσοστιαία παρουσία των MDSCs μεταξύ των ασθενών προ και υπό θεραπεία και των υγιών μαρτύρων.

Η αύξηση του πληθυσμού των ανοσορρυθμιστικών κυττάρων Tregs είναι γνωστό πως έχει συσχετιστεί με ελαττωματική ανοσοεπιτήρηση, εξέλιξη νεοπλασματικών νοσημάτων και περιορισμό της ολικής επιβίωσης.[119] Μεταξύ των ομάδων των ασθενών που αναλύθηκαν,

τόσο προ έναρξης θεραπείας όσο και μετά βραχύχρονη θεραπεία με 5-Αζασυτιδίνη και της ομάδας των υγιών μαρτύρων δε διαπιστώθηκε διαφορά στατιστικώς σημαντική ως προς τον πληθυσμό των Tregs. Τα βιβλιογραφικά δεδομένα είναι περιορισμένα, ωστόσο υπάρχει αναφορά αυξημένης παρουσίας των Tregs στο περιφερικό αίμα ασθενών με ΜΔΣ καθώς και σημαντική θετική συσχέτιση μεταξύ του πληθυσμού των Tregs, ΜΔΣ υψηλού κινδύνου και εξέλιξης του νοσήματος.[64,119,120] Η παρουσία υψηλού ποσοστού Tregs κατά τη διάγνωση ΜΔΣ έχει συσχετισθεί με μειωμένη πιθανότητα ανταπόκρισης σε 5-Αζασυτιδίνη, ενώ το ποσοστό και η απόλυτη τιμή του πληθυσμού των Tregs δε φαίνεται να διαφοροποιείται υπό θεραπεία, με εξαίρεση πρόσκαιρη αύξηση κατά τον πρώτο μήνα της χορήγησης 5-Αζασυτιδίνης που αποκαθίσταται μετά τον τρίτο μήνα θεραπείας.[121] Η ομάδα των ασθενών υπό θεραπεία με 5-Αζασυτιδίνη που μελετήθηκε παρουσίαζε ικανοποιητικό ποσοστό ανταπόκρισης (33,3%) και πιθανά έτσι ερμηνεύεται η μη διαπίστωση αυξημένου ποσοστού Tregs στην ομάδα των ασθενών σε σύγκριση με τους υγιείς μάρτυρες.

Εστιάζοντας στις μεταβολές που πιθανά επιφέρει τόσο η νόσος (ΜΔΣ-ΟΜΛ) όσο και η θεραπεία με 5-Αζασυτιδίνη στα ανοσοδραστικά κύτταρα του περιφερικού αίματος, διαπιστώθηκε στατιστικώς σημαντική μείωση του υποπληθυσμού των $CD4^+$ λεμφοκυττάρων, με μέση τιμή στην ομάδα των ασθενών πριν την έναρξη θεραπείας 51,1% και μέση τιμή στην ομάδα των ασθενών μετά βραχύχρονη θεραπεία 29% ($p=0,0016$).

Αναλύοντας τα αποτελέσματα των εργαστηριακών μετρήσεων της μελέτης δε θα μπορούσε να υποστηριχθεί, πως η μη διαφοροποίηση των πληθυσμών των Tregs καθώς και των MDSCs κυττάρων μεταξύ ασθενών μετά βραχύχρονη θεραπεία με τον υπομεθυλιωτικό παράγοντα 5-Αζασυτιδίνη και υγιών μαρτύρων αποδεικνύει την αποκατάσταση των ανοσορρυθμιστικών κυττάρων υπό την επίδραση του παράγοντα αυτού, καθώς δε διαθέτουμε δείγματα των αυτών ασθενών προ έναρξης θεραπείας για άμεση σύγκριση. Η επίδραση της 5-Αζασυτιδίνης ωστόσο, είναι πολύ πιθανό, να συμβάλλει στην αποκατάσταση της απορρύθμισης του ανοσοποιητικού συστήματος που συνοδεύει το ΜΔΣ. Ωστόσο παρά την μη σημαντική διαφοροποίηση των ανοσορρυθμιστικών πληθυσμών,

MDSCs και Tregs στο περιφερικό αίμα, δεν μπορεί να αποκλεισθεί η πιθανή τοπική επίδραση της 5-Αζασυτιδίνης στην παρουσία των κυττάρων αυτών γύρω από τις αθροίσεις των μυελικών βλαστών στο περιβάλλον του μυελού των οστών, καθώς δείγματα μυελού δεν εκτιμήθηκαν στην παρούσα μελέτη. Τέτοια δράση έχει δείχθει σε συμπαγή νεοπλάσματα και σε δείγματα ασθενών πασχόντων από ΟΜΛ σε συνδυασμό με άλλα χημειοθεραπευτικά σκευάσματα. Οι ακριβείς μηχανισμοί είναι σύνθετοι, αλληλεπιδρούν πολλαπλώς και αναμένεται με ιδιαίτερο ενδιαφέρον να διερευνηθούν με ακόλουθες μελέτες στο μέλλον.

Το κύριο εύρημα που αναδείχθηκε από την τρέχουσα μελέτη είναι η προγνωστική αξία της υψηλής *in vitro* NK κυτταροτοξικής δράσης μετά από βραχεία έκθεση σε 5-Αζασυτιδίνη ασθενών πασχόντων από ΜΔΣ ή ολιγοβλαστική ΟΜΛ, ως προς τη συνολική ανταπόκριση των ασθενών αυτών. Η NK-κυτταροτοξικότητα ήταν ο μόνος δείκτης με θετική προγνωστική αξία ως προς την μακρά (>12 μηνών) διατήρηση της ανταπόκρισης μετά τη χορήγηση της 5-Αζασυτιδίνης (AUC=0.850, 95% CI, 0.605 – 0.969, $p=0.0002$), αλλά και ως προς την μακρά ολική επιβίωση (>2 ετών) αυτών των ασθενών (AUC=0.875, 95% CI, 0.635 – 0.979, <0.0001). NK-κυτταροτοξικότητα έναντι της K562 κυτταρικής σειράς >20,4%, προσδιορίστηκε ως το όριο με ευαισθησία 80% και ειδικότητα 86%, στην πρόβλεψη μακράς διάρκειας ανταπόκρισης (>12 μηνών) ασθενών πασχόντων εκ ΜΔΣ/ολιγοβλαστική ΟΜΛ υπό 5-Αζασυτιδίνη, καθώς και στην πρόβλεψη μακράς διάρκειας επιβίωσης (>2 ετών) των ασθενών αυτών. Στην πολυπαραγοντική ανάλυση, η διατήρηση υψηλής NK-κυτταροτοξικότητας (>20,4%) αναγνωρίστηκε ως η μόνη από τις αναλυθείσες παραμέτρους που παρουσιάζει στατιστικώς σημαντική συσχέτιση με την μακρά επιβίωση (>2 έτη) των ασθενών υπό αγωγή με 5-Αζασυτιδίνη [HR=0.08, 95% CI, 0.01 – 0.67, $p=0.019$].

Από την ανάλυση των ευρημάτων προκύπτει αβίαστα η διαπίστωση πως η θεραπευτική δράση της 5-Αζασυτιδίνης διαμεσολαβείται, τουλάχιστον μερικώς, μέσω ανοσοτροποποιητικής δράσης. Τα αποτελέσματα της μελέτης είναι σε συμφωνία με την κλινική

μελέτη των Lowdell και συν.[36] και εστιάζουν στη σημαντική δράση της αποδοτικής ανοσοεπιτήρησης για τον έλεγχο του κακοήθους κλώνου τόσο στο ΜΔΣ όσο και στην ΟΜΛ. Η ΝΚ κυτταροτοξική δραστηριότητα αποτελεί για τους ασθενείς πάσχοντες από ΜΔΣ/ΟΜΛ που λαμβάνουν 5-Αζασυτιδίνη προγνωστικό δείκτη ολικής επιβίωσης. Οι ασθενείς με υψηλή ΝΚ-κυτταροτοξικότητα (>20,4%) έχουν ευνοϊκότερη πρόγνωση σε σύγκριση με τους ασθενείς που παρουσιάζουν χαμηλότερη ΝΚ-κυτταροτοξικότητα. Επιπλέον η *in vitro* ΝΚ-κυτταροτοξικότητα μπορεί να αποτελέσει ένα βιοδείκτη για την επιλογή των ασθενών που θα έχουν σημαντικό όφελος από την παρατεταμένη θεραπεία με 5-Αζασυτιδίνη. Η μελέτη αυτή αποτελεί την πρώτη αναφορά θετικής συσχέτισης μεταξύ της *in vitro* ΝΚ-κυτταροτοξικότητας και της ανταπόκρισης των ασθενών με υψηλού κινδύνου ΜΔΣ ή ολιγοβλαστική ΟΜΛ που λαμβάνουν 5-Αζασυτιδίνη.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

Έντυπα ενημέρωσης, συναίνεσης και καταγραφής ασθενών και υγιών μαρτύρων

Έντυπο 1.

Έντυπο ενημέρωσης ασθενούς / υγιούς μάρτυρα

Τίτλος Μελέτης: Μελέτη της in vitro κυτταρολυτικής δραστηριότητας των NK κυττάρων ασθενών πασχόντων από Μυελικές Κακοήθειες

Τμήμα : Αιματολογικό Τμήμα - Β΄ Προπαιδευτική Παθολογική Κλινική Πανεπιστημιακό
Νοσοκομείο «ΑΤΤΙΚΟΝ»

Καλείστε να συμμετάσχετε σε μια ερευνητική μελέτη. Πριν αποφασίσετε εάν επιθυμείτε ή όχι τη συμμετοχή σας, είναι σημαντικό να αντιληφθείτε το σκοπό της μελέτης, τις πληροφορίες που ελπίζουμε να προκύψουν και με ποιο τρόπο θα συμβάλλετε εσείς σε αυτή. Παρακαλούμε αφιερώστε λίγο χρόνο ώστε να διαβάσετε το παρακάτω κείμενο. Μην διστάσετε να απευθυνθείτε στον ιατρό σας για πρόσθετες πληροφορίες.

Ποιος είναι ο σκοπός της μελέτης;

Διερευνούμε την αντίδραση κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος του ασθενούς έναντι παθολογικών κυττάρων.

Είναι υποχρεωτική η συμμετοχή;

Η απόφαση είναι απόλυτα προσωπική. Αν αποφασίσετε να συμμετάσχετε θα σας δοθεί ένα αντίγραφο του παρόντος κειμένου και θα σας ζητηθεί να υπογράψετε μια φόρμα συγκατάθεσης. Επίσης θα πρέπει να γνωρίζετε πως έχετε τη δυνατότητα να αποσυρθείτε οποιαδήποτε στιγμή ακόμη και αν αρχικά συναινέσατε, αυτό δε να είστε σίγουροι πως δεν θα επηρεάσει καθόλου την μελλοντική σας περίθαλψη.

Ποιες είναι οι υποχρεώσεις μου αν αποφασίσω να συμμετάσχω;

Αν αποφασίσετε να λάβετε μέρος στην μελέτη, τότε δείγμα αίματος θα ληφθεί την ίδια στιγμή με την προγραμματισμένη αιμοληψία σας.

Ποια θα είναι τα πιθανά πλεονεκτήματα για μένα αν λάβω μέρος στην μελέτη;

Δεν είναι ιδιαίτερα πιθανό να ωφεληθείτε άμεσα από την μελέτη αυτή, ωστόσο καθώς δυνητικά θα συμβάλλει στην ανάπτυξη νέων και ασφαλών θεραπειών για τη νόσο από την οποία πάσχετε, πιθανά θα σας ωφελήσει μελλοντικά.

Ποια θα είναι τα πιθανά μειονεκτήματα για μένα αν λάβω μέρος στην μελέτη;

Κανένα.

Η συμμετοχή μου στην μελέτη θα παραμείνει απόρρητη;

Κάθε σχετική με εσάς πληροφορία θα παραμείνει απόλυτα απόρρητη.

Ποιος χρηματοδοτεί την μελέτη;

Η μελέτη χρηματοδοτείται από το Αιματολογικό Τμήμα της Β΄ Προπαιδευτικής Παθολογικής Κλινικής του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου «ΑΤΤΙΚΟΝ».

Ποιος διενεργεί την μελέτη;

Η μελέτη διενεργείται από το Αιματολογικό Τμήμα της Β΄ Προπαιδευτικής Παθολογικής Κλινικής του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου «ΑΤΤΙΚΟΝ».

Τελικά

Σας ευχαριστούμε για το χρόνο που διαθέσατε να διαβάσετε το παρόν έγγραφο. Αν αποφασίσετε να συμμετάσχετε στην μελέτη, θα σας ζητηθεί να υπογράψετε μια φόρμα συγκατάθεσης, αντίγραφο της οποίας θα σας επιδοθεί.

Έντυπο 2.

Έντυπο συγκατάθεσης ασθενούς

Τίτλος Μελέτης: **Μελέτη της in vitro κυτταρολυτικής δραστηκότητας των NK κυττάρων ασθενών πασχόντων από Μυελικές Κακοήθειες**

Τμήμα : **Αιματολογικό Τμήμα - Β΄ Προπαιδευτική Παθολογική Κλινική Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο «ΑΤΤΙΚΟΝ»**

1. Επιβεβαιώνω ότι έχω διαβάσει και καταλάβει το έγγραφο ενημέρωσης ασθενούς σχετικά με την μελέτη που αναγράφεται παραπάνω, καθώς και ότι είχα την ευκαιρία να κάνω ερωτήσεις σχετικά με την μελέτη.
2. Έχω καταλάβει ότι η συμμετοχή μου είναι απόλυτα εθελοντική και δύναμαι να αποσυρθώ οποιαδήποτε στιγμή χωρίς να υποχρεούμαι να δικαιολογήσω την απόφασή μου αυτή και χωρίς να επηρεασθεί καθόλου η περαιτέρω περίθαλψή μου.
3. Αντιλαμβάνομαι ότι πληροφορίες από το ιατρικό μου αρχείο μπορεί να χρησιμοποιηθούν υπό ανώνυμη μορφή σε δημοσιεύσεις στον ιατρικό τύπο και συγκατατίθεμαι σε αυτό.
4. Συμφωνώ να λάβω μέρος στην παραπάνω μελέτη.

Όνομα συμμετέχοντος

Ημερομηνία

Υπογραφή

Όνομα ερευνητή

Ημερομηνία

Υπογραφή

Έντυπο 3.

Έντυπο συγκατάθεσης μάρτυρα

Τίτλος Μελέτης: **Μελέτη της in vitro κυτταρολυτικής δραστικότητας των NK κυττάρων ασθενών πασχόντων από Μυελικές Κακοήθειες**

Τμήμα : **Αιματολογικό Τμήμα - Β΄ Προπαιδευτική Παθολογική Κλινική** Πανεπιστημιακό
Νοσοκομείο «ΑΤΤΙΚΟΝ»

1. Επιβεβαιώνω ότι έχω διαβάσει και καταλάβει το έγγραφο ενημέρωσης ασθενούς σχετικά με την μελέτη που αναγράφεται παραπάνω, καθώς και ότι είχα την ευκαιρία να κάνω ερωτήσεις σχετικά με την μελέτη.
2. Έχω καταλάβει ότι η συμμετοχή μου είναι απόλυτα εθελοντική και δύναμαι να αποσυρθώ οποιαδήποτε στιγμή χωρίς να υποχρεούμαι να δικαιολογήσω την απόφασή μου αυτή και χωρίς να επηρεασθεί καθόλου η περαιτέρω περίθαλψή μου.
3. Αντιλαμβάνομαι ότι πληροφορίες από το ιατρικό μου αρχείο μπορεί να χρησιμοποιηθούν υπό ανώνυμη μορφή σε δημοσιεύσεις στον ιατρικό τύπο και συγκατατίθεμαι σε αυτό.
4. Συμφωνώ να λάβω μέρος στην παραπάνω μελέτη.

Όνομα συμμετέχοντος

Ημερομηνία

Υπογραφή

Όνομα ερευνητή

Ημερομηνία

Υπογραφή

Έντυπο 4.

Αρχικά ονόμ.

Έντυπο εγγραφής ασθενούς

Τίτλος Μελέτης: **Μελέτη της in vitro κυτταρολυτικής δραστηριότητας των NK κυττάρων ασθενών πασχόντων από Μυελικές Κακοήθειες**

Βραχύς Τίτλος: **μελέτη NK-AZA**

Τμήμα : **Αιματολογικό Τμήμα - Β΄ Προπαιδευτική Παθολογική Κλινική Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο «ΑΤΤΙΚΟΝ»**

Επίθετο ασθενούς

Όνομα ασθενούς

Ημερομηνία γέννησης ασθενούς (_/_/___)

Κλινική όπου θεραπεύεται ο ασθενής

Όνομα του θεράποντος ιατρού

Διάγνωση ασθενούς

Ημερομηνία διάγνωσης(ημ/νία λήψης διαγνωστικού μυελού) (_/_/___)

Ηλικία κατά τη διάγνωση

Ανοσοφαινοτυπικά χαρακτηριστικά λευχαιμικών βλαστών _____

Κυτταρογενετικές ανωμαλίες _____

Ποσοστό βλαστών περιφερικού αίματος κατά τη συλλογή του δείγματος _____

Υπάρχει διαθέσιμο δείγμα κρυοκατεψυγμένων βλαστών του ασθενούς; _____

Πληροφορίες σχετικά με την μεταγενέστερη κλινική πορεία ασθενούς

Έντυπο 5.

Αρχικά ονόμ.

Έντυπο εγγραφής μάρτυρα

Τίτλος Μελέτης: **Μελέτη της in vitro κυτταρολυτικής δραστικότητας των NK κυττάρων ασθενών πασχόντων από Μυελικές Κακοήθειες**

Βραχύς Τίτλος: **Μελέτη NK-AZA**

Τμήμα : **Αιματολογικό Τμήμα - Β΄ Προπαιδευτική Παθολογική Κλινική Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο «ΑΤΤΙΚΟΝ»**

Επίθετο μάρτυρα

Όνομα μάρτυρα

Ημερομηνία γέννησης μάρτυρα

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1: Μονοκλωνικά αντισώματα, κλώνοι και φθορίζουσες ουσίες που χρησιμοποιήθηκαν στη μελέτη	σελ.41
Πίνακας 2: Συνδυασμοί μονοκλωνικών αντισωμάτων για τον προσδιορισμό των NK λεμφοκυττάρων, των NK CD56 ^{bright} , των CD4+ T-λεμφοκυττάρων, των Tregs και των MDSCs	σελ.74
Πίνακας 3: Τα χαρακτηριστικά των υπό μελέτη ασθενών που λάμβαναν θεραπεία με 5-Αζασυτιδίνη	σελ.88
Πίνακας 4: Αποτελέσματα μετρήσεων απόλυτου αριθμού NK-κυττάρων περιφερικού αίματος με τεχνική κυτταρομετρίας ροής, απόλυτου αριθμού PMNCs περιφερικού αίματος με τεχνική αιμοκυτταρομέτρου και απόλυτου αριθμού NK κυττάρων μετά απομόνωσή τους με τεχνική αρνητικού ανοσομαγνητικού κυτταρικού διαχωρισμού. Μετρήσεις της βιωσιμότητάς των PMNCs και των απομονωμένων NKcs με τεχνική Trypan blue.	σελ.91
Πίνακας 5 ^α : NK κυτταροτοξικότητα υγιών μαρτύρων έναντι των κυτταρικών σειρών K562 και Raji	σελ.93
Πίνακας 5β: NK κυτταροτοξικότητα ασθενών υπό θεραπεία με 5-Αζασυτιδίνη έναντι των κυτταρικών σειρών K562 και Raji	σελ.94
Πίνακας 6: Ανοσορρυθμιστικά κύτταρα περιφερικού αίματος υγιών μαρτύρων και ασθενών πριν την έναρξη οποιασδήποτε θεραπείας και ασθενών υπό θεραπεία με 5-Αζασυτιδίνη	σελ.101
Πίνακας 7: Σύγκριση της ποσοστιαίας κατανομής των υποπληθυσμών των ανοσορρυθμιστικών κυττάρων που μελετήθηκαν μεταξύ των ομάδων υγιών μαρτύρων και ασθενών	σελ.104
Πίνακας 8: Εκτίμηση της επίδρασης παραμέτρων στην ολική επιβίωση των ασθενών υπό θεραπεία με 5-Αζασυτιδίνη	σελ.107

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1: Ανοσοφαινοτυπική απεικόνιση των NK κυττάρων σε περιφερικό αίμα και προσδιορισμός του απολύτου αριθμού τους. Παρατίθενται δύο δείγματα από τους ασθενείς που ελέγχθηκαν (α,β)	σελ.45
Εικόνα 2α: Η διαβαθμισμένη επιφάνεια του αιμοκυτταρομέτρου. Μετρώνται τα κύτταρα που βρίσκονται στα διαβαθμισμένα πεδία A,B,C,D.	σελ.48
Εικόνα 2β: Τεχνική μέτρησης των κυττάρων στο οπτικό μικροσκόπιο με τη μέθοδο του αιμοκυτταρομέτρου	σελ.49
Εικόνα 3α,β: Ανοσοφαινοτυπική μέτρηση της NK-κυτταροτοξικότητας κατά τη συνεπώαση κυττάρων στόχων με NK-δραστικά κύτταρα	σελ.69
Εικόνα 4α,β: Ανοσοφαινοτυπική μέτρηση της αυτόματης λύσης των κυττάρων στόχων	σελ.70
Εικόνα 5α: Ανοσοφαινοτυπική μελέτη των πληθυσμών NK και NK-CD56 ^{bright} σε δείγμα περιφερικού αίματος υγιούς μάρτυρα.	σελ.76
Εικόνα 5β: Ανοσοφαινοτυπική μελέτη των πληθυσμών CD4 ⁺ T-λεμφοκυττάρων και των Tregs κυττάρων σε δείγμα περιφερικού αίματος υγιούς μάρτυρα.	σελ.77
Εικόνα 5γ: Ανοσοφαινοτυπική μελέτη του πληθυσμού των MDSCs κυττάρων σε δείγμα περιφερικού αίματος υγιούς μάρτυρα.	σελ.78
Εικόνα 6α: Ανοσοφαινοτυπική μελέτη των πληθυσμών NK και NK-CD56 ^{bright} κυττάρων σε δείγμα περιφερικού αίματος ασθενούς πριν τη χορήγηση 5-Αζασυτιδίνης.	σελ.79
Εικόνα 6β: Ανοσοφαινοτυπική μελέτη των πληθυσμών CD4 ⁺ T-λεμφοκυττάρων και των Tregs κυττάρων σε δείγμα περιφερικού αίματος ασθενούς πριν τη χορήγηση 5-Αζασυτιδίνης.	σελ.80
Εικόνα 6γ: Ανοσοφαινοτυπική μελέτη του πληθυσμού MDSCs κυττάρων σε δείγμα περιφερικού αίματος ασθενούς πριν τη χορήγηση 5-Αζασυτιδίνης.	σελ.81
Εικόνα 7α: Ανοσοφαινοτυπική μελέτη των πληθυσμών NK και NK-CD56 ^{bright} κυττάρων σε δείγμα περιφερικού αίματος ασθενούς μετά τη χορήγησης 5-Αζασυτιδίνης.	σελ.82
Εικόνα 7β: Ανοσοφαινοτυπική μελέτη των πληθυσμών CD4 ⁺ T-λεμφοκυττάρων και των Tregs κυττάρων σε δείγμα περιφερικού αίματος ασθενούς μετά τη χορήγησης 5-Αζασυτιδίνης.	σελ.83

Εικόνα 7γ: Ανοσοφαινοτυπική μελέτη του πληθυσμού MDSCs κυττάρων σε δείγμα περιφερικού αίματος ασθενούς μετά τη χορήγηση 5-Αζασυτιδίνης.	σελ.84
Εικόνα 8α,β: Ανοσοφαινοτυπική απεικόνιση μέτρησης NK-κυτταροτοξικότητας έναντι της κυτταρικής σειράς K562 σε δείγματα υγιών μαρτύρων (α) και ασθενών (β) με τις αντίστοιχες μετρήσεις της αυτόματης λύσης των κυττάρων στόχων	σελ.95
Εικόνα 8γ,δ:Ανοσοφαινοτυπική απεικόνιση μέτρησης NK-κυτταροτοξικότητας έναντι της κυτταρικής σειράς Raji σε δείγματα υγιών μαρτύρων (γ) και ασθενών (δ) με τις αντίστοιχες μετρήσεις της αυτόματης λύσης των κυττάρων στόχων	σελ.96

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΓΡΑΦΗΜΑΤΩΝ

Γράφημα 1: Ολική επιβίωση των ασθενών που λάμβαναν θεραπεία με 5-Αζασυτιδίνη. Διάμεση ολική επιβίωση: 30 μήνες.	σελ.89
Γράφημα 2: NK κυτταροτοξικότητα έναντι της κυτταρικής σειράς K562, υγιών μαρτύρων και ασθενών υπο θεραπεία με 5-Αζασυτιδίνη	σελ.98
Γράφημα 3: Ποσοστιαία κατανομή των υπο μελέτη υποπληθυσμών των ανοσορρυθμιστικών κυττάρων στο περιφερικό αίμα υγιών μαρτύρων, ασθενών πριν την έναρξη οποιασδήποτε θεραπείας και ασθενών υπο θεραπεία με 5-Αζασυτιδίνη.	σελ.102
Γράφημα 4: Η προβλεπτική αξία της NK-κυτταροτοξικής δραστηριότητας ως προς την μακρά διατήρηση της ανταπόκρισης στους ασθενείς με ΜΔΣ-ΟΜΛ(ολιγοβλαστική) που λαμβάνουν 5-Αζασυτιδίνη (ανάλυση ROC)	σελ.105
Γράφημα 5: Η προβλεπτική αξία της NK-κυτταροτοξικής δραστηριότητας ως προς την μακρά ολική επιβίωση (>2 ετών), στους ασθενείς που λαμβάνουν 5-Αζασυτιδίνη (ανάλυση ROC)	σελ.106
Γράφημα 6: Η Υψηλή NK-κυτταροτοξική δραστηριότητα (>20,85%) σχετίζεται με στατιστικά σημαντικά αυξημένη ολική επιβίωση	σελ.107

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΑΝΑΦΟΡΕΣ

1. Langemeijer S.M. et al. Acquired mutations in TET2 are common in myelodysplastic syndromes. *Nat. Genet.* 2009; 41 (7): 838–842
2. Bejar R. et al. Unraveling the molecular pathophysiology of myelodysplastic syndromes. *J. Clin. Oncol.* 2011; 29 (5): 504–515
3. Bejar R. et al. Clinical effect of point mutations in myelodysplastic syndromes. *N. Engl. J. Med.* 2011; 364 (26): 2496–2506
4. Papaemmanuil E. et al. Somatic SF3B1 mutation in myelodysplasia with ring sideroblasts, *N. Engl. J. Med.* 2011; 365 (15): 1384–1395
5. Visconteet V. et al. SF3B1, a splicing factor is frequently mutated in refractory anemia with ring sideroblasts. *Leukemia* 2012; 26 (3): 542–545
6. Yoshida K. et al, Frequent pathway mutations of splicing machinery in myelodysplasia. *Nature* 2011; 478 (7367): 64–69
7. Graubert T.A. et al. Recurrent mutations in the U2AF1 splicing factor in myelodysplastic syndromes. *Nat. Genet.* 2011; 44 (1): 53–57
8. Walter M.J. et al. Clonal architecture of secondary acute myeloid leukemia, *N. Engl. J. Med.* 2012; 366 (12): 1090–1098
9. Walter M.J. et al. Clonal diversity of recurrently mutated genes in myelodysplastic syndromes. *Leukemia* 2013; 27 (6): 1275–1282
10. Busque L. et al. Recurrent somatic TET2 mutations in normal elderly individuals with clonal hematopoiesis. *Nat. Genet.* 2012; 44 (11):1179–1181
11. Jaiswal S. et al. Age-related clonal hematopoiesis associated with adverse outcomes. *N. Engl. J. Med.* 2014; 371 (26): 2488–2498
12. Xie M. et al. Age-related mutations associated with clonal hematopoietic expansion and malignancies. *Nat. Med.* 2014; 20 (12): 1472–1478
13. Genovese G. et al. Clonal hematopoiesis and blood-cancer risk inferred from blood DNA sequence. *N. Engl. J. Med.* 2014; 371 (26): 2477–2487
14. Delhommeau F. et al. Mutation in TET2 in myeloid cancers. *N. Engl. J. Med.* 2009; 360 (22): 2289–2301
15. Gelsi-Boyeret V. et al. Mutations of polycomb-associated gene ASXL1 in myelodysplastic syndromes and chronic myelomonocytic leukaemia, *Br. J. Haematol.* 2009; 145 (6): 788–800
16. Leyet T.J. al. DNMT3A mutations in acute myeloid leukemia. *N. Engl. J. Med.* 2010; 363 (25): 2424–2433
17. Valent P. et al. Definitions and standards in the diagnosis and treatment of the myelodysplastic syndromes: Consensus statements and report from a working conference. *Leuk Res.* 2007 Jun; 31 (6): 727-36

18. Arber D.A. et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood*, 2016; 27(20): 2391-405
19. Greenberg P. et al, International scoring system for evaluating prognosis in myelodysplastic syndromes. *Blood*, 1997 ;89(6): 2079–88
20. Greenberg P. et al. Revised International Prognostic Scoring System for Myelodysplastic Syndromes. *Blood*, 2012; 120(12): 2456-65
21. Fenaux P. et al. Efficacy of azacitidine compared with that of conventional care regimens in the treatment of higher-risk myelodysplastic syndromes: a randomised, open-label, phase III study. *Lancet Oncol*. 2009; 10(3): 223-32
22. Fenaux P. et al. Azacitidine prolongs overall survival compared with conventional care regimens in elderly patients with low bone marrow blast count acute myeloid leukemia. *J Clin Oncol*. 2010; 28(4): 562-9
23. Sherif S. et al. Human natural killer cell development and biology. *Blood Reviews* 200; 20: 123–137
24. Freud A.G. et al. Human natural killer cell development. *Immunological Reviews* 2006; 214: 56–72
25. Megan A. et al, The biology of human natural killer-cell subsets. *Trends in Immunology*, 2001: 22 (11): 633-40
26. Wing Leung et al, Determinants of Antileukemia Effects of Allogeneic NK cells. *J. Immunol*. 2004; 172; 644-650
27. Yenani T. et al. Synergy among receptors on resting NK cells for the activation of natural cytotoxicity and cytokine secretion. *Blood*, 2006: 107(1): 159-66
28. Sabry M., Tsirogianni M., Leukemic Priming of Resting NK Cells Is Killer Ig-like Receptor Independent but Requires CD15-Mediated CD2 Ligation and Natural Cytotoxicity Receptors. *J Immunol*. 2011; 187(12): 6227-34
29. Tsirogianni M. et al. The Involvement of NCRs in the priming stage of NK cell activation by tumours. Abstract No 637, EHA 2011
30. Berg M. et al. Clinical Grade Ex Vivo-Expanded Human Natural Killer Cells Upregulate Activating Receptors and Death Receptor Ligands and Have Enhanced Cytolytic Activity against Tumor Cells. *Cytotherapy*, . 2009; 11(3): 341–355
31. Sutlu T., Alici E. Natural killer cell-based immunotherapy in cancer: current insights and future prospects. *J Intern Med*. 2009; 266: 154–181
32. Gleason. K.M., et al. CD16xCD33 bispecific killer cell engager (BiKE) activates NK cells against primary MDS and MDSC CD33⁺ targets. *Blood*, 2014; 123(19): 3016-26

33. Demanet C., et al. Down-regulation of HLA-A and HLA-Bw6, but not HLA-Bw4, allospecificities in leukemic cells: an escape mechanism from CTL and NK attack? *Blood*, 2004;103(8): 3122-3130
34. Siegler U. et al. Activated natural killer cells from patients with acute myeloid leukemia are cytotoxic against autologous leukemic blasts in NOD/SCID mice. *Leukemia*, 2005; 19: 2215–2222
35. Lowdell M.W., N Ray. The in vitro detection of anti-leukaemia-specific cytotoxicity after autologous bone marrow transplantation for acute leukaemia. *Bone Marrow Transplantation*, 1997; 19: 891–897
36. Mark W. Lowdell et al. Evidence that continued remission in patients treated for acute leukaemia is dependent upon autologous natural killer cells. *British Journal of Haematology*, 2002; 117: 821–827
37. Giovanni F. et al. Expansion of cytotoxic effectors with lytic activity against autologous blasts from acute myeloid leukaemia patients in complete haematological remission. *British Journal of Haematology*, 2002; 116: 299-307
38. Janet North et al. Tumor-Primed Human Natural Killer Cells Lyse NK-Resistant Tumor Targets: Evidence of a Two-Stage Process in Resting NK Cell Activation. *J. Immunol.* 2007; 178: 85-94
39. Sherif S. Farag et al. Natural killer cell receptors: new biology and insights into the graft-versus-leukemia effect. *Blood*. 2002; 100: 1935-1947
40. Caligiuri M.A. et al. Selective modulation of human natural killer cells in vivo after prolonged infusion of low dose recombinant interleukin. *J Clin Invest.* 1993; 91: 123–32.
41. Caligiuri, M.A. et al. Functional consequences of interleukin-2 receptor expression on resting human lymphocytes. Identification of a novel natural-killer-cell subset with high-affinity receptors. *J. Exp. Med.* 1990; 171: 1509–1526
42. Kottaridis P. et al. Two-Stage Priming of Allogeneic Natural Killer Cells for the Treatment of Patients with Acute Myeloid Leukemia: A Phase I Trial. *PLOS ONE*; June 10, 2015, DOI:10.1371/journal.pone.0123416
43. Serafini P. Myeloid derived suppressor cells in physiological and pathological conditions: the good, the bad, and the ugly. *Immunol Res.* 2013; 57: 172–184
44. Youn J.I. Subsets of myeloid-derived suppressor cells in tumor-bearing mice, *Immunology.* 2008; 181: 5791-802
45. Gabrilovich D.I. et al. Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system. *Nat Rev Immunol.* 2009; 9(3): 162–74

46. Elkabets M. et al. IL-1b regulates a novel myeloid-derived suppressor cell subset that impairs NK cell development and function. *Eur J Immunol.* 2010; 40(12): 3347–57
47. Kusmartsev S. et al. Reversal of myeloid cell-mediated immunosuppression in patients with metastatic renal cell carcinoma. *Clin Cancer Res.* 2008; 14(24): 8270–8
48. Rodriguez P.C. et al. Arginase I-producing myeloid-derived suppressor cells in renal cell carcinoma are a subpopulation of activated granulocytes. *Cancer Res.* 2009; 69(4): 1553–60.
49. Schmielau J., Finn O.J. Activated granulocytes and granulocyte derived hydrogen peroxide are the underlying mechanism of suppression of T-cell function in advanced cancer patients. *Cancer Res.* 2001; 61(12): 4756–60
50. Youn J.I. et al. Epigenetic silencing of retinoblastoma gene regulates pathologic differentiation of myeloid cells in cancer. *Nat. Immunol.* 2013. doi:10.1038/ni.2526
51. Eruslanov E. et al. Circulating and tumor-infiltrating myeloid cell subsets in patients with bladder cancer. *Int J Cancer,* 2012; 130(5): 1109–19
52. Raber P. et al. Metabolism of L-arginine by myeloid-derived suppressor cells in cancer: mechanisms of T cell suppression and therapeutic perspectives. *Immunol. Invest.* 2012; 41(6–7): 614–34
53. Rodriguez P.C. et al. L-arginine availability regulates T-lymphocyte cell-cycle progression. *Blood,* 2007; 109(4): 1568–73
54. Giallongo C. et al. Myeloid Derived Suppressor Cells (MDSCs) Are Increased and Exert Immunosuppressive Activity Together with Polymorphonuclear Leukocytes (PMNs) in Chronic Myeloid Leukemia Patients. *PLOS ONE,*2014: 9 (7), | e101848
55. Macphail S.E. et al. Nitric oxide regulation of human peripheral blood mononuclear cells: critical time dependence and selectivity for cytokine versus chemokine expression. *J Immunol.* 2003; 171(9): 4809–15
56. Mannick J.B. et al. Fas-induced caspase denitrosylation. *Science,* 1999; 284(5414): 651–4
57. Srivastava M.K. et al. Myeloid-derived suppressor cells inhibit T-cell activation by depleting cystine and cysteine. *Cancer Res.* 2010; 70(1): 68–77
58. Kittang A.O., Expansion of myeloid derived suppressor cells correlates with number of T regulatory cells and disease progression in myelodysplastic syndrome. *Oncolimmunology* 2016; 5:2, e1062208
59. Bensinger S. J. et al. Major histocompatibility complex class II-positive cortical epithelium mediates the selection of CD4(+)25(+) immunoregulatory T cells. *J. Exp. Med.* 2001; 194: 427– 438

60. Jordan M. S. et al. Thymic selection of CD4+CD25+ regulatory T cells induced by an agonist self-peptide. *Nat. Immunol.* 2001; 2: 301–306
61. Van Santen H. M. et al. Number of T reg cells that differentiate does not increase upon encounter of agonist ligand on thymic epithelial cells. *J. Exp. Med.* 2004; 200: 1221–1230
62. Kim J. M. et al. Regulatory T cells prevent catastrophic autoimmunity throughout the lifespan of mice. *Nat.Immunol.* 2007; 8: 191–197
63. Malek T. R. et al. CD4 regulatory T cells prevent lethal autoimmunity in IL-2R beta-deficient mice. Implications for the nonredundant function of IL-2. *Immunity.* 2002; 17: 167–178
64. Kordasti S., CD4+CD25high Foxp3+ regulatory T cells in myelodysplastic syndrome (MDS). *Blood,* 2007; 110(3): 847-850
65. Verhoef G.E. et al. Measurement of serum cytokine levels in patients with myelodysplastic syndromes. *Leukemia,* 1992; 6(12): 1268–72
66. Allampallam K. et al. Measurement of mRNA expression for a variety of cytokines and its receptors in bone marrows of patients with myelodysplastic syndromes. *Anticancer Res.* 1999; 19(6B): 5323–8
67. Molnar L. et al. Detection of TNFalpha expression in the bone marrow and determination of TNFalpha production of peripheral blood mononuclear cells in myelodysplastic syndrome. *Pathol. Oncol. Res.,* 2000; 6(1): 18–23
68. Kordasti S.Y. et al. IL-17-producing CD4(+) T cells, pro-inflammatory cytokines and apoptosis are increased in low risk myelodysplastic syndrome. *Br J Haematol.,* 2009; 145(1): 64–72
69. Calado R.T., Immunologic aspects of hypoplastic myelodysplastic syndrome, *Semin Oncol.* ,2011; 38(5): 667–72
70. Shao L.L. et a. Th22 cells as well as Th17 cells expand differentially in patients with early-stage and late-stage myelodysplastic syndrome. *PLoS One,* 2012; 7(12): e51339
71. Chen H.W. et al. Mesenchymal stem cells tune the development of monocyte-derived dendritic cells toward a myeloid-derived suppressive phenotype through growth-regulated oncogene chemokines. *J Immunol.* 2013; 190(10): 5065–77
72. Sternberg A. et al. Evidence for reduced B-cell progenitors in early (low-risk) myelodysplastic syndrome. *Blood,* 2005; 106(9): 2982–91
73. Chamuleau M.E. et al. Immune mediated autologous cytotoxicity against hematopoietic precursor cells in patients with myelodysplastic syndrome. *Haematologica,* 2009; 94(4): 496–506

74. Hejazi M. et al. Impaired cytotoxicity associated with defective natural killer cell differentiation in myelodysplastic syndromes. *Haematologica*, 2015; 100(5): 643–52
75. Epling-Burnette P.K. et al. Reduced natural killer (NK) function associated with high-risk myelodysplastic syndrome (MDS) and reduced expression of activating NK receptors. *Blood*, 2007;109: 4816-4824
76. Kiladjian J.J. et al. Defects of immune surveillance offer new insights into the pathophysiology and therapy of myelodysplastic syndromes. *Leukemia*, 2007; 21(11): 2237–9
77. Carlsten M. et al. Reduced DNAM-1 expression on bone marrow NK cells associated with impaired killing of CD34+ blasts in myelodysplastic syndrome. *Leukemia*, 2010; 24: 1607-1616
78. Mailloux A.W. et al. Effector memory regulatory T-cell expansion marks a pivotal point of immune escape in myelodysplastic syndromes. *Oncoimmunology*, 2013; 2(2): e22654
79. Jones P.A., Taylor S.M., Cellular differentiation, cytidine analogs and DNA methylation. *Cell*, 1980; 20(1): 85–93
80. Egger G. et al. Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy. *Nature*, 2004; 429(6990): 457–463
81. Issa J.P. et al. Azacitidine. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2005; 4 (4): 275–276
82. Gore S.D. et al. Decitabine. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2006; 5(11): 891–892
83. Jones P.A. et al. Targeting the cancer epigenome for therapy, *Nat. Rev. Genet.* 2016; 17(10): 630–641
84. Esteller M., Cancer epigenomics: DNA methylomes and histone-modification maps, *Nature Reviews Genetics*, 2007; 8(4): 286–298
85. Chiappinelli K.B. et al. Inhibiting DNA methylation causes an interferon response in cancer via dsRNA including endogenous retroviruses. *Cell*, 2015; 162(5): 974–986
86. Roulois D. et al. DNA-Demethylating agents target colorectal cancer cells by inducing viral mimicry by endogenous transcripts. *Cell*, 2015; 162 (5): 961–973
87. Almstedt M. et al. The DNA demethylating agent 5-aza-2'-deoxycytidine induces expression of NY-ESO-1 and other cancer/testis antigens in myeloid leukemia cells. *Leukemia Research*, 2010; 34(7): 899–905
88. Atanackovic D. et al. Cancer-testis antigen expression and its epigenetic modulation in acute myeloid leukemia. *American Journal of Hematology*, 2011; 86 (11): 918–922

89. Goodyear O. et al. Induction of a CD8+ T-cell response to the MAGE cancer testis antigen by combined treatment with azacitidine and sodium valproate in patients with acute myeloid leukemia and myelodysplasia. *Blood*, 2010; 116(11): 1908–1918
90. Silverman L.R. et al. Randomized controlled trial of azacitidine in patients with the myelodysplastic syndrome: a study of the cancer and leukemia group B. *J Clin Oncol*. 2002; 20: 2429–2440
91. Fenaux P. et al. Efficacy of azacitidine compared with that of conventional care regimens in the treatment of higher-risk myelodysplastic syndromes: a randomised, open-label, phase III study. *Lancet Oncol*. 2009; 10: 223–232
92. Issa J-P.J., Kantarjian H.M., Targeting DNA methylation. *Clin Cancer Res* 2009; 15: 3938–3946
93. Vanneman M., Dranoff G., Combining immunotherapy and targeted therapies in cancer treatment. *Nat Rev Cancer*, 2012; 12: 237–251
94. Fenaux P. et al. Azacitidine prolongs overall survival compared with conventional care regimens in elderly patients with low bone marrow blast count acute myeloid leukemia. *J. Clin. Oncol*. 2010; 28(4), 562–569
95. Dombret H. et al. International phase 3 study of azacitidine vs conventional care regimens in older patients with newly diagnosed AML with >30% blasts. *Blood*, 2015; 126(3): 291–299
96. Sylvain Th. et al. Azacitidine in untreated acute myeloid leukemia: A report on 149 patients. *American Journal of Hematology*, 2014; 89(4): 410-416
97. Metzeler K.H. et al. DNMT3A mutations and response to the hypomethylating agent decitabine in acute myeloid leukemia. *Leukemia*, 2012; 26: 1106–1107
98. Blum W. et al. Clinical response and miR-29b predictive significance in older AML patients treated with a 10-day schedule of decitabine. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010; 107: 7473–7478
99. Itzykson R. et al. Impact of TET2 mutations on response rate to azacitidine in myelodysplastic syndromes and low blast count acute myeloid leukemias. *Leukemia* 2011; 25: 1147–1152
100. Timothy J. Ley et al. DNMT3A Mutations in Acute Myeloid Leukemia, *N Engl J Med*. 2010; 363: 2424-2433
101. Hsin-An Hou et al. DNMT3A mutations in acute myeloid leukemia: stability during disease evolution and clinical implications. *Blood*, 2012; 119: 559-568
102. Ana Flávia Tibúrcio Ribeiro et al. Mutant DNMT3A: a marker of poor prognosis in acute myeloid leukemia. *Blood*, 2012; 119: 5824-5831

103. Santourlidis S., Crucial Role of DNA Methylation in Determination of Clonally Distributed Killer Cell Ig-like Receptor Expression Patterns in NK Cells. *Journal of Immunology* 2002; 169: 4253-4261
104. Schmiedel B.J. et al, Azacytidine impairs NK cell reactivity while decitabine augments NK cell responsiveness toward stimulation. *Int J Cancer*, 2011; 128: 2911–2922
105. Gao X. et al. Demethylating treatment suppresses natural killer cell cytolytic activity. *Mol Immunol.* 2009; 46: 2064–2070
106. Gang A.O., 5-Azacytidine treatment sensitizes tumor cells to T-cell mediated cytotoxicity and modulates NK cells in patients with myeloid malignancies. *Immunol.* 2002; 169: 4253-4261; doi:10.1038/bcj.2014.14
107. Thomas Stübiger et al. 5-Azacytidine Promotes an Inhibitory T-Cell Phenotype and Impairs Immune Mediated Antileukemic Activity. *Mediators of Inflammation*, 2014; Article ID 418292, <http://dx.doi.org/10.1155/2014/418292>
108. Benjamin D. Singer et al. Regulatory T Cell DNA Methyltransferase Inhibition Accelerates Resolution of Lung Inflammation. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 2015; 52(50): 641-652
109. Wu C. J. et al. The DNA Methylation Inhibitor 5-Azacytidine Increases Regulatory T Cells and Alleviates Airway Inflammation in Ovalbumin-Sensitized Mice. *Int Arch Allergy Immunol* 2013; 160: 356–364
110. Vardiman JW. Et al. The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. *Blood*. 2009; 114(5): 937-51
111. Bruce D. Cheson et al. Clinical application and proposal for modification of the International Working Group (IWG) response criteria in myelodysplasia. *Blood*, 2006; 108 (2): 419-425
112. Basha G et al. Comparative study of classical, colorimetric and immunologic staining methods for the assessment of tumor cell viability. *Tumor Biol.* 1996; 354-61.
113. Altman SA. et al. Comparison of trypan blue exclusion and fluorometric assays for mammalian cell viability determinations. *Biotechnol Prog.* 1993; 9(6): 671-4
114. Bronte V. et al. Recommendations for myeloid-derived suppressor cell nomenclature and characterization standards. *Nature Communications*, 2016;7, article num. 12150
115. Fazekas de St Groth B. et al. Flow cytometric detection of human regulatory T cells. *Methods Mol Biol.* 2011; 707: 263-79
116. Pulvertaft JV. Cytology of Burkitt's Tumour (African Lymphoma). *Lancet*, 1964: 238-240

117. Chen X. et al. Induction of myelodysplasia by myeloid-derived suppressor cells. *J Clin Invest.* 2013;123: 4595-611
118. Jiang H.J. et al. Increased circulating of myeloid-derived suppressor cells in myelodysplastic syndrome. *Chin Med. J.* 2013;126: 2582-2584
119. Chaudhary B. et al. Phenotypic alterations, clinical impact and therapeutic potential of regulatory T cells in cancer. *Expert Opin Biol Ther.* 2014;14: 931-45
120. Kordasti SY. et al. CD4 CD25^{high} Foxp3 regulatory T cells in myelodysplastic syndrome (MDS). *Blood*, 2007;110: 847-850
121. Costantini B. et al. The effects of 5-azacytidine on the function and number of regulatory T cells and T-effectors in myelodysplastic syndrome. *Haematologica*, 2013; 98(8): 1196-1205
120. Lal G. et al. Epigenetic regulation of Foxp3 expression in regulatory T cells by DNA methylation. *J Immunol.* 2009; 182: 259–273

Natural killer cell cytotoxicity is a predictor of outcome for patients with high risk myelodysplastic syndrome and oligoblastic acute myeloid leukemia treated with azacytidine

Maria Tsirogianni^a, Eirini Grigoriou^b, Violetta Kapsimalli^c, Kleopatra Dagla^d, Maria Stamouli^d, Konstantinos Gkirkas^d, Eve Konsta^d, Angeliki Karagiannidou^d, Konstantinos Gkodopoulos^d, Georgia Stavroulaki^d, Vassiliki Pappa^d, Maria Angelopoulou^e, Mark Lowdell^f and Panagiotis Tsirigotis^d

^aDepartment of Hematology and Bone Marrow Transplantation, Saint Savvas Regional Cancer Hospital, Athens, Greece; ^bDepartment of Immunology and Histocompatibility, "Evangelismos" General Hospital, Athens, Greece; ^cDepartment of Microbiology, Medical School, National and Kapodistrian University of Athens, Athens, Greece; ^dHematology Division, 2nd Department of Internal Medicine, "ATTIKO" General University Hospital, National and Kapodistrian University of Athens, Athens, Greece; ^eDepartment of Hematology and Bone Marrow Transplantation, Laikon General Hospital, National and Kapodistrian University of Athens, Athens, Greece; ^fInstitute of Immunity and Transplantation Centre for Cell, Gene & Tissue Therapeutics, Royal Free Hospital, London, UK

ABSTRACT

The aim of the present study was to identify biomarkers predictive of the outcome of patients with high-risk myelodysplastic syndrome and oligoblastic acute myeloid leukemia (AML) treated with 5-azacytidine (AZA). We prospectively examined the association between NK-cytotoxic activity, myeloid-derived suppressor cells (MDSCs), and T-regulatory cells (Tregs) on the overall survival (OS) of patients. Patients with NK-cytotoxicity above a critical threshold had a longer duration of response and survived longer than patients with severe impairment of NK-cytotoxicity. The numbers of MDSCs, and Tregs in the PB of patients after a short exposure to AZA were not different from normal donors. In conclusion, the results of our study suggest that the therapeutic activity of AZA is at least partly mediated by an immunomodulatory effect. To our knowledge, this is the first study reported so far, that shows a positive correlation between NK cytotoxicity and OS of AZA-treated patients.

ARTICLE HISTORY

Received 3 December 2018
Revised 27 January 2019
Accepted 3 February 2019

KEYWORDS

Natural killer cell;
NK-cytotoxicity; azacytidine;
myelodysplastic syndrome;
acute myeloid leukemia

Introduction


5-Azacytidine (AZA) is a cytosine analog with a potent DNA methyltransferase inhibition activity. Therapeutic administration of AZA (Vidaza, Celgene Corporation, Boudry, Switzerland) has been approved for patients with high-risk myelodysplastic syndrome (MDS), as well as for patients with acute myeloid leukemia (AML) not eligible for intensive chemotherapy [1,2]. Although the mechanism of action of AZA is probably due to its hypomethylating activity, it has been suggested that the therapeutic activity of AZA is at least partly explained by an immune-mediated effect. The speculation of an AZA immune effect comes from the observation that late responses can occur in a significant percentage of patients.

The effect of AZA on Natural Killer (NK) cell function has been the focus of previous studies. NK cells, treated *in vitro* with AZA, displayed reduced cytotoxic

activity that was mainly attributed to overexpression of inhibitory NK-receptors [3]. Although the impact of AZA on NK cell function has been studied in 'in vitro' studies, there is a paucity of published data regarding the 'in vivo' effect of treatment with AZA on NK cells.

NK cells are an important element of innate immunity with a significant contribution to immune surveillance against infectious agents and tumor cells. NK cytotoxic activity is regulated by the coordinated expression of a vast number of inhibitory and activation receptors. The therapeutic potential of NK cell has been mainly explored in the setting of allogeneic stem cell transplantation (allo-SCT) [4]. The NK cytotoxic activity against leukemic cells has been studied in the autologous setting. Leukemic cells were collected and cryopreserved from 25 patients with AML before induction chemotherapy. After the completion

CONTACT Panagiotis Tsirigotis  panagtsirigotis@gmail.com  Hematology Division, 2nd Department of Internal Medicine, ATTIKO General University Hospital, National and Kapodistrian University of Athens, Rimini-1, Haidari, Athens 12462, Greece

 Supplemental data for this article can be accessed [here](#).

© 2019 Informa UK Limited, trading as Taylor & Francis Group

of treatment, PB MNCs were collected from patients in remission and the NK-cytotoxic activity against autologous leukemic blasts was tested in an 'in vitro' assay. Patients who remained in remission for more than 2 years had significantly higher anti-leukemic NK-cytotoxicity in comparison with relapsed patients [5]. These data set up the rationale of an immune-patrolling effect against leukemia of autologous NK cells. To our knowledge, a similar study examining the predictive ability of NK cytotoxicity on the outcome of patients treated with AZA has not been published so far. In our study, we examined NK cytotoxic activity in a cohort of 18 patients with high-risk MDS or AML not eligible for intensive chemotherapy, treated with AZA.

Patients and methods

Patients

Eighteen patients with high-risk MDS (RAEB-II) and oligoblastic AML [20–30% bone marrow (BM) blasts], according to World Health Organization (WHO) criteria, were included in this study. Patients were not eligible for intensive induction chemotherapy due to age or presence of comorbidities. All patients were selected for treatment with AZA. Exclusion criteria were acute promyelocytic leukemia, simultaneous autoimmune disease, and acute or chronic hepatitis B or C virus infection. All patients were monitored prospectively for response to treatment and overall survival (OS).

NK-cytotoxicity against K562, Raji and the percentage of various immune subpopulations in the peripheral blood (PB) was measured after 3–6 cycles of AZA were administered. Fresh heparinized PB samples (50ml) were obtained from 10 normal healthy donors and from patients after written informed consent according to the declaration of Helsinki. The study protocol was reviewed and approved by the independent ethics committee and institutional review board of 'ATTIKO' hospital where the study was performed. The objective of our study was to identify biomarkers with the potential to predict outcome after treatment with AZA.

NK-cytotoxicity against K562 and Raji

The cytotoxic activity of purified NK-cells was tested *in vitro* against NK-sensitive (K562) and NK-resistant (Raji) human leukemic cell lines. PB mononuclear cells (PBMNCs) were isolated from venous blood by discontinuous density gradient separation (Lymphoprep). CD56⁺/CD3⁻ cells were purified from PBMNCs

performing negative immunomagnetic selection by using the BDTM IMag Human NK Cell Enrichment Set – DM (BD Biosciences, San Jose, CA, USA). The purity of NK-selected cells was approximately 90–95%. All NK isolated cells were resuspended in complete medium at a concentration of 1×10^6 /ml. Target cells in cytotoxicity assays were the K562 and Raji cell lines. Raji and K562 cells were grown in continuous cultures. Cell cultures were maintained in complete media consisting of RPMI 1640 supplemented with 10% FCS, penicillin (100IU), and streptomycin (100IU) (all supplied by Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), with a half medium change performed the day before assay was set up. Target cells were recovered from culture, washed in HBSS and then labeled by PKH67 green fluorescent cell membrane dye (Sigma-Aldrich, Burlington, MA, USA) according to the manufacturer's guidelines. Finally, the labeled target cells were washed twice in complete medium and resuspended in complete medium at 10^6 /ml. Ten thousand PKH-67 labeled target cells in 100µl of RPMI1640(10%FCS) were added to 500µl of effector cells (E:T ratio 1:5) in a final volume of 1ml by adding complete media. Cytotoxicity was measured in duplicate or triplicate samples using a 4-h cytotoxicity assay at 37 °C. Cell viability was determined by staining with 7-AAD. After the incubation period, the cells were resuspended in PBS solution (Invitrogen Life Technologies) and analyzed by flow cytometry. At least 10,000 events/target cells were acquired after electronic gating, and the mean proportion of 7-AAD positive cells from the duplicate or triplicate samples was determined. Background target cell death was determined from target cells incubated in the absence of effector cells. Cell-mediated cytotoxicity was reported as the percentage of killing over background cell death averaged from the two or three samples: specific lysis = mean percentage of cell lysis in test – mean percentage of spontaneous lysis [6].

Immune cell subsets

Quantitative estimation of various immune cell subsets in PB of patients and healthy donors was performed by flow cytometry. In more detail, the immune cell subsets examined were: T-cells (CD3⁺), NK cells (CD3⁻/CD16⁺/CD56⁺), NK-T cells (CD3⁺,CD56⁺), CD3⁺/CD4⁺ lymphocytes, T-regulatory (Tregs) cells (CD3⁺/CD4⁺/CD25⁺/CD127low/–), and myeloid-derived suppressor cells (MDSCs) cells (CD33⁺/CD11b⁺/CD14⁺/HLADRlow/–). The number of MDSCs was expressed as percentage among CD33⁺ PB monocytes [7], while the number of Tregs was expressed as percentage

among CD3⁺/CD4⁺ PB lymphocytes [8]. At least 100,000 events were acquired from each sample. All fluorochrome-conjugated mAbs were purchased from BD Immunocytometry Systems or Beckman Coulter.

Statistical analysis – Definitions

Prognostic risk stratification was performed by using the IPSS system [9]. Response to treatment was defined according to International Working Group (IWG) response criteria for MDS [10]. In more detail, patients with complete remission, partial remission, as well as those with stable disease but with haematological improvement were considered as responders to AZA. OS was defined as the time from start of treatment until death due to any cause or last follow up. Comparison between groups was performed by using Fisher's exact test for dichotomous or categorical variables and by using Mann–Whitney test for continuous variables. Receiver operating curve analysis was performed with the aim to determine the ability of various parameters for the prediction of 2-year survival by estimating the area-under-the-curve (AUC) values and selecting the maximal sum of sensitivity and specificity. Kaplan–Meier and log rank test were used for estimating the probability of overall survival. Statistical analyses were performed using Medcalc bvba (Ostend, Belgium) and R software (R Foundation, Vienna, Austria).

Results

Patients

Six female and 12 male patients with a median age of 70 years, (range, 60–86 years) were included in our

study. The diagnosis was high-risk MDS and oligoblastic AML in 10 and 8 patients respectively. Patient characteristics are presented in Table 1. The median time of follow up for all patients since the start of treatment with AZA was 25.5 months (range 7–53 months).

NK cytotoxicity

The median NK-cytotoxicity against K562 of patients and healthy volunteer donors was 21.8% (95% CI, 7.5–32.6) and 41.8% (95% CI, 11.4–56.1) respectively. NK-cytotoxicity of patients with MDS/AML was tested after previous exposure to AZA (median 4 cycles, range 3–6). Patients with MDS/AML had a significantly reduced NK-cytotoxicity against K562 as compared with NK cytotoxic activity of healthy volunteer donors ($p = .01$), (Figure 1; Supplementary Figure 2).

NK cytotoxic activity against Rajii of both patients and healthy donor volunteers was very low to absent (data not shown).

Immune cell subsets

The mean percentage of PB MDSCs (expressed as percentage of CD33⁺ PB monocytes) of patients and healthy donor volunteers was 0.76% (95% CI, 0.33–1.26) and 0.82% (95% CI, 0.30–1.3). There was no difference between MDSCs in the PB of patients and healthy volunteer donors. There was no difference in the number of T-cells, NK-cells, NK-T cells, and Tregs between patients and donors. The only difference was the significantly reduced percentage of CD4⁺/CD3⁺ observed in patients as compared with healthy donors. The cytotoxic activity of unpurified PB lymphocytes (including NK and various T-cell subsets) against K562 was not different between normal

Table 1. Patient's characteristics.

No	Age	Sex	Cytogenetics	WHO	IPSS	Response to AZA	Relapse (months)	Alive	Follow up
1	76	M	add18	RAEB-II	High	Yes (HI)	Yes (11)	No	16
2	70	M	–7	RAEB-II	High	Yes (HI)	Yes (13)	No	19
3	63	F	–17p	RAEB-II	High	Yes (PR)	Yes (20)	Yes	+26
4	86	M	normal	RAEB-II	Int-2	No	–	No	26
5	61	M	normal	AML	High	Yes (HI)	Yes (12)	No	15
6	81	F	–5	RAEB-II	Int-2	Yes (CR)	No (+53)	Yes	+53
7	75	M	normal	AML	High	Yes (CR)	No (+28)	Yes	+28
8	71	M	–5	RAEB-II	Int-2	No	–	Yes	+28
9	78	F	–11q	RAEB-II	Int-2	Yes (CR)	No (+26)	Yes	+26
10	75	M	normal	AML	High	Yes (PR)	Yes (24)	Yes	+29
11	59	M	+8	AML	High	No	–	No	12
12	67	M	complex	RAEB-II	High	Yes (PR)	Yes (21)	Yes	+25
13	70	F	normal	RAEB-II	Int-2	No	–	No	9
14	76	F	normal	AML	High	No	–	No	8
15	70	F	normal	AML	High	Yes (HI)	Yes (16)	Yes	+18
16	68	M	complex	AML	High	No	–	No	7
17	69	M	normal	RAEB-II	Int-2	Yes (PR)	Yes (30)	Yes	+35
18	71	M	normal	AML	High	Yes (CR)	Yes (26)	No	30

CR: complete remission, PR: partial remission, HI: hematological improvement.

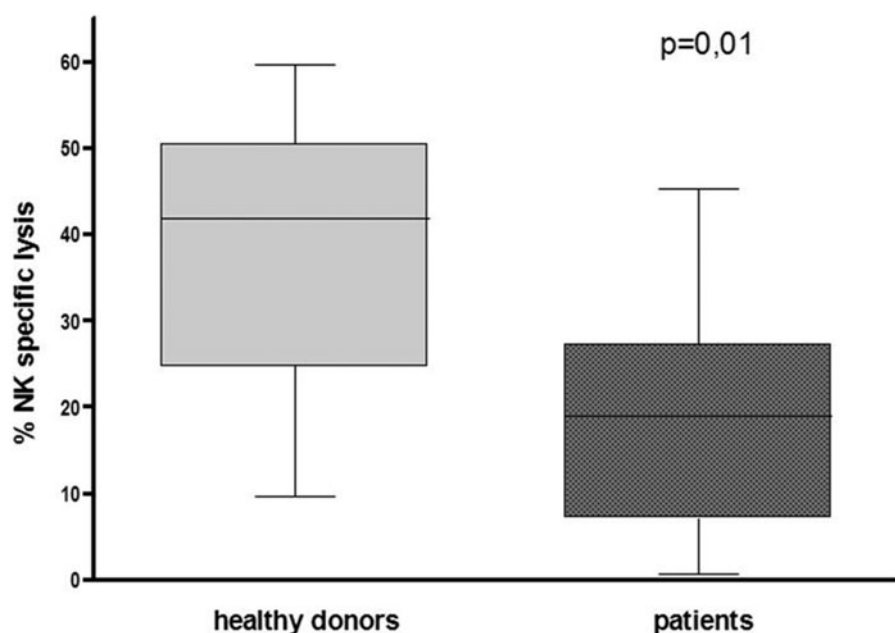


Figure 1. NK-cytotoxicity against K562 of patients and normal donors.

Table 2. Percentages of immune cell subsets in peripheral blood from healthy donors and patients.

	Healthy donors			Patients			<i>p</i> value
	Mean %	±95% CI of mean	Range	Mean %	±95% CI of mean	Range	
CD3 ⁺ lymphocytes	61%	53–69%	47–79%	54%	44–62%	19–74%	.31
NK cells (CD3 ⁻ /CD16 ⁺ /CD56 ⁺)	15%	7.6–22%	6–36%	19%	14–24%	51–33%	.25
NKT cells (CD3 ⁺ /CD56 ⁺)	10%	2.4–18%	1–27%	14%	5.2–23%	1.5–50%	.72
CD3 ⁺ /CD4 ⁺ lymphocytes	40%	31–50%	13–53%	29%	24–34%	12–48%	.02
TRegs (CD3 ⁺ /CD4 ⁺ /CD25 ⁺ /CD127 ^{low/-})	1.3%	0.008–2.6%	0.2–51%	0.79%	0.43–1.2%	0.1–2.5%	.92
MDSCs (CD33 ⁺ /CD11b ⁺ /CD14 ⁺ /HLADR ^{low/-})	0.82%	0.3–1.3%	0.27–2.2%	0.76%	0.33–1.2%	0.09–3.5%	.55

NK: Natural Killer cells; NKT: Natural Killer T-cells; TRegs: T-Regulatory cells; MDSCs: Myeloid Derived Suppressor Cells.

donors and patients (data not shown) The numbers of various immune cells subsets are presented in Table 2.

NK cytotoxicity is predictor of duration of response and OS

The ability of various parameters, including the PB percentage of immune cell subsets such as MDSCs and Tregs, as well as of NK cytotoxic activity, to predict the duration of response and survival at 2 years after AZA was examined by using ROC analysis.

NK cytotoxic activity was the only predictor of a long duration of response (>12 months) to AZA (AUC = 0.850, 95% CI, 0.605–0.969, *p* = .0002). NK-cytotoxicity above 20.4% was estimated as the best cut off with sensitivity 80% and specificity 86% in predicting long duration of response. NK cytotoxic activity was the only predictor of long OS (>2 years) for patients treated with AZA (AUC = 0.875, 95% CI, 0.635–0.979, *p* < .0001). NK-cytotoxicity above 20.4% was estimated as the best cut off with sensitivity 80% and specificity 87% in predicting long OS (Figure 2(a)). In more detail,

NK-cytotoxicity of long term survivors (OS >2 years) was 45.3%, 39.9%, 39.6%, 32%, 29.2%, 25.5%, 23.9%, 22.8%, 16.9%, and 11% respectively. NK-cytotoxicity of eight patients who survived less than 2 years was 34.2%, 20.1%, 15.3%, 8.1%, 6.1%, 6%, 2.9%, and 0.6% respectively (Figure 2(b)).

In multivariate analysis, age, sex, and disease risk according to IPSS were not associated with OS. NK-cytotoxicity above the critical threshold (>20.4%) was the only parameter statistically associated with significantly improved OS after treatment with AZA (HR = 0.08, 95% CI, 0.01–0.67, *p* = .019) (Table 3; Figure 3).

Discussion

In our study, we prospectively examined the association of several parameters, including NK-cytotoxic activity and various subsets of immune-regulatory cells present in PB of patients after 3–6 cycles of treatment with AZA, with OS. The aim of our study was to find biomarkers with a predictive ability on the outcome of AZA-treated patients with high-risk MDS and

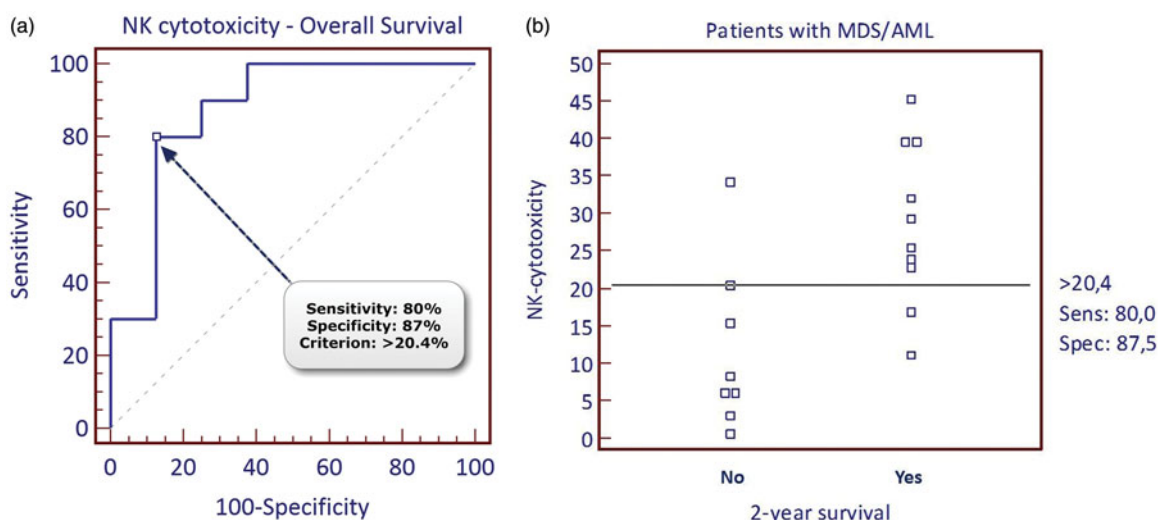


Figure 2. (a) Receiving operating curve analysis: NK cytotoxicity is predictor of long overall survival (>2 years). (b) Interactive dot diagram: NK-cytotoxicity of patients in relation to outcome after treatment with azacytidine.

Table 3. Parameters associated with overall survival.

Variable	Hazard Ratio	95% CI	p value
age, years (above vs. below the median)	0.61	0.13–2.94	n.s
Sex (male vs. female)	1.04	0.20–5.35	n.s
IPSS risk (inter 2 vs. high)	1.49	0.23–9.49	n.s
NK-cytotoxicity (above a critical threshold vs. severe impairment)	0.08	0.01–0.67	.019

oligoblastic AML. We observed that the NK-cytotoxicity of patients was decreased in comparison with healthy volunteers. This finding is in accordance with data reported in previous trials.

The percentage and the absolute number of NK cells are slightly lower in MDS patients when compared with healthy donor volunteers. However severe NK cell deficiency is mostly observed in the subgroup of patients with high-risk MDS and/or with increased blast percentage [11]. NK cells from patients with high-risk MDS are functionally defective with severely reduced cytotoxic activity and cytokine production. The functional defects observed in MDS patients have been at least partly explained by the decreased expression of NK activating receptors. Kiladjian et al. [12] studied the NK cell function in patients with MDS and observed diminished NK cytotoxicity against K562 targets, as well as decreased IFN-gamma and TNF- α production after stimulation with interleukin-2 (IL-2). Epling-Burnette et al. [13] showed that reduced NK-cytotoxicity is correlated with decreased expression of the NK activating receptors NKp30 and NKG2D. In another study performed by Carlsten et al. impaired NK activity against K562 targets was attributed to reduced expression of DNAM-1 and NKG2D on the surface of BM NK cells [14].

The exact pathogenetic mechanisms leading to NK hypo-responsiveness in patients with high-risk MDS

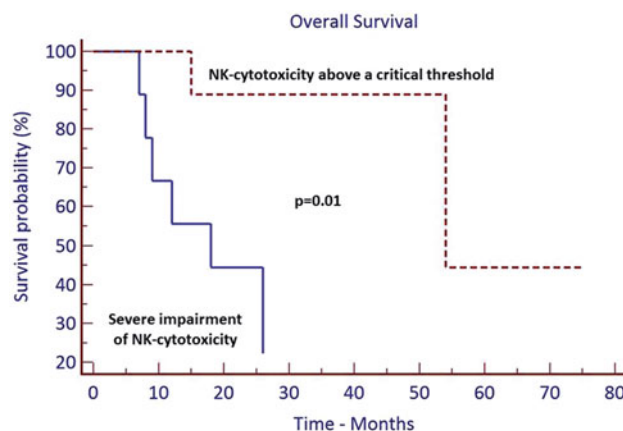


Figure 3. NK-cytotoxicity is associated with overall survival after treatment with AZA.

and AML remain unknown. However, a contributory role of immune-regulatory cells has been suggested. MDSCs are a heterogeneous population of cells with immunoregulatory capacity derived from myeloid progenitors. Under normal circumstances, MDSCs accumulate in inflamed tissues and help in the prevention of excessive tissue damage due to immune system hyperactivation. *In vitro* studies have shown that MDSCs suppress both the proliferation of and cytokine production by effector T cells, B cells and NK cells. The expansion of MDSC is regulated by inflammatory cytokines produced by immune effectors present in the

inflamed microenvironment. Importantly, tumor cells take advantage of the same mechanism in order to escape from immune surveillance, and increased PB circulating MDSCs have been observed in patients with solid tumors [15]. The role of MDSCs in the immune surveillance against haematological malignancies is a matter of ongoing research. An elegant study performed by Chen et al. [16] showed an increased percentage of MDSCs present in the BM of patients with MDS as compared with healthy donors, while other studies have shown that the percentage of MDSCs is increased in the PB of patients with MDS. Moreover, Gleason et al. [17] showed that there is a negative correlation between MDSCs and NK cell CD16 surface expression suggestive of an immunosuppressive effect of MDSCs on NK activity. Jiang et al. observed significantly increased number of PB MDSCs in a cohort of 35 patients with MDS in comparison with healthy donors. The increased number of MDSCs was more prominent in patients with high-risk disease. Interestingly patients who responded to treatment with decitabine had a significant decrease in PB MDSCs while increased MDSCs were observed in non-responding patients [18].

T-regulatory cells (Tregs) are a subset of immune-regulatory cells present in healthy individuals and constitutively express the transcription factor forkhead box P3 (FOXP3). Tregs are antigen-specific and help in the prevention of autoimmunity as well as in prevention of solid organ rejection and graft versus host disease. Increased numbers of Tregs have been observed in the PB and tumor microenvironment and have been associated with tumor progression and shortened OS [19]. Previous studies showed the presence of increased number of CD4 Tregs in the PB of 52 patients with MDS. A significant positive correlation between Tregs, high-risk MDS and disease progression was observed [20].

We estimated the percentages and the absolute numbers of MDSCs, and Tregs in the PB of patients after previous exposure to AZA. There was no difference in the numbers of immune-regulatory cells between patients and healthy donors. Although we cannot support that AZA results in normalization of immune-regulators because we do not have pretreatment samples for direct comparison, it is highly possible that treatment with AZA has a positive effect in restoring the immune-dysregulation observed in patients with MDS.

The main finding of our study was the predictive ability of NK-cytotoxicity after a short exposure to AZA on the final outcome of treated patients. The results

from our study are in accordance with those from the study by Lowdell et al. [5] in patients with AML after the completion of treatment. This finding is very interesting and it postulates that immune surveillance plays a significant role in controlling the malignant clone. Moreover, it can serve as a biomarker for selection of patients who may have a significant benefit after prolonged treatment with AZA. The major limitation of our study is the small number of patients included. The predictive ability of NK-cytotoxicity on outcome after treatment with AZA should be tested in a larger cohort of patients.

In conclusion, NK-cytotoxicity in patients treated with AZA is predictive of OS. Patients with NK-cytotoxicity above a critical threshold have a better prognosis than patients with severe impairment of NK-cytotoxicity. The numbers of various immune-regulators in the PB of patients after a short exposure to AZA were not different from normal donors. To our knowledge, this is the first study reported so far, that shows a positive correlation between NK cytotoxicity and outcome of AZA-treated patients with high-risk MDS and AML.

Acknowledgments

The authors wish to thank all patients and the nursing staff of ATTIKO General University Hospital.

Potential conflict of interest: Disclosure forms provided by the authors are available with the full text of this article online at <https://doi.org/10.1080/10428194.2019.1581935>.

Funding

This study was partly funded by Janssen Hellas. The authors have no other relevant affiliations or financial involvement with any organization or entity with a financial interest in or financial conflict with the subject matter or materials discussed in the manuscript apart from those disclosed.

References

- [1] Fenaux P, Mufti GJ, Hellstrom-Lindberg E, et al. Efficacy of azacitidine compared with that of conventional care regimens in the treatment of higher-risk myelodysplastic syndromes: a randomised, open-label, phase III study. *Lancet Oncol.* 2009;10:223–232.
- [2] Fenaux P, Mufti GJ, Hellstrom-Lindberg E, et al. Azacitidine prolongs overall survival compared with conventional care regimens in elderly patients with low bone marrow blast count acute myeloid leukemia. *J Clin Oncol.* 2010;28:562–569.

- [3] Gao X, Lin J, Wang L, et al. Demethylating treatment suppresses natural killer cell cytolytic activity. *Mol Immunol.* 2009;46:2064–2070.
- [4] Tsirigotis P, Resnick IB, Shapira MY. The role of natural killer cells in hematopoietic stem cell transplantation. *Ann Med.* 2012;44:130–145.
- [5] Lowdell MW, Craston R, Samuel D, et al. Evidence that continued remission in patients treated for acute leukaemia is dependent upon autologous natural killer cells. *Br J Haematol.* 2002;117:821–827.
- [6] Tsirigotis P, Resnick IB, Kapsimali V, et al. Irradiated mononuclear cells express significant in vitro cytotoxic activity: promise for in vivo clinical efficacy of irradiated mismatched donor lymphocytes infusion. *Immunotherapy.* 2014;6:409–417.
- [7] Bronte V, Brandau S, Chen SH, et al. Recommendations for myeloid-derived suppressor cell nomenclature and characterization standards. *Nat Commun.* 2016;7:12150.
- [8] Fazekas de St Groth B, Zhu E, et al. Flow cytometric detection of human regulatory T cells. *Methods Mol Biol.* 2011;707:263–279.
- [9] Greenberg P, Cox C, LeBeau MM, et al. International scoring system for evaluating prognosis in myelodysplastic syndromes. *Blood.* 1997;89:2079–2088.
- [10] Cheson B, Greenberg PL, Bennett JM, et al. Clinical application and proposal for modification of the International Working Group (IWG) response criteria in myelodysplasia. *Blood.* 2006;108:419–425.
- [11] Hejazi M, Manser AR, Fröbel J, et al. Impaired cytotoxicity associated with defective natural killer cell differentiation in myelodysplastic syndromes. *Haematologica.* 2015;100:643–652.
- [12] Kiladjian JJ, Bourgeois E, Lobe I, et al. Cytolytic function and survival of natural killer cells are severely altered in myelodysplastic syndromes. *Leukemia.* 2006;20:463–470.
- [13] Epling-Burnette PK, Bai F, Painter JS, et al. Reduced natural killer (NK) function associated with high-risk myelodysplastic syndrome (MDS) and reduced expression of activating NK receptors. *Blood.* 2007;109:4816–4824.
- [14] Carlsten M, Baumann BC, Simonsson M, et al. Reduced DNAM-1 expression on bone marrow NK cells associated with impaired killing of CD341 blasts in myelodysplastic syndrome. *Leukemia.* 2010;24:1607–1616.
- [15] Almand B, Clark JI, Nikitina E, et al. Increased production of immature myeloid cells in cancer patients: a mechanism of immunosuppression in cancer. *J Immunol.* 2001;166:678–689.
- [16] Chen X, Eksioglu EA, Zhou J, et al. Induction of myelodysplasia by myeloid-derived suppressor cells. *J Clin Invest.* 2013;123:4595–4611.
- [17] Gleason MK, Ross JA, Warlick ED, et al. CD16xCD33 bispecific killer cell engager (BiKE) activates NK cells against primary MDS and MDSC CD33+ targets. *Blood.* 2014;123:3016–3026.
- [18] Jiang HJ, Fu R, Wang HG, et al. Increased circulating of myeloid-derived suppressor cells in myelodysplastic syndrome. *Chin Med J.* 2013;126:2582–2584.
- [19] Chaudhary B, Abd Al Samid M, al-Ramadi BK, et al. Phenotypic alterations, clinical impact and therapeutic potential of regulatory T cells in cancer. *Expert Opin Biol Ther.* 2014;14:931–945.
- [20] Kordasti SY, Ingram W, Hayden J, et al. CD4+CD25high Foxp3+ regulatory T cells in myelodysplastic syndrome (MDS). *Blood.* 2007;110:847–850.