



**Αιματολογικό Τμήμα**

**Α Προπαιδευτικής Παθολογικής Κλινικής Ιατρικής Σχολής**

**Εθνικού και Καποδιστριακού**

**Πανεπιστημίου Αθηνών**

**«Ο Ρόλος του Μικροπεριβάλλοντος του Μυελού των  
Οστών στα Μυελουπερπλαστικά Σύνδρομα»**

**Ιωάννα-Διονυσία Τριανταφυλλοπούλου**

**Ειδικός Αιματολόγος**

Διδακτορική Διατριβή

Αθήνα 2018



**«Ο ΡΟΛΟΣ ΤΟΥ ΜΙΚΡΟΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ ΤΟΥ  
ΜΥΕΛΟΥ ΤΩΝ ΟΣΤΩΝ ΣΤΑ  
ΜΥΕΛΟΥΠΕΡΙΠΛΑΣΤΙΚΑ ΣΥΝΔΡΟΜΑ»**





**Τριμελής επιτροπή:**

*Μαρία-Χριστίνα Κυρτσώνη*

**Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Αιματολογίας, Α'ΠΠΚ-ΕΚΠΑ  
(επιβλέπουσα)**

*Παναγιώτης Παναγιωτίδης*

**Καθηγητής Αιματολογίας, Α'ΠΠΚ-ΕΚΠΑ**

*Μαρία Αγγελοπούλου*

**Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Αιματολογίας**





## Περιεχόμενα

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ .....	9
ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ .....	13
Α.ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ .....	29
Κεφάλαιο 1 Αληθής Πολυκυτταραιμία.....	31
1.1.Εισαγωγή- Ιστορική Αναδρομή.....	31
1.2.Κλινικές Εκδηλώσεις Αληθούς Πολυκυτταραιμίας .....	32
1.4. Διαγνωστικά Κριτήρια.....	34
1.5.Εργαστηριακά ευρήματα .....	35
1.6. Μελέτη Μυελού των Οστών –Καρυοτυπος - Μοριακή Μελέτη.....	36
1.7.JAK 2 Κιναση.....	36
1.8. Καλρετικουλινη (CALR).....	37
1.9. Θεραπευτική αντιμετώπιση ασθενών με ΑΠ.....	38
Κεφάλαιο 2 Ιδιοπαθής Θρομβοκυττάρωση.....	39
2.1. Εισαγωγή .....	39
2.2. Επιδημιολογία.....	39
2.3.Αιτιολογία.....	39
2.4.Κλινικά ευρήματα-Επιπλοκές.....	41
2.5. Θεραπευτική αντιμετώπιση ασθενών με ΙΘ .....	42
Κεφάλαιο 3 Ιδιοπαθής Μυελοίνωση.....	43
3.1.Εισαγωγή .....	43
3.2.Επιδημιολογία.....	43
3.3. Μοριακή Παθογένεση.....	43
3.4. Κλινικά Ευρήματα .....	44
3.5.Εργαστηριακά ευρήματα .....	46



3.6.Κυτταρογενετικά και μοριακά ευρήματα .....	48
3.7.Διαγνωστικ κριτήρια μυελοίνωσης.....	48
3.8. Θεραπευτική αντιμετώπιση ασθενών με ΜΙ.....	51
Κεφάλαιο 4 Το μικροπεριβάλλον του μυελού των οστών .....	55
4.1.Εισαγωγή .....	55
4.2.Τα οστικά κύτταρα.....	56
4.3. Κυτταροκίνες .....	59
4.4. Ίνωση στα ΜΥΣ.....	61
4.5. Ο Ρόλος του TGF-β στην Ίνωση του Μυελού των Οστών στα ΜΥΣ, Ρh-.....	63
4.6. Οστεοπροτεγερίνη .....	65
4.7.Ιντερλευκίνη 8.....	67
4.8. Κυτταροκίνες και ανάπτυξη του μυελουπερπλαστικού κλώνου .....	68
Β ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ .....	71
Κεφάλαιο 5 Ανάλυση διδακτορικής διατριβής .....	73
5.1 Σκοπός.....	73
5.2. Μέθοδοι .....	73
5.3. Ασθενείς.....	74
5.4. Ερωτήματα.....	76
5.5. Αποτελέσματα.....	76
5.6. Συμπεράσματα .....	94
ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΠΕΡΙΛΗΨΗ .....	103
ΑΓΓΛΙΚΗ ΠΕΡΙΛΗΨΗ .....	105
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ .....	107
ΣΧΕΤΙΚΗ ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΗ .....	119



## Περιεχόμενα γραφημάτων

Γράφημα 1. «Επιβίωση ως προς την ένταση της χρώσης της οστεοπροτεγερίνης (OPG) στα μεγακαρυοκύτταρα».....	77
Γράφημα 2. «Ένταση της χρώσης της οστεοπροτεγερίνης (OPG) στα μεγακαρυοκύτταρα ως προς τον καρυότυπο».....	78
Γράφημα 3. «Ένταση της χρώσης της οστεοπροτεγερίνης (OPG) στην κοκκιώδη σειρά ως προς την αιμοσφαιρίνη (HB) ».....	79
Γράφημα 4 . «Ένταση της χρώσης της οστεοπροτεγερίνης (OPG) της κοκκιώδους σειράς ως προς την παρουσία λεμφαδενοπάθειας».....	79
Γράφημα 5. «Ένταση IL-8 ως προς τα λευκά αιμοσφαίρια (WBC) ».....	80
Γράφημα 6. «Ένταση IL-8 ως προς τα ουδετερόφιλα».....	80
Γράφημα 7. «Θετικότητα της χρώσης της ιντερλευκίνης IL8 ως προς τον αιματοκρίτη (Ht) ».....	81
Γράφημα 8. «Θετικότητα της χρώσης της ιντερλευκίνης IL8 ως προς την αιμοσφαιρίνη (HB) ».....	81
Γράφημα 9. «Ένταση της IL-8 ως προς τον Ht».....	82
Γράφημα 10. «Θετικότητα της ιντερλευκίνης IL-8 ως προς την παρουσία σπληνομεγαλίας».....	83
Γράφημα 11. «Θετικότητα της ιντερλευκίνης IL8 ως προς την αιμοσφαιρίνη HB».....	83
Γράφημα 12. «Θετικότητα της ιντερλευκίνης IL8 και συχνότητα σπληνομεγαλίας».....	84
Γράφημα 13. «Ένταση IL8 ως προς τα ουδετερόφιλα».....	85
Γράφημα 14. «Ένταση της χρώσης της οστεοπροτεγερίνης (OPG) ΜΓΚ ως προς τον αιματοκρίτη».....	86
Γράφημα 15 « Ένταση της χρώσης της (OPG) ΜΓΚ ως προς την αιμοσφαιρίνη »...	86
Γράφημα 16. «Συσχέτιση Ht ως προς την ένταση της οστεοπροτεγερίνης (OPG) στην κοκκιώδη σειρά».....	87
Γράφημα 17. « Συσχέτιση Hb ως προς την ένταση της (OPG) στην κοκκιώδη σειρά».....	87
Γράφημα 18. «Συσχέτιση Ht ως προς την θετικότητα της IL8».....	88





Γράφημα 19. «Συσχέτιση Hb ως προς την ένταση θετικότητας της IL8».....	88
Γράφημα 20. «Συσχέτιση των λευκών αιμοσφαιρίων (WBC) ως προς την ένταση της IL8 ».....	89
Γράφημα 21. «Επιβίωση ως προς την ένταση της (OPG) στα ΜΓΚ».....	90
Γράφημα 22. «Ένταση της χρώσης της ( OPG) ΜΓΚ ως προς JAK 2».....	90
Γράφημα 23. « Συσχέτιση επιβίωσης ως προς IL8 (2 ομάδες ασθενών)».....	91
Γράφημα 24. « Συσχέτιση επιβίωσης ως προς IL8 (3 ομάδες ασθενών)».....	91
Γράφημα 25. « Συσχέτιση έντασης IL8 ως προς τιμή WBC>10.000μL » .....	92
Γράφημα 26. « Θετικότητα IL8 ποσοστοθετικών μεγακαρυοκυττάρων και βαθμός ίνωσης μυελού».....	93
Γράφημα 27. « Συσχέτιση υψηλής έντασης της (OPG) ως προς την επιβίωση».....	98
Γράφημα 28. « Συσχέτιση της (OPG) στα ΜΓΚ ως προς τον καρυότυπο».....	99
Γράφημα 29. « Συσχέτιση χαμηλής έκφρασης της (OPG) στα ΜΓΚ και πτωχή πρόγνωση».....	100



## ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θεωρώ υποχρέωσή μου να ευχαριστήσω θερμά την καθηγήτρια Αιματολογίας κ. Χριστίνα Κυρτσώνη, επιβλέπουσα καθηγήτρια της Διατριβής μου, για την ανάθεση του θέματος Διατριβής, για τις χρήσιμες συμβουλές της, την συνεχή εποπτεία και για την άριστη συνεργασία καθ' όλη την διάρκεια αυτού του επίπνου εγχειρήματος.

Όλα τα μέλη του παθολογοανατομικού εργαστηρίου για την σημαντική τους συνδρομή και την καθηγήτρια Παθολογοανατομίας κ. Πηνελόπη Κορκολοπούλου για την συμβολή της στην διεκπεραίωση της ανοσοιστοχημείας και για την πολύτιμη βοήθειά της.

Την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Αιματολογίας κ. Μαρία Αγγελοπούλου για την βοήθειά της.

Τον συνάδελφό μου ιατρό Αιματολόγο και διδάκτορα της Ιατρικής κ. Δημήτρη Μαλτέζα για την βοήθειά του στην στατιστική ανάλυση δεδομένων, την βοήθειά του σε οποιοδήποτε ζήτημα προέκυπτε και την συνεχή υποστήριξή του. Η άψογη συνεργασία μας είναι απόρροια φιλίας πολλών χρόνων, από τα χρόνια της ειδικότητας στο Νοσοκομείο Μεταξά.

Την αγαπημένη συνάδελφο και φίλη Μαρία Κωτσοπούλου για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε από την αρχή της γνωριμίας μας στο Νοσοκομείο Μεταξά και την έμπρακτη βοήθειά της για την ολοκλήρωση αυτού του πονήματος.

Κλείνοντας, θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένειά μου.

Ευχαριστώ τους γονείς μου, Σωτήρη Τριανταφυλλόπουλο και Ελευθερία Τριανταφυλλοπούλου, ιατρούς, που μου έμαθαν να στηρίζομαι στον εαυτό μου και που με ενθάρρυναν καθ' όλη την διάρκεια της συγγραφής αυτού του πονήματος.

Ευχαριστώ τον σύζυγό μου Ιωάννη Γκίκα και τον γιό μου Γιώργο, για την ατελείωτη ψυχραιμία τους και την αμέριστη συμπαράσταση που μου έδωσαν όλα αυτά τα χρόνια.

Τέλος ευχαριστώ θερμά, την αδελφή μου Πέννυ Τριανταφυλλοπούλου, Ιατρό, για την αγάπη της και την έμπρακτη βοήθειά της και τον ανιψιό μου Γιώργο Καρατζά για την βοήθεια που τόσο απλόχερα μου προσέφερε όποτε του την ζήτησα.





## ΟΡΚΟΣ

ΟΜΝΥΜΙ ΑΠΟΛΛΩΝΑ ΙΗΤΡΟΝ ΚΑΙ ΑΣΚΛΗΠΙΟΝ ΚΑΙ ΥΓΕΙΑΝ  
ΚΑΙ ΠΑΝΑΚΕΙΑΝ ΚΑΙ ΘΕΟΥΣ ΠΑΝΤΑΣ ΤΕ ΚΑΙ ΠΑΣΑΣ, ΙΣΤΟΡΑΣ  
ΠΟΙΕΥΜΕΝΟΣ, ΕΠΙΤΕΛΕΑ ΠΟΙΗΣΕΙΝ ΚΑΤΑ ΔΥΝΑΜΙΝ ΚΑΙ ΚΡΙΣΙΝ  
ΕΜΗΝ ΟΡΚΟΝ ΤΟΝΔΕ ΚΑΙ ΣΥΓΓΡΑΦΗΝ ΤΗΝΔΕ ἩΓΗΣΕΣΘΑΙ  
ΜΕΝ ΤΟΝ ΔΙΔΑΣΚΑΝΤΑ ΜΕ ΤΗΝ ΤΕΧΝΗΝ ΤΑΥΤΗΝ ΙΣΑ ΓΕΝΕΤΗ;  
ΣΙΝ ΕΜΟΙΣΙ ΚΑΙ ΒΙΟΥ ΚΟΙΝΩΣΕΣΘΑΙ ΚΑΙ ΧΡΕΩΝ ΧΡΗΖΟΝΤΙ  
ΜΕΤΑΔΟΣΙΝ ΠΟΙΗΣΕΣΘΑΙ ΚΑΙ ΤΕΝΟΣ ΤΟ ΕΞ ΕΩΥΤΟΥ ΑΔΕΛ-  
ΦΟΙΣ ΙΣΟΝ ΕΠΙΚΡΙΝΕΕΙΝ ἈΡΡΕΣΙ ΚΑΙ ΔΙΔΑΣΕΙΝ ΤΗΝ ΤΕΧΝΗΝ  
ΤΑΥΤΗΝ, ΗΝ ΧΡΗΖΩΣΙ ΜΑΝΘΑΝΕΙΝ, ΑΝΕΥ ΜΙΣΘΟΥ ΚΑΙ ΣΥΓ-  
ΓΡΑΦΗΣ, ΠΑΡΑΓΓΕΛΙΗΣ ΤΕ ΚΑΙ ΑΚΡΟΗΣΙΟΣ ΚΑΙ ΤΗΣ ΛΟΙΠΗΣ  
ΑΡΑΣΗΣ ΜΑΘΗΣΙΟΣ ΜΕΤΑΔΟΣΙΝ ΠΟΙΗΣΕΣΘΑΙ ΥΙΟΙΣΙ ΤΕ ΕΜΟΙΣ  
ΚΑΙ ΤΟΙΣ ΤΟΥ ΕΜΕ ΔΙΔΑΣΚΑΝΤΟΣ ΚΑΙ ΜΑΘΗΤΗΣΙ ΣΥΓΓΕΓΡΑΜ-  
ΜΕΝΟΙΣΙ ΤΕ ΚΑΙ ὈΡΚΙΣΜΕΝΟΙΣ ΝΟΜΩ, ΙΗΤΡΙΚΩ, ἈΛΛΩ ΔΕ ΟΥΔΕΝΙ.  
ΔΙΑΙΤΗΜΑΣΙ ΤΕ ΧΡΗΣΟΜΑΙ ΕΠ' ὄφελειν, ΚΑΜΝΟΝΤΩΝ ΚΑΤΑ  
ΔΥΝΑΜΙΝ ΚΑΙ ΚΡΙΣΙΝ ΕΜΗΝ. ΕΠΙ ΔΗΛΗΣΕΙ ΔΕ ΚΑΙ ΑΔΙΚΗΝ, ΕΙΡΞΕΙΝ,  
ΟΥ ΔΩΣΩ ΔΕ ΟΥΔΕ ΦΑΡΜΑΚΟΝ ΟΥΔΕΝΙ ΑΙΤΗΘΕΙΣ ΘΑΝΑΣΙ-  
ΜΟΝ ΟΥΔΕ ΥΠΗΓΗΣΟΜΑΙ ΣΥΜΒΟΥΛΙΗΝ ΤΟΙΗΝΔΕ ὍΜΟΙΩΣ ΔΕ  
ΟΥΔΕ ΓΥΝΑΙΚΙ ΠΡΕΣΣΟΝ ΦΘΟΡΙΟΝ ΔΩΣΩ. ἈΓΝΩΣ ΔΕ ΚΑΙ ΟΣΙΩΣ  
ΔΙΑΤΗΡΗΣΩ ΒΙΟΝ ΤΟΝ ΕΜΟΝ ΚΑΙ ΤΕΧΝΗΝ ΤΗΝ ΕΜΗΝ. ΟΥ ΤΕΜΕΩ  
ΔΕ ΟΥΔΕ ΜΗΝ ΛΙΘΙΩΝΤΑΣ, ΕΚΧΩΡΗΣΩ ΔΕ ΕΡΓΑΤΗΣΙΝ ἈΝΔΡΑΣΙ  
ΠΡΗΒΙΟΣ ΤΗΣΔΕ. ΕΞ ΟΙΚΙΑΣ ΔΕ ΟΚΟΣΑΣ ἈΝ ΕΞΙΩ, ΕΞΕΛΕΥΣΟΜΑΙ  
ΕΠ' ὄφελειν, ΚΑΜΝΟΝΤΩΝ, ΕΚΤΟΣ ΕΩΝ ΠΑΣΗΣ ΑΔΙΚΗΣ ΕΚΟΥΣΙ-  
ΗΣ ΚΑΙ ΦΘΟΡΙΗΣ ΤΗΣ ΤΕ ἈΛΛΗΣ ΚΑΙ ΑΦΡΟΔΙΣΙΩΝ ΕΡΓΩΝ ΕΠΙ  
ΤΕ ΓΥΝΑΙΚΕΙΩΝ ΣΩΜΑΤΩΝ ΚΑΙ ἈΝΔΡΩΩΝ ΕΛΕΥΘΕΡΩΝ ΤΕ ΚΑΙ  
ΔΟΥΛΩΝ, Ἀ ΔΕ ΑΙΙ ΕΝ ΘΕΡΑΠΕΙΑ, Η ΙΔΩ Η ΑΚΟΥΣΩ, Η ΚΑΙ ΑΝΕΥ  
ΘΕΡΑΠΕΙΑΣ ΚΑΤΑ ΒΙΟΝ ἈΝΘΡΩΠΩΝ, Ἀ ΜΗ ΧΡΗ ΠΟΤΕ ΕΚΚΑ-  
ΛΕΙΣΘΑΙ ΕΞΩ, ΣΙΓΗΣΟΜΑΙ, ἈΡΡΗΤΑ ΗΓΕΥΜΕΝΟΣ ΕΙΝΑΙ ΤΑ ΤΟΙ-  
ΑΥΤΑ. ΟΡΚΟΝ ΜΕΝ ΟΥΝ ΜΟΙ ΤΟΝΔΕ ΕΠΙΤΕΛΕΑ ΠΟΙΕΟΝΤΙ, ΚΑΙ  
ΜΗ ΣΥΓΧΕΟΝΤΙ, ΕΙΗ ΕΠΑΥΡΑΣΘΑΙ ΚΑΙ ΒΙΟΥ ΚΑΙ ΤΕΧΝΗΣ ΔΟΞΑ-  
ΖΟΜΕΝΩ, ΠΑΡΑ ΠΑΣΙΝ ἈΝΘΡΩΠΟΙΣ ΕΙΣ ΤΟΝ ΑΙΕΙ ΧΡΟΝΟΝ Ὅ  
ΠΑΡΑΒΑΙΝΟΝΤΙ ΔΕ ΚΑΙ ΕΠΙΟΡΚΟΥΝΤΙ, ΤΑΝΑΝΤΙΑ ΤΟΥΤΕΩΝ



## ΟΡΚΟΣ

ΟΡΚΙΖΟΜΑΙ ΕΙΣ ΤΟΝ ΑΠΟΛΛΩΝΑ ΤΟΝ ΙΑΤΡΟΝ ΚΑΙ ΕΙΣ ΤΟΝ ΑΣΚΛΗΠΙΟΝ ΚΑΙ ΕΙΣ ΤΗΝ ΥΓΕΙΑΝ ΚΑΙ ΕΙΣ ΤΗΝ ΠΑΝΑΚΕΙΑΝ ΚΑΙ ΕΙΣ ΟΛΟΥΣ ΤΟΥΣ ΘΕΟΥΣ ΚΑΙ ΕΙΣ ΟΛΑΣ ΤΑΣ ΘΕΑΣ. ΕΠΙΚΑΛΟΥΜΕΝΟΣ ΑΥΤΟΥΣ ΩΣ ΜΑΡΤΥΡΑΣ ΟΤΙ ΘΑ ΤΗΡΗΣ ΚΑΤΑ ΔΥΝΑΜΙΝ ΚΑΙ ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΚΡΙΣΙΝ ΜΟΥ ΑΥΤΟΝ ΕΔΩ ΤΟΝ ΟΡΚΟΝ ΚΑΙ ΑΥΤΗΝ ΕΔΩ ΤΗΝ ΕΓΓΡΑΦΟΝ ΣΥΜΦΩΝΙΑΝ. ΘΑ ΘΕΩΡΩ ΜΕΝ ΕΚΕΙΝΟΝ. Ο ΟΠΟΙΟΣ ΜΕ ΕΔΙΔΑΞΕ ΤΗΝ ΤΕΧΝΗΝ ΑΥΤΗΝ. ΙΣΘΝ ΠΡΟΣ ΤΟΥΣ ΓΟΝΕΙΣ ΜΟΥ ΚΑΙ ΘΑ ΤΟΝ. ΚΑΜΩ ΚΟΙΝΩΝΟΝ ΤΟΥ ΒΙΟΥ ΜΟΥ ΚΑΙ ΘΑ ΤΟΝ ΒΟΗΘΩ ΟΤΑΝ ΕΥΡΙΣΚΕΤΑΙ ΕΙΣ ΟΙΚΟΝΟΜΙΚΗΝ ΑΝΑΓΚΗΝ. ΚΑΙ ΘΑ ΘΕΩΡΩ ΤΟΥΣ ΑΠΟΓΟΝΟΥΣ ΤΟΥ ΩΣ ΑΔΕΛΦΟΥΣ ΜΟΥ ΚΑΙ ΘΑ ΤΟΥΣ ΔΙΔΑΣΚΩ ΤΗΝ ΤΕΧΝΗΝ ΑΥΤΗΝ. ΕΑΝ ΘΕΛΟΥΝ ΝΑ ΤΗΝ ΜΑΘΟΥΝ. ΧΩΡΙΣ ΑΜΟΙΒΗΝ ΚΑΙ ΕΓΓΡΑΦΟΝ ΣΥΜΦΩΝΙΑΝ. ΘΑ ΠΑΡΕΧΩ ΔΕ ΣΥΜΒΟΥΛΑΣ. ΕΙΔΙΚΑ ΠΡΟΦΟΡΙΚΑ ΜΑΘΗΜΑΤΑ ΚΑΙ ΟΛΑΣ ΤΑΣ ΥΠΟΛΟΙΠΟΥΣ ΓΝΩΣΕΙΣ ΤΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΚΑΙ ΕΙΣ ΤΑ ΠΑΙΔΙΑ ΜΟΥ ΚΑΙ ΕΙΣ ΤΑ ΠΑΙΔΙΑ ΤΟΥ ΔΙΔΑΣΚΑΛΟΥ ΜΟΥ ΚΑΙ ΕΙΣ ΤΟΥΣ ΜΑΘΗΤΑΣ. ΟΙ ΟΠΟΙΟΙ ΚΑΙ ΕΓΓΕΓΡΑΜΜΕΝΟΙ ΕΙΝΑΙ ΚΑΙ ΕΧΟΥΝ ΔΩΣΕΙ ΟΡΚΟΝ ΣΥΜΦΩΝΩΣ ΠΡΟΣ ΤΟΝ ΙΑΤΡΙΚΟΝ ΝΟΜΟΝ. ΕΙΣ ΚΑΝΕΝΑ ΔΕ ΑΛΛΟΝ.

ΘΑ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΩ ΔΕ ΤΗΝ ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΗΝ ΑΓΩΓΗΝ ΠΡΟΣ ΩΦΕΛΕΙΑΝ ΤΩΝ ΑΣΘΕΝΩΝ ΚΑΤΑ ΔΥΝΑΜΙΝ ΚΑΙ ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΚΡΙΣΙΝ ΜΟΥ. ΘΑ ΠΡΟΛΑΜΒΑΝΩ ΔΕ ΒΛΑΒΗΝ ΥΓΕΙΑΣ ΚΑΙ ΑΔΙΚΙΑΝ. ΔΕΝ ΘΑ ΔΩΣΩ ΔΕ ΦΑΡΜΑΚΟΝ ΘΑΝΑΤΗΦΟΡΟΝ ΕΙΣ ΚΑΝΕΝΑ. ΟΥΤΕ ΚΑΙ ΕΑΝ ΜΟΥ ΖΗΤΗΘΗ. ΚΑΙ ΟΥΤΕ ΘΑ ΔΩΣΩ ΤΟΙΑΥΤΗΝ ΣΥΜΒΟΥΛΗΝ ΩΣΑΥΤΩΣ ΟΥΤΕ ΕΙΣ ΕΓΚΥΟΝ ΓΥΝΑΙΚΑ ΘΑ ΔΩΣΩ ΕΚ ΤΡΩΤΙΚΟΝ ΦΑΡΜΑΚΟΝ. ΘΑ ΔΙΑΤΗΡΩ ΔΕ ΤΟΝ ΒΙΟΝ ΜΟΥ ΚΑΙ ΤΗΝ ΤΕΧΝΗΝ ΜΟΥ ΚΑΤΑ ΤΡΟΠΟΝ ΑΓΝΟΝ ΚΑΙ ΣΥΜΦΩΝΟΝ ΠΡΟΣ ΤΟΝ ΘΕΙΟΝ ΝΟΜΟΝ. ΑΚΟΜΗ ΔΕ ΔΕΝ ΘΑ ΧΕΙΡΟΥΡΓΩ ΟΥΤΕ ΚΑΙ ΤΟΥΣ ΠΑΣΧΟΝΤΑΣ ΑΠΟ ΛΙΘΙΑΣΙΝ. ΑΛΛΑ ΘΑ ΤΟΥΣ ΠΑΡΑΠΕΜΠΩ ΕΙΣ ΑΝΔΡΑΣ ΧΕΙΡΟΥΡΓΟΥΣ. ΕΙΔΙΚΟΥΣ ΔΙΑ ΤΟ ΕΡΓΟΝ ΤΟΥΤΟ. ΕΙΣ ΟΣΑΣ ΔΕ ΟΙΚΙΑΣ ΜΕΤΑΒΑΙΝΩ, ΘΑ ΕΙΣΕΡΧΟΜΑΙ ΠΡΟΣ ΒΟΗΘΕΙΑΝ ΤΩΝ ΑΣΘΕΝΩΝ. ΑΠΕΧΩΝ ΠΑΙΣΗΣ ΕΚΟΥΣΙΑΣ ΑΔΙΚΙΑΣ ΚΑΙ ΑΛΛΗΣ ΔΙΑΦΘΟΡΑΣ ΚΑΙ ΣΑΡΚΙΚΩΝ ΣΧΕΣΕΩΝ ΜΕΤΑ ΓΥΝΑΙΚΩΝ Η ΑΝΔΡΩΝ ΕΛΕΥΘΕΡΩΝ ΚΑΙ ΔΟΥΛΩΝ.

ΟΣΑ ΔΕ ΙΔΩ Η ΑΚΟΥΣΩ ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΘΕΡΑΠΕΙΑΝ Η ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΕΠΙΚΟΙΝΩΝΙΑΝ ΜΟΥ ΜΕΤΑ ΤΩΝ ΑΛΛΩΝ ΑΝΘΡΩΠΩΝ ΕΙΣ ΤΗΝ ΚΑΘΗΜΕΡΙΝΗΝ ΤΟΥΣ ΖΩΗΝ. ΤΑ ΟΠΟΙΑ ΔΕΝ ΠΡΕΠΕΙ ΠΟΤΕ ΝΑ ΑΝΑΚΟΙΝΩΘΟΥΝ ΕΙΣ ΤΟΥΣ ΑΛΛΟΥΣ. ΘΑ ΚΡΑΤΩ ΜΥΣΤΙΚΑ ΠΙΣΤΕΥΩΝ ΟΤΙ ΤΑ ΤΟΙΑΥΤΑ ΕΙΝΑΙ ΑΠΟΡΡΗΤΑ. ΕΦ' ΟΣΟΝ ΜΕΝ ΛΟΙΠΟΝ ΤΗΡΩ ΑΥΤΟΝ ΕΔΩ ΤΟΝ ΟΡΚΟΝ ΚΑΙ ΔΕΝ ΤΟΝ ΠΑΡΑΒΑΙΝΩ. ΕΙΘΕ ΝΑ ΑΠΟΛΑΥΩ ΚΑΙ ΤΗΣ ΖΩΗΣ ΚΑΙ ΤΗΣ ΤΕΧΝΗΣ. ΕΚΤΙΜΩΜΕΝΟΣ ΕΞΑΕΙ ΑΠΟ ΟΛΟΥΣ ΤΟΥΣ ΑΝΘΡΩΠΟΥΣ. ΕΑΝ ΟΜΩΣ ΠΑΡΑΒΩ ΑΥΤΟΝ ΚΑΙ ΓΙΝΩ. ΕΠΙΟΡΚΟΣ. ΝΑ ΠΑΘΩ ΤΑ ΑΝΤΙΘΕΤΑ ΤΟΥΤΩΝ.



## ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

<b>Όνομα:</b>	<b>Ιωάννα-Διονυσία</b>
<b>Εθνικότητα:</b>	<b>Τριανταφυλλοπούλου</b> <b>Ελληνική</b>
<b>Τόπος Γέννησης:</b>	<b>Πάτρα Αχαΐας</b>
<b>Ημερομηνία Γέννησης:</b>	<b>4 Αυγούστου 1976</b>
<b>Οικογενειακή Κατάσταση:</b>	<b>Έγγαμη</b>
<b>Διεύθυνση Κατοικίας:</b>	<b>33,Rookery Close, PR7</b> <b>2JY,Chorley, Lancashire</b>
<b>E mail:</b>	<b><a href="mailto:diana3gi@yahoo.gr">diana3gi@yahoo.gr</a></b>



## **ΤΙΤΛΟΣ-ΠΑΡΟΥΣΑ ΑΠΑΣΧΟΛΗΣΗ:**

- Αιματολόγος στο Royal Blackburn Hospital από τις 25.11.2013, ειδική στις Αιμοσφαιρινοπάθειες.
- Υπεύθυνη Ενδορραχιαίων Εγχύσεων χημειοθεραπευτικών φαρμάκων του τμήματος της Χημειοθεραπείας στο Royal Blackburn Hospital.
- Επικεφαλής της Επιτροπής Φλεβοθρόμβωσης του Royal Blackburn Hospital.
- Μέλος του Ιατρικού Διεπιστημονικού Συμβουλίου Αιματολογίας στο Royal Blackburn Hospital.
- Μέλος του Network Site Specific Group-Haematology (NSSG).
- Μέλος του Βασιλικού Κολλεγίου Παθολογίας ( Royal College of Pathologists).
- Εκπαιδεύτρια Ιατρών (Medical Educator), από τις 13.7.2015.
- Designated Medical Practitioner (DMP) mentor.

## **ΣΠΟΥΔΕΣ-ΤΙΤΛΟΙ:**

<b>24/3/2011</b>	Απόκτηση τίτλου ειδικότητας Αιματολογίας
<b>15/2/2012-</b>	Διδακτορική Διατριβή στο Πανεπιστήμιο Αθηνών σε εξέλιξη με θέμα «Ο ρόλος του μικροπεριβάλλοντος του μυελού των οστών στα μυελουπερπλαστικά σύνδρομα»
<b>21/9/1995-12/6/2001,</b> <b>Πανεπιστήμιο Καρόλου, Πράγας, 2<sup>η</sup></b> <b>Ιατρική Σχολή</b>	Πτυχίο Ιατρικής με βαθμό «Λίαν Καλώς»
<b>5/7/2002</b>	Αναγνώριση πτυχίου από το ΔΙΚΑΤΣΑ



## **ΠΡΟΥΠΗΡΕΣΙΑ**

<b>25/11/2013-</b>	Αιματολόγος στο Royal Blackburn Hospital
<b>12/2012-6/2013</b>	Επικουρική Αιματολόγος στο ΕΑΝΠ Μεταξά
<b>31/5/2011-1/6/2012</b>	Αιματολόγος στο νοσοκομείο Υγεία
<b>10/5/2006-22/11/2010</b>	Ειδικευόμενη Αιματολογίας στο ΕΑΝΠ Μεταξά. Επιμέρους εκπαίδευση στην Μονάδα Μεταμόσχευσης Μυελού Οστών του νοσοκομείου Παιδών ‘‘Η Αγ. Σοφία’’ (6 μήνες), Μονάδα Αιμορραγικών Διαθέσεων Νοσ. Παιδών «Αγ. Σοφία» (3 μήνες), Αιμοδοσία ΕΑΝΠ «ΜΕΤΑΞΑ» (6 μήνες).
<b>1/7/2004-31/3/2006</b>	Ειδικευόμενη Παθολογίας στο Γενικό Νοσοκομείο Αργοστολίου
<b>4/12/2002-5/12/2003</b>	Αγροτικός Ιατρός στο Κέντρο Υγείας Κατω Αχαΐας





## **ΠΡΟΣΘΕΤΗ ΕΜΠΕΙΡΙΑ**

**2013-2015**

Ερευνήτρια στο πρωτόκολλο Myeloma XI “Randomised comparisons, in myeloma patients of all ages, of thalidomide, lenalidomide, carfilzomib and bortezomib induction combinations, and of lenalidomide and combination lenalidomide vorinostat as maintainance”, under Professor GJ Morgan, Chief Investigator, The Royal Marsden NHS Foundation Trust

**2014-2015**

Διδασκαλία στο μάθημα της Αιματολογίας σε φοιτητές της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου του Μάντσεστερ.

**2012-2013**

Ερευνήτρια στην μελέτη PROLONG “Phase III trial in Relapsed CLL of a monoclonal antibody Ofatumumab maintainance therapy to delay progression Versus Observation”

## **ΓΛΩΣΣΕΣ**

**Αγγλικά**

Κάτοχος διπλώματος Proficiency in English, University of Cambridge, 1991

**Γαλλικά**

Κάτοχος διπλώματος Diplome d’etudes francaises 2e degre, 1992

Κάτοχος διπλώματος Certificat pratique de Langue Francaise, 1er degre

**Ιταλικά**

Κάτοχος διπλώματος Diploma di Lingua Italiana 2003



## **ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΟ ΕΡΓΟ:**

### **ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ ΣΕ ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΑ ΠΕΡΙΟΔΙΚΑ:**

#### **An unusual case of vomiting caused by Myeloid Sarcoma**

*Vivek Chand Goodoory, Diana Triantafyllopoulou, Ioannis Gkikas, Fouad Alani, Ayub Ali Bin, Stuart Mellor, Jagdish Adiyodi, Neil Sahasrabudhe, Matthew Saxton and Hazel Cowburn, Reports 2019,2,2;doi:103390/reports2010002*

#### **Bone marrow osteoprotegerin (OPG) and innterlekin-8 (IL-8) immunostaining in patients with Ph-negative myeloproliferative neoplasms (MPN):Clonical correlations**

*Diana Triantafyllopoulou, Dimitrios Maltezas, Eleni-Andrianna Trigka, Tatiana Tzenou, Theodoros Iliakis, Maria Dimou, Aspasia Koudouna, Kallirroï Spanou, Panagiota Dailiani, Efstratios Patsouris, Maria K. Angelopoulou, Maria Kotsopoulou, Panayotis Panayotidis, Penelope Korkolopoulou and Marie-Christine Kyrtsonis, Merit Research Journal of Medicine and Medical Sciences, Vol. 6(12), December 2018*

#### **Acute pancreatitis as a complication of sickle cell anaemia**

*Parisa L. Moori, Alexios Dosis, Zoheb Ahmad, Ambareen Kausar and Diana Triantafyllopoulou, Reports 2018, 1(3),19.*

#### **Pseudomonas Aeruginosa Bacteraemia in Patients with Hematologic Malignancies: Risk Factors, Treatment and Outcome.**

*Polydoros Tofas , Michael Samarkos , Evangelia-Theophano Piperaki , Christos Kosmidis , Ioanna-Dionysia Triantafyllopoulou , Maria Kotsopoulou , Aggeliki Pantazatou , Stavroula Perlorentzou , Anastasia Poulli , Maria Vagia , George L Daikos , , Diagn Microbiol Infect Dis 88 (4), 335-341*

#### **Non secretory Multiple Myeloma Presenting as an Intestinal Tumor**

*Diana Triantafyllopoulou, Stuart Mellor, Catherine Cargo, Ioannis Gkikas, Jagdish Adiyodi, Ayub Ali Bin, Neil Sahasrabudhe, and Margaret Rokicka, Case Reports in Hematology, Volume 2015 (2015), Article ID 818715, 5 pages*



**An Imatinib-treated FIP1L1-PDGFR $\alpha$  chronic eosinophilic leukemia transforming to erythroid blast crisis: a case report.**

*Papanikolaou X, Kotsopoulou M, Triantafyllopoulou ID, Zoi A, Chatziantoniou V, Maltezas D, MitsouliMentzof, Annals of hematology 91(5):7857*



## ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΙΣ ΣΕ ΔΙΕΘΝΗ ΣΥΝΕΔΡΙΑ

### **EHA 2016**

**Osteoprotegerin (OPG) and interleukin-8 (IL-8) immunostaining in bone marrow biopsies of patients with PH-negative myeloproliferative disorders (MPD) at diagnosis: Clinical correlations**

*Diana Triantafyllopoulou, Dimitrios Maltezas, Eleni-Adriana Trigka, Tatiana Tzenou, Theodoros Iliakis, Maria Dimou, Panagiota Petsa, Kallirroï Spanou, Panagiota Ntailiani, Efstratios Patsouris, Penelope Korkolopoulou, Panayotis Panayotidis, Marie-Christine Kyrtsolis*

### **EHA 2012**

**Treatment with bortezomib based regimens improves overall response and predicts for survival in patients with primary or secondary plasma cell leukemia: analysis of the greek myeloma study group**

*Eirini Katodritou, Evangelos Terpos, Charikleia Kelaidi, Maria Kotsopoulou, Diana Triantafyllopoulou, Sossana Delimpasi, Marie Christine Kyrtsolis, Eirini Rissaki, Argiris Symeonidis, Vassiliki Lambropoulou, Nikos Giannakoulas, Aikaterini Stefanoudaki, Fani Kalala, Nikos Spyridis, Evgenia Verrou, Vassiliki Gastari, Christina Hadjiaggelidou, Evlambia Giannopoulou, Kostas Zervas, Meletios Dimopoulos*

### **Σεπτέμβριος 2010**

**Primary bone lymphoma: results of combination treatment**

*D. Maltezas, M. Kotsopoulou, ID. Triantafyllopoulou, V. Chatziantoniou, M Dadakaridou, M. Stamouli, K Megalakaki, P. Repousis, C. Mitsouli-Mentzikof*  
*8th Congress of B.U.ON, Sibiu, Romania*

### **Σεπτέμβριος 2010**

**Impact of multi-drug resistant bacteria sepsis in clinical outcome of haematological patients.**



*C. Megalakaki, S. Perlorentzou, A. Tsatsani, M Plega, D.I. Triantafyllopoulou, V. Chatziantoniou, M. Dadakaridou, P. Repousis, V. Papaemanouil, C. Mitsouli*  
*8th Congress of B.U.ON, Sibiu, Romania*

**Ιούλιος 2010**

**Safety and efficacy of Palifermin for prevention of oral mucositis after Autologous Stem Cell Tranplantation**

*ID Triantafyllopoulou, V. Chatziantoniou, A. Alexopoulos, A. Rekleiti, S. Amtoulach, M. Dadakaridou, M. Stamouli, M. Kotsopoulou, C. Megalakaki, P. Repousis, C. Mitsouli-Mentzikof* MERIT at the 2nd International Meeting of the Hellenic Association of Supportive Care of the Oral Cavity in Cancer, Athens, Greece



## ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΟ ΕΡΓΟ

- 2017** Έκθεση ελέγχου για την Αιματολογική Κλινική του Royal Blackburn Hospital με θέμα τον Ιολογικό έλεγχο πριν την χορήγηση Χημειοθεραπείας σε αιματολογικούς ασθενείς (Audit on virology screening prior chemotherapy, in haematology patients)
- 2016** Έκθεση ελέγχου για την Αιματολογική Κλινική του Royal Blackburn Hospital με θέμα την Χρόνια Μυελογενή Λευχαιμία, και το ποσοστό ανταπόκρισης των ασθενών τους πρώτους 12 μήνες στην θεραπεία (audit on CML).
- 2016** Έκθεση ελέγχου για το Royal Blackburn Hospital για την μετάγγιση αίματος και αιμοπεταλίων στους αιματολογικούς ασθενείς (audit of Red Cell and Platelet Transfusion in Adult Haematology Patients)
- 2016** Συγγραφή κατευθυντήριων οδηγιών για την αντιμετώπιση της Δρεπανοκυτταρικής Κρίσης για το Royal Blackburn Hospital
- 2016** Παρουσίαση με θέμα την Σπληνομεγαλία στο εκπαιδευτικό πρόγραμμα του Royal



	Blackburn Hospital
<b>2015</b>	Παρουσίαση με θέμα την Θρομβοκυττάρωση στους Junior Doctors του Royal Blackburn Hospital
<b>2014</b>	Παρουσίαση με θέμα την Αναιμία στους Junior Doctors του Royal Blackburn Hospital
<b>2011</b>	Συμμετοχή στο εκπαιδευτικό πρόγραμμα της αιματολογικής κλινικής του EANΠ Μεταξά με θέμα «Αιμολυτικό Ουραιμικό Σύνδρομο»
<b>2010</b>	Συμμετοχή στο εκπαιδευτικό πρόγραμμα της αιματολογικής κλινικής EANΠ Μεταξά με θέμα «Βιβλιογραφική ενημέρωση: Παρουσίαση 2 κλινικών μελετών σχετικά με το Non-Hodgkin Λέμφωμα και το Πολλαπλό Μυέλωμα»
<b>2009</b>	Συμμετοχή στο εκπαιδευτικό πρόγραμμα της αιματολογικής κλινικής EANΠ Μεταξά με θέμα «Νεότερες κατευθυντήριες οδηγίες στη ΧΜΛ – ELN 2009»
<b>2007</b>	Συμμετοχή στο εκπαιδευτικό πρόγραμμα της αιματολογικής κλινικής EANΠ Μεταξά με θέμα «Εψιδίνη» 2007
<b>2007</b>	Συμμετοχή στο εκπαιδευτικό πρόγραμμα της αιματολογικής κλινικής EANΠ Μεταξά με θέμα «Αιματολογικές εκδηλώσεις συστηματικών νοσημάτων»



## ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΙΣ ΣΕ ΕΛΛΗΝΙΚΑ ΣΥΝΕΔΡΙΑ

- Νοέμβριος 2016,  
27<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Αιματολογικό Συνέδριο, Θεσσαλονίκη
- “Ανοσοιστοχημικές χρώσεις οστεοπροτεγερίνης (OPG) και ιντερλευκίνης 8 (IL-8) σε οστεομυελικές (OMB) κατά τη διάγνωση ασθενών με Rh αρνητικά μυελοϋπερπλαστικά νοσήματα (MYN). Κλινικές συσχετίσεις”
- Δ. Μαλτέζας, Ι.-Δ. Τριανταφυλλοπούλου, Ε.-Α. Τρίγκα, Τ. Τζένου, Θ. Ηλιάκης, Μ. Δήμου, Κ. Μπιτσάνη, Π. Πέτσα, Π. Παπαϊωάννου, Σ. Κοτσαντή, Α. Κουδουνά, Κ. Σπανού, Π. Νταϊλιάνη, Ε. Πατσούρης, Π. Κορκολοπούλου, Μ. Κωτσοπουλου, Π. Σφηκάκης, Π. Παναγιωτίδης 1, Μ-Χ. Κυρτσώνη
- Νοέμβριος 2012,  
23<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Αιματολογικό Συνέδριο, Θεσσαλονίκη
- “Συστηματικά νεοπλάσματα από ώριμα T και NK κύτταρα: Η εμπειρία ενός κέντρου”
- Β. Χατζηαντωνίου, ΙΔ Τριανταφυλλοπούλου, Α Ρεκλείτη Α, Ο Τζιάδα, Γ Γαβαλάς, Μ Κωτσοπούλου, Π Ρεπούσης, Ι Ιακωβίδου, Α Μεγαλακάκη
- Νοέμβριος 2010,  
21<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Αιματολογικό Συνέδριο, Θεσσαλονίκη
- “Bortezomib ως θεραπεία πρώτης γραμμής σε ασθενείς με πολλαπλούν μυέλωμα.”





Β. Χατζηαντωνίου, Μ. Δαδακαρίδου, Μ. Σταμούλη, Ι. Τριανταφυλλοπούλου, Π. Ρεπούσης, Α. Μεγαλακάκη, Μ. Κωτσοπούλου, Χ. Μητσούλη-Μεντζικώφ

Νοέμβριος 2009,  
20<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Αιματολογικό  
Συνέδριο, Ηράκλειο Κρήτης

**“Επίπεδα ανοσοσφαιρινών και  
λοιμώξεις σε ασθενείς που λαμβάνουν  
Rituximab είτε ως μονοθεραπεία είτε  
σε συνδυασμό με άλλους  
αντινεοπλασματικούς παράγοντες.”**

Μ. Σταμούλη, Μ. Δαδακαρίδου, Ξ. Παπανικολάου, Δ. Μαλτέζας, Α. Ρεκλείτη, Ι.Δ. Τριανταφυλλοπούλου, Β. Χατζηαντωνίου, Α. Αλεξόπουλος, Μ. Κωτσοπούλου, Π. Ρεπούσης, Κ. Μεγαλακάκη, Χ. Μητσούλη-Μεντζικώφ

Νοέμβριος 2008,  
19<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Αιματολογικό  
Συνέδριο, Αθήνα

**“Πρωτοπαθή Μη-Hodgkin  
Λεμφώματα οστών. Η εμπειρία μιας  
αιματολογικής κλινικής.”**

Μαλτέζας Δ, Πατρινού Α, Γαβρεσέα Θ, Δαδακαρίδου Μ, Ρεκλείτη Α, Τριανταφυλλοπούλου Ι.Δ, Χατζηαντωνίου Β, Ρεπούσης Π, Κωτσοπούλου Μ, Μεγαλακάκη Α, Ιακωβίδου Ι, Μητσούλη-Μεντζικώφ Χ.

Νοέμβριος 2008,  
19<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Αιματολογικό

**“Θεραπεία ασθενών με Χρόνια  
Μυελογενή Λευχαιμία με αναστολείς**



**Συνέδριο, Αθήνα**

**της BCR-ABL κινάσης: Η εμπειρία μιας κλινικής”**

Β. Χατζηαντωνίου, Δ. Μαλτέζας, Ξ. Παπανικολάου, Μ. Δαδακαρίδου, Α. Ρεκλείτη, Ι.Δ. Τριανταφυλλοπούλου, Μ. Κωτσοπούλου, Π. Ρεπούσης, Κ. Μεγαλακάκη, Χ. Μητσούλη-Μεντζικώφ

**Νοέμβριος 2008,  
28<sup>ο</sup> Συνέδριο Γαστρεντερολογίας**

**Λέμφωμα στομάχου από T κύτταρα σχετιζόμενο με κοιλιοκάκη**

Ι. Γκίκας, Ι.Καλλιακμάνης, Π. Σφήκας, Κ. Ευγενίδη, Ι.Δ. Τριανταφυλλοπούλου, Ν. Κούκουνας, Γ.Μορφόπουλος, Σ. Σάββα, Π. Καρανάνος, Θ. Γκούμα Παπαδάκη, Ε. Καρκαντζός

**Νοέμβριος 2007,  
18<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Συνέδριο Αιματολογίας**

**Αιμοφαγοκυτταρικό Συνδρόμο ως πρώτη εκδήλωση λεμφώματος Hodgkin- Παρουσίαση Περιστατικού**

Ξ. Παπανικολάου, Μ. Κωτσοπούλου,, Π. Ρεπούσης, Δ.Μαλτέζας, Β. Χατζηαντωνίου, Μ.Δαδακαρίδου, Ι.Δ. Τριανταφυλλοπούλου, Κ.Μεγαλακάκη, Ι. Ιακωβίδου, Χ. Μητσούλη Μεντζικώφ



## **ΣΥΜΜΕΤΟΧΗ ΣΕ ΣΥΝΕΔΡΙΑ ΚΑΙ ΣΕΜΙΝΑΡΙΑ**

<b>14-15/2/2019</b>	Haematology masterclass, London
<b>8-9/2/2018</b>	Haematology masterclass, London
<b>9-12/12/2017</b>	60th ASH Annual Meeting & Exposition, American Society of Hematology (ASH), Atlanta, Georgia, USA
<b>17-18/3/2017</b>	Haematology Tutorial on Haematologic Malignancies, Warsaw Poland
<b>9/12/2016</b>	Basic Life Support in the Primary Care Environment, NHS, Health Education England
<b>10-12/6/2016</b>	21 <sup>st</sup> Congress of EHA, Copenhagen, Denmark
<b>5-8/12/2015</b>	57 <sup>th</sup> ASH Annual Meeting and Exposition, Orlando, FL, USA
<b>19/11/2015</b>	UK Forum on Haemoglobin Disorders, 41 <sup>st</sup> Academic Meeting, National Haemoglobinopathy Registry Update, Manchester
<b>12/11/2015</b>	North West Haematologists Association Educational Symposium
<b>7-9/10/2015</b>	9 <sup>th</sup> Annual Sickle cell and Thalassemia Advanced Conference, London
<b>13/7/2015</b>	Doctors as Educators Certificate
<b>21/9/2015</b>	RCP Educational Supervisor Accreditation by the Royal College of Physicians of London
<b>20-22/4/2015</b>	55 <sup>th</sup> annual scientific meeting-British Society for Haematology
<b>5-6/3/2015</b>	Doctors as educators-educational supervisor workshop and RCP accreditation
<b>12/11/2014</b>	UK Myeloma Autumn Forum Day
<b>11/11/2014</b>	12 <sup>th</sup> London Lymphoma Forum
<b>2014</b>	North West Haematology Association Symposium
<b>8/5/2014</b>	Challenges, Changes and new advances in the management of multiple myeloma and MDS
<b>4/7/2014</b>	Past, Present and future of leukemia and lymphoma diagnosis, Leeds
<b>15-16/5/2014</b>	National Advanced Communications Skills Training Programme



(ASCT)

<b>10/1/2014</b>	Introduction to Good Clinical Practice
<b>24-26/11/2011</b>	22 <sup>ο</sup> Πανελλήνιο Αιματολογικό Συνέδριο, Αθήνα
<b>13-15/11/2009</b>	15 <sup>ο</sup> Πανελλήνιο Ογκολογικό Συνέδριο, Αθήνα
<b>22-24/10/2009</b>	Lymphoma and Myeloma, NY, USA
<b>11-12/9/2009</b>	Athens Conference on Plasma Cell Dyscrasias
<b>13-15/2/2009</b>	5 <sup>th</sup> European Congress on Haematologic Malignancies, Munich, Germany
<b>19-22/11/2008</b>	19ο Πανελλήνιο Αιματολογικό Συνέδριο, Αθήνα
<b>14-17/11/2007</b>	18 <sup>ο</sup> Πανελλήνιο Αιματολογικό Συνέδριο, Θεσσαλονίκη
<b>22/9/2007</b>	Bone Marrow Failure Syndromes, Ioannina, Greece





## **Α.ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**





## Κεφάλαιο 1 Αληθής Πολυκυτταραιμία

### 1.1.Εισαγωγή- Ιστορική Αναδρομή

Η Αληθής Πολυκυτταραιμία (Α.Π.) ανήκει στην ομάδα των χρόνιων μυελουπερπλαστικών νόσων και περιγράφηκε για πρώτη φορά από τον Vaquez το 1892, ο οποίος παρατήρησε τα κλινικά συμπτώματα σε ασθενείς. Στην αρχή του αιώνα, ο Cabot και ο Osler συσχέτισαν το όνομα της ΑΠ με αυτήν την κλινική οντότητα. Η ΑΠ διαφέρει από πολλές άλλες αιματολογικές κακοήθειες στο γεγονός ότι οι ασθενείς μπορούν να έχουν παράταση επιβίωσης όταν ο αριθμός των ερυθρών αιμοσφαιρίων και των αιμοπεταλίων είναι ελεγχόμενος.

Αυτή η παράταση επιβίωσης όμως μπορεί να συνυπάρχει με άλλα σύνδρομα όπως η ΜΙ (*post -PV MF*) και η μετατροπή σε οξεία λευχαιμία. Χαρακτηρίζεται από απόλυτη αύξηση της μάζας ερυθρών και συχνά υπάρχει λευκοκυττάρωση, θρομβοκυττάρωση και σπληνομεγαλία. Υπάρχει κλωνική διαταραχή των BFU-E (Burst Forming Unit-Erythroid) και CFU-E κυττάρων, τα οποία αυξάνονται χωρίς την παρουσία ερυθροποιητίνης (EPO). Δηλαδή, οι BFU-E είναι ανεξάρτητοι από την δράση της EPO και η ερυθροποίηση σε καλλιέργειες κυττάρων μυελού της ερυθράς σειράς, γίνεται απουσία εξωγενούς προσθήκης της ερυθροποιητίνης (Percy MJ 2006). Η συχνότητά της ανέρχεται στα 2,8/100.000 πληθυσμού τον χρόνο. Από το 1951 συμπεριλαμβάνεται στα Μυελουπερπλαστικά Σύνδρομα (ΜΥΣ). Πρώτος ο William Dameshek (1900-1969), το 1953, ομαδοποίησε 4 ασθένειες που παρουσίαζαν κοινά κλινικά χαρακτηριστικά ως ΜΥΣ, ειδικότερα, χρησιμοποίησε αυτόν τον όρο για την Ιδιοπαθή Θρομβοκυττάρωση, την Ιδιοπαθή Μυελοίνωση και την Χρόνια Μυελογενή Λευχαιμία. Το 2001 στον όρο ΜΥΣ ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας προσθέτει 2 επιπλέον οντότητες: την Χρόνια Ηωσινοφιλική Λευχαιμία και την Χρόνια Ουδετεροφιλική Λευχαιμία.

Ο Dameshek περιέγραψε την Αληθή Πολυκυτταραιμία ως μία οντότητα που χαρακτηρίζεται από υπερπλασία και των τριών κυτταρικών σειρών στον μυελό των οστών, με ταυτόχρονη παρουσία ερυθροβλαστικής αντίδρασης, κοκκιοκυττάρωσης και συσσώρευσης ώριμων μεγακαρυοκυττάρων. Το γεγονός ότι υπάρχει αύξηση και των τριών κυτταρικών σειρών, οδηγεί στο συμπέρασμα ότι η βασική βλάβη βρίσκεται στο επίπεδο του αρχέγονου αιμοποιητικού κυττάρου (Gale DP, 2008).





Η αυξημένη μάζα ερυθρών στους ασθενείς με ΑΠ οφείλεται στην διπλάσια με τριπλάσια αύξηση της παραγωγής των ερυθρών αιμοσφαιρίων, από έναν υπερπλαστικό μυελό των οστών και σίγουρα δεν οφείλεται στην αυξημένη επιβίωση των ερυθρών αιμοσφαιρίων. Η υπερπλασία των τριών σειρών οφείλεται, είτε στην παντελή έλλειψη ή μείωση δράσης ανασταλτικού παράγοντα. Η υπόθεση αυτή επιβεβαιώθηκε από την ανακάλυψη της μετάλλαξης του γονιδίου JAK2, (Janus Kinase 2), το οποίο βρίσκεται στο χρωμόσωμα 9 και κωδικοποιεί την πρωτεΐνη JAK2 (Percy MJ, 2007).

Η πρωτεΐνη JAK2, συνδέεται με τον υποδοχέα της EPO και οδηγεί στην αντικατάσταση βαλίνης από φαινυλαλανίνη στη θέση 617 της πρωτεΐνης (V617F). Η μετάλλαξη JAK2 V617F, προκαλεί ελάττωση της ανασταλτικής δράσης της JH2 ψευδοκινάσης, γεγονός που οδηγεί σε αυξημένη δραστηριότητα της φυσιολογικής JH1 κινάσης (Gale DP, 2008). Με αυτόν τον τρόπο, τα αρχέγονα αιμοποιητικά κύτταρα γίνονται υπερευαίσθητα στην δράση αυξητικών παραγόντων όπως η ερυθροποιητίνη, ο αυξητικός παράγοντας των αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων, η θρομβοποιητίνη, με αποτέλεσμα την υπερπλασία και των τριών αιμοποιητικών σειρών. Τα επίπεδα ερυθροποιητίνης στον ορό των ασθενών με ΑΠ είναι συνήθως χαμηλά, βρίσκονται αυξημένα στις περισσότερες περιπτώσεις δευτεροπαθούς ερυθροκυττάρωσης και φυσιολογικά σε ασθενείς με σχετική ερυθροκυττάρωση , αποδεικνύοντας ότι η ΑΠ δεν είναι ανωμαλία της παραγωγής ερυθροποιητίνης (Percy MJ, 2008).

## **1.2.Κλινικές Εκδηλώσεις Αληθούς Πολυκυτταραιμίας**

Τα κυριότερα συμπτώματα της ΑΠ, σχετίζονται με την αυξημένη παραγωγή κυττάρων που ανήκουν και στις τρεις κυτταρικές σειρές που έχουν προσβληθεί από την κακοήθη εξεργασία, συμπεριλαμβανομένων των ερυθρών και λευκών αιμοσφαιρίων και των αιμοπεταλίων. Αν οι ασθενείς με αυξημένο αιματοκρίτη δεν παρουσιάζουν αυξημένη μάζα ερυθρών , τότε τίθεται η διάγνωση της δευτεροπαθούς πολυερυθραιμίας. Η έναρξη συμβαίνει συνήθως στην έκτη δεκαετία της ζωής, με σπάνια την εμφάνιση της νόσου στην παιδική ηλικία. Η νόσος παρατηρείται το ίδιο συχνά σε άνδρες και γυναίκες (Nagalla S. 2014).



Οι ασθενείς εμφανίζουν πληθωρικό προσωπείο, ερυθρή κυάνωση, αύξηση της αρτηριακής πίεσης, υπεραιμία των επιπεφυκότων, ηπατοσπληνομεγαλία και καρδιακά φυσήματα.

Επίσης μπορεί να υπάρχουν εκδηλώσεις υπεργλοιότητας, όπως κεφαλαλγία, διαταραχές όρασης, και εμβοές.

Γενικευμένος κνησμός παρατηρείται στο 40% των περιπτώσεων με ΑΠ. Η επαφή με το νερό, κυρίως το θερμό λουτρό, μπορεί να οδηγήσει σε ανυπόφορο κνησμό. Δεν φαίνεται να υπάρχει συσχέτιση μεταξύ κνησμού και σοβαρότητας της νόσου, και 20% των ασθενών συνεχίζουν να τον βιώνουν, ενώ ο αιματοκρίτης τους έχει επανέλθει στα φυσιολογικά επίπεδα (Prchal JT,2015).

Περίπου το ¼ των ασθενών αναφέρουν παραισθησίες, δύσπνοια, επιγαστρική δυσφορία και αρθραλγίες. Η επιγαστρική δυσφορία συνήθως οφείλεται στην σπληνομεγαλία, η οποία είναι μικρού ή μέτριου βαθμού, ενώ το μέγεθος του σπληνός αυξάνεται όταν αναπτύσσεται μυελοίνωση (Prchal JT,2015).

### 1.3.Επιπλοκές

Συχνά είναι τα θρομβωτικά επεισόδια που αφορούν τα μεγάλα αγγεία και παρατηρούνται στο 1/3 των ασθενών. Σε διάφορες μεγάλες σειρές ασθενών με ΑΠ, η θρόμβωση ήταν αιτία θανάτου στο 30-40% των ασθενών. Η θρομβωτική διάθεση εκφράζεται με αρτηριακές και φλεβικές θρομβώσεις (Rollison DE, 2008).

Στις *αρτηριακές* θρομβώσεις που αποτελούν τα 2/3 των συμβαμάτων αυτών, περιλαμβάνονται τα αγγειακά εγκεφαλικά επεισόδια (ΑΕΕ), τα παροδικά ΑΕΕ, τα στεφανιαία επεισόδια και οι θρομβώσεις των αρτηριών άνω και κάτω άκρων. Στις *φλεβικές* θρομβώσεις που αποτελούν το 1/3 των περιπτώσεων, περιλαμβάνονται η πνευμονική εμβολή, η επιπολής θρομβοφλεβίτις, και οι θρομβώσεις των σπλαχνικών φλεβών, συμπεριλαμβανομένων των μεσεντερίων φλεβών, της πυλαίας ή της σπληνικής φλέβας. Η θρόμβωση της πυλαίας ή/και των ηπατικών φλεβών, οδηγεί στην εμφάνιση του συνδρόμου Budd Chiari. Φλεβική απόφραξη μπορεί να συμβεί σε οποιοδήποτε επίπεδο, από τις μικρές ηπατικές φλέβες έως την εκβολή της κάτω κοίλης φλέβας στο δεξιό καρδιακό κόλπο. Το σύνδρομο Budd Chiari μπορεί να



προηγείται έτη της εκδήλωσης της αληθούς πολυκυτταραιμίας και η ΑΠ είναι η αιτία για περίπου το 10-40% των περιπτώσεων Budd Chiari (Vannucchi AM. 2014).

Περίπου το 30-40% των ασθενών με ΑΠ εμφανίζουν αιμορραγικές εκδηλώσεις, όπως για παράδειγμα επίσταξη ή αιμορραγία από τα ούλα, αιμορραγία από το πεπτικό και αιματώματα ζωτικών οργάνων. Η εμφάνιση αιμορραγίας είναι συχνότερη σε περιπτώσεις που ο αριθμός των αιμοπεταλίων είναι άνω των  $1500 \times 10^9/L$ , και αναπτύσσεται επίκτητη νόσος Von Willebrand.

Συχνές επιπλοκές της νόσου είναι τα μικροαγγειακά θρομβωτικά συμβάματα στα οποία συγκαταλέγονται 1) η ερυθρομελαλγία με οιδηματώδη ερυθρά άκρα με ή χωρίς αίσθημα καύσου η οποία οφείλεται σε αποφράξεις των αγγείων από αιμοπεταλιακούς θρόμβους. Αξίζει να σημειωθεί ότι η ερυθρομελαλγία είναι από τις ελάχιστες οντότητες, όπου η ισχαιμία των δακτύλων με ή χωρίς εξέλκωση υπάρχει με την παρουσία ψηλαφητών σφύξεων. 2)η δικτυωτή πελίωση, 3)μη ειδικά συμπτώματα εκ του ΚΝΣ (Vannucchi AM. 2015).

Περίπου 40% των ασθενών παρουσιάζει κνησμό, που συχνά επιδεινώνεται μετά από θερμό λουτρό και αποδίδεται στα αυξημένα επίπεδα ισταμίνης και βασεόφιλων στους ασθενείς αυτούς. Ο κνησμός που σχετίζεται με νερό είναι πιο συχνός στους ασθενείς με την JAK2V617F μετάλλαξη. Η αιτιολογία του κνησμού παραμένει αβέβαιη.

Τέλος, 5% των ασθενών παρουσιάζουν ουρική αρθρίτιδα.

#### 1.4. Διαγνωστικά Κριτήρια

Τα κριτήρια διάγνωσης της ΑΠ προτάθηκαν την δεκαετία του 1970 από την ομάδα μελέτης της ΑΠ (Polycythemia Vera Study Group-PVSG).

Μετά την περιγραφή της μετάλλαξης JAK2 V617F, τροποποιήθηκαν τα κριτήρια διάγνωσης, με την ενσωμάτωση της μετάλλαξης αυτής.

Κριτήρια Διάγνωσης* (WHO 2016)
<b>Μείζονα κριτήρια</b>
1. Αιμοσφαιρίνη > 16.5 g/dl για τους άνδρες ή > 16.0 g/dl για τις γυναίκες ή αιματοκρίτης >49% για τους άνδρες και >48% για τις γυναίκες ή αύξηση του όγκου των ερυθρών αιμοσφαιρίων.
2. Υπερκυτταρικός, για την ηλικία του ασθενούς, μυελός των οστών στην



οστεομυελική βιοψία, με υπερπλασία και των τριών σειρών, με την μεγακαρυοκυτταρική σειρά να παρουσιάζει πλειομορφικά ώριμα μεγακαρυοκύτταρα διαφόρων μεγεθών.
3.Παρουσία της JAK2V617F μετάλλαξης ή άλλης λειτουργικά όμοιας, όπως της JAK2 exon 12 μετάλλαξης.
<b>Ελάχιστο κριτήριο</b>
Χαμηλότερα επίπεδα ερυθροποιητίνης ορού από τις φυσιολογικές τιμές αναφοράς.

Σύμφωνα με την ταξινόμηση του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας (WHO 2016), για την διάγνωση απαιτείται η παρουσία και των τριών μειζόνων κριτηρίων ή η παρουσία των δύο πρώτων μειζόνων κριτηρίων και του ελάχιστου κριτηρίου (Tefferi A, 2007).

### **1.5.Εργαστηριακά ευρήματα**

Η γενική αίματος καταδεικνύει αυξημένο αιματοκρίτη, ουδετερόφιλη λευκοκυττάρωση (στο 70% των ασθενών) και μέτριου βαθμού θρομβοκυττάρωση στους μισούς ασθενείς.

Η ερυθροκυττάρωση είναι το χαρακτηριστικό εύρημα της ΑΠ και αποτελεί την πιο σημαντική διαφορά της ΑΠ, από την ΙΘ και την ΜΙ (Silver RT, 2011).

Σπάνια ο αιματοκρίτης είναι φυσιολογικός και αυτό μπορεί να συμβεί όταν ο ασθενής έχει ήδη εισέλθει στην φάση της μυελοίνωσης. Η Ταχύτητα Καθίζησης Ερυθρών είναι χαμηλή, λόγω των απωστικών δυνάμεων που αναπτύσσονται μεταξύ της πληθώρας των ερυθροκυττάρων.

Από τον βιοχημικό έλεγχο, μπορεί να υπάρχει αύξηση της γαλακτικής αφυδρογονάσης (LDH), αύξηση του ουρικού οξέος και σε περίπτωση συνυπάρχουσας θρομβοκυττάρωσης να ανευρεθεί ψευδής υπερκαλιαιμία (Spivak JL 2008).

Από τον αιμορραγικό έλεγχο, μπορεί να υπάρχει ψευδής παράταση χρόνων προθρομβίνης και μερικής θρομβοπλαστίνης (PT και APTT). Αυτό συνήθως παρουσιάζεται σε ασθενείς με πολύ υψηλό αιματοκρίτη που οδηγεί σε χαμηλότερο όγκο πλάσματος στο δείγμα αίματος. Στους ασθενείς με ΑΠ, η αναλογία κιτρικών με τον όγκο του πλάσματος μέσα στο φιαλίδιο είναι πολύ υψηλός. Αυτό συμβαίνει διότι



η περίσσεια κιτρικών εντός του φιαλιδίου δεν μπορεί να εξουδετερωθεί από το  $\text{CaCl}_2$ , που υπάρχει ήδη στο φιαλίδιο. Μπορεί επίσης να προκύψει και λόγω της μειωμένης ποσότητας πλάσματος εντός του φιαλιδίου, από τον αυξημένο αιματοκρίτη (Barbui T,2011).

Τέλος, τα επίπεδα EPO ορού είναι χαμηλά.

## **1.6. Μελέτη Μυελού των Οστών –Καρυοτυπος - Μοριακή Μελέτη**

Η αρχική εκτίμηση του μυελού των οστών σε ασθενείς με ΑΠ, είναι σημαντική για τη διαφορική διάγνωση από τα λοιπά ΜΥΣ και αποτελεί σημείο αναφοράς για το μέλλον, όσον αφορά την ανταπόκριση στη θεραπεία και την πρόοδο νόσου.

Η κυτταροβρίθεια του μυελού είναι αυξημένη, με υπερπλασία όλων των σειρών, αλλά κυρίως της ερυθράς και της μεγακαρυοκυτταρικής σειράς. Τα μεγακαρυοκύτταρα παρουσιάζουν μεγάλο μέγεθος με πολυλοβωτούς υπεργχρωματικούς πυρήνες και ενεργοποιημένο κυτταρόπλασμα (Marchioli R, 2013). Ίνωση παρατηρείται στο 30% των περιπτώσεων, λόγω ήπιας αύξησης δικτυωτών ινών της ρετικουλίνης.

Ο καρυότυπος στη διάγνωση είναι παθολογικός μόνο στο 10%-20% και κάποιες μελέτες πρότειναν μία συσχέτιση με χαμηλότερο προσδόκιμο επιβίωσης (2).

Συχνότερα παρατηρούνται ελλείψεις, όπως η  $\text{del}(20q)$  στο 8.4% των ασθενών, η έλλειψη 13q στο 3% των ασθενών, η τρισωμία 8 στο 7% των ασθενών, η τρισωμία 9 στο 7% των ασθενών, η τρισωμία 1q στο 4% των ασθενών,  $\text{del}(5q)$  στο 3% των ασθενών και η  $\text{del}(7q)$  στο 1% των ασθενών.

Η μοριακή μελέτη γίνεται σε περιφερικό αίμα και αφορά τον αποκλεισμό της μοριακής βλάβης BCR-ABL και την ανίχνευση της μετάλλαξης JAK2 V617F, και της καλρετικουλίνης (CALR) (Marchioli R,2013).

## **1.7.JAK 2 Κιναση**

Η JAK 2 κινάση είναι μία κυτταροπλασματική τυροσινική κινάση που ρόλος της είναι η μετάδοση σημάτων προς διάφορους υποδοχείς αιμοποιητικών αυξητικών παραγόντων. Ανήκει στην οικογένεια των JAK κινασών που επιπλέον περιλαμβάνει τις JAK1,JAK3 και TYK 2 κινάσες. Τα ένζυμα αυτά αποτελούνται από πάνω από



1000 αμινοξέα και το μοριακό τους βάρος κυμαίνεται από 120-130 kDa (Pearson TC, 1995).

Η μετάλλαξη του γονιδίου JAK 2 (Janus Kinase 2), το οποίο βρίσκεται στο χρωμόσωμα 9, κωδικοποιεί την πρωτεΐνη JAK2, η οποία συνδέεται με τον υποδοχέα της EPO (EPO-R). Η μετάλλαξη αυτή οδηγεί στην αντικατάσταση βαλίνης από φαινυλαλανίνη στη θέση 617 της πρωτεΐνης (V617F). Φαίνεται ότι προκαλεί μείωση της ανασταλτικής δράσης της JH 1 κινάσης, με τελικό αποτέλεσμα τα αρχέγονα αιμοποιητικά κύτταρα να είναι υπερευαίσθητα στην ερυθροποιητίνη, της θρομβοποιητίνη, τον IGF I καθώς και τον παράγοντα των αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων (SCF). Έτσι ενεργοποιείται ο υποδοχέας της EPO στο κυτταρόπλασμα και επί απουσίας της EPO (Lorberboym M, 2005).

Η JAK κινάση κλωνοποιήθηκε το 1989, και το όνομά της προερχόταν από τα αρχικά Just Another Kinase, αφού έως τότε δεν γνωρίζαμε τον τρόπο δράσης τους. Όμως η ανακάλυψη ότι στη δομή της υπάρχουν 2 περιοχές, μία με δράση κινάσης και μία άλλη με δράση ψευδοκινάσης, οδήγησε στην αλλαγή του ονόματος. Ονομάστηκε Janus Activated Kinase εμπνευσμένη από τον Ιανό, την Ρωμαϊκή θεότητα που εμφανίζεται με διπλή όψη, να κοιτά σε δύο κατευθύνσεις (Johansson PL, 2005).

## 1.8. Καλρετικουλίνη (CALR)

Η καλρετικουλίνη, επίσης γνωστή ως καλρεγκουλίνη, CRP 55, CaBP3, ERp60 (endoplasmic reticulum resident protein), είναι μία πρωτεΐνη, που στους ανθρώπους κωδικοποιείται από το γονίδιο CALR και έχει πολλαπλές λειτουργίες (κυτταρική ανάπτυξη και κινητικότητα, φαγοκυττάρωση, απόπτωση, ομοιόσταση ασβεστίου). Δεσμεύει ιόντα ασβεστίου, μετατρέποντας το ασβέστιο ανενεργό. Το 2013, 2 διαφορετικά εργαστήρια ανέφεραν την μετάλλαξη της πρωτεΐνης CALR. Η CALR βρίσκεται στο ενδοπλασματικό δίκτυο, στον πυρήνα, στην εξωκυττάρια θεμέλια ουσία και στην μεμβράνη. Μεταλλάξεις frameshift (μετατόπισης πλαισίου), στο εξώνιο 9 της πρωτεΐνης CALR, οδηγεί σε μετάλλαξη της καλρετικουλίνης με ένα καινούργιο μοτίβο C terminus. Αυτές οι μεταλλάξεις εισαγωγής και διαγραφής (>50), συμβαίνουν στο εξώνιο 9 της πρωτεΐνης CALR και βρίσκονται περίπου στο 25% των ασθενών με ΙΘ και ΜΙ. Ο τύπος 1 (52bp deletion) και ο τύπος 2 (5bp



insertion) αποτελούν το 80% των μεταλλάξεων σε JAK αρνητικούς ασθενείς. Αναδρομικές μελέτες εμπλέκουν την παρουσία της μετάλλαξης CALR σε ασθενείς με ΜΙ που παρουσιάζουν υψηλό αριθμό αιμοπεταλίων, χαμηλή τιμή αιμοσφαιρίνης και λευκών αιμοσφαιρίων, μικρότερο κίνδυνο θρομβώσεων και καλύτερη συνολική πρόγνωση από αυτή ασθενών θετικών για την JAK2V617F (3). Αρχικές μελέτες φαίνεται να αποδίδουν χειρότερη πρόγνωση σε ασθενείς με την τύπου 2 CALR μετάλλαξη σε σχέση με την τύπου 1. Επιπλέον μελέτες έχουν πιά δείξει ότι ασθενείς με ΜΙ που βρίσκονται θετικοί στην CALR, επίσης παρουσιάζουν αυξορρυθμισμένη του JAK-STAT signaling και ανταποκρίνονται στη θεραπεία με JAK2 αναστολείς.

Ο ακριβής παθοβιολογικός δεσμός μεταξύ της μετάλλαξης CALR και του απορρυθμισμένου μονοπατιού JAK-STAT, είναι το θέμα πολλών ερευνών. Πρόσφατη μελέτη έδειξε ότι ούτε η έκφραση του μεταλλαγμένου C terminus ούτε η έκφραση της CALR χωρίς C terminus οδηγεί σε ανεξέλεγκτη ανάπτυξη κυτταροκινών, προτείνοντας ότι το νέο C terminus (mutated) είναι αναγκαίο, για την εξαλλαγή.

## **1.9. Θεραπευτική αντιμετώπιση ασθενών με ΑΠ**

Οι ασθενείς εντάσσονται σε 2 ομάδες: στους ασθενείς χαμηλού κινδύνου και στους ασθενείς υψηλού κινδύνου. Και στις δύο ομάδες συνιστάται η χορήγηση ασπιρίνης 40-100mg και εάν ο αιματοκρίτης είναι άνω του 45% συνιστώνται αφαιμάξεις.

Οι ασθενείς χαμηλού κινδύνου είναι κάτω των 60 ετών και δεν έχουν ιστορικό θρόμβωσης. Σε περίπτωση που ο αριθμός των λευκών είναι αυξημένος ή υπάρχει καρδιαγγειακή νόσος και ειδικά υπέρταση ή δεν ελέγχονται τα μικροαγγειακά συμπτώματα τότε ενδείκνυται η χορήγηση ασπιρίνης δύο φορές ημερησίως.

Οι ασθενείς υψηλού κινδύνου είναι άνω των 60 ετών ή έχουν ιστορικό θρόμβωσης. Σε αυτή την ομάδα ασθενών συνιστάται αρχικά υδροξυουρία 500mg δις ημερησίως. Εάν υπάρχει ιστορικό αρτηριακής θρόμβωσης συνιστάται ασπιρίνη δις ημερησίως και εάν υπάρχει ιστορικό φλεβικής θρόμβωσης προστίθεται συστηματική αντιπηκτική αγωγή. Οι ασθενείς με δυσανεξία στην υδροξυουρία μπορούν να λάβουν πεγκυλιωμένη ιντερφερόνη ή βουσουλφάνη.



## Κεφάλαιο 2      Ιδιοπαθής Θρομβοκυττάρωση

### 2.1. Εισαγωγή

Η Ιδιοπαθής θρομβοκυττάρωση (Ι.Θ.) ανήκει στην ομάδα των χρονίων μυελουπερπλαστικών νόσων. Χαρακτηρίζεται από την υπερπλασία της μεγακαρυοκυτταρικής σειράς, που οδηγεί στον αυξημένο αριθμό αιμοπεταλίων στο περιφερικό αίμα. Η ΙΘ περιγράφηκε για πρώτη φορά από τους Epstein και Goedel, το 1934, με τον William Dameshek να την συμπεριλαμβάνει στα MYN το 1951.

Για να τεθεί η διάγνωση της ΙΘ, θα πρέπει να αποκλειστεί η αντιδραστική θρομβοκυττάρωση, όπως επίσης και το μυελοδυσπλαστικό σύνδρομο 5q- (Beer, PA 2009).

### 2.2. Επιδημιολογία

Η πραγματική επίπτωση της ΙΘ είναι άγνωστη, διότι δεν υπάρχουν επαρκείς επιδημιολογικές μελέτες. Πάντως, έχει αναφερθεί στην βιβλιογραφία ότι η επίπτωση είναι περίπου 1.5-2.4 συμβάματα/100.000 πληθυσμού, κατ'έτος. Η διάμεση ηλικία των ασθενών είναι τα 50-60 έτη, με ίση πιθανότητα προσβολής αρρένων και θήλεων. Υπάρχει μια αυξημένη επίπτωση σε γυναίκες περί την ηλικία των 30 ετών. Γενετική μετάδοση της νόσου είναι ασυνήθης, αν και έχει περιγραφεί ΙΘ, σε πολλά μέλη της ίδιας οικογένειας. Σε δύο οικογένειες, η ΙΘ συνέβη σε 3 διαδοχικές γενεές, με ασθενείς ηλικίας 2-62 ετών. Μια ανωμαλία στην παραγωγή θρομβοποιητίνης ή στον υποδοχέα θρομβοποιητίνης, φαίνεται να είναι η αιτία στην παραπάνω περίπτωση (Fu, R 2013).

### 2.3. Αιτιολογία

Τα αιμοπετάλια σε ασθενείς με ΙΘ έχουν φυσιολογική επιβίωση. Η θρομβοκυττάρωση οφείλεται στην αυξημένη παραγωγή των αιμοπεταλίων από τα μεγακαρυοκύτταρα. Η παραγωγή των αιμοπεταλίων είναι δεκαπλάσια και σχετίζεται με υπερπλασία των μεγακαρυοκυττάρων, τα οποία παρουσιάζουν γιγάντιες ή και άωρες μορφές. Μερικές φορές τα μεγακαρυοκύτταρα σχηματίζουν συγκύτια, με αυξημένη λόβωση (Frewin, R 2012).

Η θρομβοποιητίνη (TPO), είναι ο κύριος ρυθμιστής της μεγακαρυοποίησης και της παραγωγής αιμοπεταλίων. Αυτός ο αυξητικός παράγοντας δρα συνδεδεμένος με τον





κυτταρικό υποδοχέα, τον c- mpl. Ο υποδοχέας της θρομβοποιητίνης εκφράζεται από τα CD34+ προγονικά κύτταρα, τα μεγακαρυοκύτταρα και τα αιμοπετάλια. Φυσιολογικά ή ελαφρώς αυξημένα επίπεδα θρομβοποιητίνης έχουν παρατηρηθεί σε ασθενείς με ΙΘ. Επιπλέον η έκφραση του υποδοχέα της ερυθροποιητίνης και του mRNA του, είναι μειωμένη στα αιμοπετάλια των ασθενών με ΙΘ. Ερευνητές έδειξαν ότι στην Αληθή Πολυκυτταραιμία υπάρχει υπερ-έκφραση του γονιδίου PRV-1, στα λευκά αιμοσφαίρια. Η έκφραση του γονιδίου PRV-1 βρίσκεται λιγότερο συχνά σε ασθενείς με ΙΘ. Έτσι, η υπερέκφραση του γονιδίου PRV-1 στα λευκά αιμοσφαίρια δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως δείκτης διαχωρισμού των δύο αυτών νοσημάτων. Πάντως, μειωμένη έκφραση του c-mpl και αυξημένη έκφραση στα κοκκιοκύτταρα του PRV-1, έχει παρατηρηθεί σε ασθενείς με οικογενή θρομβοκυττάρωση, που φέρουν μετάλλαξη στο γονίδιο της θρομβοποιητίνης. Επιπλέον μελέτες της μοριακής παθογένειας της ΙΘ χρειάζονται για την καλύτερη κατανόηση της προέλευσης της νόσου (Tefferi, A 2018).

<b>ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΑ ΚΡΙΤΗΡΙΑ</b>
<b>ΜΕΙΖΟΝΑ ΚΡΙΤΗΡΙΑ</b>
Εμμένουσα αύξηση του αριθμού των αιμοπεταλίων (>450x10 <sup>9</sup> /L)
Υπερπλασία της μεγακαρυοκυτταρικής σειράς στην OMB, με αυξημένο αριθμό μεγάλων, ώριμων μεγακαρυοκυττάρων, με υπερλοβώδεις πυρήνες. Δεν υπάρχει ιδιαίτερη αύξηση ή αριστερή στροφή της κοκκιοποίησης, της ευθροποίησης, και πολύ σπάνια υπάρχει ελάχιστη αύξηση των ινωδών ινών (grade 1).
Αποκλεισμός με βάση τα κριτήρια της WHO της ΑΠ, της ΜΙ, της ΧΜΛ και των ΜΔΣ
Παρουσία της μετάλλαξης JAK2 V617F, CALR ή MPL άλλου δείκτη κλωνικότητας, ή επί απουσίας αυτών, αποκλεισμός αιτίων αντιδραστικής θρομβοκυττάρωσης
<b>ΕΛΑΣΣΟΝΑ ΚΡΙΤΗΡΙΑ</b>
Παρουσία άλλου δείκτη κλωνικότητας ή επί απουσίας αυτού, αποκλεισμός αιτίων αντιδραστικής θρομβοκυττάρωσης

*Η διάγνωση της ΙΘ απαιτεί την παρουσία και των 4 μείζονων κριτηρίων, ή τα πρώτα 3 μείζονα κριτήρια και το έλασσον κριτήριο.*



## 2.4.Κλινικά ευρήματα-Επιπλοκές

Πολλοί ασθενείς (12%-67%), παρουσιάζουν πολύ αυξημένο αριθμό αιμοπεταλίων, σε τυχαίο αιματολογικό έλεγχο. Οι περισσότεροι από αυτούς παρουσιάζουν συμπτώματα που οφείλονται σε μικρο-μακρο-αγγειακές θρομβώσεις ή σε αιμορραγία. Μαζική αιμορραγία είναι ασυνήθης. Νευρολογικά συμπτώματα είναι συχνά, εκ των οποίων η κεφαλαλγία είναι συχνότερη, με τις παραισθησίες των άκρων να είναι το δεύτερο πιο συχνό σύμπτωμα. Επίσης λόγω μικροαγγειακών θρομβωτικών επεισοδίων, τα παροδικά ισχαιμικά επεισόδια είναι αρκετά συχνά. Τα συμπτώματα αυτά μπορεί να έχουν απότομη έναρξη, να διαρκούν ελάχιστα δευτερόλεπτα και να συνοδεύονται από σοβαρή κεφαλαλγία. Μπορεί να προυπάρχει αυτών ή να ακολουθεί η ερυθρομελαλγία, η οποία αποτελεί θρομβωτική επιπλοκή της ΙΘ, και χαρακτηρίζεται από καυσalgία ή σφύζον άλγος στα δάκτυλα των ποδών και των χεριών ή στις πελματιαίες επιφάνειες. Τα συμπτώματα επιδεινώνονται κατά την βάδιση, την αύξηση θερμοκρασίας και την παρατεταμένη ορθοστασία (Vannucchi, 2010).

Η ερυθρομελαλγία μπορεί να οδηγήσει σε γάγγραινα ή και νέκρωση των δακτύλων και κυρίως των ποδών.

Η θεραπεία εκλογής είναι η ασπιρίνη και η υποχώρηση των συμπτωμάτων με μία και μόνο δόση επιβεβαιώνει την διάγνωση.

Οι θρομβώσεις μεγάλων αγγείων είναι σπανιότερες, αλλά αποτελούν την κύρια αιτία θνησιμότητας. Στο 50% των ασθενών το 30% παρουσίαζε αρτηριακές θρομβώσεις κάτω άκρων, το 18% θρόμβωση των στεφανιαίων αγγείων και το 10% θρόμβωση των νεφρικών αρτηριών. Οι αρτηριακές θρομβώσεις είναι πιο συχνές από τις φλεβικές.

Το 10-25% των θρομβωτικών επεισοδίων είναι εν τω βάθει φλεβικές θρομβώσεις, που μπορεί να επισυμβαίνουν σε ασυνήθεις θέσεις όπως η σπληνική φλέβα, οι ηπατικές φλέβες ή φλέβες των ποδών ή της πυέλου. Η θρόμβωση των ηπατικών φλεβών οδηγεί στο Σύνδρομο Budd Chiari, ενώ η θρόμβωση της νεφρικής φλέβας οδηγεί σε νεφρωσικό σύνδρομο. Ο πριαπισμός είναι μία σπάνια επιπλοκή της ΙΘ, που οφείλεται στην θρόμβωση των σπραγγωδών σωμάτων του πέους. Επίσης, γυναίκες αναπαραγωγικής ηλικίας μπορεί να παρουσιάζουν αυξημένη συχνότητα αποβολών, κυρίως στο πρώτο τρίμηνο της κύησης λόγω θρόμβωσης των αγγείων του πλακούντα.



Επίσης, πνευμονική υπέρταση μπορεί να παρουσιασθεί λόγω μικροαγγειακών θρομβώσεων των κυψελίδων (Nangalia J 2013).

Σε ασθενείς με αιμοπετάλια  $>1000 \times 10^9$ , μπορεί να παρουσιασθεί επίκτητη νόσος Von Willebrand, και η θεραπευτική μείωση των αιμοπεταλίων διορθώνει τις ανωμαλίες του παράγοντα Von Willebrand και σταματάει την αιμορραγία. Τα εργαστηριακά χαρακτηριστικά της επίκτητης νόσου Von Willebrand είναι ανεπάρκεια του παράγοντα II, παρατεταμένος χρόνος αιμορραγίας, μειωμένη δραστηριότητα του ristocetin cofactor, και μείωση ή παντελής έλλειψη των πολυμερών του παράγοντα Von Willebrand.

## **2.5. Θεραπευτική αντιμετώπιση ασθενών με ΙΘ**

Παράγοντες κινδύνου για θρόμβωση σε ασθενείς με ΙΘ είναι το προηγούμενο ιστορικό θρόμβωσης, η ύπαρξη των μεταλλάξεων JAK2/MPL και η προχωρημένη ηλικία.

Οι ασθενείς με ΙΘ κατατάσσονται σε 4 κατηγορίες:

1. Πολύ χαμηλού κινδύνου που δεν έχουν κανένα παράγοντα κινδύνου. Στους ασθενείς της κατηγορίας αυτής συνιστάται κλινικοεργαστηριακή παρακολούθηση.
2. Χαμηλού κινδύνου όταν υπάρχουν οι μεταλλάξεις JAK2/MPL. Συνιστάται η χορήγηση ασπιρίνης μία ή δύο φορές ημερησίως εφόσον τα αιμοπετάλια είναι  $<1500 \times 10^9/L$  και δεν υπάρχει επίκτητη νόσος Von Willebrand.
3. Ενδιάμεσου κινδύνου σε ηλικιωμένους ασθενείς  $> 60$  ετών. Σε αυτή την κατηγορία συνιστάται υδροξυουρία και ασπιρίνη μια φορά ημερησίως.
4. Πολύ υψηλού κινδύνου όταν υπάρχουν και οι 3 παράγοντες ( ιστορικό θρόμβωσης, μετάλλαξη JAK2/MPL, προχωρημένη ηλικία. Εάν ο ασθενής έχει ιστορικό αρτηριακής θρόμβωσης συνιστάται υδροξυουρία και ασπιρίνη δύο φορές ημερησίως. Εάν ο ασθενής έχει ιστορικό φλεβικής θρόμβωσης, συνιστάται υδροξυουρία και συστηματική αντιπηκτική αγωγή. Εάν ο ασθενής με ιστορικό φλεβικής θρόμβωσης έχει καρδιολογικούς παράγοντες κινδύνου ή έχει την μετάλλαξη JAK2 ή MPL, τότε μπορεί να προστεθεί και ασπιρίνη μία φορά ημερησίως.

Επί δυσανεξίας στην υδροξυουρία μπορεί να χορηγηθεί αναγρελίδη ή πεγκυλιωμένη ιντερφερόνη. (Tefferi et al: Essential thrombocythemia treatment algorithm 2018, Blood Cancer Journal 8, Article Number:2 (2018), DOI <https://doi.org/10.1038/s41408-017-0041-8>)



## Κεφάλαιο 3    Ιδιοπαθής Μυελοίνωση

### 3.1.Εισαγωγή

Η Ιδιοπαθής Μυελοίνωση (MI), ή Μυελοσκλήρυνση, ή αγνωγενής μυελοειδής μεταπλασία, είναι μία χρόνια μυελουπερπλαστική νόσος που χαρακτηρίζεται από υπερπλασία των κοκκιοκυττάρων και των μεγακαρυοκυττάρων στο μυελό των οστών, συνοδευόμενη από αντιδραστική εναπόθεση συνδετικού ιστού και εξωμυελική αιμοποίηση (Kantarjian HM, 2006).

### 3.2.Επιδημιολογία

Η επίπτωση της MI κυμαίνεται μεταξύ 0.5 και 1.5 ανά 100.000 πληθυσμού κατ' έτος. Η διάμεση ηλικία διάγνωσης της νόσου είναι τα 60 έτη. Τα αίτια της νόσου είναι άγνωστα, αν και η έκθεση σε βενζίνη και ιονίζουσα ακτινοβολία έχουν ενοχοποιηθεί για την αυξημένη επίπτωση της νόσου (Kantarjian HM, 2006).

### 3.3. Μοριακή Παθογένεση

Διάφοροι μοριακοί μηχανισμοί υποδηλώνουν τον κλωνικό χαρακτήρα της νόσου και η κλωνική εξέλιξη στην MI εξαρτάται από πολλούς αιμοποιητικούς κλώνους. Το παθολογικό αρχέγονο αιμοποιητικό κύτταρο περιέχει γενετικές μεταλλάξεις που οδηγούν στον υπερπλαστικό φαινότυπο της νόσου. Οι JAK2 V617F και η MPL 515 μεταλλάξεις παρουσιάζονται στο 50% και 5% των περιπτώσεων MI αντίστοιχα, με αποτέλεσμα την μόνιμη ενεργοποίηση του JAK/STAT signaling pathway, οδηγώντας *in vitro* στην ανεξαρτησία των κλώνων ως προς τους αυξητικούς παράγοντες. Η πρόσφατη ανακάλυψη της μετάλλαξης της καλρετικουλίνης συμπληρώνει το πεδίο των μεταλλάξεων στην MI, συμβαίνοντας στο 25% και 88% των ασθενών χωρίς τις MPL και JAK 2 μεταλλάξεις αντίστοιχα. Τέλος, λιγότερο από 10% των ασθενών είναι “τριπλά αρνητικοί”. Η πρωτεΐνη της καλρετικουλίνης οδηγεί στο trafficking ενδοκυττάρων πρωτεϊνών και μετάλλαξη αυτής θα μπορούσε να αλλάξει την έκφραση των υποδοχέων της μεμβράνης που συμμετέχουν στην υπερπλαστική ικανότητα των κλωνικών κυττάρων (Murgo AJ 2001).

Άλλες μεταλλάξεις συμβαίνουν λιγότερο συχνά και συμμετέχουν στην ενεργοποίηση του JAK/STAT pathway: π.χ. η LNK, μία πρωτεΐνη που ελέγχει αρνητικά το



signaling της TPO, βρίσκεται μεταλλαγμένη σε μερικούς ασθενείς. Επίσης, η πρωτεΐνη SOCS-3 που προάγει ογκοκατασταλτικά γονίδια, μπορεί να υποστεί υπερμεθυλίωση. Εκτός από τις παραπάνω μεταλλάξεις, άλλες όπως οι NRAS και NF1, έχουν χειρότερη πρόγνωση. Μεταλλάξεις μπορούν να συμβούν σε γονίδια, όπως το TET-2, DNMT3A ή το ASXL1.

Βασικό ρόλο στην παθογένεια της MI διαδραματίζει η υπερπλαστική μεγακαρυοκυτταρική σειρά, τα κύτταρα της οποίας εκκρίνουν (Druker BJ 2000)

- 1 PDGF (Platelet Derived Growth Factor)
- 2 PDEGF (Platelet Derived Endothelial Growth Factor)
- 3 TGF-β (Transforming Growth Factor B)
- 4 PF4 (Platelet Factor 4)
- 5 Καλμοδουλίνη

### **3.4. Κλινικά Ευρήματα**

Περίπου το 25% των ασθενών είναι ασυμπτωματικοί κατά την διάγνωση, και η τυχαία εύρεση σπληνομεγαλίας κατά την φυσική εξέταση ή η παρουσία αναιμίας, λευκοκυττάρωσης ή θρομβοπενίας στη γενική αίματος οδηγούν στον αιματολόγο.

Στο αρχικό προινωτικό στάδιο της MI, το μόνο εύρημα μπορεί να είναι θρομβοκυττάρωση μιμούμενη την ΙΘ. Στο 47-71% των περιπτώσεων συμπτώματα που οφείλονται στην αναιμία, όπως εύκολη κόπωση, δύσπνοια στην κόπωση, αίσθημα παλμών είναι χαρακτηριστικά της νόσου (Kantarjian HM, 1999).

Στο 11-48% των περιπτώσεων, κυριαρχούν συμπτώματα που οφείλονται στη μεγάλη διόγκωση του σπληνός όπως βάρος στο αριστερό υποχόνδριο, και γρήγορος κορεσμός μετά την λήψη γευμάτων. Στο 5-20% περίπου των ασθενών εμφανίζεται ήπια αιμορραγική διάθεση, ενώ σε ανάλογο ποσοστό υπάρχουν συμπτώματα απώλειας βάρους, επιδρώσεων, πυρετού, λόγω υπερμεταβολικού συνδρόμου.

Τέλος, το 6-13% παρουσιάζει ουρική αρθρίτιδα και νεφρολιθίαση λόγω υπερουριχαιμίας.

Στο 95% των περιπτώσεων, υπάρχει σπληνομεγαλία που στο 1/3 των ασθενών είναι ογκώδης. Στο 39-70% των ασθενών υπάρχει ηπατομεγαλία. Πυλαία υπέρταση ανευρίσκεται στο 2-6% των ασθενών, που μπορεί να εκδηλωθεί με κισσούς οισοφάγου και ασκίτη (Moracova J, 1999).

Περιστασιακά, έχουν αναφερθεί περιπτώσεις κίρρωσης ή θρόμβωσης της πυλαίας ή των ηπατικών φλεβών. Οζώδης αναγεννητική υπερπλασία του ήπατος έχει



παρατηρηθεί στο 14.6% των περιπτώσεων και σχετιζόταν στενά με την παρουσία βλαβών στην πυλαία φλεβα.

Πολύ σπάνια, μπορεί να προηγηθεί της μυελοίνωσης το σύνδρομο Sweet, με την παρουσία πολλαπλών δερματικών βλαβών (οιδηματώδεις δερματικές πλάκες και οζία). Πρόκειται για ένα σύνδρομο που παρατηρείται σε πολλές άλλες αιματολογικές κακοήθειες (Sacci S, 1999).

Το γαγγραινώδες πυόδερμα έχει επίσης συσχετισθεί με την μυελοίνωση.

Επίσης έχει αναφερθεί πνευμονική υπέρταση στους ασθενείς με ΜΙ. Συνήθως οι άρρωστοι αυτοί παρουσιάζονται με δύσπνοια, καρδιακή ανεπάρκεια και ταχέως επιδεινούμενη ηπατοσπληνομεγαλία.

Παρατηρείται αύξηση της πνευμονικής αρτηριακής πίεσης και πολλοί από τους ασθενείς αυτούς καταλήγουν λόγω καρδιοπνευμονικών επιπλοκών, εντός 18 μηνών από την διάγνωση της πνευμονικής υπέρτασης. Η πνευμονική υπέρταση είναι το αποτέλεσμα είτε θρομβοεμβολικής νόσου ή πνευμονικής ίνωσης που οφείλεται στην κυκλοφορία ινογενετικών κυτταροκινών που παράγονται από τα δυσλειτουργικά κυκλοφορούντα μεγακαρυοκύτταρα και αιμοπετάλια (Reiter E, 1999).

Περίληψη των συμπτωμάτων και των αντικειμενικών ευρημάτων των ασθενών με **Πρωτοπαθή Μυελοίνωση κατά την διάγνωση:**

Συμπτώματα- αντικειμενικά ευρήματα	Επίπτωση %
Κόπωση	47-71%
Πυρετός	5-15%
Απώλεια βάρους	7-39%
Εφιδρώσεις	6-21%
Συμπτώματα λόγω σπληνομεγαλίας	11-48%
Αιμορραγία	5-20%
Ουρική αρθρίτιδα ή νεφρολιθίαση	6-13%
Ωχρότης	60%
Πετέχειες ή εκχυμώσεις	15-20%
Σπληνομεγαλία	89-99%
Ηπατομεγαλία	39-70%
Περιφερικό οίδημα	13%
Πυλαία υπέρταση	2-6%



Λεμφαδενοπάθεια	1-10%
Ίκτερος	0-4%
Ασυμπτωματικοί	16-30%

### 3.5.Εργαστηριακά ευρήματα

Προσεκτική εξέταση του επιχρίσματος του αίματος και του μυελού των οστών οδηγεί στην διάγνωση της MI. Η λευκοερυθροβλαστική αντίδραση με δακρυοκυττάρωση είναι χαρακτηριστικά ευρήματα της νόσου.

Η λευκοερυθροβλαστική αντίδραση χαρακτηρίζεται από την παρουσία εμπύρηνων ερυθρών και άωρων μυελικών στοιχείων στο 96% των περιπτώσεων. Μεγαθρομβοκύτταρα και θραύσματα μεγακαρυοκυττάρων είναι συχνά ευρήματα.

Ο αριθμός των δακρυοκυττάρων μειώνεται μετά την σπληνεκτομή ή την έναρξη θεραπείας (Sacci S, 1999).

Στο 60% των ασθενών η αιμοσφαιρίνη είναι μικροτερη από 10g/dl. Η παθογένεια της αναιμίας είναι πολυπαραγοντική και περιλαμβάνει μη αποδοτική ερυθροποίηση, ελαττωμένη αντιπροσώπευση της ερυθράς σειράς στο μυελό των οστών, αιμοαραιώση λόγω αυξημένου όγκου πλάσματος στα πλαίσια της σπληνομεγαλίας, αιμόλυση στο 15% των ασθενών, και ένδεια φυλικού οξέος.

Από τους ασθενείς με μειωμένη μάζα ερυθρών, οι 95% έχουν ορθόχρωμους, ορθοκυτταρικούς δείκτες ερυθρών.

Υπόχρωμη μικροκυτταρική αναιμία μπορεί να παρουσιαστεί στο 5% των ασθενών με MI, λόγω αιμορραγίας κισών οισοφάγου, γαστρίτιδος ή ενδοαγγειακής αιμόλυσης.

Λευκοπενία μπορεί να συμβεί στο 13%-25% των ασθενών και λευκοκυττάρωση έχει παρατηρηθεί στο 1/3 των ασθενών. Ο μέσος αριθμός λευκών αιμοσφαιρίων είναι 16.600/mm<sup>3</sup>. Συχνά ευρήματα είναι η παρουσία στο αίμα βλαστικών κυττάρων και κοκκιοκυττάρων με την ανωμαλία Pseudo Pelger . Η αλκαλική φωσφατάση των ουδετεροφίλων είναι φυσιολογική ή αυξημένη σε αντίθεση με την Χρόνια Μυελογενή Λευχαιμία, όπου είναι μηδέν (Hehlmann R. 1998).

Ο αριθμός των αιμοπεταλίων επίσης ποικίλλει. Στο προινωτικό στάδιο της νόσου, περίπου το 90% των ασθενών έχουν αιμοπετάλια > 500.000/mm<sup>3</sup>. Στο 15% των ασθενών, υπάρχουν ανωμαλίες που υποδηλώνουν ΔΕΠ, όπως μειωμένος αριθμός αιμοπεταλίων, μειωμένα επιπεδα του παράγοντα πήξεως V και VIII, και αυξημένα προϊόντα αποδομής ινωδογόνου-ινώδους. Η ΔΕΠ στην MI είναι συνήθως



ασυμπτωματική και δυστυχώς μπορεί να γίνει κλινικώς εμφανής, μετά από χειρουργική παρέμβαση. Η ηπατική δυσπραγία που μπορεί να συνυπάρχει, οδηγεί στην παράταση του χρόνου προθρομβίνης (Hehlmann R. 1998).

Συχνό εύρημα σε ασθενείς σε προχωρημένο στάδιο, αποτελεί η αύξηση της LDH του ορού. Αντίθετα μόνο το 20% των ασθενών που βρίσκονται στο προινωτικό στάδιο της νόσου, έχουν αυξημένη LDH.

Οι ασθενείς με MI μπορεί επίσης να παρουσιάζουν μειωμένη χοληστερόλη, και το κλάσμα HDL/LDH cholesterol ευρίσκεται μειωμένο.

Επιπλέον εργαστηριακές ανωμαλίες που μπορεί να υπάρχουν σε ασθενείς με MI είναι οι εξής:

Το γαλακτικό οξύ είναι αυξημένο στο 95% των ασθενών, η χολερυθρίνη στο 40%, το ουρικό οξύ στο 60% και η αλκαλική φωσφατάση και η γλουταμική οξαλοξική τρανσαμινάση στο 50%. (Moracova J, 1999).

Μια ποικιλία ανοσολογικών ανωμαλιών είναι αρκετά συχνές, όπως η παρουσία αντιπυρηνικών αντισωμάτων, η αύξηση του ρευματοειδούς παράγοντα, χαμηλές τιμές συμπληρώματος, θετική άμεση Coombs και παρουσία αντιπηκτικού του λύκου (Murgio AJ 2001).

Μερικοί ερευνητές θεωρούν ότι οι ανωμαλίες του συμπληρώματος παίζουν σημαντικό ρόλο στην πρόοδο της νόσου, ενώ άλλοι υποθέτουν ότι χαμηλά επίπεδα συμπληρώματος προδιαθέτουν στην ανάπτυξη σοβαρών βακτηριακών λοιμώξεων. Επίσης στο 8-10% των ασθενών υπάρχει μονοκλωνική γαμμαπάθεια.

Επιτυχής αναρρόφηση μυελού των οστών είναι ασυνήθης, με ξηρά αναρρόφηση μυελού (dry tap) στο 50% των περιπτώσεων. Η οστεομυελική βιοψία είναι απαραίτητη σε όλες τις περιπτώσεις για την αξιολόγηση του ποσοστού υπάρχοντος αιμοποιητικού ιστού και του βαθμού ίνωσης του μυελού (Murgio AJ, 2001).

Οι περισσότερες οστεομυελικές βιοψίες στην MI, παρουσιάζουν υπερκυτταρικό μυελό με αυξημένο αριθμό μεγακαρυοκυττάρων. Τα μεγακαρυοκύτταρα συρρέουν και είναι άτυπα. Η άτυπη μορφολογία τους είναι εντονότερη απ'ότι σε άλλα μυελουπερπλαστικά σύνδρομα και χαρακτηρίζεται από μεγάλα μεγακαρυοκύτταρα, με γυμνούς, νεφελοειδείς πυρήνες και διαταραχές του λόγου κυτταροπλάσματος πυρήνα. Το ποσοστό των βλαστών στην MI είναι κάτω του 20%, όμως η ανεύρεση βλαστών σε ποσοστό 10-19%, υποδηλώνει την επιταχυνόμενη φάση της νόσου.





Μυελός με βλάστες >20%, είναι συμβατός με εκτροπή της ΜΙ σε οξεία λευχαιμία. Ίνωση μυελού και οστεοσκλήρυνση παρατηρήθηκε στο 67% και 54% αντίστοιχα.

### 3.6.Κυτταρογενετικά και μοριακά ευρήματα

Ο καρυότυπος είναι παθολογικός στο 40% των ασθενών. Οι πιο συχνές κυτταρογενετικές ανωμαλίες είναι η τρισωμία 8, η τρισωμία 1q, και σπάνια η τρισωμία 9, η έλλειψη στις περιοχές 20q και 13q.

Σε όλες τις περιπτώσεις, θα πρέπει να αποκλείεται η Χρόνια Μυελογενής Λευχαιμία με συμβατικό καρυότυπο για αναζήτηση του χρωμοσώματος Φιλαδέλφεια και RT PCR για την παρουσία του BCR-ABL.

### 3.7.Διαγνωστικ κριτήρια μυελοίνωσης

<b>ΚΡΙΤΗΡΙΑ WHO ΓΙΑ ΤΗΝ ΔΙΑΓΝΩΣΗ ΚΑΙ ΣΤΑΔΙΟΠΟΙΗΣΗ ΤΗΣ ΠΡΟ ΜΥΕΛΟΙΝΩΣΗΣ (pre PMF)</b>
<b>ΜΕΙΖΟΝΑ ΚΡΙΤΗΡΙΑ</b>
1.Υπερπλασία και ατυπία των μεγακαρυοκυττάρων, χωρίς ίνωση ρετικουλίνης> grade 1,που συνοδεύεται από αυξημένη κυτταροβρίθεια μυελού για την ηλικία του ασθενούς, υπερπλασία της κοκκιώδους σειράς, και συχνά μειωμένη ερυθροποίηση.
2. Απουσία άλλου Μυελουπερπλαστικού ή Μυελοδυσπλαστικού Συνδρόμου
3. Παρουσία της JAK2, CALR, ή MPL μετάλλαξης ή επί απουσία αυτών, παρουσία άλλου κλωνικού δείκτη ( ASXL1,EZH2, TET2, IDH1/IDH2, SRSF2, SF3B1)
<b>ΕΛΑΣΣΟΝΑ ΚΡΙΤΗΡΙΑ</b>
Παρουσία τουλάχιστον 1 από τα κάτωθι, που να επιβεβαιώνεται από 2 συνεχόμενες μετρήσεις:
A) Αναιμία που δεν οφείλεται συννοσηρότητα
B) Λευκοκυττάρωση >11 x 10 <sup>9</sup> /L
Γ) Ψηλαφητή σπληνομεγαλία
Δ) Αυξημένη LDH

*Η διάγνωση της προ ΜΙ απαιτεί την παρουσία και των τριών μειζόνων κριτηρίων, και τουλάχιστον ένα έλασσον κριτήριο.*



## ΚΡΙΤΗΡΙΑ WHO ΓΙΑ ΤΗΝ ΔΙΑΓΝΩΣΗ ΚΑΙ ΣΤΑΔΙΟΠΟΙΗΣΗ ΤΗΣ ΦΑΝΕΡΗΣ ΜΥΕΛΟΙΝΩΣΗΣ (overt PMF)

### ΜΕΙΖΟΝΑ ΚΡΙΤΗΡΙΑ

1. Υπερπλασία και ατυπία των μεγακαρυοκυττάρων, με συνοδό ίνωση ρετικουλίνης ή/και ίνωση κολλαγόνου grade 2 ή 3.

2. Απουσία άλλου Μυελουπερπλαστικού ή Μυελοδυσπλαστικού Συνδρόμου

3. Παρουσία της JAK2, CALR, ή MPL μετάλλαξης ή επί απουσία αυτών, παρουσία άλλου κλωνικού δείκτη ( ASXL1, EZH2, TET2, IDH1/IDH2, SRSF2, SF3B1)

### ΕΛΑΣΣΟΝΑ ΚΡΙΤΗΡΙΑ

Παρουσία τουλάχιστον 1 από τα κάτωθι, που να επιβεβαιώνεται από 2 συνεχόμενες μετρήσεις:

A) Αναιμία που δεν οφείλεται συννοσηρότητα

B) Λευκοκυττάρωση  $>11 \times 10^9/L$

Γ) Ψηλαφητή σπληνομεγαλία

Δ) Αυξημένη LDH

E) Λευκοερυθροβλάστωση

***Η διάγνωση της φανερούς ΜΙ απαιτεί τρία μείζονα κριτήρια και τουλάχιστον ένα έλασσον.***

### Ταξινόμηση της ΜΙ

MI-0 Διάσπαρτη γραμμική ρετικουλίνη χωρίς διασταυρώσεις ( crossovers), που αντιστοιχεί σε φυσιολογικό μυελό.

MI-1 Χαλαρό δίκτυο ρετικουλίνης, με πολλές διασταυρώσεις κυρίως γύρω από τις περιαγγειακές περιοχές.

MI-2 Διάχυτη και πυκνή αύξηση της ρετικουλίνης με εκτεταμένες διασταυρώσεις, περιστασιακά με εστιακές δεσμίδες παχιών ινών που συνάδουν με κολλαγόνο ή/και εστιακή οστεοσκλήρυνση.

MI-3 Διάχυτη και πυκνή αύξηση της ρετικουλίνης με εκτεταμένες διασταυρώσεις και πυκνές δεσμίδες παχιών ινών που αποτελούνται από κολλαγόνο, και κυρίως σχετίζονται με οστεοσκλήρυνση.



## Κριτήρια Κλωνίας για την διάγνωση και σταδιοποίηση της Χρόνιας Ιδιοπαθούς Μυελοίνωσης

<p>A1-Κλινικά- Απουσία άλλου Μυελουπερπλαστικού ή Μυελοδυσπλαστικού Συνδρόμου</p>	<p>B1-Ευρήματα OMB</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>-Υπερπλασία κοκκιδόδους και μεγακαρυοκυτταρικής σειράς</li> <li>-Σχετική ελάττωση ερυθράς σειράς</li> <li>-Αύξηση μεγακαρυοκύτταρων σε σωρούς</li> <li>-΄Ατυπα, γιγάντια αιμοπετάλια με διαταραχές ωρίμανσης.</li> </ul>
<b>Σταδιοποίηση</b>	
<b>Κριτήρια</b>	<b>Κατάταξη</b>
<p>A2- Αναιμία: απύσα (HB&gt;12g/dl)</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>-Θρομβοκυττάρωση (Plts&gt; 400x10<sup>9</sup>/l)</li> <li>-Λευκοερυθροβλαστική αντίδραση: απύσα</li> <li>- Σπληνομεγαλία: ήπια ή μέτρια</li> <li>-Δυσμενείς προγνωστικοί παράγοντες: απόντες</li> </ul>	<p>MF0- Προινωτικό στάδιο, χωρίς ίνωση ρετικούλινης</p>
<p>A3- Αναιμία: μέτρια -Αιμοσφαιρίνη ( HB&gt; 10g/dl)</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>-Αιμοπετάλια ( Plts &gt;300x10<sup>9</sup>/l)</li> <li>-Σπληνομεγαλία</li> <li>-Λευκοερυθροβλαστική αντίδραση+-δακρυοκυττάρωση</li> <li>-Δυσμενείς προγνωστικοί παράγοντες : απόντες</li> </ul>	<p>MF1- Πρώιμη MI: ήπια ίνωση ρετικούλινης</p> <p>MF2- Έκδηλη MI: εκσεσημασμένη ίνωση ρετικούλινης ίνωση ρετικούλινης ή/και κολλαγόνου</p>
<p>A4-&gt; εκ των κατώτερων δυσμενών προγνωστικών παραγόντων:</p>	<p>MF3 -Έντονη κολλαγόνος ίνωση/ Οστεοσκλήρυνση</p>



<ul style="list-style-type: none"><li>-Αναιμία σοβαρή ( HB&lt; 10g/dl)</li><li>-Αιμοπετάλια ( Plts&lt; 300x109/l)</li><li>-Λευκά: (WBC&gt;20X109/L)</li><li>-Βλάστες αίματος: &gt;2%</li><li>-Ερυθροβλάστες αίματος: &gt;2%</li><li>-Ογκώδης Σπληνομεγαλία</li><li>-Σοβαρά γενικά συμπτώματα</li><li>-Ηλικία &gt;70 έτη</li><li>-Καρυοτυπικές διαταραχές</li></ul>	
Η διάγνωση της ΜΙ απαιτεί να πληρούνται τα κριτήρια A1+B1 και την παρουσία σπληνομεγαλίας είτε κλινικώς (ψηλαφητός σπλην) είτε ακτινολογικώς (>11 εκ υπερηχογραφικώς)	Η διάγνωση της ΜΙ απαιτεί να πληρούνται τα κριτήρια A1+B1 και την παρουσία σπληνομεγαλίας είτε κλινικώς (ψηλαφητός σπλην) είτε ακτινολογικώς (>11 εκ υπερηχογραφικώς)

### 3.8. Θεραπευτική αντιμετώπιση ασθενών με ΜΙ

Η ιεράρχηση των θεραπευτικών ενεργειών σε κάθε ασθενή βασίζεται στην εκτίμηση των κλινικών συμπτωμάτων και στην πρόγνωση. Γενικά η θεραπεία ενδείκνυται όταν υπάρχει αναιμία, σπληνομεγαλία, αιμορραγική διάθεση, απειλητική για τη ζωή θρομβοπενία, σοβαρή υπερουριχαιμία, πυλαία υπέρταση, οστικά άλγη και συστηματικά συμπτώματα όπως πυρετός, εφιδρώσεις και απώλεια βάρους. Η υπερουριχαιμία θα πρέπει να διορθώνεται σε όλους τους ασθενείς και σε αυτή την περίπτωση προτείνεται η χορήγηση αλλοπουρινόλης 300mg ημερησίως.

#### Αλλογενής μεταμόσχευση αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων

Η αλλογενής μεταμόσχευση λαμβάνεται υπόψιν σε ασθενείς με πτωχούς προγνωστικούς δείκτες και μειωμένη πιθανότητα επιβίωσης. Όλοι οι ασθενείς νεότεροι των 70 ετών και τα αδέρφια τους θα πρέπει να ελέγχονται για την εύρεση συμβατού δότη. Η αλλογενής μεταμόσχευση είναι η μόνη θεραπεία με αποτέλεσμα στην επιβίωση. Οι ασθενείς με νόσο υψηλού και ενδιάμεσου κινδύνου με συμβατούς δότες θα πρέπει να λαμβάνουν υπόψιν την θεραπεία αυτή πριν αναπτύξουν



σημαντική επιδείνωση. Η θνητότητα εκ της συμβατικής αλλογενούς μεταμόσχευσης εντός ενός χρόνου είναι μεταξύ 20% και 30%. Η προχωρημένη ηλικία και παράγοντες που σχετίζονται με προχωρημένη νόσο όπως  $HB < 10 \text{g/dL}$ , αυξημένος αριθμός μεταγγίσεων ερυθρών, αυξημένος αριθμός κλωνικών ανωμαλιών και παρουσία μυελοσκληρύωσης, επηρέαζαν αρνητικά την έκβαση της νόσου.

### Αναιμία

Η αναιμία είναι ένα συχνό πρόβλημα στους ασθενείς με ΜΙ. Ο τρόπος αντιμετώπισης της συμπτωματικής αναιμίας είναι οι μεταγγίσεις συμπυκνωμένων ερυθρών.

Τα κορτικοστεροειδή (π.χ., πρεδνιζολόνη  $1 \text{ mg/kg}$  ημερησίως) έχουν χρησιμοποιηθεί επιτυχώς όταν συνυπάρχει και αιμολυτικό στοιχείο.

Η χορήγηση ανδρογόνων όπως οξυμεθολόνη ή δαναζόλη επίσης ενδείκνυνται στην αναιμία και περίπου 20%-30% των ασθενών ανταποκρίνονται εντός 3-6 μηνών αποφεύγοντας τις μεταγγίσεις συμπυκνωμένων ερυθρών. Οι ασθενείς με χρωμοσωμικές ανωμαλίες φαίνεται ότι δεν ανταποκρίνονται στην θεραπεία με ανδρογόνα. Επίσης μπορεί να χορηγηθεί ανασυνδυασμένη ερυθροποιητίνη και επί αστοχίας των ανωτέρω παραγόντων μπορεί να χορηγηθεί θαλιδομίδη.

Η ανάλυση 5 ερευνών φάσης II, έδειξαν ότι 29% των ασθενών με μέτρια έως σοβαρή αναιμία, αύξησαν την αιμοσφαιρίνη τους και δεν χρειάζονταν μεταγγίσεις συμπυκνωμένων ερυθρών. Αυτοί οι ασθενείς λάμβαναν θαλιδομίδη  $200-800 \text{mg}$  ημερησίως. Λόγω των επιπλοκών που ανέπτυξαν όμως όπως περιφερική νευροπάθεια και θρομβώσεις, η χορήγηση θαλιδομίδης  $50 \text{ mg}$  ημερησίως με ή χωρίς κορτικοστεροειδή, θεωρήθηκε καλύτερα ανεκτή, με 31% των ασθενών να ανταποκρίνονται στη θεραπεία.

### Συμπτωματική σπληνομεγαλία

Οι ασθενείς με συμπτωματική σπληνομεγαλία μπορούν να λάβουν υδροξουρία σε δόση  $20-30 \text{mg/kg}$  βάρους τρεις φορές την εβδομάδα ή μπορεί να χορηγηθεί άπαξ ημερησίως. Η υδροξουρία μπορεί να δοθεί εφόσον η γενική αίματος είναι ικανοποιητική.

Εάν η θεραπεία αυτή αποτύχει ή ο ασθενής έχει και άλλα συμπτώματα τότε μπορεί να χορηγηθεί η ρουξολιτινίμη (JAK2 αναστολέας)



που έχει εγκριθεί για ασθενείς με ενδιάμεσου και υψηλού κινδύνου ΜΙ. Επιπλέον η χρήση της ρουξολιτινίμπης δεν ενδείκνυται σε ασθενείς που έχουν αιμοπετάλια <math>50 \times 10^9/L</math>.

#### Αιμορραγικές εκδηλώσεις

Επί σοβαρής θρομβοπενίας με αιμοπετάλια <math>< 20 \times 10^9/L</math>, συνιστάται υποστηρικτική αγωγή με μεταγγίσεις αιμοπεταλίων. Περίπου 20%-30% των ασθενών με σοβαρή θρομβοπενία έχουν σημαντική βελτίωση στις τιμές των αιμοπεταλίων μετά από σπληνεκτομή.





## **Κεφάλαιο 4 Το μικροπεριβάλλον του μυελού των οστών**

### **4.1.Εισαγωγή**

Το μικροπεριβάλλον όπου βρίσκονται και αναπτύσσονται τα αιμοποιητικά κύτταρα, ασκεί ρυθμιστική δράση στην επιβίωση, στην φάση ηρεμίας, στην διαφοροποίηση, στην μετανάστευση, στην γονιδιακή έκφραση και στον θάνατό τους, παρέχοντας σημαντικά σήματα για την διατήρηση των αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων και των προγονικών κυττάρων. Το πολύπλοκο μικροπεριβάλλον που συμπεριλαμβάνει την αγγείωση του μικροπεριβάλλοντος (vascular niche), και την ενδοστική επιφάνεια (endosteal niche), παρέχει τις κατάλληλες συνθήκες για επιβίωση πολλών ειδών κυττάρων, συμπεριλαμβανομένων των μεσεγχυματικών στρωματικών κυττάρων και των παραγώνων τους όπως τα κύτταρα Ca<sub>2</sub> που εκφράζουν υψηλά επίπεδα χυμοκινών C-X-C, motif ligand 12, οστεοβλαστικά κύτταρα, ενδοθηλιακά κύτταρα και μεγακαρυοκύτταρα. Στην ενδοστική επιφάνεια εντοπίζονται οι εσοχές των στελεχιαίων αιμοποιητικών κυττάρων (Yin T, 2006). Τα στελεχιαία κύτταρα βρίσκονται σε στενή επαφή με τους οστεοβλάστες, οι οποίοι είναι απαραίτητοι για την διατήρηση και τον πολλαπλασιασμό τους μέσω της αλληλεπίδρασης των πρωτεϊνών N- Cadherin και B Catenin. Στην διαδικασία διατήρησης, αυτοανανέωσης και διαφοροποίησης των στελεχιαίων αιμοποιητικών κυττάρων, αλλά και στην μυελική αναγέννηση, λαμβάνουν μέρος αιμοποιητικοί παράγοντες οι οποίοι απελευθερώνονται με την ενεργοποίηση μεταλλοπρωτεϊνών (MMP-9), υπό την επίδραση χημειοκίνης που παράγεται από το στρώμα (Stromal derived Factor-1, SDF-1). Οι αιμοποιητικοί παράγοντες παράγονται κυρίως από τα κύτταρα του στρώματος και είναι διαλυτοί ή συνδεδεμένοι με την μεμβράνη (Calvi LM, 2003). Ο χαρακτηρισμός των κυτταρικών και μοριακών δικτύων που λειτουργούν στην «φωλιά» των αιμοποιητικών στελεχιαίων κυττάρων, άνοιξε νέους ορίζοντες στην κατανόηση της αμφίδρομης διακυτταρικής επικοινωνίας μεταξύ των στελεχιαίων αιμοποιητικών κυττάρων και στρωματικών κυττάρων σε φυσιολογικές και κακοήθεις καταστάσεις (Nilsson SK, 2001).

Η δομική και λειτουργική αναδιαμόρφωση της «φωλιάς» (remodeling of the niche), μπορεί να συμβάλλει στην ανάπτυξη των μυελουπερπλαστικών παθήσεων. Κακοήθη





στελεχιαία αιμοποιητικά κύτταρα, αλλοιώνουν την λειτουργία και την επιβίωση των μεσεγχυματικών κυττάρων, που δεν ανήκουν στο νεοπλασματικό κλώνο.

Για παράδειγμα, μείωση της νεστίνης των μεσεγχυματικών κυττάρων λόγω απόπτωσης, έχει βρεθεί σε ασθενείς με νευρογλιακή βλάβη στους ΜΥΣ (Kiel MJ, 2005). Μη καρκινικά μεσεγχυματικά κύτταρα προάγουν την επιθετικότητα και την αντίσταση στα φάρμακα των κακοήθων κυττάρων. Στο μέλλον, στρατηγικές που θα εξουδετερώνουν την παθολογική αλληλεπίδραση μεταξύ της niche και των κακοήθων αιμοποιητικών κυττάρων, μπορεί να προσφέρουν επιπλέον θεραπευτικές στρατηγικές για τους ασθενείς με ΜΥΣ.

#### **4.2.Τα οστικά κύτταρα**

Τα κύτταρα είναι τριών ειδών : οι οστεοβλάστες, οι οστεοκλάστες και τα οστεοκύτταρα.

Οι **οστεοβλάστες** βρίσκονται κυρίως στο μυελό των οστών και στο περιόστεο, και προέρχονται από τα αρχέγονα μεσεγχυματικά κύτταρα. Διάφοροι ρυθμιστικοί παράγοντες όπως ο transcription factor Cbfa1/ Runx2/ osterix, δρουν στα προγονικά τους κύτταρα και τους διαφοροποιούν σε ώριμους οστεοβλάστες. Είναι υπεύθυνοι για την παραγωγή της μεσοκυττάριας ουσίας και την παραγωγή του υδροξυαπατίτη . Οι οστεοβλάστες εκκρίνουν σε μεγάλες ποσότητες κυτταροκίνες όπως είναι οι αυξητικοί παράγοντες **TGF-β2** και **IGF-1** και πρωτείνες όπως η οστεοκαλσίνη, η οστεονεκτίνη και η οστεοποντίνη (Arai F, 2004).

Επίσης, υπεύθυνοι για την δημιουργία των οστεοκλαστών είναι οι οστεοβλάστες που έχουν την μορφή **επενδυματικών κυττάρων ή στρωματικών** κυττάρων.

Αφού έχει δημιουργηθεί η οστική μάζα, οι οστεοβλάστες διαφοροποιούνται σε ένα άλλο είδος κυττάρων, τα οστεοκύτταρα, των οποίων το σχήμα είναι αστεροειδές, 9-20 μm και περιβάλλονται από την θεμέλια ουσία, έχοντας άφθονες δενδριτικού τύπου προσεκβολές που βοηθούν στην ενδοκυτταρική επικοινωνία (Varnum-Finney B, 1998).

Οι **οστεοκλάστες** είναι γιγαντοκύτταρα, με πολλούς πυρήνες και άφθονο κυτταρόπλασμα που προέρχονται από την εξέλιξη των μονοπυρήνων μακροφάγων του αίματος. Ο ρόλος των οστεοκλαστών είναι: α) η λύση της μεσοκυττάριας ουσίας των οστών και η απόδοση ασβεστίου στον οργανισμό απομακρύνοντας κατεστραμμένα οστεοκύτταρα και μεσοκυττάρια ουσία, β) η διατήρηση του οστού



και η επιδιόρθωση διαφόρων μικροβλαβών, γ) η ρύθμιση της διαφοροποίησης των οστεοβλαστών, δ) η μετακίνηση των αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων από τον μυελό των οστών στην περιφερική κυκλοφορία, ε) συμμετοχή στην ανοσολογική απόκριση (Holtrop 1977, Arai F, 2004).

Ο **οστεοκλάστης** είναι ένα μεγάλο πολυπύρηνο κύτταρο, διαμέτρου 15-20 μm. Ευρίσκεται στα βοθρία του Howship και χαρακτηρίζεται από ένα ομοιογενές, «αφρώδες» κυτταρόπλασμα. Αυτό οφείλεται στην υψηλή συγκέντρωση κυστιδίων και κενοτοπίων. Τα κυστίδια αυτά μπορεί να είναι λυσοσωμάτια που περιέχουν άφθονη **όξινη φωσφατάση** (tartrate resistant acid phosphatase (TRAP) όπως και **Καθεψίνη K** (cathepsin K). Το ενδοπλασματικό δίκτυο των οστεοκλαστών είναι αραιό, ενώ το σύμπλεγμα Golgi είναι εκτεταμένο (Kondo M, 2003). Η κυτταρική τους μεμβράνη στη περιοχή που εφάπτεται με το οστόν έχει πτυχωτή μορφή, αυξάνοντας έτσι την κυτταρική επιφάνεια και οδηγεί στην απορρόφηση οστού.

Οι οστεοκλάστες ανακαλύφθηκαν περί το 1873 και υπήρχαν 3 θεωρίες για την προέλευσή τους: Από το 1949-1970 η προέλευση από τον συνδετικό ιστό ήταν δημοφιλής, όπου οι οστεοκλάστες και οι οστεοβλάστες προέρχονταν από την ίδια κυτταρική σειρά, με την σύντηξη των οστεοβλαστών να δημιουργούν οστεοκλάστες. Μετά από χρόνια αμφισβητήσεων, είναι πιά ξεκάθαρο ότι αυτά τα κύτταρα προέρχονται από την σύντηξη μακροφάγων (Manabe A 1992, Ponce 2012).

Η δημιουργία των οστεοκλαστών γίνεται με την επίδραση δύο ουσιών του M-CSF (Macrophage Colony-Stimulating Factor) και του RANKL (Receptor Activator of Nuclear factor Kβ Ligand) που εκκρίνονται από τους οστεοβλάστες και τα γειτονικά στρωματικά κύτταρα του οστού.

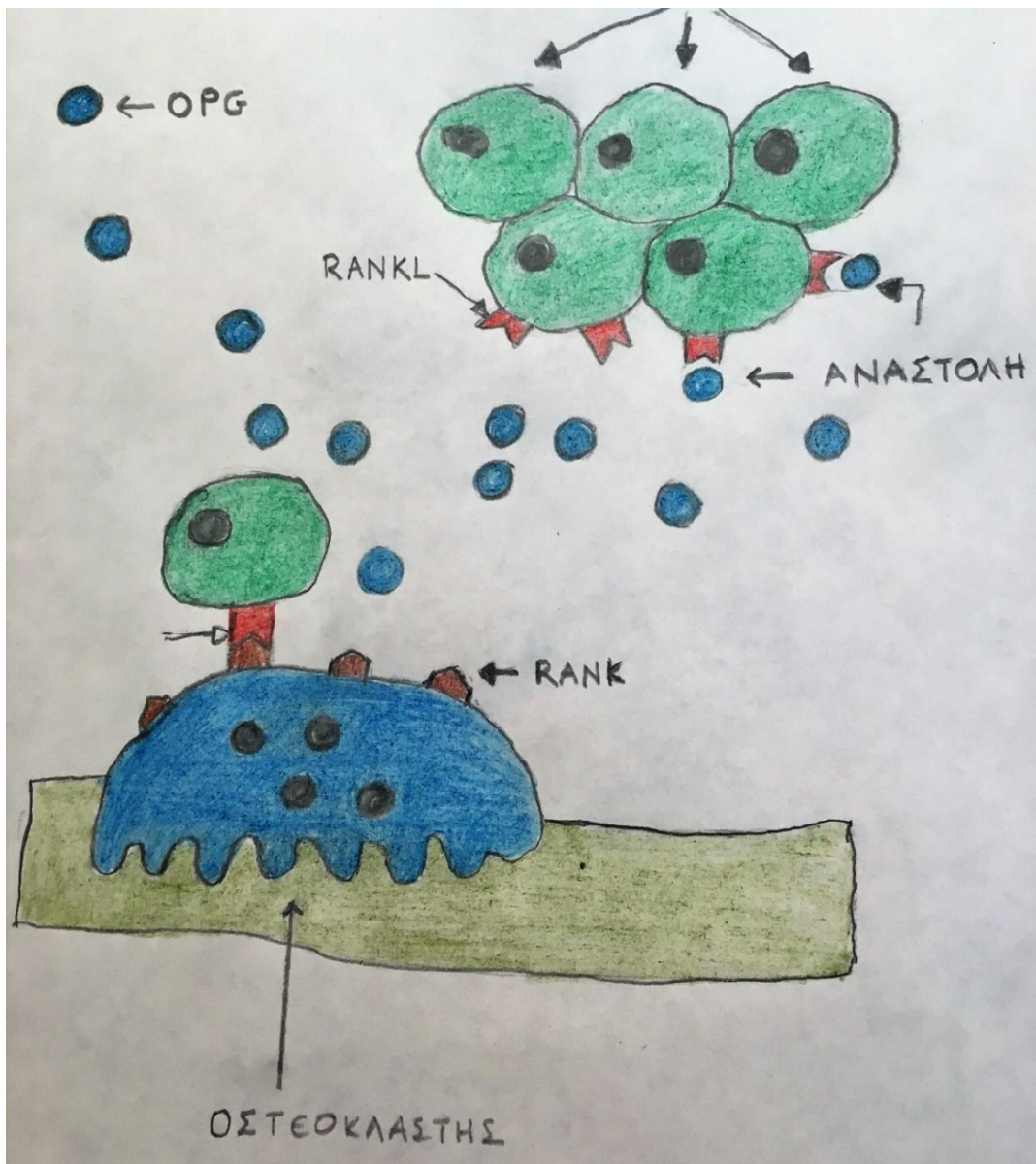
Τα οστεοκύτταρα είναι το αποτέλεσμα της διαφοροποίησης των οστεοβλαστών σε κύτταρα με σφηνοειδές σχήμα και πολλαπλές αποφυάδες που τα βοηθούν να επικοινωνούν μεταξύ τους αλλά και με τα υπόλοιπα κύτταρα. Δρουν ως μηχανοποδοχείς αξιολογώντας τις δυνάμεις που εξασκούνται στα οστά και επικοινωνούν με τις εξωκυττάρια ουσίες, ελέγχοντας έτσι την ανάπτυξη των οστών. (Frost H.M., Ηλιόπουλος Α. Ελληνική Ρευματολογία 2000)



Ο **RANKL** είναι μια κυτταροκίνη που ανήκει στην υπεροικογένεια του TNF (Tumor Necrosis Factor), βασική για την οστεοκλαστογένεση. Η αναστολή της σύνδεσης του RANKL με τον υποδοχέα του RANK οδηγεί σε αναστολή της οστεόλυσης.

Η κυτταροκίνη που αναστέλλει την διαφοροποίηση των οστεοκλαστών είναι η **Οστεοπροτεγερίνη (OPG)**. Ανήκει στην υπεροικογένεια του TNF (Tumor Necrosis Factor), εκκρίνεται από τους οστεοβλάστες και συνδέεται στον RANKL, εμποδίζοντάς τον να συνδεθεί με τον υποδοχέα του RANK. Έτσι αναστέλλεται η ωρίμανση των μακροφάγων σε οστεοκλάστες (Manabe A, 1994).

Στην κάτωθι εικόνα, απεικονίζονται οι οστεοβλάστες και τα στρωματικά κύτταρα σε πράσινο χρώμα που παράγουν οστεοπροτεγερίνη:





Ο ώριμος οστεοκλάστης μετακινείται στις περιοχές όπου υπάρχει οστικό κάταγμα με χημειοταξία. Προσκολλάται στα βοθρία του **Howship**, και αρχίζει τη διαδικασία της οστεόλυσης και της απορρόφησης της θεμέλιας ουσίας των οστών. Για να δράσει ο οστεοκλαστής πρέπει η **πτυχωτή του μεμβράνη να ενωθεί** με τη θεμέλιο ουσία και να δημιουργηθεί η **σφραγισμένη ζώνη** (sealing zone) (Iwamoto S, 2007). Η προσκόλληση του οστεοκλάστη στη θεμέλιο ουσία επιτυγχάνεται με ειδικές προσκολλητικές πρωτεΐνες, τις **Ιντεγκρίνες** (ανβ3), οι οποίες δεσμεύονται με πρωτεΐνες της θεμέλιας ουσίας, όπως είναι η **Οστεοποντίνη**. Οι σχηματισμοί αυτοί ονομάζονται **ποδοσωμάτια** (podosomes).

### 4.3. Κυτταροκίνες

Η θρομβοποιητίνη είναι ο κύριος ρυθμιστής της μεγακαρυοκυτταροποίησης και της παραγωγής αιμοπεταλίων, δρώντας στα προγονικά κύτταρα στο μυελό των οστών. Η θρομβοποιητίνη συνδέεται με τον κυτταρικό υποδοχέα της, ο οποίος κωδικοποιείται από το πρωτοογκογονίδιο c-mpl, στα CD34+ προγονικά αιμοποιητικά κύτταρα, στα μεγακαρυοκύτταρα και στα αιμοπετάλια. Τα επίπεδα θρομβοποιητίνης στην ιδιοπαθή θρομβοκυττάρωση είναι υψηλά ή φυσιολογικά λόγω της μειωμένης έκφρασης του υποδοχέα c-mpl στην επιφάνεια των κλωνικών μεγακαρυοκυττάρων και αιμοπεταλίων (Nishiyama, 2002).

Στην IM, ουσίες που εκκρίνονται από τα μεγακαρυοκύτταρα και τα αιμοπετάλια και οδηγούν σε ίνωση είναι: ο αυξητικός παράγοντας προερχόμενος από τα αιμοπετάλια (PDGF), ο αυξητικός παράγοντας του ενδοθηλίου προερχόμενος από τα αιμοπετάλια (PDEGF), ο μετατρεπτικός παράγοντας β,(TGF-B), ο αιμοπεταλιακός παράγοντας 4 (PF4).

Μία πρόσφατη μελέτη έδειξε την σημασία μίας άλλης κυτταροκίνης, της θρομβοσπονδίνης-1 (Thrombin sensitive protein-1). Πρόκειται για γλυκοπρωτεΐνη που βρίσκεται στα α-κοκκία των αιμοπεταλίων, συμμετέχει στην άθροιση των αιμοπεταλίων και στη δημιουργία θρόμβου, όπως επίσης παίζει ρόλο στην κυτταρική προσκόλληση και στην αγγειογένεση. Επιπλέον ενεργοποιεί τον μετατρεπτικό αυξητικό παράγοντα β1 (Romeo, 2008). Ο μετατρεπτικός αυξητικός παράγοντας β1 (TGF β1) είναι μία κυτταροκίνη με πλειοτρόπο δράση, προκαλώντας ίνωση σε διάφορους ιστούς συμπεριλαμβανόμενου και του αιμοποιητικού ιστού.



Άλλη μελέτη σε ασθενείς με μυελοίνωση , έδειξε πως η παθολογική αύξηση κυτταροκινών όπως οι IL-1B, IL-1A, IL-2R, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IL-13, IL-15, TNFa, INF-a, αυξητικός παράγοντας των ηπατοκυττάρων, VEGF, MIG (monokine induced by interferon-γ) έχουν προγνωστική αξία για την έκβαση της νόσου. Επίσης τα επίπεδα των IL-8, IL-2R, IL-12 και IL-15 φαίνεται να είναι ανεξάρτητοι προγνωστικοί παράγοντες για την επιβίωση των ασθενών με MI. Υπάρχουν πολλά δεδομένα μελετών που υποστηρίζουν ότι το φορτίο νόσου στα ΜΥΣ οφείλεται στον πρωταρχικό νεοπλαστικό κλώνο αλλά και σε μία δευτεροπαθή φλεγμονή που οφείλεται στην ανώμαλη παραγωγή κυτταροκινών στο μικροπεριβάλλον του μυελού των οστών.το γεγονός ότι οι κυτταροκίνες οδηγούν σε ίνωση, αγγειογένεση και οστεοσκλήρυνση/οστεοπενία στα ΜΥΣ έχει τεκμηριωθεί. Συγκεκριμένα, οι FGF-b,IL-8, VEGF,HGF,PDGFR,TGF-b,TNF-a και OSM φαίνεται να παίζουν ρόλο στις αλλαγές του μικροπεριβάλλοντος του μυελού των οστών (Klemm, 2005).

Ο Tefferi και συν. διερεύνησαν την προγνωστική σημασία των κυτταροκινών στην MI. Στην συγκεκριμένη μελέτη οι IL-1B,IL-1RA,IL-2R,IL-6,IL-8,IL-10,IL-12,IL-13,IL-15, TNF-a, G-CSF, IFN-a, MIP-1b, HGF, IFN-γ inducible protein 10 (IP10), monokine induced by IFN-γ (MIG), monocyte chemotactic protein 1(MCP-1) και VEGF βρέθηκαν σε αυξημένα επίπεδα σε ασθενείς με MI (Piotrowski, 2011). Επιπλέον οι συγγραφείς βρήκαν τα επίπεδα των IL-8,IL-2R, IL-12 και IL-15, ανεξάρτητους προγνωστικούς παράγοντες για την επιβίωση ασθενών με MI. Αυτά τα ευρήματα συνάδουν με άλλες μελέτες που αποδεικνύουν το αυξημένο επίπεδο κυτταροκινών στην MI, την ΙΘ και την ΑΠ. Emadi και συν. μελέτησαν την παραγωγή IL-8 στην MI. Τα επίπεδα IL-8 στον ορό ασθενών με MI βρέθηκαν σημαντικά αυξημένα και η έκφρασή της παρατηρήθηκε σε διάφορα αιμοποιητικά κύτταρα, συμπεριλαμβανομένων των κοκκιοκυττάρων, μονοκυττάρων, μεγακαρυοκυττάρων ,CD34+ προγονικών κυττάρων και αιμοπεταλίων (Bishop,2007). Αυξημένα επίπεδα IL-8 έχουν επίσης περιγραφεί σε ασθενείς με ΑΠ και ΙΘ. Η IL-8 βρέθηκε να οδηγεί στη δημιουργία ερυθροκυτταρικών αποικιών in vitro.

Ανοσοιστοχημικές μελέτες που έγιναν σε τομές μυελού των οστών ασθενών με ΙΘ,ΑΠ και MI έδειξαν αυξημένη έκφραση του VEGF και του υποδοχέα του. Μεγακαρυοκύτταρα, μακροφάγα και πρόιμα κύτταρα της μυελικής σειράς έδειξαν



θετική ανοσοιστοχημεία, ενώ τα πρώιμα κύτταρα της ερυθράς σειράς βρέθηκαν αρνητικά για τον VEGF.

Ο Wickenhauser και συν, περιέγραψαν την παραγωγή του TGF- $\beta$  και του PDGFR στα φυσιολογικά ανθρώπινα μεγακαρυοκύτταρα. Επιπλέον μελέτες βρήκαν υψηλότερα επίπεδα του TGF- $\beta$  στα μεγακαρυοκύτταρα μυελών των οστών ασθενών με ΜΙ. Αντίθετα, ο TGF- $\beta$  δεν βρέθηκε αυξημένος στο μυελό των οστών με ΙΘ. Ο TNF- $\alpha$  επίσης βρέθηκε αυξημένος σε ορισμένους ασθενείς με ΜΙ. Ο Tefferi και συν μελέτησαν 127 ασθενείς με ΜΙ και παρατήρησαν υψηλότερα επίπεδα TNF- $\alpha$  σε σύγκριση με τα controls. Παρά ταύτα ένας ουσιώδης αριθμός ασθενών δεν έδειξε την ύπαρξη TNF- $\alpha$  στο περιφερικό αίμα και δεν υπήρξε συσχέτιση με κλινικές παραμέτρους ή πρόοδο νόσου (Deguchi, 2006)

#### **4.4. Ίνωση στα ΜΥΣ**

Η ίνωση θεωρείται μία αντιδραστική διαδικασία που συσχετίζεται με την αναγέννηση και αναδόμηση ιστών. Η ιστική ίνωση μπορεί να συμβεί σε διάφορα όργανα με την συμμετοχή των ινοβλαστών και άλλων κυττάρων του συνδετικού ιστού (Tefferi, 2014).

Η ίνωση είναι το μεγαλύτερο παθολογικό εύρημα στα ΜΥΣ. Η διαδικασία αυτή δεν αφορά μόνο στους τοπικούς ινοβλάστες και στα λευκά αιμοσφαίρια, αλλά και στην ανάπτυξη κυττάρων με μυοινοβλαστικό φαινότυπο. (myofibroblast phenotype). Οι παθολογικοί μηχανισμοί που οδηγούν στην ανάπτυξη ίνωσης στα ΜΥΣ, δεν έχουν ακόμα κατανοηθεί. Τα κύτταρα που συμμετέχουν σε αυτήν την διαδικασία, παράγουν διαφορετικούς αυξητικούς παράγοντες, προτεολυτικά ένζυμα, αγγειογενετικούς παράγοντες και κυτταροκίνες, που οδηγούν στην εναπόθεση των στοιχείων του συνδετικού ιστού. Αυτό οδηγεί στην προοδευτική αναδόμηση και τελικώς στην καταστροφή της αρχιτεκτονικής του φυσιολογικού ιστού (mediators of inflammation) (James, 2006).

Η ίνωση του μυελού των οστών είναι μια δευτεροπαθής διεργασία. Πιστεύεται ότι ο μεταλλαγμένος κλώνος ενεργοποιεί την παραγωγή του ινώδους ιστού από ινοβλάστες που είναι πολυκλωνικοί όπως φαίνεται από την κυτταρογενετική ανάλυση και την έκφραση G-6PD στα κύτταρα αυτά. Οι ινοβλάστες του μυελού των οστών φαίνεται ότι συμπεριφέρονται φυσιολογικά (Tefferi, 2014) σε καλλιέργειες και δεν φέρουν τη μετάλλαξη JAK2 (14). Η μεταμόσχευση του μυελού των οστών θεωρείται



αποτελεσματική γιατί προκαλεί ανατροπή της ίνωσης αφαιρώντας τον μεταλλαγμένο κλώνο (Staerk, 2014). Παρ'όλα αυτά, σε αντίθεση με τους αναστολείς της τυροσινικής κινάσης για την ΧΜΛ, οι αναστολείς του JAK2 αποτυγχάνουν να αφανίσουν τον μεταλλαγμένο κλώνο.

Η ελαττωματική φωλιά οδηγεί στην παθογένεση

Τα αιμοποιητικά προγονικά κύτταρα εδρεύουν στο μικροπεριβάλλον του μυελού των οστών και αλληλεπιδρούν με διάφορα κύτταρα της φωλιάς.

Η φωλιά αποτελείται από ινοβλάστες, οστεοκύτταρα και λιποκύτταρα που προέρχονται από μεσεγχυματικά κύτταρα, οστεοκλάστες που προέρχονται από αιμοποιητικά και ενδοθηλιακά προγονικά κύτταρα με επιπλέον διαφορετικούς αυξητικούς παράγοντες και μόρια προσκόλλησης (Them, 2013, Le Bousse-Kerdiles 2012).

Δύο τύποι φωλιάς έχουν περιγραφεί; η αγγειακή φωλιά και η ενδοστική φωλιά. Τώρα, εάν οι δύο φωλιές είναι διαφορετικές οντότητες ή εάν είναι ένας συνδυασμός και των δύο στο αιμοποιητικό περιβάλλον είναι υπό συζήτηση, αλλά υπάρχει απόδειξη ότι είναι δύο διαφορετικές λειτουργικές μονάδες.

Η αγγειακή φωλιά βρίσκεται στην πλούσια περιοχή σε οξυγόνο δίπλα στο ενδόστεο και ρυθμίζει την ανάπτυξη, την διαφοροποίηση και την κινητικότητα των προγονικών κυττάρων.

Η ενδοστική φωλιά βρίσκεται στην άκρη του οστού και κρατά τα προγονικά κύτταρα σε ηρεμία. Η ανισορροπία μεταξύ των 2 φωλιών έχει προταθεί να είναι η αιτία των ΜΥΣ (Tefferi, 2010).

Κατά την αιμοποίηση, το σηματοδοτικό μονοπάτι του TGF- $\beta$ , παίζει σημαντικό ρόλο στην ηρεμία των προγονικών κυττάρων, καθώς και στην διαφοροποίησή τους.

Αυτή η κυτταροκίνη, έχει μελετηθεί εκτενώς ως ρυθμιστής της ίνωσης στα ΜΥΣ.

Υπάρχει σε 3 υπότυπους: τον TGF $\beta$ 1, TGF $\beta$ 2, και τον TGF $\beta$ 3.

Ο TGF $\beta$ 1, είναι ο πιο άφθονος από τους 3 υπότυπους και παράγεται από τα αιμοπετάλια, τα μεγακαρυοκύτταρα και τα κύτταρα του μυελού των οστών. Παράγεται ως λανθάνουσα πρωτεΐνη και αποθηκεύεται στην εξωκυττάρια θεμέλια ουσία. Τα λανθάνοντα συμπλέγματα ταξινομούνται είτε ως μικρά, είτε ως μεγάλα. Το μικρό σύμπλεγμα αποτελείται από τον TGF- $\beta$  μη ομοιοπολικά συνδεδεμένο (noncovalently) με την latency-associated protein (LAP). Στο μεγάλο σύμπλεγμα, η



LAP συνδέεται με τις λανθάνουσες δεσμευτικές πρωτεΐνες του TGFβ  $\text{tgf-}\beta$  binding proteins (LTBPs). Ένας αριθμός πρωτεασών που συμπεριλαμβάνει την πλασμίνη, τις ιντεγκρίνες και την Θρομβοσπονδίνη 1 (TSP-1), μετατρέπει τα ανενεργά λανθάνοντα συμπλέγματα σε ενεργά, με το να τον αποδεσμεύεται από την LAP και τις LTBPs (Chou JM, 2003).

Η ενεργή πρωτεΐνη δεσμεύεται από 2 κυτταρικούς υποδοχείς: τον type 1 receptor (TBRI) και τον type 2 (TBPII), με πρωτεϊνικές κινάσες σερίνης/θρεονίνης στα ενδοκυττάρια πεδία τους (Trow, TK 2010).

Ο TGF-β δεσμεύεται από τον TBRII που έπειτα προσελκύει, φωσφορυλιώνει και δεσμεύει τον TBRI (Lataillade JJ). Ο ενεργοποιημένος TBRI φωσφορυλιώνει τους μεταγραφικούς παράγοντες Smad, που έπειτα δεσμεύουν την κοινή πρωτεΐνη Smad 4. Το σύμπλεγμα R-Smad/ Co-Smad μεταφέρεται στον πυρήνα όπου συνδέεται με πρωτεΐνες που δεσμεύουν DNA, ρυθμίζοντας την μεταγραφή των γονιδίων στόχων του TGF-β. Η ρύθμιση του μονοπατιού του TGF-β επιτυγχάνεται από πολλαπλούς μηχανισμούς αρνητικής ανάδρασης όπως: τη μείωση της έκφρασης των κυτταρικών υποδοχέων, την αύξηση των ανασταλτικών πρωτεϊνών Smad-6 και 7 οι οποίες αναστέλλουν την απάντηση του TGF-β και την ενεργοποίηση πρωτεϊνών που ενεργοποιούν πολλαπλούς μεταγραφικούς ανασταλτές και ενεργοποιητές μέσα στον πυρήνα (Kröger N, 2008).

#### **4.5. Ο Ρόλος του TGF-β στην Ίνωση του Μυελού των Οστών στα ΜΥΣ, Ph-.**

Η παθολογία του μυελού των οστών στην MI, χαρακτηρίζεται από ίνωση, νεοαγγειογένεση και οστεοσκλήρυνση. Η ίνωση οφείλεται κυρίως στην αύξηση της παραγωγής του ολικού κολλαγόνου, συμπεριλαμβανομένων των τύπων κολλαγόνου I, III, IV και V (Yelin E 2016, Hasselbach HC, 1993).

Αυξημένη εναπόθεση λαμίνης και γλυκοπρωτεϊνών όπως η βιτρονεκτίνη, η φιβρονεκτίνη και η τενασκίνη, παρατηρούνται σε προχωρημένα στάδια της νόσου (Le Bousse- Kerdiles 1999). Ο TGF β1 αυξάνει την σύνθεση του κολλαγόνου τύπου I, III και IV, όπως επίσης αυξάνει και την εναπόθεση φιβρονεκτίνης, προτεογλυκανών και τενασκίνης (Qu D, 2015). Η διαδικασία της ίνωσης που προκαλείται από τον TGFβ1 είναι ο συνδυασμός της αύξησης της βιοσύνθεσης της θεμέλιας ουσίας που συνοδεύεται από την μείωση της διαδικασίας αποσύνθεσης





αυτής. Ο TGF β1 το επιτυγχάνει αυτό μειώνοντας τις μεταλλοπρωτεϊνάσες της θεμέλιας ουσίας, κυρίως της MMP3 και αυξάνοντας την σύνθεση των ιστικών αναστολέων της μεταλλοπρωτεϊνάσης, κυρίως της TIMP-1 (Goodrich JT,2012).

Εκτός από την επίδραση στο μικροπεριβάλλον, ο TGF-β, επιφέρει αλλαγές στα αιμοποιητικά κύτταρα και είναι γνωστός αρνητικός ρυθμιστής της ανάπτυξης των πρόγονων κοκκιοκυττάρων, ερυθροκυττάρων, μαγακαρυοκυττάρων και μακροφάγων. Επίσης προωθεί την διαφοροποίησή τους (Mendes SC,2002).

Έχει παρατηρηθεί ότι τα αιμοποιητικά κύτταρα σε Ph- ΜΥΣ, γίνονται ανθεκτικά στα αποτελέσματα του TGF β, λόγω μειωμένων επιπέδων ρυθμιστών και υποδοχέων του TGF- β. Οι ΙΘ,ΑΠ και ΜΙ έχουν συσχετιστεί με μειωμένα επίπεδα υποδοχέων τύπου 2, ενώ μειωμένα επίπεδα SMAD 4 έχουν βρεθεί σε ορισμένες περιπτώσεις ΙΘ. Αυτά τα δεδομένα δείχνουν ότι η δράση του TGF-β παίζει κυρίαρχο ρόλο στο μικροπεριβάλλον του μυελού των οστών (Suzuki Y, 2001, Rodriguez JP,2000). Η ανακάλυψη της JAK2 μετάλλαξης και ακολούθως η ανάπτυξη των νέων αναστολέων της JAK2 κινάσης υπήρξαν τα ορόσημα στη θεραπεία των συμπτωμάτων της ΜΙ. Παρ'όλα αυτά όμως, σε αντίθεση με τους αναστολείς της τυροσινικής κινάσης για την ΧΜΛ, οι αναστολείς της JAK2 κινάσης δεν ήταν δυνατό να εξαλείψουν τον μεταλλαγμένο κλώνο (Johnson PC, 2007).

Οι αναστολείς της JAK 2 κινάσης βοήθησαν στην μείωση του μεγέθους του σπληνός και στην μείωση των συμπτωμάτων της νόσου, αλλά δεν μπόρεσαν να μειώσουν την ίνωση του μυελού των οστών (Kim K, 2010).

Η αναστολή του TGF-β είναι μία πιθανή θεραπευτική στρατηγική να μειωθεί η ίνωση του μυελού των οστών στην ΜΙ. Τα επίπεδα του ενεργού TGF-β μπορεί να μειωθούν με το να στοχευθεί η μετατροπή του λανθάνοντος υπότυπου στην ενεργό μορφή.

Η ιντεγκρίνη ανβ6 παίζει σημαντικό ρόλο στο να μετατρέπει τον λανθάνων υπότυπο στην ενεργό μορφή με το να τον αποδεσμεύει από τον LTBP (Large latent complex) και LAP (Latency Associated Protein).

Τέλος, η συμμετοχή του TGF-β στην ΜΙ εξετάστηκε αρχικά σε δείγματα ασθενών με οξεία μεγακαρυοβλαστική λευχαιμία και συνοδό ίνωση του μυελού των οστών. Τα μεγακαρυοκύτταρα παράγουν και εκκρίνουν μία ενεργό μορφή του TGF-β, που φαίνεται ικανή να ενεργοποιεί την σύνθεση κολλαγόνου in vitro (Hosseinkhani M, 2014).



Τα ενδοαιμοπεταλιακά επίπεδα του TGF-β, βρέθηκαν 2-3 φορές αυξημένα σε ασθενείς με ΜΙ εν συγκρίσει με τα δείγματα ελέγχου (Kagami H, 2014). Η αύξηση του TGF-β, σε αυτή την πολύπλοκη νόσο μαζί με άλλες κυτταροκίνες όπως η substance P (Stroncek DF, 2013) , ο vascular endothelial growth factor (VEGF) (Polymeri A, 2016), παίζουν σημαντικό ρόλο στην παθογένεση την ίνωσης του μυελού των οστών .

#### **4.6. Οστεοπροτεγερίνη**

Η οστεοπροτεγερίνη είναι μία πρωτεΐνη που κωδικοποιείται από το γονίδιο TNFRSF11B. Είναι γνωστή ως ανασταλτικός παράγοντας της οστεοκλαστογένεσης (osteoclastogenesis inhibitory factor ή OCIF) ή tumor necrosis factor receptor superfamily member 11B (TNFRSF11B).

Η οστεοπροτεγερίνη είναι υποδοχέας κυτταροκινών και μέλος της tumor necrosis factor receptor superfamily.

Στην φυσιολογική ομοιόσταση των οστών, η οστεοπροτεγερίνη και ο υποδοχέας ενεργοποιητής του nuclear factor kappa B ligand (RANKL), συμμετέχουν στον αυστηρό έλεγχο της διαφοροποίησης των οστεοκλαστών από τα προγονικά μονοκύτταρα. Η οστεοπροτεγερίνη δρα ως διαλυτός υποδοχέας decoy για το RANKL, έτσι ώστε να περιορίζει την δέσμευση του RANKL από τον λειτουργικό υποδοχέα της RANK.Ο RANKL εκφράζεται εκτενώς σε περιοχές αναδιαμόρφωσης σπογγώδους ιστού και σηματοδοτεί την πλήρη ανάπτυξη, ενεργοποίηση και επιβίωση των οστεοκλαστών (Reid PE,2009).

Άλλες μελέτες έδειξαν ότι σε ασθενείς με πολλαπλούν μυέλωμα και άλλα νοσήματα που σχετίζονται με οστική καταστροφή, η αύξηση της έκφρασης της RANKL με την σύγχρονη μείωση της έκφρασης της οστεοπροτεγερίνης οδηγούσε σε οστεόλυση ευνοώντας την διαφοροποίηση των οστεοκλαστών (Baud'huin M,2013).

Επίσης, υπάρχουν θεραπευτικές μελέτες που χρησιμοποιούν ανταγωνιστές του RANKL για να αποδείξουν κλινικό όφελος για ασθενείς με οστεόλυση και οστική καταστροφή ( Sordillo, Pearse ).

Ο Chagraoui et al (Xi L,2013) έδειξε σε ένα μοντέλο ποντικού με ΜΙ, ότι η οστεοπροτεγερίνη προκαλούσε αναστολή της οστεοκλαστογένεσης και μπορεί να είναι υπεύθυνη για την ανάπτυξη οστεοσκλήρυνσης. Αυτό φαίνεται να συμβαίνει με την εμφύτευση αιμοποιητικών κυττάρων που υπερεκφράζουν την θρομβοποιητίνη σε

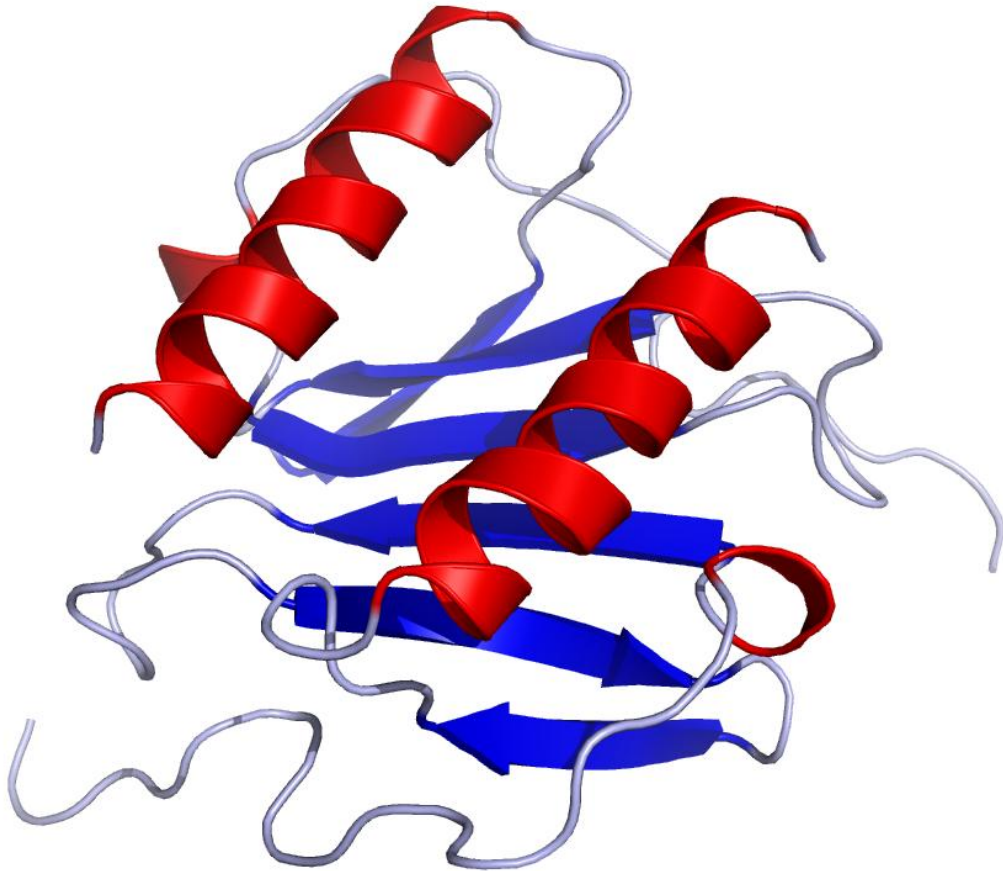


δέκτες ανεπαρκείς σε οστεοπροτεγερίνη. Σε αυτό το ζωικό πείραμα, τα στρωματικά κύτταρα, αλλά όχι τα αιμοποιητικά κύτταρα, πιθανόν παρήγαγαν οστεοπροτεγερίνη. Τα επίπεδα οστεοπροτεγερίνης στον ορό ασθενών με MI βρέθηκαν αυξημένα. Όπως υποστηρίζουν οι συγγραφείς, η οστεοσκλήρυνση στην MI, μπορεί να οφείλεται στην υπερπαραγωγή της OPG, αλλά αυτό να μην οφείλεται στην δράση του TGF-β1 στα στρωματικά κύτταρα, αλλά σε κύτταρα άλλα όπως είναι οι οστεοβλάστες (Hosbond SE, 2012).

Τα ενδοθηλιακά κύτταρα έχουν θεωρηθεί πιθανοί παραγωγοί OPG (Bernardi S, 2016). Είναι ευρέως γνωστό ότι η αγγείωση των οστών παίζει σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη και στην αναδιαμόρφωση του οστού, όπως επίσης ότι το αγγειακό ενδοθήλιο λειτουργεί περισσότερο ως φραγμός διαπερατότητας και παθητικός διάυλος κυττάρων και ενδοκρινών σημάτων. Η αγγείωση των οστών λειτουργεί και ως εκκριτικό και ανοσολογικό όργανο (Bernardi S, 2016). Τα προγονικά αιμοποιητικά κύτταρα των οστεοκλαστών, βρίσκονται και στην περιφερική κυκλοφορία και στον μυελό των οστών. Σε όλες τις περιπτώσεις αναπτύσσονται σε ώριμους λειτουργικούς οστεοκλάστες μέσα στον οστίτη ιστό, ενώ βρίσκονται σε μικρή απόσταση από τα κολποειδή και την μικροαγγείωση. Οι οστεοβλάστες και τα στρωματικά κύτταρα ρυθμίζουν την δημιουργία και την λειτουργία των οστεοκλαστών διά μέσου ενός μηχανισμού κυτταρικής επαφής, αλλά ελάχιστα γνωρίζουμε για την αλληλεπίδραση μεταξύ των ενδοθηλιακών κυττάρων και των ώριμων οστεοκλαστών.



#### 4.7.Ιντερλευκίνη 8



*(Η παραπάνω εικόνα διατίθεται από Βικιπαίδεια)*

Η ιντερλευκίνη 8 (IL-8) ή χημειοκίνη C-X-C, παράγεται από τα μακροφάγα και άλλα είδη κυττάρων όπως τα επιθηλιακά κύτταρα, τα κύτταρα των λείων μυϊκών ινών του αναπνευστικού και τα ενδοθηλιακά κύτταρα (Hedges JC, 2000). Τα ενδοθηλιακά κύτταρα αποθηκεύουν την IL-8 στα σωμάτια Weibel- Palade (Wolff B, 1998, Utgaard JO 1998). Στους ανθρώπους, η IL-8 κωδικοποιείται από το γονίδιο CXCL8 (Modi WS 1990). Η IL-8 παράγεται αρχικά ως πρόδρομο πεπτίδιο 99 αμινοξέων που στη συνέχεια διασπάται σε διάφορα ενεργά IL-8 ισόμορφα. Σε καλλιέργειες, ένα πεπτίδιο 72 αμινοξέων είναι αυτό που εκκρίνεται από τα μακροφάγα. Υπάρχουν πολλοί υποδοχείς στην επιφάνεια της κυτταρικής μεμβράνης που είναι ικανοί να δεσμεύσουν την IL-8. Οι περισσότερο μελετημένοι υποδοχείς είναι οι G protein serpentine receptors CXCR1 και CXCR2. Η έκφραση για την IL-8 διαφέρει μεταξύ των δύο υποδοχέων (Hedges JC, 2000). Μέσα από μια αλυσίδα βιοχημικών αντιδράσεων, η



IL-8 εκκρίνεται και είναι ένας βασικός διαμεσολαβητής της ανοσολογικής αντίδρασης του εγγενούς άνοσου συστήματος.

Η IL-8, είναι γνωστή ως χημειοτακτικός παράγοντας των ουδετεροφίλων και έχει 2 πρωταρχικές λειτουργίες:

Προκαλεί χημειοταξία κυρίως στα ουδετερόφιλα αλλά επίσης και σε άλλα κοκκιοκύτταρα, τα οποία με αυτόν τον τρόπο μεταναστεύουν στην περιοχή όπου υπάρχει φλεγμονή. Η IL-8 προκαλεί επίσης φαγοκυττάρωση των κυττάρων αυτών. Επίσης προάγει την αγγειογένεση. Στα κύτταρα στόχους, η IL-8 προκαλεί μία σειρά φυσιολογικών αντιδράσεων που είναι αναγκαίες για την μετανάστευση και την φαγοκυττάρωση, όπως είναι η αύξηση του ενδοκυττάριου  $Ca^{++}$ , εξοκυττάρωση και το respiratory burst (Haake, 2002).

#### **4.8. Κυτταροκίνες και ανάπτυξη του μυελοπερπλαστικού κλώνου**

Οι κυτταροκίνες υποδιαιρούνται σε 4 ομάδες ανάλογα με την βιολογική τους λειτουργία:

**Φυσική ανοσία:** TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6, και χημειοκίνες

**Ενεργοποίηση, ανάπτυξη, και διαφοροποίηση λεμφοκυττάρων:** IL-2, IL-4 και TGF- $\beta$

**Ρύθμιση της φλεγμονής:** IL-4, TGF- $\beta$ , IL-1, IL-10, IFN- $\gamma$ , και ο granulocyte macrophage –colony stimulating factor (GM-CSF)

**Ενεργοποίηση της ανάπτυξης και διαφοροποίησης των λευκοκυττάρων:** IL-1, IL-3, IL-5, IL-6, G-CSF, macrophage –CSF (M-CSF) και GM-CSF.

Οι κυτταροκίνες ταξινομούνται ως προφλεγμονώδεις και αντιφλεγμονώδεις.

ΟΙ **προφλεγμονώδεις (Th1)** κυτταροκίνες είναι οι έξης: IL-1, IL-2, IL-12, TNF- $\alpha$ , και IFN- $\gamma$ . Προάγουν την ενεργοποίηση των CD-8 θετικών κυτταρολυτικών T-λεμφοκυττάρων, οδηγώντας σε εκκαθάριση ιών (viral clearance).

Οι **αντιφλεγμονώδεις κυτταροκίνες (Th2)** είναι οι IL-4 και IL-10.

Έτσι, οι κυτταροκίνες που παράγονται κατά την διάρκεια χρόνιας φλεγμονής ποικίλουν ανάλογα με την αιτία της φλεγμονής και τα κύτταρα που εμπλέκονται σε αυτήν. Οι κυτταρικές πηγές παραγωγής φλεγμονωδών κυτταροκινών, χημειοκινών και αυξητικών παραγόντων είναι πολλές και βεβαίως ποικίλουν αναλόγως τον υπότυπο του ΜΥΣ και τις σχετιζόμενες επιπλοκές ( θρόμβωση, ίνωση μυελού των οστών). Κυρίως όμως είναι τα περισσότερα κύτταρα που βρίσκονται στο



μικροπεριβάλλον του μυελού των οστών, η αιμοποιητική φωλιά, οι ινοβλάστες, τα μακροφάγα, τα T λεμφοκύτταρα και τα ενδοθηλιακά κύτταρα, όπως επίσης φυσιολογικά ή κλωνικά αιμοποιητικά προγονικά κύτταρα, αιμοπετάλια, ουδετερόφιλα, μονοκύτταρα και μακροφάγα. Τα μακροφάγα μπορεί να έχουν τον M1 φαινότυπο, όπου παράγουν υψηλά επίπεδα TNF- $\alpha$ , IL-12 (που βρίσκονται και οι δύο αυξημένοι στην ΑΠ και στην ΜΙ) αλλά και IL-23. Τα μακροφάγα του φαινότυπου M2 εκκρίνουν IL-4 ή IL-10 (που βρίσκονται αυξημένες στην ΙΘ) (Rottner M, 2009). Στα ΜΥΣ, το επίπεδο της ερυθροποιητίνης είναι χαμηλό και τυπικά μη ανιχνεύσιμο στην ΑΠ (Bhaumik D, 2009). Η παρουσία της μετάλλαξης JAK2-V617F σε >95% των περιπτώσεων ΑΠ, φαίνεται να αντισταθμίζει την χαμηλή παραγωγή ερυθροποιητίνης με το να μετατρέπει τα προγονικά κύτταρα της ερυθράς σειράς πολύ ευαίσθητα σε χαμηλές δόσεις ερυθροποιητίνης, οδηγώντας σε πολυκυτταραιμία. Αυτή η εξήγηση πιθανόν να ισχύει για το 50-60% των ΙΘ και ΜΙ που φέρουν την μετάλλαξη JAK2-V617F.

Επιπλέον, τα επίπεδα άλλων κυτταροκινών στο αίμα που ενεργοποιούν το μονοπάτι JAK2/STAT5 (TPO και G-CSF) ή το μονοπάτι JAK2/STAT3 (GM-CSF, IL-12, IL-33 και κυτταροκίνες της οικογένειας IL-6: Οι IL-6, IL-11 και ονκοστατίνη Μ (OSM), βρίσκονται φυσιολογικές ή αυξημένες στα ΜΥΣ. Αρκετές από αυτές τις κυτταροκίνες παράγονται από μη αιμοποιητικά κύτταρα και από προγονικά μυελικά κύτταρα, και προάγουν την ανάπτυξη και επιβίωση των κλωνικών και των μη κλωνικών μυελικών προγονικών κυττάρων. Αυτό ισχύει για την TPO, IL-6, IL-8, IL-11, IL-33, GM-CSF, HFG και TNF- $\alpha$ ; πολλές από αυτές τις κυτταροκίνες έχουν αποδειχθεί να οδηγούν στην αύξηση των κυττάρων με μετάλλαξη JAK2-V617F (Bacon K, 2002).

Όσον αφορά την θρομβοποιητίνη (TPO), είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι η χαμηλή έκφραση επιφανείας του Mpl (του υποδοχέα της TPO), που παρατηρήθηκε στα αιμοπετάλια και στα προγονικά κύτταρα με ΜΥΣ, περιορίζει την δράση των υψηλών επιπέδων της TPO. Οι λόγοι για την χαμηλή έκφραση του Mpl σε ασθενείς με ΜΥΣ δεν έχει πλήρως κατανοηθεί. Από την μία πλευρά, η JAK2-V617F φαίνεται να είναι λιγότερο ικανή από την wild type JAK2 να μεταφέρει τους Mpl υποδοχείς στην κυτταρική επιφάνεια και να αυξάνει την καταστροφή του Mpl. Από την άλλη πλευρά, υψηλά επίπεδα TPO και η μετάλλαξη JAK2-V617F ή η μετάλλαξη MPL-W515L/K, μπορεί να δρουν ενάντια στην καταστολή του Mpl στα προγονικά κύτταρα.



Άλλη μία ενδιαφέρουσα παρατήρηση είναι η αυξημένη παραγωγή της IL-33. Η IL-33 είναι γνωστό ότι βοηθάει στην καταπολέμηση ιογενών λοιμώξεων σε αυτοάνοσα νοσήματα, και ένας αυξημένος κίνδυνος αυτοάνοσων νοσημάτων έχει παρατηρηθεί σε ασθενείς με ΜΥΣ (Reeves EP, 2011, Zhang XY, 2004).

Η συνεχής διέγερση των παραπάνω κυτταροκινών, βελτιώνει την επιβίωση των ινοβλαστών και την ίνωση (IL-6, b-FGF), την επιβίωση των μονοκυττάρων-μακροφάγων (IL-6, GM-CSF), την παραγωγή αιμοπεταλίων (IL-6), και την νεοαγγειογένεση (VEGF), ενώ οι IL-12 και IL-33 ενεργοποιούν τα T λεμφοκύτταρα και τα κύτταρα φυσικούς φονείς (NK). Επιπλέον, τα κύτταρα των ΜΥΣ, συγκεντρώνονται στον μυελό των οστών, με αποτέλεσμα αυτό να δημιουργεί ως ένα βαθμό υποξία, και επακόλουθη ενεργοποίηση του HIF-1<sup>α</sup> μονοπατιού και την αύξηση της έκφρασης της STAT3 και την παραγωγή κυτταροκινών που προάγουν την κυτταρική επιβίωση (IGF-2, HGF, και IL-6), την ίνωση (PDGF, FGF2 και IL-6) και τη νεοαγγειογένεση (VEGF) (Brown AS, 2004, Itoh Y, 2005).

Συνολικά, οι ποιοτικές και ποσοτικές διαφορές στην παραγωγή κυτταροκινών και στα 3 ΜΥΣ, δείχνουν ότι οι αιτίες και οι μηχανισμοί της χρόνιας φλεγμονής σχετικά διαφέρουν στην ΑΠ, ΙΘ και στην ΜΙ. Οι μεταλλάξεις JAK2V617F, CALR και MPL στην ΙΘ σχετίζονται με ήπια φλεγμονή, ενώ στην ΜΙ με σοβαρή φλεγμονή.



## **Β ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**







## Κεφάλαιο 5 Ανάλυση διδακτορικής διατριβής

### 5.1 Σκοπός

Σκοπός της παρούσας διδακτορικής διατριβής είναι η μελέτη του μικροπεριβάλλοντος του μυελού των οστών, σε ασθενείς που πάσχουν από Μυελουπερπλαστικά σύνδρομα με ιδιαίτερη έμφαση στην ιντερλευκίνη 8 (IL8) και στην οστεοπροτεγερίνη (OPG), ώστε να διασαφηνισθεί εάν και σε ποιο βαθμό συμμετέχουν στην παθογένεια των νόσων αυτών, στην πρόγνωση και στον διαχωρισμό τους.

### 5.2. Μέθοδοι

Στο κεφάλαιο αυτό θα παρουσιαστούν τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης. Τα τεστ τα οποία χρησιμοποιήθηκαν είναι τα μη παραμετρικά τεστ Mann Whitney, Kruskal Wallis, X<sup>2</sup> (Chi square) και Kaplan Meier. Τα μη παραμετρικά τεστ προτιμήθηκαν λόγω μικρού μεγέθους δείγματος καθώς σύμφωνα με το Κ.Ο.Θ. (κεντρικό οριακό θεώρημα) η μέση τιμή ακολουθεί την κανονική κατανομή για δείγματα πλήθους  $\geq 30$ . (Φ.Κολυβά-Μαχαίρα-Ε.Μπόρα-Σέντα (1998), «Στατιστική Θεωρία Εφαρμογές»). Το Mann Whitney test χρησιμοποιήθηκε για έλεγχο εξάρτησης ποσοτικής μεταβλητής με ποιοτική, η οποία χωρίζει το δείγμα σε 2 κατηγορίες, ενώ το KruskalWallis test για έλεγχο εξάρτησης ποσοτικής μεταβλητής με ποιοτική η οποία χωρίζει το δείγμα σε περισσότερες από 2 κατηγορίες. Το X<sup>2</sup> test (Chi square) χρησιμοποιήθηκε για έλεγχο εξαρτήσεων μεταξύ ποιοτικών μεταβλητών ενώ το τεστ Kaplan Meier για έλεγχο χρόνου επιβίωσης μεταξύ ποσοτικών μεταβλητών. Για τα test Man Whitney, Kruskal Wallis και X<sup>2</sup> (Chi square) η αρχική υπόθεση είναι ότι οι μεταβλητές είναι ανεξάρτητες και η εναλλακτική ότι είναι εξαρτημένες ενώ για το test Kaplan Meier η αρχική υπόθεση είναι ότι οι χρόνοι επιβίωσης είναι ίσοι και οι εναλλακτική ότι διαφέρουν. Η στάθμη σημαντικότητας ορίστηκε 0,05. Η αρχική υπόθεση γίνεται δεκτή όταν  $p\text{-value} \geq 0,05$  και απορρίπτεται όταν  $p\text{-value} < 0,05$ .

Στην μελέτη μας, εκτιμήθηκε η έκφραση και η ένταση των χρώσεων της ιντερλευκίνης 8 (IL-8), και της οστεοπροτεγερίνης (OPG) με ανοσοϊστοχημεία, στις οστεομυελικές βιοψίες ασθενών με μυελουπερπλαστικά σύνδρομα (ΜΥΣ) κατά τη διάγνωση. Οι ανοσοϊστοχημικές χρώσεις για την IL-8 και την OPG



πραγματοποιήθηκαν σε τομές παραφίνης 4μm των οστεομυελικών βιοψιών της διάγνωσης με τη μέθοδο δύο φάσεων συζευγμένων πολυμερών υπεροξειδάσης. Η ένταση και η θετικότητα της έκφρασης της IL-8 και της OPG μετρήθηκαν σε κλίμακα βαθμονομημένη από 0 έως 3. Η στατιστική ανάλυση έγινε με το πρόγραμμα SPSS και στατιστικά σημαντικές θεωρήθηκαν οι τιμές του  $p < 0.05$ . Στην συνέχεια, μελετήθηκαν οι κυττοκίνες αυτές στον ορό των ασθενών, και συγκρίναμε αν υπάρχουν σημαντικές διαφορές μεταξύ των ευρημάτων στις οστεομυελικές βιοψίες ασθενών με ΜΥΣ και των ορών τους.

Η νεοαγγειογένεση εκτιμήθηκε με ανοσοιστοχημεία σε τομές παραφίνης.

Η παραγωγή των κυτταροκινών μελετήθηκε ανοσοιστοχημικά σε τομές παραφίνης με την μέθοδο ELISA στους ορούς κατά την διάγνωση, στην έναρξη θεραπείας, κατά την διάρκεια της θεραπείας, στην επιδείνωση και στην μετατροπή της νόσου.

Η ανοσοιστοχημεία για την IL-8 και την (OPG), πραγματοποιήθηκε σε τομές παραφίνης των οστεομυελικών βιοψιών, κατά την διάγνωση, χρησιμοποιώντας την τεχνική της πολυμερούς συζευγμένης υπεροξειδάσης. Η ένταση της θετικότητας της έκφρασης της IL-8 και της (OPG), βαθμολογήθηκε με κλίμακα από το 0 ως το 3. Πιο συγκεκριμένα, η τιμή 0 αντιστοιχεί σε πολύ χαμηλή θετικότητα έως ανύπαρκτη, 1 ισοδυναμεί με χαμηλή θετικότητα, 2 με μέτρια θετικότητα, και 3 με υψηλή θετικότητα. Συνοψίζοντας, αξίζει να αναφερθεί πως η θετικότητα των μεγακαροκυττάρων εκφράστηκε ως το ποσοστό των θετικών μεγακαροκυττάρων προς το σύνολό τους.

### **5.3. Ασθενείς**

Μελετήθηκαν 65 ασθενείς με ΑΠ, 65 με ΙΘ, 30 με ΙΜ και επιπλέον 30 με δευτεροπαθή ιδιοπαθή μυελοίνωση.

Τα αρχεία 76 ασθενών με ΜΥΣ (Ph-), μελετήθηκαν αναδρομικά. Η διάμεση ηλικία ήταν 65 έτη, 49 ήταν άνδρες. Το 22% είχε διαγνωσθεί με ΑΠ, το 42% με ΙΘ και το 36% με ΜΙ. Η διάγνωση έγινε σύμφωνα με τα κριτήρια της WHO και οι εξετάσεις που διενεργήθηκαν κατά τη διάγνωση ήταν η γενική αίματος, μελέτη των νεφρικών, ηπατικών και οστικών δεικτών, η γαλακτική αφυδρογονάση, τα επίπεδα της ερυθροποιητίνης και η JAK2 μετάλλαξη στην οστεομυελική βιοψία. Τα κύρια ευρήματα όλων των ασθενών που μελετήθηκαν ήταν κόπωση (19%), σπληνομεγαλία (42%), οστικά άλγη (8%), και επιδρώσεις (9%), ενώ το 13% εκδήλωσε ένα



θρομβωτικό επεισόδιο, 5% παρουσίαζε απώλεια βάρους και 77% βρέθηκαν JAK 2 θετικοί. Ο καρυότυπος ήταν παθολογικός στο 32% ενώ 7% των ασθενών παρουσίαζε δυσμενή καρυοτυπικά ευρήματα όπως αναδιάταξη του χρωμοσώματος 5 ή 7 ή πάνω από 3 χρωμοσωμικές ανωμαλίες. Συγκεκριμένα, συμπτώματα που σχετίζονταν με σπληνομεγαλία υπήρχαν στο 24% των ασθενών με ΑΠ, στο 19% με ΙΘ και στο 78% με ΜΙ. Επιπλέον, κόπωση παρατηρήθηκε στο 24% των ασθενών με ΑΠ και στο 37% των ασθενών με ΜΙ. Στην θρομβοκυττάρωση δεν παρατηρήθηκε κόπωση. Εφιδρώσεις υπήρχαν στο 12% των ασθενών με ΑΠ, στο 3% των ασθενών με ΜΙ και καθόλου στην ΙΘ; απώλεια βάρους δεν παρατηρήθηκε στους ασθενείς με ΑΠ, θρομβωτικά επεισόδια παρατηρήθηκαν στο 8% των ασθενών με ΑΠ, στο 14% των ασθενών με ΙΘ και στο 16% των ασθενών με ΜΙ. 77% των ασθενών με ΑΠ, 74% με ΙΘ και 83% με ΜΙ βρέθηκαν JAK2 θετικοί. Δυσμενής καρυότυπος παρατηρήθηκε στο 10% των ασθενών με ΑΠ, στο 5% των ασθενών με ΙΘ και στο 10% των ασθενών με ΜΙ. Τα χαρακτηριστικά τους παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα: Ο μέσος χρόνος παρακολούθησης των ασθενών ήταν 55 μήνες.

	<b>ΟΛΟΙ</b>	<b>ΑΠ</b>	<b>ΙΘ</b>	<b>ΜΙ</b>
<b>N</b>	76	17	32	27
<b>Άνδρες/γυναίκες (%)</b>	63/37	76/24	50/50	70/30
<b>Μέση ηλικία</b>	65	65	65	65
<b>Κόπωση%</b>	19	24	0	37
<b>Σπληνομεγαλία (%)</b>	42	24	19	78
<b>Εφιδρώσεις (%)</b>	9	12	3	15
<b>Οστικά άλγη(%)</b>	8	18	0	7
<b>Θρομβωτικά επεισόδια συμπεριλαμβανομένων καρδιολογικών συμβαμάτων (%)</b>	13	8	14	16
<b>Απώλεια βάρους (%)</b>	5	0	9	4
<b>JAK2(+) (%)</b>	77	77	74	83
<b>Δυσμενής</b>	7	10	5	10



<b>καρυότυπος* (%)</b>				
<b>Λευκά &gt;10000 (%)</b>	39	35	38	37
<b>Αιμοσφαιρίνη&lt;11.0 (%)</b>	25	0	3	63
<b>Αιμοπετάλια &gt;400 (%)</b>	66	59	97	35
<b>Ουδετερόφιλα &gt;6600 (%)</b>	43	35	42	46
<b>Μέσος χρόνος επιβίωσης ( μήνες)</b>	54	49	60	50

\*Παθολογικός καρυότυπος: πολύπλοκος καρυότυπος, μία ή 2 κυτταρογενετικές ανωμαλίες που συμπεριλαμβάνουν +8,-7/7q, -5/5q-, 12p-, inv(3), ή αναδιάταξη του 11q23.

Η θεραπεία των ασθενών συμπεριλάμβανε ασπιρίνη ή κλοπιδογρέλη, σε συνδυασμό ή όχι με υδροξουρία στην ΑΠ και στην ΙΘ. Στην ΜΙ συμπεριλάμβανε την χρήση ερυθροποιητίνης, μεταγγίσεις ερυθρών αιμοσφαιρίων και ρουξολιτινίμης.

#### 5.4. Ερωτήματα

Τα ερωτήματα που τίθενται είναι τα εξής:

- ✓ Το μικροπεριβάλλον του μυελού των οστών δύναται να έχει προγνωστική αξία για τη συμπεριφορά της νόσου και την επιβίωση των ασθενών με ΜΥΣ;
- ✓ Ποιές κυτταροκίνες έχουν προγνωστική αξία στην έναρξη θεραπείας, στην πιθανότητα μετατροπής του νοσήματος και στην συνολική επιβίωση των ασθενών αυτών;

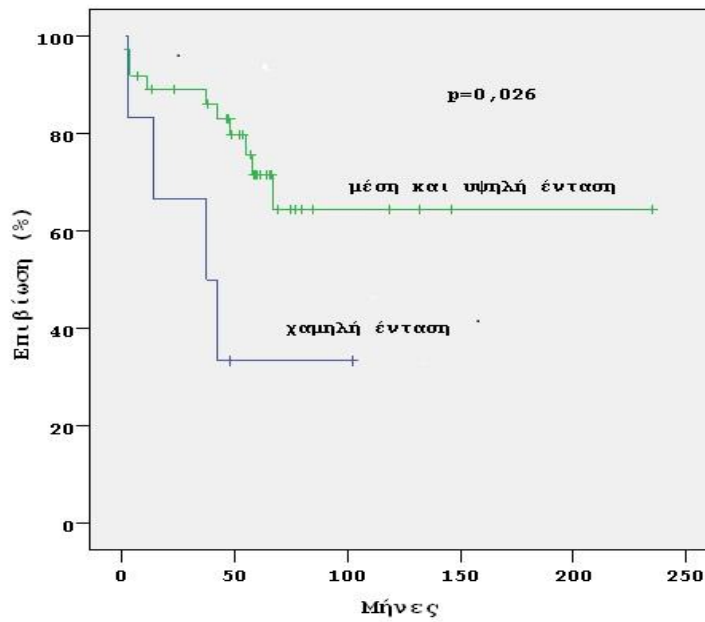
#### 5.5. Αποτελέσματα

Δεν παρατηρήθηκε σημαντική διαφορά στον βαθμό έκφρασης της έντασης ή θετικότητας αμφοτέρων των χρώσεων στους ασθενείς με ΜΥΣ. Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε ξεχωριστά σε κάθε ομάδα ΜΥΣ, αλλά συγχρόνως και συνολικά λόγω του χαμηλού αριθμού ασθενών.



### Ένταση χρώσης OPG στο σύνολο των ασθενών

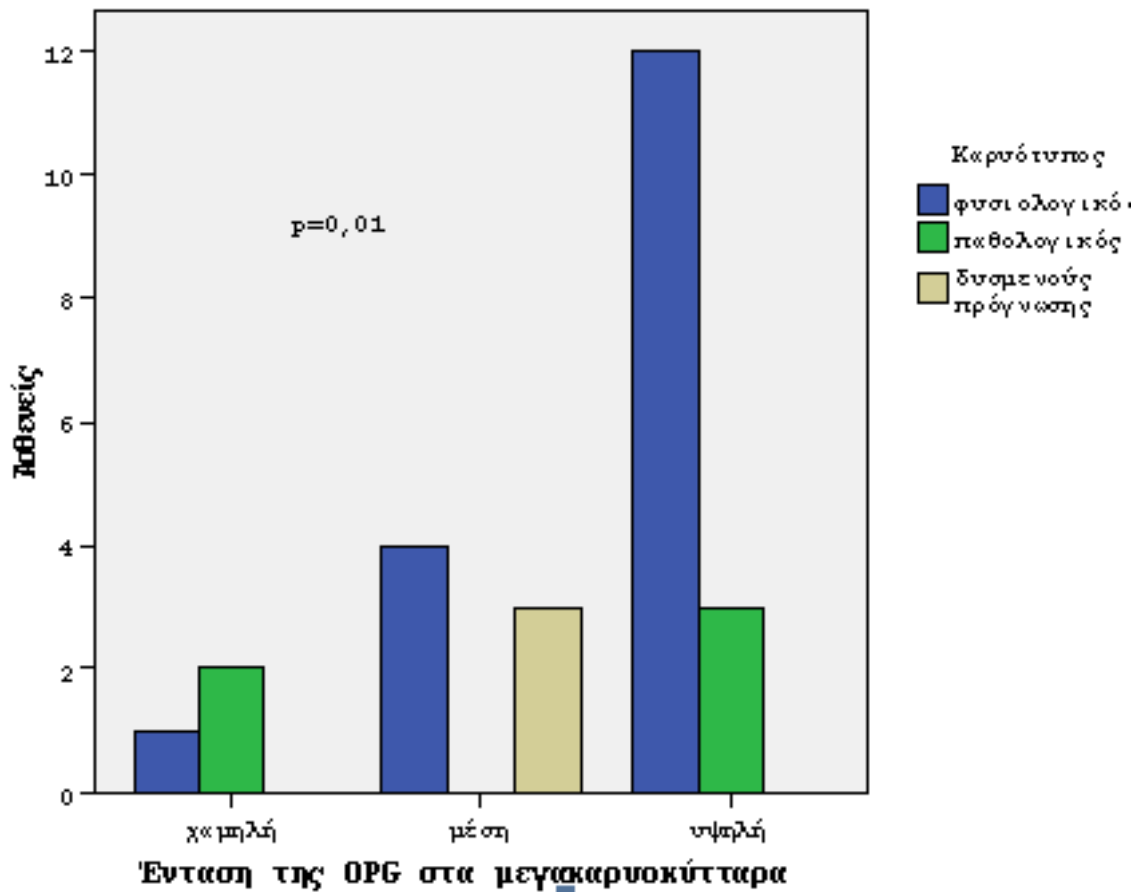
Όλοι οι ασθενείς με χαμηλή ένταση χρώσης OPG στα ΜΓΚ, είχαν πτωχότερη επιβίωση, σε σχέση με αυτούς που εκφράζουν ενδιάμεση και υψηλή ένταση χρώσης στα ΜΓΚ ( $p=0,026$  Kaplan Meier test, Γράφημα 1).



γράφημα 1. «Επιβίωση ως προς την ένταση της χρώσης της οστεοπροτεγερίνης (OPG) στα μεγακαρυοκύτταρα»



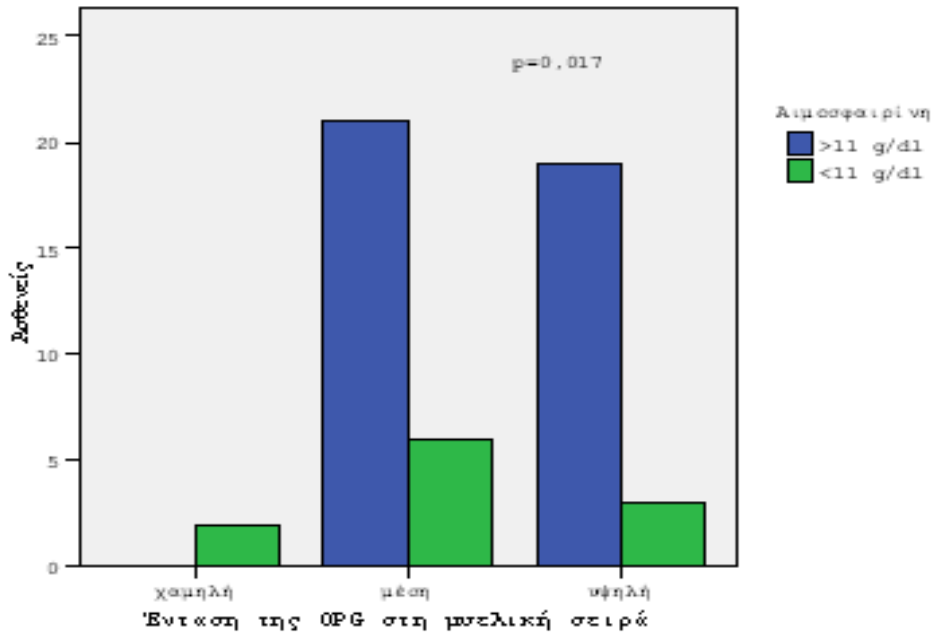
Αυξημένη ένταση χρώσης της OPG στα ΜΓΚ, συσχετίστηκε με φυσιολογικό καρυότυπο ενώ στη μέση ένταση βρίσκεται η ομάδα κακής πρόγνωσης καρυοτύπου ( $p=0,01$  Chi square test, Γράφημα 2). Επιπλέον, στατιστικά σημαντική είναι η συσχέτιση χρώσης OPG με την ύπαρξη λευκών αιμοσφαιρίων ( $p=0,01$  Kruskal Wallis) και ουδετεροφίλων ( $p=0,02$  Kruskal Wallis).



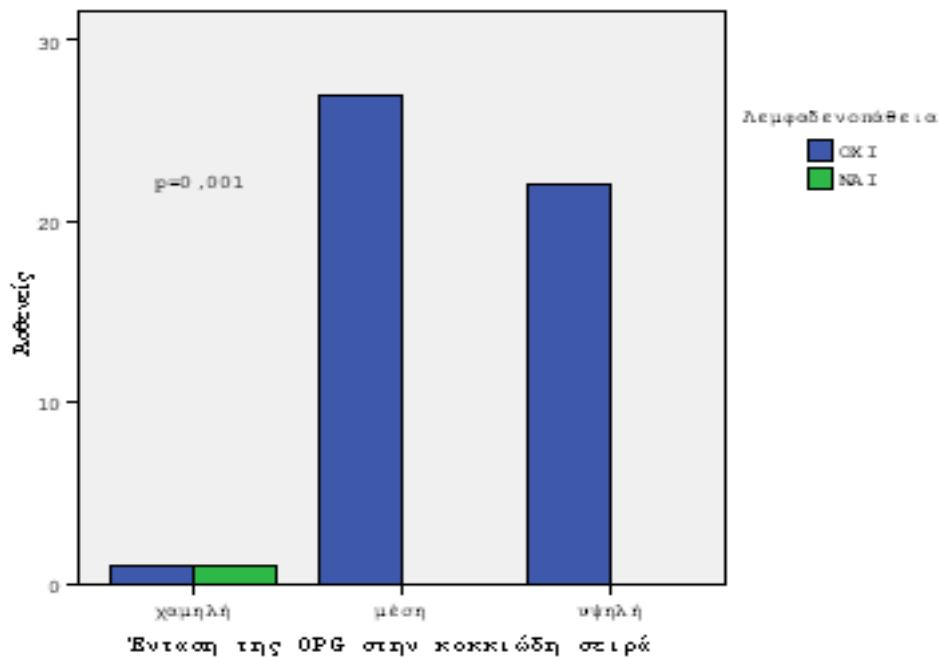
γράφημα 2. «Ένταση της χρώσης της οστεοπροτεγερίνης (OPG) στα μεγακαρυοκύτταρα ως προς τον καρυότυπο»



Αυξημένη ένταση χρώσης της (OPG), στην κοκκιώδη σειρά συσχετίστηκε με τιμές αιμοσφαιρίνης > 11.0g/dl, ενώ μειωμένη ένταση της χρώσης (OPG) με τιμές αιμοσφαιρίνης < 11.0g/dl ( $p=0,017$  Chi square test & Γράφημα 3). Επιπλέον, μειωμένη ένταση χρώσης της (OPG) στην κοκκιώδη σειρά συσχετίστηκε με ύπαρξη λεμφαδενοπάθειας ( $p=0,001$  Chi square test & Γράφημα 4).



γράφημα 3. «Ένταση της χρώσης της οστεοπροτεγερίνης (OPG) στην κοκκιώδη σειρά ως προς την αιμοσφαιρίνη (Hb)»



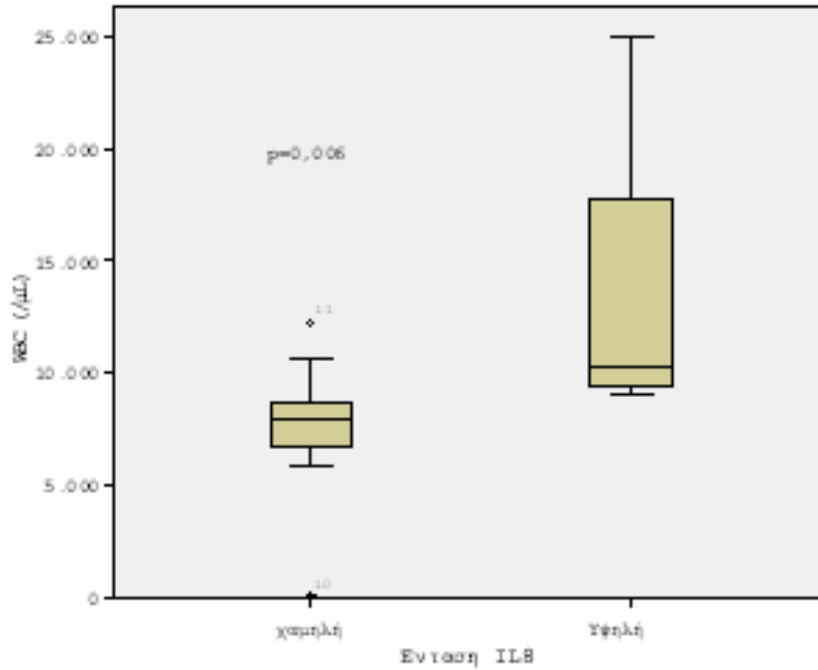




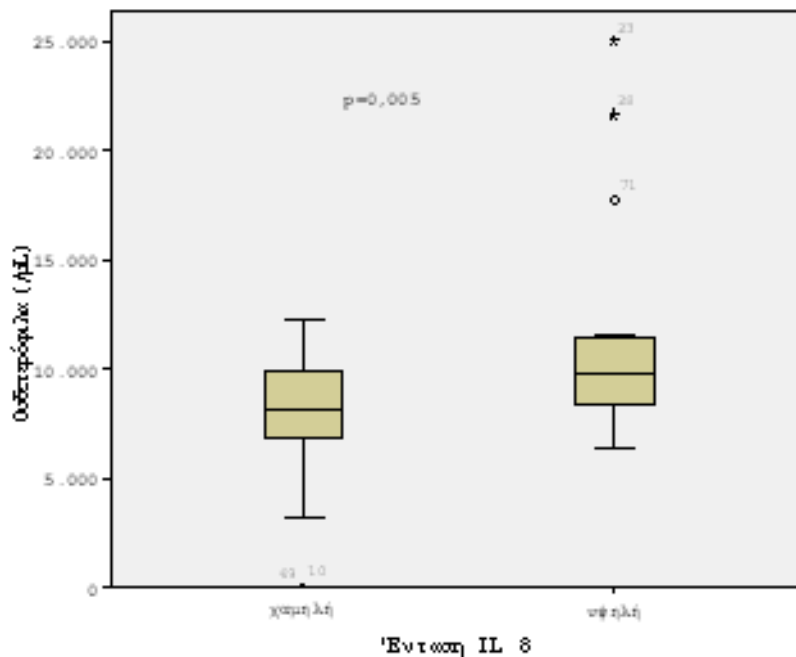
γράφημα 4. « Ένταση της χρώσης της οστεοπροτεγερίνης (OPG) της κοκκιάδους σειράς ως προς την παρουσία λεμφαδενοπάθειας»

### Τιμές IL8 στο σύνολο των ασθενών και συσχέτιση με τα λευκά αιμοσφαίρια

Στο σύνολο των ασθενών αυξημένες τιμές της IL8 συσχετίστηκαν με αυξημένες τιμές λευκών αιμοσφαιρίων και αυξημένες τιμές ουδετεροφίλων ( $p=0,006$  &  $p=0,005$  Mann Whitney και Γραφήματα 5 & 6).



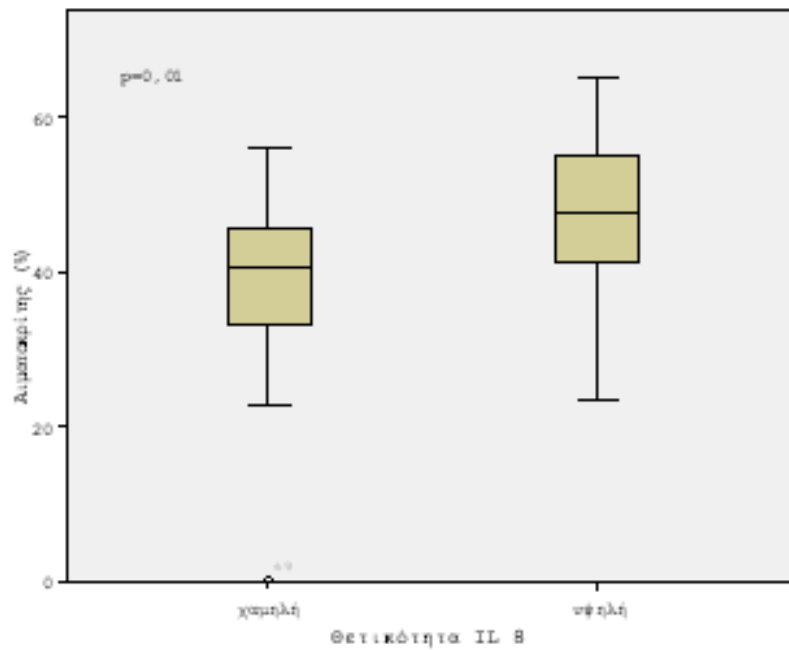
γράφημα 5. «Ένταση IL-8 ως προς τα λευκά αιμοσφαίρια (WBC)»



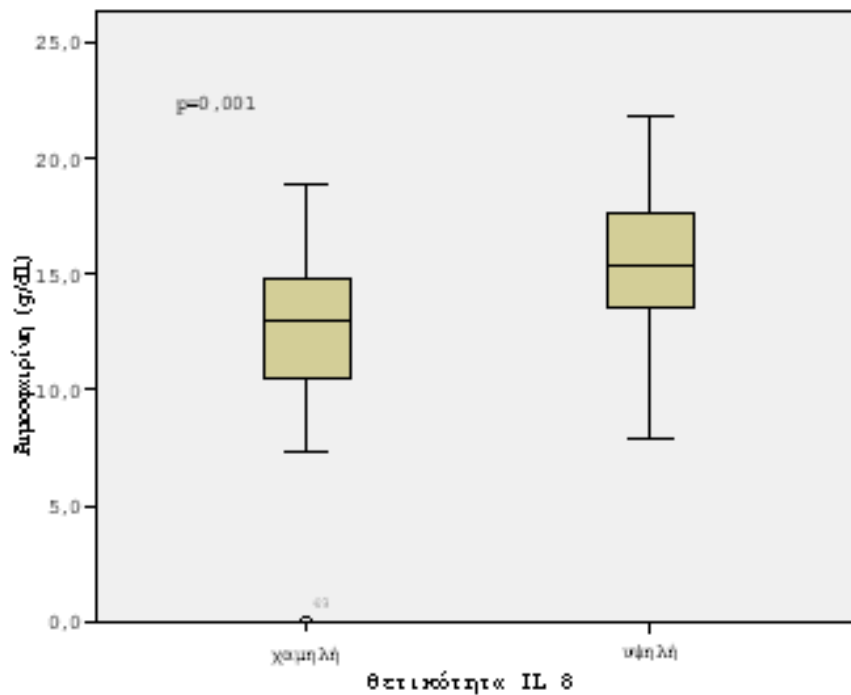


γράφημα 6. «Ένταση IL-8 ως προς τα ουδετερόφιλα»

Στο σύνολο των ασθενών, αυξημένη θετικότητα χρώσης της IL8 παρατηρήθηκε σε ασθενείς με υψηλό αιματοκρίτη και με υψηλή αιμοσφαιρίνη ( $p=0,001$  Mann Whitney και Γραφήματα 7 & 8).



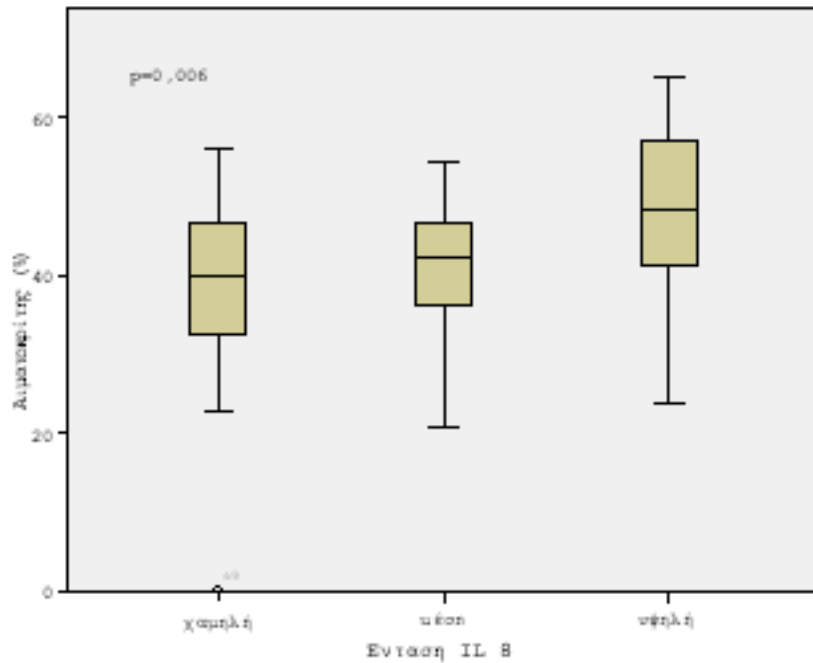
γράφημα 7. «Θετικότητα χρώσης της ιντερλευκίνης IL8 ως προς τον αιματοκρίτη (Ht)»





γράφημα 8. «Θετικότητα της χρώσης της IL8 ως προς την αιμοσφαιρίνη (HB)»

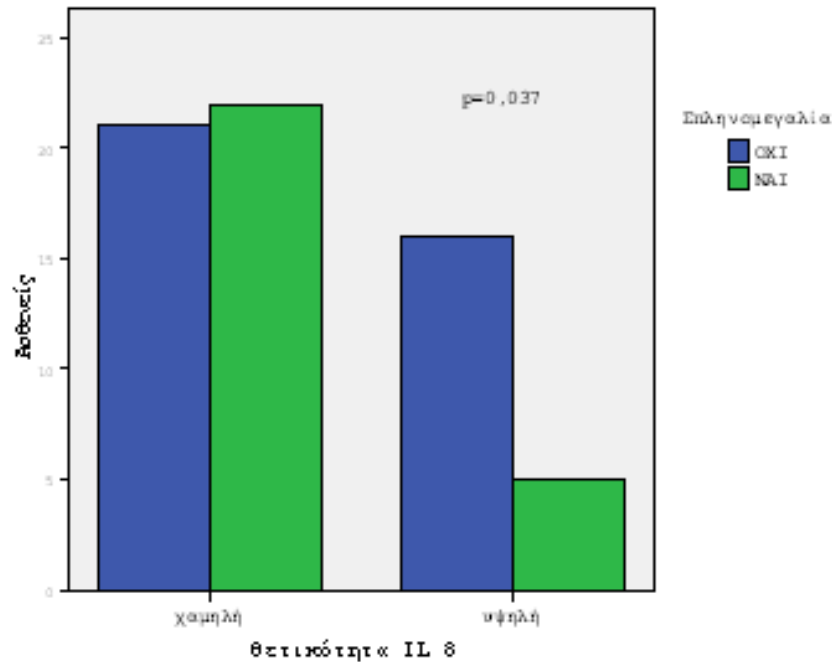
Το Γραφημα 9 μας δείχνει ότι αυξημένη ένταση χρώσης της IL8, παρατηρήθηκε σε όλους τους ασθενείς με υψηλό αιματοκρίτη ( $p=0,006$  Kruskal Wallis test).



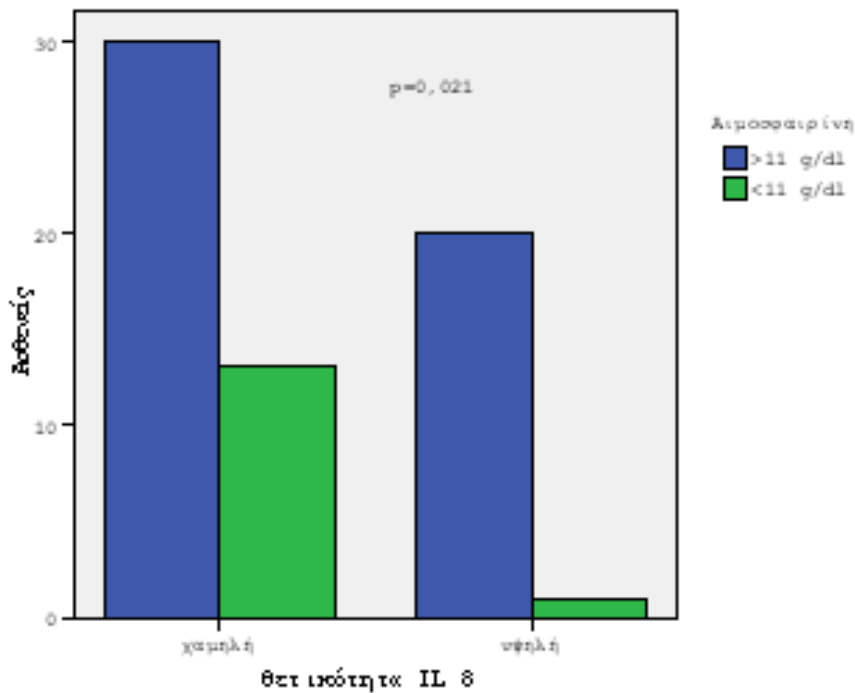
γράφημα 9. «Ένταση IL8 ως προς Ht »



Μειωμένη θετικότητα της χρώσης της IL8, παρατηρήθηκε σε ασθενείς χωρίς σπληνομεγαλία ( $p=0,037$  chi square test), και με υψηλές τιμές αιμοσφαιρίνης  $> 11.0\text{g/dl}$  ( $p=0,021$  chi square test) όπως φαίνεται και στα Γραφήματα 10 & 11.



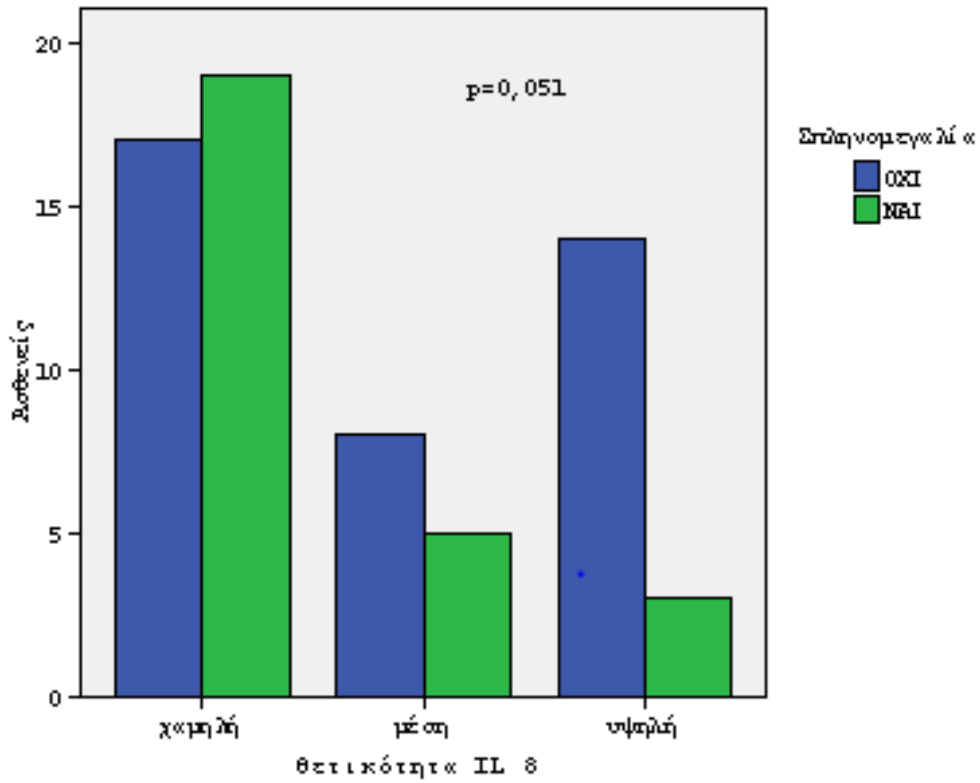
γράφημα 10. «Θετικότητα της IL8 ως προς την παρουσία σπληνομεγαλίας»



γράφημα 11. «Θετικότητα της IL8 ως προς την αιμοσφαιρίνη Hb»



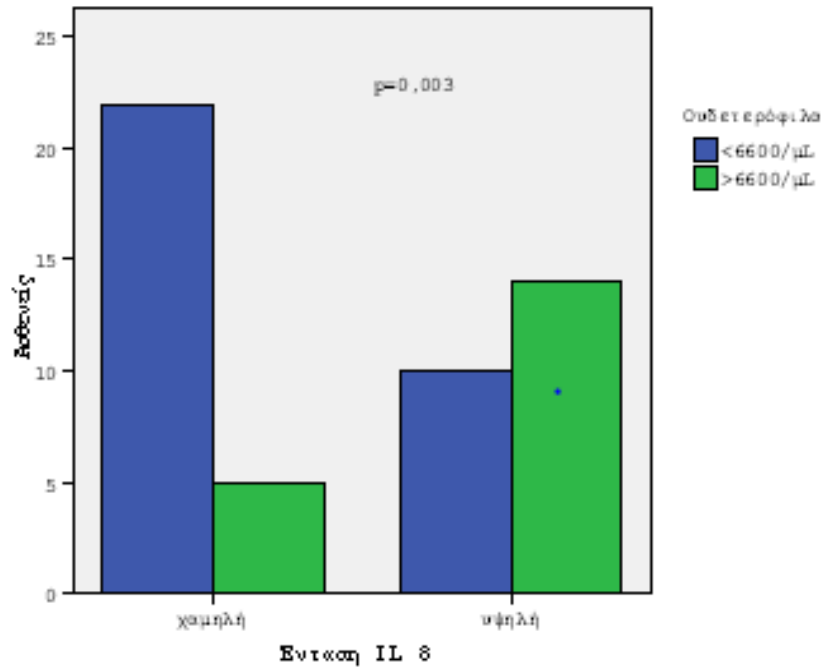
Αυξημένη θετικότητα της IL8 δεν συσχετίστηκε με σπληνομεγαλία ( $p=0,051$  Chi square & Γράφημα 12).



γράφημα 12. «Θετικότητα IL8 και συχνότητα σπληνομεγαλίας»



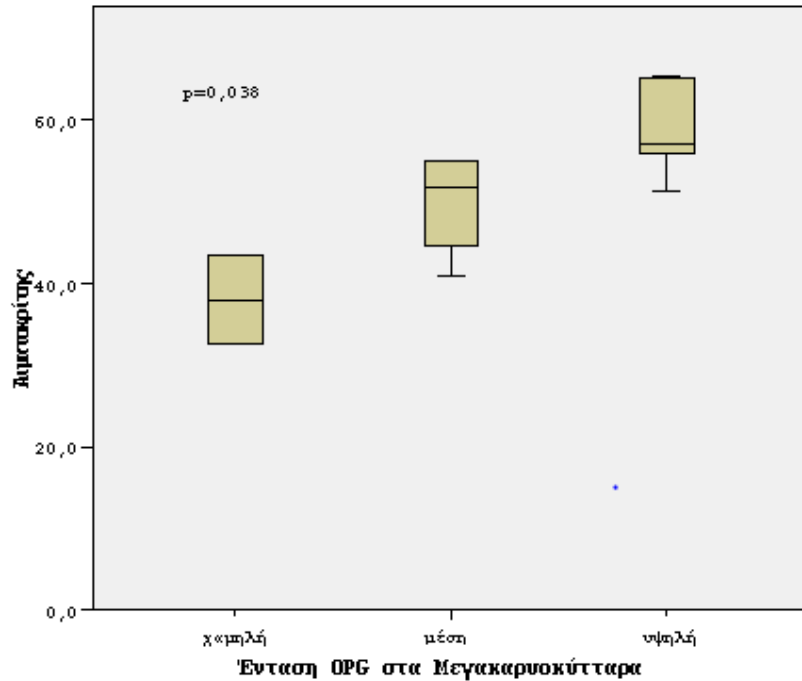
Αυξημένη ένταση της IL8 συσχετίστηκε με αυξημένη συχνότητα ασθενών με ουδετερόφιλα >6600/μL (αυξημένος αριθμός ουδετεροφίλων) σύμφωνα με το Γράφημα 13. ( $p=0,003$  Chi square)



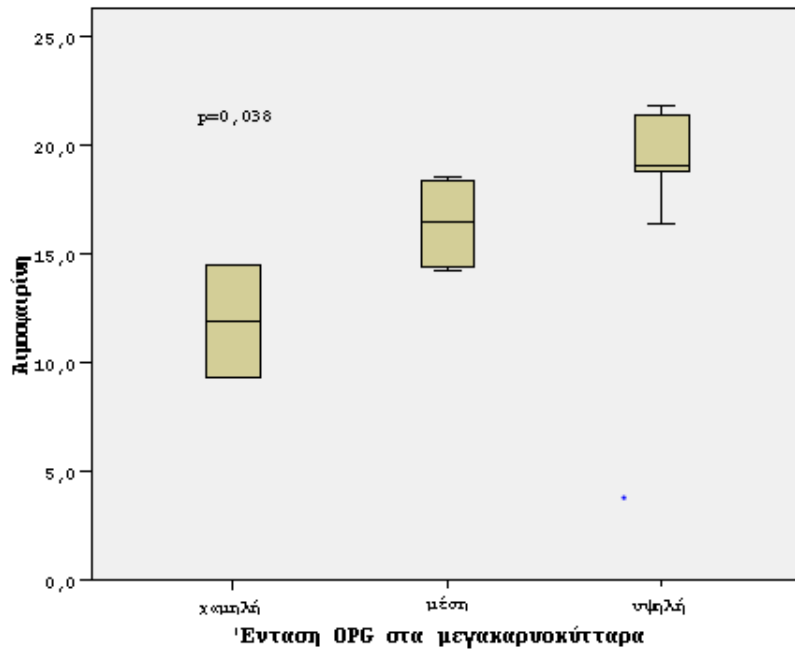
γράφημα 13. «Ένταση IL8 ως προς τα ουδετερόφιλα»



Στους ασθενείς με *Αληθή Πολυκυτταραιμία (ΑΠ)*, ο υψηλός αιματοκρίτης και η υψηλή αιμοσφαιρίνη, συσχετίσθηκαν με αυξημένη ένταση χρώσης της OPG, στα μεγακαρυοκύτταρα (ΜΓΚ) ( $p=0.038$  Kruskal Wallis test).



γράφημα 14. «Ένταση της χρώσης της οστεοπροτεγερίνης (OPG) ΜΓΚ ως προς τον αιματοκρίτη»



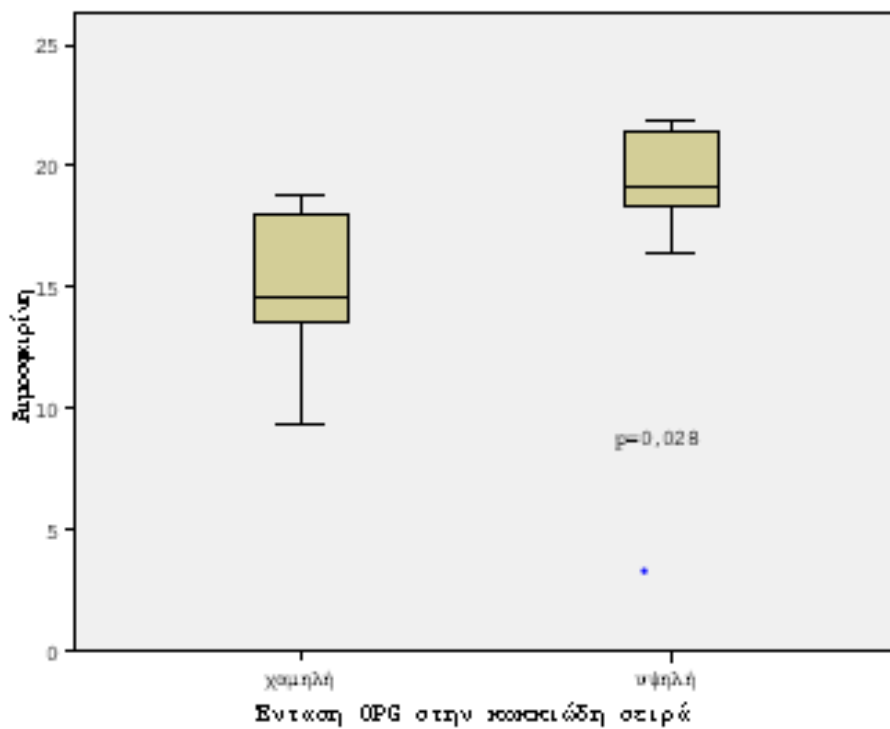
γράφημα 15. «Ένταση της χρώσης της οστεοπροτεγερίνης (OPG) ΜΓΚ ως προς την αιμοσφαιρίνη»



Στους ασθενείς με Αληθή Πολυκυτταραιμία (ΑΠ), ο υψηλός αιματοκρίτης και η υψηλή αιμοσφαιρίνη, συσχετίστηκαν με αυξημένη ένταση χρώσης της OPG κοκκιώδους σειράς ( $p=0,019$  &  $p=0,028$  Kruskal Wallis test).



γράφημα 16. «Συσχέτιση Ht ως προς την ένταση της οστεοπροτεγερίνης (OPG) στην κοκκιώδη σειρά»



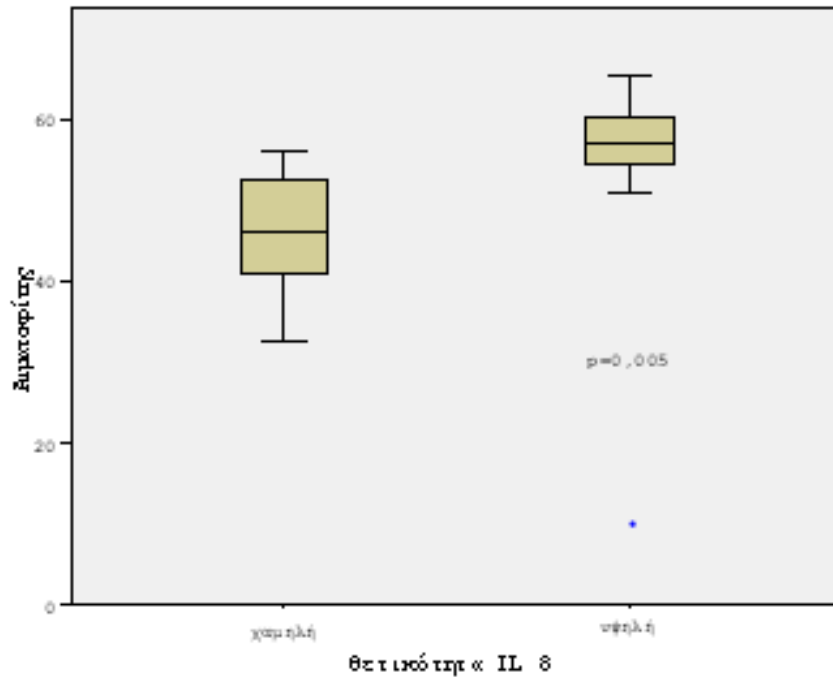
γράφημα 17. «Συσχέτιση Hb ως προς την ένταση της (OPG) στην κοκκιώδη σειρά»



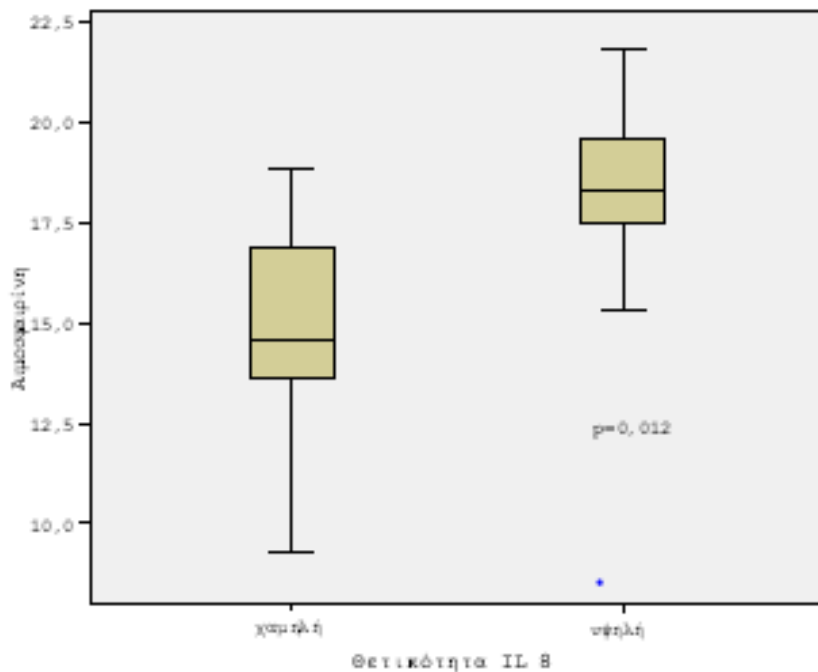


### Έκφραση της IL8 στην ΑΠ

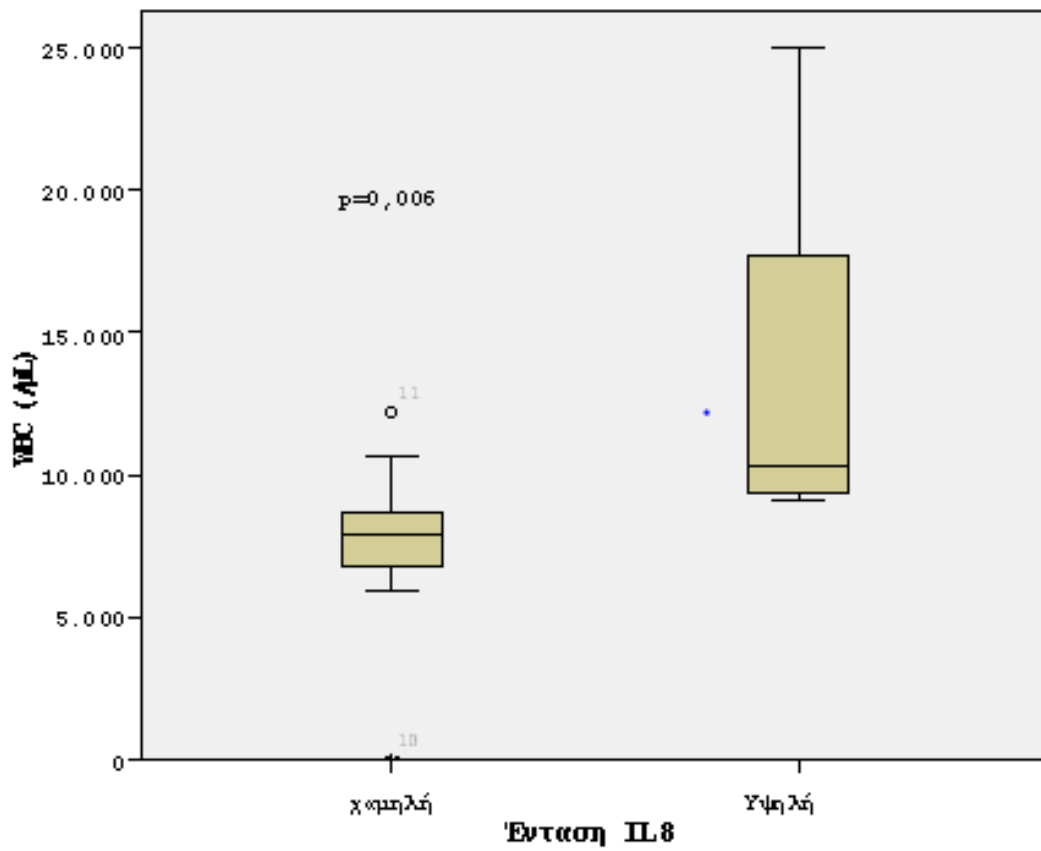
Σχετικά με την έκφραση της IL8 στην ΑΠ, αυξημένη θετικότητα παρατηρήθηκε στους ασθενείς με υψηλό αιματοκρίτη ( $p=0,005$ , Mann Whitney test & Γράφημα 18) και υψηλή αιμοσφαιρίνη ( $p=0,012$ , Mann Whitney test & Γράφημα 19).



γράφημα 18. «Συσχέτιση Ht ως προς την θετικότητα της IL8»



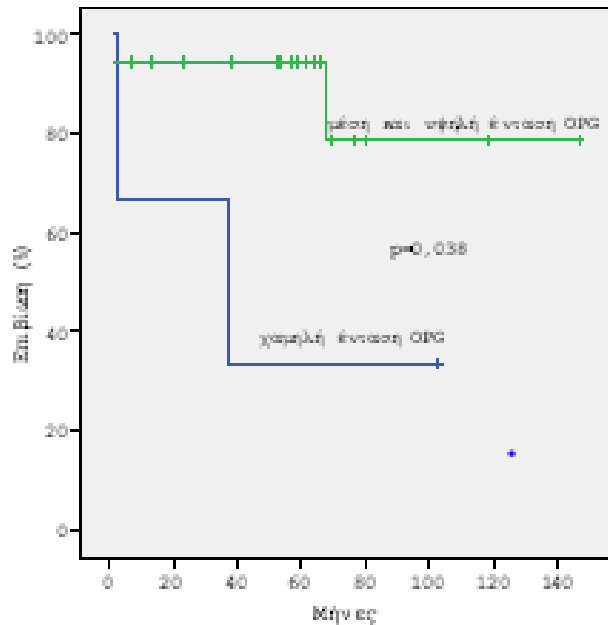
γράφημα 19. «Συσχέτιση Hb ως προς την θετικότητα της IL8»



γράφημα 20. «Συσχέτιση των λευκών αιμοσφαιρίων (WBC) ως προς την ένταση της IL8»

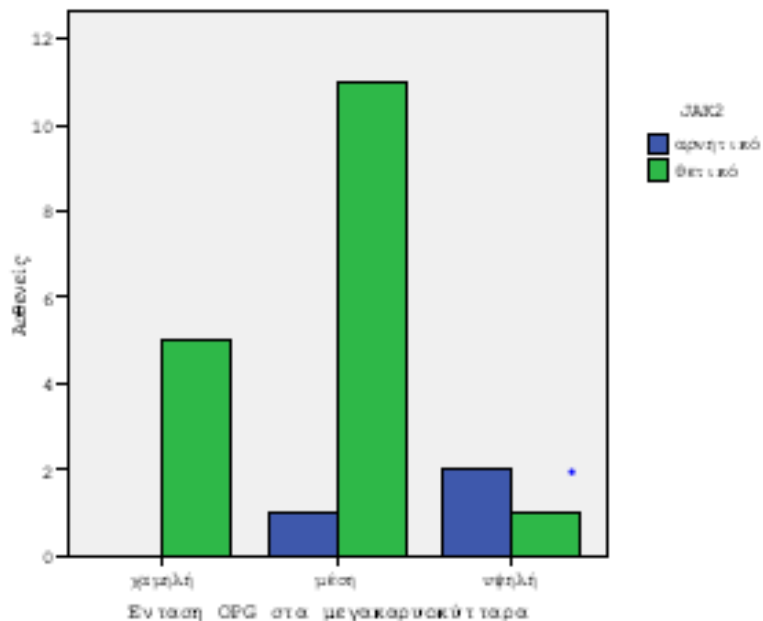


Στους ασθενείς με **Ιδιοπαθή Θρομβοκυττάρωση (ΙΘ)**, μειωμένη ένταση χρώσης της (OPG) στα ΜΓΚ, συσχετίστηκε με πτωχό προσδόκιμο επιβίωσης, συγκρινόμενο με ασθενείς που είχαν ενδιάμεση και υψηλή ένταση χρώσης (OPG) στα ΜΓΚ ( $p=0,038$ , Kaplan Meier test), όπως φαίνεται στο Γράφημα 21.



γράφημα 21. «Επιβίωση ως προς την ένταση της (OPG) στα ΜΓΚ»

Μέση ένταση χρώσης OPG ΜΓΚ, παρατηρήθηκε στους ασθενείς που ήταν JAK2 +. ( $p=0,023$  Chi square), σύμφωνα με το Γράφημα 22.

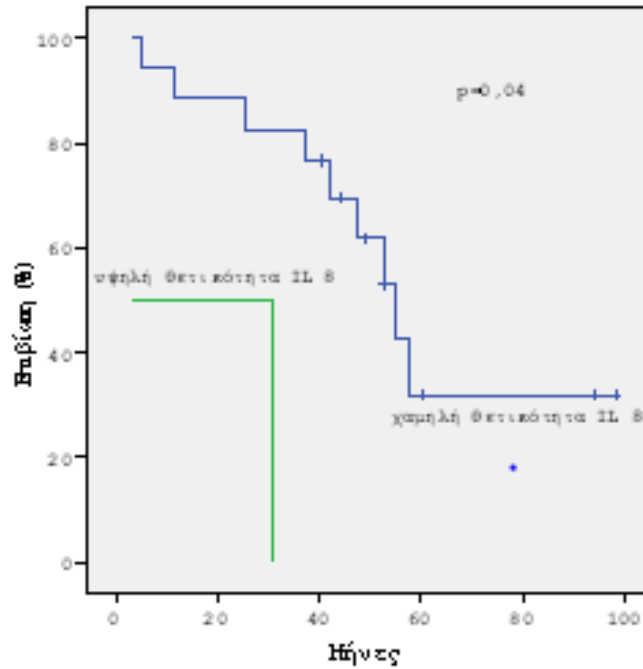


γράφημα 22. «Ένταση της χρώσης της (OPG) ΜΓΚ ως προς JAK 2»

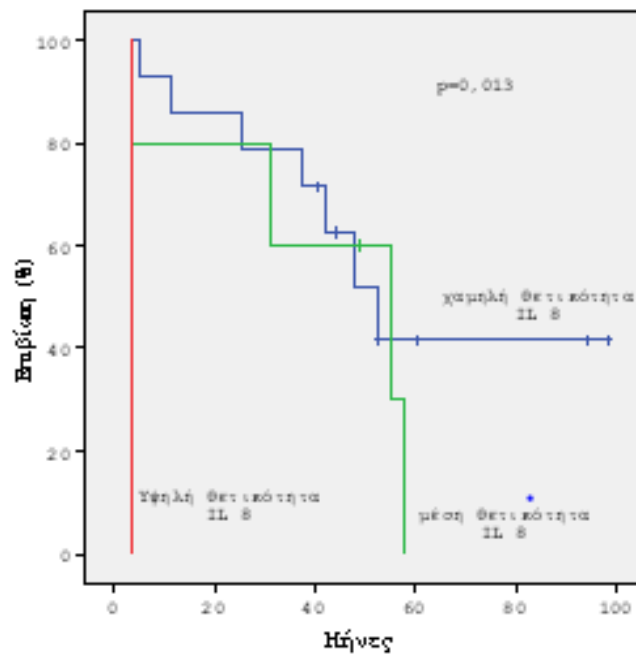


### Θετικότητα γρώσης IL8 στην MI

Στους ασθενείς με Μυελοίνωση, υψηλή ένταση έκφρασης της IL8, συσχετίστηκε με πτωχή επιβίωση ( $p=0,04$  &  $p=0,013$  KaplanMeier test και Γραφήματα 23 & 24)



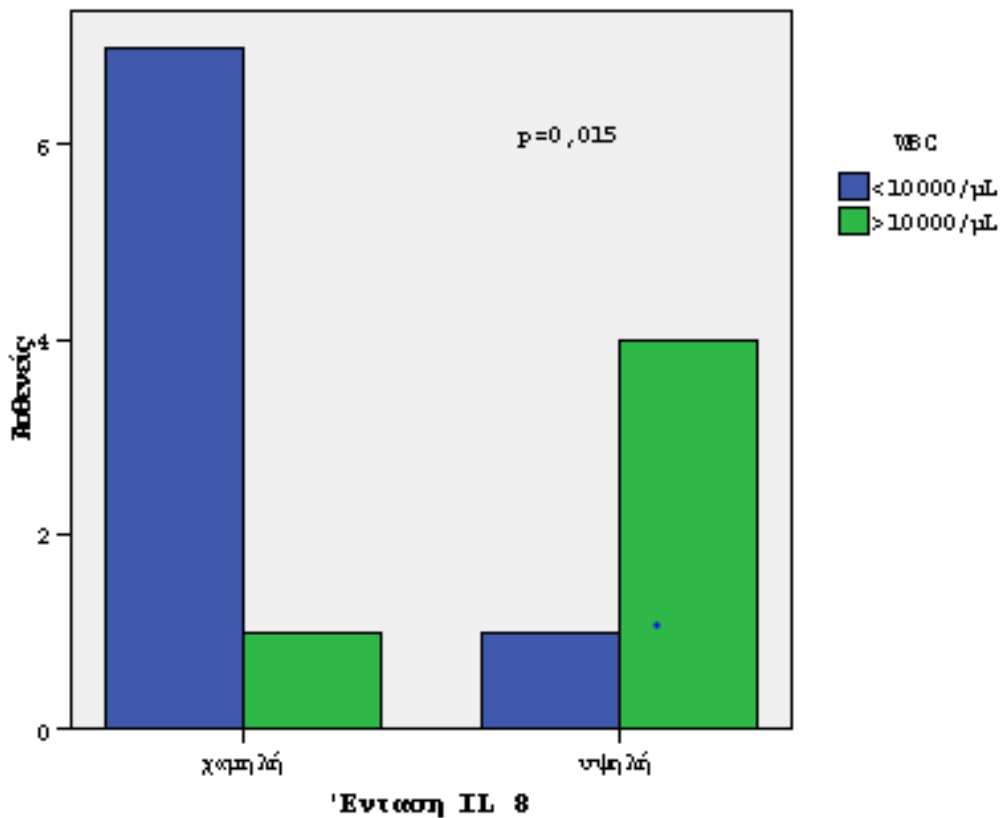
γράφημα 23. «Συσχέτιση επιβίωσης ως προς IL8 ( 2 ομάδες ασθενών)»



γράφημα 24. «Συσχέτιση επιβίωσης ως προς IL8 ( 3 ομάδες ασθενών) »



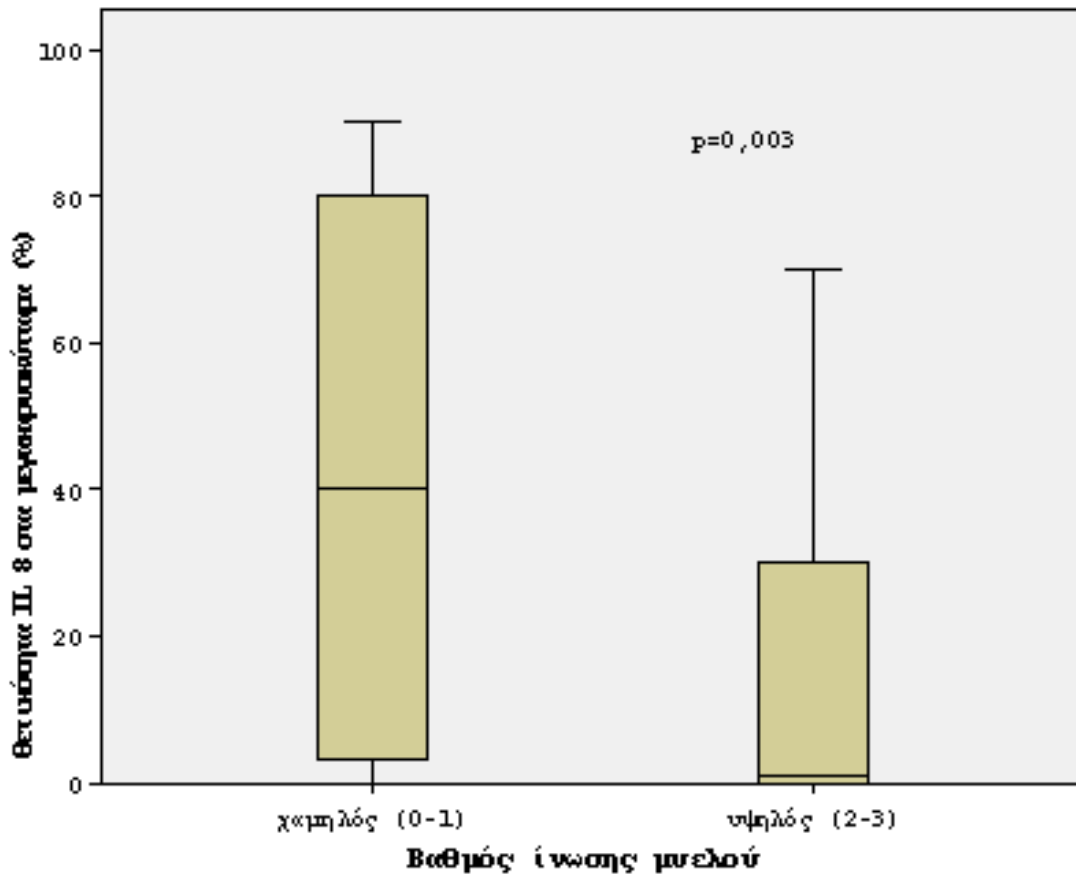
Η OPG, εκφράστηκε και σε κύτταρα της κοκκιώδους σειράς, και η υψηλή έντασή της, παρατηρήθηκε σε ασθενείς με υψηλά λευκά αιμοσφαίρια. Συγκεκριμένα αυξημένη ένταση της OPG υποδηλώνει τιμή WBC >10.000/μL ( $p=0,015$  Chi square, Γράφημα 25).



γράφημα 25. «Συσχέτιση έντασης IL8 ως προς τιμή WBC>10.000μL»



Τέλος, στους ασθενείς με ίωση εμφανίστηκαν χαμηλότερες τιμές της IL8 Ποσοστόθετικών Μεγακαρυοκυττάρων ( $p=0,003$  Mann Whitney & Γράφημα 26).



γράφημα 26. « Θετικότητα IL8 Ποσοστοθετικών Μεγακαρυοκυττάρων και βαθμός ίωσης μυελού»

OPG Πολυκυτταραιμία	Αληθής	↑ ΜΓΚ, ↑MLC
OPG Θρομβοκυττάρωση	Ιδιοπαθής	↓ΜΓΚ, ↓επιβίωση
OPG ΜΥΣ		↓ΜΓΚ, ↓επιβίωση
OPG ΜΥΣ		↑ΜΓΚ, φυσιολογικός καρύοτυπος
IL-8 Πολυκυτταραιμία	Αληθής	↑ ένταση
IL-8 Μυελοινωση		↑ ένταση, πτωχή επιβίωση



## 5.6. Συμπεράσματα

Η ΑΠ, η ΙΘ και η ΜΙ είναι μυελουπερπλαστικά νοσήματα BCR-ABL αρνητικά που χαρακτηρίζονται από αλλαγές στο στρώμα του μυελού των οστών. Ως στρώμα θεωρείται ο ιστός που δεν συμμετέχει άμεσα στην αιμοποίηση αλλά οδηγεί στην ερυθροποίηση μέσω της παραγωγής παραγόντων διέγερσης αποικιών. Τα παραπάνω στοιχεία δείχνουν ότι η βαρύτητα των νοσημάτων αυτών, δεν προκαλείται μόνο από τον πρωτογενή και νεοπλασματικό κλώνο, αλλά και από μια δευτερεύουσα φλεγμονή, που δημιουργείται από την παραγωγή κυττοκινών στο μικροπεριβάλλον του μυελού των οστών. Όλα τα ΜΥΣ οφείλονται σε γενετικές βλάβες εντός των πολυδύναμων αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων που συσσωρεύονται κατά την διάρκεια της νόσου και τα κλινικά συμπτώματα σχετίζονται με την απορρυθμισμένη παραγωγή των κυτταροκινών, κυρίως του TNF $\alpha$ , IL-8, IL-1, IL-6 και της OPG.

Στην μελέτη μας μελετήσαμε την ένταση και θετικότητα έκφρασης της IL-8 και της OPG στα ΜΥΣ με ανοσοϊστοχημεία.

Μελετώντας την βιβλιογραφία, φαίνεται ότι η IL-8 έχει μελετηθεί μόνο στον ορό ασθενών. Ο Emadi και συν. μελέτησε τα επίπεδα της IL-8 στον ορό ασθενών με ΜΙ και τα βρήκε σημαντικά αυξημένα, συμβάλλοντας στην διαδικασία της μυελουπερπλασίας. Η έκφραση της IL-8 παρατηρήθηκε σε διάφορους αιμοποιητικούς κυτταρικούς τύπους, συμπεριλαμβανόμενων των κοκκιοκυττάρων, των μονοκυττάρων, των μεγακαρυοκυττάρων, των αιμοπεταλίων και των CD34+ κυττάρων. Αυξημένα επίπεδα IL-8 στον ορό ασθενών με ΑΠ και ΙΘ, βρέθηκαν να ενισχύουν την δημιουργία ενδογενών αποικιών ερυθράς σειράς *in vitro* (46). Ο Emadi και συν έδειξαν ότι τα επίπεδα της IL-8 ήταν σημαντικά αυξημένα στον ορό ασθενών με ΜΙ και ότι διάφορα αιμοποιητικά κύτταρα συμπεριλαμβανόμενων των αιμοπεταλίων, συμμετέχουν στην παραγωγή της. Ο Tefferi και συν, βρήκαν ότι η IL-8 σχετίζεται με αυξημένα επίπεδα βλαστών στο περιφερικό αίμα και με την παρουσία σωματικών συμπτωμάτων στα ΜΥΣ. Υψηλά επίπεδα IL-8 στον ορό φαίνεται να προάγουν εξωμυελική αιμοποίηση στο ήπαρ και στον σπλήνα. Επίσης η IL-8 έχει φανεί ότι προάγει την ενδοθηλιακή κυτταρική ανάπτυξη, την οργάνωση του τριχοειδικού αυλού και την έκφραση των μεταλλοπρωτεϊνών του δικτύου στα ενδοθηλιακά κύτταρα. Η αυξημένη παραγωγή κυτταροκινών φαίνεται να οδηγεί στην



συμπτωματολογία των ασθενών και αναφέρεται ως «θύελλα κυτταροκινών»-cytokine storm. Η IL-8 φαίνεται να επιδρά στον κακοήθη κλώνο, επηρεάζοντας την κυτταρική του ανάπτυξη και διαφοροποίηση στο μικροπεριβάλλον του μυελού των οστών αλλά και σε διάφορα όργανα εξωμυελικής αιμοποίησης, όπως ειπώθηκε παραπάνω. Η έκφραση της IL-8 παρατηρήθηκε σε διάφορους τύπους αιμοποιητικών κυττάρων όπως τα κύτταρα της κοκκιώδους σειράς, τα μεγακαρυοκύτταρα και τα αιμοπετάλια.

Η (OPG), αναγνωρίστηκε για πρώτη φορά το 1997 από 2 ανεξάρτητες μεταξύ τους ομάδες ερευνητών: της εταιρείας AMGEN στην Αμερική και μίας άλλης εταιρείας στην Ιαπωνία. Και οι δύο ομάδες θεώρησαν ότι η (OPG) είναι ένας δυναμικός αναστολέας της οστεοκλαστογένεσης. Η (OPG) είναι επίσης γνωστή ως Ανασταλτικός Παράγοντας της Οστεοκλαστογένεσης (ΑΠΟ) και είναι ένα «δόλωμα» υποδοχέας για τον υποδοχέα ενεργοποιητή του συνδέτη RANKL. Όταν η OPG συνδέεται με τον RANKL, εμποδίζει την ενεργοποίηση του NF-kb, που είναι ένας μεταγραφικός παράγοντας για τα γονίδια ανοσίας και ρυθμιστής κλειδί της φλεγμονής, της φυσικής ανοσίας, της κυτταρικής επιβίωσης και διαφοροποίησης. Στην βιολογία των οστών, ο RANKL είναι μία κυτταροκίνη οστεοκλαστογένεσης, η (OPG) είναι ο αναστολέας της και ο RANK είναι ο υποδοχέας του RANKL.

Η μετάλλαξη JAK2V617F υπάρχει σε όλους σχεδόν τους ασθενείς με ΑΠ.

Τα συμπτώματα της ΑΠ σχετίζονται με την υπεργλοιότητα του αίματος που οφείλεται στην αύξηση του αιματοκρίτη και στην αύξηση της μάζας των ερυθρών αιμοσφαιρίων. Η συσσώρευση των κυττάρων έχει ως συνέπεια την οργανομεγαλία, την υπερουριχαιμία και διάφορα συμβάματα που προέρχονται από την παραγωγή κυτταροκινών όπως κνησμός, θρομβωτικά ή αιμορραγικά φαινόμενα που προκαλούν κεφαλαλγία, ναυτία και οφθαλμικές ενοχλήσεις. Η φλεβική θρόμβωση είναι πιο συχνή στην ΑΠ, όπως είναι το σύνδρομο Budd- Chiari, η θρόμβωση μεσεντερικών φλεβών, η θρόμβωση σπληνικής ή πυλαίας φλέβας.





Η ΙΘ χαρακτηρίζεται από εμμένουσα θρομβοκυττάρωση με τα αιμοπετάλια να είναι άνω των 450x10<sup>9</sup>/lt. Η μετάλλαξη JAK2V617F βρίσκεται στο 55% των περιπτώσεων. Η θρόμβωση και η αιμορραγία είναι συχνές επιπλοκές και ο αριθμός των αιμοπεταλίων > 1500 x10<sup>9</sup>/L είναι ένδειξη για έναρξη θεραπείας με κυτταροστατικά. Σωματικές μεταλλάξεις στο JAK2, στο CALR ή στο MPL βρίσκονται στο 90% των ασθενών και έχουν βελτιώσει την διαγνωστική και κλινική αντιμετώπιση αυτής της νόσου.

Η ΜΙ είναι η κλωνική ανάπτυξη του αρχέγονου αιμοποιητικού κυττάρου που χαρακτηρίζεται από την παραγωγή κυτταροκινών και αυξητικών παραγόντων επηρεάζοντας το στρώμα του μυελού των οστών προκαλώντας ίνωση. Τα νεοπλασματικά κύτταρα διηθούν εξωμυελικά όργανα όπως είναι το ήπαρ και ο σπλήνας, οδηγώντας σε ηπατομεγαλία και σπληνομεγαλία αντίστοιχα. Η αναιμία, τα δακρυοκύτταρα και η ερυθροβλάστωση στο περιφερικό αίμα χαρακτηρίζουν τη νόσο. Η μετάλλαξη JAK2 είναι παρούσα στο 60% των ασθενών με ΜΙ ή σε ΜΙ μετά ΙΘ και στο 95% σε ΜΙ μετά ΑΠ. Μεταλλάξεις στο γονίδιο MPL ευρίσκονται στο 3% με 8% των ασθενών με ΜΙ και ΜΙ μετά ΙΘ, ενώ μεταλλάξεις στο γονίδιο της καλρετικουλίνης παρατηρήθηκαν στους μισούς ασθενείς με ΜΙ και ΜΙ μετά ΙΘ, που δεν είχαν τις μεταλλάξεις στο JAK2 και στο MPL. Παρ'όλα αυτά, τα κλινικά συμπτώματα όπως πυρετός, νυκτερινές εφιδρώσεις, σπληνομεγαλία και κόπωση φαίνεται ότι προκαλούνται από τις κυτταροκίνες.

Η κόπωση είναι το πιο συχνό σύμπτωμα άσχετα από τον υπότυπο του ΜΥΣ.

Είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι η σωστή ιστολογική διάγνωση είναι απαραίτητη για το διαχωρισμό των νοσημάτων αυτών.

Ο πρωταρχικός σκοπός αυτής της μελέτης ήταν η αξιολόγηση της έντασης και ο βαθμός θετικότητας της έκφρασης της IL-8 και της OPG με ανοσοιστοχημεία στο μυελό των οστών των ασθενών με ΜΥΣ κατά τη διάγνωση για να δούμε εάν σχετίζονται με τα κλινικά χαρακτηριστικά των νοσημάτων αυτών. Ο δεύτερος σκοπός ήταν να αξιολογηθεί αν η ένταση της IL-8 και της OPG με ανοσοιστοχημεία θα μπορούσαν να δώσουν πρόσθετες πληροφορίες για την πρόγνωση. Η ανάλυση των



αποτελεσμάτων έγινε σε κάθε νόσημα ξεχωριστά αλλά και σε όλα τα νοσήματα συλλογικά λόγω του χαμηλού αριθμού των ασθενών αλλά και λόγω του βαθμού της έκφρασης που παρατηρήθηκε στα πλαίσια της έντασης και της θετικότητας μιάς και η χρώση ήταν πανομοιότυπη σε όλους τους ασθενείς με ΜΥΣ.

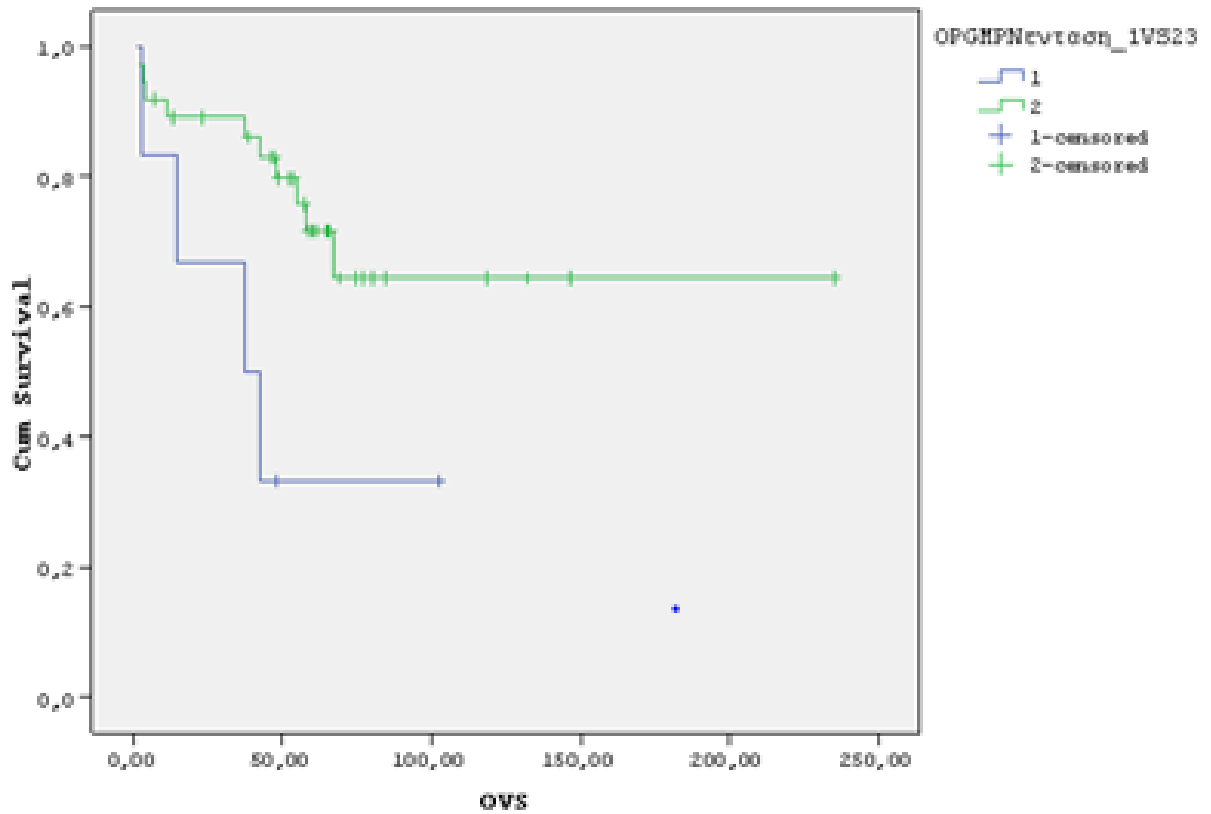
Οι ανοσοιστοχημικές χρώσεις για την IL-8 και την OPG πραγματοποιήθηκαν σε τομές παραφίνης 4μm των οστεομυελικών βιοψιών της διάγνωσης με τη μέθοδο δύο φάσεων συζευγμένων πολυμερών υπεροξειδάσης. Η ένταση και η θετικότητα της έκφρασης της IL-8 και της OPG μετρήθηκαν σε κλίμακα βαθμονομημένη από 0 έως 3. Η στατιστική ανάλυση έγινε με το πρόγραμμα SPSS και στατιστικά σημαντικές θεωρήθηκαν οι τιμές του  $p < 0.05$ . Στην συνέχεια, μελετήθηκαν οι κυττοκίνες αυτές στις οστεομυελικές βιοψίες ασθενών με ΜΥΣ. Η ίωση του μυελού των οστών αξιολογήθηκε σύμφωνα με το σύστημα Manoharan et al, που προσδιορίζει την ίωση σε κλίμακα από 0-4. Οι τριχρωματικές χρώσεις και η χρώση της ρετικουλίνης χρησιμοποιούνται για να προσδιορίσουν την παρουσία ίωσης στις οστεομυελικές βιοψίες ασθενών με ΜΥΣ. Ένα κοινό χαρακτηριστικό σε όλα τα ΜΥΣ είναι η αρχική υπερκυτταρική φάση που μπορεί να εξελιχθεί σε ινωτική φάση στα τελευταία στάδια της νόσου. Στην ινωτική φάση ο μυελός των οστών έχει αυξημένη εναπόθεση συνδετικού ιστού ο οποίος μπορεί να ανιχνευθεί από την χρώση ρετικουλίνης και τις τριχρωματικές χρώσεις. Πολλά από τα μορφολογικά και κλινικά χαρακτηριστικά των ΜΥΣ φαίνεται να χάνονται στην ινωτική φάση. Συνεπώς όταν η αρχική διάγνωση γίνεται στην ινωτική φάση παρά στην υπερκυτταρική φάση, είναι πολύ δύσκολο να καθοριστεί αν ο ασθενής έχει πρωτοπαθή MI ή δευτεροπαθή MI μετά ΑΠ ή ΙΘ. Αν και θεωρείται ότι η ινωτική εξαλλαγή που συμβαίνει στην ΑΠ και στην ΙΘ έχει παρόμοια βιολογικά χαρακτηριστικά και προγνωστική σημασία, αυτό δεν έχει ελεγχθεί επίσημα, κυρίως λόγω της υποκειμενικότητας της κατάταξης της ίωσης και της συνεχόμενης διαδικασίας εξαλλαγής στο ινωτικό στάδιο.



## Η ανοσοιστοχημεία

Τα ευρήματά μας όσον αφορά την (OPG), έδειξαν ότι οι ασθενείς με ΜΥΣ που παρουσίαζαν χαμηλή ένταση έκφρασης της (OPG) στα ΜΓΚ, με ανοσοιστοχημεία του μυελού των οστών είχαν πτωχή επιβίωση (γράφημα 27).

Survival Functions

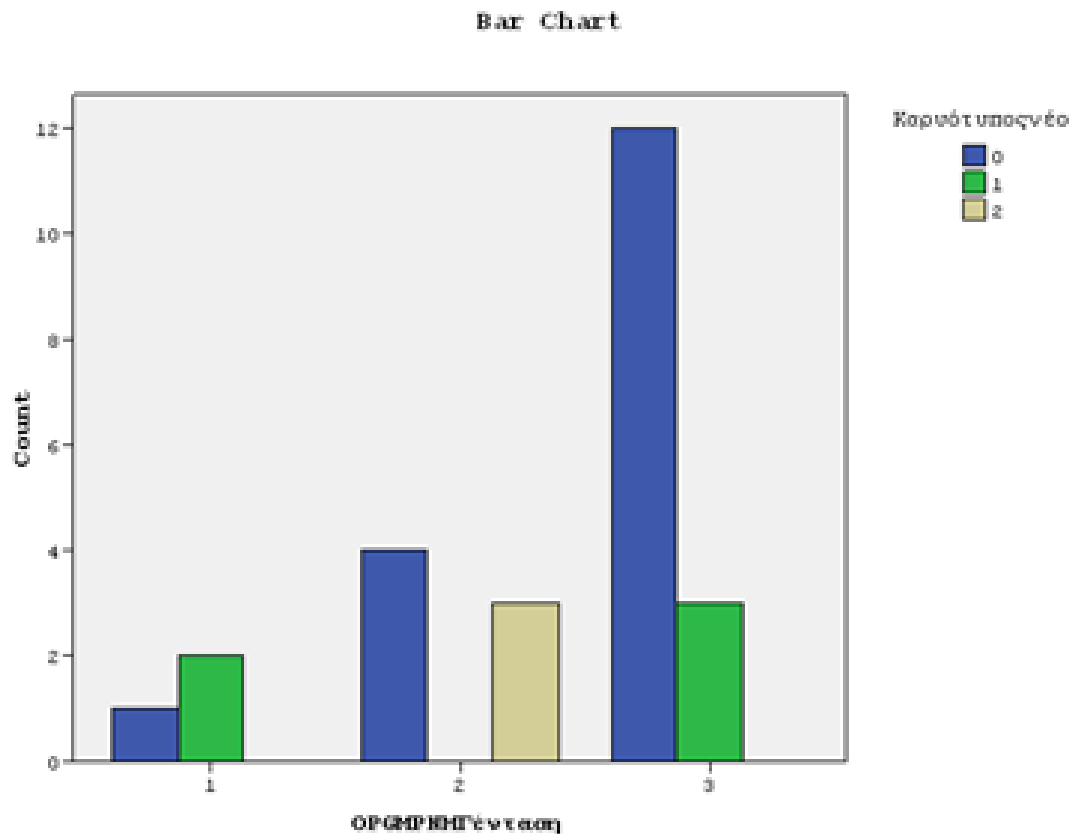


γράφημα 27. «Συσχέτιση υψηλης έντασης (OPG) ως προς την επιβίωση



Η έκφραση της (OPG) σε σύγκριση με τα καρυοτυπικά ευρήματα δεν έχει αναφερθεί στην βιβλιογραφία μέχρι σήμερα και θα χρειαστούν περαιτέρω μελέτες καθώς μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως προγνωστικός δείκτης στο μέλλον.

Υψηλή ένταση έκφρασης της (OPG) στα ΜΓΚ σχετιζόταν με φυσιολογικό καρύοτυπο σε όλους τους ασθενείς (γράφημα 28).

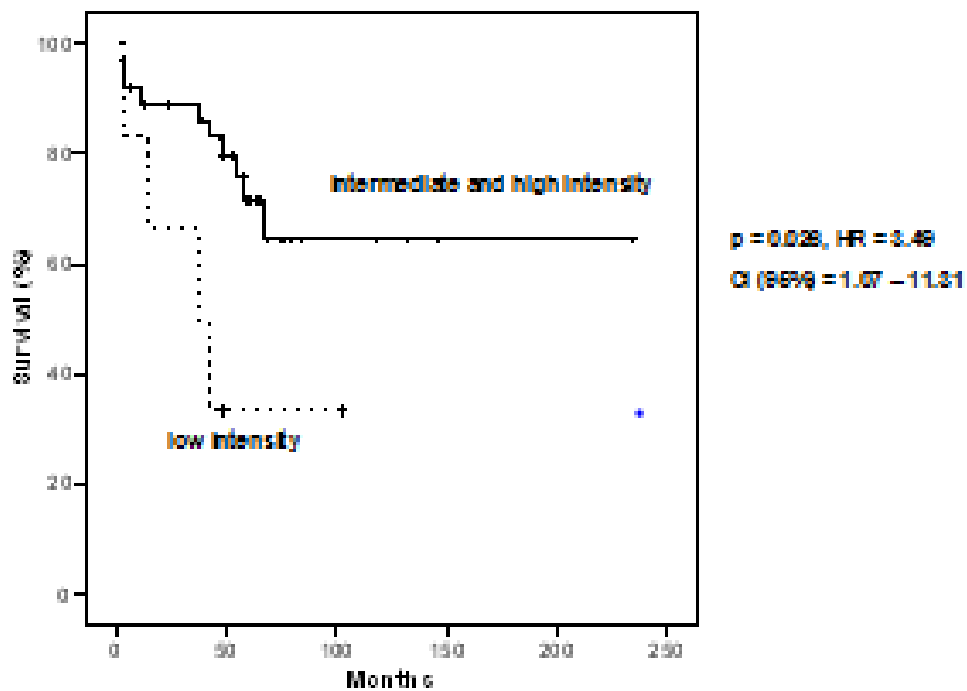


γράφημα 28. « Συσχέτιση έκφρασης της (OPG) στα ΜΓΚ ως προς τον καρύοτυπο»

Επιπλέον, υψηλή ένταση ανοσοιστοχημικής έκφρασης της IL-8 στα ΜΓΚ, παρατηρήθηκε σε όλους τους ασθενείς με υψηλή τιμή LDH και λευκοκυττάρωση που είναι δυσμενείς προγνωστικοί παράγοντες. Αυτά τα ευρήματα σίγουρα χρήζουν περαιτέρω διερεύνησης της (OPG) και της (IL-8) ως πιθανοί θεραπευτικοί στόχοι μιάς και δεν έχουν αναφερθεί στην βιβλιογραφία. Ίσως νέες θεραπείες στοχεύουν και ξεπεράσουν την αντίσταση της τυροσίνης κινάσης, στους ασθενείς με ΜΥΣ. Μέχρι σήμερα, δεν υπάρχει καμμία συστηματική μελέτη που να συγκρίνει την έκφραση της (OPG) με την επιβίωση στα ΜΥΣ.



Πιο συγκεκριμένα, η χαμηλή ένταση έκφρασης της (OPG) στα ΜΓΚ με ανοσοιστοχημεία θα μπορούσε να επιδείξει ποιοί ασθενείς θα έχουν πτωχή πρόγνωση. Είναι εμφανές ότι ο κλινικός φαινότυπος των ΜΥΣ, είναι το αποτέλεσμα της κλωνικής μυελουπερπλασίας αλλά και μιας δευτεροπαθούς φλεγμονής που χαρακτηρίζουν τις στρωματικές αλλαγές στο μυελό των οστών (γράφημα 29).



γράφημα 29. «Χαμηλή ένταση έκφρασης της (OPG) ΜΓΚ και πτωχή πρόγνωση»



Στους ασθενείς με ΑΠ η υψηλή ένταση της έκφρασης της OPG στα ΜΓΚ, συνέπιπτε με υψηλά επίπεδα αιμοσφαιρίνης. Η υψηλή ένταση της OPG εκφράστηκε στα κύτταρα της κοκκιώδους σειράς και αυτό συσχετίστηκε με υψηλή τιμή της αιμοσφαιρίνης. Υψηλή ένταση θετικότητας της έκφρασης της IL-8 συσχετίστηκε με υψηλά επίπεδα αιμοσφαιρίνης ενώ υψηλή ένταση της έκφρασης της IL-8 συσχετίστηκε με υψηλό αριθμό λευκών αιμοσφαιρίων.

Στους ασθενείς με ΙΘ, χαμηλή ένταση έκφρασης της OPG στα ΜΓΚ, συσχετίστηκε με πτωχή επιβίωση όταν συγκρίθηκε με τους ασθενείς που είχαν ενδιάμεση και υψηλή ένταση έκφρασης στα ΜΓΚ. Ενδιάμεση ένταση της έκφρασης της OPG στα ΜΓΚ πατατηρήθηκε στους ασθενείς που ήταν JAK2 θετικοί.

Στους ασθενείς με ΜΙ, συσχετίσεις με τον αιματοκρίτη, την αιμοσφαιρίνη, την LDH και την μετάλλαξη JAK2 δεν έδειξαν κάποια στατιστική σημασία.

Η παρούσα μελέτη είναι η πρώτη που η IL-8 και η OPG μελετήθηκαν με ανοσοιστοχημεία σε δείγματα οστεομυελικών βιοψιών. Υπάρχουν και κάποιες άλλες μελέτες σχετικά με την OPG στα ΜΥΣ. Οι Bock και συν, έδειξαν ότι η οστεοσκλήρυνση στην ΜΙ σχετίζεται με αυξημένη έκφραση OPG στο ενδοθήλιο.

Επίσης, αυξημένα επίπεδα OPG έχουν συσχετισθεί με αιμορραγία και φλεβικές θρομβώσεις σε ασθενείς με ΑΠ, όπως παρατηρήθηκε από την ομάδα του Kees M et al (85). Συγκεκριμένα, οι ασθενείς με ΑΠ έχουν αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης θρομβοαιμορραγικών εκδηλώσεων. Η παθογένεση αυτών των επιπλοκών παραμένει ασαφής. Στην μελέτη του Kees et al η OPG φαίνεται να παίζει σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη αγγειακής νόσου. Η OPG παράγεται από διάφορους ιστούς του καρδιαγγειακού συστήματος και υπάρχουν στοιχεία που δείχνουν την σχέση μεταξύ OPG και καρδιαγγειακής νοσηρότητας. Ιστοί που παράγουν OPG είναι τα ενδοθηλιακά κύτταρα του καρδιαγγειακού συστήματος (86), το αρτηριακό αγγειακό τοίχωμα και τα κύτταρα των λείων μυικών ινών (87).

Βρήκαμε ότι η υψηλή ένταση έκφρασης της IL-8 στα ΜΓΚ, συσχετίστηκε με πτωχή επιβίωση στην ΜΙ, αλλά όχι με σπληνομεγαλία όπως αναμενόταν. Ίσως αυτό να οφείλεται στο μικρό αριθμό ασθενών που μελετήθηκαν και στο γεγονός ότι δεν γνωρίζαμε αν οι ασθενείς βρίσκονταν στην υπερκυτταραιμική φάση της μυελοίνωσης, πριν αναπτύξουν σπληνομεγαλία.



Υψηλή ένταση IL8 παρατηρήθηκε σε όλους τους ασθενείς με ΜΥΣ, που παρουσίαζαν υψηλή LDH και υψηλά επίπεδα ουδετερόφιλων, που είναι δείκτες επιθετικότητας της νόσου. Είναι η πρώτη φορά που η IL-8 μελετάται με ανοσοιστοχημεία στον μυελό των οστών.

Η IL-8 έδειξε υψηλή ένταση έκφρασης σε όλους τους ασθενείς με ΜΥΣ που είχαν υψηλό αριθμό λευκών αιμοσφαιρίων, που συνήθως είναι δείκτης επιθετικότητας της νόσου. Επίσης υπήρξε υψηλή θετικότητα στους ασθενείς που είχαν υψηλά επίπεδα αιμοσφαιρίνης. Ο δείκτης βαθμού έκφρασης δεν συσχετίστηκε με άλλα χαρακτηριστικά της νόσου. Η IL-8 στα ΜΥΣ έχει μελετηθεί στον ορό ασθενών μόνο, και είναι η πρώτη φορά που μελετάται με ανοσοιστοχημεία στον μυελό των οστών. Ο Emadi και συν μελέτησε τα επίπεδα της IL-8 στον ορό των ασθενών με ΜΙ που δεν ελάμβαναν κάποια θεραπεία κατά τη διάρκεια της μελέτης, και τα βρήκε σημαντικά αυξημένα, συμβάλλοντας στην διαδικασία της μυελουπερπλασίας. Στην μελέτη του Emadi και συν, η έκφραση της IL-8 με κυτταρομετρία ροής παρατηρήθηκε σε διάφορους τύπους αιμοποιητικών κυττάρων, όπως κοκκιοκύτταρα, μονοκύτταρα, μεγακαρυοκύτταρα, αιμοπετάλια και CD34+ κύτταρα, που προέρχονταν από φυσιολογικό αίμα. Στην ίδια μελέτη, τα επίπεδα της IL-8, βρέθηκαν σημαντικά αυξημένα στον ορό ασθενών με ΜΙ, και διάφορα αιμοποιητικά κύτταρα συμπεριλαμβανομένων των αιμοπεταλίων συνέβαλλαν στην παραγωγή της. Αυξημένα επίπεδα της IL-8 έχουν παρατηρηθεί επίσης στους ασθενείς με ΑΠ και ΙΘ και φαίνεται ότι η IL-8 βοηθάει στην δημιουργία ερυθροκυτταρικών αποικιών in vitro προάγουν την εξωμυελική αιμοποίηση στο ήπαρ και στο σπλήνα.

Στην μελέτη μας ανακαλύψαμε ότι υπάρχει συσχέτιση της IL-8 και της (OPG), με τον φαινότυπο. Είναι ενδιαφέρον πώς η αλληλεπίδραση μεταξύ των νεοπλαστικών κυττάρων και του μικροπεριβάλλοντος έχει μελετηθεί πρόσφατα με σκοπό να καθοριστούν νέοι πιθανοί θεραπευτικοί στόχοι και να αναπτυχθούν νέες θεραπευτικές προσεγγίσεις. Η ανάπτυξη νέων, πιο αποτελεσματικών θεραπειών εξαρτάται από την καλύτερη κατανόηση της παθογένειας της νόσου. Η αυξανόμενη γνώση του μικροπεριβάλλοντος του μυελού των οστών πιθανόν να οδηγήσει στην ίαση των ασθενειών αυτών με την εξάλειψη των νεοπλαστικών αιμοποιητικών κυττάρων. Η χρόνια φλεγμονή μπορεί να είναι και ο μνηστής αλλά και ο οδηγός της κλωνικής εξέλιξης στους ασθενείς με ΜΥΣ, όπως έχει προταθεί από τον Hasselbach.



## ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τόσο η IL-8 όσο και η OPG εμπλέκονται στην παθογένεση και τις κλινικές εκδηλώσεις της Μυελοϊνώσεως που αποτελεί το Ph-αρνητικό MYN με τη βαρύτερη εικόνα. Έχει αναφερθεί ότι η IL-8 και η υποδοχείς της προάγουν την παθολογική αύξηση των μεγακαρυοκυττάρων (ΜΓΚ) (Emadi et al. IL-8 and its CXCR1 and CXCR2 receptors participate in the control of megakaryocytic proliferation, differentiation, and ploidy in myeloid metaplasia with myelofibrosis. Blood. 2005;105(2):464-73) ενώ είναι γνωστό ότι η OPG βρέθηκε αυξημένη σε ενδοθηλιακά κύτταρα (Bock et al. Osteosclerosis in advanced chronic idiopathic myelofibrosis is associated with endothelial overexpression of osteoprotegerin. Br J Haematol. 2005;130(1):76-82).

Σκοπός αυτής της διατριβής, είναι η μελέτη της έκφρασης και έντασης ανοσοιστοχημικών χρώσεων IL-8 και OPG σε OMB ασθενών με MYN κατά τη διάγνωσή τους καθώς και των πιθανών συσχετισμών των παραπάνω με κλινικά χαρακτηριστικά και πρόγνωση.

Μελετήθηκαν αναδρομικά 78 ασθενείς με ΜΥΣ που διαγνώστηκαν μεταξύ 1984 και 2012, με διάμεσο χρόνο παρακολούθησης 55 μηνών. Η διάμεση ηλικία τους ήταν 65 έτη, 49 εξ'αυτών ήταν άνδρες. Το 22% είχαν διάγνωση Αληθούς Πολυκυτταραιμίας (ΑΠ), 42% είχαν Ιδιοπαθή Θρομβοκυττάρωση (ΙΘ) και 36% είχαν Μυελοϊνώση (ΜΙ). Στο σύνολο των ασθενών, 58% παρουσίαζαν σπληνομεγαλία, 8% είχαν οστικά άλγη, 81% παρουσίαζαν κόπωση, 9% είχαν επιδρώσεις, 12% εμφάνισαν κάποιο θρομβωτικό επεισόδιο, 5% ανέφεραν απώλεια βάρους ενώ 77% ήταν θετικοί για τη μετάλλαξη JAK2. Ο καρυότυπος ήταν παθολογικός στο 32%, ενώ το 7% παρουσίαζε καρυοτυπικά ευρήματα δυσμενούς πρόγνωσης.

Οι ανοσοιστοχημικές χρώσεις για την IL-8 και την OPG, πραγματοποιήθηκαν σε τομές παραφίνης 4μm των οστεομυελικών βιοψιών της διάγνωσης με τη μέθοδο δύο φάσεων συζευγμένων πολυμερών υπεροξειδάσης. Η ένταση και η θετικότητα της έκφρασης της IL-8 και της OPG μετρήθηκαν σε κλίμακα βαθμονομημένη από 0 έως 3. Η στατιστική ανάλυση έγινε με το πρόγραμμα SPSS και στατιστικά σημαντικές θεωρήθηκαν οι τιμές του  $p < 0,05$ .

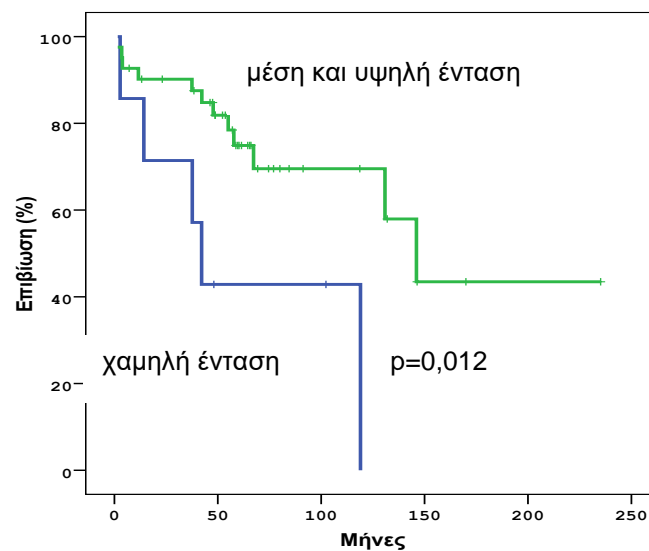




Δεν παρατηρήθηκε σημαντική διαφορά στο βαθμό της έκφρασης των δύο χρώσεων ανάμεσα στα διάφορα ΜΥΣ.

Στο σύνολο των ασθενών υψηλή ένταση της έκφρασης της IL-8 στα ΜΓΚ συσχετίστηκε με πολυμορφοπυρήνωση ( $p=0,029$ ), λεμφοπενία ( $p=0,026$ ) και αυξημένη αιμοσφαιρίνη ( $p=0,02$ ). Η OPG ήταν παρούσα στα κύτταρα της μυελικής σειράς και η υψηλή της ένταση παρατηρήθηκε σε ασθενείς με θρομβοκυττάρωση ( $p=0,015$ ). Υψηλή ένταση της έκφρασης της OPG, στα ΜΓΚ, συσχετίστηκε με πολυμορφοπυρήνωση ( $p=0,045$ ), θρομβοκυττάρωση ( $p=0,02$ ) και καρύοτυπο μη δυσμενούς πρόγνωσης ( $p=0,006$ ). Η χαμηλή ένταση της OPG στα ΜΓΚ, συσχετίστηκε με πτωχή επιβίωση ( $p=0,012$ , Εικ 1). Δε βρέθηκε συσχετισμός μεταξύ OPG και παρουσίας οστικών αλγών.

Συνοψίζοντας, το σημαντικότερο εύρημα αυτής της μελέτης ήταν ότι η υψηλή ένταση της έκφρασης της OPG στα ΜΓΚ συσχετίστηκε με αυξημένη επιβίωση και ευνοικό καρύοτυπο σε ασθενείς με ΜΥΝ. Το παραπάνω αποτελεί νέο εύρημα και χρήζει επιβεβαίωσης σε μεγαλύτερη σειρά ασθενών.



Εικ. 1: Ένταση OPG στα μεγακαρυοκύτταρα



## ΑΓΓΛΙΚΗ ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Both IL-8 and OPG have been implicated in the pathogenesis and clinical manifestations of myelofibrosis (MF), the most severe Ph(-) MPD. IL-8 and its receptors were reported to promote altered megakaryocyte (MGK) growth (Emadi et al), a typical MF finding, while OPG was found upregulated in endothelial cells (Bock et al).

The aims of this thesis are to evaluate the expression and intensity of IL-8 and OPG immunostaining in BM biopsies of MPD patients at diagnosis and to study any eventual correlations between them and clinical characteristics or outcome.

78 patients were studied, diagnosed with MPN from 1984 to 2012 with a median follow up period of 55 months. Median age was 65 years, 49 were males. 22% were diagnosed with polycythemia vera (PV), 42% with essential thrombocytosis (ET) and 36% with MF. Of those, 58% had splenomegaly, 8% had bone pain, 81% presented with fatigue, 9% had sweating, 11.5% experienced a thrombotic event, 5% lost weight and 77% were JAK2 positive. Cytotype was abnormal in 32% while 7% presented unfavourable cytotype findings. Immunostaining for IL-8 and OPG was performed on paraffin-embedded 4µm sections of formalin fixed BM biopsies, carried out at the time of diagnosis, using the two-step peroxidase conjugated polymer technique. Grade of positivity and Intensity of IL-8 and OPG expression was scored according to a 0 to 3 scale. Statistical analysis was performed conventionally, using the SPSS version 22.0 package, and p values <0.05 were considered significant.

There was no significant difference observed concerning the grade of expression of both stainings among the different MPN-groups. High intensity of IL-8 expression in MGK correlated, in the whole cohort, with a high neutrophil count (p=0.029), low lymphocyte count (p=0.026), and increased haemoglobin (p=0.02). OPG was also expressed in cells of myeloid lineage (MLC) and its high intensity in MLC was observed in patients with high platelet counts (p=0.015). High intensity of OPG expression in MGK correlated with high neutrophil counts (p=0.045), high hemoglobin (p=0.045), high platelet counts (p=0.02), and a favourable karyotype



( $p=0.006$ ). Most importantly, OPG low intensity in MGK correlated with poor survival ( $p=0.012$ ). There was no correlation found between OPG and bone pain.

In Conclusion, our most important finding is that high intensity of OPG expression in MGK correlated with increased survival and a favourable karyotype in patients with MPDs (PV, ET and MF). To the best of our knowledge, this finding has not been reported yet. It should indeed be further validated.



## ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Percy MJ, Zhao Q, Flores A, et al. (January 2006). "A family with erythrocytosis establishes a role for prolyl hydroxylase domain protein 2 in oxygen homeostasis". *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103 (3): 654–9. doi:10.1073/pnas.0508423103. PMC 1334658. PMID 16407130.
2. Gale DP, Harten SK, Reid CD, Tuddenham EG, Maxwell PH (August 2008). "Autosomal dominant erythrocytosis and pulmonary arterial hypertension associated with an activating HIF2 alpha mutation". *Blood.* 112 (3): 919–21. doi:10.1182/blood-2008-04-153718. PMID 18650473.
3. Percy MJ, Furlow PW, Beer PA, Lappin TR, McMullin MF, Lee FS (September 2007). "A novel erythrocytosis-associated PHD2 mutation suggests the location of a HIF binding groove". *Blood.* 110 (6): 2193–6. doi:10.1182/blood-2007-04-084434. PMC 1976349. PMID 17579185.
4. Percy MJ, Furlow PW, Lucas GS, et al. (January 2008). "A gain-of-function mutation in the HIF2A gene in familial erythrocytosis". *N. Engl. J. Med.* 358 (2): 162–8. doi:10.1056/NEJMoa073123. PMC 2295209. PMID 18184961.
5. Nagalla S. Polycythemia vera. Medscape. Published December 14, 2014. <http://emedicine.medscape.com/article/205114-overview>. Accessed March 23, 2015.
6. Prchal J et al. "Polycythemia vera. The in vitro response of normal and abnormal stem cell lines to erythropoietin." *J Clin Invest* 1998;61: 1044-1053
7. Rollison DE, Howlader N, Smith MT, et al. Epidemiology of myelodysplastic syndromes and chronic myeloproliferative disorders in the United States, 2001-2004, using data from the NAACCR and the SEER programs. *Blood.*2008;112(1):45-52.
8. Vannucchi AM. How I treat polycythemia vera. *Blood.* 2014;124(22):3212-3220.
9. Tefferi A, Thiele J, Orazi A, et al. Proposals and rationale for revision of the World Health Organization diagnostic criteria for polycythemia vera, essential



thrombocythemia, and primary myelofibrosis: recommendations from an ad hoc international expert panel. *Blood* 2007;110(4):1092-1097.

10. Silver RT, Chow W, Vandris K, et al . Prospective evaluation of the World Health Organization criteria for the diagnosis of polycythemia vera [abstract]. *Blood* 2011;118(21). Abstract 3837.
11. Spivak JL, Silver RT. The revised World Health Organization diagnostic criteria for polycythemia vera, essential thrombocytosis, and primary myelofibrosis: an alternative proposal. *Blood* 2008;112(2):231-239.
12. Barbui T, Barosi G, Birgegard G, et al; European LeukemiaNet. Philadelphia-negative classical myeloproliferative neoplasms: critical concepts and management recommendations from European LeukemiaNet. *J Clin Oncol* 2011;29(6):761-770.
13. Marchioli R, Finazzi G, Specchia G, et al ; CYTO-PV Collaborative Group. Cardiovascular events and intensity of treatment in polycythemia vera. *N Engl J Med* 2013;368(1):22-33.
14. Wang YL, Vandris K, Jones A, Cross NC, Christos P, Adriano F, Silver RT. JAK2 Mutations are present in all cases of polycythemia vera. *Leukemia* 2008;22(6):1289.
15. Pearson TC, Guthrie DL, Simpson J, et al . Interpretation of measured red cell mass and plasma volume in adults: Expert Panel on Radionuclides of the International Council for Standardization in Haematology. *Br J Haematol* 1995;89(4):748-756.
16. Lorberboym M, Rahimi-Levene N, Lipszyc H, Kim CK . Analysis of red cell mass and plasma volume in patients with polycythemia. *Arch Pathol Lab Med* 2005;129(1):89-91.
17. Johansson PL, Safai-Kutti S, Kutti J . An elevated venous haemoglobin concentration cannot be used as a surrogate marker for absolute erythrocytosis: a study of patients with polycythaemia vera and apparent polycythaemia. *Br J Haematol* 2005;129(5):701-705.



18. Fu, R; Zhang, L; Yang, R (November 2013). "Paediatric essential thrombocythaemia: clinical and molecular features, diagnosis and treatment". *British Journal of Haematology*. 163 (3): 295–302. doi:10.1111/bjh.12530. PMID 24032343.
19. Frewin, R; Dowson, A (October 2012). "Headache in essential thrombocythaemia" (PDF). *International Journal of Clinical Practice*. 66 (10): 976–83. doi:10.1111/j.1742-1241.2012.02986.x. PMC 3469735. PMID 22889110.
20. Tefferi, A (March 2011). "Annual Clinical Updates in Hematological Malignancies: a continuing medical education series: polycythemia vera and essential thrombocythemia: 2011 update on diagnosis, risk-stratification, and management". *American Journal of Hematology*. 86 (3): 292–301. doi:10.1002/ajh.21946. PMID 21351120.
21. Vannucchi, AM (June 2010). "Insights into the pathogenesis and management of thrombosis in polycythemia vera and essential thrombocythemia". *Internal and Emergency Medicine*. 5 (3): 177–84. doi:10.1007/s11739-009-0319-3. PMID 19789961.
22. Nangalia J, Massie CE, Baxter EJ, Nice FL, Gundem G, Wedge DC, Avezov E, Li J, Kollmann K, Kent DG, Aziz A, Godfrey AL, Hinton J, Martincorena I, Van Loo P, Jones AV, Guglielmelli P, Tarpey P, Harding HP, Fitzpatrick JD, Goudie CT, Ortmann CA, Loughran SJ, Raine K, Jones DR, Butler AP, Teague JW, O'Meara S, McLaren S, Bianchi M, Silber Y, Dimitropoulou D, Bloxham D, Mudie L, Maddison M, Robinson B, Keohane C, Maclean C, Hill K, Orchard K, Tauro S, Du MQ, Greaves M, Bowen D, Huntly BJ, Harrison CN, Cross NC, Ron D, Vannucchi AM, Papaemmanuil E, Campbell PJ, Green AR (Dec 2013). "Somatic CALR mutations in myeloproliferative neoplasms with nonmutated JAK2". *The New England Journal of Medicine*. 369 (25): 2391–405. doi:10.1056/NEJMoa1312542. PMC 3966280. PMID 24325359.
23. Kantarjian HM, Cortes J. New strategies in chronic myeloid leukemia. *Int J Hematol*. 2006;83:289-93.



24. Murgo AJ. Clinical trials of arsenic trioxide in hematologic and solid tumors: overview of the national cancer institute cooperative research and development studies. *Oncologist*. 2001; 6:22-28.
25. Druker BJ, et al., Lessons learned from the development of an abl tyrosine kinase inhibitor for chronic myelogenous leukemia. *J Clin Invest*. 2000;105:3-7.
26. Kantarjian HM, et al., Significance of FHIT expression in chronic myelogenous leukemia. *Clin Cancer Res*. 1999;5:4059-64.
27. Moracova J, et al., Polymerase chain reaction analyses should be used as a basis for clinical decision making in patients with chronic myelogenous leukemia. *Blood*. 1999;94:3609-11.
28. Sacci S, et al., Unexpected high incidence of severe toxicities associated with alpha-interferon, low dose cytosine arabinoside and all-trans retinoic acid in patients with chronic myelogenous leukemia. *Leuk Lymphoma*. 1999;35:483-89.
29. Reiter E, et al., Long-term follow-up of patients after related- and unrelated-donor bone marrow transplantation for chronic myelogenous leukemia. *Ann Hematol*. 1999;78:507-13.
30. Hehlmann R., A chance of a cure for every patient with chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med*. 1998;338:980.
31. Yin T, Li L. The stem cell niches in bone. *J. Clin. Invest*. 2006;116(5):1195–1201. [PMC free article] [PubMed]
32. Calvi LM, Adams GB, Welbrecht KW, et al. Osteoblastic cells regulate the haematopoietic stem cell niche. *Nature*. 2003;425(6960):841–846. [PubMed]
33. Nilsson SK, Johnston HM, Coverdale JA. Spatial localization of transplanted hemopoietic stem cells: inferences for the localization of stem cell niches. *Blood*. 2001;97(8):2293–2299. [PubMed]
34. Kiel MJ, Yilmaz OH, Iwashita T, Yilmaz OH, Terhorst C, Morrison SJ. SLAM family receptors distinguish hematopoietic stem and progenitor cells and reveal endothelial niches for stem cells. *Cell*. 2005;121(7):1109–1121. [PubMed]



35. Holtrop, M.E. and G.J King (1977). "The ultrastructure of the osteoclast and its functional implications". *Clin. Orthop Relat Res.* 123(123): 177-196. Doi:10.1097/00003086-197703000-00062. PMID 856515
36. Arai F, Hirao A, Ohmura M, et al. Tie2/angiopoietin-1 signaling regulates hematopoietic stem cell quiescence in the bone marrow niche. *Cell.* 2004;118(2):149–161. [PubMed]
37. Varnum-Finney B, Purton LE, Yu M, et al. The Notch ligand, Jagged-1, influences the development of primitive hematopoietic precursor cells. *Blood.* 1998;91(11):4084–4091. [PubMed]
38. Kondo M, Wagers AJ, Manz MG, et al. Biology of hematopoietic stem cells and progenitors: implications for clinical application. *Annu. Rev. Immunol.* 2003;21:759–806. [PubMed]
39. Manabe A, Coustan-Smith E, Behm FG, Raimondi SC, Campana D. Bone marrow-derived stromal cells prevent apoptotic cell death in B-lineage acute lymphoblastic leukemia. *Blood.* 1992;79(9):2370–2377.
40. C.C. Ponce, F.C.M.de Lourdes, S.S.M.Ihara, and M.R.R. Silva: "The relationship of the active and latent forms of TGF-beta1 with marrow fibrosis in essential thrombocythemia and primary myelofibrosis", *Medical Oncology*, vol.29, no.4, pp2337-2344, 2012
41. Frost H.M. et al., *Calcif Tissue Int* 1997;62:1, Ηλιόπουλος Α. , *Ελληνική Ρευματολογία* 2000;11(1):1:15).
42. Nishiyama, Yoshiharu; Langan, Paul; Chanzy, Henri (2002). "Crystal Structure and Hydrogen-Bonding System in Cellulose I $\beta$  from Synchrotron X-ray and Neutron Fiber Diffraction". *J. Am. Chem. Soc.* 124 (31): 9074–82. doi:10.1021/ja0257319. PMID 12149011.
43. Romeo, Tony (2008). *Bacterial biofilms*. Berlin: Springer. pp. 258–263. ISBN 978-3-540-75418-3





44. Klemm, Dieter; Heublein, Brigitte; Fink, Hans-Peter; Bohn, Andreas (2005). "Cellulose: Fascinating Biopolymer and Sustainable Raw Material". *Angew. Chem. Int. Ed.* 44 (22): 3358–93. doi:10.1002/anie.200460587. PMID 15861454
45. Piotrowski, Stephan and Carus, Michael (May 2011) Multi-criteria evaluation of lignocellulosic niche crops for use in biorefinery processes. nova-Institut GmbH, Hürth, Germany.
46. Emadi S. et al. "IL-8 and its CXCR1 and CXCR2 receptors participate in the control of megakaryocytic proliferation, differentiation, and ploidy in myeloid metaplasia with myelofibrosis."
47. *Blood*. 2005 Jan 15;105(2):464-73. Epub 2004 Sep28
48. Wickenhauser C et al. "Detection and quantification of transforming growth factor beta (TGF- beta) and platelet derived growth factor (PDGF) release by normal human megakaryocytes"
49. *Leukemia*. 1995 Feb;9(2):310-5.
50. Tefferi, Ayalew (2014). "Primary myelofibrosis: 2014 update on diagnosis, risk-stratification, and management". *American Journal of Hematology*. 89 (9): 915–925. doi:10.1002/ajh.23703. ISSN 0361-8609. PMID 25124313.
51. James, William D.; Berger, Timothy G.; et al. (2006). *Andrews' Diseases of the Skin: clinical Dermatology*. Saunders Elsevier. ISBN 978-0-7216-2921-6.
52. Staerk, Judith; Constantinescu, Stefan N. (2014). "The JAK-STAT pathway and hematopoietic stem cells from the JAK2 V617F perspective". *Jak-Stat*. 1 (3): 184–190. doi:10.4161/jkst.22071. ISSN 2162-3996. PMC 3670242. PMID 24058768.
53. Them, Nicole C. C.; Kralovics, Robert (2013). "Genetic Basis of MPN: Beyond JAK2-V617F". *Current Hematologic Malignancy Reports*. 8 (4): 299–306. doi:10.1007/s11899-013-0184-z. ISSN 1558-8211. PMID 24190690.
54. Le Bousse-Kerdiles MC. "Primary myelofibrosis and the "bad seeds in bad soil" concept." *Fibrogenesis Tissue Repair* 2012;5:S20.



55. Tefferi, A (2010). "Novel mutations and their functional and clinical relevance in myeloproliferative neoplasms: JAK2, MPL, TET2, ASXL1, CBL, IDH and IKZF1". *Leukemia*. 24 (6): 1128–1138. doi:10.1038/leu.2010.69. ISSN 0887-6924. PMC 3035972. PMID 20428194.
56. Chou JM, et al. (2003). "Bone marrow immunohistochemical studies of angiogenic cytokines and their receptors in myelofibrosis with myeloid metaplasia". *Leukemia Research*. 27 (6): 499–504. doi:10.1016/S0145-2126(02)00268-0. PMID 12648509.
57. Trow, TK; et al. (2010). "A 71-Year-Old Woman With Myelofibrosis, Hypoxemia, and Pulmonary Hypertension". *Chest*. 138 (6): 1506–10. doi:10.1378/chest.10-0973. PMID 21138888.
58. Lataillade JJ, et al. "Does primary myelofibrosis involve a defective stem cell niche? From concept to evidence." *Blood* 2008;112:3026-35.
59. Kröger N, Mesa RA (March 2008). "Choosing between stem cell therapy and drugs in myelofibrosis". *Leukemia*. 22 (3): 474–86. doi:10.1038/sj.leu.2405080. PMID 18185525.
60. Yelin E, Weinstein S, King T. The burden of musculoskeletal diseases in the United States. *Semin Arthritis Rheum*. 2016;46:259–260. doi: 10.1016/j.semarthrit.2016.07.013. [PubMed] [CrossRef]
61. Hasselbach HC. "Idiopathic myelofibrosis—an update with particular reference to clinical aspects and prognosis." *Int J Clin Lab Res* 1993;23:124-38.
62. Le Bousse-Kerdiles et al. "Dual implication of fibrogenic cytokines in the pathogenesis of fibrosis and myeloproliferation in myeloid metaplasia with myelofibrosis." *Ann Hematol* 1999;78:437-44.
63. Qu D, Mosher CZ, Boushell MK, Lu HH. Engineering complex orthopaedic tissues via strategic biomimicry. *Ann Biomed Eng*. 2015;43:697–717. doi: 10.1007/s10439-014-1190-6. [PMC free article] [PubMed] [CrossRef]



64. Goodrich JT, Sandler AL, Tepper O. A review of reconstructive materials for use in craniofacial surgery bone fixation materials, bone substitutes, and distractors. *Childs Nerv Syst.* 2012;28:1577–1588. doi: 10.1007/s00381-012-1776-y. [PubMed] [CrossRef]
65. Mendes SC, Tibbe JM, Veenhof M, Bakker K, Both S, Platenburg PP, Oner FC, de Bruijn JD, van Blitterswijk CA. Bone tissue-engineered implants using human bone marrow stromal cells: Effect of culture conditions and donor age. *Tissue Eng.* 2002;8:911–920. doi: 10.1089/107632702320934010. [PubMed] [CrossRef]
66. Suzuki Y, Kim KJ, Kotake S, Itoh T. Stromal cell activity in bone marrow from the tibia and iliac crest of patients with rheumatoid arthritis. *J Bone Miner Metab.* 2001;19:56–60. doi: 10.1007/s007740170061. [PubMed] [CrossRef]
67. Rodriguez JP, Montecinos L, Rios S, Reyes P, Martinez J. Mesenchymal stem cells from osteoporotic patients produce a type I collagen-deficient extracellular matrix favoring adipogenic differentiation. *J Cell Biochem.* 2000;79:557–565. doi: 10.1002/1097-4644(20001215)79:4<557::AID-JCB40>3.0.CO;2-H. [PubMed] [CrossRef]
68. Johnson PC, Mikos AG, Fisher JP, Jansen JA. Strategic directions in tissue engineering. *Tissue Eng.* 2007;13:2827–2837. doi: 10.1089/ten.2007.0335. [PubMed] [CrossRef]
69. Kim K, Dean D, Lu A, Mikos AG, Fisher JP. Early osteogenic signal expression of rat bone marrow stromal cells is influenced by both hydroxyapatite nanoparticle content and initial cell seeding density in biodegradable nanocomposite scaffolds. *Acta Biomater.* 2011;7:1249–1264. doi: 10.1016/j.actbio.2010.11.007. [PMC free article] [PubMed] [CrossRef]
70. Hosseinkhani M, Mehrabani D, Karimfar MH, Bakhtiyari S, Manafi A, Shirazi R. Tissue engineered scaffolds in regenerative medicine. *World J Plast Surg.* 2014;3:3–7. [PMC free article] [PubMed]
71. Kagami H, Agata H, Inoue M, Asahina I, Tojo A, Yamashita N, Imai K. The use of bone marrow stromal cells (bone marrow-derived multipotent mesenchymal



- stromal cells) for alveolar bone tissue engineering: Basic science to clinical translation. *Tissue Eng Part B Rev.* 2014;20:229–232. doi: 10.1089/ten.teb.2013.0578. [PubMed] [CrossRef]
72. Stroncek DF, Sabatino M, Ren J, England L, Kuznetsov SA, Klein HG, Robey PG. Establishing a bone marrow stromal cell transplant program at the National Institutes of Health Clinical Center. *Tissue Eng Part B Rev.* 2014;20:200–205. doi: 10.1089/ten.teb.2013.0529. [PMC free article] [PubMed] [CrossRef]
73. Polymeri A, Giannobile WV, Kaigler D. Bone marrow stromal stem cells in tissue engineering and regenerative medicine. *Horm Metab Res.* 2016;48:700–713. doi: 10.1055/s-0042-118458. [PubMed]
74. Reid PE, Brown NJ, Holen I (July 2009). "Breast cancer cells stimulate osteoprotegerin (OPG) production by endothelial cells through direct cell contact". *Molecular Cancer.* 8 (1): 49. doi:10.1186/1476-4598-8-49. PMID 19604388.
75. Baud'huin M, Duplomb L, Teletchea S, Lamoureux F, Ruiz-Velasco C, Maillaçon M, Redini F, Heymann MF, Heymann D (October 2013). "Osteoprotegerin: multiple partners for multiple functions". *Cytokine & Growth Factor Reviews.* 24 (5): 401–9. doi:10.1016/j.cytogfr.2013.06.001. PMID 23827649.
76. Pearse R.N et al. "Multiple myeloma disrupts the TRANCE/ osteoprotegerin cytokine axis to trigger bone destruction and promote tumor progression." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2001, 25; 98 (20):11581-11586.
77. Chagraoui H. et al. "Stimulation of osteoprotegerin production is responsible for osteosclerosis in mice overexpressing TPO." (2003) *Blood*, 101,2983-2989.
78. Hosbond SE, Poulsen TS, Diederichsen AC, Nybo M, Rasmussen LM, Mickley H (August 2012). "Osteoprotegerin as a marker of atherosclerosis: a systematic update". *Scandinavian Cardiovascular Journal.* 46 (4): 203–11. doi:10.3109/14017431.2012.685491. PMID 22506827.



79. Bernardi S, Bossi F, Toffoli B, Fabris B (2016). "Roles and Clinical Applications of OPG and TRAIL as Biomarkers in Cardiovascular Disease". *BioMed Research International*. 2016: 1752854. doi:10.1155/2016/1752854. PMID 27200369
80. Hedges JC, Singer CA, Gerthoffer WT (2000). "Mitogen activated protein kinases regulate cytokine gene expression in human airway myocytes". *Am.J.Respir.Cell Mol.Biol.*23(1):86-94. Doi:10.1165/ajrcmb.23.1.4014. PMID 10873157
81. Wolff B, Burns AR, Middleton J, Rot A (1998). "Endothelial cell "memory" of inflammatory stimulation: human venular endothelial cells store interleukin 8 in Weibel-Palade bodies". *J.Exp.Med.*188(9):1757-62. Doi:10.1084/jem.188.9.1757.PMC 2212526.PMID 9802987
82. Utgaard JO, Jahnsen FL, Bakka A, Brandtzaeg P, Haralsen G (1998). "Rapid selection of prestored interleukin 8 from Weibel-Palade bodies of microvascular endothelial cells" *J.Exp.Med.*188(9);1751-6. Doi:10.1084/jem.188.9.1751.PMC 2212514, PMID 9802986
83. Modi WS, Dean M, Seunanz HN, Mukaida N, Matsushima K, O'Brien SJ (1990). "Monocyte-derived neutrophil chemotactic factor (MDNCF/IL-8) resides in a gene cluster along with several other members of the platelet factor 4 gene superfamily". *Hum.Genet.*84(2):185-7. Doi:10.1007/BF00208938.PMID 1967588
84. Manoharan A, Horsley R, Pitney WR. "The reticulin content of bone marrow in acute leukemia in adults". *Br J Haematol.*1979;43:185-90
85. Kees M, Wiesbauer F, Gisslinger B, Wagner R, Shehata M, Gisslinger H (2005). "Elevated plasma osteoprotegerin levels are associated with venous thrombosis and bleeding in patients with polycythemia vera". *Thromb Haemost* 2005;93: 70-5
86. Kim HH, Shih HS, Kwak HJ, et al (2003) "RANKL regulates endothelial cell survival through the phosphatidylinositol 3'-kinase/ Akt signal transduction pathway". *FASEB J*2003;17:2163-5



87. Zhang J, Fu M, Myles D et al (2002) "PDGF induces osteoprotegerin expression in vascular smooth muscle cells by multiple signal pathways" FEBS Lett 2002;521:180-4





## **ΣΧΕΤΙΚΗ ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΗ**







*Original Research Article*

## **Bone marrow osteoprotegerin (OPG) and interleukin-8 (IL-8) immunostaining in patients with Ph-negative myeloproliferative neoplasms (MPN): Clinical correlations**

**Diana Triantafyllopoulou<sup>1\*</sup>, Dimitrios Maltezas<sup>1\*</sup>, Eleni-Andrianna Trigka<sup>2</sup>, Tatiana Tzenou<sup>1</sup>, Theodoros Iliakis<sup>1</sup>, Maria Dimou<sup>1</sup>, Aspasia Koudouna<sup>1</sup>, Kallirroï Spanou<sup>2</sup>, Panagiota Ntailiani<sup>2</sup>, Efstratios Patsouris<sup>2</sup>, Maria K. Angelopoulou<sup>3</sup>, Maria Kotsopoulou, Panayiotis Panayiotidis<sup>1</sup>, Penelope Korkolopoulou<sup>2</sup> and Marie-Christine Kyrtsonis<sup>1\*</sup>**

### **Abstract**

<sup>1</sup>Hæmatology Section of First Department of Propædeutic Internal Medicine, Laikon Hospital, National and Kapodistrian University of Athens' Medical School, Athens, Greece

<sup>2</sup>Department of Pathology, National and Kapodistrian University of Athens' Medical School, Athens, Greece

<sup>3</sup>Department of Hæmatology, National and Kapodistrian University of Athens' Medical School, Athens, Greece

\*Corresponding Author Email: [mck@ath.forthnet.gr](mailto:mck@ath.forthnet.gr)

We evaluated the expression and intensity of IL-8 and OPG immunostaining in BM biopsies of MPN patients at diagnosis and correlated the results with clinical parameters. Seventy-six patients were studied, diagnosed with MPN from 1984 to 2012 with a median follow up period of 55 months. IL-8 and OPG immunostaining was performed on paraffin-embedded sections of formalin fixed BM biopsies, carried out at the time of diagnosis, using the two-step peroxidase conjugated polymer technique. Grade of positivity and intensity of IL-8 and OPG expression was scored according to a 0 to 3 scale. Statistical analysis was performed conventionally, using the SPSS version 22.0 package, and p values <0.05 were considered significant. High intensity of IL-8 expression in megakaryocytes correlated, in the whole cohort, with neutrophilia (p=0.005) and high haemoglobin (p=0.001). High intensity of OPG expression in megakaryocytes correlated high haemoglobin (p=0.017) and a favorable karyotype (p=0.01). Most importantly, low OPG intensity in megakaryocytes correlated with poor survival (p=0.026) in the whole patient series. In conclusion, our most important finding is that high intensity of OPG expression in megakaryocytes correlated with increased survival and a favorable karyotype in patients with MPN, a finding that has not been reported yet.

**Keywords:** Myeloproliferative Neoplasms (MPN), Polycythemia Vera (PV), Essential Thrombocythosis (ET), Primary Myelofibrosis (MF), Osteoprotegerin (OPG), Interleukin-8 (IL-8)

### **INTRODUCTION**

Polycythemia Vera (PV), Essential Thrombocythosis (ET) and Myelofibrosis (MF), are BCR-ABL negative myeloproliferative neoplasms, characterized by dysregulated signaling pathways with production of inflammatory markers and subsequent changes in the

bone marrow stroma. Alterations of the bone marrow microenvironment are found in all MPN types. In addition, elevated levels of proinflammatory and microenvironment regulating cytokines are also found. The concept of cytokine mediated bone marrow stromal reaction is not



new, and was discussed by Groopman J E in 1980. Tefferi et al investigated the prognostic significance of cytokines in MF by determining serum levels of a comprehensive cytokine panel. All MPN, arise from genetic defects within the pluripotent stem cell populations that accumulate during the disease course and the burdensome symptom profile seems to arise from the dysregulated synthesis of cytokines, particularly TNF $\alpha$ , IL-8, IL-1, IL-6 and OPG (Tefferi A et al, 2013). There are many other studies in the literature that support this concept which is well established (Vaidya R et al., 2013; Le Bousse-Kerdiles M.C et al., 1996; Le Bousse-Kerdiles M.C et al., 2001; Martyre M.C et al., 1997). It seems that in MPN, disease burden is not only mediated by the neoplastic clone, but also by a secondary inflammation process with significant cytokine production referred as cytokine storm, and changes of the bone marrow (BM) microenvironment (Hoermann G et al., 2015). Interleukin-8 (IL-8), a CXC motif-related chemokine family member, has been shown to play an important role in tumor growth, angiogenesis and metastasis (Li A et al., 2003). IL-8 was found expressed in various haematopoietic cell types, including granulocytes, monocytes, megakaryocytes, platelets and CD34+ cells and was additionally shown involved in MPN pathogenesis as already mentioned. Osteoprotegerin (OPG), was first identified in 1997 by 2 independent groups; Amgen investigators in the USA and investigators in Japan, that considered it a potent negative inhibitor of osteoclastogenesis. It is also known as Osteoclastogenesis Inhibitory Factor (OCIF), or tumor necrosis factor receptor superfamily member 11B and is a decoy receptor for the receptor activator of nuclear factor kappa B ligand (RANKL) (Simonet WS et al., 1997; Tsuda E et al., 1997). By binding RANKL, OPG prevents RANK mediated nuclear kappa B (NF-Kb) activation, which is a rapid acting transcription factor for immune related genes and a key regulator of inflammation, innate immunity, cell survival and differentiation. In the context of bone biology, RANKL describes the osteoclastogenic cytokine, OPG describes its inhibitor and RANK describes the receptor for RANKL (Weitzmann MN, 2013).

Distinct clinical manifestations are associated with the aforementioned Ph negative MPNs. The somatic mutation JAK2V617F is present in nearly all patients with PV (Baxter EJ et al., 2005). Symptoms of PV are usually related to blood hyperviscosity, secondary to a marked increase in haematocrit (Ht) and red cell mass. The consequences of cell accumulation can manifest as organ enlargement, hyperuricemia, cytokine-mediated events such as pruritus, or/and microvascular occlusive or haemorrhagic phenomena causing headache, dizziness, vertigo, tinnitus and visual disturbances (Spivak J et al., 2002). Venous thrombosis is more common in PV such as Budd Chiari syndrome (BCS), mesenteric, splenic (SVT) or portal vein thrombosis

(PVT). PVT is the most common type of splanchnic vein thrombosis (40%), while BCS is the least common (5%). (De Stefano V et al., 2008; Smalberg JA et al., 2012).

ET is characterized by an unexplained and persistent thrombocytosis (plts>450x10<sup>9</sup>/lt). The JAK2V617F mutation identifies 55% of patients with isolated thrombocytosis, as possibly having ET (Tefferi A et al., 2018). Both thrombosis and bleeding are common complications and a platelet count of >1500x10<sup>9</sup>/L is an indication to initiate cytoreductive treatment. Patients can develop neurological symptoms, such as paresthesias of the lower extremities and cerebrovascular accidents (CVAs) due to microvascular circulation clotting disturbances. The identification of somatic mutations of JAK2, CALR or MPL is found in 90% of patients and they have improved the diagnostic and clinical approach to this disorder.

MF is a clonal proliferation of the pluripotent haematopoietic stem cell, characterized by the production of cytokines and growth factors, that affect the bone marrow stroma leading to fibrosis. Neoplastic cells infiltrate extramedullary organs such as the liver and the spleen, leading to hepatomegaly and splenomegaly respectively. Anaemia, teardrop poikilocytes and a leukoerythroblastic blood film characterize the disease. JAK 2 is present in 60% of patients with MF or post ET MF, and in 95% with post PV MF (James C et al., 2005; Kralovics R et al., 2005; Baxter EJ et al., 2005). Mutations in the thrombopoietin receptor gene (MPL), were subsequently found in 3% to 8% of patients with MF and post ET MF, whereas mutations in the calreticulin gene (CALR) have been observed in half of patients with MF and post ET MF lacking JAK2 and MPL mutations.

However, there are overlapping clinical features such as fever, night sweats, splenomegaly and fatigue, which are thought to be cytokine driven. Fatigue is the most common symptom regardless of MPN subtype. It is important to emphasize that an accurate histologic diagnosis is essential to precisely distinguish each condition.

The primary aim of the present study was to assess the intensity and degree of expression of IL-8 and OPG by immunostaining in BM biopsies of MPN patients at diagnosis and investigate if they are related to disease clinical characteristics. The secondary aim was to assess whether the intensity of IL-8 and OPG immunostaining could provide any additional prognostic information.

## MATERIALS AND METHODS

### Patients

Files from 76 Ph (-) MPN patients were retrospectively studied. Median age was 65 years, 49 were males. 22% were diagnosed with PV, 42% with ET and 36% with MF. Diagnosis was established according to the WHO criteria



**Table 1.** Patients Characteristics

	ALL	PV	ET	MF
N	76	17	32	27
Male/Female (%)	63/37	76/24	50/50	70/30
Median Age	65	65	65	65
Fatigue (%)	19	24	0	37
Splenomegaly (%)	42	24	19	78
Sweating (%)	9	12	3	15
Bone pain (%)	8	18	0	7
Thrombotic events, Including cardiac events (%)	13	8	14	16
Weight loss (%)	5	0	4	9
JAK2 (+) (%)	77	77	74	83
Unfavorable karyotype <sup>†</sup> (%)	7	10	5	10
WBC ≥ 10000 (%)	39	35	38	37
HB ≤ 11.0(%)	25	0	3	63
PLTs ≥ 400(%)	66	59	97	35
Neutrophils ≥ 6600 (%)	43	35	42	46
Median overall survival (months)	54	49	60	50

<sup>†</sup>Unfavorable karyotype: complex karyotype or sole or two abnormalities that include +8, -7/7q-, -5/5q-, 12p-, inv(3), or 11q23 rearrangement.

and routine tests underwent at the time of diagnosis included a full blood count, renal, liver, bone profiles, LDH, EPO level and JAK2. The main findings of all patients studied were fatigue (19%), splenomegaly (42%), bone pains (8%), and sweating (9%), while 13% experienced a thrombotic event, 5% lost weight and 77% were JAK2 positive. Karyotype was abnormal in 32% while 7% presented unfavorable karyotypic findings such as rearrangement of chromosome 5 or 7, or >3 chromosomal abnormalities. In more detail, symptoms associated with splenomegaly were present in 24% of patients with PV, 19% with ET and 78% with MF. Additional complaints included fatigue present in 24% of patients with PV and 37% with MF. In ET no fatigue was observed. Sweating was present in 12% of patients with PV, 3% with ET, 15% with MF. Bone pains were present in 18% of patients with PV, in 7% with MF and none in ET; weight loss was present in 4% of patients with ET, and 9% in MF; weight loss was not observed in patients with PV; thrombotic events were noted in 8% of patients with PV, 14% of patients with ET and 16% of patients with MF. JAK 2 positivity was observed in 77% of patients with PV, 74% of patients with ET and in 83% of patients

with MF; an unfavorable karyotype was noticed in 10% of patients with PV, in 5% of patients with ET and 10% of patients with MF. Their characteristics are shown in Table 1. Patients' median follow-up period was 55 months.

Patients' treatment consisted of red blood cell transfusions, hydroxyurea, corticosteroids and ruxolitinib in MF; Aspirin, or clopidogrel combined with or without hydroxyurea in PV and ET.

## Methods

The study was approved by the local ethical committee and patients' consent was obtained.

Immunostaining for IL-8 and OPG was performed on paraffin-embedded 4µm sections of formalin fixed BM biopsies, carried out at the time of diagnosis, using the two-step peroxidase conjugated polymer technique. Grade of positivity and intensity in OPG expression was scaled in low, intermediate and high according to the percentage of positive stained megakaryocytes or myeloid cells and to the intensity of the staining respectively. Grade of positivity of IL-8 -expression was

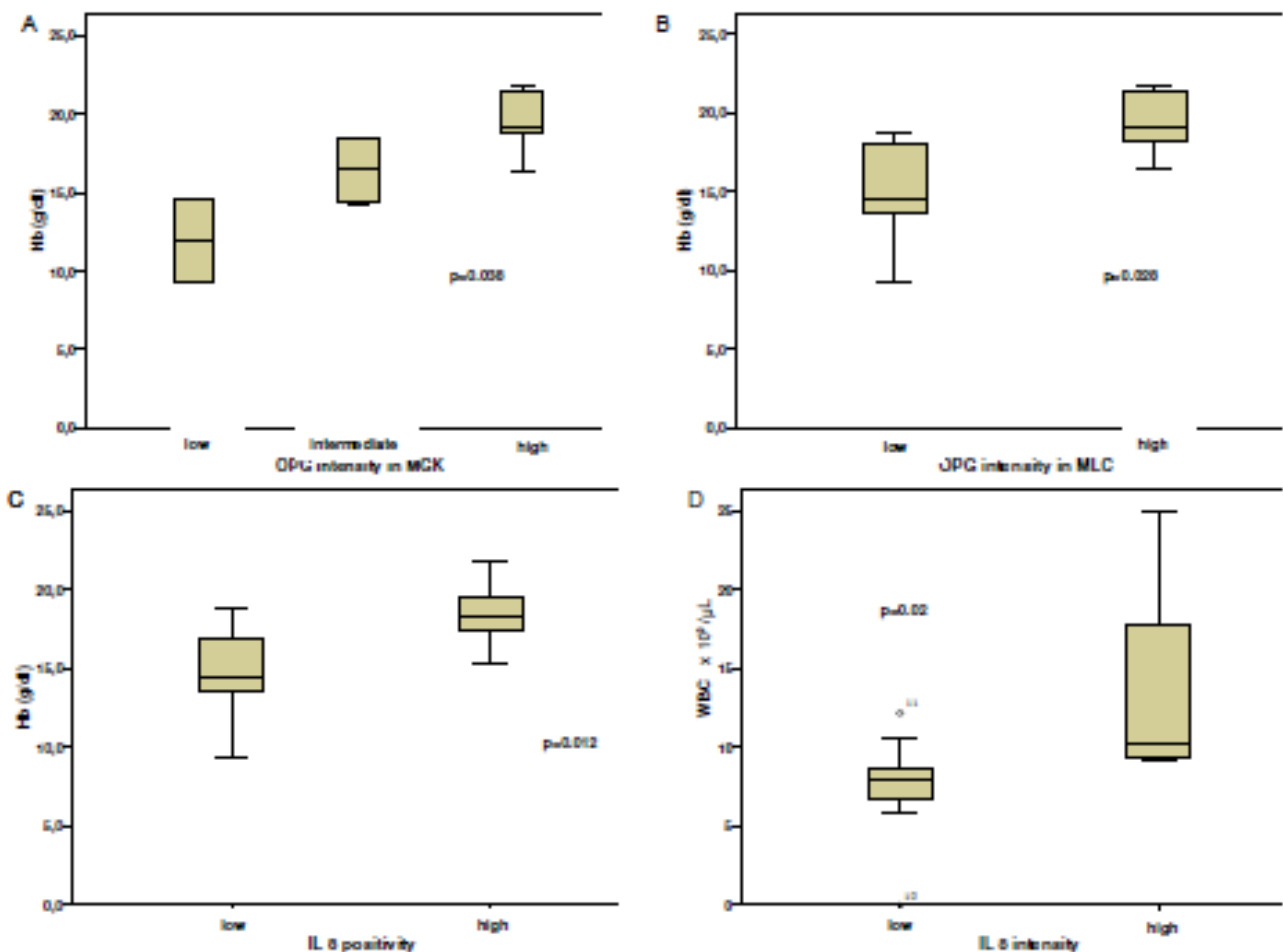


Figure 1. Correlations of OPG and IL 8 In patients with PV

scaled in low, intermediate and high or in low and high according to the percentage of positive stained megakaryocytes. Grade of intensity of IL-8 -expression was scaled in low or high. The scoring system used to evaluate bone marrow fibrosis was according to Manoharan et al 1979. Patients with no reticulin fibers demonstrable or mild presence of reticulin fibers in their bone marrows were placed in the low fibrosis category whereas patients with moderate or severe fibrosis were labeled as high fibrosis category. Statistical analysis was performed conventionally, using the SPSS version 22.0 package, and p values <0.05 were considered significant.

## RESULTS

The analysis of results was performed separately in every MPN-group but also in the whole series due to the relatively low number of patients and also because the grade of expression observed in terms of intensity or positivity of both staining was similar in all MPN groups.

## Subgroup Analysis

In PV patients high intensity of OPG expression in megakaryocytes, coincided with high haemoglobin levels (Figure 1A,  $p=0.038$ , Kruskal Wallis test). High intensity OPG was also expressed in cells of myeloid lineage and this correlated with high haemoglobin levels (Figure 1B,  $p=0.028$ ) as well. High grade of positivity of IL-8 expression correlated with high haemoglobin levels (Figure 1C,  $p=0.012$ , Mann Whitney test) while high intensity of IL-8 expression correlated with high WBC counts (Figure 1D,  $p=0.02$ , Mann Whitney test).

In ET patients, low intensity of OPG expression in megakaryocytes correlated with poor survival, compared with patients showing an intermediate and high OPG intensity expression in megakaryocytes (Figure 2A,  $p=0.038$ , Kaplan Meier test). An intermediate intensity of OPG expression in megakaryocytes was observed in patients who were JAK-2 positive (Figure 2B,  $p=0.023$ , chi square test).

In MF patients, correlations with haemoglobin, haematocrit, LDH and JAK2 did not reach statistical significance.

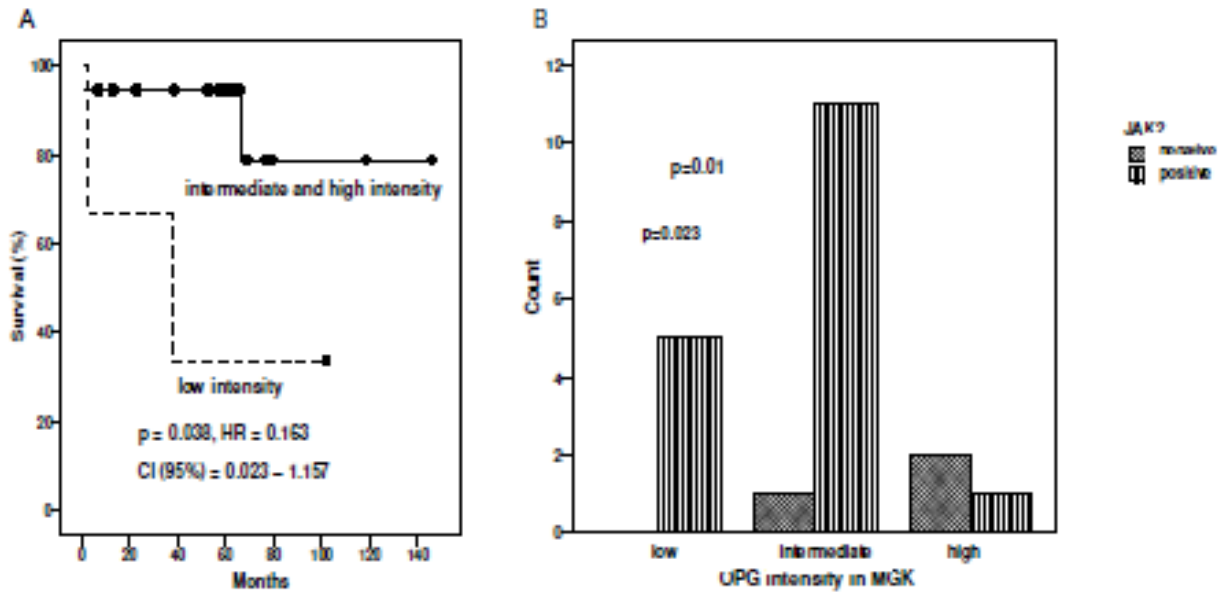


Figure 2. Correlations of OPG in patients with ET

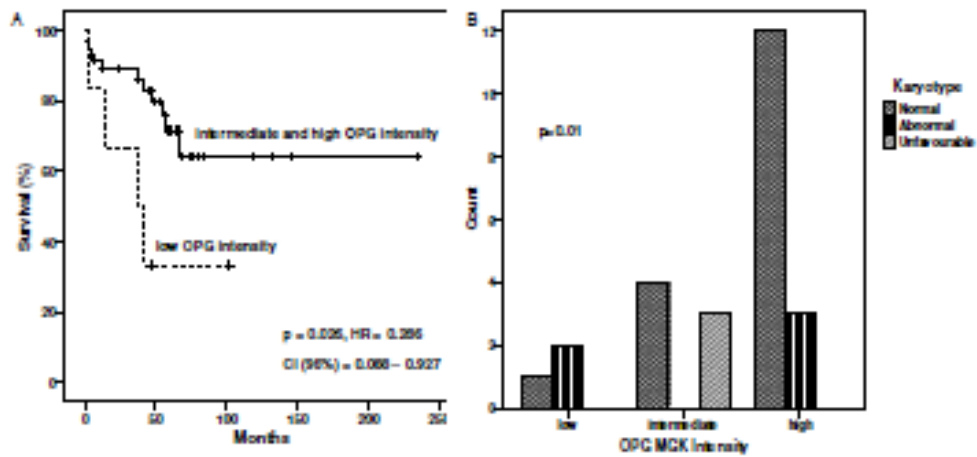


Figure 3. Survival and Karyotype findings in the whole patient series

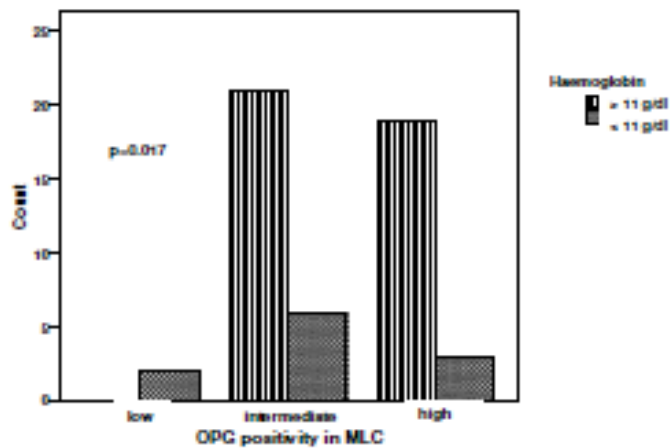


Figure 4. Correlation of OPG positivity and Haemoglobin in Myeloid cell lines

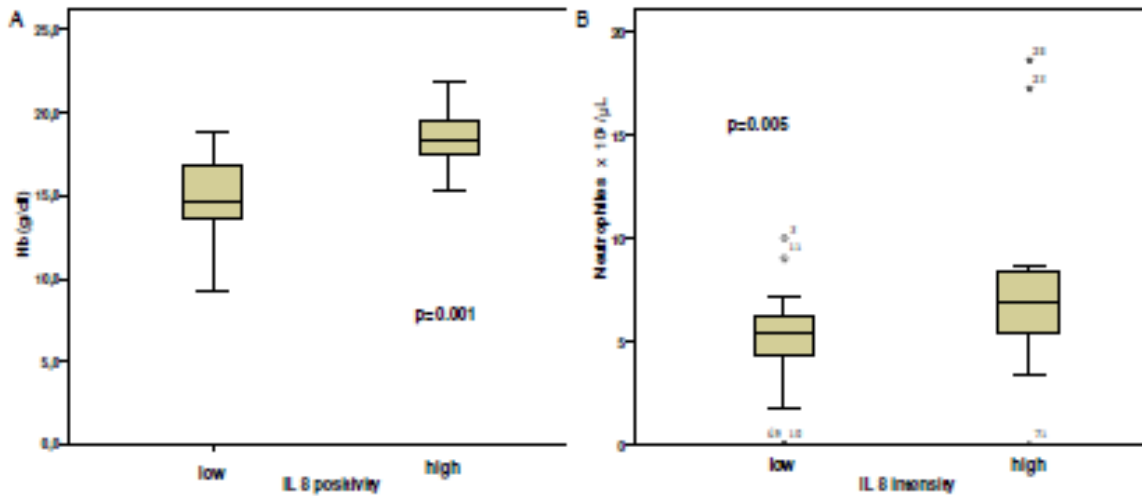


Figure 5. Correlations of IL-8 in the whole patient series

### Analysis of the whole series

In the analysis of the whole series, patients with low intensity of OPG expression in megakaryocytes presented poorer overall survival (Figure 3A,  $p=0.026$ , Kaplan Meier test) whereas high intensity in OPG expression in megakaryocytes correlated with a normal karyotype (Figure 3B,  $p=0.01$ , chi square test). Furthermore, increased OPG expression in myeloid cell lineage correlated with haemoglobin levels  $>11.0$  g/dl (Figure 4,  $p=0.017$ , chi square test).

In terms of IL-8 in the whole series, high positivity was observed in all patients with high haemoglobin levels (Figure 5A,  $p=0.001$ , Mann Whitney test). Furthermore, high IL-8 intensity expression was observed in patients with high neutrophil counts (Figure 5B,  $p=0.005$ , Mann Whitney test).

### DISCUSSION

The present study is the first where IL-8 and OPG were studied by immunohistochemistry in BM samples. With regard to IL-8, it was expressed at high intensity in all MPN patients with high neutrophil counts, which is considered an indicator of tumor aggressiveness (Tefferi A et al., 2010) and the level of positivity was higher in patients with high haemoglobin levels. Its degree of expression was not found correlated with other disease characteristics. IL-8 in MPN has been studied in the serum only and immunohistochemistry findings are herein shown for the first time to the best of our knowledge. Emadi et al studied IL-8 serum levels in patients with MF not receiving chemotherapy at the time of the study, and found them significantly increased, contributing to the myeloproliferative process. It is worth mentioning that in Emadi's study, IL-8 expression by flow

cytometry was observed in various haematopoietic cell types, including granulocytes, monocytes, megakaryocytes, platelets and CD34+ cells, derived from unmobilised normal blood. Emadi et al showed that the level of IL-8 is significantly increased in the serum of patients with MF and that various haematopoietic cells including platelets, participate in its production. Increased serum levels of IL-8 were observed in patients with PV and ET while IL-8 was also found to enhance formation of erythroid colonies in vitro and were suggested to promote extramedullary haematopoiesis in the liver and spleen (Corre-Buscail I et al., 2005); various haematopoietic cells including platelets were shown to contribute to IL-8 production. Tefferi et al found that IL-8 is also associated with elevated levels of circulating blasts and with the presence of constitutional symptoms in MPN. In addition, IL-8 promotes endothelial cell proliferation, capillary tube organization and matrix metalloproteinase expression in endothelial cells (Li A et al., 2003).

Regarding OPG, we showed that MPN patients with low intensity of OPG in megakaryocytes by immunostaining have poor survival. High intensity of OPG MGK expression in all patients was related with a normal karyotype. OPG expression compared to karyotypic findings has not been mentioned in the literature yet and this will require further studies as it could be used as a prognostic marker in the future. There are a few other studies on OPG in myeloproliferative neoplasms in medical literature; Bock et al showed that osteosclerosis in MF is associated with increased endothelial OPG expression. Immunohistochemical detection of OPG protein revealed strong labeling of endothelial cells within proliferating vessels in fibrotic IMF and heterogeneously labeled megakaryocytes and fibroblasts. Even though, the cellular origin of OPG in patients with MPN has not been elucidated, Bock et al



showed that bone marrow areas with fully developed fibrosis and osteosclerosis, exhibited predominant endothelial OPG expression (Bock O et al., 2005). Increased production of OPG, provokes impairment of osteoclast formation, thereby inducing osteosclerosis, but also can contribute to endothelial growth and neoangiogenesis (Collin Osdoby P., 2001). Endothelial cells have been identified as potential producers of OPG (Kneipe H et al., 2012). Besides a role in bone homeostasis, OPG may be important for endothelial cell proliferation and survival (Malyankar UM et al., 2000).

In conclusion, our study supports that low intensity of OPG MGK expression by bone marrow immunohistochemistry in patients with MPN is associated with poor survival. Furthermore, high intensity IL-8 immunohistochemical expression in MGK was also observed in all MPN patients with neutrophilia which is an unfavorable prognostic factor. These findings certainly warrant further investigation as both biomarkers are potential therapeutic targets. To the best of our knowledge, these findings have not been reported yet. It is evident that the clinical phenotype of MPN is the result of both clonal myeloproliferation and a secondary inflammation process characterized by bone marrow stromal changes. The development of novel more effective therapies largely depends on a better understanding of the disease pathogenesis. Increasing knowledge of the bone marrow microenvironment will hopefully establish curative strategies for MPN. It is worth mentioning that in all MPNs but most commonly in the advanced myelofibrosis state, autoimmune and chronic inflammatory diseases have been described, linked to elevated biomarkers of inflammation (Barbui T et al., 2011; Hasselbach H., 1990; Kristinsson SY et al., 2010). Chronic inflammation may be both an initiator and a driver of clonal evolution in patients with MPN, as elegantly proposed by Hasselbach (2012).

**Declaration of Interest:** None

## REFERENCES

Barbui T et al. (2011). "Inflammation and thrombosis in essential thrombocythemia and polycythemia vera: different role of C reactive protein and pentraxin 3", *Haematologica* 96(2):315-318.

Baxter EJ et al (2005). "Cancer Genome Project. Acquired mutation of the tyrosine kinase JAK2 in human myeloproliferative disorders", *Lancet* 365(9484):1054-1061.

Baxter EJ, Scott LM, Campbell PJ, East C, Fourouclas N, Swanton S, et al. (2005). Acquired mutation of the tyrosine kinase JAK2 in human myeloproliferative disorders. *Lancet*. 365(9484):1054-61.

Bock O et al (2005). "Osteosclerosis in advanced chronic idiopathic myelofibrosis is associated with endothelial over-expression of osteoprotegerin"- *Brit. J. Haematol.* vol 130, Issue 1, pp76-82.

Collin-Osdoby P (2001). "Receptor activator of NF-kappa B and osteoprotegerin expression by human microvascular endothelial cells, regulation by inflammatory cytokines, and role in human osteoclastogenesis" *J. Biol. Chem.* 8:276 (23): 20659-72.

Cone-Buscail I et al (2005). "Erythropoietin-independent erythroid colony formation by bone marrow progenitors exposed to interleukin-11 and interleukin-8", *Experimental Hematology*, vol 33 (11):1299-1308.

De Stefano V et al (2008). "Recurrent thrombosis in patients with polycythemia vera and essential thrombocythemia: incidence, risk factors, and effect of treatments", *Haematologica* 93:372-380.

Emadi S et al (2005). "IL-8 and its CXCR1 and CXCR2 receptors participate in the control of megakaryocytic proliferation, differentiation and ploidy in myeloid metaplasia with myelofibrosis", *Blood* 105:464-473.

Groopman JE et al (1980). "The pathogenesis of myelofibrosis in myeloproliferative disorders", *Ann Internal Medicine* 92 (6):857-858.

Hasselbach H (1990). "Idiopathic Myelofibrosis: a clinical study of 80 patients" *Am J Hematol* 34(4):291-300.

Hasselbach HC et al (2012). "Perspectives on chronic inflammation in essential thrombocythemia, polycythemia vera, and myelofibrosis: is chronic inflammation a trigger and driver of clonal evolution and development of accelerated atherosclerosis and second cancer?" *Blood* 119:3219-3225

Hoermann G et al (2015). "Cytokine regulation of microenvironmental cells in Myeloproliferative neoplasms"-*Mediators of Inflammation* vol 2015, Article ID 889242.

James C et al (2005). "A unique clonal JAK2 mutation leading to constitutive signaling causes polycythaemia vera", *Nature* 434(7037):1144-1148.

Kralovics R et al (2005). "A gain-of function mutation of JAK2 in myeloproliferative disorders" *N Engl J Med* 352(17):1779-1790.

Kneipe H et al (2012). "Myelofibrosis: molecular and cell biological aspects" *Fibrogenesis and Tissue Repair* 5 (Suppl1): S21.

Kristinsson SY et al (2010). "Autoimmunity and the risk of myeloproliferative neoplasms" *Haematologica* 95(7):1216-1220.

Le Bousse-Kerdiles M.C et al (1996). "Differential expression of transforming growth factor-beta, basic fibroblast growth factor, and their receptors in CD34+ hematopoietic progenitor cells from patients with myelofibrosis and myeloid metaplasia," *Blood* vol88, no.12, pp.4534-4546.

Le Bousse-Kerdiles M.C et al (2001). "Involvement of the fibrogenic cytokines, TGF- $\beta$  and b FGF, in the pathogenesis of idiopathic myelofibrosis," *PathologieBiologie* vol.49, no.2, pp.153-157.

LiA et al (2003). "IL-8 directly enhanced endothelial cell survival, proliferation and matrix metalloproteinase production and regulated angiogenesis", *J Immunol* 170:3369-3376.

Malyankar UM et al (2000 Jul 14). "Osteoprotegerin is an alphabeta 3-induced, NK-kappa B-dependent survival factor for endothelial cells", *J BiolChem*275(28):20959-62.

Manoharan et al (1979). "The reticulin content of bone marrow in acute leukemia in adults", *Br J Haematology* Oct;43(2): 185-90.

Martyre M.C et al (1997). "Elevated levels of basic fibroblast growth factor in megakaryocytes and platelets from patients with idiopathic myelofibrosis," *Brit. J. Haematol.* vol.97,no.2, pp. 441-448.

Simonet WS et al (1997). "Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density", *Cell* 18:89 (2):309-19.

Smalberg JH et al (2012). "Myeloproliferative neoplasms in Budd-Chiari syndrome and portal vein thrombosis: a meta-analysis." *Blood* 120(25):4921-4928.

Spivak J et al (2002). "Polycythemia vera: myths, mechanisms, and management", *Blood* 100: 4272-4290.

Tefleri A et al (2010). "Circulating (IL)-8, IL-2R, IL-12, and IL-15 Levels are independently prognostic in Primary Myelofibrosis: A comprehensive Cytokine Profiling Study", *JCO* February 11, doi:10.1200/JCO. 32.9490.

Tefleri A et al (2013). "Survival and prognosis among 1545 patients with contemporary polycythemia vera: an international study", *Leukemia* 27(9):1874-1881.

Tefleri A et al (2018). "Essential thrombocythemia treatment algorithm 2018", *Blood* 9:2 Doi 10.1038/s41408-017-0041-8.

Tsuda E et al (1997). "Isolation of a novel cytokine from human fibroblasts that specifically inhibits osteoclastogenesis", *Biochemical and Biophysical Research Communications* vol.234, pp137-142.





Vaidya R et al (2012). "Plasma cytokines in polycythemia vera: phenotypic correlates, prognostic relevance, and comparison with myelofibrosis", *The Ame. J. Hematol.* vol.87, no.11, pp1003-1005.

Weitzmann MN (2013). "The role of Inflammatory Cytokines, the RANKL/OPG Axis, and the Immunoskeletal surface in Physiological Bone Turnover and Osteoporosis", *Scientifica* article ID 125705.