



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ**  
**ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ**  
**ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ**

**Διπλωματική εργασία**

**« Εφαρμογή της συνεστιακής μικροσκοπίας στην ιστοπαθολογία του  
μυελού των οστών »**

**Γκαμπράνη Πολυξένη του Ιωάννη**

**Λάρισα 2023**

**« Εφαρμογή της συνεστιακής μικροσκοπίας στην ιστοπαθολογία του  
μυελού των οστών »**

**«Application of confocal microscopy in bone marrow histopathology»**

## **ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ**

**Ιωάννου Μαρία** (επιβλέπουσα)

Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομικής, Τομέας Μορφολογίας, Τμήμα Ιατρικής,  
Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

**Παπουτσοπούλου Σταματία**

Επίκουρη Καθηγήτρια Μοριακής Ανοσοβιολογίας, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας,  
Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

**Βασιλάκη Άννα**

Επίκουρη Καθηγήτρια – Μόνιμη Φαρμακολογίας, Τομέας Βασικών και Εφαρμοσμένων  
Βιοϊατρικών Επιστημών, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

## **ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ**

Η παρούσα διπλωματική μελέτη πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Παθολογικής Ανατομικής του τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας υπό την επίβλεψη της κ. Ιωάννου Μαρίας, Καθηγήτριας Παθολογικής Ανατομικής.

Πρωτίστως, θα ήθελα να ευχαριστήσω ολόψυχα την επιβλέπουσα Καθηγήτριά μου κ. Ιωάννου Μαρία για την ανάθεση της συγκεκριμένης πτυχιακής εργασίας, την εμπιστοσύνη που μου έδειξε, την επιστημονική καθοδήγηση που μου παρείχε απλόχερα, την εκπαίδευσή μου στο χώρο του εργαστηρίου και την υποστήριξη καθόλη τη διάρκεια της συνεργασίας μας .

Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω τις Καθηγήτριες κ. Παπουτσοπούλου Σταματία και κ. Βασιλάκη Άννα για την άψογη συνεργασία που είχαμε κατά την εκπόνηση της εργασίας μου, τη βοήθεια και τις πληροφορίες που μου προσέφεραν καθόλη τη διάρκεια της μελέτης μου. Την ιατρό, παθολογοανατόμο υπότροφο του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, Τμήματος Ιατρικής κ. Ζαχαρούλη Κωνσταντίνα, για την υποστήριξη και τη βοήθειά της στην περάτωση της εργασίας μου.

Τέλος, ευχαριστώ όλα τα μέλη του εργαστηρίου για την προθυμία τους να με βοηθήσουν κατά την διάρκεια εκπόνησης της εργασίας μου και τις πολύτιμες συμβουλές που μου παρείχαν.

## **ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ**

|                      |          |
|----------------------|----------|
| <b>ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....</b> | <b>6</b> |
|----------------------|----------|

|                      |          |
|----------------------|----------|
| <b>ABSTRACT.....</b> | <b>7</b> |
|----------------------|----------|

|                      |          |
|----------------------|----------|
| <b>ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....</b> | <b>8</b> |
|----------------------|----------|

### **ΜΥΕΛΟΣ ΤΩΝ ΟΣΤΩΝ**

|                                       |   |
|---------------------------------------|---|
| ❖ ΙΣΤΟΛΟΓΙΑ ΤΟΥ ΜΥΕΛΟΥ ΤΩΝ ΟΣΤΩΝ..... | 8 |
|---------------------------------------|---|

|                                         |    |
|-----------------------------------------|----|
| ❖ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΕΣ ΤΟΥ ΜΥΕΛΟΥ ΤΩΝ ΟΣΤΩΝ..... | 10 |
|-----------------------------------------|----|

|                   |    |
|-------------------|----|
| • ΑΙΜΟΠΟΙΗΣΗ..... | 10 |
|-------------------|----|

|                                    |    |
|------------------------------------|----|
| • ΩΡΙΜΑΝΣΗ ΤΩΝ ΕΡΥΘΡΟΚΥΤΤΑΡΩΝ..... | 12 |
|------------------------------------|----|

|                                    |    |
|------------------------------------|----|
| • ΩΡΙΜΑΝΣΗ ΤΩΝ ΚΟΚΚΙΟΚΥΤΤΑΡΩΝ..... | 12 |
|------------------------------------|----|

|                                     |    |
|-------------------------------------|----|
| • ΩΡΙΜΑΝΣΗ ΤΩΝ ΑΚΟΚΚΙΟΚΥΤΤΑΡΩΝ..... | 12 |
|-------------------------------------|----|

|                                   |    |
|-----------------------------------|----|
| • ΠΡΟΕΛΕΥΣΗ ΤΩΝ ΑΙΜΟΠΕΤΑΛΙΩΝ..... | 13 |
|-----------------------------------|----|

|                                |           |
|--------------------------------|-----------|
| <b><u>ΛΕΜΦΟΠΟΙΗΣΗ.....</u></b> | <b>14</b> |
|--------------------------------|-----------|

|                                                   |           |
|---------------------------------------------------|-----------|
| <b><u>ΜΥΕΛΟΪΠΕΡΙΠΛΑΣΤΙΚΑ ΝΕΟΠΛΑΣΜΑΤΑ.....</u></b> | <b>14</b> |
|---------------------------------------------------|-----------|

|                                              |           |
|----------------------------------------------|-----------|
| <b><u>ΜΥΕΛΟΔΥΣΠΛΑΣΤΙΚΑ ΣΥΝΔΡΟΜΑ.....</u></b> | <b>17</b> |
|----------------------------------------------|-----------|

|                                                        |    |
|--------------------------------------------------------|----|
| <u>Ο ΡΟΛΟΣ ΤΟΥ GABA ΣΤΟ ΜΥΕΛΟ ΤΩΝ ΟΣΤΩΝ</u> .....      | 18 |
| <u>ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΑ</u> .....                               | 20 |
| ❖ ΦΘΟΡΙΣΜΟΣ.....                                       | 20 |
| ❖ ΣΥΝΕΣΤΙΑΚΗ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΑ.....                          | 21 |
| ❖ ΤΡΟΠΟΣ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑΣ ΤΟΥ ΣΥΝΕΣΤΙΑΚΟΥ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΟΥ..... | 22 |
| <b>ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ</b> .....                        | 24 |
| <b>ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ</b> .....                         | 25 |
| <u>ΑΠΟΠΑΡΑΦΙΝΩΣΗ ΚΑΙ ΕΝΥΔΑΤΩΣΗ ΤΟΜΩΝ</u> .....         | 25 |
| <u>ΑΝΟΣΟΪΣΤΟΧΗΜΕΙΑ</u> .....                           | 26 |
| <u>ΣΥΝΕΣΤΙΑΚΗ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΑ</u> .....                    | 27 |
| <b>ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ</b> .....                              | 28 |
| <b>ΣΥΖΗΤΗΣΗ</b> .....                                  | 34 |
| <b>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ</b> .....                              | 39 |

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο μυελός των οστών είναι το κύριο αιμοποιητικό όργανο, εντοπίζεται στο εσωτερικό ορισμένων οστών και πληρούται από πρόδρομες και ώριμες κυτταρικές μορφές των αιμοποιητικών κυτταρικών σειρών με ιδιαίτερη ιστική οργάνωση. Είναι υπεύθυνος για τη διαδικασία της αιμοποίησης και την παραγωγή διαφόρων τύπων κυττάρων (ερυθροκυττάρων, κοκκιοκυττάρων, μονοκυττάρων, αιμοπεταλίων και λεμφοκυττάρων). Διακρίνονται δύο τύποι μυελού των οστών, ο ερυθρός ή μυελώδης μυελός των οστών και ο κίτρινος ή λιπώδης μυελός των οστών. Συχνές διαταραχές του μυελού των οστών αποτελούν τα μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα και τα μυελοϋπερπλαστικά νεοπλάσματα. Τα μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα αφορούν την ελαττωματική ωρίμανση των προγονικών κυττάρων και οδηγούν σε μυελογενή λευχαιμία, ενώ τα μυελοϋπερπλαστικά νεοπλάσματα αφορούν διαταραχές της σηματοδότησης, με συνέπεια την υπερπαραγωγή κυττάρων του αίματος, και έχουν ως αποτέλεσμα ασθένειες όπως η χρόνια μυελοενής λευχαιμία, η αληθής πολυκυτταραιμία, η πρωτοπαθής μυελοϊνωση και η ιδιοπαθής θρομβοκυτταραιμία. Στην παρούσα πτυχιακή εργασία μελετήθηκε η δυνατότητα εφαρμογής της συνεστιακής μικροσκοπίας στην ιστοπαθολογία του μυελού των οστών. Ιστολογικές τομές από οστεομυελικές βιοψίες τριών ασθενών, η πρώτη χωρίς σημαντικές ιστολογικές αλλοιώσεις, η δεύτερη με μυελοϊνωση και η τρίτη με μυελοδυσπλαστικό σύνδρομο, μονιμοποιήθηκαν σε υδατικό διάλυμα φορμαλδεΰδης και στη συνέχεια εμπεδώθηκαν σε παραφίνη. Η διάγνωση των διαταραχών στηρίχθηκε στη χρώση αιματοξυλίνης – ηωσίνης και τις κλασσικές ανοσοϊστοχημικές χρώσεις. Στη συνέχεια δημιουργήθηκαν ιστολογικές τομές 4μ για την ανοσοϊστοχημική χρώση νευρώνων του μυελού των οστών με χρήση anti-GABA ( Gamma Amino-Butyric Acid) αντισωμάτων και τη μελέτη σε συνεστιακό μικροσκόπιο. Τα αποτελέσματα που εξήχθησαν από τα πειράματα ήταν ότι Α) η συνεστιακή μικροσκοπία μπορεί να εφαρμοσθεί χωρίς περιορισμούς σε ιστούς οι οποίοι έχουν εμπεδωθεί σε παραφίνη, Β) δημιουργήθηκαν τρισδιάστατες εικόνες που θα μπορούσαν να αναδεικνύουν ενδιαφέρουσες λεπτομέρειες της μικροανατομίας του μυελού των οστών και συγκεκριμένα στοιχεία της ενδοστικής επιφάνειας των οστεοδοκίδων με τον αιμοποιητικό μυελό και Γ) η έκφραση GABA παρουσιάζει ενδιαφέρουσες ιδιαιτερότητες ανάλογα με το αιματολογικό νόσημα.

## **ABSTRACT**

The bone marrow is the main hematopoietic tissue, located inside some bones and filled with progenitor and mature cell lines of hematopoietic cell lines with a characteristic tissue organization. It is responsible for the process of hematopoiesis and the production of various types of cells (erythrocytes, granulocytes, monocytes, platelets and lymphocytes). There are two types of bone marrow, the red bone marrow and the yellow bone marrow. Common bone marrow disorders are myelodysplastic syndromes and myeloproliferative neoplasms. Myelodysplastic syndromes involve defective maturation of progenitor cells leading to myelogenous leukemia, while myeloproliferative neoplasms involve signaling disorders, resulting in the overproduction of blood cells, and result in diseases such as chronic myelogenous leukemia, true polycythemia, primary myelofibrosis and idiopathic thrombocythemia. The application of confocal microscopy in bone marrow histopathology was studied in this thesis. Histological sections from bone marrow biopsies of three patients, the first without significant histological changes, the second with myelofibrosis and the third with myelodysplastic syndrome, were isolated in formaldehyde solution and then embedded in paraffin. The diagnosis of the disorders was based on hematoxylin-eosin staining and classical immunohistochemical staining. Next, 4µm histological sections were created for immunohistochemical staining of bone marrow neurons using anti-GABA (Gamma Amino-Butyric Acid) antibodies and were observed by a confocal microscope. The results extracted from the experiments were that A) confocal microscopy can be applied without limitations to tissues that have been embedded in paraffin, B) three-dimensional images were generated that could highlight interesting details of bone marrow microanatomy and in particular details of the intracellular surface of the bone marrow with the hematopoietic marrow, and C) GABA expression shows interesting specificities depending on the hematological disease.



## ΕΙΣΑΓΩΓΗ

### ΜΥΕΛΟΣ ΤΩΝ ΟΣΤΩΝ

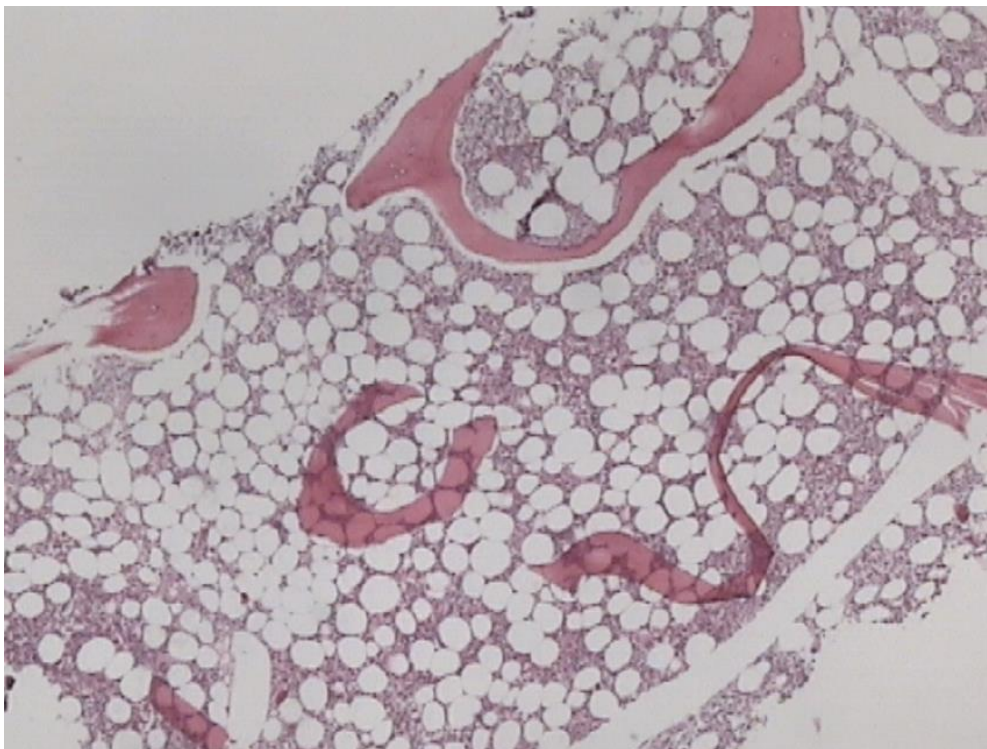
Ο μυελός των οστών είναι το κύριο αιμοποιητικό όργανο και βρίσκεται στο εσωτερικό των μακρών οστών και στις μικρές κοιλότητες των σπογγωδών οστών. Είναι υπεύθυνος για την παραγωγή ερυθροκυττάρων, κοκκιοκυττάρων, μονοκυττάρων, αιμοπεταλίων και λεμφοκυττάρων. Αποτελείται από κύτταρα του αιμοποιητικού ιστού, εντός υποστρώματος με λιπώδη κύτταρα, στοιχεία συνδετικού ιστού και αγγεία. Τα κύτταρα του αιμοποιητικού ιστού παρουσιάζουν ιδιαίτερη οργάνωση προκειμένου να επιτυγχάνεται η φυσιολογική αιμοποίηση. [Junqueira. (2013). *Βασική Ιστολογία* (Λουίζα Ανδριοπούλου- Οικονόμου, Ed.; 6η ελληνική). Π.Χ. Πασχαλίδης, Travlos, G. S. (2006). Normal Structure, Function and Histology of the Bone Marrow]

### ΙΣΤΟΛΟΓΙΑ ΜΥΕΛΟΥ ΤΩΝ ΟΣΤΩΝ

Ο μυελός των οστών, που βρίσκεται στο εσωτερικό συγκεκριμένων οστών του σώματος, περιέχει αρχέγονα βλαστικά κύτταρα τα οποία διαφοροποιούνται σταδιακά σε ώριμες κυτταρικές μορφές των αιμοποιητικών σειρών. Τα αρχέγονα, βλαστικά κύτταρα του μυελού διακρίνονται σε μεσεγχυματικά και αιμοποιητικά. Για την φυσιολογική αιμοποίηση, απαραίτητη προϋπόθεση αποτελεί η ομαλή διαφοροποίηση στο κατάλληλο μικροπεριβάλλον του μυελού ενώ στις νόσους του μυελού, κρίσιμο ρόλο παίζουν τόσο γενετικές όσο και επιγενετικές βλάβες στο επίπεδο του αρχέγονου βλαστικού κυττάρου αλλά και διαταραχές στην ομοιοστασία του μικροπεριβάλλοντος και στην αλληλεπίδρασή του με τα αιμοποιητικά κύτταρα του μυελού. Οι δύο τύποι μυελού των οστών είναι ο ερυθρός μυελός των οστών, ή αλλιώς μυελώδης ιστός και ο κίτρινος μυελός των οστών, ή αλλιώς λιπώδης μυελός. Ο ερυθρός μυελός των οστών αποτελείται από έναν λεπτό, αγγειώδη ιστό που περιέχει αιμοποιητικά κύτταρα που θα παράγουν τα κυτταρικά στοιχεία του αίματος, ενώ ο κίτρινος μυελός αποτελείται από λιπώδη ιστό. Στα νεογέννητα, ο μυελός των οστών είναι εξολοκλήρου ερυθρός προκειμένου να παράγει τα κύτταρα του αίματος, ενώ προοδευτικά, προϊούσης της ηλικίας το μεγαλύτερο τμήμα του μυελού αντικαθίσταται από λιπώδη μυελό.

Η μικροσκοπική ανατομία του μυελού των οστών περιλαμβάνει τον οστίτη ιστό, το αγγειακό σύστημα και ένα πλέγμα δικτυωτών στρωματικών κυττάρων. Ο οστίτης ιστός

οριοθετεί τους μυελοχώρους προβάλλοντας εσωτερικά με δοκίδες που διεισδύουν στο παρέγχυμα του μυελού των οστών. Το αγγειακό σύστημα αποτελείται από αρτηρίδια (αιμοποιητικές χορδές, νησίδια κυττάρων και κολποειδή τριχοειδή αγγεία) που διατρέχουν το οστό συγκλίνοντας στο φλεβικό δίκτυο, και απομακρύνονται μέσω μίας κεντρικής φλέβας. Το πλέγμα δικτυωτών στρωματικών κυττάρων, που περιβάλλει τα διάφορα αγγεία, αποτελείται από ένα δίκτυο εξειδικευμένων ινοβλαστών και από δικτυωτές ίνες. Παράλληλα, στο μυελό των οστών εντοπίζεται κολλαγόνο τύπου I, πρωτεογλυκάνες, φιβρονεκτίνη και λαμινίνη. Η φιβρονεκτίνη και η λαμινίνη αλληλεπιδρούν με τις ιντεγκρίνες συμμετέχοντας στη σύνδεση των κυττάρων με τη μεσοκυττάρια ουσία. Στον ερυθρό μυελό των οστών γίνεται επίσης η φαγοκυττάρωση των γηρεότερων ερυθροκυττάρων από τα μακροφάγα, αναπαράγοντας αίμη δεσμευμένη με σίδηρο και μεταφέροντάς τη έπειτα στα υπό διαφοροποίηση ερυθροκύτταρα.



*Εικόνα 1: Βιοψία μυελού των οστών χωρίς αιματολογικό νόσημα [Ιωάννου Μαρία. (2023). ΟΔΗΓΟΣ ΜΕΛΕΤΗΣ ΙΣΤΟΛΟΓΙΑΣ. Εκδόσεις Νέον]*

Στα ενήλικα άτομα τα προγονικά κύτταρα όλων των λεμφοκυττάρων εντοπίζονται στον ερυθρό μυελό των οστών, η ωρίμανσή τους, όμως, συμβαίνει σε δύο πρωτογενή λεμφικά όργανα. Τα κύτταρα τα οποία πρόκειται να γίνουν Β-λεμφοκύτταρα παραμένουν στο μυελό των οστών, όπου και διαφοροποιούνται, ενώ αυτά που πρόκειται να διαφοροποιηθούν προς Τ-λεμφοκύτταρα μεταφέρονται μέσω της κυκλοφορίας του αίματος στον αναπτυσσόμενο θύμο.

Τα Β-λεμφοκύτταρα είναι υπεύθυνα για τη χυμική ανοσία, ενώ τα Τ-λεμφοκύτταρα για την κυτταρική ανοσία. [Junqueira. (2013). *Βασική Ιστολογία* (Λουίζα Ανδριοπούλου - Οικονόμου, Ed.; 6η ελληνική). Π.Χ. Πασχαλίδης, Lucas, D. (2021). Structural organization of the bone marrow and its role in hematopoiesis, Wu, Q., Zhang, J., & Lucas, D. (2021). Anatomy of Hematopoiesis and Local Microenvironments in the Bone Marrow, Travlos, G. S. (2006). Histopathology of Bone Marrow]

## ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΕΣ ΜΥΕΛΟΥ ΤΩΝ ΟΣΤΩΝ

### ΑΙΜΟΠΟΙΗΣΗ

Αιμοποίηση είναι η διαδικασία κατά την οποία πρόδρομα βλαστικά κύτταρα διαφοροποιούνται προς ώριμα κύτταρα αίματος. Στην εμβρυική φάση, κατά το πρώτο τρίμηνο τα αιμοποιητικά κύτταρα παράγονται από το μεσόδερμα του λεκιθικού σάκου. Στο δεύτερο τρίμηνο η αιμοποίηση πραγματοποιείται στο υπό διαφοροποίηση ήπαρ με τον σπλήνα να συμμετέχει αμυδρά, ενώ στο τρίτο τρίμηνο ο μυελός των οστών είναι το κύριο αιμοποιητικό όργανο σε μερικά οστά, εφόσον έχουν αρχίσει να διαμορφώνονται τα σκελετικά στοιχεία. Στην παιδική και ενήλικη ζωή του ατόμου ο μυελός των οστών είναι υπεύθυνος για την παραγωγή των ερυθροκυττάρων (ερυθροποίηση), των κοκκιοκυττάρων (κοκκιοκυτταροποίηση), των μονοκυττάρων (μονοκυτταροποίηση) και των αιμοπεταλίων (θρομβοκυτταροποίηση).

Τα αρχέγονα κύτταρα από τα οποία προκύπτουν όλοι οι τύποι κυττάρων του αίματος είναι πολυδύναμα και βρίσκονται στο μυελό των οστών. Κάποια από αυτά διαφοροποιούνται προς εξειδικευμένους, μη αναστρέψιμους κυτταρικούς τύπους, ενώ άλλα λειτουργούν ως μια δεξαμενή βραδέως διαιρούμενων κυττάρων. Έχουν την ικανότητα να πολλαπλασιάζονται και να δημιουργούν δύο γενιές προγονικών κυττάρων, τη γενιά παραγωγής λεμφοκυττάρων και τη γενιά παραγωγής μυελοειδών κυττάρων. Τα προγονικά κύτταρα των κυττάρων του αίματος ονομάζονται μονάδες οι οποίες σχηματίζουν αποικίες κυττάρων (CFUs), διότι όταν αυτά καλλιεργούνται προκύπτουν κυτταρικές αποικίες που ανήκουν σε ένα μόνο κυτταρικό είδος. Οι τέσσερις τύποι προγονικών κυττάρων που σχηματίζουν CFUs είναι η γενιά των ερυθρού τύπου κυττάρων – τα ερυθροκύτταρα (CFU-E), η γενιά των θρομβοκυττάρων – τα μεγακαρυοκύτταρα (CFU-Meg), η γενιά των κοκκιοκυττάρων – μονοκυττάρων – τα κοκκιοκύτταρα-μονοκύτταρα (CFU-GM), και η γενιά των λεμφοειδών κυττάρων – λεμφοκύτταρα όλων των τύπων (CFU-L). Από κάθε

γενιά προγονικών κυττάρων/CFU προκύπτουν πρόδρομα κύτταρα ή βλάστες που σταδιακά αποκτούν τα μορφολογικά χαρακτηριστικά του ώριμου, λειτουργικού κυτταρικού τύπου στον οποίο θα διαφοροποιηθούν.

Η αιμοποίηση προϋποθέτει ένα μικροπεριβάλλον, έναν συνδυασμό εξειδικευμένων ενδοκρινικών, παρακρινικών παραγόντων ή παραγόντων που καθορίζονται από τη παρασπειραματική συσκευή των νεφρώνων. Οι προϋποθέσεις αυτές πληρούνται από τα κύτταρα της περιοχής στην οποία πραγματοποιείται η αιμοποίηση, αλλά και από την εξωκυττάρια περιοχή των αιμοποιητικών οργάνων. Ιδιαίτερα σημαντικό ρόλο στην αιμοποίηση έχουν οι κυτοκίνες ή παράγοντες διέγερσης του σχηματισμού αποικιών (CFS), οι οποίες είναι γλυκοπρωτεΐνες, που λειτουργούν ως αυξητικοί παράγοντες, ενεργοποιώντας τον πολλαπλασιασμό των προγονικών και των πρόδρομων κυττάρων. Οι κυτοκίνες προάγουν τη διαφοροποίηση των κυττάρων και την ωρίμανση μεταξύ των εξειδικευμένων γενεών προέλευσης των κυτταρικών σειρών της αιμοποίησης. Οι σπουδαιότερες αιμοποιητικές κυτοκίνες είναι ο παράγοντας στελεχιαίων κυττάρων (μιτογόνος ουσία για όλα τα προγονικά αιμοποιητικά κύτταρα, προέρχεται από κύτταρα του στρώματος του μυελού των οστών), η ερυθροποιητίνη (μιτογόνος ουσία για όλα τα προγονικά και τα πρόδρομα κύτταρα της ερυθράς σειράς, προάγοντας τη διαφοροποίησή τους, προέρχεται από ενδοθηλιακά κύτταρα που περιβάλλουν τα νεφρικά σωληνάρια και ηπατικά κύτταρα), η θρομβοποιητίνη (μιτογόνος ουσία για τις μεγακαρυοβλάστες και όλα τα προγονικά τους κύτταρα, προέρχεται από τον νεφρό και το ήπαρ), ο παράγοντας που διεγείρει τον σχηματισμό των αποικιών των κοκκιοκυττάρων και των μακροφάγων (μιτογόνος ουσία για όλα τα προγονικά κύτταρα της μυελοειδούς σειράς, προέρχεται από ενδοθηλιακά κύτταρα του μυελού των οστών και T-λεμφοκύτταρα), ο παράγοντας που διεγείρει τον σχηματισμό των αποικιών των κοκκιοκυττάρων (μιτογόνος ουσία για όλα τα πρόδρομα κύτταρα της σειράς των ουδετερόφιλων, προέρχεται από ενδοθηλιακά κύτταρα του μυελού των οστών και μακροφάγα), ο παράγοντας που διεγείρει τον σχηματισμό των αποικιών των μονοκυττάρων (μιτογόνος ουσία για όλα τα πρόδρομα κύτταρα τη σειράς παραγωγής των μονοκυττάρων, προέρχεται από ενδοθηλιακά κύτταρα του μυελού των οστών και μακροφάγα), η ιντερλευκίνη-1 (ρυθμίζει τις δραστηριότητες και τις εκκρίσεις των κυτοκινών σε πολλά λευκά αιμοσφαίρια καθώς και σε άλλα κύτταρα, προέρχεται από μακροφάγα και T βοηθητικά κύτταρα), κ.ά.. [Junqueira. (2013). *Βασική Ιστολογία* (Λουίζα Ανδριοπούλου - Οικονόμου, Ed.; 6η ελληνική). Π.Χ. Πασχαλίδης, Lucas, D. (2021). Structural organization of the bone marrow and its role in hematopoiesis, Wu, Q., Zhang,

J., & Lucas, D. (2021). Anatomy of Hematopoiesis and Local Microenvironments in the Bone Marrow, Travlos, G. S. (2006). Histopathology of Bone Marrow]

### I. ΩΡΙΜΑΝΣΗ ΤΩΝ ΕΡΥΘΡΟΚΥΤΤΑΡΩΝ

Η ωρίμανση των ερυθροκυττάρων, ή αλλιώς ερυθροποίηση, είναι η διαφοροποίηση βλαστικών κυττάρων προς ερυθρά κύτταρα κατά την οποία πραγματοποιείται η σύνθεση της αιμοσφαιρίνης και ο σχηματισμός ενός μικρού, απύρηνου, αμφίκιου κυτταρικού σώματος. Κατά την διαδικασία της ερυθροποίησης ελαττώνεται ο πυρήνας ώστε τελικά εξαφανίζεται, μειώνεται ο αριθμός των πολυριβοσωμάτων, αυξάνεται το ποσό της αιμοσφαιρίνης και τα μιτοχόνδρια και άλλα κυτταρικά οργάνδια εξαφανίζονται. Σημαντικό ρόλο στην διαδικασία της ερυθροποίησης διαδραματίζει η γλυκοπρωτεΐνη ερυθροποιητίνη, ένας αυξητικός παράγοντας που παράγεται από κύτταρα των νεφρών και διεγείρει την παραγωγή του mRNA στην παραγωγή σφαιρινών.

### II. ΩΡΙΜΑΝΣΗ ΤΩΝ ΚΟΚΚΙΟΚΥΤΤΑΡΩΝ

Η κοκκιοποίηση είναι η διαδικασία κατά την οποία συμβαίνουν κυτταροπλασματικές αλλαγές, όπως η σύνθεση πρωτεϊνών για τον σχηματισμό των αζουρόφιλων κοκκίων και των ειδικών κοκκίων, των οποίων η παραγωγή πραγματοποιείται στο αδρό ενδοπλασματικό δίκτυο και την συσκευή Golgi. Ο μυελοβλάστης, το προγονικό κύτταρο των κοκκιοκυττάρων δεν περιέχει καθόλου κυτταροπλασματικά κοκκία. Τα πρώτα αζουρόφιλα κοκκία που εκκρίνονται από τη συσκευή Golgi, σχηματίζονται αρχικά στο στάδιο του προμυελοκυττάρου. Τα ειδικά κοκκία αρχίζουν να σχηματίζονται στο στάδιο του μυελοκυττάρου και τελικά στο στάδιο του μεταμυελοκυττάρου εντοπίζονται άφθονα ειδικά κοκκία και διάσπαρτα αζουρόφιλα κοκκία, ενώ η συσκευή Golgi μειώνεται.

### III. ΩΡΙΜΑΝΣΗ ΤΩΝ ΑΚΟΚΚΙΟΚΥΤΤΑΡΩΝ

Από την ωρίμανση των ακοκκιοκυττάρων προκύπτουν δύο τύποι διαφοροποιημένων κυττάρων, τα μακροφάγα και τα λεμφοκύτταρα. Οι μονοβλάστες, τα προγονικά κύτταρα των μακροφάγων, μοιάζουν με τους μυελοβλάστες. Η διαφοροποίηση των μονοβλαστών θα δώσει το προμονοκύτταρο,

ένα ευμεγέθες κύτταρο με βασεόφιλο κυτταρόπλασμα και πυρήνα. Με τη διαίρεση των προμυελοκυττάρων προκύπτουν τα μονοκύτταρα, τα οποία περιέχουν εκτεταμένο αδρό ενδοπλασματικό δίκτυο και μεγάλες συσκευές Golgi. Τα μονοκύτταρα κυκλοφορούν στο περιφερικό αίμα για μερικές ώρες μέχρι την είσοδό τους στους ιστούς, όπου ωριμάζουν σε μακροφάγα και παραμένουν ενεργά για μερικούς μήνες. Όσον αφορά τα λεμφοκύτταρα, παρόλο που παράγονται από το θύμο αδένα και τα περιφερικά λεμφικά όργανα, όλα τα λεμφογενούς προέλευσης κύτταρα προέρχονται από το μυελό των οστών. Κάποια από αυτά μεταναστεύουν στο θύμο αδένα όπου και αποκτούν ιδιότητες των T λεμφοκυττάρων, ενώ άλλα παραμένουν στο μυελό των οστών, διαφοροποιούνται σε B λεμφοκύτταρα και μεταναστεύουν στα περιφερικά λεμφικά όργανα. Τα προγονικά κύτταρα της λεμφοειδούς σειράς είναι οι λεμφοβλάστες, ευμεγέθη κύτταρα από την διαίρεση των οποίων προκύπτουν τα λεμφοκύτταρα. Κατά την διαφοροποίηση, οι πυρήνες γίνονται μικρότεροι και τα κύτταρα μικραίνουν ως προς το συνολικό τους μέγεθος. Στη συνέχεια, γίνεται η σύνθεση εξειδικευμένων πρωτεϊνών της κυτταρικής τους επιφάνειας στο μυελό των οστών ή στο θύμο αδένα για τα B ή T λεμφοκύτταρα αντίστοιχα.

#### IV. ΠΡΟΕΛΕΥΣΗ ΤΩΝ ΑΙΜΟΠΕΤΑΛΙΩΝ

Τα αιμοπετάλια ή αλλιώς θρομβοκύτταρα είναι κυτταρικά θραύσματα που προέρχονται από τον ερυθρό μυελό των οστών μετά την αποκοπή τους από τα ώριμα μεγακαρυοκύτταρα, τα οποία διαφοροποιούνται από τους μεγακαρυοβλάστες με τη συμβολή της θρομβοποιητίνης. Οι μεγακαρυοβλάστες είναι πολύ μεγάλα, σπάνια κύτταρα στο μυελό των οστών με βασεόφιλο κυτταρόπλασμα, από τη διαίρεση των οποίων προκύπτουν τα μεγακαρυοκύτταρα, τα οποία είναι ακόμη μεγαλύτερα κύτταρα με λιγότερο βασεόφιλο κυτταρόπλασμα. Τα μεγακαρυοκύτταρα διαθέτουν αναπτυγμένο αδρό ενδοπλασματικό δίκτυο και εκτεταμένη συσκευή Golgi, από τα οποία παράγονται τα κοκκία των αιμοπεταλίων, και με μια πολύπλοκη διαδικασία παράγουν αρκετές επιμήκεις, διακλαδιζόμενες αποφυάδες, τα προ-αιμοπετάλια, από τις άκρες των οποίων αποκόπτονται τα αιμοπετάλια πλήρως σχηματισμένα.

Όλοι αυτοί οι τύποι κυττάρων αίματος που σχηματίζονται, εισέρχονται στην κυκλοφορία του περιφερικού αίματος μέσω του ασυνεχούς τύπου ενδοθηλίου των κολπωδών τριχοειδών αγγείων του ερυθρού μυελού των οστών. [Junqueira. (2013). *Βασική*

*Ιστολογία* (Λουίζα Ανδριοπούλου - Οικονόμου, Ed.; 6η ελληνική). Π.Χ. Πασχαλίδης, Lucas, D. (2021). Structural organization of the bone marrow and its role in hematopoiesis, Wu, Q., Zhang, J., & Lucas, D. (2021). Anatomy of Hematopoiesis and Local Microenvironments in the Bone Marrow, Travlos, G. S. (2006). Histopathology of Bone Marrow]

## ΛΕΜΦΟΠΟΙΗΣΗ

Λεμφοποίηση είναι η διαδικασία διαφοροποίησης λεμφοκυττάρων και πραγματοποιείται στο μυελό των οστών και στα πρόδρομα κύτταρα των λεμφοκυτογόνων οργάνων που μεταναστεύουν από τον μυελό των οστών στο θύμο ή στους λεμφαδένες, στο σπλήνα και σε άλλες λεμφικές δομές όπου γίνεται ο πολλαπλασιασμός και η διαφοροποίησή τους. [Junqueira. (2013). *Βασική Ιστολογία* (Λουίζα Ανδριοπούλου - Οικονόμου, Ed.; 6η ελληνική). Π.Χ. Πασχαλίδης]

## ΜΥΕΛΟΪΠΕΡΠΛΑΣΤΙΚΑ ΝΕΟΠΛΑΣΜΑΤΑ

Τα μυελοΐπερπλαστικά νεοπλάσματα χαρακτηρίζονται από την παρουσία μεταλλαγμένων, σταθερά ενεργών κινασών τυροσίνης ή άλλων επίκτητων διαταραχών στις σηματοδοτικές οδούς που ευθύνονται για την ανεξάρτητη λειτουργία αυξητικών παραγόντων. Έτσι εξηγείται η υπερπαραγωγή κυττάρων αίματος, η οποία έχει θεραπευτική σημασία εξαιτίας διαθέσιμων αναστολέων της κίνησης της τυροσίνης. Οι τέσσερις κυριότερες κατηγορίες μυελοΐπερπλαστικών συνδρόμων είναι η χρόνια μυελογενής λευχαιμία, η αληθής πολυκυτταραιμία, η πρωτοπαθής μυελοϊνωση και η ιδιοπαθής θρομβοκυτταραιμία.

Η χρόνια μυελογενής λευχαιμία εμφανίζεται κυρίως σε ενήλικα άτομα ηλικίας 25-60 ετών και χαρακτηρίζεται από την παρουσία του γονιδίου συγχώνευσης BCR-ABL, το οποίο προέρχεται από τμήμα του γονιδίου BCR στο χρωμόσωμα 22 και του γονιδίου ABL στο χρωμόσωμα 9. Οι ασθενείς με χρόνια μυελογενή λευχαιμία φέρουν το γονίδιο συγχώνευσης BCR-ABL σε πρόδρομες μορφές κοκκιοκυττάρων, ερυθροκυττάρων, μεγακαρυοκυττάρων και Β κυττάρων, όπως και σε μερικές περιπτώσεις σε πρόδρομες μορφές Τ κυττάρων. Το γονίδιο BCR-ABL παράγει μια πρωτεΐνη συγχώνευσης που αποτελείται από τμήματα του BCR και από την περιοχή κίνησης τυροσίνης του ABL. Φυσιολογικά, τα προγονικά μυελικά κύτταρα εξαρτώνται από αυξητικούς παράγοντες και υποδοχείς για την ανάπτυξη και την επιβίωσή τους. Στη χρόνια μυελογενή λευχαιμία, η BCR-ABL παράγει σήματα όμοια των επιδράσεων της ενεργοποίησης των υποδοχέων των αυξητικών παραγόντων με αποτέλεσμα να μειώνεται η εξάρτηση των προγονικών μορφών της από αυξητικούς παράγοντες. Στα αρχικά στάδια της

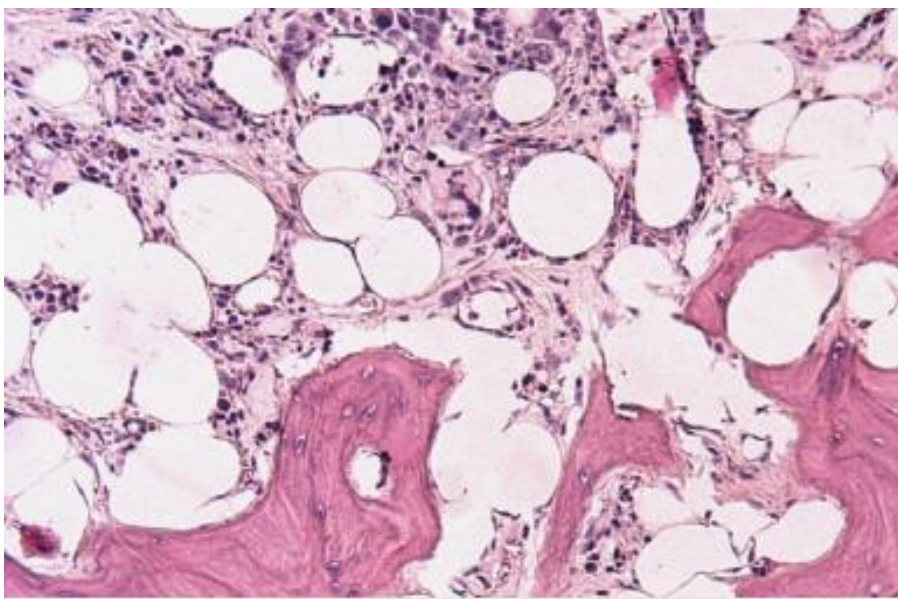
νόσου τα συμπτώματα δεν είναι ειδικά, και επίσης παρατηρείται υπερπαραγωγή φυσιολογικών κυττάρων του αίματος, καθώς η BCR-ABL δεν αναστέλλει τη διαφοροποίηση. Τα κλινικά χαρακτηριστικά της νόσου περιλαμβάνουν εύκολη κόπωση, αδυναμία, απώλεια βάρους και αίσθημα βάρους στην κοιλιά εξαιτίας της σπληνομεγαλίας. Αρχικά η νόσος εξελίσσεται αργά και έπειτα από ένα χρονικό διάστημα το 50% περίπου των ασθενών περνά σε μια επιταχυνόμενη φάση, που περιλαμβάνει επιδείνωση της αναιμίας και νεοεμφανιζόμενη θρομβοκυτταροπενία, εμφάνιση γενετικών ανωμαλιών και, τελικά, οξεία λευχαιμία. Το άλλο 50% των ασθενών περνά στη βλαστική κρίση αιφνίδια, χωρίς την μεσολάβηση της επιταχυνόμενης φάσης. Το γονίδιο συγχώνευσης BCR-ABL είναι δυνατόν να ταυτοποιηθεί με την εφαρμογή εξετάσεων όπως ο καρνύτυπος, ο φθορίζων *in situ* υβριδισμός (FISH) ή η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR). Θεραπεία για τη νόσο αποτελεί η χρήση αναστολέων τυροσινικής κινάσης, προκαλώντας παρατεταμένες υφέσεις.

Η αληθής πολυκυτταραιμία χαρακτηρίζεται από στενά ενεργοποιητικές σημειακές μεταλλάξεις στην τυροσινική κινάση JAK2. Η JAK2 φυσιολογικά συμμετέχει στις οδούς σηματοδότησης υποδοχέων ερυθροποιητίνης και υποδοχέων άλλων αυξητικών παραγόντων. Η πιο συνήθης μετάλλαξη της JAK2 οδηγεί στη μείωση της εξάρτησης των αιμοποιητικών κυττάρων από αυξητικούς παράγοντες για την ανάπτυξη και την επιβίωση, δημιουργώντας υπερπλασία ερυθροκυττάρων, κοκκιοκυττάρων και μεγακαρυοκυττάρων. Η αληθής πολυκυτταραιμία χαρακτηρίζεται από χαμηλά επίπεδα ερυθροποιητίνης στον ορό και τα περισσότερα κλινικά συμπτώματα σχετίζονται με την απόλυτη αύξηση της μάζας των ερυθροκυττάρων. Προσβάλλει, συνήθως, άτομα στο τέλος της μέσης ηλικίας και τα συμπτώματα περιλαμβάνουν ερυθρότητα, κυάνωση, έντονο κνησμό, θρομβωτική και αιμορραγική τάση, υπέρταση, κεφαλαλγία, ζάλη, αιματέμεση και μέλαινα. Στο 5-10% των ασθενών παρουσιάζεται και ουρική αρθρίτιδα εξαιτίας του αυξημένου ρυθμού κυτταρικής ανακύκλωσης. Για τη διάγνωση της νόσου ο αριθμός των ερυθροκυττάρων πρέπει να κυμαίνεται από 6 έως 10 εκατομμύρια/ $\mu\text{L}$ , ο αιματοκρίτης να πλησιάζει ή να υπερβαίνει το 60%, ο αριθμός των λευκοκυττάρων στα 50.000 κύτταρα/ $\mu\text{L}$ , ο αριθμός των αιμοπεταλίων να υπερβαίνει τα 400.000 κύτταρα/ $\mu\text{L}$  και ο αριθμός των βασεόφιλων να είναι επίσης αυξημένος. Θεραπεία για τη νόσο αποτελούν αναστολείς που στοχεύουν τη JAK2 και οι περισσότεροι ασθενείς παρουσιάζουν κάποια βελτίωση.

Η πρωτοπαθής μυελοϊνωση χαρακτηρίζεται από ανάπτυξη ίνωσης στο μυελό των οστών, μειώνοντας την αιμοποίηση και οδηγώντας σε κυτταροπενίες και εκτεταμένη εξωμυελική αιμοποίηση. Παρουσιάζει ιστολογική ομοιότητα με τη φάση εξάντλησης που παρατηρείται σε άλλα μυελοϋπερπλαστικά σύνδρομα. Το μοριακό μονοπάτι σηματοδότησης



JAK-STAT ευθύνεται για τη διαταραχή, σχεδόν σε όλες τις περιπτώσεις. Αιτία της χαρακτηριστικής αυτής ίνωσης ενδεχομένως να αποτελεί η απελευθέρωση ινογόνων παραγόντων από νεοπλασματικά μεγακαρυοκύτταρα. Συγκεκριμένα, δύο παράγοντες που συντίθενται στα μεγακαρυοκύτταρα και είναι μιτογόνοι για τους ινοβλάστες ευθύνονται για την πρόκληση τη νόσου: ο αυξητικός παράγοντας που προέρχεται από τα αιμοπετάλια και ο μεταμορφωτικός αυξητικός παράγοντας-β (TGF-β). Κατά τη διάρκεια της ίνωσης, αρχέγονα αιμοποιητικά κύτταρα φωλεύουν στα δευτερογενή αιμοποιητικά όργανα, όπως ο σπλήνας, το ήπαρ και οι λεμφαδένες, καταλήγοντας σε εξωμυελική αιμοποίηση. Η διαταραγμένη παραγωγή ερυθροκυττάρων σε εξωμυελικές θέσεις και η ταυτόχρονη καταστολή της λειτουργίας του μυελού των οστών οδηγεί σε μετρίου έως σοβαρού βαθμού αναιμία. Προσβάλλει συνήθως άτομα άνω των 60 ετών και τα συμπτώματα είναι προοδευτική αναιμία, σπληνομεγαλία, κόπωση, απώλεια βάρους, νυχτερινοί ιδρώτες, υπερουριχαιμία και δευτεροπαθής ουρική αρθρίτιδα. Η αντιμετώπισή της είναι πιο δύσκολη από ό,τι η αληθής πολυκυτταραιμία και η χρόνια μυελογενής λευχαιμία, και το προσδόκιμο ζωής για τους ασθενείς είναι τα 4-5 έτη. Οι αναστολείς JAK2 συμμετέχουν στη μείωση της σπληνομεγαλίας και των υπόλοιπων συμπτωμάτων και ως θεραπεία σε νεαρούς ασθενείς θα μπορούσε να λειτουργήσει η μεταμόσχευση αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων. [Robbins. (2020). *ΒΑΣΙΚΗ ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΗ ΑΝΑΤΟΜΙΚΗ* (Μελαχροινού Μαρία, Ζολώτα Βασιλική, Κουρέα Ελένη, & Τζελέπη Βασιλική, Eds.; 10η). ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΕΣ ΕΚΔΟΣΕΙΣ ΠΑΡΙΣΙΑΝΟΥ Α.Ε.]



Εικόνα 2: Βιοψία μυελού των οστών με μυελοϊνωση [Ιωάννου Μαρία. (2023). *ΟΔΗΓΟΣ ΜΕΛΕΤΗΣ ΙΣΤΟΛΟΓΙΑΣ*. Εκδόσεις Νέον]

## ΜΥΕΛΟΔΥΣΠΛΑΣΤΙΚΑ ΣΥΝΔΡΟΜΑ

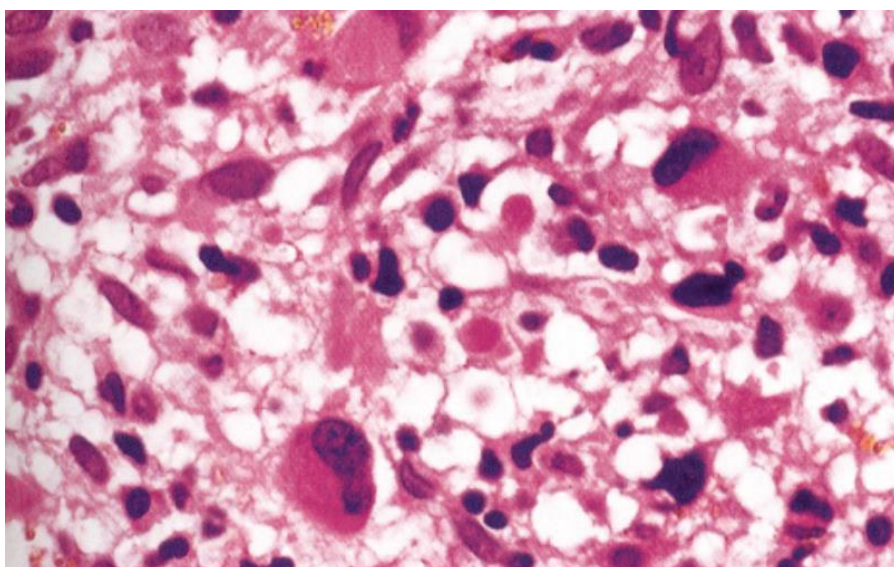
Τα μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα αναφέρονται σε διαταραχές που αφορούν την ελαττωματική ωρίμανση προγονικών κυττάρων με αποτέλεσμα να μη γίνεται αποδοτικά η αιμοποίηση και να υπάρχει μεγάλος κίνδυνος εξάλλαξης σε μυελογενή λευχαιμία. Ουσιαστικά, γίνεται μερική ή πλήρης αντικατάσταση του μυελού των οστών από τον κλώνο ενός εξαλλαγμένου πολυδύναμου προγονικού κυττάρου, το οποίο διαφοροποιείται, με μη αποδοτικό και διαταραγμένο τρόπο, προς ερυθροκύτταρα, κοκκιοκύτταρα και αιμοπετάλια. Απόρροια αυτού είναι συνήθως υπερκυτταρικός ή ορθοκυτταρικός μυελός των οστών με μία ή περισσότερες μορφές κυτταροπενίας στο περιφερικό αίμα. Λόγω του ότι ο εξαλλαγμένος αυτός κλώνος είναι γονιδιακά ασταθής, συσσωρεύονται ακόμη περισσότερες μεταλλάξεις που οδηγούν τελικά σε οξεία μυελογενή λευχαιμία.

Τα γενετικά φαινόμενα που συσχετίζονται με την παθογένεση των μυελοδυσπλαστικών συνδρόμων, μπορούν να κατηγοριοποιηθούν ως εξής:

- Επιγενετικοί παράγοντες: εντοπίζονται μεταλλάξεις στις οποίες συμμετέχουν πολλοί από τους επιγενετικούς παράγοντες που είναι μεταλλαγμένοι στην οξεία μυελογενή λευχαιμία, όπως για παράδειγμα παράγοντες που ρυθμίζουν τη μεθυλίωση του DNA και τις τροποποιήσεις της ιστόνης.
- Παράγοντες συρραφής του RNA: εντοπίζονται μεταλλάξεις που εμπλέκονται στον μηχανισμό συρραφής του RNA και θεωρείται ότι καθοδηγούν τη μεταμόρφωση μεταβάλλοντας την επεξεργασία του RNA. Συχνά οι μεταλλάξεις αφορούν δακτυλιοειδείς σιδηροβλάστες, μια κλασική μορφή δυσπλασίας.
- Μεταγραφικοί παράγοντες: εντοπίζονται μεταλλάξεις σε μεταγραφικούς παράγοντες υπεύθυνους για τη φυσιολογική μυελοποίηση και μπορεί να σχετίζονται με τη διαταραχή της διαφοροποίησης που αφορά το μυελοδυσπλαστικό σύνδρομο.
- Μεταλλάξεις απώλειας της γονιδιακής λειτουργίας στο ογκοκατασταλτικό γονίδιο TP53 είναι υπεύθυνες για το 10% των περιπτώσεων μυελοδυσπλαστικού συνδρόμου, με την παρουσία ενός σύνθετου καρυότυπου και εξαιρετικά δύσκολη κλινική έκβαση.

Η συχνότητα του μυελοδυσπλαστικού συνδρόμου είναι παρόμοια με τη συχνότητα της μυελογενούς λευχαιμίας. Προσβάλλει άτομα ηλικίας 50-70 ετών και λόγω των κυτταροπενιών, πολλοί ασθενείς αντιμετωπίζουν λοιμώξεις, συμπτώματα σχετιζόμενα με την αναιμία και αιμορραγίες. Οι ασθενείς δεν ανταποκρίνονται επαρκώς στη χημειοθεραπεία, γεγονός που επιβεβαιώνει ότι η μυελοδυσπλασία αναπτύσσεται σε ένα υπόστρωμα ανεπάρκειας των

αρχέγονων κυττάρων, ενώ ένα ποσοστό 10-40% των ασθενών αντιμετωπίζουν και εκτροπή σε οξεία μυελογενή λευχαιμία. Ο προσδοκώμενος χρόνος ζωής των ασθενών είναι 9-29 μήνες. [Robbins. (2020). *ΒΑΣΙΚΗ ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΗ ΑΝΑΤΟΜΙΚΗ* (Μελαχροινού Μαρία, Ζολώτα Βασιλική, Κουρέα Ελένη, & Τζελέπη Βασιλική, Eds.; 10η). ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΕΣ ΕΚΔΟΣΕΙΣ ΠΑΡΙΣΙΑΝΟΥ Α.Ε.]



*Εικόνα 3: Βιοψία μυελού των οστών με μυελοδυσπλαστικό σύνδρομο. [Ιωάννου Μαρία. (2023). ΟΔΗΓΟΣ ΜΕΛΕΤΗΣ ΙΣΤΟΛΟΓΙΑΣ. Εκδόσεις Νέον]*

### Ο ΡΟΛΟΣ ΤΟΥ GABA ΣΤΟ ΜΥΕΛΟ ΤΩΝ ΟΣΤΩΝ

Το GABA (Gamma Amino-Butyric Acid) είναι ο κύριος ανασταλτικός νευροδιαβιβαστής του ΚΝΣ, καθώς μειώνει την νευρωνική διεγερσιμότητα αναστέλλοντας τη μετάδοση των νευρών. Σχηματίζεται από την προσθήκη γλουταμινικής αποκαρβοξυλάσης και βιταμίνης B6 σε γλουταμινικό οξύ. Μόλις το GABA σχηματιστεί απελευθερώνεται στις απολήξεις των μετασυναπτικών νευρών, οι οποίες φέρουν τους υποδοχείς GABA. Το GABAεργικό σύστημα εντοπίζεται νωρίς στην ανάπτυξη και έχει ρόλο αναπτυξιακού σήματος για τους νευρώνες κατά την ανάπτυξη του νευρικού συστήματος ή ρόλο προαγωγέα της νευρωνικής διαφοροποίησης των ενήλικων προγονικών κυττάρων. [Mary J. Allen; Sarah Sabir; Sandeep Sharma. (2023). *GABA Receptor*, Manuela Marcolia, (2008). *In vitro modulation of gamma amino butyric acid (GABA) receptor expression by bone marrow stromal cells*]

Είναι ενδιαφέρον, πώς τα στρωματικά κύτταρα του μυελού των οστών είναι δυνατόν να μετατραπούν σε κύτταρα που θυμίζουν νευρικά, μετά από έκθεση σε επαγωγικό μέσο, φέροντας κατάλληλους υποδοχείς συζευγμένους με μηχανισμούς μεταγωγής και οι οποίοι δυνητικά ανταποκρίνονται στον νευροδιαβιβαστή. [Mary J. Allen; Sarah Sabir; Sandeep Sharma. (2023). *GABA Receptor*, Manuela Marcolia, (2008). *In vitro modulation of gamma amino butyric acid (GABA) receptor expression by bone marrow stromal cells*]

Επιπλέον, ο υποδοχέας GABA έχει λειτουργικό ρόλο στην ομοίωση των αιμοποιητικών προγονικών κυττάρων. Στην προσπάθεια ερευνητών να αποκαλυφθεί εάν το GABA ανιχνεύεται στο μυελό των οστών και να προσδιοριστεί η κυτταρική πηγή του, αποδείχθηκε ότι το GABA εντοπίζεται στο μυελό των οστών, με υψηλά επίπεδα στο ενδόστέο του μηριαίου οστού. Βρέθηκε επίσης ότι τα ώριμα B-κύτταρα εκκρίνουν GABA, το οποίο δρα στα λεμφοειδή προγονικά κύτταρα του μυελού των οστών και δημιουργούν ένα βρόχο ανατροφοδότησης σηματοδότησης. [Mary J. Allen; Sarah Sabir; Sandeep Sharma. (2023). *GABA Receptor*, Manuela Marcolia, (2008). *In vitro modulation of gamma amino butyric acid (GABA) receptor expression by bone marrow stromal cells*, Antonio Morales - Hernandez, Shannon McKinney - Freeman. (2021). *GABA gets blood on its hands*]. Περαιτέρω μελέτες έδειξαν ότι η αναστολή του GABRR1 με ένα μοντέλο ποντικού knockout, διαγραφή με τη μεσολάβηση CRISPR ή θεραπεία με ανταγωνιστή GABA ανέστειλε τη διαφοροποίηση των μεγακαρυοκυττάρων και των αιμοπεταλίων, ενώ η ενεργοποίηση του GABRR1 μέσω υπερέκφρασης με τη μεσολάβηση lentivirus ή θεραπεία με αγωνιστή GABA προώθησε τη δημιουργία αιμοπεταλίων.

Έχει βρεθεί, ακόμη, ότι ο υποδοχέας GABA GABRR1 εκφράζεται και λειτουργεί σε αιμοποιητικά βλαστικά κύτταρα και προγονικά κύτταρα μεγακαρυοκυττάρων. Η αναστολή του GABRR1 ανέστειλε τη διαφοροποίηση των μεγακαρυοκυττάρων και των αιμοπεταλίων, ενώ η ενεργοποίηση του GABRR1 προώθησε τη δημιουργία αιμοπεταλίων. [Fangfang Zhu et al. (2019). *The GABA receptor GABRR1 is expressed on and functional in hematopoietic stem cells and megakaryocyte progenitors*]. Έχει αναφερθεί επίσης, από δεδομένα RNA-Seq που ελήφθησαν από CD34<sup>+</sup> κύτταρα μυελού των οστών με μυελοδυσπλαστικό σύνδρομο και φυσιολογικού μυελού των οστών, ότι το γονίδιο της υπομονάδας-1 του υποδοχέα GABAB GABBR1 ήταν το μόνο που υπερεκφράστηκε σημαντικά στα CD34<sup>+</sup> κύτταρα μυελού των οστών ασθενών με μυελοδυσπλαστικό σύνδρομο σε σύγκριση με τους υγιείς δότες ελέγχου. Ο υποδοχέας GABAB έχει ρυθμιστικό ρόλο στην αιμοποίηση και η ενεργοποίησή της σηματοδότησής επηρεάζει αρνητικά την αιμοποιητική δραστηριότητα των προγονικών και βλαστικών αιμοποιητικών κυττάρων του μυελού των οστών, και ιδίως τη λειτουργία της

ερυθροποίησης. Η αναστολή της σηματοδότησης του υποδοχέα GABAB έχει τη δυνατότητα να βελτιώσει την ερυθροποίηση στο μυελοδυσπλαστικό σύνδρομο. [Faezeh Darbaniyan et al. (2022). Transcriptomic Signatures of Hypomethylating Agent Failure in Myelodysplastic Syndromes and Chronic Myelomonocytic Leukemia].

## ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΑ

Τα μικροσκόπια είναι όργανα, τα οποία χάρη στην ικανότητά τους να μεγεθύνουν τα προς ανάλυση αντικείμενα, χρησιμοποιούνται για την παρατήρηση μικροσκοπικών λεπτομερειών που δεν μπορούν να παρατηρηθούν με γυμνό μάτι. Υπάρχουν πλέον διάφορων ειδών μικροσκόπια, τα οποία φέρουν διαφορετικά χαρακτηριστικά και ιδιότητες. Οι μέθοδοι με τις οποίες τα μικροσκόπια μεγεθύνουν ένα δείγμα περιλαμβάνουν την εκπομπή μιας δέσμης φωτός ή ηλεκτρονίων στην οπτική διαδρομή του προς εξέταση αντικειμένου, την λήψη των φωτονίων που εκπέμπει το δείγμα και την σάρωση επιφανειών του αντικειμένου με τη χρήση καθετήρα. Ο πρώτος τύπος μικροσκοπίου ήταν το οπτικό μικροσκόπιο. Ο τρόπος λειτουργίας του είναι ο εξής: φως από μία πηγή αντανακλά σε έναν αντικειμενικό φακό και έπειτα στον συγκεντρωτικό φακό, και στη συνέχεια διαπερνά από μία λεπτή τομή του δείγματος παράγοντας έτσι τη μεγεθυμένη εικόνα, η οποία δεσμεύεται από τον προσοφθάλμιο φακό και απεικονίζεται στο μάτι. Τα οπτικά μικροσκόπια έχουν μέγιστη μεγέθυνση μέχρι 2000X. Άλλα είδη μικροσκοπίων είναι τα μικροσκόπια φθορισμού, τα μικροσκόπια με καθετήρα σάρωσης (SPM), τα οπτικά μικροσκόπια υψηλής ανάλυσης (super resolution), τα μικροσκόπια με ακτίνες X, τα μικροσκόπια με επιταχυνόμενα ηλεκτρόνια (TEM, SEM), τα ακουστικά μικροσκόπια και τα ηλεκτρονικά μικροσκόπια. [Νασέμπ Κωνσταντίνος. (2022). *Μελέτη Ψηφιακού μικροσκοπίου και παρουσίαση μεταφοράς δεδομένων με χρήση του λογισμικού DinoCapture*]

## ΦΘΟΡΙΣΜΟΣ

Φθορισμός λέγεται το φαινόμενο κατά το οποίο άτομα ή μόρια που βρίσκονται σε μια ενεργειακή κατάσταση διεγείρονται από ακτινοβολία κατάλληλου μήκους κύματος και τα ηλεκτρόνιά τους μετακινούνται προς υψηλότερη ενεργειακή στιβάδα. Όταν έπειτα αυτά τα ηλεκτρόνια επαναφερθούν στην βασική τους στιβάδα εκπέμπεται ακτινοβολία φθορισμού μεγαλύτερου μήκους κύματος και μικρότερης ενέργειας. Η μικροσκοπία φθορισμού βρίσκει εφαρμογή στον εντοπισμό μακρομορίων στο κύτταρο, στην παρατήρηση κυτταρικών δομών και στη μελέτη κυτταρικών λειτουργιών.

Ανοσοφθορισμός είναι η ανοσοϊστοχημική μέθοδος με την οποία γίνεται οπτικοποίηση της αντίδρασης μεταξύ ενός αντισώματος με το αντιγόνο – στόχο στους ιστούς ή στα κύτταρα που εξετάζουμε. Προκειμένου να συμβεί η οπτικοποίηση χρησιμοποιούνται επισημασμένα με φθορίζουσα χρωστική αντισώματα. Εάν επισημανθεί με φθορίζουσα χρωστική το 1<sup>ο</sup> αντίσωμα, η οπτικοποίηση είναι άμεση, καθώς ανιχνεύονται γνωστά αντιγόνα, ενώ εάν επισημανθεί με φθορίζουσα χρωστική το 2<sup>ο</sup> αντίσωμα, η οπτικοποίηση είναι έμμεση, καθώς ανιχνεύονται τα πρώτα αντισώματα. [Τρισόκκα Τσικκίνη Παναγιώτα. (2022). *Αμφιβληστροειδική Βλάβη Ισχαιμίας/Επαναιμάτωσης Ανίχνευση πρώιμων βιοδεικτών για την αξιολόγηση φαρμακολογικών στόχων σε ex vivo μοντέλο επίμωος*]

### ΣΥΝΕΣΤΙΑΚΗ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΑ

Η συνεστιακή μικροσκοπία χρησιμοποιεί την οπτική απεικόνιση για να παρέχει τη δυνατότητα δημιουργίας ενός εικονικού επιπέδου περίπου 150 μικρομέτρων βάθος μέσα στον ιστό με υψηλή ευκρίνεια και αντίθεση. Είναι χρήσιμο εργαλείο στην κατασκευή τρισδιάστατων εικόνων, μπορεί να συλλέγει τμηματικές οπτικές τομές από δείγματα μεγάλου πάχους, και ακόμη παρέχει τη δυνατότητα της in vivo απεικόνισης. Η συνεστιακή μικροσκοπία βασίζεται στον σημειακό φωτισμό μέσω μιας χωρικής οπής, ώστε να ελαχιστοποιήσει τα σήματα εκτός εστίασης. Μπορεί να χρησιμοποιηθεί είτε ανακλώμενο, είτε φθορίζον φως για την απεικόνιση του δείγματος. Στη συνεστιακή μικροσκοπία ανάκλασης η απεικόνιση στηρίζεται στις φυσικές διαφορές που παρουσιάζουν οι δείκτες διάθλασης των υποκυτταρικών δομών των ιστών, ενώ στη συνεστιακή μικροσκοπία φθορισμού η απεικόνιση στηρίζεται στη χρήση φθορίζουσών χρωστικών, οι οποίες αυξάνουν την αντίθεση επιθηλίου – στρώματος.

Ο αντικειμενικός φακός ο οποίος χρησιμοποιείται για να εστιάσει, είναι ο ίδιος ο οποίος συλλέγει το ανακλώμενο ή φθορίζον φως που επιστρέφει από τον ιστό. Το φως αυτό προβάλλεται και δεν οπτικοποιείται απευθείας. Το συνεστιακό μικροσκόπιο αποτελείται από μικροσκόπιο φθορισμού, πολλαπλές πηγές φωτός laser, την κεφαλή σάρωσης και ηλεκτρονικό υπολογιστή. Συναντάμε τη συνεστιακή μικροσκοπία σάρωσης με λέιζερ (Laser Scanning Confocal Microscopy) και τη συνεστιακή ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης (Scanning Confocal Electron Microscopy), με την οποία μπορούν επίσης να απεικονιστούν τρισδιάστατες εικόνες μη ζωντανών δειγμάτων. Η συνεστιακή ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης βασίζεται σε μια δέσμη ηλεκτρονίων η οποία λειτουργεί ως πηγή φωτός, δίνοντας έτσι μεγαλύτερη ανάλυση από ότι η συνεστιακή μικροσκοπία σάρωσης με λέιζερ.

Σημαντικά πλεονεκτήματα της συνεστιακής μικροσκοπίας αποτελούν επίσης το γεγονός ότι ελαχιστοποιείται η βλάβη του δείγματος αλλά και η δυνατότητα ελέγχου για

συνεντόπιση μορίων. Η συνεστιακή μικροσκοπία μειονεκτεί στο κόστος σε σύγκριση με τα συμβατικά μικροσκόπια. Ακόμη, προβλήματα όπως αυτό της φωτοέκπλυσης φθορισμού και της φωτοτοξικότητας είναι παρόντα τόσο στη μικροσκοπία φθορισμού, όσο και στη συνεστιακή μικροσκοπία.

Η ένταξη της συνεστιακής μικροσκοπίας στα εργαλεία της παθολογικής ανατομικής είναι ιδιαίτερα σημαντική. Αν και δεν είναι δυνατόν να αντικαταστήσει την κλασσική μικροσκοπική εξέταση στην ιστοπαθολογική διάγνωση, εντούτοις θα μπορούσε να αξιοποιηθεί συμπληρωματικά, για την αξιολόγηση ειδικών χαρακτηριστικών των οργάνων, όπως της ίνωσης, της διηθητικής ανάπτυξης νεοπλάσματος στους γύρω ιστούς κλπ, ιδιαίτερα σε τριδιάστατες απεικονίσεις. Επιπλέον, αποτελεί καινοτόμο μεθοδολογία για τη μορφολογική απεικόνιση ιστών και οργάνων και υπό αυτή την έννοια αποτελεί εξαιρετικό εργαλείο τόσο για διδακτικούς, όσο και ερευνητικούς σκοπούς. In vivo παραδείγματα εφαρμογής της συνεστιακής μικροσκοπίας αποτελούν η εφαρμογή στην οφθαλμολογία για την παρατήρηση του αμφιβληστροειδούς και του κερατοειδούς, στην δερματολογία για τη διάκριση νεοπλασματικών και φλεγμονωδών δερματικών παθήσεων, αλλά και η χρήση σε σωματικές κοιλότητες που είναι προσβάσιμες μέσω συνεστιακών ενδομικροσκοπίων λέιζερ. Ex vivo η συνεστιακή μικροσκοπία έχει χρησιμοποιηθεί κυρίως σε νεοπλασματικά δερματολογικά δείγματα, ενώ σε άλλους ιστούς η χρήση της ήταν περιορισμένη. Το κώλυμα στην απεικόνιση του μυελού των οστών, σύμφωνα με τις προηγούμενες μελέτες, ήταν η μεγάλη δυσκολία στο να κοπούν οι γύρω οστικές δομές και να απεικονισθεί εσωτερικά σε αυτές ο μυελός των οστών. [Nwaneshiudu, A., Kuschal, C., Sakamoto, F. H., Rox Anderson, R., Schwarzenberger, K., & Young, R. C. (2012). Introduction to confocal microscopy. *Journal of Investigative Dermatology*, 132(12). <https://doi.org/10.1038/jid.2012.429>]

### ΤΡΟΠΟΣ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑΣ ΣΥΝΕΣΤΙΑΚΟΥ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΟΥ

Ο τρόπος με τον οποίο γίνεται η απεικόνιση του δείγματος στη συνεστιακή μικροσκοπία είναι ο εξής: μία δέσμη διερχόμενου φωτός εστιάζεται σε ένα σημείο στο εσωτερικό του ιστού μέσω του αντικειμενικού φακού του μικροσκοπίου. Η διάμετρος της δέσμης φωτός είναι περίπου στα 0,5μm. Το ανακλώμενο ή φθορίζον φως που επιστρέφει από τον ιστό συλλέγεται από τον ίδιο αντικειμενικό φακό, και προβάλλεται, σε αντίθεση με τη συμβατική μικροσκοπία στην οποία απεικονίζεται απευθείας ο ιστός. Μόνο το φως που εκπέμπεται από το επιθυμητό εστιακό σημείο είναι δυνατόν να περάσει μέσα από μία μικρή, ώστε να αποφευχθεί η επισκίαση της εικόνας λόγω του ανακλώμενου ή φθορίζοντος φωτός που σκεδάζεται. Η οπή (pinhole) είναι τοποθετημένη σε συζυγές εστιακό επίπεδο με το δείγμα,

και έτσι προκύπτει και η ονομασία συνεστιακό μικροσκόπιο. Στην άλλη πλευρά της οπής είναι τοποθετημένος ένας ευαίσθητος ανιχνευτής φωτός, επιτρέποντας έτσι την απεικόνιση του δείγματος σε ένα σημείο κάθε φορά. Το σημείο αυτό σαρώνεται γρήγορα και διαδοχικά στο επίπεδο X-Y παράγοντας εικόνες εικονικών τομών σε δισδιάστατο επίπεδο. Καθώς επαναλαμβάνεται αυτή η διαδικασία της σάρωσης, αποθηκεύονται στον υπολογιστή οι διαδοχικές σημειακές εικόνες του δείγματος και είναι δυνατόν να απεικονιστεί μια στοίβα εικόνων, επιτρέποντας έτσι την απεικόνιση του δείγματος σε τρισδιάστατο επίπεδο. Οι υψηλής ευκρίνειας και αντίθεσης εικόνες προβάλλονται σε μια οθόνη. [Nwaneshiudu, A., Kuschal, C., Sakamoto, F. H., Rox Anderson, R., Schwarzenberger, K., & Young, R. C. (2012). Introduction to confocal microscopy. *Journal of Investigative Dermatology*, 132(12). <https://doi.org/10.1038/jid.2012.429>]



## **ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ**

Η μελέτη της οστεομυελικής βιοψίας έχει κομβική σημασία στη διάγνωση και σε μεγάλο βαθμό στον καθορισμό της πρόγνωσης σε ασθενείς με αιματολογικά νοσήματα. Η παθολογοανατομική διάγνωση των νοσημάτων αυτών προϋποθέτει την ιστολογική μελέτη της αιμοποίησης και την διάκριση των διαταραχών αυτής στο οπτικό μικροσκόπιο.

Η ανοσοϊστοχημεία είναι η μέθοδος με την οποία μπορεί να ταυτοποιηθούν οι αιμοποιητικές σειρές και να αναγνωριστούν παθολογικά κύτταρα στην οστεομυελική βιοψία. Επίσης με την ανοσοϊστοχημική μελέτη, είναι δυνατή η εκτίμηση της παρουσίας και του ποσοστού των προγονικών κυττάρων στο μυελό των οστών και ο προσδιορισμός ορισμένων δεικτών που σχετίζονται με την πρόγνωση των αιματολογικών νοσημάτων.

Η συνεστιακή μικροσκοπία παρέχει τη δυνατότητα μελέτης των ιστών σε βάθος με την συλλογή εικόνων από πολλαπλά επίπεδα. Επίσης μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την τρισδιάστατη απεικόνιση ιστών και εικόνων. Τα πλεονεκτήματα της μεθόδου, σε συνδυασμό με τη δυνατότητα ανοσοϊστοχημικών χρώσεων, προσφέρουν μια σημαντική μέθοδο μορφολογικής ανάλυσης με διαγνωστικές και ερευνητικές εφαρμογές.

Στα πλαίσια αυτά, σκοπός της παρούσας πτυχιακής εργασίας ήταν να διερευνηθεί η δυνατότητα εφαρμογής της συνεστιακής μικροσκοπίας στην ιστοπαθολογία του μυελού των οστών.

## ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Η παρούσα πτυχιακή εργασία πραγματοποιήθηκε σε αρχειακό υλικό του εργαστηρίου Παθολογικής Ανατομικής της Ιατρικής σχολής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας. Μελετήθηκαν ιστολογικές τομές από οστεομυελικές βιοψίες τριών ασθενών. Ο πρώτος μυελός προήλθε από ασθενή με εμπύρετο, ο οποίος δεν παρουσίαζε σημαντικές ιστολογικές αλλοιώσεις. Η δεύτερη οστεομυελική βιοψία διενεργήθηκε για τη διάγνωση ασθενούς με μυελοϊνωση, και η τρίτη για τη διάγνωση ασθενούς με μυελοδυσπλαστικό σύνδρομο. Οι δύο πρώτοι ασθενείς ήταν άρρενες 60 και 65 ετών και η τρίτη ασθενής ήταν θήλυ 72 ετών.

Όλοι οι ιστοί είχαν μονιμοποιηθεί σε υδατικό διάλυμα φορμαλδεΰδης και είχαν εμπεδωθεί σε παραφίνη. Αρχικά μελετήθηκε χρώση αιματοξυλίνης – ηωσίνης και κλασσικές ανοσοϊστοχημικές χρώσεις για την αναγνώριση των αιμοποιητικών σειρών και των διαταραχών τους. Στη συνέχεια δημιουργήθηκαν ιστολογικές τομές 4μ για τη χρώση με GABA και τη μελέτη σε συνεστιακό μικροσκόπιο.

## ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ – ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

### ΑΠΟΠΑΡΑΦΙΝΩΣΗ ΚΑΙ ΕΝΥΔΑΤΩΣΗ ΤΟΜΩΝ

Οι ιστολογικές τομές παραφίνης από βιοψίες μυελού των οστών πάχους 4μm, υπεβλήθησαν σε αποπαραφίνωση και ενυδάτωση σύμφωνα με τα κάτωθι:

Αρχικά, οι αντικειμενοφόρες πλάκες με τις τομές τοποθετήθηκαν στους 60 °C για 30 λεπτά, έτσι ώστε να λιώσει η παραφίνη. Στη συνέχεια εμβαπτίστηκαν στα εξής διαλύματα για καθορισμένο χρόνο:

- 1<sup>η</sup> ξυλόλη για 10 λεπτά (αποπαραφίνωση)
- 2<sup>η</sup> ξυλόλη για 10 λεπτά (αποπαραφίνωση)
- Αλκοόλη 100% για 5 λεπτά (ενυδάτωση)
- Πλύση με απεσταγμένο νερό
- 10 εμβαπτίσεις σε αλκοόλη 100%
- 10 εμβαπτίσεις σε αλκοόλη 96%
- 10 εμβαπτίσεις σε αλκοόλη 96%
- Πλύση με απεσταγμένο νερό

- Διατήρηση σε 0.1 M PBS  
[Μαρίνος Ευάγγελος, *Ανοσοϊστοχημεία σε τομές παραφίνης*]

## ΑΝΟΣΟΪΣΤΟΧΗΜΕΙΑ

Για την παρασκευή όλων των διαλυμάτων χρησιμοποιήθηκε ddH<sub>2</sub>O και όλα τα αντιδραστήρια ήταν της εταιρίας SIGMA.

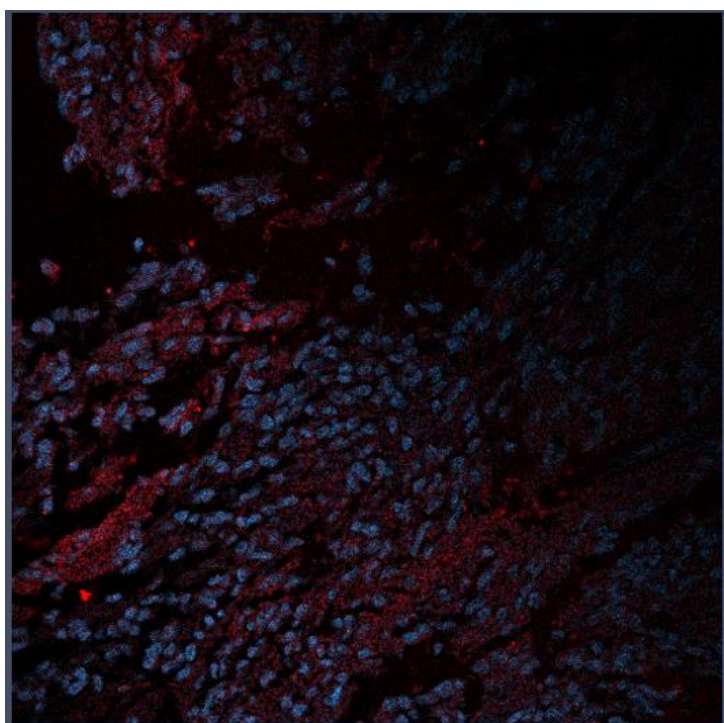
Αρχικά παραλήφθηκαν οι αντικειμενοφόρες πλάκες (οστεομυελικές τομές και τομές όγκου εγκεφάλου) εφόσον είχαν υποστεί τις διαδικασίες της αποπαραφίνωσης και ενυδάτωσης. Οριοθετήθηκαν οι ιστοί στις αντικειμενοφόρες πλάκες και τοποθετήθηκαν σε μαύρο κουτί. Έγιναν 2 πλύσεις 10 λεπτών με ρυθμιστικό διάλυμα 0.1 M PBS (Phosphate Buffered Saline, 137mM, 2,7 mM KCl, 10mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,8mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,2-7,4) και ακολούθησε επώαση των τομών με το διάλυμα του πρώτου αντισώματος (Antibody buffer) για 16-18 ώρες, στο coldroom σε μαύρο κουτί, το οποίο περιείχε νερό για να μην αφυδατωθούν οι τομές. Το Ab buffer περιέχει το πρωτογενές αντίσωμα σε συγκέντρωση 1/500 (mouse anti-GABA antibody → βάφει νευρώνες), φυσιολογικό ορό γαϊδουριού 3% (Normal Donkey Serum, NDS) από το ζώο προέλευσης των δευτέρων αντισωμάτων, απορρυπαντικό Triton-X 0.5% v/v, 0.025% w/v NaN<sub>3</sub> σε PBS (αζίδιο) διαλυμένα σε 0.1 M PBS.

Έπειτα από την επώαση, συλλέχθηκαν με πιπέτα τα αντισώματα από τις αντικειμενοφόρες πλάκες και αποθηκεύτηκαν. Έγιναν 3 πλύσεις 45 λεπτών με ρυθμιστικό διάλυμα 0.1 M PBS και ακολούθησε επώαση των τομών με το δεύτερο αντίσωμα (Donkey anti-Mouse), σε συγκέντρωση επίσης 1/500, μέχρι την επόμενη ημέρα. Από τη στιγμή που τοποθετήθηκε το δεύτερο αντίσωμα, όλοι οι χειρισμοί πραγματοποιήθηκαν στο σκοτάδι, επειδή είναι φωτοευαίσθητο.

Μετά την επώαση με το φθορίζον δεύτερο αντίσωμα, αυτό συλλέχθηκε και τοποθετήθηκε στο ψυγείο, ενώ στις αντικειμενοφόρες πλάκες πραγματοποιήθηκαν 3 πλύσεις 45 λεπτών με ρυθμιστικό διάλυμα 0.1 M PBS. Ακολούθησε η παρασκευή 40μM DAPI (4',6-διαμιδινο- 2-φαινυλινδόλη) σύμφωνα με το πρωτόκολλο και τέλος τοποθετήθηκε DAPI στις τομές για τη σήμανση των πυρήνων, και προστέθηκαν καλυπτρίδες στις αντικειμενοφόρες πλάκες. Οι καλυπτρίδες σφραγίστηκαν και οι αντικειμενοφόρες πλάκες διατηρήθηκαν στους 4°C μέχρι να παρατηρηθούν στο μικροσκόπιο. [Τρισόκκα Τσικκίνη Παναγιώτα.

(2022). *Αμφιβληστροειδική Βλάβη Ισχαιμίας/Επαναιμάτωσης Ανίχνευση πρόιμων βιοδεικτών για την αξιολόγηση φαρμακολογικών στόχων σε ex vivo μοντέλο επίμυος*]

Ως θετικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε τομή από βιοψία εγκεφαλικού παρεγχύματος [Εικόνα 1] και ως αρνητικός μάρτυρας ιστολογική τομή η οποία υπεβλήθη στην ανοσοϊστοχημεία με παράλειψη πρωτογενούς αντισώματος.



*Εικόνα 4: Τομή από βιοψία εγκεφαλικού παρεγχύματος*

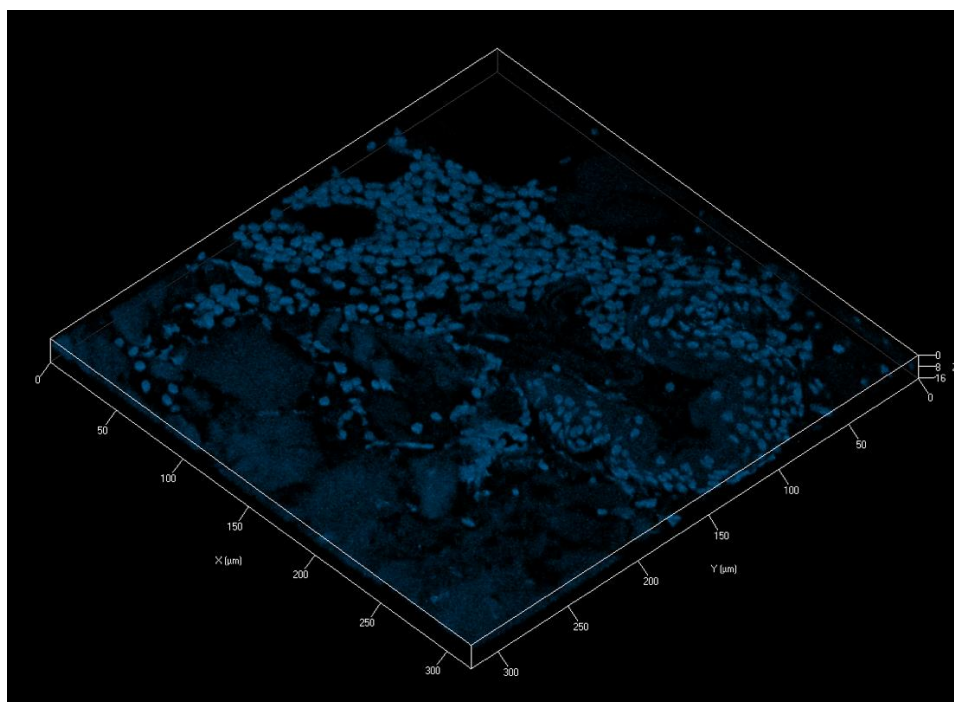
### ΣΥΝΕΣΤΙΑΚΗ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΑ

Οι ιστοί παρατηρήθηκαν σε συνεστιακό μικροσκόπιο φθορισμού Zeiss Axioskop 40 (Carl Zeiss Inc, Ney York, USA) το οποίο ήταν συνδεδεμένο με κάμερα Leica DFC 480 (Leica Cameras, Solms, Germany) με μεγέθυνση 20x και ελήφθησαν αντιπροσωπευτικές εικόνες. Από τα δεδομένα που ελήφθησαν δημιουργήθηκαν των τρισδιάστατες απεικονίσεις της δομής του μυελού των οστών. Έτσι έχουμε τη δυνατότητα παρατήρησης του ιστού σε διαφορετικά σημεία στον άξονα x-y-z αλλά και τη δυνατότητα τρισδιάστατης περιστροφής των εικόνων.

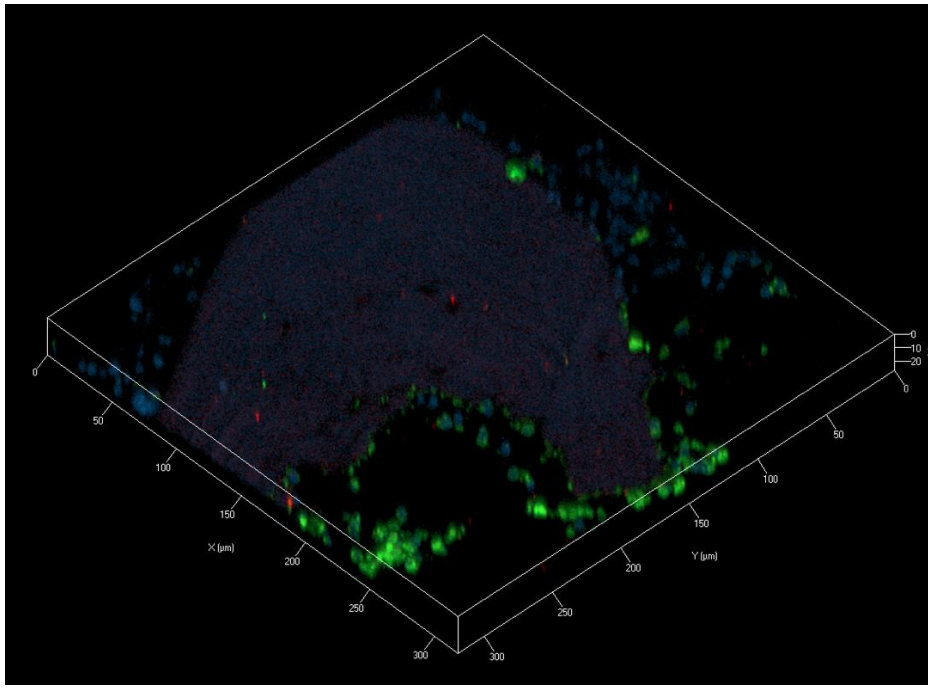
## ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

A. Η μεθοδολογία της συνεστιακής μικροσκοπίας εφαρμόστηκε σε ιστούς που είχαν εμπεδωθεί σε παραφίνη. Δεν παρατηρήθηκαν τεχνικές δυσχέρειες ή τεχνικοί περιορισμοί.

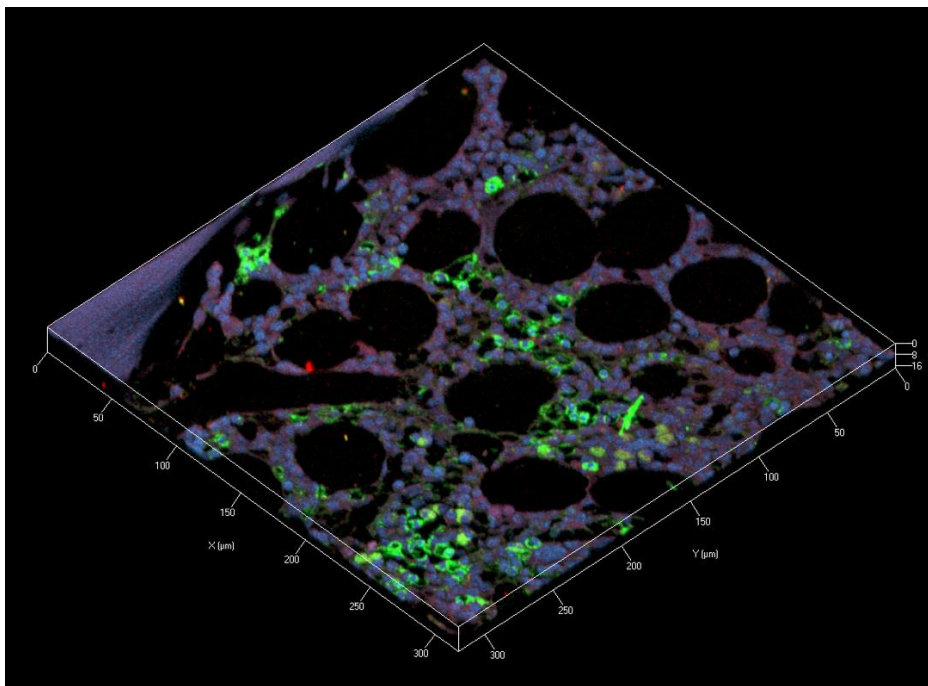
B. Δημιουργήθηκαν τρισδιάστατες εικόνες οι οποίες ανέδειξαν την μικροανατομία του μυελού και συγκεκριμένα τη σύνδεση της ενδοστικής επιφάνειας των οστεοδοκίδων με τον αιμοποιητικό μυελό.



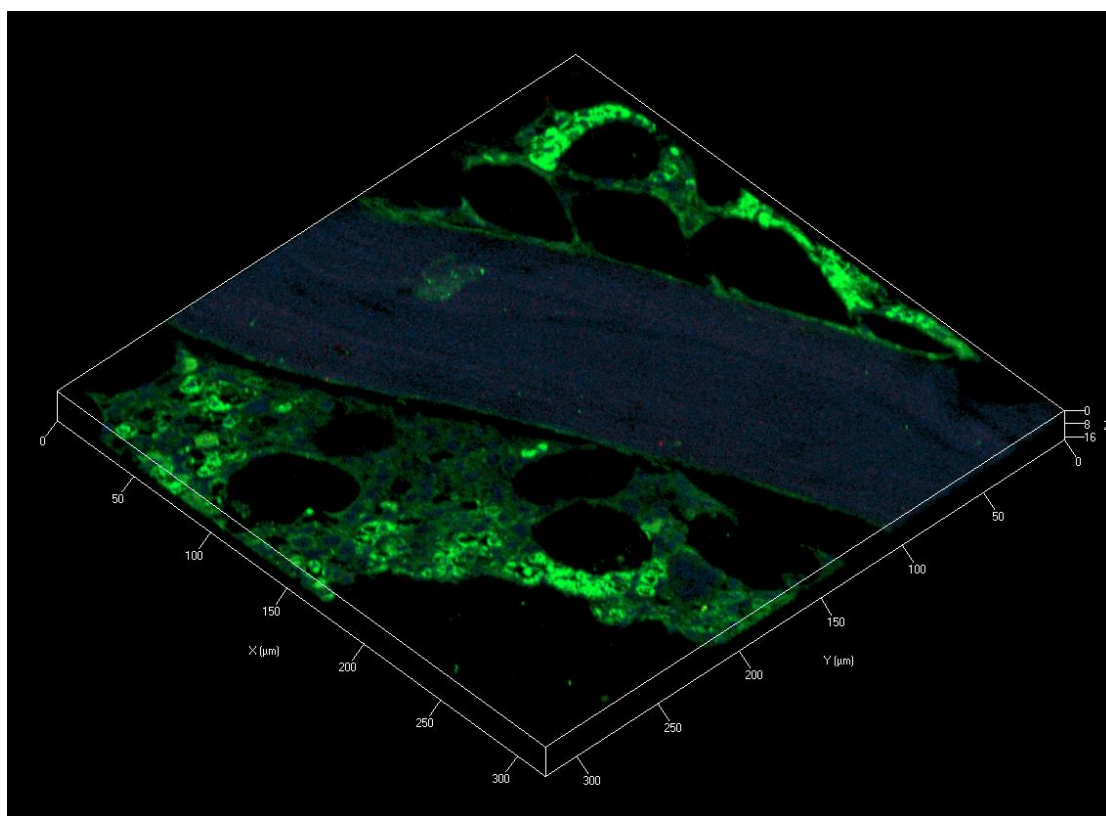
*Εικόνα 5: 3D απεικόνιση της οστεομυελικής βιοψίας του 1ου ασθενούς χωρίς αιματολογικό νόσημα*



*Εικόνα 6: 3D απεικόνιση της οστεομυελικής βιοψίας του 2ου ασθενούς με μυελοϊνώση. Αποτύπωση της οστεοδοκίδας και της έκφρασης GABA θετικών κυττάρων παραδοκιοδώς.*



*Εικόνα 7: 3D απεικόνιση της οστεομυελικής βιοψίας του 3ου ασθενούς με μυελοδυσπλαστικό σύνδρομο. Αποτύπωση της έκφρασης GABA θετικών κυττάρων παραδοκιοδώς.*

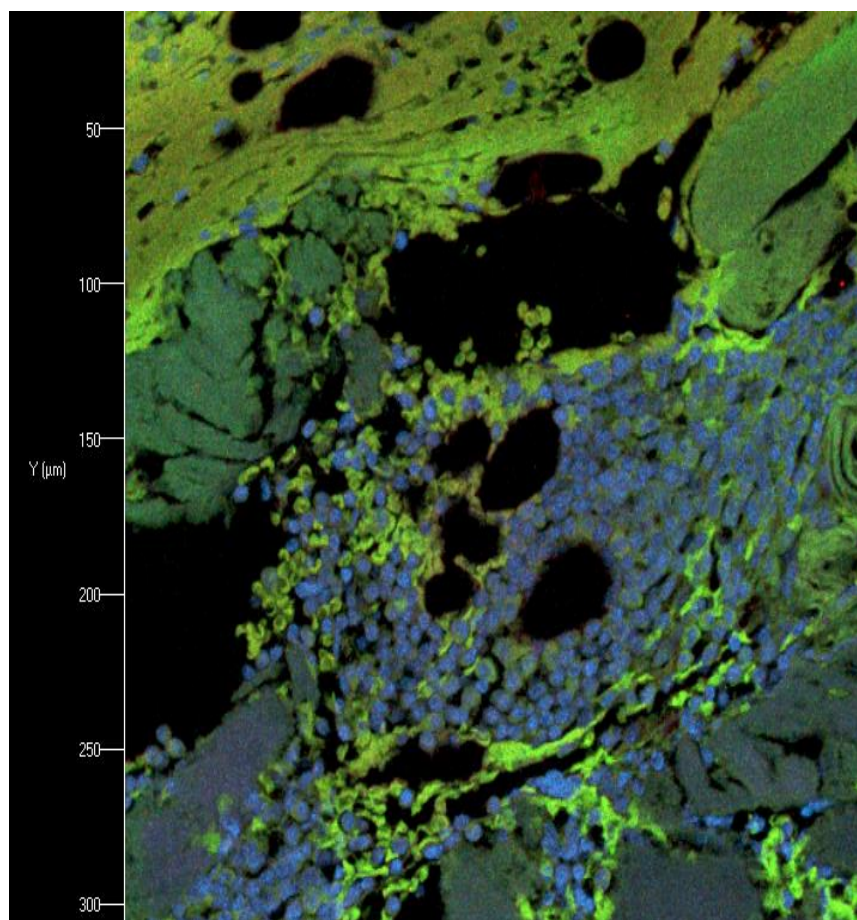


*Εικόνα 8: 3D απεικόνιση της οστεομυελικής βιοψίας του 3ου ασθενούς με μυελοδυσπλαστικό σύνδρομο. Αποτύπωση της έκφρασης GABA θετικών κυττάρων παραδοκιδωδώς.*



Γ. Η έκφραση του GABA παρουσιάζει ιδιαιτερότητες ανάλογα με το αιματολογικό νόσημα.

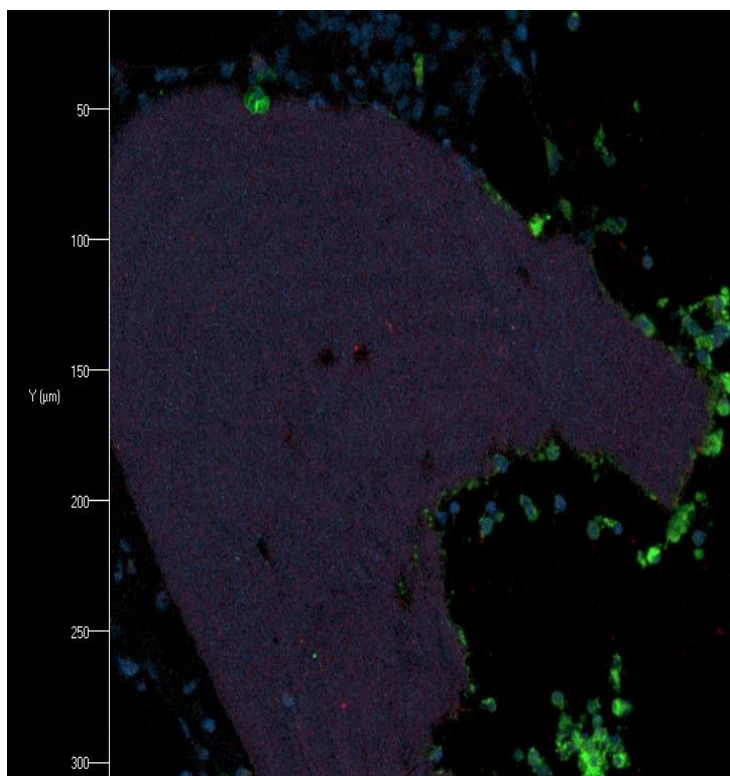
Συγκεκριμένα, στην οστεομυελική βιοψία του πρώτου ασθενούς, με ελάχιστες ιστολογικές αλλοιώσεις δυσαιμοποίησης δίχως νεοπλασματική διήθηση, η χρώση με GABA και η παρατήρηση στο συνεστιακό μικροσκόπιο, ανέδειξε ελάχιστα κύτταρα με ασθενή έκφραση GABA.



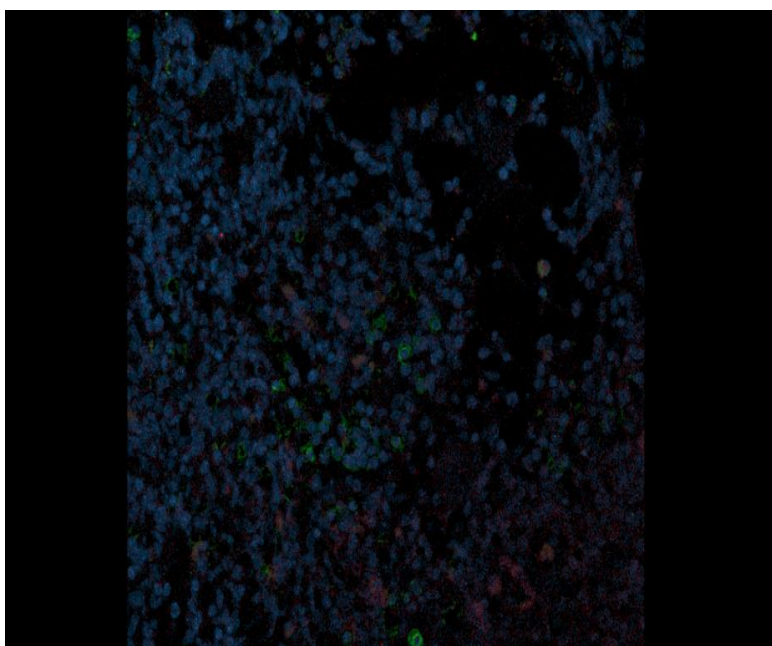
*Εικόνα 9: Οστεομυελική βιοψία 1ου ασθενούς χωρίς σημαντικές αλλοιώσεις. Αποτύπωση της έκφρασης GABA θετικών κυττάρων παραδοκιδιδώς και στο μέσο του μυελοχώρου.*



Στην οστεομυελική βιοψία του ασθενούς με μυελοϊνωση παρατηρήθηκε μικρός αριθμός κυττάρων με ασθενή έκφραση GABA, πλησίον οστεοδοκίδων.

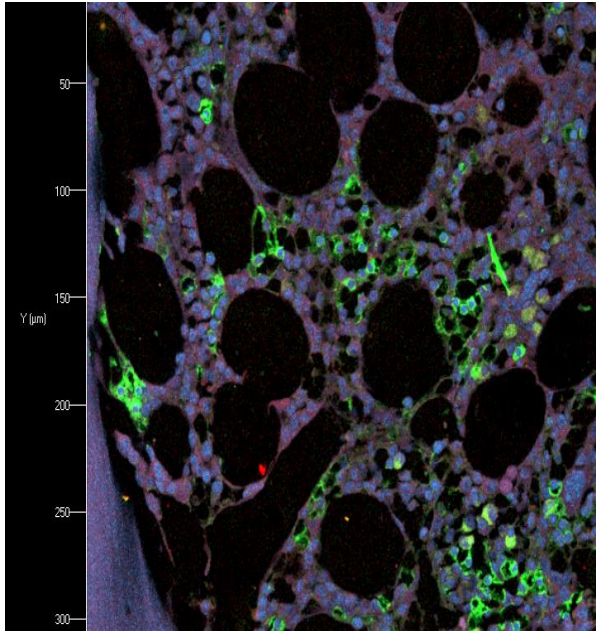


*Εικόνα 10: Οστεομυελική βιοψία του 2ου ασθενούς με μυελοϊνωση. Αποτύπωση της οστεοδοκίδας και της έκφρασης GABA θετικών κυττάρων παραδοκιδοδώς.*

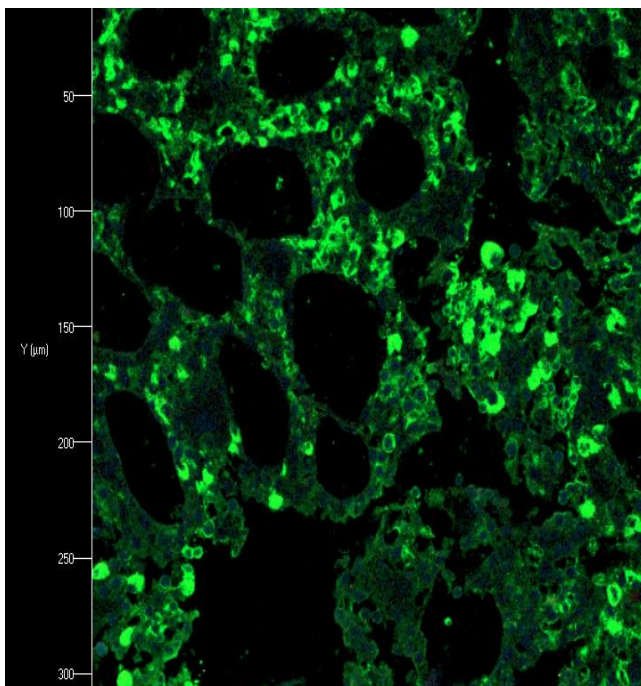


*Εικόνα 11: Οστεομυελική βιοψία του 2ου ασθενούς με μυελοϊνωση. Αποτύπωση της έκφρασης GABA θετικών κυττάρων στο μέσον του μυελοχώρου.*

Τέλος, στην οστεομυελική βιοψία από την ασθενή με μυελοδυσπλαστικό σύνδρομο, παρατηρήθηκε έντονη έκφραση GABA σε κύτταρα που εντοπίζονται στις θέσεις προγονικών κυττάρων, δηλαδή παραδοκιδοδώς, και στο μέσον των μυελοχώρων.



*Εικόνα 12: Οστεομυελική βιοψία του τρίτου ασθενούς με μυελοδυσπλαστικό σύνδρομο. Αποτύπωση της έκφρασης GABA θετικών κυττάρων παραδοκιδοδώς.*



*Εικόνα 13: Οστεομυελική βιοψία ασθενούς με μυελοδυσπλαστικό σύνδρομο. Αποτύπωση της έκφρασης GABA θετικών κυττάρων στο μέσον του μυελοχώρου.*

## ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στην παρούσα πτυχιακή εργασία εφαρμόστηκε η μέθοδος της ανοσοϊστοχημείας προκειμένου να σημανθούν με φθορισμό συγκεκριμένα κύτταρα του μυελού των οστών και στη συνέχεια ελήφθησαν εικόνες υψηλής ευκρίνειας από τα δείγματα, με τη χρήση του συνεστιακού μικροσκοπίου αποκαλύπτοντας ορισμένα ιδιότυπα και ενδιαφέροντα μορφολογικά χαρακτηριστικά του μυελού των οστών σε αιματολογικά νοσήματα, τα οποία θα αναλυθούν στη συνέχεια. Επίσης δημιουργήθηκαν τρισδιάστατες απεικονίσεις των τομών που αποτυπώνουν την επιφάνεια αλληλεπίδρασης οστού-αιμοποιητικού μυελού.

Ο μυελός των οστών, ο οποίος είναι κυρίως υπεύθυνος για την παραγωγή των κυττάρων του αίματος, είναι ανατομικά πολύπλοκος και αποτελείται από πολλούς διαφορετικούς τύπους κυττάρων, οργανωμένους σε ένα πλέγμα τριχοειδών-φλεβωδών κόλπων. [Junqueira. (2013). *Βασική Ιστολογία* (Λουίζα Ανδριοπούλου- Οικονόμου, Ed.; 6η ελληνική). Π.Χ. Πασχαλίδης]. Είναι, στην ουσία, ο χώρος ανάμεσα στις δοκίδες του σπογγώδους οστού, ο οποίος πληρούται από τον ερυθρό μυελό των οστών (αιμοποιητικός ιστός) και από τον κίτρινο ή ωχρό μυελό των οστών (μονόχωρος λιπώδης ιστός) και περιβάλλεται από την εξωκυττάρια μήτρα. Ο ερυθρός μυελός των οστών εντοπίζεται στις περισσότερες μυελικές κοιλότητες κατά τη νεογνική και παιδική ηλικία, ενώ στους ενήλικες εντοπίζεται στις μυελικές κοιλότητες στα πλατιά οστά και τους σπονδύλους. Ο ωχρός μυελός των οστών εντοπίζεται στις περισσότερες μυελικές κοιλότητες των ενηλίκων και έχει ρόλο στην ανάπτυξη και τον έλεγχο των ανοσολογικών αποκρίσεων και τη ρύθμιση του σκελετικού μεταβολισμού. [Ιωάννου Μαρία. (2023). *ΟΔΗΓΟΣ ΜΕΛΕΤΗΣ ΙΣΤΟΛΟΓΙΑΣ*. Εκδόσεις Νέον]

Οι λειτουργίες του μυελού των οστών εκτελούνται χάριν της εξειδικευμένης αλληλεπίδρασης όλων των κυτταρικών τύπων που περιλαμβάνει, μέσω ειδικών συστημάτων ρύθμισης και εξελιγμένων μοριακών μηχανισμών [Junqueira. (2013). *Βασική Ιστολογία* (Λουίζα Ανδριοπούλου- Οικονόμου, Ed.; 6η ελληνική). Π.Χ. Πασχαλίδης]. Η εξέταση των βιοψιών του μυελού των οστών αποτελεί τυπική μέθοδο για τη διάγνωση και τη σταδιοποίηση των νεοπλασματικών και άλλων αιματολογικών διαταραχών [Ιωάννου Μαρία. (2023). *ΟΔΗΓΟΣ ΜΕΛΕΤΗΣ ΙΣΤΟΛΟΓΙΑΣ*. Εκδόσεις Νέον]. Η ανοσοϊστοχημεία βρίσκει εφαρμογή στη διάγνωση λεμφωμάτων, οξείων λευχαιμιών, μυελοδυσπλαστικών και μυελοϋπερπλαστικών συνδρόμων. [Tomoiku Takaku et al. (2016). Hematopoiesis in 3 dimensions: human and murine bone marrow architecture visualized by confocal microscopy]

Η συνεστιακή μικροσκοπία παρέχει τη δυνατότητα απεικόνισης σε τρισδιάστατο επίπεδο των αλληλεπιδράσεων μεταξύ των διαφορετικών κυτταρικών τύπων δίνοντας πληροφορίες για τις λειτουργικές και ανατομικές τους σχέσεις. [Moiragazzi et al. (2014). Fluorescence confocal microscopy for pathologists].

Με τη χρήση της ανοσοϊστοχημείας προσδιορίζονται βιολογικά μόρια-πρωτεΐνες, σε βιολογικά παρασκευάσματα. Η μέθοδος στηρίζεται στη σύνδεση αντιγόνου – αντισώματος και στις μεθόδους οπτικής παρουσίασης του αντισώματος. Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε έμμεση μέθοδος ανοσοϊστοχημείας, με χρήση δύο ειδών αντισωμάτων. Το πρωτογενές αντίσωμα είναι ειδικό προς το αντιγόνο και προσδένεται σε αυτό, ενώ το δευτερογενές αντίσωμα είναι σημασμένο με φθορίζουσα ουσία και ειδικό προς το πρωτογενές, στο οποίο και προσδένεται. Η αντίδραση σύζευξης έχει ως αποτέλεσμα την ανάδειξη του πρωτογενούς αντισώματος με φθορίζον σήμα, το οποίο ανιχνεύεται ως μήκος κύματος στο συνεστιακό μικροσκόπιο. [ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΔΙΑ ΒΙΟΥ ΜΑΘΗΣΗΣ ΑΕΙ ΓΙΑ ΤΗΝ ΕΠΙΚΑΙΡΟΠΟΙΗΣΗ ΓΝΩΣΕΩΝ ΑΠΟΦΟΙΤΩΝ ΑΕΙ (ΠΕΓΑ): «Οι σύγχρονες τεχνικές βιο-ανάλυσης στην υγεία, τη γεωργία, το περιβάλλον και τη διατροφή», Ψαρρά Άννα – Μαρία]

Το πρωτογενές αντίσωμα που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα μελέτη ήταν το μονοκλωνικό mouse anti-GABA. Το GABA ανιχνεύεται φυσιολογικά στους νευρώνες. Συγκεκριμένα, μετά τον σχηματισμό του, το GABA απελευθερώνεται στις απολήξεις των μετασυναπτικών νευρών και προσδένεται στους υποδοχείς GABA. Ως ο κύριος ανασταλτικός διαβιβαστής, μειώνει την ικανότητα ενός νευρικού κυττάρου να λαμβάνει, να δημιουργεί ή να στέλνει χημικά μηνύματα σε άλλα νευρικά κύτταρα. [Ιωάννου Μαρία. (2023). ΟΔΗΓΟΣ ΜΕΛΕΤΗΣ ΙΣΤΟΛΟΓΙΑΣ. Εκδόσεις Nov]. Μελέτες παρουσιάζουν ενδείξεις συμμετοχής νευροδιαβιβαστών στη ρύθμιση της αιμοποίησης [James Goolsby, (2003). Hematopoietic progenitors express neural genes] και υποδεικνύουν έμμεσο ρόλο στην παθογένεση κάποιων αιματολογικών νοσημάτων [Faezeh Darbaniyan et al. (2022). Transcriptomic Signatures of Hypomethylating Agent Failure in Myelodysplastic Syndromes and Chronic Myelomonocytic Leukemia] ενδεχομένως μέσω διαφοροποίησης στρωματικών κυττάρων του μυελού των οστών. Συγκεκριμένα, η αναστολή του υποδοχέα GABA GABRR1 που εκφράζεται και λειτουργεί σε αιμοποιητικά βλαστικά κύτταρα και προγονικά κύτταρα μεγακαρυοκυττάρων ανέστειλε τη διαφοροποίηση των μεγακαρυοκυττάρων και των αιμοπεταλίων, ενώ η ενεργοποίησή του προώθησε τη δημιουργία αιμοπεταλίων. [Fangfang Zhu et al. (2019). The GABA receptor GABRR1 is expressed on and functional in hematopoietic stem cells and megakaryocyte progenitors]. Στο μυελοδυσπλαστικό σύνδρομο ο υποδοχέας GABAB GABBR1 φαίνεται να διαδραματίζει επίσης σημαντικό ρόλο στην αιμοποίηση και έχει δειχθεί

ότι η ενεργοποίηση της σηματοδότησής του επηρεάζει αρνητικά την αιμοποιητική δραστηριότητα των προγονικών και βλαστικών αιμοποιητικών κυττάρων του μυελού των οστών, και ιδίως τη λειτουργία της ερυθροποίησης. [Faezeh Darbaniyan et al. (2022). Transcriptomic Signatures of Hypomethylating Agent Failure in Myelodysplastic Syndromes and Chronic Myelomonocytic Leukemia]. Τα δεδομένα αυτά βρίσκουν εφαρμογή σε πειραματικές μελέτες πιθανής θεραπευτικής αντιμετώπισης ποικίλων νοσημάτων που βασίζονται στη δυνατότητα νευρικής διαφοροποίησης των μεσεγχυματικών βλαστοκυττάρων. [Luan Cao-Sy et al. (2018). *Prominence of nestin-expressing Schwann cells in bone marrow of patients with myelodysplastic syndromes with severe fibrosis*]. Είναι, όμως, σαφές πως οι μοριακοί μηχανισμοί για αυτή τη διαφοροποίηση δεν είναι πλήρως γνωστοί. [Antonio Morales-Hernandez and Shannon McKinney-Freeman. (2021). GABA gets blood on its hands]

Παρόλο που η διάγνωση των μυελοδυσπλαστικών συνδρόμων και των χρόνιων μυελοϋπερπλαστικών νεοπλασμάτων όπως η χρόνια μυελογενής λευχαιμία, η αληθής πολυκυτταραιμία, η πρωτοπαθής μυελοϊνώση και η ιδιοπαθής θρομβοκυτταραιμία βασίζονται κατά κύριο λόγο σε κλινικά και μοριακά δεδομένα, εντούτοις η ιστολογική διάγνωση με τη χρήση ανοσοϊστοχημείας αποτελεί αναπόσπαστο τμήμα της διαγνωστικής προσέγγισης και θέτει τη βάση της κλινικής αξιολόγησης και παρακολούθησης των ασθενών με αιματολογικά νοσήματα [Tomoiku Takaku, et al. (2016). *Hematopoiesis in 3 dimensions: human and murine bone marrow architecture visualized by confocal microscopy*]

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκαν σε συνεστιακό μικροσκόπιο οστεομυελικές βιοψίες ασθενών με μυελοδυσπλαστικό σύνδρομο και μυελοϊνώση που χρώσθηκαν με αντίσωμα GABA, ενώ τα ευρήματα μελετήθηκαν σε σχέση με τα αντίστοιχα σε οστεομυελική βιοψία ασθενούς δίχως αιματολογική διαταραχή η οποία διενεργήθηκε για αποκλεισμό κακοηθείας (βιοψία-control/μάρτυρας).

Ένα ενδιαφέρον εύρημα αποτελεί η παρουσία GABA – θετικών κυττάρων σε αυξημένο ποσοστό στη βιοψία μυελοδυσπλαστικού συνδρόμου σε σχέση με τη μυελοϊνώση και τη βιοψία-μάρτυρα. Ειδικά η εντόπιση των θετικών κυττάρων σε παραδοκιδώδεις θέσεις, όπου εδράζονται προγονικά κύτταρα του μυελού, υποδεικνύει εμμέσως την πιθανότητα διακριτού ρόλου του GABA στην αιμοποίηση. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία [Antonio Morales – Hernandez and Shannon McKinney – Freeman. (2021). *GABA gets blood on its hands*] GABA ανιχνεύεται σε κύτταρα του μυελού, δίχως όμως να έχει αποσαφηνισθεί πλήρως η τοπογραφική εντόπιση και η λειτουργία τους. Επιπλέον, ο υποδοχέας GABA έχει λειτουργικό ρόλο στην ομοιοστάση των αιμοποιητικών προγονικών κυττάρων. Στην προσπάθεια ερευνητών να αποκαλυφθεί εάν το GABA ανιχνεύεται στο μυελό των οστών και να προσδιοριστεί η

κυτταρική πηγή του, αποδείχθηκε ότι το GABA εντοπίζεται στο μυελό των οστών, με υψηλά επίπεδα στο ενδόστεο του μηριαίου οστού. Βρέθηκε επίσης ότι τα ώριμα B-κύτταρα εκκρίνουν GABA, το οποίο δρα στα λεμφοειδή προγονικά κύτταρα του μυελού των οστών και δημιουργούν ένα βρόχο ανατροφοδότησης σηματοδότησης. [Mary J. Allen; Sarah Sabir; Sandeep Sharma. (2023). GABA Receptor, Manuela Marcolia, (2008). In vitro modulation of gamma amino butyric acid (GABA) receptor expression by bone marrow stromal cells, Antonio Morales - Hernandez, Shannon McKinney - Freeman. (2021). GABA gets blood on its hands]. Σύμφωνα με βιβλιογραφικές αναφορές η αναστολή του GABRR1 με ένα μοντέλο ποντικού knockout, διαγραφή με τη μεσολάβηση CRISPR ή θεραπεία με ανταγωνιστή GABA ανέστειλε τη διαφοροποίηση των μεγακαρυοκυττάρων και των αιμοπεταλίων, ενώ η ενεργοποίηση του GABRR1 μέσω υπερέκφρασης με τη μεσολάβηση lentivirus ή θεραπεία με αγωνιστή GABA προώθησε τη δημιουργία αιμοπεταλίων. [Fangfang Zhu et al. (2019). The GABA receptor GABRR1 is expressed on and functional in hematopoietic stem cells and megakaryocyte progenitors]. Ακόμη, το γονίδιο της υπομονάδας-1 του υποδοχέα GABAB GABBR1 ήταν το μόνο που υπερεκφράστηκε σημαντικά στα CD34+ κύτταρα μυελού των οστών ασθενών με μυελοδυσπλαστικό σύνδρομο σε σύγκριση με τους υγιείς δότες ελέγχου, κάτι που υποδεικνύει πως ο υποδοχέας GABAB διαδραματίζει ρυθμιστικό ρόλο στην αιμοποίηση και η ενεργοποίηση της σηματοδότησής επηρεάζει αρνητικά τη λειτουργία της ερυθροποίησης. Η αναστολή της σηματοδότησης του υποδοχέα GABAB έχει τη δυνατότητα να βελτιώσει την ερυθροποίηση στο μυελοδυσπλαστικό σύνδρομο. [Faezeh Darbaniyan et al. (2022). Transcriptomic Signatures of Hypomethylating Agent Failure in Myelodysplastic Syndromes and Chronic Myelomonocytic Leukemia].

Επιπλέον, στην παρούσα μελέτη αναδείχθηκε η παρουσία GABA – θετικών κυττάρων σε θέσεις έκτοπης αιμοποίησης, οι οποίες αντιστοιχούν σε έκτοπη θέση προγονικών κυττάρων. Το τελευταίο εύρημα αναφέρεται για πρώτη φορά στη βιβλιογραφία και θα μπορούσε να αξιοποιηθεί περαιτέρω για άλλες πειραματικές μελέτες προς επιπλέον διευκρίνηση της σημασίας του.

Συμπερασματικά, με βάση τα αποτελέσματα των πειραμάτων στην παρούσα πτυχιακή μελέτη αναδεικνύεται πως οι τεχνικές της συνεστιακής μικροσκοπίας είναι δυνατόν να εφαρμοστούν σε ιστούς μονιμοποιημένους σε φορμόλη και εμπεδωμένους σε παραφίνη. Επιπλέον, η χρήση ανοσοϊστοχημείας μπορεί να υποστηρίξει την ανάλυση της ιστοπαθολογικής εικόνας αφενός με την κατάδειξη ειδικών πρωτεϊνών που ενέχονται στην αιμοποίηση και στις διαταραχές της και αφετέρου με τρισδιάστατη απεικόνιση του ιστού και της αλληλεπίδρασης των μικροανατομικών κυτταρικών διαμερισμάτων στη βιοψία. Τέλος,

επιπλέον μελέτες σε μεγάλο αριθμό βιοψιών από ασθενείς με αιματολογικά νοσήματα, θα μπορούσαν ενδεχομένως να προσφέρουν σημαντική πληροφορία σχετικά με το ρόλο του GABA στην αιμοποίηση και στην παθογένεση του μυελοδυσπλαστικού συνδρόμου.

## **ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

- Suetterlin, R., Baschong, W., & Laeng, R. H. (2004). Immunofluorescence and Confocal Laser Scanning Microscopy of Chronic Myeloproliferative Disorders on Archival Formaldehyde-fixed Bone Marrow. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 52(3). <https://doi.org/10.1177/002215540405200305>
- Travlos, G. S. (2006). Normal Structure, Function, and Histology of the Bone Marrow. *Toxicologic Pathology*, 34(5). <https://doi.org/10.1080/01926230600939856>
- Lucas, D. (2021). Structural organization of the bone marrow and its role in hematopoiesis. In *Current Opinion in Hematology* (Vol. 28, Issue 1). <https://doi.org/10.1097/MOH.0000000000000621>
- Wu, Q., Zhang, J., & Lucas, D. (2021). Anatomy of Hematopoiesis and Local Microenvironments in the Bone Marrow. Where to? In *Frontiers in Immunology* (Vol. 12). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.768439>
- Travlos, G. S. (2006). Histopathology of Bone Marrow. *Toxicologic Pathology*, 34(5). <https://doi.org/10.1080/01926230600964706>
- Nwaneshiudu, A., Kuschal, C., Sakamoto, F. H., Rox Anderson, R., Schwarzenberger, K., & Young, R. C. (2012). Introduction to confocal microscopy. *Journal of Investigative Dermatology*, 132(12). <https://doi.org/10.1038/jid.2012.429>
- Robbins. (2020). *ΒΑΣΙΚΗ ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΗ ΑΝΑΤΟΜΙΚΗ* (Μελαχροινού Μαρία, Ζολώτα Βασιλική, Κουρέα Ελένη, & Τζελέπη Βασιλική, Eds.; 10η). ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΕΣ ΕΚΔΟΣΕΙΣ ΠΑΡΙΣΙΑΝΟΥ Α.Ε.
- Junqueira. (2013). *Βασική Ιστολογία* (Λουίζα Ανδριοπούλου - Οικονόμου, Ed.; 6η ελληνική). Π.Χ. Πασχαλίδης.
- Μαρίνος Ευάγγελος. (n.d.). *Ανοσοϊστοχημεία σε τομές παραφίνης*.
- Τρισόκκα Τσικκίνη Παναγιώτα. (2022). *Αμφιβληστροειδική Βλάβη Ισχαιμίας/Επαναιμάτωσης Ανίχνευση πρώιμων βιοδεικτών για την αξιολόγηση φαρμακολογικών στόχων σε ex vivo μοντέλο επίμυος*.
- Νασέμπ Κωνσταντίνος. (2022). *Μελέτη Ψηφιακού μικροσκοπίου και παρουσίαση μεταφοράς δεδομένων με χρήση του λογισμικού DinoCapture*.
- *Alkaline phosphatase cytochemistry in confocal scanning light microscopy for imaging the bone marrow stroma*. (n.d.)



- Paolo Bianco 1, A. B. 2. (1993). Confocal images of marrow stromal (Westen-Bainton) cells. *Histochemistr*
- Mary J. Allen; Sarah Sabir; Sandeep Sharma. (2023). *GABA Receptor*.
- Manuela Marcolia, S. C. L. T. d, M. M. d, e, M. M. d, A. O. d, C. C. P. P. G. M. f, M. P. R. C. d, P. C. (2008). *In vitro modulation of gamma amino butyric acid (GABA) receptor expression by bone marrow stromal cells*.
- Jonas Camposa, b, c, S. G.-G. b, S. C. S. b, G. B. d, J. F. O. b, e, F. G. T. b, 1, A. J. S. b, 1, \*. (2020). *Astrocyte signaling impacts the effects of human bone marrow mesenchymal T stem cells secretome application into the hippocampus: A proliferation and morphometrical analysis on astrocytic cell populations*.
- Ιωάννου Μαρία. (2023). *ΟΔΗΓΟΣ ΜΕΛΕΤΗΣ ΙΣΤΟΛΟΓΙΑΣ*. Εκδόσεις Νέον.
- YeVin Mun, C. N.-A. (2021). *3D Microscopy of Murine Bone Marrow Hematopoietic Tissues*.
- Antonio Morales-Hernández and Shannon McKinney-Freeman. (2021). *GABA gets blood on its hands*.
- Tomoiku Takaku, D. M. J. C. R. T. C. S. K. and N. S. Y. (2016). *Hematopoiesis in 3 dimensions: human and murine bone marrow architecture visualized by confocal microscopy*.
- Moira Ragazzi, S. P. C. L. F. C. M. F. G. F. G. G. and G. P. (2014). *Fluorescence confocal microscopy for pathologists*.
- James Goolsby, M. C. M. D. H. J. C. G. T. D. Y. P. S. F. S. D.-J. C. T. B. B. P. and D. T. (2003). *Hematopoietic progenitors express neural genes*.
- Luan Cao-Sy, N. O. T. S. T. K. K. H. S. S. Y. N. S. O. H. H. M. S. H. N. S. C. (2018). *Prominence of nestin-expressing Schwann cells in bone marrow of patients with myelodysplastic syndromes with severe fibrosis*.
- Faezeh Darbaniyan, H. Z. R. K.-S. K.-A. D. G. G.-M. Y. W. (2022). *Transcriptomic Signatures of Hypomethylating Agent Failure in Myelodysplastic Syndromes and Chronic Myelomonocytic Leukemia*.
- Fangfang Zhu, M. F. R. S. M. P. M. F. L. e, 3 K. S. K. K. S. J. S. and I. L. W. (2019). *The GABA receptor GABRR1 is expressed on and functional in hematopoietic stem cells and megakaryocyte progenitors*.

