



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ
ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

Ανοσοφαινοτυπική Μελέτη του Πολλαπλού
Μυελώματος

Διπλωματική εργασία
ΑΛΕΞΑΝΔΡΗΣ ΑΘΑΝΑΣΙΟΣ

Υπεύθυνος Καθηγητής: Σπελέτας Ματθαίος
Τμήμα Ιατρικής - Εργαστήριο Ανοσολογίας &
Ιστοσυμβατότητας



UNIVERSITY OF THESSALY
DEPARTMENT
OF BIOCHEMISTRY & BIOTECHNOLOGY

Immunophenotyping in Multiple Myeloma

Diploma Project
ALEXANDRIS ATHANASIOS

Supervising Professor: Speletas Matthaios

**Department of Medicine - Immunology &
Histocompatibility Laboratory**

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	3
A. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	3
1. ΣΚΟΠΟΣ.....	3
2. ΠΟΛΛΑΠΛΟ ΜΥΕΛΩΜΑ.....	3
2.1 ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ	4
2.2 ΒΙΟΛΟΓΙΚΗ ΚΑΙ ΜΟΡΙΑΚΗ ΟΠΤΙΚΗ.....	5
2.3 ΚΛΙΝΙΚΗ ΕΙΚΟΝΑ ΚΑΙ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗ ΕΚΤΙΜΗΣΗ.....	7
2.4 ΝΕΦΡΑ ΚΑΙ ΠΟΛΛΑΠΛΟ ΜΥΕΛΩΜΑ	9
2.5 ΝΕΥΡΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ ΚΑΙ ΠΟΛΛΑΠΛΟ ΜΥΕΛΩΜΑ.....	10
2.6 ΔΙΑΦΟΡΙΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ.....	11
2.7 ΠΡΟΓΝΩΣΗ ΚΑΙ ΣΤΑΔΙΟΠΟΙΗΣΗ	11
3. ΜΟΡΦΕΣ ΠΟΛΛΑΠΛΟΥ ΜΥΕΛΩΜΑΤΟΣ	12
3.1 Ασυμπτωματικό Πολλαπλό Μυέλωμα (Smoldering Multiple Myeloma, SMM)	12
3.2 Πλασματοκυτταρική Λευχαιμία (Plasma Cell Leukemia).....	13
3.4 Μη Εκκριτικό Μυέλωμα (Non Secretory Myeloma)	14
3.5 Μονήρες Πλασμοκύτωμα των Οστών (Solitary Plasmacytoma of Bone).....	14
3.6 Εξωμυελικό Πλασμοκύτωμα (Extramedullary Plasmacytoma).....	15
4. ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΙΑ ΡΟΗΣ (Flow Cytometry).....	16
4.1 Περιγραφή της μεθόδου	16
B. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	18
1. ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΑ ΑΝΟΣΟΦΑΙΝΟΤΥΠΙΚΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ.....	21
1.1 ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΠΛΑΣΜΑΤΟΚΥΤΤΑΡΩΝ	21
1.2 ΕΝΔΟΚΥΤΤΑΡΙΑ ΚΛΩΝΙΚΟΤΗΤΑ ΠΛΑΣΜΑΤΟΚΥΤΤΑΡΩΝ	22
Γ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	24
1. ΑΝΟΣΟΦΑΙΝΟΤΥΠΙΚΗ ΕΙΚΟΝΑ.....	24
2. ΑΝΑΛΥΣΗ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ	28
Δ. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	32
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	35

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η ανοσοφαινοτυπική μελέτη του πολλαπλού μυελώματος αποτελεί δελεαστική προσέγγιση τόσο για ερευνητικούς σκοπούς όσο και για κλινικές εφαρμογές. Βασισμένη σε καλά καθορισμένα πρωτόκολλα χρήσης μονοκλωνικών αντισωμάτων μπορεί να χρησιμοποιηθεί για το διαχωρισμό ανάμεσα σε μυελωματικά και φυσιολογικά κύτταρα. Επιπρόσθετα, ο ανοσοφαινότυπος μπορεί να είναι μια εναλλακτική μέθοδος σε συνδυασμό με την κλασσική μορφολογική ανάλυση, για τη μελέτη του μυελού και την αναζήτηση διήθησης από κλωνικά πλασματοκύτταρα. Στην εργασία αυτή περιγράφονται αναλυτικά τα πρωτόκολλα και η προετοιμασία των δειγμάτων ασθενών με μυέλωμα, καθώς και τα αποτελέσματα έπειτα από τη χρήση μονοκλωνικών αντισωμάτων και κυτταρομετρίας ροής.

A. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.ΣΚΟΠΟΣ

Η συγκεκριμένη εργασία έγινε με σκοπό την ανοσοφαινοτυπική μελέτη, με τη χρήση κυτταρομετρίας ροής, δειγμάτων ασθενών που πάσχουν από πολλαπλό μυέλωμα και τη σύγκριση των ευρημάτων με αντίστοιχες μελέτες.

2.ΠΟΛΛΑΠΛΟ ΜΥΕΛΩΜΑ

Το πολλαπλό μυέλωμα χαρακτηρίζεται από το νεοπλασματικό πολλαπλασιασμό ενός κλώνου πλασματοκυττάρων που οδηγεί στην παραγωγή μονοκλωνικής αιμοσφαιρίνης.⁽¹⁾

2.1 ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ

Το πολλαπλό μυέλωμα είναι υπεύθυνο περίπου για το 1% των νεοπλασιών στον άνθρωπο και για λίγο παραπάνω από το 10% των αιματολογικών κακοηθειών. Παρά το γεγονός ότι έχει αναφερθεί διπλάσια έως πενταπλάσια αύξηση στην συχνότητα εμφάνισής του στις ΗΠΑ, την Αγγλία και την Ουαλία τα τελευταία χρόνια, η συχνότητα σε άλλες χώρες, όπως στη Σουηδία, αυξήθηκε ελάχιστα.⁽³⁰⁾ Δεδομένα από την επαρχία Όλμστεντ της Μινεσότα δείχνουν μια συχνότητα τριών ασθενών ανά 100.000 κατοίκους για τα έτη 1945-1954 και μια παρόμοια συχνότητα κατά την διάρκεια των επόμενων δύο δεκαετιών. Στην διάρκεια των ετών 1978-1990 τα ετήσια κρούσματα πολλαπλού μυελώματος στην επαρχία Όλμστεντ ήταν 4 ασθενείς ανά 100.000 κατοίκους. Στην Δανία την περίοδο 1943-1962 η συχνότητα εμφάνισής του σχεδόν τριπλασιάστηκε, αλλά από τότε παρέμεινε σχετικά στάσιμη. Η συχνότητα του πολλαπλού μυελώματος πιθανόν να μην έχει αλλάξει σημαντικά· η προφανής αύξηση των συχνοτήτων πιθανώς σχετίζεται με την αυξημένη διαθεσιμότητα και χρήση ιατρικών εγκαταστάσεων, καθώς και τη βελτιστοποίηση των διαγνωστικών τεχνικών.⁽³⁰⁾

Η συχνότητα εμφάνισης του πολλαπλού μυελώματος κορυφώνεται κατά την έβδομη δεκαετία της ζωής του ανθρώπου και μόνο το 3% των ασθενών είναι κάτω από 40 ετών. Τα κρούσματα είναι διπλάσια στη μαύρη φυλή σε σχέση με τη λευκή και ελάχιστα πιο συχνά στους άνδρες. Το πολλαπλό μυέλωμα επηρεάζει όλες τις φυλές και τις γεωγραφικές περιοχές, αλλά έχουν παρατηρηθεί λιγότερα κρούσματα στην Ασία.

2.2 ΒΙΟΛΟΓΙΚΗ ΚΑΙ ΜΟΡΙΑΚΗ ΟΠΤΙΚΗ

Η αιτία εμφάνισης του πολλαπλού μυελώματος παραμένει άγνωστη, ενώ έχει αναφερθεί μία συσχέτιση της ασθένειας με την έκθεση σε ιονίζουσα ακτινοβολία. Κυτταρογενετικές μελέτες σε ασθενείς με τη νόσο δεν ήταν μέχρι πρόσφατα δυνατές εξαιτίας της χαμηλής ικανότητας πολλαπλασιασμού των πλασματοκυττάρων. Ανάλυση με κυτταρομετρία ροής οδήγησε στην ανάδειξη ενός ανευπλοειδούς κυτταρικού πληθυσμού μυελώματος σε περίπου 80% των ασθενών, με πιο συνηθισμένη την υπερδιπλοειδία.⁽³¹⁾ Αnevπλοειδία ανιχνεύεται στο μυελό των οστών στο 54% των ασθενών με πολλαπλό μύελωμα και σπάνια σε ασθενείς με καλοήγη μονοκλωνική γαμμαπάθεια. Έχουν περιγραφεί τόσο δομικές αλλαγές των χρωμοσωμάτων 1, 11 και 14, όσο και μονοσωμίες και τρισωμίες.⁽³²⁻³⁴⁾ Οι μισοί σχεδόν ασθενείς με μύελωμα εμφανίζουν ανωμαλίες στον καρυότυπο, με συχνότερες τις τρισωμίες 3, 5, 9, 15 και τις μονοσωμίες 13 και 16. Εάν μπορούσε να μελετηθεί ευκολότερα ο καρυότυπος των πλασματοκυττάρων είναι πιθανό να βρίσκαμε περισσότερες ανωμαλίες.^(32,33)

Στο μύελωμα έχουν παρατηρηθεί επίσης μεταθέσεις που περιλαμβάνουν τις $t(8;14)(q24;q32)$ και $t(11;14)(q13;q32)$, με την $t(8;14)$ ανωμαλία να συμβαίνει μόνο σε ασθενείς με IgA μονοκλωνική γαμμαπάθεια.⁽³⁴⁾ Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι οι 8q24 και 11q13 είναι οι θέσεις των πρωτοοογκογονιδίων *c-myc* και *bcl-1*, και η 14q32 είναι η τοποθεσία του γονιδίου της βαριάς αλυσίδας των ανοσοσφαιρινών. Σε 8 από τους 13 ασθενείς με πολλαπλό μύελωμα βρέθηκε απώλεια των θέσεων περιορισμού σε μια περιοχή 44 ζευγών βάσεων ανοδικά του 3' άκρου του πρώτου εξονίου του *c-myc*.⁽³⁵⁾ Σε μία άλλη σειρά ασθενών με μύελωμα, 4 από τους 70 ασθενείς παρουσίασαν επίσης αναδιάταξη του *bcl-1*.⁽³⁶⁾

Σε μία άλλη σειρά βρέθηκαν αυξημένα τα επίπεδα mRNA του *c-myc* σε 9 από τους 37 ασθενείς με πολλαπλό μύελωμα.⁽³⁷⁾ Οι περισσότεροι από τους 37 ασθενείς παρουσίασαν χαρακτηριστικές αναδιατάξεις των γονιδίων της βαριάς και ελαφράς

αλυσίδας των ανοσοσφαιρινών · δύο από τους εννέα ασθενείς με αυξημένη έκφραση του *c-myc* εμφάνιζαν επίσης και αναδιάταξη του γονιδίου.

Σε μία άλλη αναφορά, 17 από τους 23 ασθενείς (74%) με μυέλωμα εμφάνιζαν μεγαλύτερο φθορισμό της πρωτεΐνης p21^{H-ras} σε ανευπλοειδή κύτταρα όγκου σε σχέση με ασθενείς με μυέλωμα σε ύφεση.⁽³⁸⁾ Στο πολλαπλό μυέλωμα έχουν παρατηρηθεί αυξημένα επίπεδα έκφρασης του *c-myc* γονιδίου και *c-myc* αναδιάταξης, καθώς και αυξημένη έκφραση της πρωτεΐνης p21^{H-ras} σε ανευπλοειδή κύτταρα όγκου⁽³⁸⁾. Μεταλλάξεις των γονιδίων *ras* έχουν αναφερθεί στο 47% των ασθενών που πάσχουν από τη νόσο. Τα 2/3 των ασθενών με μεταλλάξεις των γονιδίων *ras* εμφάνισαν και επιθετική συμπεριφορά της νόσου. Παρόλο το γεγονός ότι έχει αναφερθεί αυξημένη έκφραση της *bcl-2* πρωτεΐνης, δεν βρέθηκε αναδιάταξη του *bcl-2* γονιδίου σε 16 ασθενείς με πολλαπλό μυέλωμα.⁽³⁹⁾ Σημειακές μεταλλάξεις του p53 γονιδίου βρέθηκαν σε τρεις πρόσφατες αναφορές.⁽⁴⁰⁾ Τόσο μεταλλάξεις του p53 γονιδίου όσο και του γονιδίου *ras*, βρέθηκαν σε ασθενείς που έπασχαν από πολλαπλό μυέλωμα με επιθετική συμπεριφορά, οδηγώντας σε αναθεώρηση της βιολογίας της νόσου.⁽⁴⁰⁾

Τα πλασματοκύτταρα εκφράζουν κυτταροπλασματική ανοσοσφαιρίνη, CD38, το πλασματοκυτταρικό αντιγόνο-1 και μία μειοψηφία αυτών εκφράζει CD10, HLA-DR, και CD20. Τα περισσότερα κύτταρα του μυελώματος είναι θετικά για το N-CAM (CD56), ενώ ασθενείς με πλασματοκυτταρική λευχαιμία ή με φυσιολογικά πλασματοκύτταρα εκφράζουν λίγο ή καθόλου CD56.⁽⁴¹⁾ Η φύση των κλωνικών κυττάρων στο πολλαπλό μυέλωμα είναι άγνωστη.⁽⁴²⁾

Η παρουσία πολλαπλών αιμοποιητικών αντιγόνων επιφανείας σε κακοήθη πλασματοκύτταρα υποδηλώνει την πιθανή προέλευσή τους από ένα πολυδύναμο βλαστικό κύτταρο. Είναι πιθανό οι πρόγονοι των πλασματοκυττάρων του μυελώματος να κυκλοφορούν στο περιφερικό αίμα. Τα κυκλοφορούντα κλωνικά προμυελωματικά κύτταρα μπορούν να εγκατασταθούν στο μυελό των οστών μέσω

μορίων προσκόλλησης και να βρύνε ένα μικροπεριβάλλον (δίκτυο κυτταροκινών, περιλαμβάνοντας και κύτταρα του στρώματος), το οποίο θα τους επιτρέψει να διαφοροποιηθούν και να πολλαπλασιαστούν.^(41,42)

Είναι γνωστό ότι στη διαφοροποίηση και ανάπτυξη των φυσιολογικών Β κυττάρων συμμετέχουν πολλοί παράγοντες ανάπτυξης. Τα Β κύτταρα που βρίσκονται σε κατάσταση ηρεμίας εισέρχονται στη διαδικασία σύνθεσης DNA, η οποία ακολουθείται από την ενεργοποίηση από την IL-4, πολλαπλασιασμό με IL-5 και διαφοροποίηση σε πλασματοκύτταρα έπειτα από ενεργοποίηση με IL-6. Σε ασθενείς με πολλαπλό μυέλωμα έχει βρεθεί υπερπαραγωγή της ιντερλευκίνης (IL)-1 και του παράγοντα νέκρωσης των όγκων [tumor necrosis factor (TNF)], που εμφανίζουν δραστηριότητα απορρόφησης από το μυελό των οστών. Τα κύτταρα του μυελώματος παράγουν IL-6 και εκφράζουν υποδοχείς για την IL-6.⁽⁴³⁾ Τα αυξημένα επίπεδα της IL-6 στους περισσότερους ασθενείς με πολλαπλό μυέλωμα σε τελικό στάδιο και σε αυτούς με πλασματοκυτταρική λευχαιμία, ενισχύουν την υπόθεση ότι η κυτταροκίνη αυτή είναι ένας σημαντικός παράγοντας στην εξέλιξη του πολλαπλού μυελώματος. Επιπλέον, τα αυξημένα αυτά επίπεδα υποστηρίζουν την θεραπεία με στόχο την IL-6 σε άτομα που πάσχουν από επιθετικής μορφής μυέλωμα και εμφανίζουν ανθεκτικότητα στην χημειοθεραπεία.⁽⁴³⁾

2.3 ΚΛΙΝΙΚΗ ΕΙΚΟΝΑ ΚΑΙ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗ ΕΚΤΙΜΗΣΗ

Στη διάγνωση σε περισσότερα από τα 2/3 των ασθενών είναι χαρακτηριστικός ο πόνος των οστών, κυρίως της ράχης και του στήθους, ενώ λιγότερο συχνά εμφανίζεται πόνος στα άκρα. Ο πόνος επιδεινώνεται από την κίνηση και οι ασθενείς νιώθουν συνήθως πιο άνετα κατά την ανάπαυση. Το ύψος των ασθενών μπορεί να μειωθεί έως και μερικά εκατοστά εξαιτίας των συμπιεστικών καταγμάτων των σπονδύλων. Συνηθισμένο γεγονός είναι η εμφάνιση αδυναμίας

και κόπωσης, τα οποία πολύ συχνά σχετίζονται με την αναιμία. Παρά το γεγονός ότι οι περισσότεροι ασθενείς με πολλαπλό μυέλωμα εκδηλώνουν πυρετό, αυτός σπάνια οφείλεται αποκλειστικά στην ασθένεια, ενώ συνήθως είναι αποτέλεσμα κάποιας λοίμωξης. Χαρακτηριστικό γνώρισμα της ασθένειας συνήθως είναι η ασυνήθιστη αιμορραγία, πιο συχνά ρινορραγία ή πορφύρα, λόγω θρομβοπενίας. Η αρχική εικόνα μπορεί επίσης να είναι συμπτώματα οξείας λοίμωξης, αναπνευστικής ανεπάρκειας, υπερασβεστιαϊμίας ή αμυλοείδωσης.⁽¹⁹⁾

Το πιο συχνό κλινικό σημείο της νόσου είναι η ωχρότητα. Στο 20% των περιπτώσεων παρατηρείται ηπατομεγαλία και στο 5% σπληνομεγαλία. Τα εξωμυελικά πλασμοκυτώματα εμφανίζονται συνήθως αργότερα κατά την εξέλιξη της ασθένειας ως μεγάλες, αγγειακές, υποδόριες ή μη, μάζες με πορφυρή χροιά.⁽¹⁹⁾

Τα 2/3 των ασθενών πάσχουν από αναιμία. Η ταχύτητα καθίζησης των ερυθροκυττάρων είναι κατά κανόνα αυξημένη, αλλά στο 10% των ασθενών παραμένει σε φυσιολογικά επίπεδα (σε μη εκκρίνων μυέλωμα). Έπειτα από ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών του ορού, στο 80% των ασθενών αναγνωρίζεται μονοκλωνικό κλάσμα, περίπου το 10% πάσχει από υπογαμμασφαιριναιμία και το υπόλοιπο 10% εμφανίζει φυσιολογική εικόνα. Ωστόσο με τη χρήση τεχνικών ανοσοηλεκτροφόρησης και ανοσοκαθήλωσης του ορού φανερώνεται η ύπαρξη της Μ παραπρωτεΐνης (παθολογικής μονοκλωνικής αιμοσφαιρίνης) σε ποσοστό >90% των περιπτώσεων. Το επίπεδο της κρεατινίνης του ορού είναι αυξημένο στους μισούς ασθενείς και το 1/5 αυτών εμφανίζει κατά τη διάγνωση συγκέντρωση $\geq 2\text{mg/dl}$. Η ανοσοηλεκτροφόρηση ή η ανοσοκαθήλωση αποκαλύπτουν μία Μ παραπρωτεΐνη στα ούρα στο 80% των ασθενών με μία συχνότητα παρουσίας ελαφρών αλύσων κ/λ της τάξης 2:1 (Bence Jones) · το 99% των ασθενών έχουν μια Μ παραπρωτεΐνη καθόλη την πορεία της ασθένειας.^(19,20)

Έπειτα από αναρρόφηση μυελού των οστών και βιοψία, συνήθως παρατηρούμε διήθηση από πλασματοκύτταρα σε ποσοστό >10%. Η ύπαρξη μεγάλων

ομοιογενών οξιδίων ή η διάχυτη διήθηση από πλασματοκύτταρα είναι το πιο συνηθισμένο κριτήριο για τη διάγνωση.⁽⁴⁴⁾

2.4 ΝΕΦΡΑ ΚΑΙ ΠΟΛΛΑΠΛΟ ΜΥΕΛΩΜΑ

Οι ασθενείς με πολλαπλό μυέλωμα πάσχουν συχνά από νεφρική ανεπάρκεια. Οι δύο σημαντικότερες αιτίες της νεφρικής ανεπάρκειας είναι η υπερασβεστιαμία και οι μυελωματικοί νεφροί. Οι μυελωματικοί νεφροί χαρακτηρίζονται από την παρουσία μεγάλων, κηροειδών, πολυστρωματικών εκμαγείων στα περιφερικά και αθροιστικά σωληνάκια, από κατακρημνισμένες μονοκλωνικές ελαφρές αλυσίδες και περιβάλλονται από πολυπύρηννα επιθηλιακά κύτταρα. Σταδιακά παρατηρείται διαστολή και ατροφία των νεφρικών σωληναρίων, και τελικά ολόκληρος ο νεφρός παύει να λειτουργεί. Είναι πιθανό να συμβεί παράλληλα αύξηση των επιπέδων ασβεστίου και διάμεση ίνωση.⁽⁴⁵⁾

Η έκταση των σχηματιζόμενων εκμαγείων σχετίζεται άμεσα με το ποσό των ελεύθερων ελαφρών αλύσων στα ούρα και με την σοβαρότητα της νεφρικής ανεπάρκειας. Ο πραγματικός μηχανισμός της νεφροτοξικότητας οφειλόμενης σε πρωτεϊνουρία είναι άγνωστος και ο ρόλος του ισοηλεκτρικού σημείου της πρωτεΐνης Bence Jones είναι αντιφατικός. Οι ελαφρές αλυσίδες λ πιστεύεται ότι είναι περισσότερο τοξικές για το νεφρό σε σχέση με τις κ αλυσίδες, ενώ παρουσία Bence Jones στα ούρα δε φαίνεται να έχει προγνωστική αξία.^(45,46)

Μία από τις πιο συχνές αιτίες της νεφρικής ανεπάρκειας είναι η υπερασβεστιαμία, η οποία εμφανίζεται σχεδόν στο 25% των ασθενών. Η χρήση μη στεροειδών αντιφλεγμονωδών παραγόντων μπορεί, επίσης, να προάγει την ανάπτυξη νεφρικής ανεπάρκειας. Η υπερουριχαιμία μπορεί επίσης να συνεισφέρει στην ανάπτυξη της νεφρικής ανεπάρκειας. Τέλος, η αμυλοείδωση συμβαίνει στο 10-15% των ασθενών με πολλαπλό μυέλωμα και είναι πιθανό να οδηγήσει επίσης σε νεφρική ανεπάρκεια ή νεφρωσικό σύνδρομο, ή και τα δύο.⁽⁴⁵⁾

Σπανιότερα παρατηρείται το επίκτητο σύνδρομο Fanconi, το οποίο χαρακτηρίζεται από δυσλειτουργία των εγγύς ουροφόρων σωληναρίων με αποτέλεσμα την εκδήλωση γλυκοζουρίας, φωσφατουρίας και αμινοξυουρίας. Τα πλασματοκύτταρα και τα κύτταρα των νεφρικών σωληναρίων σε τέτοιους ασθενείς εμφανίζουν συχνά κρυσταλλικά κυτταροπλασματικά έγκλειστα.⁽⁴⁵⁾

Οι μονοκλωνικές ελαφριές αλυσίδες μπορούν να εναποτεθούν στο σπείραμα των νεφρικών σωληναρίων και να οδηγήσουν σε νεφρωσικό σύνδρομο ή σε νεφρική ανεπάρκεια (αποκαλούμενη συνήθως ως ασθένεια εναπόθεσης ελαφριών αλυσίδων)⁽⁴⁶⁾. Τυπικά παρατηρείται κονδυλώδης σπειραματοσκλήρυνση και με τη χρήση ηλεκτρονικής μικροσκοπίας φανερώνονται κοκκιώδεις εναποθέσεις, οι περισσότερες εκ των οποίων αποτελούνται από κ ελαφριές αλυσίδες.⁽⁴⁶⁾

2.5 ΝΕΥΡΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ ΚΑΙ ΠΟΛΛΑΠΛΟ ΜΥΕΛΩΜΑ

Η πιο συνηθισμένη νευρολογική διαταραχή είναι η νευροπάθεια λόγω προσβολής νωτιαίων ριζών (radiculopathy), η οποία είναι συνήθως θωρακική ή οσφυϊκή. Ο πόνος προέρχεται είτε από συμπίεση των νεύρων εξαιτίας κάκωσης στη σπονδυλική στήλη, είτε από συμπιεστικά κατάγματα των οστών. Σε ασθενείς που πάσχουν από πολλαπλό μυέλωμα έχει βρεθεί σε ποσοστό $\leq 10\%$ συμπίεση του νωτιαίου μυελού, που προκαλείται από την εμφάνιση του μυελώματος στην κοιλότητα του νωτιαίου μυελού και την επέκτασή του στον εξωμυελικό χώρο. Οι συνηθισμένες κλινικές εικόνες είναι πόνος στην πλάτη, αδυναμία ή παράλυση των κάτω άκρων, και εντερική ακράτεια ή ακράτεια ούρων.⁽⁴⁷⁾

Στο πολλαπλό μυέλωμα δεν είναι συνηθισμένη η εμφάνιση περιφερικών νευροπαθειών. Όταν συμβαίνει αυτό, οφείλεται σχεδόν πάντα στην ανάπτυξη αμυλοείδωσης. Ενδοκρανιακά πλασμοκυτώματα αποτελούν, συνήθως, επεκτάσεις μυελωματικών κακώσεων του κρανίου. Σε σπάνιες περιπτώσεις μπορεί να συμβεί λεπτομηνιγγική διήθηση από μυελωματικά κύτταρα.⁽⁴⁷⁾

2.6 ΔΙΑΦΟΡΙΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ

Ο συνδυασμός αναιμίας, πόνου στην πλάτη και νεφρικής ανεπάρκειας, είναι ενδεικτικός για την ύπαρξη πολλαπλού μυελώματος. Τα ελάχιστα κριτήρια για τη διάγνωση είναι η ύπαρξη πλασματοκυττάρων στο μυελό των οστών σε ποσοστό >10% σε συνδυασμό με ένα από τα παρακάτω στοιχεία: α) Μ παραπρωτεΐνη στον ορό (συνήθως σε ποσότητα >3g/dl), β) Μ παραπρωτεΐνη στα ούρα και γ) λυτικές αλλοιώσεις των οστών. Τα ευρήματα αυτά δεν θα πρέπει να συσχετίζονται με το μεταστατικό καρκίνωμα, με παθήσεις του συνδετικού ιστού, με τη χρόνια λοίμωξη, ή με το λέμφωμα. Οι ασθενείς που πάσχουν από πολλαπλό μύελωμα θα πρέπει να διαφοροποιούνται από εκείνους που πάσχουν από MGUS (Monoclonal Gammopathy Of Undetermined Significance) και SMM (Smoldering Multiple Myeloma).⁽¹⁾

2.7 ΠΡΟΓΝΩΣΗ ΚΑΙ ΣΤΑΔΙΟΠΟΙΗΣΗ

Η διάρκεια επιβίωσης των ασθενών που πάσχουν από πολλαπλό μύελωμα ποικίλει από μερικούς μήνες έως αρκετά χρόνια · η μέση διάρκεια ζωής είναι 2,5-3 χρόνια. Ένας από τους πιο ισχυρούς προγνωστικούς παράγοντες είναι το επίπεδο της β₂-μικροσφαιρίνης. Το επίπεδο της C-αντιδρώσας πρωτεΐνης (CRP) σχετίζεται με το επίπεδο της IL-6 του ορού, που είναι ένας σημαντικός αυξητικός παράγοντας των πλασματοκυττάρων. Πραγματοποιήθηκε ανάλυση επιβίωσης σε 162 ασθενείς με πολλαπλό μύελωμα και αναφέρθηκε ότι η μέση διάρκεια επιβίωσης ήταν 6 μήνες για ασθενείς που εμφάνιζαν αυξημένα επίπεδα CRP και β₂-μικροσφαιρίνης, ενώ για ασθενείς με χαμηλά επίπεδα και των δύο ήταν 54 μήνες. Τα αυξημένα επίπεδα της LDH (γαλακτικής δεϋδρογονάσης) αποτελούν επίσης δείκτη κακής πρόγνωσης του ασθενούς. Σε μελέτη που πραγματοποιήθηκε σε 391 ασθενείς με πολλαπλό μύελωμα, βρέθηκε ότι το 11% αυτών είχε αυξημένα επίπεδα LDH στον ορό. Τα αποτελέσματα αυτά σχετίστηκαν με επιθετική μορφή

της ασθένειας, με μεγάλο φορτίο νόσου και με χαμηλή ανταπόκριση στη χημειοθεραπεία. Επιπλέον, υπήρξε συσχέτιση του σταδίου της νόσου και της επιβίωσης των ασθενών, με τον αριθμό CD4(+) T-κυττάρων $< 700 \times 10^6$ κυττάρων /L.⁽²⁸⁾

Έπειτα από μελέτη 107 ασθενών που μόλις είχαν διαγνωσθεί με πολλαπλό μυέλωμα βρέθηκε ότι η ηλικία, τα επίπεδα της κινάσης της θυμιδίνης, της αλβουμίνης του ορού, της CRP, της β₂-μικροσφαιρίνης, καθώς και το ποσοστό των πλασματοκυττάρων, αποτελούν σημαντικούς επίσης προγνωστικούς παράγοντες.⁽²⁷⁾ Μετά από μία πολυπαραγοντική ανάλυση, έγινε φανερό ότι τα επίπεδα της β₂-μικροσφαιρίνης και το ποσοστό των πλασματοκυττάρων αποτελούν ανεξάρτητους δυσμενείς προγνωστικούς δείκτες της νόσου. Επίσης το 89% των ασθενών ηλικίας κάτω των 65 ετών με χαμηλά επίπεδα β₂-μικροσφαιρίνης και χαμηλό ποσοστό πλασματοκυττάρων επέζησε για 6 χρόνια μετά την έναρξη της χημειοθεραπείας.⁽²⁷⁾ Κατά τη διάρκεια σχεδιασμού της θεραπευτικής πορείας είναι σημαντική η αναγνώριση των διαφορετικών υποσυνόλων των ασθενών με πολλαπλό μυέλωμα (κάποιοι ασθενείς παρουσιάζουν μεγάλη διάρκεια επιβίωσης). Ασθενείς οι οποίοι ανταποκρίνονται άμεσα στη χημειοθεραπεία και εμφανίζουν υψηλό ποσοστό πλασματοκυττάρων έχουν μικρότερη διάρκεια ύφεσης και επιβίωσης.⁽⁴⁸⁾

3. ΜΟΡΦΕΣ ΠΟΛΛΑΠΛΟΥ ΜΥΕΛΩΜΑΤΟΣ

3.1 Ασυμπτωματικό Πολλαπλό Μυέλωμα (Smoldering Multiple Myeloma, SMM)

Η διάγνωση εξαρτάται από την ύπαρξη της M παραπρωτεΐνης στον ορό σε συγκέντρωση >3 g/dl, την ύπαρξη άτυπων πλασματοκυττάρων στο μυελό των

οστών σε ποσοστό $>10\%$, και στην απουσία αναιμίας, νεφρικής ανεπάρκειας και σκελετικών κακώσεων.⁽⁴⁹⁾ Συχνά, ένα ποσό της Μ παραπρωτεΐνης βρίσκεται στα ούρα και η συγκέντρωση των υπόλοιπων φυσιολογικών ανοσοσφαιρινών του ορού μειώνεται. Το ποσοστό των πλασματοκυττάρων είναι χαμηλό. Έτσι σε μερικούς ασθενείς τα συμπτώματα του πολλαπλού μυελώματος δεν εμφανίζονται για χρόνια. Είναι απαραίτητη η αναγνώριση του SMM, διότι οι ασθενείς αυτοί δεν πρέπει να υποβληθούν σε κάποια θεραπεία εάν δεν παρατηρηθεί εξέλιξη της ασθένειας. Βιολογικά, οι ασθενείς αυτοί πάσχουν από BMG (Benign Monoclonal Gammopathy), αλλά είναι δύσκολο αρχικά να γίνει δεκτή μία τέτοια διάγνωση όταν τα επίπεδα της Μ παραπρωτεΐνης είναι >3 g/dl και το ποσοστό των πλασματοκυττάρων στο μυελό των οστών $>10\%$. Έχει αναφερθεί ότι εμφάνιση λυτικών αλλοιώσεων των οστών, συγκέντρωση Μ-παραπρωτεΐνης στον ορό >3 g/dl και πρωτεϊνουρία Bence Jones, αποτελούν ενδείξεις μικρότερου μέσου χρόνου εξέλιξης της ασθένειας (10 μήνες), σε σύγκριση με τους 61 μήνες ασθενών που δεν εμφανίζουν κανέναν από τους παραπάνω παράγοντες.⁽⁵⁰⁾

3.2 Πλασματοκυτταρική Λευχαιμία (Plasma Cell Leukemia)

Οι ασθενείς που πάσχουν από πλασματοκυτταρική λευχαιμία εμφανίζουν ένα ποσοστό πλασματοκυττάρων στο περιφερικό αίμα $>20\%$ και έναν απόλυτο αριθμό πλασματοκυττάρων $\geq 2000/\text{mm}^3$. Η διαταραχή αυτή κατηγοριοποιείται ως πρωτογενής, εάν διαγνωσθεί στο στάδιο της λευχαιμίας, ή ως δευτερογενής εάν έχει πραγματοποιηθεί στα πλαίσια εξέλιξης μυελώματος. Περίπου το 60% των ασθενών παρουσιάζουν την πρωτογενή μορφή. Συγκριτικά με τους ασθενείς που πάσχουν από τη δευτερογενή μορφή, εκείνοι που εμφανίζουν την πρωτογενή μορφή της ασθένειας είναι νεότεροι, έχουν μεγαλύτερη πιθανότητα εμφάνισης ηπατομεγαλίας, σπληνομεγαλίας και λεμφαδενοπάθειας, υψηλότερο αριθμό αιμοπεταλίων, λιγότερες αλλοιώσεις των οστών, χαμηλότερα επίπεδα Μ

παραπρωτεΐνης, και σχετικά μεγαλύτερη διάρκεια ζωής. Η θεραπεία της μορφής αυτής δεν είναι ικανοποιητική και ο χρόνος επιβίωσης παραμένει μικρός.⁽¹⁹⁾

3.4 Μη Εκκριτικό Μυέλωμα (Non Secretory Myeloma)

Οι ασθενείς που πάσχουν από μη εκκριτικό μυέλωμα δεν έχουν Μ παραπρωτεΐνη τόσο στον ορό όσο και στα ούρα, και αποτελούν το 1% του συνολικού αριθμού των ασθενών με μυέλωμα. Για να είναι ακριβής η διάγνωση είναι απαραίτητη η αναγνώριση της Μ παραπρωτεΐνης στα πλασματοκύτταρα με μεθόδους ανοσοφθορισμού ή ανοσοϊστοχημείας. Έχει αναφερθεί ότι η διάρκεια επιβίωσής τους είναι παρόμοια και ίσως μεγαλύτερη από εκείνη των ασθενών με πολλαπλό μυέλωμα.⁽⁵¹⁾

3.5 Μονήρες Πλασμοκύττωμα των Οστών (Solitary Plasmacytoma of Bone)

Η διάγνωση του μονήρους πλασμοκυτώματος (solitary myeloma) βασίζεται στην ιστολογική εξέταση ενός όγκου που αποτελείται από πλασματοκύτταρα παρόμοια με αυτά που συναντούμε στο πολλαπλό μυέλωμα. Επιπρόσθετα, οι ακτινογραφίες του σκελετού δεν δείχνουν άλλες αλλοιώσεις οστών, σε δείγμα μυελού δεν υπάρχουν ενδείξεις πολλαπλού μυελώματος (δηλαδή διήθηση >10% από νεοπλασματικά πλασματοκύτταρα) και στα αποτελέσματα ανοσοηλεκτροφόρησης ή ανοσοκαθήλωσης ορού ή ούρων δεν παρατηρείται ύπαρξη Μ παραπρωτεΐνης. Για το τελευταίο κριτήριο υπάρχουν κάποιες εξαιρέσεις. Το πιο αβέβαιο κριτήριο για τη διάγνωση αποτελεί το χρονικό διάστημα παρατήρησης που απαιτείται για τον αποκλεισμό της πιθανότητας γενίκευσης της ασθένειας. Το χρονικό διάστημα επιβίωσης στο 50% των ασθενών που πάσχουν από μονήρες πλασμοκύττωμα είναι 10 χρόνια.⁽⁵²⁾ Δεν υπάρχουν αποδείξεις ότι η χημειοθεραπεία επηρεάζει την πιθανότητα μεταλλαγής της ασθένειας σε πολλαπλό μυέλωμα. Μέσα σε ένα

διάστημα 3 ετών παρατηρείται η εμφάνιση μυελώματος στα 2/3 των ασθενών. Η θεραπεία περιλαμβάνει την χρήση ακτινοθεραπείας.⁽⁵³⁾ Για την παρακολούθηση της πορείας των ασθενών που πιθανόν πάσχουν από μονήρες πλασματοκύτωμα είναι απαραίτητες εξετάσεις ηλεκτροφόρησης, ανοσοηλεκτροφόρησης και ανοσοκαθήλωσης ορού και ούρων.

3.6 Εξωμυελικό Πλασμοκύτωμα (Extramedullary Plasmacytoma)

Το εξωμυελικό πλασματοκύτωμα είναι ένας όγκος πλασματοκυττάρων που εντοπίζεται έξω από το μυελό των οστών, συνήθως στην άνω αναπνευστική οδό, συμπεριλαμβανομένου της ρινικής κοιλότητας, του ρινοφάρυγγα και του λάρυγγα⁽⁵⁴⁾. Επίσης, είναι πιθανό να παρατηρήσουμε εξωμυελικά πλασματοκυτώματα στη γαστρεντερική οδό, στο κεντρικό νευρικό σύστημα, στην ουροδόχο κύστη, στο θυροειδή αδένα, στους όρχεις, στην παρωτίδα και στους λεμφαδένες.⁽⁵⁴⁾

Η διάγνωση βασίζεται στην εύρεση όγκου πλασματοκυττάρων με απουσία πολλαπλού μυελώματος, έπειτα από εξέταση του μυελού των οστών, ακτινογραφίας και κατάλληλων εξετάσεων αίματος και ούρων. Η θεραπεία περιλαμβάνει την χρήση ακτινοθεραπείας και η πρόγνωση της ασθένειας είναι αρκετά καλή.⁽⁵⁵⁾ Σε μια σειρά ασθενών μόνο 5 από τους 25 ασθενείς παρουσίασαν εξέλιξη της νόσου, εκ των οποίων ο ένας εμφάνισε οστικές βλάβες, σε δύο η ασθένεια εξελίχθηκε σε πολλαπλό μύελωμα και στους άλλους δύο εμφανίστηκαν πολλαπλά εξωμυελικά πλασμοκυτώματα.⁽⁵⁵⁾ Σε μία άλλη σειρά, 4 από τους 13 ασθενείς με εξωμυελικό πλασμοκύτωμα εμφάνισαν πολλαπλό μύελωμα μετά το πέρας μιας μέσης χρονικής διάρκειας 13 μηνών. Σε αρχικό στάδιο η ασθένεια μπορεί να είναι ιάσιμη⁽⁵⁶⁾.

4. ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΙΑ ΡΟΗΣ (Flow Cytometry)

Η κυτταρομετρία ροής είναι μία ποσοτική, πολυπαραγοντική και αυτοματοποιημένη μέθοδος μέτρησης και ανάλυσης των σημάτων που παράγονται καθώς μια μονήρης σωματιδιακή διάταξη διέρχεται μπροστά από μία φωτεινή δέσμη.⁽¹⁷⁾ Όταν η κυτταρομετρία αποσκοπεί στη μελέτη κυτταρικών πληθυσμών η σωματιδιακή διάταξη αφορά τα κύτταρα που βρίσκονται στο υπό εξέταση εναιώρημα (αίμα ή άλλα βιολογικά υγρά) . Είναι όμως δυνατόν με την κυτταρομετρία ροής να εξεταστούν και άλλα σωματίδια αδρανούς υλικού, τα οποία χρησιμοποιούνται για την ανίχνευση προσροφήσιμων ουσιών (π.χ αντιγόνων ή αντισωμάτων κ.ά.) σε βιολογικά υγρά. Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκαν εναιωρήματα μυελού των οστών. Η κυτταρομετρία εξετάζει τις κυτταρικές παραμέτρους με μεγάλο ρυθμό, επιτρέποντας τον προσδιορισμό σπάνιων κυτταρικών χαρακτηριστικών και, κατά συνέπεια, τον εντοπισμό και τη μελέτη πολύ μικρών κυτταρικών πληθυσμών. Επιπρόσθετα, σε αντίθεση με το σύνολο σχεδόν των αναλυτικών μεθόδων, όπου οι κυτταρικές παράμετροι προσδιορίζονται ως μέσος όρος των τιμών στον αντίστοιχο κυτταρικό πληθυσμό, στην κυτταρομετρία ο προσδιορισμός των παραμέτρων γίνεται για κάθε κύτταρο ξεχωριστά.⁽¹⁷⁾

4.1 Περιγραφή της μεθόδου

Βασικό στοιχείο των κυτταροομέτρων είναι το υδροδυναμικό σύστημα, με το οποίο επιτυγχάνεται η μονήρης κυτταρική (ή άλλη σωματιδιακή) διάταξη, που επιτρέπει την πρόσπτωση της φωτεινής δέσμης και τη μέτρηση των υπό μελέτη παραμέτρων για κάθε κύτταρο ξεχωριστά. Πρόκειται για μία χοανοειδή κατασκευή (flow cell= κυψέλη ροής), μέσω της οποίας διοχετεύεται υπό πίεση

ένα υγρό (ρυθμιστικό διάλυμα, sheath fluid) με αποτέλεσμα τη δημιουργία του φαινομένου του Bernoulli. Ρυθμίζοντας κατάλληλα τις σχετικές ταχύτητες του υγρού και του κυτταρικού εναιωρήματος, η διάμετρος του κεντρικού άξονα ροής διαμορφώνεται έτσι, ώστε να αντιστοιχεί στη διάμετρο των κυττάρων, γεγονός που τα αναγκάζει να διατάσσονται το ένα κατόπιν του άλλου.⁽²⁶⁾

Καθώς η μονήρης κυτταρική διάταξη διέρχεται από το ρύγχος της κυψέλης ροής, προσπίπτει κάθετα επ' αυτής μια δέσμη laser προκαλώντας σκεδασμό του φωτός. Η ένταση του σκεδαζόμενου φωτός που εκπέμπεται κατά τη φορά της φωτεινής δέσμης (πρόσθιος σκεδασμός, forward scatter- FS) είναι ανάλογη του μεγέθους των κυττάρων, ενώ η ένταση του σκεδαζόμενου φωτός που εκπέμπεται κατά ορθή γωνία προς τη φορά της δέσμης (πλάγιος σκεδασμός, side scatter-SS), σχετίζεται με το σχήμα και την οπτική ομοιογένεια (κοκκίωση) των κυττάρων. Στην περίπτωση που έχει προηγηθεί, όπως και στην παρούσα εργασία, σύνδεση ορισμένων μεμβρανικών ή ενδοκυττάρων συστατικών με φοριοσημασμένα μονοκλωνικά αντισώματα, η επί των κυττάρων πρόσπτωση της φωτεινής δέσμης προκαλεί διέγερση των φθοριοχρωμάτων και εκπομπή αντίστοιχων σημάτων φθορισμού.⁽²¹⁾

Η παρουσίαση και ανάλυση των σημάτων γίνεται με τη χρήση ιστογραμμάτων κατανομής, στικτογραμμάτων (dot plots) και περιμετρικών διαγραμμάτων (contour plots). Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκαν για την ανάλυση στικτογράμματα πρόσθιου και πλάγιου σκεδασμού, που επιτρέπουν την διάκριση των βασικών υποπληθυσμών των λευκοκυττάρων. Το λογισμικό των κυτταρομέτρων επιτρέπει τη χάραξη περιοχής (gating) γύρω από τον υποπληθυσμό που μας ενδιαφέρει, καθώς και το διαχωρισμό των στικτογραμμάτων σε τεταρτημόρια που περιλαμβάνουν τα κύτταρα που είναι θετικά για καθεμιά από τις δύο σημάσεις, τα θετικά και αρνητικά για τα φθοριοσημασμένα μονοκλωνικά αντισώματα.^(21,26)

B. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Συλλέχθηκε μυελός των οστών από 17 ασθενείς, εκ των οποίων 9 ήταν άντρες και 8 γυναίκες, με μέση ηλικία τα 63 έτη και εύρος 48-87 έτη. Τα δημογραφικά και βιολογικά χαρακτηριστικά των ασθενών φαίνονται στον πίνακα 1.

ΑΣΘΕΝΕΙΣ	ΦΥΛΟ	ΗΛΙΚΙΑ	ΤΥΠΟΣ ΜΜ
1	άρρεν	48	IgA-λ
2	θήλυ	52	IgG-κ
3	θήλυ	72	IgA-κ
4	άρρεν	51	IgG-λ
5	θήλυ	51	Kappa light chain
6	θήλυ	63	IgA-κ
7	άρρεν	79	IgG-λ
8	άρρεν	75	IgG-κ
9	άρρεν	53	Kappa light chain
10	θήλυ	66	IgA-κ
11	θήλυ	87	IgG-λ
12	άρρεν	70	IgG-κ
13	θήλυ	61	Nonsecretory
14	θήλυ	72	IgG-λ
15	άρρεν	58	IgG-κ
16	άρρεν	56	IgG-κ
17	άρρεν	62	IgG-λ

Πίνακας 1: Δημογραφικά και βιολογικά χαρακτηριστικά των ασθενών της μελέτης

Για τη μελέτη των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκαν ένας αιματολογικός αναλυτής, το κυτταροόμετρο ροής διπλού laser της εταιρείας BECKMAN - COULTER και φθοριοσημασμένα (FITC, PE, PC5) μονοκλωνικά αντισώματα των εταιρειών BECKMAN και DAKO. Διαφορετικά μονοκλωνικά αντισώματα, ειδικά για εξωκυττάρια και ενδοκυττάρια αντιγόνα, χρησιμοποιήθηκαν σε δύο διαφορετικά πρωτόκολλα για τον διαχωρισμό και εντοπισμό του συνολικού πληθυσμού των πλασματοκυττάρων και για τον ακριβή χαρακτηρισμό αυτών ως παθολογικών και

μη. Πιο συγκεκριμένα χρησιμοποιήθηκαν μονοκλωνικά αντισώματα έναντι των CD38, CD138, CD56, CD27, CD28, CD19, CD20 και CD117 (Πίνακας 2).

Πίνακας 2: Μόρια σχετιζόμενα με το πολλαπλό μυέλωμα

- CD38: είναι μια διαμεμβρανική γλυκοπρωτεΐνη με ενζυμική δραστηριότητα που εκφράζεται στην επιφάνεια των κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος (λευκοκύτταρα), συμπεριλαμβάνοντας τα CD4⁺, CD8⁺, B και φυσικά κυτταροκτόνα κύτταρα. Συμμετέχει στη προσκόλληση των κυττάρων, στη μεταγωγή σήματος και στη ρύθμιση του ενδοκυττάριου ασβεστίου.^(3,23)
- CD138 (syndecan-1): είναι μια διαμεμβρανική πρωτεογλυκάνη που μεσολαβεί στη σηματοδότηση των κυττάρων, στη προσκόλληση μεταξύ κυττάρων και στη διαμόρφωση του κυτταροσκελετού. Στο μυελό των οστών εκφράζεται αποκλειστικά από τα πλασματοκύτταρα και χάνεται στα αποπτωτικά κύτταρα.^(3,15,23) Τόσο τα φυσιολογικά όσο και τα καρκινικά πλασματοκύτταρα εκφράζουν CD38 και CD138 αντιγόνα, όμως διαφέρουν ως προς το ποσοστό έκφρασης, επιτρέποντας εν μέρει τον διαχωρισμό τους (τα κύτταρα του μυελώματος εκφράζουν περισσότερο CD 138 και λιγότερο CD 38).⁽¹⁵⁾
- CD45 (κοινό λευκοκυτταρικό αντιγόνο): είναι μια πρωτεΐνη που απαιτείται για την ενεργοποίηση και ανάπτυξη των λεμφοκυττάρων. Η έκφρασή της μειώνεται κατά τη διαφοροποίηση των πλασματοκυττάρων. Στη περίπτωση του πολλαπλού μυελώματος απουσιάζει από τις επιφάνειες των πλασματοκυττάρων.^(3,23)
- CD19: πρωτεΐνη της επιφάνειας του υποδοχέα των B-λεμφοκυττάρων κωδικοποιούμενη από το γονίδιο CD19. Λειτουργεί μειώνοντας τον ουδό διέγερσης των εξαρτώμενων από τα αντιγόνα υποδοχέων. Απουσιάζει από τα κλωνικά πλασματοκύτταρα.^(3,23)

Πίνακας 2 (συνέχεια)

- CD20: είναι αντιγόνο της επιφάνειας των ώριμων B-κυττάρων το οποίο είναι κατά κανόνα απών στο πολλαπλό μυέλωμα.^(3,23,24)
- CD56 (Neural Cell Adhesion Molecule, NCAM): αντιπροσωπευτικό αντιγόνο των φυσικών κυτταροκτόνων κυττάρων. Τα κύτταρα του μυελώματος υπερεκφράζουν CD56, σε αντίθεση με τα φυσιολογικά πλασματοκύτταρα.^(3,23)
- CD28: ειδικό αντιγόνο των T- κυττάρων (τμήμα του υποδοχέα των T-κυττάρων) και δεν εκφράζεται από τα φυσιολογικά πλασματοκύτταρα. Τα κύτταρα του μυελώματος εκφράζουν CD28, καθώς και τον ένα από τους δύο συνυποδοχείς του, τον CD86. Έχει παρατηρηθεί αύξηση της έκφρασης του CD28 κατά την πορεία της ασθένειας^(3,23,25).
- CD117: υποδοχέας με δράση κινάσης τυροσίνης τύπου III που εκφράζεται στην επιφάνεια των αιμοποιητικών βλαστικών κυττάρων καθώς και σε άλλους τύπους κυττάρων. Όταν ο υποδοχέας προσδένεται στο παράγοντα των βλαστικών κυττάρων (stem cell factor, SCF) δημιουργεί ένα διμερές που ενεργοποιεί τη δράση κινάσης τυροσίνης. Ως αποτέλεσμα είναι η ενεργοποίηση σηματοδοτικών μορίων μέσω φωσφορυλίωσης. Η σηματοδότηση διαμέσου του CD117 διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στο πολλαπλασιασμό, διαφοροποίηση αλλά και την επιβίωση των κυττάρων.^(3,23) Έκφραση του αντιγόνου CD117 σε μυέλωμα έχει συσχετιστεί με καλύτερη πρόγνωση της ασθένειας.⁽¹⁰⁾
- CD27: δείκτης μνήμης που εκφράζεται στα βλαστικά κύτταρα, σε κύτταρα μνήμης και πλασματοκύτταρα. Είναι από τις σημαντικότερες πρωτεΐνες που δεν εκφράζονται κατά κανόνα στο πολλαπλό μυέλωμα. Η έκφρασή του, ωστόσο, σε κάποιες περιπτώσεις έχει σχετιστεί με καλύτερη πρόγνωση της ασθένειας.^(3,12,23)

1. ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΑ ΑΝΟΣΟΦΑΙΝΟΤΥΠΙΚΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

1.1 ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΠΛΑΣΜΑΤΟΚΥΤΤΑΡΩΝ

Σε σωληνάρια τοποθετούνται από 100 μl δείγματος και 10 μl του αντίστοιχου μονοκλωνικού αντισώματος (πίνακας 3). Τα χαρακτηριστικά των μονοκλωνικών αντισωμάτων που χρησιμοποιήθηκαν περιγράφονται στον πίνακα 4. Ακολουθεί ανάδευση και επώαση στο σκοτάδι για 15 λεπτά. Η ανάγκη για επώαση ελλείψει φωτός έγκειται στη φωτοευαισθησία των μονοκλωνικών αντισωμάτων έως ότου πραγματοποιηθεί η πρόσδεσή τους στα αντίστοιχα μεμβρανικά συστατικά. Στη συνέχεια προστίθεται 1 ml Versalyse για να πραγματοποιηθεί λύση των ερυθροκυττάρων, διότι τα ερυθροκύτταρα μπορεί να δώσουν ψευδώς θετικά αποτελέσματα λόγω του φθορισμού του Fe^{3+} που περιέχουν. Ακολουθεί ανάδευση και τοποθέτηση των δειγμάτων σε κατάσταση ηρεμίας για δέκα λεπτά. Το πρώτο σωληνάριο περιέχει μονοκλωνικά αντισώματα χωρίς συγκεκριμένη ειδικότητα και χρησιμοποιείται ως μάρτυρας. Έπειτα από ανάλυση των δειγμάτων με το κυτταροόμετρο αναγνωρίζουμε τον πληθυσμό των πλασματοκυττάρων σύμφωνα με το στικτόγραμμα FS-SS, όπως φαίνεται στην εικόνα 1.

	FITCH	PE	PC5
1	IgG1	IgG1	CD45
2	CD38	CD56	CD45
3	CD38	CD138	CD45
4	CD38	CD27	CD45
5	CD38	CD28	CD45
6	CD38	CD19	CD45
7	CD38	CD20	CD45
8	CD38	CD117	CD45

Πίνακας 3: Συνδυασμός μονοκλωνικών αντισωμάτων που χρησιμοποιήθηκε στη παρούσα μελέτη για τον χαρακτηρισμό των πλασματοκυττάρων

1.2 ΕΝΔΟΚΥΤΤΑΡΙΑ ΚΛΩΝΙΚΟΤΗΤΑ ΠΛΑΣΜΑΤΟΚΥΤΤΑΡΩΝ

Η ενδοκυττάρια κλωνικότητα γίνεται για την εξακρίβωση της κλωνικότητας είτε της κ είτε της λ ελαφριάς αλυσίδας. Όταν ο λόγος των κ και λ αλύσεων είναι $0,5 < \kappa/\lambda < 4$, τότε θεωρούμε ότι τα πλασματοκύτταρα είναι πολυκλωνικά. Στην περίπτωση που $\kappa/\lambda >$ ή $\kappa/\lambda < 0,5$ τότε έχουμε εμφάνιση κλωνικότητας κατά κ ή κατά λ αντίστοιχα.⁽⁴⁾ Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήσαμε 2 σωληνάρια όπου το ένα ήταν ο μάρτυρας με IgG/IgG/CD38 και το άλλο ήταν $\kappa/\lambda/CD38$. Ως μάρτυρας χρησιμοποιήθηκαν τα αντισώματα mouse IgG2a FITC (code no. X0933) και rabbit F(ab')₂ PE (code no. X0930) της εταιρείας DAKO. Για την ανίχνευση των ελαφρών αλύσεων κ, λ χρησιμοποιήθηκαν τα αντισώματα Anti-human Kappa light chain (FITC)/Anti-human Lamda light chain (PE) [code no. FR481] της εταιρείας DAKO. Χρησιμοποιήθηκαν 100 μ l ολικού αίματος στο κάθε σωληνάριο και 1 ml Versalyse. Ακολουθεί ανάδευση και επώαση για 10 λεπτά. Έπειτα τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν στις 1600 στροφές για 5 λεπτά. Αδειάζεται το υπερκείμενο και γίνεται πλύση με PBS ξαναφυγοκεντρώντας

στις ίδιες συνθήκες. Αδειάζεται πάλι το υπερκείμενο, προστίθενται 20μl από το μονοκλωνικό αντίσωμα CD38 PC5. Ακολουθεί ανάδευση και επώαση στο σκοτάδι για 15 λεπτά. Στη συνέχεια προστίθενται 100 μl Fix & Perm A (διάλυμα που επιτρέπει τη δημιουργία πόρων στη κυτταρική μεμβράνη) και στα δυο σωληνάρια. Γίνεται ανάδευση, επώαση για 15 λεπτά και πλύση με PBS στις 1600 στροφές για 5 λεπτά. Έπειτα διατηρείται το ίζημα σε κάθε σωληνάριο, το οποίο αναδεύεται και ακολούθως προστίθενται 100 μl Fix & Perm B (διάλυμα που σταθεροποιεί τη δέσμευση των μονοκλωνικών αντισωμάτων) σε κάθε σωληνάριο. Τα σωληνάρια διατηρούνται σε ηρεμία για 5 λεπτά. Προστίθενται από 20 μl από τα μονοκλωνικά για την ενδοκυττάρια χρώση, δηλαδή το Dual control (G1/G1) στο σωληνάριο που χρησιμοποιείται ως μάρτυρας και κ/λ στο άλλο σωληνάριο. Τα σωληνάρια αναδεύονται και επωάζονται για 15 λεπτά. Τέλος, γίνεται πλύση με PBS στις 1600 στροφές για 5 λεπτά, απομακρύνεται το υπερκείμενο, γίνεται ανάδευση, προστίθεται από 1 ml PBS σε κάθε σωληνάριο και αναλύονται τα δείγματα στο κυτταροόμετρο.

Mab	Κλώνος	Φθοριόχρωμα	Προέλευση	Cat. No.
CD38	T16	FITC	Beckman Coulter	A0778
CD138	BB4	PE	Beckman Coulter	A54190
CD20	B9E9	PE	Beckman Coulter	IM1451
CD19	J4.119	PE	Beckman Coulter	A07769
CD27	IA4CD27	PE	Beckman Coulter	IM2578
CD28	CD28.2	PE	Beckman Coulter	IM2071
CD56	N901	PE	Beckman Coulter	A07788
CD117	95C3	PE	Beckman Coulter	IM1360
CD45	J.33	PC5	Beckman Coulter	A07785
CD38	LS198-4-3	PC5	Beckman Coulter	A07780

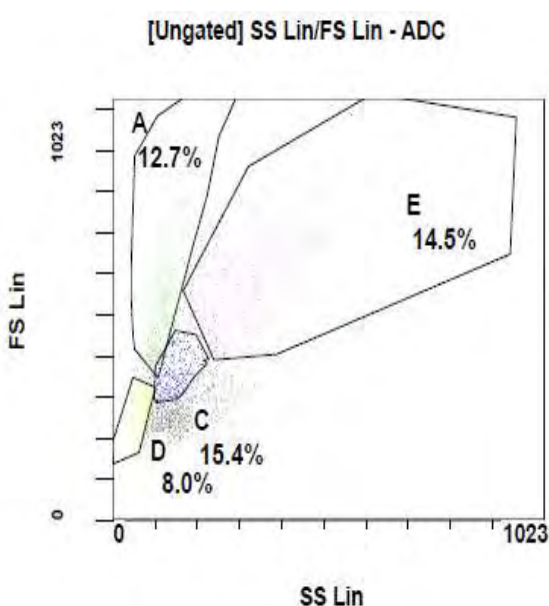
Πίνακας 4: Χαρακτηριστικά των μονοκλωνικών αντισωμάτων που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη

Γ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

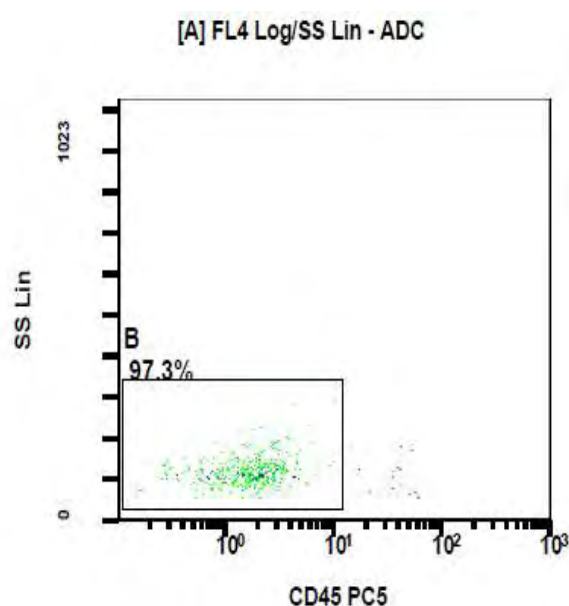
1. ΑΝΟΣΟΦΑΙΝΟΤΥΠΙΚΗ ΕΙΚΟΝΑ

Η παρουσίαση και η ανάλυση ενός δείγματος μυελού των οστών όπως προκύπτει έπειτα από χρήση κυτταρομετρίας ροής γίνεται με τη χρήση στικτογραμμάτων πρόσθιου και πλάγιου σκεδασμού.

A



B



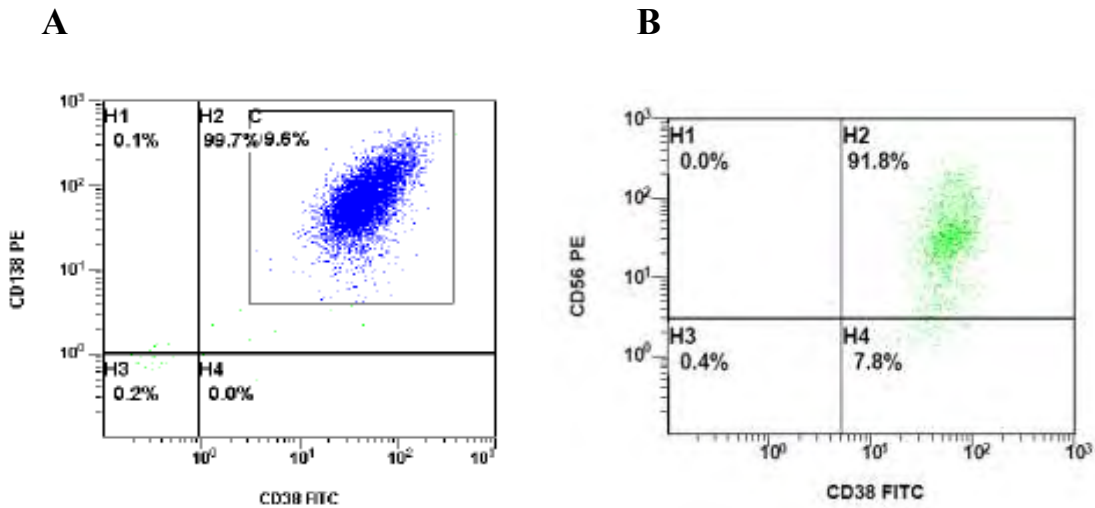
Εικόνα 1: A. Διαχωρισμός των κυτταρικών πληθυσμών επιλέγοντας το συνολικό πληθυσμό των πλασματοκυττάρων (gate A), λεμφοκυττάρων (gate D), μονοκυττάρων (gate C) και πολυμορφοπύρηνων (gate E) B. Επιλογή μυελωματικών πλασματοκυττάρων (gate B) χρησιμοποιώντας συνδυασμό πλάγιου σκεδασμού και CD45 PC5.

Στην εικόνα 1A βλέπουμε το στικτόγραμμα FS – SS και τη χάραξη των περιοχών των διαφορετικών κυτταρικών πληθυσμών από την ανάλυση μυελού των οστών ασθενούς με πολλαπλό μύελωμα. Ένα στικτόγραμμα FS – SS απεικονίζει τον τρόπο κατανομής των κυτταρικών πληθυσμών του μυελού των οστών του ασθενούς. Ο διαχωρισμός των κυττάρων γίνεται βάσει του μεγέθους και της

κοκκίωσης τους. Για παράδειγμα στην εικόνα 1Α βλέπουμε την κατανομή των κυταρρικών πληθυσμών του μυελού των οστών ενός ασθενούς σε τέσσερις περιοχές. Στην περιοχή Α εμφανίζονται τα πλασματοκύτταρα λόγω του μεγάλου μεγέθους και της έλλειψης κοκκίωσης στην επιφάνεια. Η περιοχή C αποτελείται από τα μονοκύτταρα (μεσαίο μέγεθος και κοκκίωση), στη περιοχή D παρατηρούμε τα λεμφοκύτταρα (μικρό μέγεθος και έλλειψη κοκκίωσης) και τέλος στη περιοχή E βλέπουμε τα πολυμορφοπύρηνα (μεγάλο μέγεθος και υψηλός βαθμός κοκκίωσης). Στο στικτόγραμμα αυτό παρατηρείται επίσης δίπλα στον πληθυσμό των λεμφοκυττάρων μια υποομάδα κυττάρων τα οποία δεν συμπεριλαμβάνονται στη μελέτη (ungated; γκρι χρώμα). Επειδή δίπλα στο πληθυσμό των λεμφοκυττάρων δεν υπάρχει υπό κανονικές συνθήκες κάποιος άλλος πληθυσμός συμπεραίνουμε ότι τα κύτταρα αυτά είναι νεκρά.

Με τη βοήθεια του κυτταροομέτρου μπορούμε να επιλέξουμε ένα συγκεκριμένο πληθυσμό και να χρησιμοποιήσουμε διαφορετικές παραμέτρους για την εξακρίβωση των μυελωματικών κυττάρων. Κάνοντας το στικτόγραμμα SS-CD45PC5 (εικόνα 1B) για τον πληθυσμό των πλασματοκυττάρων (gate A) επιλέγουμε τον πληθυσμό ο οποίος είναι αρνητικός για την έκφραση του CD45. Κριτήριο για την διάκριση μεταξύ του θετικού και του αρνητικού πληθυσμού αποτελεί η τιμή της τετμημένης. Τα κύτταρα που εμφανίζουν τιμή $<10^1$ συμπεριλαμβάνονται στον αρνητικό πληθυσμό. Συγκεκριμένα στην εικόνα 1B βλέπουμε ένα πληθυσμό πλασματοκυττάρων που δεν εκφράζουν CD45 (gate B) της τάξης του 97,3%, ενδεικτικό στοιχείο των πλασματοκυττάρων.

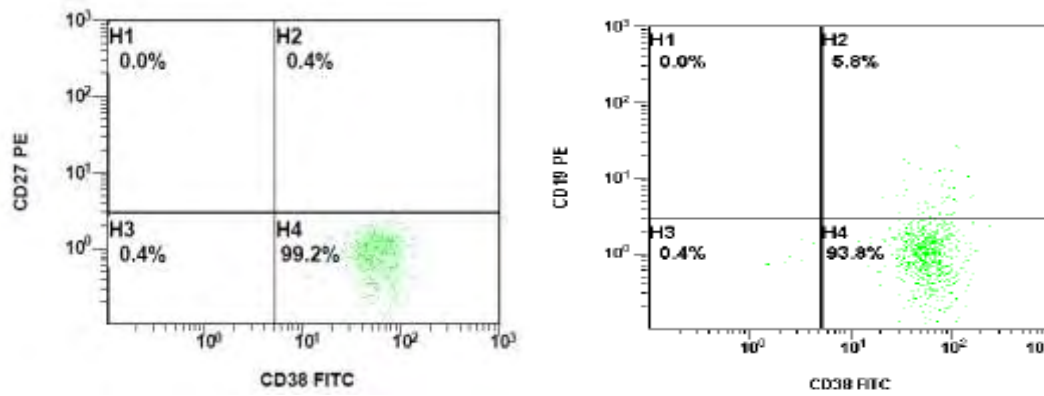
Η ανοσοφαινοτυπική μελέτη με τη χρήση των υπόλοιπων μονοκλωνικών αντισωμάτων πραγματοποιείται στον πληθυσμό των κυττάρων που έχουν βρεθεί ότι δεν εκφράζουν CD45.



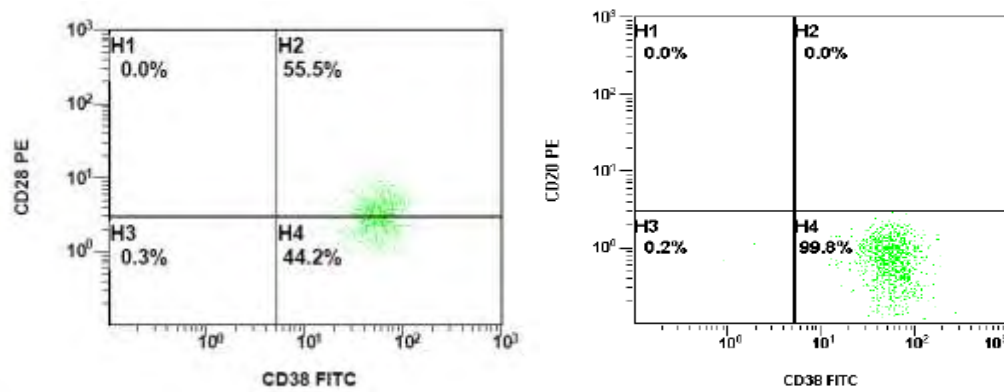
Εικόνα 2: **A.** Παρατηρείται συνέκφραση CD38 και CD138, και **B.** Παρατηρείται υπερέκφραση CD56 σε συνδυασμό με συνέκφραση CD38 που αντιστοιχεί σε νεοπλασματικά πλασματοκύτταρα.

Στην εικόνα 2A βλέπουμε τα στικτογράμματα CD38 FITCH - CD138 PE και στην εικόνα 2B τα στικτογράμματα CD38 FITCH - CD56 PE. Για την ολοκλήρωση της ανοσοφαινοτυπικής εικόνας προχωρήσαμε και σε ανάλυση των μονοκλωνικών αντισωμάτων CD19, CD20, CD27, CD28, CD117, καθώς και της κλωνικότητας κατά κ ή λ. Παραδείγματα της ανάλυσης παρουσιάζονται στην Εικόνα 3.

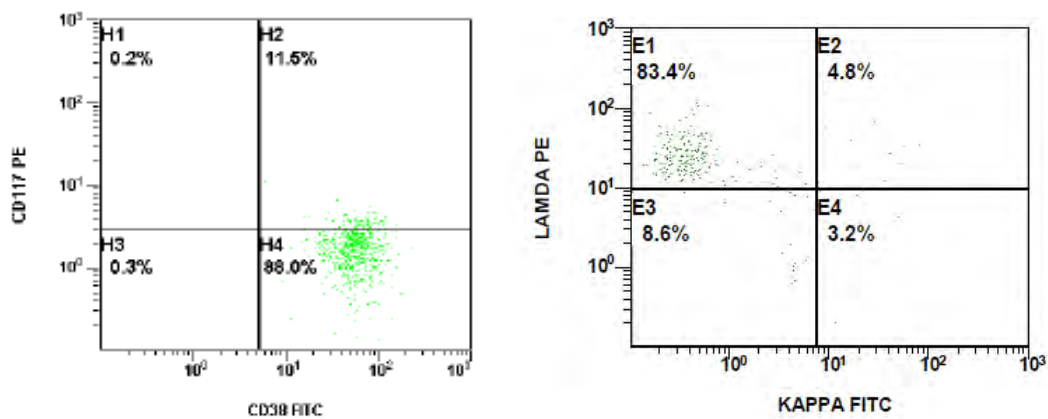
A



B



C



Εικόνα 3: **A.** Αρνητική έκφραση CD27 και CD19, **B.** Αρνητική έκφραση CD20 και ασθενώς θετική έκφραση CD28, **C.** Αρνητική έκφραση CD117 και εμφάνιση μονοκλωνικότητας στη λ αλυσίδα.

2. ΑΝΑΛΥΣΗ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ

Ο ανοσοφαινότυπος δειγμάτων μυελού των οστών, όπως προκύπτει έπειτα από εφαρμογή της κυτταρομετρίας ροής, μας επιτρέπει να εξάγουμε συμπεράσματα τόσο για το γενικό πληθυσμό των κυττάρων που βρίσκονται στο δείγμα όσο και πιο ειδικά συμπεράσματα, που στην παρούσα εργασία αφορούν αποκλειστικά τον πληθυσμό των πλασματοκυττάρων. Στη συγκεκριμένη εργασία έγινε ανάλυση δείγματος μυελού των οστών από 17 ασθενείς με πολλαπλό μυέλωμα, χρησιμοποιώντας κυτταρομέτρο διπλού laser και τριπλό φθορισμό επιτρέποντας την ταυτόχρονη αναγνώριση τριών μονοκλωνικών αντισωμάτων. Τα αποτελέσματα που λήφθηκαν συνοψίζονται στους πίνακες 5 και 6. Ο πίνακας 5 περιλαμβάνει τις συχνότητες των συνολικών κυτταρικών πληθυσμών των ασθενών όπως αυτές προκύπτουν από το στικτόγραμμα FS-SS. Η πρώτη στήλη δείχνει μια γενική εικόνα του κυτταρικού πληθυσμού του μυελού των οστών, ενώ στις υπόλοιπες στήλες βλέπουμε το ποσοστό των μονοκυττάρων, των λεμφοκυττάρων και των πλασματοκυττάρων. Στην τελευταία στήλη συμπεριλαμβάνεται ο λόγος κ/λ όπως προκύπτει από το στικτόγραμμα ενδοκυττάριας κλωνικότητας. Μια πρώτη ένδειξη της νόσου αποτελεί η ύπαρξη πλασματοκυττάρων στο μυελό σε ποσοστό $\geq 10\%$. Ωστόσο, το ποσοστό των πλασματοκυττάρων στο μυελό είναι πάντα μικρότερο απ'ότι κατά την μορφολογική εκτίμηση. Αυτό οφείλεται σε καταστροφή ή λύση κυττάρων κατά την ως άνω περιγραφόμενη διαδικασία. Συνεπώς, η κυτταρομετρική ανάλυση δεν αποδίδει το ποσοστό διήθησης της νόσου και πρέπει πάντα να συνεκτιμάται με τη μορφολογία του μυελού, που θα αναδείξει και το ακριβές ποσοστό διήθησης από τη νόσο. Παρατηρούμε ότι 9 από τους 17 ασθενείς (53%) που μελετήθηκαν εμφανίζουν ποσοστό πλασματοκυττάρων $>10\%$, ενώ 8 από τους 17 ασθενείς (47%) εμφανίζουν πληθυσμό πλασματοκυττάρων $<10\%$ (ασθενείς 3, 5, 7, 8, 12, 13, 15 και 17).

Ένα άλλο χαρακτηριστικό γνώρισμα του πολλαπλού μυελώματος ήταν η εμφάνιση κλωνικότητας των ενδοκυττάρων ελαφρών αλύσων κ ή λ. Όλοι οι ασθενείς

εμφανίζουν μονοκλωνικότητα και συγκεκριμένα 11 από τους 17 ασθενείς (64,7%) εμφάνισαν κλωνικότητα κατά κ ενώ το 35,3% κλωνικότητα κατά λ. Ακολούθησε ανάλυση και των υπόλοιπων μονοκλωνικών αντισωμάτων όπως περιγράφηκε στη μεθοδολογία. Στον πίνακα 6 αναγράφονται τα ποσοστά των ειδικών, για την αναγνώριση του πολλαπλού μυελώματος, αντιγόνων που αντιστοιχούν στον πληθυσμό των πλασματοκυττάρων, όπως αυτός παρουσιάζεται στον πίνακα 5.

ΑΣΘΕΝΕΙΣ	FC myeloid %	FC monocytes %	FC lymphocytes %	FC plasma cells %	κ/λ polycl.
1	62,5	4	20	15	0,001
2	36,1	3,2	43,8	17,7	921
3	74,7	2,3	17,6	5	455
4	56,1	5,6	15,6	19,2	214,6
5	36	7	51	1	109
6	63,5	2	18,5	15,9	784
7	48,9	11,1	37,2	3,2	0,01
8	58,9	6,2	25,6	9,1	0,03
9	3,6	0,1	6	82,5	692
10	53	1,9	13,9	30,2	188
11	31,6	10,8	18	38	0,001
12	61,7	1,9	26,6	9,6	418
13	61,5	4,3	27,2	6,8	110
14	46	4,7	38	10,2	0,03
15	81,3	4,7	8,9	5	0,03
16	39,3	3,3	14,7	12,7	984
17	78	2,7	14	7,3	476

Πίνακας 5: Συχνότητες των κυτταρικών πληθυσμών των ασθενών

ΑΣΘΕΝΕΙΣ	CD38	CD138	CD56	CD27	CD28	CD19	CD20	CD117
	%	%	%	%	%	%	%	%
1	99,3	99,5	94	0,2	2,7	0,1	0	9,4
2	99,6	42	0,1	0,1	3,2	0,5	0,1	3,3
3	99,1	94,4	97	1,8	9,4	0,5	0	3,5
4	99	92	86	1	35	0,6	0,9	26
5	84,8	80,6	12	65	0	44	0	1,5
6	98,3	89,7	82	2,3	8,7	0,8	0,1	19,9
7	92,6	91,4	89	0,9	1,1	0	0	0
8	97,7	77,4	36	13	41	3	0	41,3
9	96,7	99,3	63	0,5	10	0,1	59	37,4
10	99,9	99,7	99	0	1,4	0	0,1	2,2
11	99,6	99,3	99	2,1	92	0,1	30	1,4
12	90,1	88	5	3,7	7,8	4,6	0	16,2
13	99,2	90,7	76	7,9	7,2	1,2	1,9	6,5
14	99,5	99	99	0,4	0,9	0	0	0,8
15	85,6	85,4	82	78	6,2	0,7	0,7	1,4
16	95	97	93	8,1	4	0,1	0,1	4
17	82,2	56	9,4	0	23	0,2	0,5	63,1

Πίνακας 6: Συχνότητες έκφρασης των CD38, CD138, CD56, CD27, CD28, CD19, CD20, CD117 στο πληθυσμό των PCs.

Χαρακτηριστικά παρατηρούμε ότι οι ασθενείς 1, 4, 6, 10, 14 και 16 που έχουν αυξημένο αριθμό πλασματοκυττάρων εμφανίζουν τον αναμενόμενο ανοσοφαινότυπο του πολλαπλού μυελώματος, όπως έχει αναφερθεί προηγουμένως. Δηλαδή υψηλή

έκφραση των CD38, CD138 και CD56, απουσία έκφρασης των CD19, CD20 και CD27 και χαμηλή έκφραση CD28 και CD117. Τον ίδιο ανοσοφαινότυπο παρουσιάζουν και οι ασθενείς 3, 7 και 13 των οποίων ο πληθυσμός των πλασματοκυττάρων είναι <10%. Μία παραλλαγή στον συγκεκριμένο φαινότυπο της νόσου εμφανίζουν οι ασθενείς 2, 5, 8, 12 και 17, στους οποίους ο χαρακτηριστικός δείκτης CD56 βρίσκεται σε χαμηλότερα από τα προβλεπόμενα επίπεδα.

Για την λεπτομερή ανάλυση του ανοσοφαινότυπου κάθε ασθενούς είναι σημαντική η παρατήρηση της έντασης έκφρασης κάθε αντιγόνου. Η ένταση της έκφρασης βαθμονομήθηκε ως εξής : 0, αρνητικό · 1+, ασθενώς θετικός πληθυσμός· 2+, θετικός πληθυσμός· 3+, ισχυρά θετικός πληθυσμός.

Όπως προέκυψε από την ανάλυση των δεδομένων, όλοι οι ασθενείς εκφράζουν ισχυρά CD38, το 94,1% αυτών εκφράζει ισχυρά CD138 και 70,6% εκφράζει ισχυρά CD56. Επιπλέον, τα CD19 και CD20 είναι αρνητικά στο 82,4% των ασθενών και μόνο σε ένα μικρό ποσοστό παρατηρήθηκε ασθενής έκφραση. Τα CD28 και CD117 παρουσιάζουν μία ασθενή (52,9% και τα δυο) έως μέτρια έκφραση (23,5% και 29,4% αντίστοιχα). Τέλος, το CD27 είναι αρνητικό στο 47,1% και ασθενώς θετικό στο 29,4% των ασθενών. Στην πλειοψηφία η εικόνα των ασθενών κατά την ανοσοφαινοτυπική μελέτη είναι CD38⁺⁺⁺ CD138⁺⁺⁺ CD56⁺⁺⁺ CD19⁻ CD20⁻ CD27⁻ CD28⁺⁺ CD117⁺⁺.

Δ. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Το πολλαπλό μυέλωμα χαρακτηρίζεται από το νεοπλασματικό πολλαπλασιασμό ενός κλώνου πλασματοκυττάρων ο οποίος οδηγεί στη παραγωγή μονοκλωνικής αιμοσφαιρίνης. Στη παρούσα εργασία μελετήθηκαν δείγματα μυελού των οστών 17 ασθενών με τη χρήση κυτταρομετρίας ροής για την ανοσοφαινοτυπική μελέτη του πολλαπλού μυελώματος. Η πρόσληψη, επεξεργασία και διατήρηση των δειγμάτων έγινε με τη χρήση αποστειρωμένων υλικών και σε κατάλληλες συνθήκες θερμοκρασίας. Για την ανάλυση των δειγμάτων χρησιμοποιήσαμε κυτταροόμετρο ροής διπλού laser και τριπλό φθορισμό.

Αρχικά έγινε διαχωρισμός του πληθυσμού των πλασματοκυττάρων από τα άλλα κύτταρα του μυελού, σύμφωνα με την έκφραση ή όχι του CD45. Το CD45 θεωρείται ως κοινό λευκοκυτταρικό αντιγόνο και εντοπίζεται σε όλα τα αιμοποιητικά κύτταρα με εξαίρεση τα αιμοπετάλια και τα ερυθροκύτταρα. Κατά την ωρίμανση των B λεμφοκυττάρων παρατηρείται σταδιακή απώλεια του αντιγόνου αυτού με αποτέλεσμα τα ώριμα πλασματοκύτταρα να μην το εκφράζουν. Αφού έγινε αναγνώριση του πληθυσμού των πλασματοκυττάρων στη συνέχεια έγινε ανάλυσή του.

Με το πέρας της ανάλυσης παρατηρήσαμε ότι τα νεοπλασματικά πλασματοκύτταρα χαρακτηρίζονται από ισχυρή έκφραση CD38, CD138 και CD56, αρνητική έκφραση CD19 και CD20 και μέτρια έκφραση CD28. Επιπλέον, παρατηρήσαμε κυρίως ασθενή έκφραση CD117.

Μια πρώτη ένδειξη της ασθένειας αποτελεί η εμφάνιση ενός πληθυσμού πλασματοκυττάρων σε ποσοστό $\geq 10\%$. Από τους 17 ασθενείς το 53% αυτών παρουσίαζε αυτό το ποσοστό πλασματοκυττάρων και τον προαναφερόμενο ανοσοφαινότυπο πολλαπλού μυελώματος. Ωστόσο, παρατηρήσαμε ότι ακόμα και ασθενείς με πληθυσμό πλασματοκυττάρων σε ποσοστό $< 10\%$ (το 47% των ασθενών) πάσχουν από πολλαπλό μυέλωμα όπως φαίνεται απο τον

ανοσοφαινότυπό τους, καθώς και από την εκτίμηση της μορφολογίας του μυελού. Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, η παρουσία των πλασματοκυττάρων στο μυελό σε ποσοστό μικρότερο από το αναμενόμενο μπορεί να οφείλεται σε καταστροφή ή λύση των κυττάρων κατά την επεξεργασία των δειγμάτων. Για το λόγο αυτό η κυτταρομετρική ανάλυση θα πρέπει πάντοτε να συνεκτιμάται με τη μορφολογία του μυελού. Ωστόσο, σύμφωνα με τη βιβλιογραφία η κυτταρομετρία ροής παρέχει περισσότερες πληροφορίες σε σύγκριση με τη μορφολογική εξέταση τόσο σε διαγνωστικό επίπεδο όσο και σε προγνωστικό. Για παράδειγμα, μπορεί να υπάρχει σε ορισμένες καταστάσεις αυξημένο ποσοστό πλασματοκυττάρων, π.χ. >10% ,ωστόσο αυτά να μην είναι κλωνικά, οπότε αποκλείεται η διάγνωση μυελώματος. (8,9)

Σε όλα τα δείγματα, παρά τη διαφορά στο πληθυσμό των πλασματοκυττάρων, παρατηρήσαμε υπερέκφραση των αντιγόνων CD38 και CD138, καθώς και αρνητική έκφραση των αντιγόνων CD19 και CD20 με εξαίρεση δύο ασθενείς (έναν για κάθε αντιγόνο). Χαρακτηριστική ήταν η χαμηλή ή αρνητική έκφραση του αντιγόνου CD56 σε 5 από τους 17 ασθενείς. Το αντιγόνο CD56 (NCAM) φυσιολογικά εκφράζεται στα φυσικά κυτταροκτόνα κύτταρα, ενώ υπερεκφράζεται στα μυελωματικά κύτταρα. Παρόλα αυτά ακόμα και ασθενείς με χαμηλή έκφραση CD56 πάσχουν από πολλαπλό μύελωμα και πιο συγκεκριμένα από πιο επιθετικής μορφής της ασθένειας.⁽²⁸⁾

Η ανοσοφαινοτυπική ανάλυση σε συνδυασμό με τη μορφολογική εκτίμηση του μυελού των οστών μας επιτρέπει να αναγνωρίσουμε την ασθένεια και το στάδιο στο οποίο βρίσκεται, καθώς και την πιθανότητα υποτροπής ασθενών που έχουν ακολουθήσει θεραπεία.⁽⁵⁾

Η σοβαρότητα της ασθένειας και η αδυναμία αντιμετώπισής της καθιστούν αναγκαία την έρευνα για την ανακάλυψη πιο αποτελεσματικών και χωρίς παρενέργειες θεραπειών. Η χρήση του ανοσοφαινοτύπου είναι μια πολλά

υποσχόμενη οδός προς αυτή την κατεύθυνση, διότι μας επιτρέπει να αναγνωρίσουμε τα υπεύθυνα για την ασθένεια μόρια αλλά και να παρατηρήσουμε την έκφραση αυτών έπειτα από την εφαρμογή θεραπευτικών πρωτοκόλλων. Η δυνατότητα αυτή μπορεί να οδηγήσει στην ανακάλυψη πιο στοχευμένων θεραπειών με σκοπό τη θεραπεία της νόσου.

Για παράδειγμα, στηριζόμενοι στο φαινότυπο θα μπορούσαμε να χρησιμοποιήσουμε στοχευμένες θεραπείες έναντι των CD38 και CD138 τα οποία εκφράζονται σε όλους τους ασθενείς.^(14,15) Επιπρόσθετα, μόρια επιφανείας, όπως CD19, CD20, CD27 ή CD117 θα μπορούσαν να είναι στόχος θεραπείας καλά καθορισμένων υποπληθυσμών της νόσου. Επίσης, μελέτες έχουν γίνει για τη σπουδαιότητα του CD56 στη παρακολούθηση υπολειμματικής νόσου σε ασθενείς που έχουν ακολουθήσει κάποια θεραπεία.⁽²⁹⁾

Συμπερασματικά, μπορούμε να πούμε πως η καθιέρωση του φαινοτύπου των κυττάρων του μυελώματος και ο διαχωρισμός τους από τα φυσιολογικά πλασματοκύτταρα αποτελεί σημαντικό εργαλείο στη διάγνωση και παρακολούθηση ασθενών με μυέλωμα, ενώ με βάση τις πληροφορίες που παρέχει θα μπορούσε να οδηγήσει την ανάδειξη θεραπευτικών στόχων για την καλύτερη αντιμετώπιση της νόσου.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Ronald Hoffman, Edward J. Benz, Sanford J. Shattil: HEMATOLOGY (Second Edition): Basic Principles and Practice. 87: 1360-1367, 1995
2. Kumar S, Kimlinger T, Morice W.: Immunophenotyping in multiple myeloma and related plasma cell disorders. *Best Pract Res Clin Haematol.* 23(3):433-51, 2010
3. Lin P, Owens R, Tricot G, Wilson CS: Flow cytometric immunophenotypic analysis of 306 cases of multiple myeloma. *Am J Clin Pathol.* 121(4):482-8, 2004
4. Marsee DK, Li B, Dorfman DM: Single tube, six-color flow cytometric analysis is a sensitive and cost-effective technique for assaying clonal plasma cells. *Am J Clin Pathol.* 133(5):694-9, 2010
5. Gupta R, Bhaskar A, Kumar L: Flow cytometric immunophenotyping and minimal residual disease analysis in multiple myeloma. *Am J Clin Pathol.* 132(5):728-32, 2009
6. Hutchinson AT, Ramsland PA, Jones DR, 2010: Free Ig light chains interact with sphingomyelin and are found on the surface of myeloma plasma cells in an aggregated form. 185(7):4179-88
7. Paiva B, Almeida J, Pérez-Andrés M: Utility of flow cytometry immunophenotyping in multiple myeloma and other clonal plasma cell-related disorders. *Cytometry B Clin Cytom.* 78(4):239-52, 2010
8. Cannizzo E, Bellio E, Sohani AR: Multiparameter immunophenotyping by flow cytometry in multiple myeloma: The diagnostic utility of defining ranges of normal antigenic expression in comparison to histology. *Cytometry B Clin Cytom.* 78(4):231-8, 2010
9. Paiva B, Vidriales MB, Pérez JJ: Multiparameter flow cytometry quantification of bone marrow plasma cells at diagnosis provides more prognostic information than morphological assessment in myeloma patients. *Haematologica* 94(11):1599-602, 2009
10. Schmidt-Hieber M, Pérez-Andrés M, Paiva B: CD117 expression in gammopathies is associated with an altered maturation of the myeloid and

lymphoid hematopoietic cell compartments and favorable disease features. *Haematologica* 96(2):328-32, 2011

11. Bataille R, Robillard N, Avet-Loiseau H: CD221(IGF-1R) is aberrantly expressed in multiple myeloma, in relation to disease severity. *Haematologica* 90:706-7, 2005

12. Moreau P, Robillard N, Jégo G: Lack of CD27 in myeloma delineates different presentation and outcome. *Br J Haematol.* 132:168-70, 2006

13. Robillard N, Wuilleme S, Lode L: CD33 is expressed on plasma cells of a significant number of myeloma patients, and may represent a therapeutic target . *Leukemia* 19:2021-2, 2005

14. von Strandmann EP, Hansen HP, Reiners KS: A novel bispecific protein (ULBP2-BB4) targeting the NKG2D receptor on natural killer (NK) cells and CD138 activates NK cells and has potent antitumor activity against human multiple myeloma in vitro and in vivo. *Blood* 107:1955-62, 2006

15. Lovell R, Dunn JA, Begum G: Soluble syndecan-1 level at diagnosis is an independent prognostic factor in multiple myeloma and the extent of fall from diagnosis to plateau predicts for overall survival. *Br J Haematol.* 130(4):542-8, 2005

16. De Vos J, Horse D, Rème T: Microarray-based understanding of normal and malignant plasma cells. *Immunol Rev.* 210:86-104, 2006

17. Rieseberg M, Kasper C, Reardon KF: Flow cytometry in biotechnology. *Appl Microbiol Biotechnol* 56:350-60, 2001

18. Kumar S, Rajkumar SV, Kimlinger T: CD45 expression by bone marrow plasma cells in multiple myeloma: clinical and biological correlations. *Leukemia* 19: 1466-70, 2005

19. Bardwick PA, Zvaifler NJ, Gill GN: Plasma cell dyscrasia with polyneuropathy, organomegaly, endocrinopathy, M protein and skin changes: the POEMS syndrome. *Medicine* 59:311-322, 1980

20. Takatsuki K, Sanada I: Plasma cell dyscrasia with polyneuropathy and endocrine disorder: clinical and laboratory features of 109 reported cases. *JJ Clin Oncol* 13:543-556, 1983

21. Herzenberg LA, De Rosa SC: Monoclonal antibodies and the FACS: complementary tools for immunobiology and medicine. *Immunol Today* 21:383-90, 2000

22. Andy C. Rawstron, Alberto Orfao, Meral Beksac: Report of the European Myeloma Network on multiparametric flow cytometry in multiple myeloma and related disorders. *haematol.* 431-438, 2008

23. Gema Mateo Manzanera, Jesús F. San Miguel Izquierdo, Alberto Orfao de Matos: Immunophenotyping of Plasma Cells in Multiple Myeloma. *Methods in Molecular Medicine* pp 5-24, 2005
24. Teresa Paino, Enrique M. Ocio, Bruno Paiva: CD20 positive cells are undetectable in the majority of multiple myeloma cell lines and are not associated with a cancer stem cell phenotype. *Haematologica* 97(7):1110-4, 2012
25. Jayakumar R. Nair, Louise M. Carlson, Chandana Koorella: CD28 Expressed on Malignant Plasma Cells Induces a Prosurvival and Immunosuppressive Microenvironment. *J Immunol.* 187(3):1243-53, 2011
26. Scaffold A, Kern F: Recent developments in flow cytometry. *J Clin Immunol.* 20:400-7, 2000
27. Greip PR, Lust JA, O'Fallon WM: Plasma cell labeling index and beta-microglobulin predict survival independent of thymidin kinase and C-reactive protein in multiple myeloma. *Blood* 81:3382-7, 1993
28. San Miguel JF, Gonzales M Gascon: Immunophenotyping heterogeneity of multiple myeloma: influence on the biology and clinical course of the disease. *Br J Haematol.* 77:185-90, 1991
29. Harrington AM, Hari P, Kroft SH: Utility of CD56 immunohistochemical Studies in Follow-up of Plasma Cell Myeloma. *Am J Clin Pathol.* 132(1):60-6, 2009
30. Turesson I, Zettervall O, Cuzick C: Comparison of trends of multiple myeloma in Malmo, Sweden and other countries, 1950-1979. *N Engl J Med* 310:421-4, 1984
31. Latreille J, Barlogie B, Jonston D: Ploidy and proliferative characteristics in monoclonal gammopathies. *Blood* 59:43-51, 1982
32. Dewald GW, Kyle RA, Hicks GA: The clinical significance of cytogenetic studies in 100 patients with multiple myeloma, plasma cell leukemia, or amyloidosis. *Blood* 66:380-90, 1985
33. Gould J, Alexanian R, Goodacre A: Plasma cell karyotype in multiple myeloma. *Blood* 71:453-6, 1988
34. Philip P: Chromosomes and monoclonal gammopathies. *Cancer Genet Cytogenet* 2:79-86, 1980
35. Meltzer B, Shadle K, Durie B: Somatic mutation alters a critical region of the c-myc gene in multiple myeloma. *Blood* 70:282, 1987
36. Selavanayagan P, Goodacre A, Strong L: Alterations of bcl-1 oncogene in human multiple myeloma. *Proc Am Assoc Cancer Res* 28:19, 1987

37. Selavanayagan P, Blick M, Narni F: Alteration and abnormal expression of the c-myc oncogene in human multiple myeloma. *Blood* 71:30 -5, 1988
38. Tsuchiya H, Epstein J, Selavanayan P: Correlated flow cytometric analysis of H-ras p21 and nuclear DNA in multiple myeloma. *Blood* 72:796-800, 1988
39. Ladanyi M, Wang S, Niesvizky R: Proto-oncogene analysis in multiple myeloma. *Am J Pathol* 141:949 -953 , 1992
40. Neri A, Baldini L, Trecca D: p53 gene mutations in multiple myeloma are associated with advanced form of malignancy. *Blood* 81:128 -135, 1993
41. Barker HF, Hamilton MS, Ball J: Expression of adhesion molecule LFA-3 and N-CAM on normal and malignant plasma cells. *Br J Haematol* 81:331-5., 1992
42. Epstein J: Myeloma phenotype: clues to disease origin and manifestation. *Haematol Oncol Clin North Am* 6:249 -56, 1992
43. Kawano M, Hirano T, Matsuda T: Autocrine generation and requirement of BSF-2/ IL-6 for human multiple myelomas. *Nature* 332:83 -5, 1988
44. Buss DH, Prichard RW, Cooper MR: Plasma cell dyscrasias. *Hematol Oncol Clin* 2:603 -615, 1988
45. Kyle RA: Monoclonal gammopathies and the kidney. *Annu Rev Med* 40:53 -60, 1989
46. Alpers Ce, Tu W-H: Single light chain subclass (kappa chain) immunoglobulin deposition in glomerulonephritis. *Hum Pathol* 16:294 -304., 1992
47. Berner B, Nagler A Viener A: Partial response of meningeal myeloma to craniospinal radiotherapy. *Scand J Haematol* 37:360 -2, 1986
48. Boccadoro M, Marmont F, Tribalto M: Early responded myeloma: kinetic studies identify a patient subgroup characterized by a very poor prognosis. *J Clin Oncol* 7:119 -25, 1989
49. Kyle Ra, Greip Pr: Smoldering multiple myeloma. *N Engl J Med* 302:1347 -1349, 1980
50. Dimopoulos MA, Moulopoulos A, Smith T: Risk of disease progression in asymptomatic multiple myeloma. *Am J Med* 94:57 -61, 1993
51. Cavo M.. Galieni P, Gobbi M: Nonsecretory multiple myeloma: presenting findings, clinical course and prognosis. *Acta Haematol* 74:27 -30, 1985
52. Frassica DA, Frassica FJ, Schray MF: Solitary plasmacytoma of bone: Mayo clinic experience. *Oncol BiolPhys* 16:43 -48, 1989
53. Chak LY, Cox RS, Bostwick DG: Solitary plasmacytoma of bone: treatment, progression and survival. *J Clin Oncol* 5:1811 -1815, 1987

54. Wiltshaw E: The natural history of extramedullary plasmacytoma and its relation to solitary myeloma of bone and myelomatosis. *Medicine* 55:217 -38, 1976
55. Knowling MA, Harwood AR, Bergsagel DE: Comparison of extramedullary plasmacytomas with solitary and multiple plasma cell tumors of bone. *J Clin Oncol* 1:255 -262, 1983
56. Meis JM, Buttler JJ, Osborne BM: Solitary plasmacytomas of bone and extramedullary plasmacytomas: a clinopathological and immunohistochemical study. *Cancer* 59:1457 , 1987