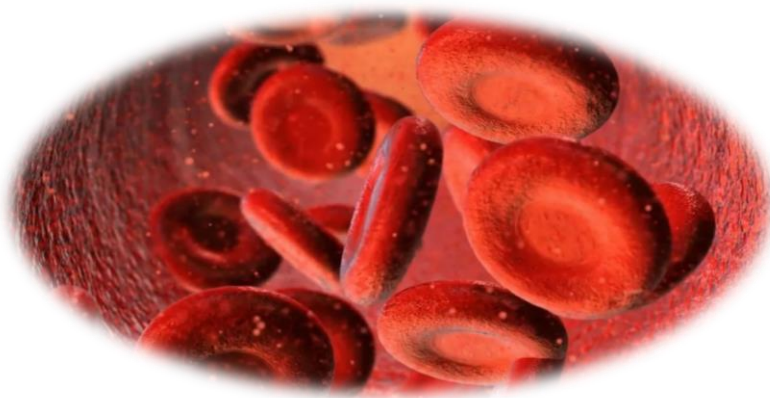




ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΔΥΤΙΚΗΣ ΑΤΤΙΚΗΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ ΚΑΙ ΠΡΟΝΟΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΪΑΤΡΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΟΜΕΑΣ ΙΑΤΡΙΚΩΝ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΩΝ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΜΕΛΕΤΗ ΚΡΥΟΑΙΜΟΛΥΣΗΣ ΣΤΑ ΜΥΕΛΟΔΥΣΠΛΑΣΤΙΚΑ ΣΥΝΔΡΟΜΑ



Φοιτήτρια

Κυριτσάκη Ηλιάνα (ΑΜ 18678099)

Επιβλέπων

Αναστάσιος Κριεμπάρδης

Αναπληρωτής Καθηγητής

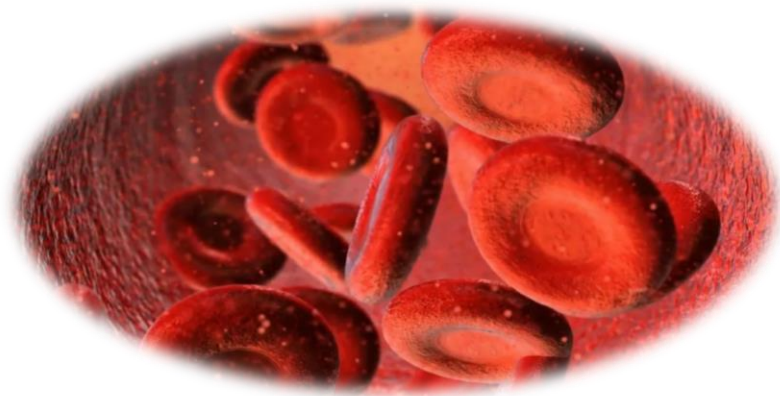
ΑΘΗΝΑ 2023



UNIVERSITY OF WEST ATTICA
FACULTY OF HEALTH AND CARE SCIENCES
DEPARTMENT OF BIOMEDICAL SCIENCES
DIVISION MEDICAL LABORATORIES

DIPLOMA THESIS

STUDY OF CRYOHEMOLYSIS IN MYELOYDYSPLASTIC SYNDROMES



Student

Kyritsaki Iliana (AM 18678099)

Supervisor

Anastasios Kriebardis

Associate Professor

Athens 2023



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΔΥΤΙΚΗΣ ΑΤΤΙΚΗΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ ΚΑΙ ΠΡΟΝΟΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΪΑΤΡΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΟΜΕΑΣ ΙΑΤΡΙΚΩΝ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΩΝ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΜΕΛΕΤΗ ΚΡΥΟΑΙΜΟΛΥΣΗΣ ΣΤΑ ΜΥΕΛΟΔΥΣΠΛΑΣΤΙΚΑ ΣΥΝΔΡΟΜΑ

ΜΕΛΗ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ ΣΥΜΠΕΡΙΛΑΜΒΑΝΟΜΕΝΟΥ ΚΑΙ ΤΟΥ ΕΙΣΗΓΗΤΗ:

ΟΝΟΜΑΤΕΠΩΝΥΜΟ	ΒΑΘΜΙΔΑ	ΥΠΟΓΡΑΦΗ
Αναστάσιος Κριεμπάρδης	Αναπληρωτής Καθηγητής	
Βασίλειος Μπίρτσας	Ακαδημαϊκός Υπότροφος	
Σωτήριος Φόρτης	Ακαδημαϊκός Υπότροφος	

ΔΗΛΩΣΗ ΣΥΓΓΡΑΦΕΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Η κάτωθι υπογεγραμμένη Κυριτσάκη Ηλιάνα του Ηλία, με αριθμό μητρώου 18678099 φοιτήτρια του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής της Σχολής Επιστημών Υγείας και Πρόνοιας του Τμήματος Βιοϊατρικών Επιστημών, δηλώνω υπεύθυνα ότι: «Είμαι συγγραφέας αυτής της διπλωματικής εργασίας και ότι κάθε βοήθεια την οποία είχα για την προετοιμασία της είναι πλήρως αναγνωρισμένη και αναφέρεται στην εργασία. Επίσης, οι όποιες πηγές από τις οποίες έκανα χρήση δεδομένων, ιδεών ή λέξεων, είτε ακριβώς είτε παραφρασμένες, αναφέρονται στο σύνολό τους, με πλήρη αναφορά στους συγγραφείς, τον εκδοτικό οίκο ή το περιοδικό, συμπεριλαμβανομένων και των πηγών που ενδεχομένως χρησιμοποιήθηκαν από το διαδίκτυο. Επίσης, βεβαιώνω ότι αυτή η εργασία έχει συγγραφεί από μένα αποκλειστικά και αποτελεί προϊόν πνευματικής ιδιοκτησίας τόσο δικής μου, όσο και του Ιδρύματος. Παράβαση της ανωτέρω ακαδημαϊκής μου ευθύνης αποτελεί ουσιώδη λόγο για την ανάκληση του πτυχίου μου».

Η Δηλούσα	Εισηγητής
Κυριτσάκη Ηλιάνα	Κριεμπάρδης Αναστάσιος

Περιεχόμενα

ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ.....	8
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	13
ABSTRACT	15
1. <i>ΕΙΣΑΓΩΓΗ</i>	17
1.1 Ερυθρά αιμοσφαίρια	17
1.1.1 Αιμοποίηση	19
1.1.2 Ερυθροποίηση	31
1.1.3 Λειτουργίες και ιδιότητες των ερυθρών αιμοσφαιρίων.....	40
1.2 Μυελοδυσπλαστικά Σύνδρομα.....	51
1.2.1 Ορισμός και επιδημιολογία μυελοδυσπλαστικών συνδρόμων	51
1.2.2 Αιτιολογία και προδιαθεσικοί παράγοντες ΜΔΣ	52
1.2.3 Παθογένεια ΜΔΣ	53
1.2.4 Διάγνωση	68
1.2.5 Θεραπεία	75
1.2.6 Δυσερυθροποίηση στα ΜΔΣ	78
1.3 Δοκιμασία Κρυσταλλοποίησης.....	81
1.4 Δοκιμασία Άμεση Coombs	83
2. <i>ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ</i>	84
2.1 Σκοπός Εργασίας	84
2.2 Υλικά & Μέθοδοι	84
3. <i>Αποτελέσματα</i>	88
4 Συζήτηση	91
5. Συμπεράσματα	94
6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	95
Πηγές Εικόνων:	101

Κατάλογος Εικόνων

Εικόνα 1- Η τομή ενός αγγείου και τα συστατικά του αίματος. Πηγή: [1]	19
Εικόνα 2- Η αιμοποιητική ιεραρχία. Πηγή: [2]	22
Εικόνα 3- Η θέση των αιμοποιητικών φωλιών και η αλληλεπίδραση των HSCs με τα περιβάλλοντα κύτταρα εντός αυτών. Πηγή: [3] (A,B)	24
Εικόνα 4- Απεικόνιση του μυελικού μικροπεριβάλλοντος. Πηγή: [4]	29
Εικόνα 5- Τα στάδια διαφοροποίησης της ερυθροκυτταρικής σειράς. Πηγή: [5]	32
Εικόνα 6- Η ερυθροβλαστική νησίδα. Πηγή: [6]	35
Εικόνα 7- Τα στάδια αποπυρήνωσης της ορθοχρωματόφιλης ερυθροβλάστη για τη δημιουργία του δικτυοερυθροκυττάρου. Πηγή: [7]	38
Εικόνα 8- Η μορφολογία των ερυθροκυττάρων υπό διάφορες συνθήκες. Πηγή: [8]	41
Εικόνα 9- Τα φυσιολογικά ερυθρά αιμοσφαίρια και η διακίνηση τους στην κυκλοφορία σε σύγκριση με τα παθολογικά. Πηγή: [9]	43
Εικόνα 10- Οι οριζόντιοι δεσμοί μεταξύ των κυτταροσκελετικών πρωτεϊνών ακτίνης-σπεκτρίνης. Πηγή: [8]	47
Εικόνα 11- Το μοντέλο της μεμβράνης και του κυτταροσκελετού των ερυθρών αιμοσφαιρίων. Πηγή: [10]	47
Εικόνα 12- Η μεμβράνη των ερυθρών αιμοσφαιρίων. Πηγή: [8]	50
Εικόνα 13- Η έναρξη και η εξέλιξη των μυελοδυσπλαστικών συνδρόμων. Πηγή: [11]	54
Εικόνα 14- Η παθογένεια, αιτιολογία και εξέλιξη των μυελοδυσπλαστικών συνδρόμων. Πηγή: [12]	55
Εικόνα 15- Οπτική μικροσκόπηση επιχρίσματος από περιφερικό αίμα και μυελό των οστών μιας τυπικής περίπτωσης μυελοδυσπλαστικού συνδρόμου. Πηγή: [13]	70
Εικόνα 16- Τα δυσπλαστικά μορφολογικά χαρακτηριστικά της ερυθροκυτταρικής, κοκκιοκυτταρικής και μεγακαρυοκυτταρικής σειράς στα ΜΔΣ. Πηγή: [14] (A)	72
Εικόνα 17- Τα δυσπλαστικά μορφολογικά χαρακτηριστικά της ερυθροκυτταρικής σειράς. Πηγή: [15]	80
Εικόνα 18- Μικρογραφία των ερυθρών αιμοσφαιρίων σε ασθενείς με ΜΔΣ και υγιή άτομα με τη χρήση ηλεκτρονικού μικροσκοπίου σάρωσης. Πηγή: [16]	80

Κατάλογος Πινάκων

Πίνακας 1- Αιματολογικές παράμετροι από τις γενικές αίματος των ασθενών με ΜΔΣ και των υγιών(controls).....	88
Πίνακας 2- Οι βασικοί στατιστικοί δείκτες που απορρέουν από τα αποτελέσματα της δοκιμασίας της κρυσταλλοποίησης σε ασθενείς με ΜΔΣ και υγιή άτομα (controls).	90

ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ

HSC	Hematopoietic Stem Cell	LT-HSC	Long Term Hematopoietic Stem Cell
RBC	Red Blood Cell	ST-HSC	Short Term Hematopoietic Stem Cell
WBC	White Blood Cell	CMP	Common Myeloid Progenitor
PLT	Platelet	CLP	Common Lymphoid Progenitor
Hct	Hematocrit	MEP	Megakaryocyte–Erythroid Progenitor
Hb	Hemoglobin	GMP	Granulocytic-Monocytic Progenitor
Neut	Neutrophil	EPO	Erythropoietin
LY	Lymphocyte	TPO	Thrombopoietin
MO	Monocyte	DA	Dorsal Aorta
MCV	Mean Corpuscular Volume	AGM	Aorta-Gonad-Mesonephros
MCH	Mean Corpuscular Hemoglobin	EMPs	Erythro-Myeloid Progenitors
MCHC	Mean Corpuscular Hemoglobin Concentration	PEs	Primitive Erythroblasts
MPV	Mean Platelet Volume	BFU-E	Burst Forming Unit-Erythroid
RDW	Red Cell Distribution Width	CFU-E	Colony Forming Unit-Erythroid
PDW	Platelet Distribution Width	MDSCs	Myeloid Derived Stem Cells
ΜΔΣ/ MDS	Μυελοδυσπλαστικά Σύνδρομα/ Myelodysplastic Syndromes	G-CSF	Granulocyte Colony-Stimulating Factor
OM/AML	Οξεία Μυελογενής Λευχαιμία/ Acute Myeloid Leukemia	DAT	Direct Antiglobulin Test
MDS-RA	Myelodysplastic Syndromes with Refractory Anemia	EDTA	Ethylene Diamine Tetraacetic Acid

MDS-RAEB	Myelodysplastic Syndromes- Refractory Anemia with Excess Blasts	OD	Optical Density
MDS-RCMD	Myelodysplastic Syndromes- Refractory Cytopenia with Multilineage Dysplasia	HS	Hereditary Spherocytosis
MDS-RS	Myelodysplastic Syndromes with Ring Sideroblasts	HE	Hereditary elliptocytosis
MDS-SLD	Myelodysplastic Syndromes with Single Lineage Dysplasia	IBMFs	Inherited Bone Marrow Failure Syndromes
t-MDS	Treatment-related Myelodysplastic Syndromes	ΠΟΥ	Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας
IWGM-MDS	International Working Group on Morphology of MDS	NGS	Next Generation Sequencing
IPSS	International Prognostic Scoring System	SEM	Scanning Electron Microscopy
Tc	T-cytotoxic cell	TEM	Transmission Electron Microscopy
Tregs	T-regulatory cell	GEP	Gene Expression Profiling
NK	Natural Killer	SNP	Single Nucleotide Polymorphism
MSC	Mesenchymal Cell	EHT	Endothelial-to-haematopoietic Transition
HSPC	Hematopoietic Stem Progenitor Cell	ECM	Extracellular Matrix

SCF	Stem Cell Factor	Glut1	Glucose Transporter 1
CXCL-12	Chemokine C-X-C Motif Ligand-12	ICAM-4	Intercellular Adhesion Molecule 4
CAR cells	CXCL-12 Abundant Reticular Cells	RhAg	Rh-Associated Glycoprotein
LepR+ cells	Leptin Receptor Perivascular-Expressing Cells	Rh	Rhesus
Nes+ MSCs	Nestin-Expressing Mesenchymal Stem Cells	LW	Landsteiner-Weiner
OPN	Osteopontin	EF	
ANXA2	Annexin2	DARC	Duffy Antigen/Chemokine receptor
ANG1	Angiopoietin 1	GP	Glycoprotein
SDF-1	Stromal Derived Factor-1	DDX41	DEAD-box helicase 41
CXC4	Chemokine C-X-C motif 4	ETV6	Translocation-Ets-leukemia Virus
TIE2/ Tek	Tyrosine-protein Kinase Receptor 2	SRP72	Signal Recognition Particle 72
NF-κB	Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells	ANKRD26	Ankyrin Repeat Domain containing 26
VEGF-A	Vascular Endothelial Growth Factor A	ASXL-1	Additional Sex-comb Like-1
FGF-2	Fibroblast Growth Factor 2	TET-2	tet methylcytosine dioxygenase 2
TSP1	Thrombospondin 1	sn-RNPs	Small Nuclear Ribonucleoproteins
FN	Fibronectin	NMD	Nonsense-mediated Decay
MMPs	Matrix Metalloproteinases	PPT	Polypyrimidine Tract
GAGs	Glycosaminoglycans	U2AF	U2 Auxiliary Factor
MHC	Major Histocompatibility Complex	SF3B1	Splicing Factor 3b Subunit 1
CD	Cluster of Differentiation	ZRSR2	Zinc finger RNA-binding motif and serine/arginine rich 2
GATA-2	GATA-binding Factor 2	SRSF2	Serine/arginine-rich splicing factor 2

RUNX1	Runt-Related Transcription Factor 1	Tp53	Tumor Protein 53
TAL-1	T-cell Acute Lymphocytic Leukemia protein	Maea	Macrophage-Erythroblast attacher
LMO2	LIM Domain Only 2	PD-1	Programmed Cell Death Protein 1
IL	Interleukin	DNMTs	DNA Methyltransferases
PI3K	Phosphoinositide 3-Kinase	2OG	2-κετογλουταρικό
KCC	K-Cl Co-transporter	HATs	Histone acetyltransferases
EMP	Erythroblast Macrophage Protein	EZH2	Enhancer Of Zeste Homolog 2
EphB1	Ephrin type-B receptor 1	TNF	Tumor Necrosis Factor
LepR+Oln+	Leptin R+ Osteolectin+	IFN	Interferon
SLC4A1	Solute Carrier Family 4 Member 1	TGF-β	Transforming Growth Factor beta
HIF	Hypoxia-inducible Factor	TLR	Toll-Like Receptor
EPOR	Erythropoietin Receptor	Fc	Fragment crystallizable
BMP4	Bone morphogenetic protein 4	Fab	Fragment antigen-binding
STAT5	Signal Transducer and Activator of Transcription 5	Fas-L	Fas-Ligand
GR	Glucocorticoid receptor	TNFR	Tumor Nekrosis Factor Receptor
PS	Phosphatidylserine	MAPK	Mitogen-activated protein kinase
PIP2	Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate	DAMPs	Damage-associated Molecular Patterns
cAMP	Cyclic Adenosine Monophosphate	PAMPs	Pathogen-associated Molecular Patterns
WT1	Wilms Tumor protein 1	PD-L1	Programmed Cell Death Protein 1-Ligand

CTAs	Cancer-testis antigens	ANC	Absolute Neutrophil Count

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η παρούσα εργασία στοχεύει στη μελέτη της επίδρασης της δοκιμασίας κρυσταλλοποίησης στα ερυθρά αιμοσφαίρια ασθενών με μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα (ΜΔΣ/MDS). Τα **ερυθρά αιμοσφαίρια ή ερυθροκύτταρα** αποτελούν τον πολυπληθέστερο κυτταρικό τύπο του αίματος κι είναι υπεύθυνα για πολλαπλές διαδικασίες, ύψιστης σημασίας για τη ζωή, όπως η μεταφορά του οξυγόνου από τους πνεύμονες στους ιστούς, μέσω της αιμοσφαιρίνης, η αιμόσταση, η ρύθμιση της ροής του αίματος και του αγγειακού τόνου, ακόμα και η μεταφορά ανοσοσυμπλεγμάτων. Χαρακτηρίζονται για την ιδιαίτερη μορφολογία τους, η οποία ομοιάζει με αμφίκιλλο δίσκο, και συντίθεται από την ευέλικτη πλασματική μεμβράνη και το υποκείμενο κυτταροσκελετικό δίκτυο. Το κυτταρόπλασμα τους υπολείπεται οργανιδίων, ενώ είναι πλούσιο σε αιμοσφαιρίνη. Τα ερυθροκύτταρα παράγονται από τον μυελό των οστών, μέσω μιας εξαιρετικά πολύπλοκης διαδικασίας, η οποία ονομάζεται **ερυθροποίηση** και περιλαμβάνει μια σειρά διακριτών σταδίων ωρίμανσης. Βασική ιδιότητα των ερυθροκυττάρων αποτελεί η **παραμορφωσιμότητα ή προσαρμοστικότητα (deformability)**, δηλαδή η ικανότητα τους να τροποποιούν το σχήμα και τη μορφολογία τους, ως απόκριση στις συνθήκες της ροής του αίματος, και στη συνέχεια να τα ανακτούν, όταν επέρχονται οι φυσιολογικές συνθήκες, μηχανισμός που τα προστατεύει από τη ρήξη, κατά τη διακίνηση τους στην κυκλοφορία. Η ρήξη των ερυθροκυττάρων καλείται **αιμόλυση** και εκδηλώνεται με την απελευθέρωση της αιμοσφαιρίνης στο πλάσμα του αίματος.

Τα ερυθρά αιμοσφαίρια στα μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα παρουσιάζουν πολυάριθμες μορφολογικές ανωμαλίες, λόγω της **δυσερυθροποίησης** που λαμβάνει χώρα κατά την ανάπτυξη αυτών των συνδρόμων. Ειδικότερα, τα μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα συνιστούν μια ετερογενή και σύνθετη ομάδα κλωνικών αιματολογικών κακοηθειών, με κοινή προέλευση το αρχέγονο αιμοποιητικό κύτταρο (HSC), το οποίο βρίσκεται στην κορυφή της αιμοποιητικής ιεραρχίας. Κύριο γνώρισμα αυτών των συνδρόμων αποτελεί η **αναποτελεσματική αιμοποίηση**, η οποία συνοδεύεται από αυξημένη απόπτωση των κυττάρων του μυελού των οστών, κυτταροπενία στο περιφερικό αίμα, παρουσία βλαστών, τόσο στο μυελό, όσο και στην κυκλοφορία, και μορφολογική δυσπλασία σε μία ή περισσότερες κυτταρικές σειρές. Η αναποτελεσματική αιμοποίηση οφείλεται σε μια πληθώρα μοριακών διαταραχών, οι οποίες διενεργούνται στα αρχικά στάδια της αιμοποίησης κι επηρεάζουν κυρίως τη μυελοειδή σειρά, όπως μεταλλάξεις στη συρραφή του RNA, στους μεταγραφικούς παράγοντες της αιμοποίησης, τις διεργασίες τις επιγενετικής ρύθμισης, τις οδούς σηματοδότησης, καθώς και

κυτταρογενετικές και ανοσολογικές διαταραχές. Αυτές οι μοριακές διαταραχές μπορεί να είναι απόρροια είτε πρωτοπαθών αιτιών, όπως η γήρανση και οι στρεσογόνοι καταστάσεις, που επάγουν την αιμοποίηση, είτε δευτεροπαθών αιτιών, όπως η αντineοπλασματική και ανοσοκατασταλτική θεραπεία. Τα μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα αποτελούν νοσήματα που επηρεάζουν κυρίως την τρίτη ηλικία, με μέση ηλικία εμφάνισης τα 70 έτη, ενώ η κλινική τους εικόνα μπορεί να κυμαίνεται από αναιμία, ευαισθησία στις λοιμώξεις κι ανεπαρκή πήξη του αίματος, έως μετασχηματισμό σε οξεία μυελογενή λευχαιμία.

Στη συγκεκριμένη μελέτη, αρχικά διεξάχθηκε **αιματολογική ανάλυση** δειγμάτων αίματος από ασθενείς με ΜΔΣ και υγιή άτομα και στη συνέχεια εκτελέστηκε η **δοκιμασία της κρυοαιμόλυσης** και το **τεστ Άμεσης Coombs**. Η δοκιμασία της κρυοαιμόλυσης περιλαμβάνει την επώαση των ερυθροκυττάρων σε υπέρτονο μέσο, σε αρχική θερμοκρασία 37° C και την μετέπειτα ψύξη τους σε θερμοκρασία 0° C. Σύμφωνα με προηγούμενες μελέτες, η απότομη αλλαγή της θερμοκρασίας προκαλεί μετάβαση φάσης της λιπιδικής διπλοστιβάδας της μεμβράνης από υγρή σε μορφή gel, επιδρώντας στους κατακόρυφους δεσμούς μεταξύ της μεμβράνης και του κυτταροσκελετού, με συνέπεια τη ρήξη της μεμβράνης και κατ' επέκταση του κυττάρου. Το ποσοστό των κυττάρων που υπέστησαν ρήξη, δηλαδή το ποσοστό της κρυοαιμόλυσης, υπολογίζεται με την μέτρηση της **ελεύθερης αιμοσφαιρίνης** στο πλάσμα του αίματος. Το τεστ κρυοαιμόλυσης χρησιμοποιείται ευρέως για τη διάγνωση της κληρονομικής σφαιροκυττάρωσης, αιματολογική διαταραχή που χαρακτηρίζεται για τις δομικές βλάβες στον κυτταροσκελετό και το σχήμα των ερυθροκυττάρων. Ως εκ τούτου, η διεξαγωγή αυτού του πειράματος σε ασθενείς με ΜΔΣ μπορεί να συμβάλλει στην κατανόηση της δομής και της μορφολογίας των δυσπλαστικών ερυθροκυττάρων. Ακόμα, με το τεστ Άμεσης Coombs μπορεί να αποδειχθεί η παρουσία αντισωμάτων ή συμπληρώματος στην επιφάνεια των ερυθροκυττάρων, η οποία πιθανόν να υποδηλώνει αυτοάνοσες εκδηλώσεις στο περιφερικό αίμα των ασθενών.

Συμπερασματικά, τα αποτελέσματα της μελέτης έδειξαν την ύπαρξη αναιμίας, λευκοπενίας και θρομβοπενίας στους ασθενείς, με παράλληλη αύξηση των δεικτών MCV, MCH, RDW, PDW και MPV και τη μείωση του δείκτη MCHC. Τα αποτελέσματα της κρυοαιμόλυσης ήταν σχεδόν ίδια στην ομάδα των ασθενών και των υγιών ατόμων, με αυτά των ασθενών να είναι ελαφρώς χαμηλότερα. Κατά συνέπεια, η συγκεκριμένη μελέτη δεν επέδειξε κάποια διαφορά όσον αφορά την επίδραση της κρυοαιμόλυσης στα ερυθρά αιμοσφαίρια των ασθενών, συγκριτικά με αυτά των υγιών. Τέλος, τα δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν στην έρευνα βρέθηκαν αρνητικά στο τεστ της Άμεσης Coombs, επομένως δεν αναγνωρίστηκαν αυτοάνοσα φαινόμενα στο περιφερικό αίμα των ασθενών με ΜΔΣ.

ABSTRACT

The present study aims to investigate the effect of cryohemolysis test on red blood cells of patients with myelodysplastic syndromes (MDS/MDS). Red blood cells or erythrocytes are the most numerous cell type in the blood and are responsible for multiple processes of utmost importance for life, such as the transport of oxygen from the lungs to the tissues via hemoglobin, hemostasis, regulation of blood flow and vascular tone, and even the transport of immune complexes. They are characterised by their particular morphology, which resembles a biconcave disc, and are composed of the flexible plasma membrane and the underlying cytoskeletal network. Their cytoplasm is deficient in organelles and rich in haemoglobin. Erythrocytes are produced by the bone marrow through a highly complex process called erythropoiesis, which involves a series of distinct maturation stages. A key property of erythrocytes is their deformability, i.e. their ability to modify their shape and morphology in response to blood flow conditions and then to recover them when normal conditions occur, a mechanism that protects them from rupture as they move through the circulation. The rupture of erythrocytes is called haemolysis and is manifested by the release of haemoglobin into the blood plasma.

Red blood cells in myelodysplastic syndromes show numerous morphological abnormalities due to the dysregulation that occurs during the development of these syndromes. In particular, myelodysplastic syndromes constitute a heterogeneous and complex group of clonal haematological malignancies, with a common origin being the hematopoietic stem cell (HSC), which is at the top of the haematopoietic hierarchy. The main feature of these syndromes is inefficient haematopoiesis, accompanied by increased apoptosis of bone marrow cells, cytopenia in peripheral blood, the presence of blasts both in the marrow and in the circulation, and morphological dysplasia in one or more cell lines. Inefficient haematopoiesis is caused by a variety of molecular perturbations that occur in the early stages of haematopoiesis and mainly affect the myeloid lineage, such as mutations in RNA splicing, transcription factors in haematopoiesis, epigenetic regulation processes, signalling pathways, and cytogenetic and immunological disorders. These molecular perturbations may result from either primary causes, such as ageing and stressors that induce haematopoiesis, or secondary causes, such as antineoplastic and immunosuppressive therapy. Myelodysplastic syndromes are diseases that mainly affect the elderly, with a mean age of onset of 70 years, and their clinical presentation can range from anaemia, susceptibility to infections and poor blood clotting, to transformation into acute myeloid leukaemia.

In this study, hematological analysis of blood samples from patients with MDS and healthy people was initially performed, followed by cryohemolysis and Coombs Direct test. The cryohemolysis test involves the incubation of erythrocytes in hypertonic medium at an initial temperature of 37° C and their subsequent cooling to 0° C. According to previous studies, the abrupt change in temperature causes a phase transition of the lipid bilayer of the membrane from liquid to gel form, affecting the vertical bonds between the membrane and the cytoskeleton, resulting in rupture of the membrane and consequently the cell. The percentage of ruptured cells, i.e. the percentage of cryohemolysis, is calculated by measuring the free hemoglobin in the blood plasma. The cryohemolysis test is widely used to diagnose hereditary spherocytosis, a hematological disorder characterized by structural defects in the cytoskeleton and shape of erythrocytes. Therefore, conducting this experiment in patients with MDS may contribute to our understanding of the structure and morphology of dysplastic erythrocytes. Also, the Direct Coombs test can demonstrate the presence of antibodies or complement on the surface of erythrocytes, which may possibly indicate autoimmune manifestations in the peripheral blood of patients.

In conclusion, the results of the study indicated the presence of anemia, leukopenia and thrombocytopenia in the patients, with a parallel increase in MCV, MCH, RDW, PDW and MPV and a decrease in MCHC index. Cryohemolysis results were almost identical in the patient and healthy people's group, with those of the patients being slightly lower.

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Ερυθρά αιμοσφαίρια

Το αίμα είναι ένας εξειδικευμένος συνδετικός ιστός, ο οποίος αποτελείται από τα καλούμενα **έμμορφα συστατικά**, δηλαδή τα κύτταρα του αίματος, αιωρούμενα μέσα σε ένα υγρό εξωκυτταρικό υλικό, το **πλάσμα** (Εικόνα 1). Τα έμμορφα συστατικά του αίματος περιλαμβάνουν τα **ερυθρά αιμοσφαίρια ή ερυθροκύτταρα, τα λευκά αιμοσφαίρια ή λευκοκύτταρα** και τα **αιμοπετάλια**. Το πλάσμα είναι ένα υδατικό διάλυμα, με pH 7,4, το οποίο περιέχει οργανικές χημικές ενώσεις μικρού ή μεγάλου μοριακού βάρους, όπως πρωτεΐνες, αμινοξέα, λιπίδια, βιταμίνες και ορμόνες, ανόργανα ιόντα, καθώς και άλλες θρεπτικές ουσίες όπως αναπνευστικά αέρια και νιτρώδη προϊόντα αποβολής. Οι κυριότερες πρωτεΐνες του πλάσματος είναι η λευκωματίνη, οι α, β και γ σφαιρίνες, το ινωδογόνο και οι πρωτεΐνες του συμπληρώματος. Το τοίχωμα των τριχοειδών αγγείων διατηρεί την ισορροπία μεταξύ των μικρού μοριακού βάρους στοιχείων του πλάσματος και του μεσοκυττάριου υγρού. Ως εκ τούτου, η σύνθεση του πλάσματος αποτελεί δείκτη της μέσης σύνθεσης των εξωκυττάριων υγρών των ιστών.

Η ετερογένεια των συστατικών του αίματος αντανακλάται στις στιβάδες που δημιουργούνται στο δοκιμαστικό σωλήνα, ύστερα από φυγοκέντρηση δείγματος αίματος, το οποίο έχει συλλεχθεί παρουσία αντιπηκτικού. Ειδικότερα, τα ερυθροκύτταρα, τα οποία καθιζάνουν, αντιστοιχούν στο 45% του συνολικού όγκου του αίματος στους υγιείς ενήλικες. Αυτό το ποσοστό του ερυθροκυτταρικού όγκου αποτελεί τον **αιματοκρίτη**. Το ίζημα των ερυθροκυττάρων επικαλύπτεται από μια λεπτή φαιά-λευκή στιβάδα, η οποία περιέχει τα λευκοκύτταρα και τα αιμοπετάλια, αμφότερα μικρότερης πυκνότητας από τα ερυθροκύτταρα, και ονομάζεται στιβάδα των λευκοκυττάρων (**buffy coat**). Η στιβάδα αυτή αποτελεί περίπου το 1% του συνολικού όγκου του αίματος. Το άχρωμο, διαυγές, ελαφρά ιξώδες υπερκείμενο αποτελεί το πλάσμα. Ωστόσο, αν πραγματοποιηθεί φυγοκέντρηση σε δείγμα αίματος χωρίς αντιπηκτικό, τα κύτταρα σε συνδυασμό με τις πρωτεΐνες του πλάσματος, κυρίως του ινωδογόνου, σχηματίζουν θρόμβο στο δοκιμαστικό σωλήνα. Το υπερκείμενο υγρό που προκύπτει στην προκειμένη περίπτωση είναι ο **ορός** του αίματος, δηλαδή το πλάσμα απουσία του ινωδογόνου, το οποίο περιέχει αυξητικούς παράγοντες και άλλες πρωτεΐνες.

Κυτταρικά στοιχεία του αίματος:

- **Ερυθροκύτταρα:** Τα ερυθροκύτταρα είναι κύτταρα τελικού σταδίου διαφοροποίησης, τα οποία στερούνται πυρήνα και οργανιδίων. Σε ισότονο διάλυμα έχουν σχήμα εύκαμπτου αμφίκοιλου δίσκου και διάμετρο περίπου 7,8 μm. Αποτελούνται μόνο από κυτταροπλασματική μεμβράνη, τον υποκείμενο

κυτταροσκελετό και το κυτταρόπλασμα, το οποίο βρίθεται από αιμοσφαιρίνη, την πρωτεΐνη μεταφοράς του O_2 , και γλυκολυτικά ένζυμα. Τα ερυθροκύτταρα περιορίζονται στο κυκλοφορικό σύστημα και η βασική τους λειτουργία είναι η μεταφορά O_2 και CO_2 . Το αμφίκυκλο δισκοειδές σχήμα τους αυξάνει την αναλογία του εμβαδού της επιφάνειας σε σχέση με τον όγκο, διευκολύνοντας έτσι τη μεταφορά των αερίων, ενώ η εύκαμπτη δομή τους επιτρέπει την διακίνηση διαμέσου του ανώμαλου σχήματος και της μικρής διαμέτρου των τριχοειδών αγγείων. Βρίσκονται σε συγκέντρωση $4-6 \times 10^6$ ανά mm^3 στην κυκλοφορία του αίματος, όπου επιζούν φυσιολογικά για περίπου 120 μέρες. Τα γηρασμένα ερυθροκύτταρα απομακρύνονται από την κυκλοφορία μέσω φαγοκυττάρωσης από τα μακροφάγα του σπλήνα, του ήπατος ή του μυελού των οστών ή καταστρέφονται μέσω αιμόλυσης στο σπλήνα. Στη συνέχεια, αντικαθίστανται από τα δικτυοερυθροκύτταρα της κυκλοφορίας, τα οποία αποτελούν το 1-2% των κυκλοφορούντων ερυθροκυττάρων.

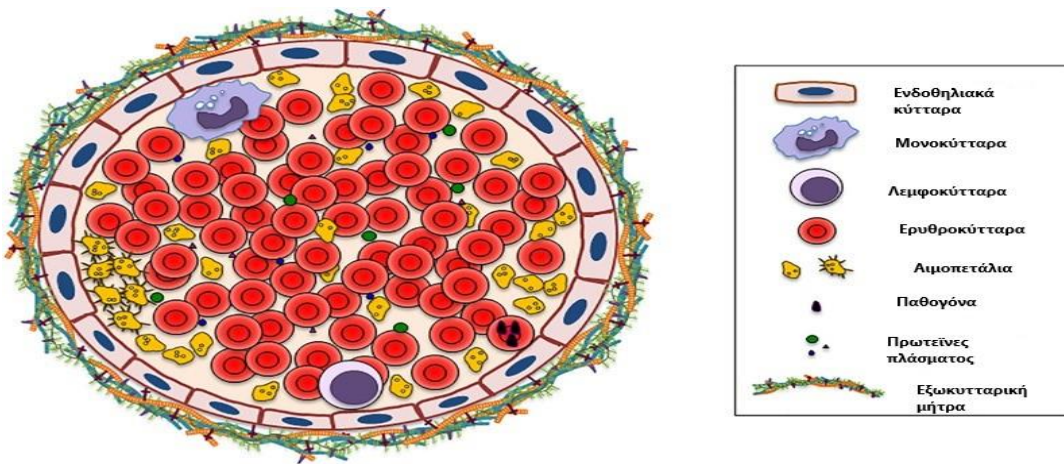
▪ **Λευκοκύτταρα:** Τα λευκοκύτταρα βρίσκονται σε συγκέντρωση $6-10 \times 10^3$ ανά mm^3 στο αίμα και διαιρούνται σε δύο κύριες κατηγορίες, τα **κοκκιοκύτταρα** και τα **ακοκκιοκύτταρα**. Τα κοκκιοκύτταρα περιέχουν πρωτογενή και δευτερογενή κυτταροπλασματικά κοκκία και περιλαμβάνουν τα **ουδετερόφιλα**, τα **βασεόφιλα** και τα **ηωσινόφιλα**, ενώ τα ακοκκιοκύτταρα περιέχουν μόνο πρωτογενή κοκκία και περιλαμβάνουν τα **λεμφοκύτταρα** και τα **μονοκύτταρα**. Τα λευκοκύτταρα έχουν την ικανότητα να εγκαταλείπουν την κυκλοφορία του αίματος, ως απόκριση σε συγκεκριμένα ερεθίσματα, και να διαπιδούν στο συνδετικό ιστό, μέσω ενός μηχανισμού, που ονομάζεται εποίκισμός.

➤ **Κοκκιοκύτταρα:** Τα κοκκιοκύτταρα είναι φαγοκύτταρα με πολύλοβο πυρήνα και διάμετρο 12-15 μm . Τα **ουδετερόφιλα** αποτελούν τον πολυπληθέστερο κυτταρικό τύπο των κοκκιοκυττάρων και το 60-70% των κυκλοφορούντων λευκοκυττάρων. Είναι ενεργά φαγοκύτταρα των βακτηρίων και των μικρών σωματιδίων, αλλά και τα πρώτα λευκοκύτταρα που φτάνουν στο σημείο της φλεγμονής. Τα **ηωσινόφιλα** αποτελούν το 2-4% των κυκλοφορούντων λευκοκυττάρων, συμμετέχουν στην άμυνα έναντι παρασιτικών λοιμώξεων και διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στις αλλεργικές φλεγμονώδεις αντιδράσεις. Τα **βασεόφιλα** αποτελούν μόνο το 1% των κυκλοφορούντων λευκοκυττάρων και συμμετέχουν ενεργά στις αλλεργικές αντιδράσεις. Επίσης, έχουν την ικανότητα να εισέρχονται στο συνδετικό ιστό, όπου μετατρέπονται σε **μαστοκύτταρα**.

➤ **Ακοκκιοκύτταρα:** Τα ακοκκιοκύτταρα έχουν υποστρόγγυλο πυρήνα ή πυρήνα με εντομή και περιέχουν μόνο πρωτογενή κοκκία λυσοσωματικού τύπου. Τα **λεμφοκύτταρα** μπορεί να έχουν είτε μεγάλο (9-12 μm), είτε μικρό μέγεθος (6-8 μm). Χωρίζονται σε Β λεμφοκύτταρα, Τ λεμφοκύτταρα και ΝΚ

κύτταρα (φυσικοί φονείς). Τα **B λεμφοκύτταρα** παράγονται και ωριμάζουν στο μυελό των οστών και όταν διεγείρονται από αντιγόνα διαφοροποιούνται σε **πλασματοκύτταρα**, τα οποία εκκρίνουν τις ανοσοσφαιρίνες. Τα **T λεμφοκύτταρα** παράγονται στο μυελό των οστών, ωριμάζουν στο θύμο αδένα και όταν ενεργοποιούνται συμμετέχουν στις διεργασίες της κυτταρικής ανοσίας. Τέλος, τα **μονοκύτταρα** (12-20 μm) κυκλοφορούν στο αίμα για 12-100 ώρες και στη συνέχεια εισέρχονται στο συνδετικό ιστό, όπου διαφοροποιούνται σε μακροφάγα. Εκεί, συμβάλλουν στη βακτηριακή φαγοκυττάρωση, την αντιγονοπαρουσίαση και την απομάκρυνση προϊόντων κυτταρικής αποικοδόμησης.

- **Αιμοπετάλια:** Τα αιμοπετάλια είναι μικρά απύρρηνα κυτταροπλασματικά θραύσματα, που περιβάλλονται από μεμβράνη, διαμέτρου 2-4 μm . Προέρχονται από τον κατακερματισμό των άκρων κυτταροπλασματικών αποφυάδων γιγάντιων πολυπλοειδών κυττάρων, των **μεγακαρουκυττάρων**. Ο αριθμός τους στη κυκλοφορία κυμαίνεται από 150.000 έως 400.000 ανά mm^3 και η κύρια λειτουργία τους είναι η πήξη του αίματος και η αποκατάσταση της αγγειακής ακεραιότητας. Η διάρκεια ζωής των αιμοπεταλίων στο περιφερικό αίμα είναι περίπου 10 ημέρες. [1,2]



Εικόνα 1- Η τομή ενός αγγείου και τα συστατικά του αίματος. Πηγή: [1] Απεικονίζεται το περιεχόμενο των αγγείων, με τα **συστατικά του αίματος**, συμπεριλαμβανομένων των ερυθρών αιμοσφαιρίων, που αποτελούν τον πολυπληθέστερο κυτταρικό τύπο, τα μονοκύτταρα, τα λεμφοκύτταρα, τα αιμοπετάλια, τις πρωτεΐνες του πλάσματος, αλλά και τα **συστατικά του αγγειακού τοιχώματος**, συμπεριλαμβανομένων των ενδοθηλιακών κυττάρων, τα οποία επενδύουν το εσωτερικό τοίχωμα και την υποστηρικτική εξωκυτταρική μήτρα.

1.1.1 Αιμοποίηση

Το αιμοποιητικό σύστημα περιλαμβάνει περισσότερους από 10 διαφορετικούς κυτταρικούς τύπους, με διακριτές λειτουργίες. Όλοι οι κυτταρικοί τύποι του αίματος προέρχονται από τα αρχέγονα αιμοποιητικά κύτταρα (HSCs), τα οποία βρίσκονται στο μυελό των οστών, την κύρια περιοχή αιμοποίησης στον ενήλικο άνθρωπο. [3] Το αίμα αποτελεί έναν από τους πιο αναγεννητικούς ιστούς του οργανισμού, με περίπου ένα τρισεκατομμύριο κύτταρα να εμφανίζονται καθημερινά στο μυελό των

οστών. [4] Εκατομμύρια γηρασμένα κύτταρα του αίματος αντικαθίστανται με νέα κάθε δευτερόλεπτο, κατά τη διάρκεια της ζωής. Σε καταστάσεις μεγάλης ανάγκης για αιμοποίηση, όπως στις αναιμίες ή τις λοιμώξεις, ο αριθμός των κυττάρων του αίματος αυξάνεται ταχύτατα, ενώ μετά την αποκατάσταση του προβλήματος επανέρχεται στα φυσιολογικά επίπεδα. Η διάρκεια ζωής των διαφόρων ώριμων κυττάρων του αίματος κυμαίνεται από ώρες έως χρόνια. [3] Τα ώριμα κύτταρα του αίματος κατατάσσονται σε δύο θεμελιώδεις κυτταρικές σειρές, **τη λεμφοειδή και τη μυελοειδή** σειρά. Η λεμφοειδής σειρά αποτελείται από τα Β, Τ και ΝΚ κύτταρα, τα οποία επιτελούν τις λειτουργίες της έμφυτης και ειδικής ανοσολογικής απόκρισης, ενώ η μυελοειδής σειρά περιλαμβάνει έναν αριθμό διακριτών, πλήρως διαφοροποιημένων, βραχύβιων κυττάρων, τα κοκκιοκύτταρα, συμπεριλαμβανομένων των ηωσινόφιλων, βασεόφιλων, ουδετερόφιλων και μαστοκυττάρων καθώς και τα μονοκύτταρα, τα ερυθροκύτταρα και τα μεγακαρυοκύτταρα. [4]

1.1.1.1 Εξέλιξη της έξω- & ενδοεμβρυϊκής αιμοποίησης

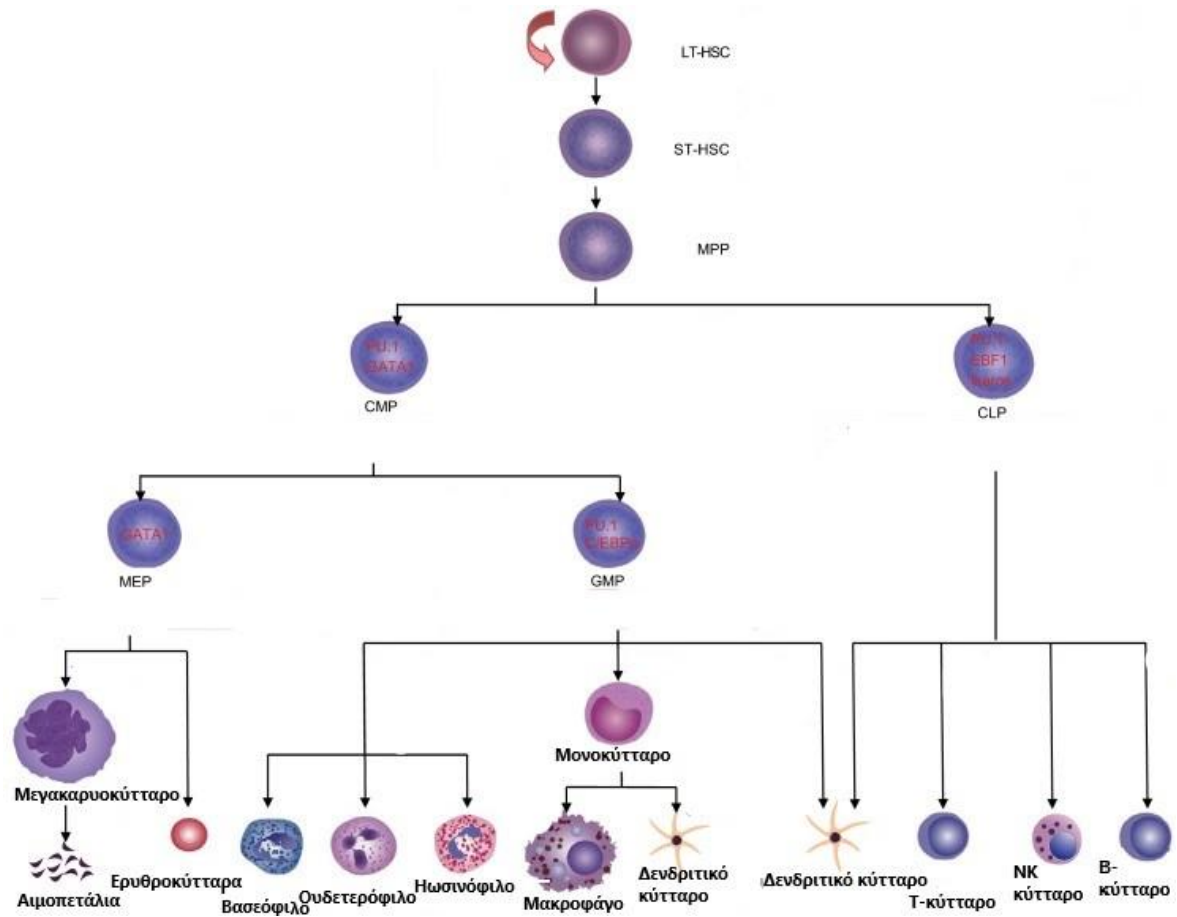
Η αιμοποίηση είναι μια υψηλά συντηρημένη εξελικτική διαδικασία, η οποία λαμβάνει χώρα σε διάφορες θέσεις κατά τη διάρκεια της εμβρυϊκής ζωής και διακρίνεται σε τρία διαδοχικά στάδια, τα επονομαζόμενα **«κύματα αιμοποίησης»**. **Το πρώτο κύμα** πραγματοποιείται εξωεμβρυϊκά στις αιμοποιητικές νησίδες του λεκιθικού σάκου και έχει ως αποτέλεσμα το σχηματισμό τριών κυτταρικών τύπων, των πρωτόγονων ερυθροκυττάρων, που εκφράζουν εμβρυϊκές σφαιρίνες, των μεγακαρυοκυττάρων και των μακροφάγων. [5,6] Ο βασικός ρόλος του πρώτου κύματος αιμοποίησης είναι η παραγωγή ερυθρών αιμοσφαιρίων για την οξυγόνωση των ιστών, καθώς το έμβρυο υφίσταται ταχεία ανάπτυξη. [7] **Κατά το δεύτερο κύμα**, το οποίο πραγματοποιείται επίσης στις αιμοποιητικές νησίδες του λεκιθικού σάκου, παράγονται οριστικά πολυδύναμα κύτταρα, οι ερυθρομυελοειδείς πρόγονοι (**EMPs**). Τα δύο πρώτα κύματα αιμοποίησης, ουσιαστικά, παράγουν μεταβατικούς αιμοποιητικούς πληθυσμούς κι αποτελούν τη **«μεγαλοβλαστική» ή «πρωτόγονη» αιμοποίηση**, η οποία είναι παροδική και τη διαδέχεται γρήγορα το τρίτο κύμα αιμοποίησης, υπεύθυνο για την οριστική πλέον αιμοποίηση τύπου-ενηλικού, τη **«νορμοβλαστική» αιμοποίηση**. [5,7] **Κατά το τρίτο κύμα** αιμοποίησης, ένα στρώμα του κοιλιακού μεσοδέρματος μετακινείται προς τα εσωτερικό του αναπτυσσόμενου εμβρύου, έρχεται σε επαφή με το ενδόδερμα και σχηματίζει το σωλήνα της αορτής. Στη συνέχεια, συστάδες αιμοποιητικών κυττάρων εμφανίζονται στο κοιλιακό τοίχωμα της ραχιαίας αορτής (**DA**), μια περιοχή που ορίζεται και ως περιοχή Αορτή-Γονάδες-Μεσονέφριο (**AGM**). [6,7] Έτσι, σε αυτό το κύμα δημιουργούνται ενδοεμβρυϊκά τα στελεχιαία προγονικά αιμοποιητικά κύτταρα (**HSPCs**) και τελικά τα στελεχιαία αιμοποιητικά κύτταρα (**HSCs**) και τα στελεχιαία

μεσεγχυματικά κύτταρα (**MSCs**), ικανά να παράγουν συνεχώς νέα αιμοσφαίρια. Κατά τη διάρκεια του δεύτερου και του τρίτου κύματος αιμοποίησης, σχηματίζεται το **αιμογενές ενδοθήλιο**, ένας εξαιρετικά εξειδικευμένος τύπος ενδοθηλίου, από τον οποίο προέρχονται τα προγονικά αιμοποιητικά κύτταρα, σε μια διαδικασία γνωστή ως μετάβαση από τον ενδοθηλιακό στον αιμοποιητικό ιστό (EHT). [5] Μάλιστα, στο έμβρυο ποντικού έχει βρεθεί επιπρόσθετη αιμοποιητική δραστηριότητα στις ομφαλικές αρτηρίες, όπου εντοπίζονται αιμοποιητικά και ενδοθηλιακά κύτταρα. [7] Έπειτα, τα σχηματιζόμενα EMPs και HSPCs από το λεκιθικό σάκο και τη ραχιαία αορτή αντίστοιχα, μεταναστεύουν στο εμβρυϊκό ήπαρ, όπου διαφοροποιούνται για να δώσουν γένεση στα ώριμα κύτταρα του αίματος. Τα HSPCs είναι ανώριμα κύτταρα κι αποκτούν την πλήρη μεταγραφική ταυτότητα του ώριμου στελεχιαίου αιμοποιητικού κυττάρου (HSC), μόνο κατά τον αποικισμό του εμβρυϊκού ήπατος. [5] Κατόπιν, ο πληθυσμός των HSCs επεκτείνεται και μεταναστεύει στο μυελό των οστών, την οριστική θέση αιμοποίησης στον ενήλικα. Πρόσφατα, αναγνωρίστηκε ως επιπλέον θέση αιμοποίησης ο πλακούντας, η αιμοποιητική δραστηριότητα του οποίου διαρκεί από τη φάση της AGM έως την εμβρυϊκή ηπατική περίοδο. [7]

1.1.1.2 Κλασσικό μοντέλο αιμοποίησης στον ενήλικα

Τα HSCs του μυελού των οστών βρίσκονται στην κορυφή της αιμοποιητικής ιεραρχίας στον ενήλικα. Ειδικότερα, τα κύτταρα αυτά έχουν την ικανότητα της αυτοανανέωσης, για τη διατήρηση σταθερού του πληθυσμού τους, και της πολυδύναμης διαφοροποίησης προς όλες τις κυτταρικές σειρές του αίματος. Ωστόσο, το κυριότερο γνώρισμα των HSCs είναι η ικανότητα ανασύστασης ολόκληρου του αιμοποιητικού συστήματος όταν μεταμοσχεύονται σε ασθενείς, με κατεστραμμένο μυελό των οστών, λόγω ακτινοβόλησης ή θεραπείας με κυτταροτοξικά φάρμακα υψηλής δόσης. [4,7,8] Οι χαρακτηριστικοί δείκτες απομόνωσης των HSCs είναι οι CD34, Sca-1, c-Kit και SLAM. Τα HSCs διακρίνονται στους υποπληθυσμούς (LT)-HSCs και (ST)-HSCs, με βάση την έκφραση του δείκτη CD34. Τα **LT-HSCs** είναι CD34- κι αποτελούν ένα σπάνιο, αδρανές πληθυσμό στο μυελό των οστών, με πλήρη μακροπρόθεσμη (>3-4 μηνών) ικανότητα ανασύστασης του αιμοποιητικού συστήματος. Τα LT-HSCs διαφοροποιούνται σε **ST-HSCs**, τα οποία είναι CD34+ και έχουν την ικανότητα βραχυπρόθεσμης ανασύστασης, μικρότερη του ενός μηνός. Αυτά με τη σειρά τους διαφοροποιούνται, δίνοντας γένεση στους πολυδύναμους προγόνους (**MPPs**), οι οποίοι δεν παρουσιάζουν ανιχνεύσιμη ικανότητα ανασύστασης. Στη συνέχεια, ακολουθεί η διαφοροποίηση των MPPs, είτε προς την κυτταρική σειρά του κοινού μυελοειδούς προγόνου (**CMP**), είτε προς αυτήν του κοινού λεμφικού προγόνου (**CLP**). Έπειτα, το CMP θα δώσει γένεση είτε στους διδύναμους προγόνους μεγακαρυοκυττάρων-ερυθροκυττάρων (**MEPs**), είτε στους προγόνους

κοκκιοκυττάρων-μακροφάγων (**GMPs**). Τελικά, τα MEPs και GMPs θα διαφοροποιηθούν προς μεγακαρυοκύτταρα ή ερυθροκύτταρα και κοκκιοκύτταρα ή μονοκύτταρα, αντίστοιχα. Από την άλλη, το CLP θα σχηματίσει τα T, B, NK και δενδριτικά κύτταρα. Ακόμα, τα GMPs μπορούν να διαφοροποιηθούν και προς δενδριτικά κύτταρα (Εικόνα 2). [8]



Εικόνα 2- Η αιμοποιητική ιεραρχία. Πηγή: [2] Απεικονίζεται η διαφοροποίηση του στελεγχαϊού αιμοποιητικού κυττάρου HSC στις επιμέρους κυτταρικές σειρές του αίματος.

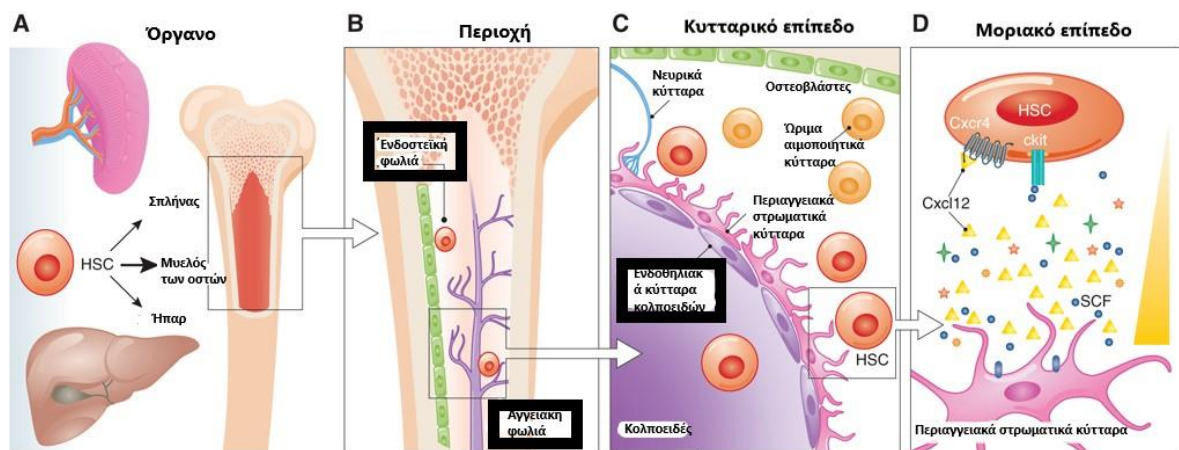
1.1.1.3 Αρχιτεκτονική μυελού των οστών και η συμβολή της στην αιμοποίηση

Ο μυελός των οστών είναι ένας εξειδικευμένος, μαλακός ιστός, ο οποίος βρίσκεται στις μεγάλες κοιλότητες των μακρών οστών και τις μικρές κοιλότητες των σπογγωδών οστών και χωρίζεται σε δύο κατηγορίες, τον αιμοποιητικά ενεργό **ερυθρό μυελό των οστών** και τον αιμοποιητικά ανενεργό **κίτρινο μυελό**. Ο ερυθρός μυελός είναι πλούσιος σε αιμοποιητικά κύτταρα και κύτταρα του αίματος, ενώ ο κίτρινος μυελός αποτελείται από λιπώδη κύτταρα, τα οποία αποκλείουν την παρουσία των περισσότερων αιμοποιητικών κυττάρων. Στα νεογνά, ολόκληρος ο μυελός είναι ερυθρός, αλλά με την αύξηση της ηλικίας, το μεγαλύτερο μέρος του

μυελού αντικαθίσταται βαθμιαία από τον λιπώδη ή κίτρινο μυελό, ο οποίος συναντάται κυρίως στο σκελετό των άκρων. Έτσι, στον ενήλικα ο αιμοποιητικά ενεργός ερυθρός μυελός εντοπίζεται κυρίως στα κεντρικά οστά, όπως η σπονδυλική στήλη, τα πλευρά και τα εγγύς μακριά οστά. Υπό συνθήκες αυξημένης ανάγκης για αιμοποίηση, όπως σε σοβαρή αιμορραγία ή υποξία, ο κίτρινος μυελός δύναται να επανέλθει στον τύπο του ερυθρού μυελού. Ο μυελός των οστών διαμορφώνεται δομικά από τον **οστίτη ιστό**, το **αγγειακό σύστημα** και τα **δικτυωτά στρωματικά κύτταρα**. Ο οστίτης ιστός περικλείει το μυελό των οστών, καθορίζει τα όρια του και προβάλλει δοκίδες, οι οποίες διεισδύουν στο παρέγχυμα του μυελού, σχηματίζοντας κοιλότητες, οι οποίες αποτελούν το **ενδόστεο**. Το ενδόστεο επενδύεται εσωτερικά από οστεοβλάστες και οστεοκλάστες, οι οποίοι αναδιαμορφώνουν τα οστά καθ' όλη τη διάρκεια της ζωής. [1,9,10] Το αγγειακό σύστημα του μυελού αποτελείται από σπάνια αρτηρίδια, τα οποία προέρχονται από την **κεντρική επιμήκη αρτηρία**, εισέρχονται διαμέσου του οστού και μετατρέπονται σε τριχοειδή αγγεία, σχηματίζοντας δύο κύρια τριχοειδικά πλέγματα, το **μυελικό** και **περιοστικό πλέγμα**. Τα πλέγματα αυτά αναστομώνονται μεταξύ τους, δημιουργώντας ένα εξαιρετικά πυκνό δίκτυο φλεβικών **κολποειδών**, το οποίο καταλαμβάνει το μεγαλύτερο μέρος του παρεγχύματος του μυελού και παροχετεύει το περιεχόμενο του στην **κεντρική επιμήκη φλέβα**. [2,10,11] Τα κολποειδή επενδύονται από «θυριδωτό» ενδοθήλιο, με αποτέλεσμα την αυξημένη διαπερατότητα τους τόσο σε πρωτεΐνες όσο και σε κύτταρα. [9] Μάλιστα, θεωρείται ότι τα θυριδωτά κολποειδή αποτελούν τα σημεία εξόδου των λευκοκυττάρων από τον μυελό των οστών στην κυκλοφορία. [12] Τα **κυτταρικά συστατικά** του μυελικού παρεγχύματος περιλαμβάνουν τα **αιμοποιητικά κύτταρα**, συμπεριλαμβανομένων των HSCs, των μεγακαρυοκυττάρων, των μακροφάγων, των μυελοειδών και των δενδριτικών κυττάρων, καθώς και τα **μη αιμοποιητικά κύτταρα**, όπως οι οστεοβλαστικοί πρόδρομοι, οι οστεοβλάστες, τα οστεοκύτταρα, τα λιποκύτταρα, τα κύτταρα Schwann, οι συμπαθητικοί και αισθητικοί νευρώνες και οι ινοβλάστες. [9,11]

Η αιμοποίηση λαμβάνει χώρα στις **“αιμοποιητικές φωλιές”** του μυελού, μια ιδέα η οποία διατυπώθηκε για πρώτη φορά από τον Schofield το 1978, σύμφωνα με την οποία τα HSCs καταλαμβάνουν ένα εξειδικευμένο μικροπεριβάλλον, το οποίο αποτελείται από τα υποστηρικτικά κύτταρα που περιβάλλουν τα HSCs, τα κυτταρικά και μοριακά σήματα που αναδύονται από αυτά τα κύτταρα και την εξωκυτταρική μήτρα (**ECM**). Ειδικότερα, η αιμοποιητική φωλιά αποτελεί μια πολύπλοκη αλληλεπίδραση μεταξύ διαφορετικών κυτταρικών τύπων και της ECM, των οποίων οι λειτουργίες, τα συστατικά και οι φυσικοχημικοί παράγοντες ποικίλλουν σε όλο το διάστημα του μυελικού παρεγχύματος, όπως το περιεχόμενο σε ασβέστιο και τα επίπεδα O₂. Μελέτες στη *Drosophila melanogaster* και τον *Caenorhabditis elegans*, έδειξαν ότι συγκεκριμένα χαρακτηριστικά της αιμοποιητικής φωλιάς είναι υπεύθυνα

για τη ρύθμιση της συμπεριφοράς των HSCs. Πιο συγκεκριμένα, η αιμοποιητική φωλιά παρέχει αυτοκρινή, ενδοκρινή και παρακρινή σήματα, απαραίτητα για την αυτοανανέωση, την επιβίωση, την ασύμμετρη κυτταρική διαίρεση και διαφοροποίηση των στελεχιαίων αιμοποιητικών κυττάρων προς όλες τις κυτταρικές σειρές του αίματος. Ακόμα, η προσκόλληση των αιμοποιητικών βλαστικών κυττάρων στα συστατικά της ECM, οι διακυτταρικές αλληλεπιδράσεις και οι φυσικοχημικοί παράγοντες που χαρακτηρίζουν την αιμοποιητική φωλιά, συμβάλλουν στην αγκυροβόληση των HSCs κοντά στα σήματα εξωκυτταρικής ανανέωσης και κυτταρικής επιβίωσης. Ωστόσο, εκτός από την μηχανική, δομική και τροφική υποστήριξη στα αιμοποιητικά κύτταρα, τα στοιχεία της αιμοποιητικής φωλιάς παρέχουν κινητούς και ακινητοποιημένους **αυξητικούς παράγοντες**, ζωτικής σημασίας για τις λειτουργίες των αιμοποιητικών βλαστικών κυττάρων. Ως εκ τούτου, το παρέγχυμα του μυελού των οστών συνιστά μια συλλογή πολυάριθμων μικρότερων αιμοποιητικών φωλιών, οι οποίες δημιουργούνται από χημειοτακτικές κλίσεις και διακριτούς κυτταρικούς πληθυσμούς. Κάθε μία από αυτές τις μικρές αιμοποιητικές φωλιές επάγει διαφορετικές αποκρίσεις στα HSCs, όπως ο **αποικισμός**, η **κινητοποίηση**, η **αδράνεια**, η **αυτοανανέωση** ή η **δέσμευση** προς μια συγκεκριμένη κυτταρική γενεαλογία. Οι αιμοποιητικές φωλιές διακρίνονται σε **ενδοστεϊκές ή οστεοβλαστικές και αγγειακές φωλιές** (Εικόνα 3 και 4). [9,13]



Εικόνα 3- Η θέση των αιμοποιητικών φωλιών και η αλληλεπίδραση των HSCs με τα περιβάλλοντα κύτταρα εντός αυτών. Πηγή: [3] (A,B) Τα HSCs, όπως απεικονίζεται στην παραπάνω εικόνα, μπορούν να ανευρισκονται στην κυκλοφορία και να αποικίζουν προσωρινά όργανα με αιμοποιητική λειτουργία, όπως το ήπαρ και ο σπλήνας. Ωστόσο, στους ενήλικες η πλειονότητα των ώριμων και λειτουργικών HSCs εγκαθίστανται στις αιμοποιητικές φωλιές του μυελού των οστών, οι οποίες διακρίνονται στις ενδοστεϊκές και αγγειακές φωλιές. (C,D) Οι **ενδοστεϊκές φωλιές** απαρτίζονται από τα οστεοκύτταρα, τους οστεοβλάστες, τους οστεοκλάστες και τα βραδέως διαφοροποιούμενα ήρεμα HSCs, ενώ οι αγγειακές από τα μυελικά κολποειδή και τα παρακείμενα προγονικά αιμοποιητικά κύτταρα. Τα μυελικά κολποειδή επενδύονται εσωτερικά από θυριδωτά ενδοθηλιακά κύτταρα, τα οποία υποστηρίζονται από τον υποεπιθηλιακό ιστό, αποτελούμενος από περιαγγειακά δικτυωτά στρωματικά κύτταρα, συμπεριλαμβανομένων των LepR+ και Nes+ MSCs κυττάρων, καθώς και των κυττάρων CAR. Τα κύτταρα αυτά παράγουν χημειοκίνες, όπως ο GSF και η CXCL-12, απαραίτητες για τη διατήρηση, αυτοανανέωση και τον πολλαπλασιασμό των HSCs.

▪ **Ενδοστεϊκή φωλιά:**

Στην ενδοστεϊκή φωλιά, τα βραδέως διαφοροποιούμενα, ήρεμα HSCs εντοπίζονται κοντά στο ενδόστεο, ενώ τα περισσότερο διαφοροποιημένα HSCs προς την κεντρική περιοχή του μυελού των οστών γύρω από την αγγειακή φωλιά. Η ενδοστεϊκή φωλιά επιτυγχάνει την διατήρηση των HSCs στη φάση ηρεμίας του κυτταρικού κύκλου και την αναστολή της διαφοροποίησής τους, παρέχοντας ένα μικροπεριβάλλον, το οποίο ευνοεί την αγκυροβόληση των HSCs εντός της φωλιάς, μέσω των διακυτταρικών αλληλεπιδράσεων. Επίσης, ρυθμίζει την αυτοανανέωση των HSCs, με την παραγωγή αυξητικών παραγόντων και κυτταροκινών. Είναι αποδεδειγμένο ότι τα ήρεμα HSCs κοντά στο ενδόστεο επιδεικνύουν μεγαλύτερη ικανότητα *in vitro* και *in vivo* αιμοποίησης σε σχέση με τα HSCs από άλλες περιοχές του μυελού. Αυτό επιβεβαιώνεται από περαιτέρω μελέτες σε ποντίκια, στις οποίες βρέθηκε ότι κατά τη μεταμόσχευση μυελού των οστών, τα HSCs μεταναστεύουν κατά προτίμηση στην περιοχή του ενδόστεου, κοντά στα κύτταρα της οστικής επένδυσης, ενώ παράλληλα τα HSCs που απομονώθηκαν από αυτές τις περιοχές παρουσίαζαν υψηλότερο δυναμικό πολλαπλασιασμού και μακροπρόθεσμης αιμοποιητικής ανασύστασης. Τα κύρια κύτταρα της ενδοστεϊκής φωλιάς είναι οι οστεοβλάστες, οι οστεοκλάστες και τα οστεοκύτταρα.

➤ **Οστεοβλάστες:**

Τα κύτταρα της οστεοβλαστικής γενεαλογίας αποτελούν τα κύρια κύτταρα της ενδοστεϊκής φωλιάς και τον συνδετικό κρίκο μεταξύ του ασβεστοποιημένου οστού και του μυελικού παρεγχύματος. Ανάλογα με το στάδιο της διαφοροποίησής τους, διαδραματίζουν καθοριστικό ρόλο στη ρύθμιση της αιμοποίησης. Πιο συγκεκριμένα, η μείωση του αριθμού των οστεοβλαστών ευνοεί την επέκταση της μυελοειδούς σειράς, αλλά καταστέλλει αυτήν της λεμφοειδούς και ερυθράς σειράς. Οι οστεοβλάστες αλληλεπιδρούν με τα HSCs και ρυθμίζουν τη συμπεριφορά τους, μέσω της παραγωγής κυτταροκινών και αυξητικών παραγόντων, όπως οι CXCL-12, SCF, OPN, G-CSF, ANXA2, ANG1 και TPO. Η **CXCL-12** (chemokine C-X-C motif ligand-12), γνωστή και ως SDF-1 (stromal-derived factor 1), είναι μια χημειοκίνη, η οποία παράγεται κυρίως από τους ανώριμους οστεοβλάστες, καθώς κι από τα ενδοθηλιακά κύτταρα κι ένα υποσύνολο δικτυωτών κυττάρων, διάσπαρτων σε όλο το μυελό. Ελέγχει τον αποικισμό, τη διατήρηση, την αυτοανανέωση αλλά και τη μετανάστευση των HSCs από το εμβρυϊκό ήπαρ στο μυελό των οστών, σε συνεργασία με τον υποδοχέα της CXCR4. Ο **G-CSF** (granulocyte colony-stimulating factor) παράγεται, επίσης, κυρίως από τους οστεοβλάστες και είναι απαραίτητος για την προώθηση της μυελοποίησης. Ακόμα, η **ANXA2** (annexin 2) παράγεται τόσο από τους οστεοβλάστες όσο και από τα ενδοθηλιακά κύτταρα και ρυθμίζει τον αποικισμό και την εμφύτευση των HSCs. Επιπλέον, η παραγόμενη από τους

οστεοβλάστες **ANG1** (angiopoietin 1) αλληλεπιδρά με τον **TIE2** (tyrosine-protein kinase receptor 2), για τη διατήρηση των HSCs σε ηρεμία και την ενίσχυση της προσκόλλησης τους στην αιμοποιητική φωλιά. Επιπρόσθετα, η έκφραση **θρομβοποιητίνης** (TPO) από τους οστεοβλάστες φαίνεται να εμπλέκεται στη διατήρηση των LT-HSCs στο στάδιο ηρεμίας του κυτταρικού κύκλου. Πρόσφατα, βρέθηκε ότι τα **μεσεγχυματικά κύτταρα** της ενδοστεϊκής φωλιάς εκφράζουν διακριτά μοριακά προφίλ, ανάλογα με την εγγύτητα τους με τα HSCs. Συγκεκριμένα, αυτά που βρίσκονται σε μεγαλύτερη εγγύτητα, εκφράζουν τρία μόρια, σε εκκρινόμενη μορφή ή ως μόρια της κυτταρικής επιφάνειας, τα οποία αποδείχτηκε ότι ρυθμίζουν τη φάση ηρεμίας των HSCs, συμπεριλαμβανομένων της RNAασης της αγγειογενίνης, της ιντερλευκίνης 18 (IL-18) και του μορίου προσκόλλησης εμπιγκίνη.

➤ **Οστεοκύτταρα:**

Τα οστεοκύτταρα αποτελούν το τελικό στάδιο διαφοροποίησης των οστεοβλαστών και το 90% των ώριμων οστικών κυττάρων. Βρίσκονται ενσωματωμένα στη μήτρα του οστού και εκτείνουν μακριές προεκβολές, για τη σύνδεση τους με τα περιβάλλοντα οστεοκύτταρα και τους οστεοβλάστες της οστικής επένδυσης. Τα οστεοκύτταρα ασκούν έμμεση επίδραση στα HSCs, μέσω της αλληλεπίδρασης τους με τους οστεοβλάστες του ενδόστευου. Ειδικότερα, ρυθμίζουν τη συμπεριφορά των HSCs, δρώντας στην έκκριση και την απόκριση τους στον G-CSF. Ως εκ τούτου, η αφαίρεση των οστεοκυττάρων δεν επηρεάζει τον αριθμό των HSCs, αλλά μειώνει την ικανότητα τους να κινητοποιούνται, ως απόκριση στον G-CSF.

➤ **Οστεοκλάστες:**

Οι οστεοκλάστες σχηματίζονται από τη σύντηξη πολλαπλών προγόνων των κοκκιοκυττάρων και των μακροφάγων και είναι υπεύθυνοι για την απορρόφηση και τη διάσπαση του οστού. Διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο τόσο στη διατήρηση της δεξαμενής των HSCs, όσο και στην απελευθέρωση τους από την ενδοστεϊκή φωλιά στην κυκλοφορία του αίματος. Πιο συγκεκριμένα, υπό συνθήκες αιμοποιητικού στρες, ο αριθμός των οστεοκλαστών στο μυελό των οστών αυξάνεται, με συνέπεια την έκκριση πρωτεολυτικών ενζύμων, που υδρολύουν τη μήτρα των οστών. Με αυτό τον τρόπο, επάγεται η κινητοποίηση των αιμοποιητικών προγονικών κυττάρων της ενδοστεϊκής φωλιάς και κατ' επέκταση η αύξηση του αριθμού τους στην κυκλοφορία. Επίσης, οι πρωτεάσες που εκκρίνονται από τους οστεοκλάστες, απελευθερώνουν αυξητικούς παράγοντες από την ECM, επηρεάζοντας τον πολλαπλασιασμό και τη διατήρηση των HSCs. Επιπλέον, η ενεργοποίηση των οστεοκλαστών από τον

ενεργοποιητή υποδοχέα του συνδέτη του NF-κΒ οδηγεί στη διάσπαση της CXCL-12, η οποία με τη σειρά της προκαλεί την απελευθέρωση των αιμοποιητικών προγονικών κυττάρων στην κυκλοφορία.

▪ **Αγγειακή φωλιά:**

Η παρατήρηση ότι τα HSCs εντοπίζονται και σε θέσεις πιο μακριά από το ενδόστεο, καθώς και η ικανότητα των HSCs να αυτοανανεώνονται και να διαφοροποιούνται κατά τη διάρκεια της εμβρυϊκής ανάπτυξης, ακόμα και πριν το σχηματισμό των μυελικών κοιλοτήτων, αποδεικνύει την ύπαρξη επιπλέον τύπων αιμοποιητικών φωλιών, εκτός από τις ενδοστεϊκές. Ο δεύτερος κυριότερος τύπος είναι η αγγειακή φωλιά, η οποία σχηματίζεται από τα αγγειακά κολποειδή και τους παρακείμενους αιμοποιητικούς προγόνους. Τα αιμοποιητικά κύτταρα της αγγειακής φωλιάς βρίσκονται στο ενεργό στάδιο του κυτταρικού κύκλου, έχουν χαμηλότερο δυναμικό πολλαπλασιασμού κι είναι περισσότερο διαφοροποιημένα, σε σχέση με αυτά της ενδοστεϊκής φωλιάς. Επίσης, η αγγειακή φωλιά περιέχει μεγαλύτερα επίπεδα O₂ κι είναι περισσότερο ετερογενής, όσον αφορά την κυτταρική της σύσταση και προέλευση. Το τοίχωμα των κολποειδών αποτελείται από ένα λεπτό στρώμα θυριδωτών ενδοθηλιακών κυττάρων, η ακεραιότητα των οποίων διατηρείται από τα περιβάλλοντα HSCs, κι από ένα υποεπιθηλιακό στρώμα από δικτυωτά κύτταρα, τα οποία βρίσκονται σε στενή επικοινωνία με τα HSCs. Η επιθηλιακή επένδυση των κολποειδών επιτρέπει την μετακίνηση των HSCs εντός κι εκτός του μυελού και παρέχει στοιχεία απαραίτητα για την αυτοανανέωση, επιβίωση και διαφοροποίησή τους. Τα κυτταρικά συστατικά της αγγειακής φωλιάς είναι τα **ενδοθηλιακά κύτταρα**, τα **LepR+ κύτταρα** (Leptin-Receptor Perivascular Expressing cells), τα **Nes+ MSCs** (Nestin+ Mesenchymal Stem Cells) και τα **κύτταρα CAR** (CXCL-12 Abundant Reticular Cells). [9,13]

➤ **Ενδοθηλιακά κύτταρα:**

Τα ενδοθηλιακά κύτταρα αποτελούν στοιχεία κλειδιά της αγγειακής αιμοποιητικής φωλιάς, ρυθμίζοντας την εξέλιξη των HSCs, τόσο μέσω των διακυτταρικών αλληλεπιδράσεων, όσο και μέσω της έκκρισης αγγειοκρινών παραγόντων. Π.χ η αφαίρεση ενός ειδικού ενδοθηλιακού μορίου προσκόλλησης, της **E-σελεκτίνης**, έχει ως αποτέλεσμα την παραμονή των HSCs στο στάδιο ηρεμίας του κυτταρικού τους κύκλου, γεγονός που αποδεικνύει το ρόλο των διακυτταρικών συνδέσεων μεταξύ των HSCs και των επιθηλιακών κυττάρων, στον πολλαπλασιασμό των HSCs. Επιπλέον, η έκκριση των παραγόντων **CXCL12**, **VEGF-A** (vascular endothelial

growth factor A), **FGF2** (fibroblast growth factor 2), **ANG1** (angiopoietin 1), **TSP1** (thrombospondin-1), **SCF** και των **δεσμευτών Notch** από τα ενδοθηλιακά κύτταρα συμβάλλει στη διατήρηση της δεξαμενής των HSCs και ελέγχει την αυτοανανέωση τους. Ακόμα, είναι ενδιαφέρον ότι τα ενδοθηλιακά κύτταρα μπορεί να ενορχηστρώνουν μεσεγχυματικούς πληθυσμούς που βρίσκονται κοντά τους, και είναι υπεύθυνοι για την στήριξη των HSCs.

➤ **Leptin Receptor Perivascular-Expressing Cells:**

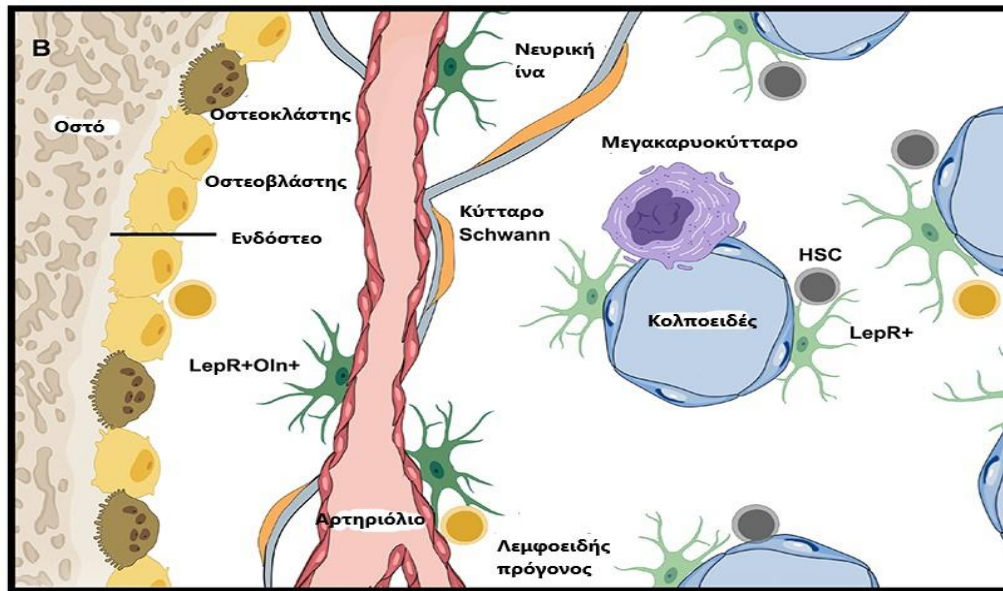
Τα LepR⁺ κύτταρα είναι στρωματικά κύτταρα που εκφράζουν τον υποδοχέα για την ειδική για τα λιποκύτταρα ορμόνη, τη λεπτίνη, υπεύθυνα για τη διαφοροποίηση των MSCs προς τις τρεις διαφορετικές κυτταρικές σειρές, των λιποκυττάρων, χονδροκυττάρων και οστεοβλαστών. Βρίσκονται γύρω από τα κολλοειδή μαζί με τα κύτταρα CAR και αποτελούν την κύρια πηγή των αυξητικών παραγόντων CXCL-12 και GSF, οι οποίοι είναι απαραίτητοι για τη διατήρηση σταθερής της δεξαμενής των HSCs.

➤ **Κύτταρα CAR (CXCL-12 Abundant Reticular Cells):**

Τα κύτταρα CAR είναι μεσεγχυματικοί πρόγονοι, οι οποίοι εκφράζουν σε υψηλά επίπεδα τη χημειοκίνη CXCL-12, ένας παράγοντας κλειδί για τον πολλαπλασιασμό των HSCs. Τα κύτταρα αυτά μπορούν να διαφοροποιηθούν τόσο προς την κυτταρική σειρά των λιποκυττάρων, όσο και προς αυτή των οστεοκυττάρων. Όπως και τα LepR⁺ κύτταρα, είναι οι κύριοι παραγωγοί των χημειοκινών SCF και CXCL-12 και η αφαίρεση τους οδηγεί σε αξιοσημείωτη μείωση αυτών των κυτταροκινών στο μυελό των οστών. Μάλιστα, έχει βρεθεί ότι τα HSPCs και ορισμένοι λεμφοειδείς πρόγονοι βρίσκονται σε άμεση επικοινωνία με τα κύτταρα CAR του μυελού.

➤ **Nestin-Expressing Mesenchymal Stem Cells:**

Τα Nes⁺ κύτταρα ή Nes-GFP⁺ κύτταρα ορίζονται ως περιαγγειακά στρωματικά κύτταρα, τα οποία εκφράζουν υψηλά επίπεδα GFP υπό τον έλεγχο του ενισχυτή νεστίνης. Παρόμοια με τα άλλα κύτταρα της αγγειακής φωλιάς, παράγουν CXCL-12, SCF και αγγειοποιητίνη, για την διατήρηση του αριθμού των HSCs. Στην περιαγγειακή περιοχή βρίσκονται μαζί με τα HSCs, όπως αποδεικνύεται κι από μελέτες με μεταμοσχευμένα HSCs, τα οποία εμφυτεύονται κατά προτίμηση κοντά στα Nes⁺ κύτταρα. Η αφαίρεση αυτών των κυττάρων επηρεάζει την κινητοποίηση των HSCs και οδηγεί σε μέτρια μείωση του αριθμού τους. [12,13]



Εικόνα 4- Απεικόνιση του μυελικού μικροπεριβάλλοντος. Πηγή: [4] Στη συγκεκριμένη εικόνα απεικονίζεται η τυπική σύσταση του μυελικού μικροπεριβάλλοντος. Το αίμα εισέρχεται εντός του μυελικού παρεγχύματος μέσω της κεντρικής επιμήρους αρτηρίας, η οποία διαιρείται σε μικρότερα **αρτηριόλια** και απομακρύνεται από αυτό, μέσω των φλεβικών **κολποειδών**, τα οποία παροχετεύουν το περιεχόμενό τους στην κεντρική επιμήκη φλέβα. Τα φλεβικά κολποειδή συνιστούν μέρος των αγγειακών αιμοποιητικών φωλιών του μυελού, αλλά και το σημείο εξόδου, τόσο των HSCs, όσο και των παραγόμενων αιμοσφαιρίων, από το μυελό στην κυκλοφορία του αίματος. Γύρω από τα κολποειδή βρίσκονται διάφορα περιαγγειακά στρωματικά κύτταρα, όπως τα **LepR+** κύτταρα, καθώς και **μεγακαρυοκύτταρα**. Ακόμα, διακρίνονται οι **νευρικές ίνες** και τα **κύτταρα Schwann** κοντά στα αρτηριόλια. Επίσης, απεικονίζονται οι **οστεοβλάστες**, οι οποίοι επενδύουν το ενδόστεο και αποτελούν το συνδετικό κρίκο μεταξύ του ασβεστοποιημένου οστού και του μυελικού παρεγχύματος, και μικρός αριθμός **οστεοκλαστών**, υπεύθυνων για την αναδιαμόρφωση των οστών και τη διευκόλυνση της διακίνησης των HSCs και των αιμοσφαιρίων της ενδοστεϊκής φωλιάς, από το ενδόστεο στα κολποειδή. Τέλος, οι **λεμφοειδείς πρόγονοι** τείνουν να ανευρίσκονται, είτε κοντά στις ενδοστεϊκές φωλιές, όπου εξαρτώνται από την παραγόμενη CXCL-12 των οστεοβλαστών, είτε κοντά στα αρτηριόλια, όπου εξαρτώνται από τον SCF, εκκρινόμενος από ένα υποσύνολο των LepR+ κυττάρων, τα LepR+Osteoclectin+ κύτταρα (LepR+Oln+).

- **Εξωκυττάρια μήτρα μυελού των οστών:**

Η εξωκυττάρια μήτρα αποτελεί συστατικό τους μικροπεριβάλλοντος των μυελού των οστών, ύψιστης σημασίας για την εξέλιξη της αιμοποίησης. Παρέχει δομική ακεραιότητα και υποστήριξη στην αιμοποιητική φωλιά, ευνοεί την αγκυροβόληση των αιμοποιητικών κυττάρων μέσα σε αυτήν, επάγει πολλαπλές οδούς σηματοδότησης, ενώ παράλληλα αποθηκεύει κυτταροκίνες και αυξητικούς παράγοντες, καθιστώντας τους διαθέσιμους κι εύκολα προσβάσιμους για τα αιμοποιητικά κύτταρα. Μάλιστα, η προσκόλληση των HSCs στα συστατικά της εξωκυττάριας μήτρας αναστέλλει τη διαφοροποίησή τους και εμποδίζει την απόπτωση. Η σχετική ελαστικότητα ή ακαμψία του μικροπεριβάλλοντος μπορεί να τροποποιήσει άμεσα την εξέλιξη της διαφοροποίησης των βλαστικών αιμοποιητικών κυττάρων. Ειδικότερα, τα κύτταρα των αιμοποιητικών φωλιών συνδέονται με τα συστατικά της εξωκυττάριας μήτρας μέσω πρωτεϊνών της κυτταρικής επιφάνειας, η εξωκυτταρική επικράτεια των οποίων εμπλέκεται στις διακυτταρικές αλληλεπιδράσεις και τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των κυττάρων και της ECM, και η

κυτταροπλασματική στη μεσολάβηση των οδών σηματοδότησης. Έτσι, η σύνδεση των αιμοποιητικών κυττάρων με τα υποστηρικτικά στρωματικά κύτταρα και τα συστατικά της ECM εντός της αιμοποιητικής φωλιάς, μέσω ενός διακλαδισμένου συμπλέγματος διασύνδεσης, προσανατολίζει την κυτταρική διαίρεση και διαφοροποίηση των HSCs προς διακριτές κυτταρικές σειρές.

Τα κύρια συστατικά της ECM είναι οι **δομικές πρωτεΐνες**, συμπεριλαμβανομένων του κολλαγόνου και της ελαστίνης, οι **εξειδικευμένες πρωτεΐνες**, όπως η φιμπρονεκτίνη (FN) και η λαμινίνη, οι **πρωτεογλυκάνες** καθώς και άλλες πρωτεΐνες όπως η αιμονεκτίνη, η θρομβοσπονδίνη, οι μεταλλοπρωτεϊνάσες μήτρας (MMPs) και οι ιστικοί αναστολείς των MMPs. Όσον αφορά τις εξειδικευμένες πρωτεΐνες, οι **λαμινίνες** αποτελούν ετεροτριμερείς εξωκυτταρικές πρωτεΐνες, οι οποίες ρυθμίζουν την κυτταρική προσκόλληση μέσω του υποδοχέα της ιντεγκρίνης. Οι ιδιότητες προσκόλλησης των διαφόρων ισόμορφων λαμινίνης επηρεάζουν άμεσα την μετανάστευση των HSCs in vivo. Από την άλλη, η **φιμπρονεκτίνη** είναι μια υψηλού μοριακού βάρους γλυκοπρωτεΐνη, περιέχουσα πολλές επικράτειες δέσμευσης, οι οποίες μπορούν να δεσμεύονται σε δομικές περιοχές άλλων κυττάρων και επιδεικνύουν δεσμευτική συγγένεια με τις ιντεγκρίνες, το κολλαγόνο και τις πρωτεογλυκάνες. Έτσι, η φιμπρονεκτίνη συμβάλλει σημαντικά στην προσκόλληση και ανάπτυξη των HSCs. Όσον αφορά τις **δομικές πρωτεΐνες**, το κολλαγόνο είναι απαραίτητο για τη διατήρηση της δομικής ακεραιότητας του στρωματικού μικροπεριβάλλοντος του μυελού των οστών. Επιπρόσθετα, οι **πρωτεογλυκάνες** είναι εξειδικευμένες γλυκοπρωτεΐνες, οι οποίες περιέχουν τις γλυκοζοαμινογλυκάνες (GAGs). Οι GAGs έχουν σημαντικό ρόλο στη κυτταρική σηματοδότηση, εξαιτίας της μοναδικής τους θέσης στην κυτταρική μεμβράνη και στην ECM. Γενικότερα, συνεισφέρουν στην οργάνωση της ECM και στην κυτταρική προσκόλληση, δεσμεύοντας τα κύτταρα στενά με το κολλαγόνο, την ελαστίνη και τις πρωτεογλυκάνες. Ακόμα, οι πρωτεογλυκάνες όπως η **θειική ηπαράνη**, η οποία εκφράζεται στα στρωματικά κύτταρα του μυελού, υποστηρίζει την αιμοποίηση, με την τοποθέτηση των κυτταροκινών στη στρωματική επιφάνεια. Επιπλέον, η **αιμονεκτίνη και η θρομβοσπονδίνη** είναι πρωτεΐνες προσκόλλησης, οι οποίες εμφανίζουν ειδικότητα δέσμευσης για κύτταρα συγκεκριμένης κυτταρικής σειράς. Η OPN, η σιαλοπρωτεΐνη των οστών, η τενασκίνη C, η SPARC και οι θρομβοσπονδίνες είναι πρωτεΐνες της μήτρας, οι οποίες μεσολαβούν έμμεσα τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των κυττάρων και των συστατικών της ECM και ρυθμίζουν τη διαθεσιμότητα των αυξητικών παραγόντων στο μικροπεριβάλλον του μυελού των οστών. Τέλος, οι **MMPs** είναι εξαρτώμενες από το ψευδάργυρο ενδοπεπτιδάσες, οι οποίες εμπλέκονται στην αποικοδόμηση των πρωτεϊνών της ECM και κατ' επέκταση στην αναδιαμόρφωση της ECM και την απελευθέρωση των δεσμευμένων κυτταροκινών και HSCs στη κυκλοφορία του αίματος. [9]

1.1.2 Ερυθροποίηση

Όπως προαναφέρθηκε στην παράγραφο 1.1.1, η αιμοποίηση περιλαμβάνει τρία διαδοχικά κύματα, τα οποία πραγματοποιούνται σε διακριτές θέσεις, ανάλογα με το στάδιο της ανάπτυξης. Κατά το πρώτο κύμα αιμοποίησης ή πρωτόγονο κύμα, παράγονται μεγαλοβλαστικοί ερυθροβλάστες με πυρήνα, μεγακαρυοκύτταρα και μακροφάγα από τις αιμοποιητικές νησίδες του λεκιθικού σάκου. Οι μεγαλοβλαστικοί ερυθροβλάστες αναφέρονται και ως πρωτόγονοι ερυθροβλάστες (**PEs**) και χαρακτηρίζονται από την έκφραση εμβρυϊκών σφαιρινών. Κατά το δεύτερο κύμα αιμοποίησης, παράγονται, εξίσου από το λεκιθικό σάκο, οι ερυθρομυελοειδείς πρόγονοι (**EMPs**). Στη συνέχεια, στο τρίτο κύμα αιμοποίησης, το οποίο αποτελεί την οριστική πλέον αιμοποίηση, παράγονται τα στελεγχαϊά αιμοποιητικά κύτταρα (**HSCs**) από έναν ιδιαίτερο πληθυσμό ενδοθηλιακών κυττάρων, το αιμογενές ενδοθήλιο, το οποίο εμφανίζεται στη ραχιαία αορτή ή περιοχή Αορτή-Γονάδες-Μεσονέφριο (AGM). Τα EMPs και HSCs μεταναστεύουν στο εμβρυϊκό ήπαρ, όπου τα πρώτα παράγουν ώριμους ερυθροβλάστες με τις οριστικές σφαιρίνες του ενήλικα, ενώ τα δεύτερα υφίστανται κλωνική επέκταση μέχρι να φτάσουν τελικά στο μυελό των οστών, όπου παραμένουν στη φάση ηρεμίας. Τα HSCs μπορεί να προέρχονται και από τα αιμογενή ενδοθηλιακά κύτταρα εντός των αρτηριών του ομφάλιου λώρου, του λεκιθικού σάκου και του πλακούντα. Κατόπιν, τα στελεγχαϊά αιμοποιητικά κύτταρα υφίστανται μια ακολουθία σταδίων διαφοροποίησης, έως ότου να δεσμευτούν σε μια συγκεκριμένη κυτταρική σειρά. Ειδικότερα, οι πρώτοι αναγνωρίσιμοι πρόγονοι των ερυθροκυττάρων, μετά το στάδιο του MEP κυττάρου, είναι τα κύτταρα **BFU-E** (burst-forming unit erythroid) και **CFU-E** (colony-forming unit erythroid), τα οποία χαρακτηρίζονται για την ικανότητα τους να σχηματίζουν αποικίες με διάσπαρτες συστάδες ερυθροβλαστών, σε ημιστερεά μέσα. Το κύτταρο BFU-E είναι ο πιο πρώιμος πρόγονος των ερυθροκυττάρων, ικανός να σχηματίζει σημαντικά μεγαλύτερες αποικίες, σε σχέση με το κύτταρο CFU-E. Το BFU-E διαφοροποιείται, δίνοντας γένεση στο CFU-E, το οποίο σχηματίζει μικρότερες αποικίες, με περίπου 50 κύτταρα, δεν διαθέτει την ικανότητα της αυτοανανέωσης και είναι εξαιρετικά ευαίσθητο στα ερεθίσματα της ερυθροποιητίνης, την κύρια ορμόνη που διεγείρει την ερυθροποίηση. Τα BFU-Es ανευρίσκονται και στην κυκλοφορία, σε αντίθεση με τα CFU-Es, των οποίων η παρουσία στην κυκλοφορία υποδεικνύει την ύπαρξη κάποιας παθολογικής κατάστασης. Η συχνότητα των BFU-Es και CFU-Es στο μυελό των οστών είναι 4-10 και 20-60 κύτταρα στα 10^4 κύτταρα, αντίστοιχα. Τα CFUs διαφοροποιούνται περαιτέρω, δίνοντας γένεση στα ερυθροειδή προγονικά κύτταρα, τα οποία υφίστανται πολλαπλά στάδια ωρίμανσης, εντός ειδικών δομών του μυελού των οστών, τις **ερυθροβλαστικές νησίδες**. Ο πρώτος μορφολογικά αναγνωρίσιμος ερυθροειδής πρόγονος που εμφανίζεται στην ερυθροβλαστική νησίδα είναι η **προερυθροβλάστη**, η οποία διαφοροποιείται

διαδοχικά σε **βασεόφιλη, πολυχρωματόφιλη και ορθοχρωματική ερυθροβλάστη**. Κατά τη διάρκεια αυτών των σταδίων ωρίμανσης, τα προγονικά ερυθροειδή κύτταρα υφίστανται μια πληθώρα δομικών και μορφολογικών αλλαγών, με τελικό αποτέλεσμα το σχηματισμό των **δικτυοερυθροκυττάρων**. Οι αλλαγές αυτές περιλαμβάνουν ειδικές κυτταρικές διαιρέσεις, τη μείωση του κυτταρικού μεγέθους, την εξάλειψη των περισσότερων κυτταρικών οργανιδίων, τη συγκέντρωση υψηλών επιπέδων αιμοσφαιρίνης στο κυτταρόπλασμα για τη μεταφορά του οξυγόνου και τη διαμόρφωση εξειδικευμένης κυτταρικής μεμβράνης, για τη διευκόλυνση της διέλευσης των ερυθροκυττάρων διαμέσου των τριχοειδών αγγείων. Τελικά, τα δικτυοερυθροκύτταρα αφήνουν την ερυθροβλαστική νησίδα και εισέρχονται στην κυκλοφορία του αίματος, μέσω διαπίδυσης, εκτείνοντας ψευδοπόδια διαμέσου του τοιχώματος των μυελικών κολποειδών. Στην κυκλοφορία, υφίστανται αναδιαμόρφωση των κυτταροσκελετικών και μεμβρανικών συστατικών τους, απομακρύνουν τυχόν εναπομείναντα οργανίδια και αποκτούν το τυπικό αμφίκιλο δισκοειδές σχήμα των **ώριμων ερυθροκυττάρων** (Εικόνα 5). [14-16]



Εικόνα 5- Τα στάδια διαφοροποίησης της ερυθροκυτταρικής σειράς. Πηγή: [5] Απεικονίζεται η σειρά των σταδίων διαφοροποίησης των πρόδρομων ερυθροειδών κυττάρων για την παραγωγή των τελικών ώριμων ερυθρών αιμοσφαιρίων. Η ερυθροποίηση λαμβάνει χώρα στο μυελό των οστών και συγκεκριμένα στις ερυθροβλαστικές νησίδες, από το στάδιο του CFU-E έως το δικτυοερυθροκύτταρο. Κατά τη διάρκεια αυτών των σταδίων, τα ερυθροειδή κύτταρα μειώνονται σε μέγεθος, απομακρύνουν τα περισσότερα οργανίδια τους, διαμορφώνουν εξειδικευμένη πλασματική μεμβράνη και συσσωρεύουν μεγάλες ποσότητες αιμοσφαιρίνης στο κυτταρόπλασμα τους. Έτσι, σχηματίζεται το δικτυοερυθροκύτταρο, το οποίο απελευθερώνεται στην κυκλοφορία του αίματος, όπου υφίσταται περαιτέρω αναδιαμόρφωση του κυτταροσκελετού και της μεμβράνης του, καθώς και εξάλειψη των εναπομείναντων οργανιδίων, με τελικό αποτέλεσμα τη δημιουργία του ώριμου ερυθροκυττάρου.

➤ **Μορφολογία προγονικών ερυθροειδών κυττάρων:**

Προερυθροβλάστη: Οι προερυθροβλάστες είναι μεγάλα μονοπύρρηνα κύτταρα, διαμέτρου 20-25 μm, με βασεόφιλο κυτταρόπλασμα κατά τη χρώση με Giemsa, λόγω της υψηλής συγκέντρωσης σε ριβονουκλεϊκά οξέα. Έχουν μεγάλο πυρήνα, ο οποίος καταλαμβάνει το 75-80% του όγκου των κυττάρων, με λόγο

πυρήνα/κυτταροπλάσματος 8:1. Ο πυρήνας περιέχει πυρηνίσκους με ευχρωματίνη, ενώ, επίσης, παρατηρούνται και πυρηνικές εσοχές.

Βασεόφιλη ερυθροβλάστη: Η βασεόφιλη ερυθροβλάστη, όπως και η προερυθροβλάστη, χαρακτηρίζεται για τη μεγάλη αναλογία πυρήνα/κυτταροπλάσματος και περιέχει συμπυκνωμένη χρωματίνη, δηλαδή ετεροχρωματίνη. Έχει διάμετρο 16-18 μm και βασεόφιλο κυτταρόπλασμα κατά τη χρώση με Giemsa, λόγω του μεγάλου αριθμού ριβοσωμάτων που συνθέτουν αιμοσφαιρίνη.

Πολυχρωματόφιλη ερυθροβλάστη: Η πολυχρωματόφιλη ερυθροβλάστη, διαμέτρου 12-15 μm έχει πιο συμπυκνωμένο πυρήνα από τη βασεόφιλη ερυθροβλάστη, με συστάδες ετεροχρωματίνης δίπλα στους πυρηνικούς πόρους. Οι περιπυρηνικές δεξαμενές των πολυχρωματόφιλων ερυθροβλαστών είναι ευρύτερες, σε σχέση με αυτές των βασεόφιλων ερυθροβλαστών και των προερυθροβλαστών. Κατά τη χρώση με Giemsa, το κυτταρόπλασμα λαμβάνει μια ροζ απόχρωση, λόγω της υψηλής κυτταροπλασματικής συγκέντρωσης σε αιμοσφαιρίνη.

Ορθοχρωματόφιλη ερυθροβλάστη: Η ορθοχρωματόφιλη ερυθροβλάστη δεν έχει την ικανότητα κυτταρικής διαίρεσης. Έχει διάμετρο 10-15 μm, συμπυκνωμένο πυρήνα, με μεγάλα συσσωματώματα ετεροχρωματίνης και ηωσινόφιλο κυτταρόπλασμα κατά τη χρώση Giemsa, λόγω της υψηλής συγκέντρωσης σε αιμοσφαιρίνη.

Δικτυοερυθροκύτταρο: Η αποβολή του πυρήνα από την ορθοχρωματόφιλη ερυθροβλάστη οδηγεί στο σχηματισμό του δικτυοερυθροκυττάρου και του **πυρηνοκυττάρου**, μιας δομής η οποία αποτελείται από τον πυρήνα, που μόλις αποβλήθηκε από την ορθοχρωματόφιλη ερυθροβλάστη, περιβαλλόμενο από ένα λεπτό στρώμα κυτταροπλάσματος και κυτταρικής μεμβράνης. Μετά το σχηματισμό των δικτυοερυθροκυττάρων, τα τελευταία παραμένουν στο μυελό των οστών, όπου υφίστανται περαιτέρω ωρίμανση για 24 με 48 ώρες. Στη συνέχεια, εγκαταλείπουν το μυελό, μέσω διαπίδυσης, και εισέρχονται στην κυκλοφορία, όπου ανευρίσκονται για 24-48 ώρες, έως ότου μετατραπούν σε ερυθροκύτταρα. Τα δικτυοερυθροκύτταρα έχουν διάμετρο 8-10 μm και παίρνουν το όνομα τους από την παρουσία μπλε δικτυωτών συσσωματωμάτων στο κυτταρόπλασμα, όταν χρωματίζονται με έντονες χρώσεις, όπως το κυανό του κρεζυλίου. Το κυτταρόπλασμα τους χρωματίζεται ροζ με τη χρώση Giemsa, λόγω της αυξημένης συγκέντρωσης σε αιμοσφαιρίνη. Τα νεοσχηματιζόμενα δικτυοερυθροκύτταρα έχουν μεγαλύτερη επιφάνεια από τα πιο ώριμα δικτυοερυθροκύτταρα, λιγότερο σταθερή κυτταρική μεμβράνη σε σχέση με αυτή ενός ώριμου ερυθροκυττάρου και διατηρούν

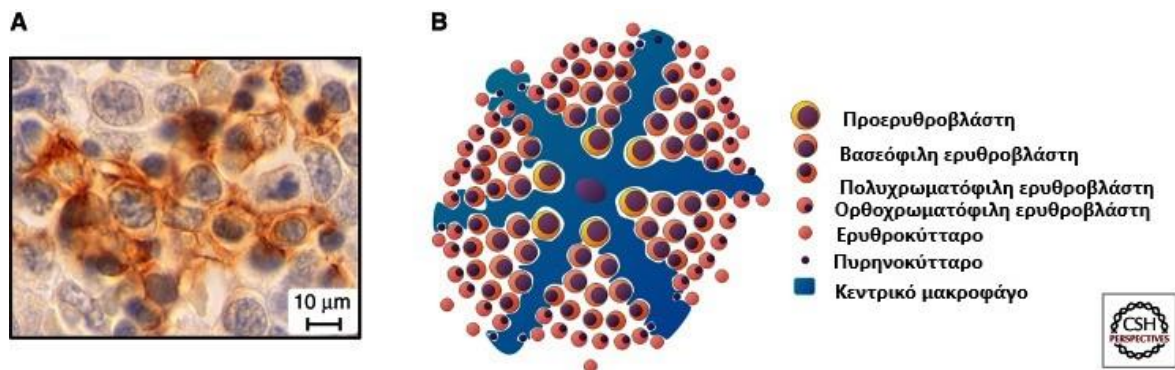
ακόμα κάποια κυτταρικά οργανίδια, όπως τα μιτοχόνδρια και τα πολυριβοσώματα. Ωστόσο, για τη διαφοροποίηση τους σε ώριμα ερυθροκύτταρα είναι απαραίτητη η αναδιαμόρφωση της πλασματικής τους μεμβράνης. Η διαδικασία αυτή πραγματοποιείται μέσω μια αρχικής εσωτερίκευσης ορισμένων μεμβρανικών συστατικών, η οποία τελικά οδηγεί στην εξωκυττάρωση και κατ' επέκταση την αποβολή κυτταροπλασματικών θραυσμάτων και ειδικών μεμβρανικών συστατικών. Π.χ τα κενοτόπια, τα οποία φέρουν φερριτίνη, καθώς και οι υποδοχείς τρανσφερίνης απομακρύνονται μέσω εξωκυττάρωσης, σε κυστίδια επικαλυμμένα με κλαθρίνη. [16]

➤ **Ο ρόλος της ερυθροβλαστικής νησίδας στην ερυθροποίηση:**

Η σταδιακή ωρίμανση των προερυθροβλαστών σε δικτυοερυθροκύτταρα πραγματοποιείται σε ειδικές δομές, οι οποίες καλούνται ερυθροβλαστικές νησίδες και απαντώνται στα ερυθροποιητικά όργανα, όπως το εμβρυϊκό ήπαρ, ο μυελός των οστών και σε ορισμένα είδη ο σπλήνας. Οι ερυθροβλαστικές νησίδες αποτελούνται από ένα κεντρικό μακροφάγο, το οποίο περιβάλλεται από τα αναπτυσσόμενα ερυθροειδή κύτταρα (Εικόνα 6). [16] Στο μυελό των οστών, οι ερυθροβλαστικές νησίδες κατανέμονται ομοιόμορφα, παρά την αρχική υπόθεση ότι βρίσκονται σε μεγαλύτερη αφθονία παρακείμενες στα μυελικά κολποειδή, για την ευκολότερη μεταβίβαση των δικτυοερυθροκυττάρων από το μυελό στην κυκλοφορία. Εντούτοις, βρέθηκε ότι η σύσταση των ερυθροβλαστικών νησίδων, οι οποίες είναι παρακείμενες στα μυελικά κολποειδή, διαφέρει σε σχέση με εκείνων, που εντοπίζονται σε πιο απομακρυσμένες περιοχές. Ειδικότερα, αποδείχτηκε ότι οι μη παρακείμενες στα μυελικά κολποειδή ερυθροβλαστικές νησίδες περιέχουν περισσότερους προερυθροβλάστες, ενώ οι παρακείμενες στα κολποειδή νησίδες είναι πλούσιες σε ορθοχρωματόφιλους ερυθροβλάστες, με τα ποσοστά των βασεόφιλων και πολυχρωματόφιλων ερυθροβλαστών να είναι περίπου ισοδύναμα και στις δύο. Έτσι, προτάθηκε ότι οι ερυθροβλαστικές νησίδες μεταναστεύουν προς τα μυελικά κολποειδή, όσο τα κύτταρα στο εσωτερικό τους ωριμάζουν, ένα εύρημα το οποίο μπορεί να αποκαλύψει τον πιθανό ρόλο των εκκρινόμενων από τους ώριμους ερυθροβλάστες ή το κεντρικό μακροφάγο πρωτεασών, στην αναδιαμόρφωση της υποκείμενης εξωκυττάριας μήτρας, για την διευκόλυνση της μετανάστευσης. [17]

Οι ερυθροβλαστικές νησίδες είναι ύψιστης σημασίας για την υποστήριξη, τόσο των πρώιμων όσο και των όψιμων σταδίων της ερυθροποίησης. Ειδικότερα, κατά τα πρώιμα στάδια της ερυθροποίησης, το κεντρικό μακροφάγο της νησίδας αλληλεπιδρά με τους αναπτυσσόμενους ερυθροβλάστες, **παρέχοντας θρεπτικά συστατικά**, καθώς και **ερεθίσματα πολλαπλασιασμού** και επιβίωσης. Μάλιστα, η άμεση επαφή του κεντρικού μακροφάγου με τους παρακείμενους ερυθροβλάστες προάγει τον πολλαπλασιασμό τους και την επακόλουθη παραγωγή των ερυθρών

αιμοσφαιρίων. Πρόσφατες μελέτες σε καλλιέργειες προγονικών ερυθροειδών κυττάρων, έδειξαν ότι οι ερυθροβλάστες, οι οποίοι βρίσκονται σε άμεση αλληλεπίδραση με τα μακροφάγα, μπορούσαν να πολλαπλασιάζονται τρεις φορές περισσότερο, σε σχέση με τα ερυθροειδή προγονικά κύτταρα, που καλλιεργήθηκαν απουσία των μακροφάγων. Επίσης, ο χρόνος μετάβασης από τη φάση G₀ στην G₁ του κυτταρικού κύκλου βρέθηκε μειωμένος στους ερυθροβλάστες, οι οποίοι καλλιεργήθηκαν παρουσία των μακροφάγων. Όλα αυτά τα ευρήματα επιβεβαιώνουν την ιδέα, ότι διαταραχές στη λειτουργία των κεντρικών μακροφάγων των ερυθροβλαστικών νησίδων στο μυελό, μπορεί να οδηγήσουν σε μειωμένη παραγωγή ερυθρών αιμοσφαιρίων και κατ' επέκταση σε αναιμία. Επιπρόσθετα, τα κεντρικά μακροφάγα της ερυθροβλαστικής νησίδας είναι υπεύθυνα για τη **φαγοκυττάρωση του πυρήνα** που αποβάλλεται, κατά τη διαφοροποίηση της ορθοχρωματόφιλης ερυθροβλάστη σε δικτυοερυθροκύτταρο. Υπάρχουν, ακόμα, ενδείξεις ότι τα κεντρικά μακροφάγα προωθούν την **αποπυρήνωση της ορθοχρωματόφιλης ερυθροβλάστη**. Μια επιπλέον καθοριστική λειτουργία των κεντρικών μακροφάγων κατά τη διάρκεια της ερυθροκυτταρικής ωρίμανσης, είναι η **μεταφορά σιδήρου** στα παρακείμενα ερυθροειδή κύτταρα. Τέλος, τα μακροφάγα αλληλεπιδρούν με τους ερυθροβλάστες, μέσω των προσκολλητικών τους ιδιοτήτων, απαραίτητων για τη **διατήρηση της ακεραιότητας της ερυθροβλαστικής νησίδας**, αλλά και για την επαγωγή ενδοκυτταρικών οδών σηματοδότησης και την επακόλουθη **ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης των ερυθροειδών κυττάρων**. [17,18]



Εικόνα 6- Η ερυθροβλαστική νησίδα. Πηγή: [6] Στην εικόνα A απεικονίζεται η ερυθροβλαστική νησίδα στο εμβρυϊκό ήπαρ. Οι κυτταροπλασματικές προεκτάσεις του κεντρικού μακροφάγου έχουν χρωματιστεί καφέ, με το αντίσωμα F4/80, ενώ τα παρακείμενα κύτταρα γύρω από τις προεκτάσεις, αποτελούν τα προγονικά ερυθροειδή κύτταρα σε διάφορες φάσεις της ερυθροκυτταρικής ωρίμανσης. Στην εικόνα B απεικονίζεται σχηματικά η δομή της ερυθροβλαστικής νησίδας με τις διάφορες μορφές των ερυθροβλαστών.

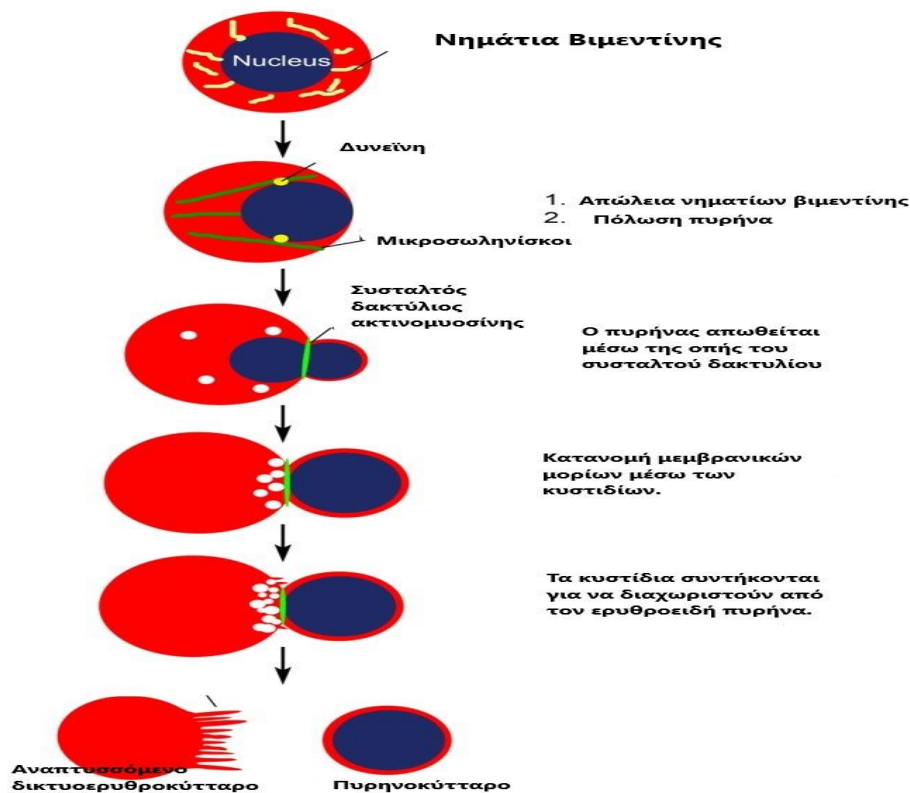
➤ **Κυτταρικά συμβάντα κατά την ερυθροποίηση:**

Η ερυθροποίηση είναι μια πολύπλοκη σταδιακή διεργασία, η οποία πραγματοποιείται στις ερυθροβλαστικές νησίδες του μυελού των οστών και έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή δύο δισεκατομμυρίων νέων ερυθροκυττάρων την ημέρα. Κατά τη διάρκεια της ερυθροποίησης, λαμβάνουν χώρα πολυάριθμα κυτταρικά συμβάντα στους αναπτυσσόμενους ερυθροβλάστες, οποιαδήποτε αλλαγή στα οποία μπορεί να οδηγήσει σε παθολογικές καταστάσεις, όπως η αναιμία. Η ερυθροποίηση ξεκινά με την **προσκόλληση των προερυθροβλαστών στο κεντρικό μακροφάγο της ερυθροβλαστικής νησίδας**, μέσω επιφανειακών μορίων προσκόλλησης, όπως οι ιντεγκρίνες και τα μόρια EMP/Maea και EphB1. Αυτό συνεπάγεται την επαγωγή οδών σηματοδότησης, με αποτέλεσμα την αναδιαμόρφωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης, τόσο στο κεντρικό μακροφάγο όσο και στην προερυθροβλάστη, προάγοντας έτσι την είσοδο της στην καθορισμένη σειρά διαφοροποίησης της. Κατά την εξέλιξη της προερυθροβλάστη σε ορθοχρωματόφιλη ερυθροβλάστη, λαμβάνουν χώρα βαθμιαίες διεργασίες, συμπεριλαμβανομένων της **σύνθεσης αιμοσφαιρίνης, της καταστροφής των κυτταρικών οργανιδίων** –πιθανόν μέσω μιας προγραμματισμένης διαδικασίας, που καλείται αυτοφαγία-, και της **συμπύκνωσης της χρωματίνης με την επακόλουθη μείωση του μεγέθους του πυρήνα**. Στο τελευταίο στάδιο της ερυθροβλαστικής διαφοροποίησης, διενεργείται η **αποπυρήνωση** της ορθοχρωματόφιλης ερυθροβλάστη, ένα είδος ασύμμετρης κυτταρικής διαίρεσης, η οποία οδηγεί στο σχηματισμό του απύρηνου δικτυοερυθροκυττάρου και του πυρηνοκυττάρου. Κατά τη διάρκεια της αποπυρήνωσης, απομακρύνονται περίπου 40 pg πυρηνικού υλικού. Για την έναρξη της αποπυρήνωσης, είναι απαραίτητη η **αναδιάταξη των μικροσωληνίσκων του κυττάρου**, ώστε ο πυρήνας να γίνει έκκεντρος και πολωμένος, δηλαδή να μετακινηθεί προς το ένα άκρο της περιφέρειας του κυττάρου. Ειδικότερα, στα αρχικά στάδια της ερυθροποίησης, ο πυρήνας συγκρατείται στο κέντρο του κυττάρου μέσω ενός κυτταροσκελετικού δικτύου, το οποίο σχηματίζεται από τα ενδιάμεσα νηματία βιμεντίνης. Προς το τέλος της ερυθροβλαστικής ωρίμανσης, μειώνεται η έκφραση της βιμεντίνης, με αποτέλεσμα την απώλεια των ενδιάμεσων νηματίων και την μετακίνηση του πυρήνα προς την περιφέρεια του κυττάρου. Η έκκεντρη πόλωση του πυρήνα ενισχύεται περαιτέρω από την εξαρτώμενη από τους μικροσωληνίσκους φωσφοϊνοσιτιδική 3-κινάση (PI3K) και από την πρωτεΐνη κινητήρα, τη δυνεΐνη, υπεύθυνη για τη μετακίνηση του πυρηνικού φορτίου μόνο προς την κατεύθυνση του αρνητικού άκρου των μικροσωληνίσκων. Έπειτα, η F-ακτίνη και οι μικροσωληνίσκοι που ρυθμίζονται από την τροπομοντουλίνη-1 και τη γελσολίνη, σχηματίζουν ένα **συσταλτό δακτύλιο ακτινομυοσίνης** στο μεμβρανικό άκρο του κυττάρου, όπου βρίσκεται τοποθετημένος ο πυρήνας μετά την πόλωση. Στη συνέχεια, η F-ακτίνη προκαλεί

κυτταροπλασματικές συσπάσεις, οι οποίες ωθούν τον πυρήνα έξω από το κύτταρο, διαμέσου του στενού ανοίγματος του δακτυλίου. Σε αυτό το στάδιο, πραγματοποιείται η **ταξινόμηση των μεμβρανικών πρωτεϊνών επιφάνειας της ορθοχρωματόφιλης ερυθροβλάστη**, είτε στο νεοσχηματιζόμενο απύρρηνο δικτυοερυθροκύτταρο, είτε στο πυρηνοκύτταρο. Η διαδικασία αυτή είναι ύψιστης σημασίας για τη δημιουργία του τελικού ώριμου ερυθροκυττάρου, καθώς εξασφαλίζει ότι τα επιφανειακά μόρια προσκόλλησης της ορθοχρωματόφιλης ερυθροβλάστη θα κατανεμηθούν στη κυτταρική μεμβράνη του πυρηνοκυττάρου και όχι του δικτυοερυθροκυττάρου. Διαταραχές σε αυτή τη λειτουργία έχουν παρατηρηθεί σε πολλές αιματολογικές παθήσεις, όπως η σφαιροκυττάρωση. Τα επιφανειακά μόρια προσκόλλησης, τα οποία τείνουν να κατανέμονται κατά προτίμηση στη κυτταρική μεμβράνη του πυρηνοκυττάρου είναι οι ιντεγκρίνες α4, α5 και β1, καθώς και τα μόρια CD9, CD44 και CD147. Αντίθετα, στη κυτταρική μεμβράνη του δικτυοερυθροκυττάρου κατανέμονται κυρίως υψηλά γλυκοζυλιωμένα επιφανειακά μόρια, τα οποία δρουν πιθανά κατά της προσκόλλησης, όπως οι γλυκοφορίνες A και C, το αντιγόνο Rhesus και Ter-119 και ο ανιοντοανταλλάκτης διττανθρακικών SLC4A1/Zώνη 3/AE-1. Η ταξινόμηση, λοιπόν, των μεμβρανικών πρωτεϊνών πραγματοποιείται μέσω των κυστιδίων ή των κενοτοπίων, τα οποία διακινούνται μεταξύ του νεοσχηματιζόμενου δικτυοερυθροκυττάρου και πυρηνοκυττάρου, συνενώνονται σε μεγαλύτερα κυστίδια και συντήκονται με την πλασματική μεμβράνη ενός εκ των δύο. Έτσι, προωθείται η αναδιαμόρφωση της κυτταρικής μεμβράνης του αναπτυσσόμενου δικτυοερυθροκυττάρου (Εικόνα 7).

Μετά το διαχωρισμό του πυρηνοκυττάρου από το δικτυοερυθροκύτταρο, ακολουθεί η αποικοδόμηση του πρώτου από το κεντρικό μακροφάγο της ερυθροβλαστικής νησίδας, με τη βοήθεια της DNAασης II και της οξυγενάσης της αίμης 1, καθώς και η ωρίμανση του δικτυοερυθροκυττάρου σε ερυθροκύτταρο. Πιο συγκεκριμένα, το νεοσχηματιζόμενο δικτυοερυθροκύτταρο περιέχει πολυριβοσώματα και είδη RNA, για τη σύνθεση της απαιτούμενης συγκέντρωσης αιμοσφαιρίνης του ώριμου ερυθροκυττάρου, και ένα μικρό αριθμό εναπομείναντων μιτοχονδρίων, τα οποία καταστρέφονται με τη διαδικασία της μιτοφαγίας. Σε αυτό το στάδιο, τα δικτυοερυθροκύτταρα βρίσκονται σε άμεση επαφή με το κεντρικό μακροφάγο της ερυθροβλαστικής νησίδας, με τα σημεία σύνδεσής τους να είναι στενότερα από τα αντίστοιχα μεταξύ ερυθροβλαστών-κεντρικών μακροφάγων. Για την ωρίμανση σε ερυθροκύτταρα και την αποκόλληση τους από την ερυθροβλαστική νησίδα, τα δικτυοερυθροκύτταρα υφίστανται **περαιτέρω αναδιαμόρφωση της κυτταρικής τους μεμβράνης**, αφαιρώντας μικρά εναπομείναντα κλάσματα μορίων προσκόλλησης, όπως τα μόρια CD44, CD71 και α4β1. Π.χ το CD71 αφαιρείται μέσω της ενδοκυτταρικής οδού, κατά την οποία το μόριο προσκόλλησης εισέρχεται εντός του κυττάρου μέσω ενδοκυττάρωσης και το προκύπτον ενδόσωμα που περιέχει το

CD71, συντήκεται σε μεγαλύτερα εξωσώματα και απελευθερώνεται με εξωκυττάρωση. Έτσι, με αυτή τη διαδικασία απομακρύνεται το 20% της κυτταρικής μεμβράνης των δικτυοερυθροκυττάρων και της κυτταροπλασματικής τουμπουλίνης και ακτίνης, συντελώντας στην παράλληλη μείωση του όγκου των κυττάρων. Ακόμα, η **μείωση του όγκου** των δικτυοερυθροκυττάρων επιτυγχάνεται με την αφαίρεση της ακουαπορίνης-1 από τη μεμβράνη, μέσω της ενδοκυτταρικής οδού, αλλά και με την ενεργοποίηση του συν-μεταφορέα χλωρίου-καλίου KCC, ο οποίος επάγει την αφαίρεση του νερού. Ως εκ τούτου, τα δικτυοερυθροκύτταρα αποδεσμεύονται από τα κεντρικά μακροφάγα του μυελού κι εισέρχονται στην κυκλοφορία του αίματος, όπου υπόκεινται σε επιπλέον αναδιατάξεις του κυτταροσκελετού τους εντός 48 ωρών, για τη δημιουργία του τελικού ώριμου κυττάρου, του ερυθροκυττάρου, με το χαρακτηριστικό αμφίκιλλο δισκοειδές σχήμα. [15,16]



Εικόνα 7- Τα στάδια αποπυρήνωσης της ορθοχρωματόφιλης ερυθροβλάστη για τη δημιουργία του δικτυοερυθροκυττάρου. Πηγή: [7] Προς το τέλος της ερυθροκυτταρικής ωρίμανσης, μειώνεται η έκφραση των ενδιάμεσων νηματίων βιμεντίνης, που συγκρατούν τον πυρήνα στο κέντρο του κυττάρου. Έτσι, ο πυρήνας μετακινείται προς την περιφέρεια του κυττάρου, με τη βοήθεια της δυνείνης και των μικροσωληνίσκων του κυτταροσκελετού. Στη συνέχεια, η F-ακτίνη και οι μικροσωληνίσκοι σχηματίζουν ένα συσταλτό δακτύλιο ακτινομυοσίνης στο περιφερικό άκρο του κυττάρου, όπου βρίσκεται ο πυρήνας. Η F-ακτίνη προκαλεί κυτταροπλασματικές συσπάσεις, με συνέπεια την εξώθηση του πυρήνα από το κύτταρο, μέσω του στενού ανοίγματος του δακτυλίου. Πριν την εξώθηση του πυρήνα, συγκεντρώνονται κυστιδία ή κενοτόπια στο άνοιγμα του δακτυλίου, τα οποία ακολούθως συνενώνονται σε μεγαλύτερα κυστιδία και τελικά συντήκονται στη μεμβράνη είτε του πυρηνοκυττάρου είτε του δικτυοερυθροκυττάρου. Έτσι, διενεργείται η επιλογή των μορίων που θα κατανεμηθούν στη μεμβράνη του αναπτυσσόμενου δικτυοερυθροκυττάρου. Τα μόρια με προσκολλητικές ιδιότητες μεταφέρονται στη μεμβράνη του πυρηνοκυττάρου, μέσω σύντηξης των αντίστοιχων κυστιδίων στο εξωθούμενο πυρηνοκύτταρο, ενώ εκείνα που δρουν κατά της προσκόλλησης μεταφέρονται ομοίως στη μεμβράνη του αναπτυσσόμενου δικτυοερυθροκυττάρου.

➤ **Ρυθμιστικοί παράγοντες ερυθροποίησης:**

Η ερυθροποίηση ελέγχεται από έναν αριθμό μεταγραφικών και αυξητικών παραγόντων, αναγκαίων για τη φυσιολογική της εξέλιξη. Όσον αφορά τους μεταγραφικούς παράγοντες, οι **TAL1** και **LMO2** δρουν κατά την έναρξη της αιμοποίησης στο έμβρυο και η απουσία τους οδηγεί στην απώλεια τόσο της πρωτόγονης, όσο και της οριστικής αιμοποίησης. Επιπλέον, ο μεταγραφικός παράγοντας **GATA-2** διαδραματίζει καθοριστικό ρόλο στα πρώιμα στάδια της αιμοποίησης, ειδικά για την προώθηση του πολλαπλασιασμού των προγονικών αιμοποιητικών κυττάρων, και όχι τόσο για τη διαφοροποίησή τους. Απώλεια του γονιδίου GATA-2 οδηγεί στην κατάργηση της πρωτόγονης και οριστικής αιμοποίησης. Ακόμα, ο μεταγραφικός παράγοντας **RUNX1** είναι αναγκαίος για τα αρχικά στάδια της οριστικής αιμοποίησης.

Μετά τον σχηματισμό των HSCs, ξεκινάει η δέσμευση των προγονικών αιμοποιητικών κυττάρων προς μια συγκεκριμένη κυτταρική σειρά, είτε τη λεμφοειδή, είτε τη μυελοειδή. Σε αυτό το στάδιο, εμπλέκεται κυρίως ο μεταγραφικός παράγοντας **PU.1**, ανάλογα με το επίπεδο έκφρασης του. Πιο συγκεκριμένα, τα υψηλά επίπεδα έκφρασης του PU.1 οδηγούν στη δέσμευση προς τη μυελοειδή σειρά, ενώ τα χαμηλότερα επίπεδα έκφρασης στη δέσμευση προς τη λεμφική σειρά. [19]

Ο κύριος ρυθμιστής της ερυθροποίησης είναι η **ερυθροποιητίνη (EPO)**, μια κυτταροκίνη που παράγεται από τους νεφρούς, ως απόκριση στη χαμηλή τάση οξυγόνου στους ιστούς, μέσω της δράσης του συμπλέγματος του επαγόμενου από την υποξία μεταγραφικού παράγοντα (HIF). Η EPO δεσμεύεται με τον υποδοχέα της EPOR στα προγονικά ερυθροειδή κύτταρα του μυελού των οστών, με αποτέλεσμα την επαγωγή πληθώρας οδών σηματοδότησης, που προωθούν τη διαφοροποίηση τους προς ώριμα ερυθροκύτταρα. Ακόμα, προάγει την ερυθροποίηση και κατά την εμβρυογένεση. Οι διαταραχές στην παραγωγή της EPO προκαλούν πολυάριθμες παθήσεις, σχετιζόμενες με υψηλά ή χαμηλά επίπεδα ερυθρών αιμοσφαιρίων. Η EPO δρα κυρίως στα κύτταρα CFU-E και στους προερυθροβλάστες, για την προώθηση της ωρίμανσης και της επιβίωσης τους. Επίσης, επάγει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και μπορεί να κατευθύνει τα πολυδύναμα αιμοποιητικά κύτταρα προς την ερυθροκυτταρική σειρά, χωρίς να είναι απαραίτητη για τη δέσμευσή τους σε αυτή την κυτταρική γενεαλογία. Έτσι, η in vivo χορήγηση EPO κατευθύνει ταχέως τα προγονικά κύτταρα προς την ερυθροειδή σειρά, έναντι της μυελοειδούς και τροποποιεί τη γονιδιακή έκφραση των κυττάρων BFU-E και CFU-E. [15,19]

Επιπρόσθετες κυτταροκίνες, οι οποίες δρουν στα προγονικά ερυθροειδή κύτταρα, είναι η θρομβοποιητίνη (**TPO**), η **GM-CSF**, η **GCF** και οι **ιντερλευκίνες 3 και 11**.

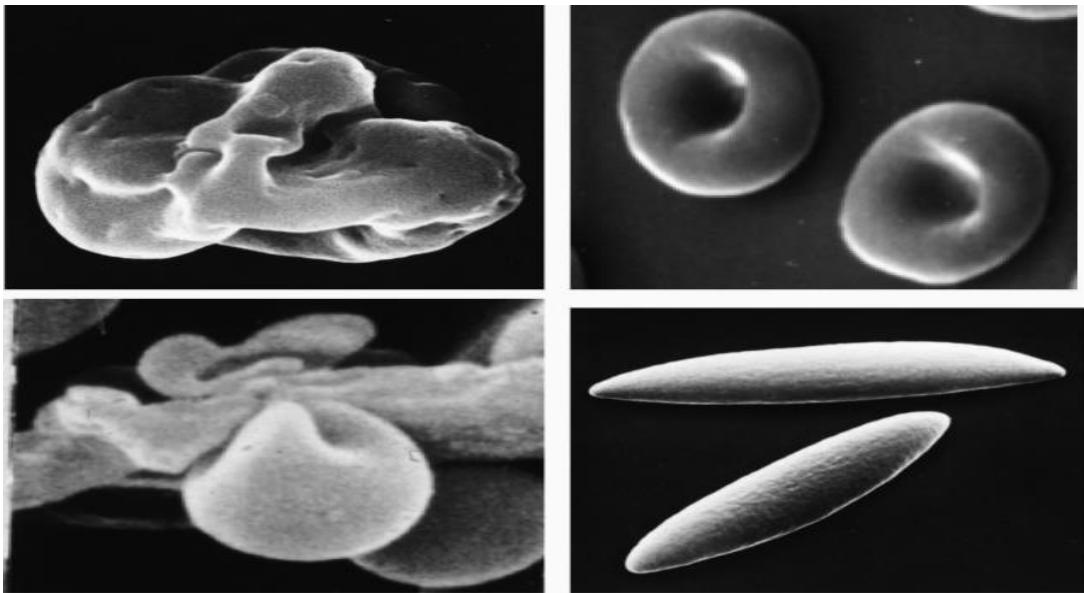
Ειδικότερα, η **GCF** συνδέεται με τον υποδοχέα της c-kit, μια τυροσινική κινάση, επάγοντας οδούς σηματοδότησης, συμπεριλαμβανομένων της κινάσης PI-3, των κινασών Src και του PLC-γ. Σε πιο όψιμα στάδια της ερυθροποίησης, λειτουργεί σε συνεργασία με την EPO, για την προαγωγή του πολλαπλασιασμού και της επέκτασης των αναπτυσσόμενων προγονικών ερυθροειδών κυττάρων. Εκτός από την ερυθροποιητίνη και την GCF, αυξητικοί παράγοντες ζωτικής σημασίας για τη φυσιολογική ερυθροποίηση, εμπλέκονται περαιτέρω επικουρικοί παράγοντες, όπως η πρωτεΐνη **BMP4**, **STAT5** και ο υποδοχέας των γλυκοκορτικοειδών (**GR**). [19,20]

1.1.3 Λειτουργίες και ιδιότητες των ερυθρών αιμοσφαιρίων

Τα ερυθρά αιμοσφαίρια είναι ένας ιδιαίτερος κυτταρικός τύπος, με μοναδικές ιδιότητες, οι οποίες τα καθιστούν ικανά να ανταπεξέρχονται στο απαιτητικό ταξίδι των 120 ημερών ζωής τους, στην κυκλοφορία. Αποτελούν τον πολυπληθέστερο κυτταρικό τύπο του αίματος και διακρίνονται για την ιδιόμορφη σύστασή τους, καθώς υπολείπονται οργανιδίων, τα οποία είναι απαραίτητα για την επιβίωση άλλων κυττάρων. Η απουσία των οργανιδίων επιτρέπει στο ερυθροκύτταρο να συσσωρεύει μεγάλες ποσότητες αιμοσφαιρίνης στο κυτταρόπλασμα του, μια πρωτεΐνη υπεύθυνη για τη μεταφορά του οξυγόνου στους ιστούς, και να έχει την απαραίτητη ευκαμψία για τη διακίνηση του στο αγγειακό δίκτυο. Επιπλέον, σε αντίθεση με άλλους κυτταρικούς τύπους, η λειτουργία και η επιβίωση των ερυθροκυττάρων δεν εξαρτάται από την αλληλεπίδραση τους με άλλα κύτταρα. Κατά συνέπεια, η προσκόλλησή τους σε άλλα κύτταρα ή το αγγειακό τοίχωμα είναι αμελητέα, υπό φυσιολογικές συνθήκες. [21,22] Ο κύριος **ρόλος των ερυθρών αιμοσφαιρίων**, λοιπόν, είναι η μεταφορά του οξυγόνου από τους πνεύμονες στους ιστούς και του διοξειδίου του άνθρακα από τους ιστούς στους πνεύμονες, με τη δέσμευση των αερίων στην αιμοσφαιρίνη, η διατήρηση της οξεοβασικής ισορροπίας αλλά και η μεταφορά ανοσοσυμπλεγμάτων πρωτεϊνών σχετιζόμενων με τη γλυκοφωσφατιδυλινοσιτόλη. Παράλληλα, τα ερυθρά αιμοσφαίρια συμβάλλουν στη θρόμβωση και την αιμόσταση, καθώς και στη ρύθμιση του αγγειακού τόνου και της αιματικής ροής, μέσω του ελέγχου της συστηματικής βιοδιαθεσιμότητας του NO, το οποίο προκαλεί αγγειοδιαστολή. Η **αιμοσφαιρίνη** είναι μια τετραμερής πρωτεΐνη, η οποία αποτελείται από δύο α και δύο β πολυπεπτιδικές αλυσίδες, κάθε μια από τις οποίες αποτελείται από μια ομάδα αίμης, περιέχουσα σίδηρο, ικανό να δεσμεύει ένα μόριο οξυγόνου. [23-28]

Για τη μεταφορά του οξυγόνου στα κύτταρα, είναι αναγκαία η φυσιολογική ροή του αίματος σε όλο το καρδιαγγειακό σύστημα και ειδικότερα στη μικροκυκλοφορία. Δεδομένου ότι τα ερυθρά αιμοσφαίρια αποτελούν το κύριο κυτταρικό στοιχείο του αίματος, διαδραματίζουν καθοριστικό ρόλο στη φυσιολογία της ροής του αίματος και

κατ' επέκταση στη καρδιαγγειακή λειτουργία. Τα ερυθροκύτταρα έχουν εξελιχθεί με μία βασική ιδιότητα, η οποία τα βοηθά να αντιστέκονται στις υψηλές διατμητικές δυνάμεις κατά τη διέλευση τους από τις μεγάλες αρτηρίες και να διακινούνται αποτελεσματικά κατά μήκος των στενών τριχοειδών αγγείων, χωρίς τη ρήξη τους και την επακόλουθη απόφραξη της αιματικής κυκλοφορίας. Η ιδιότητα αυτή είναι η **προσαρμοστικότητα ή παραμορφωσιμότητα**, δηλαδή η ικανότητα του ερυθροκυττάρου να τροποποιεί το σχήμα και τη μορφολογία του, με σκοπό την αντιστάθμιση των συνεχώς μεταβαλλόμενων συνθηκών της αιματικής ροής (Εικόνα 8). Ωστόσο, για τη φυσιολογική ροή του αίματος στη **μικροκυκλοφορία** απαιτείται και μία επιπλέον ιδιότητα των ερυθροκυττάρων, εκτός από την παραμορφωσιμότητα, την **προσκόλληση**, δηλαδή την έκθεση ολόκληρης της περιφέρειας του ερυθροκυττάρου στο αγγειακό τοίχωμα. Σε πολλές αιματολογικές διαταραχές παρατηρείται μειωμένη παραμορφωσιμότητα ή ανώμαλη προσκόλληση των ερυθρών στο αγγειακό ενδοθήλιο, με συνέπεια την απόφραξη της ροής του αίματος στα τριχοειδή (Εικόνα 9).



Εικόνα 8- Η μορφολογία των ερυθροκυττάρων υπό διάφορες συνθήκες. Πηγή: [8] Οι παραπάνω εικόνες αντικατοπτρίζουν τις διάφορες μεταβολές, που μπορεί να πραγματοποιηθούν στη μορφολογία και το σχήμα των ερυθροκυττάρων, ως απόκριση στις συνθήκες της κυκλοφορίας. Στην πάνω αριστερή εικόνα απεικονίζεται ένα πολύλοβο δικτυοερυθροκύτταρο και στην πάνω δεξιά ο πρόγονος του ώριμου ερυθροκυττάρου. Στην κάτω αριστερή εικόνα απεικονίζεται η παραμόρφωση, που υφίστανται τα ερυθροκύτταρα, προκειμένου να διαπεράσουν τη στενή ενδοθηλιακή σχισμή, μεταξύ των πολφικών χορδών του ερυθρού πολφού και των κολποειδών του σπλήνα. Αντίθετα, στην κάτω δεξιά εικόνα φαίνεται το ελλειψοειδές σχήμα που αποκτούν τα ερυθρά αιμοσφαίρια, ύστερα από επαγωγή κατάλληλων συνθηκών ροής in vitro.

Η **παραμορφωσιμότητα** καθορίζεται από τα εξής χαρακτηριστικά των ερυθροκυττάρων:

- i. τη **γεωμετρία του κυττάρου**,
- ii. το **χαμηλό κυτταροπλασματικό ιξώδες** και

iii. την **ακεραιότητα και οργάνωση του κυτταροσκελετικού δικτύου.**

Γεωμετρία ερυθροκυττάρου: Η γεωμετρία του ερυθροκυττάρου, δηλαδή το σχήμα του αμφίκυκλου δίσκου, προσδίδει στο ερυθροκύτταρο ευκαμψία και ευελιξία, καθώς και υψηλή αναλογία κυτταρικής επιφάνειας προς όγκο, απαραίτητη για τη δέσμευση των αερίων. Το δισκοειδές σχήμα καθορίζεται από τις **δομικές πρωτεΐνες του κυτταροσκελετού** κι από τα **κανάλια ιόντων**. Για τη διατήρηση του σχήματος, ο όγκος στο εσωτερικό του ερυθροκυττάρου είναι απαραίτητο να μην υπερβαίνει τις δυνάμεις οργάνωσης του κυτταροσκελετού. Διαταραχές που σχετίζονται με τον κυτταροσκελετό των ερυθρών αιμοσφαιρίων, όπως η ελλειπτοκυττάρωση και η σφαιροκυττάρωση, έχουν ως αποτέλεσμα την μεταβολή του συνολικού σχήματος των ερυθρών και κατ' επέκταση τη μείωση της αναλογίας κυτταρικής επιφάνειας προς όγκο και της παραμορφωσιμότητας, με επιζήμιες επιπτώσεις στην ανταλλαγή των αερίων και τη διακίνηση στη μικροκυκλοφορία.

Κυτταροπλασματικό ιξώδες: Η παραμορφωσιμότητα του ερυθροκυττάρου εξαρτάται τόσο από το κυτταροπλασματικό ιξώδες, όσο και από το **ιξώδες της μεμβράνης**. Συγκεκριμένα, το κυτταροπλασματικό ιξώδες καθορίζεται από την ενδοκυτταρική συγκέντρωση της αιμοσφαιρίνης, των ιόντων και του νερού και είναι υπεύθυνο για την έμφυτη αντοχή του κυττάρου στις εξωτερικές δυνάμεις. Παράλληλα, οι διαταραχές στη λιπιδική σύσταση της ερυθροκυτταρικής μεμβράνης επηρεάζουν το ιξώδες της και συνεπώς την παραμορφωσιμότητα των ερυθροκυττάρων. Αναλυτικότερα, έχει βρεθεί ότι η υψηλή αναλογία χοληστερόλης και φωσφολιπιδίων στην ερυθροκυτταρική μεμβράνη οδηγεί σε μειωμένη παραμορφωσιμότητα. Μάλιστα, στους διαβητικούς ασθενείς παρατηρείται μεταβολή στη φυσιολογική λιπιδική σύσταση του εξωτερικού στρώματος της διπλοστιβάδας της μεμβράνης, με αποτέλεσμα τη μειωμένη παραμορφωσιμότητα και διαταραχές στη ροή του αίματος.

Μηχανικές ιδιότητες του κυτταροσκελετού: Η ευελιξία του ερυθροκυττάρου και η συνακόλουθη ικανότητα του να μεταβάλλει τη μορφολογία του ως απόκριση στις συνθήκες της αιματικής ροής, εξαρτάται σημαντικά από τον τρόπο οργάνωσης του τμήματος του κυτταροσκελετού, το οποίο εφάπτεται στο εσωτερικό στρώμα της ερυθροκυτταρικής μεμβράνης, δηλαδή τον **υπομεμβρανικό κυτταροσκελετό ή σκελετό της μεμβράνης**. Ειδικότερα, οι μεμβρανικές πρωτεΐνες ενσωματώνονται και στηρίζονται εντός μιας ψευδοεξαγωνικής δομής, η οποία σχηματίζεται από τις κυτταροσκελετικές πρωτεΐνες, σπεκτρίνη, ακτίνη, ζώνη 3 και αγκυρίνη. Αυτή η δομή διασφαλίζει και διατηρεί την ακεραιότητα των ερυθροκυττάρων, σε συνθήκες υψηλής πίεσης. Έτσι, η ευκαμψία της μεμβράνης εξαρτάται από τις **αλληλεπιδράσεις των κυτταροσκελετικών πρωτεϊνών, σπεκτρίνης- ακτίνης,**

οι οποίες συντελούν κυρίως στο σχηματισμό του δυναμικού ψευδοεξαγωνικού ικρίωματος, καθώς και από την **πλαστικότητα του μορίου της σπεκτρίνης**, λόγω της ιδιαίτερης μακρομοριακής δομής του. Επιπλέον, η σπεκτρίνη έχει καθοριστικό ρόλο στη διατήρηση της μορφολογίας του ερυθροκυττάρου, καθώς παρέχει σταθερότητα, υπό συνθήκες υψηλών διατμητικών δυνάμεων, μέσω της σύνδεσης της ακτίνης με άλλες μεμβρανικές πρωτεΐνες. Έτσι, η ισορροπία της αλληλεπίδρασης σπεκτρίνης-ακτίνης σε συνδυασμό με τις διαμεμβρανικές πρωτεΐνες (πχ υποδοχείς ερυθροκυττάρου, κανάλια ιόντων κα) και τις πρωτεΐνες συνδεόμενες στη μεμβράνη (π.χ αγκυρίνη, ζώνη 3) παρέχουν στο ερυθροκύτταρο **σταθερότητα και ακεραιότητα**, για τη διατήρηση του λειτουργικού δισκοειδούς τους σχήματος, αλλά και την απαραίτητη **ελαστικότητα και ευελιξία**, η οποία είναι αναγκαία για την επιβίωση τους στην κυκλοφορία. [21,23]



Εικόνα 9- Τα φυσιολογικά ερυθρά αιμοσφαίρια και η διακίνηση τους στην κυκλοφορία σε σύγκριση με τα παθολογικά. Πηγή: [9] Στην επάνω εικόνα απεικονίζονται τα υγιή ερυθροκύτταρα με το φυσιολογικό αμφίκωλο σχήμα, τα οποία έχουν την ιδιότητα να εκθέτουν ολόκληρη την επιφάνεια τους στο αγγειακό τοίχωμα, χωρίς όμως να προσκολλώνται σε αυτό, καθώς και να μεταβάλλουν τη μορφολογία και το σχήμα τους, για την προσαρμογή τους στις εκάστοτε συνθήκες της αιματικής ροής. Τα υγιή ερυθροκύτταρα διακινούνται διαμέσου του αγγειακού δικτύου χωρίς να εμποδίζουν τη ροή του αίματος. Αντίθετα, στην κάτω εικόνα απεικονίζονται τα παθολογικά ερυθρά αιμοσφαίρια, με εμφανείς αλλοιώσεις στη μεμβράνη και το σχήμα τους, οι οποίες έχουν ως αποτέλεσμα να προσκολλώνται τόσο στα αγγειακά τοιχώματα όσο και μεταξύ τους, καθώς και να αδυνατούν να παραμορφωθούν, ως απόκριση στις μεταβολές της ροής και του αγγειακού δικτύου. Αυτά τα ερυθροκύτταρα αποφράσσουν την κυκλοφορία, αφενός διότι δημιουργούν συσσωματώματα και προσκολλώνται στο αγγειακό ενδοθήλιο κι αφετέρου, διότι διαρρηγνύονται, λόγω της απώλειας παραμορφωσιμότητας.

1.1.3.1 Δομή Ερυθρών Αιμοσφαιρίων

➤ Μεμβράνη ερυθροκυττάρου:

Η μεμβράνη του ερυθροκυττάρου αποτελείται από μια λιπιδική διπλοστιβάδα και τον υποκείμενο κυτταροσκελετό, τον λεγόμενο **σκελετό της μεμβράνης**. Το 52% της

μεμβρανικής μάζας καταλαμβάνεται από πρωτεΐνες, το 40% από λιπίδια και το 8% από πολυσακχαρίτες, από το οποίο το 7% είναι γλυκοσφιγγολιπίδια και το 93% βρίσκεται υπό τη μορφή ολιγοσακχαρικών αλυσίδων στις γλυκοπρωτεΐνες της μεμβράνης. [29,30]

Η **λιπιδική διπλοστιβάδα** συνίσταται από ίσες αναλογίες κατά βάρος χοληστερόλης και φωσφολιπιδίων. Τα τέσσερα βασικά φωσφολιπίδια της ερυθροκυτταρικής μεμβράνης κατανέμονται **ασύμμετρα** εντός της λιπιδικής διπλοστιβάδας, μια ιδιότητα με εξαιρετική σημασία για την επιβίωση και την κυκλοφορία των ερυθροκυττάρων, ενώ η χοληστερόλη θεωρείται ότι παρουσιάζει ίση κατανομή μεταξύ των δύο λιπιδικών στιβάδων. Πιο συγκεκριμένα, η φωσφατιδυλοχολίνη και η σφιγγομυελίνη εντοπίζονται κυρίως στην εξωτερική στιβάδα της πλασματικής μεμβράνης, σε αντίθεση με τη φωσφατιδυλοσερίνη (PS), τη φωσφατιδυλαιθανολαμίνη και τα δευτερεύοντα συστατικά φωσφοϊνοσιτίδης, τα οποία περιορίζονται στην εσωτερική στιβάδα. Η διατήρηση της ασυμμετρίας στην κατανομή των φωσφολιπιδίων επιτυγχάνεται από τη δράση διαφόρων τύπων εξαρτώμενων ή ανεξάρτητων από την ενέργεια πρωτεϊνών μεταφοράς των φωσφολιπιδίων, όπως οι “φλιπάσες”, οι “φλοπάσες” και οι “σκραμπλάσες”. Αναλυτικότερα, οι “**φλιπάσες**” μεταφέρουν τα φωσφολιπίδια από την εξωτερική στιβάδα της μεμβράνης στην εσωτερική, ενώ οι “**φλοπάσες**” διενεργούν την αντίστροφη μεταφορά με τρόπο που εξαρτάται από την ενέργεια, έναντι της κλίσης συγκέντρωσης. Από την άλλη, οι “**σκραμπλάσες**” μετακινούν τα φωσφολιπίδια και προς τις δύο κατευθύνσεις, ανάλογα με την κλίση συγκέντρωσης, με τρόπο ανεξάρτητο από την ενέργεια. Η διασφάλιση της ασύμμετρης κατανομής των φωσφολιπιδίων στην ερυθροκυτταρική μεμβράνη, ειδικά η εντόπιση της φωσφατιδυλοσερίνης και των φωσφοϊνοσιτιδίων αποκλειστικά στην εσωτερική στιβάδα, είναι πολύ σημαντική για την επιβίωση των ερυθροκυττάρων, καθώς η εκτεθειμένη φωσφατιδυλοσερίνη στην επιφάνεια τους αναγνωρίζεται από τα μακροφάγα και έχει ως αποτέλεσμα τη φαγοκυττάρωση τους. Κατά συνέπεια, ο περιορισμός της PS στο εσωτερικό στρώμα αποτρέπει την καταστροφή των ερυθρών και τα προστατεύει από τα μακροφάγα του δικτυοενδοθηλιακού συστήματος. Μάλιστα, η πρόωρη καταστροφή των ερυθροκυττάρων στη θαλασσαιμία και τη δρεπανοκυτταρική αναιμία θεωρείται ότι οφείλεται στην διαταραχή της λιπιδικής ασυμμετρίας και την επακόλουθη έκθεση της PS στην επιφάνεια. Ακόμα, η εκτεθειμένη PS ενέχει τον κίνδυνο προσκόλλησης των ερυθρών στα ενδοθηλιακά κύτταρα των αγγείων. Έτσι, ο περιορισμός της στην εσωτερική στιβάδα συντελεί στην απρόσκοπτη διέλευση τους από τα τριχοειδή αγγεία. Εκτός από τον καθοριστικό της ρόλο στην επαγωγή της φαγοκυττάρωσης, η PS συμβάλλει στην ενίσχυση της μηχανικής σταθερότητας στο ερυθροκύτταρο, μέσω της σύνδεσής της με τη σπεκτρίνη. Αμφότερες η PS και η φωσφατιδυλινοσιτόλη-4,5-

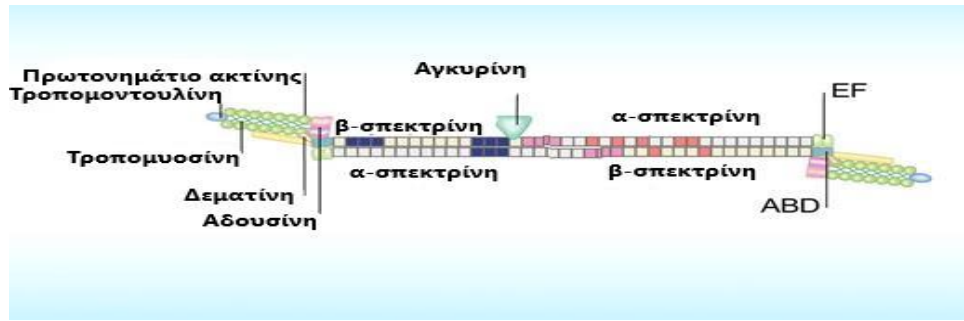
διφωσφορική (PIP2) είναι ικανές να ρυθμίζουν τη μηχανική λειτουργία της μεμβράνης, λόγω των αλληλεπιδράσεων τους με τις κυτταροσκελετικές πρωτεΐνες, σπεκτρίνη και πρωτεΐνη 4.1R. Επιπλέον, όσον αφορά τη λιπιδική σύσταση της ερυθροκυτταρικής μεμβράνης, πρόσφατα διατυπώθηκε η ύπαρξη “**λιπιδικών σχεδίων**” στην επιφάνεια των ερυθρών, οι οποίες είναι πλούσιες σε χοληστερόλη και σφιγγολιπίδια, σε συνδυασμό με ειδικές μεμβρανικές πρωτεΐνες συμπεριλαμβανομένων των φλοτιλλινών, της στοματίνης, των G-πρωτεϊνών και των β-αδρενεργικών υποδοχέων. Αξιοσημείωτος είναι, επίσης, ο ρόλος των λιπιδικών σχεδίων στη ρύθμιση της εισόδου των παρασίτων της ελονοσίας εντός των ερυθροκυττάρων. Ειδικότερα, οι λιπιδικές σχεδίες, οι οποίες εμπλέκονται σε συμβάντα κυτταρικής σηματοδότησης στα μη ερυθροειδή κύτταρα, στα ερυθροκύτταρα είναι αποδεδειγμένο ότι επάγουν τη σηματοδότηση μέσω του β2-αδρενεργικού υποδοχέα, αυξάνοντας τα επίπεδα cAMP, με αποτέλεσμα την είσοδο των παρασίτων στο εσωτερικό τους.

Οι **πρωτεΐνες της μεμβράνης** ταξινομούνται σε δύο κατηγορίες, τις **διαμεμβρανικές** και τις **περιφερειακές**. Οι διαμεμβρανικές πρωτεΐνες διαπερνούν το λιπιδικό στρώμα και αλληλεπιδρούν με τον υδρόφοβο λιπιδικό πυρήνα, σε αντίθεση με τις περιφερειακές, οι οποίες αλληλεπιδρούν με λιπίδια και πρωτεΐνες της μεμβρανικής επιφάνειας αλλά δεν εισχωρούν στη λιπιδική διπλοστιβάδα. Ένα ξεχωριστό είδος πρωτεϊνών σχετιζόμενων με την ερυθροκυτταρική μεμβράνη αποτελούν οι **μεμβρανοσυνδεδεμένες πρωτεΐνες**, οι οποίες μπορεί να βρίσκονται ενδοκυτταρικά, όπως η στοματίνη και οι φλοτιλίνες, ή να συσχετίζονται με τη μεμβράνη εξωκυτταρικά, με την ομοιοπολική σύνδεση τους στη γλυκοφωσφατιδυλινοσιτόλη. Οι μεμβρανικές πρωτεΐνες παρουσιάζουν ευρεία λειτουργική ετερογένεια, δρώντας ως μεταφορείς, μόρια προσκόλλησης για την αλληλεπίδραση των ερυθροκυττάρων με άλλα κύτταρα του αίματος ή αγγειακά ενδοθηλιακά κύτταρα, υποδοχείς σηματοδότησης και άλλες περαιτέρω απροσδιόριστες λειτουργίες. Η συγγένεια με την οποία οι πρωτεΐνες συνδέονται με τη μεμβράνη καθορίζεται από πολλαπλούς παράγοντες, όπως ο βαθμός φωσφορυλίωσης, γλυκοζυλίωσης και μεθυλίωσης τους ή η τροποποίηση των λιπιδίων. Έχουν ταυτοποιηθεί περισσότερες από 50 διαμεμβρανικές πρωτεΐνες, με μερικές εκατοντάδες έως ένα εκατομμύριο αντίγραφα ανά ερυθροκύτταρο, εκ των οποίων ένα κλάσμα 25 περίπου πρωτεϊνών συνιστά τα αντιγόνα των ομάδων αίματος. Οι μεμβρανικές πρωτεΐνες, οι οποίες λειτουργούν ως **μεταφορείς** είναι η ζώνη 3 (μεταφορέας ανιόντων), η υδατοπορίνη 1 (μεταφορέας νερού), η Glut1 (μεταφορέας γλυκόζης και L-δεϋδροασκορβικού οξέος), η πρωτεΐνη αντιγόνου Kidd (μεταφορέας ουρίας), η RhAG (μεταφορέας αερίου, πιθανόν διοξειδίου του άνθρακα), η Na⁺-K⁺-ATPάση, η Ca⁺⁺ ATPάση, οι συνμεταφορείς Na⁺-K⁺-2Cl⁻, Na⁺-Cl⁻, Na⁺-K⁺, K⁺-Cl⁻ και το κανάλι Gardos. Ακόμα, οι μεμβρανικές πρωτεΐνες με την

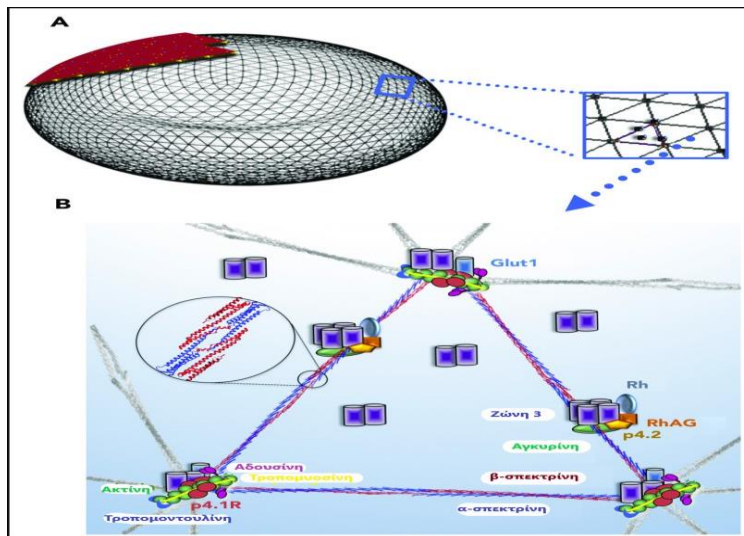
ιδιότητα της **προσκόλλησης** περιλαμβάνουν το μόριο προσκόλλησης ICAM-4, το οποίο συνδέεται με τις ιντεγκρίνες και το μόριο Lu, που δεσμεύει τη λαμινίνη. Τέλος, οι **περιφερειακές πρωτεΐνες** σχηματίζουν το κυτταροσκελετικό δίκτυο, το οποίο στηρίζει την πλασματική μεμβράνη του ερυθροκυττάρου, δηλαδή το σκελετό της μεμβράνης. Οι κύριες πρωτεΐνες αυτής της κατηγορίας είναι η α και β σπεκτρίνη, η ακτίνη, η πρωτεΐνη 4.1 R, η αδουσίνη, η δεματίνη, η τροπομουσίνη και η τροπομοντουλίνη. Η αλληλεπίδραση των διμερών ακτίνης μεταξύ τους και των πρωτεϊνών σπεκτρίνης-ακτίνης-πρωτεΐνης 4.1R προσδίδουν σταθερότητα στο ερυθροκύτταρο, προλαμβάνοντας τη πιθανή ρήξη και κατακερματισμό της μεμβράνης από την επικείμενη παραμόρφωση του, ως απόκριση στις υψηλές διαμηθικές δυνάμεις της κυκλοφορίας. [30,31]

➤ **Κυτταροσκελετός ερυθροκυττάρου:**

Ο κυτταροσκελετός του ερυθροκυττάρου αποτελείται από πολλά τρίγωνα, τα οποία συνδέονται μεταξύ τους, σχηματίζοντας ένα ψευδοεξαγωνικό δίκτυο. Η κάθε πλευρά των επιμέρους τριγώνων συνιστά ένα τετραμερές, αποτελούμενο από δύο ετεροδιμερή α- και β- σπεκτρίνης, τα οποία συνδέονται αντιπαράλληλα (Εικόνα 10). Κάθε ετεροδιμερές κατασκευάζεται από μια σειρά αλυσίδων 3-έλικας, οι οποίες έχουν την ικανότητα να τυλίγονται και να ξετυλίγονται, προσδίδοντας ελαστικότητα στο ερυθροκύτταρο. Για το σχηματισμό του ετεροδιμερούς, συνενώνονται οι κεφαλές της α- και β- σπεκτρίνης, δηλαδή η N-τελική περιοχή της α-σπεκτρίνης με τη C-τελική περιοχή της β-σπεκτρίνης. Σε κάθε γωνία του τριγώνου βρίσκεται τοποθετημένο ένα συνδετικό σύμπλεγμα, το επονομαζόμενο **σύμπλοκο ζεύξης**, το οποίο δημιουργείται από ένα πρωτονημάτιο ακτίνης και από την πρωτεΐνη 4.1R, η οποία μεσολαβεί τη σύνδεση ακτίνης-σπεκτρίνης (Εικόνα 11). Το μήκος των νημάτων ακτίνης διατηρείται αυστηρά στα 12 με 14 μονομερή ακτίνης ανά ολιγομερές και καθορίζεται από την τροπομουσίνη. Τα νημάτια ακτίνης καλύπτονται από τις κυτταροσκελετικές πρωτεΐνες, τροπομοντουλίνη και αδουσίνη. Η λιπιδική διπλοστιβάδα της πλασματικής μεμβράνης συνδέεται με τον κυτταροσκελετό μέσω **κατακόρυφων δεσμών**, οι οποίοι παρέχονται από τα σύμπλοκα των διαμεμβρανικών πρωτεϊνών, συμπεριλαμβανομένων της ζώνης 3 και του RhAg, και των περιφερειακών μεμβρανικών πρωτεϊνών, την αγκυρίνη και τη ζώνη 4.2. [32]



Εικόνα 10- Οι οριζόντιοι δεσμοί μεταξύ των κυτταροσκελετικών πρωτεϊνών ακτίνης-σπεκτρίνης. Πηγή: [8] Στη συγκεκριμένη εικόνα απεικονίζεται η οριζόντια σύνδεση των κυτταροσκελετικών πρωτεϊνών ακτίνης-σπεκτρίνης, με τις επιπρόσθετες στηρικτικές πρωτεΐνες. Ειδικότερα, αποτυπώνεται η αντιπαράλληλη σύνδεση των δύο ετεροδιμερών α- και β- σπεκτρίνης, για το σχηματισμό του τετραμερούς, που αποτελεί την πλευρά των επιμέρους τριγώνων του ψευδοεξαγωνικού κυτταροσκελετικού δικτύου του ερυθροκυττάρου. Οι ροζ επαναλήψεις στο μόριο της σπεκτρίνης αντιπροσωπεύουν τη σύνδεση του **N-άκρου της α-σπεκτρίνης** του ενός ετεροδιμερούς με το **C-άκρο της β-σπεκτρίνης** από το άλλο ετεροδιμερές. Ακόμα, οι μπλε επαναλήψεις αποτελούν τα σημεία σύνδεσης της φωσφατιδυλοσερίνης με τη σπεκτρίνη, ενώ οι κόκκινες επαναλήψεις αποτελούν τις περιοχές του μορίου με χαμηλή θερμική σταθερότητα ($T_m < 37^\circ \text{C}$). Επιπλέον, απεικονίζεται η περιοχή EF στο C-άκρο της α-σπεκτρίνης, στην οποία προσδένεται η πρωτεΐνη 4.1R. Η τελευταία μεσολαβεί τη σύνδεση σπεκτρίνης-ακτίνης. Από την άλλη, η περιοχή ABD βρίσκεται στο N-άκρο της β-σπεκτρίνης κι αποτελεί την περιοχή δέσμευσης της ακτίνης στη σπεκτρίνη. Τέλος, απεικονίζεται και η αγκυρίνη, η οποία συνδέει τη σπεκτρίνη με πρωτεΐνες της μεμβράνης, καθώς και τα πρωτονημάτια ακτίνης, στα άκρα των ετεροδιμερών σπεκτρίνης, μαζί με τις υποστηρικτικές πρωτεΐνες του συμπλόκου ζεύξης, την τροπομοντουλίνη, τροπομοουσίνη, δεματίνη και αδουσίνη.



Εικόνα 11- Το μοντέλο της μεμβράνης και του κυτταροσκελετού των ερυθρών αιμοσφαιρίων. Πηγή: [10] Στην εικόνα Α απεικονίζεται το σχήμα και η μορφολογία των ερυθρών αιμοσφαιρίων με το ψευδοεξαγωνικό κυτταροσκελετικό δίκτυο και την πλασματική μεμβράνη. Η μεγέθυνση στο εσωτερικό του ερυθροκυττάρου αποκαλύπτει τα επιμέρους τρίγωνα που συνθέτουν αυτό το δίκτυο. Περαιτέρω μεγέθυνση (εικόνα Β) αποκαλύπτει την αρχιτεκτονική του κάθε τριγώνου, με τα τετραμερή σπεκτρίνης σε κάθε πλευρά του, το σύμπλοκο ζεύξης σε κάθε γωνία του και τις επιπλέον πρωτεΐνες, οι οποίες μεσολαβούν τη σύνδεση του κυτταροσκελετού με την πλασματική μεμβράνη, σχηματίζοντας τους «κατακόρυφους δεσμούς», συμπεριλαμβανομένων των διαμεμβρανικών πρωτεϊνών RhAg και Ζώνης 3 και των περιφερειακών πρωτεϊνών, τη Ζώνη 4.2 και την αγκυρίνη.

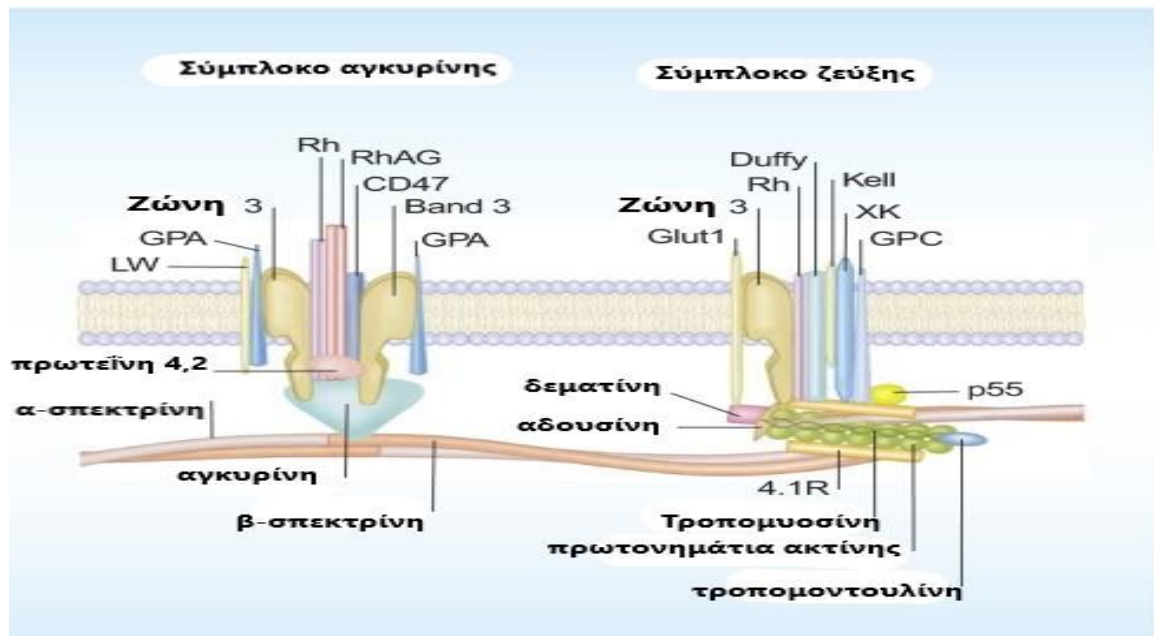
➤ **Αλληλεπιδράσεις μεμβράνης-κυτταροσκελετού:**

Όπως προαναφέρθηκε, η πλασματική μεμβράνη στηρίζεται στο υποκείμενο κυτταροσκελετικό της δίκτυο μέσω **κατακόρυφων δεσμών**, οι οποίοι αναπτύσσονται μεταξύ των μεμβρανικών πρωτεϊνών και του δικτύου σπекτρίνης-ακτίνης του σκελετού. Οι δεσμοί αυτοί είναι αναγκαίοι για τη διατήρηση του δισκοειδούς σχήματος του ερυθροκυττάρου και για την ευρύτερη σταθερότητα, ακεραιότητα και προσαρμοστικότητα του στην κυκλοφορία. Αναλυτικότερα, οι κατακόρυφοι δεσμοί παρέχονται από δύο βασικά συνδετικά σύμπλοκα, το **σύμπλοκο ζεύξης** και το **σύμπλοκο αγκυρίνης**.

Σύμπλοκο αγκυρίνης: Το σύμπλοκο αγκυρίνης αποτελεί ένα πολυπρωτεϊνικό σύμπλεγμα, το οποίο ουσιαστικά λειτουργεί χρησιμοποιώντας την αγκυρίνη ως γέφυρα για τη σύνδεση των μεμβρανικών πρωτεϊνών με τη β-σπекτρίνη του κυτταροσκελετικού δικτύου. Σύμφωνα με μελέτες εκτίμησης της ολικής πρωτεϊνικής συγκέντρωσης του ερυθροκυττάρου, υπολογίζεται ότι το σύμπλοκο αυτό αποτελείται από ένα μόριο αγκυρίνης, ένα τετραμερές ζώνης 3, δύο διμερή ή ετεροδιμερή γλυκοφορίνης A ή B, δύο μόρια πρωτεΐνης 4.2 και ένα σύμπλοκο Rhesus, ένα τριμερές αποτελούμενο από την πρωτεΐνη RhAg σε συνδυασμό με την RhD και RhCE. Περαιτέρω συστατικά, τα οποία φαίνεται να εντοπίζονται σε ορισμένα υποσύνολα του συμπλόκου, αποτελούν οι πρωτεΐνες του γλυκολυτικού μεταβολισμού, τα αντιγόνα της ομάδας αίματος Landsteiner-Weiner και το μόριο CD47. Διαταραχές στη σύνθεση αυτών των πρωτεϊνών επηρεάζουν το σχηματισμό του συμπλόκου αγκυρίνης, με συνέπεια την ελαττωματική πρόσδεση της λιπιδικής διπλοστιβάδας στον κυτταροσκελετό και κατ' επέκταση την απώλεια του αμφίκιουλο δισκοειδούς σχήματος των ερυθροκυττάρων. Π.χ στην κληρονομική σφαιροκυττάρωση (HS) παρατηρείται μειωμένη σύνθεση της σπекτρίνης, της αγκυρίνης, της ζώνης 3 ή της πρωτεΐνης 4.2, που οδηγεί στην απώλεια της μεμβράνης και την ανάπτυξη ανώμαλων ερυθροκυττάρων, με σφαιρικό αντί για αμφίκιουλο δισκοειδές σχήμα.

Σύμπλοκο ζεύξης: Όπως προαναφέρθηκε, το σύμπλοκο ζεύξης βρίσκεται στις γωνίες των τριγώνων, που σχηματίζουν το ψευδοεξαγωνικό δίκτυο του κυτταροσκελετού. Το σύμπλοκο αυτό συνιστά έναν εξίσου απαραίτητο συνδετικό κρίκο μεταξύ της λιπιδικής διπλοστιβάδας και του κυτταροσκελετικού δικτύου του ερυθροκυττάρου. Παλαιότερα, θεωρούνταν ότι η σύνδεση αυτού του συμπλόκου με την πλασματική μεμβράνη μεσολαβείται από ένα τριμερές σύμπλεγμα, το οποίο σχηματίζεται από την πρωτεΐνη 4.1R, p55 και τη γλυκοφορίνη C ή D, κάθε μια από τις οποίες αλληλεπιδρά με τις άλλες δύο σε καθορισμένες θέσεις. Ωστόσο, σύγχρονες μελέτες αποδεικνύουν ότι το σύμπλοκο είναι ιδιαίτερα περίπλοκο και περιλαμβάνει μια πληθώρα πρωτεϊνών, οι οποίες αλληλεπιδρούν μεταξύ τους με

διακριτούς συνδυασμούς. Αρχικά, η πρωτεΐνη 4.1 R και η αγκυρίνη ανταγωνίζονται για την πρόσδεση τους στη ζώνη 3, οδηγώντας στο συμπέρασμα ότι η κάθε μια συνδέεται σε διαφορετικούς υποπληθυσμούς της ζώνης 3. Η τελευταία διαδραματίζει καθοριστικό ρόλο, τόσο στο σύμπλοκο ζεύξης, όσο και στο σύμπλοκο αγκυρίνης. Εκτός από τη λειτουργία της ως συνδετικό μόριο στα αμφότερα σύμπλοκα, συμβάλλει στη συναρμολόγηση ενός μακρομοριακού συμπλέγματος, το οποίο ονομάζεται "metabolon" και αποτελείται από τα γλυκολυτικά ένζυμα, τον μεταφορέα του CO₂ και την ανθρακική ανυδράση. Το σύμπλεγμα αυτό ρυθμίζει τη μεταφορά των ιόντων και των αερίων, καθώς και το μεταβολισμό των ερυθροκυττάρων. Επιπρόσθετα, η πρωτεΐνη 4.1 R, η οποία απαιτεί τη μεσολάβηση της ζώνης 3 για την ενσωμάτωση της στη μεμβράνη, προσδένεται στην περιοχή EF, δηλαδή στο άκρο της σπεκτρίνης, το οποίο συνδέεται με την ακτίνη. Επιπλέον, η αδουσίνη προσαρτάται στη ζώνη 3, φέρνοντας έτσι σε επαφή έναν υποπληθυσμό της με τα πρωτονημάτια της ακτίνης. Συνεπώς, σε κάθε νημάτιο ακτίνης εντοπίζονται 6 σύμπλοκα ζεύξης, καθένα από τα οποία περιέχει ένα μόριο σπεκτρίνης, μια πρωτεΐνη 4.1R, καθώς και επαρκή ποσότητα ζώνης 3, γλυκοφορίνης A, γλυκοφορίνης C/D, μεταφορέα γλυκόζης 1 και στοματίνης. Επίσης, υπάρχει ένα αντίγραφο αδουσίνης και τρία αντίγραφα δεματίνης, αν είναι μονομερές, ή ένα αντίγραφο αν είναι τριμερές. Ακόμα, το σύμπλοκο ζεύξης περιλαμβάνει ένζυμα του γλυκολυτικού μεταβολισμού, αλλά και πρωτεΐνες της ομάδας αίματος Kx/Kell και DARC/Duffy, σε ελάχιστες ποσότητες ακόμα και για ένα αντίγραφο ανά ακτίνη. Μια πάθηση, η οποία σχετίζεται με τη διαταραχή στο σύμπλοκο ζεύξης, είναι η κληρονομική ελλειπτοκυττάρωση (HE), στην οποία παρατηρείται βλάβη στις συνδέσεις σπεκτρίνης-ακτίνης-πρωτεΐνης 4.1R και της σπεκτρίνης α-β. Κατά συνέπεια, μειώνεται η ικανότητα των ερυθροκυττάρων να ανακτούν το φυσιολογικό αμφίκυκλο σχήμα τους, ύστερα από μεγάλη παραμόρφωση. Είναι αξιοσημείωτο το γεγονός ότι τα δύο σύμπλοκα βρίσκονται κοντά το ένα στο άλλο εντός της ερυθροκυτταρικής μεμβράνης, και συχνά συγκρούονται κατά την παραμόρφωση του ερυθροκυττάρου ή ακόμα και όταν βρίσκεται σε ηρεμία. Δεδομένου ότι πολλές πρωτεΐνες, όπως η ζώνη 3, η πρωτεΐνη 4.1R, η πρωτεΐνη 4.2 και η αδουσίνη έχουν δεσμευτικά μόρια και στα δύο σύμπλοκα, ενώ ορισμένες από αυτές ανταγωνίζονται για τη δέσμευσή τους στις ίδιες θέσεις –όπως η πρωτεΐνη 4.1 R και η αγκυρίνη για τη ζώνη 3-, προκύπτει η υπόθεση ότι αυτές οι πρωτεΐνες θα μπορούσαν να εναλλάσσονται από το ένα σύμπλοκο στο άλλο, ως ένας ρυθμιστικός μηχανισμός για τη διαφύλαξη της ακεραιότητας του ερυθροκυττάρου. [31,33,34,35]



Εικόνα 12- Η μεμβράνη των ερυθρών αιμοσφαιρίων. Πηγή: [8] Απεικονίζεται σχηματικά η μεμβράνη των ερυθρών αιμοσφαιρίων, ο υποκείμενος κυτταροσκελετός και οι κατακόρυφες αλληλεπιδράσεις μεταξύ αυτών. Ειδικότερα, αναδεικνύονται τα **σύμπλοκα ζεύξης και αγκυρίνης**, τα οποία απαρτίζονται από τις κυτταροσκελετικές πρωτεΐνες, τις διαμεμβρανικές πρωτεΐνες, οι οποίες διαπερνούν το λιπιδικό στρώμα της πλασματικής μεμβράνης και τις περιφερειακές, οι οποίες λειτουργούν ως γέφυρα, για τη σύνδεση των κυτταροσκελετικών με τις διαμεμβρανικές πρωτεΐνες. Το **σύμπλοκο ζεύξης**, όπως φαίνεται, αποτελείται από τις κυτταροσκελετικές πρωτεΐνες σπεκτρίνη, ακτίνη, τροπομοσίνη, τροπομοντουλίνη, αδουσίνη και δεματίνη, οι οποίες συνδέονται με τις διαμεμβρανικές πρωτεΐνες Ζώνη 3, Glut1, Duffy, Kell, XK, Rh, και GPC, μέσω της περιφερειακής πρωτεΐνης 4.1R. Το **σύμπλοκο αγκυρίνης** αποτελείται εξίσου από την κυτταροσκελετική πρωτεΐνη σπεκτρίνη, η οποία συνδέεται με τις διαμεμβρανικές πρωτεΐνες Rh, Ζώνη 3, GPA, RhAg, LW και CD47, μέσω των περιφερειακών πρωτεϊνών αγκυρίνη και πρωτεΐνη 4.2.

1.2 Μυελοδυσπλαστικά Σύνδρομα

1.2.1 Ορισμός και επιδημιολογία μυελοδυσπλαστικών συνδρόμων

Τα μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα (MDS) αποτελούν μια ετερογενή και σύνθετη ομάδα κλωνικών αιματολογικών κακοηθειών, οι οποίες έχουν ως κοινή προέλευση το αιμοποιητικό στελεγχαίο κύτταρο (HSC). Το βασικό γνώρισμα της παθοφυσιολογίας τους είναι η **αναποτελεσματική αιμοποίηση**, η οποία οφείλεται σε διάφορες διαταραχές κατά την οδό ωρίμανσης της κάθε κυτταρικής σειράς. Οι διαταραχές αυτές είναι απότοκο μιας πληθώρας γενετικών και επιγενετικών μεταλλαγών στη μεθυλίωση και υδροξυμεθυλίωση του DNA, την απομεθυλίωση και τροποποίηση της ιστόνης και τη συρρύθμιση της μεταγραφής, οι οποίες οδηγούν σε κλωνικές αλλαγές στη γονιδιακή έκφραση και κατ' επέκταση στη διαφοροποίηση, ανάπτυξη και γήρανση των βλαστικών κυττάρων. Ως εκ τούτου, παρατηρείται **αυξημένη απόπτωση** των κυττάρων του μυελού των οστών και **κυτταροπενία** στο περιφερικό αίμα, που περιλαμβάνει μία ή περισσότερες κυτταρικές σειρές. Τα κοινά χαρακτηριστικά που ορίζουν τα μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα είναι:

- Μορφολογική δυσπλασία σε μία ή περισσότερες κυτταρικές σειρές
- Παρουσία βλαστών στο περιφερικό αίμα και στο μυελό των οστών σε ποσοστό μικρότερο από 20%
- Παρουσία κυτταρογενετικών και μοριακών γενετικών διαταραχών σε έως και 90% των de novo περιπτώσεων
- Αυξημένος κίνδυνος εξέλιξης σε οξεία μυελοειδή λευχαιμία, σε ποσοστό περίπου 20-25% των περιπτώσεων, ιδίως απουσία περιφερικής λευκοκυττάρωσης.

Τα μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα εμφανίζονται στο γενικό πληθυσμό με συχνότητα έως 5 νέες διαγνώσεις ανά 100.000 άτομα, με υψηλότερη συχνότητα στους άνδρες. Η συχνότητα αυτή αυξάνεται με την πάροδο της ηλικίας, φτάνοντας τις 50 νέες διαγνώσεις ΜΔΣ ανά 100.000 άτομα, στην ηλικιακή ομάδα άνω των 80 ετών. Η μέση ηλικία έναρξης της νόσου είναι περίπου τα **70 έτη**, ενώ στις δυτικές χώρες η συχνότητα εμφάνισης, μεταξύ ατόμων ηλικίας άνω των 70 ετών, κυμαίνεται από 22 έως 45 νέες διαγνώσεις ανά 100.000 άτομα. Μόνο το 10% των ασθενών με ΜΔΣ είναι κάτω των 50 ετών. Τα περιστατικά με ΜΔΣ σε νεαρότερη ηλικία είναι συχνότερα σε ασιατικές χώρες, όπως η Ιαπωνία, η Κίνα, η Κορέα, η Ινδία, η Ταϊλάνδη και η Τουρκία, με μέση ηλικία εμφάνισης τα 40 και 50 έτη, δηλαδή περίπου μία ή και δύο δεκαετίες μικρότερη από αυτή των ασθενών στις δυτικές χώρες. Η διαφορά αυτή πιθανόν οφείλεται στην περιβαλλοντική ρύπανση, στην ανεξέλεγκτη χρήση φυτοφαρμάκων ή και σε άλλους παράγοντες. Τα ΜΔΣ εμφανίζονται σπάνια στην παιδική και εφηβική ηλικία, σε ποσοστό μικρότερο του

5% του συνόλου των κακοηθειών του αιμοποιητικού συστήματος. Ακόμα, οι κληρονομικές περιπτώσεις ΜΔΣ είναι σπάνιες. Η αυξημένη αναφορά τέτοιων περιπτώσεων στη βιβλιογραφία τα τελευταία χρόνια υποδηλώνει τη μεγαλύτερη επαγρύπνηση, γνώση και εξειδίκευση των κλινικών ιατρών κατά τη διαδικασία της ταυτοποίησης και διάγνωσης των κληρονομικών ΜΔΣ. Επιπλέον, τα μυελοειδή νεοπλασμάτα που σχετίζονται με τη θεραπεία, όπως το t-MDS αποτελούν το 10-20% του συνόλου των περιπτώσεων της οξείας μυελοειδούς λευχαιμίας, των μυελοδυσπλαστικών συνδρόμων και των μικτού τύπου Μυελοδυσπλαστικών-Μυελοϋπερπλαστικών συνδρόμων. Τα ΜΔΣ χαρακτηρίζονται από συμπτώματα ανεπάρκειας του αιμοποιητικού συστήματος, όπως η αναιμία ή σε μικρότερη συχνότητα από ευαισθησία στις μολύνσεις και ανεπαρκή πήξη του αίματος. Η εξέλιξη της νόσου διαφέρει από ασθενή σε ασθενή, με μέσο χρόνο επιβίωσης, ο οποίος κυμαίνεται από μερικούς μήνες έως πολλά χρόνια. [36,37]

1.2.2 Αιτιολογία και προδιαθεσικοί παράγοντες ΜΔΣ

Τα μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα ταξινομούνται σε δύο μεγάλες κατηγορίες, τα πρωτοπαθή και τα δευτεροπαθή. Τα **πρωτοπαθή** ΜΔΣ είναι νοσήματα, στα οποία εμπλέκονται επίκτητες βλάβες κατά τη διάρκεια της γήρανσης, ενώ τα δευτεροπαθή μπορεί να σχετίζονται είτε με προηγούμενη ανοσοκατασταλτική ή αντινεοπλασματική θεραπεία με κυτταροτοξικούς παράγοντες, όπως οι αναστολείς της DNA τοποϊσομεράσης II και οι αλκυλιωτικοί παράγοντες, είτε με περιβαλλοντικούς-εξωγενείς παράγοντες, όπως η έκθεση σε ιονίζουσα ακτινοβολία, τοξικές ουσίες, βενζόλιο και το κάπνισμα. Ωστόσο, η ανάπτυξη των ΜΔΣ ευνοείται και από **κληρονομικούς γενετικούς προδιαθεσικούς παράγοντες**, οι οποίοι είναι εξαιρετικά σπάνιοι, συναντώνται κυρίως στη παιδική ηλικία και αντιπροσωπεύουν το 4 έως 15% του συνόλου των περιπτώσεων ΜΔΣ. Ειδικότερα, αφορούν μεταλλάξεις σε γονίδια, τα οποία επηρεάζουν διαδικασίες όπως η συντήρηση των τελομερών, η επιδιόρθωση του DNA, η βιογένεση των ριβοσωμάτων και η ρύθμιση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, προκαλώντας τα λεγόμενα **κληρονομικά σύνδρομα ανεπάρκειας μυελού των οστών (IBMFS)**. Τα ΜΔΣ, τα οποία αναπτύσσονται υπό το έδαφος των IBMFS, διαφέρουν τόσο ως προς την πρόγνωση, όσο και ως προς τη στρατηγική της θεραπείας, σε σχέση με τα ΜΔΣ που εμφανίζονται στους ενήλικες, χωρίς κληρονομική γενετική προδιάθεση. Σε αυτές τις περιπτώσεις, η μοναδική υπάρχουσα θεραπεία είναι η αλλογενής μεταμόσχευση αιμοποιητικών στελεγχιαίων κυττάρων στα πρώιμα στάδια της νόσου, η οποία απαιτεί την έγκαιρη διάγνωση και ταυτοποίηση του συνδρόμου και την παράλληλη αυστηρή επιτήρηση του ασθενούς. Μεταξύ των IBMFS

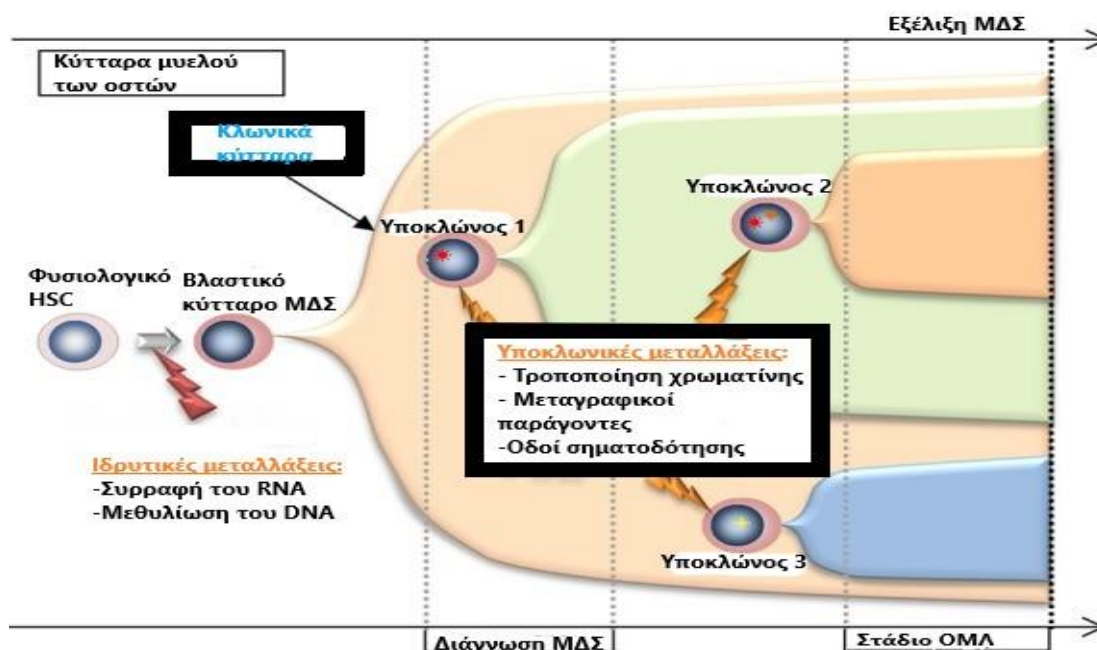
περιλαμβάνονται παθήσεις όπως η απλαστική αναιμία, η συγγενής δυσκεράτωση, η αναιμία Diamond-Blackfan, το σύνδρομο Shwachman–Diamond και η παροξυσμική νυχτερινή αιμοσφαιρινουρία. Ακόμα, τα τελευταία χρόνια, η γονιδιωματική έρευνα οικογενειών παρεμφερών κληρονομικών συνδρόμων έχει φέρει στην επιφάνεια πολυάριθμα γονίδια, οι μεταλλάξεις στα οποία, λειτουργούν ως παράγοντες κινδύνου για την ανάπτυξη ΜΔΣ ή/και οξείας μυελοειδούς λευχαιμίας ως κύρια κακοήθεια, συμπεριλαμβανομένων των RUNX1, ANKRD26, DDX41, ETV6, GATA2 και SRP72. [36,38,39]

1.2.3 Παθογένεια ΜΔΣ

Η μεγάλη ετερογένεια στους μορφολογικούς τύπους ή τους κλινικούς φαινότυπους των μυελοδυσπλαστικών συνδρόμων οφείλεται στην πολυπλοκότητα των μηχανισμών παθογένεσης τους. Γενικότερα, θεωρείται ότι ένα μεγάλος εύρος αυτής της ετερογένειας στηρίζεται σε συνδυασμούς σημειακών μεταλλάξεων και χρωμοσωμικών ανωμαλιών, ωστόσο οι **σωματικές σημειακές μεταλλάξεις** εντοπίζονται σε ποσοστό μεγαλύτερο του 50% των περιστατικών ΜΔΣ, συμπεριλαμβανομένης και της πλειονότητας εκείνων με φυσιολογικό καρυότυπο. Ειδικότερα, στα ΜΔΣ εντοπίζονται επαναλαμβανόμενες μεταλλάξεις, οι οποίες τροποποιούν μια σειρά βασικών κυτταρικών διαδικασιών, όπως η συρραφή του RNA, η απόκριση στη βλάβη του DNA, η οδός σηματοδότησης της τυροσινικής κινάσης και η επιγενετική ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης, η οποία περιλαμβάνει τη μεθυλίωση του DNA και την τροποποίηση της ιστόνης. Ακόμα, σημειώνονται μεταλλάξεις στην έκφραση μεταγραφικών παραγόντων, καθοριστικών για την ομαλή αιμοποίηση. Παράλληλα, οι μεταλλάξεις στα μόρια μεταγωγής σήματος οδηγούν σε μεταβολή της πορείας των μονοπατιών σηματοδότησης, με τελικό αποτέλεσμα την επαγωγή είτε της απόπτωσης είτε του κυτταρικού πολλαπλασιασμού (Εικόνα 12). Μάλιστα, έχει παρατηρηθεί ότι συγκεκριμένες μεταλλάξεις σχετίζονται άμεσα με ειδικά μορφολογικά χαρακτηριστικά των ΜΔΣ ή διακριτούς κλινικούς φαινότυπους. Π.χ οι μεταλλάξεις στο γονίδιο SF3B1 συνδέονται με την παρουσία δακτυλιοειδών σιδηροβλαστών, ενώ οι μεταλλάξεις στα γονίδια SRSF2, TET2 και ASXL1 εντοπίζονται σε μεγάλο βαθμό στα μικτού τύπου μυελοδυσπλαστικά-μυελοϋπερπλαστικά σύνδρομα με έντονη μυελομονοκυτταρική διαφοροποίηση. [40,41]

Παρ' όλο που τα ΜΔΣ θεωρείται ότι προέρχονται από διαταραχές στο αρχέγονο αιμοποιητικό κύτταρο, οι χρωμοσωμικές ανωμαλίες φαίνεται να περιορίζονται στα προγονικά αιμοποιητικά κύτταρα, τα οποία είναι δεσμευμένα στη μυελοειδή σειρά. Αποτελέσματα ερευνών αποδεικνύουν ότι οι μεταλλάξεις στα γονίδια των συστατικών που συμμετέχουν στη συρραφή του RNA και τη μεθυλίωση του DNA αποτελούν

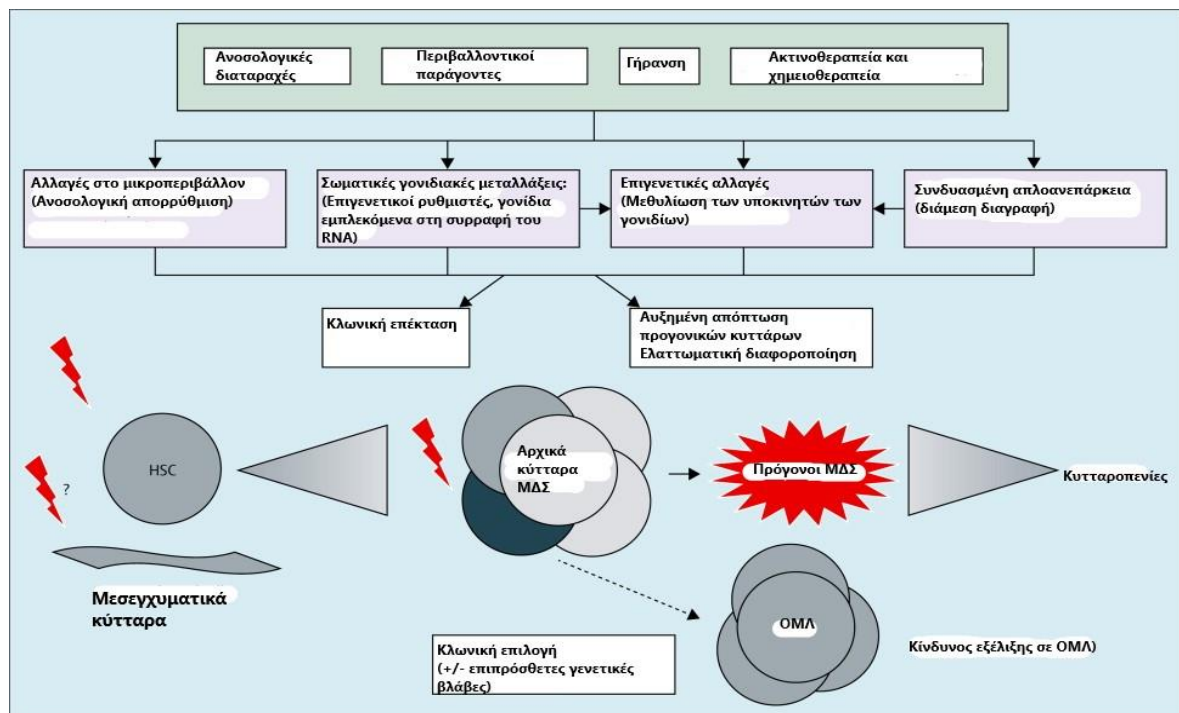
«ιδρυτικές μεταλλάξεις», οι οποίες διενεργούνται σε πρώιμο στάδιο της νόσου, ενώ οι μεταλλάξεις στα γονίδια που εμπλέκονται στην τροποποίηση των ιστονών και των οδών σηματοδότησης πραγματοποιούνται αργότερα κατά την εξέλιξη της νόσου και καλούνται «υποκλωνικές μεταλλάξεις» (Εικόνα 13). Επιπλέον, έχει αποδειχθεί ότι ο τύπος των ιδρυτικών μεταλλάξεων ενδέχεται να καθορίσει τον τύπο των υποκλωνικών. Ιδίως, οι μεταλλάξεις στη συρραφή του RNA φαίνεται να ορίζουν τον τύπο και τον κλινικό φαινότυπο του ΜΔΣ. [42]



Εικόνα 13- Η έναρξη και η εξέλιξη των μυελοδυσπλαστικών συνδρόμων. Πηγή: [11] Η έναρξη των μυελοδυσπλαστικών συνδρόμων λαμβάνει χώρα κατά την κυτταρική διαίρεση των αιμοποιητικών στελεχειαίων κυττάρων (HSCs), όπου πραγματοποιούνται μεταλλάξεις στα συστατικά που εμπλέκονται στη συρραφή του RNA ή τη μεθυλίωση του DNA, οι οποίες ονομάζονται **ιδρυτικές μεταλλάξεις**. Ως εκ τούτου, προκύπτουν παθολογικά αιμοποιητικά βλαστοκύτταρα, τα οποία συνεχίζουν τη διαφοροποίησή τους, σχηματίζοντας μεταλλαγμένους υποκλώνους. Σε αυτό το στάδιο είναι δυνατή η διάγνωση των ΜΔΣ. Κατά την επέκταση των ήδη μεταλλαγμένων κλώνων, διενεργούνται επιπρόσθετες μεταλλάξεις, οι καλούμενες **υποκλωνικές μεταλλάξεις**, οι οποίες αφορούν τη τροποποίηση των ιστονών και της χρωματίνης, τις οδούς σηματοδότησης και τους μεταγραφικούς παράγοντες. Έτσι, μπορεί να προκύψουν τόσο νέοι υποκλώνοι με συνδυασμό ιδρυτικών και υποκλωνικών μεταλλάξεων, όσο και υποκλώνοι που θα φέρουν μόνο υποκλωνικές μεταλλάξεις. Η περαιτέρω διαίρεση αυτών των υποκλώνων οδηγεί στη συσσώρευση των μεταλλάξεων και την εξέλιξη τελικά του μυελοδυσπλαστικού συνδρόμου σε οξεία μυελογενή λευχαιμία.

Ωστόσο, η εμφάνιση όλων αυτών των μεταλλάξεων μπορεί να είναι απόρροια είτε της γήρανσης, είτε μιας στρεσογόνου κατάστασης, η οποία επιτάσσει τον άμεσο και ταχύ πολλαπλασιασμό των στελεχειαίων αιμοποιητικών κυττάρων. Πιο συγκεκριμένα, καταστάσεις όπως η χρόνια αιμορραγία, η γενικευμένη φλεγμονή και οι λοιμώξεις, απαιτούν την άμεση ανταπόκριση των HSCs τόσο για την ανανέωση της δεξαμενής τους, όσο και για την παραγωγή νέων κυττάρων του αίματος και την αποκατάσταση της βλάβης, με συνέπεια τη μετάβαση τους από την αδρανή φάση ηρεμίας στη συνεχή κυτταρική διαίρεση. Οι επαναλαμβανόμενες κυτταρικές διαιρέσεις αυξάνουν την πιθανότητα συσσώρευσης μεταλλάξεων στο DNA, καθιστώντας τα

HSCs πιο επιρρεπή σε γενετικές αλλοιώσεις σε σχέση με τα πιο διαφοροποιημένα κύτταρα. Παράλληλα, η ταχεία διαίρεση οδηγεί στην παραγωγή δραστικών μορφών οξυγόνου, στην κατάρρευση του δυναμικού της μιτοχονδριακής μεμβράνης και το σχηματισμό δίκλωνων θραυσμάτων DNA στα προκύπτοντα κύτταρα, λόγω βλάβης του γενετικού υλικού. Από την άλλη, με τη γήρανση μειώνεται η λειτουργικότητα των HSCs, καθώς και η ικανότητα τους να επιδιορθώνουν τις βλάβες του DNA, γεγονός που συμβάλλει περαιτέρω στη συσσώρευση των μεταλλαγών. Τέλος, τα γηρασμένα στελεγχαϊα κύτταρα παρουσιάζουν ελαττωμένη δυνατότητα σχηματισμού νέων κυττάρων και τροποποιημένη λεμφική διαφοροποίηση. [43]



Εικόνα 14- Η παθογένεια, αιτιολογία και εξέλιξη των μυελοδυσπλαστικών συνδρόμων. Πηγή: [12]

1.2.3.1 Τροποποιήσεις στη διαδικασία της συρραφής του RNA:

Η συρραφή του RNA αποτελεί τη διαδικασία, κατά την οποία το πρόδρομο mRNA, το οποίο περιέχει εσώνια, μετατρέπεται σε ώριμο mRNA, μέσω της αποκοπής των εσωνίων. Η διεργασία αυτή καταλύεται από ένα ενζυμικό σύμπλοκο, το **σωμάτιο συρραφής (spliceosome)**, το οποίο αποτελείται από τις μικρές πυρηνικές ριβονουκλεοπρωτεΐνες (**snRNPs**) και τις επικουρικές **non-snRNPs** πρωτεΐνες. Οι snRNPs είναι καθοριστικές για τη δομική και ενζυμική δραστηριότητα του συμπλόκου, ενώ οι non-snRNPs είναι απαραίτητες για τη συναρμολόγηση του συμπλόκου, την επιλογή των θέσεων συρραφής, καθώς και των συμβάντων εναλλακτικής συρραφής. Η συρραφή του mRNA διαδραματίζεται είτε με το **βασικό μηχανισμό**, κατά τον οποίο αποκόπεται το εσώνιο και εν συνεχεία δεσμεύονται τα πλευρικά του εσώνια, οδηγώντας στην παραγωγή ενός μόνο είδους mRNA, είτε με **εναλλακτικό**

τρόπο, ένας εξελικτικά διατηρημένος μηχανισμός, ο οποίος επιτρέπει τη δημιουργία πολλών διαφορετικών ισομορφών mRNA και κατ' επέκταση πρωτεϊνών, από ένα μοναδικό γονίδιο. Τα ανώμαλα είδη mRNA που προκύπτουν από λανθασμένη συρραφή αποικοδομούνται μέσω της οδού NMD (nonsense-mediated decay), ενώ εκείνα που διαφεύγουν αυτής της οδού, κωδικοποιούν ελαττωματικές πρωτεΐνες, οι οποίες εμπλέκονται στην παθογένεια του καρκίνου και άλλων ασθενειών. Μάλιστα, ύστερα από αλληλούχιση των mRNA από ιστούς του ανθρώπου βρέθηκε ότι το 90-95% των γονιδίων με πολλαπλά εξόνια υπόκεινται σε εναλλακτική συρραφή, με συνέπεια την παραγωγή περισσότερων από 100.000 διαφορετικών ειδών mRNA από μόνο 25.000 γονίδια. Ο **βασικός μηχανισμός** της συρραφής του πρόδρομου mRNA πραγματοποιείται με μια σειρά καθορισμένων σταδίων, η οποία περιλαμβάνει την αναγνώριση των κατάλληλων θέσεων συρραφής, τη συναρμολόγηση του σωματίου συρραφής και την επακόλουθη κατάλυση των αντιδράσεων διάσπασης και δέσμευσης. Η αναγνώριση των θέσεων συρραφής λαμβάνει χώρα μέσω της αλληλεπίδρασης των συστατικών του σωματίου με ειδικά διατηρημένα μοτίβα στην αλληλουχία του mRNA. Οι βασικές περιοχές του πρόδρομου mRNA, οι οποίες αλληλεπιδρούν με τα συστατικά του σωματίου και διαδραματίζουν καθοριστικό ρόλο στο μηχανισμό της συρραφής, είναι κατά σειρά η θέση συρραφής 5', περιέχουσα τις αμετάβλητες αλληλουχίες GU, η περιοχή διακλάδωσης, που περιέχει αδενίνη, η οδός πολυπυριμιδίνης (PPT) και η θέση συρραφής 3', με τις αμετάβλητες αλληλουχίες AG. Η θέση 5' αναγνωρίζεται από τον παράγοντα U1 snRNP, ενώ η θέση 3' από τον επικουρικό παράγοντα U2 (U2AF). Η πρωτεΐνη U2AF αποτελείται από δύο υπομονάδες, την U2AF35 (U2AF1) και την U2AF65 (U2AF2). Η πρωτεΐνη U2AF συνδέεται με το μόριο SF3B1 μέσω ενός παράγοντα συρραφής, τον SF1, με αποτέλεσμα το σχηματισμό ενός ετεροδιμερούς συμπλόκου. Ο παράγοντας U2 έχει υψηλή συγγένεια για το ZRSR2 και το SRSF2, το οποίο με τη σειρά του συνδέεται με την οδό πολυπυριμιδίνης, στη θέση συρραφής 3'. Ως εκ τούτου, το SRSF2 μεσολαβεί την αφαίρεση των εσωνίων από το αρχικό αντίγραφο mRNA, καθώς και τον έλεγχο των μοριακών συμβάντων για την εναλλακτική συρραφή.

Στα ΜΔΣ παρατηρούνται επαναλαμβανόμενες σωματικές μεταλλάξεις σε συστατικά του σωματίου συρραφής, με συνέπεια τη λανθασμένη συρραφή του mRNA και την παραγωγή ελαττωματικών πρωτεϊνών. Οι μεταλλάξεις αυτές είναι εξαιρετικά συνήθεις στα ΜΔΣ, επιδρώντας στην παθογένεια του 45-85% των περιπτώσεων, ανάλογα με το μορφολογικό υπότυπο. Γενικά, οι μεταλλάξεις στη συρραφή του mRNA εντοπίζονται σε πολύ μεγάλο ποσοστό σε νοσήματα, τα οποία διακρίνονται για την **κυτταρική μορφολογική δυσπλασία**, όπως τα ΜΔΣ, η χρόνια μυελομονοκυτταρική λευχαιμία και η σχετιζόμενη με τη θεραπεία οξεία μυελογενής λευχαιμία. Εντούτοις, στα μυελοειδή νοσήματα χωρίς δυσπλασία, όπως στη de

νονο οξεία μυελοειδή λευχαιμία και τα μυελοϋπερπλαστικά νεοπλάσματα, οι μεταλλάξεις στα σωματίδια συρραφής παρατηρούνται σε χαμηλό ποσοστό. [40,41]

1.2.3.2 Μεταλλάξεις σε μεταγραφικούς παράγοντες της αιμοποίησης

Οι μεταγραφικοί παράγοντες έχουν καθοριστική σημασία για την εξέλιξη της αιμοποίησης, καθώς κατευθύνουν τη γονιδιακή έκφραση για τη δέσμευση των HSCs σε μια συγκεκριμένη κυτταρική σειρά και τη μετέπειτα διαφοροποίηση τους σε ώριμα κύτταρα. Οι μεταλλάξεις στα γονίδια των μεταγραφικών παραγόντων της αιμοποίησης αποτελεί σύνηθες γνώρισμα των αιματολογικών κακοηθειών, που επηρεάζουν τη μυελοειδή ή λεμφική κυτταρική σειρά, συμπεριλαμβανομένων και των μυελοδυσπλαστικών νοσημάτων. Γενικότερα, θεωρείται ότι αυτές οι μεταλλάξεις έχουν επιβλαβή επίδραση στη φυσιολογική αυτοανανέωση και διαφοροποίηση των HSCs, με συνέπεια την ανώμαλη αυτοανανέωση τους και την τελική κυριαρχία του μεταλλαγμένου κλώνου. Στα μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα, οι κύριοι μεταγραφικοί παράγοντες που παρουσιάζουν μεταλλάξεις είναι ο RUNX1, ο ETV6 και η πρωτεΐνη **p53**. Ειδικότερα, οι μεταλλάξεις στο γονίδιο του **RUNX1** εμφανίζονται στο 10-20% των περιστατικών ΜΔΣ, με υψηλότερη συχνότητα σε ασθενείς με προηγούμενη έκθεση σε ακτινοβολία ή χημειοθεραπεία, καθώς και σε ασθενείς με πιο προχωρημένη νόσο. Επιπλέον, συσχετίζονται με σοβαρή θρομβοπενία (αιμοπετάλια < 50.000), αυξημένο ποσοστό βλαστών στο μυελό των οστών (>5%) και μειωμένο χρόνο επιβίωσης.

Οι μεταλλάξεις στο γονίδιο του παράγοντα **ETV6** απαντώνται σε ποσοστό 1-3% στα ΜΔΣ και σχετίζονται με δυσμενή πρόγνωση και μειωμένο χρόνο επιβίωσης. Ο παράγοντας ETV6 εκφράζεται σε όλα τα στάδια της αιμοποίησης και είναι απαραίτητος για τη διατήρηση των HSCs. Οι διαταραχές στο γονίδιο του ETV6 συμβάλλουν στην παθογένεια των ΜΔΣ με ποικίλους μηχανισμούς. Π.χ η σύντηξη του γονιδίου ETV6 με συγκεκριμένα άλλα γονίδια μπορεί να οδηγήσει είτε στην επαγωγή ανεξέλεγκτου κυτταρικού πολλαπλασιασμού ή ακόμα και στο αντίθετο αποτέλεσμα, με την προαγωγή της ογκοκατασταλτικής δραστηριότητας. Από την άλλη, οι σημειακές μεταλλάξεις του γονιδίου ETV6 επιφέρουν την έκφραση ελαττωματικών πρωτεϊνών, με κύριο επακόλουθο την κατάργηση της λειτουργίας του μεταγραφικού καταστολέα. [40]

Η πρωτεΐνη **p53** είναι ένας μεταγραφικός παράγοντας με ογκοκατασταλτική δραστηριότητα, ο οποίος παράγεται από το γονίδιο Trp53 στο χρωμόσωμα 17p, ως απόκριση στο κυτταρικό στρες που επάγεται από τη βλάβη του DNA και την ενεργοποίηση ογκογονιδίων. Η λειτουργία της είναι η ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου, η προώθηση της απόπτωσης και η επιδιόρθωση του DNA. Το γονίδιο Trp53

παρουσιάζει σημειακές μεταλλάξεις ή διαγράφεται στην πλειοψηφία των ανθρώπινων καρκίνων, ωστόσο στις αιματολογικές κακοήθειες εμφανίζει βλάβες σε σχετικά χαμηλό ποσοστό, το οποίο κυμαίνεται από 10-20%. Όσον αφορά τα μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα, στο γονίδιο Tr53 εντοπίζονται μεταλλάξεις, που προκαλούν απώλεια της δραστηριότητας της πρωτεΐνης, στο 4-14% των ΜΔΣ και στο 20-30% εκείνων των περιπτώσεων που προκύπτουν ύστερα από έκθεση σε αλκυλιωτικούς παράγοντες ή ακτινοβολία. Οι μεταλλάξεις στο Tr53 συχνά συνοδεύονται από σύνθετο καρυότυπο και σχετίζονται με την πιο δυσμενή πρόγνωση από όλες τις γονιδιακές μεταλλάξεις των ΜΔΣ.[40,42]

1.2.3.3 Μεταλλάξεις σε συστατικά των οδών σηματοδότησης

Εξίσου καθοριστικό ρόλο στην εξέλιξη της φυσιολογικής αιμοποίησης διαδραματίζουν και οι ενδοκυτταρικές οδοί σηματοδότησης της τυροσινικής κινάσης, οι οποίες ενεργοποιούνται ύστερα από τη δέσμευση ειδικών κυτταρικών υποδοχέων με αυξητικούς παράγοντες ή κυτταροκίνες. Η κατάλληλη χωροχρονική δράση των αυξητικών παραγόντων και κυτταροκινών στα αιμοποιητικά προγονικά κύτταρα ρυθμίζει τη διαφοροποίηση και ωρίμανση των κυττάρων του αίματος. Κατά συνέπεια, οι μεταλλάξεις στα συστατικά των οδών σηματοδότησης που επάγουν αυτοί οι παράγοντες, μπορεί να επιφέρουν είτε τη συνεχή διέγερση των κυττάρων από ενδογενή ερεθίσματα ή την επαγωγή ενός μέρους του μονοπατιού σηματοδότησης. Επομένως, τα προγονικά αιμοποιητικά κύτταρα με αυτές τις μεταλλάξεις παρουσιάζουν ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό και αποφυγή της απόπτωσης, λόγω της συνεχούς απόκρισης τους στα ερεθίσματα των αυξητικών παραγόντων, ή παρέκκλιση από τη φυσιολογική ρύθμιση της αιμοποίησης. Παράδειγμα τέτοιων μεταλλάξεων αποτελούν οι μεταλλάξεις στην οικογένεια RAS των πρωτο-ογκογονιδίων, οι οποίες συναντώνται σε ένα υποσύνολο των περιστατικών ΜΔΣ. Οι πρωτεΐνες RAS είναι μικρές τριφωσφατάσες γουανοσίνης, οι οποίες πυροδοτούν μονοπάτια μεταγωγής σήματος, καθοριστικά για την ανάπτυξη και ωρίμανση των κυττάρων, ύστερα από τη δέσμευσή τους σε ειδικούς υποδοχείς της κυτταρικής επιφάνειας. Στα ΜΔΣ εντοπίζονται σε ποσοστό περίπου 10% και 1-2%, μεταλλάξεις στα γονίδια NRAS και KRAS, αντίστοιχα. Ιδίως οι μεταλλάξεις στο NRAS σχετίζονται με σοβαρή θρομβοπενία και αυξημένο ποσοστό βλαστών στο μυελό των οστών και μπορεί να προμηνύουν μετασχηματισμό σε οξεία λευχαιμία. [40]

1.2.3.4 Διαταραχές σε διεργασίες της επιγενετικής ρύθμισης

Εκτός από τις γενετικές ανωμαλίες, στην παθογένεια των μυελοδυσπλαστικών συνδρόμων, εμπλέκονται και διαταραχές στην επιγενετική ρύθμιση των προγονικών αιμοποιητικών κυττάρων. Η επιγενετική ρύθμιση περιλαμβάνει το σύνολο των μοριακών μηχανισμών, οι οποίοι καθορίζουν τη γονιδιακή έκφραση και συνεπώς τη μορφολογία και λειτουργία του κάθε κυττάρου, κατά τη διάρκεια της διαφοροποίησης. Οι μηχανισμοί αυτοί δεν αφορούν αλλαγές στην αλληλουχία του DNA και μπορούν να διατηρούνται κατά την κυτταρική διαίρεση, δηλαδή να μεταβιβάζονται στα θυγατρικά κύτταρα. Οι κύριοι μηχανισμοί επιγενετικής ρύθμισης είναι η **μεθυλίωση του DNA** και η **τροποποίηση της ιστόνης**.

Η **μεθυλίωση του DNA** πραγματοποιείται στις νησίδες CpG, δηλαδή στις περιοχές του γενετικού υλικού, όπου είναι υψηλή η συχνότητα εμφάνισης του διουκλεοτιδίου CG. Η διαδικασία αυτή καταλύεται από τα ένζυμα DNA μεθυλοτρανσφεράσες (DNMTs), οι οποίες μετατρέπουν την κυτοσίνη του διουκλεοτιδίου σε 5-μεθυλκυτοσίνη. Δεδομένου ότι σε αυτές τις περιοχές εντοπίζονται πολλοί κεντρικοί υποκινητές γονιδίων, η μεθυλίωση των CpG οδηγεί στην καταστολή της μεταγραφής και συνεπώς στην **αποσιώπηση των γονιδίων**. Από την άλλη, η μεθυλίωση των νουκλεοτιδίων εντός του γονιδίου επάγει τη μεταγραφή. Η μέθυλο-CpG καταστέλλει τη μεταγραφή είτε με την παρεμπόδιση της δέσμευσης μεταγραφικών παραγόντων στους υποκινητές ή λειτουργώντας ως σήμα, για τη σύνδεση πρωτεϊνών στο μεθυλιωμένο DNA, οι οποίες στρατολογούν άλλα κατασταλτικά πρωτεϊνικά σύμπλοκα. Οι DNMTs διακρίνονται σε δύο κατηγορίες, την de novo μεθυλοτρανσφεράση DNMT3A και DNMT3B και τη μεθυλοτρανσφεράση συντήρησης DNMT1. Τα ένζυμα αυτά λειτουργούν συνεργικά για τη δημιουργία αρχικών προτύπων μεθυλίωσης και την αναγέννηση του ημιμεθυλιωμένου DNA κατά την αντιγραφή. Ωστόσο, είναι απαραίτητο να υπάρχει και ένας αντισταθμιστικός μηχανισμός για την αποφυγή της υπέρμετρης μεθυλίωσης και την αποσιώπηση σημαντικών γονιδίων για το κύτταρο. Έτσι, η 5-μεθυλκυτοσίνη μπορεί να οξειδωθεί διαδοχικά σε 5-υδροξυμεθυλκυτοσίνη (5 hmC), 5-φορμυλκυτοσίνη (5fC) και 5-καρβοξυκυτοσίνη (5caC), από τρία μέλη της οικογένειας των διοξυγενασών TET (TET1, TET2 και TET3), τα οποία απαιτούν την παρουσία του δισθενή σιδήρου (Fe II) και του 2-κετογλουταρικού (2OG) ως συμπαραγόντες. Τα ένζυμα TET μπορούν να δράσουν τόσο σε πλήρες όσο και σε ημιμεθυλιωμένο DNA, καθώς και σε περιοχές που δεν περιέχουν το διουκλεοτίδιο CG. Μάλιστα, η απώλεια του γονιδίου TET2 μπορεί να επιφέρει αυξημένη επιβίωση, αυτοανανέωση και επέκταση των αιμοποιητικών προγονικών κυττάρων.

Στα μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα έχουν εντοπιστεί μεταλλάξεις σε πολλαπλά γονίδια που κωδικοποιούν επιγενετικούς ρυθμιστές, οι οποίοι συμμετέχουν στη μεθυλίωση του DNA, όπως τα γονίδια **DNMT3A** και **TET2**. Οι μεταλλάξεις αυτές

προκαλούν εκτεταμένες αλλαγές στα μεταγραφικά πρότυπα, οι οποίες διατηρούνται μέσω της κυτταρικής διαίρεσης και οδηγούν στην παγίωση και επιμονή του φαινοτύπου ΜΔΣ. Οι αλλαγές της επιγενετικής ρύθμισης αντανακλώνονται σε δείγματα DNA από ασθενείς με ΜΔΣ, όπου εντοπίζεται **υπερμεθυλίωση στις περιοχές των υποκινητών των γονιδίων**, τόσο στα ΜΔΣ χαμηλού όσο και σε αυτά υψηλού κινδύνου και η έκταση της σχετίζεται με τη σοβαρότητα της νόσου, ενώ προμηνύει μετασχηματισμό σε ΟΜΛ και μειωμένη συνολική επιβίωση. Ως φυσικό επακόλουθο της υπερμεθυλίωσης, καταστέλλεται η έκφραση πολυάριθμων γονιδίων, εκ των οποίων και ρυθμιστές του κυτταρικού κύκλου, όπως το p15INK4B. Οι μεταλλάξεις στο γονίδιο TET2 είναι αρκετά συνηθισμένες στα ΜΔΣ και γενικότερα στις μυελοειδείς κακοήθειες, όπως η οξεία μυελογενής λευχαιμία, τα μυελοϋπερπλαστικά νοσήματα και η χρόνια μυελομονοκυτταρική λευχαιμία και είναι δυνατό να προκύψουν είτε σε πρώιμο στάδιο ή αργότερα κατά την εξέλιξη της νόσου. Ακόμα, επαναλαμβανόμενες μεταλλάξεις στο γονίδιο DNMT3A παρατηρούνται περίπου στο 22% των de novo περιπτώσεων ΟΜΛ, στο 2-8% των ΜΔΣ και έως και το 7% των περιπτώσεων ΧΜΜΛ και της πρωτοπαθούς μυελοϊνώσεως. Οι μεταλλάξεις DNMT3A στα ΜΔΣ σχετίζονται με δυσμενή πρόγνωση και ταχύτερο μετασχηματισμό σε ΟΜΛ.

Ο καθοριστικός ρόλος της ανώμαλης υπερμεθυλίωσης του DNA στην παθογένεια των μυελοδυσπλαστικών συνδρόμων αποδεικνύεται από την αποτελεσματικότητα των αναστολέων της DNA μεθυλοτρανσφεράσης, δεσιπαβίνη και 5-αζακιτιδίνη, στη θεραπεία. Το ποσοστό ανταπόκρισης στη θεραπεία με τους συγκεκριμένους παράγοντες υπομεθυλίωσης ανέρχεται στο 40-60%. Πιο συγκεκριμένα, οι παράγοντες αυτοί συμβάλλουν στη βελτίωση των κυτταροπενιών και στη μείωση του ρυθμού μετατροπής σε οξεία μυελογενή λευχαιμία, ενώ η 5-αζακιτιδίνη έχει βρεθεί ότι παρατείνει το συνολικό χρόνο επιβίωσης. [40,44]

Εξίσου σημαντικός μηχανισμός επιγενετικής ρύθμισης, ο οποίος επηρεάζεται στα μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα, αποτελεί η **τροποποίηση των ιστονών**. Οι ιστόνες είναι μικρές πρωτεΐνες, οι οποίες σχηματίζουν τον πυρήνα του νουκλεοσώματος. Το νουκλεόσωμα αποτελεί τη βασική δομική μονάδα της χρωματίνης και αποτελείται από DNA μήκους 147 ζεύγη βάσεων, το οποίο τυλίγεται γύρω από το οκταμερές των ιστονών. Το οκταμερές αυτό συγκροτείται από ζεύγη που δημιουργούν οι ιστόνες H2A, H2B, H3 και H4. Οι ιστόνες H2A και H2B έχουν δομικό ρόλο, ενώ οι H3 και H4 υφίστανται ειδικές μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις, οι οποίες ρυθμίζουν τη γονιδιακή έκφραση, συμπεριλαμβανομένων της μεθυλίωσης, ακετυλίωσης, φωσφορυλίωσης, σουμοϋλίωσης και της ουβικουΐτινοποίησης. Οι τροποποιήσεις αυτές πραγματοποιούνται στις N-αμινοτελικές ουρές των ιστονών H3 και H4, οι οποίες προεξέχουν από τη βασική δομή του νουκλεοσώματος κι έρχονται σε επαφή με το DNA. Ουσιαστικά, ειδικά ένζυμα συνδέουν ομοιοπολικά

τους αντίστοιχους υποκαταστάτες, ανάλογα με τη τροποποίηση που λαμβάνει χώρα, στις πλευρικές ομάδες συγκεκριμένων αμινοξέων. Π.χ η ακετυλίωση καταλύεται από τις ακετυλοτρανσφεράσες των ιστονών HATs (Histone Acetyltransferases), οι οποίες προσθέτουν ακετυλομάδες σε συγκεκριμένες λυσίνες των αμινοτελικών ουρών των ιστονών. Ως αποτέλεσμα αυτών των τροποποιήσεων, αλλάζει το ηλεκτρικό φορτίο της πολυπεπτιδικής αλυσίδας, οδηγώντας είτε στην άμεση μεταβολή της δομής του νουκλεοσώματος ή στη δημιουργία θέσεων πρόσδεσης για τη σύνδεση άλλων πρωτεϊνών, που αλλάζουν τις ιδιότητες της χρωματίνης. Ως εκ τούτου, με τη τροποποίηση των ιστονών μπορεί να επιτευχθεί η δημιουργία τόσο συμπαγών και σύνθετων δομών χρωματίνης και νουκλεοσώματος, οι οποίες παρεμποδίζουν την πρόσβαση της μεταγραφικής συσκευής στο γενετικό υλικό και συνεπώς αναστέλλουν τη γονιδιακή έκφραση, όσο και πιο “χαλαρών” δομών νουκλεοσώματος, οι οποίες επιτρέπουν τη μεταγραφή και προάγουν τη γονιδιακή έκφραση. Τα ένζυμα που πραγματοποιούν αυτές τις τροποποιήσεις στρατολογούνται από σύμπλοκα ενεργοποιητή-συνενεργοποιητή της μεταγραφής σε υποκινητές στοχευμένων γονιδίων, ως απόκριση σε διάφορα φυσιολογικά ερεθίσματα. [45-47]

Ειδικότερα, η ακετυλίωση των ουρών ιστόνης έχει βρεθεί ότι αποτρέπει τις αλληλεπιδράσεις που οδηγούν σε πιο σύνθετες δομές χρωματίνης, επιτρέποντας στη μεταγραφική συσκευή να εισέλθει στο DNA, ώστε να πραγματοποιηθεί η μεταγραφή. Από την άλλη, η μεθυλίωση μπορεί τόσο να επάγει, όσο και να καταστείλει τη μεταγραφή. Συγκεκριμένα, η μεθυλίωση του 4^{ου} καταλοίπου λυσίνης στην αμινοτελική ουρά της ιστόνης H3 (H3K4) επάγει τη μεταγραφή, ενώ η μεθυλίωση του 9^{ου} και 27^{ου} καταλοίπου, επίσης στην ιστόνη H3 (H3K9 και H3K27), αναστέλλει τη μεταγραφή. Στα μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα παρατηρούνται μεταλλάξεις σε διάφορα γονίδια, που κωδικοποιούν επιγενετικούς ρυθμιστές, εμπλεκόμενους στη τροποποίηση των ιστονών. Ένα από αυτά είναι το γονίδιο **ASXL-1**, το οποίο ρυθμίζει τον επιγενετικό κώδικα, αλληλεπιδρώντας με πρωτεΐνες του συμπλόκου polycomb και άλλους ενεργοποιητές και καταστολείς της μεταγραφής. Το γονίδιο αυτό συμβάλλει στη διατήρηση των σημάτων είτε της επαγωγής, είτε της αναστολής της γονιδιακής έκφρασης, ανάλογα με τα σύμπλοκα με τα οποία αλληλεπιδρά. Έτσι, η απώλεια του γονιδίου μπορεί να επιφέρει αδιάκοπη ενεργοποίηση της μεταγραφής ή αποσιώπηση των γονιδίων-στόχων. Σε δύο διαφορετικές μελέτες σε ασθενείς με ΜΔΣ εντοπίστηκαν μεταλλάξεις στο γονίδιο ASXL-1 σε ποσοστό 11% και 18,5%, αντίστοιχα. Σε μία άλλη μελέτη, εντοπίστηκαν μεταλλάξεις σε αυτό το γονίδιο, πιο συχνά στην Ανθεκτική Αναιμία με Περίσσεια Βλαστών-2 (MDS RAEB-2), σε ποσοστό 47%. Το ASXL-1, όπως και το TET2, έχει βρεθεί ότι παρουσιάζει μεταλλάξεις σε όλες τις μυελοειδείς κακοήθειες. Επιπρόσθετο γονίδιο, στο οποίο εντοπίζονται μεταλλάξεις στα ΜΔΣ και σχετίζεται

με την τροποποίηση των ιστονών, αποτελεί το **EZH2**, συστατικό του κατασταλτικού πρωτεϊνικού συμπλόκου polycomb, το οποίο καταλύει τη τριμεθυλίωση του 27^{ου} καταλοΐπου λυσίνης στην ιστόνη 3. Σύμφωνα με πρόσφατες μελέτες, μεταλλάξεις σε αυτό το γονίδιο παρουσιάζονται σε ποσοστό 6% των ασθενών με ΜΔΣ, και συχνά επιφέρουν απώλεια λειτουργικότητας του EZH2. Το γονίδιο EZH2 εδράζεται στο χρωμόσωμα 7q36, το οποίο διαγράφεται σε ορισμένους φαινότυπους ΜΔΣ χαμηλού κινδύνου, εξηγώντας την απώλεια δραστηριότητας της μεθυλοτρανσφεράσης EZH2, σε αυτούς τους φαινότυπους. Μεταλλάξεις στο EZH2 έχουν, ακόμα, ανιχνευθεί και στα μυελοϋπερπλαστικά νοσήματα, τη χρόνια μυελομονοκυτταρική λευχαιμία, τα λεμφώματα και διάφορους συμπαγείς όγκους. [42,44,48]

1.2.3.5 Κυτταρογενετικές διαταραχές

Τα μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα χαρακτηρίζονται από πολλαπλές επίκτητες κυτταρογενετικές βλάβες, οι οποίες εντοπίζονται σε ποσοστό 40-50% των de novo ΜΔΣ. Ο καρυότυπος είναι απαραίτητος για τη διάγνωση των ΜΔΣ και αποτελεί ισχυρό προγνωστικό δείκτη της συνολικής επιβίωσης σε ασθενείς, όπου δεν παρατηρείται εξέλιξη του συνδρόμου σε λευχαιμία, ο οποίος εντάσσεται στο σύστημα IPSS (International Prognostic Scoring System). Οι πιο κοινές χρωμοσωμικές ανωμαλίες στα ΜΔΣ είναι οι διάμεσες διαγραφές του μακριού βραχίονα το χρωμοσώματος 5 (**5q**), οι οποίες εμφανίζονται στο 10-15% των ασθενών. Οι ασθενείς με **del(5q) ΜΔΣ** παρουσιάζουν κλινική ετερογένεια και διακρίνονται σε δύο κατηγορίες, με βάση την κλινική τους εικόνα, την πρόγνωση και την ανταπόκριση σε συγκεκριμένη θεραπεία. Σε ορισμένους ασθενείς με del(5q) ΜΔΣ, η νόσος εμφανίζει επιθετική πορεία, με αυξημένη πιθανότητα εξέλιξης σε ΟΜΛ και μειωμένο χρόνο συνολικής επιβίωσης. Αυτός ο υπότυπος προκύπτει συνήθως σε ασθενείς που έχουν υποβληθεί σε θεραπεία με αλκυλιωτικούς παράγοντες ή/και ακτινοβολία και συχνά συνοδεύεται από επιπλέον κυτταρογενετικές διαταραχές και μετάλλαξη στο γονίδιο TP53. Άλλες κυτταρογενετικές ανωμαλίες των ΜΔΣ αποτελούν οι διαταραχές του **χρωμοσώματος 7**, η μονοσωμία 7 ή η διάμεση διαγραφή του 7q, οι οποίες εμφανίζονται στο 10% των de novo ΜΔΣ και περίπου στο 50% των ΜΔΣ, που προκύπτουν ύστερα από έκθεση σε αλκυλιωτικούς παράγοντες. Οι βλάβες στο χρωμόσωμα 7 σχετίζονται με μειωμένο χρόνο επιβίωσης, ενώ η μονοσωμία 7 χαρακτηρίζεται από πιο δυσμενή πρόγνωση σε σχέση με τον τύπο διάμεση del(7q) ΜΔΣ. Τα τμήματα, τα οποία αφαιρούνται συνήθως από το 7^ο χρωμόσωμα στον τύπο del(7q) ΜΔΣ, είναι τα 7q22 και 7q32-34. Σε μοντέλο ποντικού, με διαγραφή του τμήματος 7q22, παρατηρήθηκε ομόζυγη διαγραφή του γονιδίου MLL5, το οποίο εδράζεται σε εκείνη την περιοχή και κωδικοποιεί μια μεθυλοτρανσφεράση ιστόνης. Η διαγραφή αυτή επηρεάζει την ομοιόσταση των αιμοποιητικών βλαστοκυττάρων και προκαλεί εξασθένηση της

ικανότητας τους να αυτοανανεώνονται. Επιπλέον κυτταρογενετική διαταραχή αποτελεί η **τρισωμία 8**, η οποία εντοπίζεται στο 5% των περιστατικών ΜΔΣ και σχετίζεται με ενδιάμεσο προγνωστικό κίνδυνο και συνολικό χρόνο επιβίωσης, τους 23 μήνες. Η τρισωμία 8 φαίνεται να διενεργείται σε όψιμο στάδιο της αιμοποίησης, κατά τη δέσμευση των προγονικών αιμοποιητικών κυττάρων στη μυελοειδή σειρά, γεγονός που αποδεικνύεται από την απουσία της στο διαμέρισμα των βλαστοκυττάρων CD34+, CD38-, CD90+, το οποίο θεωρείται ότι περιέχει τον αρχικό μεταλλαγμένο κλώνο. Μάλιστα, έχει βρεθεί ότι τα προγονικά αιμοποιητικά κύτταρα που παρουσιάζουν τρισωμία στο χρωμόσωμα 8, εκφράζουν αντιαποπτωτικά γονίδια σε υψηλά επίπεδα και παρουσιάζουν αυξημένη αντοχή σε πειραματικά αποπτωτικά ερεθίσματα, γεγονός που πιθανόν αποτελεί μηχανισμό κλωνικού πλεονεκτήματος, για την επικράτηση του συγκεκριμένου μεταλλαγμένου κλώνου και την εγκατάσταση του αντίστοιχου φαινοτύπου. [40]

1.2.3.6 Ανοσολογικές διαταραχές

Το ανοσοποιητικό σύστημα συμμετέχει ενεργά στην παθογένεια των ΜΔΣ. Πολλαπλές επιδημιολογικές μελέτες ανά δεκαετίες έχουν αναδείξει τη συσχέτιση των αυτοάνοσων νοσημάτων με τα μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα. Παράλληλα, με την αλματώδη εξέλιξη της Ανοσοθεραπείας-Ανοσολογίας αναπτύχθηκαν νέες εναλλακτικές θεραπευτικές επιλογές για τα ΜΔΣ, οι οποίες στοχεύουν στη ρύθμιση των ανοσολογικών διαταραχών που λαμβάνουν χώρα στο μικροπεριβάλλον του μυελού των οστών, κατά την ανάπτυξη των ΜΔΣ. Πιο συγκεκριμένα, η **απορρύθμιση του ανοσοποιητικού συστήματος** αποτελεί το εναρκτήριο έναυσμα για την ανάπτυξη τόσο των ΜΔΣ όσο και των αυτοάνοσων νοσημάτων, γεγονός που εξηγεί τα υψηλά ποσοστά ανάπτυξης μυελοδυσπλαστικού συνδρόμου σε ασθενείς με προγενέστερα αυτοάνοσα νοσήματα. Γενικά, θεωρείται ότι η **χρόνια ανοσολογική διέγερση** που συμβαίνει στα αυτοάνοσα νοσήματα, οδηγεί στην ανάπτυξη του ΜΔΣ, ωστόσο ο ακριβής μοριακός μηχανισμός δεν είναι ακόμη γνωστός. Κατά την πορεία εξέλιξης του μυελοδυσπλαστικού συνδρόμου, το ανοσοποιητικό σύστημα παρουσιάζει ποικίλες τροποποιήσεις, οι οποίες αφορούν τόσο την έμφυτη, όσο και την ειδική ανοσολογική απόκριση. Αρχικά, κατά την ανάπτυξη του **χαμηλού κινδύνου ΜΔΣ**, το έμφυτο ανοσοποιητικό σύστημα φαίνεται να υπερλειτουργεί, επιδρώντας στα επίπεδα των εκκρινόμενων κυτταροκινών, στη σηματοδότηση των φλεγμονωδών διεργασιών, καθώς και στη δραστηριότητα των ανοσοποιητικών κυττάρων. Ως εκ τούτου, διαταράσσεται η φυσιολογική αιμοποίηση και η ισορροπία ανάμεσα στην απόπτωση και τον πολλαπλασιασμό των αιμοποιητικών κυττάρων. Συνεπώς, η ανοσοκατασταλτική θεραπεία αποδεικνύεται αρκετά αποτελεσματική για το συγκεκριμένο τύπο ΜΔΣ. Παράλληλα, όσον αφορά το προσαρμοστικό ανοσοποιητικό σύστημα, τα Tc

κύτταρα παρουσιάζουν αυξημένη ανοσολογική λειτουργία, λόγω της ενεργοποίησης τους από τα κακοήθη βλαστικά κύτταρα, με αποτέλεσμα την καταστολή της αιμοποίησης. Επιπλέον, χαρακτηριστικό γνώρισμα των **ΜΔΣ υψηλού κινδύνου** αποτελεί η αποφυγή της ανοσολογικής επιτήρησης από τα κακοήθη βλαστικά κύτταρα, η οποία συμβάλλει στην περαιτέρω εξέλιξη του. Έτσι, για αυτόν τον τύπο ακολουθούνται θεραπευτικές στρατηγικές, που διεγείρουν το ανοσοποιητικό σύστημα, μεταξύ των οποίων οι αναστολείς των σημείων ανοσολογικού ελέγχου και τα εμβόλια.

➤ **Κυτταροκίνες:**

Τα επίπεδα έκκρισης των κυτταροκινών μεταβάλλονται κατά την ανάπτυξη των ΜΔΣ και παρουσιάζουν διακυμάνσεις μεταξύ των διαφορετικών τύπων. Στο περιφερικό αίμα και το μυελό των οστών ασθενών με ΜΔΣ παρατηρήθηκε τροποποιημένη έκκριση τουλάχιστον 30 κυτταροκινών. Αναλυτικότερα, βρέθηκε ότι αυξάνονται τα επίπεδα των **TNF-α, IFN-γ, TGF-β, IL-6** και **IL-8**, με επιζήμιες επιδράσεις στις οδούς σηματοδότησης των φλεγμονωδών διαδικασιών και τη διαφοροποίηση της μυελοειδούς σειράς. Ο **TNF-α** εκκρίνεται από τα στρωματικά κύτταρα του μυελού των οστών και η αύξηση του υποδηλώνει έντονη συστηματική φλεγμονώδη δραστηριότητα. Τα επίπεδα του αυξάνονται στο μυελό των οστών και στο περιφερικό αίμα των ασθενών με ΜΔΣ, ενώ συνάμα έχει βρεθεί ότι υπερεκφράζεται σε κυτταροκαλλιέργειες από ασθενείς με ΜΔΣ. Τα υψηλά επίπεδα του TNF-α στον ορό αποτελούν δυσμενή προγνωστικό παράγοντα, καθώς σχετίζονται με μεγαλύτερα επίπεδα λευκοκυττάρων, β2-μικροσφαιρίνης και κρεατινίνης και χαμηλότερα επίπεδα αιμοσφαιρίνης. Ακόμα, στα ΜΔΣ χαμηλού κινδύνου αυξάνονται τα επίπεδα της **IFN-γ** και της **IL-6**, κυτταροκίνες υπεύθυνες για την επαγωγή της απόπτωσης στο μυελό των οστών των ασθενών. Αντίθετα, στα ΜΔΣ υψηλού κινδύνου παρατηρείται αυξημένη έκκριση ανοσοκατασταλτικών κυτταροκινών, όπως η **IL-10**. Τα ευρήματα αυτά συνάδουν με τα βασικά γνωρίσματα των ΜΔΣ χαμηλού και υψηλού κινδύνου, δηλαδή την αυξημένη ενδομυελική απόπτωση και την κακοήθη κλωνική επέκταση, αντίστοιχα.

➤ **Ανοσολογικές οδοί σηματοδότησης:**

Χαρακτηριστική αντίφαση των ΜΔΣ, που δυσχεραίνει την κατανόηση της παθογένειας τους, αποτελεί η συνύπαρξη αυξημένου κυτταρικού πολλαπλασιασμού και απόπτωσης στο μυελό των οστών. Αυτή η διαταραχή στην ισορροπία κυτταρικού θανάτου-πολλαπλασιασμού οφείλεται σε διάφορα φλεγμονώδη μονοπάτια σηματοδότησης, τα οποία επάγονται στο μικροπεριβάλλον του μυελού των οστών, συμπεριλαμβανομένων της **αποπτωτικής οδού**, της **οδού σηματοδότησης μέσω του υποδοχέα TLR** (Toll-like receptor) και της **οδού σηματοδότησης του NF-κΒ** (Nuclear transcription factor).

✚ **Αποπτωτική οδός:** Η αποπτωτική οδός επάγεται σε μεγάλο βαθμό στα ΜΔΣ χαμηλού κινδύνου, προκαλώντας αυξημένη απόπτωση και κυτταροπενία στο μυελό των οστών. Η απόπτωση μπορεί να ενεργοποιηθεί με ποικίλους μηχανισμούς, όπως μέσω της σύνδεσης του «υποδοχέα θανάτου» **Fas**, ο οποίος υπερεκφράζεται στα βλαστικά αιμοποιητικά κύτταρα των ασθενών με ΜΔΣ, με τον ειδικό συνδέτη του, τον Fas-L (Fas-Ligand). Τα CD34+ βλαστικά κύτταρα δεν εκφράζουν τον υποδοχέα Fas υπό φυσιολογικές συνθήκες, ωστόσο η έκφραση του επάγεται ύστερα από την έκθεση τους σε κυτταροκίνες, όπως ο TNF-α ή η IFN-γ. Ακόμα, η αποπτωτική οδός μπορεί να ενεργοποιηθεί άμεσα από τον **TNF-α**, ο οποίος συνδέεται επιλεκτικά με δύο υποδοχείς, τον TNFR1 και TNFR2. Η σύνδεση με τον TNFR1 επάγει την απόπτωση μέσω ενεργοποίησης της κασπάσης-8, ενώ η σύνδεση με τον TNFR2 επάγει την οδό της c-Jun N-τελικής κινάσης, η οποία μεσολαβεί αντι-αποπτωτικές λειτουργίες. Τέλος, η απόπτωση των αιμοποιητικών βλαστικών κυττάρων μπορεί να προκληθεί από διάφορες άλλες κυτταροκίνες, συμπεριλαμβανομένων της **TGF-β** και της **IFN-α**, οι οποίες ενεργοποιούν την οδό σηματοδότησης MAPK (p38 mitogen-activated protein kinase).

✚ **Οδός σηματοδότησης του υποδοχέα TLR:** Οι υποδοχείς τύπου Toll (TLRs) είναι μεμβρανικοί υποδοχείς, με καθοριστικό ρόλο για την έμφυτη ανοσολογική απόκριση. Οι TLRs επάγουν μονοπάτια σηματοδότησης, μεταξύ των οποίων η οδός της πρωτεΐνης ενεργοποιητή 1 (AP-1), η p38 MAPK και το μονοπάτι NF-κΒ, ύστερα από την αναγνώριση μοριακών προτύπων PAMPs (pathogen-associated molecular patterns) και DAMPs (damage-associated molecular patterns), στο πλαίσιο των μεταβολικών τροποποιήσεων, της άμυνας κατά των μικροβίων, της επούλωσης των ιστών και της κυτταρικής διαφοροποίησης. Επίσης, η οδός σηματοδότησης TLR προάγει την έκφραση διαφόρων microRNAs, συμπεριλαμβανομένων των miR-146a/b, miR-147, miR-155, miR-181 και miR-21, τα οποία εμπλέκονται στις φλεγμονώδεις διεργασίες και κάποια από αυτά πιθανόν συμμετέχουν στην παθογένεια των ΜΔΣ. Ύστερα από μελέτες του μοτίβου γονιδιακής έκφρασης, βρέθηκε ότι πολυάριθμοι τύποι TLRs, καθώς και άλλα συστατικά αυτής της οδού, υπερεκφράζονται σε ασθενείς με ΜΔΣ. Ακόμα, αποδείχτηκε ότι ο TLR4 υπερεκφράζεται στα μονοκύτταρα του μυελού των οστών (BMMCs) και στα CD34+ κύτταρα των ασθενών με ΜΔΣ, και τα επίπεδα του σχετίζονται με το ποσοστό απόπτωσης. Τέλος, η έκφραση των TLR-1, TLR-2, TLR-4, TLR-6, TLR-7 και TLR-9 βρέθηκε αυξημένη σε ασθενείς με ΜΔΣ, ωστόσο η έκφραση του TLR-9 ελαττώθηκε σε μεταγενέστερο στάδιο, κατά το μετασχηματισμό του συνδρόμου σε OMA.

✚ **Οδός σηματοδότησης του πυρηνικού μεταγραφικού παράγοντα NF-κB:**

Η οδός του NF-κB σε αντίθεση με τις προαναφερθείσες οδούς δεν προάγει τον κυτταρικό θάνατο, αλλά συμβάλλει στην κυτταρική διαφοροποίηση, αυτοανανέωση και τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Ως εκ τούτου, η δραστηριότητα του NF-κB αυξάνεται σε όψιμο στάδιο κατά την ανάπτυξη του ΜΔΣ, όπου παρατηρείται επιθετική κλωνική επέκταση, προσδίδοντας πλεονέκτημα επιβίωσης στα κακοήθη βλαστικά κύτταρα. Συγκεκριμένα, η οδός NF-κB επάγεται ως απόκριση σε ερεθίσματα από φλεγμονώδεις κυτταροκίνες ή βλάβες του DNA και επιφέρει την έκφραση παραγόντων με αντι-αποπτωτική και πολλαπλασιαστική λειτουργία. Η δραστηριότητα του NF-κB έχει βρεθεί αυξημένη σε βλαστικά κύτταρα και κυτταρικές σειρές από τον μυελό των οστών ασθενών με ΜΔΣ και σχετίζεται με την εξέλιξη του συνδρόμου. Κατά συνέπεια, η υπερλειτουργία του NF-κB στα ΜΔΣ προκαλεί **απορρύθμιση της αιμοποίησης**, καθώς πυροδοτεί υπέρμετρη διαφοροποίηση και πολλαπλασιασμό στα προγονικά αιμοποιητικά κύτταρα, και περαιτέρω **ενίσχυση της φλεγμονής** στο μικροπεριβάλλον του μυελού των οστών, μέσω της επαγωγής της έκκρισης φλεγμονωδών κυτταροκινών.

➤ **Κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος:**

Τα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος διαδραματίζουν εξίσου σημαντικό ρόλο στην παθογένεια των ΜΔΣ. Γενικά, είναι αποδεδειγμένο ότι στα **ΜΔΣ χαμηλού κινδύνου**, παρά τη λεμφοπενία, το ανοσοποιητικό σύστημα υπερλειτουργεί και χαρακτηρίζεται από αυξημένο αριθμό T-κυτταροτοξικών κυττάρων (Tc) και μειωμένο αριθμό T-ρυθμιστικών κυττάρων (Tregs). Αντίθετα, στα **ΜΔΣ υψηλού κινδύνου** παρατηρείται χαμηλός αριθμός Tc και NK κυττάρων και υψηλότερος αριθμός Tregs, γεγονός που ευνοεί την κακοήθη επέκταση των δυσπλαστικών βλαστικών κυττάρων.

✚ **T-κυτταροτοξικά κύτταρα (Tc):** Σύμφωνα με in vitro μελέτες, τα Tc κύτταρα έχουν τη δυνατότητα να καταστέλλουν τόσο τη κακοήθη όσο και τη φυσιολογική αιμοποίηση και να επάγουν την απόπτωση των κυττάρων του μυελού των οστών, κατά την ενεργοποίησή τους. Τα κακοήθη βλαστικά κύτταρα του μυελού των οστών με ΜΔΣ έχει βρεθεί ότι εκφράζουν επιτόπους, εκ των οποίων η πρωτεΐνη του όγκου Wilms 1 (WT1), η πρωτεΐνωση 3, το σύμπλεγμα ιστοσυμβατότητας τάξης I (MHC-I) και τα καρκινικά αντιγόνα του όρχεως (CTA), οι οποίοι ενεργοποιούν τα Tc κύτταρα, με συνέπεια την επέκτασή τους, την καταστολή της αιμοποίησης και την επαγωγή ενδομυελικής απόπτωσης. Αντίθετα, στα ΜΔΣ υψηλού κινδύνου, τα κακοήθη βλαστικά κύτταρα έχουν αναπτύξει μηχανισμούς διαφυγής από την ειδική ανοσολογική απόκριση, πιθανόν μέσω της έκφρασης μορίων «ανοσολογικών σημείων ελέγχου», όπως η πρωτεΐνη προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου (**PD-1**), τα οποία καταστέλλουν την ενεργοποίηση και δραστηριότητα των Tc κυττάρων και κατ' επέκταση την αντικαρκινική άμυνα. Π.χ τα Tc κύτταρα, στο μυελό των οστών

ασθενών με ΜΔΣ, εκκρίνουν προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες, όπως ο TNF-α και η IFN-γ, οι οποίες επάγουν την έκφραση, αφενός του υποδοχέα **PD-1 στα Τ κύτταρα** και αφετέρου του αντίστοιχου συνδέτη του **PD-L1 στα κακόηθη βλαστικά κύτταρα**, προάγοντας έτσι την απόπτωση των Τ-κυττάρων, για την αποφυγή της αντικαρκινικής ανοσολογικής απόκρισης. Αυτός ο μηχανισμός ανοσοκαταστολής επιβεβαιώνεται, επίσης, από την αυξημένη έκφραση του μορίου PD-L1 στα βλαστικά κύτταρα ασθενών με ΜΔΣ υψηλού κινδύνου.

✚ **T-ρυθμιστικά κύτταρα (Tregs):** Τα Tregs αποτελούν υποκατηγορία των T_H κυττάρων, τα οποία ελαττώνουν την ένταση της ανοσολογικής απόκρισης και είναι βασικοί ρυθμιστές της ανοσολογικής ανοχής. Η μείωση του αριθμού ή της λειτουργίας τους έχει συσχετιστεί με την ανάπτυξη αυτοάνοσων νοσημάτων, ενώ η αύξηση τους ευνοεί την καρκινογένεση, λόγω της εξασθένησης της ανοσολογικής απόκρισης έναντι των καρκινικών κυττάρων. Τα Tregs έχουν ενεργό ρόλο στην παθογένεια των ΜΔΣ κι αποτελούν προγνωστικό παράγοντα για τα ΜΔΣ χαμηλού κινδύνου, τη σοβαρότητα της αναιμίας και την εξέλιξη σε ΟΜΛ. Πιο συγκεκριμένα, σύμφωνα με πρόσφατες μελέτες, παρατηρήθηκε ελάττωση του αριθμού και της δραστηριότητας των Tregs σε ασθενείς με ΜΔΣ χαμηλού κινδύνου, σε αντίθεση με τα ΜΔΣ υψηλού κινδύνου όπου βρέθηκε αύξηση του αριθμού και της λειτουργίας τους, σε συνδυασμό με ενισχυμένο πολλαπλασιασμό των λευχαιμικών κλώνων.

✚ **Άλλα κύτταρα του ανοσοποιητικού και του μυελικού μικροπεριβάλλοντος:** Επιπρόσθετα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος, τα οποία συντελούν στη διαφυγή των κακόηθων βλαστικών κυττάρων του ΜΔΣ από την ανοσολογική επιτήρηση, αποτελούν τα **NK κύτταρα**. Σύμφωνα με πρόσφατες έρευνες, τα NK κύτταρα παρουσίασαν μείωση του αριθμού και της λειτουργίας τους στο περιφερικό αίμα των ασθενών με ΜΔΣ, εύρημα που υποδηλώνει δυσμενή πρόγνωση για την εξέλιξη της νόσου. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζουν, επίσης, και τα μεσεγχυματικά στρωματικά κύτταρα (**MSCs**) του μυελού των οστών στην παθογένεια των ΜΔΣ, καθώς βρέθηκαν σημαντικές αποκλίσεις στις ανοσορυθμιστικές τους λειτουργίες, μεταξύ των ασθενών με ΜΔΣ χαμηλού κινδύνου και αυτών με ΜΔΣ υψηλού κινδύνου. Στα ΜΔΣ χαμηλού κινδύνου, τα MSCs εμφάνισαν ελαττωμένη δυνατότητα αναστολής της διαφοροποίησης και ωρίμανσης των δενδριτικών κυττάρων, ενώ στα ΜΔΣ υψηλού κινδύνου τα MSCs παρουσίασαν αυξημένη παραγωγή του TGF-β, επαγωγή των Tregs, απόπτωση και ανοσοκατασταλτικές ιδιότητες. Τέλος, τα **MDSCs** (myeloid-derived suppressor cells) φαίνεται να συνεισφέρουν σημαντικά στην παθογένεση των ΜΔΣ και την αναποτελεσματική αιμοποίηση. Τα MDSCs είναι ανοσοκατασταλτικά κύτταρα του μυελού των οστών, τα οποία εκφράζουν τον ανοσοϋποδοχέα CD33. Αποτελούν διακριτό επεκτεινόμενο κλώνο κυττάρων, ο οποίος υπερεκκρίνει κατασταλτικές κυτταροκίνες της αιμοποίησης και δρα ως ισχυρός αποπτωτικός παράγοντας,

στοχεύοντας αυτόλογα προγονικά αιμοποιητικά κύτταρα. Σε ασθενείς με ΜΔΣ έχει βρεθεί ότι μειώνουν τον πολλαπλασιασμό και τη δραστηριότητα των Τ κυττάρων. Ακόμα, προάγουν την έκκριση των κατασταλτικών κυτταροκινών IL-10 και TGF- β από τα ανώριμα μυελοειδή κύτταρα, μέσω της σύνδεσης του υποδοχέα τους CD33 με το προφλεγμονώδες μόριο S100A9. [49]

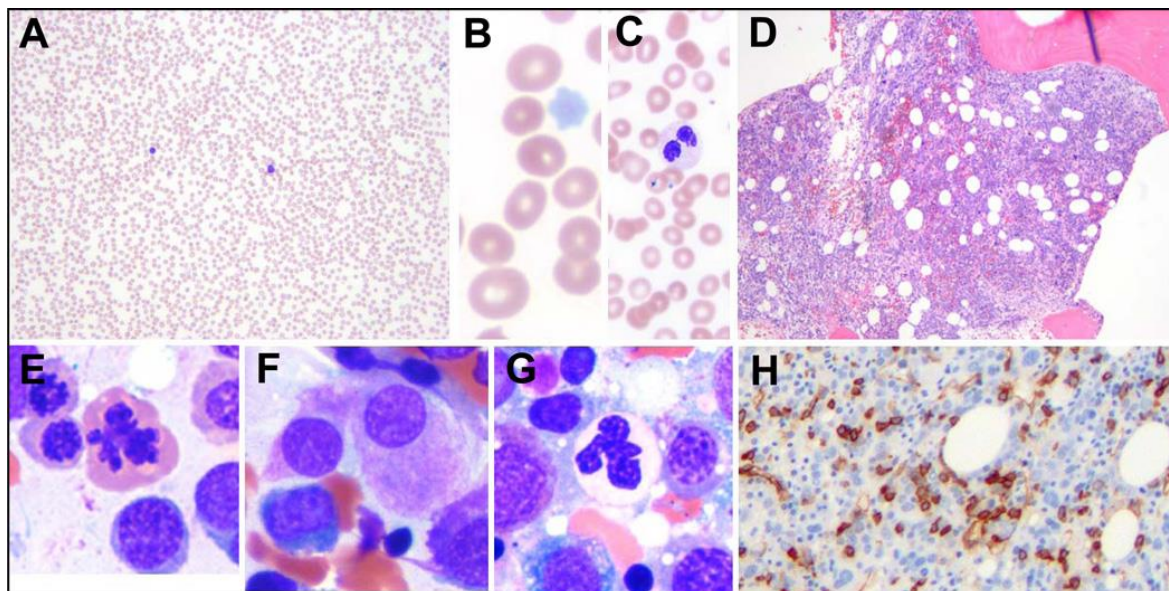
1.2.4 Διάγνωση

Η διαγνωστική προσέγγιση των Μυελοδυσπλαστικών Συνδρόμων έχει οριστεί από τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας και αναθεωρήθηκε τον Αύγουστο του 2016. Περιλαμβάνει 6 διακριτές οντότητες ΜΔΣ, με εξαίρεση μια ανεπίσημη οντότητα που αφορά την παιδική ηλικία. Συνήθως, η διάγνωση στηρίζεται στη **μορφολογική, ποιοτικά και ποσοτικά, αξιολόγηση του περιφερικού αίματος και του μυελού των οστών**, με τη χρήση βασικών αιματολογικών τεχνικών. Επιπρόσθετες προσεγγίσεις με υψηλή διαγνωστική αξία για τα ΜΔΣ αποτελούν η **βιοψία μυελού των οστών** και η **κυτταρομετρική ανοσοφαινοτύπιση**. Επιπλέον, οι μέθοδοι της **μοριακής γενετικής** και **κυτταρογενετικής** είναι απαραίτητες για την πρόγνωση και την επιλογή της κατάλληλης θεραπευτικής στρατηγικής. Ωστόσο, η μεγάλη ετερογένεια στην κλινική εικόνα των ασθενών με ΜΔΣ, ιδίως σε αυτούς με ΜΔΣ χαμηλού κινδύνου, απαιτεί την απόκλιση παθολογικών καταστάσεων, οι οποίες προκαλούν κυτταροπενία και πιθανόν να συγχέονται κλινικά με τα ΜΔΣ. Παραδείγματα τέτοιων καταστάσεων είναι οι κυτταροπενίες που προκαλούνται από διάφορα φάρμακα, η ανεπάρκεια βιταμίνης B12, φυλλικού οξέος, ψευδαργύρου ή χαλκού, η υπερβολική κατανάλωση αλκοόλ, η έκθεση σε βαρέα μέταλλα όπως ο μόλυβδος και το αρσενικό, διάφορες λοιμώξεις (HIV, ιός Epstein-Barr, ιός ηπατίτιδας C, παρβοϊός, λεισμανίαση), η αυτοάνοση κυτταροπενία, η αιμοφαγοκυτταρική λεμφοϊστικοκυττάρωση, η χρόνια αναιμία λόγω λοίμωξης, φλεγμονής ή καρκίνου και μεταβολικές διαταραχές, όπως η ηπατική και νεφρική ανεπάρκεια. Παράλληλα, σύμφωνα με την ταξινόμηση του ΠΟΥ το 2001, έχουν ταυτοποιηθεί ομάδες αιμοποιητικών κακοηθειών με δυσπλασία, οι οποίες δεν εντάσσονται στην κατηγορία των ΜΔΣ, συμπεριλαμβανομένων των μικτού τύπου Μυελοδυσπλαστικών-Μυελοϋπερπλαστικών Συνδρόμων, της οξείας μυελογενούς λευχαιμίας με δυσπλαστικές ή μυελοδυσπλαστικές αλλοιώσεις, και της ΟΜΛ/ΜΔΣ σχετιζόμενων με τη θεραπεία. Αξίζει, ακόμα, να σημειωθεί ότι στο μυελό των οστών υγιών ατόμων μπορεί να βρεθεί ένας μικρός αριθμός ερυθροειδών κυττάρων, κοκκιοκυττάρων ή μεγακαρυοκυττάρων, με δυσπλασία. Συνολικά, οι διαγνωστικές προσεγγίσεις για τα ΜΔΣ περιλαμβάνουν:

- α. τη **λήψη περιφερικού αίματος και δείγματος μυελού των οστών**, για την αξιολόγηση της κυτταρικής τους σύνθεσης και την ανίχνευση τυχόν κυτταροπενιών,

- β. τον ποιοτικό και ποσοτικό προσδιορισμό της μορφολογικής δυσπλασίας στα κύτταρα του περιφερικού αίματος,
- γ. τη μέτρηση και ταυτοποίηση βλαστικών κυττάρων στο περιφερικό αίμα και το μυελό των οστών,
- δ. την εκτίμηση της κυτταροβρίθειας του μυελού,
- ε. τη βιοψία μυελού των οστών, για τη συνολική ιστολογική εκτίμηση,
- στ. τη κυτταρομετρία ροής, για την ανοσοφαινοτύπωση των βλαστών,
- ζ. καθώς και τεχνικές Γενετικής και
- η. Μοριακής Γενετικής, για την ανίχνευση χρωμοσωμικών και μοριακών ανωμαλιών.

➤ **Αξιολόγηση κυτταρικής σύστασης περιφερικού αίματος και μυελού:** Με την εφαρμογή βασικών αιματολογικών τεχνικών σε δείγματα περιφερικού αίματος και μυελού, όπως η **αιμοκυτταρομετρία**, η **οπτική μικροσκόπηση** και η **κυτταροχημεία** για την ανίχνευση του σιδήρου, είναι δυνατή η αξιολόγηση της κυτταρικής σύστασης του περιφερικού αίματος και του μυελού, καθώς και η ανίχνευση τυχόν κυτταροπενιών (Εικόνα 15). Απαραίτητη προϋπόθεση για τη διάγνωση των ΜΔΣ, αποτελεί ο εντοπισμός **κυτταροπενίας σε τουλάχιστον μία κυτταρική σειρά**. Τα όρια των τιμών για τον ορισμό της κυτταροπενίας είναι τα εξής: αιμοσφαιρίνη <10 g/dL, αιμοπετάλια <100×10⁹/L, απόλυτος αριθμός ουδετερόφιλων (ANC) <1,8×10⁹/L, μονοκύτταρα περιφερικού αίματος <1×10⁹/L. Η κυτταροπενία θα πρέπει να είναι σταθερή για διάστημα μεγαλύτερο ή ίσο των 6 μηνών, ώστε να θεωρηθεί ΜΔΣ, με εξαίρεση περιπτώσεις όπου μπορεί να συνυπάρχει με συγκεκριμένο καρυότυπο ή να εντοπίζεται κυτταροπενία σε δύο κυτταρικές σειρές, στις οποίες απαιτούνται 2 μήνες σταθερής κυτταροπενίας. Δεδομένου ότι ορισμένες εθνικές ομάδες ενδέχεται να έχουν ANC <1,8×10⁹/L, η ερμηνεία της ουδετεροπενίας χρειάζεται να είναι προσεκτική, εφόσον είναι η μοναδική ανιχνεύσιμη κυτταροπενία. [36]

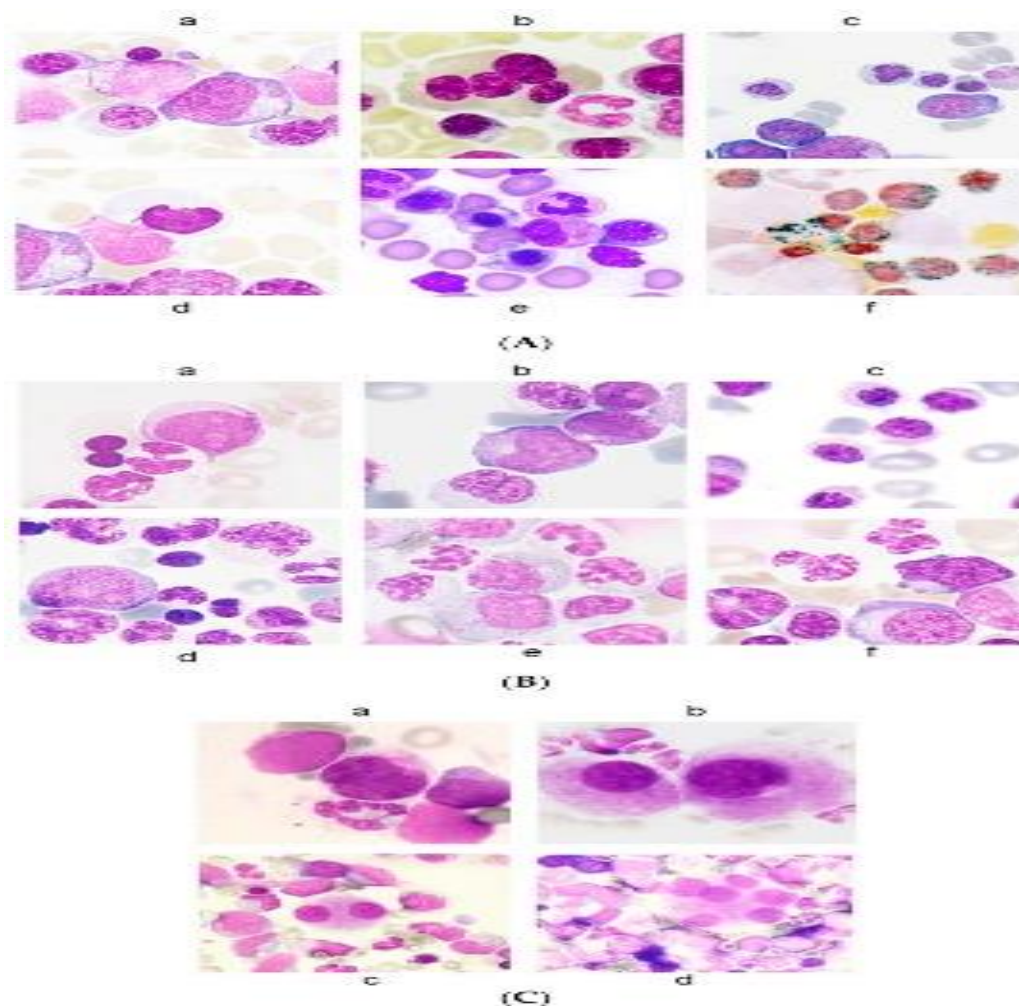


Εικόνα 15- Οπτική μικροσκόπηση επιχρίσματος από περιφερικό αίμα και μυελό των οστών μιας τυπικής περίπτωσης μυελοδυσπλαστικού συνδρόμου. Πηγή: [13] Οι εικόνες A, B, C αφορούν περιφερικό επίχρισμα, το οποίο αποκαλύπτει σοβαρή πανκυτταροπενία (A), με μακροκυτταρική αναιμία (B), ουδετεροπενία με δυσπλαστικά ουδετερόφιλα και θρομβοπενία με ωχρά αιμοπετάλια (C). Το επίχρισμα μυελού των οστών αποκαλύπτει αυξημένη κυτταροβρίθεια (D), δυσπλασία στην ερυθροειδή (E), μεγακαρυοκυτταρική (F) και κοκκιοκυτταρική σειρά (G), με αυξημένους βλάστες, οι οποίοι μερικές φορές ανιχνεύονται ως CD34+ με ανοσοχρωματισμό (H).

➤ **Προσδιορισμός μορφολογικής δυσπλασίας στα κύτταρα του περιφερικού αίματος και του μυελού:** Η αναποτελεσματική αιμοποίηση που λαμβάνει χώρα στα ΜΔΣ έχει ως αποτέλεσμα το σχηματισμό κυτάρων με ποικίλες μορφολογικές διαταραχές, οι οποίες ανιχνεύονται με την μικροσκόπηση δείγματος από το περιφερικό αίμα ή το μυελό των ασθενών κι έχουν σημαντική αξία για τη διάγνωση. Συγκεκριμένα, οι μορφολογικές ανωμαλίες στην **κοκκιοκυτταρική και μεγακαρυοκυτταρική** σειρά είναι πιο ειδικές για τη διάγνωση των ΜΔΣ, σε αντίθεση με αυτές της ερυθροκυτταρικής σειράς, καθώς η δυσερυθροποίηση αποτελεί εύρημα πολλαπλών αιματολογικών και μη διαταραχών. Ωστόσο, μεμονωμένα τα μορφολογικά ευρήματα δεν είναι αρκετά για την ακριβή και αξιόπιστη διάγνωση και συχνά χρησιμεύουν στον αποκλεισμό άλλων παθολογικών καταστάσεων. Για τον ορισμό μιας κυτταρικής σειράς του μυελού των οστών ως «δυσπλαστική» είναι αναγκαίο να ανευρίσκονται μορφολογικές ανωμαλίες σε συγκεκριμένα ποσοστά των κυττάρων κάθε σειράς. Έτσι, η δυσπλασία ορίζεται όταν τα δυσπλαστικά χαρακτηριστικά εντοπίζονται σε τουλάχιστον 10% των ερυθροειδών προγόνων – χωρίς να περιλαμβάνονται τα ώριμα ερυθροκύτταρα- ή/ και στο 10% των κοκκιοκυττάρων –σε αυτή την περίπτωση λαμβάνοντας υπόψιν και τα ώριμα κύτταρα- από έναν αριθμό τουλάχιστον 200 κυττάρων κάθε σειράς, ή/και στο 10% των μεγακαρυοκυττάρων από 30 κύτταρα της μεγακαρυοκυτταρικής σειράς. Όσον αφορά τις μορφολογικές δυσπλασίες της **κοκκιοκυτταρικής σειράς** στα ΜΔΣ, χαρακτηριστικό εύρημα αποτελεί η ελλιπής κοκκίωση του κυτταροπλάσματος, η οποία εκτιμάται καλύτερα με την αντίδραση της υπεροξειδάσης ή με τη χρώση

Sudan black. Σύμφωνα με την πρόταση του IWGM-MDS (International Working Group on Morphology of MDS), τα ουδετερόφιλα χαρακτηρίζονται δυσπλαστικά εφόσον διαθέτουν ένα από τα εξής μορφολογικά γνωρίσματα: α) μείωση του περιεχομένου των κοκκίων τους κατά τα 2/3, β) ανωμαλία ψεύδο-Pelger του πυρήνα, γ) μη-Pelger διαταραχές πυρηνικής κατάτμησης, δ) παρουσία μακροπολυκυττάρων, ε) ανώμαλη συσσώρευση χρωματίνης, στ) περισσότερες από 4 πυρηνικές προεξοχές. Όσον αφορά τη **μεγακαρυοκυτταρική** σειρά, τα δύσμορφα μεγακαρυοκύτταρα μπορεί να εμφανίζονται με μεσαίο μέγεθος κι έναν ωοειδή έκκεντρο πυρήνα, μορφολογία χαρακτηριστική για το σύνδρομο 5q-, ή με 2 πυρήνες, παρεμφερούς ή διαφορετικού μεγέθους, κοντά ο ένας στον άλλο. Ακόμα, μπορεί να ανευρίσκονται ως ώριμα μεγακαρυοκύτταρα με πολλαπλούς μικρούς στρογγυλούς διακριτούς πυρήνες. Ωστόσο, ειδικό γνώρισμα της δυσμεγακαρυοποίησης, αποτελεί η παρουσία των μικρομεγακαρυοκυττάρων, τα οποία συνιστούν μεγακαρυοκύτταρα με περίπου ίσο μέγεθος με τα περιβάλλοντα μυελοειδή κύτταρα κι ελάχιστο κοκκιώδες κυτταρόπλασμα. [36,50] Ακόμα, στη μικροσκοπική εξέταση του περιφερικού αίματος ασθενών με ΜΔΣ, εντοπίζονται πολύ συχνά μορφολογικές ανωμαλίες στην **ερυθροκυτταρική σειρά**. Σε αυτή την περίπτωση, ιδιαίτερο χαρακτηριστικό είναι η ανίχνευση δύο πληθυσμών ερυθροκυττάρων, από τους οποίους ο ένας είναι συνήθως φυσιολογικός, ενώ ο άλλος αποτελεί τον ανώμαλο νεοπλασματικό κλώνο, που χαρακτηρίζεται από μακροκυττάρωση ή μικροκυττάρωση. [36] Επίσης, στην ερυθροκυτταρική σειρά μπορεί να παρατηρηθούν μεγαλοβλαστικές αλλαγές, πολυπυρηνικότητα στα προγονικά ερυθροειδή κύτταρα, πυρηνική λοβοποίηση, συμπίκνωση της χρωματίνης στον πυρήνα, κυτταροπλασματική φθορά που περιλαμβάνει και το 50% της κυτταρικής μεμβράνης, διαπυρηνικές γεφυρώσεις, καθώς και παρουσία κενοτοπίων στο κυτταρόπλασμα και περιπυρηνικών δακτυλιοειδών σιδηροβλαστών. [51] Ωστόσο, τα παραπάνω δυσπλαστικά μορφολογικά στοιχεία, εκτός από τους δακτυλιοειδείς σιδηροβλάστες, ανευρίσκονται σε πολλαπλές αιματολογικές και μη διαταραχές, επομένως η διάγνωση των ΜΔΣ δεν μπορεί να κριθεί μόνο από αυτά. Οι **δακτυλιοειδείς σιδηροβλάστες** αποτελούν βασικό γνώρισμα της δυσερυθροποίησης στα ΜΔΣ. Ειδικότερα, ορίζονται ως παθολογικοί ερυθροβλάστες, οι οποίοι φέρουν τουλάχιστον 5 κοκκία σιδήρου, που περιβάλλουν τουλάχιστον το 1/3 της περιφέρειας του πυρήνα, λόγω υπερφόρτωσης των μιτοχονδρίων με σίδηρο. Για την ανίχνευση τους απαιτείται η χρώση Perls σε επιχρίσματα μυελού των οστών. Οι δακτυλιοειδείς σιδηροβλάστες είναι απαραίτητο να διακρίνονται από τους **σιδηροβλάστες φερριτίνης**, οι οποίοι βάφονται εξίσου από τη χρώση Perls. Πρόκειται για φυσιολογικούς ερυθροβλάστες, με λίγα μπλε κοκκία σιδήρου, διάσπαρτα στο κυτταρόπλασμα. Τα κοκκία αυτά συνιστούν λυσοσώματα ή ενδοσώματα, στα οποία έχει αποθηκευτεί η περίσσεια σιδήρου που

δεν χρησιμοποιήθηκε για την παραγωγή της αίμης. Συνεπώς, ο σίδηρος των σιδηροβλαστών φερριτίνης αποθηκεύεται στη κυτοσολική φερριτίνη, ενώ ο σίδηρος των δακτυλιοειδών σιδηροβλαστών στη μιτοχονδριακή φερριτίνη (Εικόνα 14).[50,52]



Εικόνα 16- Τα δυσπλαστικά μορφολογικά χαρακτηριστικά της ερυθροκυτταρικής, κοκκιοκυτταρικής και μεγακαρυοκυτταρικής σειράς στα ΜΔΣ. Πηγή: [14] (A) Απεικονίζεται η δυσπλασία της **ερυθροκυτταρικής σειράς** με τους **a)** μεγαλοβλάστες, **b)** την πολυπυρηνικότητα, **c)** την πυρηνική λοβοποίηση, **d)** την πύκνωση, **e)** την ελαττωματική σύνθεση αιμοσφαιρίνης και την κυτταροπλασματική φθορά, καθώς και τους **f)** δακτυλιοειδείς σιδηροβλάστες. **(B)** Απεικονίζεται η δυσπλασία της **κοκκιοκυτταρικής σειράς** με **a)** τους μυελοβλάστες, **b)** τα ραβδία Auer, **c)** την υπολοβίωση, **d,e)** τους πυρήνες με ανώμαλο σχήμα και την **f)** υποκοκκιοποίηση. **(C)** Απεικονίζεται η δυσπλασία της **μεγακαρυοκυτταρικής σειράς** με **a)** τα μικρομεγακαρυοκύτταρα, **b)** τα μονοπύρνα μεγακαρυοκύτταρα, **c)** τα μικρά διπύρνα μεγακαρυοκύτταρα και **d)** τα μεγακαρυοκύτταρα με πολλούς διακριτούς πυρήνες.

➤ **Μέτρηση και ταυτοποίηση βλαστών:** Η ταυτοποίηση των βλαστών έχει σημαντική προγνωστική και διαγνωστική αξία για τα ΜΔΣ. Ως βλάστες στα ΜΔΣ ορίζονται οι μυελοβλάστες, οι μονοβλάστες, τα προμονοκύτταρα και οι μεγακαρυοβλάστες. Οι προερυθροβλάστες και τα δυσπλαστικά μεγακαρυοκύτταρα δεν πρέπει να συμπεριλαμβάνονται στην ομάδα των βλαστών, με εξαίρεση τις περιπτώσεις οξείας ερυθρολευχαιμίας. Η προέλευση των βλαστών μπορεί να

εκτιμηθεί μέσω κυτταροχημείας, ανοσοκυτταροχημείας ή κυτταρομετρίας ροής. Οι βλάστες έχουν μεταβλητό μέγεθος κι αριθμό πυρήνων, οι οποίοι μπορεί να έχουν ωοειδές ή ακανόνιστο σχήμα, χαλαρό μοτίβο χρωματίνης, βασεόφιλο κυτταρόπλασμα, ενώ υπολείπονται εμφανούς ζώνης Golgi. Χωρίζονται σε δύο κατηγορίες, τους κοκκιώδεις και μη κοκκιώδεις βλάστες και δύναται να περιέχουν ραβδία Auer, η παρουσία των οποίων θέτει αυτόματα τη διάγνωση του MDS-RAEB-2 και σχετίζεται με δυσμενή πρόγνωση. Η απουσία σαφούς περιοχής Golgi αποτελεί κύριο μορφολογικό γνώρισμα για τη διαφοροποίηση των κοκκιωδών βλαστών από τα φυσιολογικά ή δυσπλαστικά προμυελοκύτταρα. Τα φυσιολογικά προμυελοκύτταρα χαρακτηρίζονται από μια εμφανώς αναγνωρίσιμη περιοχή Golgi, ενώ τα δυσπλαστικά εμφανίζονται συχνά με υπερκοκκίωση ή υποκοκκίωση και λιγότερο εμφανή ζώνη Golgi. Επίσης, οι μυελοβλάστες με έντονα βασεόφιλο κυτταρόπλασμα συχνά συγχέονται με προγονικά ερυθροειδή κύτταρα, παρότι έχουν συμπυκνωμένη χρωματίνη και είναι μεγαλύτεροι από τους μυελοβλάστες στα αρχικά στάδια. Το όριο των βλαστικών κυττάρων για τη διάγνωση των ΜΔΣ είναι <20% για το περιφερικό αίμα και τον μυελό των οστών, ύστερα από εξέταση 200 εμπύρηνων κυττάρων στο περιφερικό αίμα 500 εμπύρηνων κυττάρων στο μυελόγραμμα. [36,50]

➤ **Κυτταροβρίθεια μυελού των οστών:** Κατά τη διάγνωση των ΜΔΣ, η κυτταρικότητα του μυελού των οστών των ασθενών συνήθως ανευρίσκεται αυξημένη, με υπερπλασία της ερυθροκυτταρικής ή κοκκιοκυτταρικής σειράς ή και των δύο. Ένα ποσοστό 30 με 40% των ασθενών εμφανίζει ποσοτικά φυσιολογική κυτταρικότητα, ενώ το 10% περίπου παρουσιάζει μειωμένη κυτταρικότητα. Σε αυτές τις περιπτώσεις κρίνεται αναγκαία η εφαρμογή άλλων διαγνωστικών μεθόδων, όπως η κυτταρογενετική και η ιστολογική ανάλυση και η ανοσοϊστοχημεία, για τη διάκριση των ΜΔΣ από άλλες υποπλαστικές μυελοειδείς διαταραχές. Συχνά, επίσης, κατά τη διάγνωση εντοπίζονται μη ειδικές μεταβολές στην κυτταρικότητα του μυελού, όπως η αύξηση των λεμφοκυττάρων, των πλασματοκυττάρων, των μαστοκυττάρων ή των φορτωμένων με αιμοσιδηρίνη μακροφάγων, με μερική αιμοφαγοκυττάρωση στο μυελό των οστών.

➤ **Ιστολογική εκτίμηση μυελού:** Η βιοψία του μυελού των οστών είναι απαραίτητη για τη διαφοροποίηση των ΜΔΣ από την αντιδραστική και δευτεροπαθή μυελοδυσπλασία. Ειδικότερα, με τη βιοψία μπορεί να αξιολογηθεί η κυτταρικότητα και η αρχιτεκτονική του μυελού, η κατανομή και ο εντοπισμός διαφόρων κυτταρικών συστατικών εντός του μυελού, ο βαθμός ίνωσης, ο εντοπισμός πρόδρομων κοκκιοκυττάρων σε θέσεις που δεν ανευρίσκονται φυσιολογικά, μεταξύ των οποίων οι μεσοδοκιδωτές περιοχές ή/και οι κεντρικές ζώνες του αιμοποιητικού ιστού, καθώς και η παρουσία συστάδων μεγακαρυοκυττάρων και μικρομεγακαρυοκυττάρων. Επιπλέον, με τη χρήση της ανοσοϊστοχημείας, και συγκεκριμένα του αντισώματος αντι-CD34, μπορεί να ανιχνευθεί η παθολογική συσσώρευση βλαστών, παρότι

σύμφωνα με την ταξινόμηση του ΠΟΥ, οι βλάστες στα ΜΔΣ δεν είναι πάντα θετικοί στο CD34 και η θετικότητα σε αυτόν το δείκτη μπορεί να αποτελεί γνώρισμα των ενδοθηλιακών κυττάρων. Τέλος, με τη βιοψία μπορεί να ανιχνευθούν λεμφοειδή οζίδια, η παρουσία των οποίων υποδηλώνει συνυπάρχουσα λεμφοπολλαπλασιαστική διαταραχή.

➤ **Κυτταρομετρία ροής:** Η κυτταρομετρία ροής δε έχει υψηλή διαγνωστική αξία για τα ΜΔΣ, ωστόσο μπορεί να είναι αρκετά χρήσιμη για τη διερεύνηση των στοιχείων ωρίμανσης των πρόδρομων κυττάρων, με σκοπό την ανίχνευση μη φυσιολογικών ανοσοφαινοτυπικών δεικτών, ως πιθανούς δείκτες δυσπλασίας μιας συγκεκριμένης κυτταρικής σειράς. Επίσης, μπορεί να εφαρμοστεί για τον προσδιορισμό του πληθυσμού των βλαστών, με σκοπό την εύρεση πιθανών εναπομείναντων παθολογικών χαρακτηριστικών, μετά τη θεραπεία. Ωστόσο, η εφαρμογή της δεν ενδείκνυται για τον ακριβή υπολογισμό του ποσοστού των βλαστών, για τον οποίο μέθοδος αναφοράς είναι η μικροσκοπική εξέταση μυελικού επιχρίσματος, σύμφωνα με την ταξινόμηση του ΠΟΥ του 2016.

➤ **Γενετική ανάλυση:** Η χρωμοσωμική μελέτη μέσω του καρυότυπου είναι ύψιστης σημασίας για την προγνωστική κατηγοριοποίηση των ασθενών με de novo ΜΔΣ, δεδομένου ότι το 90% των ασθενών παρουσιάζει μοριακές ή γενετικές βλάβες. Εκτός από τον καρυότυπο, εφαρμόζονται επιπρόσθετες νέες διαγνωστικές μέθοδοι για την ανίχνευση των γενετικών ανωμαλιών, εκ των οποίων η NGS (next-generation sequencing), η GEP (gene expression profiling) και η SNP-array (single nucleotide polymorphism). Ορισμένες κυτταρογενετικές ανωμαλίες συνδέονται με συγκεκριμένες μορφολογικές διαταραχές της ερυθροκυτταρικής και κοκκιοκυτταρικής σειράς. Π.χ η διαγραφή του χρωμοσώματος 5q, μια αρκετά συνηθισμένη κυτταρογενετική ανωμαλία των ΜΔΣ, ανιχνεύεται κυρίως στις γυναίκες και σχετίζεται με υποκατατετμημένα και μη μεγακαρυοκύτταρα, μακροκυτταρική αναιμία, φυσιολογικό ή αυξημένο αριθμό αιμοπεταλίων και καλή πρόγνωση. Πολλαπλές κυτταρογενετικές ανωμαλίες, ισορροπημένες και μη ισορροπημένες, μπορούν να θέσουν τη διάγνωση των ΜΔΣ, ακόμα και απουσία μορφολογικών διαταραχών. Η παρουσία μίας ή περισσότερων από τις εξής μη ισορροπημένες χρωμοσωμικές ανωμαλίες οδηγεί στη διάγνωση των ΜΔΣ: η μονοσωμία 5, 7 ή 13, η διαγραφή 5q, 7q, και 13q, i(7p) και t(17p), η διαγραφή 11q, η διαγραφή 9q ή 12p διαγραφή ή t(12p), idix(X)(q13). Ακόμα, η παρουσία τρισωμίας 8, η διαγραφή του Y χρωμοσώματος, ή η διαγραφή 20q συναντώνται στα ΜΔΣ, αλλά απαιτείται η συνύπαρξη των διαγνωστικών μορφολογικών τους γνωρισμάτων, για τη διάγνωση. Τέλος, στα ΜΔΣ παρατηρείται συχνά περίπλοκος καρυότυπος, με τρεις ή περισσότερες χρωμοσωμικές διαταραχές, συμπεριλαμβανομένων συνήθως των ανωμαλιών του χρωμοσώματος 7 ή/και 5, ο οποίος σχετίζεται με δυσμενή πρόγνωση.

➤ **Μοριακή Διαγνωστική:** Στα ΜΔΣ εντοπίζεται μια πληθώρα σωματικών μεταλλάξεων, όπως προαναφέρθηκε και σε προηγούμενες υποενότητες, ωστόσο η παρουσία μεταλλάξεων δε μπορεί μεμονωμένα να θέσει τη διάγνωση των ΜΔΣ. Η μοναδική μετάλλαξη που εξετάζεται μέσω γονιδιακής ανάλυσης στο διαγνωστικό πρωτόκολλο των ΜΔΣ, σύμφωνα με την ταξινόμηση του ΠΟΥ του 2016, είναι η μετάλλαξη στο γονίδιο SF3B1, το οποίο εμπλέκεται στη συρραφή του RNA, διότι σχετίζεται με τον υπότυπο MDS-RS. Συγκεκριμένα, οι ασθενείς με MDS-RS, που φέρουν μεταλλάξεις στο γονίδιο SF3B1, έχουν πιο ευνοϊκή πρόγνωση, σε σχέση με τους ασθενείς MDS-RS που δεν παρουσιάζουν μεταλλάξεις σε αυτό το γονίδιο. [36]

1.2.5 Θεραπεία

Η θεραπεία των ΜΔΣ βασίζεται στο συνδυασμό πολλαπλών διαφορετικών θεραπευτικών προσεγγίσεων, ανάλογα με το στάδιο της νόσου του ασθενή, το οποίο ορίζεται από την ταξινόμηση του IPSS (International Prognostic Scoring System). Το σύστημα IPSS περιλαμβάνει 5 ομάδες κινδύνου, ανάλογα με τη σοβαρότητα των κυτταροπενιών, το ποσοστό των βλαστών στο μυελό και την παρουσία κυτταρογενετικών ανωμαλιών: τα ΜΔΣ πολύ χαμηλού, χαμηλού, ενδιάμεσου, υψηλού και πολύ υψηλού κινδύνου. Οι πρώτες τρεις ομάδες αναφέρονται ως **ΜΔΣ χαμηλότερου κινδύνου**, ενώ οι δύο τελευταίες ως **ΜΔΣ υψηλότερου κινδύνου**, αν και στους ασθενείς ενδιάμεσου κινδύνου απαιτείται η αυστηρή παρακολούθηση της πορείας της νόσου και των πιθανών ενδείξεων για αλλογενή μεταμόσχευση βλαστοκυττάρων. Οι ασθενείς χαμηλότερου κινδύνου παρουσιάζουν μεγαλύτερη επιβίωση και συχνά πεθαίνουν από διαφορετικά αίτια, συνεπώς η θεραπεία τους αποσκοπεί στη βελτίωση των συνεπειών των κυτταροπενιών και των μεταγγίσεων και της ευρύτερης ποιότητας ζωής. Από την άλλη, στους ασθενείς με ΜΔΣ υψηλότερου κινδύνου είναι αναγκαίο να εφαρμόζεται ισχυρότερη θεραπεία, για την αποτροπή εξέλιξης της νόσου σε οξεία μυελογενή λευχαιμία. [53,54]

➤ **Θεραπεία ΜΔΣ χαμηλότερου κινδύνου:** Η θεραπεία των ΜΔΣ χαμηλότερου κινδύνου είναι υποστηρικτική, στοχεύοντας ουσιαστικά στην ενίσχυση της αιμοποίησης ή την αναστολή παθογενετικών μηχανισμών, οι οποίοι διαταράσσουν τη φυσιολογική εξέλιξη της αιμοποίησης. Μια από τις κυριότερες θεραπευτικές προσεγγίσεις ασθενών με αναιμία αποτελεί η χορήγηση **ερυθροποιητίνης (EPO)**, η οποία προάγει την ερυθροποίηση, συμβάλλοντας έτσι στην αποφυγή των συνεχών τακτικών μεταγγίσεων που επιβαρύνουν τους ασθενείς. Κατά συνέπεια, η EPO παρατείνει το χρονικό διάστημα, κατά το οποίο ο ασθενής δεν εξαρτάται από τη μετάγγιση και κατ' επέκταση βελτιώνει την ποιότητα ζωής του. Παράλληλα, η άμεση εφαρμογή της συγκεκριμένης θεραπείας, κατά την

έναρξη της νόσου, επιφέρει υψηλότερα ποσοστά και διάρκεια ανταπόκρισης. Στο ποσοστό των ασθενών που δεν ανταποκρίνεται μόνο με τη χορήγηση της EPO, χορηγείται επιπλέον ο παράγοντας G-CSF (granulocyte colony-stimulating factor). Επιπρόσθετα, όπως προαναφέρθηκε στην παράγραφο 1.2.3.6, το ανοσοποιητικό σύστημα υπερλειτουργεί στα αρχικά στάδια χαμηλού κινδύνου των ΜΔΣ. Επομένως, η **ανοσοκατασταλτική θεραπεία**, με αντι-θυμοκυτταρική σφαιρίνη και κυκλοσπορίνη μπορεί να είναι ευεργετική, ιδίως για τους νεότερους ασθενείς χαμηλού κινδύνου, οι οποίοι εμφανίζουν ενεργοποιημένη ανοσολογική απόκριση, με πρωταγωνιστές τα ολιγοκλωνικά T κύτταρα, που καταστέλλουν την αιμοποίηση με παρεμφερή μηχανισμό, όπως στην απλαστική αναιμία. Επίσης, η ανοσοκατασταλτική θεραπεία ενδείκνυται για τους ασθενείς με τρισωμία 8, υποπλαστικό μυελό των οστών, καθώς και για ασθενείς θετικούς στο HLA-DR15. Γενικά, η ανοσοκατασταλτική θεραπεία επιφέρει επιβίωση ανεξάρτητη από μεταγγίσεις σε περίπου το 1/3 των ασθενών με ΜΔΣ. Επιπλέον θεραπεία αποτελεί η **λεναλιδομίδη**, η οποία έχει εγκριθεί από την Ευρώπη, για τη χορήγηση της σε ασθενείς χαμηλότερου κινδύνου με ΜΔΣ del(5q), που δεν ανταποκρίνονται στη θεραπεία με παράγοντες διέγερσης της ερυθροποιητίνης. Η λεναλιδομίδη προωθεί την ουβικουΐτινοποίηση και αποικοδόμηση ειδικών μορίων, απαραίτητων για την επιβίωση των κακόηθων κυττάρων. Στους ασθενείς όπου ακολουθείται αυτή η θεραπεία, επιτυγχάνεται ανεξαρτησία από τις μεταγγίσεις σε ποσοστό περίπου 50%, ενώ το 23-57% αυτών παρουσιάζει κυτταρογενετική ανταπόκριση, διάρκειας περίπου 2 ετών. Τέλος, περαιτέρω νέες θεραπευτικές επιλογές για τα ΜΔΣ βρίσκονται υπό μελέτη, όπως η **αναστολή της οδού σηματοδότησης TGF-β**, η δραστηριότητας της οποίας είναι υπεραυξημένη στα προγονικά αιμοποιητικά κύτταρα των ασθενών με ΜΔΣ, οι **ρυθμιστές της συρραφής του RNA** και η **βιταμίνη C**. Πιο συγκεκριμένα, η βιταμίνη C είναι αποδεδειγμένο ότι ρυθμίζει τη φυσιολογική λειτουργία του ενζύμου TET, σε κύτταρα που φέρουν μεταλλάξεις στο αντίστοιχο γονίδιο, το οποίο όπως προαναφέρθηκε στην παράγραφο 1.2.3.4, καταλύει την υπομεθυλίωση του DNA, οδηγώντας σε πιο «χαλαρές» δομές χρωματίνης, που επιτρέπουν την είσοδο της μεταγραφικής συσκευής και την επακόλουθη γονιδιακή έκφραση. Στα ΜΔΣ παρατηρούνται μεταλλάξεις που οδηγούν σε απώλεια λειτουργίας του TET-2, σε ποσοστό περίπου 30% των ασθενών, με συνέπεια διαταραχές στην αιμοποίηση και εξέλιξη της κλωνικής μυελοειδούς νόσου. Ως εκ τούτου, η χορήγηση της βιταμίνης C θα μπορούσε να συμβάλλει στην επιδιόρθωση των μοριακών διαταραχών, κατά τα πρώιμα στάδια της κλωνικής αιμοποίησης, ειδικά σε ασθενείς με μεταλλάξεις στο γονίδιο TET2. Τέλος, οι ρυθμιστές της συρραφής του RNA θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν στη θεραπεία των ΜΔΣ, δεδομένου ότι οι μεταλλάξεις στη συσκευή συρραφής (spliceosome) ανευρίσκονται στο 60% των ασθενών κι επηρεάζουν κυρίως τα

γονίδια SF3B1, SRSF2, U2AF1, και ZRSR2. Τόσο οι ρυθμιστές της συρραφής RNA όσο και οι αναστολείς της οδού σηματοδότησης TGF-β, διερευνώνται σε κλινικές δοκιμές για την καταλληλότητα τους, με τους δεύτερους να παρουσιάζουν υψηλά ποσοστά αιμοποιητικής βελτίωσης σε ασθενείς με ΜΔΣ.

➤ **Θεραπεία ΜΔΣ υψηλότερου κινδύνου:** Η θεραπεία πρώτης γραμμής για τα ΜΔΣ υψηλότερου κινδύνου είναι οι **υπομεθυλιωτικοί παράγοντες**, με κυριότερους την αζακιτιδίνη και τη δεσιταβίνη. Συγκεκριμένα, ύστερα από κλινικές δοκιμές της **αζακιτιδίνης** σε ασθενείς με ΜΔΣ, βρέθηκε ότι παρέχει πλεονέκτημα επιβίωσης στους ασθενείς, σε αντίθεση με τις συμβατικές θεραπευτικές επιλογές, όπως η υποστηρικτική θεραπεία, η χαμηλή δόση ενός χημειοθεραπευτικού φαρμάκου, της κυτταραβίνης, και η εντατική χημειοθεραπεία, με συνδυασμούς ανθρακυκλινών και κυτταραβίνης. Μάλιστα, το πλεονέκτημα αυτό φάνηκε σε ένα μεγάλο εύρος ασθενών, ανεξάρτητα από τον καρυότυπο, την ηλικία και το ποσοστό των βλαστών στο μυελό τους. Συμπληρωματικά, παρατηρήθηκε καθυστέρηση του μετασχηματισμού σε οξεία μυελογενή λευχαιμία και σημαντική αύξηση του ποσοστού αυτών, με ανεξαρτησία από τις μεταγγίσεις ερυθροκυττάρων. Η ανταπόκριση στην αζακιτιδίνη καθυστέρησε στους περισσότερους ασθενείς, με μέσο χρόνο ανταπόκρισης τους 2-3 μήνες, ενώ ορισμένοι ανταποκρίθηκαν μόνο ύστερα από 6 κύκλους θεραπείας. Η αποτελεσματικότητα της **δεσιταβίνης** έχει δοκιμαστεί σε 2 κλινικές δοκιμές, στις οποίες οι ασθενείς είχαν περίπου τα ίδια ποσοστά ανταπόκρισης με την αζακιτιδίνη, ωστόσο δεν παρουσίασαν σημαντικό πλεονέκτημα επιβίωσης, σε σχέση με αυτούς που λάμβαναν συμβατική θεραπεία. Η διαφορά στο πλεονέκτημα επιβίωσης μεταξύ αυτών των δύο υπομεθυλιωτικών παραγόντων μπορεί να οφείλεται είτε στο διαφορετικό μηχανισμό δράσης τους ή στο μικρό αριθμό κύκλων θεραπείας, που εφαρμόστηκαν στους ασθενείς κατά τις δοκιμές. Συμπερασματικά, η δράση και η συμβολή των υπομεθυλιωτικών παραγόντων στη θεραπεία των ΜΔΣ διερευνάται ολοένα και περισσότερο σε κλινικές δοκιμές, ειδικά σε ασθενείς που πρόκειται να υποβληθούν σε αλλογενή μεταμόσχευση βλαστοκυττάρων κι έχουν περίσσεια βλαστών ή ανώμαλο καρυότυπο. Οι δοκιμές αυτές στοχεύουν στη χρήση των υπομεθυλιωτικών παραγόντων, ως εναλλακτική θεραπεία, για τη μείωση του κινδύνου υποτροπής μετά τη μεταμόσχευση, αντί για την τυπική εντατική χημειοθεραπεία, η οποία έχει επιζήμιες επιπτώσεις στον οργανισμό. Επιπρόσθετα, σημαντική μέθοδος θεραπείας για τα ΜΔΣ υψηλού κινδύνου αποτελεί η **αλλογενής μεταμόσχευση βλαστοκυττάρων**, η οποία προσδίδει πλεονέκτημα παρατεταμένης επιβίωσης χωρίς την ανάπτυξη νόσου, σε ποσοστό 35-50% των ασθενών. Εντούτοις, η θεραπεία αυτή ενέχει πολλούς κινδύνους, όπως η ανάπτυξη συννοσηρότητας και η μειωμένη λειτουργικότητα του μεταμοσχευόμενου μυελού, και μπορεί να εφαρμοστεί σε μικρό αριθμό ασθενών με ΜΔΣ. Ειδικότερα, εφαρμόζεται σε νεότερους ασθενείς

που έχουν προηγουμένως υποβληθεί σε μυελοαφαίρεση, δηλαδή μείωση των κυττάρων του μυελού, ή ακόμα και σε μεγαλύτερους ασθενείς, έως 70 ετών ή και παραπάνω, εφόσον βρίσκονται σε καλή φυσική κατάσταση, διενεργώντας μειωμένης έντασης μεταμόσχευση βλαστοκυττάρων, από δότη με πανομοιότυπο HLA. Η εφαρμογή αυτής της θεραπείας σε πρώιμο στάδιο της νόσου προσδίδει πλεονέκτημα επιβίωσης, σε σχέση με άλλες θεραπευτικές προσεγγίσεις. Ωστόσο, δεδομένου ότι η παρουσία βλαστών στο μυελό σε ποσοστό άνω του 10% σχετίζεται με κίνδυνο υποτροπής της νόσου, είναι αναγκαίο να ελέγχεται το ποσοστό των βλαστών πριν τη μεταμόσχευση κι εφόσον είναι αυξημένο, να πραγματοποιείται κυτταρική μείωση, μέσω χημειοθεραπευτικών ή πιθανόν υπομεθυλιωτικών παραγόντων. [53]

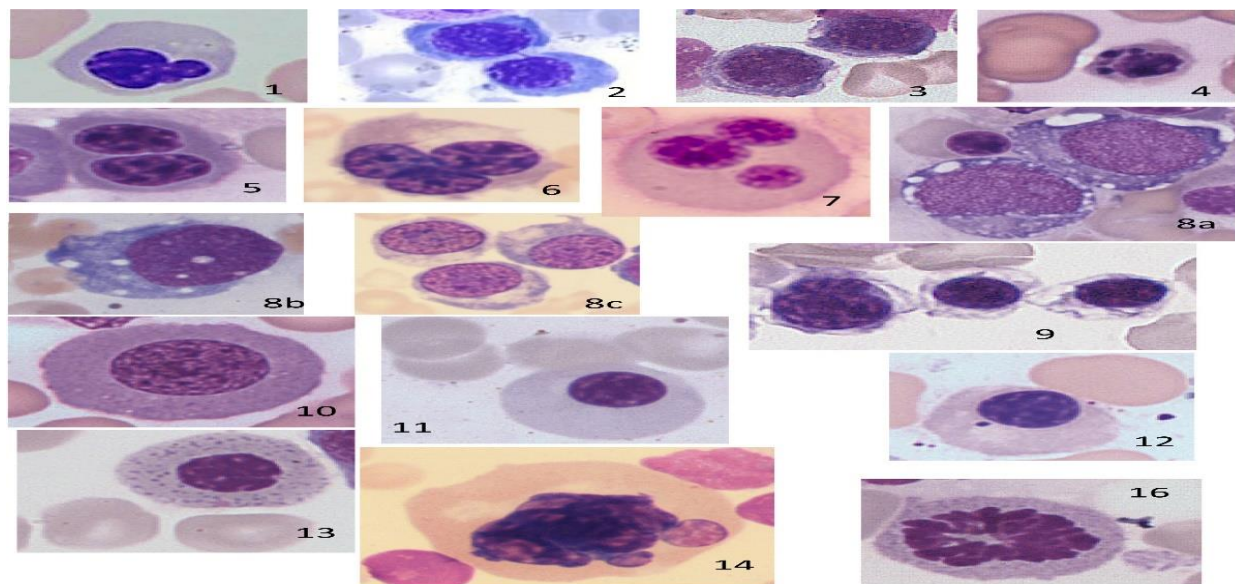
1.2.6 Δυσερυθροποίηση στα ΜΔΣ

Δυσερυθροποίηση καλείται η αδυναμία παραγωγής επαρκή αριθμού ερυθρών αιμοσφαιρίων, η οποία συνοδεύεται από αυξημένη παρουσία δυσπλαστικών ερυθροειδών προγονικών κυττάρων στο μυελό των οστών. Οι μοριακές διαταραχές που λαμβάνουν χώρα στα αιμοποιητικά βλαστικά κύτταρα, κατά την έναρξη της αιμοποίησης στα ΜΔΣ, οδηγούν στη δυσπλασία όλων των κυτταρικών σειρών, εκ των οποίων και της ερυθροκυτταρικής σειράς, όπως προαναφέρθηκε σε προηγούμενες ενότητες (Εικόνα 17). Το πιο κοινό σύμπτωμα των ΜΔΣ, το οποίο απορρέει από τη δυσερυθροποίηση, είναι η **αναιμία**. Η δυσερυθροποίηση στα ΜΔΣ οφείλεται σε ένα συνδυασμό **αυξημένης απόπτωσης** των ερυθροειδών προγονικών κυττάρων και **παύσης της ερυθροκυτταρικής διαφοροποίησης**. Σύμφωνα με μια πρόσφατη μελέτη, τα κύτταρα HSCs, MEPs, BFU-Es και CFU-Es είναι σημαντικά μειωμένα στους ασθενείς με ΜΔΣ, σε σχέση με τους υγιείς ανθρώπους, ενώ για πρώτη φορά βρέθηκαν ερυθροειδείς πρόγονοι, με φαινότυπους που παραπέμπουν σε γηρασμένα κύτταρα, επιρρεπή στην απόπτωση. Το εύρημα αυτό υποδηλώνει την τάση των πρόδρομων ερυθροειδών κυττάρων να υφίστανται **πρόωρη γήρανση**. Το συμπέρασμα αυτό επιβεβαιώθηκε περαιτέρω από την αλληλούχιση RNA, η οποία έδειξε αυξημένη ενεργοποίηση των οδών σηματοδότησης που σχετίζονται με τη γήρανση, σε ασθενείς με ΜΔΣ. Παράλληλα με αυτά τα ευρήματα, κατά την *in vitro* επαγωγή της διαφοροποίησης των MEPs ασθενών με ΜΔΣ, παρατηρήθηκε πρώιμη εμφάνιση ώριμων ερυθροβλαστών, καθώς και πρόωρη σύνθεση αιμοσφαιρίνης στα ερυθροειδή κύτταρα. Αυτή η **επιτάχυνση στη διαδικασία της διαφοροποίησης** μπορεί να είναι είτε αποτέλεσμα των μοριακών παθογενετικών συμβάντων, που λαμβάνουν χώρα από την αρχή της αιμοποίησης, ή να αποτελεί μηχανισμό του οργανισμού, για την αντιστάθμιση της ανώμαλης ερυθροποίησης. [55]

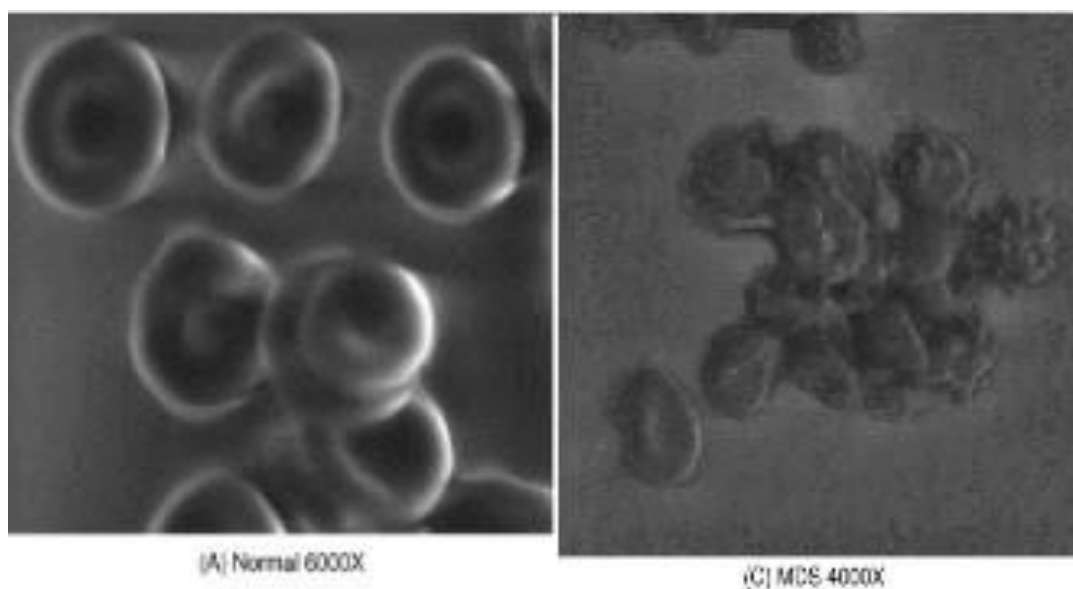
Οι διαταραχές αυτές στην ερυθροποίηση οδηγούν στο σχηματισμό ερυθροκυττάρων με **ανώμαλη μορφολογία** και δυσπλαστικά χαρακτηριστικά που περιεγράφηκαν διεξοδικά στην παράγραφο 1.2.4. Μια μελέτη των ερυθροκυττάρων από ασθενείς με ΜΔΣ και άλλες αιματολογικές κακοήθειες, υπέδειξε επιπρόσθετες μεταβολές στη γενικότερη μορφολογία τους. Συγκεκριμένα, με τη χρήση ηλεκτρονικού μικροσκοπίου σάρωσης SEM (scanning electron microscopy) παρατηρήθηκε η επικράτηση ερυθροκυττάρων, που παρουσίαζαν δομές ομοιάζουσες με «αγκάθια» και «κέρατα» στην επιφάνεια τους, καθώς και εχνοκυττάρων και ακανθοκυττάρων. Ακόμα, παρατηρήθηκαν ελάχιστα ερυθροκύτταρα με πορώδεις δομές στη μεμβράνη, αλλά και λεπτότερα ή χαμηλής πυκνότητας ερυθροκύτταρα. Επιπλέον, με τη χρήση ηλεκτρονικού μικροσκοπίου μετάδοσης TEM (transmission electron microscopy) αναδείχθηκαν οι πορώδεις δομές, ειδικά στην επιφάνεια των ερυθροκυττάρων με ΜΔΣ και συνυπάρχουσα ΟΜΛ. Μάλιστα, τα ερυθρά ασθενών με MDS-RA δεν μπορούσαν να επανασυνδεθούν ύστερα από υποτονική λύση. Ως εκ τούτου, κατά την εξέλιξη των ΜΔΣ, χάνεται το αμφίκυκλο σχήμα των ερυθροκυττάρων και εν συνεχεία εμφανίζονται οι παθολογικές δομές στην επιφάνεια τους, οι οποίες μοιάζουν με «αγκάθια» και «κέρατα» (Εικόνα 18). [56]

Όσον αφορά τις **δομικές διαταραχές** των ερυθροκυττάρων, μέσω δοκιμών κυτταρομετρίας ροής, έχει διαπιστωθεί η **έκθεση της φωσφατιδυλοσερίνης (PS)** στην επιφάνεια των ερυθρών, καθώς και η **απώλεια των γλυκοφορινών** από την επιφάνεια τους σε ασθενείς με ΜΔΣ. Η PS φυσιολογικά κατανέμεται στην εσωτερική λιπιδική στιβάδα της ερυθροκυτταρικής μεμβράνης, ωστόσο στα ΜΔΣ τείνει να εκτίθεται στην επιφάνεια του κυττάρου, ειδικά στους υποτύπους MDS-RA, MDS-RAEB, και MDS-RCMD. Κατά συνέπεια, τα ερυθροκύτταρα που εκφράζουν τη PS, μπορούν να αναγνωριστούν από τα φαγοκύτταρα του δικτυοενδοθηλιακού συστήματος και να καταστραφούν. Συγχρόνως, στα ΜΔΣ παρατηρείται απώλεια του «καλύμματος» γλυκοφορινών από την επιφάνεια των ερυθροκυττάρων, λόγω του σχηματισμού λιπιδικά συμμετρικών μικροκυστιδίων, περιέχοντα αιμοσφαιρίνη. Έτσι η έκθεση PS σε συνδυασμό με την απώλεια των γλυκοφορινών, που φυσιολογικά προστατεύουν τα ερυθρά από τη φαγοκυττάρωση, αλλά και από την προσκόλληση με άλλα κύτταρα ή το αγγειακό τοίχωμα –μέσω της δημιουργίας αρνητικού φορτίου στην επιφάνεια τους-, οδηγεί τελικά στην πρώιμη καταστροφή των ερυθρών από τα φαγοκύτταρα της κυκλοφορίας. [57,58] Παρ' όλα αυτά από άλλες μελέτες με

κυτταρομετρία ροής, δεν έχουν ανιχνευθεί διαταραχές στις κυτταροσκελετικές πρωτεΐνες των ερυθροκυττάρων σε ασθενείς με ΜΔΣ. [59]



Εικόνα 17- Τα δυσπλαστικά μορφολογικά χαρακτηριστικά της ερυθροκυτταρικής σειράς. Πηγή: [15] 1: πυρηνική λοβοποίηση, 2: διαπυρηνικές γέφυρες, 3: κυτταροπλασματική γέφυρα, 4: καρρουρηξία, 5: δύο πυρήνες, 6: 3 ή περισσότεροι πυρήνες, 7: πυρήνες που διαφέρουν ως προς τα χαρακτηριστικά, 8a: ακανόνιστα συνενωμένα κενοτόπια, 8b: στρογγυλά κενοτόπια, 8c: άλλα κενοτόπια, 9: ελαττωματική αιμοσφαιρίνη (στη σιδηροβλαστική ερυθροποίηση), 10: μεγαλοβλάστες, 11: μακρονορμοβλάστες, 12: αποκολλημένο πυρηνικό θραύσμα, 13: βασεόφιλα στίγματα, 14: γιγαντιαία ερυθροβλάστη, 16: μιτωτικό σχήμα



Εικόνα 18- Μικρογραφία των ερυθρών αιμοσφαιρίων σε ασθενείς με ΜΔΣ και υγιή άτομα με τη χρήση ηλεκτρονικού μικροσκοπίου σάρωσης. Πηγή: [16] Όπως φαίνεται στην εικόνα Α, τα ερυθροκύτταρα των υγιών ατόμων έχουν το τυπικό αμφίκιλλο δισκοειδές σχήμα, σε αντίθεση με τα ερυθρά των ασθενών με ΜΔΣ (C), τα οποία παρουσιάζουν ανώμαλη μορφολογία, με ακανθώδεις δομές στην επιφάνειά τους. Ακόμα, παρατηρείται συγκόλληση των παθολογικών ερυθρών αιμοσφαιρίων.

1.3 Δοκιμασία Κρυοαιμόλυσης

Η κρυοαιμόλυση είναι μια δοκιμασία, η οποία χρησιμοποιείται για τη διάγνωση της κληρονομικής σφαιροκυττάρωσης (HS) και τη διαφοροποίηση της από άλλες αιτίες αιμόλυσης, με ποσοστά ευαισθησίας και ειδικότητας, 95% και 96%, αντίστοιχα. Κατά τη δοκιμασία της κρυοαιμόλυσης, τα ερυθρά αιμοσφαίρια επωάζονται αρχικά σε υπέρτονο διάλυμα στους 37° C και στη συνέχεια ψύχονται στους 0° C, μια διαδικασία η οποία οδηγεί σε **μαζική αιμόλυση**, δηλαδή ρήξη των ερυθροκυττάρων. Ο βαθμός της αιμόλυσης εξαρτάται από την τονικότητα και τη θερμοκρασία του μέσου. Σύμφωνα με τους Green και Jung, οι οποίοι περιέγραψαν για πρώτη φορά αυτό το φαινόμενο, η απότομη αλλαγή της θερμοκρασίας προκαλεί μετάβαση φάσης της λιπιδικής διπλοστιβάδας της μεμβράνης, από υγρή σε μορφή gel. Αυτή η μεταβολή φάσης επιδρά στις κατακόρυφες συνδέσεις μεταξύ των μεμβρανικών φωσφολιπιδίων και των κυτταροσκελετικών πρωτεϊνών, επιφέροντας ρήξη της μεμβράνης και κατ' επέκταση του κυττάρου. Επόμενες μελέτες από τους Dubbelman et al, πρότειναν ότι η αιμόλυση είναι συνέπεια της συρρίκνωσης της ερυθροκυτταρικής μεμβράνης λόγω του υπέρτονου μέσου, και της επακόλουθης αδυναμίας του κυττάρου να επαναφέρει τη φυσιολογική του μορφολογία. Ωστόσο, ο ακριβής μοριακός μηχανισμός της κρυοαιμόλυσης δεν είναι ακόμα γνωστός. Οι προαναφερθείσες μελέτες διερεύνησαν τα ποσοστά κρυοαιμόλυσης σε φυσιολογικά ερυθροκύτταρα καθώς και σε ερυθρά ασθενών με κληρονομική σφαιροκυττάρωση, αποδεικνύοντας ότι αυτά των ασθενών με HS ήταν σημαντικά πιο εύθραυστα και επιρρεπή στην κρυοαιμόλυση, σε σχέση με τα φυσιολογικά. Στην HS παράγονται ερυθροκύτταρα με φυσιολογικό αμφίκοιλο σχήμα, από το μυελό των οστών των ασθενών, καθώς όμως αυτά διέρχονται διαμέσου του σπλήνα, χάνουν τη μεμβράνη τους, λόγω διαταραχών στις πρωτεΐνες που εμπλέκονται στις κατακόρυφες διασυνδέσεις μεταξύ της μεμβράνης και του κυτταροσκελετικού δικτύου. Η απώλεια της μεμβράνης συνεπάγεται την αλλοίωση του σχήματος των ερυθροκυττάρων, τα οποία εμφανίζονται με σφαιρικό σχήμα και μικρότερη αναλογία επιφάνειας προς όγκο. Ως εκ τούτου, οι ερευνητές συμπέραναν ότι η συρρίκνωση της ήδη ελαττωματικής μεμβράνης των ερυθροκυττάρων στην HS, λόγω του υπέρτονου διαλύματος, σε συνδυασμό με την μεταβολή της φάσης της λιπιδικής διπλοστιβάδας, εξαιτίας της αλλαγής θερμοκρασίας, καθιστούν τα ερυθροκύτταρα ανάκαινα να επαναφέρουν τις φυσιολογικές μηχανικές τους λειτουργίες, με συνέπεια τη ρήξη. Ακόμα, η κρυοαιμόλυση αποδείχτηκε ως η μοναδική δοκιμασία, που ήταν ικανή να διαγνώσει όλα τα περιστατικά HS, τόσο των ασυμπτωματικών φορέων της νόσου, όσο κι εκείνων με ελάχιστη μεταβολή στην αναλογία της επιφάνειας προς όγκο, που δεν ανιχνεύθηκε με τη δοκιμασία της ωσμωτικής ευθραυστότητας. Το γεγονός αυτό είναι, επίσης, ενδεικτικό της διαγνωστικής της αξίας, για την ανίχνευση βλαβών στις πρωτεΐνες της μεμβράνης και του κυτταροσκελετού. Εντούτοις, εκτός

από την HS, παρατηρήθηκαν αυξημένα ποσοστά κρυσταλλοποίησης στο Μελανησιακό τύπο της κληρονομικής ελλειπτοκυττάρωσης (HE), ο οποίος χαρακτηρίζεται από ανεπάρκεια του θραύσματος της ζώνης 3, αποδεικνύοντας περαιτέρω τη σημασία των συνδετικών πρωτεϊνών στη ρήξη που προκαλείται, ύστερα από την έκθεση των ερυθροκυττάρων σε χαμηλή θερμοκρασία. Συμπερασματικά, η υψηλή διαγνωστική ισχύς, το χαμηλό κόστος, η γρήγορη και απλή διαδικασία συνιστούν την κρυσταλλοποίηση, την καταλληλότερη επιλογή για τη διάγνωση ασθενών με HS. [60,61]

Όσον αφορά τα ΜΔΣ, δεν υπάρχουν μελέτες που να συσχετίζουν τη δοκιμασία της κρυσταλλοποίησης με τη διάγνωση αυτών των συνδρόμων. Στη παρούσα ερευνητική εργασία, εκτελέστηκε η δοκιμασία της κρυσταλλοποίησης σε ασθενείς με ΜΔΣ, αλλά και σε υγιείς ανθρώπους, για τη διερεύνηση πιθανής ευαισθησίας και ευθραυστότητας των παθολογικών ερυθροκυττάρων, όταν εκτίθενται σε συνθήκες χαμηλής θερμοκρασίας και υπέρτονου διαλύματος. Τυχόν αύξηση στα ποσοστά κρυσταλλοποίησης στους ασθενείς με ΜΔΣ, σε σχέση με τους υγιείς ανθρώπους, μπορεί να υποδεικνύει βλάβες στα συστατικά των κατακόρυφων συνδέσεων ή και γενικότερα της μεμβράνης και του κυτταροσκελετού των ερυθροκυττάρων, οι οποίες θα καθιστούν τα κύτταρα λιγότερο σταθερά, ακέραια κι ικανά να επανακτούν τη φυσιολογική τους μορφολογία κι να αποφεύγουν τη ρήξη, ύστερα από την καταπόνηση.

1.4 Δοκιμασία Άμεση Coombs

Η δοκιμασία **DAT** (direct antiglobulin test) ή **άμεση Coombs** αποτελεί μέθοδο, η οποία στηρίζεται στην αντίδραση αντιγόνου-αντισώματος, για την ανίχνευση τυχόν αντισωμάτων ή συμπληρώματος συνδεδεμένων στη μεμβράνη των ερυθροκυττάρων. Το αντιδραστήριο που χρησιμοποιείται σε αυτή τη δοκιμασία είναι ένα αντι-αντίσωμα, η αντι-ανθρώπινη σφαιρίνη, οι Fab περιοχές του οποίου αναγνωρίζουν τις Fc περιοχές των αντισωμάτων, που περιβάλλουν τα ερυθροκύτταρα, προκαλώντας εμφανή **συγκόλληση**, στο υπό εξέταση δείγμα αίματος. Τα ερυθροκύτταρα μπορεί να φέρουν αντισώματα ή συμπλήρωμα στην επιφάνεια τους στις περιπτώσεις α) αυτοάνοσης αιμολυτικής αναιμίας, β) αιμολυτικής νόσου του νεογνού και του εμβρύου, γ) αλλο-άνοσης αντίδρασης λόγω μετάγγισης και δ) αιμόλυσης επαγόμενης από φάρμακα ή χημικές ουσίες. Κατά συνέπεια, ένα θετικό τεστ άμεσης αντισφαιρίνης μπορεί να διαγνώσει τις παραπάνω καταστάσεις, αλλά και να διακρίνει την ανοσολογικής φύσεως αιμόλυση, από την αιμόλυση που προκαλείται από άλλες μη-άνοσες αιτίες. Σε κάθε περίπτωση, ένα θετικό τεστ αντισφαιρίνης χρήζει οπωσδήποτε περαιτέρω διερεύνησης. [62]

Η χρήση της άμεσης Coombs στα ΜΔΣ μπορεί να είναι ιδιαίτερα χρήσιμη για τη διαλεύκανση της ανοσοποιητικής λειτουργίας κατά την ανάπτυξη του συνδρόμου και τη διάγνωση πιθανών συνυπαρχουσών επιπλοκών, όπως η αυτοάνοση αιμολυτική αναιμία και οι αντιδράσεις από τις μεταγγίσεις. Όπως προαναφέρθηκε στην παράγραφο 1.2.3.6, το ανοσοποιητικό σύστημα είναι απορυθμισμένο στα ΜΔΣ και συχνά παρατηρούνται αυτοάνοσες εκδηλώσεις. Π.χ η αυτοάνοση αιμολυτική αναιμία συναντάται στο 3% των περιπτώσεων, κυρίως σε ΜΔΣ χαμηλού κινδύνου συμπεριλαμβανομένων του MDS-SLD και MDS-RS, ενώ ερυθροκυτταρικά αυτοαντισώματα ανευρίσκονται σε έως και 35% των ασθενών. Επομένως, η εφαρμογή αυτού του τεστ σε δείγματα ασθενών με ΜΔΣ μπορεί να επιδείξει τυχόν ευαισθητοποίηση των ερυθροκυττάρων, είτε λόγω των συχνών μεταγγίσεων, στις οποίες υποβάλλονται για τη βελτίωση των κυτταροπενιών, είτε λόγω γενικότερης διαταραχής του ανοσοποιητικού συστήματος. [63]

2. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

2.1 Σκοπός Εργασίας

Η παρούσα εργασία είχε ως στόχο τη μελέτη της δοκιμασίας της κρυσταλλοποίησης, καθώς και τη μελέτη της δοκιμασίας της άμεσης αντι-ανθρώπινης σφαιρίνης (DAT) στο αίμα ασθενών με μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα.

Τυχόν αυξημένα ποσοστά κρυσταλλοποίησης μπορεί να επιδεικνύουν βλάβες στις αλληλεπιδράσεις μεταξύ της μεμβράνης και του κυτταροσκελετού ή και στη γενικότερη δομή των ερυθρών αιμοσφαιρίων, με συνέπεια μικρότερη ανθεκτικότητα και αντοχή του κυττάρου έναντι στην απότομη αλλαγή της θερμοκρασίας. Η ελλιπής αντοχή και η αδυναμία του ερυθροκυττάρου να διατηρήσει ακέραιο το σχήμα και τη δομή του, οδηγεί στη λεγόμενη αιμόλυση, δηλαδή τη ρήξη του ερυθροκυττάρου, η οποία συνοδεύεται από την απελευθέρωση της περιεχόμενης αιμοσφαιρίνης στο πλάσμα.

Παράλληλα με τη δοκιμασία της κρυσταλλοποίησης, διεξήχθη και το τεστ της άμεσης δοκιμασίας κατά Coombs για τη διερεύνηση πιθανής παρουσίας αντισωμάτων ή συμπληρώματος στη μεμβράνη των ερυθροκυττάρων, η οποία ενέχει τον κίνδυνο αναγνώρισης και καταστροφής τους από τα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος. Ακόμα, το συμπλήρωμα μπορεί να προκαλέσει ρήξη των ερυθροκυττάρων και συνεπώς αιμόλυση. Δεδομένης της πολύπλοκης ανοσολογικής εμπλοκής στην παθογένεια των ΜΔΣ, καθώς και της αποδεδειγμένης συσχέτισης των αυτοάνοσων νοσημάτων με τα ΜΔΣ, η χρήση της άμεσης Coombs έχει ιδιαίτερο ενδιαφέρον, τόσο για την επιτήρηση των ασθενών για τυχόν αυτοάνοσες αιμολυτικές αντιδράσεις, όσο και για την έρευνα της ανοσολογικής λειτουργίας στα ΜΔΣ.

Για τη διεξαγωγή της έρευνας, συγκεντρώθηκαν δείγματα αίματος από 22 ασθενείς με ΜΔΣ, η ηλικία των οποίων κυμαινόταν από 64 έως 96 ετών, και από 14 υγιή άτομα μάρτυρες, ίδιου ηλικιακού εύρους με τους ασθενείς, τα οποία λειτούργησαν ως τα δείγματα ελέγχου (controls), για τη σύγκριση των αποτελεσμάτων.

2.2 Υλικά & Μέθοδοι

- **Αναλώσιμα:**
- ✓ Eppendorfs 1,5 mL
- ✓ Πιπέτες Pasteur
- ✓ Ακροφύσια για πιπέτες

- ✓ Σωληνάρια αιμοληψίας
- ✓ Δοκιμαστικοί σωλήνες
- ✓ Κυβέττες
- ✓ Falcon

- **Υλικά:**
 - ✓ Buffer Σουκρόζης 0,7 M
 - ✓ Sodium Chloride 0,9%
 - ✓ Water for Injection

- **Αντιδραστήρια:**
 - ✓ Anti-human globulin

- **Όργανα-συσσκευές:**
 - ✓ Επιτραπέζια ψυχώμενη φυγόκεντρος
 - ✓ Φωτόμετρο
 - ✓ Υδατόλουτρο
 - ✓ Πιπέτες
 - ✓ Vortex

- **Πειραματική διαδικασία κρυσταλλοποίησης:**

I. Τα δείγματα συλλέγονται σε σωληνάρια γενικής αίματος EDTA και μεταφέρονται στο εργαστήριο. Στη συνέχεια, μεταφέρεται ποσότητα 0,5 mL από τη γενική σε erpendorf και συμπληρώνεται με περίπου 1 mL διαλύματος 0,9% NaCl μέχρι να γεμίσει. Έπειτα, τα δείγματα φυγόκεντρούνται σε ψυχώμενη φυγόκεντρο στις 3.000 rpm για 10 λεπτά. Ακολουθεί απόρριψη του υπερκείμενου και συμπλήρωση με 1 mL διαλύματος 0,9% NaCl, μέχρι να γεμίσει το erpendorf, όπως και προηγουμένως. Αυτή η διαδικασία πραγματοποιείται 3 φορές, ώστε να «πλυθούν» τα ερυθρά αιμοσφαίρια και το ίζημα που θα προκύψει να αποτελείται μόνο από ερυθρά αιμοσφαίρια.

II. Στη συνέχεια, ετοιμάζονται 2 mL duplicates buffer σουκρόζης 0,7 M για κάθε δείγμα. Τα duplicates επωάζονται στο υδατόλουτρο στους 37° C για 10 λεπτά.

III. Από το ίζημα των ερυθρών αιμοσφαιρίων που έχει προκύψει ύστερα από τις 3 πλύσεις, μεταφέρεται ποσότητα 50 µL σε κάθε duplicate. Κατόπιν, τα duplicates αναδεύονται έντονα στο vortex για 10 με 15 δευτερόλεπτα και τοποθετούνται στο υδατόλουτρο στους 37° C για 10 λεπτά.

IV. Τα duplicates τοποθετούνται στον πάγο για 10 λεπτά, για να επιτευχθεί θερμοκρασία 0° C.

V. Ακολουθεί ανάδευση στο vortex για λίγα δευτερόλεπτα. Έπειτα, τα duplicates φυγοκεντρώνονται σε κανονική φυγόκεντρο στις 3.000 rpm για 10 λεπτά.

VI. Το υπερκείμενο, που αποτελεί το πλάσμα, μεταφέρεται σε άλλο σωληνάριο. Ακολούθως, τα σωληνάρια με το πλάσμα από κάθε duplicate τοποθετούνται στο φωτόμετρο, όπου υπολογίζεται η απορρόφηση (OD) της ελεύθερης αιμοσφαιρίνης στα 540 nm. Αν η απορρόφηση είναι υψηλή αραιώνεται ποσότητα 200 µL από το υπερκείμενο σε 4 mL dWFI.

Για την εκτίμηση του ποσοστού κρυσταλλοποίησης σε κάθε δείγμα, είναι απαραίτητο να υπολογιστεί η **100% κρυσταλλοποίηση**, δηλαδή το ποσοστό της αιμόλυσης ύστερα από μεταφορά ποσότητας «πλυμένων» ερυθρών αιμοσφαιρίων σε dWFI. Η διαδικασία, σε αυτή την περίπτωση, είναι παρόμοια, με τη διαφορά ότι τα ερυθρά αιμοσφαίρια διαλύονται σε καθαρό νερό, αντί για τη σουκρόζη, όπου είναι γνωστό ότι διαρρηγνύονται σε ποσοστό 100%. Τα βήματα της διαδικασίας είναι τα εξής:

- Μεταφέρεται ποσότητα 50 µL από τα «πλυμένα» ερυθρά κάθε δείγματος σε 2 mL dWFI και αναδεύεται ήπια με vortex.
- Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 3.000 rpm για 10 λεπτά.
- Από το υπερκείμενο που προκύπτει, λαμβάνεται ποσότητα 200 µL, η οποία διαλύεται σε 4 mL dWFI και στη συνέχεια τοποθετείται στο φωτόμετρο, όπου μετράται η απορρόφηση της ελεύθερης αιμοσφαιρίνης (OD) στα 540 nm. Η παραπάνω διαδικασία πραγματοποιείται δύο φορές για το κάθε δείγμα, δηλαδή σε duplicates, όπως και στην κρυσταλλοποίηση των υπό εξέταση δειγμάτων.

Από τα αποτελέσματα που προκύπτουν, υπολογίζεται το **OD540_{test}**, δηλαδή ο μέσος όρος της απορρόφησης της ελεύθερης αιμοσφαιρίνης από τα duplicates του κάθε δείγματος στα 540nm, καθώς και το **OD540_{hemolysate(100%)}**, που αποτελεί τον αντίστοιχο μέσο όρο των duplicates από την 100% αιμόλυση. Τέλος, το συνολικό ποσοστό κρυσταλλοποίησης για το κάθε δείγμα υπολογίζεται από τον παρακάτω τύπο:

$$\% \text{ κρυσταλλοποίηση} = \frac{OD\ 540\ test}{OD\ 540\ hemolysate\ (100\%)} \times 5$$

Η διαδικασία αυτή ακολουθείται ομοίως και για τους μάρτυρες, δηλαδή τα controls, για τη σύγκριση των αποτελεσμάτων και την εύρεση πιθανών διαφορών στα ποσοστά κρυσταλλοποίησης μεταξύ των υγιών ατόμων και των νοσούντων από ΜΔΣ.

- **Πρωτόκολλο Άμεσης Coombs:**

- I. Αρχικά, πραγματοποιούνται 3 πλύσεις των ερυθρών αιμοσφαιρίων, όπως περιγράφηκε και στη δοκιμασία της κρυσταλλοποίησης.
- II. Από το προκύπτον ίζημα, λαμβάνεται ποσότητα 5 μL , η οποία διαλύεται σε 95 μL διαλύματος 0,9% NaCl, για τη δημιουργία Hct 5%.
- III. Από το διάλυμα των ερυθρών Hct 5%, λαμβάνονται 2 σταγόνες σε άλλο σωληνάριο και ύστερα προστίθενται 2 σταγόνες από αντισφαιρινικό ορό.
- IV. Ακολουθεί ανάδευση και επώαση του μίγματος ερυθρών αιμοσφαιρίων-αντισφαιρινικού ορού για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
- V. Ύστερα, φυγοκεντρείται στις 1500 rpm για 2 λεπτά.
- VI. Τέλος, εκτιμάται το αποτέλεσμα, τόσο μικροσκοπικά, όσο και μακροσκοπικά. Η παρουσία συγκόλλησης δηλώνει θετικό αποτέλεσμα, ενώ η απουσία αρνητικό αποτέλεσμα.

3. Αποτελέσματα

▪ Αποτελέσματα των αιματολογικών εξετάσεων των ασθενών:

Κατά τη διεξαγωγή της έρευνας, πραγματοποιήθηκε αιματολογικός έλεγχος, τόσο στους νοσούντες όσο και στα υγιή άτομα, με σκοπό την ευρύτερη αποσαφήνιση των αιματολογικών διαταραχών που λαμβάνουν χώρα στα μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα. Αρχικά, παρατηρήθηκε μειωμένος αριθμός των λευκών αιμοσφαιρίων (WBCs), ερυθρών αιμοσφαιρίων (RBCs), αιμοπεταλίων (PLTs) και των ουδετεροφίλων (Neut) στους πάσχοντες, σε σχέση με τους υγιείς, τα οποία ωστόσο βρίσκονταν εντός των φυσιολογικών ορίων. Ακόμα, οι τιμές της αιμοσφαιρίνης (Hb) και του αιματοκρίτη (Hct) βρέθηκαν σημαντικά μειωμένες, κάτω από τη μικρότερη φυσιολογική τιμή. Επιπλέον, ο αριθμός των λεμφοκυττάρων (LY) ήταν μεγαλύτερος στους ασθενείς σε σχέση με τους υγιείς, αλλά εντός των φυσιολογικών ορίων. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει ο αριθμός των μονοκυττάρων (MO), ο οποίος ήταν αξιοσημείωτα αυξημένος, και μάλιστα σε μεγάλη απόκλιση από το εύρος των φυσιολογικών τιμών, και στις δύο υπό εξέταση ομάδες. Όπως και με τις υπόλοιπες παραμέτρους, η τιμή των μονοκυττάρων ήταν μεγαλύτερη στους ασθενείς σε σχέση με τους υγιείς. Αύξηση παρουσίασαν, επίσης, οι τιμές των ερυθροκυτταρικών δεικτών MCV, MCH, MPV και PDW στους ασθενείς, σε σύγκριση με τους υγιείς. Ο δείκτης RDW, που αποτελεί το εύρος κατανομής του μεγέθους των ερυθροκυττάρων, ήταν αυξημένος και στις δύο ομάδες, εκτός των φυσιολογικών ορίων, με την τιμή των ασθενών να υπερβαίνει αυτή των υγιών. Τέλος, ο δείκτης MCHC, που αντιπροσωπεύει τη μέση συγκέντρωση αιμοσφαιρίνης στα ερυθρά αιμοσφαίρια, βρέθηκε κάτω από τα φυσιολογικά όρια και στις δύο ομάδες, με την τιμή των ασθενών να είναι ελάχιστα πιο υψηλή από αυτή των υγιών (Πίνακας 1).

Πίνακας 1- Αιματολογικές παράμετροι από τις γενικές αίματος των ασθενών με ΜΔΣ και των υγιών(controls). Παρουσιάζονται οι παράμετροι από τον αιματολογικό έλεγχο των ασθενών με ΜΔΣ και των υγιών ατόμων (controls), που συμμετείχαν στην έρευνα. Στη δεξιά στήλη απεικονίζονται τα εύρη των φυσιολογικών τιμών. Οι τιμές των υπό εξέταση ομάδων παρουσιάζονται ως μέσοι όροι +/- την τυπική απόκλιση. $p < 0,05$ **Με έντονη γραφή** τονίζονται οι παθολογικές τιμές.

Παράμετροι Γενικής Αίματος	Ασθενείς n=22	Υγιείς (controls) n=14	Φυσιολογικές Τιμές (Α: άνδρες, Γ: γυναίκες)
WBCs ($\times 10^3/\mu\text{l}$)	5,8 (5,5-6,1)	8,2 (7,6-8,8)	5-10
Neut (%)	54,1 (51,6-56,6)	60,1 (55,8-64,4)	50-60
LY (%)	31,1 (29,7-32,5)	28,5 (26,5-30,5)	20-40
MO (%)	13,7 (13,5-13,9)	11,4 (10,6-12,2)	2-6
RBCs ($\times 10^6/\mu\text{l}$)	3,76 (3,59-3,93)	4,38 (4,07-4,69)	Γ: 3,6-5

			A: 4,2-5,4
Hb (gr/dl)	10,3 (9,8-10,8)	11,5 (10,7-12,3)	Γ: 12,1-16,1 A: 14,1-17,4
Hct (%)	33,7 (32,2-35,2)	38 (35-41)	Γ: 37-47 A: 40-51
MCV (fl)	91,5 (87,3-95,7)	88,3 (82-94,6)	82-98
MCH (pg)	28,2 (26,9-29,5)	26,8 (24,9-28,7)	26-34
MCHC (gr/dl)	30,7 (29,3-32,1)	30,2 (28-32,4)	31-37
RDW (%)	17,3 (16,5-18,1)	14,9 (13,8-16)	11,5-14,5
PLTs (x10 ³ μl)	202 (193-211)	281,2 (261,1-301,3)	150-400
MPV (fl)	11,3 (10,8-11,8)	10,9 (10,1-11,7)	8,9-13,2
PDW (%)	15,7 (15-16,4)	14,5 (13,5-15,5)	9-17

▪ Κρυσταλλοποίηση και άμεση Coombs:

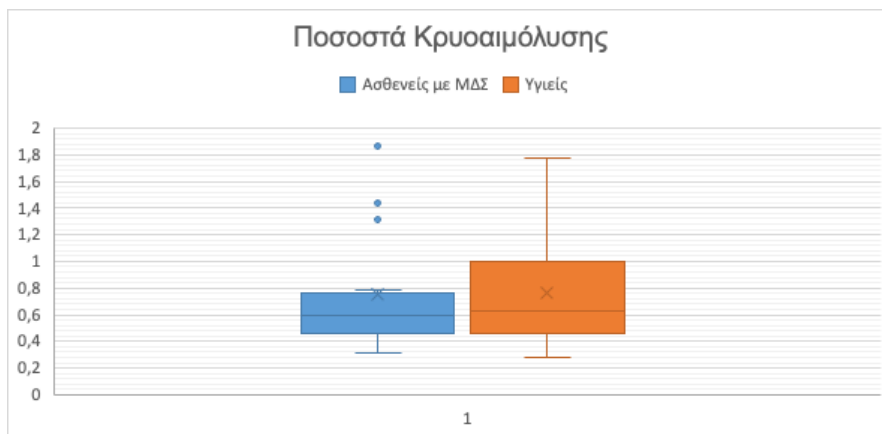
Τα ποσοστά κρυσταλλοποίησης δεν επέδειξαν μεγάλη διαφορά μεταξύ των ασθενών με ΜΔΣ και των υγιών ατόμων. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα και τα παρακάτω διαγράμματα, τα ποσοστά κρυσταλλοποίησης των ασθενών φαίνεται να είναι ελαφρώς μειωμένα, σε σύγκριση με αυτά των υγιών ατόμων. Ειδικότερα, οι μέσοι όροι (Average) των τιμών κρυσταλλοποίησης των ασθενών και υγιών ατόμων, είναι **0,74** και **0,75**, ενώ οι διάμεσοι **0,6** και **0,625**, αντίστοιχα. Παρά την ελάχιστη μείωση των τιμών κρυσταλλοποίησης στους ασθενείς, παρατηρήθηκε αυξημένο εύρος (Range) στις τιμές των ασθενών σε σχέση με αυτές των υγιών, με τις τιμές των ασθενών να κυμαίνονται από **0,31 έως 1,9**, ενώ των υγιών από **0,28 έως 1,78**. Ακόμα, η τυπική απόκλιση (Standard Deviation) των τιμών των ασθενών είναι εμφανώς μεγαλύτερη (**0,457**) από αυτή των υγιών (**0,392**). Οι υπολογιζόμενες τυπικές αποκλίσεις σε συνδυασμό με τα εύρη των δύο υπό εξέταση ομάδων, υποδηλώνουν ότι οι τιμές κρυσταλλοποίησης των ασθενών είναι περισσότερο απομακρυσμένες από τον μέσο όρο, σε σχέση με τις τιμές των υγιών ατόμων. Το εύρημα αυτό αποδεικνύεται περαιτέρω από τα παρακάτω διαγράμματα, στα οποία φαίνεται ότι οι τιμές των ασθενών διασπείρονται ανομοιόμορφα σε ένα μεγαλύτερο φάσμα, εμφανίζοντας μεγαλύτερη απόσταση-απόκλιση από τον μέσο όρο, σε αντίθεση με τις τιμές των υγιών, οι οποίες βρίσκονται σχετικά συγκεντρωμένες κοντά στο μέσο όρο, με ελάχιστες από αυτές να βρίσκονται σε μεγάλη απόκλιση από τον τελευταίο (Πίνακας 2, Διάγραμμα 1).

Όσον αφορά τη δοκιμασία της Άμεσης Coombs όλα τα δείγματα, τόσο αυτά των ασθενών, όσο κι εκείνα των υγιών μαρτύρων ήταν αρνητικά, δηλαδή δεν εμφάνισαν συγκόλληση μικροσκοπικά ή μακροσκοπικά.

Πίνακας 2- Οι βασικοί στατιστικοί δείκτες που απορρέουν από τα αποτελέσματα της δοκιμασίας της κρουαيمόλυσης σε ασθενείς με ΜΔΣ και υγιή άτομα (controls).

Στατιστικοί δείκτες	Ασθενείς με ΜΔΣ n=22	Υγιείς (controls) n=14
Μέσος Όρος	0,74	0,75
Διάμεσος	0,6	0,625
Εύρος	1,59	1,5
Τυπική απόκλιση	0,457	0,392
Ελάχιστη τιμή	0,31	0,28
Μέγιστη τιμή	1,9	1,78

Διάγραμμα 1- Στατιστική σύγκριση των ποσοστών κρουαيمόλυσης μεταξύ ασθενών και υγιών ατόμων. Το μπλε θηκόγραμμα αντιπροσωπεύει την κατανομή των τιμών κρουαيمόλυσης στους ασθενείς με ΜΔΣ ενώ το πορτοκαλί, αυτήν των υγιών μαρτύρων.



4 Συζήτηση

Η συγκεκριμένη ερευνητική εργασία αποσκοπεί στη μελέτη της επίδρασης της δοκιμασίας της κρυσταλλοποίησης στα παθολογικά ερυθρά αιμοσφαίρια των ασθενών με ΜΔΣ, καθώς και στην πιθανή εύρεση αυτοάνοσων φαινομένων έναντι των κυκλοφορούντων ερυθροκυττάρων, μέσω της δοκιμασίας της άμεσης Coombs. Για τη διεξαγωγή αυτής της μελέτης, χρησιμοποιήθηκαν δείγματα αίματος από δύο ομάδες πληθυσμών, παρόμοιου ηλικιακού εύρους και διαφορετικού φύλου, συμπεριλαμβανομένων της ομάδας των νοσούντων από ΜΔΣ και των υγιών ατόμων (μάρτυρες/controls).

Αρχικά, πραγματοποιήθηκε αιματολογική ανάλυση των δειγμάτων, η οποία είναι απαραίτητη για τη διερεύνηση της ευρύτερης αιματολογικής και κλινικής εικόνας των ασθενών, σε σύγκριση με τους υγιείς, αλλά και για την ορθότερη ερμηνεία των αποτελεσμάτων των δύο πειραματικών διαδικασιών. Τα αποτελέσματα της γενικής αίματος συνάδουν με τα εργαστηριακά ευρήματα των ΜΔΣ και την προαναφερθείσα παθοφυσιολογία τους. Πιο συγκεκριμένα, στην ομάδα των ασθενών παρατηρήθηκε σημαντική μείωση της αιμοσφαιρίνης (Hb) με παράλληλη μείωση του αιματοκρίτη (Hct) και του αριθμού των ερυθρών αιμοσφαιρίων (RBCs), ευρήματα που συνηγορούν στην ύπαρξη **αναιμίας**, χαρακτηριστικό επακόλουθο της δυσερυθροποίησης, που λαμβάνει χώρα στα ΜΔΣ. Ακόμη, βρέθηκε χαμηλός αριθμός λευκών αιμοσφαιρίων (WBCs) και αιμοπεταλίων (PLTs), αποδεικνύοντας την ύπαρξη **λευκοπενίας** και **θρομβοπενίας**, εξίσου συνήθη εργαστηριακά ευρήματα των ΜΔΣ, τα οποία όπως προαναφέρθηκε διακρίνονται για την **πανκυτταροπενία** στο περιφερικό αίμα. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσίασαν οι αριθμοί των λεμφοκυττάρων (LY) και των μονοκυττάρων (MO), οι οποίοι βρέθηκαν αυξημένοι, παρά τη γενικότερη κυτταροπενία. Μάλιστα, ο αριθμός των μονοκυττάρων επέδειξε στατιστικά μεγάλη απόκλιση από την ανώτατη φυσιολογική τιμή και στις δύο ομάδες έρευνας. Οι αυξημένες τιμές αυτών των κυττάρων μπορεί να είναι απότοκο της ανοσολογικής απορρύθμισης που συμβαίνει στο δυσπλαστικό μικροπεριβάλλον του μυελού των οστών. Όπως επισημάνθηκε και στην παράγραφο 1.2.3.6, στα αρχικά στάδια της νόσου, κατά την ανάπτυξη του συνδρόμου χαμηλού κινδύνου, παρατηρείται αύξηση, τόσο στον αριθμό, όσο και στην ανοσολογική λειτουργία των Tc λεμφοκυττάρων, γεγονός που μπορεί να δικαιολογεί την αύξηση των LYs στους ασθενείς της έρευνας. Από την άλλη, η αύξηση των μονοκυττάρων μπορεί να οφείλεται στην υπερλειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος, κατά την έναρξη της νόσου, και στην επακόλουθη πυροδοτούμενη φλεγμονή ή πιθανά να προδίδει το μετασχηματισμό του συνδρόμου σε οξεία μυελογενή λευχαιμία (OML), η οποία χαρακτηρίζεται από ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό των κυττάρων της μυελοειδούς σειράς.

Όσον αφορά τους ερυθροκυτταρικούς δείκτες και τους δείκτες των αιμοπεταλίων, βρέθηκαν αυξημένοι οι δείκτες MCV, RDW, MCH, MPV και PDW, με τον RDW να υπερβαίνει το εύρος των φυσιολογικών τιμών, ενώ μειωμένος βρέθηκε ο δείκτης MCHC, κάτω από τα φυσιολογικά όρια. Ο **MCV** αντιπροσωπεύει τον μέσο όγκο των ερυθροκυττάρων και η αύξηση του υποδηλώνει την ύπαρξη **μακροκυττάρωσης**, δηλαδή την παρουσία ερυθρών αιμοσφαιρίων με μεγαλύτερο μέγεθος από το φυσιολογικό, ενώ η μείωση του την ύπαρξη μικροκυττάρωσης, δηλαδή ερυθρά αιμοσφαίρια με μικρότερο μέγεθος από το φυσιολογικό. Επιπλέον, η αύξηση του μπορεί να οφείλεται στην **παρουσία δικτυοερυθροκυττάρων** στο περιφερικό αίμα, τα οποία έχουν μεγαλύτερο μέγεθος από τα ερυθροκύτταρα. Τα δεδομένα αυτά συνάδουν με τα χαρακτηριστικά των ΜΔΣ, στα οποία μπορεί να εντοπίζονται δικτυοερυθροκύτταρα, άωρες μορφές ερυθροκυττάρων και μακροκύτταρα στο περιφερικό αίμα των ασθενών, ως απόρροια της αναποτελεσματικής ερυθροποίησης. Μάλιστα, σε πρόσφατη μελέτη, η οποία διερεύνησε τους αιματολογικούς δείκτες σε δύο ομάδες πληθυσμών, τους ασθενείς με ΜΔΣ και εκείνους με άλλα είδη κυτταροπενίας, βρέθηκε αυξημένο το κλάσμα των ανώριμων δικτυοερυθροκυττάρων στο περιφερικό αίμα IRF (immature reticulocyte fraction). Ο **RDW** αντικατοπτρίζει το εύρος κατανομής του μεγέθους των ερυθροκυττάρων κι αποτελεί τον δείκτη **ανισοκυττάρωσης**, δηλαδή την ένδειξη παρουσίας ερυθρών αιμοσφαιρίων με ακανόνιστο κι ανώμαλο σχήμα στο περιφερικό αίμα. Ως εκ τούτου, η σημαντική αύξηση του στην ομάδα των ασθενών μπορεί να αποδεικνύει την παρουσία, τόσο ανισοκυττάρωσης, όσο και **δίμορφου πληθυσμού ερυθροκυττάρων**. Πράγματι, όπως περιγράφηκε και στην παράγραφο 1.2.4, η δυσπλασία της ερυθροκυτταρικής σειράς πιθανόν να εκδηλώνεται με την ύπαρξη δύο διαφορετικών πληθυσμών ερυθροκυττάρων στο περιφερικό αίμα των ασθενών, εκ των οποίων ο ένας αποτελεί τον φυσιολογικό πληθυσμό ερυθρών αιμοσφαιρίων, ενώ ο άλλος αντιπροσωπεύει τον νεοπλασματικό κλώνο, παρουσιάζοντας μακροκυττάρωση ή μικροκυττάρωση. Η συσχέτιση του αυξημένου RDW στα ΜΔΣ με την ύπαρξη διμορφισμού στο περιφερικό αίμα επιβεβαιώνεται κι από πρόσφατη έρευνα, η οποία αποκάλυψε, επίσης, τη σύνδεση μεταξύ της αύξησης του RDW με τη δυσερυθροποίηση, την ελαττωματική σύνθεση αιμοσφαιρίνης και τον απορυθμισμένο μεταβολισμό του σιδήρου. [64,65] Επιπρόσθετα, ο δείκτης **MCHC**, δηλαδή η μέση συγκέντρωση αιμοσφαιρίνης στα ερυθρά αιμοσφαίρια, ήταν σημαντικά μειωμένος, πιθανόν λόγω της αναιμίας. Παρά τη μείωση του MCHC, το μέσο βάρος της αιμοσφαιρίνης στο κάθε ερυθρό αιμοσφαίριο, που εκφράζεται με τον δείκτη **MCH**, ήταν αυξημένο στους ασθενείς. Η αύξηση του MCH ενδέχεται να είναι αποτέλεσμα της **ελαττωματικής σύνθεσης αιμοσφαιρίνης**, που συμβαίνει στα ΜΔΣ. Πράγματι, μια μελέτη σε ασθενείς με αναιμία Diamond Blackfan και ΜΔΣ τύπου del(5q), έδειξε αύξηση των δεικτών MCV και MCH, με ταυτόχρονη

μακροκυττάρωση. Στη συγκεκριμένη μελέτη, οι ερευνητές απέδειξαν την καθυστερημένη σύνθεση των σφαιρινών, σε αντίθεση με την ταχεία σύνθεση της αίμης, στους υπό εξέταση ασθενείς, οδηγώντας σε συσσώρευση περίσσειας αίμης-σιδήρου και δραστικών ειδών οξυγόνου στα προγονικά ερυθροειδή κύτταρα. Η περίσσεια αίμης είναι τοξική για τα κύτταρα κι επάγει τον κυτταρικό θάνατο. Έτσι, οι ερευνητές υπέθεσαν ότι οι αυξημένες τιμές των MCH και MCV οφείλονταν στη συνεχή διέγερση της σύνθεσης σφαιρινών, από την περίσσεια αίμης, ως αντισταθμιστικός μηχανισμός του κυττάρου, για τη δέσμευση της ελεύθερης αίμης στην αιμοσφαιρίνη και την αποφυγή των τοξικών της επιδράσεων. Είναι, λοιπόν, πιθανό, γενικότερα στα ΜΔΣ, οι πρόδρομοι ερυθροβλάστες να επιταχύνουν τη σύνθεση σφαιρινών, ως απόκριση στην ταχεία παραγωγή αίμης, με σκοπό την επιβίωση και κατ' επέκταση τη συνέχιση της ωρίμανσης τους. Συνεπώς, η αύξηση των σφαιρινών στο ερυθροκύτταρο μπορεί να αυξήσει τον δείκτη MCH. Τέλος, όσον αφορά τους αιμοπεταλιακούς δείκτες, παρατηρείται αύξηση του μέσου όγκου των αιμοπεταλίων (**MPV**), καθώς και του εύρους κατανομής μεγέθους των αιμοπεταλίων (**PDW**), λόγω των μορφολογικών ανωμαλιών στη μεγακαρυοκυτταρική σειρά, που προαναφέρθηκαν στην παράγραφο 1.2.4. [66]

Η δοκιμασία της κρυσταλλοποίησης δεν επέδειξε στατιστικά σημαντικά ευρήματα. Αναλυτικότερα, τα ποσοστά κρυσταλλοποίησης, δηλαδή οι τιμές της ελεύθερης αιμοσφαιρίνης ύστερα από την ψύξη των ερυθρών αιμοσφαιρίων, ήταν σχεδόν ίδιες στις δύο ομάδες, με ελάχιστη μείωση σε αυτήν των ασθενών. Το αποτέλεσμα αυτό πιθανόν να οφείλεται στην αναιμία των ασθενών και να δικαιολογείται από τα παραπάνω προαναφερθέντα αποτελέσματα, όπου βρέθηκε χαμηλή αιμοσφαιρίνη (Hb) και MCHC στους ασθενείς. Παρά ταύτα, οι τιμές στην ομάδα των ασθενών είχαν μεγαλύτερη τυπική απόκλιση, σε σύγκριση με τους υγιείς, δηλαδή τα ποσοστά κρυσταλλοποίησης διασπείρονταν ανομοιόμορφα σε ένα μεγάλο φάσμα τιμών, σχετικά μακριά από την τιμή του μέσου όρου. Αντίθετα, οι τιμές των υγιών ήταν συγκεντρωμένες κοντά στο μέσο όρο, με ελάχιστες από αυτές να αποκλίνουν σημαντικά από τη μέση τιμή. Κατά συνέπεια, από τα αποτελέσματα της έρευνας, δεν προκύπτει συσχέτιση της δοκιμασίας της κρυσταλλοποίησης με τις πιθανές βλάβες στη δομή και τη μορφολογία των παθολογικών ερυθρών αιμοσφαιρίων στα ΜΔΣ. Ωστόσο, για την περαιτέρω επιβεβαίωση της χρησιμότητας της στη διάγνωση των ΜΔΣ, χρειάζεται να γίνουν επιπλέον μελέτες με μεγαλύτερο δείγμα ασθενών και controls.

Τέλος, τα αποτελέσματα της δοκιμασίας της άμεσης Coombs ήταν όλα αρνητικά, συνεπώς δε βρέθηκαν αυτοάνοσες εκδηλώσεις εναντίον των ερυθρών αιμοσφαιρίων στους ασθενείς με ΜΔΣ. Και σε αυτή την περίπτωση, είναι αναγκαία η περαιτέρω εκτέλεση του πειράματος σε μεγαλύτερο δείγμα ασθενών, για τη διεξαγωγή ασφαλέστερων συμπερασμάτων.

5. Συμπεράσματα

Συμπερασματικά, οι ασθενείς με μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα εμφανίζουν πολλαπλές αιματολογικές διαταραχές, οι οποίες αντικατοπτρίζονται στη γενική αίματος, με την αναιμία, τη λευκοπενία και τη θρομβοπενία, με την αύξηση των ερυθροκυτταρικών και αιμοπεταλιακών δεικτών, MCV, MCH, RDW και MPV, PDW, αντίστοιχα, καθώς και με τη σημαντική μείωση του ερυθροκυτταρικού δείκτη MCHC. Από τη δοκιμασία της κρυσταλλοποίησης, προκύπτει η υπόθεση, ότι τα ελαφρώς χαμηλότερα ποσοστά ελεύθερης αιμοσφαιρίνης στο πλάσμα των ασθενών, συγκριτικά με των υγιών, ύστερα από καταπόνηση των ερυθρών αιμοσφαιρίων, με την επώαση τους σε υπέρτονο μέσο και την απότομη αλλαγή θερμοκρασίας, οφείλονται στην **αναιμία**, που διακρίνει τα μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα. Επιπλέον, δεν αναδεικνύεται κάποια συσχέτιση μεταξύ της δοκιμασίας της κρυσταλλοποίησης με τη διάγνωση δομικών βλαβών στις διασυνδέσεις του κυτταροσκελετού και της μεμβράνης του ερυθροκυττάρου, όπως προτάθηκε αρχικά, με βάση τη χρήση της στη διάγνωση της κληρονομικής σφαιροκυττάρωσης. Ωστόσο, αξίζει να αναφερθεί ότι το τεστ κρυσταλλοποίησης υπολείπεται έρευνας και χρήζει περισσότερης εμβάθυνσης, για την κατανόηση του μηχανισμού επίδρασης του στο ερυθροκύτταρο και κατ' επέκταση την ένταξη του στις διαγνωστικές και ερευνητικές διαδικασίες των αιματολογικών διαταραχών. Τέλος, από το τεστ Άμεσης Coombs δεν προκύπτει η ύπαρξη αντι-ερυθροκυτταρικών αντισωμάτων ή συμπληρώματος στην επιφάνεια των ερυθροκυττάρων. Όμως και σε αυτή την περίπτωση κρίνεται αναγκαία η ανάλυση μεγαλύτερου δείγματος ατόμων, για την πιθανή εύρεση αυτοάνοσων εκδηλώσεων στο περιφερικό αίμα των ασθενών με μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα.

6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Mescher A. L. Junqueira's Basic Histology: Text and Atlas. 13th ed. New York: Mc Graw Hill; 2013.
2. Kierszenbaum A. L., Tres L. L. Histology and Cell Biology: An Introduction to Pathology. 3rd ed. New York: Elsevier; 2012.
3. Rieger M. A., Schroeder T. Hematopoiesis. Cold Spring Harbor Perspectives in Biology. 2012; 4(12): a008250. DOI: 10.1101/cshperspect.a008250
4. Doulatov S., Notta F., Laurenti E., Dick J. E. Hematopoiesis: A Human perspective. Cell Stem Cell. 2012; 10(2): 120-136. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.stem.2012.01.006>
5. Belyavsky A., Petinati N., Drize N. Hematopoiesis during Ontogenesis, Adult Life, and Aging. International Journal of Molecular Sciences. 2021; 22(17): 9231. DOI: 10.3390/ijms22179231
6. Ciau-Uitz A., Monteiro R., Kirmizitas A., Patient R. Developmental Hematopoiesis: Ontogeny, genetic programming and conservation. Experimental Hematology. 2014; 42(8):669-683. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.exphem.2014.06.001>
7. Orkin S. H., Zon L. I. Hematopoiesis: An Evolving Paradigm for Stem Cell Biology. Cell. 2008; 132(4): 631-644. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.01.025>
8. Cheng H., Zheng Z., Cheng T. New paradigms on hematopoietic stem cell differentiation. Protein & Cell. 2020; 11(1): 34–44. DOI: 10.1007/s13238-019-0633-0
9. Wasnik S., Tiwari A., Kirkland M. A., Pande G. International Review of Cell and Molecular Biology. Burlington: Academic Press; 2012. Available from: [https://www.academia.edu/11999824/Osteohematopoietic Stem Cell Niches in Bone Marrow](https://www.academia.edu/11999824/Osteohematopoietic_Stem_Cell_Niches_in_Bone_Marrow)
10. Lucas D. Structural organization of the bone marrow and its role in hematopoiesis. Current Opinion in Hematology. 2021; 28(1): 36-42. DOI: 10.1097/MOH.0000000000000621
11. Wu Q., Zhang J., Lucas D. Anatomy of Hematopoiesis and Local Microenvironments in the Bone Marrow. Where to? Frontiers in Immunology. 2021; 12: 768439. DOI: 10.3389/fimmu.2021.768439
12. Anthony B., Link D. C. Regulation of Hematopoietic Stem Cells by Bone Marrow Stromal Cells. Trends in Immunology. 2014; 35(1): 32–37. DOI: 10.1016/j.it.2013.10.002
13. Galán-Díez M., Cuesta-Domínguez A., Kousteni S. The Bone Marrow Microenvironment in Health and Myeloid Malignancy. Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine. 2018; 8(7): a031328. DOI: 10.1101/cshperspect.a031328

14. Nandakumar S. K., Ulirsch J.C., Sankaran V. G. Advances in Understanding Erythropoiesis: Evolving Perspectives. *British Journal of Haematology*. 2016; 173(2): 206–218. DOI: 10.1111/bjh.13938
15. Bhoopalan S. V., Jun-shen Huang L., Weiss M. J. Erythropoietin regulation of red blood cell production: from bench to bedside and back. *F1000 Research*. 2020; 9: F1000 Faculty Rev-1153. DOI: 10.12688/f1000research.26648.1
16. Yeo J. H., Lam Y. W., Fraser S. T. Cellular dynamics of mammalian red blood cell production in the erythroblastic island niche. *Biophysical Reviews*. 2019; 11(6): 873–894. DOI: 10.1007/s12551-019-00579-2
17. Manwani D., Bieker J. J. The Erythroblastic Island. *Current Topics in Developmental Biology*. 2008; 82: 23–53. DOI: 10.1016/S0070-2153(07)00002-6
18. An X., Mohandas N. Erythroblastic islands, terminal erythroid differentiation and reticulocyte maturation. *International Journal of Hematology*. 2011; 93(2): 139–143. DOI: 10.1007/s12185-011-0779-x.
19. Dzierzak E., Philipsen S. Erythropoiesis: Development and Differentiation. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*. 2013; 3(4): a011601. DOI: 10.1101/cshperspect.a011601
20. Barminko J., Reinholt B., Baron M. H. Development and differentiation of the erythroid lineage in mammals. *Developmental & Comparative Immunology*. 2016; 58: 18–29. DOI: 10.1016/j.dci.2015.12.012
21. Gurkan U. A. Biophysical and rheological biomarkers of red blood cell physiology and pathophysiology. *Current Opinion in Hematology*. 2021; 28(3): 138–149. DOI: 10.1097/MOH.0000000000000639
22. Pretini V., H. Koenen M. H., Kaestner L., Fens M. H. A. M., Schiffelers R. M., Bartels M., Wijk R. Red Blood Cells: Chasing Interactions. *Frontiers in Physiology*. 2019; 10: 945. DOI: 10.3389/fphys.2019.00945
23. Kuhn V., Diederich L., Keller S. T.C, IV, Kramer C. M., Lückstädt W., Panknin C., Suvorava T., Isakson B. E., Kelm M., Cortese-Krott M. M. Red Blood Cell Function and Dysfunction: Redox Regulation, Nitric Oxide Metabolism, Anemia. *Antioxidants & Redox Signaling*. 2017; 26(13): 718–742. DOI: 10.1089/ars.2016.6954
24. Bryk A. H., Wisniewski J. R. Quantitative Analysis of Human Red Blood Cell Proteome. *Journal of Proteome Research*. 2017;16(8): 2752–2761. DOI: 10.1021/acs.jproteome.7b00025
25. Gupta A. S. Hemoglobin-based oxygen carriers: current state-of-the-art and novel molecules. *SHOCK*. 2019; 52(1): 70–83. DOI: 10.1097/SHK.0000000000001009

- 26.** Cortese-Krott M. M., Kelm M. Endothelial nitric oxide synthase in red blood cells: Key to a new erythrocrine function. *Redox Biology*. 2014; 2: 251–258. DOI: 10.1016/j.redox.2013.12.027
- 27.** Litvinov R. I., Weisel J. W. Role of red blood cells in haemostasis and thrombosis. *ISBT Science Series*. 2017; 12(1): 176–183. DOI: 10.1111/voxs.12331
- 28.** Kulandavelu S., Balkan W., Hare J. M. Regulation of oxygen delivery to the body via hypoxic vasodilation. *PNAS*. 2015; 112(20): 6254–6255. DOI: 10.1073/pnas.1506523112
- 29.** Pasricha S. The Red Cell Membrane, Part 1: The Role of the Red Cell Membrane. *Clinical Advances in Hematology & Oncology*. 2014; 12(8): 533-5.
- 30.** Tzounakas V. Red blood cell aging and death signaling in vivo and in vitro (Doctoral dissertation). Athens; 2015. DOI: 10.12681/eadd/36173
- 31.** Mohandas N., Gallagher P. G. Red cell membrane: past, present, and future. *Blood*. 2008; 112(10): 3939–3948. DOI: 10.1182/blood-2008-07-161166
- 32.** Risinger M., Kalfa T. A. Red cell membrane disorders: structure meets function. *Blood*. 2020; 136(11): 1250–1261. DOI: 10.1182/blood.2019000946
- 33.** Lux S. E. Anatomy of the red cell membrane skeleton: unanswered questions. *Blood*. 2016; 127(2): 187–199. DOI: 10.1182/blood-2014-12-512772
- 34.** Pretini V., Koenen M. H., Kaestner L., Fens M. H. A. M., Schiffelers R. M., Bartels M., Wijk R. V. Red Blood Cells: Chasing Interactions. *Frontiers in Physiology*. 2019; 10: 945. DOI: 10.3389/fphys.2019.00945
- 35.** Li H., Lykotrafitis G. Erythrocyte Membrane Model with Explicit Description of the Lipid Bilayer and the Spectrin Network. *Biophysical Journal*. 2014; 107(3): 642–653. DOI: 10.1016/j.bpj.2014.06.031
- 36.** Zini G. Diagnostics and Prognostication of Myelodysplastic Syndromes. *Annals of Laboratory Medicine*. 2017; 37(6): 465–474. DOI: 10.3343/alm.2017.37.6.465
- 37.** Germing U., Kobbe G., Haas R., Gattermann N. Myelodysplastic Syndromes: Diagnosis, Prognosis, and Treatment. *Deutsches Arzteblatt International*. 2013; 110(46): 783–790. DOI: 10.3238/arztebl.2013.0783
- 38.** Bannon S. A., DiNardo C. D. Hereditary Predispositions to Myelodysplastic Syndrome. *International Journal of Molecular Sciences*. 2016; 17(6): 838. DOI: 10.3390/ijms17060838
- 39.** Crisà E., Boggione P., Nicolosi M., Mahmoud A. M., Essa W. A., Awikeh B., Aspesi A., Andorno A., Boldorini R., Dianzani I., Gaidano G., Patriarca A. Genetic Predisposition to Myelodysplastic Syndromes: A Challenge for Adult Hematologists. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021; 22(5): 2525. DOI: 10.3390/ijms22052525

40. Lindsley R. C., Ebert B. L. Molecular Pathophysiology of Myelodysplastic Syndromes. *Annual Reviews*. 2013; 8: 21–47. DOI: 10.1146/annurev-pathol-011811-132436
41. Lee P., Yim R., Yung Y., Chu H-T, Yip P-K, Gill H. Molecular Targeted Therapy and Immunotherapy for Myelodysplastic Syndrome. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021; 22(19): 10232. DOI: 10.3390/ijms221910232
42. Harada H., Harada Y. Recent advances in myelodysplastic syndromes: Molecular pathogenesis and its implications for targeted therapies. *Cancer Science*. 2015; 106(4): 329–336. DOI: 10.1111/cas.12614
43. Dussiau C., Fontenay M. Mechanisms underlying the heterogeneity of myelodysplastic syndromes. *Experimental Hematology*. 2018; 58:17-26 DOI: 10.1016/j.exphem.2017.10.004
44. Shih A. H., Levine R. L. Molecular Biology of Myelodysplastic syndromes. *Seminars in Oncology*. 2011; 38(5): 613–620. DOI: 10.1053/j.seminoncol.2011.04.013
45. Tropp Burton E. *Principles of Molecular Biology*. First edition. Burlington: Jones & Bartlett Learning LLC;2014.
46. Giassafaki L-P. Analysis of the role of methyltransferase EZH2 in Chronic Lymphocytic Leukemia (Master thesis). Thessaloniki; 2016.
47. Issa J-P. Epigenetic Changes in the Myelodysplastic Syndrome. *Hematology/oncology clinics of North America*. 2010; 24(2): 317–330. DOI: 10.1016/j.hoc.2010.02.007
48. Gelsi-Boyer V., Brecqueville M., Devillier R., Murati A., Marie-Joelle Mozziconacci M-J., Birnbaum D. Mutations in *ASXL1* are associated with poor prognosis across the spectrum of malignant myeloid diseases. *Journal of Hematology & Oncology*. 2012; 5:12. DOI: 10.1186/1756-8722-5-12.
49. Wang C., Yang Y., Gao S., Chen J., Yu J., Zhang H., Li M., Zhan X., Li W. Immune dysregulation in myelodysplastic syndrome: Clinical features, pathogenesis and therapeutic strategies. *Critical reviews in oncology/hematology*. 2018; 122:123-132. DOI: 10.1016/j.critrevonc.2017.12.013.
50. Invernizzi R., Quaglia F., Della Porta M. G. Importance of Classical Morphology in the Diagnosis of Myelodysplastic Syndrome. *Mediterranean journal of hematology and infectious diseases*. 2015; 7(1): e2015035. DOI: 10.4084/MJHID.2015.035
51. Tria F. P., Ang D. C., Fan G. Myelodysplastic Syndrome: Diagnosis and Screening. *Diagnostics (Basel)*. 2022; 12(7): 1581. DOI: 10.3390/diagnostics12071581
52. Girard S., Genevieve F., Rault E., Fenneteau O., Lesesve J-F. When Ring Sideroblasts on Bone Marrow Smears Are Inconsistent with the Diagnosis of

Myelodysplastic Neoplasms. *Diagnostics (Basel)*. 2022; 12(7): 1752. DOI: 10.3390/diagnostics12071752

53. Tobiasson M., Kittang A. O. Treatment of myelodysplastic syndrome in the era of next-generation sequencing. *Journal of Internal Medicine*. 2019; 286(1): 41-62. DOI: 10.1111/joim.12893.

54. Adès L., Itzykson R., Fenaux P. Myelodysplastic syndromes. *The Lancet*. 2014; 383(9936): 2239-52. DOI: 10.1016/S0140-6736(13)61901-7.

55. Huang H., Xu C., Gao J., Bing Li, Qin T., Xu Z., Ren S., Zhang Y., Jiao M., Qu S., Pan L., Hu N., Liu J., Cai W., Zhang Y., Wu D., Zhang P., Gale R. P., Gang Huang, Zhou J., Shi L., Xiao Z. Severe ineffective erythropoiesis discriminates prognosis in myelodysplastic syndromes: analysis based on 776 patients from a single centre. *Blood Cancer Journal*. 2020; 10(8): 83. DOI: 10.1038/s41408-020-00349-4

56. Majumder D., Banerjee D., Chandra S., Banerjee S., Chakrabarti A. Red cell morphology in leukemia, hypoplastic anemia and myelodysplastic syndrome. *Pathophysiology*. 2006; 13(4): 217-225. DOI: 10.1016/j.pathophys.2006.06.002

57. Basu S., Banerjee D., Ghosh M., Chakrabarti A. Erythrocyte membrane defects and asymmetry in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria and myelodysplastic syndrome. *Hematology*. 2010; 15(4):236-9. DOI: 10.1179/102453309X12583347114095

58. Hollox E. J., Louzada S. Genetic variation of glycophorins and infectious disease. *Immunogenetics*. 2023;75(3):201-206. DOI: 10.1007/s00251-022-01280-7

59. Uman N., Kobbuaklee S., Kansuwan P., Watanaboonyongcharoen P., Polprasert C. Detection of Red Blood Cell Membrane Proteins in Myelodysplastic Syndromes Using Eosin-5-Maleimide (EMA) Staining by Flow Cytometry. *Hematology reports*. 2022; 14(1): 13–18. DOI: 10.3390/hematolrep14010003

60. Streichman S., Gescheidt Y. Cryohemolysis for the detection of hereditary spherocytosis: correlation studies with osmotic fragility and autohemolysis. *American journal of hematology*. 1998; 58(3): 206-12. DOI: 10.1002/(sici)1096-8652(199807)58:3<206::aid-ajh8>3.0.co;2-v

61. Iglauer A., Reinhardt D., Schröter W., Pekrun A. Cryohemolysis test as a diagnostic tool for hereditary spherocytosis. *Annals of hematology*. 1999; 78(12): 555-7. DOI: 10.1007/s002770050557.

62. Parker V., Tormey C. A. The Direct Antiglobulin Test: Indications, Interpretation, and Pitfalls. *Archives of pathology & laboratory medicine*. 2017; 141(2): 305-310. DOI: 10.5858/arpa.2015-0444-RS.

63. Grignano E., Jachiet V., Fenaux P., Ades L., Fain O., Mekinian A. Autoimmune manifestations associated with myelodysplastic syndromes.

Annals of hematology. 2018; 97(11): 2015-2023. DOI: 10.1007/s00277-018-3472-9.

64. Baba Y., Saito B., Shimada S., Sasaki Y., Murai S., Abe M., Fujiwara S., Arai N., Kawaguchi Y., Kabasawa N., Tsukamoto H., Uto Y., Ariizumi H., Yanagisawa K., Hattori N., Harada H., Nakamaki T. Association of red cell distribution width with clinical outcomes in myelodysplastic syndrome. *Leukemia research*. 2018; 67:56-59. DOI: 10.1016/j.leukres

65. Hwang S. M., Nam Y. Complete blood count and cell population data parameters from the Abbott Alinity hq analyzer are useful in differentiating myelodysplastic syndromes from other forms of cytopenia. *International journal of laboratory hematology*. 2022; 44(3):468-476 DOI: 10.1111/ijlh.13777.

66. Yang Z., Keel S. B., Shimamura A., Liu L., Gerds A. T., Li H. Y., Wood B. L., Scott B. L., Abkowitz J. L. Delayed globin synthesis leads to excess heme and the macrocytic anemia of Diamond Blackfan anemia and del(5q) myelodysplastic syndrome. *Science translational medicine*. 2016; 8(338): 338ra67. DOI: 10.1126/scitranslmed.aaf3006

Πηγές Εικόνων:

1. Pretini V., H. Koenen M. H., Kaestner L., Fens M. H. A. M., Schiffelers R. M., Bartels M., Wijk R. Red Blood Cells: Chasing Interactions. *Frontiers in Physiology*. 2019; 10: 945. DOI: 10.3389/fphys.2019.00945
2. Cheng H., Zheng Z., Cheng T. New paradigms on hematopoietic stem cell differentiation. *Protein & Cell*. 2020; 11(1): 34–44. DOI: 10.1007/s13238-019-0633-0
3. Ugarte F., Forsberg E. C. Haematopoietic stem cell niches: new insights inspire new questions. *The EMBO Journal*. 2013; 32(19): 2535–2547. DOI: 10.1038/emboj.2013.201
4. Comazzetto S., Shen B., Morrison S. J. Niches that regulate stem cells and hematopoiesis in adult bone marrow. *Developmental cell*. 2021; 56(13): 1848–1860. DOI: 10.1016/j.devcel.2021.05.018
5. Zivot A., Lipton J. M., Narla A., Blanc L. Erythropoiesis: insights into pathophysiology and treatments in 2017. *Molecular Medicine*. 2018; 24: 11. DOI: 10.1186/s10020-018-0011-z
6. Dzierzak E., Philipsen S. Erythropoiesis: Development and Differentiation. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*. 2013; 3(4): a011601. DOI: 10.1101/cshperspect.a011601
7. Yeo J. H., Lam Y. W., Fraser S. T. Cellular dynamics of mammalian red blood cell production in the erythroblastic island niche. *Biophysical Reviews*. 2019; 11(6): 873–894. DOI: 10.1007/s12551-019-00579-2
8. Mohandas N., Gallagher P. G. Red cell membrane: past, present, and future. *Blood*. 2008; 112(10): 3939–3948. DOI: 10.1182/blood-2008-07-161166
9. Gurkan U. A. Biophysical and rheological biomarkers of red blood cell physiology and pathophysiology. *Current Opinion in Hematology*. 2021; 28(3): 138–149. DOI: 10.1097/MOH.0000000000000639
10. Risinger M., Kalfa T. A. Red cell membrane disorders: structure meets function. *Blood*. 2020; 136(11): 1250–1261. DOI: 10.1182/blood.2019000946
11. Harada H., Harada Y. Recent advances in myelodysplastic syndromes: Molecular pathogenesis and its implications for targeted therapies. *Cancer Science*. 2015; 106(4): 329–336. DOI: 10.1111/cas.12614
12. Adès L., Itzykson R., Fenaux P. Myelodysplastic syndromes. *The Lancet*. 2014; 383(9936): 2239-52. DOI: 10.1016/S0140-6736(13)61901-7.
13. Odenike O., Anastasi J., Le Beau M. M. Myelodysplastic Syndromes. *Clinics in laboratory medicine*. 2011; 31(4): 763–784. DOI: 10.1016/j.cll.2011.08.005

- 14.** Tria F. P., Ang D. C., Fan G. Myelodysplastic Syndrome: Diagnosis and Screening. *Diagnostics* (Basel). 2022; 12(7): 1581. DOI: 10.3390/diagnostics12071581
- 15.** Goasguen J. E., Bennett J. M., Bain B. J., Brunning R., Vallespi M-T., Tomonaga M., Zini G., Renault A. Dyserythropoiesis in the diagnosis of the myelodysplastic syndromes and other myeloid neoplasms: problem areas. *British Journal of Haematology*. 2018; 182(4):526-533. DOI: 10.1111/bjh.15435.
- 16.** Majumder D., Banerjee D., Chandra S., Banerjee S., Chakrabarti A. Red cell morphology in leukemia, hypoplastic anemia and myelodysplastic syndrome. *Pathophysiology*. 2006; 13(4): 217-225. DOI: 10.1016/j.pathophys.2006.06.002