

ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ



026000200058



AA A
610
620
9002

262





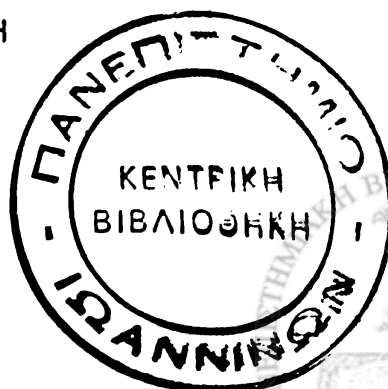
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ
ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΟΣ ΤΟΜΕΑΣ
ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ
ΜΟΝΑΔΑ ΑΙΜΑΤΟΛΟΓΙΑΣ
ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ: ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ Ε.Β. ΤΣΙΑΝΟΣ

IN VIVO ΚΑΙ VITRO ΕΠΙΔΡΑΣΗ
ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΕΝΗΣ ΑΝΘΡΩΠΙΝΗΣ
ΕΡΥΘΡΟΠΟΙΗΤΙΝΗΣ
ΣΤΑ ΜΥΕΛΟΔΥΣΠΛΑΣΤΙΚΑ ΣΥΝΔΡΟΜΑ

ΠΑΥΛΙΝΑ ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΙΔΟΥ
ΙΑΤΡΟΣ ΑΙΜΑΤΟΛΟΓΟΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2002



ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Κωνσταντίνος Μπουραντάς

Καθηγητής Παθολογίας-Αιματολογίας Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, Επιβλέπων

Βασιλική Μαλάμου-Μήτσι

Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομίας Πανεπιστημίου

Ιωαννίνων, Μέλος

Ελισάβετ Ιωαννίδου-Παπαγιαννάκη

Επίκουρη Καθηγήτρια Παθολογίας-Αιματολογίας Αριστοτελείου Πανεπιστημίου

Θεσσαλονίκης, Μέλος



ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Κωνσταντίνος Μπουραντάς

Καθηγητής Παθολογίας-Αιματολογίας Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, Επιβλέπων

Νίκη Αγνάντη

Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομίας Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, Μέλος

Αγαθοκλής Τσατσούλης

Καθηγητής Παθολογίας-Ενδοκρινολογίας Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, Μέλος

Κωνσταντίνος Σεφεριάδης

Καθηγητής Βιολογικής Χημείας Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, Μέλος

Βασιλική Μαλάμου-Μήτση

**Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομίας Πανεπιστημίου
Ιωαννίνων, Μέλος**

Ελισάβετ Ιωαννίδου-Παπαγιαννάκη

**Επίκουρη Καθηγήτρια Παθολογίας-Αιματολογίας Αριστοτελείου Πανεπιστημίου
Θεσσαλονίκης, Μέλος**

Ιωάννης Γεωργίου

**Επίκουρος Καθηγητής της Γενετικής της Μαιευτικής-Γυναικολογικής Κλινικής
Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, Μέλος**



ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Οι άνθρωποι είναι διαφορετικοί. Ο καθένας έχει τον δικό του τρόπο να βλέπει τον κόσμο. Ο καθένας έχει τον δικό του τρόπο να αισθάνεται. Ο καθένας έχει τον δικό του τρόπο να σκέφτεται. Ο καθένας έχει τον δικό του τρόπο να ζει. Ο καθένας έχει τον δικό του τρόπο να αγαπά. Ο καθένας έχει τον δικό του τρόπο να πεθαίνει.

Στην οικογένειά μου

Οι άνθρωποι είναι διαφορετικοί. Ο καθένας έχει τον δικό του τρόπο να βλέπει τον κόσμο. Ο καθένας έχει τον δικό του τρόπο να αισθάνεται. Ο καθένας έχει τον δικό του τρόπο να σκέφτεται. Ο καθένας έχει τον δικό του τρόπο να ζει. Ο καθένας έχει τον δικό του τρόπο να αγαπά. Ο καθένας έχει τον δικό του τρόπο να πεθαίνει.

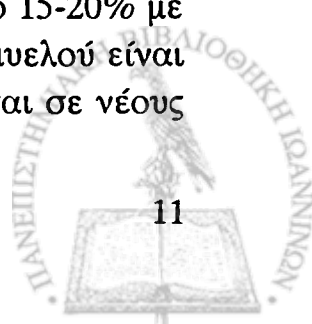
Οι άνθρωποι είναι διαφορετικοί. Ο καθένας έχει τον δικό του τρόπο να βλέπει τον κόσμο. Ο καθένας έχει τον δικό του τρόπο να αισθάνεται. Ο καθένας έχει τον δικό του τρόπο να σκέφτεται. Ο καθένας έχει τον δικό του τρόπο να ζει. Ο καθένας έχει τον δικό του τρόπο να αγαπά. Ο καθένας έχει τον δικό του τρόπο να πεθαίνει.



ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Τα Μυελοδυσπλαστικά Σύνδρομα (ΜΔΣ) αποτελούν μία ομάδα κλωνικών διαταραχών του αρχέγονου αιμοποιητικού κυττάρου (stem cell) και χαρακτηρίζονται από διαταραχή της αιμοποιητικής διαφοροποίησης και ωρίμανσης. Εκδηλώνονται σαν περιφερικές κυτταροπενίες με δυσλειτουργικά στοιχεία αίματος, υπερπλαστικό μυελό και έχουν μεγάλη τάση εξέλιξης σε οξεία μυελοβλαστική λευχαιμία. Αναιμία παρατηρείται στο 90% των ασθενών με ΜΔΣ, ενώ ουδετεροπενία και/ ή θρομβοπενία εμφανίζονται επίσης συχνά. Η Γαλλική-Αμερικανική-Βρετανική (French-American-British, FAB) ταξινόμηση (Bennett et al, 1982) αναγνώρισε πέντε υπότυπους [Ανθεκτική αναιμία (Refractory anaemia, RA), Ανθεκτική αναιμία με δακτυλιοειδείς σιδηροβλάστες (Refractory anaemia with ringed sideroblasts, RARS), Ανθεκτική αναιμία με περίσσεια βλαστών (Refractory anaemia with excess of blasts, RAEB), Ανθεκτική αναιμία με περίσσεια βλαστών σε μετατροπή (Refractory anaemia with excess of blasts in transformation, RAEB-T), Χρόνια Μυελομονοκυτταρική λευχαιμία (Chronic Myelomonocytic leukemia, CMML)], με προοδευτική ελάττωση της διάμεσης επιβίωσης και αυξανόμενο κίνδυνο εξέλιξης σε οξεία μυελογενή λευχαιμία. Χρωμοσωμικές ανωμαλίες παρατηρούνται στο 40-90% των ασθενών κατά την διάγνωση και σχετίζονται με κακή πρόγνωση.

Η θεραπεία στα ΜΔΣ περιλαμβάνει βασικά υποστηρικτικά μέτρα, όπως μεταγγίσεις ερυθρών αιμοσφαιρίων και αιμοπεταλίων, αντιβιοτικά και θεραπεία άλλων συνοδών διαταραχών. Προσπάθειες για αιματολογική βελτίωση με παράγοντες όπως πυριδοξίνη, ρετινοειδή και βιταμίνη D₃ είχαν απογοητευτικά αποτελέσματα. Χαμηλής δόσης κυτταροτοξική θεραπεία με αρασιτίνη και 5-αζακυτιδίνη, που χρησιμοποιήθηκαν σαν παράγοντες διαφοροποίησης, προκάλεσαν ανταπόκριση σε ποσοστό 15-20% με σημαντική όμως τοξικότητα από τον μυελό. Η μεταμόσχευση μυελού είναι το μόνο αποτελεσματικό θεραπευτικό μέτρο, αλλά εφαρμόζεται σε νέους



ασθενείς με HLA-συμβατούς δότες. Στην προσπάθεια μείωσης των κυτταροπενιών των ΜΔΣ αιμοποιητικοί παράγοντες όπως GM-CSF, G-CSF, r-HuEpo, IL-3, IL-6 μόνοι τους ή σε συνδυασμό απέτελεσαν πεδία έρευνας.

Μετά το 1990 αρκετοί συγγραφείς περιέγραψαν τα αποτελέσματα της κλινικής χρήσης της ανασυνδυασμένης ανθρώπινης Ερυθροποιητίνης για την θεραπεία της αναιμίας των ΜΔΣ και αναμφίβολα υπάρχουν ασθενείς που δείχνουν τόσο καλή ανταπόκριση, όσο και καλή ανοχή στην θεραπεία, αλλά η συνολική συχνότητα ανταπόκρισης είναι χαμηλή (15-30%).

Η χρήση των *in vitro* αιμοποιητικών συστημάτων καλλιιεργειών μας έχει εφοδιάσει με μεθόδους για την ανάλυση των αιμοποιητικών αρχέγονων και προγονικών κυτταρικών διαμερισμάτων, καθώς και των χυμικών παραγόντων που είναι υπεύθυνοι για την ρύθμιση του πολλαπλασιασμού και της διαφοροποίησής τους.

Σκοπός της παρούσης εργασίας ήταν: α) Η μελέτη της ερυθροποίησης ασθενών με ΜΔΣ σε καλλιέργειες βραχείας διάρκειας (ημίρρευστες καλλιέργειες) υπό την επίδραση διαφόρων συγκεντρώσεων ανθρώπινης ανασυνδυασμένης Ερυθροποιητίνης (rh-Epo) και η συσχέτιση της ανάπτυξης ερυθροκυτταρικών αποικιών με παραμέτρους όπως το φύλο και η αιμοσφαιρίνη του ασθενούς, η συγκέντρωση της rh-Epo και ο κατά FAB υπότυπος.

β) Η διερεύνηση της *in vivo* ανταπόκρισης στην θεραπεία με rh-Epo των ασθενών με ΜΔΣ και της συσχέτισης της με την *in vitro* ανάπτυξη αποικιών ερυθράς σειράς, στα πλαίσια της προσπάθειας ανεύρεσης προγνωστικών δεικτών ανταπόκρισης στην θεραπεία με Ερυθροποιητίνη.

Η μελέτη χωρίζεται σε δύο μέρη, γενικό και ειδικό.

Στο γενικό μέρος περιγράφονται τα Μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα: ιστορική αναδρομή, ταξινόμηση, παθογένεση, κλινικές εκδηλώσεις, διάγνωση, κλινικές ποικιλίες, πρόγνωση, θεραπεία. Στην συνέχεια αναλύεται η φυσιολογική αιμοποίηση και οι μέθοδοι καλλιιεργειών. Τέλος περιγράφεται η ερυθροποιητίνη, η σύνθεση της, η παραγωγή της, ο ρόλος της στην ερυθροποίηση, ο υποδοχέας της και οι οδοί μεταβίβασης των μηνυμάτων, καθώς και η φαρμακοκινητική και χρήση της ανασυνδυασμένης ανθρώπινης ερυθροποιητίνης.

Στο ειδικό μέρος περιγράφονται ο σκοπός, το υλικό, οι μέθοδοι και τα αποτελέσματα της έρευνας. Ακολουθεί συζήτηση των ευρημάτων και η συσχέτισή τους με τα βιβλιογραφικά δεδομένα, τα συμπεράσματα και η περίληψη της εργασίας.



Η εργασία αυτή άρχισε στο Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Ιωαννίνων και συνεχίστηκε και ολοκληρώθηκε στο Αιματολογικό Εργαστήριο της Β΄ Πανεπιστημιακής Παθολογικής Κλινικής του Ιπποκρατείου Νοσοκομείου Θεσσαλονίκης.

Επιθυμώ να αναφερθώ σε όλους όσους μου παραστάθηκαν στην υλοποίηση αυτής της μελέτης.

Αισθάνομαι την υποχρέωση να ευχαριστήσω θερμά τον Καθηγητή Παθολογίας-Αιματολογίας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων κ. Κωνσταντίνο Μπουραντά, κύριο επιβλέποντα της διατριβής μου, για την ανάθεση του ενδιαφέροντος αυτού θέματος, την συνεχή παρότρυνση και ενθάρρυνση για την συνέχιση και ολοκλήρωσή του, την λεπτομερή καθοδήγηση για την εκτέλεσή του, καθώς και για την κριτική ανάλυση των αποτελεσμάτων.

Επιθυμώ επίσης να ευχαριστήσω την Επίκουρη Καθηγήτρια Παθολογίας-Αιματολογίας της Β΄ Πανεπιστημιακής Παθολογικής Κλινικής του Ιπποκρατείου Νοσοκομείου Θεσσαλονίκης κ. Ελισάβετ Ιωαννίδου-Παπαγιαννάκη, μέλος της τριμελούς επιτροπής, η οποία με δίδαξε όλες τις μεθόδους των κυτταρικών καλλιέργειών και στάθηκε δίπλα μου σ' όλη την διάρκεια της μελέτης, ενθαρρύνοντάς με και δίνοντας λύσεις σε όλες τις δύσκολες φάσεις της διεξαγωγής της.

Ευχαριστώ θερμά την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια της Παθολογικής Ανατομίας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων κ. Βασιλική Μαλάμου-Μήτση, μέλος της τριμελούς επιτροπής, για την ηθική συμπαράσταση και ουσιαστική βοήθεια στην ολοκλήρωση αυτής της μελέτης.

Τον Αναπληρωτή Καθηγητή Αιματολογίας της Β΄ Πανεπιστημιακής Παθολογικής Κλινικής του Ιπποκρατείου Νοσοκομείου Θεσσαλονίκης κ. Ιωάννη Κλωνιζάκη ευχαριστώ για την αμέριστη συμπαράσταση και το ιδιαίτερο ενδιαφέρον του για την πορεία της εργασίας αυτής.



ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΡΟΛΟΓΟΣ	11
----------------	----

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΜΥΕΛΟΔΥΣΠΛΑΣΤΙΚΑ ΣΥΝΔΡΟΜΑ	21
Ορισμός	21
Ιστορία	21
Ομάδες Μυελοδυσπλαστικών συνδρόμων	22
Παθογένεση μυελοδυσπλαστικών συνδρόμων	24
<i>Μονοκλωνικότητα των ΜΔΣ</i>	24
<i>Κυτταρογενική</i>	24
<i>Αδρανοποίηση του Χ χρωμοσώματος στα ΜΔΣ</i>	26
<i>Άλλες μοριακές αλλοιώσεις στα ΜΔΣ</i>	27
<i>Μυελική ανεπάρκεια στα ΜΔΣ</i>	28
<i>Αιμοποιητικά προγονικά κύτταρα</i>	28
<i>Αιμοποιητικό μικροπεριβάλλον</i>	29
Περιγραφή	30
<i>Αιματολογικά ευρήματα</i>	31
<i>Δυσπλασία ερυθράς σειράς (Δυσερυθροποίηση)</i>	32
<i>Δυσπλασία κοκκιώδους σειράς</i>	33
<i>Δυσπλασία μεγακαρουκυτταρικής σειράς</i>	33
<i>Βλάστες στα Μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα</i>	34
<i>Τα πέντε μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα</i>	34
1. <i>Ανθεκτική αναιμία (RA)</i>	34
2. <i>Ανθεκτική αναιμία με δακτυλιοειδείς σιδηροβλάστες (RARS)</i>	35
3. <i>Ανθεκτική αναιμία με περίσσεια βλαστών (RAEB)</i>	36
4. <i>Χρόνια μυελομεγακαρυκυτταρική λευχαιμία (CMML)</i>	37
5. <i>Ανθεκτική αναιμία με περίσσεια βλαστών σε μετατροπή (RAEB-T)</i>	38



<i>Κλινικές ποικιλίες ΜΔΣ</i>	38
<i>Αλληλοεπικαλυπτόμενα Σύνδρομα-Υποκυτταρικά ΜΔΣ</i>	38
<i>ΜΔΣ με ίνωση</i>	38
<i>5q- Σύνδρομο</i>	39
<i>Χρόνια Μυελομονοκυτταρική Λευχαιμία (CMML)</i>	39
<i>Δευτεροπαθή ΜΔΣ (δ-ΜΔΣ)</i>	39
<i>Οστεομυελική βιοψία</i>	40
<i>Πρόγνωση</i>	40
<i>Θεραπεία</i>	44
<i>Θεραπευτικά διλήματα</i>	44
<i>Υποστηρικτική αγωγή</i>	45
<i>Αιμοποιητικοί αυξητικοί παράγοντες</i>	45
<i>Τροφικοί και διαφοροποιητικοί παράγοντες</i>	47
<i>Χαμηλής έντασης χημειοθεραπεία</i>	48
<i>Τροποποίηση των οδών μεταβίβσης του μηνύματος απόπτωσης</i>	49
<i>Ανοσοτροποποιητικοί παράγοντες</i>	50
<i>Έντατική Θεραπεία</i>	50
<i>Έντατική Χημειοθεραπεία</i>	51
<i>Μεταμόσχευση προγονικών κυττάρων</i>	52
<i>Αλλογενής μεταμόσχευση προγονικών κυττάρων</i>	52
<i>Ενδείξεις για αλλογενή μεταμόσχευση</i>	53
<i>Αυτόλογη μεταμόσχευση</i>	54
ΑΙΜΟΠΟΙΗΣΗ	56
<i>Εικαγωγή</i>	56
<i>Ιστορική αναδρομή</i>	56
<i>Ιεραρχία αιμοποιητικών κυττάρων</i>	57
<i>Απομόνωση και λειτουργικά χαρακτηριστικά των αρχέγονων</i> <i>αιμοποιητικών κυττάρων</i>	58
<i>Δέσμευση</i>	60
<i>Αιμοποιητικό μικροπεριβάλλον</i>	61
ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΤΗΣ ΕΡΥΘΡΟΠΟΙΗΣΗΣ, ΔΙΑΦΟΡΟΠΟΙΗΣΗ ΚΑΙ ΩΡΙΜΑΝΣΗ ΤΗΣ ΕΡΥΘΡΑΣ ΣΕΙΡΑΣ	62
<i>Διαμέρισμα προγονικών κυττάρων ερυθράς σειράς</i>	63
<i>Διαμέρισμα ερυθρών προδρομών κυττάρων</i>	67
ΕΡΥΘΡΟΠΟΙΗΤΙΝΗ	72
<i>Παραγωγή ερυθροποιητίνης</i>	72
<i>Φυσιολογικός ρόλος της Epo στην Ερυθροποίηση</i>	73



	17
Υποδοχέας Ερο και οδοί μεταβίβασης των μηνυμάτων	76
Φαρμακοκινητική και Χρήση της rHuEpo	77

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΣΚΟΠΟΣ	81
ΥΛΙΚΟ	83
ΜΕΘΟΔΟΙ	85
Υλικά	85
Μέθοδος	86
Στατιστική ανάλυση	88
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	89
ΣΥΖΗΤΗΣΗ	105
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	115
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	117
SUMMARY	121
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	125



ΜΙΑ ΑΝΤΙΚΑΤΑΧΤΗ ΕΡΕΥΝΑ

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ



ΜΥΕΛΟΔΥΣΠΛΑΣΤΙΚΑ ΣΥΝΔΡΟΜΑ

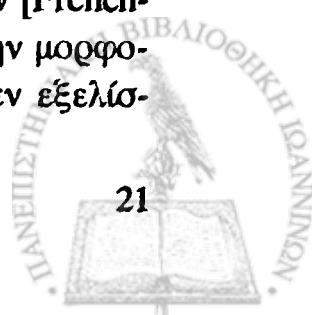
Ορισμός

Τα Μυελοδυσπλαστικά Σύνδρομα (ΜΔΣ) αποτελούν ομάδα κλωνικών αιματολογικών νοσημάτων που χαρακτηρίζονται από κυτταροπενίες, ανεπιτυχή αιμοποίηση, υπερκυτταρικό μυελό και αυξημένο κίνδυνο εξέλιξης προς οξεία μυελοβλαστική λευχαιμία (ΟΜΛ). Διακρίνονται σε πρωτογενή άγνωστης αιτιολογίας και δευτερογενή που είναι αποτέλεσμα έκθεσης σε ακτινοβολία και σε κυτταροτοξικά φάρμακα, κυρίως αλκυλιωτικούς παράγοντες.

Ιστορία

Το 1949 ο Hamilton-Patterson¹ περιέγραψε τρία περιστατικά ασθενών με οξεία λευχαιμία στους οποίους είχε προηγηθεί μία φάση αναιμίας ("προλευχαιμική αναιμία"). Ακολούθησε το 1953 μία ανακοίνωση του Block και συν.² που αφορούσε μία μεγαλύτερη ομάδα 12 ασθενών με κυτταροπενία, 11 από τους οποίους ανέπτυξαν οξεία λευχαιμία, μετά από μία προλευχαιμική φάση που διήρκεσε μέχρι και 27 μήνες. Κατά τις επόμενες τρεις δεκαετίες πολλοί όροι χρησιμοποιήθηκαν για την περιγραφή των συνδρόμων της παραγωγικής αιμοποιητικής ανεπάρκειας, που συχνά κατέληγαν σε οξεία Μυελοβλαστική λευχαιμία (ΟΜΛ), όπως ανθεκτική αναιμία, προλευχαιμία, ολιγοβλαστική λευχαιμία, "έρπουσα" (smouldering) οξεία λευχαιμία, ανθεκτική δυσμυελοποιητική λευχαιμία, μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα και αιμοποιητική δυσπλασία³. Οι ασθενείς συνήθως παρουσίαζαν αναιμία και δυσπλαστικές μορφολογικές ανωμαλίες των κυττάρων περισσότερων της μιάς σειράς.

Το 1975 μία ομάδα Γάλλων-Αμερικανών-Βρετανών ερευνητών [French-American-British (FAB)]⁴ κατά την αρχική συζήτησή τους για την μορφολογική ταξινόμηση των οξείων λευχαιμιών, αναγνώρισαν ότι δεν εξέλι-



σονταν σε οξεία λευχαιμία όλοι οι ασθενείς με κυτταροπενίες και δυσπλαστικά χαρακτηριστικά των κυττάρων του περιφερικού αίματος και του μυελού. Έτσι διαχώρισαν από την ομάδα των οξείων λευχαιμιών, μία άλλη ομάδα νοσημάτων, που είχαν βέβαια μερικά από τα χαρακτηριστικά της ΟΜΛ, όμως η πορεία τους ήταν υποξεία ή χρόνια. Έτσι οι ερευνητές της FAB έδωσαν την ονομασία δυσμυελοποιητικά ή μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα σ' αυτήν την ομάδα νοσημάτων, που αρχικά περιελάμβανε δύο κατηγορίες: την χρόνια μυελομονοκυτταρική λευχαιμία και την ανθεκτική αναιμία με περίσσεια βλαστών (RAEB).

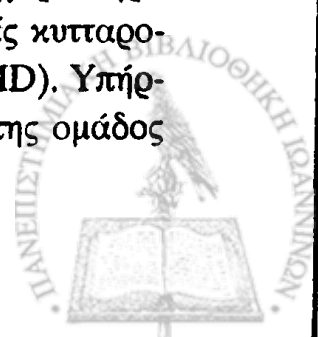
Ομάδες Μυελοδυσπλαστικών συνδρόμων

Το 1980 η συνεργατική ομάδα των Γάλλων- Αμερικανών- Βρεττανών ερευνητών (FAB) ανασκόπησε μεγαλύτερο αριθμό περιστατικών και κατέταξε τα ΜΔΣ σε πέντε ομάδες με βάση τα μορφολογικά κριτήρια, όπως περιγράφονται παρακάτω⁵.

1. Ανθεκτική αναιμία (Refractory anaemia, RA).
2. Ανθεκτική αναιμία με δακτυλιοειδείς σιδηροβλάστες (Refractory anaemia with ringed sideroblasts, RARS)
3. Ανθεκτική αναιμία με περίσσεια βλαστών (Refractory anaemia with excess of blasts, RAEB).
4. Χρόνια μυελομονοκυτταρική λευχαιμία (Chronic myelomonocytic leukemia, CMML)
5. Ανθεκτική αναιμία με περίσσεια βλαστών σε μετατροπή (Refractory anaemia with excess of blasts in transformation, RAEB-T).

Τα χαρακτηριστικά κάθε ομάδας παρουσιάζονται αναλυτικά στον Πίνακα 1^{5,6}.

Το 1997 η Παγκόσμια Οργάνωση Υγείας (World Health Organization, WHO) ανακοίνωσε προτάσεις για την ταξινόμηση των ΜΔΣ, που ίσως σε μερικά χρόνια αντικαταστήσουν την FAB ταξινόμηση⁷. Σύμφωνα με την WHO ταξινόμηση η ομάδα RAEB-T καταργήθηκε και οι ασθενείς με >20% βλάστες θεωρήθηκαν ότι πάσχουν από οξεία μυελοβλαστική λευχαιμία (ΟΜΛ). Ανθεκτική αναιμία (RA) και ανθεκτική αναιμία με δακτυλιοειδείς σιδηροβλάστες (RARS) είναι όροι που χρησιμοποιούνται μόνο για δυσπλασία μιάς σειράς. Περιπτώσεις με δυσπλαστικά χαρακτηριστικά δύο ή περισσότερων σειρών αναφέρονται σαν ανθεκτικές κυτταροπενίες (Refractory Cytopenia with Multilineage Dysplasia, RCMD). Υπήρξε διαφωνία όσον αφορά την CMML. Οι παθολογοανατόμοι της ομάδος



Πίνακας 1. Ταξινόμηση FAB

Υπότυπος	Περιφερικό αίμα		Μυελός των οστών
Ανθεκτική αναιμία (RA)	αναιμία, βλάστες $\leq 1\%$, μονοκύτταρα $\leq 1 \times 10^9/\lambda$	ΚΑΙ	βλάστες $< 5\%$, δακτυλιοειδείς σιδηροβλάστες $\leq 15\%$ των ερυθροβλαστών
Ανθεκτική αναιμία με δακτυλιοειδείς σιδηροβλάστες (RARS)	αναιμία, βλάστες $\leq 1\%$ μονοκύτταρα $\leq 1 \times 10^9/\lambda$	ΚΑΙ	βλάστες $< 5\%$, δακτυλιοειδείς σιδηροβλάστες $> 15\%$ των ερυθροβλαστών
Ανθεκτική αναιμία με περίσσεια βλαστών (RAEB)	αναιμία, μονοκύτταρα $\leq 1 \times 10^9/\lambda$	βλάστες $> 1\%$ βλάστες $< 5\%$ Ή ΚΑΙ	βλάστες $\geq 5\%$ βλάστες $\leq 20\%$
Χρόνια μυελομονοκυτταρική λευχαιμία (CMML)	μονοκύτταρα $> 1 \times 10^9/\lambda$ κοκκιοκύτταρα συχνά αυξημένα, βλάστες $< 5\%$		βλάστες μέχρι 20% προμονοκύτταρα συχνά αυξημένα
Ανθεκτική αναιμία με περίσσεια βλαστών σε μετατροπή (RAEB-T)	βλάστες $> 5\%$	Ή Ραβδία Auer στους βλάστες αίματος ή μυελού	Ή βλάστες $> 20\%$ ΛΛΛΛ βλάστες $< 30\%$

πρότειναν μία νέα κατηγορία Μυελοδυσπλαστικών/ Μυελοπαραγωγικών νοσημάτων, που θα περιλάβει την CMML, την νεανική μυελομονοκυτταρική λευχαιμία (JMML) και την άτυπη χρόνια μυελογενή λευχαιμία (aCML). Ορισμένες μορφές οξείων λευχαιμιών διέρχονται μία ολιγοβλαστική φάση, με στοιχεία δυσπλασίας της κοκκιδώδους σειράς. Έχουν χαρακτηριστικές χρωμοσωμικές μεταθέσεις: t(8;21), t(15;17), inv16 και ανωμαλίες του 11q23. Αυτές οι περιπτώσεις δεν πρέπει να χαρακτηριστούν σαν ΜΔΣ, αλλά σαν ξεχωριστές οντότητες, ποικιλίες της ΟΜΛ. Διακριτή οντότητα αποτελεί και το 5q- σύνδρομο και ταξινομείται σαν ποικιλία των ΜΔΣ. Αναγνωρίζεται ότι μερικές περιπτώσεις δεν ταιριάζουν σε καμία ομάδα και θεωρούνται σαν ΜΔΣ αταξινομήτα. Ορισμένες μορφές ΟΜΛ αναγνωρίζονται ότι προέρχονται από ΜΔΣ, και αυτό πρέπει να δηλώνεται. Επίσης η ομάδα RAEB χωρίζεται σε RAEB I με 5-9% βλάστες και RAEB II με 10-19% βλάστες.



Παθογένεση μυελοδυσπλαστικών συνδρόμων

Είναι γνωστό από 20ετίας ότι τα ΜΔΣ αποτελούν μία ετερογενή ομάδα αιμοποιητικών διαταραχών, οι οποίες χαρακτηρίζονται από μονοκλωνικότητα και μυελική ανεπάρκεια. Ο μονοκλωνικός χαρακτήρας των ΜΔΣ είναι υπεύθυνος για τον αυξημένο κίνδυνο μετατροπής σε λευχαιμία. Η μυελική ανεπάρκεια, η οποία οφείλεται τόσο σε διαταραχή του πολλαπλασιασμού και της διαφοροποίησης όσο και σε μειωμένη επιβίωση των προγονικών αιμοποιητικών κυττάρων, έχει σαν αποτέλεσμα κυτταροπενία στο περιφερικό αίμα. Τα τελευταία χρόνια έχει γίνει σημαντική πρόοδος στην διερεύνηση των παθογενετικών μηχανισμών που οδηγούν στην μονοκλωνικότητα, στην νεοπλασματική εξέλιξη και στην μυελική ανεπάρκεια των ΜΔΣ⁸.

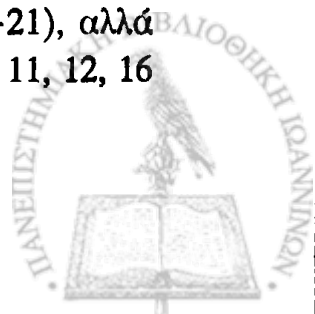
Μονοκλωνικότητα των ΜΔΣ

Η μονοκλωνική φύση των ΜΔΣ έχει πλήρως αποδειχθεί με την κυτταρογενετική, την μελέτη αδρανοποίησης του X χρωμοσώματος και με τις μοριακές μεθόδους ανίχνευσης των μεταλλάξεων των ογκογονιδίων και των κατασταλακτικών των όγκων γονιδίων.

Κυτταρογενετική

Μη τυχαίες καρυοτυπικές ανωμαλίες έχουν βρεθεί στο 50-70% των ασθενών με πρωτογενή ΜΔΣ (π-ΜΔΣ) και στο 90% ή και περισσότερο αυτών με δευτερογενή ΜΔΣ (δ-ΜΔΣ)⁹. Αυτές οι ανωμαλίες ποικίλουν από μονήρεις αριθμητικές ή δομικές μεταβολές έως σύνθετες βλάβες του γονιδιώματος, που αφορούν τουλάχιστον 3 διαφορετικά χρωμοσώματα. Οι μονήρεις χρωμοσωμικές ανωμαλίες παρατηρούνται συχνότερα στα π-ΜΔΣ και στα αρχικά στάδια της νόσου, ενώ οι σύνθετες ανιχνεύονται συνηθέστερα στα δ-ΜΔΣ και κατά την εξέλιξη της νόσου¹⁰.

Σε αντίθεση με την πρωτοπαθή ΟΜΛ, όπου οι συχνότερα παρατηρούμενες χρωμοσωμικές ανωμαλίες είναι οι ισορροπημένες μεταθέσεις τμημάτων χρωμοσωμάτων, στα ΜΔΣ η έλλειψη τμήματος ή ολόκληρου χρωμοσώματος είναι οι συχνότερες μεταβολές. Η μερική ή ολική έλλειψη χρωμοσώματος αφορά συνηθέστερα τα χρωμοσώματα 5 [del(5q), -5], 7 [del(7q), -7], 20 [del(20q)], 11 [del(11q)], 12 [del(12p)], 13 [del(13q)] και 17 [del(17p)]. Άλλες καρυοτυπικές ανωμαλίες που συχνά απαντούν στα ΜΔΣ είναι η ύπαρξη επιπλέον χρωμοσωμάτων (+8, +5, +6, +13, +21), αλλά και αμοιβαίες μεταθέσεις μεταξύ των χρωμοσωμάτων 3, 5, 6, 8, 11, 12, 16 και 21¹¹.



Η συχνότητα των χρωμοσωμικών ανωμαλιών και των ιδιαίτερων ελλειμμάτων, που παρατηρούνται στα ΜΔΣ, σχετίζεται με την αστάθεια του γενετικού υλικού, η οποία προκαλείται από την συσσώρευση γενετικών βλαβών και/ ή από την αδυναμία του αιμοποιητικού κυττάρου να επιδιορθώσει την βλάβη του DNA¹². Απόδειξη της γονιδιακής βλάβης από εξωγενείς παράγοντες αποτελούν οι χρωμοσωμικές μεταβολές, συμπεριλαμβανομένων και των σύνθετων ανωμαλιών και ελλειμμάτων όλου ή τμήματος των χρωμοσωμάτων 5 και 7, που παρατηρούνται σε ασθενείς με ΜΔΣ μετά από έκθεση σε τοξικούς παράγοντες, όπως η ακτινοβολία και το βενζόλιο ή μετά από θεραπεία με χημειοθεραπευτικούς παράγοντες που προκαλούν βλάβη του DNA¹³.

Οι καρυοτυπικές ανωμαλίες αποτελούν ειδικούς δείκτες της νόσου, έχουν προγνωστική αξία, δίνουν πληροφορίες για την συμμετοχή των προγονικών κυττάρων και βοηθούν στην αποκάλυψη των μοριακών μηχανισμών που οδηγούν στην μυελική ανεπάρκεια και στην εξέλιξη προς οξεία λευχαιμία.

Λόγω της προγνωστικής του αξίας ο καρυότυπος έχει συμπεριληφθεί στο Διεθνές προγνωστικό Scoring σύστημα [International Prognostic Scoring System (IPSS)] και φαίνεται να έχει μεγάλη-σημασία τόσο για την επιβίωση, όσο και για την εξέλιξη σε οξεία λευχαιμία¹⁴.

Όσον αφορά την προσβολή των προγονικών κυττάρων η κυτταρογενετική ανάλυση έδειξε ότι οι κλωνικές μεταλλάξεις των ΜΔΣ αφορούν το ώριμο μυελο-μονοκυτταρικό τμήμα και όχι το λεμφικό τμήμα, με εξαίρεση λίγες αναφορές σε κλωνικά Β-λεμφοκύτταρα^{15,16}. Αυτό δείχνει ότι οι κυτταρογενετικές μεταλλάξεις συμβαίνουν σε ένα μυελικό προγονικό κύτταρο, ή σε ένα προγονικό κύτταρο κοινό της μυελικής και της Β-λεμφοκυτταρικής σειράς. Η άμεση κυτταρογενετική ανάλυση στο επίπεδο των προγονικών κυττάρων οδήγησε σε ετερογενή αποτελέσματα. Μερικοί ερευνητές δεν βρήκαν τις κυτταρογενετικές μεταλλάξεις στα λεμφικά ή μυελικά CD34+ προγονικά κύτταρα, ενώ άλλοι βρήκαν τόσο τις πρωτογενείς όσο και τις επιπρόσθετες χρωμοσωμικές ανωμαλίες στο επίπεδο των άωρων CD34+lin- προγονικών κυττάρων¹⁷.

Σημαντικές πληροφορίες προέκυψαν επίσης από την συσχέτιση των κυτταρογενετικών ευρημάτων με την μοριακή ανάλυση, που έγινε με σκοπό να διευκρινισθεί με ποιο τρόπο η διαταραχή της φυσιολογικής δομής και λειτουργίας των γονιδίων που εμπλέκονται στις μεταλλάξεις των ΜΔΣ, επηρεάζουν την επιβίωση, τον πολλαπλασιασμό και την διαφοροποίηση

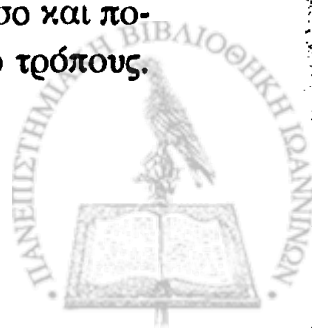


των προγονικών κυττάρων. Οι πιο σημαντικές γνωστές χρωμοσωμικές περιοχές και τα αντίστοιχα γονίδια που εμπλέκονται στην παθογένεση των ΜΔΣ αναφέρονται παρακάτω.

Τα ελλείμματα του μακρού σκέλους του χρωμοσώματος 5 [del(5q)] είναι η πιο συχνή κυτταρογενετική ανωμαλία που απαντά στα ΜΔΣ (10-15% των π-ΜΔΣ και 50% των δ-ΜΔΣ), γι' αυτό και έγινε μεγάλη προσπάθεια για να καθοριστεί η μοριακή δομή και λειτουργία της περιοχής αυτής. Έτσι το έλλειμα εντοπίστηκε στη περιοχή 5q31-5q33, η οποία περιέχει γονίδια πολλών κυτταροκινών (GM-CSF, IL-4, IL-5, IL-9), το γονίδιο FMS που κωδικοποιεί τον M-CSF υποδοχέα καθώς και δύο γονίδια IRF1 (Interferon regulatory factor 1) και EGR1 (κωδικοποιεί την GTP-ase ενεργοποιό πρωτεΐνη για το γονίδιο p21ras), που αφορούν την μεταφορά του μηνύματος και την ρύθμιση της αποκωδικοποίησης^{18,19,20}. Τα ελλείμματα του χρωμοσώματος 7 σχετίζονται με την έκφραση της P170 MDR γλυκοπρωτεΐνης, ενώ η περιοχή 7q22 πιθανά περιέχει γονίδια που αφορούν την διόρθωση του DNA²¹. Μεταλλαγμένα γονίδια στην περιοχή 12p13 αφορούν την ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου και περιλαμβάνουν τον αναστολέα της κινάσης τον εξαρτώμενο από κυκλίνη (CDKI) p27, την κυκλίνη D2 και το EST-σχετιζόμενο γονίδιο TEL/ETV6²². Οι μεταθέσεις του γονιδίου MLL του 11q23 στο χρωμόσωμα 16 και η κατά συνέπεια συνένωση με τον ενεργοποιητή της αποκωδικοποίησης CBP [t(11;16)(q23;p13.3)]²³, καθώς και η συνένωση του AML-1 γονιδίου της περιοχής 21q22 με περιοχή επί του χρωμοσώματος 3 [t(3;21)] απαντούν μόνο στα δ-ΜΔΣ²⁴. Τα ελλείμματα του βραχέος σκέλους του χρωμοσώματος 17 (το 17p- σύνδρομο) αντιπροσωπεύουν ειδική ομάδα των ΜΔΣ, με ιδιαίτερες ανωμαλίες στην κοκκιοκυτταρική σειρά και συχνή απώλεια του p53 κατασταλτικού των όγκων γονιδίου²⁵.

Αδρανοποίηση του Χ χρωμοσώματος στα ΜΔΣ

Από την αρχική αναφορά από τον Prchal το 1978²⁶ έως σήμερα, μελέτες κλωνικότητας με την μέθοδο αδρανοποίησης του Χ χρωμοσώματος, κατ' αναλογία με τα κυτταρογενετικά ευρήματα, αδιαμφισβήτητα απέδειξαν την μονοκλωνική φύση των κυττάρων της μυελικής σειράς, των ερυθροκυττάρων και των αιμοπεταλίων στην πλειονότητα των ασθενών με ΜΔΣ. Με την ίδια τεχνική όμως η μονοκλωνική φύση των T-λεμφοκυττάρων είναι αμφισβητούμενη, γιατί βρέθηκαν τόσο μονοκλωνικά όσο και πολυκλωνικά λεμφικά κύτταρα²⁷. Αυτό μπορεί να εξηγηθεί με δύο τρόπους.



Πρώτον η μονοκλωνικότητα των λεμφοκυττάρων με την μέθοδο της αδρανοποίησης μπορεί να οφείλεται σε ιδιοσυγκρατική ή επίκτητη εκτροπή (skewing). Δεύτερον υπάρχει η πιθανότητα λόγω της μακράς τους επιβίωσης τα πολυκλωνικά T-λεμφοκύτταρα να αποτελούν μέρος του πληθυσμού που δημιουργήθηκε πριν από την κλωνική μετάλλαξη ενός άωρου προγονικού κυττάρου. Αυτό δείχνει ακόμη ότι οι κυτταρογενετικές μεταλλάξεις αντιπροσωπεύουν μία δευτερογενή κλωνική βλάβη που κατά προτίμηση προσβάλλει την μυελική σειρά και αφήνει ανέπαφη την λεμφική σειρά. Παρακολούθηση της κλωνικότητας των λεμφοκυττάρων στους ασθενείς με ΜΔΣ είναι απαραίτητη για την επιβεβαίωση ή απόρριψη της θεωρίας αυτής. Με την χρήση του πολυμορφισμού στο HUMARA γονίδιο αποδείχθηκε ότι σε ασθενείς με υψηλού κινδύνου ΜΔΣ τα άωρα CD34+38- και τα δεσμευμένα CD34+38+ προγονικά κύτταρα ήταν κλωνικά μεταλλαγμένα²⁸.

Άλλες μοριακές αλλοιώσεις στα ΜΔΣ

Μεταλλάξεις στα ογκογονίδια N-RAS και K-RAS έχουν αναφερθεί στο 30-40% όλων των κατά FAB υποτύπων των ΜΔΣ¹². Οι μεταλλάξεις του RAS έχουν βρεθεί σε άωρα και δεσμευμένα προγονικά κύτταρα, ιδιαίτερα στην CMMML και συνδέονται με αυξημένο κίνδυνο λευχαιμικής μετατροπής. Επί πλέον μεταλλάξεις του p53 γονιδίου ανευρίσκονται σε ποσοστό 0-23% και σχετίζονται με εξέλιξη της νόσου και κακή πρόγνωση. Ο ρόλος της αυξημένης έκφρασης του γονιδίου του όγκου του Wilms (WT1), που αποτελεί ρυθμιστή της παραγωγής των αιμοποιητικών κυττάρων στα ΜΔΣ προχωρημένου σταδίου, χρειάζεται περαιτέρω διερεύνηση²⁹.

Περίληπτικά τα δεδομένα αυτά της κλωνικότητας επιβεβαιώνουν ότι η αθροιστική βλάβη του γενετικού υλικού των αρχέγονων αιμοποιητικών προγονικών κυττάρων είναι ένα από τα κλειδιά ρυθμιστές του φαινότυπου και της πορείας της νόσου στα ΜΔΣ. Πρώτιστα κλωνικά γεγονότα δίνουν πλεονέκτημα ανάπτυξης σε ένα προ-κακόηθες προγονικό κύτταρο και ακολουθούνται από συσσώρευση άλλων μεταλλάξεων που προκαλούν την λευχαιμική μετατροπή. Ενώ η συνολική βλάβη του γενετικού υλικού μάλλον υποεκτιμάται, το κριτικό μέγεθος της γονιδιακής βλάβης που είναι απαραίτητη για μονοκλωνικό πολλαπλασιασμό καθώς και οι ρυθμιστές της μετατροπής δεν έχουν ακόμη πλήρως κατανοηθεί. Νεότερες τεχνικές καθορισμού γενετικών βλαβών, όπως το πολλαπλού χρωματισμού FISH και ο έλεγχος του DNA, καθώς και η γνώση του ρόλου του κάθε γονιδίου θα μας



επιτρέψουν στο εγγύς μέλλον να βρούμε ένα κοινό παρονομαστή στον καταράκτη της γενετικής βλάβης αυτής της ετερογενούς νόσου. Αυτό θα οδηγήσει όχι μόνο στην καλύτερη κατανόηση των ΜΔΣ, αλλά και στην ανεύρεση νέων θεραπειών, βασιζόμενων στην μοριακή βιολογία

Μυελική ανεπάρκεια στα ΜΔΣ

Εκτός από την κλωνικότητα, η αιμοποίηση στα ΜΔΣ χαρακτηρίζεται επίσης από διαταραχή του πολλαπλασιασμού και της διαφοροποίησης των προγονικών κυττάρων και από μειωμένη κυτταρική επιβίωση.

Η αιμοποίηση βρίσκεται σε στενή σχέση με το μικροπεριβάλλον, που αποτελείται από κυτταρικά στοιχεία, το εξωκυττάριο στρώμα και τις αυτοκρινώς και παρακρινώς δρώσες κυτταροκίνες. Εκτός από την στηρικτική λειτουργία το μικροπεριβάλλον του στρώματος ρυθμίζει επιπλέον την ανάπτυξη και επιβίωση των προγονικών κυττάρων. Στα ΜΔΣ δυσλειτουργούν τόσο τα προγονικά κύτταρα όσο και το στρώμα του μικροπεριβάλλοντος.

Αιμοποιητικά προγονικά κύτταρα

Από δεκαετίας περίπου έχει αποδειχθεί ότι η αιμοποίηση στα ΜΔΣ συνδέεται με αυξημένη ενδομυελική απόπτωση. Παρατηρείται σε όλους τους κατά FAB υπότυπους των ΜΔΣ και αφορά την μυελική, ερυθρά και μεγακαρουκυτταρική σειρά με συχνότητες μεταξύ 17%³⁰ και 50%³¹. Οι περισσότεροι ερευνητές συμφωνούν ότι οι υψηλότεροι ρυθμοί απόπτωσης παρατηρούνται στις RA, RARS και RAEB, ενώ παρατηρείται μία προοδευτική μείωση της απόπτωσης καθώς η νόσος εξελίσσεται προς RAEB-T και δ-ΟΜΛ³². Δεν βρέθηκε καμία σχέση μεταξύ του ρυθμού απόπτωσης και των κυτταρογενετικών ευρημάτων ή της μονοκλωνικότητας.

Η αυξημένη απόπτωση μπορεί να οφείλεται στην αύξηση των κυτταροκινών που προάγουν την απόπτωση ή/ και στην μείωση των κυτταροκινών που προάγουν την επιβίωση, στην ενεργοποίηση του Fas-FasL συστήματος³³ και στην ενδογενή δυσλειτουργία του κυτταρικού κύκλου.

Αρκετοί συγγραφείς έχουν αναφέρει αυξημένα επίπεδα του παράγοντα νέκρωσης του όγκου (Tumor necrosis factor- α , TNF- α) στον ορό και στον μυελό στους ασθενείς με ΜΔΣ³⁴. Τα επίπεδα του TNF- α και της ιντερλευκίνης-1 β (Interleukin-1 β , IL-1 β) σχετίζονται με τον βαθμό της απόπτωσης και ο TNF- α μπορεί να προκαλέσει απόπτωση μέσω οξειδωσης του DNA και των πρωτεϊνών³⁵.

Επιπλέον τα κυτταρικά μηνύματα επιβίωσης είναι συχνά ελαττωμένα στα ΜΔΣ, όπως αποδεικνύεται από τα ελαττωμένα επίπεδα κυτταροκινών



στον ορό³⁶ και στον μυελό³⁷. Αυτό οδηγεί τον κυτταρικό κύκλο προς τον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο. Τα ανωτέρω *in vitro* ευρήματα επιβεβαιώνονται από τα *in vivo* ευρήματα της θεραπείας ΜΔΣ με ανασταλτές του TNF-α και με κυτταροκίνες όπως ο παράγοντας που διεγείρει τον σχηματισμό αποικιών από κοκκιοκύτταρα (Granulocyte-Colony Stimulating Factor, G-CSF) και η ερυθροποιητίνη και την κατά συνέπεια μείωση της απόπτωσης στους ανταποκρινόμενους ασθενείς.

Η πρωτεΐνη Fas (ή CD95) είναι μία 45kD μεμβρανική πρωτεΐνη που προκαλεί απόπτωση όταν συνδεθεί με το φυσιολογικό της σύνδεσμο Fas Ligand (FasL). Οι κυτταροκίνες TNF-α και IFN-γ αυξάνουν την δράση της. Η έκφραση του Fas στα ΜΔΣ βρέθηκε αυξημένη σε ποικίλα κύτταρα του μυελού, όπως στα CD34+ προγονικά κύτταρα, στους ερυθροβλάστες και στα κύτταρα της μυελικής σειράς. Παρόλο που η πρωτεΐνη Fas είναι ένας σημαντικός διεγέρτης της απόπτωσης, δεν βρέθηκε καμία συσχέτιση μεταξύ αυτής και των κατά FAB υποτύπων των ΜΔΣ ή του ρυθμού της απόπτωσης³⁸.

Το FasL εκφράζεται στους ίδιους πληθυσμούς με το Fas συμπεριλαμβανομένων και των CD68+ μακροφάγων. Η λειτουργικότητα του συστήματος Fas στα ΜΔΣ αποδείχθηκε με την χρήση διεγερτικών και ανταγωνιστικών συνδέσμων. Οι πρώτοι προκαλούν μείωση και οι δεύτεροι αύξηση των αποικιών σε ημίρρευστες καλλιέργειες.

Η ενεργοποίηση του Fas προκαλεί εντός του κυττάρου ενεργοποίηση των πρωτεασών της κυστεΐνης (κασπάσες), οι οποίες είναι υπεύθυνες για την πρωτεολυτική διάσπαση κατά την απόπτωση^{39,40}. Προσθήκη αναστολέων των κασπασών σε ημίρρευστες καλλιέργειες κυττάρων μυελού των οστών από ασθενείς με ΜΔΣ είχε σαν αποτέλεσμα σημαντική αύξηση του αριθμού των αποικιών της ερυθράς και της μυελικής σειράς.

Άλλα γονίδια σχετιζόμενα με την απόπτωση που έχουν μελετηθεί στα ΜΔΣ είναι η ομάδα των Bcl-2 γονιδίων. Πρώιμα ΜΔΣ (RA, RARS) παρουσιάζουν μία αύξηση στην σχέση των προ-αποπτωτικών (Bax, Bad) έναντι των αντι-αποπτωτικών (Bcl-2, Bcl-X) πρωτεϊνών⁴¹, ενώ στα ΜΔΣ προχωρημένου σταδίου (RAEB, RAEB-T) και κατά την εξέλιξη σε ΟΜΛ η σχέση αναστρέφεται λόγω αύξησης της έκφρασης του Bcl-2⁴².

Αιμοποιητικό μικροπεριβάλλον

Ο ακριβής ρόλος του μικροπεριβάλλοντος του στρώματος στην πρόκληση απόπτωσης στα ΜΔΣ σύνδρομα είναι ακόμη άγνωστος. Η ανάπτυξη



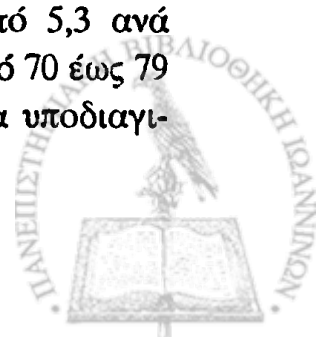
του στρώματος στα ΜΔΣ έχει σοβαρή βλάβη και σχετίζεται με μειωμένη ικανότητα να υποστηρίξει την φυσιολογική⁴³ και την μυελοδυσπλαστική αιμοποίηση⁴⁴. Τα αυξημένα μακροφάγα του στρώματος είναι οι ρυθμιστές της παραγωγής των προ-αποπτωτικών κυτταροκινών όπως ο TNF-α, η Ιντερφερόνη-γ (Interferon-γ, IFN-γ) και ο μετατρέπων αυξητικός παράγων (Transforming growth factor, TGF-β)⁴⁵. Δεν είναι γνωστό αν η διαταραχή στην ελαφή των κυττάρων του στρώματος με τα προγονικά κύτταρα των ΜΔΣ, μέσω μορίων προσκόλλησης (ιντεγκρίνης), σχετίζονται με την απόπτωση.

Ανεξάρτητα του μηχανισμού που οδηγεί στην απόπτωση, είναι γενικά παραδεκτό ότι ο ενδομυελικός προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος είναι υπεύθυνος για τις κυτταροπενίες στο περιφερικό αίμα. Είναι όμως ακόμη άγνωστο αν η αυξημένη απόπτωση στα ΜΔΣ σχετίζεται με την μοριακή παθογένεση της νόσου ή αν αυτή είναι μόνο μία συνέπεια της ανεπτυχούς αιμοποίησης, που προκαλείται από την γενετική βλάβη και τις αλλαγές του μικροπεριβάλλοντος. Ακόμη υπάρχει η πιθανότητα η αυξημένη απόπτωση να αποτελεί ένα φαινόμενο διαφυγής, που έχει στόχο την εξάλειψη του κακοήθους κλώνου.

Συνοψίζοντας τα στοιχεία από την πρόσφατη βιβλιογραφία, φαίνεται ότι η παθογένεση των ΜΔΣ είναι σύνθετη και εμπλέκονται τόσο τα προγονικά αιμοποιητικά κύτταρα, όσο και το αιμοποιητικό μικροπεριβάλλον. Τα τελευταία χρόνια πολλοί ερευνητές περιέγραψαν ανωμαλίες του γονότυπου και του φαινότυπου της αιμοποίησης των ΜΔΣ. Μεγάλη πρόκληση για το εγγύς μέλλον αποτελεί η αποσαφήνιση αυτών των ανωμαλιών και η προσπάθεια σύνδεσης της γονιδιακής βλάβης με την διαταραχή της παραγωγής, διαφοροποίησης και κυτταρικής επιβίωσης. Η καλύτερη γνώση της παθογένειας των ΜΔΣ θα οδηγήσει και σε καλύτερη θεραπευτική τους αντιμετώπιση.

Περιγραφή

Τα ΜΔΣ εμφανίζονται κυρίως σε προχωρημένη ηλικία, αν και έχουν περιγραφεί και στην παιδική ηλικία. Η μέση ηλικία εμφάνισης της νόσου είναι μεταξύ 60 και 75 ετών και μόνο 20% των ασθενών βρίσκονται σε ηλικία κάτω των 50 ετών κατά την διάγνωση της νόσου⁴⁶. Η συχνότητα εμφάνισης της νόσου αυξάνει με την πάροδο της ηλικίας, από 5,3 ανά 100.000 μεταξύ 50 και 59 ετών, σε 15 από 60 έως 69 ετών, 49 από 70 έως 79 ετών και 89 από 80 ετών και άνω⁴⁷. Τα ΜΔΣ μέχρι πρόσφατα υποδιαγι-



γνώσκονταν. Τα δύο φύλα προσβάλλονται εξ ίσου, με εξαίρεση το 5q- σύνδρομο που κυρίως προσβάλλει γυναίκες και την CMMML που προσβάλλει κυρίως άνδρες⁴⁸.

Τα συμπτώματα των ασθενών με ΜΔΣ οφείλονται στην βλάβη και των τριών αιμοποιητικών σειρών, με πιο σημαντική την πτώση του αιματοκρίτη. Περίπου 50% των ασθενών δεν έχουν συμπτώματα κατά την διάγνωση και η νόσος ανακαλύπτεται τυχαία κατά την εξέταση ρουτίνας του αίματος. Η αναιμία είναι το συχνότερο εύρημα και παρατηρείται στο 90% των ασθενών. Σπληνομεγαλία παρατηρείται στο 10-20% των ασθενών κατά την διάγνωση και ηπατομεγαλία στο ίδιο ποσοστό. Το μέγεθος της σπληνομεγαλίας και η συχνότητα εμφάνισης της είναι μεγαλύτερη σε ασθενείς με CMMML, παρατηρούμενη στο 40% των περιπτώσεων και μπορεί να προκαλέσει συμπτώματα, όπως εύκολο κορεσμό, κοιλιακή δυσφορία και επώδυνα έμφρακτα. Η λεμφαδενοπάθεια είναι ασυνήθης. Εκτός από τα συμπτώματα της αναιμίας, όπως εύκολη κόπωση και δύσπνοια προσπάθειας, περίπου ένα τρίτο των ασθενών αναφέρουν επαναλαμβανόμενες λοιμώξεις, λόγω της διαταραχής του ανοσολογικού μηχανισμού και του μειωμένου αριθμού των δυσλειτουργικών πολυμορφοκυττάρων^{49,50}. Λοιμώξεις παρατηρούνται με συχνότητα ενός επεισοδίου ανά έτος, και είναι σοβαρότερες όταν τα ουδετερόφιλα είναι κάτω από 1.000/μl. Οι πιο συχνές λοιμώξεις είναι το πιο συχνό αίτιο θανάτου στα ΜΔΣ (64% των θανάτων)^{51,52}. Αιμορραγικά επεισόδια που οφείλονται στην θρομβοπενία και στην διαταραχή της πρωτοπαθούς αιμόστασης παρατηρούνται συνήθως σε ασθενείς με προχωρημένη νόσο, αν και η αιμορραγία μπορεί να αποτελέσει το πρώτο σύμπτωμα σε λιγότερες από 10% των περιπτώσεων. Συχνά τα ΜΔΣ σχετίζονται με διήθητικές δερματικές διαταραχές, ιδιαίτερα αυτοάνοση αγγειίτιδα⁵³ ή οξεία ουδετεροφιλική δερμάτωση (σύνδρομο Sweet)^{54,55,56}. Η διήθηση του δέρματος από μυελοβλάστες στην RAEB-T ή από μονοκύτταρα στην CMMML μπορεί να δημιουργήσει την εικόνα της δερματικής λευχαιμίδος⁵⁷.

Αιματολογικά ευρήματα

Η κατά FAB ταξινόμηση των ΜΔΣ στηρίζεται στις μορφολογικές διαταραχές των κυττάρων και στην αρίθμηση των βλαστών του περιφερικού αίματος και του μυελού των οστών. Συνήθως η υποψία για την ύπαρξη ΜΔΣ τίθεται όταν παρατηρηθούν στο αίμα ή στον μυελό μορφολογικές αλλοιώσεις, που αφορούν μία ή περισσότερες σειρές.



Δυσπλασία ερυθράς σειράς (Δυσερυθροποίηση)

Ποιοτικές διαταραχές της ερυθράς σειράς τόσο στο μυελό, όσο και στο περιφερικό αίμα είναι συνήθεις στα ΜΔΣ. Παρατηρούνται νησίδες υπερπλασίας της ερυθράς σειράς με μεγαλοβλαστοειδείς ώλουύσεις, που είναι αποτέλεσμα κλωνικής βλάβης του πολυδύναμου αιμοποιητικού κυττάρου. Οι μεγαλοβλαστοειδείς ώλουύσεις και η ασυγχρονία πυρήνος-προτοπλάσματος είναι συχνά όμοιες με τις παρατηρούμενες στην τροφική μεγαλοβλαστική αναιμία. Η αυξημένη κυτταροβρίθεια είναι γεωγραφικά ανομοιογενής και οι μεγαλοβλαστοειδείς χαρακτηρές στον ίδιο ασθενή κυμαίνονται από ελάχιστους έως εκσεσημασμένους. Οι ερυθροβλάστες μπορεί να είναι πολυπύρηνοι, ή ο πυρήνας τους είναι τεμαχισμένος ή ανώμαλου σχήματος. Μονές, διπλές, ή τριπλές εντομές ή περισφίξεις μπορούν να δημιουργήσουν δύο ή περισσότερους πυρήνικούς λοβούς ποικίλου μεγέθους, συχνά συνδεδεμένους με λεπτές πυρήνικές γέφυρες. Η κυτταροπλασματική χρώση είναι συχνά κηλιδώδης, τα κυτταρικά όρια είναι συχνά ανώμαλα ή αδιάκριτα και οι ανομοιόμορφα χρωματισμένες περιοχές παρουσιάζουν συχνά βασιεόφιλη στίξη. Στο περιφερικό αίμα παρατηρούνται μακροκυτταρικά ερυθρά αιμοσφαίρια, βασιεόφιλη στίξη, κατακερματισμένα ερυθρά, εμπύρηνα ερυθρά και σε 10% των ασθενών παρατηρείται ένας υποπληθυσμός ακανθοκυττάρων⁵⁸, σαν πρώιμο εμφανές μορφολογικό χαρακτηριστικό. Άλλες σποραδικές διαταραχές των ερυθρών χωρίς διαγνωστική σημασία περιλαμβάνουν την επανεμφάνιση της αιμοσφαιρίνης F,⁵⁹ επίκτητη αιμοσφαιρίνη H⁶⁰, επίκτητη α ή β θαλασσαιμία^{61,62,63}, αλλαγές στα αντιγόνα επιράνειας⁶⁴ και αυτοάνοση αιμολυτική αναιμία^{65,66}.

Δακτυλιοειδείς σιδηροβλάστες: Η χρώση του μυελού για κοκκία σιδήρου στους ασθενείς με ανθεκτική αναιμία αποκαλύπτει σε ποσοστό 25%, την ύπαρξη δακτυλιοειδών σιδηροβλαστών αναλόγων με αυτούς που παρατηρούνται στις σιδηροβλαστικές αναιμίες. Οι δακτυλιοειδείς σιδηροβλάστες είναι εύκολα αναγνωρίσιμοι και πρέπει να πληρούν τα εξής κριτήρια: τα κοκκία σιδήρου πρέπει α) να είναι μεγάλα, β) να υπερβαίνουν τα πέντε έως έξι στον αριθμό, γ) να σχηματίζουν ένα περιτυρητικό τόξο, που να εκτείνεται τουλάχιστον στο ένα τρίτο της περιφέρειας του πυρήνα⁶⁷. Σε αντίθεση με τις μεγαλοβλαστικές αναιμίες, στις οποίες οι δακτυλιοειδείς σιδηροβλάστες είναι σπάνιοι, στην ανθεκτική αναιμία μπορεί να υπερβαίνουν το 15% των ερυθροβλαστών⁶⁸. Με το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο αποκαλύφθηκε ότι ο σίδηρος εναποτίθεται στα μιτοχόνδρια, τα οποία είναι μεγάλα και ανώμαλα⁶⁹. Η ανθεκτική αναιμία με δακτυλιοειδείς σιδηρο-



βλάστες χαρακτηρίζεται από διπλό πληθυσμό ερυθρών αιμοσφαιρίων στην περιφέρεια: έναν μικρότερο αποτελούμενο από υπόχρωμα και μικροκυτταρικά ερυθρά, που συχνά εμφανίζουν βασεόφιλη στίξη και έναν μεγαλύτερο από μακροκυτταρικά ερυθρά.

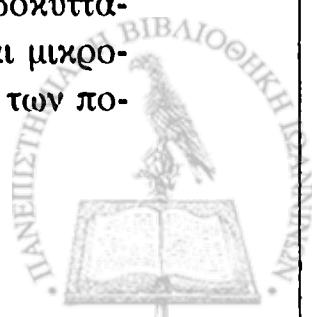
Δυσπλασία κοκκιώδους σειράς

Τα πολυμορφοπύρηνα του αίματος και του μυελού των οστών συχνά εμφανίζονται χωρίς ή με λίγα κοκκία, ένα χαρακτηριστικό δυσπλασίας που συχνά διαφεύγει ή θεωρείται αποτέλεσμα κακής χρώσης (artifact). Στον μυελό τα προγονικά τους μυελοκύτταρα στερούνται επίσης των δευτερογενών κοκκίων, ενώ στην περιφέρεια των κυττάρων σχηματίζεται πυκνός βασεόφιλος δακτύλιος από άφθονα κυτταροπλασματικά ριβοσώματα. Τα προμυελοκύτταρα άλλοτε στερούνται πρωτογενών κοκκίων, ενώ άλλοτε περιέχουν ανώμαλα και μεγάλα κοκκία που έχουν την τάση να σχηματίζουν ένα διάστικτο δακτύλιο γύρω από τον πυρήνα. Δύο ανωμαλίες του πυρήνα θα πρέπει να θεωρούνται σαν προλευχαιμικά χαρακτηριστικά: η ψευδο-Pelger-Huet ανωμαλία (δίλοβος ή μονόλοβος πυρήνας και αυξημένη συμπύκνωση της χρωματίνης του) και η ανωμαλία του διπλασιασμού του πυρήνα (twinning deformity). Ο συνδυασμός των ψευδο-Pelger με άκοκκα πολυμορφοπύρηνα είναι χαρακτηριστικό των ΜΔΣ και απαντά στο 90% των περιπτώσεων^{70,71}. Γιγαντιαία πολυκατάτμητα πολυμορφοπύρηνα με πολυπλοειδία και ανώμαλα σχήματα συχνά συνοδεύουν προλευχαιμικές και λευχαιμικές καταστάσεις.

Η αλκαλική φωσφατάση είναι μειωμένη στο 50% των ασθενών με ανθεκτικές αναιμίες και είναι χωρίς διαγνωστική σημασία⁷². Η μυελοϋπεροξειδάση σε μερικούς ασθενείς είναι μειωμένη, ενώ σε άλλους αυξημένη⁷³.

Δυσπλασία μεγακαρουκυτταρικής σειράς

Τα Μεγακαρουκύτταρα μερικές φορές είναι μειωμένα σε αριθμό, ενώ συχνά παρουσιάζουν μορφολογικές ανωμαλίες, οι κυριότερες από τις οποίες είναι: μεγάλες μονοπύρηνες μορφές, τα μικρο-μεγακαρουκύτταρα (μικρά μονοπύρηνα μεγακαρουκύτταρα), και μεγακαρουκύτταρα με πολλούς χωριστούς πυρήνες⁷⁴. Τελευταία και η υποκοκκίωση των μεγακαρουκυττάρων αναγνωρίζεται σαν στοιχείο δυσπλασίας^{75,76,77}. Στο περιφερικό αίμα σύνηθες εύρημα αποτελεί η θρομβοπενία και σπάνια η θρομβοκυττάρωση, ενώ έχουν παρατηρηθεί επίσης γιγαντιαία αιμοπετάλια και μικρο-μεγακαρουκύτταρα ή θραύσματα μεγακαρουκυττάρων. Η τριάδα των πο-



λυπύρηνων μεγακαρουοκυττάρων, της ψευδο-Pelger ανωμαλίας και των άκοκκων πολυμορφοπύρηνων αποτελούν τα πλέον αξιόπιστα και εύκολα αναγνωρίσιμα χαρακτηριστικά της μυελοδυσπλασίας.

Βλάστες στα Μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα

Ένα σημαντικό χαρακτηριστικό για την FAB ταξινόμηση είναι ο αριθμός των βλαστών. Διακρίνουμε τρία είδη βλαστών στα ΜΔΣ: α) Οι βλάστες τύπου I που ποικίλουν από φυσιολογικούς μυελοβλάστες έως αδιαφοροποίητες και αταξινομήτες μορφές βλαστών. Η πυρηνική χρωμάτινη είναι μη συμπυκνωμένη, τα πυρήνια είναι μεγάλα και δεν υπάρχουν κοκκία. β) Οι βλάστες τύπου II έχουν ελάχιστα πρωτογενή αζουρόφιλα κοκκία και αφθονότερο κυτταρόπλασμα. Οι δύο αυτές κατηγορίες αντιστοιχούν στους βλάστες που παρατηρούνται στην M1 και M2 Οξεία μυελοβλαστική λευχαιμία. γ) Οι βλάστες τύπου III αποτελούν κύτταρα με χαρακτηριστικές μυελοβλαστών, με μικρή αύξηση των κοκκίων (έξι ή περισσότερα)⁷⁸.

Τα Auer rods, που αποτελούν ραβδία που προέρχονται από την συνένωση πρωτογενών κοκκίων, είναι χαρακτηριστικά των M2 βλαστών. Αποδείχθηκε ότι η ύπαρξη ραβδίων Auer σε ασθενείς με RAEB δεν επηρεάζει την συχνότητα εκτροπής σε ΟΛ⁷⁹.

Τα πέντε μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα

Τα περισσότερα ΜΔΣ ξεκινούν με διαταραχή και των τριών σειρών. Αναιμία, ουδετεροπενία, θρομβοπενία αναπτύσσονται παρά την φυσιολογική ή και αυξημένη κυτταροβρίθεια του μυελού. Το γεγονός ότι οι υποπληθυσμοί όλων των αιμοποιητικών σειρών είναι δυσπλαστικοί αποδεικνύει ότι το μεταλλαγμένο αρχικό κύτταρο του κλώνου είναι το αρχέγονο αιμοποιητικό κύτταρο ή το αμέσως επόμενο του, γεγονός που εξηγεί και την ποικιλία της κλινικής έκφρασης της νόσου. Η κατά FAB ταξινόμηση βασισμένη μόνο σε μορφολογικά χαρακτηριστικά διακρίνει τα ΜΔΣ σε πέντε σύνδρομα.

1. Ανθεκτική αναιμία (RA)

Από τους ασθενείς με ΜΔΣ 20% ταξινομούνται στην κατηγορία της ανθεκτικής αναιμίας, αν και η αναλογία αυτή ποικίλει σημαντικά μεταξύ των διαφόρων σειρών^{68,72}. Συνήθως προσέρχονται με συμπτώματα αναιμίας ή η διάγνωση είναι τυχαίο εύρημα και ελάχιστοι έχουν σπληνομεγαλία ή ηπατομεγαλία.



Σταθερό εύρημα αποτελεί η αναιμία συνοδευόμενη από απόλυτη δικτυοκυτταροπενία. Τα ερυθρά αιμοσφαίρια είναι συνήθως μακροκυτταρικά, αλλά μερικές φορές και ορθοκυτταρικά. Οι μορφολογικές και ποσοτικές διαταραχές σε μερικές περιπτώσεις αφορούν μόνο την ερυθρά σειρά, ενώ άλλοτε συνυπάρχει ουδετεροπενία ή θρομβοπενία ή η ψευδο-Pelger-Huet διαταραχή ή υπόκοκκα πολυμορφοπύρηνα ή άκοκκα αιμοπετάλια. Θρομβοκυττάρωση παρατηρείται μερικές φορές, ειδικά σε ασθενείς με 5q- σύνδρομο. Οι βλάστες στο περιφερικό αίμα δεν υπερβαίνουν σε ποσοστό το 1% και τα μονοπύρηνα είναι λιγότερα από $1 \times 10^9/l$.

Ο μυελός είναι συνήθως υπερπλαστικός και κυριαρχούν δυσπλαστικοί μεγαλοβλαστοειδείς ερυθροβλάστες. Μπορεί να υπάρχουν δακτυλιοειδείς σιδηροβλάστες, αλλά δεν ξεπερνούν το 15% των ερυθροβλαστών. Μερικές περιπτώσεις εμφανίζουν και δυσπλασίες της μυελικής σειράς και των μεγακαρυοκυττάρων. Οι βλάστες μπορεί να είναι αυξημένοι, όχι όμως περισσότεροι από 5%. Η πορεία της νόσου ποικίλει. Η μέση επιβίωση μετά την διάγνωση είναι περίπου 2,5 χρόνια και 30% των θανάτων οφείλονται στις λοιμώξεις. Λευχαιμική μετατροπή παρατηρείται στο 15% των ασθενών.

Σημαντικό ποσοστό ασθενών με RA έχουν έλλειψη του μακρού σκέλους του χρωμοσώματος 5 (5q-), σαν μοναδική χρωμοσωμική ανωμαλία και έχουν χαρακτηριστικά που ονομάστηκαν 5q- σύνδρομο⁸⁰⁾. Αφορά συνήθως γυναίκες και χαρακτηρίζεται από μακροκυτταρική αναιμία, υπόλοβα μεγακαρυοκύτταρα και σχετικά καλή πρόγνωση. Τα ανώμαλα μεγακαρυοκύτταρα έχουν πυρήνα χωρίς κανένα ή με δύο μόνο λοβούς, αλλά έχουν διάμετρο μεγαλύτερη από 30-40μm και έτσι διαφέρουν από τα μικρομεγακαρυοκύτταρα που απαντούν σε άλλες μορφές ΜΔΣ και δεν είναι μεγαλύτερα από τα άλλα αιμοποιητικά κύτταρα. Μερικοί ασθενείς με 5q- σύνδρομο ανήκουν στις κατηγορίες RARS και RAEB.

2. Ανθεκτική αναιμία με δακτυλιοειδείς σιδηροβλάστες (RARS)

Αποτελεί το 15% των ασθενών με ΜΔΣ. Οι ασθενείς εμφανίζονται με συμπτώματα αναιμίας ή η διάγνωση γίνεται τυχαία. Ο σίδηρος ορού είναι αυξημένος, με αυξημένο κορεσμό τρανσφερρίνης και πολύ αυξημένη φερίτίνη.

Στο περιφερικό αίμα παρατηρείται δίμορφη αναιμία με κυρίαρχα τα ορθόχρωμα μακροκύτταρα και λιγότερα τα υπόχρωμα μικροκύτταρα και ποικίλου βαθμού λευκοπενία ή θρομβοπενία. Οι βλάστες δεν είναι περισσότεροι από 1% και τα μονοπύρηνα λιγότερα από $1 \times 10^9/l$.



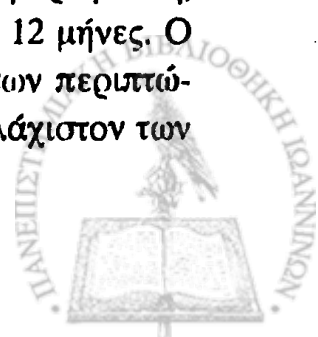
Ο μυελός εμφανίζει αυξημένη κυτταροβρίθεια και υπερπλασία της ερυθράς σειράς που χαρακτηρίζεται από μεγαλοβλαστοειδή δυσπλασία και διτύρηνους ερυθροβλάστες. Οι βλάστες δεν ξεπερνούν το 5%. Το χαρακτηριστικό της νόσου είναι οι δακτυλιοειδείς σιδηροβλάστες, οι οποίοι στις περισσότερες περιπτώσεις αποτελούν το 30-40% των ερυθροβλαστών, ενώ τουλάχιστον 50% όλων των σιδηροβλαστών είναι δακτυλιοειδείς⁸¹. Με την πάροδο του χρόνου οι δυσπλαστικοί ερυθροβλάστες και ο σίδηρος μυελού αυξάνουν παράλληλα και το ίδιο συμβαίνει και με την φερριτίνη. Μικρός αριθμός ασθενών αναπτύσσει αιμοχρωμάτωση. Σε αυτά τα άτομα βρέθηκε ότι η συχνότητα του HLA-A3 είναι σημαντικά υψηλότερη (71%) από ότι στον γενικό πληθυσμό. Πιθανά οι ασθενείς σ' αυτήν την υποομάδα κληρονόμησαν το γονίδιο της αιμοχρωμάτωσης και αργότερα απέκτησαν ένα μεταλλαγμένο γονίδιο για την RARS^{82,83}.

Η ανθεκτική αναιμία με δακτυλιοειδείς σιδηροβλάστες εξελίσσεται αργά στην αρχή, για να φθάσει μετά από μερικά χρόνια σε ένα στάδιο αναιμίας εξαρτώμενης από μεταγγίσεις στο 40% των ασθενιών. Λευχαιμική μετατροπή παρατηρείται σε ποσοστό μόνο 5%. Η μέση επιβίωση μετά την διάγνωση είναι 4 χρόνια⁸⁴, αν και πολλοί ασθενείς έχουν μία παρατεταμένη υποκλινική πορεία για αρκετά χρόνια και συνήθως ανακαλύπτονται τυχαία σε έλεγχο ρουτίνας.

3. Ανθεκτική αναιμία με περίσσεια βλαστών (RAEB)

Είναι ο συχνότερος υπότυπος των ΜΔΣ και αποτελεί το 40-50% όλων των νέων περιπτώσεων^{85,86}. Οι ασθενείς προσέρχονται με συμπτώματα αναιμίας, λοίμωξης, ή αιμορραγικών εκδηλώσεων. Και οι τρεις αιμοποιητικές σειρές είναι επηρεασμένες και εμφανίζουν δυσπλαστικές αλλοιώσεις.

Η αναιμία είναι μακροκυτταρική και συχνά δίμορφη. Ουδετεροπενία παρατηρείται στους μισούς ασθενείς και συνοδεύεται από δυσπλασίες των πολυμορφοπυρήνων όπως η ψευδο-Pelger-Huet ανωμαλία, ο δακτυλιοειδής πυρήνας και διαταραχές της κοκκίωσης (απουσία ή μείωση των κοκκίων) του πρωτοπλάσματος. Στους μισούς περίπου ασθενείς παρατηρούνται θρομβοπενία, γιγαντιαία αιμοπετάλια και μικρομεγακαρουκύτταρα και η συνύπαρξή τους με ουδετεροπενία αποτελεί κακό προγνωστικό δείκτη. Η ανεύρεση 1-5% βλαστών στην περιφέρεια και 5-20% βλαστών στον μυελό χαρακτηρίζει το σύνδρομο αυτό και καθορίζει την κακή πρόγνωση, γιατί η μέση επιβίωση μετά την διάγνωση είναι λιγότερη από 12 μήνες. Ο θάνατος επέρχεται από λοίμωξη ή αιμορραγία στο 40-50% των περιπτώσεων, ενώ θανατηφόρος λευχαιμία εμφανίζεται στο 40% τουλάχιστον των



ασθενών. Ο αριθμός των βλαστών του μυελού σχετίζεται αντίστροφα με την επιβίωση.

4. Χρόνια μυελομονοκυτταρική λευχαιμία (CMML)

Είναι η λιγότερο συχνή από όλα τα ΜΔΣ και αποτελεί το 10% του συνόλου των περιστατικών. Οι ασθενείς προσέρχονται με συμπτώματα αναιμίας ή με την κλινική εικόνα της λευχαιμίας ή και τα δύο. Η αναιμία είναι λιγότερο συχνή σε σχέση με την RA και RARS, ενώ η ηπατομεγαλία και σπληνομεγαλία είναι πολύ συχνότερες σε σχέση με τα άλλα ΜΔΣ. Μερικοί ασθενείς εμφανίζουν πλευριτική, περιτοναϊκή, ή περικαρδιακή συλλογή, λεμφαδενοπάθεια ή δερματικές εκδηλώσεις⁸⁷. Σπάνια παρατηρείται υπερτροφία των ούλων. Συχνά συνυπάρχουν ανοσολογικές ανωμαλίες. Η συγκέντρωση των ανοσοσφαιρινών του ορού είναι αυξημένη στο ένα τρίτο των ασθενών και 5-10% έχουν μονοκλωνική παραπρωτεΐνη. Αυτοαντισώματα υπάρχουν στους μισούς ασθενείς και αυτά μπορεί να συμπεριλαμβάνουν ψυχρού τύπου αιμοσυγκολλητίνες. Θετική άμεση Coombs παρατηρήθηκε σε ποσοστό 10%. Ανοσολογικές ανωμαλίες παρατηρούνται και σε άλλα ΜΔΣ, αλλά είναι συχνότερες στην CMML.

Στο περιφερικό αίμα παρατηρούνται μονοπύρρηνα περισσότερα από $1 \times 10^9/l$. Τα μονοπύρρηνα μερικές φορές είναι μορφολογικά ανώμαλα με πολυκατάτμητο ή ανώμαλου σχήματος πυρήνα ή με χαρακτηρισες αωρότητας. Ο αριθμός των ουδετεροφίλων είναι συνήθως αυξημένος και μερικές φορές είναι δυσπλαστικά. Μπορεί να υπάρχει αναιμία και συνήθως είναι νορμόχρωμη και νορμοκυτταρική. Τα αιμοπετάλια είναι φυσιολογικά ή μειωμένα σε αριθμό, με δυσπλαστικούς χαρακτήρες. Οι βλάστες είναι λιγότεροι από 5%.

Ο μυελός είναι υπερκυτταρικός και κυριαρχούν τα προμονοπύρρηνα. Οι βλάστες ποικίλουν από πολύ χαμηλά επίπεδα έως 20%. Δυσπλαστικά χαρακτηριστικά παρατηρούνται σε όλες τις σειρές, αν και σε μερικούς ασθενείς η δυσπλασία της ερυθράς και της μεγακαρυοκυτταρικής σειράς είναι ελάχιστη. Οι ασθενείς με CMML διαδραματίζουν μία χρόνια πορεία και έχουν πιθανότητα εκτροπής προς λευχαιμία 14%^{88,89}. Προγνωστικοί δείκτες είναι ο αριθμός των βλαστών και ο αριθμός των μονοπυρήνων. Η μέση επιβίωση του συνόλου των ασθενών είναι 20 μήνες, ενώ όταν τα μονοπύρρηνα είναι περισσότερα από $2,6 \times 10^9/l$ τότε η μέση επιβίωση μειώνεται στους 11 μήνες^{90,91,84}.



5. Ανθεκτική αναιμία με περίσσεια βλαστών σε μετατροπή (RAEB-T)

Συνήθως οι ασθενείς με RAEB-T προσέρχονται με συμπτώματα αναιμίας, λοίμωξης και αιμορραγίας, λόγω βαρειάς πανκυτταροπενίας. Μπορεί επίσης να εμφανίζουν ηπατομεγαλία ή/και σπληνομεγαλία.

Το περιφερικό αίμα περιέχει περισσότερους από 5% βλάστες ή βλάστες που περιέχουν ραβδία Auer. Όλα τα χαρακτηριστικά που περιγράφηκαν στα άλλα ΜΔΣ μπορούν να υπάρχουν και στην RAEB-T όπως αναιμία, ουδετεροπενία, θρομβοπενία και δυσπλαστικά πολυμορφοπύρηνα ή αιμοπετάλια. Οι βλάστες στον μυελό κυμαίνονται μεταξύ 20 και 30%. Έχει την χειρότερη πρόγνωση η μέση επιβίωση είναι 5 μήνες και η συχνότητα λευχαιμικής εκτροπής 60%.

Κλινικές ποικιλίες ΜΔΣ

Αλληλοεπικαλυπτόμενα Σύνδρομα - Υποκυτταρικά ΜΔΣ

Αν και οι περισσότεροι ασθενείς με ΜΔΣ έχουν μυελό φυσιολογικής ή αυξημένης κυτταροβρίθειας, υπάρχουν λίγοι ασθενείς (< 15% των ΜΔΣ) που έχουν υποπλαστικό μυελό κατά την διάγνωση^{92,68}. Η διαφορική διάγνωση αυτών των συνδρόμων από την απλαστική αναιμία ή την ΟΜΛ είναι δύσκολη. Όταν η κυτταροβρίθεια του μυελού είναι μειωμένη, είναι προβληματική η αναγνώριση δυσπλαστικών στοιχείων τόσο στο μυελικό επίχρισμα όσο και στην οστεομυελική βιοψία. Οι περισσότερες υποπλαστικές μορφές ανήκουν στην κατηγορία RA και RAEB⁹³. Η ανεύρεση καρυοτυπικής ανωμαλίας χαρακτηριστικής των ΜΔΣ (π.χ. -5, -7, 5q-, 7q-, +8) αποδεικνύεται ιδιαίτερα χρήσιμη στην αναγνώριση υποπλαστικού ΜΔΣ^{94,95,96}.

ΜΔΣ με ίνωση

Ήπια έως μέτρια μυελοϊνωση παρατηρείται σε ποσοστό μέχρι 50% των ΜΔΣ, ενώ εκσεσημασμένη παρατηρείται σε ποσοστό μικρότερο του 15%⁹⁷. Μυελοϊνωση παρατηρείται σε όλους τους κατά FAB υπότυπους και είναι συχνότερη στα δευτεροπαθή ΜΔΣ (εκσεσημασμένη μυελοϊνωση στο 50% των περιπτώσεων και ήπια στο 85%)^{98,99}.

Το σύνδρομο του ΜΔΣ με μυελοϊνωση χαρακτηρίζεται από αιφνίδια έναρξη πανκυτταροπενίας χωρίς οργανομεγαλία, αλλά με σημαντική ανισοποικιλοκυττάρωση των ερυθρών αιμοσφαιρίων, υπερκυτταρικό μυελό με μυελοϊνωση, δυσπλασία και των τριών σειρών, υπόλοβα και αυξημένα μεγακαρυοκύτταρα και αυξημένο αριθμό βλαστών¹⁰⁰. Μπορεί επίσης να υπάρχει λευκοερυθροβλαστική αντίδραση. Οι ασθενείς συνήθως έχουν ταχεία εξέλιξη¹⁰¹.



Το σύνδρομο αυτό θα πρέπει να διαφοροδιαγνωστεί από τα Μυελο- παραγωγικά σύνδρομα (ΜΠΣ), που μερικές φορές είναι αρκετά δύσκολο.

5q- Σύνδρομο

Έχει περιγραφεί στο κεφάλαιο της RA.

Μυελοδυσπλαστικά/ Μυελοπαραγωγικά Σύνδρομα

Μερικοί ασθενείς έχουν διαταραχές με χαρακτηριστικά τόσο ΜΔΣ όσο και ΜΠΣ. Σ' αυτήν την ομάδα συμπεριλαμβάνονται περιπτώσεις με λευκοκυττάρωση, μυελό με αυξημένη κυτταροβρίθεια, ποικίλου βαθμού δυσπλασία και σπληνομεγαλία. Μερικοί από αυτούς τους ασθενείς είναι πιθανόν να έχουν CMML. Αν και η FAB ταξινόμηση κατέταξε την CMML στα ΜΔΣ, αποτελεί πρότυπο για αυτές τις διαταραχές που βρίσκονται μεταξύ ΜΔΣ και ΜΠΣ. Η CMML αρχικά θεωρήθηκε ΜΔΣ λόγω της δυσπλασίας και των περιφερικών κυτταροπενιών που την συνοδεύουν. Αυτή η ταξινόμηση δεν είναι αποδεκτή από όλους τους ερευνητές, γιατί τα μυελοπαραγωγικά στοιχεία κυριαρχούν σε αρκετές περιπτώσεις¹⁰². Έτσι το νόσημα υποδιαιρέθηκε σε δύο μορφές την παραγωγική και την μη-παραγωγική μορφή. Η παραγωγική μορφή (Λευκά αιμοσφαίρια $> 12.000/mm^3$, ηπατο-σπληνομεγαλία, συστηματικές εκδηλώσεις) μοιάζει περισσότερο με ΜΠΣ. Επιπλέον οι καλλιέργειες μυελού των προγονικών κυττάρων της μυελικής σειράς ασθενών με CMML είναι ανάλογες των ΜΠΣ που χαρακτηρίζονται από αυξημένες αποικίες μυελικής σειράς και όχι των ΜΔΣ των οποίων τα προγονικά κύτταρα αναπτύσσονται πτωχά στις ημίρρεστες καλλιέργειες.

Δευτεροπαθή ΜΔΣ (δ-ΜΔΣ)

Τα δευτεροπαθή ΜΔΣ (σχετιζόμενα με θεραπεία ή με τοξικά χημικά) αποτελούν ένα σημαντικό κλινικό πρόβλημα¹⁰³. Η αυξανόμενη συχνότητα των δ-ΜΔΣ και δευτεροπαθών λευχαιμιών οφείλεται σε αρκετούς παράγοντες, όπως η μακρύτερη επιβίωση μετά από επιτυχή θεραπεία στερεών όγκων, τα εντατικότερα θεραπευτικά σχήματα συνδυασμού χημειοθεραπείας (Χ/Θ)-ακτινοθεραπείας (Α/Θ) και τέλος η περιβαλλοντική μόλυνση και η έκθεση σε χημικά και καρκινογόνα στις βιομηχανοποιημένες χώρες. Τα δ-ΜΔΣ έχουν κακή πρόγνωση¹⁰⁴.

Σε όλους τους ασθενείς παρατηρούνται ανώμαλοι καρυότυποι, με πολλαπλές χρωμοσωμικές ανωμαλίες¹⁰⁵. Τα χρωμοσώματα 5 και 7 είναι τα πιο συχνά εμπλεκόμενα (85%) και σχετίζονται με έκθεση σε αλκυλιωτικούς παράγοντες και σε ακτινοβολία. Το βενζόλιο προκαλεί συνήθως τρι-



σωμία 9. Τελευταία έχουν αναγνωριστεί δύο επιπλέον μορφές λευχαιμίας σχετιζόμενης με χημειοθεραπεία, η μία οφείλεται σε έκθεση σε θεραπευτικούς παράγοντες που αναστέλλουν την τοποϊσομεράση II και αφορά την χρωμοσωμική θέση 11q23 και η δεύτερη την 21q22 θέση¹⁰⁶.

Οστεομυελική βιοψία

Η οστεομυελική βιοψία αποτελεί μία εξέταση, σημαντική για την διάγνωση των ΜΔΣ και προσθέτει συχνά πληροφορίες, που δεν παρέχονται από την εξέταση του μυελικού επιχρίσματος. Η βιοψία είναι το καλύτερο υλικό για την μελέτη της κυτταροβρίθειας, της ύπαρξης ίνωσης ή λεμφικής διήθησης και για τον υπολογισμό της απόπτωσης¹⁰⁷. Στα ΜΔΣ παρατηρείται συχνά ανώμαλη κατανομή κυττάρων που μπορεί να εκτιμηθεί μόνο στην βιοψία. Συγκεκριμένα τα άωρα μυελικά πρόγονικά κύτταρα σχηματίζουν αθροίσματα κεντρικά στην μυελική κοιλότητα, αντί για την συνήθη παραδοκιδιόδη κατανομή τους. Το φαινόμενο αυτό ονομάζεται "Ανώμαλη εντόπιση άωρων πρόγονικών κυττάρων" ["Abnormal localization of immature precursors" (ALIP)] και θεωρείται κακός προγνωστικός δείκτης. Μεγακαρυοκύτταρα με δυσπλαστικούς χαρακτήρες εντοπίζονται εύκολα στην βιοψία. Οι δυσπλασίες της ερυθράς και της μυελικής σειράς, αν και παρατηρούνται και στην βιοψία, είναι εμφανέστερες στο μυελικό επίχρισμα.

Η οστεομυελική βιοψία είναι ιδιαίτερα χρήσιμη σε περιπτώσεις όπου ο μυελός είναι μειωμένης ή φυσιολογικής κυτταροβρίθειας, καθώς και σε περιπτώσεις με αυξημένη ίνωση, στις οποίες λαμβάνεται πτωχό και κατά συνέπεια μη αντιπροσωπευτικό δείγμα μυελικού επιχρίσματος^{108,109}. Επομένως είναι πιθανά απαραίτητη στα δευτεροπαθή ΜΔΣ, στα οποία τόσο η μειωμένη κυτταροβρίθεια όσο και η ίνωση είναι συχνότερες των πρωτοπαθών ΜΔΣ. Επίσης είναι σημαντική στην διαφορική διάγνωση ενός υποκυτταρικού ΜΔΣ, που πιθανά έχει αυξημένη ίνωση και εστίες βλαστών, από την απλαστική αναιμία που δεν έχει αυτά τα χαρακτηριστικά¹¹⁰.

Πρόγνωση

Η FAB μορφολογική ταξινόμηση των ΜΔΣ, η οποία αναπτύχθηκε το 1982, χρησιμοποιήθηκε και για τον καθορισμό της πρόγνωσης. Αν και τα ΜΔΣ αποτελούν μία ετερογενή ομάδα νοσημάτων, διαπιστώθηκε ότι υπήρχε αλληλουχία στα προγνωστικά ευρήματα σε σχέση με την επιβίωση και την εξέλιξη σε ΟΜΛ σε αρκετές και μεγάλες μελέτες όταν χρησιμο-

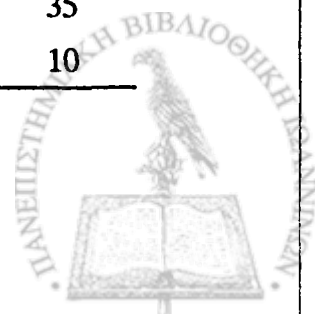


ποιούνταν οι κατά FAB υπότυποι¹¹¹ (Πίνακας 2). Οι ασθενείς με RAEB και RAEB-T είχαν σχετικά πτωχή πρόγνωση με μέση επιβίωση κυμαινόμενη μεταξύ 5 και 12 μηνών, σε αντίθεση με τους ασθενείς με RA και RARS που είχαν μέση επιβίωση 3-6 ετών. Η αναλογία των ασθενών στους οποίους η νόσος εξελίχθηκε σε ΟΜΛ παρουσίαζε παρόμοια διακύμανση: στους υψηλού κινδύνου ασθενείς με RAEB και RAEB-T η συχνότητα αυτή ήταν 40-50%, ενώ στην ομάδα χαμηλού κινδύνου (RA και RARS) ήταν 5-15%. Σε μία άλλη μελέτη στην οποία εκτιμήθηκε ο χρόνος εξέλιξης σε ΟΜΛ διαπιστώθηκε ότι 25% και 55% των ασθενών με RAEB και RAEB-T αντίστοιχα παρουσίαζαν την εξέλιξη σε 1 χρόνο, αντίστοιχα, και 35% και 65% σε 2 χρόνια. Αντίθετα για τους ασθενείς με RA η συχνότητα ήταν 5% και 10% σε 1 και 2 χρόνια αντίστοιχα. Κανείς από τους ασθενείς με RARS δεν παρουσίασε λευχαιμική εκτροπή στα 2 χρόνια.

Σύμφωνα με μελέτες, που χρησιμοποίησαν την FAB ταξινόμηση, ο κύριος προγνωστικός δείκτης επιβίωσης για τους ασθενείς με CMML είναι ο αριθμός των βλαστών¹¹². Η μέση επιβίωση των ασθενών με CMML με βλάστες <5% ήταν 53 μήνες, ενώ για αυτούς με βλάστες 5-20% ήταν 16 μήνες. Η μονοκυττάρωση $>2,6 \times 10^9/L$, και ο ανώμαλος καρύοτυπος σχετίζονται επίσης με κακή πρόγνωση. Παραμένει αμφιλεγόμενο αν οι υποκυτταρικές μορφές ΜΔΣ έχουν προγνωστική σημασία, γιατί σε ορισμένες μελέτες σχετίζονται με λιγότερο συχνή εκτροπή προς ΟΛ και μεγαλύτερη επιβίωση, ενώ σε άλλες έχουν ανάλογη εξέλιξη με τα υπόλοιπα ΜΔΣ¹¹³. Οι ασθενείς με ΜΔΣ σχετιζόμενα με θεραπεία έχουν συχνότερα υποκυτταρικό μυελό και αυτοί έχουν συνήθως μικρότερη επιβίωση. Οι ασθενείς με ΜΔΣ με μυελοϊώση έχουν μικρότερη επιβίωση, συγκρινόμενοι με ασθενείς με ΜΔΣ χωρίς ίνωση¹⁰¹. Σύμφωνα με την FAB ταξινόμηση η παρουσία ραβδίων Aue1 στα κύτταρα της μυελικής σειράς καθορίζει την διάγνωση της

Πίνακας 2. Επιβίωση και εξέλιξη ΜΔΣ σε ΟΜΛ σε σχέση με μορφολογικούς υπότυπους (Μετά-ανάλυση)

	Κατά FAB υπότυποι				
	RA	RARS	RAEB	RAEB-T	CMML
Διάμεση επιβίωση (μήνες)	43	73	12	5	20
Μετατροπή σε ΟΜΛ (%)	15	5	40	50	35
Αναλογία ασθενών (%)	25	15	35	15	10



RAEB-T. Δεν αποδείχθηκε όμως επίπτωση της ύπαρξης ραβδίων Auer στην επιβίωση.

Η θνησιμότητα στα ΜΔΣ οφείλεται σε διάφορα αίτια, όπως η εξέλιξη σε ΟΜΛ, η λοίμωξη, ή η αιμορραγία. Επειδή οι περισσότεροι ασθενείς είναι ηλικιωμένοι και άλλα αίτια, μη αιματολογικά, συμβάλλουν σημαντικά στην θνησιμότητα. Στους ασθενείς με RAEB και RAEB-T η ΟΜΛ είναι το αίτιο θανάτου στο 20-55% των ασθενών, η λοίμωξη και η αιμορραγία, λόγω μυελικής ανεπάρκειας, προκαλούν περίπου το 36-50% των θανάτων, ενώ τα μη αιματολογικά αίτια το 10-20%¹¹⁴. Στην RA και RARS τα στοιχεία αυτά περίπου αναστρέφονται και η ΟΜΛ είναι το αίτιο στο 0-29%, η λοίμωξη και αιμορραγία στο 15-44% και τα μη αιματολογικά αίτια το 25-42% των θανάτων.

Εκτός από την FAB ταξινόμηση και αναπτύχθηκαν άλλα συστήματα που χρησιμοποιήσαν κλινικά ή κυτταρογενετικά χαρακτηριστικά για τον καθορισμό της πρόγνωσης. Σε όλα βρέθηκε ότι ο σημαντικότερος προγνωστικός δείκτης ήταν ο αριθμός των βλαστών. Αποδείχθηκε μάλιστα ότι το όριο των 10% βλαστών (σημπεριλαμβανομένων δηλαδή, των ασθενών με RAEB και RAEB-T με βλάστες > 10%) είναι καθοριστικό και προσθέτει σημαντική προγνωστική αξία στα κριτήρια της FAB ταξινόμησης.

Το Bougne-mouth score¹¹⁵ ήταν η πρώτη προσπάθεια που έγινε για την ταξινόμηση των ΜΔΣ σύμφωνα με τους προγνωστικούς δείκτες. Αρχετές και ανόμοιες μέθοδοι αναπτύχθηκαν στην συνέχεια για την εκτίμηση της κλινικής έκβασης ασθενών με ΜΔΣ^{116,117}. Σε μία προσπάθεια βελτίωσης αυτών των συστημάτων, ένα διεθνές Συμπόσιο για την μελέτη των ΜΔΣ συνδύασε τα κυτταρογενετικά, μορφολογικά και κλινικά χαρακτηριστικά από 816 ασθενείς με πρωτοπαθή ΜΔΣ, που δεν είχαν υποβληθεί σε καμία θεραπεία. Τα στοιχεία συνελέγησαν από επτά προηγούμενες μεγάλες μελέτες, και έγινε μία σφαιρική ανάλυση των δεδομένων. Οι μελέτες που είχαν γίνει μέχρι τότε και τα στοιχεία των ασθενών επανεκτιμήθηκαν, ώστε να δημιουργηθεί ένα κοινά αποδεκτό προγνωστικό σύστημα. Από την ανάλυση κάθε παράγοντα χωριστά αποδείχθηκε ότι οι πιο σημαντικοί παράγοντες για την εξέλιξη σε ΟΜΛ ήταν το ποσοστό των μυελοβλαστών του μυελού, ο αριθμός των κυτταρογενετικών ανωμαλιών, και ο αριθμός των κυτταροπενιών. Για την επιβίωση, επιπρόσθετα με τους παραπάνω παράγοντες, αποδείχθηκαν μεγάλης σημασίας η ηλικία και το φύλο. Οι κυτταρογενετικές ανωμαλίες¹¹⁸ που σχετίζονταν με καλή πρόγνωση ήταν: φυσιολογικός καρυότυπος, εξάλειψη του Y χρωμοσώματος μόνον, del(5q)



μόνο, del(20q) μόνο. Πτωχή πρόγνωση είχαν οι ακόλουθες κυτταρογενετικές ανωμαλίες: σύνθετος καρυότυπος (π.χ. τρεις ή περισσότερες ανωμαλίες) και ανωμαλίες του χρωμοσώματος 7. Ενδιαμέσου κινδύνου θεωρήθηκαν όλες οι άλλες ανωμαλίες. Μία πολυπαραγοντική μελέτη συνδύασε τις τρεις υποομάδες των καρυοτυπικών ανωμαλιών με το ποσοστό των βλάστων του μυελού και τον αριθμό των κυτταροπενιών για να δημιουργήσει ένα προγνωστικό μοντέλο, ονομαζόμενο το Διεθνές προγνωστικό σύστημα βαθμολόγησης (International Prognostic scoring system, IPSS)¹⁴. Αναλόγως με την στατιστική σημασία αυτών των παραμέτρων οι ασθενείς κατανεμήθηκαν σε διακριτές ομάδες κινδύνου (χαμηλού, ενδιαμέσου-1, ενδιαμέσου-2, και υψηλού) για την εξέλιξη σε ΟΜΛ και την επιβίωση. Ο σχηματισμός υποομάδων ανάλογα με την ηλικία βελτίωσε περαιτέρω την ανάλυση της επιβίωσης (Πίνακας 3)¹⁴.

Πίνακας 3. Διεθνές προγνωστικό σύστημα βαθμολόγησης για ΜΔΣ (IPSS) (1997)

Προγνωστικός Δείκτης	Τιμή score για επιβίωση και εξέλιξη σε ΟΜΛ				
	0	0,5	1	1,5	2
% βλάστες μυελού	<5	5-10	-	11-20	21-30
Καρυότυπος	Καλής πρόγνωσης	Ενδιάμεσης πρόγνωσης	Πτωχής πρόγνωσης		
Κυτταροπενίες	0/1	2/3			
	Ομάδα κινδύνου			Συνολικό score	
	Χαμηλού κινδύνου			0	
	Ενδιαμέσου κινδύνου-1			0,5-1,0	
	Ενδιαμέσου κινδύνου-2			1,5-2,0	
	Υψηλού κινδύνου			≥2,5	

Καλής πρόγνωσης Καρυότυπος: -Y, del(5q), del(20q)

Πτωχής πρόγνωσης Καρυότυπος: 3 ή περισσότερες ανωμαλίες (σύνθετες) ή ανωμαλίες του χρωμοσώματος 7

Ενδιάμεσης πρόγνωσης Καρυότυπος: όλες οι άλλες ανωμαλίες

Κυτταροπενίες: Ουδετερόφιλα < 1.500/μl, Αιμοπετάλια < 100.000/μl, Αιμοσφαιρίνη < 10gr/μl



Πίνακας 4. Επιβίωση και εξέλιξη ΜΔΣ σε ΟΜΑ σχετιζόμενη με την ηλικία στις υποομάδες του IPSS

Διάμεση επιβίωση (έτη)					
	Αριθμός ασθ.	Χαμηλού κινδύνου	Ενδιαμέσου κινδύνου-1	Ενδιαμέσου κινδύνου-2	Υψηλού κινδύνου
Συνολικός αρ. ασθ.	816	267 (33%)	314 (38%)	176 (22%)	59 (7%)
Διάμεση επιβίωση(έτη)		5,7	3,5	1,2	0,4
Ηλικία ≤ 60	205 (25%)	11,8	5,2	1,8	0,3
>60	611	4,8	2,7	1,1	0,5
≤ 70	445 (54%)	9,0	4,4	1,3	0,4
>70	371	3,9	2,4	1,2	0,4

Διάμεσος χρόνος (έτη) για εξέλιξη σε ΟΜΑ 25% των ασθενών

	Αριθμός ασθ.	Χαμηλού κινδύνου	Ενδιαμέσου κινδύνου-1	Ενδιαμέσου κινδύνου-2	Υψηλού κινδύνου
Συνολικός αρ. ασθ.	759	235 (31%)	295 (39%)	171 (22%)	58 (8%)
Διάμεσος χρόνος (έτη)		9,4	3,3	1,1	0,2
Ηλικία ≤ 60	187 (25%)	>9,4	6,9	0,7	0,2
>60	572	9,4	2,7	1,3	0,2
≤ 70	414 (55%)	>9,4	5,5	1,0	0,2
>70	345	>5,8	2,2	1,4	0,4

Θεραπεία

Η συνήθως μεγάλη ηλικία των ασθενών με ΜΔΣ, η αλληλοεπικάλυψη των νοσημάτων αυτών με άλλα νεοπλασματικά νοσήματα του αρχέγονου αιμοποιητικού κυττάρου, καθώς και η ποικίλη κλινική τους εικόνα δημιούργησε δυσκολίες στην θεραπευτική τους προσέγγιση. Η καλύτερη κατανόηση της παθογένειας και της βιολογίας των ΜΔΣ, η αναγνώριση προγνωστικών δεικτών και η ανάπτυξη νέων θεραπευτικών παραγόντων θα οδηγήσει σε καλύτερη αντιμετώπιση στο μέλλον.

Θεραπευτικά διλήμματα

Αρκετά διλήμματα υπάρχουν όσον αφορά την θεραπεία των ΜΔΣ και συγκεκριμένα ποιόν ασθενή, πότε, και πως να θεραπεύσουμε. Η κατά



FAB ταξινόμηση συνέβαλε στην αναγνώριση διακριτών προγνωστικά υποομάδων των ΜΔΣ. Οι διαφορές στην επιβίωση και στα κλινικά χαρακτηριστικά μέσα στις υποομάδες της FAB ταξινόμησης απέδειξαν ότι ο αριθμός των βλαστών μόνον, είναι ανεπαρκής για τον καθορισμό του κινδύνου εκτροπής. Αντίθετα το διεθνές προγνωστικό scoring σύστημα (IPSS), που πρόσφατα ανακοινώθηκε και το οποίο συμπεριλαμβάνει τον αριθμό των βλαστών, τον καρυότυπο και τον αριθμό των κυτταροπενιών, φαίνεται να προβλέπει με μεγαλύτερη ακρίβεια τόσο την επιβίωση όσο και τον κίνδυνο μετατροπής σε οξεία λευχαιμία και βοηθάει στην αναγνώριση ασθενών που θα επωφεληθούν από την θεραπεία.

Τα ΜΔΣ προέρχονται από μία σταδιακή άθροιση γενετικών βλαβών του αρχέγονου αιμοποιητικού κυττάρου (stem cell). Έχει αποδειχθεί ότι οι πρώιμες γενετικές βλάβες οδηγούν σε αυξημένη απόπτωση των προγονικών κυττάρων με αποτέλεσμα περιφερικές κυτταροπενίες¹¹⁹. Αντίθετα η λευχαιμική εξέλιξη προέρχεται από γεγονότα που εμποδίζουν το προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο¹²⁰. Επομένως η θεραπεία στα αρχικά στάδια σκοπό έχει την μείωση της αυξημένης απόπτωσης και την προαγωγή της διαφοροποίησης, ενώ στα προχωρημένα στάδια απαιτείται θεραπεία που θα εξαφανίσει τον νεοπλασματικό κλώνο.

Υποστηρικτική αγωγή

Οι μεταγγίσεις ερυθρών αιμοσφαιρίων αποτελούν την πιο συχνά χρησιμοποιούμενη και απαραίτητη για την διατήρηση στη ζωή πολλών ασθενών με ΜΔΣ θεραπεία. Είναι αναγκαία η ανάπτυξη προγράμματος μετάγγισης, ώστε να διατηρείται η ποιότητα της ζωής και ο ασθενής να είναι ελεύθερος συμπτωμάτων αναιμίας. Οι πολλαπλές μεταγγίσεις οδηγούν σύντομα σε υπερφόρτωση με σίδηρο και ενδείκνυται αποσιδήρωση με δεσφερριόξαμίνη σε πολλούς ασθενείς για την πρόληψη της επιβάρυνσης καρδιακής λειτουργίας και των υπολοίπων οργάνων. Η ουδετεροπενία μπορεί να δημιουργήσει προβλήματα, με τις επαναλαμβανόμενες λοιμώξεις, που πρέπει να θεραπεύονται έγκαιρα και με μεγάλη ακρίβεια, ενώ και η προφυλακτική αντιβίωση είναι απαραίτητη σε ορισμένες περιπτώσεις. Η θρομβοπενία είναι το μεγαλύτερο πρόβλημα, γιατί προς το παρόν δεν υπάρχει αποτελεσματική θεραπεία, εκτός από τις μεταγγίσεις αιμοπεταλίων όταν κρίνεται απαραίτητο.

Αιμοποιητικοί αυξητικοί παράγοντες

Η παθολογική ανάπτυξη και η αυξημένη απόπτωση των προγονικών



κυττάρων των ΜΔΣ οφείλεται πιθανόν στην σχετική ανεπάρκεια ή στην ελαττωμένη ανταπόκριση σε τροφικούς παράγοντες ή σε διαταραχή της ισορροπίας μεταξύ παραγόντων που προάγουν και αυτών που καταστέλλουν την αιμοποίηση. Αυξημένες συγκεντρώσεις ανασυνδυασμένων αιμοποιητικών παραγόντων αυξάνουν *in vitro* την επιβίωση και την διαφοροποίηση των προγονικών κυττάρων των ΜΔΣ. Έχει αποδειχθεί από μελέτες ότι τόσο ο παράγοντας που διεγείρει τον σχηματισμό αποικιών κοκκιοκυττάρων (granulocyte colony-stimulating factor, G-CSF), όσο και ο παράγοντας που διεγείρει τον σχηματισμό αποικιών κοκκιοκυττάρων-μακροφάγων (granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, GM-CSF) αυξάνουν *in vitro* την ανάπτυξη αποικιών της μυελικής σειράς (Colony Forming Unit-Granulocyte Macrophage, CFU-GM), ελαττώνουν την απόπτωση και βελτιώνουν τον αριθμό και την λειτουργία των κοκκιοκυττάρων στο 76-90% των ασθενών με ΜΔΣ¹²¹. Η προσθήκη του παράγοντα διαφοροποίησης, ρετινοϊκό οξύ (all-trans retinoid acid, ATRA) μπορεί να βελτιώσει περαιτέρω την ανταπόκριση^{122,123}. Δυστυχώς όμως η δράση αυτών των κυτταροκινών περιορίζεται μόνο στην κοκκιοειδή σειρά. Δεν επηρεάζουν την αιμοσφαιρίνη, ενώ προκαλούν και σημαντική μείωση των αιμοπεταλίων. Επιπλέον μεγάλες κλινικές μελέτες δεν έδειξαν αύξηση της επιβίωσης¹²⁴⁻¹³⁰. Κατ' αναλογία η χορήγηση πολυδύναμων αιμοποιητικών κυτταροκινών, όπως η ιντερλευκίνη-3 (IL-3) και η ιντερλευκίνη-6 μόνες τους ή σε συνδυασμό με G-CSF/GM-CSF είχαν απογοητευτικά αποτελέσματα και συχνά συνοδεύονταν από σημαντική τοξικότητα.

Η Ερυθροποιητίνη, ένας φυσιολογικός διεγέρτης της αιμοποίησης, βελτιώνει την αναιμία στο 15-30% των ασθενών με ΜΔΣ^{131,132}. Η ανταπόκριση συνήθως παρατηρείται τις οκτώ πρώτες εβδομάδες της θεραπείας και αφορά ασθενείς με ελάχιστες προ θεραπείας ανάγκες σε μεταγγίσεις, επίπεδα ερυθροποιητίνης μικρότερα από 200U/L και FAB υπότυπο άλλο εκτός RARS^{133,134,135}. *In vitro* μελέτες δείχνουν ότι η προσθήκη μυελοειδών αυξητικών παραγόντων, λόγω συνεργικής δράσης με την Ερo, αυξάνουν την ανταπόκριση σ' αυτήν. Και οι κλινικές μελέτες που χρησιμοποίησαν ΕΡΟ σε συνδυασμό με G-CSF ή GM-CSF έδειξαν βελτίωση στα επίπεδα της αιμοσφαιρίνης και/ ή μείωση των αναγκών σε μεταγγίσεις στο 9-52% των ασθενών με μέση διάρκεια ανταπόκρισης 11-24 μήνες¹³⁶⁻¹⁴⁰. Επιπλέον σημαντικό είναι ότι η προσθήκη του G-CSF προκάλεσε ανταπόκριση σε ένα ποσοστό ασθενών που δεν οφελήθηκαν από την ΕΡΟ μόνο, ιδιαίτερα σε ασθενείς με RARS. Σε μία πρόσφατη πολυπαραγοντική μελέτη η χαμη-



λή Ερυθροποιητίνη ορού και οι μειωμένες ανάγκες για μεταγγίσεις προ θεραπείας αποδείχθηκαν οι κυριότεροι δείκτες ανταπόκρισης¹⁴¹. Άλλοι προγνωστικοί δείκτες είναι ο υψηλός αριθμός δικτυοερυθροκυττάρων, φυσιολογικός καρυότυπος, χαμηλός παράγοντας νέκρωσης όγκου (tumor necrosis factor, TNF-α) στον ορό και αυξημένοι ερυθροβλάστες μυελού. Σε αντίθεση με την θεραπεία με Ερο μόνον, η ανταπόκριση στον συνδυασμό Ερο και G-CSF των ασθενών με RARS ήταν ανάλογη της ανταπόκρισης των ασθενών με τους άλλους υποτύπους της FAB.

Φυσιολογικά η ΕΡΟ ασκεί την δράση της μέσω αναστολής της απόπτωσης και της προαγωγής της διαφοροποίησης της προγονικών κυττάρων της ερυθράς σειράς. Παρόμοια και ο συνδυασμός G-CSF και ΕΡΟ μειώνει σημαντικά στον μυελό τα αποπτωτικά κύτταρα. Κανένας αυξητικός παράγοντας δεν επηρέασε την συχνότητα λευχαιμικής εκτροπής.

Τροφικοί και διαφοροποιητικοί παράγοντες

Η 5-αζακυτιδίνη (5-Aza) και η 5-αζα-2-δεοξυκυτιδίνη είναι ανάλογα της πυριμιδίνης και αναστέλλουν την δραστηριότητα της DNA μεθυλοτρανσφεράσης. Βελτιώνουν την μυελοδυσπλαστική αιμοποίηση, αναστέλλοντας την μεθυλίωση του παθολογικού γονιδίου και επιτρέποντας την κυτταρική διαφοροποίηση. Οι μελέτες με 5-Aza στα ΜΔΣ, έχουν γίνει μέχρι σήμερα μόνο σε ασθενείς με υψηλού κινδύνου ΜΔΣ. Περισσότεροι από το 63% των ασθενών παρουσίασαν βελτίωση των τιμών του περιφερικού αίματος και/ή κυτταρογενετική ανταπόκριση. Επιπλέον μία μεγάλη προοπτική και τυχαιοποιημένη μελέτη φάσης III, που έγινε από την Ομάδα Cancer and Leukemia απέδειξε ότι οι ασθενείς που είχαν θεραπευθεί με 5-Aza είχαν σημαντικά μικρότερη πιθανότητα εκτροπής σε ΟΜΛ και μεγαλύτερο χρονικό διάστημα έως την λευχαιμική εκτροπή ή τον θάνατο συγκρινόμενοι με την ομάδα ελέγχου^{142,143}. Βελτιώθηκε επίσης η ποιότητα της ζωής σε αυτούς που ελάμβαναν 5-Aza¹⁴⁴. Η κυριότερη επιπλοκή της 5-Aza, που είναι η μυελοκαταστολή, περιορίζει την χρήση της σε ασθενείς με χαμηλού κινδύνου ΜΔΣ και δημιουργεί το ερώτημα αν η δράση της οφείλεται στην διαφοροποίηση ή στην καταστολή του κλώνου.

Το φαινυλοβουτυρικό Νάτριο (Sodium phenylbutyrate), μία αρωματική βραχεία αλυσος λιπαρών οξέων, έχει ικανότητα διαφοροποίησης της λευχαιμίας και των κυτταρικών σειρών στερεών όγκων. Ο ακριβής μηχανισμός δράσης δεν είναι γνωστός, αν και φαίνεται ότι επηρεάζει την μεταγραφική ρύθμιση της έκφρασης των γονιδίων, μέσω της αναστολής της μεθυλίωσης του DNA και της αποακετυλίωσης της ιστόνης. Σε μία μελέτη



φάσης I 17/27 (63%) ασθενείς με ΜΔΣ ή ΟΜΛ παρουσίασαν βελτίωση του αριθμού των πολυμορφοκυττάρων και αύξηση του αριθμού των αιμοπεταλίων¹⁴⁵. Σε εξέλιξη βρίσκεται τώρα η μελέτη φάσης II.

Η Αμιφοστίνη, ένα προ-φάρμακο που ενεργοποιείται από την αλκαλική φωσφατάση της μεμβράνης για να μετατραπεί σε αμινοθιόλη WR-1065, αυξάνει *in vitro* την ανάπτυξη των φυσιολογικών και των ΜΔΣ πολυδύναμων προγονικών κυττάρων και αυτών της ερυθράς σειράς και ελατώνει την αναλογία των CD34⁺ κυττάρων που βρίσκονται σε απόπτωση. Η δράση των μεταβολιτών της αμιφοστίνης φαίνεται ότι οφείλεται στην ομοιότητά τους με τις πολυαμίνες, οι οποίες συνδέονται με το DNA και ρυθμίζουν την κυτταρική παραγωγή και διαφοροποίηση. Η αμιφοστίνη επίσης μειώνει την έκκριση προ-αποπτωτικών κυτταροκινών TNF-α και IL-1b από το σπρώμα. Οι αρχικές μελέτες φάσης I/II που έδειξαν βελτίωση της *in vitro* ανάπτυξης αποικιών και αιματολογική ανταπόκριση σε 15/18 ασθενείς (83%) που έλαβαν αμιφοστίνη¹⁴⁶ δεν επιβεβαιώθηκαν σε όλες τις μελέτες που ακολούθησαν¹⁴⁷.

Χαμηλής έντασης χημειοθεραπεία

Η συνεχής καταστολή του μυελοδυσπλαστικού κλώνου, με χημειοθεραπεία χαμηλής έντασης, αποτελεί μία ελκυστική θεραπευτική στρατηγική, στους προχωρημένους κατά FAB υπότυπους ΜΔΣ, ιδιαίτερα σε ηλικιωμένα άτομα που συνοδεύονται και με άλλους επιβαρυντικούς παράγοντες. Θεραπεία με χαμηλή δόση Αρασιτίνης προκάλεσε ανταπόκριση στο 10-25% των ασθενών με ΜΔΣ ή ΟΜΛ δευτερογενή μετά ΜΔΣ¹⁴⁸⁻¹⁵². Προγνωστικοί δείκτες ανταπόκρισης είναι ο φυσιολογικός αριθμός αιμοπεταλίων πριν την θεραπεία και ο φυσιολογικός καρυότυπος. Μία μεγάλη τυχαιοποιημένη μελέτη έδειξε ότι η επιβίωση των ασθενών με ΜΔΣ που πήραν χαμηλή δόση Αρασιτίνης δεν ήταν μεγαλύτερη αυτών που έλαβαν μόνο υποστηρικτική αγωγή¹⁵³. Η προσθήκη GM-CSF και IL-3 δεν βελτίωσε την ανταπόκριση¹⁵⁴⁻¹⁵⁶. Ανάλογα αποτελέσματα είχε και η χαμηλή δόση ανθρακυκλινών. Η θεραπεία με χαμηλή δόση μελφαλάνης από του στόματος είχε σαν αποτέλεσμα πλήρη αιματολογική ανταπόκριση στο ένα τρίτο των ηλικιωμένων ασθενών με ενδιαμέσου-2 προς υψηλού κινδύνου ΜΔΣ, ειδικά σε περιπτώσεις με φυσιολογικό καρυότυπο και φυσιολογικό έως υποκυτταρικό μυελό προ θεραπείας^{157,158}. Η τοποτεκάνη, αναστολέας της τοποϊσομεράσης I, χορηγούμενη σε 5ημερη συνεχή ενδοφλέβια έγχυση, είχε ανταπόκριση στους 26/60 (43%) ασθενείς με RAEB, RAEB-T, ή CMML ενώ 19 ασθενείς (32%) είχαν αιματολογική και κυτταρογενετική



πλήρη ύφεση. Η προσθήκη Αραουτίνης στο παραπάνω σχήμα βελτιώνει περαιτέρω την ανταπόκριση [πλήρης ύφεση, 48/86 (56%)] και φαίνεται ιδιαίτερα αποτελεσματική σε ασθενείς με καρυοτυπικές ανωμαλίες που αφορούν τα χρωμοσώματα 5, 7 (πλήρης ύφεση, 71%), ή τα δευτερογενή ΜΔΣ (πλήρης ύφεση, 72%)¹⁵⁹.

Ασθενείς με CMMML συχνά θεραπεύονται με τα φάρμακα που χρησιμοποιούνται στα μυελοπαραγωγικά σύνδρομα. Μεγάλη τυχαιοποιημένη μελέτη φάσης III έδειξε ότι η υδροξουρία είχε καλύτερα αποτελέσματα (60% ανταπόκριση) από την ετοποσίδη (36%) και η επιβίωση ήταν καλύτερη με την πρώτη¹⁶⁰. Παρόλ' αυτά η μέση επιβίωση με την υδροξουρία ήταν μόνο 20 μήνες, που είναι ανάλογη με την επιβίωση των ασθενών χωρίς θεραπεία στις περισσότερες μελέτες.

Τροποποίηση των οδών μεταβίβασης του μηνύματος απόπτωσης

Αρκετές μελέτες έδειξαν ότι η αυξημένη απόπτωση και οι κατά συνέπεια αυτής κυτταροπενίες στα πρώιμα ΜΔΣ, κατά ένα μέρος τουλάχιστον προκαλούνται από τις κυτταροκίνες της φλεγμονής τον TNF-α, τον μετατρέποντα αυξητικό παράγοντα-β [transforming growth factor-β (TGF-β)] και την ιντερλευκίνη 1b (IL-1b).

Η αναστολή της οδού μεταβίβασης του σήματος αυτών των κυτταροκινών, με την χρησιμοποίηση του συνδυασμού της μεθυλοξανθίνης πεντοξυφυλίνης (PTX) και της σιπροξυφλοξασίνης, που εμποδίζει τον ηπατικό μεταβολισμό της PTX, με ή χωρίς δεξαμεθαζόνη, ελαττώνει σημαντικά τα επίπεδα του TNF-α στον μυελό και βελτιώνει τις κυτταροπενίες στους 18/51 (35%) ασθενείς με ΜΔΣ. Η προσθήκη αμφοστίνης βελτιώνει ακόμη περισσότερο τα ποσοστά ανταπόκρισης [22/29, (76%)], αν και κανείς ασθενής, που θεραπεύθηκε με αυτόν τον συνδυασμό, δεν έχει επιτύχει ακόμη πλήρη ύφεση¹⁶¹.

Δεδομένου ότι τα περισσότερα μηνύματα κυτταρικού θανάτου εκτελούνται μέσω ενός "καταρράκτη" της κασπάσης, η χρήση αναστολέων της τελευταίας αποτελεί έναν ελκυστικό μηχανισμό για την μείωση της υπερβολικής απόπτωσης στα πρώιμα ΜΔΣ. Πράγματι, η προσθήκη ειδικών ανασταλτών της κασπάσης-1 και -3 σε καλλιέργειες μυελού ΜΔΣ βελτιώνει σημαντικά την ανάπτυξη των προγονικών κυττάρων τόσο της μυελικής, όσο και της ερυθράς σειράς. Μεταβολές στην μιτοχονδριακή μεμβράνη, η οποία παίζει σημαντικό ρόλο στην ρύθμιση της απόπτωσης, μπορούν επίσης να ρυθμιστούν φαρμακολογικά. Έτσι η κυκλοσπορίνη Α και το bongkrekic acid που εμποδίζουν την διάνοϊξη των μιτοχονδριακών πόρων και κατά



συνέπεια την απόπτωση, ίσως είναι χρήσιμα στα πρώιμα ΜΔΣ, ενώ αντίθετα οι ενώσεις του αρσενικού ίσως μπορούν να επηρεάσουν την προχωρημένη νόσο, μέσω της μιτοχονδριακά προκαλούμενης αναστολής της απόπτωσης.

Ανοσοτροποποιητικοί παράγοντες

Η συχνή αλληλοεπικάλυψη μερικών μορφών ΜΔΣ με σύνδρομα μυελικής ανεπάρκειας όπως η απλαστική αναιμία και η παροξυσμική νυκτερινή αιμοσφαιρινουρία (PNH) και η αναγνώριση ότι η καταστολή της αιμοποίησης μπορεί να είναι ανοσολογικής αιτιολογίας, οδήγησε στην εφαρμογή ανοσοτροποποιητικής θεραπείας στα ΜΔΣ. Η θεραπεία με αντιθυμοκυτταρική σφαιρίνη (ATG) μπορεί να ελαττώσει την προκαλούμενη από τα CD8+T-λεμφοκύτταρα καταστολή της μυελοδυσπλαστικής αιμοποίησης. Στην θεραπεία φαίνονται να ανταποκρίνονται όχι μόνο τα υποπλαστικά ΜΔΣ, αλλά και η φυσιολογικής ή αυξημένης κυτταροβρίθειας RA καθώς και η RAEB με χαμηλό ποσοστό μυελοβλαστών. Μία μεγάλη, φάσης II μελέτη σε ασθενείς με μη-υποπλαστικά ΜΔΣ έδειξε ότι περισσότεροι από 50% των ασθενών με ΜΔΣ είχαν παρατεταμένη ανταπόκριση με μία μόνο συνεδρία ALG¹⁶². Η ανταπόκριση ήταν κλινικά σημαντική, με διακοπή των αναγκών για μεταγγίσεις. Η διάρκεια των ανταποκρίσεων που έχουν παρατηρηθεί μέχρι τώρα ήταν μεγαλύτερη από τρία χρόνια και σε ασθενείς με υποτροπή η επαναχορήγηση ήταν επιτυχής σε ορισμένες περιπτώσεις. Δεν παρατηρήθηκε καμία ανταπόκριση σε ασθενείς με RARS, γεγονός που περαιτέρω υποστηρίζει την άποψη ότι η RA και η RARS έχουν διαφορετική βιολογία. Οι νεότεροι ασθενείς καθώς και ασθενείς με ανιχνεύσιμο PNH κλώνο ανταποκρίθηκαν καλύτερα στην θεραπεία. Θετικά αποτελέσματα παρατηρήθηκαν επίσης σε ασθενείς με RA με την χορήγηση κυκλοσπορίνης¹⁶³. Οι περισσότεροι από αυτούς ήταν είχαν υποπλαστικό μυελό και 82% παρουσίασαν βελτίωση της ερυθράς σειράς. Υπάρχουν αρκετές μελέτες υπό εξέλιξη, που διερευνούν τα αποτελέσματα της T-κυτταρικής καταστολής στα ΜΔΣ και περισσότερα στοιχεία θα δημοσιευθούν τα επόμενα χρόνια.

Εντατική Θεραπεία

Η πτωχή επιβίωση ασθενών με ενδιάμεσου ή υψηλού κινδύνου ΜΔΣ έχει αυξήσει την ανάγκη για βελτίωση της θεραπευτικής στρατηγικής, συμπεριλαμβανομένης της εισαγωγής εντατικής κυτταροτοξικής θεραπείας



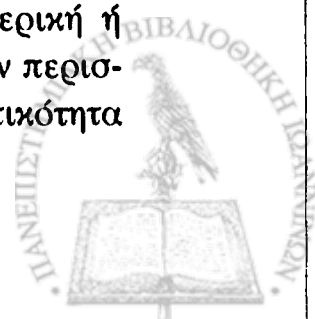
με ή χωρίς υποστήριξη με αρχέγονα αιμοποιητικά κύτταρα.

Εντατική Χημειοθεραπεία

Το Διεθνές Προγνωστικό scoring σύστημα οδήγησε στην αναγνώριση ασθενών με επιβίωση μικρότερη του έτους. Η προσπάθεια βελτίωσης της επιβίωσης σε αυτή την ομάδα υψηλού κινδύνου με σχήματα εντατικής χημειοθεραπείας είχε σαν αποτέλεσμα ανταπόκριση σε ποσοστό 15-64%. Τα χαμηλότερα ποσοστά πλήρους ύφεσης στα ΜΔΣ, συγκρινόμενα με την de novo ΟΜΛ, πιθανά οφείλονται στην μεγαλύτερη ηλικία, στην υψηλότερη συχνότητα κυτταρογενετικών ανωμαλιών μη καλής πρόγνωσης και στην αυξημένη έκφραση αντιγόνων σχετιζόμενων με την αντίσταση στην θεραπεία. Η πανκυτταροπενία λόγω χημειοθεραπείας είναι συνήθως παρατεταμένη και οι ευκαιριακές λοιμώξεις σχετικά συχνές. Καλοί προγνωστικοί παράγοντες ανταπόκρισης στην θεραπεία είναι η νεώτερη ηλικία, η διάγνωση RAEB ή RAEB-T συγκρινόμενη με άλλους FAB υπότυπους, πρωτογενή έναντι δευτερογενών ΜΔΣ και βραχύτερη διάρκεια νόσου προ-θεραπείας. Αντίθετα η ύπαρξη κακής πρόγνωσης καρυότυπου σχετίζεται με μειωμένη ανταπόκριση και μειωμένη διάρκεια ύφεσης¹⁶⁴. Η άποψη ότι τα ΜΔΣ σχετίζονται με πτωχή ανταπόκριση στην χημειοθεραπεία (X/Θ) οδήγησε σε κάποια απροθυμία για την θεραπεία αυτών των ασθενών με σχήματα εντατικής X/Θ. Διαπιστώθηκε όμως ότι οι ασθενείς με RAEB και RAEB-T έχουν τα ίδια ποσοστά πλήρους ύφεσης με αυτά που παρατηρούνται στην de novo ΟΜΛ, όταν στην σύγκριση λαμβάνονται υπόψη και οι παράγοντες κινδύνου¹⁶⁵. Κλινικές μελέτες που αφορούν ερευνητικές χημειοθεραπείες (φλουνταραμπίνη+ κυταραμπίνη (FA), FA με G-CSF (FLAG) ή FLAG με Ινταρουμπισίνη (FLAG-Ida) και τοποτεκάνη με υψηλή δόση αρασιτίνης) έχουν προκαλέσει ενθαρρυντικές ανταποκρίσεις και μπορούν να βοηθήσουν ασθενείς με ΜΔΣ κακής πρόγνωσης¹⁶⁶⁻¹⁶⁸.

Η διατήρηση της ύφεσης μετά την επίτευξη της φαίνεται να είναι μέζον πρόβλημα. Η μέση διάρκεια της επιβίωσης χωρίς νόσο σπάνια υπερβαίνει τους 12 μήνες. Για τους ασθενείς που επιτυγχάνουν ύφεση, η ηλικία φαίνεται να γίνεται λιγότερο σημαντικός προγνωστικός δείκτης τόσο για την ολική όσο και για την χωρίς νόσο επιβίωση. Αντίθετα ο κακής πρόγνωσης καρυότυπος είναι ο κύριος καθοριστικός παράγων πτωχής επιβίωσης μετά από εντατική X/Θ.

Περίπου 15% των ασθενών με ΜΔΣ, που επιτυγχάνουν μερική ή πλήρη ύφεση μετά από εντατική X/Θ, είναι πιθανόν να επιβιώσουν περισσότερο από 5 χρόνια και μερικοί από αυτούς ίσως στην πραγματικότητα



θεραπευθούν. Οι ασθενείς που επιβιώνουν επί μακρόν είναι πιθανότερο να πάσχουν από RAEB-T κατά την διάγνωση και να έχουν φυσιολογικά ή καλής πρόγνωσης καρυοτυπικά ευρήματα. Αυτό δείχνει ότι τουλάχιστον μερικοί ασθενείς μπορούν να επωφεληθούν από την εντατική κυτταροτοξική θεραπεία^{169,170}.

Μεταμόσχευση προγονικών κυττάρων

Αλλογενής μεταμόσχευση προγονικών κυττάρων

Η αλλογενής μεταμόσχευση αιμοποιητικών προγονικών κυττάρων (stem cells) μπορεί να οδηγήσει σε παρατεταμένη ελεύθερη νόσου επιβίωση [Disease Free survival (DFS)] και ίαση σε επιλεγμένη ομάδα ασθενών με ΜΔΣ^{171,172}.

Τα αποτελέσματα της αλλο-μεταμόσχευσης είναι καλύτερα σε νέους ασθενείς με RA που έχουν λάβει ελάχιστη ή καμία θεραπεία, καθώς επίσης και στην σταθερή RAEB. Από τα αποτελέσματα της Ευρωπαϊκής ομάδας μεταμόσχευσης μυελού των οστών (EBMT) φαίνεται ότι η DFS είναι 46%, 35%, 27% και 0% στα 5 χρόνια για την RA/RARS, RAEB, RAEB-T και δευτερογενή ΟΜΑ αντίστοιχα^{174,175}. Πολυπαραγοντική ανάλυση έδειξε ότι η ύπαρξη βλαιπών στον μυελό σε ποσοστό μεγαλύτερο του 30% επηρεάζει αρνητικά την ολική επιβίωση. Οι ασθενείς που επιτυγχάνουν πλήρη ύφεση, έχουν καλύτερη πορεία από εκείνους που δεν ανταποκρίνονται στην επιθετική Χ/Θ και πολύ λίγοι από τους δεύτερους επιβιώνουν μετά την μεταμόσχευση. Οι ασθενείς με ΜΔΣ ή ΟΜΑ που σχετίζονται με προηγούμενη χημειο-ακτινοθεραπεία γενικά έχουν χειρότερη πρόγνωση, ιδιαίτερα μάλιστα αν δεν μπορεί να επιτευχθεί πλήρης ύφεση με την Χ/Θ εφόδου.

Η ομάδα του Seattle ανακοίνωσε τα αποτελέσματα από 251 ασθενείς με διάμεση παρακολούθηση 3,7 ετών^{176,177}. Η DFS ήταν 41% και η συχνότητα υποτροπής 17%. Η 3-ετής συχνότητα θνησιμότητας, μη σχετιζόμενη με υποτροπή ήταν 42%. Η πολυπαραγοντική ανάλυση έδειξε πάλι σαν κακούς προγνωστικούς δείκτες, τόσο για την υποτροπή όσο και για τον πρώιμο θάνατο, την μεγάλη ηλικία, την προχωρημένη νόσο, τις καρυοτυπικές ανομαλίες κακής πρόγνωσης και την σχετιζόμενη με θεραπεία νόσο. Η μη σχετιζόμενη με υποτροπή θνησιμότητα παραμένει απογοητευτικά υψηλή έως πολύ υψηλή.

Επιπλέον οι περισσότεροι ασθενείς με ΜΔΣ δεν έχουν συμβατό HLA-πανομοιότυπο συγγενή δότη¹⁷⁸. Τα αποτελέσματα από την χρησιμο-



ποίηση εναλλακτικών λύσεων, όπως μερικά συμβατούς οικογενειακούς δότες ή φαινοτυπικά συμβατούς μη σχετιζόμενους δότες, παραμένουν μη ικανοποιητικά, με θνησιμότητα περίπου 50%. Η πιθανότητα επιβίωσης χωρίς νόσο είναι μόλις 18 έως 30% και εξαρτάται κατά κύριο λόγο από την ηλικία και το διάστημα μεταξύ διάγνωσης και μεταμόσχευσης^{179,180}. Πολλοί ερευνητές θεωρούν τα υψηλά ποσοστά θνησιμότητας μη αποδεκτά.

Ενδείξεις για αλλογενή μεταμόσχευση στα ΜΔΣ

Για τους ασθενείς με υψηλού και ενδιάμεσου-2 κινδύνου ΜΔΣ, που έχουν συμβατό αδελφό ή μη συγγενή δότη, η αλλογενής μεταμόσχευση (μυελού ή περιφερικών προγονικών κυττάρων) αποτελεί την θεραπεία επιλογής.

Τα καλύτερα αποτελέσματα επιτυγχάνονται σε νεώτερους ασθενείς, νωρίς στην πορεία της νόσου, αλλά ειδικά αυτή η ομάδα ασθενών (<60, RA ή RARS) έχει βάσει της IPSS ανάλυσης διάμεση επιβίωση μεγαλύτερη από 11 χρόνια χωρίς θεραπεία. Κατά συνέπεια οι κατηγορίες χαμηλού και ενδιάμεσου-1 κινδύνου κατά IPSS δεν αποτελούν ένδειξη για πρώιμη μεταμόσχευση, εκτός αν υπάρχουν σύνθετες και κακής πρόγνωσης κυτταρογενετικές ανωμαλίες ή μία επικίνδυνη για την ζωή κυτταροπενία.

Μεταμοσχεύσεις από μη συγγενή δότη προς το παρόν δεν συνιστώνται σ' αυτή την κατηγορία. Στις σειρές από το Seattle για τις μεταμοσχεύσεις από μη συγγενείς δότες και σε ασθενείς με RA η μη σχετιζόμενη με υποτροπή θνησιμότητα στα 2 χρόνια ήταν 46%. Σύμφωνα με το IPSS αυτοί οι ασθενείς, αν αφεθούν χωρίς θεραπεία, έχουν 50% πιθανότητα να επιβιώσουν περισσότερο από 11 χρόνια.

Επιπλέον από τα συνολικά δεδομένα του Seattle φαίνεται ότι από τους 241 μεταμοσχευμένους ασθενείς, περισσότεροι από τους μισούς (145) ανήκαν στην υψηλού ή ενδιάμεσου-2 κινδύνου ομάδα, πριν από την μεταμόσχευση και η επιβίωσή τους χωρίς νόσο ήταν μόλις 32 και 24% αντίστοιχα.

Συμπερασματικά σαφείς συστάσεις για την πρώιμη χρήση αλλογενούς μεταμόσχευσης στα ΜΔΣ έξω από καλά ελεγχόμενες και τυχαιοποιημένες μελέτες δεν μπορούν να γίνουν. Γίνονται προσπάθειες για την μείωση της θνησιμότητας από την μεταμόσχευση. Η αντικατάσταση της ισχυρής Χ/Θ προ μεταμόσχευσης από ηπιότερα σχήματα ή ολόσωμη ακτινοβολία, υποστηριζόμενα από έγχυση λεμφοκυττάρων του δότη μπορούν να βελτιώσουν την επιβίωση σημαντικά. Οι αρχικές δοκιμασίες δείχνουν ότι κάτι τέτοιο είναι δυνατόν, αλλά με αποτελέσματα κατώτερα αυτών των



λεμφωμάτων.

Αυτόλογη μεταμόσχευση

Η δυνατότητα αυτόλογης μεταμόσχευσης μυελού των οστών ή περιφερικών προγονικών κυττάρων σε ασθενείς με ενδιάμεσου και υψηλού κινδύνου έχει πλέον σήμερα αποδειχθεί¹⁸¹.

Η Ευρωπαϊκή Ένωση Μεταμόσχευσης μυελού έχει στοιχεία για 200 περίπου ασθενείς που έκαναν αυτόλογη μεταμόσχευση λόγω ΜΔΣ ή δευτερογενούς λευχαιμίας¹⁸². Έχουν δημοσιευθεί τα στοιχεία για 79 ασθενείς, που μεταμοσχεύθηκαν στην πρώτη πλήρη ύφεση. Η 2-ετής ολική επιβίωση, η επιβίωση ελεύθερη νόσου και η συχνότητα υποτροπής ήταν αντίστοιχα 39%, 34% και 64%. Η πλειονότητα των ασθενών αυτών είχαν μεταμοσχευθεί για δευτερογενή λευχαιμία ή δ-ΜΔΣ και μόνο 19 έκαναν αυτομεταμόσχευση για πρωτοπαθές RAEB ή RAEB-T. Η επιβίωση μόνο των δευτέρων ήταν λίγο καλύτερη (46%) από το σύνολο των ασθενών. Η σχετιζόμενη με την μεταμόσχευση θνησιμότητα ήταν χαμηλότερη από 10%.

Τα παραπάνω δεδομένα πρέπει να ερμηνευθούν με προσοχή. Στην ανάλυση συμπεριελήφθηκαν μόνο ασθενείς σε πλήρη ύφεση, ενώ εξαιρέθηκαν όσοι δεν ανάρρωσαν ή ήταν ανθεκτικοί στην Χ/Θ. Επιπλέον δεν υπάρχουν στοιχεία για τους ασθενείς με ΜΔΣ, για τους οποίους ήταν αδύνατη η συλλογή μυελού (επιμένουσα υποπλασία, ίνωση, κακή γενική κατάσταση κλπ.).

Προκαταρκτικά αποτελέσματα για την επίδραση των καρυοτυπικών ανωμαλιών στην έκβαση της αυτομεταμόσχευσης επιβεβαιώνουν τα προηγούμενα στοιχεία της εντατικής Χ/Θ. Η 2ετής επιβίωση ήταν 52% για τους ασθενείς με καλής πρόγνωσης ή ενδιάμεσου κινδύνου έναντι 28% για τα υψηλού κινδύνου ΜΔΣ.

Η συλλογή ικανού αριθμού περιφερικών προγονικών κυττάρων (π.χ. $>10^6$ CD34/kg ή $>10^5$ CFU-GM/kg) ήταν δυνατή ακόμη και στα υψηλού κινδύνου ΜΔΣ κατά την πρώτη ύφεση μετά Χ/Θ και χορήγηση G-CSF. Η έγχυση αυτών των προγονικών κυττάρων μετά από μυελοτοξική Χ/Θ έχει σαν αποτέλεσμα γρηγορότερη και πληρέστερη αποκατάσταση των τιμών των κοκκιοκυττάρων και των αιμοπεταλίων¹⁸³.

Οι πρώιμες υποτροπές δεν διαφέρουν από την αυτόλογη μεταμόσχευση μυελού, ενώ η άμεσα με την μεταμόσχευση σχετιζόμενη θνησιμότητα είναι μικρότερη. Δυστυχώς παραμένει η μέγιστη ανησυχία της επιμόλυνσης των περιφερικών προγονικών κυττάρων από κλωνικά κακοήθη κύτταρα.



Προκαταρκτικά αποτελέσματα δείχνουν ότι στα πρώιμα ΜΔΣ (RA ή RARS) παραμένει πολυκλωνική αιμοποίηση και πολυκλωνικά προγονικά κύτταρα μπορούν να συλλεγούν με αυξητικούς παράγοντες στην σταθερή φάση της νόσου^{184,185}. Στα υψηλού κινδύνου ΜΔΣ κατά την ύφεση μετά από εντατική Χ/Θ μπορούν να συλλεγούν μη-κλωνικά καλοήθη CD34+ προγονικά κύτταρα.

Τα αρχικά αποτελέσματα της μεταμόσχευσης περιφερικών προγονικών κυττάρων δείχνουν ότι η επιβίωση (όχι η DFS) πλησιάζει αυτήν που επιτυγχάνεται με αλλογενή μεταμόσχευση και ακόμη υπερβαίνει αυτήν της μεταμόσχευσης από μη συγγενείς δότες, γεγονός που οφείλεται στην χαμηλή θνησιμότητα που σχετίζεται με την μεταμόσχευση.

Η συχνότητα υποτροπής παραμένει το κύριο πρόβλημα. Το αν η μεταμόσχευση περιφερικών προγονικών κυττάρων θα βελτιώσει την επιβίωση σε σχέση με την συμβατική Χ/Θ, υψηλής δόσης παραμένει προς το παρόν αβέβαιο.



ΑΙΜΟΠΟΙΗΣΗ

Εισαγωγή

Τα υγιή άτομα χρειάζονται καθημερινά επαρκή παραγωγή ενός τεράστιου αριθμού διαφοροποιημένων κυττάρων αίματος. Τα ώριμα αυτά κύτταρα του αίματος προέρχονται από αδιαφοροποίητα αρχέγονα κύτταρα (stem cells) και από σχετικά πιο διαφοροποιημένα, προγονικά κύτταρα (progenitor cells), μέσω μίας σύνθετης σειράς σταδίων διαίρεσης και ωρίμανσης, που δεν έχουν ακόμα πλήρως αποσαφηνισθεί. Η πολυπλοκότητα αυτού του συστήματος είναι τεράστια, δεδομένου ότι καθημερινά και ανά ώρα παράγονται στον ανθρώπινο οργανισμό για όλη του την ζωή $1-5 \times 10^9$ ερυθρά και $1-5 \times 10^9$ λευκά κύτταρα του αίματος. Ο μυελός επιπλέον έχει την ικανότητα, αφενός να ανταποκρίνεται ταχέως σε οξύ stress (αιμορραγία, λοίμωξη) και αφετέρου να διατηρεί μια δεξαμενή αδιαφοροποίητων κυττάρων, από τα οποία προκύπτουν τα ώριμα κύτταρα. Διαταραχές αυτής της διεργασίας εκδηλώνονται σαν νοσήματα, μερικές φορές επικίνδυνα για την ζωή, όπως απλαστική αναιμία, κυτταροπενίες, λευχαιμίες και άλλες μυελοπαραγωγικές διαταραχές.

Η κατανόηση των πολύπλοκων σχέσεων, που αφορούν την παραγωγή κυττάρων του αίματος, έγινε δυνατή με την συνεχιζόμενη βασική έρευνα από αιματολόγους, βιολόγους και ανοσολόγους.

Ιστορική αναδρομή

Στις αρχές του προηγούμενου αιώνα έγινε δεκτή η άποψη ότι η αναπαραγωγή των κυττάρων του αίματος ρυθμίζεται από μία σειρά χυμικών ουσιών.

Το 1906 οι P. Carnot και G. Delfande ανακάλυψαν τον πρώτο αιμοποιητικό αυξητικό παράγοντα, δηλαδή την Ερυθροποιητίνη με την χρήση απλών πειραμάτων σε ζώα. Δεν υπήρχε καμία αμφιβολία την εποχή εκείνη



ότι θα ήταν εύκολο να καθοριστούν ανάλογοι παράγοντες για τις άλλες κυτταρικές σειρές, αλλά τα γεγονότα αποδείχθηκαν διαφορετικά. Τα επόμενα 50 χρόνια μετά την ανακάλυψη της ερυθροποιητίνης δεν έγινε καμία πρόοδος στον τομέα αυτό.

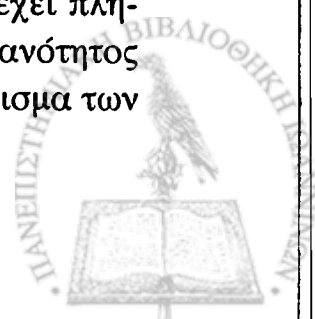
Σταθμός στην έρευνα της αιμοποίησης ήταν η ανακάλυψη των Till και Mc Cullogh¹⁸⁶ το 1961, οι οποίοι ανέπτυξαν ένα in vivo σύστημα αποικιών του σπληνός, που αναγνώρισε ένα πολυδύναμο και αυτοανανεούμενο αρχέγονο κύτταρο του ποντικού, το colony forming unit-spleen (CFU-S). Το 1965-66 οι Pluznik και Sacks (Rehovot)¹⁸⁷ και Bradley και Metcalf (Μελβούρνη)¹⁸⁸ περιέγραψαν ένα in vitro σύστημα αποικιών τις ημίρρευστες καλλιέργειες, που οδήγησε στην κατανόηση του ρόλου των αυξητικών παραγόντων στην επιβίωση και διαφοροποίηση των αιμοποιητικών κυττάρων. Στην συνέχεια το 1968 οι Wolf και Trentin¹⁸⁹ πρόβαλλαν την σημασία του μικροπεριβάλλοντος. Και τέλος το 1971 ο Dexter¹⁹⁰ περιέγραψε τις υγρές καλλιέργειες, ένα in vitro σύστημα που μιμήθηκε το περιβάλλον του μυελού και επέτρεπε την παραγωγή αιμοποιητικών κυττάρων για μήνες.

Ιεραρχία αιμοποιητικών κυττάρων

Τα πειραματικά μοντέλα που περιγράφηκαν παραπάνω, καθώς και πολλές άλλες μελέτες οδήγησαν σε ορισμένες γενικές απόψεις για την αιμοποίηση. Η δημιουργία των κυττάρων του αίματος είναι αποτέλεσμα μιάς σειράς διαιρέσεων κατά τις οποίες επιτελείται ωρίμανση των κυττάρων. Το αιμοποιητικό σύστημα, που δίνει γένεση σε όλα τα κύτταρα του αίματος, μπορεί να θεωρηθεί σαν μία σειρά αλληλοεπικαλυπτόμενων διαμερισμάτων¹⁹¹.

A. Το διαμέρισμα των αρχέγονων κυττάρων (Stem cells) αποτελείται από σπάνια κύτταρα, που έχουν τρία χαρακτηριστικά: α) είναι πολυδύναμα (multipotential), έχουν δηλαδή την ικανότητα να δίνουν γένεση σε όλες τις κυτταρικές σειρές του αίματος, β) έχουν υψηλή αυτοανεωτική ικανότητα, δίνουν δηλαδή γένεση σε πανομοιότυπα με τους εαυτούς τους θυγατρικά κύτταρα και γ) μιτωτικά βρίσκονται σε φάση ηρεμίας G₀.

Η διεργασία της δέσμευσης (commitment) περιγράφει την μετάβαση από το στάδιο των πολυδύναμων και αυτοανανεούμενων κυττάρων του διαμερίσματος A των stem cells στο διαμέρισμα B των προγονικών δεσμευμένων κυττάρων (committed progenitors). Η διεργασία δεν έχει πλήρως αποσαφηνιστεί, αλλά χαρακτηρίζεται από περιορισμό της ικανότητας του stem cell προς διαφοροποίηση και αυτοανανέωση. Το διαμέρισμα των

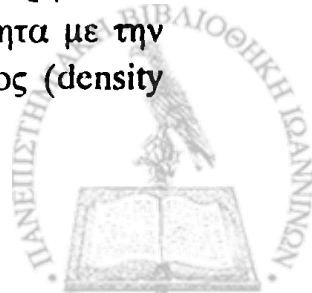


προγονικών δεσμευμένων κυττάρων περιλαμβάνει κύτταρα ικανά για διαφοροποίηση προς μία και λιγότερο συχνά προς δύο ή περισσότερες σειρές. Η δέσμευση περιλαμβάνει την απόκτηση ειδικών υποδοχέων αυξητικών παραγόντων και απώλεια άλλων. Τα προγονικά κύτταρα γενικά καθορίζονται λειτουργικά, δηλαδή από την ικανότητά τους να σχηματίζουν αποικίες σε *in vitro* συστήματα. Έχουν μικρή μόνο ικανότητα αυτοανανέωσης και περισσότερα κύτταρα βρίσκονται σε μίτωση, σε σχέση με το διαμέρισμα των stem cells.

Η πλειονότητα των κυττάρων του μυελού ανήκουν στο Γ διαμέρισμα των πρόδρομων κυττάρων (precursors cells) διαφόρων σειρών. Τα κύτταρα αυτά έχουν εύκολα αναγνωρίσιμα μορφολογικά χαρακτηριστικά του πυρήνα και του πρωτοπλάσματος, που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την κατάταξή τους σε μία σειρά δέσμευσης. Ο μυελοβλάστης, για παράδειγμα, έχει ευδιάκριτα μορφολογικά χαρακτηριστικά που επιτρέπουν την ταξινόμηση του στην σειρά των κυττάρων που πρόκειται να γίνουν πολυμορφοπύρηνα. Έχουν μικρή ικανότητα αυτοανανέωσης, αλλά λόγω του μεγάλου τους αριθμού και της αυξημένης μιτωτικής τους δραστηριότητας, παρατηρείται αξιοσημείωτη αύξηση του απόλυτου αριθμού των κυττάρων σ' αυτό το διαμέρισμα. Τα αρχέγονα κύτταρα επομένως έχουν την ικανότητα να δίνουν γένεση σε μεγάλο αριθμό προδρόμων κυττάρων, σε κλωνική βάση, κατά την μετάβαση από στάδιο του stem cell στο ώριμο και διαφοροποιημένο κύτταρο.

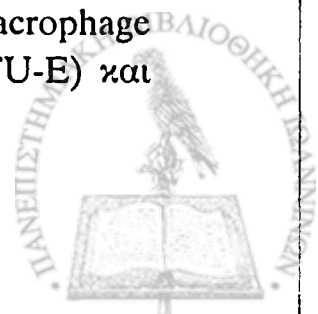
Απομόνωση και λειτουργικά χαρακτηριστικά των αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων

Τα αρχέγονα κύτταρα (stem cells) έχουν καθορισθεί λειτουργικά, από την ικανότητά τους να αποκαθιστούν τόσο την μυελική όσο και την λεμφική αιμοποίηση, όταν μεταμοσχεύονται σε ένα δότη. Οι Till και McCulloch το 1961 ανέπτυξαν το πρώτο ποσοτικό σύστημα μελέτης του stem cell με την έγχυση κυττάρων μυελού από υγιείς επίμυες σε επίμυες ακτινοβολημένους με θανατηφόρες δόσεις ακτινοβολίας. Η μελέτη των stem cells στον μυελό είναι δύσκολη λόγω της σπανιότητός τους, της έλλειψης μέσων για τον διαχωρισμό τους από άλλα άωρα κύτταρα και την ένδεια πρακτικών και ποσοτικών μεθόδων για τα ανθρώπινα stem cells. Τελευταία έχει γίνει σημαντική πρόοδος σ' αυτόν τον τομέα και συγκεκριμένα έχει επιτευχθεί απομόνωση των stem cells με μεγάλη καθαρότητα με την χρήση φυγοκέντρησης που βασίζεται στην διαφορά πυκνότητας (density



gradient centrifugation), με την σήμανση με αντισώματα, λεκτίνες ή χρωστικές καθώς και με διαχωρισμό με ειδικά μηχανήματα (cell sorters) μετά από ενεργοποίηση με φθορίζουσες ουσίες. Μία άλλη τεχνική είναι η χρήση ανοσομαγνητικών σφαιριδίων. Διαχωρισμός των αιμοποιητικών stem cells μπορεί επίσης να γίνει με την χρήση της έκφρασης του CD34 αντιγόνου^{192,193}, την έλλειψη έκφρασης του HLA-DR¹⁹⁴ και την έλλειψη αντιγόνων, που εκφράζονται σε πιο ώριμα κύτταρα¹⁹⁵. Δυσκολία στην μελέτη του ανθρώπινου stem cell αποτελεί η αδυναμία ελέγχου κεκαθαρωμένων πληθυσμών σε in vivo συστήματα επαναπληθυσμοποίησης μετά μεταμόσχευση. Νέα προσέγγιση στο θέμα αυτό αποτελεί η χρήση επίμυων στους οποίους μεταμοσχεύονται ανθρώπινα αιμοποιητικά κύτταρα. Αυτά τα μοντέλα συμπεριλαμβάνουν τον κλασικό C.B-17scid/scid επίμυ με σοβαρή συνδυασμένη ανοσοανεπάρκεια (severe combined immunodeficiency, SCID), τον ανθρωποποιημένο SCID επίμυ, στον οποίο έχουν μεταμοσχευθεί χειρουργικά ανθρώπινοι αιμοποιητικοί ιστοί όπως το ήπαρ, ο θύμος και τμήματα οστών και τον transgenic SCID επίμυ που εκφράζει τα γονίδια για την ιντερλευκίνη-3 (IL-3), τον GM-CSF και τον stem cell factor (SCF). Σε όλα αυτά τα μοντέλα μπορεί να εγκαθιδρυθεί η ανθρώπινη αιμοποίηση και να εκτιμηθεί η συχνότητα επαναπληθυσμοποίησης, ενώ σε κάποιο βαθμό μπορεί να λάβει χώρα πολλαπλασιασμός και διαφοροποίηση. Η απομόνωση κεκαθαρωμένων ανθρώπινων stem cell αποτελεί πεδίο εντατικής έρευνας και ίσως βοηθήσει στην θεραπεία αιμοποιητικών νοσημάτων, όπως η χρόνια μυελογενής λευχαιμία, για την οποία στόχος είναι ο διαχωρισμός των φυσιολογικών stem cell από αυτά με την κυτταρογενετική ανωμαλία.

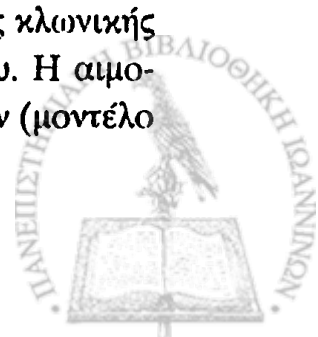
Τα αρχέγονα κύτταρα τόσο των επίμυων όσο και των ανθρώπων¹⁹⁶ μπορούν να σχηματίζουν αποικίες σε ημίρρευστα υλικά, καθώς επίσης και να διατηρούν την αιμοποίηση σε ειδικές υγρές καλλιέργειες, που περιέχουν στρώμα. Έχουν αναπτυχθεί πολλά τέτοια συστήματα, όμως δεν είναι σαφής η σχέση μεταξύ των κυττάρων που καθορίζονται από αυτά τα συστήματα και των μεταμοσχεύσιμων αιμοποιητικών stem cell. Τα πολυδύναμα και μονοδύναμα αιμοποιητικά κύτταρα μπορούν επίσης να μελετηθούν σε ημίρρευστες καλλιέργειες in vitro, γιατί έχουν την ικανότητα να δίνουν γένεση σε αποικίες. Οι αποικίες αυτές των οποίων η δημιουργία διεγείρεται από την προσθήκη στις καλλιέργειες αυξητικών ρυθμιστικών πρωτεϊνών (αυξητικοί παράγοντες), αποτελούνται από ωριμάζοντα κοκκιοκύτταρα και μακροφάγα [Colony forming unit-granulocyte/macrophage (CFU-GM)], ερυθροκύτταρα [burst forming unit-erythroid (BFU-E)] και



CFU-erythroid (CFU-E)], μεγακαρουκύτταρα [BFU- και CFU-megacaryocyte (BFU-Mk, CFU-Mk)], και μείγματα όλων των σειρών (CFU-Mix ή CFU-GEMM). Οι αποικίες των προγονικών κυττάρων περιέχουν 50 έως 100.000 κύτταρα, τα περισσότερα με ώριμο φαινότυπο. Επιπλέον τα αρχέγονα και τα προγονικά κύτταρα του επίμυος και σε μικρότερο βαθμό του ανθρώπου μπορούν να καλλιεργηθούν *in vitro* για παρατεταμένα χρονικά διαστήματα σε συστήματα καλλιέργειών, που ονομάζονται μακράς διάρκειας μυελικές ή υγρές ή Dextran καλλιέργειες, οι οποίες επιτρέπουν την άμεση επαφή μεταξύ αυτών των αιμοποιητικών κυττάρων και των υποστηρικτικών κυττάρων που προέρχονται από την μυελική κοιλότητα. Μία πρόσφατη τροποποίηση αυτών των καλλιέργειών αποτελούν οι μακράς διάρκειας καλλιέργειες προϊμότερων προγονικών κυττάρων [Long term culture-initiating cells (LTC-IC)], που επίσης επιτρέπουν την ακριβή μέτρηση της συχνότητας των προϊμότερων προγονικών κυττάρων που είναι υπεύθυνα για την διατήρηση της αιμοποίησης σε τέτοιες καλλιέργειες (initiating cells).

Δέσμευση

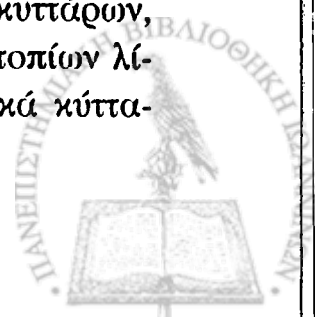
Οι παράγοντες που ρυθμίζουν τον πολλαπλασιασμό, την διαφοροποίηση και την δέσμευση σε μία σειρά των αιμοποιητικών κυττάρων παραμένουν άγνωστοι. Οι θεωρίες για την συμπεριφορά του stem cell συμπεριλαμβάνουν το στοχαστικό μοντέλο¹⁹⁷ σύμφωνα με το οποίο η αυτοανανέωση έναντι της διαφοροποίησης του stem cell βασίζεται στην πιθανότητα, και το μοντέλο του μικροπεριβάλλοντος¹⁸⁹, το οποίο συνδέει την δέσμευση με τοπικά μηνύματα από το μικροπεριβάλλον. Αν η ικανότητα αυτοανανέωσης των stem cell ήταν απεριόριστη, τότε θα μπορούσαν πιθανόν να λειτουργούν για όλη την ζωή του ατόμου. Η αθανασία των stem cell θα είχε σαν αποτέλεσμα σταθερότητα της κλωνικής σύνθεσης του αιμοποιητικού συστήματος ενός ζώου. Από την άλλη πλευρά η ικανότητα αυτοανανέωσης των stem cell θα μπορούσε να είναι πολύ περισσότερο περιορισμένη. Υπό αυτές τις συνθήκες μόνο ένα τμήμα του ολικού πληθυσμού των stem cell θα ήταν ενεργό σε δεδομένη στιγμή, και νέα stem cell θα χρειαζόταν να συνεισφέρουν στην ενεργό παραγωγή κυττάρων του αίματος, με την αντικατάσταση των κυττάρων που πέθαιναν. Αυτή η συνεχής αλλαγή του πληθυσμού των ενεργών stem cell θα οδηγούσε πιθανά σε αλλαγές της κλωνικής σύνθεσης των αιμοποιητικών σειρών με την πάροδο του χρόνου. Η αιμοποίηση θα διατηρούνταν από μία διαδοχή βραχείας ζωής κλώνων (μοντέλο



κλωνικής διαδοχής). Η άποψη αυτή των βραχείας-ζωής stem cell υποστηρίζεται από το εύρημα ότι το αιμοποιητικό σύστημα ακτινοβολημένων και επαναπληθυσμοποιημένων ζώων παρουσιάζει κλωνικές αλλαγές με την πάροδο του χρόνου. Εξίσου πειστικά ευρήματα δείχνουν ότι τουλάχιστον ένας υποπληθυσμός stem cell ζουν και λειτουργούν για μεγάλο χρονικό διάστημα και μπορούν να πολλαπλασιαστούν και να αυξηθούν (expand) κλωνικά κατά την αναγέννηση ενός νέου αιμοποιητικού συστήματος. Πρόσφατα αποδείχθηκε ότι stem cell προερχόμενα από διαφορετικά στάδια εξέλιξης λειτουργούν με διαφορετικό τρόπο, γεγονός που δείχνει ότι πιθανά παράγοντες ενδογενείς στο stem cell ίσως ρυθμίζουν την μοίρα του. Η επιβίωση και η διαφοροποίηση των αιμοποιητικών κυττάρων επηρεάζεται από γλυκοπρωτεΐνες, που ονομάζονται κυτταροκίνες ή αυξητικοί παράγοντες και διεγείρουν την διαίρεση και την επιβίωση των κυττάρων¹⁹⁸. Οι αυξητικοί παράγοντες, που είναι απαραίτητοι για την επιβίωση των stem cell και την αύξηση των προγονικών κυττάρων in vitro συμπεριλαμβάνουν τον παράγοντα Steel (που ονομάζεται αλλιώς stem cell factor ή kit-ligand), την ιντερλευκίνη-1 (IL-1), την IL-6 και πιθανά την IL-11, τον G-CSF¹⁹⁹ τον παράγοντα τον αναστέλλοντα την λευχαιμία (leukemia inhibitor factor, LIF)²⁰⁰ και την θρομβοποιητίνη.

Αιμοποιητικό μικροπεριβάλλον

Η αιμοποίηση συμβαίνει μέσα σε ένα σύνθετο περιβάλλον στην μυελική κοιλότητα των ενηλίκων, στο εμβρυικό ήπαρ²⁰¹, και στον λεκιθικό ασκό^{202,203} του αναπτυσσόμενου εμβρύου²⁰⁴. Πολλά από τα κύτταρα που αποτελούν το μικροπεριβάλλον δεν προέρχονται από τα αιμοποιητικά stem cells. Τα αιμοποιητικά κύτταρα αναπτύσσονται σε περιοχές που ονομάζονται "περιοχές πλακόστρωτου" (cobblestone areas)²⁰⁵. Τα κύτταρα του δικτύου (reticular) βρίσκονται στην αντίθετη προς τον αυλό επιφάνεια των ενδοθηλιακών κυττάρων των φλεβών που διαπερνούν την μυελική κοιλότητα²⁰⁶ και παρέχουν ένα δίκτυο για την υποστήριξη της ανάπτυξης των κυττάρων του αίματος. Τα κύτταρα του δικτύου και τα λιποκύτταρα παράγουν τόσο διαλυτούς, όσο και συνδεδεμένους με την μεμβράνη αυξητικούς παράγοντες^{207,206}. Επιπρόσθετα αυτά τα κύτταρα αντιδρούν στα αιμοποιητικά stress με μεταβολή του όγκου τους: διαταραχή της αιμοποίησης σχετίζεται με αυξημένη συσσώρευση εγκλειστών λίπους και στα δύο είδη κυττάρων, ενώ η αυξημένη αιμοποίησή συνοδεύεται από μείωση των κενοτοπίων λίπους και κατά συνέπεια αύξηση του χώρου για τα αιμοποιητικά κύττα-



ρα^{2η}. Τα μακροφάγα και οι οστεοκλάστες, κύτταρα προερχόμενα από τα αιμοποιητικά προγονικά κύτταρα, καθώς επίσης και οι οστεοβλάστες παίζουν σημαντικό ρόλο στο μικροπεριβάλλον. Αρκετές θεωρίες που αφορούν τον φυσιολογικό ρόλο του μικροπεριβάλλοντος στην ρύθμιση της αιμοποίησης έχουν προταθεί (πίνακας 5) και βρίσκονται υπό έρευνα.

Πίνακας 5. Πιθανοί ρόλοι μικροπεριβάλλοντος στην αιμοποίηση

- 1) Άμεση επικοινωνία μέσω στενής κύτταρο προς κύτταρο επαφής.
- 2) Σταθεροποίηση αυξητικών παραγόντων, μέσω της σύνδεσής τους με μόρια του εξωκυττάριου στρώματος ή των μεμβρανικών πρωτεϊνών.
- 3) Παραγωγή θετικών ή αρνητικών ρυθμιστών της αιμοποίησης.
- 4) Συνίπαρξη αυξητικών παραγόντων και αιμοποιητικών κυττάρων σε μία περιορισμένη περιοχή, έτσι ώστε τροποποιήσεις υποδοχέων να γίνονται από μικρές ποσότητες κυτταροκινών.

ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΤΗΣ ΕΡΥΘΡΟΠΟΙΗΣΗΣ, ΔΙΑΦΟΡΟΠΟΙΗΣΗ ΚΑΙ ΩΡΙΜΑΝΣΗ ΤΗΣ ΕΡΥΘΡΑΣ ΣΕΙΡΑΣ

Η ερυθροποίηση, δηλαδή η παραγωγή ερυθροκυττάρων, είναι μία δυναμική και εξαιρετικά ρυθμισμένη διεργασία. Τα ώριμα ερυθροκύτταρα αποτελούν την τελική φάση μιάς σύνθετης, αλλά καλά οργανωμένης σειράς γενετικών γεγονότων, που αρχίζουν από τη στιγμή που το πολυδύναμο-στελεχιαίο προγονικό κύτταρο του μυελού (stem cell) δεσμεύεται ώστε να εκφράσει το πρόγραμμα της ερυθράς σειράς^{21η}. Αυτό συμβαίνει μετά από αρκετές διαιρέσεις, σ' έναν πολύ αυξημένο πληθυσμό ερυθροκυττάρων, τα οποία έχουν χαρακτηριστική μορφολογία και λειτουργία. Τα ωριμάζοντα αυτά κύτταρα είναι τα πρόδρομα κύτταρα της ερυθράς σειράς και τα δικτυοερυθροκύτταρα. Τα τελικά διαφοροποιημένα κύτταρα έχουν περιορισμένη διάρκεια ζωής και γι' αυτό αναπληρώνονται συνεχώς από τα πρωϊμότερα διαμερίσματα των προγονικών κυττάρων, που έχουν ανεπιστρεπτή δεσμευθεί στην έκφραση του φαινότυπου της ερυθράς σειράς. Ο πολλαπλασιασμός και η ωρίμανση των προγονικών κυττάρων λαμβάνει χώρα σε συγκεκριμένες ανατομικές θέσεις, όπου έρχονται σε επαφή με άλλα κύτταρα που αποτελούν το μικροπεριβάλλον τους. Εκεί η ανάπτυξη της ερυθράς σειράς επηρεάζεται από τις κυτταροκίνες, οι οποίες είτε πα-

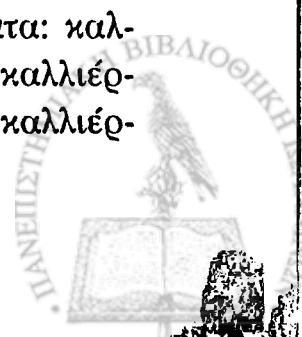


ράγονται από τα κύτταρα του μικροπεριβάλλοντος, είτε παράγονται αλλού και στην συνέχεια δεσμεύονται στην εξωκυττάρια ουσία του στρώματος.

Διαμέρισμα προγονικών κυττάρων ερυθράς σειράς

Το διαμέρισμα προγονικών κυττάρων της ερυθράς σειράς, που λειτουργικά βρίσκεται μεταξύ του πολυδύναμου stem cell και των μορφολογικά αναγνωρίσιμων προδρομικών κυττάρων της ερυθράς σειράς, περιέχει μία σειρά κυττάρων με πατρική-προς-απόγονο σχέση που όλα είναι σταθερά δεσμευμένα στην ερυθρά σειρά. Ο ακριβής τρόπος με τον οποίο γίνεται η δέσμευση σε μοριακό ή βιοχημικό επίπεδο δεν είναι γνώστος. Στοιχεία από τις καλλιέργειες *in vitro* και από την μελέτη λευχαιμικών κυττάρων οδήγησε στην υπόθεση ότι η δέσμευση σε μία σειρά δεν επιτυγχάνεται με απόκτηση νέων γενετικών πληροφοριών, αλλά με περιορισμό σε ένα μόνο πρόγραμμα από ένα ευρύτερο άθροισμα πληροφοριών που έχει το πολυδύναμο κύτταρο^{210,211}. Πρόσφατες πληροφορίες από την μοριακή βιολογία υποστηρίζουν αυτή την άποψη.

Τα προγονικά κύτταρα είναι σπάνια και δύσκολα απομονώνονται σε ικανοποιητικό αριθμό για μελέτη. Η ύπαρξή τους και τα χαρακτηριστικά τους συμπεραίνονται από την ικανότητά τους να δίνουν γένεση σε αιμοσφαιρινοποιημένους απογόνους *in vitro*, σε κλωνικές καλλιέργειες της ερυθράς σειράς. Μέσω αυτής της προσέγγισης δύο ομάδες προγονικών κυττάρων έχουν αναγνωρισθεί, τα BFU-E και τα CFU-E²¹². Η πρώτη πιο αρχέγονη ομάδα αποτελείται από τα BFU-E (Burst Forming Unit -Erythroid), που ονομάστηκαν έτσι από την ικανότητά τους να δίνουν γένεση σε αποικίες με πολλά αθροίσματα κυττάρων (erythroid bursts) που περιέχουν αιμοσφαιρίνη. Τα BFU-E αποτελούν τα πρωϊμότερα προγονικά κύτταρα, δεσμευμένα αποκλειστικά στην διαφοροποίηση της ερυθράς σειράς και αποτελούν μία δεξαμενή σε φάση ηρεμίας, γιατί σε δεδομένη στιγμή μόνο το 10-20% από αυτά είναι σε κύκλο. Παρ' αυτά μόλις διεγερθούν για να πολλαπλασιαστούν, παρουσία των απαραίτητων κυτταροκινών, επιδεικνύουν σημαντική ικανότητα πολλαπλασιασμού *in vitro* και δίνουν γένεση σε αποικίες με περισσότερα ή ίσα με 30.000-40.000 κύτταρα, που αιμοσφαιρινοποιούνται πλήρως μετά από 2-4 εβδομάδες, με την μεγαλύτερη συχνότητα στις 14-16 μέρες. Αναγνωρίστηκαν για πρώτη φορά μέσω *in vitro* καλλιιεργειών σε τρία διαφορετικά καλλιιεργητικά συστήματα: καλλιιεργειες πήγματος ινικής από τον Stephenson²¹³, σε ημίρρευστες καλλιιεργειες μεθυλοκυτταρίνης από τους Gregory και Eaves²¹⁴, και σε καλλιιεργ-



γειες σε άγαρ από τους Metcalf και Moore²¹⁵. Τα BFU-E αρχικά και για 3-7 ημέρες διαιρούνται και μετακινούνται, ώστε το καθένα να δίνει γένεση σε 2-64 κύτταρα ανεξάρτητα μεταξύ τους και εγκαθιστάμενα το ένα κοντά στο άλλο. Τις επόμενες 10-14 ημέρες αυτά, καθηλωμένα πλέον στην θέση τους, διαιρούνται και διαφοροποιούνται και με τον εμπλουτισμό τους σε αιμοσφαιρίνη αποκτούν σταδιακά την μορφολογία των ερυθροκυττάρων στην χρώση Wright-Giemsa. Η τελική εμφάνιση μιάς αποικίας που προέρχεται από ένα BFU-E είναι ένα σύνολο αλληλοεπικαλυπτομένων μεταξύ τους αποικιών. Τα BFU-E κύτταρα μορφολογικά είναι βλάστες μεγάλου μεγέθους με πολλά πυρήνια, βαθύ κυανούν πρωτόπλασμα και διαυγή περιτυρητική άλω²¹⁶. Κατά το διάστημα της μετακίνησής τους εμφανίζουν μικρά ψευδοπόδια στην επιφάνειά τους^{217,218}. Έχουν επίσης περιορισμένη ικανότητα αυτοανανέωσης²¹⁹, εφόσον τουλάχιστον μία υποομάδα των BFU-E είναι ικανή να δώσει γένεση σε δευτερογενείς αποικίες (bursts) μετά από επανακαλλιέργεια (replating). Η αναλογία των BFU-E στον μυελό των οστών υπολογίζεται σε 40-120 ανά 10^5 εμπύρηνα κύτταρα.

Εντός 6-8 ημερών τα BFU-E πολλαπλασιάζονται και διαφοροποιούνται σε CFU-E (Colony Forming Unit-Erythroid)^{220,222}. Τα περισσότερα (60-80%) από αυτά τα προγονικά κύτταρα είναι σε κύκλο και έτσι πολλαπλασιάζονται αμέσως μετά την έναρξη της καλλιέργειας και δίνουν γένεση σε αποικίες σε 7 μέρες. Τα CFU-E είναι πιο διαφοροποιημένα από τα BFU-E, γι' αυτό χρειάζονται λιγότερες διαιρέσεις για να δημιουργήσουν αποικίες αιμοσφαιρινοποιημένων κυττάρων *in vitro* σε καλλιέργειες και οι αποικίες είναι μικρές (8-65 κύτταρα)^{223,224,213}. Μορφολογικά τα CFU-E είναι ανώριμα κύτταρα με λεπτή χρωματίνη, μεγάλο πυρήνα, περιτυρητική διαυγή άλω και βασιεόφιλο πρωτόπλασμα. Δεν ανευρίσκονται στο περιφερικό αίμα, ενώ στο μυελό κυμαίνονται από 200 έως 600 ανά 10^5 κύτταρα.

Αν και οι δύο ομάδες των δεσμευμένων προγονικών κυττάρων της ερυθράς σειράς τα BFU-E και τα CFU-E φαίνονται να ξεχωρίζουν μεταξύ τους, στην πραγματικότητα τα προγονικά κύτταρα αποτελούν μία συνεχή σειρά με διαβαθμιζόμενες μεταβολές στις ιδιότητές τους²²⁵. Μόνο τα προγονικά κύτταρα στα άκρα αυτής της σειράς διαφοροποίησης έχουν διαφορετικές ιδιότητες. Πιθανά το πρωϊμότερο κύτταρο με την δυνατότητα να δίνει γένεση σε αιμοσφαιρινοποιημένους απογόνους είναι ένα ολιγοδύναμο προγονικό κύτταρο ικανό να δίνει επίσης γένεση σε ώριμα κύτταρα τουλάχιστον ακόμη μιάς άλλης σειράς (κοκκιοκύτταρα, μακροφάγα ή μεγακαροκύτταρα), εκτός της ερυθράς σειράς. Αυτό το προγονικό κύτταρο,



ένα CFU (Colony Forming Unit), που ονομάζεται CFU-κοκκιοκυττάρων/ερυθροκυττάρων /μακροφάγων /μεγακαρυοκυττάρων (CFU-granulocytic/erythrocyte/ macrophage/ megacaryocytic, CFU-GEMM) και το πιο αρχέγονο BFU-E έχουν φυσιολογικές και λειτουργικές ιδιότητες, που είναι κοινές τόσο στα πολυδύναμα stem cell όσο και στα προγονικά κύτταρα τα δεσμευμένα σε μη-ερυθρά σειρά. Αυτές οι ιδιότητες είναι η υψηλή δυνατότητα πολλαπλασιασμού, η μικρή συχνότητα κυττάρων σε φάση κύκλου, η ανταπόκριση σε αρκετές κυτταροκίνες και η ύπαρξη ειδικών αντιγόνων ή υποδοχέων επιφάνειας. Αντίθετα τα ωριμότερα CFU-E έχουν πολλές ομοιότητες με τα πρόδρομα κύτταρα της ερυθράς σειράς και λίγα κοινά χαρακτηριστικά με τα πρώιμα BFU-E. Η ικανότητά τους για πολλαπλασιασμό είναι περιορισμένη, δεν μπορούν να αυτοανανεωθούν, δεν έχουν τα αντιγόνα επιφάνειας τα κοινά σε όλα τα πρώιμα προγονικά κύτταρα και είναι εξαιρετικά ευαίσθητα στην Ερυθροποιητίνη²²⁶⁻²²⁸.

Αν και οι καλλιέργειες είναι αναντικατάστατες για την μελέτη των προγονικών κυττάρων της ερυθράς σειράς, δεν αναπαράγουν πιστά την in vivo κινητική της διαφοροποίησης και ωρίμανσης της ερυθράς σειράς. In vivo η ερυθροποίηση πιθανά συμβαίνει γρηγορότερα σε σχέση με τις καλλιέργειες.

Τα BFU-E που προέρχονται από τα πρόδρομα πολυδύναμα ή ολιгодύναμα κύτταρα του μυελού, εξαρτώνται για την επιβίωση και τον πολλαπλασιασμό τους από κυτταροκίνες, οι οποίες παράγονται ή από τα κύτταρα του στρώματος ή από ανοσορρυθμιστικά βοηθητικά κύτταρα του μικροπεριβάλλοντος. Αρκετές κυτταροκίνες έχουν βρεθεί ότι επηρεάζουν την επιβίωση και τον πολλαπλασιασμό των πρώιμων προγονικών κυττάρων. Μεταξύ αυτών ο kit-ligand²²⁹ που παράγεται από τα κύτταρα του στρώματος και η IL-3, που παράγεται από μία υποομάδα των T λεμφοκυττάρων, ανεξάρτητα ο καθένας τους, αλλά και συνεργικά, έχουν έντονη επίδραση στα BFU-E και στα προγονικά τους κύτταρα. Άλλες κυτταροκίνες όπως GM-CSF, IL-11 και η θρομβοποιητίνη διεγείρουν ένα μέρος των BFU-E. Οι κυτταροκίνες ασκούν την δράση τους μέσω αλληλεπίδρασης με ειδικούς υποδοχείς που βρίσκονται στην επιφάνεια των BFU-E. Η εξάρτησή τους από τις κυτταροκίνες αποδεικνύεται από κυτταροκαλλιέργειες, όπου άνω του 80% των κυττάρων υφίστανται αποπτωτικό θάνατο επί απουσίας κυτταροκινών για διάστημα μεγαλύτερο των 6 ημερών. Εκτός από τους θετικούς ρυθμιστές έχουν βρεθεί και παράγοντες με αρνητική επίδραση στον πολλαπλασιασμό των BFU-E όπως ο tumor necrosis factor- α , (TNF- α),

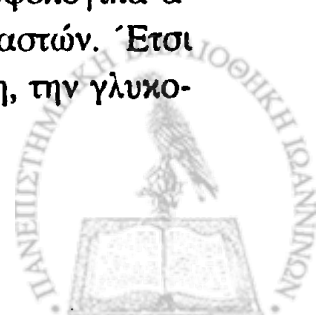


transforming growth factor- β (TGF- β), και η γ -ιντερφερόνη²³⁰. Οι δύο τελευταίοι φαίνεται να εμποδίζουν την είσοδο των BFU-E στην συνθετική φάση (S) του κυτταρικού κύκλου.

Τα BFU-E και οι άμεσοι απόγονοι τους είναι κύτταρα κινητά και βρίσκονται σε σημαντικό αριθμό στο περιφερικό αίμα ($0,02-0,08/10^8$ μονοπυρηνοειδή κύτταρα). Όπως και για τα BFU-E, έτσι και για τα stem cell, η ικανότητά τους να κυκλοφορούν είναι σημαντική για την ανακατανομή των μυελικών κυττάρων, όταν υπάρχει βλάβη στο μικροπεριβάλλον και για την αποκατάσταση της αιμοποίησης μετά μεταμόσχευση. Το εύρος των BFU-E που κυκλοφορούν είναι πιθανά μικρότερο (αποτελούμενο κυρίως από προωιότερα και σε φάση ηρεμίας κύτταρα) σε σχέση με αυτά του μυελού, αλλά κατά τα άλλα έχουν τις ίδιες ιδιότητες. Ο αριθμός των κυκλοφορούντων BFU-E μπορεί να αυξηθεί μετά από διέγερση με κυτταροκίνες και μετά χημειοθεραπεία.

Τα αντιγόνα επιφάνειας των BFU-E έχουν προσδιοριστεί με την χρήση μονοκλωνικών αντισωμάτων²³¹. Η έκφραση των διαφόρων αντιγόνων φαίνονται στον πίνακα 6. Όπως και άλλα προγονικά κύτταρα τα BFU-E εκφράζουν τα αντιγόνα HLA τάξεως I (A, B, C) και τάξεως II (DP, DQ, DR), όμως τα αντιγόνα τάξεως II και ειδικά το προϊόν της DR θέσης έχει ποικίλη έκφραση στα BFU-E. Η ύπαρξη του αντιγόνου HLA τάξεως II επιτρέπει στα BFU-E να αναγνωρίζουν και να αλληλοεπιδρούν με τα ανοσορυθμιστικά κύτταρα (T-κύτταρα, μονοκύτταρα), που επίσης εκφράζουν τους καθοριστές της τάξεως II²³². Εκτός του HLA και άλλα αντιγόνα έχουν βρεθεί στην επιφάνεια των BFU-E. Το πιο αντιπροσωπευτικό είναι το CD34, που χρησιμοποιείται και για την απομόνωση των BFU-E και των άλλων προγονικών κυττάρων, χωρίς όμως να είναι γνωστή η λειτουργικότητά του στην αιμοποίηση. Έχει αποδειχθεί επίσης ότι τα BFU-E εκφράζουν υποδοχείς για KL (Kit-Ligand), EPO, TPO (Thrombopoietin), GM-CSF, IL-3, IL-6 και IL-11. Η μεγάλη πλειονότης των BFU-E δεν εκφράζει το CD45RA σε αντίθεση με τα μυελικά προγονικά κύτταρα (CFU-GM). Επιπλέον τα BFU-E εκφράζουν, όπως και τα ώριμα CFU-Meg, την γλυκοπρωτεΐνη IIb/IIIa (CD41) και επίσης τον υποδοχέα των Μεγακαρουοκυττάρων c-Mpl.

Καθώς τα BFU-E ωριμάζουν προς το στάδιο των CFU-E, αρχίζουν να εκφράζουν αντιγόνα επιφάνειας χαρακτηριστικά των μορφολογικά αναγνωρίσιμων κυττάρων της ερυθράς σειράς, των ερυθροβλαστών. Έτσι τα CFU-E εκφράζουν την ειδική των ερυθρών σιαλοπρωτεΐνη, την γλυκο-

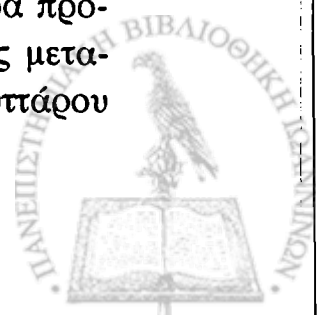


φορίνη Α, και τα Rhesus αντιγόνα. Οι ομάδες αίματος τύπου ΑΒΗ, ιΙ είναι επίσης ανιχνεύσιμες, τουλάχιστον σε μία υποομάδα των CFU-E. Η πιο σημαντική λειτουργική διαφορά των BFU-E και των CFU-E είναι η αφθονία των υποδοχέων Ερυθροποιητίνης στα CFU-E και η εξάρτησή τους από την ΕΡΟ για επιβίωση. Τα CFU-E σε αντίθεση με τα BFU-E δεν μπορούν να επιβιώσουν ούτε για λίγες ώρες χωρίς ΕΡΟ. Ενώ περισσότερα του 80% των CFU-E έχουν υποδοχείς ΕΡΟ, μόνο ένα μικρό ποσοστό των BFU-E έχει υποδοχείς και μπορεί να διαφοροποιηθεί με την παρουσία μόνο ΕΡΟ^{233,234}. Μελέτες έδειξαν ότι ο αριθμός των υποδοχέων της ΕΡΟ φθάνει σε ένα μέγιστο επίπεδο στο στάδιο του CFU-E/ προερυθροβλάστου και στην συνέχεια προοδευτικά ελαττώνεται, καθώς προχωράει η ωρίμανση, αντανακλώντας και την μείωση της επίδρασης της ΕΡΟ. Εκτός από την αφθονία των υποδοχέων της ΕΡΟ, τα προγονικά κύτταρα της ερυθράς σειράς διακρίνονται από τα άλλα προγονικά κύτταρα του μυελού και από την ύπαρξη άφθονων υποδοχέων της τρανσφερρίνης, που παίζουν σημαντικό ρόλο στην μεταφορά σιδήρου και την σύνθεση της αιμοσφαιρίνης²³⁵. Τα υψηλότερα επίπεδα των υποδοχέων της τρανσφερρίνης απαντούν στα CFU-E και στα πρόδρομα κύτταρα της ερυθράς σειράς και τα χαμηλότερα επίπεδα στα δικτυοερυθροκύτταρα^{236,237}.

Διαμέρισμα ερυθρών προδρόμων κυττάρων

Τα πρόδρομα κύτταρα της ερυθράς σειράς, που ονομάζονται επίσης "ερυθρόν", περιλαμβάνουν κύτταρα, που αντίθετα με τα προγονικά κύτταρα (BFU-E, CFU-E), καθορίζονται από μορφολογικά κριτήρια. Το πιο πρώιμο αναγνωρίσιμο κύτταρο της ερυθράς σειράς είναι η προερυθροβλάστη, η οποία μετά από τέσσερις με πέντε μιτωτικές διαιρέσεις δίνει γένεση στα ώριμα ερυθρά κύτταρα. Οι απόγονοι της προερυθροβλάστης είναι οι βασεόφιλοι ερυθροβλάστες, που είναι τα πρωϊμότερα θυγατρικά του κύτταρα, ακολουθούμενοι από τις πολυχρωματόφιλες και τελικά από τις ορθοχρωματικές ερυθροβλάστες. Μετά την τελευταία μιτωτική διαίρεση, ο αδρανής πυκνωτικός πυρήνας της ορθοχρωματικής ερυθροβλάστης αποβάλλεται από το κύτταρο. Συνήθως υπάρχει μεγάλη μεταβλητότητα στον αριθμό και την συχνότητα των διαιρέσεων και πιθανά καθορίζονται από τα επίπεδα της ερυθροποιητίνης

Οι αλλαγές στην μορφολογία των κυττάρων, καθώς τα ερυθρά πρόδρομα κύτταρα ωριμάζουν, καθορίζονται από σύνθετες βιοχημικές μεταβολές, που συμπεριλαμβάνουν την άθροιση ειδικών του ερυθροκυττάρου



πρωτεϊνών και την προοδευτική μείωση του πολλαπλασιασμού. Αναλυτικά οι μεταβολές που καθορίζουν την μετάβαση από το ένα στάδιο στο άλλο είναι οι εξής:

1. Μείωση του μεγέθους του κυττάρου. Η διάμετρος της προερυθροβλάστης είναι 12μ. και μειώνεται σταδιακά στα 10μ. στην βασεόφιλη και στα 8μ. στην πολυχρωματόφιλη και στην ορθοχρωματική ερυθροβλάστη.
2. Μείωση της σύνθεσης του RNA και μείωση του περιεχομένου στο κύτταρο RNA μετά το στάδιο της βασεόφιλης ερυθροβλάστης, μέχρι το ώριμο ερυθρό που δεν περιέχει καθόλου RNA.
3. Μείωση του ποσού του DNA ανά κύτταρο και πλήρη διακοπή της σύνθεσης του στο στάδιο της πολυχρωματόφιλης ερυθροβλάστης.
4. Αύξηση της περιεκτικότητας σε αιμοσφαιρίνη. Η μέση συγκέντρωση της αιμοσφαιρίνης, MCH, στην βασεόφιλη ερυθροβλάστη είναι 4×10^{-6} μg ανά κύτταρο και αυξάνει σε 20×10^{-6} στο δικτυοερυθροκύτταρο και 28×10^{-6} μg ανά κύτταρο στο ώριμο ερυθρό.

Οι μεταβολές αυτές ολοκληρώνονται σε συγκεκριμένο χρονικό διάστημα. Το στάδιο της προερυθροβλάστης και της βασεόφιλης ερυθροβλάστης διαρκεί 60 ώρες, η ωρίμανση της πολυχρωματόφιλης σε ορθοχρωματική ερυθροβλάστη απαιτεί 30 ώρες, και τέλος η μετάβαση της ορθοχρωματικής ερυθροβλάστης στο στάδιο του δικτυοερυθροκύτταρου απαιτεί 50 ώρες.

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω τα πρόδρομα κύτταρα της ερυθράς σειράς είναι εύκολα αναγνωρίσιμα στο κοινό μικροσκόπιο, με βάση τα μορφολογικά χαρακτηριστικά που αποκτούν κατά την ωρίμανσή τους. Η ονομασία τους αντιστοιχεί στην χρώση του πρωτοπλάσματος. Η προερυθροβλάστη έχει έντονα βασεόφιλο πρωτόπλασμα, μεγάλο αραιοχρωματικό πυρήνα με ένα ή περισσότερα πυρήνια και περιτυρηνική άλω που αντιστοιχεί στην συσκευή Golgi και αρχίζει να συνθέτει μικρά ποσά αιμοσφαιρίνης. Η βασεόφιλη ερυθροβλάστη, που προκύπτει από την διαίρεση της προερυθροβλάστης, έχει μικρότερο μέγεθος, πιο πυκνωτικό πυρήνα χωρίς πυρήνια, αφθονία ριβοσωμάτων και αυξημένη σύνθεση αιμοσφαιρίνης. Από τον πολλαπλασιασμό της προκύπτει η πολυχρωματόφιλη ερυθροβλάστη στην οποία σταδιακά μειώνονται τα ριβοσώματα και αυξάνει η αιμοσφαιρίνη. Το 30% των πολυχρωματόφιλων ερυθροβλαστών διατηρούν την ικανότητα διαίρεσης, ενώ ένα ποσοστό τους απολύπει ενδομυελικά. Τα υπόλοιπα κύτταρα ωριμάζουν προς ορθοχρωματικές ερυθροβλάστες.



Στο στάδιο αυτό διακόπτεται η σύνθεση RNA, ενώ ο πυρήνας εμφανίζεται πυκνωτικός και εκφυλίζεται. Με την αποβολή του πυρήνα προκύπτει το δικτυοερυθροκύτταρο, που περιέχει μικρό αριθμό ριβοσωμάτων και είναι ικανό να συνθέτει μικρά ποσά αιμοσφαιρίνης. Τα ριβοσώματα χρώνονται με ειδικές χρώσεις και σχηματίζουν βασεόφιλο δίκτυο νηματίων από το οποίο προέρχεται και το όνομα του κυττάρου. Κατά την ωρίμανση του δικτυοερυθροκυττάρου τα κυτταροπλασματικά οργανύλια ελαττώνονται μέσω αυτοπεψίας. Τα ώρια ερυθρά στερούνται οργανυλίων και δεν μπορούν να συνθέτουν αιμοσφαιρίνη. Τα δικτυοερυθροκύτταρα παραμένουν για δύο ημέρες στον μυελό και στην συνέχεια αρχίζουν να κυκλοφορούν στο περιφερικό αίμα²³⁸. Ακολούθως παραμένουν στον σπλίνα για 1-2 ημέρες, όπου ωριμάζουν και μετατρέπονται σε ερυθρά αιμοσφαίρια²³⁹.

Το σχήμα και η ευμεταβλητότης των ερυθρών αιμοσφαιρίων καθορίζεται από τις μεμβρανικές πρωτεΐνες, περισσότερες από τις οποίες αθροίζονται μετά το στάδιο του CFU-E (σπεκτρίνη, γλυκοφορίνη, band 3, band 4.1 και ανκυρίνη). Παρόμοια η πολυγακτοζαμινογλυκάνη, μία ειδική υδατανθρακική αλυσσος που μεταφέρει την ομάδα αίματος ABH και την iI απαντά σε υψηλότερες ποσότητες στα ώρια ερυθροκύτταρα απ' ότι στις ερυθροβλάστες²⁴⁰. Οι γλυκοφορίνες και ειδικά η γλυκοφορίνη A εκφράζονται πλήρως στο στάδιο του CFU-E και της προερυθροβλάστης και κατά την διάρκεια της ωρίμανσης λίγες μεταβολές συμβαίνουν.

Η δραστηριότητα των γονιδίων κατά την διάρκεια της ωρίμανσης της ερυθράς σειράς κυριαρχείται από την έκφραση των γονιδίων της σφαιρίνης. Ενώ στο στάδιο της προερυθροβλάστης οι σφαιρίνες αποτελούν <0,1% των πρωτεϊνών, στο στάδιο του δικτυοερυθροκυττάρου φθάνουν το 95% όλων των πρωτεϊνών²⁴¹. Η έκφραση των γονιδίων των σφαιρινών έχει μελετηθεί εκτεταμένα. Ο τύπος της σφαιρίνης που συντίθεται από τα πρόδρομα κύτταρα της ερυθράς σειράς του ενήλικα είναι η αιμοσφαιρίνη A ($\alpha_2\beta_2$). Επιπλέον παράγονται δύο μικρότερα κλάσματα η αιμοσφαιρίνη A₂ ($\alpha_2\delta_2$) και η αιμοσφαιρίνη F ($\alpha_2\gamma_2$). Η σύνθεση των σφαιρινών φαίνεται να συντονίζεται με την σύνθεση της αίμης κατά την διάρκεια της ωρίμανσης, έτσι ώστε να σχηματίζονται λειτουργικά τετραμερή αιμοσφαιρίνης γρήγορα και αυτόματα.

Σημαντική στην λειτουργική ανταπόκριση των προδρόμων κυττάρων της ερυθράς είναι η έκφραση των υποδοχέων της EPO και των υποδοχέων της τρανσφερίνης. Οι υποδοχείς της EPO ελαττώνονται προοδευτικά (από περίπου 1000 σε <300 ανά κύτταρο) καθώς οι προερυθροβλάστες ω-



Πίνακας 6. Χαρακτηριστικά αρχηγόνων κυττάρων ερυθράς σειράς

Ιδιότητες	CFU-GEMM	BFU-E	CFU-E
Αυτοανανέωση	++	+	0
Δυνατότητα διαφοροποίησης	Πολυδυναμία	Δέσμευση για ερυθροποίηση	Δέσμευση για ερυθροποίηση
Ποσοστό κυττάρων σε S φάση	15-20%	30-40%	60-80%
Αναλογία ανά 10^5 κύτταρα μυελού	2-5	40-120	200-600
Κυκλοφορία στο περιφερικό αίμα	+	+	-
Υποδοχείς/Αντιγόνα επιφανείας			
CD34	++	++	-
CD33	+	+	0
c-kit	++	++	±
HLA-DR (-DP, -DQ)	++	++	±
EPO υποδοχέας	+	+	++
TNF υποδοχέας	+	+	++
Er-1	±	+	++
23.6	0	0	+
CD36	0	0	+
Γλυκοφορίνη A	0	0, ±	+
ABH, iI	0	+	+
Μόρια προσκόλλησης			
VLA-4 (CD49d/CD29)	++	++	++
VLA-4 (CD49e/CD29)	+	+	++
CD41	+	+	
CD11A/CD18	+	+	
CD44	+	+	
HCAM-1	+	+	-
Απάντηση σε αυξητικούς παράγοντες			
Ερυθροποιητίνη	+	+	++
GM-CSF, IL-3	+	+	+
Ινσουλίνη, insoulin-like growth factor	0	0	+
TGF-β1	0	0	++



ριμάζουν και είναι μη ανιχνεύσιμοι στο στάδιο του δικτυοερυθροκυττάρου²²⁸. Μέσω αυτών των υποδοχέων ασκεί την διεγερτική της δράση στις προερυθροβλάστες και στις βασεόφιλες ερυθροβλάστες, αλλά η ωρίμανση μετά από τα στάδια αυτά μπορεί να προχωρήσει χωρίς την παρουσία της ΕΡΟ.

Οι υποδοχείς της τρανσφερρίνης απαντούν σε αφθονία στα ερυθρά αιμοσφαίρια (300-800.000/ κύτταρο). Αυτό δείχνει τις αυξημένες ανάγκες σε σίδηρο για την σύνθεση αιμοσφαιρίνης και γι' αυτό τον λόγο οι υποδοχείς παραμένουν στις ωριμάζουσες, μη διαιρούμενες ερυθροβλάστες και στα δικτυοερυθροκύτταρα. Υπάρχει αντίστροφη σχέση μεταξύ πυκνότητας υποδοχέων τρανσφερρίνης και της διαθεσιμότητας του σιδήρου²⁴². Στέρηση σιδήρου οδηγεί σε επαγωγή των υποδοχέων και αφθονία σιδήρου σε καταστολή των υποδοχέων. Παρολαυτά οι μηχανισμοί που ρυθμίζουν τον αριθμό των υποδοχέων της τρανσφερρίνης κατά την ωρίμανση είναι άγνωστοι.



ΕΡΥΘΡΟΠΟΙΗΤΙΝΗ

Η Ερυθροποιητίνη (Epo) είναι μία γλυκοπρωτεΐνη μοριακού βάρους 35 kd και είναι ο φυσιολογικός αυξητικός παράγοντας της ανάπτυξης της ερυθράς σειράς. Αποτελείται από 166 αμινοξέα και απομονώθηκε για πρώτη φορά (1906 Garnot-De Flandre) από τα ούρα ασθενών με απλαστική αναιμία²⁴³. Περιέχει 30% υδατάνθρακες, από τους οποίους το 11% αποτελείται από σιαλικό οξύ, το 11% από εξόζες και το 8% από N-ακετυλογλυκοζαμίνη²⁴⁴. Έχει απομονωθεί, χαρακτηρισθεί, και κλωνοποιηθεί. Η ανασυνδυασμένη ανθρώπινη ανασυνδυασμένη Epo (recombinant Human Erythropoietin, rHuEpo) άρχισε να χρησιμοποιείται το 1985 σε κλινικές μελέτες και από το 1989 για την θεραπεία των ασθενών με νεφρική ανεπάρκεια.

Παραγωγή ερυθροποιητίνης

Η Epo παράγεται κυρίως στους νεφρούς και συγκεκριμένα από τα περισωληναριακά διάμεσα κύτταρα του φλοιού και του έξω τμήματος της μυελώδους μοίρας²⁴⁵. Φυσιολογικά οι νεφροί παράγουν το 85-90% της Epo. Επίσης παράγεται σε μικρό ποσοστό (<10%) από τα κύτταρα του Kupffer του ήπατος.

Η υποξία είναι ο κύριος διεγέρτης της παραγωγής της Epo²⁴⁶. Μία πρωτεΐνη (μεταλλοπρωτεΐνη)²⁴⁷ που περιέχει αίμη είναι ο αισθητήρας της έλλειψης οξυγόνου και προκαλεί την σύνθεση Epo και την απελευθέρωση της στην κυκλοφορία. Η Epo αλληλεπιδρά με κύτταρα του μυελού που έχουν υποδοχείς Epo και έτσι οι αυξημένες απαιτήσεις σε οξυγόνο μεταφράζονται σε αυξημένη παραγωγή ερυθρών. Επομένως η Epo είναι μία πραγματική ορμόνη, δηλαδή παράγεται σε μία ανατομική θέση και μεταφέρεται μέσω του αίματος στην θέση όπου ασκεί την δράση της.

Εκτός από την ιστική υποξία και άλλοι παράγοντες παρεμβαίνουν στην ρύθμιση της παραγωγής της Epo ή μπορούν να επηρεάσουν την συ-



γκέντρωση της στο αίμα. Υψηλά επίπεδα Ερο έχουν αναφερθεί σε ασθενείς με απλαστική αναιμία και σημαντικές μεταβολές στον ορό παρατηρήθηκαν μετά χημειοθεραπεία και κατά την διάρκεια της θεραπείας αποκατάστασης με βιταμίνη Β12 ή σίδηρο. Αυτά τα ευρήματα συνηγορούν υπέρ της ύπαρξης μίας αντιστρόφως ανάλογης σχέσης μεταξύ της μάζας των προδρομών κυττάρων της ερυθράς σειράς και των επιπέδων της Ερο στον ορό: όσο υψηλότερος είναι ο αριθμός των προδρομών κυττάρων της ερυθράς σειράς, τόσο χαμηλότερα είναι τα επίπεδα της Ερο στον ορό²⁴⁸.

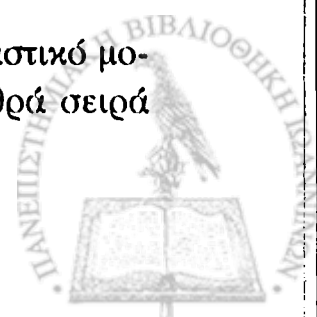
Οι κυτταροκίνες της φλεγμονής επηρεάζουν την έκφραση του γονιδίου της Ερο. Η ιντερλευκίνη-1, ο παράγων νέκρωσης του όγκου α (tumor necrosis factor-α, TNFα) και ο μετατρέπων αυξητικός παράγων β (transforming growth factor β, TGFβ) αναστέλλουν in vitro την παραγωγή της Ερο σε υποξία. Αυτές οι κυτταροκίνες αναστέλλουν επίσης τον πολλαπλασιασμό των προγονικών κυττάρων της ερυθράς σειράς και διαδραματίζουν μ' αυτό τον τρόπο σημαντικό ρόλο στην παθογένεση της αναιμίας της χρόνιας νόσου. Αντίθετα η IL-6 αποδείχθηκε ότι μιμείται την ανοξία in vitro²⁴⁹ και αυξημένα επίπεδα της στον άνθρωπο σχετίζονται με επαρκή ενδογενή παραγωγή Ερο.

Η αυξημένη γλοιότητα του πλάσματος αναστέλλει την παραγωγή Ερο, συμβάλλοντας έτσι στην αναιμία τόσο στη φλεγμονή, όσο και στις μονοκλωνικές γαμμαπάθειες. Οι χημειοθεραπευτικοί παράγοντες μειώνουν την ανταπόκριση στην Ερο^{250,251}. Η σισπλατίνη είναι ιδιαίτερα τοξική και προκαλεί παρατεταμένη αναιμία. Η κυκλοσπορίνη Α επίσης μειώνει την παραγωγή της Ερο και αυτό ίσως συμβάλλει στην αναιμία ασθενών που κάνουν μεταμόσχευση οργάνων. Η θεοφυλλίνη είναι ακόμη ένα φάρμακο που ελαττώνει την παραγωγή Ερο. Επίσης έχει βρεθεί in vitro άμεση καταστολή της σύνθεσης Ερο από τον HIV²⁵², η οποία πιθανά συμβάλλει στην παθογένεια της αναιμίας που συνοδεύει την νόσο.

Το γονίδιο της Ερο βρίσκεται στο μακρύ σκέλος του χρωμοσώματος 7 (7q11-22) και αποτελείται από 5 εξόνια και 4 ιντρόνια. Τα φυσιολογικά επίπεδα της Ερο στον ορό, όπως καθορίζονται με ραδιοανοσολογική μέθοδο, κυμαίνονται μεταξύ 8 και 18 μονάδων (U)/l. Η μέση διάρκεια ζωής της Ερο είναι 5-6 ώρες και κυρίως μεταβολίζεται στο ήπαρ.

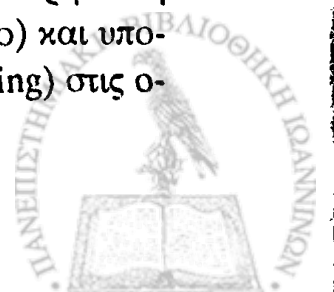
Φυσιολογικός ρόλος της Ερο στην ερυθροποίηση

Σύμφωνα με το επικρατέστερο μοντέλο αιμοποίησης (στοχαστικό μοντέλο), τα προγονικά κύτταρα που είναι δεσμευμένα στην ερυθρά σειρά



(π.χ. BFU-E) παράγονται κατά τυχαίο τρόπο από τα πολυδύναμα stem cells. Η Epo και οι ρυθμιστικοί παράγοντες, ειδικοί των διαφόρων σειρών φαίνεται ότι δεν παίζουν ρόλο στον καθορισμό της σειράς δέσμευσης. Κατά το μοντέλο αυτό η Epo επηρεάζει την διαφοροποίηση της ερυθράς σειράς καταστέλλοντας (μέσω των αντιαποπτωτικών πρωτεϊνών bcl-XL και bcl-2) την απόπτωση των κυττάρων, που εκφράζουν τον υποδοχέα της Epo και πολλαπλασιάζοντας τα περαιτέρω. Δεν έχει διευκρινιστεί αν υποδοχείς Epo υπάρχουν σε όλα τα BFU-E, ή αν και είναι ανιχνεύσιμοι μόνο σε μία υποομάδα των BFU-E. Κατά συνέπεια δεν είναι γνωστό αν η ύπαρξη υποδοχέων της Epo είναι ταυτόχρονη με την αρχική δέσμευση ή την ακολουθεί. Πειράματα in vivo σε αναιμικές καταστάσεις ή μετά φαρμακολογικές δόσεις της Epo δείχνουν ότι η Epo μπορεί να επιταχύνει την μετάβαση από τα BFU-E στα κύτταρα που παράγουν αιμοσφαιρίνη, είτε ελαττώνοντας τον αριθμό των διαιρέσεων που απαιτούνται γι' αυτή την μετάβαση, είτε ελαττώνοντας τις περιόδους ηρεμίας μεταξύ των κυτταρικών διαιρέσεων. Αυτοραδιογραφικές μελέτες κεκεθαρμένων BFU-E πληθυσμών έδειξαν ότι οι υποδοχείς της Epo αυξάνουν καθώς τα BFU-E ωριμάζουν προς CFU-E και τα υψηλότερα επίπεδα παρατηρούνται στο στάδιο του CFU-E και της προερυθροβλάστης.

Τα BFU-E και CFU-E μπορούν να παραχθούν in vitro και in vivo απουσία της Epo ή των υποδοχέων της (Epo-R) σε Epo ή Epo-R null επίμυες, αλλά η επιβίωσή τους και η τελική τους ωρίμανση εξαρτάται από την Epo. Φαίνεται ότι η Epo διεγείρει από το επίπεδο των CFU-E όλες τις βιοχημικές διεργασίες που χαρακτηρίζουν τα ερυθρά κύτταρα (π.χ. την σύνθεση της αίμης, την σύνθεση της σφαιρίνης και την σύνθεση των πρωτεϊνών του κυτταροσκελετού), όμως ο ακριβής της ρόλος σ' αυτές τις διεργασίες δεν έχει διευκρινισθεί. Δεν είναι γνωστό επίσης αν η Epo απλά αυξάνει τον αριθμό των κυττάρων που είναι δεσμευμένα σ' αυτή την διεργασία, ή απευθείας επηρεάζει τους ενδοκυττάριους μηχανισμούς της μεταγραφής των πρωτεϊνών, που είναι ειδικές για την ερυθρά σειρά. Πράγματι πειράματα in vitro, που έδειξαν ωρίμανση των BFU-E απουσία Epo, αποδεικνύουν ότι και άλλοι παράγοντες ή συνδυασμοί παραγόντων μπορούν να επηρεάσουν την ωρίμανση των ερυθροκυττάρων. Ενεργοποίηση της οδού μεταβίβασης του μηνύματος της gp130 μέσω της χρήσης του συνδυασμού του διαλυτού υποδοχέα της IL-6 και της IL-6, οδηγεί σε ωρίμανση της ερυθράς σειράς (παρουσία SCF και IL-3, αλλά απουσία Epo) και υποδηλώνει ότι υπάρχει πιθανά κάποια διασταύρωση (cross-circuiting) στις ο-



δούς μεταβίβασης του μηνύματος μεταξύ των διαφόρων αιμοποιητικών αυξητικών παραγόντων. Επιπλέον η διέγερση από την θρομβοποιητίνη της δημιουργίας αποικιών ερυθράς σειράς από κύτταρα λεκιθικού ασκού απουσία Epo-R (σε Epo-R -/- έμβρυα) μπορεί να εξηγηθεί με την ίδια λογική, καθώς επίσης από το γεγονός ότι υπάρχει υψηλότερη αναλογία διδύναμων ερυθροκυτταρικών/ μεγακαρουοκυτταρικών προγονικών κυττάρων στον λεκιθικό ασκό, που φέρουν υποδοχείς τόσο της Epo όσο και της θρομβοποιητίνης (c-mpl), συγκρινόμενα με τον μυελό των ενηλίκων.

Ανεξάρτητα του ακριβούς τρόπου δράσης της Epo, αυτή επηρεάζει άμεσα τον αριθμό των CFU-E και την ωρίμανση των απογόνων τους. Αυτό επιτυγχάνεται μέσω της επίδρασης στην επιβίωση των CFU-E και όχι στην φάση του κύκλου που βρίσκονται. Τα CFU-E χάνονται οριστικά μετά από ένα κύκλο σύνθεσης DNA, αν δεν υπάρχει Epo. Καθώς τα CFU-E και οι προερυθροβλάστες ωριμάζουν προς δικτυοερυθροκύτταρα, παρατηρείται μία προοδευτική μείωση του αριθμού των Epo-R. Κεκαθαρμένοι πληθυσμοί δικτυοερυθροκυττάρων δεν έχουν κανένα υποδοχέα Epo. Η μείωση αυτή των υποδοχέων, που σχετίζεται με την πρόοδο της ωρίμανσης, βαίνει παράλληλα με την μειούμενη επίδραση της Epo στα ερυθρά κύτταρα κατά την τελική φάση της ωρίμανσης.

Οι Koury και Bondurant²⁵³ πρότειναν ένα μοντέλο ερυθροποίησης, που βασίζεται στο γεγονός ότι η Epo παρεμποδίζει τον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο σε ένα πληθυσμό ερυθρών προγονικών κυττάρων, που παρουσιάζουν μεγάλη ετερογένεια της εξάρτησης από την Epo. Σ' αυτό το μοντέλο που επιβεβαιώθηκε από παρατηρήσεις στον knockout επίμυ, η ερυθροποίηση μπορεί να αυξηθεί ουσιαστικά και σταθερά μόνο μέσω της αύξησης των προγονικών κυττάρων των εξαρτώμενων από την Epo. Αναλυτικά τα ωριμότερα προγονικά κύτταρα της ερυθράς σειράς (CFU-E και προερυθροβλάστες) εξαρτώνται για την επιβίωσή τους από την συνεχή παρουσία Epo (για να καταστείλει την απόπτωση) και ποικιλούν σημαντικά όσον αφορά την ευαισθησία στην Epo, πιθανά λόγω ποικιλίας στην οδό της ενδοκυττάριας μετάδοσης του μηνύματος. Σε φυσιολογικές συνθήκες μόνο ένα μέρος των προγονικών αυτών κυττάρων και συγκεκριμένα αυτά με τις μικρότερες απαιτήσεις σε Epo, επιβιώνουν και δίνουν γένεση σε πρόδρομα κύτταρα της ερυθράς, που στη συνέχεια παράγουν φυσιολογικό αριθμό ερυθρών αιμοσφαιρίων. Σε καταστάσεις που χαρακτηρίζονται από μειωμένη παραγωγή Epo, όπως π.χ. η νεφρική ανεπάρκεια, η πλειονότης των προγονικών κυττάρων της ερυθράς σειράς οδηγούνται σε απόπτωση,



λόγω μειωμένων επιπέδων Epo στον μυελό. Μόνο ένας υποπληθυσμός προγονικών κυττάρων με μεγάλη ευαισθησία στην Epo και μικρές απαιτήσεις επιβιώνει, με αποτέλεσμα να παράγεται μικρός αριθμός ερυθρών αιμοσφαιρίων και να αναπτύσσεται αναιμία. Η χορήγηση ανθρώπινης ανασυνδυασμένης Epo (rHuEpo) οδηγεί σε ουσιαστική αύξηση της ερυθροποίησης, μέσω αναπτολής της απόπτωσης μεγάλου αριθμού ώριμων προγονικών κυττάρων της ερυθράς σειράς με ενδιάμεση ευαισθησία στην Epo. Σε περίπτωση αναιμίας λόγω περιφερικής αιμόλυσης ή οξείας απώλειας αίματος, η νεφρική παραγωγή Epo αυξάνει σημαντικά και υψηλά επίπεδα Epo παρατηρούνται στον μυελό. Σχεδόν όλα τα προγονικά κύτταρα της ερυθράς σειράς, ακόμη και αυτά με τις υψηλές απαιτήσεις σε Epo, επιβιώνουν με αποτέλεσμα την μέγιστη αύξηση της ερυθροποίησης. Η χορήγηση της rHuEpo σ' αυτήν την περίπτωση δεν μπορεί περαιτέρω να αυξήσει την παραγωγή ερυθρών αιμοσφαιρίων, γιατί επίπεδα ικανά να εμποδίσουν την απόπτωση των ελάχιστα ευαίσθητων προγονικών κυττάρων, δεν μπορούν λογικά να επιτευχθούν.

Υποδοχέας Epo και οδοί μεταβίβασης των μηνυμάτων

Ο υποδοχέας της Epo (Epo-R) αποτελεί μία μεμβρανική πρωτεΐνη MB 66kD, που ανήκει στην οικογένεια των υποδοχέων αυξητικών παραγόντων και κυτταροκινών. Η παραγωγή του ρυθμίζεται από ένα γονίδιο που βρίσκεται στο 19p χρωμόσωμα και κλωνοποιήθηκε το 1989 από τους D' Andrade και συν. από κύτταρα ερυθρολευχαιμίας ποντικού²⁵⁴. Ο υποδοχέας αποτελείται από τρία τμήματα, εξωκυττάριο, διαμεμβρανικό και ενδοκυττάριο. Το εξωκυττάριο τμήμα του Epo-R περιέχει τέσσερις υποομάδες κυστεΐνης και ένα motif (αλληλουχία αμινοξέων) WSXWS και είναι υπεύθυνο για την σύνδεση με την ερυθροποιητίνη²⁵⁵. Η διαλυτή μορφή του υποδοχέα της Epo συνδέεται επίσης με την Epo και μ' αυτό τον τρόπο δρα ανταγωνιστικά προς τους κυτταρικούς υποδοχείς. Στο κυτταροπλασματικό τμήμα διακρίνουμε δύο περιοχές, μία εγγύς της μεμβράνης που είναι υπεύθυνη για την μετάδοση μηνυμάτων πολλαπλασιασμού, διαφοροποίησης και σύνθεσης σφαιρίνης και ένα απομακρυσμένο από την μεμβράνη τμήμα του που καταστέλλει τα μηνύματα μίτωσης του Epo-R. Το κυτταροπλασματικό τμήμα του Epo-R δεν περιέχει κινάση της τυροσίνης, αλλά αντίθετα αντιδρά με κυτταροπλασματικές κινάσες της τυροσίνης. Η σύνδεση της Epo με τον υποδοχέα της, οδηγεί στην δημιουργία τουλάχιστον δύο συνδεδεμένων πρωτεϊνικών συμπλεγμάτων 120kD και 140kD. Η δημιουργία αυ-



τού του διμερούς του υποδοχέα είναι σημαντική για την λειτουργία του και ακολουθείται από μία σειρά φωσφορυλιώσεων από τυροσίνη, που οδηγούν μετάδοση μηνύματος μίτωσης και διαφοροποίησης. Αναλυτικά μετά την σύνδεση της Epo με τον υποδοχέα της, η Janus κινάση JAK2 ενεργοποιείται γρήγορα, μέσω της σύνδεσης με το εγγύς της μεμβράνης κυτταροπλασματικό τμήμα του υποδοχέα. Η ενεργοποίηση του JAK2 οδηγεί στην φωσφορυλίωση από τυροσίνη αρκετών πρωτεϊνών, όπως του ιδίου του JAK2, του Epo-R και του μεταγραφικού παράγοντα STAT5. Ο ενεργοποιημένος STAT5 εισέρχεται στον πυρήνα και ενεργοποιεί την μεταγραφή γονιδίων που ελέγχονται από την Epo, όπως τα *myc* και *fos*. Επιπλέον η JAK2 ενεργοποιεί την οδό των Ras/ Raf/ MAP κινασών, συμβάλλοντας περαιτέρω στην προκαλούμενη από την Epo μετάδοση μηνύματος μίτωσης.

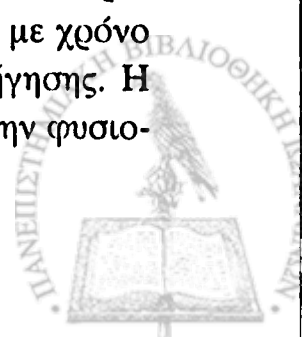
Η διακοπή της μετάδοσης των μηνυμάτων επιτυγχάνεται μέσω της σύνδεσης του καρβοξυλικού άκρου του Epo-R με μία τυροσινική φωσφατάση την SHP1 (Hemopoietic Cell Phosphatase-HCP)²⁵⁶. Μετά την σύνδεση της η SHP1 οδηγεί στην αποφωσφορυλίωση της JAK2 και μ' αυτόν τον τρόπο διακόπτει την ανταπόκριση στην Epo²⁵⁷. Κληρονομικό έλλειμα του καρβοξυλικού άκρου του Epo-R οδηγεί στην οικογενή ερυθροκυττάρωση, λόγω απουσίας της ανωτέρω αρνητικής ρυθμιστικής δράσης.

Οι περισσότεροι οδοί μετάδοσης του σήματος που ενεργοποιούνται από τον Epo-R είναι κοινοί και σε άλλους υποδοχείς κυτταροκινών, όπως IL-3, GM-CSF, IL-5. Παραμένει ασαφές πως ο Epo-R προκαλεί ανταπόκριση ειδική της Epo, που οδηγεί σε διαφοροποίηση προς ερυθρά σειρά. Έρευνες έδειξαν ότι η έκφραση του Epo-R είναι απαραίτητη, αλλά δεν είναι από μόνη της επαρκής. Απαιτούνται άλλοι παράγοντες επίσης, όπως ο GATA-1, ο NFE-2 και ο EKLF.

Υποδοχείς Epo βρέθηκαν και σε άλλα κύτταρα εκτός της ερυθράς σειράς, στα νευρικά κύτταρα και στα κύτταρα των λείων μυϊκών ινών και πιθανολογείται η ύπαρξή τους στα μεγακαρυοκύτταρα και στα ενδοθηλιακά κύτταρα.

Φαρμακοκινητική και Χρήση της rHuEpo

Η rHuEpo μπορεί να χορηγηθεί τόσο ενδοφλέβια, όσο και υποδόρια, όμως υπάρχουν σημαντικές διαφορές μεταξύ των δύο οδών. Η υποδόρια χορήγηση προκαλεί χαμηλότερες μέγιστες τιμές Epo πλάσματος, με χρόνο εξαφάνισης 19-22 ώρες έναντι 4-5 ωρών της ενδοφλέβιας χορήγησης. Η υποδόρια χορήγηση σε μικρότερες δόσεις μοιάζει περισσότερο την φυσιο-



λογική παραγωγή της Ερο και έχει μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα από την ενδοφάρμαχη χορήγηση μεγάλων δόσεων. Επομένως η γHuΕρο πρέπει να χορηγείται υποδόρια. Η γHuΕρο χρησιμοποιήθηκε αρχικά για την θεραπεία της αναιμίας της χρόνιας νεφρικής ανεπάρκειας με θεαματικά αποτελέσματα. Έκτοτε έχει δοκιμασθεί για την θεραπεία της αναιμίας άλλων νοσημάτων, όπως αναιμία της προωρότητας, αναιμία της φλεγμονής (ρευματοειδής αρθρίτις, φλεγμονώδης νόσος του εντέρου, χρόνια λοίμωξη)^{2,58}, αναιμία των κακοήθων νοσημάτων (στεροειδείς όγκοι, πολλαπλούν μυέλωμα, κακόηθη λεμφιώματα, μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα), στην μεταμόσχευση του μυελού και στην αναιμία της κύησης. Επίσης χορηγείται σε υγιή άτομα που θα υποβληθούν σε προγραμματισμένη επέμβαση και υποβάλλονται σε αφαιμάξεις προκειμένου να υποστούν αυτόλογη μετάγγιση.



ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ



ΣΚΟΠΟΣ

Σκοπός της παρούσης εργασίας ήταν: α) Η μελέτη της ερυθροποίησης ασθενών με ΜΔΣ σε καλλιέργειες βραχείας διάρκειας (ημίρρευστες καλλιέργειες) υπό την επίδραση διαφόρων συγκεντρώσεων ανασυνδυασμένης ανθρώπινης Ερυθροποιητίνης (rh-Epo) και η συσχέτιση της ανάπτυξης ερυθροκυτταρικών αποικιών με παραμέτρους όπως το φύλο και η αιμοσφαιρίνη του ασθενούς, η συγκέντρωση της rh-Epo και ο κατά FAB υπότυπος.

β) Η διερεύνηση της *in vivo* ανταπόκρισης στην θεραπεία με rh-Epo των ασθενών με ΜΔΣ και της συσχέτισης της με την *in vitro* ανάπτυξη αποικιών ερυθράς σειράς, στα πλαίσια της προσπάθειας ανεύρεσης προγνωστικών δεικτών ανταπόκρισης στην θεραπεία με Ερυθροποιητίνη.

ΥΛΙΚΟ.

Μελετήθηκαν 30 ασθενείς με ΜΔΣ κατά την αρχική διάγνωση της νόσου. Με βάση τον μυελό και το περιφερικό αίμα ταξινομήθηκαν κατά FAB ως εξής: RA 8 ασθενείς (26,6%), RARS: 5 ασθενείς (16,6%), RAEB: 10 ασθενείς (33,3%), RAEB-T: 5 ασθενείς (16,6%) και CMML: 2 ασθενείς (6,6%). Η διάμεση ηλικία ήταν 68 έτη με διακύμανση 49-82 και η μέση τιμή \pm σταθερή διακύμανση (Standard Deviation, SD) $66,7 \pm 9,31$. Από σύνολο των 30 ασθενών 15 ήταν άνδρες και 15 γυναίκες, ενώ αναλυτικά σε κάθε υπότυπο η σχέση ανδρών προς γυναίκες αντίστοιχα ήταν ως ακολούθως RA:5/3, RARS:2/3, RAEB:4/6, RAEB-T:3/2 και CMML:1/1. Η μέση τιμή της εκατοστιαίας αναλογίας των βλαστών του μυελού \pm SD ήταν $10,7 \pm 7,89$ (διακύμανση 1-25 %). Η μέση τιμή του αριθμού των λευκών αιμοσφαιρίων του περιφερικού αίματος $\times 10^9/l \pm$ SD ήταν $3,52 \pm 2,52$ (0,8-14,2), ενώ μέση τιμή του απόλυτου αριθμού των πολυμορφοπυρήνων $\times 10^9/l \pm$ SD ήταν $1,353 \pm 1,152$ (0,3-5,943). Η μέση τιμή της αιμοσφαιρίνης \pm SD σε gr/dl ήταν $8,27 \pm 1,25$ (6,2-11) και τέλος η μέση τιμή του αριθμού των αιμοπεταλίων \pm SD $\times 10^9/l$ ήταν $131 \pm 90,8$ (40-480). Τα χαρακτηριστικά των ασθενών φαίνονται αναλυτικά στον πίνακα 7.

Κανένας από τους ασθενείς δεν είχε έλλειψη βιταμίνης B12 ή φυλλικού οξέος. Πριν την λήψη του μυελού για την καλλιέργεια κανείς από τους 30 ασθενείς δεν είχε υποβληθεί σε κάποιου είδους θεραπεία. Ακολούθως υποβλήθηκαν σε θεραπεία με ανασυνδυασμένη ανθρώπινη Ερυθροποιητίνη (rh-Epo) 27 ασθενείς σε δόση 150 U/kg βάρους σώματος, υποδόρια, τρεις φορές την εβδομάδα, για τουλάχιστον 2 μήνες. Οι ασθενείς που δεν ανταποκρίθηκαν διέκοψαν την θεραπεία.

Σαν ομάδα ελέγχου στην *in vitro* μελέτη χρησιμοποιήθηκαν οι μυελοί από 10 φυσιολογικά άτομα 5 άνδρες και 5 γυναίκες, ανάλογης ηλικίας με τους ασθενείς.

Πίνακας 7. Χαρακτηριστικά ασθενών με ΜΔΣ

Νο ασθ.	Ηλικία	Φύλο	Τύπος ΜΔΣ	Βλάστες μυελού %	Hb (gr/dl)	Λευκά $\times 10^9/l$	Πολυμορφο-πύρρηνα $\times 10^9/l$	Λιμποπετάλια $\times 10^9/l$	Ανταπόκριση στην Ερω
1	51	Θήλυ	RA	4	10,5	2,77	1,16	259	ΝΑΙ
2	58	Θήλυ	RA	4	9,8	14,2	1,60	295	ΟΧΙ
3	62	Αρρεν	RA	3	9	3,00	1,20	150	ΟΧΙ
4	61	Αρρεν	RA	3	8,5	4,00	1,50	135	ΟΧΙ
5	72	Αρρεν	RA	3	9,5	3,10	1,10	110	ΟΧΙ
6	80	Αρρεν	RA	3	8	2,50	1,00	160	ΝΑΙ
7	75	Αρρεν	RA	3	8,7	3,40	1,224	100	ΟΧΙ
8	56	Θήλυ	RA	4	10,8	1,80	1,116	210	ΝΑΙ
9	67	Αρρεν	RARS	3	11	3,85	1,70	140	ΔΕ
10	78	Αρρεν	RARS	2	7,5	5,82	4,365	141	ΟΧΙ
11	74	Θήλυ	RARS	2	8,5	4,08	2,223	182	ΟΧΙ
12	82	Θήλυ	RARS	1	7,7	8,49	5,943	480	ΝΑΙ
13	80	Θήλυ	RARS	3	6,6	4,87	2,045	220	ΟΧΙ
14	66	Θήλυ	RAEB	10	7,5	2,10	0,95	90	ΟΧΙ
15	55	Θήλυ	RAEB	19	9	2,50	0,90	100	ΟΧΙ
16	62	Αρρεν	RAEB	16	9	3,50	1,20	105	ΟΧΙ
17	52	Αρρεν	RAEB	17	8	2,80	1,10	75	ΟΧΙ
18	49	Θήλυ	RAEB	7	9,7	4,20	1,90	123	ΝΑΙ
19	69	Θήλυ	RAEB	11	8,4	0,80	0,30	80	ΝΑΙ
20	71	Θήλυ	RAEB	12	8	3,10	1,00	115	ΟΧΙ
21	75	Θήλυ	RAEB	16	8,3	3,40	1,10	98	ΝΑΙ
22	57	Αρρεν	RAEB	15	7,5	1,60	0,56	60	ΟΧΙ
23	70	Αρρεν	RAEB	13	8,5	2,20	0,90	78	ΟΧΙ
24	61	Θήλυ	RAEB-T	21	6,9	1,90	0,50	45	ΟΧΙ
25	77	Αρρεν	RAEB-T	25	7,2	1,80	0,50	56	ΔΕ
26	62	Αρρεν	RAEB-T	21	6,8	1,50	0,60	66	ΟΧΙ
27	63	Θήλυ	RAEB-T	22	7	3,00	1,0	80	ΟΧΙ
28	71	Αρρεν	RAEB-T	24	6,7	1,20	0,40	40	ΔΕ
29	70	Αρρεν	CMML	19	7,5	3,70	0,74	57	ΟΧΙ
30	75	Θήλυ	CMML	15	6,2	4,70	0,78	80	ΟΧΙ

*ΔΕ: Δεν έλαβε θεραπεία με rh-Ερω

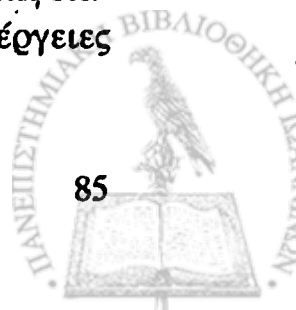


ΜΕΘΟΔΟΙ

Για την μελέτη της ανάπτυξης των αποικιών της ερυθράς σειράς χρησιμοποιήθηκαν ημίρρευστες (βραχείας διάρκειας, short term) καλλιέργειες.

Υλικά

1. Histopaque-1077 (Sigma): διάλυμα πολυσουκρόζης και Νατριούχου diatrizoate το οποίο χρησιμοποιείται για τον διαχωρισμό ζώντων μονοπυρηνικών κυττάρων (απομάκρυνση ερυθροκυττάρων και πολυμορφοπύρηνων) από μικρές ποσότητες αίματος ή μυελού.
2. Θρεπτικό υλικό καλλιέργειας: Iscove's modification of Dubelcco's Medium (IMDM) εμπλουτισμένο με διττανθρακικά (NaHCO_3) και μείγμα πενικιλίνης/στρεπτομυκίνης.
3. MethoCult H4533 (Stem Cell Technologies Inc): Έτοιμο μείγμα μεθυλοκυτταρίνης το οποίο περιέχει:
 - Ορό εμβρύου βοός (Fetal Bovine serum)-30%
 - Phytohaemagglutinin-Lymphocyte conditioned medium (PHA-LCM) (υπερκείμενο υγρής καλλιέργειας στην οποία επωάζονται λεμφοκύτταρα και διεγείρονται από φυτοαιμοσυγκολλητίνη)-5%
 - Βόειος αλβουμίνη ορού (Bovine serum Albumin)-1%
 - Μεθυλοκυτταρίνη -0.9%
 - 2-Μερκαπτοαιθανόλη- 10^{-4}M
 - Γλουταμίνη -2mMΔιατηρείται στους -20°C για 6 μήνες.
4. Ανθρώπινη ανασυνδυασμένη Ερυθροποιητίνη (rh-Epo) περιεκτικότητας 5000U/ml: Αραιώνεται με IMDM. Ετοιμάζουμε 7 διαφορετικά διαλύματα rh-Epo, έτσι ώστε οι τελικές συγκεντρώσεις στις καλλιέργειες να είναι 1, 2, 5, 20, 100, 200, 500 U/ml.



Μέθοδος

A. Λήψη μυελού

Μετά από τοπική αναισθησία με ξυλοκαΐνη γίνεται παρακέντηση με ειδική βελόνα μυελογράμματος της οπισθίας λαγονίου άκανθας ή του στέρνου και αναρρόφηση 2-3 ml μυελού. Το δείγμα μεταφέρεται σε αποστειρωμένα σωληνάκια με πώμα, στα οποία έχει τοποθετηθεί εκ των προτέρων 1ml ηπαρίνης. Κλείνουμε το πώμα και αναμειγνύουμε με προσοχή, αλλά γρήγορα, για να αποφευχθεί ο κίνδυνος τόσο της επιμόλυνσης όσο και της πήξης του δείγματος.

B. Διαχωρισμός κυττάρων

1. Το δείγμα του μυελού αραιώνεται με IMDM (1:1).
2. Σε αποστειρωμένα σωληνάκια φυγοκέντρησης τοποθετούνται 3ml Histopaque, υλικό που φυλάσσεται στο ψυγείο και αφήνεται να αποκτήσει θερμοκρασία δωματίου.
3. Με προσοχή επιστοιβάζεται επί του Histopaque ίση ποσότητα του αραιωμένου δείγματος. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στα 400 x g για ακριβώς 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
4. Μετά το πέρας της φυγοκέντρησης τα ερυθρά και τα πολυμορφοπύρηνα καθιζάνουν στον πυθμένα του σωληναρίου, επάνω δε από το ευδιάκριτο ίζημα τους δημιουργούνται τρεις στοιβάδες διαδοχικά, η στοιβάδα του Histopaque, η λεπτή θολερή στοιβάδα των μονοπυρηνικών κυττάρων και επάνω από αυτήν η στοιβάδα του πλάσματος. Λαμβάνουμε με προσοχή και με αποστειρωμένη πιπέτα Pasteur το ενδιάμεσο, θολερό στρώμα των μονοπυρηνικών κυττάρων.
5. Μεταφέρουμε το αναρροφηθέν στρώμα των μονοπυρηνικών κυττάρων σε ένα καθαρό αποστειρωμένο κωνικό σωληνάριο φυγοκέντρησης.
6. Προσθέτουμε σ' αυτό το σωληνάριο (βήμα 5) 10ml IMDM και αναμειγνύουμε με ήπιες κινήσεις.
7. Φυγοκεντρούμε στα 250 x g για 10 λεπτά.
8. Αναρροφάμε το υπερκείμενο και το απορρίπτουμε.
9. Προσθέτουμε στο ίζημα των κυττάρων 5ml IMDM και αναμειγνύουμε με ήπιους χειρισμούς.
10. Φυγοκεντούμε στα 250 x g για 10 λεπτά.
11. Επαναλαμβάνουμε τα βήματα 8, 9 και 10 και ακολούθως προσθέτουμε 0,5 ml IMDM.



12. Μετράμε σε πλάκα Neubauer τον αριθμό των ζώντων μονοπυρηνικών κυττάρων μετά από χρώση με Trypan Blue.
13. Αραιώνουμε ή συμπυκνώνουμε το διάλυμα ώστε η τελική περιεκτικότητά του σε κύτταρα να είναι 1×10^6 /ml.

Όλες οι διεργασίες γίνονται σε θάλαμο νηματικής ροής με αποστειρωμένα υλικά για να αποφευχθούν οι επιμολύνσεις των καλλιιεργειών.

Γ. Καλλιέργεια μυελού

Προσθέτουμε 100μl του παραπάνω εναιωρήματος κυττάρων σε 1ml του μείγματος της μεθυλοκυτταρίνης (MethoCult) και αναμειγνύουμε πολύ καλά.

Από το μείγμα αυτό, χρησιμοποιώντας μία σύριγγα ινσουλίνης 1ml, τοποθετούμε με προσοχή σε μία πλάκα 96 κυψελίδων με επίπεδη βάση 100 μl ανά θέση σε συνολικά 7 θέσεις. Πριν την τοποθέτηση του μείγματος έχουμε βάλει σε κάθε μία από τις επτά θέσεις 10μ των διαλυμάτων των διαφόρων συγκεντρώσεων της rh-Epo (1, 2, 5, 20, 100, 200, 500 U/ml). Αναμειγνύουμε το μείγμα με την rh-Epo κάνοντας ήπιες κινήσεις της πλάκας, ώστε να καλυφθεί ομοιόμορφα ο πυθμένας κάθε κυψελίδας.

Όλα τα πειράματα γίνονται εις διπλούν. Αναγράφουμε επί του τρυβλίου το όνομα και την ημερομηνία που έγινε η καλλιέργεια και τις συγκεντρώσεις της rh-Epo. Τα δείγματα τοποθετούνται σε επωαστικό κλίβανο, όπου επωάζονται στους 37°C, σε απόλυτη υγρασία και ατμοσφαιρικό αέρα με 5% CO₂ για 14 ημέρες.

Δ. Εκτίμηση των αποτελεσμάτων

Την 14η ημέρα μετρήθηκαν σε ανάστροφο μικροσκόπιο οι αποικίες της ερυθράς σειράς, που στην ουσία αντιπροσωπεύουν τα προγονικά κύτταρα της ερυθράς σειράς [Ερυθροκυτταρικά CFC (Colony Forming Cells)], δηλαδή τα BFU-E και τα CFU-E. Σαν CFU-E χαρακτηρίστηκαν ερυθροκυτταρικά αθροίσματα 20-50 αιμοσφαιρινοποιημένων κυττάρων και σαν BFU-E ερυθροκυτταρικές αποικίες αποτελούμενες από περισσότερα από 50 αιμοσφαιρινοποιημένα κύτταρα που σχηματίζουν ένα ή περισσότερα αθροίσματα (clusters).

Θεραπεία με rh-Epo-Ανταπόκριση

Από το σύνολο των 30 ασθενών 27 (αναλυτικά RA:8, RARS:4, RAEB:10, RAEB-T:3, CMM:2) έλαβαν θεραπεία με rh-Epo σε δόση 150 U/kg βάρους σώματος για τουλάχιστον 2 μήνες.



Ως ανταπόκριση ορίστηκε σύμφωνα με τα βιβλιογραφικά δεδομένα:

- α) Αύξηση της αιμοσφαιρίνης $\geq 1,5\text{g/dl}$ στους ασθενείς που δεν είχαν ανάγκη μετάγγισης.
- β) Διατήρηση σταθερών επιπέδων αιμοσφαιρίνης χωρίς ανάγκη μετάγγισης σε ασθενείς που ήταν σε θεραπεία με μεταγγίσεις πριν την έναρξη της χορήγησης gh-Epo.

Όσοι δεν ανταποκρίθηκαν μετά από 2 μήνες, διέκοψαν την θεραπεία με gh-Epo.

Στατιστική ανάλυση

Έγινε σύγκριση των μέσων τιμών των αποικιών της ερυθράς σειράς με την μέθοδο της κατανομής t-student (t-student test unpaired). Για την διερεύνηση της συσχέτισης μεταξύ του αριθμού των αποικιών της ερυθράς σειράς και της αιμοσφαιρίνης (Hb) των ασθενών χρησιμοποιήθηκε ο συντελεστής συσχέτισης κατά τάξεις του Spearman, r_s (Spearman's rank correlation coefficient). Επίσης για την εκτίμηση της σημαντικότητας του φύλου χρησιμοποιήθηκε η δοκιμασία της ακριβούς πιθανότητας (Fisher's exact probability test). Σημαντικότητα ορίστηκε ως $p \leq 0,05$.

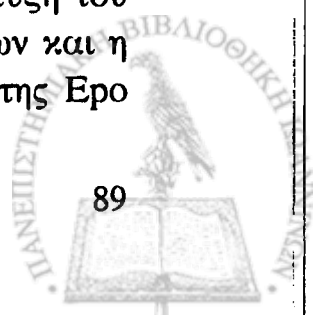


ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Μετρήθηκαν οι ερυθροκυτταρικές αποικίες, οι οποίες ως γνωστόν αντιπροσωπεύουν τον αριθμό των προγονικών κυττάρων της ερυθράς σειράς, CFU-E και BFU-E, σε ημίρρευστες καλλιέργειες κυττάρων μυελού των ασθενών με ΜΔΣ και των υγιών μαρτύρων. Τα αποτελέσματά τους φαίνονται αναλυτικά στον Πίνακα 8. Υπολογίστηκε η μέση τιμή ± σταθερά απόκλιση (SD) του αριθμού των αποικιών της ερυθράς σειράς ανά 10^4 μονοπυρηνικά κύτταρα μυελού των οστών α) του συνόλου των ασθενών με ΜΔΣ, β) του κάθε υπότυπου από αυτούς χωριστά και γ) των υγιών μαρτύρων, στις διάφορες συγκεντρώσεις ανθρώπινης ανασυνδυασμένης Ερυθροποιητίνης (Πίνακας 9).

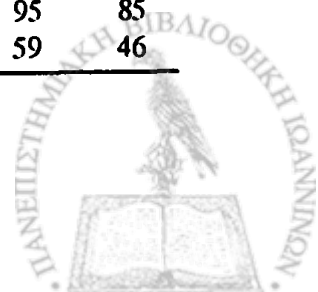
Γενικά η ανταπόκριση ήταν ανομοιογενής, ακόμη και στους ασθενείς του ίδιου υπότυπου. Συγκρίναμε την μέση τιμή του συνόλου των ασθενών με αυτήν των μαρτύρων υπό την επίδραση των διαφόρων συγκεντρώσεων της rh-Epo, καθώς επίσης και των ασθενών που ανήκαν σε διαφορετικούς υποτύπους ΜΔΣ μεταξύ τους και με τους μάρτυρες. Επιπλέον μελετήθηκε και η ανταπόκριση των ασθενών των διαφόρων υποτύπων και των μαρτύρων στις 7 διαδοχικές συγκεντρώσεις. Εξετάσαμε επίσης αν η αιμοσφαιρίνη και το φύλο των ασθενών είχαν σχέση με την ανάπτυξη των αποικιών της ερυθράς σειράς. Από τους 30 ασθενείς 27 υποβλήθηκαν σε θεραπεία με Ερυθροποιητίνη. Διερευνήθηκε η ανταπόκριση στην θεραπεία των ασθενών κάθε υπότυπου ΜΔΣ, καθώς και η σχέση της *in vivo* με την *in vitro* απάντηση στην rh-Epo.

1. Σύγκριση των ασθενών με τους φυσιολογικούς μάρτυρες: Συγκρίθηκαν αρχικά η μέση τιμή των αποικιών της ερυθράς σειράς του συνόλου των ασθενών με ΜΔΣ και χωριστά των διαφόρων υποτύπων τους με την μέση τιμή των υγιών μαρτύρων, σε κάθε συκέντρωση. Η ανάπτυξη του συνόλου των ΜΔΣ υπολείπονταν αυτής των φυσιολογικών ατόμων και η διαφορά ήταν στατιστικά σημαντική σε όλες τις συγκεντρώσεις της Epo



Πίνακας 8. Αριθμός αποικιών ερυθράς σειράς 10^4 μονοπυρηνικά κύτταρα μυελού των οστών

No. ασθ.	Τύπος ΜΔΣ	Συγκεντρώσεις rh-Epo(U/ml)						
		1	2	5	20	100	200	500
1	RA	23,5	26	30	27	39	19	21,5
2	RA	6	7,5	18	18,5	21,5	20,5	10,5
3	RA	9	11	16	14	15	10	14
4	RA	0	1,5	5	6	7,5	6	4,5
5	RA	7,5	11	11,5	11,5	24,5	15	10,5
6	RA	5	6	8	8	7	5	3
7	RA	2	3	2	2	7	12,5	17
8	RA	26,5	26	22,5	30,5	42,5	49,5	42,5
9	RARS	12,5	21	20,5	33,5	34,5	23,5	27
10	RARS	0,5	0,5	1,5	1	2	0	0
11	RARS	2	3	5	6,5	7	6	4
12	RARS	0	0,5	0,5	2	1,5	2	4
13	RARS	0,5	1	1,5	2,5	1,5	4,5	2
14	RAEB	2,5	3,5	3,5	3	1,5	1,5	1
15	RAEB	5	3	5,5	5	6	10	9
16	RAEB	5	6	8	13	17,5	10	12
17	RAEB	0	0,5	0	2	1,5	2,5	0
18	RAEB	2	3,5	5,5	5	4,5	6	5
19	RAEB	1	1,5	2	2	5	3	3
20	RAEB	4,5	5	6,5	5	7,5	7	3,5
21	RAEB	1	2	1,5	2	3,5	2,5	1
22	RAEB	0,5	1,5	1,5	1,5	5	2	0,5
23	RAEB	4	5	6	5	7,5	6,5	3,5
24	RAEB-T	0	0	0,5	1	2	1	0
25	RAEB-T	0,5	0,5	1	1,5	0,5	0	0,5
26	RAEB-T	0,5	1	1	1,5	2	1,5	1
27	RAEB-T	0	1	0	1	1	1	1
28	RAEB-T	0	0	0,5	0,5	1	0,5	0,5
29	CMML	0	0	0,5	0,5	1,5	1	0
30	CMML	0	0	0,5	0,5	1	0,5	1
No. μαρτ.	ΜΑΡΤΥΡΑΣ							
1		35	40	50	52	70	45	55
2		50	62	93	100	126	140	66
3		50	58	60	64	85	41	52
4		67,5	79	111,5	98	107,5	80	75,5
5		45	50	60	62	80	55	65
6		60	72	103	110	136	150	76
7		70	82	108	120	146	160	86
8		77	89	117	108	117	90	85
9		52	60	75	90	100	95	85
10		55	62	65	69	90	59	46



Πίνακας 9. Μέσες τιμές \pm σταθερά απόκλιση, SD, και διακύμανση του αριθμού των αποικιών της ερυθράς σειράς (CFU-E και BFU-E) ανά 10^4 μονοπυρηνικά κύτταρα μυελού των οστών

Ερο (U/ml)	1	2	5	20	100	200	500
ΜΔΣ	4,05 \pm 6,49 (0-26,5)	5,06 \pm 7,21 (0-26)	6,2 \pm 7,73 (0-30)	7,1 \pm 9,09 (0,5-33,5)	9,3 \pm 11,71 (0,5-42,5)	7,67 \pm 10,14 (0-49,5)	6,77 \pm 9,62 (0-42,5)
RA	9,93 \pm 9,75 (0-26,5)	11,5 \pm 9,55 (3-26)	14,12 \pm 9,37 (2-30)	14,68 \pm 10,05 (2-30,5)	20,5 \pm 14,17 (7-42,5)	17,18 \pm 14,19 (5-49,5)	15,43 \pm 12,51 (3-42,5)
RARS	3,1 \pm 5,3 (0-12,5)	5,2 \pm 8,89 (0,5-21)	5,8 \pm 8,39 (0,5-20,5)	9,1 \pm 13,79 (1-33,5)	9,3 \pm 14,27 (1,5-34,5)	7,2 \pm 9,39 (0-23,5)	7,4 \pm 11,08 (0-27)
RAEB	2,55 \pm 1,93 (0-5)	3,15 \pm 1,79 (0,5-5)	4 \pm 2,65 (0-8)	4,35 \pm 3,38 (1,5-13)	5,95 \pm 4,57 (1,5-17,5)	5,1 \pm 3,24 (1,5-10)	3,85 \pm 3,9 (0-12)
RAEB-T	0,2 \pm 0,27 (0-0,5)	0,5 \pm 0,5 (0-1)	0,6 \pm 0,41 (0-1)	1,1 \pm 0,42 (0,5-1,5)	1,3 \pm 0,67 (0,5-2)	0,8 \pm 0,57 (0-1,5)	0,6 \pm 0,41 (0,5-1)
CMML	0 (0)	0 (0)	0,5 (0,5)	0,5 (0,5)	1,25 \pm 0,35 (1-1,5)	0,75 \pm 0,35 (0,5-1)	0,5 \pm 0,7 (0-1)
ΜΑΡΤΥΡΕΣ	56,15 \pm 12,63 (35-77)	65,4 \pm 15,09 (40-89)	84,25 \pm 24,97 (50-117)	87,3 \pm 23,71 (52-120)	105,75 \pm 25,23 (70-146)	91,5 \pm 44,34 (41-160)	69,15 \pm 14,64 (46-86)

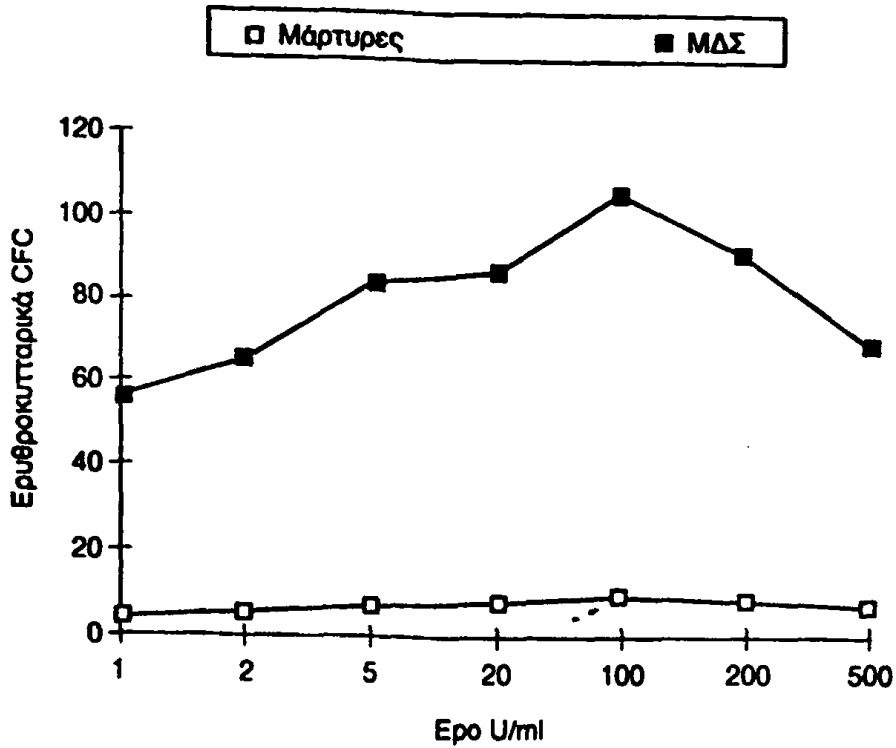
Πίνακας 10. Μέση τιμή συγκέντρωσης rh-Epo (MT) \pm SD στην οποία παρατηρείται η μέγιστη ανάπτυξη αποικιών και συσχέτιση (p) με την αντίστοιχη τιμή των μαρτύρων

	MT \pm SD	p
μαρτ.	111 \pm 72,14	
ασθ.	127,8 \pm 116,03	0,67
RA	138,75 \pm 158,58	0,62
RARS	200 \pm 173,2	0,17
RAEB	120,2 \pm 62,82	0,76
RAEB-T	64,4 \pm 15,54	0,21
CMML	100	0,83

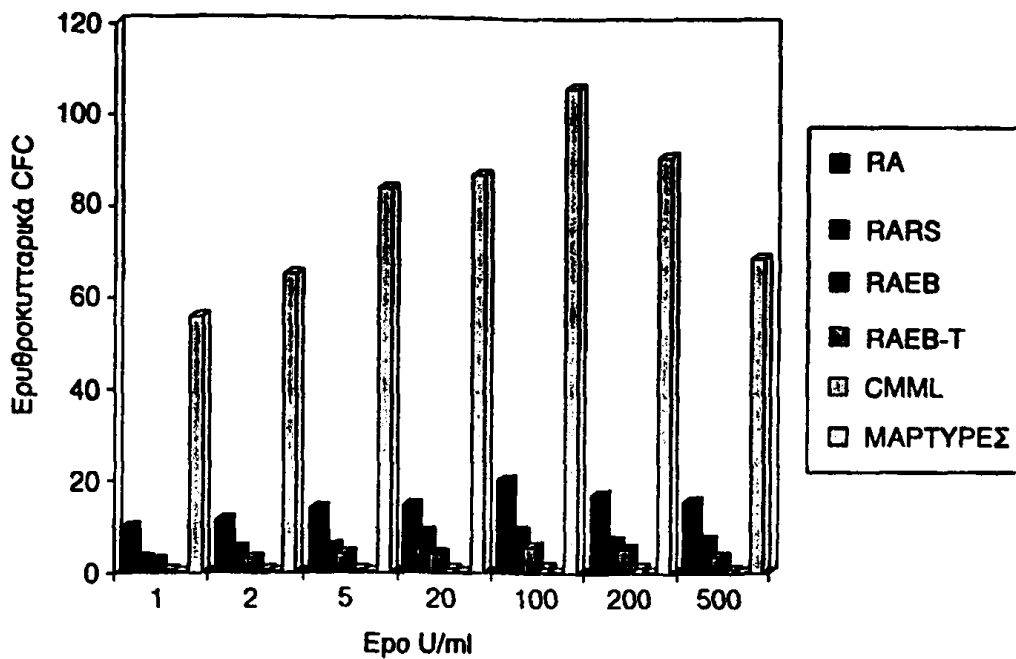
($p < 0,001$) (Σχήμα Α). Επίσης το ίδιο ίσχυε και για κάθε υπότυπο ($p < 0,05$) (Σχήμα Β).

Στους ασθενείς με ΜΔΣ η πλειονότητα των αποικιών που μετρήθηκαν ήταν CFU-E (75%), ενώ αντίθετα στους φυσιολογικούς μάρτυρες $>60\%$ των αποικιών ήταν BFU-E.





Σχήμα Α. Σύγκριση μέσων τιμών ερυθροκυτταρικών CFC/10⁴ μονοπυρηγικά κύτταρα μυελού των οστών ασθ. με ΜΔΣ και φυσιολογικών μαρτύρων.



Σχήμα Β. Σύγκριση μέσων τιμών ερυθροκυτταρικών CFC/10⁴ μονοπυρηγικά κύτταρα μυελού των οστών ασθ. των διαφόρων υποομάδων ΜΔΣ και φυσιολογικών μαρτύρων.



2. Σύγκριση της ανάπτυξης των αποικιών της ερυθράς σειράς στις διάφορες συγκεντρώσεις ανθρώπινης ανασυνδυασμένης Ερυθροποιητίνης:

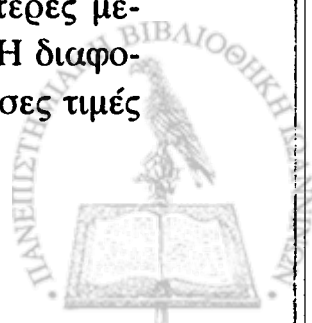
Οι συνήθεις συγκεντρώσεις gh-Epo που χρησιμοποιούνται για την μελέτη των αποικιών της ερυθράς σειράς είναι 1-2 U/ml. Στην συγκέντρωση 1 U/ml 8 από τους 30 ασθενείς με ΜΔΣ (26,6%) (αναλυτικά RA: 1/8, RARS: 1/5, RAEB: 1/10, RAEB-T: 3/5, CMML: 2/2) παρουσίασαν μηδενική ανάπτυξη αποικιών. Το ίδιο παρατηρήθηκε στη συγκέντρωση 2 U/ml για 4 ασθενείς από τους 30 (13,3%) (RAEB-T: 2/5, CMML: 2/2). Οι ασθενείς αυτοί ανταποκρίθηκαν στην αύξηση της συγκέντρωσης της Epo με μικρή ανάπτυξη αποικιών ερυθράς σειράς.

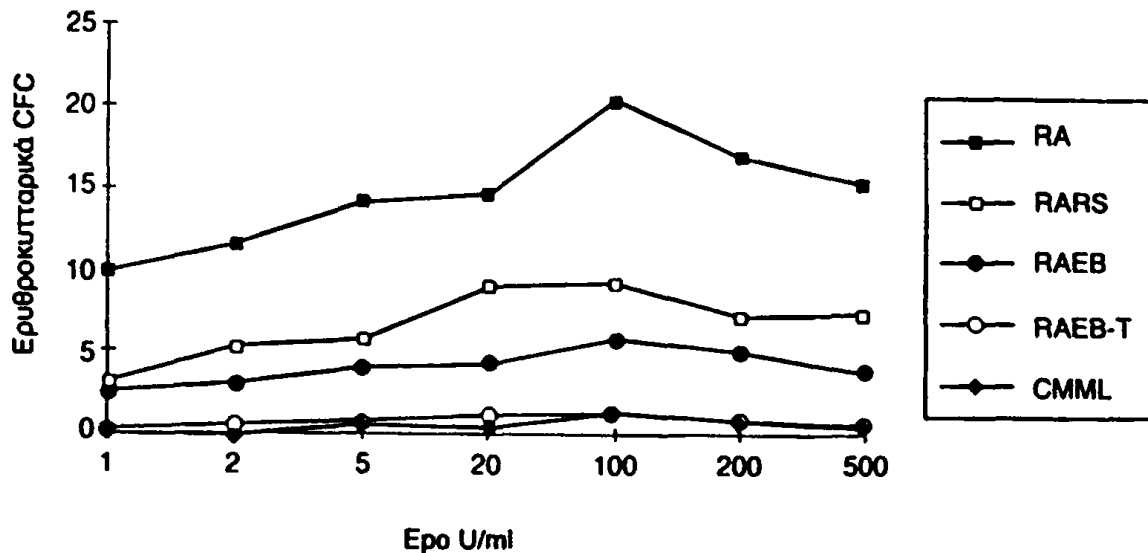
Συγκρίθηκαν οι μέσες τιμές των ερυθροκυτταρικών CFC στις διαδοχικές συγκεντρώσεις της gh-Epo (1, 2, 5, 20, 100, 200, 500 U/ml) των φυσιολογικών μαρτύρων, του συνόλου των ασθενών με ΜΔΣ και των ασθενών του κάθε υπότυπου (RA, RARS, RAEB, RAEB-T, CMML). Τόσο στους φυσιολογικούς μάρτυρες όσο και στο σύνολο των ασθενών με ΜΔΣ και στον κάθε υπότυπό τους χωριστά διαπιστώθηκε αύξηση των μέσων τιμών των αποικιών της ερυθράς σειράς σταδιακά από την συγκέντρωση Epo 1 έως 100 U/ml και στην συνέχεια μείωση των τιμών στις συγκεντρώσεις 200 και 500 U/ml. Στην συγκέντρωση 100 U/ml παρατηρήθηκε η μέγιστη τιμή των μέσων τιμών των αποικιών (Πίνακας 9).

Από την στατιστική ανάλυση παρατηρήθηκε ότι ενώ οι μέσες τιμές των αποικιών του συνόλου των ΜΔΣ αυξήθηκαν προοδευτικά από την συγκέντρωση 1 έως 100 U/ml και στην συνέχεια παρουσίασαν πτώση στις συγκεντρώσεις 200 και 500 U/ml, στατιστικά σημαντική ήταν μόνο η διαφορά της μέσης τιμής των αποικιών στην συγκέντρωση 100 U/ml, όταν αυτή συγκρίθηκε με την μέση τιμή στην συγκέντρωση 1 U/ml ($p=0,03$).

Παρά την παρατηρούμενη αύξηση του αριθμού των αποικιών, η αύξηση της gh-Epo δεν αποκατέστησε την φυσιολογική ερυθροποίηση στους ασθενείς με ΜΔΣ. Εξαιρέση αποτέλεσε ένας ασθενής (No 8), ο οποίος στην συγκέντρωση gh-Epo 200 U/ml παρουσίασε αριθμό αποικιών εντός των ορίων των φυσιολογικών μαρτύρων.

3. Σύγκριση των υποτύπων των ΜΔΣ μεταξύ τους: Αν συγκρίνουμε χωριστά σε κάθε συγκέντρωση Ερυθροποιητίνης που χρησιμοποιήθηκε την ανταπόκριση των διάφορων υποτύπων, παρατηρούμε ότι υψηλότερες μέσες τιμές αποικιών παρουσίασαν οι ασθενείς με RA (Σχήμα Γ). Η διαφορά αυτή ήταν στατιστικά σημαντική κατά την σύγκριση με τις μέσες τιμές





Σχήμα Γ. Σύγκριση μέσων τιμών ερυθροκυτταρικών CFC/10⁴ μονοπυρηνικά κύτταρα μυελού των οστών ασθ. των διαφόρων υποομάδων ΜΔΣ.

των ασθενών με RAEB και RAEB-T και όχι με τις μέσες τιμές των ασθενών με RARS. Αυτό ίσχυε για όλες τις συγκεντρώσεις της gh-Epo.

Οι μέσες τιμές των CFC της ερυθράς σειράς των ασθενών με RARS υπερέχαν αυτών των ασθενών με RAEB και RAEB-T, η διαφορά όμως δεν ήταν στατιστικά σημαντική. Αντίθετα οι μέσες τιμές των αποικιών των ασθενών με RAEB υπερέχαν με στατιστικά σημαντική διαφορά αυτών με RAEB-T σε όλες τις συγκεντρώσεις της gh-Epo, πλην αυτής των 20 και 500 U/ml.

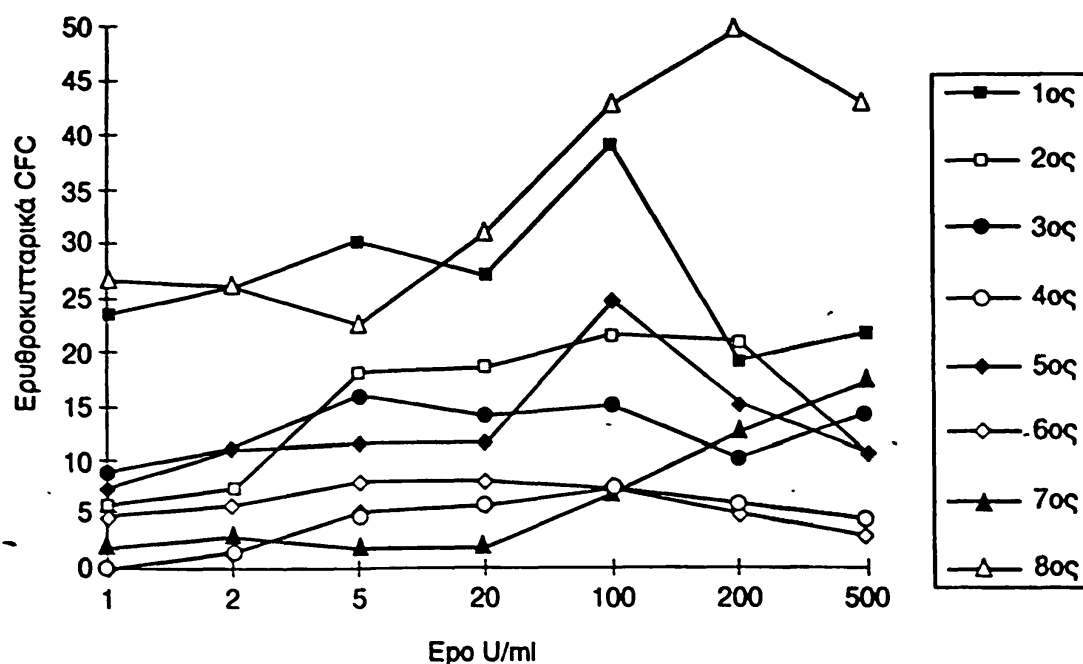
Οι μέσες τιμές των ασθενών με CMML ήταν μικρότερες όλων των άλλων ΜΔΣ, η διαφορά όμως δεν μπορεί να εκτιμηθεί στατιστικά, λόγω του μικρού αριθμού των περιστατικών.

4. Ανάλυση των αποτελεσμάτων των ασθενών του κάθε υπότυπου χωριστά καθώς και των φυσιολογικών μαρτύρων:

RA: Εξετάστηκαν συνολικά οι μυελοί 8 ασθενών με RA (26,67% του συνόλου των ασθενών), 5 άνδρες και 3 γυναίκες με διάμεση ηλικία 61,5 έτη (51-80). Η ανταπόκριση στην Ερυθροποιητίνη in vitro ήταν ανομοιογενής. Οι 6 από τους 8 ασθενείς (No. 1, 2, 3, 5, 7, 8) είχαν ικανοποιητική ανταπόκριση σε σχέση με τους υπόλοιπους 2 ασθενείς (No. 4, 6) που παρουσίασαν πτωχή ανάπτυξη (Σχήμα Δ).

Ο αριθμός των αποικιών της ερυθράς σειράς ανά 10⁴ κύτταρα και οι





Σχήμα 4. Ερυθροκυτταρικά CFC/10⁴ μονοπυρηνικά κύτταρα μυελού των οστών ασθ. με RA.

αντίστοιχες μέσες τιμές \pm SD στις διάφορες συγκεντρώσεις της rh-Epo (1, 2, 5, 20, 100, 200, 500 U/ml) κυμάνθηκαν αντίστοιχα ως ακολούθως: 0-26,5 (9,93 \pm 9,75), 3-26 (11,5 \pm 9,55), 2-30 (14,12 \pm 9,37), 2-30,5 (14,68 \pm 10,05), 7-42,5 (20,5 \pm 14,7), 5-49,5 (17,18 \pm 14,19), 3-42,5 (15,43 \pm 12,51) (Πίνακας 8, 9). Αύξηση της μέσης τιμής του αριθμού των αποικιών παρατηρήθηκε με την αύξηση της συγκέντρωσης της Epo μέχρι της συγκέντρωσης 100 U/ml και στην συνέχεια μικρή μείωση του αριθμού τους στις συγκεντρώσεις 200 και 500 U/ml. Παρά την αύξηση του αριθμού των αποικιών παράλληλα με την αύξηση της συγκέντρωσης της Epo, οι μέσες τιμές στις διάφορες συγκεντρώσεις συγκρινόμενες μεταξύ τους δεν παρουσίαζαν στατιστικά σημαντική διαφορά, ενώ αντίθετα όλες ήταν χαμηλότερες από τις αντίστοιχες των φυσιολογικών μαρτύρων με στατιστικά σημαντική διαφορά ($p < 0,001$). Η υψηλότερη τιμή των αποικιών παρατηρήθηκε για 4 ασθενείς στην συγκέντρωση rh-Epo των 100 U/ml και για τους υπόλοιπους 4 ασθενείς σε κάθε μία από τις συγκεντρώσεις 5, 20, 200 και 500 U/ml.

Η μέση τιμή της rh-Epo \pm SD στην οποία παρατηρήθηκε η μέγιστη ανάπτυξη αποικιών ήταν 138,75 \pm 158,58, χωρίς στατιστικά σημαντική διαφορά από αυτή των μαρτύρων ($p = 0,62$) (Πίνακας 10).



Οι ασθενείς με RA στο σύνολό τους είχαν καλύτερη ανταπόκριση (μεγαλύτερο αριθμό μέσων τιμών αποικιών) από αυτούς με RARS, RAEB, RAEB-T και CMML, η διαφορά αυτή όμως ήταν στατιστικά σημαντική ($p < 0,05$) μόνο σε σχέση με τους ασθενείς με RAEB, RAEB-T και CMML στις συγκεντρώσεις 5 και 20 U/ml, όπως προκύπτει από τη σύγκριση των μέσων τιμών των αποικιών στις αντίστοιχες συγκεντρώσεις gh-Epo. (Πίνακας 11).

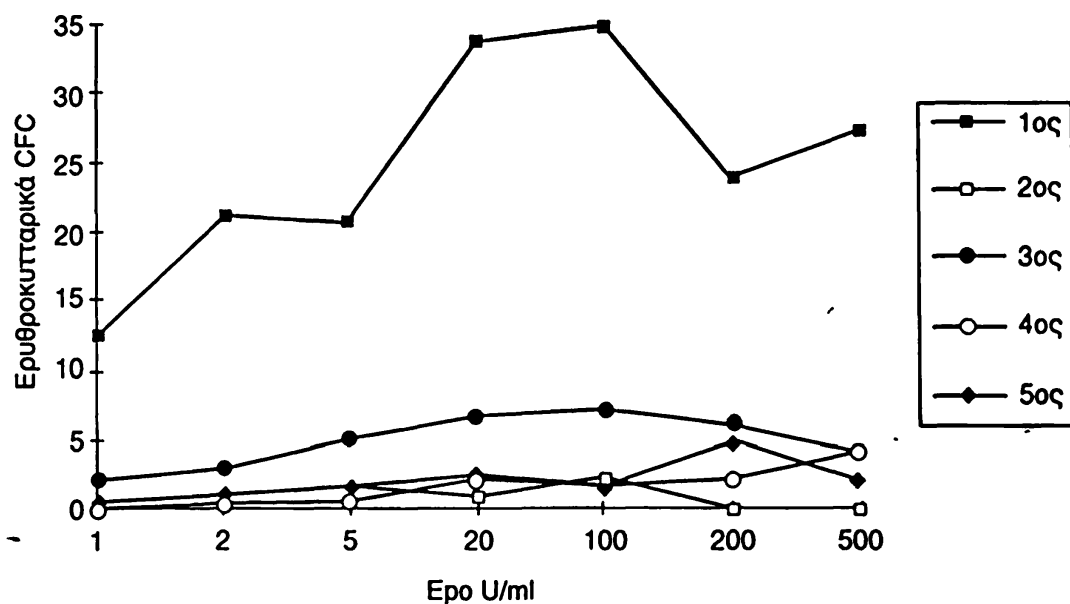
RARS: Μελετήθηκαν 5 ασθενείς με RARS (16,67%), 3 γυναίκες και 2 άνδρες, διάμεσης ηλικίας 78 ετών με διακύμανση 67-82. Ο αριθμός των CFC της ερυθράς σειράς ανά 10^4 κύτταρα και η μέση τιμή \pm SD κυμάνθηκε στις συγκεντρώσεις gh-Epo 1, 2, 5, 20, 100, 200, 500 U/ml αντίστοιχα ως εξής: 0-12,5 (3,1 \pm 5,3), 0,5-21 (5,2 \pm 8,89), 0,5-20,5 (5,8 \pm 8,39), 1-33,5 (9,1 \pm 13,79), 1,5-34,5 (9,3 \pm 14,27), 0-23,5 (7,2 \pm 9,39), 0-27 (7,4 \pm 11,08) (Σχήμα Ε). Ένας από τους 5 ασθενείς (No.9) παρουσίασε σημαντική αύξηση των αποικιών με την αύξηση της συγκέντρωσης της gh-Epo και 4 ασθενείς μικρή. Παρατηρήθηκε αύξηση των μέσων τιμών μέχρι την συγκέντρωση των 100 U/ml και στην συνέχεια μείωση. Δεν διαπιστώθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των μέσων τιμών στις διάφορες συγκεντρώσεις της gh-Epo. Αντίθετα υστερούσαν σημαντικά των αντίστοιχων μέσων τιμών των φυσιολογικών μαρτύρων ($p \leq 0,001$). Η μέγιστη τιμή αποικιών παρατηρήθηκε στην συγκέντρωση 100 U/ml για 3 από τους 5 ασθενείς και για τους

Πίνακας 11. Συσχέτιση μέσων τιμών (MT) ερυθροκυτταρικών αποικιών / 10^4 μονοπυρηνικά κύτταρα μυελού των οστών ασθ. με RA ως προς RARS, RAEB, RAEB-T, CMML.

Συγκεντρώσεις gh-Epo (U/ml)	MT \pm SD RA	p ως προς			
		RARS	RAEB	RAEB-T	CMML
1	9,93 \pm 9,75	0,1	0,03*	0,05*	0,2
2	11,5 \pm 9,55	0,2	0,01*	0,02*	0,1
5	14,12 \pm 9,37	0,1	0,005*	0,009*	0,08*
20	14,68 \pm 10,05	0,4	0,007*	0,01*	0,09*
100	20,5 \pm 14,17	0,1	0,007*	0,01*	0,1
200	17,18 \pm 14,19	0,1	0,02*	0,03*	0,1
500	15,43 \pm 12,51	0,2	0,01*	0,02*	0,1

* στατιστικά σημαντική διαφορά



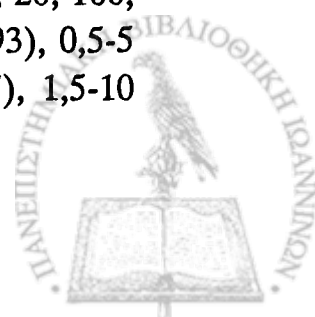


Σχήμα Ε. Ερυθροκυτταρικά CFC/10⁴ μονοπυρηνικά κύτταρα μυελού των οστών ασθ. με RARS.

υπόλοιπους 2 στις συγκεντρώσεις 200 και 500 U/ml. Η μέση τιμή συγκεντρώσεων της γh-Epo \pm SD, στις οποίες παρατηρήθηκε η μέγιστη ανταπόκριση ήταν $200 \pm 173,2$, και δεν είχε στατιστικά σημαντική διαφορά από τους μάρτυρες ($p=0,17$) (Πίνακας 10).

Κατά την σύγκριση με τα άλλα ΜΔΣ, υπολοίπων της RA, ενώ υπερεπεριεργάζονταν χωρίς καμία διαφορά να είναι στατιστικά σημαντική. (Πίνακας 12) Αν εξαιρέσουμε τον έναν από τους 5 ασθενείς (ασθ. No. 9) που παρουσίαζε πολύ καλή ανάπτυξη και ανάλογη με αυτήν των ασθενών με RA, τότε οι μέσες τιμές των υπολοίπων 4 ασθενών ($0,75 \pm 0,86$, $1,25 \pm 1,19$, $2,12 \pm 1,97$, $3 \pm 2,41$, $3 \pm 2,67$, $3,12 \pm 2,65$, $2,5 \pm 1,91$) είναι χαμηλότερες των τιμών των RA (στατιστικά σημαντική διαφορά στις συγκεντρώσεις 5-100U/ml) και RAEB (στατιστικά μη σημαντική διαφορά).

RAEB: Οι ασθενείς με RAEB ήταν 10 (33,34%), 6 γυναίκες και 4 άνδρες διάμεσης ηλικίας 64 έτη (49-75). Η ανταπόκριση ήταν ανομοιογενής, 2 ασθενείς παρουσίασαν καλή ανάπτυξη αποικιών (No. 15, 16), και οι υπόλοιποι 8 από μέτρια έως πτωχή. Ο αριθμός των CFC της ερυθράς σειράς ανά 10^4 κύτταρα που μετρήθηκαν στις συγκεντρώσεις Epo 1, 2, 5, 20, 100, 200, 500 U/ml και η μέση τιμή \pm SD ήταν αντίστοιχα 0-5 ($2,55 \pm 1,93$), 0,5-5 ($3,15 \pm 1,79$), 0-8 ($4 \pm 2,65$), 1,5-13 ($4,35 \pm 3,38$), 1,5-17,5 ($5,95 \pm 4,57$), 1,5-10

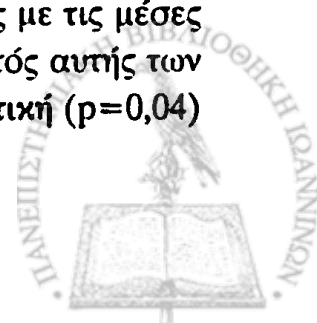


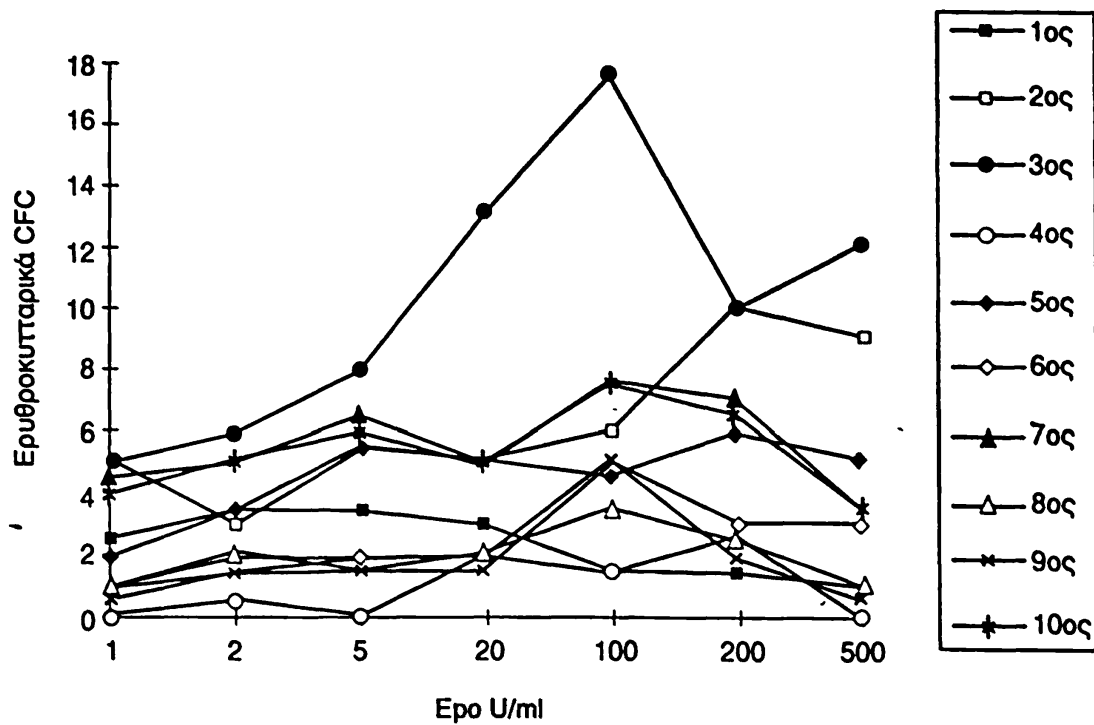
Πίνακας 12. Συσχέτιση μέσων τιμών (MT) ερυθροκυτταρικών αποικιών /10⁴ μονο-πυρηνικά χύτταρα μυελού των οστών ασθ. με RARS ως προς RAEB, RAEB-T, CMML

Συγκεντρ. rh-Epo(U/ml)	MT±SD RARS	p ως προς		
		RAEB	RAEB-T	CMML
1	3,1±5,3	0,7	0,2	0,4
2	5,2±8,89	0,4	0,2	0,4
5	5,8±8,39	0,5	0,2	0,4
20	9,1±13,79	0,3	0,2	0,4
100	9,3±14,27	0,5	0,2	0,4
200	7,2±9,39	0,5	0,1	0,4
500	7,4±11,08	0,3	0,2	0,4

(5,1±3,24), 0-12 (3,85±3,9) (Σχήμα Στ). Η μέγιστη ανάπτυξη των αποικιών παρατηρήθηκε στη συγκέντρωση 100 U/ml για 6 ασθενείς, στην συγκέντρωση 200 U/ml για 3 ασθενείς και για 1 ασθενή η ίδια μέγιστη τιμή παρατηρήθηκε σε δύο συγκεντρώσεις 2 και 5 U/ml. Η μέση τιμή συγκεντρώσεων της rh-Epo ±SD, στις οποίες παρατηρήθηκε η μέγιστη ανταπόκριση ήταν 120,2±62,82, και δεν είχε στατιστικά σημαντική διαφορά από τους μάρτυρες (p=0,76) (Πίνακας 10).

Από την σύγκριση των μέσων τιμών στις 7 διαφορετικές συγκεντρώσεις Epo παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά (p<0,05) μεταξύ των τιμών των αποικιών στις συγκεντρώσεις 100 και 200 U/ml όταν συγκρίθηκαν με την μέση τιμή των αποικιών στην συγκέντρωση 1 U/ml. Δεν παρατηρήθηκε καμία άλλη στατιστικά σημαντική διαφορά, αν και οι μέσες τιμές παρουσίαζαν αύξηση μέχρι μέγιστης τιμής στην συγκέντρωση 100 U/ml και ακολούθως μικρή μείωση. Κατά την συσχέτιση με τις άλλες υποομάδες των ΜΔΣ στις αντίστοιχες συγκεντρώσεις, οι μέσες τιμές ήταν μικρότερες αυτών των ασθενών με RA και RARS και μεγαλύτερες αυτών των ασθενών με RAEB-T και CMML (Πίνακας 13). Η διαφορά ήταν στατιστικά σημαντική (p<0,05) κατά την σύγκριση με την RA σε όλες τις συγκεντρώσεις και με την RAEB-T σε όλες εκτός από τις συγκεντρώσεις 20 και 500 U/ml. Δεν βρέθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά με τις μέσες τιμές ασθενών με RARS σε όλες τις συγκεντρώσεις και επίσης με τις μέσες τιμές των ασθενών με CMML σε όλες τις συγκεντρώσεις, εκτός αυτής των 2 U/ml, ως προς την οποία η διαφορά ήταν στατιστικά σημαντική (p=0,04)





Σχήμα ΣΤ. Ερυθροκυτταρικά CFC/10⁴ μονοπυρηνικά κύτταρα μυελού των οστών ασθ. με RAEB.

Πίνακας 13. Συσχέτιση μέσων τιμών (MT) ερυθροκυτταρικών αποικιών/10⁴ μονοπυρηνικά κύτταρα μυελού των οστών ασθ. με RAEB ως προς RAEB-T και CMML

Συγκεντρώσεις rh-Epo (U/ml)	MT±SD RAEB	p ως προς	
		RAEB-T	CMML
1	2,55±1,93	0,02*	0,1
2	3,15±1,79	0,007*	0,03*
5	4±2,65	0,01*	0,1
20	4,35±3,38	0,055	0,15
100	5,95±4,57	0,04*	0,19
200	5,1±3,24	0,01*	0,1
500	3,85±3,9	0,09	0,27

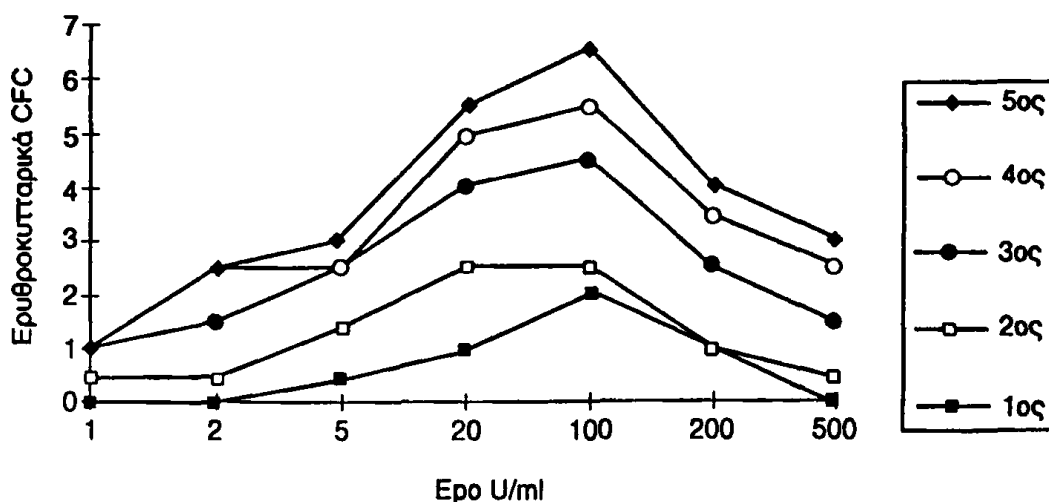
* στατιστικά σημαντική διαφορά



(Πίνακας 7). Επιπλέον οι μέσες τιμές ήταν χαμηλότερες από τις αντίστοιχες των φυσιολογικών μαρτύρων με στατιστικά σημαντική διαφορά ($p < 0,001$).

RAEB-T: Καλλιεργήθηκαν κύτταρα μυελού από 5 ασθενείς με RAEB-T (16,67%), 3 άνδρες και 2 γυναίκες, διάμεσης ηλικίας 63 έτη (61-77). Η ανάπτυξη των αποικιών της ερυθράς σειράς ήταν γενικά πτωχή και ως ακολούθως (διακύμανση, μέση τιμή \pm SD) στις συγκεντρώσεις 1, 2, 5, 20, 100, 200, 500 U/ml αντίστοιχα: 0-0,5 (0,2 \pm 0,27), 0-1 (0,5 \pm 0,5), 0-1 (0,6 \pm 0,41), 0,5-1,5 (1,1 \pm 0,42), 0,5-2 (1,3 \pm 0,67), 0-1,5 (0,8 \pm 0,57), 0,5-1 (0,6 \pm 0,41) (Σχήμα Z). Οι μέγιστες τιμές παρατηρήθηκαν στη συγκέντρωση 100 U/ml για 3 ασθενείς και 20 U/ml για έναν ασθενή, ενώ για τον τέταρτο η ίδια μέγιστη τιμή παρατηρήθηκε στις συγκεντρώσεις 2, 20, 100, 200, 500 U/ml. Η μέση τιμή συγκεντρώσεων της rh-Epo \pm SD, στις οποίες παρατηρήθηκε η μέγιστη ανταπόκριση ήταν 64,4 \pm 15,54, χωρίς στατιστικά σημαντική διαφορά από αυτήν των μαρτύρων ($p=0,21$) (Πίνακας 10).

Οι μέσες τιμές παρουσίαζαν αύξηση από την συγκέντρωση 1 έως 100 U/ml και στη συνέχεια μικρή πτώση. Συγκρινόμενες μεταξύ τους παρουσίαζαν στατιστικά σημαντική διαφορά μόνο οι τιμές στις συγκεντρώσεις 20, 100 U/ml σε σχέση με την τιμή στην συγκέντρωση 1 U/ml. Οι μέσες τιμές συγκρινόμενες με αυτές των φυσιολογικών μαρτύρων ήταν χαμηλότερες με στατιστικά σημαντική διαφορά ($p < 0,001$) (Σχήμα Γ), ενώ σε σχέση με τους άλλους υπότυπους των ΜΔΣ ήταν επίσης χαμηλότερη από τις μέσες τιμές ασθενών με RA ($p < 0,05$), RARS (μη στατιστικά σημαντική διαφο-



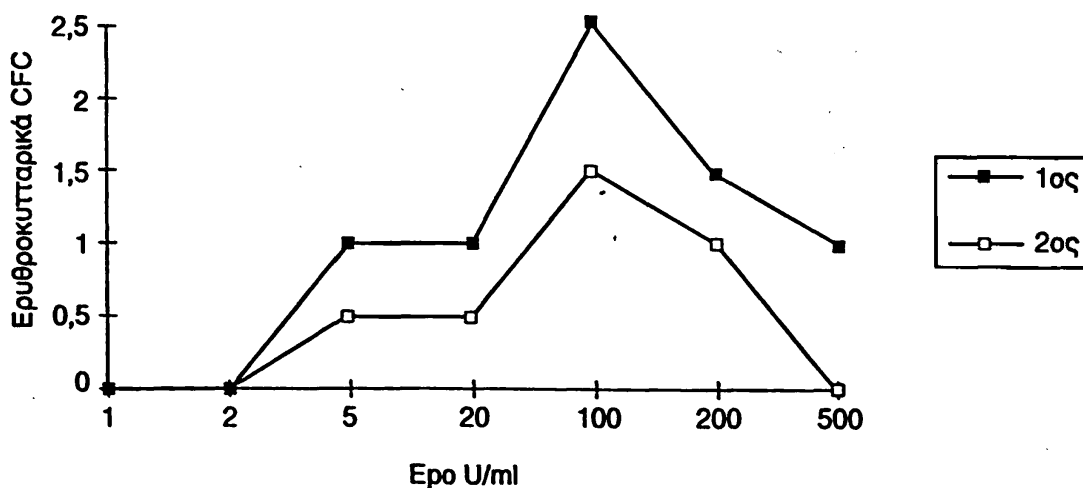
Σχήμα Z. Ερυθροκυτταρικά CFC/10⁴ μονοκλωνικά κύτταρα μυελού των οστών ασθ. με RAEB-T.



ρά), RAEB ($p < 0,05$ για όλες τις συγκεντρώσεις πλην 20 και 500 U/ml) και υψηλότερες των τιμών της CMML (στατιστικά μη σημαντική διαφορά).

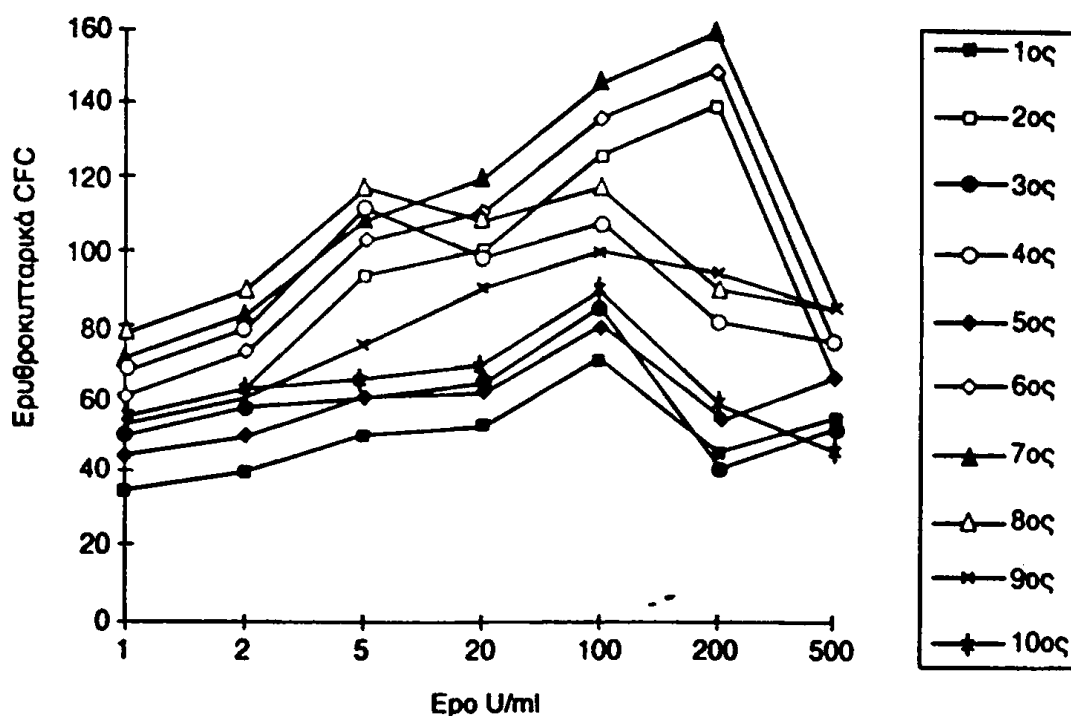
CMML: Ο αριθμός των περιστατικών που μελετήθηκαν ήταν μόνο 2 (6,67% του συνόλου), 1 άνδρας και 1 γυναίκα διάμεσης ηλικίας 72,5 (70-75). Η διακύμανση του αριθμού των αποικιών ανά 10^4 κύτταρα στις διάφορες συγκεντρώσεις th-Epo (1, 2, 5, 20, 100, 200, 500 U/ml) και οι μέσες τιμές ήταν ως ακολούθως: 0 (0-0), 0 (0-0), 0,5 (0,5-0,5), 0,5 (0,5-0,5), 1-1,5 ($1,25 \pm 0,35$), 0,5-1 ($0,75 \pm 0,35$), 0-1 ($0,5 \pm 0,7$) (Σχήμα Η). Η ανάπτυξη ήταν πτωχή, σημαντικά μικρότερη των φυσιολογικών μαρτύρων ($p < 0,05$) και όλων των άλλων υπότυπων των ΜΔΣ (στατιστικά μη σημαντική διαφορά) (Σχήμα Γ). Η μέγιστη ανάπτυξη παρατηρήθηκε στη συγκέντρωση 100 U/ml για τον ένα ασθενή και για τον δεύτερο η ίδια μέγιστη τιμή παρατηρήθηκε στις συγκεντρώσεις 100 και 500 U/ml. Η μέση τιμή στην συγκέντρωση 100 U/ml παρουσίαζε στατιστικά σημαντική διαφορά ($p < 0,05$) από την μέση τιμή στην συγκέντρωση 1 και 2 U/ml.

Φυσιολογικοί μάρτυρες: Μελετήθηκαν οι μυελοί 10 υγιών ατόμων, 5 ανδρών και 5 γυναικών. Ο αριθμός των αποικιών της ερυθράς σειράς ανά 10^4 κύτταρα και οι μέσες τιμές \pm SD στις συγκεντρώσεις 1, 2, 5, 20, 100, 200, 500 U/ml ήταν αντίστοιχα 35-77 ($56,15 \pm 12,63$), 40-89 ($65,4 \pm 15,09$), 50-117 ($84,25 \pm 4,97$), 52-120 ($87,3 \pm 23,71$), 70-146 ($105,75 \pm 25,23$), 41-160 ($91,5 \pm 44,34$), 46-86 ($69,15 \pm 14,64$) (Σχήμα Θ). Οι μέγιστες τιμές των αποικιών παρατηρήθηκαν στην συγκέντρωση 100 U/ml για 6 μάρτυρες, στη συ-



Σχήμα Η. Ερυθροκυτταρικά CFC/ 5×10^4 μονοπυρηνικά κύτταρα μυελού των οστών ασθ. με CMML.





Σχήμα 9. Ερυθροκυτταρικά CFC/10⁴ μονοπυρηνικά κύτταρα μυελού των οστών φυσιολογικών μαρτύρων.

γκέντρωση 200 U/ml για 3 μάρτυρες και στη συγκέντρωση 5 U/ml για 1 μάρτυρα. Η μέση τιμή συγκεντρώσεων της rh-Epo \pm SD, στις οποίες παρατηρήθηκε η μέγιστη ανταπόκριση ήταν $111 \pm 72,14$, χωρίς στατιστικά σημαντική διαφορά από αυτήν των ασθενών με ΜΔΣ σαν σύνολο και κάθε υπότυπου χωριστά.

Οι μέσες τιμές παρουσίαζαν προοδευτική αύξηση έως την συγκέντρωση 100 U/ml και στη συνέχεια μείωση. Συγκρινόμενες μεταξύ τους στατιστικά σημαντική διαφορά παρουσίαζαν οι τιμές στις συγκεντρώσεις 5, 20, 100, 200, 500 U/ml όταν συγκρίνονταν με την τιμή στην συγκέντρωση 1 U/ml (p : 0,005, 0,002, <0,001, 0,03, 0,04 αντίστοιχα), οι τιμές στις συγκεντρώσεις 20, 100 U/ml, όταν συγκρίνονταν με την τιμή στην συγκέντρωση 2 U/ml (p : 0,02, 0,0004) και η τιμή στη συγκέντρωση 500 U/ml όταν συγκρίνονταν με την τιμή στην συγκέντρωση 100 U/ml (p =0,0009). Σε όλες τις άλλες συσχετίσεις η διαφορά δεν ήταν στατιστικά σημαντική.

5. Διερεύνηση της σχέσης αιμοσφαιρίνης και *in vitro* ανταπόκρισης στην *rh-Epo*

Εξετάστηκε αν υπάρχει συσχέτιση της αιμοσφαιρίνης (Hb σε gr/dl) πρώτον με τον μέγιστο αριθμό αποικιών που ανέπτυξε κάθε ασθενής υπό την επίδραση της *Epo* και δεύτερον με τον αριθμό των αποικιών στην συγκέντρωση *Epo* 100 U/ml. Χρησιμοποιήθηκε ο συντελεστής συσχέτισης κατά τάξεις του Spearman. Διαπιστώθηκε στατιστικά σημαντική, θετική συσχέτιση και στις δύο συγκρίσεις ($r_s=0,891$, $p<0,01$ και $r_s=0,862$, $p<0,01$ αντίστοιχα).

6. Διερεύνηση συσχέτισης της *in vitro* ανταπόκρισης στην *rh-Epo* με το φύλο του ασθενούς

Από τους 9 ασθενείς που ανταποκρίθηκαν ικανοποιητικά *in vitro* στην *rh-Epo* 4 ήταν γυναίκες (44,4%) και 5 άνδρες (55,5%). Στο σύνολο των ασθενών απάντησαν 4 από τις 15 γυναίκες (26,6%) και 5 από τους 15 άνδρες (33,3%). Παρατηρείται μία ελαφρά υπεροχή των ανδρών στην *in vitro* ανταπόκριση στην *rh-Epo*, στατιστικά μη σημαντική ($p=0,37$).

7. Ανταπόκριση στην *in vivo* χορήγηση *rh-Epo*

Υποβλήθηκαν σε θεραπεία με *rh-Epo* (150 U/kg βάρους σώματος 3 φορές την εβδομάδα υποδόρια για δύο μήνες) 27 ασθενείς. Ανταποκρίθηκαν συνολικά 7 από τους 27 ασθενείς (25,9%), αναλυτικά 3 από τους 8 ασθενείς με RA (No. ασθ. 1, 6, 8), 1 από τους 4 με RARS (No. ασθ. 12) και 3 από τους 10 με RAEB (No. 18, 19, 21) και κανείς από τους ασθενείς με RAEB-T ή CMML. Τα ποσοστά ανταπόκρισης ήταν για την RA, RARS και RAEB 37,5%, 25%, 30% αντίστοιχα.

Δεν αναφέρθηκαν ανεπιθύμητες ενέργειες του φαρμάκου, όπως θρόμβωση, υπέρταση, σπασμοί, σπληνομεγαλία και δεν παρατηρήθηκε μεταβολή του αριθμού λευκοκυττάρων και αιμοπεταλίων.

8. Διερεύνηση συσχέτισης *in vivo-in vitro* ανταπόκρισης

Από το σύνολο των 30 ασθενών που μελετήθηκαν 9 ασθενείς παρουσίασαν ικανοποιητική ανάπτυξη αποικιών. Από αυτούς 6 είχαν RA (ασθ. No 1, 2, 3, 5, 7, 8), 1 RARS (ασθ. No 9) και 2 RAEB (ασθ. No 15, 16). Οκτώ (8) από τους 9 ασθενείς υποβλήθηκαν σε θεραπεία με *rh-Epo* και ανταποκρίθηκαν οι 2 (25%). Από τους υπόλοιπους 21 ασθενείς με μικρή ανάπτυξη αποικιών 19 ασθενείς έλαβαν θεραπεία και ανταποκρίθηκαν οι 5



(26,3%). Δεν παρατηρείται επομένως διαφορά στην ανταπόκριση στην *in vivo* χορήγηση *rh-Epo* μεταξύ αυτών που ανταποκρίνονται καλά και αυτών που ανταποκρίνονται πτωχά στην *in vitro* επίδραση του φαρμάκου. Επομένως δεν φαίνεται να υπάρχει συσχέτιση μεταξύ *in vivo* και *in vitro* ανταπόκρισης.



ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στην παρούσα μελέτη εξετάστηκε η ανάπτυξη αποικιών ερυθράς σειράς, CFU-E και BFU-E, σε ημίρρευστες καλλιέργειες μυελού 30 ασθενών με ΜΔΣ (RA:8, RARS:5, RAEB:10, RAEB-T:5 και CMML:2), σε αυξανόμενες δόσεις ανασυνδυασμένης ανθρώπινης Ερυθροποιητίνης (rh-Epo) 1, 2, 5, 20, 100, 200, 500 U/ml. Οι συγκεντρώσεις 1 και 2 U/ml είναι οι συγκεντρώσεις που είναι απαραίτητες για την ανάπτυξη της ερυθράς σειράς στις ημίρρευστες ή βραχείας διάρκειας κυτταρικές καλλιέργειες (short term). Οι υπόλοιπες συγκεντρώσεις επιλέχθηκαν με βάση την διεθνή βιβλιογραφία. Τα αποτελέσματα συγκρίθηκαν με ανάλογες καλλιέργειες μυελού 10 φυσιολογικών ατόμων στις ίδιες συγκεντρώσεις rh-Epo. Επίσης σε 27 από τους 30 ασθενείς χορηγήθηκε rh-Epo σε δόση 150 U/kg βάρους σώματος, τρεις φορές την εβδομάδα, υποδόρια για 2 μήνες και ελέγχθηκε η ανταπόκρισή τους.

Είναι γνωστό από προηγηθείσες μελέτες ότι στους περισσότερους ασθενείς με ΜΔΣ παρατηρείται πτωχή ή και απουσία ανάπτυξης αποικιών κατά την καλλιέργεια αιμοποιητικών προγονικών κυττάρων μυελού ή περιφερικού αίματος, συμπεριλαμβανομένων τόσο των πολυδύναμων κύτταρων, όσο και των δεσμευμένων στην μυελική, ερυθρά ή μεγακαρουκυτταρική σειρά²⁵⁹⁻²⁷⁰. Όσον αφορά την ερυθρά σειρά, η παρατηρούμενη ελαττωμένη ανάπτυξη μπορεί να οφείλεται είτε σε μείωση του αριθμού των δεσμευμένων προγονικών κυττάρων της ερυθράς σειράς γενικά ή/και σε διαταραχή του πολλαπλασιασμού και της διαφοροποίησής τους²⁷¹. Οι Sawada και συν.²⁷² παρατήρησαν ότι τα CD34+ κύτταρα στα ΜΔΣ είναι δεσμευμένα στην μη ερυθρά σειρά, γεγονός που εξηγεί την χαμηλή έως μηδενική ανάπτυξη αποικιών της ερυθράς σειράς από τα μυελοδυσπλαστικά προγονικά κύτταρα. Επίσης έχει αναφερθεί ότι στα ΜΔΣ τα βλαστικά κύτταρα (ώρα πολυδύναμα προγονικά κύτταρα, που έχουν ικανότητα αυτοανανέωσης και ανάπτυξης πολλαπλών αιμοποιητικών σειρών), όταν επανακαλ-



λιεργήθηκαν σε δευτερογενείς καλλιέργειες, παρουσίαζαν μειωμένη ικανότητα να δίνουν γένεση σε ερυθρά προγονικά κύτταρα BFU-E σε αντίθεση με τους φυσιολογικούς μάρτυρες²⁷³. Ο Brada και συν.²⁷⁴ έδειξαν με τα αποτελέσματα της έρευνάς τους ότι σε ένα υποπληθυσμό ασθενών με ΜΔΣ η διαταραχή στην ερυθροποίηση εντοπίζεται σε ένα πρώιμο στάδιο της ερυθροκυτταρικής διαφοροποίησης και σχετίζεται με την παραμυή της έκφρασης του CD34 αντιγόνου και σε μερικές περιπτώσεις με την έκφραση του Eni-1 γονιδίου, που θεωρείται ότι σχετίζεται με διαταραχή της διαφοροποίησης της ερυθράς και της μυελικής σειράς.

Ένας επιπρόσθετος λόγος που συμβάλλει στην μειωμένη ανάπτυξη αποικιών ερυθράς σειράς είναι το γεγονός ότι η ανταπόκριση στους αυξητικούς παράγοντες (rh-Epo, G-CSF, GM-CSF) δεν είναι η αναμενόμενη στα ΜΔΣ²⁷⁵⁻²⁷⁸. Η φυσιολογία της μειωμένης απάντησης στην Epo παραμένει αδιευκρίνιστη και πιθανά οφείλεται σε μειωμένο αριθμό υποδοχέων, μειωμένη χημική συγγένεια του υποδοχέα ή διαταραχή στην μετάδοση του μηνύματος²⁷⁹. Οι Mittelman και συν.²⁸⁰ δεν διαπίστωσαν διαταραχή του γονιδίου του υποδοχέα της Epo στους ασθενείς με RARS. Παράλληλα οι Blackx και συν.²⁸¹ απέδειξαν ότι δεν υπήρχε ποσοτική διαταραχή των υποδοχέων της Epo. Οι ίδιοι πρότειναν ότι η καταστολή της ερυθροκυτταρικής ανταπόκρισης πιθανά προκαλείται από διαταραχή στην μετάδοση του μηνύματος μετά την σύνδεση με την Epo, λόγω λειτουργικής διαταραχής είτε του ίδιου του υποδοχέα ή κάποιου άλλου παράγοντα στο επίπεδο μεταβίβασης του μηνύματος κάτωθεν του υποδοχέα. Υπέρ του τελευταίου είναι και η παρατήρηση των Hoefsloot και συν.²⁸², οι οποίοι εξέτασαν 15 δείγματα ασθενών με ΜΔΣ και διαπίστωσαν ότι η ενεργοποίηση του STAT5, που αποτελεί σημαντικό διαβιβαστή (transducer) του μηνύματος και ενεργοποιητή της μεταγραφής (transcription), είναι σημαντικά μειωμένη έως μηδενική μετά από διέγερση με rh-Epo. Τελευταία αποδείχθηκε ότι στην διαταραχή του πολλαπλασιασμού των προγονικών κυττάρων της ερυθράς σειράς συμβάλλει και η αυξημένη έκφραση του Fas/CD95, ενός διαμεμβρανικού μεσολαβητή (mediator) του αποπτωτικού κυτταρικού θανάτου στον υποπληθυσμό των κυττάρων που είναι θετικά στην γλυκοφορίνη A+²⁸³. Ο ρόλος των διαλυτών αναστολέων της ερυθροποίησης (TNF-α, TGF-β, ιντερφερόνες) χρήζει γενικά περαιτέρω διευκρίνισης, αλλά έχει αποδειχθεί ότι ο TNF-α είναι αυξημένος σε μερικούς ασθενείς με ΜΔΣ και αντιστρόφως ανάλογος με την τιμή της αιμοσφαιρίνης³⁶.

Σε συμφωνία με την διεθνή βιβλιογραφία και στην παρούσα μελέτη



διαπιστώθηκε μειωμένη ανάπτυξη αποικιών ερυθράς σειράς, όταν καλλιεργήθηκαν κύτταρα μυελού 30 ατόμων με ΜΔΣ (15 άνδρες και 15 γυναίκες), σε διάφορες συγκεντρώσεις Ερυθροποιητίνης. Η ανταπόκριση στην Ερο ήταν ανομοιογενής όχι μόνο μεταξύ των διαφόρων υποτύπων, αλλά και μεταξύ των ασθενών του ίδιου υπότυπου πιθανά λόγω ύπαρξης ετερογενούς πληθυσμού κυττάρων της ερυθράς σειράς με μεγάλη ποικιλία ανωμαλιών^{284,285} και επιπλέον γιατί πολλαπλοί παράγοντες ίσως παίζουν ρόλο για την ανάπτυξη των αποικιών.

Στις συγκεντρώσεις Ερο (1 και 2 U/ml), που συνήθως χρησιμοποιούνται στις καλλιέργειες, 26,67% και 13,34% των ασθενών αντίστοιχα, δεν ανέπτυξαν καμία αποικία. Οι υπόλοιποι ασθενείς ανέπτυξαν αποικίες, λιγότερες όμως των αντιστοίχων της ομάδος ελέγχου.

Από την σύγκριση των μέσων τιμών των αποικιών του συνόλου των ασθενών με ΜΔΣ, με τους φυσιολογικούς μάρτυρες, χωριστά για κάθε συγκέντρωση Ερο, διαπιστώθηκε ότι οι ασθενείς με ΜΔΣ υπολείπονταν των φυσιολογικών ατόμων με στατιστικά έντονα σημαντική διαφορά ($p \leq 0,001$). Επίσης συγκρίθηκαν οι μέσες τιμές των αποικιών κάθε υπότυπου (RA, RARS, RAEB, RAEB-T, CMML) χωριστά με τους φυσιολογικούς μάρτυρες στις αντίστοιχες συγκεντρώσεις και βρέθηκε μικρότερη ανάπτυξη των ασθενών του κάθε υπότυπου με στατιστικά σημαντική διαφορά ($p < 0,05$).

Παρατηρήθηκε επίσης αναστροφή της σχέσης ώριμων προς πρόιμα προγονικά κύτταρα της ερυθράς σειράς. Ενώ στους φυσιολογικούς μάρτυρες υπερερούσαν τα BFU-E των CFU-E, στους ασθενείς η σχέση τους αναστρέφονταν και η πλειονότης των αποικιών ήταν CFU-E. Είναι πιθανόν επομένως στην αναιμία των ΜΔΣ να συμμετέχει και η μειωμένη παραγωγή BFU-E από τα πιο άωρα προγονικά κύτταρα²⁸⁶. Η αναστροφή στην αναλογία πρόιμων προς ώριμα προγονικά κύτταρα δείχνει πιθανή διαταραχή στην διεργασία ωρίμανσης αωρότερων προγονικών κυττάρων του μυελού κατά την ερυθροποίηση στα ΜΔΣ. Ανάλογα ήταν και τα ευρήματα των Flores-Figueira και συν.⁴⁴ που επίσης μέτρησαν τον αριθμό των ερυθροκυτταρικών προγονικών κυττάρων (CFC) BFU-E και CFU-E την 14-17 ημέρα της καλλιέργειας και διαπίστωσαν ότι στους ασθενείς με ΜΔΣ >66% των αποικιών ήταν CFU-E, ενώ στα φυσιολογικά άτομα τα BFU-E ήταν >60%.

Από την βιβλιογραφία είναι γνωστό ότι η ανεπιτυχής ερυθροποίηση στα ΜΔΣ δεν είναι αποτέλεσμα έλλειψης Ερο, εφόσον αρκετοί ασθενείς με ΜΔΣ έχουν φυσιολογικά ή αυξημένα επίπεδα Ερυθροποιητίνης στον



ορό (s-Epo)²⁸⁷, αν και παρατηρείται μεγάλη διακύμανση της για την ίδια τιμή της αιμοσφαιρίνης μεταξύ των διαφόρων ασθενών^{16,288,289}. Πιθανολογείται παρ' αυτά ότι οι υψηλές φαρμακολογικές δόσεις της gh-Epo θα μπορούσαν να ξεπεράσουν το εμπόδιο (block) στην ωρίμανση των προγονικών κυττάρων της ερυθράς σειράς και να οδηγήσουν στην διέγερση της ερυθροποίησης²⁹⁰. Δεν έχει διερευνηθεί αν η Epo διεγείρει τον καταπιεσμένο φυσιολογικό κλώνο της ερυθράς σειράς, που εξακολουθεί να υπάρχει στον μυελό, ή αν προκαλεί διαφοροποίηση του ανώμαλου κλώνου. Οι Isnard και συν.²⁸⁴ αναφέρουν σε μία έρευνά τους ότι οι αλλαγές που παρατήρησαν στο μυελό και στο περιφερικό αίμα είναι περισσότερο ενδεικτικές για ενεργοποίηση του ανώμαλου κλώνου.

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν αυξανόμενες δόσεις Epo στις καλλιέργειες για την ανάπτυξη αποικιών-ερυθράς σειράς, με στόχο να διερευνηθεί πρώτον αν η αύξηση της δόσης προκαλούσε αύξηση της ανταπόκρισης και δεύτερον αν οι πολύ μεγάλες συγκεντρώσεις προκαλούσαν αναστολή της ανάπτυξης.

Παρατηρήθηκε αρχικά ότι ασθενείς που δεν παρουσίαζαν καμία ανάπτυξη αποικιών στην συγκέντρωση Epo 1-2 U/ml με την αύξηση της συγκέντρωσης ανέπτυξαν μικρό αριθμό αποικιών ($1-7,5 / 10^4$ μονοπυρηνικά κύτταρα). Είναι πιθανόν επομένως ασθενείς που εμφανίζουν ανθεκτικότητα, δηλαδή καμία ανταπόκριση στην gh-Epo in vivo, να ανταποκριθούν με την αύξηση της δόσης. Η υπόθεση αυτή επιβεβαιώνεται στην βιβλιογραφία, όπου αναφέρεται ότι υψηλές φαρμακολογικές δόσεις gh-Epo ήταν αποτελεσματικές σε ασθενείς, που αρχικά δεν είχαν ανταποκριθεί σε μικρότερες δόσεις²⁹¹⁻²⁹³.

Η αύξηση της συγκέντρωσης της gh-Epo είχε σαν αποτέλεσμα αύξηση του μέσου αριθμού των αποικιών μέχρι την συγκέντρωση 100 U/ml, στην οποία παρατηρήθηκε η μέγιστη ανάπτυξη. Περαιτέρω αύξηση της συγκέντρωσης δεν προκάλεσε αύξηση του αριθμού των αποικιών, αλλά αντίθετα μικρή μείωσή του. Στατιστικά σημαντική διαφορά παρουσίαζε μόνο η μέση τιμή της συγκέντρωσης 100 U/ml συγκρινόμενη με την μέση τιμή στην συγκέντρωση 1 U/ml. Ανάλογα αποτελέσματα διαπιστώθηκαν και για τους φυσιολογικούς μάρτυρες. Σε κανέναν ασθενή, πλην ενός (No 8, μόνο στην συγκέντρωση 200 U/ml), ο αριθμός των αποικιών δεν έφθασε τα επίπεδα των τιμών των φυσιολογικών μαρτύρων. Επομένως η gh-Epo παρά τις υψηλές συγκεντρώσεις δεν αποκατέστησε την φυσιολογική ερυθροποίηση στους ασθενείς με ΜΔΣ. Οι μέσες τιμές συγκεντρώσεων gh-Epo στις οποί-



ες παρατηρήθηκαν οι μέγιστοι αριθμοί αποικιών των 4 πρώτων υποτύπων, καθώς και του συνόλου των ασθενών με ΜΔΣ δεν διέφεραν στατιστικά από την αντίστοιχη τιμή των φυσιολογικών μαρτύρων.

Ανάλογα είναι και τα ευρήματα στην βιβλιογραφία. Στην μελέτη του Aoki και συν.²⁹⁴ παρατηρήθηκε plateau του αριθμού των αποικιών CFU-E στην συγκέντρωση 20-100 U/ml και καμία περαιτέρω αύξηση όταν η δόση της Epo αυξανόταν έως 200, 500 U/ml. Πιθανά οι υποδοχείς της Epo στα προγονικά κύτταρα της ερυθράς σειράς έχουν πλήρως κορεστεί από τις 100 U της Epo και έτσι η περαιτέρω αύξηση της Epo δεν οδηγεί σε αυξημένη ανταπόκριση. Αυτή η παρατήρηση θα μπορούσε να σημαίνει ότι στην κλινική πράξη δεν είναι απαραίτητες υπερβολικές δόσεις Ερυθροποιητίνης. Αναφέρεται πράγματι στην βιβλιογραφία έλλειψη συσχέτισης της ανταπόκρισης με την δόση του φαρμάκου. Μάλιστα καλύτερα αποτελέσματα επιτεύχθηκαν με τις χαμηλότερες δόσεις^{295,296}.

Οι Goy συν.²⁹⁷ αναφέρουν πτωχή ανάπτυξη αποικιών CFU-E στην δόση Epo 2 U/ml και μικρή αύξηση του αριθμού των αποικιών, όταν η συγκέντρωση της Epo αυξάνονταν έως την δόση 400 U/ml, στους 3 μόνο από τους 16 ασθενείς (18,75%). Η χορήγηση in vivo μεγάλων δόσεων Epo (100.000 IU δύο φορές την εβδομάδα ενδοφλέβια) δεν οδήγησε σε μεγαλύτερη ανταπόκριση απ' ότι η συνήθως χορηγούμενη χαμηλότερη δόση, γιατί πιθανά η ανταπόκριση στην μικρότερη αυτή δόση αντιπροσωπεύει την μέγιστη δυνατή απάντηση στην rHu-Epo σ' αυτήν την κατηγορία των ασθενών. Το τελευταίο εύρημα μπορεί να θεωρηθεί ανάλογο με τα in vitro ευρήματα της φάσης plateau.

Η αύξηση της συγκέντρωσης της Epo από 1 έως 20 U/ml στην μελέτη του Isnard²⁸⁴ οδήγησε σε αύξηση του αριθμού των αποικιών της ερυθράς σειράς 0,5 έως 15 φορές σε 8 από τους 15 ασθενείς (53,3%) μεταξύ των δόσεων 1 και 5 U/ml. Το αποτέλεσμα αυτό της αύξησης ποικίλει από ασθενή σε ασθενή.

Οι Merchav και συν.²⁷⁵ αναφέρουν ότι το 50% της μέγιστης ανάπτυξης των CFU-E και BFU-E στα ΜΔΣ παρατηρήθηκε σε 4 φορές υψηλότερη συγκέντρωση Epo από την απαιτούμενη για τα προγονικά κύτταρα της ομάδος ελέγχου. Αντίθετα με τα δικά μας ευρήματα, ενώ και αυτοί παρατήρησαν φάση plateau στην ανάπτυξη των αποικιών, η περαιτέρω αύξηση της συγκέντρωσης της Epo μέχρι 1000 U/ml μετά τον κορεσμό δεν προκάλεσε αναστολή της ανάπτυξης.

Λόγω της ανομοιογένειας των αποτελεσμάτων, ακόμη και σε ασθενέ-



νείς της ίδιας υποομάδος, συγκρίθηκαν οι μέσες τιμές των αποικιών των ασθενών του κάθε κατά FAB υπότυπου, σε κάθε συγκέντρωση χωριστά. Καλύτερη ανάπτυξη παρουσίαζαν οι ασθενείς με RA σε όλες τις συγκεκριμένες, η διαφορά όμως ήταν στατιστικά σημαντική μόνο σε σχέση με τους ασθενείς με RAEB και RAEB-T και όχι με αυτούς με RARS ή CMML.

Η ανταπόκριση των ασθενών με RARS ήταν μεγαλύτερη αυτής των RAEB και RAEB-T, όχι όμως στατιστικά σημαντική. Ενδιαφέρον είναι το γεγονός ότι από τους 5 ασθενείς με RARS που μελετήθηκαν, ο ένας (No. 9) παρουσίασε πολύ καλή ανταπόκριση ανάλογη αυτής των ασθενών με RA, ενώ οι υπόλοιποι 4 ασθενείς παρουσίασαν πτωχή ανάπτυξη. Μάλιστα οι μέσες τιμές των τελευταίων 4 ασθενών ήταν μικρότερες αυτών με RA (στατιστικά σημαντική διαφορά) και επίσης αυτών με RAEB (μη στατιστικά σημαντική διαφορά), μεγαλύτερες όμως αυτών με RAEB-T. Πιθανά επομένως να υπάρχει μία υποομάδα ασθενών με RARS που εμφανίζουν καλή ανταπόκριση στην gh-Epo. Η υπόθεση αυτή έρχεται σε συμφωνία με τα *in vivo* συμπεράσματα της μετά-ανάλυσης της Hellstrom-Lindberg^{29b}, στην οποία αναφέρεται ότι ενώ γενικά οι ασθενείς με RARS έχουν πτωχή ανταπόκριση στην θεραπεία με gh-Epo έναντι αυτών με RA, RAEB, αναγνωρίζεται μία υποομάδα ασθενών με RARS που εμφανίζει ικανοποιητική απάντηση.

Οι ασθενείς με RAEB υπερτερούσαν των ασθενών με RAEB-T, με στατιστικά σημαντική διαφορά σε όλες τις συγκεντρώσεις πλην 20 και 500 U/ml.

Στην μελέτη του Aoki²⁴ σχετικά καλή ανταπόκριση στην gh-Epo *in vitro* είχαν οι ασθενείς με RA και RARS και πτωχή αυτοί με RAEB και RAEB-T. Η καλύτερη ανταπόκριση των ασθενών με RA και RARS έναντι των υπολοίπων υποτύπων ίσως εξηγείται από την υπόθεση των Blackx και συν.^{29a} ότι κατά την εξέλιξη από τα χαμηλού κινδύνου ΜΔΣ (RA, RARS) στα υψηλού κινδύνου ΜΔΣ (RAEB, RAEB-T, CMML) τα ερυθρά προγονικά κύτταρα χάνουν την ικανότητα ανταπόκρισης τόσο στην Epo όσο και στον SCF.

Οι ασθενείς με CMML υπολοίπων όλων, αλλά ο αριθμός των ασθενών ήταν πολύ μικρός για να εξαχθούν ασφαλή συμπεράσματα. Ανάλογα στην βιβλιογραφία αναφέρεται εξαιρετικά μεγάλη ελάττωση ή και απουσία των αποικιών ερυθράς σειράς σε ασθενείς με CMML^{44,299,300}.

Σε αρκετές μελέτες έχει διερευνηθεί η σχέση της ανάπτυξης των αποικιών ερυθράς σειράς στα ΜΔΣ με την αιμοσφαιρίνη (Hb) των ασθενών



νών. Οι Masters και συν.²⁹⁹ διαπίστωσαν θετική συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων αιμοσφαιρίνης και του συνολικού αριθμού των αποικιών της ερυθράς σειράς υπό την επίδραση μόνο Epo καθώς και συνδυασμού Epo και SCF (Stem cell factor). Επίσης οι Piacibello και συν.³⁰¹ ανέφεραν σημαντική συσχέτιση μεταξύ της αύξησης του αριθμού των BFU-E υπό την επίδραση Epo και SCF και του επιπέδου της αιμοσφαιρίνης στους ασθενείς τους με ΜΔΣ. Σχετικά είναι και τα αποτελέσματα της έρευνας των Brada και συν.²⁷⁴ που έδειξαν ότι η εξάρτηση από τις μεταγγίσεις συχνά σχετίζεται με διαταραχή της διαφοροποίησης της ερυθράς σειράς *in vitro*.

Ανάλογα με τα παραπάνω βιβλιογραφικά δεδομένα ήταν και τα συμπεράσματα στην παρούσα μελέτη. Συγκρίναμε χρησιμοποιώντας τον συντελεστή συσχέτισης κατά τάξεις του Spearman, την αιμοσφαιρίνη του ασθενούς αφενός με τον μέγιστο αριθμό των αποικιών της ερυθράς σειράς που ανέπτυξε υπό την επίδραση Epo και αφετέρου με τον αριθμό των αποικιών στην συγκέντρωση 100 U/ml. Κατ' αναλογία με τους προαναφερθέντες ερευνητές διαπιστώσαμε έντονα θετική συσχέτιση, δηλαδή οι ασθενείς με τις υψηλότερες τιμές αιμοσφαιρίνης παρουσίαζαν και τον μεγαλύτερο αριθμό CFU-E+BFU-E και στις δύο συγκρίσεις. Η καλή ανάπτυξη ερυθροκυτταρικών αποικιών πιθανά δείχνει τον βαθμό στον οποίο η ερυθροποίηση παραμένει ακέραιη σ' αυτούς τους ασθενείς. Οι ασθενείς με ΜΔΣ που έχουν ήπια αναιμία και επομένως διατηρούν κάποιον βαθμό φυσιολογικής ερυθροποίησης είναι αυτοί έχουν και τις περισσότερες πιθανότητες να απαντήσουν στη ερυθροποιητίνη. Αντίθετα οι ασθενείς που έχουν σοβαρότερη αναιμία και κατά συνέπεια και ανάγκη μεταγγίσεων έχουν λιγότερες πιθανότητες να ανταποκριθούν, ίσως γιατί η ωρίμανση των κυττάρων είναι πιο ελαττωματική ή γιατί υπάρχουν λιγότερα κύτταρα ευαίσθητα στην Epo.

Αντίστοιχα στην κλινική πράξη πολλές μελέτες αναφέρουν ότι οι ασθενείς με ΜΔΣ ανταποκρίνονται καλύτερα στην θεραπεία με Epo, όταν η αιμοσφαιρίνη είναι υψηλότερη ή δεν έχουν ανάγκη μεταγγίσεων. Στην μετά-ανάλυση της Hellstrom-Lindeberg²⁹⁶ για την αποτελεσματικότητα της χορήγησης Epo στα ΜΔΣ αποδείχθηκε ότι ένας από τους καλούς προγνωστικούς δείκτες ανταπόκρισης στην θεραπεία με rh-Epo ήταν η έλλειψη ανάγκης για μετάγγιση.

Παράλληλα διερευνήθηκε αν υπήρχε κάποια σχέση ανάπτυξης ερυθροκυτταρικών αποικιών και φύλου. Δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση ($p=0,37$), αν και υπήρχε μία μικρή υπεροχή των ανδρών



μεταξύ των ασθενών με καλή ανάπτυξη αποικιών.

Σύμφωνα με την βιβλιογραφία η αποτελεσματικότητα της χορήγησης γΗ-Ερο είναι γενικά μικρή, το κόστος υψηλό και κατά συνέπεια η σχέση κόστους /ωφέλειας πολύ υψηλή. Επομένως είναι αναγκαίο να αναγνωριστούν ομάδες ασθενών με αποδεκτή ανταπόκριση. Καλοί προγνωστικοί δείκτες μέχρι τώρα θεωρούνται η έλλειψη ανάγκης για μετάγγιση, χαμηλή ερυθροποιητίνη ορού, υποομάδα FAB (ώλη πλην RARS). Οι παράγοντες αυτοί συνδυάστηκαν σε ένα μοντέλο που παρέχει πληροφορίες για την πιθανότητα ανταπόκρισης σε διάφορες ομάδες ασθενών με ΜΔΣ²⁹⁶. Στην παρούσα μελέτη εξετάσαμε αν η ανάπτυξη in vitro αποικιών ερυθράς σειράς θα μπορούσε να αποτελέσει ακόμη ένα προγνωστικό δείκτη.

Από την βιβλιογραφία οι Goy και συν.²⁹⁷ αναφέρουν ότι δεν διαπίστωσαν συσχέτιση μεταξύ της in vitro ανταπόκρισης των προγονικών κυττάρων της ερυθράς σειράς (CFU-E) σε αυξανόμενες δόσεις Ερο (0,5 έως 400 U/ml) και της in vivo ανταπόκρισης στην ενδοφλέβια χορήγηση γHu-Ερο. Αναλυτικά 3 από τους 16 ασθενείς με ΜΔΣ που παρουσίασαν αύξηση των αποικιών τους in vitro δεν ανταποκρίθηκαν καθόλου in vivo. Οι Isnard και συν.²⁸⁴ επίσης δεν βρήκαν σημαντική στατιστικά συσχέτιση της in vivo με την in vitro ανταπόκριση στην Ερο. Υπέθεσαν ως αιτία για αυτό το απογοητευτικό αποτέλεσμα είτε ότι η δράση της Ερο ασκείται in vivo σε ένα μεταγενέστερο στάδιο διαφοροποίησης, είτε ότι η in vivo ανταπόκριση είναι εξαρτώμενη από μία συνεχή διέγερση της ερυθράς σειράς για μεγάλο χρονικό διάστημα. Επίσης οι Schouten και συν δεν βρήκαν καμία συσχέτιση των in vitro καλλιιεργειών και της in vivo ανταπόκρισης³⁰².

Αντίθετα με τα παραπάνω είναι τα ευρήματα των Bowen και συν (BJH 1991)³⁰³ και Greenberg (1992)²⁸⁶, οι οποίοι αναφέρουν ότι η πιθανότητα ανταπόκρισης των ασθενών στην θεραπεία με γΗ-Ερο είναι υψηλότερη όταν έχουν καλή in vitro ανάπτυξη ερυθροκυτταρικών προγονικών κυττάρων.

Στην παρούσα μελέτη δεν διαπιστώθηκε συσχέτιση της in vivo και της in vitro ανταπόκρισης. Ανταποκρίθηκαν στην θεραπεία με γΗ-Ερο 25% των ασθενών που είχαν καλή ανάπτυξη ερυθροκυτταρικών αποικιών και 26,3% των ασθενών με μικρή ανάπτυξη in vitro.

Αρκετές μελέτες αναφέρονται στην θεραπεία ασθενών με ΜΔΣ με γΗ-Ερο μόνο. Η συνολική ανταπόκριση κυμαίνεται μεταξύ 15% και 30%. Σε αντιστοιχία με τα βιβλιογραφικά δεδομένα βρίσκονται και τα αποτελέσματα αυτής της μελέτης, στην οποία παρατηρήθηκε ανταπόκριση 25,9%



του συνόλου των ασθενών που υποβλήθηκαν σε θεραπεία με γη-Ερο. Στην μελέτη της Rose και συν.³⁰⁴ ανταποκρίθηκαν 28% των ασθενών, ενώ στην μετά ανάλυση της Hellstrom-Lindberg και συν.²⁹⁶ που περιελάμβανε 205 ασθενείς από 17 μελέτες το ποσοστό ανταπόκρισης ήταν μικρότερο και μόλις 16%.

Αναλυτικά στην παρούσα μελέτη, ανάλογα με τον κατά FAB υπότυπο, απάντησαν 37,5% των ασθενών με RA, 25% των ασθ. με RARS, 30% των ασθ. με RAEB και κανείς από τους ασθενείς με RAEB-T και CMML. Είναι γενικά παραδεκτό σε όλες τις μελέτες ότι οι ασθενείς με RA ανταποκρίνονται καλύτερα από όλες τις άλλες υποομάδες των ΜΔΣ γεγονός που επιβεβαιώθηκε και στην παρούσα έρευνα. Οι ασθενείς με RARS ανταποκρίθηκαν ικανοποιητικά, σε μικρότερο όμως ποσοστό σε σχέση με τους ασθενείς με RA και RAEB. Στην μετά ανάλυση των Hellstrom και συν.²⁹⁶ η ανταπόκριση των ασθενών με RARS υπολοίπονταν σημαντικά των RA και RAEB (7,5%, 21,8% και 22,7% αντίστοιχα) και μάλιστα ο υπότυπος RARS θεωρήθηκε κακός προγνωστικός δείκτης.

Καλύτερα αποτελέσματα για τους ασθενείς με RARS παρατηρήθηκαν σε άλλες μελέτες, όπως η μελέτη της Ιταλικής συνεργατικής ομάδος για την γη-Ερο στα ΜΔΣ, στην οποία ανταποκρίθηκαν 37,5% των ασθενών με RARS³⁰⁵.

Μεγαλύτερο ποσοστό ανταπόκρισης παρουσίασαν οι ασθενείς με RAEB σε σχέση με τους ασθενείς με RARS και μικρότερο από αυτούς με RA τόσο σε αυτήν την μελέτη όσο και στην βιβλιογραφία. Ειδικά στην μετά ανάλυση των Rodriguez και συν.³⁰⁶ το ποσοστό ανταπόκρισης ήταν ιδιαίτερα υψηλό 50% για τους ασθενείς με RAEB και μεγαλύτερο των RA και RARS (22%, 18,4% αντίστοιχα).

Κανένας από τους ασθενείς με RAEB-T και CMML δεν ανταποκρίθηκε, σε συμφωνία με την διεθνή βιβλιογραφία.

Ανεπιθύμητες ενέργειες της γη-Ερο δεν παρατηρήθηκαν.



ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

1. Οι ασθενείς με ΜΔΣ τόσο στο σύνολό τους όσο και κάθε υπότυπου χωριστά υπολοίπων των φυσιολογικών μαρτύρων στην ανάπτυξη αποικιών ερυθράς σειράς, σε όλες τις συγκεντρώσεις gh-Epo που εξετάστηκαν, με στατιστικά σημαντική διαφορά.
2. Σε καμία συγκέντρωση η gh-Epo δεν αποκατέστησε την φυσιολογική ερυθροποίηση.
3. Παρατηρήθηκε μεγάλη ανομοιογένεια αποτελεσμάτων, όχι μόνο μεταξύ των διαφόρων κατά FAB υποτύπων, αλλά και μεταξύ των ασθενών του ιδίου υπότυπου.
4. Κατά την αύξηση της συγκέντρωσης της gh-Epo παρατηρήθηκε αύξηση της μέσης τιμής του αριθμού των αποικιών της ερυθράς σειράς ασθενών και φυσιολογικών μαρτύρων σταδιακά μέχρι μία μέγιστη τιμή στην συγκέντρωση gh-Epo 100 U/ml και μετά μείωση στις συγκεντρώσεις 200 U/ml και 500 U/ml. Στατιστικά σημαντική ήταν η διαφορά της μέσης τιμής των αποικιών της ερυθράς σειράς των ασθενών με ΜΔΣ στην συγκέντρωση 100 U/ml, όταν συγκρίνονταν με αυτήν στην συγκέντρωση 1 U/ml.
5. Οι ασθενείς οι οποίοι δεν παρουσίαζαν καμία ανάπτυξη αποικιών ερυθράς σειράς στην συγκέντρωση gh-Epo 1 U/ml (26,6%) και 2 U/ml (13,3%) με την αύξηση της συγκέντρωσης ανέπτυξαν μικρό έστω αριθμό αποικιών.
6. Παρατηρήθηκε αναστροφή της σχέσης ώριμων προς πρώιμα προγονικά κύτταρα της ερυθράς σειράς. Την 14η ημέρα της καλλιέργειας στους φυσιολογικούς μάρτυρες υπερτερούσαν τα BFU-E των CFU-E, ενώ στους ασθενείς η πλειονότητα των αποικιών ήταν CFU-E.
7. Καλύτερη ανάπτυξη αποικιών παρουσίασαν οι ασθενείς με RA, σε σχέση με τους υπόλοιπους υπότυπους (στατιστικά σημαντική διαφορά μόνο σε σχέση με RAEB, RAEB-T και όχι με RARS) σε όλες τις συγκεντρώσεις της gh-Epo.



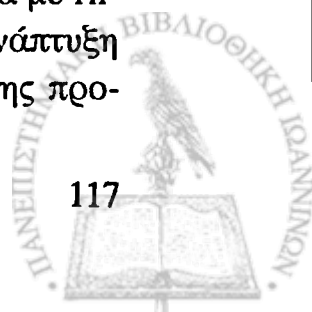
8. Οι ασθενείς με RARS υπερέχον των ασθενών με RAEB και RAEB-T, χωρίς στατιστική σημαντικότητα.
9. Οι ασθενείς με RAEB υπερέχον των ασθενών με RAEB-T και η διαφορά ήταν στατιστικά σημαντική σε όλες τις συγκεντρώσεις πλην 20 και 500 U/ml.
10. Οι ασθενείς με CMML παρουσίαζαν την μικρότερη ανάπτυξη από όλους τους υπόλοιπους υπότυπους, ο αριθμός όμως των ασθενών ήταν μικρός για να εξαχθούν στατιστικά σημαντικά συμπεράσματα.
11. Δεν διαπιστώθηκε συσχέτιση της *in vitro* ανάπτυξης αποικιών ερυθράς σειράς με το φύλο των ασθενών με ΜΔΣ.
12. Παρατηρήθηκε θετική συσχέτιση της αιμοσφαιρίνης (g/dl) τόσο με τον μέγιστο αριθμό αποικιών ερυθράς σειράς που ανέπτυξε κάθε ασθενής, όσο και με τον αριθμό των αποικιών στην συγκέντρωση 100 U/ml.
13. Μικρό ποσοστό ασθενών ανταποκρίθηκε στην θεραπεία με γh-Epo *in vivo* (25,9%). Καλύτερη ήταν η απάντηση των ασθενών με RA (37,5%) και RAEB (30%) σε σχέση με αυτούς με RARS (25%), ενώ δεν παρατηρήθηκε καμία ανταπόκριση των ασθενών με RAEB-T και CMML.
14. Δεν διαπιστώθηκε σχέση των *in vitro* με τα *in vivo* αποτελέσματα, επομένως η ανάπτυξη αποικιών ερυθράς σειράς σε ημίρρευστες καλλιέργειες δεν αποτελούν προγνωστικό δείκτη ανταπόκρισης στην θεραπεία με γh-Epo.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα Μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα (ΜΔΣ) αποτελούν μία ομάδα κλωνικών διαταραχών του πολυδύναμου αρχέγονου αιμοποιητικού κυττάρου και χαρακτηρίζονται από διαταραχές ωρίμανσης των κυττάρων του μυελού που οδηγούν σε περιφερικές κυτταροπενίες και αυξημένο κίνδυνο μετατροπής σε οξεία λευχαιμία. Η Γαλλική-Αμερικανική-Βρετανική (French-American-British, FAB) ταξινόμηση (Bennett et al, 1982) αναγνώρισε πέντε υπότυπους Μυελοδυσπλαστικών Συνδρόμων: Ανθεκτική αναιμία (Refractory anaemia, RA), Ανθεκτική αναιμία με δακτυλιοειδείς σιδηροβλάστες (Refractory anaemia with ringed sideroblasts, RARS), Ανθεκτική αναιμία με περίσσεια βλαστών (Refractory anaemia with excess of blasts, RAEB), Ανθεκτική αναιμία με περίσσεια βλαστών σε μετατροπή (Refractory anaemia with excess of blasts in transformation, RAEB-T) και Χρόνια Μυελομονοκυτταρική λευχαιμία (Chronic Myelomonocytic leukemia, CMML).

Η ανεπιτυχής ερυθροποίηση λόγω μειωμένης ανταπόκρισης στην Ερυθροποιητίνη αποτελεί μία σημαντική διαταραχή στα ΜΔΣ. Περίπου 90% των ασθενών με ΜΔΣ εμφανίζουν αναιμία κατά την διάγνωση. Για την θεραπεία της χρησιμοποιούνται τόσο οι μεταγγίσεις αίματος όσο και η ανασυνδυασμένη ανθρώπινη Ερυθροποιητίνη (rh-Epo).

Σκοπός της παρούσης εργασίας ήταν: α) Η μελέτη της ερυθροποίησης ασθενών με ΜΔΣ σε καλλιέργειες βραχείας διάρκειας (ημίρρευστες καλλιέργειες) υπό την επίδραση διαφόρων συγκεντρώσεων ανασυνδυασμένης ανθρώπινης Ερυθροποιητίνης (rh-Epo) και η συσχέτιση της ανάπτυξης ερυθροκυτταρικών αποικιών με παραμέτρους όπως το φύλο και η αιμοσφαιρίνη του ασθενούς, η συγκέντρωση της rh-Epo και ο κατά FAB υπότυπος, και β) Η διερεύνηση της in vivo ανταπόκρισης στην θεραπεία με rh-Epo των ασθενών με ΜΔΣ και της συσχέτισής της με την in vitro ανάπτυξη αποικιών ερυθράς σειράς, στα πλαίσια της προσπάθειας ανεύρεσης προ-



γνωστικών δεικτών ανταπόκρισης στην θεραπεία με Ερυθροποιητίνη.

Μελετήθηκε σε ημίρρευστες καλλιέργειες μυελού η ανάπτυξη αποικιών ερυθράς σειράς, που ουσιαστικά αντιπροσωπεύουν τα προγονικά κύτταρα της ερυθράς σειράς CFU-E και BFU-E, από 30 ασθενείς με ΜΔΣ (RA:8, RARS:5, RAEB:10, RAEB-T:5 και CMML:2) σε αυξανόμενες δόσεις ανθρώπινης ανασυνδυασμένης Ερυθροποιητίνης (rh-Epo) 1, 2, 5, 20, 100, 200, 500 U/ml. Τα αποτελέσματα συγκρίθηκαν με ανάλογες καλλιέργειες μυελού 10 φυσιολογικών ατόμων στις ίδιες συγκεντρώσεις. Επίσης σε 27 από τους 30 ασθενείς χορηγήθηκε rh-Epo σε δόση 150 U/kg βάρους σώματος, τρεις φορές την εβδομάδα, υποδόρια για 2 μήνες και ελέγχθηκε η ανταπόκρισή τους.

Η μελέτη έδειξε ότι οι ασθενείς με ΜΔΣ τόσο στο σύνολό τους όσο και κάθε υπότυπου χωριστά υπολοίπων των φυσιολογικών μαρτύρων στην ανάπτυξη αποικιών ερυθράς σειράς, σε όλες τις συγκεντρώσεις rh-Epo που εξετάστηκαν, με στατιστικά σημαντική διαφορά. Η rh-Epo σε καμία συγκέντρωση δεν αποκατέστησε την φυσιολογική ερυθροποίηση.

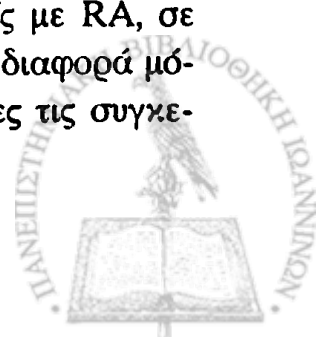
Παρατηρήθηκε μεγάλη ανομοιογένεια αποτελεσμάτων, όχι μόνο μεταξύ των διαφόρων κατά FAB υποτύπων, αλλά και μεταξύ των ασθενών του ίδιου υπότυπου.

Κατά την αύξηση της συγκέντρωσης της rh-Epo παρατηρήθηκε αύξηση της μέσης τιμής του αριθμού των αποικιών της ερυθράς σειράς ασθενών και φυσιολογικών μαρτύρων σταδιακά μέχρι μία μέγιστη τιμή στην συγκέντρωση rh-Epo 100 U/ml και μετά μείωση στις συγκεντρώσεις 200 U/ml και 500 U/ml. Στατιστικά σημαντική ήταν η διαφορά της μέσης τιμής των αποικιών της ερυθράς σειράς των ασθενών με ΜΔΣ στην συγκέντρωση 100 U/ml, όταν συγκρίνονταν με αυτήν στην συγκέντρωση 1 U/ml.

Οι ασθενείς οι οποίοι δεν παρουσίαζαν καμία ανάπτυξη αποικιών ερυθράς σειράς στην συγκέντρωση rh-Epo 1 U/ml (26,6%) και 2 U/ml (13,3%) με την αύξηση της συγκέντρωσης ανέπτυξαν μικρό έστω αριθμό αποικιών.

Παρατηρήθηκε αναστροφή της σχέσης ώριμων προς πρώιμα προγονικά κύτταρα της ερυθράς σειράς. Την 14η ημέρα της καλλιέργειας στους φυσιολογικούς μάρτυρες υπερετερούσαν τα BFU-E των CFU-E, ενώ στους ασθενείς η πλειονότητα των αποικιών ήταν CFU-E.

Καλύτερη ανάπτυξη αποικιών παρουσίασαν οι ασθενείς με RA, σε σχέση με τους υπόλοιπους υπότυπους (στατιστικά σημαντική διαφορά μόνο σε σχέση με RAEB, RAEB-T και όχι με RARS) σε όλες τις συγκε-



ντρώσεις της gh-Epo. Οι ασθενείς με RARS υπερείχαν των ασθενών με RAEB και RAEB-T, χωρίς στατιστική σημαντικότητα. Οι ασθενείς με RAEB υπερείχαν των ασθενών με RAEB-T και η διαφορά ήταν στατιστικά σημαντική σε όλες τις συγκεντρώσεις πλην 20 και 500 U/ml. Οι ασθενείς με CMML παρουσίαζαν την μικρότερη ανάπτυξη από όλους τους υπόλοιπους υπότυπους, ο αριθμός όμως των ασθενών ήταν μικρός για να εξαχθούν στατιστικά σημαντικά συμπεράσματα.

Δεν διαπιστώθηκε συσχέτιση της *in vitro* ανάπτυξης αποικιών ερυθράς σειράς με το φύλο των ασθενών με ΜΔΣ. Αντίθετα παρατηρήθηκε θετική συσχέτιση της αιμοσφαιρίνης (gr/dl) τόσο με τον μέγιστο αριθμό αποικιών ερυθράς σειράς που ανέπτυξε κάθε ασθενής, όσο και με τον αριθμό των αποικιών στην συγκέντρωση 100 U/ml.

Μικρό ποσοστό ασθενών ανταποκρίθηκε στην θεραπεία με gh-Epo *in vivo* (25,9%). Καλύτερη ήταν η απάντηση των ασθενών με RA (37,5%) και RAEB (30%) σε σχέση με αυτούς με RARS (25%), ενώ δεν παρατηρήθηκε καμία ανταπόκριση των ασθενών με RAEB-T και CMML.

Δεν διαπιστώθηκε η ύπαρξη συσχέτισης των *in vitro* με τα *in vivo* αποτελέσματα, επομένως η ανάπτυξη αποικιών ερυθράς σειράς σε ημίρρευστες καλλιέργειες δεν αποτελούν προγνωστικό δείκτη ανταπόκρισης στην θεραπεία με gh-Epo.



Doctoral Thesis

Pavlina K. Konstantinidou M.D., Haematologist

IN VIVO AND IN VITRO EFFECT OF RECOMBINANT HUMAN ERYTHROPOIETIN IN MYELOYDYSPLASTIC SYNDROMES

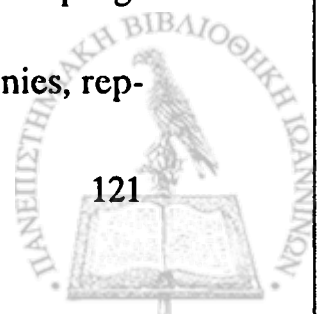
SUMMARY

The myelodysplastic syndromes (MDS) constitute a heterogeneous group of clonal disorders of the pluripotent haemopoietic stem cell, characterized by maturational defects of bone marrow cells resulting in peripheral blood cytopenias and an increased risk for transformation to acute myelogenous leukaemia. The French-American-British (FAB) classification (Bennett et al, 1982) recognized five MDS subtypes: Refractory anaemia (RA), Refractory anaemia with ringed sideroblasts (RARS), Refractory anaemia with excess of blasts (RAEB), Refractory anaemia with excess of blasts in transformation (RAEB-T), and Chronic Myelomonocytic leukaemia (CMML).

Ineffective erythropoiesis due to an impaired response to Erythropoietin is a prominent abnormality in MDS. Approximately 90% of MDS patients present with anaemia at the diagnosis. Blood transfusions as well as recombinant Human Erythropoietin (rh-Epo) are used for the treatment of anaemia.

The aim of this study was: a) to evaluate erythropoiesis in MDS patients in vitro, in short term cultures (semisolid cultures), under the influence of various concentrations of recombinant Human Erythropoietin and to investigate the relation between erythroid colony growth and parameters as the sex and the haemoglobin of the patient, the concentration of rh-Epo used in cultures and the FAB subtype, and b) to investigate the in vivo response to treatment with rh-Epo of MDS patients and its relation with the in vitro erythroid colony growth, in an attempt to find an additional prognostic factor of response to treatment with Erythropoietin.

We studied in semisolid cultures the growth of erythroid colonies, rep-



representing erythroid progenitor cells CFU-E and BFU-E, from the bone marrow of 30 patients with MDS (RA:8, RARS:5, RAEB:10, RAEB-T:5 and CMML:2) under the influence of increasing concentrations of rh-Epo 1, 2, 5, 20, 100, 200, 500 U/ml. The results were compared with the same kind of cultures from 10 normal donors. In addition 27 out of the 30 patients were treated with rh-Epo, at a dose of 150 U/kg, three times weekly, subcutaneously, for at least two months and their response was evaluated.

This study showed that patients with MDS as a whole and patients of each subtype of MDS separately, demonstrated lower erythroid colony growth than normal controls, at every concentration of rh-Epo used. The difference was statistically significant. Recombinant Human Erythropoietin did not restore normal erythropoiesis at any concentration.

A great heterogeneity of the results was observed, not only between patients of different FAB subtypes, but even between patients of the same subtype.

As the concentration of the rh-Epo was increased from 1 to 500 U/ml, we observed an increase in the mean values of the erythroid colonies of patients and normal controls gradually till the concentration of 100 U/ml and then a small reduction at the concentrations of 200 U/ml and 500 U/ml. A statistically significant difference was observed between the mean values of the erythroid colonies of MDS patients at the concentrations 100 U/ml and 1 U/ml.

Patients who developed no erythroid colony growth at the concentration of rh-Epo 1 U/ml (26.6% of the patients) and 2 U/ml (13.3%), presented a small number of erythroid colony growth when the concentration of rh-Epo was increased.

A reversal of the relation between early (BFU-E) and late (CFU-E) erythroid progenitors was noticed. On day 14th of culture in normal persons BFU-E were more than CFU-E, while in patients most of the colonies were CFU-E.

Patients with RA had the best erythroid colony growth compared with the rest of MDS subtypes (statistically significant difference only when compared with RAEB and RAEB-T but not RARS) at all the concentrations of rh-Epo. Patients with RARS presented a better erythroid colony growth than RAEB and RAEB-T, but the difference was not statistically important. Patients with RAEB had better growth than patients with RAEB-T, the difference being statistically significant at all concentrations



except 20 and 500 U/ml. Patients with CMML had the worst growth of all the other MDS subtypes, but the number of the patients was too small to have any statistically significant conclusions.

No correlation was found between the *in vitro* growth of the erythroid colonies and the sex of MDS patients. On the contrary a positive correlation was found between the Haemoglobin value (gr/dl) and the maximum erythroid colony growth, as well as the erythroid colony growth at the concentration of 100 U/ml of each patient.

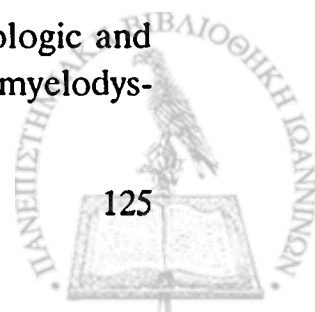
A small percentage of patients with MDS responded to the treatment with rh-Epo *in vivo* (25.9%). Patients with RA and RAEB responded better than those with RARS, response rates being 37.5%, 30%, 25% respectively, while no patient with RAEB-T and CMML responded at all.

No correlation was found between the *in vitro* and the *in vivo* results of response to rh-Epo, so it is concluded that the erythroid colony growth in short term cultures can not be used as a predicting factor for the response to treatment with rh-Epo in MDS patients.



ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Hamilton-Patterson JL: Preleukemic anaemia. *Acta Haematol* 2:309-316, 1949.
2. Block M, Jacobson LO, Bethard WF: Preleukemic human leukemia. *JAMA* 152:1018-1028, 1953.
3. Rheingold JJ, Kaufman R, Abelson E, Lear A: Smouldering acute leukemia. *N Engl J Med* 268:812, 1963.
4. Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, et al: Proposals for the classification of the acute leukemias. French-American-British (FAB) cooperative group. *Br. J Haematol* 33:451-458, 1976.
5. Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, et al: Proposals for the classification of the myelodysplastic syndromes. *Br. J Haematol* 51:189-199, 1982.
6. Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, et al: Proposed revised criteria for the classification of acute myeloid leukemia. *Annals of Internal Medicine*, 103, 626-629.
7. Harris NL, Jaffe ES, Diebold J, Flandrin G, Muller-Hermelink HK, Vardiman J, Lister TA, Bloomfield CD: World Health Organisation classification of neoplastic diseases of the hemopoietic and lymphoid tissues: report of the Clinical Advisory Committee meeting- Airlie House, Virginia, November 1997. *J Clin Oncol* 1999; 12: 3835-3849.
8. Rosenfeld C, List A: A hypothesis for the pathogenesis of myelodysplastic syndromes: implications for new therapies. *Leukemia* 2000 Jan; 14(1):2-8.
9. Meccuci C, Van den Berghe H: Cytogenetics. *Hematol Oncol Clin North Am* 6:522 1992.
10. Third MIC Cooperative study Group: Morphologic, immunologic and cytogenetic (MIC) working classification of the primary myelodys-



- plastic syndromes and therapy related myelodysplasias and leukemias. *Cancer Genet Cytogenet* 1987; 32:1-10.
11. Mecucci C: Molecular features of primary MDS with cytogenetic changes. *Leuk Res* 1998; 22:293-302.
 12. Willman CL: Molecular genetic features of myelodysplastic syndromes (MDS) *Leukemia* 1998; 12 Suppl 1;S2-S6.
 13. Karp JE, Smith MA: The molecular pathogenesis of treatment-induced (secondary) leukemias: foundations for treatment and prevention. *Sem Oncol* 1997; 24: 103-13.
 14. Greenberg P, Cox C, LeBeau M, Fenaux P, Morrel P, Sanz G, Sanz M, Vallespi T, Hamblin T, Oscier, Ohyashiki K, Toyama K, Aul C, Mufti G, and Bennet J. International Scoring System for evaluating prognosis in myelodysplastic syndromes. *Blood*, Vol 89, No 6 1997: 2079-2088.
 15. White N, Nacheva E, Asimakopoulos F, Bloxham D, Paul B, Green A. Deletion of chromosome 20q in myelodysplasia can occur in a multipotent precursor of both myeloid and B cells. *Blood* 1994; 83: 2809-16.
 16. Van Lom, Hagemcijker A, Smit E, Hahlen K, Groeneveld K, Lowenberg B: Cytogenetic clonality analysis in myelodysplastic syndrome: monosomy 7 can be demonstrated in myeloid and lymphoid lineage. *Leukemia* 1995; 9: 1818-21.
 17. Haase D, Feuring-Buske M, Schafer C, et al.: Cytogenetic analysis of the CD34+ subpopulations in AML and MDS characterised by the expression of the CD38 and CD117. *Leukemia* 1997; 11:674-9.
 18. Van den Berghe H, Meccuci C, Delannoy A: Deletion of 5q by t(5;17) in therapy-related myelodysplastic syndrome. *Cancer Genet Cytogenet* 48:49, 1990.
 19. Willman CL, Sever CE, Pallavicini MG et al: Deletion of IRF-1 mapping to chromosome 5q31.1, in human leukemia and preleukemic myelodysplasia. *Science* 259:968,1993.
 20. Le Beau MM, Espinosa R, Neuman WL, et al: Cytogenetic and molecular delineation of the smallest commonly deleted region of chromosome 5 in malignant myeloid diseases. *Proc Natl Acad Sci Usa* 1993; 90: 5484-8.
 21. Johnson E, Cotter FE: Monosomy 7 and 7q- associated with myeloid malignancy. *Blood Rev* 1997; 11: 46-55.



22. Wlodarska I, Meccuci C, Marynen P, et al: TEL gene is involved in myelodysplastic syndromes with either the typical t(5;12)(q33;p13) translocation or its variant t(10;12)(q24;p13). *Blood* 1995; 85:2848-52.
23. Sobulo OM, Borrow J, Tomek R, et al: MLL is fused to CBP, a histone acetyltransferase, in therapy-related acute myeloid leukemia with a t(11;16)(q23;p13.3). *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94:8732-7.
24. Nucifora G, Begy CR, Erickson P, Drabkin HA, Rowley JD: The 3;21 translocation in myelodysplasia results in a fusion transcript between the AML1 gene and the gene for EAP, a highly conserved protein associated with the Epstein-Barr virus small RNA EBER 1. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90:7784-8.
25. Lai JL, Preudhomme C, Zandecki M, et al. Myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemia with 17p deletion. an entity characterised by specific dysgranulopoiesis and a high incidence of P53 mutations. *Leukemia* 1995; 9:370-81.
26. Prchal J, Throckmorton D, Carroll A, Fuson E, Gams R, Prchal T: A common progenitor for human myeloid and lymphoid cells. *Nature* 1978; 274:590-1.
27. Wiemar I, Bourhis J, De Gast G, Gerritsen W: Clonality in myelodysplastic syndromes. *Leuk Lymphoma* 1994; 13:215-21.
28. Delforge M, Demuyneck H, Verhoef G, et al.: Patients with high risk myelodysplastic syndromes can have polyclonal or clonal haematopoiesis in complete haematological remission. *Br J Haematol* 1998, 102, 486-494.
29. Patmasiriwat P, Fraiser G, Kantarjian H, Saunders GF: WT1 and GATA1 expression in myelodysplastic syndrome and acute leukemia. *Leukemia* 1999; 13: 891-900.
30. Kitagawa M, Yamaguchi S, Takahashi M, Tanizawa T, Hirokawa K, Kamiyama R.: Localization of Fas and Fas ligand in bone marrow cells demonstrating myelodysplasia. *Leukemia* 1998; 12: 486-92.
31. Raza A, Gezer S, Mundle S, et al: Apoptosis in bone marrow biopsy samples involving stromal and hematopoietic cells in 50 patients with myelodysplastic syndromes. *Blood* 1995; 86: 268-76.
32. Rajapaksa R, Ginzton N, Rott LS, Greenberg PL: Altered oncoprotein expression and apoptosis in myelodysplastic syndrome marrow cells. *Blood* 1996 Dec 1; 88(11): 4275-87.



33. Gupta P, Nichans GA, LeRoy SC, et al: Fas ligand expression in the bone marrow in myelodysplastic syndromes correlates with FAB subtype and anemia, and predict survival. *Leukemia* 1999; 13:44-53.
34. Giersuk GM, Beckham C, Loken MR, et al: A role for tumour necrosis factor- α , Fas and Fas-ligand in marrow failure associated with myelodysplastic syndromes. *Br J Haematol* 1998; 103:176-88.
35. Peddie CM, Wolf CR, McLellan LJ, Collins AR, Bowen DT: Oxidative DNA damage in CD 34+ myelodysplastic cells is associated with intracellular redox changes and elevated plasma tumor necrosis factor- α concentration. *Br J Haematol* 1997;99:625-31.
36. Verhoef G, Schouer P, Ceuppens J, Van Damme J, Goossens W, Boogaerts M: Measurement of cytokine levels in patients with myelodysplastic syndromes. *Leukemia* 1992; 6: 1268-72.
37. Shetty V, Mundle S, Alvi S, et al: Measurement of apoptosis, proliferation and three cytokines in 46 patients with myelodysplastic syndromes. *Leuk Res* 1996; 20:891-900.
38. Hellstrom-Lindeberg E, Kanter-Lewensohn L, Ost A: Morphological changes and apoptosis in bone marrow from patients with myelodysplastic syndromes treated with G-CSF and erythropoietin. *Leuk Res* 1997; 21:415-25.
39. Campos I, Sabido O, Viallet A, Piselli, Guyotat D: Implication of the ICE and CP32 in the in vitro growth defects of committed progenitors from myelodysplastic syndromes. *Blood* 1997; 90: abstract 2323.
40. Ali A, Mundle S, Ragasa D, et al: Sequential activation of caspases during spontaneous apoptosis of bone marrow cells in myelodysplasia. *Blood* 1997; 90: abstract 2321.
41. Parker LE, Fishlock KL, Mijovic A, Czepulkowski B, Pagliuca A, Mufti GJ: 'Low risk' myelodysplastic syndrome is associated with excessive apoptosis and an increased ratio of pro- versus anti-apoptotic bcl-2 related proteins. *Br J Haematol* 1998; 103: 1075-82.
42. Davis RE, Greenberg PL: Bcl-2 expression by myeloid precursors in myelodysplastic syndromes: relation to disease progression. *Leuk Res* 1998 Sep;22(9):767-77.
43. Aizawa S, Nakano M, Iwase O, et al: Bone marrow stroma from refractory anemia of myelodysplastic syndrome is defective in its ability to support normal CD34-positive cell proliferation and differentiation in vitro. *Leuk Res* 1999; 23:239-46



44. Flores-Figueroa E, Gutierrez-Espindola G, Guerra-Rivera S, Pizzuto-Chavez J, Mayani H: Hematopoietic progenitor cells from patients with myelodysplastic syndromes: in vitro colony growth and long term proliferation. *Leuk Res* 1999 Apr;23(4):389-94.
45. Kitagawa M, Saito I, Kuwata T, et al: Overexpression of tumor necrosis factor (TNF)- α and interferon (INF)- α by bone marrow cells from patients with myelodysplastic syndromes. *Leukemia* 1997; 11: 2049-54.
46. Aul C, Gatterman N, Schneider W: Age-related incidence and other epidemiological aspects of myelodysplastic syndrome. *Br J Haematol* 82: 385, 1992.
47. Williamson PJ, Kruger A, Reynolds PJ, Hamblin TJ, Oscier DG: Establishing the incidence of myelodysplastic syndromes. *Br J Haematol* 1994; 87: 743-745.
48. Ribera J-M et al: A multivariate analysis of prognostic factors in chronic myelomonocytic leukemia according to the FAB criteria. *Br J Haematol* 65: 307, 1987.
49. Boogaerts MA, Nielissen V, Roelant C, Goosens W: Blood neutrophil function in primary myelodysplastic syndromes. *Br J Haematol* 55: 217, 1983.
50. Cunningham I et al: The myelodysplastic syndromes: an analysis of prognostic factors in 226 cases from a single institution. *Br J Haematol* 90: 602, 1995.
51. Pomeroy C et al: Infection in myelodysplastic syndromes. *Am J Med* 90: 338, 1991.
52. Garcia S, Sanz MA, Amigo V et al: Prognostic factors in chronic myelodysplastic syndromes. *Am J Hematol* 27: 163, 1988.
53. Enright H et al: Paraneoplastic autoimmune phenomena in patients with myelodysplastic syndromes: response to immunosuppressive therapy. *Br J Haematol* 91: 403, 1995.
54. Soppie et al: Acute febrile neutrophilic dermatosis (Sweet's syndrome) in association with myelodysplastic syndromes: a report of three cases and review of the literature. *Br J Haematol* 73:43, 1989.
55. Morioka N et al: Neutrophilic dermatosis with myelodysplastic syndrome: nuclear segmentation anomalies of neutrophils in the skin lesion and in peripheral blood. *J Am Acad Dermatol* 23:247, 1990.
56. Varma S et al: Sweet's syndrome in association with myelodysplastic syndrome. *Eur J Haematol* 45: 184, 1990.



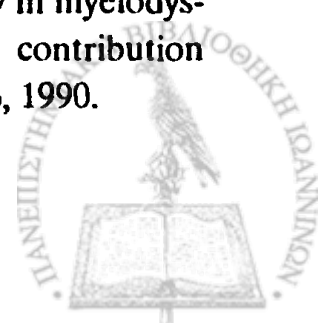
57. Mufti GJ and Galton DAG, Eds: *The myelodysplastic syndromes*. Edinburgh, Churchill Livingstone, 1992.
58. Doll DC et al: Acanthocytosis associated with myelodysplasia. *J Clin Oncol* 7: 1569, 1989.
59. Newman DR, Pierre RV, Linman JW: Studies on the diagnostic significance of haemoglobin F levels. *Mayo Clin Proc* 48:199, 1973.
60. Annino L, Di Giovanni S, Tentori L et al: Acquired haemoglobin H disease in a case of refractory anaemia with excess of blasts (RAEB) evolving into acute nonlymphoid leukemia. *Acta Haematol* 72: 41, 1984.
61. Anagnou NP et al: Acquired α -thalassaemia in preleukemia is due to decreased expression of all four α -globin genes. *Proc Natl Acad Sci USA* 80:6051, 1983.
62. Peters RE et al: Increased α :non- α globin chain synthesis ratios in myelodysplastic syndromes and myeloid leukemia.
63. Hoyle C et al: Acquired β thalassaemia trait in MDS. *Br J Haematol* 79: 116, 1991.
64. Salmon A: Blood group changes in preleukemic states. *Blood Cells* 2: 211, 1976.
65. Ganser A and Hoelzer D: Clinical course of myelodysplastic syndromes. *Hematol Oncol Clin North Am* 6:607, 1992.
66. Sokol RJ et al: Erythrocyte autoantibodies autoimmune haemolysis, and myelodysplastic syndromes. *J Clin Pathol* 42:1088, 1989.
67. Galton DAG: *The myelodysplastic syndromes*. *Scand J Hematol (suppl 45):16*, 1986.
68. Coiffier B, Adeleine P, Viala JJ et al: Dysmyelopoietic syndromes. A search for prognostic factors in 193 patients. *Cancer* 52:83, 1983.
69. Beris P et al: Primary acquired sideroblastic and primary acquired refractory anemia. *Semin Hematol* 20:101, 1983.
70. Widell S et al: Peripheral blood neutrophil morphology reflects bone marrow dysplasia in myelodysplastic syndromes. *Am J Hematol* 49: 115, 1995.
71. Hast R et al: Diagnostic significance of dysplastic features of peripheral blood polymorphs in myelodysplastic syndromes. *Leuk Res* 13: 173, 1989.
72. Rosenthal DS and Molony WC: Refractory dysmyelopoietic anemia and acute leukemia. *Blood* 63:314, 1984.



73. Breton-Gorius J et al: Partial myeloperoxidase deficiency in a case of preleukemia. I. Studies of fine structure and peroxidase synthesis of promyelocytes. *Br J Haematol* 30:273, 1975.
74. Smith WB et al: Atypical megakaryocytes in preleukemic phase of acute myeloid leukemia. *Blood* 42: 535, 1973.
75. Wong KF and Chan JKC: Are dysplastic and hypogranular megakaryocytes specific markers for myelodysplastic syndrome? *Br J Haematol* 77: 509, 1991.
76. Thiele J et al: Dysmegakaryopoiesis in myelodysplastic syndromes (MDS): an immunomorphometric study of bone marrow trephine biopsy specimens. *J Clin Pathol* 44:300, 1991.
77. Fox SB et al: Megakaryocytes in myelodysplasia: an immunohistochemical study on bone marrow trephines. *Histopathology* 17: 69, 1990.
78. Goasguen J-E et al: Prognosis implication and characterization of the blast cell population in the myelodysplastic syndrome. *Leuk Res* 15: 1159, 1991.
79. Seigneurin D and Audhuy B: Auer rods in refractory anemia with excess of blasts: presence and significance. *Am J Clin Pathol* 80:359, 1983.
80. Van den Berghe H, Vermaelen K, Mecucci C, Barbieri D and Tricot G: The 5q- anomaly. *Cancer Genetics and Cytogenetics* (1985); 17, 189-255.
81. Hast R: Studies on human preleukemia IV. Clinical and prognostic significance of sideroblasts in a regenerative anaemia with hypercellular bone marrow. *Scand J Haematol* 21:396, 1978.
82. Cartwright GE et al: Association of HLA-linked hemochromatosis with idiopathic refractory sideroblastic anemia. *J Clin Invest* 65: 989, 1980.
83. Edwards CQ et al: Hereditary haemochromatosis. *Clin Haematol* 11: 411, 1982.
84. Maschek H et al: Life expectancy in primary myelodysplastic syndromes: a prognostic score based upon histopathology from bone marrow biopsies of 569 patients. *Eur J Haematol* 53:280, 1994.
85. Dreyfus B: Preleukemic states. I. Definition and classification. II. Refractory anemia with an excess of myeloblasts in the bone marrow (smoldering acute leukemia). *Blood cells* 2:33, 1976.



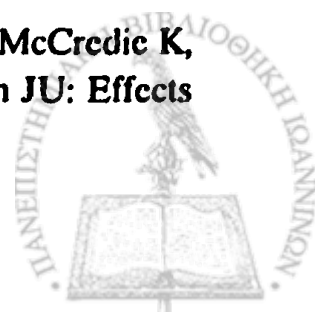
86. Israel V et al: *Donnees Nouvelles sur les leukemies ologo-blastiques. A propos d'une analyse de 120 cas.* *Nouv Presse Med* 4:947, 1975.
87. Hamblin TJ and Oscier DG (1987): *The myelodysplastic syndromes- a practical guide.* *Hematological Oncology*; 5, 19-34.
88. Joseph AS et al: *Natural history of smouldering leukemia.* *Br J Cancer* 46: 160, 1982.
89. Greenberg PL: *The smouldering myeloid leukemia states: clinical and biologic features.* *Blood* 61: 1035, 1983.
90. Storniolo AM et al: *Chronic myelomonocytic leukemia.* *Leukemia* 4: 766, 1990.
91. Worsley A et al: *Prognostic features of chronic myelomonocytic leukemia: a modified Bournemouth score gives the best prediction of survival.* *Br J Haematol* 68: 17, 1988.
92. Yoshida Y, Oguma S, Ushino h et al: *Refractory myelodysplastic anaemias with hypocellular bone marrow.* *J Clin Pathol* 41:763, 1988.
93. Nand S, Godwin JE: *Hypoplastic myelodysplastic syndrome.* *Cancer* 62:958,1988.
94. Appelbaum FR, Barrall J, Storb R et al: *Clonal cytogenetic abnormalities in patients with otherwise typical aplastic anemia.* *Exp Hematol* 15:1134, 1987.
95. DePlanque MM, Bacigalup A, Wursch A et al: *Long-term follow-up of severe aplastic anemia patients treated with antihymocyte globulin.* *Br J Haematol* 73:121, 1989.
96. Tichelli A, Gratwohl A, Wursch A: *Late haematological complications in severe aplastic anaemia.* *Br J Haematol* 69:413, 1988.
97. Ohyashiki K, Ohyashiki JH, Iwabuchi A et al: *Clinical and cytogenetic characteristics of myelodysplastic syndromes developing myelofibrosis.* *Cancer* 68:178,1991.
98. Vardiman JW, le Beau MM, Albain K et al: *Myelodysplasia: a comparison of therapy related and primary forms.* *Ann Biol Clin (Paris)* 43:369, 1985.
99. Michels SD, McKenna RW, Arthur DC et al: *Therapy-related acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome: a clinical and morphologic study of 65 cases.* *Blood* 65: 1365, 1985.
100. Rios A, Canizo MC, Sanz MA et al: *Bone marrow biopsy in myelodysplastic syndromes: morphological characteristics and contribution to the study of prognostic factors.* *Br J Haematol* 75:26, 1990.



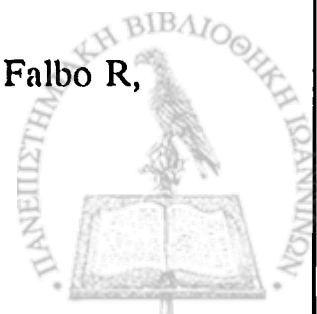
101. Lambertenghi-Deliliers G, Orazi A, Luksch R et al: Myelodysplastic syndromes with increased marrow fibrosis: a distinct clinicopathological entity. *Br J Haematol* 78:161, 1991.
102. Fenaux P, Jouet JP, Zandecki M et al: Chronic and subacute myelomonocytic leukemia in the adult: a report of 60 cases with special reference to prognostic factors. *Br J Haematol* 65: 101, 1987.
103. Pedersen-Bjergaard J: Radiotherapy -and chemotherapy- induced myelodysplasia and acute myeloid leukemia: a review. *Leuk Res* 16:61, 1992.
104. Farrow A, Jacobs A, West RR: Myelodysplasia, chemical exposure and other environmental factors. *Leukemia* 3:33, 1989.
105. Pedersen-Bjergaard J, Philip P, Larsen SO et al: Chromosome aberrations and prognostic factors in therapy related myelodysplasia and acute non-lymphocytic leukemia. *Blood* 76: 1083, 1990.
106. Pedersen-Bjergaard J, Philip P: Balanced translocations involving chromosome bands 11q23 and 21q22 are highly characteristic of myelodysplasia and leukemia following therapy with cytostatic agents targeting at DNA topoisomerase II. *Blood* 78:1147, 1991.
107. Parker JE, Mufti GI: Ineffective haemopoiesis in myelodysplastic syndromes (review). *British J Haematol* 1998; 101: 220-230.
108. Orazi A, Albitar M, Heerema Na et al: Hypoplastic myelodysplastic syndromes can be distinguished from acquired aplastic anaemia by CD34 and PNCA immunostaining of bone marrow biopsy specimens. *Am J Clin Pathol* 1997; 107: 268-274.
109. Barret J, Sauntharavajab Y, Molidrem J: Myelodysplastic syndrome and aplastic anaemia: distinct entities or diseases linked by a common pathophysiology. *Seminars in Haematol* 2000; 37: 15-29.
110. Yoshida V: The aplasia-myelodysplasia enigma: a re-emerging question (editorial). *Int J Haematol* 1999; 70: 65-67.
111. Kerkhofs H, Hermans J, Haak HL, et al: Utility of the FAB classification for myelodysplastic syndromes; investigation of prognostic factors in 237 cases. *Br J Haematol* 65: 73, 1987.
112. Fenaux P, Benscart R, Lai J: Prognostic factors in adult CMML: analysis of 107 cases. *J Clin Oncol* 6:1417, 1990.
113. Riccardi A, Giordana M, Girino M et al: Clinical course according to marrow cytology and cellularity. *Blut* 54: 153, 1987.
114. Sanz GF, Sanz MA: Prognostic factors in myelodysplastic syndromes.



- Leuk Res* 16:77, 1992.
115. Mufti GJ, Stevens J, Oscier DG and Hamblin TJ: Myelodysplastic syndromes: a scoring system with prognostic importance. *Br J Haematol* 1985; 59: 425-433.
 116. Morel P, Hebbar M, Lai JI, Duhamel A, Preudhomme C, Wattel E, Bauters F, Fenaux P. Cytogenetic analysis has strong independent prognostic value and can be incorporated in a new scoring system: a report on 408 cases. *Leukemia* 1993; 7: 1315-1323.
 117. Sanz GF, Sanz MA, Vallespi T, Carizo MC, Torrabadella M, Gancva S, Irriguible D, San Miguel JF: Two regression models and a scoring system for predicting survival and planning treatment in myelodysplastic syndromes: a multivariate analysis of prognostic factors in 370 patients. *Blood* 1989; 74: 395-408.
 118. Mufti G: Chromosomal deletions in myelodysplastic syndromes. *Leuk Res* 15:35 1992.
 119. Yoshida Y: Hypothesis: apoptosis may be the mechanism responsible for the premature intramedullary cell death in the myelodysplastic syndrome. *Leukemia* 1993; 7: 144.
 120. Parker JE, Fishlock KL, Czepulkowski B, Pagliuca A, Mufti GJ: The relationship between CD34+ cell apoptosis and proliferation alters during disease evolution in the myelodysplastic syndromes (MDS). *Br J Haematol* 1999; 105:69.
 121. Ganser A, Hoelzer D: Treatment of myelodysplastic syndromes with hematopoietic growth factors. In Koefler HP(ed). *Hematol Oncol Clin N Am*, 1992, p633.
 122. Maurer AB, Ganser A, Seipelt G, Ottmann OG, Mentzel U, Geissler GR, Hoelzer D: Changes in erythroid progenitor cell and accessory cell compartments in patients with myelodysplastic syndromes during treatment with all-trans retinoic acid and haemopoietic growth factors. *Br J Haematol* 1995, 89, 449-456.
 123. Bourantas KL et al: Treatment of 34 patients with myelodysplastic syndromes with 13-CIS retinoic acid. *Eur J Haematol* 55:235, 1995.
 124. Greenberg P, Taylor K, Larson R, et al. Phase III randomized multicenter trial of G-CSF vs observation for myelodysplastic syndromes (MDS). *Blood* 1993; 82:196a.
 125. Vadhan-Raj S, Keating M, LeMaistre A, Hittelman WN, McCredie K, Trujillo JM, Broxmeyer HE, Henney C and Gutterman JU: Effects



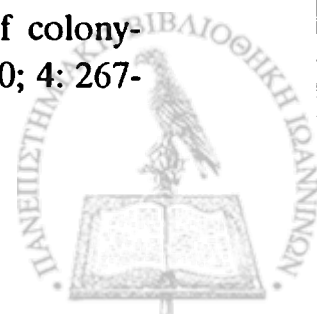
- of recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in patients with myelodysplastic syndromes. *NEJM* 1987; 317: 1545-1552.
126. Willemzee R, van der Lely N, Zwierzina H et al: A randomised phase I-II multicenter study of granulocyte macrophage colony-stimulating factor therapy for patients with myelodysplastic syndromes and a relative low risk of acute leukemia. *Annals in Haematol* 1992; 64: 173-180.
 127. Shuster MW, Larson RA, Thomson JA, Coiffier B, Bennett JM, Isracil RJ: Granulocyte-macrophage colony stimulating factor (GM-CSF) for myelodysplastic syndromes: Results of a multicenter randomised controlled trial. *Blood* 1990; 76: 318a.
 128. Shuster MW, Thomson JA, Larson RA, Coiffier B, Bennett JM, Dugan M: Randomized phase II study of recombinant human granulocyte-macrophage colony stimulating factor (rGM-CSF) in patients with neutropenia secondary to myelodysplastic syndromes. *Blood* 1995; 86 (Suppl 1): 338a.
 129. Negrin RS, Haeuber DH, Nagler A et al: Treatment of myelodysplastic syndromes with recombinant human granulocyte colony-stimulating factor. *Annals of Internal Medicine* 1989; 110: 976-982.
 130. Yoshida Y, Uchino H, Mackawa T et al: Long-term administration of G-CSF in the myelodysplastic syndromes (MDS). *Exp Haematol* 1995; 22: 920a.
 131. Goodnough L, Monk T, Andriole G: Current concepts: Erythropoietin therapy. *NEJM*, March 27, 1997-Vol 336, No.13: 933-938.
 132. Mittelman M: Recombinant erythropoietin in myelodysplastic syndromes: Whom to treat and how? More questions than answers. *Acta Haematol* 1993; 90: 53-57.
 133. Di Raimondo F, Longo G, Cacciola E JR, Milone G, Palumbo GA, Cacciola RR, Alessi M, Gioustolisi R: A good response rate to recombinant erythropoietin alone may be expected in selected myelodysplastic patients. A preliminary clinical study. *Eur. J Haematol*, 56, 7-11, 1996.
 134. Remacha AF, Arrizabalaga b, Villegas A et al: Identification of a subgroup of responders. The Spanish Erythropathology Group. *Haematologica* 1999 Dec; 84(12): 1058-64.
 135. Bucalossi A, Marotta G, Bigazzi C, Galieni P, Vessichelli F, Falbo R,



- Dispensa E: Use of functional classification of anemia in myelodysplastic syndromes to identify subgroups of patients responsive to recombinant human-erythropoietin therapy (letter):*Eur. J Haematol*, 56, 106-108, 1996.
136. Hellstrom-Lindberg E, Ahlgren T, Beguin Y, et al.: Treatment of anemia in myelodysplastic syndromes with granulocyte colony-stimulating factor plus erythropoietin: results from a randomised phase II study and long-term follow-up of 71 patients. *Blood* 1998; 92:68.
137. Negrin RS, Stein R, Doherty K, Cornwell J, Vardiman J, Krantz S and Greenberg PL: Maintenance Treatment of the anemia of myelodysplastic syndromes with recombinant human Granulocyte Colony - Stimulating Factor and erythropoietin; -Evidence of in vivo synergy. *Blood*, Vol 87, No 10, pp 4076-4081, 1996.
138. Negrin RS, Stein R, Vardiman J, Doherty K, Cornwell J, Krantz S, Greenberg PL: Treatment of the anemia of myelodysplastic syndromes using recombinant human Granulocyte Colony -Stimulating factor in combination with erythropoietin. *Blood* 1993 Aug 1;82(3): 737-43.
139. Sada H: Myelodysplastic syndromes in the elderly: The role of growth factors in the management.(Review). *Leukemia Research* Vol. 20, No 3, pp 203-219, 1996.
140. Mantovani L, Lentini G, Hentschel B, Wickramanayake PD, Loffler M, Diehl V, Tesch H. Treatment of anaemia in myelodysplastic syndromes with prolonged administration of recombinant human granulocyte-stimulating factor and erythropoietin. *Br J Haematol* 2000 May; 109(2):367-75.
141. Hellstrom-Lindberg E, Negrin R, Stein R, et al.: Erythroid response to treatment with G-CSF plus erythropoietin for the anaemia of patients with myelodysplastic syndromes: proposal for a predictive model. *Br J Haematol* 1997; 99:344.
142. Silverman LR: Effects of treatment with Azacytidine in patients with the myelodysplastic syndrome. *Leuk Res* 1999; 23:S70.
143. Wijermans PW, Lubbert M, Verhoef G, Bosley A, Ravoet C, Andre M, Ferrant A: Low dose 5-aza-2'-deoxycytidine, a DNA hypomethylating agent, for the treatment of high risk myelodysplastic syndrome: a multicenter phase II study in elderly patients. *J Clin Oncol*



- 2000; 18: 956-962.
144. Kornblith AB, Herndon II, Silverman LR, et al: The impact of 5-azacytidine on the quality of life of patients with myelodysplastic syndromes (MDS) treated in a randomized phase III trial of the Cancer and Leukemia Group B (CALGB). *Proc Am Soc Clin Oncol* 1998; 17:49a.
 145. Gore SD, Miller CB, Weng LJ, et al. Clinical development of sodium phenylbutyrate as a putative differentiating agent in myeloid malignancies. *Anticancer Res* 1997; 17:3938a.
 146. List AF, Brasfield F, Heaton R, Glinsmann-Gibson B, Crook L, Taetle R, Capizzi R: Stimulation of hematopoiesis by Amifostine in patients with myelodysplastic syndromes. *Blood* 1997, 90, 3364-3369.
 147. Bowen DT, Denzlinger C, Brugger W et al: Poor response rate to a continuous schedule of Amifostine therapy for 'low/intermediate risk' myelodysplastic patients. *Br J Haematol* 1998; 103:785.
 148. Housset M, Daniel MT, Degos L: Small doses of Ara-C in the treatment of acute myeloid leukemia: differentiation of myeloid leukemia cells? *British Journal of Haematology* 1982; 51: 125-129.
 149. Beran M, Hittelman WN, Anderson BS, McCredie KB: Induction of differentiation in human myeloid leukemia cells with cytosine arabinoside. *Leukemia Research* 1986; 10: 1033-1039.
 150. Tricot G, Bock R de, Dekker AW, Boogaerts MA, Peetermans M, Punt K, Verwilghen RL: Low dose cytosine arabinoside (Ara-C) in myelodysplastic syndromes. *Br J Haematol* 1984; 58: 231-240.
 151. Cheson BD, Simon R: Low-dose ara-C in acute nonlymphocytic leukemia and myelodysplastic syndromes: A review of 20 years' experience. *Seminars in Oncology* 1987; 14: 126-133.
 152. Hellstrom-Lindberg E, Robert KH, Gahrton G et al: A predictive model for clinical response to low dose ara-C: a study of 102 patients with myelodysplastic syndromes or acute leukemia. *Br J Haematol* 1992; 81: 503-511.
 153. Miller KB, Kim K, Morrison FS, et al.: The evaluation of low-dose cytarabine in the treatment of myelodysplastic syndromes: A phase III intergroup study. *Ann Hematol* 1992; 65:162.
 154. Schipperus M, Sonneveld P, Lindemans J et al: The effects of Interleukin 3, GM-CSF and G-CSF on the growth kinetics of colony-forming cells in myelodysplastic syndromes. *Leukemia* 1990; 4: 267-

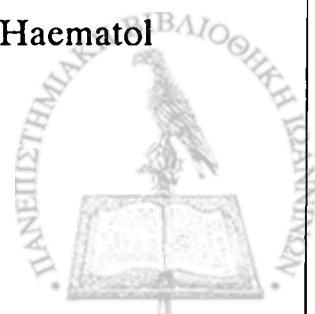


272.

155. Gerhartz HH et al: Phase III study of low dose araC alone vs LD-araC plus GM-CSF vs LD-araC+ IL3 in advanced myelodysplasia (EORTC-LCG protocol No, 06903). *Blood* 1996; 88 (Suppl 1): 580a.
156. Gerhartz HH, Marcus R, Delmar A et al: A randomized phase II study of low-dose cytosine arabinoside (LD-araC) plus granulocyte-macrophage colony stimulating factor (rhGM-CSF) in myelodysplastic syndromes (MDS) with a high risk of developing leukemia. *Leukemia* 1994; 8: 16-23.
157. Omoto E, Deguchi S, Takaba S, et al: Low-dose melphalan for treatment of high-risk myelodysplastic syndromes. *Leukemia* 1996; 10: 609.
158. Denzlinger C, Benz D, Bowen D, Gelly K, Brugger W, Kanz L: Low-dose melphalan induces favourable responses in elderly patients with high risk myelodysplastic syndromes or secondary leukemia. *Br J Haematol* 2000; 108: 93-95.
159. Estey EH.: New agents for the treatment of acute myelogenous leukemia: focus on topotecan and retinoids. *Leukemia* 1998; 12:S13.
160. Wattel E, Guersi A, Hecqet B, Economopoulos T, Copplestone A, Mahi B, Couteaux ME, Resegotti L, Voglova V, Foussard C, Pegouric B, Michaux JL, Deconick E, Stoppa AM, Mufti G, Oscier D, Fenaux P: A randomized trial of hydroxyurea vs VP 16 in adult chronic myelomonocytic leukemia. *Blood* 1996; 88: 2480-2487.
161. Raza A, Qawi H, Lisak L, et al: Patients with myelodysplastic syndromes benefit from palliative therapy with amifostine, pentoxifylline, and ciprofloxacin with or without dexamethasone. *Blood* 2000; 95:1580.
162. Molldrem JJ, Caples M, Mavroudis D, Plante M, Young NS, Barrett AJ: Antithymocyte globulin for patients with myelodysplastic syndrome. *British Journal of Haematology* 1997; 99:699-705.
163. Jonasova A, Neuwirtova R, Cermak J et al: Cyclosporin A therapy in hypoplastic MDS patients and certain refractory anaemias without hypoplastic bone marrow. *Br J Haematol* 1998; 100:304.
164. Fenaux P, Morel P, Rose C, Lai JL, Jouet JP, Bauters F: Prognostic factors in adult de novo myelodysplastic syndromes treated by intensive chemotherapy. *Br J Haematol* 1991; 77:497.



165. Estey E, Thall P, Beran M, Kantarjian h, Pierce S, Keating M.: Effect of diagnosis (refractory anemia with excess blasts, refractory anemia with excess blasts in transformation, or acute myeloid leukemia (AML)) on outcome of AML-type chemotherapy. *Blood* 1997; 90: 2969.
166. Parker JE, Pagliuca A, Cullis JO, et al: Fludarabine, cytarabine, G-CSF and idarubicin (FLAG-IDA) for the treatment of poor risk myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemia. *Br J Haematol* 1997; 99:939.
167. Ferrara F, Leoni F, Pinto A et al: Fludarabine, Cytarabine and granulocyte-colony stimulating factor for the treatment of high risk myelodysplastic syndromes. *Cancer* 1999; 86: 2006-2013.
168. Beran M, Estey E, O' Brien S et al: Topotecan and cytarabine is an active combination regimen in myelodysplastic syndromes and chronic myelomonocytic leukemia. *J Clin Oncol* 1999; 17: 2819-2830.
169. Tricot G, Boogaerts M: The role of aggressive chemotherapy in the treatment of the myelodysplastic syndromes. *Br J Haematol* 1986; 63: 477-83.
170. Wattel E, De Botton S, Lai JL, Fenaux P: Longterm follow-up of de novo myelodysplastic syndromes treated with intensive chemotherapy: incidence of longterm survivors and outcome of partial responders. *Br J Haematol* 1997; 98: 983-91.
171. Witherspoon RP, Deeg HL: Allogeneic bone marrow transplantation for secondary leukemia or myelodysplasia. *Haematologica* 1999; 84: 1085-1087.
172. Yakoub-Agha I, De La Salmomniere P, Ribaud P et al: Allogeneic bone marrow transplantation for therapy related myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukemia: A long-term study of 70 patients-Report of the French Society of Bone Marrow Transplantation. *J Clin Oncol* 2000; 18: 963-971.
173. Deeg HJ, Shulman HM, Anderson E et al: Allogeneic and synergeic marrow transplantation for myelodysplastic syndrome in patients 55-66 years of age. *Blood* 2000; 95: 1188-1194.
174. De Witte T, Zwaan F, Hermans J: Allogeneic bone marrow transplantation for secondary leukaemia and myelodysplastic syndrome. A survey by the Leukemia working party of EBMT. *Br J Haematol* 1990;74:151-5.



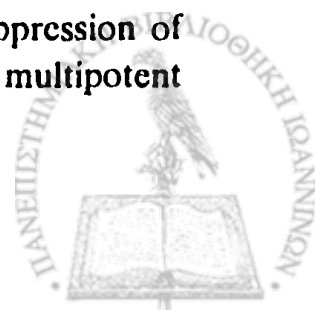
175. Arnold R, De Witte T, Van Biezen A et al: Unrelated bone marrow transplantation in patients with myelodysplastic syndromes and secondary acute myeloid leukemia: an EBMT survey. *Bone Marrow Transplant* 1998; 21: 1213-1216.
176. Anderson JE, Thomas ED: The Seattle experience with bone marrow transplantation for myelodysplasia. *Leuk Res* 1997;21s:51.
177. Anderson JE, Anasetti C, Appelbaum FR: Unrelated donor bone marrow transplantation for myelodysplasia and MDS-related acute myeloid leukemia. *Br J Haematol* 1996; 93: 59-67.
178. Demuyneck H, Verhoef G, Emonds MP, Van der Schueren E, Vandenberghe P, Boogaerts M: Treatment of a patients with myelodysplastic syndromes with allogeneic bone marrow transplantation from genotypically HLA-identical siblings and alternative donors. *Bone marrow Transplant* 1996; 17: 745-51.
179. Castro-Malaspina H, Collins JER, Gajewski J et al: Unrelated donor transplantation for myelodysplastic syndromes. *Blood* 1997; 90 (suppl 1): 106a.
180. Bjerke J, Anasetti C, Gooley T et al: Unrelated donor bone marrow transplantation for refractory anemia. *Blood* 1998; 92 (suppl 1): 142a.
181. Wattel E, Solary E, Leleu X, et al: A prospective study of autologous bone marrow or peripheral blood stem cell transplantation after intensive chemotherapy in myelodysplastic syndromes. *Leukemia* 1999; 13: 524-529.
182. De Witte T, Van Biezen A, Hermans J et al: Autologous bone marrow transplantation for patients with myelodysplastic syndromes or acute myeloid leukemia following MDS. *Blood* 1997; 90:3853-7.
183. Demuyneck H, Delforge M, Verhoef G, Zachee P, Vandenberghe P, Boogaerts M: Feasibility of peripheral blood progenitor cell harvest and transplantation in patients with poor risk myelodysplastic syndromes. *Br J Haematol* 1996; 92: 351-9.
184. Delforge M, Demuyneck H, Vandenberghe P, Boogaerts M: Polyclonal primitive hematopoietic progenitors can be detected in mobilized peripheral blood from patients with high-risk myelodysplastic syndromes. *Blood* 1995; 86:3660-7.
185. Carrella AM, Dejana A, Lerma E: In vivo mobilisation of karyotypically normal peripheral blood progenitor cells in high risk MDS,



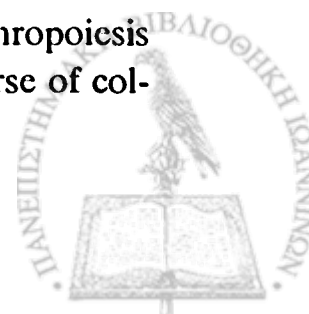
- secondary or therapy-related acute myelogenous leukemia. *Br J Haematol* 1996; 95: 127-30.
186. Till JE, McCulloch EA: A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. *Radiat Res* 14: 213, 1961.
187. Pluznik DH, Sachs L: The cloning of normal "mast" cells in tissues cultures. *J Cell Comp Physiol* 66:319, 1965.
188. Bradley TR, Metcalf D: The growth of bone marrow cells in vitro. *Aust J Exp Biol Med Sci* 44:287, 1966.
189. Wolf NS, Trentin JJ: Hemopoietic colony studies. Effect of hemopoietic organ stroma on differentiation of pluripotent stem cells. *J Exp Med* 127:205, 1968.
190. Dexter TM, Allen TD, Lajtha LG: Conditions controlling the proliferation of haemopoietic stem cells in vitro. *J Cell Physiol* 91:335, 1976.
191. Botnick LE, Hannon EC, Hellman S: Nature of the hematopoietic stem cell compartment and its proliferative potential. *Blood Cells* 5:195, 1979.
192. Civin CI, Strauss LC, Brovall C et al: Antigenic analysis of haemopoiesis. III. A hematopoietic progenitor cell surface antigen defined by a monoclonal antibody raised against KG-1a cells. *J Immunol* 133: 157, 1984.
193. Berenson RJ, Andrews RG, Bensinger WI et al: Antigen CD34+ marrow cells engraft lethally irradiated baboons. *J Clin Invest* 81: 951, 1988.
194. Srour EF, Brandt JE, Briddell RA et al: Human CD34+ HLA-DR bone marrow cells contain progenitor cells capable of self-renewal, multilineage differentiation and long-term in vitro hematopoiesis. *Blood Cells* 17:287, 1991.
195. Williams DA: In search of the self renewing hematopoietic stem cell. *Blood Cells* 17:296, 1991.
196. Gartner S, Kaplan HS: Long term culture of human bone marrow cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 77: 4756, 1980.
197. Siminovitch L, Till JE, McCulloch EA: The distribution of colony-forming cells among spleen colonies. *J Cell Comp Physiol* 62:327, 1963.
198. Clark SC, Kamen R: The human hematopoietic colony-stimulating factors. *Science* 236: 1229, 1987.



199. Williams DA: Ex vivo expansion of hematopoietic stem cell and progenitor cells-robbing Peter to pay Paul? *Blood* 81: 3169, 1993.
200. Escary JL, Perreau J, Dumenil D et al: Leukaemia inhibitory factor is necessary for maintenance of haematopoietic stem cells and thymocyte stimulation. *Nature* 363:361, 1993.
201. Weissman I, Papaioannou V, Gardner R: Fetal hematopoietic origins of the adult hematolymphoid system. p371. In Clarkson B, Marks PA, Till JE (eds): *Differentiation of Normal and Neoplastic Hematopoietic cells*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, 1978.
202. Moore MAS, Metcalf D: Ontogeny of the haematopoietic system: yolk sac origin of in vivo and in vitro colony forming cells in the developing mouse embryo. *Br J Haematol* 18:279, 1970.
203. Tyan ML: Studies of the ontogeny of the mouse immune system. I. Cell bound immunity. *Journal of Immunol* 100:535, 1968.
204. Trentin JJ, Curry JC, Wolf N, Chen V: Factors controlling stem cell differentiation and proliferation: the hematopoietic inductive microenvironment p 713. In *The proliferation and spread of neoplastic cells*. M.D. Anderson Hospital 21st Annual symposium of Fundamental Cancer research, Baltimore, Williams and Wilkins, Baltimore, 1967.
205. Weilbacher K, Weissman I, Blume K, Heimfeld S: Culture of phenotypically defined hematopoietic stem cells and other progenitors at limiting dilution on Dexter monolayers. *Blood* 78: 945, 1991.
206. Weiss L: The hematopoietic microenvironment of the bone marrow: an ultrastructural study of the stroma in rats. *Anat Rec* 186:161, 1976.
207. Gimble JM: The function of adipocytes in the bone marrow stroma. *New Biol* 2:304, 1990.
208. Tavassoli M: Marrow adipose cells and hemopoiesis: an interpretative review. *Exp Hematol* 12:139, 1984.
209. Till JE, McCulloch EA, Hemopoietic stem cell differentiation. *Biochim. Biophys. Acta* 605: 431, 1980.
210. Ogawa M, Porter PN, Nakahata T: Renewal and commitment to differentiation of hemopoietic stem cells. *Blood* 61:823,1983.
211. Fairbairn LJ, Cowling GJ, Reper BM, Dexter TM: Suppression of apoptosis allows differentiation and development of a multipotent



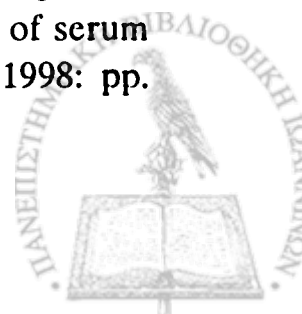
- hemopoietic cell line in the absence of added growth factor. *Cell* 74: 823, 1993.
212. Testa NG: Structure and regulation of the erythroid system at the level of progenitor cells. *CRC Crit Rev Oncol Hematol* 9:17, 1989.
213. Stephenson JR, Axelrad AA, McLeod DL, et al: Induction of colonies of hemoglobin synthesising cells by erythropoietin in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA* 68: 1542, 1971.
214. Gregory CJ, Eaves AC. Human marrow cells capable of erythropoietic differentiation in vitro: definition of three erythroid colony response. *Blood* 49: 855, 1977.
215. Metcalf D, Moore MAS. Hematopoietic cells. In Neuberger A, Tatum EL (eds): *Frontiers of biology* Vol. 25. North-Holland, Amsterdam, 1971.
216. Sawada K et al: Purification of human blood burst forming units-erythroid and demonstration of the evolution of erythropoietin receptors. *J Cell Physiol* 142: 219, 1990.
217. Emerson SG, Sieff CA, Wang EA, et al: Purification of fetal hematopoietic progenitors and demonstration of recombinant multipotential colony stimulating activity. *J Clin Invest* 76: 1286, 1985.
218. Emerson SG, Thomas S, Ferrara JL, Greenstein JL: Developmental regulation of erythropoiesis by hematopoietic growth factors: analysis on population of BFU-E from bone marrow, peripheral blood and fetal liver. *Blood* 74: 49, 1989.
219. Clark BJ, Housman D; Characterization of an erythroid precursor cell of high proliferative capacity in normal peripheral blood. *Proc Acad Sci USA* 74: 1105, 1977.
220. Gregory CJ, Tepperman AD, McCulloch EA, Till JE: Erythropoietin progenitors capable of colony formation in culture: Response of normal and genetically anemic W/W^w mice to manipulations of the erythron. *J Cell Physiol* 84:1, 1974.
221. Ogawa M, Parnley TR, Bank LH, Spicer SS: Human marrow erythropoiesis in culture. I Characterization of methylcellulose colony assay. *Blood* 48: 407, 1976.
222. Tepperman AD, Curtis JE, McCulloch EA: Erythropoietin colonies in culture of human marrow. *Blood* 44: 659, 1974.
223. Ogawa M, MacEachern DM, Avila L: Human marrow erythropoiesis in culture. II. Heterogeneity in the morphology time course of col-



- ony formation and sedimentation velocities of the colony forming cells. *Am J Hematol* 3: 29, 1977.
224. Van Zant G, Goldwasser E: Competition between erythropoietin and colony stimulating factor for target cells in mouse marrow. *Blood* 53: 946, 1979.
225. Gregory CJ, Eaves AC: Three stages of erythropoietic progenitor cell differentiation distinguished by a number of physical and biologic properties. *Blood* 51: 527, 1978.
226. Braun JL, Greenberg HM, Robinson SH: Hemopoietic progenitor cells in short term culture. Effects of erythropoietin and endotoxin contamination of erythropoietin preparations. *Exp Hematol* 7: 189, 1979.
227. Sawada K et al: Human colony forming-units-erythroid do not require accessory cells, but do require direct interaction with insulin like growth factor I and/or insulin for erythroid development. *J Clin Invest* 83: 1701, 1989.
228. Sawada K et al: Purification of human blood burst-forming-units-erythroid and demonstration of specific binding of erythropoietin. *J Clin Invest* 80: 357, 1987.
229. Bernstein A, Forrester L, Reith AD et al: The murine W/c-kit and Steel loci and the control of hematopoiesis. *Semin Hematol* 28: 138, 1991.
230. Leary AG, Ogawa M: Blast cell colony assay for umbilical cord blood and adult bone marrow progenitors. *Blood* 69:953, 1987.
231. Sieff CA: Membrane antigen expression during hemopoietic differentiation. *CRC Crit Rev Oncol Hematol* 5:1, 1986.
232. Torok-Storb B: Cellular Interactions. *Blood* 72: 373, 1988.
233. Sawada K, Kranz SB, Dai CH et al: Purification of human blood burst forming units-erythroid and demonstration of the evolution of erythropoietin receptors abstracted. *Exp Hematol* 17:513, 1989.
234. Broudy VC, Lin N, Brice M et al: Erythropoietin receptors (EpoR) on normal human erythroid precursor cells, abstracted. *Blood* 74:266, 1989.
235. Sawyer ST, Krantz SB: Transferrin receptor number, synthesis and endocytosis during erythropoietin induced maturation of Friend virus infected erythroid cells. *J Biol Chem* 261:9187, 1986.
236. Glass J et al: Transferrin receptors, iron transport and ferritin metabo-



- lism in Friend erythroleukemia cells. *Biochim Biophys Acta* 542: 154, 1978.
237. Cotner T, Das Gupta A, Ppayannopoulou T, Stamatoyannopoulos G: Characterization of a novel form of transferrin receptor preferentially expressed on normal erythroid progenitors and precursors. *Blood* 73: 214, 1989.
238. Hillman RS.: Characteristics of marrow production and reticulocytes maturation in normal man in response to anemia. *J Clin Invest* 48: 443, 1969.
239. Song SA, Groom AC: Sequestration and possible maturation of reticulocytes in the normal spleen. *Can J Physiol Pharmacol* 50: 400, 1972.
240. Hakomori SI: Blood group ABH and Ii antigen of human erythrocytes: chemistry, polymorphism and their developmental change. *Semin Hematol* 18:39,1981.
241. Nienhuis AW, Benz EJ: Regulation of hemoglobin synthesis during the development of the red cell. *N Engl J Med* 297:1318, 1371, 1430, 1997.
242. Seligman PA, Klausner RD, Huebers HA: Molecular mechanisms of iron metabolism. p219. In Stamatoyannopoulos G, Nienhuis AW, Leder P, Majerus P (eds): *Molecular Basis on Blood diseases*. WB Saunders, Philadelphia, 1987.
243. Cazzola M, Mercuriali F, Brugnara C: Use of Recombinant Human Erythropoietin outside the setting of Uremia. *Blood* Vol 89, No12 (June 15) 1997, pp 4248-4267.
244. Dordal MS et al: The role of carbohydrate in erythropoietin action. *Endocrinology* 116:2293, 1985.
245. Koury ST, Bondurant MC, Koury MJ: Localization of erythropoietin-synthesizing cells in murine kidneys by in situ hybridization. *Blood* 71: 524, 1988.
246. Krantz SB: Erythropoietin. *Blood* 77: 419, 1991.
247. Goldberg MA, Dunnin SP, Bun HF: Regulation of the erythropoietin gene: Evidence that oxygen sensor is a heme protein. *Science* 242: 1412, 1988.
248. Cazzola M, Guarnone R, Cerani P, Centenara E, Rovati A, Beguin Y: Red cell precursors mass as an independent determinant of serum erythropoietin level. *Blood*, Vol 91 No. 6 (March 15), 1998: pp.



- 2139-2145.
249. Faquin WC, Scheider TJ, Goldberg MA: Effect of inflammatory cytokines on hypoxia-induced erythropoietin production. *Blood* 79: 1987, 1992.
250. Miller CB, Jones RJ, Piantadosi S, Abeloff MD, Spivak JL: Decreased erythropoietin response in patients with anemia of cancer. *NEJM* 322:1689, 1990.
251. Smith DH, Goldwasser E, Vokes EE: Serum immunocrythropoietin levels in patients with cancer receiving cisplatin-based chemotherapy. *Cancer* 68:1101, 1991.
252. Wang Z, Goldberg M, Scadden D: HIV-1 suppresses erythropoietin production in vitro. *Exp Hematol* 21:683, 1993.
253. Koury MJ, Bondurant MC: Control of red cell production: the role of programmed cell death (apoptosis) and erythropoietin. *Transfusion* 30:673, 1990.
254. D' Andrea AD, Lodish HF, Wong GG. Expression cloning of the murine erythropoietin receptor. *Cell* 57: 277, 1989.
255. Todokoro K, Kanazawa S, Amanuma H, Ikawa Y: Specific binding of erythropoietin to its receptor on responsive mouse erythroleukemia cells. *Proc Nat Acad Sci USA* 84:4126, 1987.
256. Yi T et al: Hematopoietic cell phosphatase associates with erythropoietin receptor after Epo-induced receptor tyrosine phosphorylation: identification of potential binding sites. *Blood* 85:87, 1995.
257. Sharlow ER, Pacifici R, Crouse J, Batac J, Todokoro K, Wojchowski DM: Hemopoietic cell phosphatase negatively regulates erythropoietin-induced homoglobinization in erythroleukemic SKT6 cells. *Blood* 90: 2175, 1997.
258. Cazzola M, Ponchio L, de Benedetti F, Ravelli A, Rosti V, Beguin Y, Invernizzi R, Barosi G, Martini A: Defective iron supply for erythropoiesis and adequate endogenous erythropoietin production in the anemia associated with systemic-onset juvenile chronic arthritis. *Blood* 87: 4824, 1996.
259. Greenberg P.L. and Mara B.: The preleukemic syndrome. Correlation of in vitro parameters of granulopoiesis with clinical features. *American Journal of Medicine* 1979; 66:951-958.
260. Greenberg P.L.: In-vitro culture techniques defining biologic abnormalities in the myelodysplastic syndromes and myeloproliferative



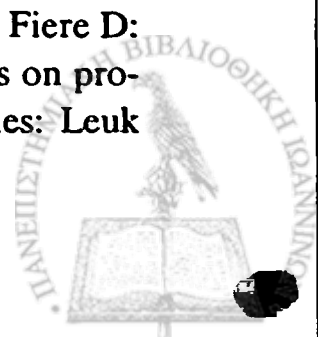
- disorders. *Clinics in Haematology* 1986; 15:973-993.
261. Greenberg P.L.: Biology and Clinical implications of marrow culture studies in myelodysplastic syndromes. *Seminars in Hematology* 1996; 33:163-175.
 262. Asano H, Hotta T, Ichihara M, Murate T, Kobayashi M, Saito H: Growth analysis of marrow CD34-Positive Hematopoietic progenitor cells in patients with Myelodysplastic syndromes. *Leukemia*, vol 8, No 5, 833-838, 1994.
 263. Junoven E, Ruutu T: Effect of culture conditions on in vitro erythroid colony formation in myelodysplastic syndromes. *Exp Haematol*, 1990; 18: 1070-1072.
 264. Juvonen E, Aimolahti A, Violin L, Ruutu T: The prognostic value of in vitro cultures of erythroid and megakaryocyte progenitors in myelodysplastic syndromes. *Leuk Res* 1999 Oct; 23(10):889-94.
 265. Amato D, Khan NR: Erythroid burst formation in cultures of bone marrow and peripheral blood from patients with refractory anemia. *Acta Haematol* 1983;70:1-10.
 266. Chui DHK, Clarke BJ: Abnormal erythroid progenitor cells in human preleukemia. *Blood* 1982; 60: 362-367.
 267. Ruutu T, Partanen S, Lintula R, Teerenhovi L, Knuutila S: Erythroid and granulocyte-macrophage colony formation in myelodysplastic syndromes. *Scand J Haematol* 1984;32:395.
 268. Haak HL, Kerkhofs H, van der Linden JSM, Schonewille H, Gonggrijp van der Sanden-van der Meer Hs, Hermans J: Significance of in vitro cultures in myelodysplastic syndromes. *Scand J Haematol* 1986; 37:380.
 269. Merchav S, Nagler A, Fleischer-Kurtz G, Tatarsky I: Regulatory abnormalities in the marrow of patients with myelodysplastic syndromes: *Br J Haematol* 1989;73:158-163.
 270. Morra L, Moccia F, Ponassi I, Bessone G, Mela GS, Ponassi GA: In vitro growth of erythroid progenitor cells (BFU-E) and production of burst-promoting activity (BPA) by T lymphocytes in patient with myelodysplastic syndromes. *Biomed Pharmacother* 1992; 46: 393.
 271. Dormer P, Schalhorn A, Wilmanns W, and Hershko C: Erythroid and myeloid maturation patterns related to progenitor assessment in myelodysplastic syndromes. *Br J Haematol* 67, 61-66, 1987.
 272. Sawada K, Sato N, Notoya A, Tarumi T, Yasukouchi T, Yamaguchi M,



- Kohno M, Mikuni C, and Koike T: Proliferation and differentiation of myelodysplastic CD34+ cells in serum free medium: II. Response to combined colony -stimulating factors. *Eur J Haematol* 1995; 54: 85-94.
273. Backx B, Broeders L, Touw I, Lowenberg B: Blast colony-forming cells in myelodysplastic syndrome: decreased potential to generate erythroid precursors. *Leukemia* 1993 Jan; 7(1): 75-9.
274. Brada S, de Wolf J, Hendriks D, Essenlink M, Ruiters M, Vellenga E: The supportive effects of Erythropoietin and Mast cell Growth factor on CD34⁺/CD36⁻ sorted bone marrow cells of myelodysplasia patients. *Blood* Vol 88, No 2: pp 505-510, 1996.
275. Merchav S, Nielsen OJ, Rosenbaum H, Sharon R, Brenner B, Tatarsky I, Scigalla P, Wiczorek L: In vitro studies of erythropoietin-dependent regulation of erythropoiesis in myelodysplastic syndromes. *Leukemia* 4: 771-774, 1990.
276. Merchav S, Wagemaker G, Souza LM, Tatarsky I: Impaired response of myelodysplastic marrow progenitors to stimulation with recombinant haemopoietic growth factors. *Leukemia* 1991;5:340-346.
277. Mayani H, Baines P, Bowen DI, Jacobs A: In vitro growth of myeloid and erythroid progenitor cells from myelodysplastic patients in response to recombinant granulocyte-macrophage colony stimulating factor. *Leukemia* 1988; 3: 29-32.
278. Verbeek W, Vehmeyer K, Wormann B, Hiddemann W: The effect of stem-cell factor, interleukin-3, and erythropoietin on in vitro erythropoiesis in myelodysplastic syndromes. *J Cancer Res Clin Oncol* 1995;121(6):338-42.
279. Sawada K, Sato N, Tarumi T, Sakai N, Koizumi K, Sakurama S, Ieko M, Yasukouchi T, Koyanagawa Y, Yamaguchi M, Ohmoto A, Kohno M, and Koike T: Proliferation and differentiation of myelodysplastic CD34+ cells in serum free medium: response to individual colony-stimulating factors. *Br. J. of Haematology*, 83, 349-358, 1993.
280. Mittelman M, Gardyn J, Carmel M, Malovani H, Barak Y, Nir U: Analysis of the erythropoietin receptor gene in patients with myeloproliferative and myelodysplastic syndromes. *Leukemia Research* Vol. 20 No, 6: 459-466, 1996.
281. Backx B, Broeders L, Hoefsloot L, Wognum B and Lowenberg B:

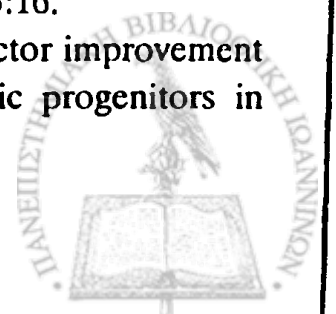


- Erythropoiesis in myelodysplastic syndrome: expression of receptors for erythropoietin and kit ligand. *Leukemia* 10, 466-472, 1996.
282. Hoefsloot L., Amelsvoort M., Broeders L., Plas D., Lom K., Hoogerbrugge H., Touw I., Lowenberg B.: Erythropoietin-induced activation of STAT5 is impaired in the myelodysplastic syndrome. *Blood*, Vol 89, No 5, 1997: 1690-1700.
283. Fontenay-Roupie M, Bouscary D, Guesnu et al: Ineffective erythropoiesis in myelodysplastic syndromes: correlation with Fas expression but not with lack of erythropoietin receptor signal transduction. *Br J Haematol* 1999 Aug; 106(2):464-73.
284. Isnard F, Najman A, Jaar B, Feanaux P, Baillou C, Khoury E, Labopin M, Laporte J-P, Woler M, and Gorin N-C: Efficacy of recombinant human erythropoietin in the treatment of refractory anemias without excess of blasts in myelodysplastic syndromes. *Leukemia and Lymphoma*, Vol 12, pp 307-314, 1994.
285. Sawada K, Sato N, Notoya A, Tarumi T, Hiramaya S, Takano H, Koizumi K, Yasukouchi T, Yamaguchi M, and Koike T: Proliferation and differentiation of myelodysplastic CD34+ cells: Phenotypic Subpopulations of marrow CD 34+ cells. *Blood*, Vol 85, No1, pp 194-202, 1995.
286. Greenberg PL, Negrin RS, Ginzton N: In vitro-in vivo correlations of erythroid responses to G-CSF plus erythropoietin in myelodysplastic syndromes. *Exp Hematol* 20:733,1992.
287. Jacobs A, Janowska-Wieczorek A, Caro J, Bowen DT, Lewis T: Circulating erythropoietin in patients with myelodysplastic syndromes. *Br J Haematol* 73:36, 1989.
288. Bowen D, Culligan D, Beguin Y, Kendall R, and Willis N: Estimation of effective and total erythropoiesis in myelodysplasia using serum transferrin receptor and erythropoietin concentrations with automated reticulocyte parameters. *Leukemia*, Vol 8, No 1, 151-155, 1994.
289. Bowen DT, Jacobs A, Mary P, Cotes P.M and Lewis T: Serum erythropoietin and erythropoiesis in patients with myelodysplastic syndromes. *Eur J Haematol* 44: 30, 1990.
290. Thomas X, Guyotat D, Campos L, Shi ZH, Vila L, Ehram A, Fiere D: In vitro effects of recombinant hemopoietic growth factors on progenitor cells from patients with myelodysplastic syndromes: *Leuk*



Res 1991; 15:29.

291. Stein RS, Abels RS, Krantz SB: Pharmacological doses of recombinant human erythropoietin in the treatment of myelodysplastic syndromes; *Blood* 78, 1658-1663, 1991.
292. Bessho M, Jinnai I, Matsuda A, Saito M, Hirashima K: Improvement of anaemia by recombinant human erythropoietin in patients with myelodysplastic syndromes and aplastic anaemia. *Int J Cell Cloning* 8; 445, 1990.
293. Hellstrom E, Birgegard G, Lockner D, Helmers C, Ost A, Wide L: Treatment of myelodysplastic syndromes with recombinant human erythropoietin. *Eur J Haematol* 47:355, 1991.
294. Aoki I, Higashi K, Homori M, Chikazawa H, Ishikawa K: Responsiveness of bone marrow erythropoietic stem cells (CFU-E and BFU-E) to recombinant human Erythropoietin in vitro in aplastic anemia and Myelodysplastic syndromes. *American Journal of Haematology* 35: 6-12, 1990.
295. Stenke L, Wallvik J, Celsing F, Hast R: Prediction of response to treatment with human recombinant erythropoietin in myelodysplastic syndromes. *Leukemia* 7: 1324, 1993.
296. Hellstrom-Lindeberg E: Efficacy of erythropoietin in myelodysplastic syndromes: a meta- analysis of 205 patients from 17 studies. *Br J Haematol* 1995, 89, 67-71.
297. Goy A, Belanger C, Casadevall N, Picard F, Guesnu M, Jaulmes D, Poisson D and Varet B: High doses of intravenous recombinant erythropoietin for the treatment of anaemia in myelodysplastic syndrome. *Br J Haematol*, 84, 232-237, 1993.
298. Backx B, Broeders L, Lowenberg B: Kit Ligand improves in vitro erythropoiesis in myelodysplastic syndromes. *Blood*, Vol 80, No 5, 1992: 1213-1217.
299. Masters GS, Baines P, Tang C, Bowen D, Burnett AK: Responsiveness to stem cell factor of peripheral blood colony-forming cells from patients with myelodysplastic syndromes. *Leuk Res* 1995; 19: 561.
300. Coutinho LH, Geary CG, Chang J, Harrison C, Testa NG: Functional studies of bone marrow haemopoietic and stromal cells in the myelodysplastic syndrome. *Br J Haematol* 1990; 75:16.
301. Piacibello W, Sanavio F, Bresso P, et al: Stem cell factor improvement of proliferation and maintenance of hemopoietic progenitors in



- myelodysplastic syndromes. *Leukemia* Vol 8, No2, 1994: 250-257.
302. Schouten HC, Vellenga E, van Rhenen DJ, de Wolf JT, Coppens PJ, Blijham GH: Recombinant human erythropoietin in patients with myelodysplastic syndromes. *Leukemia* 5:432, 1991.
303. Bowen DT, Culligan D, Jacobs A: The treatment of anaemia in myelodysplastic syndromes with recombinant human erythropoietin. *Br J Haematol* 77: 419-423, 1991.
304. Rose E, Abels R, Nelson A, McCulloch D and Lessin L: The use of r-HuEpo in the treatment of anemia related to myelodysplasia (MDS). *Br. J Haematology*, 89, 813-837, 1995.
305. Italian Cooperative Study Group for rHuEpo in Myelodysplastic syndromes: A randomised double-blind placebo-controlled study with subcutaneous recombinant human erythropoietin in patients with low-risk myelodysplastic syndromes. *Br J Haematol* 1998, 103, 1070-1074.
306. Rodriguez JN, Dieguez JC, Muniz R, Martino ML, Fernandez-Jurado A, Amian A, Canavate M, Prados D: Eritropoyetina recombinante humana en el tratamiento de la anemia de los sindromes mielodisplasicos. Estudio Metaanalitico. *Sangre (Barcelona)* 39, 435-439, 1994.

