



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ
ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΟΣ ΤΟΜΕΑΣ
ΑΙΜΑΤΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ

**Η ΑΝΟΣΟΡΡΥΘΜΙΣΗ ΣΕ ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ ΟΞΕΙΑ
ΛΕΥΧΑΙΜΙΑ ΚΑΤΑ ΤΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ ΚΑΙ ΤΗΝ
ΥΠΟΛΕΙΜΜΑΤΙΚΗ ΝΟΣΟ**

ΠΑΝΑΓΙΩΤΑ ΠΕΤΣΑ

ΙΑΤΡΟΣ ΑΙΜΑΤΟΛΟΓΟΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2018



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ
ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΟΣ ΤΟΜΕΑΣ
ΑΙΜΑΤΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ

**Η ΑΝΟΣΟΡΡΥΘΜΙΣΗ ΣΕ ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ ΟΞΕΙΑ
ΛΕΥΧΑΙΜΙΑ ΚΑΤΑ ΤΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ ΚΑΙ ΤΗΝ
ΥΠΟΛΕΙΜΜΑΤΙΚΗ ΝΟΣΟ**

ΠΑΝΑΓΙΩΤΑ ΠΕΤΣΑ

ΙΑΤΡΟΣ ΑΙΜΑΤΟΛΟΓΟΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2018

Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από το Τμήμα Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνωμών του συγγραφέα Ν. 5343/32, άρθρο 202, παράγραφος 2 (νομική κατοχύρωση του Ιατρικού Τμήματος).

Ημερομηνία αίτησης της κ. Πέτσα Παναγιώτας: 30-9-2009

Ημερομηνία ορισμού Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής: 670^α/3-11-2009

Μέλη Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:

Επιβλέπων

Μπουραντάς Κωνσταντίνος, Καθηγητής Παθολογίας-Αιματολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Μέλη

Γεωργίου Ιωάννης Καθηγητής Ιατρικής Γενετικής και Υποβοηθούμενης Αναπαραγωγής της Μαιευτικής-Γυναικολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Τσιάρα Σταυρούλα, Επίκουρη Καθηγήτρια Παθολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Ημερομηνία ορισμού θέματος: 27-11-2009

«Η ανοσορύθμιση σε ασθενείς με Οξεία Λευχαιμία κατά την διάγνωση και την υπολειμματική νόσο»

ΟΡΙΣΜΟΣ ΕΠΤΑΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ 873^α/13-11-2018

Γεωργίου Ιωάννης	Καθηγητής Ιατρικής Γενετικής και Υποβοηθούμενης Αναπαραγωγής της Μαιευτικής -Γυναικολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Μπουραντάς Κωνσταντίνος	Ομότιμος Καθηγητής Παθολογίας-Αιματολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Χαλιάσος Νικόλαος	Καθηγητής Παιδιατρικής του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Χρήστου Λεωνίδας	Καθηγητής Παθολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Τσιάρα Σταυρούλα	Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Παθολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Καψάλη Ελένη	Επίκουρη Καθηγήτρια Αιματολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Παπούδου-Μπάη Αλεξάνδρα,	Επίκουρη Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Έγκριση Διδακτορικής Διατριβής με βαθμό «ΑΡΙΣΤΑ» στις 21-11-2018

ΠΡΟΕΔΡΟΣ ΤΟΥ ΤΜΗΜΑΤΟΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

Άννα Μπατιστάτου

Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομικής



Η Γραμματέας του Τμήματος

ΜΑΡΙΑ ΚΑΠΙΤΟΠΟΥΛΟΥ

Στην οικογένειά μου

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα διατριβή εκπονήθηκε στην Ερευνητική Μονάδα Μοριακής Βιολογίας του Αιματολογικού Εργαστηρίου του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Ιωαννίνων υπό την επίβλεψη του Ομότιμου Καθηγητή Παθολογίας – Αιματολογίας κ. Κωνσταντίνου Μπουραντά.

Επιθυμώ να εκφράσω τις θερμότερες ευχαριστίες μου στον επιβλέποντα καθηγητή κ. Μπουραντά Κωνσταντίνο, ο οποίος από τα φοιτητικά μου χρόνια με έφερε σε επαφή με το αντικείμενο της Αιματολογίας και μετά το πέρας των σπουδών μου με εμπιστεύτηκε και με τίμησε με την ανάθεση της παρούσας διδακτορικής διατριβής. Η βοήθεια και η καθοδήγησή του ήταν πολύτιμη καθ' όλη τη διάρκεια της εκπόνησης της διατριβής. Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω τον κ. Γεωργίου Ιωάννη, καθηγητή Ιατρικής Γενετικής και Υποβοηθούμενης Αναπαραγωγής της Μαιευτικής και Γυναικολογίας και την κα Τσιάρα Σταυρούλα, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Παθολογίας, για τη συμβολή τους και την άριστη συνεργασία κατά την εκπόνηση της παρούσας διατριβής.

Τις ευχαριστίες μου θα ήθελα να εκφράσω και στον κ. Βαρθολομάτο Γεώργιο, επιστημονικό υπεύθυνο της Ερευνητικής Μονάδας Μοριακής Βιολογίας, ο οποίος έδωσε στέγη στα πειράματά μου και ήταν πάντα πρόθυμος να συμβάλλει με το επιστημονικό του υπόβαθρο και την εμπειρία του στην κυτταρομετρία ροής στην επίλυση των όποιων προβλημάτων ανέκυπταν. Ο ίδιος μαζί με τους συνεργάτες του, Καραμούτσιο Αχιλλέα και Πέτσιου Ασημίνα, στάθηκαν στο πλευρό μου στα πρώτα μου βήματα στην κυτταρομετρία ροής και η βοήθειά τους ήταν πολύτιμη.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένεια μου για την πολύπλευρη στήριξη που μου παρείχαν όλα αυτά τα χρόνια και χωρίς τη συμβολή τους δε θα ήταν εφικτή η ολοκλήρωση της παρούσας διατριβής.

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ	- 5 -
1. ΑΝΟΣΟΡΡΥΘΜΙΣΗ	- 7 -
1.1 ΟΡΓΑΝΑ ΑΝΟΣΟΠΟΙΗΤΙΚΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ	- 7 -
1.2 ΚΥΤΤΑΡΑ ΑΝΟΣΟΠΟΙΗΤΙΚΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ	- 12 -
1.3 ΑΝΟΣΙΑΚΗ ΑΠΑΝΤΗΣΗ	- 40 -
2. ΟΞΕΙΑ ΛΕΥΧΑΙΜΙΑ	- 42 -
2.1 ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ	- 42 -
2.2 ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ	- 46 -
2.3 ΣΥΜΠΤΩΜΑΤΟΛΟΓΙΑ	- 46 -
2.4 ΟΞΕΙΑ ΜΥΕΛΟΓΕΝΗΣ ΛΕΥΧΑΙΜΙΑ (ΟΜΛ)	- 47 -
2.5 ΟΞΕΙΑ ΛΕΜΦΟΒΛΑΣΤΙΚΗ ΛΕΥΧΑΙΜΙΑ (ΟΛΛ)	- 51 -
3. ΕΛΑΧΙΣΤΗ ΥΠΟΛΕΙΜΜΑΤΙΚΗ ΝΟΣΟΣ	- 56 -
4. Τ- ΡΥΘΜΙΣΤΙΚΑ ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΑ	- 64 -
4.1 ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ ΔΡΑΣΗΣ Τ ΡΥΘΜΙΣΤΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ	- 78 -
4.2 ΣΗΜΑΝΤΙΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ ΤΩΝ Τ ΡΥΘΜΙΣΤΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ	- 86 -
4.3 ΑΝΟΣΟΦΑΙΝΟΤΥΠΙΚΗ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ Τ ΡΥΘΜΙΣΤΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ	- 96 -
4.4 Τ ΡΥΘΜΙΣΤΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ ΣΤΗΝ ΑΝΟΣΙΑ ΤΗΣ ΚΑΚΟΗΘΕΙΑΣ	- 98 -
4.5 Τ ΡΥΘΜΙΣΤΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ ΣΤΗΝ ΟΞΕΙΑ ΜΥΕΛΟΓΕΝΗ ΛΕΥΧΑΙΜΙΑ (ΟΜΛ)	- 103 -
4.6 Τ ΡΥΘΜΙΣΤΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ ΣΤΗΝ ΟΞΕΙΑ ΛΕΜΦΟΒΛΑΣΤΙΚΗ ΛΕΥΧΑΙΜΙΑ (ΟΛΛ)	- 113 -
-	-
5. ΣΚΟΠΟΣ	- 117 -
ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	- 118 -
6. ΑΣΘΕΝΕΙΣ	- 119 -
7. ΜΕΘΟΔΟΙ	- 120 -
7.1 ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΙΑ ΡΟΗΣ	- 120 -
7.2 ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ	- 126 -
8. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	- 127 -
9. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	- 133 -
10. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	- 137 -
11. ΠΕΡΙΛΗΨΗ	- 139 -
12. ABSTRACT	- 142 -
13. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	- 144 -
14. ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ	- 155 -
15. APPENDIX	- 157 -
15.1 ΕΙΚΟΝΕΣ	- 157 -
15.2 ΠΙΝΑΚΕΣ	- 159 -

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. ΑΝΟΣΟΡΡΥΘΜΙΣΗ

Στον όρο ανοσορρύθμιση εσωκλείονται όλοι εκείνοι οι ανοσολογικοί μηχανισμοί που συμβάλλουν στην επίτευξη και διατήρηση της ομοιόστασης του οργανισμού. Ο όρος ομοιόσταση υποδηλώνει μια κατάσταση ισορροπίας ανάμεσα στο πλήθος των ερεθισμάτων, εσωτερικά ή εξωτερικά, που δέχεται ένας οργανισμός. Η ισορροπία αυτή επιτυγχάνεται με αλλαγές στην ανοσολογική απάντηση, μέσω επαγωγής, έκφρασης, ενίσχυσης και καταστολής των ρυθμιστών του ανοσολογικού συστήματος.
[1]

1.1 ΟΡΓΑΝΑ ΑΝΟΣΟΠΟΙΗΤΙΚΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ

Τα όργανα του ανοσοποιητικού συστήματος διακρίνονται σε κεντρικά και περιφερικά. Στα κεντρικά περιλαμβάνονται ο μυελός των οστών και ο θύμος αδένας, ενώ τα περιφερικά συνίστανται από τους λεμφαδένες, το σπλήνα, το λεμφικό ιστό του γαστρεντερικού σωλήνος (GALT), το λεμφικό ιστό των βρόγχων (BALT) και το λεμφικό ιστό άλλων βλεννογόνων (MALT).

Στα κεντρικά λεμφικά όργανα γίνεται η παραγωγή και η ωρίμανση των λεμφοκυττάρων. Αφού τα τελευταία ωριμάσουν, εγκαταλείπουν τα κεντρικά λεμφικά όργανα και βγαίνουν στην κυκλοφορία. Συγκεκριμένα, επανακυκλοφορούν από το αίμα στη λέμφο και πάλι στο αίμα. Στην κυκλοφορία ωστόσο είναι δύσκολο ένα λεμφοκύτταρο να συναντήσει ένα αντιγόνο. Αυτή είναι και η δράση των περιφερικών λεμφικών οργάνων. Τα τελευταία συλλέγουν αντιγόνα είτε μέσω της λέμφου (λεμφαδένες) είτε μέσω του αίματος (σπλήνας) και τα εκθέτουν στα λεμφοκύτταρα.[2]

ΜΥΕΛΟΣ ΤΩΝ ΟΣΤΩΝ:

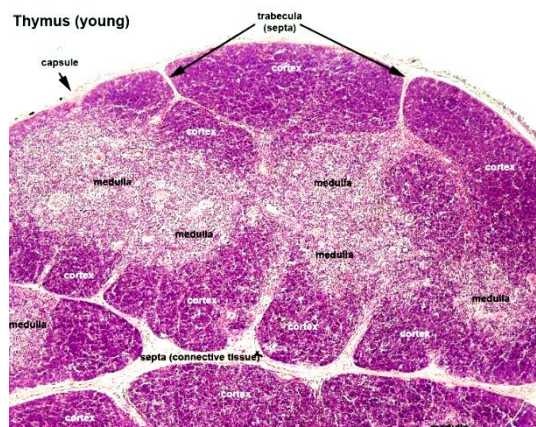
Ο μυελός των οστών καταλαμβάνει τις κοιλότητες όλων των οστών. Αποτελείται από αιμοποιητικά κύτταρα, λιποκύτταρα, οστεοβλάστες, οστεοκλάστες και κύτταρα του στρώματος. Συνίσταται στον ερυθρό μυελό, ο οποίος είναι ενεργός και παράγει όλα τα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος, και στον ωχρό μυελό, ο οποίος αποτελείται κυρίως από λιπώδη ιστό και είναι ανενεργός.

Στα πρώτα χρόνια της ζωής ο μυελός όλων των οστών είναι ερυθρός και κυτταροβριθής. Με την πάροδο της ηλικίας ωστόσο, μειώνεται η κυτταροβρίθεια του μυελού, δηλαδή μειώνεται η αναλογία των αιμοποιητικών κυττάρων προς τα λιποκύτταρα. Επίσης, ο ερυθρός μυελός εντοπίζεται μόνο στους σπονδύλους, στις πλευρές, στο στέρνο, στην κρανιακή κάψα, στην πύελο και στην επίφυση μηριαίου και βραχιονίου οστού.

Ωστόσο, όταν ο μυελός των οστών καθίσταται δυσλειτουργικός (όπως στην απλαστική αναιμία, σε διήθηση από κακοήγη κύτταρα ή σε υπερπαραγωγή μιας κυτταρικής σειράς) ή δεν μπορεί να ανταποκριθεί στις αυξημένες απαιτήσεις (για παράδειγμα στην αιμολυτική αναιμία), τότε ο σπλήνας, το ήπαρ και οι λεμφαδένες αναλαμβάνουν να παράγουν ανώριμα κύτταρα του αίματος (εξωμυελική αιμοποίηση). [3]

ΘΥΜΟΣ:

Ο θύμος είναι ένας αδένας που η κύρια λειτουργία του είναι η ωρίμανση των Τ λεμφοκυττάρων. Τα ανώριμα θυμοκύτταρα, γνωστά ως πρώιμοι πρόγονοι θυμοκυττάρου (ETPs), εγκαταλείπουν το μυελό των οστών και μεταναστεύουν στο θύμο για να διαφοροποιηθούν σε λειτουργικά Τ λεμφοκύτταρα, ικανά να μεταναστεύσουν στην περιφέρεια. [4,5] Δομικά ο θύμος περιβάλλεται από κάψα και αποτελείται από λόβια που διαχωρίζονται μεταξύ τους με διαφραγμάτια. Μέσα σε κάθε λόβιο βρίσκεται ένα σύνθετο πλέγμα επιθηλιακών και άλλων κυττάρων του στρώματος, που είναι υπεύθυνα για τη ρύθμιση της διαφοροποίησης των προθυμοκυττάρων σε ώριμα Τ κύτταρα. Η περιοχή κάτω από την κάψα του θύμου χωρίζεται στον περιφερικό φλοιό και τον κεντρικό μυελό. Ο φλοιός αποτελείται από ανώριμα θυμοκύτταρα, επιθηλιακά κύτταρα και δενδριτικά κύτταρα, με μεγάλη αναλογία των κυττάρων αυτών να αποπίπτουν. Αντιθέτως ο μυελός αποτελείται από ώριμα Τ λεμφοκύτταρα και επιθηλιακά κύτταρα.[6]



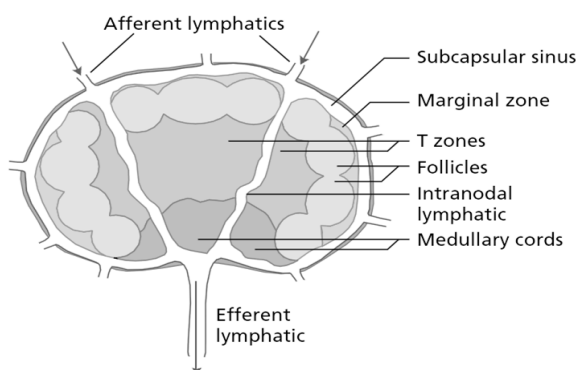
Εικόνα 1. Τα κύρια διαμερίσματα του θύμου. Τροποποιημένη εικόνα από Hill M.A. (157)

ΛΕΜΦΑΔΕΝΕΣ:

Οι λεμφαδένες είναι στερεά όργανα με κάψα που αποτελούνται από ποικίλο αριθμό κωνικών τμημάτων. Η βάση κάθε κώνου ακουμπά υποκάψια στο φλοιό και η κορυφή του στο μυελό. Οι κώνοι χωρίζονται μεταξύ τους από τους λεμφικούς κόλπους και

όλοι μαζί δίνουν το χαρακτηριστικό νεφροειδές σχήμα στο λεμφαδένα. Κάθε κώνος αποτελείται από τρεις κύριες ζώνες: το φλοιό, τις παραφλοιώδεις περιοχές (T ζώνες) και το μυελό. Ο φλοιός αποτελείται από Β λεμφοκύτταρα οργανωμένα σε λεμφοζήδια. Κάθε λεμφοζήδιο έχει στο κέντρο του μια διαυγή περιοχή που αποτελείται από ταχέως πολλαπλασιαζόμενα Β κύτταρα και ονομάζεται βλαστικό κέντρο. Στο βλαστικό κέντρο υπάρχουν επίσης μερικά Τ λεμφοκύτταρα, μακροφάγα και δενδριτικά κύτταρα. Το βλαστικό κέντρο περιβάλλεται από τη ζώνη του μανδύα, η οποία αποτελείται από μη πολλαπλασιαζόμενα Β λεμφοκύτταρα. Οι παραφλοιώδεις περιοχές αποτελούνται από Τ λεμφοκύτταρα και ο μυελός από μακροφάγα και πλασματοκύτταρα.[2]

Στους λεμφαδένες καταλήγουν πλούσια δίκτυα αγγείων που φέρουν τη λέμφο από τους επιχώριους ιστούς και ονομάζονται λεμφαγγεία. Η λέμφος αποτελεί την κύρια πηγή αντιγόνων για τον αδένα. Ενεργοποιημένα κύτταρα Langerhans αναλαμβάνουν να μεταφέρουν τα αντιγόνα μέσω της προσαγωγού λέμφου στους λεμφαδένες. Η προσαγωγός λέμφος διαπερνά τους υποκάψιους κόλπους και σχηματίζει μια λίμνη λέμφου, η οποία καλύπτει τη φλοιώδη επιφάνεια του αδένα. Από τους υποκάψιους κόλπους η λέμφος διαπερνά τις παραφλοιώδεις περιοχές και καταλήγει στο μυελό, στο απαγωγό λεμφαγγείο (Εικόνα 2). Στην πορεία της εντός του λεμφαδένα, η λέμφος διηθείται και κατακρατούνται όλα τα αντιγόνα που μεταφέρει. Με αυτόν τον τρόπο εκτίθενται τα αντιγόνα στα λεμφοκύτταρα που επανακυκλοφορούν από το αίμα, στους λεμφαδένες, στη λέμφο και πάλι στο αίμα. Το αίμα εισέρχεται και εξέρχεται από το λεμφαδένα μέσω του μυελού, ενώ τα εξειδικευμένα ενδοθηλιακά φλεβίδια, μέσω των οποίων τα επανακυκλοφορούντα Β και Τ κύτταρα και τα πρόσφατα παραχθέντα παρθένα Β κύτταρα εισέρχονται στον αδένα, εντοπίζονται στις παραφλοιώδεις περιοχές. [6]

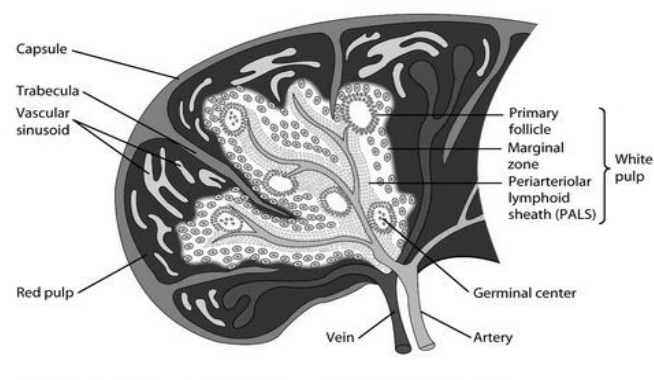


Εικόνα 2. Τα κύρια διαμερίσματα ενός λεμφαδένα. Τροποποιημένη εικόνα από Drayson MTet al. (158)

ΣΠΛΗΝΑΣ:

Ο σπλήνας είναι ένα συμπαγές όργανο που περιβάλλεται από ινώδη κάψα και διαιρείται σε τρία μέρη, τον ερυθρό πολφό, το λευκό πολφό και τη ζώνη μετάπτωσης. Αποτελείται από ένα πλαίσιο συνδετικού ιστού, λεμφικού ιστού, αγγεία και κυτταρικά στοιχεία του αιμοποιητικού και του δικτυοενδοθηλιακού συστήματος.[7,8]

Το αίμα φέρεται στο σπλήνα μέσω της σπληνικής αρτηρίας και από εκεί μέσω των κλάδων της, στις κεντρικές αρτηρίες που εντοπίζονται στο λευκό πολφό. Οι κεντρικές αρτηρίες διακλαδίζονται σε πολλά αρτηρίδια και τριχοειδή, τα οποία καταλήγουν συνήθως στο λευκό πολφό και σπανίως στον ερυθρό πολφό και στη ζώνη μετάπτωσης. Ο λεμφικός ιστός που περιβάλλει τα μικρά αρτηρίδια αποτελεί το λευκό πολφό.[9] (Εικόνα 3)



Εικόνα 3. Τα κύρια διαμερίσματα του σπλήνα. Τροποποιημένη εικόνα από Digikalla (159)

Ο ερυθρός πολφός καταλαμβάνει το μεγαλύτερο μέρος του σπλήνα και αποτελείται από κολποειδή και δοκίδες (δοκίδες Billoth). Οι δοκίδες αποτελούνται από δίκτυο ινοβλαστών και περιέχουν μακροφάγα και ερυθροκύτταρα. Στον ερυθρό πολφό διενεργείται η καταστροφή των ερυθροκυττάρων μέσω τριών μηχανισμών, το διαχωρισμό, τη φαγοκυττάρωση και τη συγκέντρωση. Ο διαχωρισμός είναι μια αναστρέψιμη διαδικασία και συνίσταται στην προσκόλληση των κυττάρων στο σύστημα των δοκίδων κατά τη δίοδό τους μέσα στο σπλήνα. Η φαγοκυττάρωση είναι μη αναστρέψιμη και επιτελείται από τα μακροφάγα, ενώ η συγκέντρωση αναφέρεται στις αυξημένες ποσότητες αίματος στο σπλήνα που βρίσκονται σε συνεχή ανανέωση μέσω της κυκλοφορίας.[6,10]

Ο λευκός πολφός συνίσταται από T και B λεμφοκυτταρικές αθροίσεις γύρω από τα αρτηριόλια. Τα T κύτταρα δημιουργούν ένα έλυτρο γύρω από τα αρτηριόλια, ενώ τα

B λεμφοκύτταρα εντοπίζονται σε βλαστικά κέντρα εντός του λευκού πολφού. Τα κύτταρα αυτά δεν συντίθενται στο σπλήνα αλλά μεταναστεύουν εκεί από το μυελό των οστών και το θύμο. Στο περιαρτηριακό λεμφικό έλυτρο (T ζώνη) τα T λεμφοκύτταρα αλληλεπιδρούν με δενδριτικά και B κύτταρα και μένουν στο σπλήνα μερικές ώρες, ενώ τα B κύτταρα σχηματίζουν θυλάκια και παράγουν ανοσοσφαιρίνες. Η σωστή οργάνωση και διατήρηση του λευκού πολφού ελέγχεται από ειδικές χημειοκίνες που προσελκύουν T και B κύτταρα σε αντίστοιχες περιοχές, ώστε να καθιερωθούν ειδικές ζώνες εντός του λευκού πολφού. [11]

Η ζώνη μετάπτωσης αποτελείται από δύο δακτυλιοειδείς σχηματισμούς μακροφάγων, έναν εξωτερικό και έναν εσωτερικό, καθένας από τους οποίους εκφράζει διαφορετικά μόρια προσκόλλησης και ανάμεσά τους μια ζώνη δενδριτικών και B κυττάρων. Η ζώνη μετάπτωσης συμβάλει τόσο στη φυσική όσο και στην ειδική ανοσία, αντίθετα με το λευκό πολφό που περιορίζεται στην ειδική (επίκτητη) ανοσία. [12-14]

Οι κύριες λειτουργίες του σπληνός είναι η αιμοποίηση, η απομάκρυνση κατεστραμμένων και γηρασμένων κυττάρων του αίματος, η αποθηκευτική λειτουργία, η αιμόσταση και η ανοσολογική λειτουργία. Η αιμοποίηση λαμβάνει χώρα στο σπλήνα έως το 2^ο τρίμηνο της κύησης, όπου αναλαμβάνει ο μυελός των οστών την αιμοποίηση. Ωστόσο η ικανότητα του σπληνός για αιμοποίηση παραμένει και ο σπλήνας αναλαμβάνει εκ νέου σε δύο καταστάσεις, σε ερυθροβλαστική υπερπλασία λόγω σοβαρής αναιμίας, όπως σε χρόνια αιμόλυση, μεγαλοβλαστική αναιμία και μείζονα θαλασσαιμία, και σε μυελοϊνώση ή μυελοειδή μεταπλασία όπως σε μυελογενή λευχαιμία ή δευτερογενή καρκινωμάτωση. Δύο μηχανισμοί εμπλέκονται στην απομάκρυνση των κυττάρων μέσω του σπληνός, ο εγκλωβισμός και η φαγοκυττάρωση. Ο σπληνικός εγκλωβισμός αποτελεί μία αναστρέψιμη διαδικασία όπου τα κύτταρα παγιδεύονται προσωρινά μέσω προσκόλλησης στο δικτυοενδοθηλιακό σύστημα κατά τη δίοδό τους μέσω του σπληνός. Κατά τη διάρκεια του εγκλωβισμού απομακρύνονται τα υπολείμματα πυρήνα, τα σωμάτια Howell–Jolly και Heinz και τα ερυθρά επιστρέφουν στην κυκλοφορία. Η φαγοκυττάρωση αποτελεί μία μη αναστρέψιμη διαδικασία, όπου τα μακροφάγα προσλαμβάνουν μη βιώσιμα κύτταρα και κύτταρα τα οποία έχουν υποστεί βλάβες λόγω παρατεταμένου εγκλωβισμού ή κύτταρα που φέρουν συγκεκριμένα αντισώματα. Με τον όρο αποθηκευτική λειτουργία του σπληνός υποδηλώνεται η παρουσία αυξημένης ποσότητας αίματος, κοκκιοκυττάρων και αιμοπεταλίων στο σπλήνα. Φυσιολογικά ανευρίσκεται λιγότερο από το 5% της ολικής μάζας των ερυθρών στο σπλήνα, ωστόσο με την αύξηση του μεγέθους του σπληνός, αυξάνεται και το αγγειακό

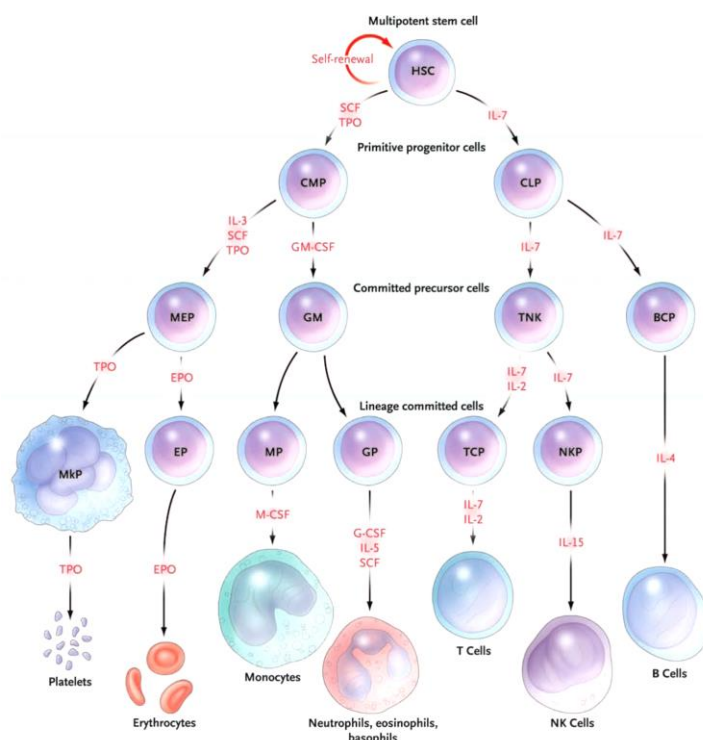
υπόστρωμα, προκαλώντας αύξηση της αποθήκευσης των ερυθρών και μικρή ανταλλαγή αυτών με τη συστηματική κυκλοφορία. Τα κοκκιοκύτταρα που περιέχονται στη δεξαμενή του σπληνός αποτελούν ένα δυναμικό ανάλογο των κυκλοφορούντων κοκκιοκυττάρων, με ποσοστό που ανέρχεται στο 30-50 % της ολικής δεξαμενής του οργανισμού. Αντιστοίχως το 20-40% του συνόλου των αιμοπεταλίων αποθηκεύονται στο σπλήνα, όπου παραμένουν για το ένα τρίτο του χρόνου ζωής τους. Ο ρόλος του σπληνός στην αιμόσταση έγκειται στην παραγωγή και αποθήκευση του παράγοντα πήξης VIII και η ανοσολογική του λειτουργία έγκειται στο ότι αποτελεί το μεγαλύτερο λεμφικό ιστό του οργανισμού. Ο σπλήνας περιέχει το 25% της δεξαμενής των T λεμφοκυττάρων και το 10-15% των B λεμφοκυττάρων. Κατά τη διάρκεια της πρωτογενούς ανοσιακής απάντησης τα CD8+ T κύτταρα δρουν σε συνεργασία με τα μακροφάγα για να διεγείρουν μέσω της φαγοκυττάρωσης την απομάκρυνση των βακτηριδίων που μεταφέρονται με το αίμα αλλά και του αντιγονικού υλικού (όπως κατεστραμμένα ερυθρά). Η δευτερογενής αντιγονική διέγερση προάγει την παραγωγή αντισωμάτων, συνήθως τάξης IgG. Το κύτταρο που έχει καλυφθεί με το αντίσωμα έρχεται σε επαφή με τα μακροφάγα, τα οποία φέρουν υποδοχείς για το Fc τμήμα του αντισώματος και επιτρέπουν τη δημιουργία ανοσοσυμπλεγμάτων. Τα μεγαλύτερα ανοσοσυμπλέγματα απομακρύνονται μέσω φαγοκυττάρωσης από τα μακροφάγα στον ερυθρό πολφό και στην οριακή ζώνη, ενώ τα μικρότερα μεταφέρονται από τα B κύτταρα στο βλαστικό κέντρο. Τα B κύτταρα παράγουν ανοσοσφαιρίνη με ειδικότητα ως προς το αντιγόνο και διεγείρουν την ανοσολογική απάντηση έναντι των διαλυτών αντιγόνων. Οι ανωτέρω μηχανισμοί είναι σημαντικοί στην προφύλαξη έναντι της βακτηριακής σήψης, κυρίως από *Streptococcus pneumoniae*, *H. Influenzae* τύπου B και *Neisseria meningitidis*. Επιπροσθέτως ο σπλήνας φαίνεται να δρα ενάντια στις ιογενείς λοιμώξεις και στις παρασιτικές λοιμώξεις των ερυθροκυττάρων, κυρίως από *Plasmodium* και *Babesia*. [15]

1.2 ΚΥΤΤΑΡΑ ΑΝΟΣΟΠΟΙΗΤΙΚΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ

Όλα τα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος, λεμφοκύτταρα (B, T, NK), μονοκύτταρα, μακροφάγα, δενδριτικά κύτταρα και κοκκιοκύτταρα, παράγονται στο μυελό των οστών από το αρχέγονο πολυδύναμο κύτταρο. Το κύτταρο αυτό παράγει τον κοινό λεμφοειδή και τον κοινό μυελοειδή πρόγονο.

Οι πρόγονοι αυτοί εν συνεχεία παράγουν περισσότερο διαφοροποιημένους προγόνους. Οι πρόγονοι MEP (μεγακαρυοκυτταρικός και ερυθροειδής πρόγονος) και GM (πρόγονος κοκκιοκυττάρων και μακροφάγων) παράγονται από τον κοινό

μυελοειδή πρόγονο, ενώ ο TNK (T και NK κυτταρικός πρόγονος) και ο BCP (πρόγονος των B κυττάρων) προέρχονται από τον κοινό λεμφοειδή πρόγονο. Περαιτέρω διαφοροποίηση των MEP και GM προγόνων οδηγεί στην παραγωγή μεγακαρουκυττάρων, προδρόμων ερυθροκυττάρων, μονοκυττάρων και κοκκιοκυττάρων. Οι πρόδρομοι αυτοί διαφοροποιούνται περαιτέρω σε αιμοπετάλια, ερυθροκύτταρα, μονοκύτταρα, ουδετερόφιλα, ηωσινόφιλα και βασεόφιλα. Αντίστοιχα οι TNK και BCP πρόγονοι διαφοροποιούνται σε NK κύτταρα, T λεμφοκύτταρα και B λεμφοκύτταρα (Εικόνα 4). Ο πολλαπλασιασμός, η διαφοροποίηση και η επιβίωση των ανωτέρω κυττάρων στηρίζονται στην παρουσία κυτταροκινών και αυξητικών παραγόντων. [16]



Εικόνα 4. Μοντέλο αιμοποίησης. Τροποποιημένη εικόνα από Turgeon M.L. (16)

ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΑ:

Οι κύριες υποομάδες των λεμφοκυττάρων είναι τα B λεμφοκύτταρα, τα T λεμφοκύτταρα και τα NK κύτταρα, τα οποία διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο αλλά είναι σπανιότερα. Τα λεμφοκύτταρα παράγονται στο μυελό των οστών από τον κοινό λεμφοειδή πρόγονο και ακολούθως, ωριμάζουν στα περιφερικά λεμφικά όργανα (θύμος για τα T λεμφοκύτταρα, σπλήνας, λεμφαδένες και άλλοι λεμφικοί ιστοί για τα

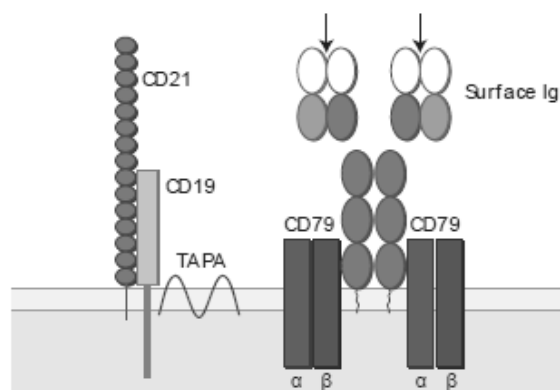
B λεμφοκύτταρα). Οι υποομάδες των λεμφοκυττάρων μπορούν να ταυτοποιηθούν από το μοναδικό φαινότυπο επιφανείας που εκφράζει έκαστη.

B ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΑ

Τα B λεμφοκύτταρα εκπροσωπούν περίπου το 10% των κυκλοφορούντων λεμφοκυττάρων ή αυτών που βρίσκονται στο μυελό των οστών. Ωστόσο το ποσοστό αυτό αυξάνεται στο 50% όταν γίνεται αναφορά στα λεμφοκύτταρα του σπληνός ή των λεμφαδένων. [17] Η κύρια λειτουργία των B λεμφοκυττάρων είναι η παραγωγή αντισωμάτων, σε απάντηση σε ξένες πρωτεΐνες βακτηρίων, ιών και καρκινικών κυττάρων. [1]

Από το στάδιο του κοινού λεμφοειδή προγόνου έως το στάδιο του ώριμου B λεμφοκυττάρου, το οποίο παράγει και εκφράζει στην επιφάνειά του ανοσοσφαιρίνη με ειδικότητα για ένα αντιγόνο, το B κύτταρο διέρχεται από διάφορα στάδια ανάπτυξης, που αρχίζουν στο μυελό των οστών και ολοκληρώνονται στα περιφερικά λεμφικά όργανα. Ο πιο άωρος πρόγονος της B σειράς ονομάζεται πρόδρομο B κύτταρο (pro- B cell). Από το στάδιο του προδρόμου B κυττάρου αρχίζει η αναδιάταξη της βαριάς αλυσίδας της ανοσοσφαιρίνης. Αν η αναδιάταξη είναι επιτυχής, τότε το κύτταρο εκφράζει στο κυτταρόπλασμα του βαριά αλυσίδα ανοσοσφαιρίνης (Ig) τάξης μ ή δ και πλέον ονομάζεται προ B κύτταρο (pre- B cell). Ακολουθεί η αναδιάταξη της ελαφράς αλυσίδας της ανοσοσφαιρίνης, που οδηγεί στην έκφραση της ελαφράς αλυσίδας. Η ελαφρά αλυσίδα κωδικοποιείται είτε από κάππα (κ) είτε από λάμδα (λ) γονίδια [τα (κ) εντοπίζονται στο χρωμόσωμα 2 ενώ τα (λ) στο χρωμόσωμα 22], με σχεδόν ισοδύναμη αναλογία. Έτσι το 60% των B κυττάρων εκφράζουν κ αλυσίδα ενώ το 40% λ αλυσίδα. Μετά την επιτυχή αναδιάταξη της ελαφράς αλυσίδας, και την έκφραση κ ή λ αλυσίδας, το προ- B κύτταρο μετατρέπεται σε ανώριμο B λεμφοκύτταρο που εκφράζει στην επιφάνειά του τον ώριμο υποδοχέα του B κυττάρου [B-cell receptor (BCR)]. Ο BCR αποτελείται από ένα μόριο ανοσοσφαιρίνης επιφανείας IgM ή IgD (μ ή δ βαριά αλυσίδα συνδεδεμένη με κ ή λ ελαφρά αλυσίδα) συνδεδεμένο με Ig α και Ig β πρωτεΐνες που είναι απαραίτητες για την έναρξη του ενδοκυττάρου καταρράκτη σήματος, έπειτα από τη σύνδεση του αντιγόνου (Εικόνα 5). Αν η αναδιάταξη είτε της βαριάς, είτε της ελαφράς αλυσίδας της ανοσοσφαιρίνης αποτύχει, τότε το κύτταρο αποπίπτει. Αποπίπτουν επίσης τα B κύτταρα που ο υποδοχέας τους (BCR) συνδέεται ισχυρά με αντιγόνα που εκφράζονται σε κύτταρα του μυελού των οστών. Με αυτόν τον τρόπο περιορίζεται η παραγωγή αυτό-αντιδραστικών λεμφοκυττάρων. Από τα B λεμφοκύτταρα που παράγονται στο μυελό των οστών, μόνο ένα μικρό ποσοστό (10 –

20%) φτάνει στο στάδιο του ανώριμου παρθένου λεμφοκυττάρου, ικανό να εγκαταλείψει το μυελό των οστών. [18]



Εικόνα 5. Ο υποδοχέας του B κυττάρου. Τροποποιημένη εικόνα από Moss P et al. (18)

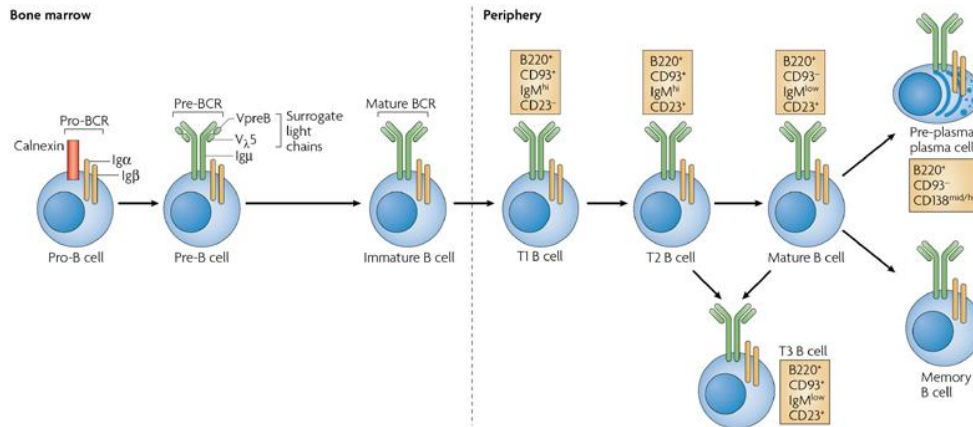
Τα ανώριμα B λεμφοκύτταρα αφήνουν το μυελό των οστών και μεταναστεύουν στα δευτερογενή λεμφικά όργανα για να υποστούν περαιτέρω ωρίμανση και να ενεργοποιηθούν, αφού έλθουν σε επαφή με αντιγόνα. Κυρίως μεταναστεύουν στο σπλήνα όπου ωριμάζουν περαιτέρω είτε σε B κύτταρα του λεμφοζιδίου, είτε σε B κύτταρα οριακής ζώνης. Τα B κύτταρα του λεμφοζιδίου εξαρτώνται από τα T λεμφοκύτταρα και ανταποκρίνονται σε T- εξαρτώμενα αντιγόνα. Αντιθέτως τα οριακής ζώνης B κύτταρα είναι ανεξάρτητα από τα T λεμφοκύτταρα.

Όταν το ανώριμο B λεμφοκύτταρο εισέρχεται στο σπλήνα, πλέον ονομάζεται μεταβατικό 1 B-κύτταρο (T1), και αρχικά καταλαμβάνει την εξωτερική στιβάδα του περιαορτικού λεμφικού στρώματος. Εκεί ωριμάζει, μέσω αρνητικής επιλογής σε περίπτωση διέγερσης του BCR από αυτοαντισώματα, σε ένα σπληνικό πληθυσμό B λεμφοκυττάρων που ονομάζεται μεταβατικό 2 B-κύτταρο (T2). Το T2 κύτταρο ωριμάζει σε οριακής ζώνης B κύτταρο ή σε B κύτταρο του λεμφοζιδίου, αναλόγως της ισχύος του σήματος που διεγείρει τον BCR υποδοχέα. Χαμηλή ανταπόκριση του BCR οδηγεί στην ωρίμανση σε κύτταρα οριακής ζώνης. Η ζώνη αυτή είναι επίσης πλούσια σε αυτό-αντιδραστικά B κύτταρα, δείχνοντας ότι ασθενή αυτό- αντιγόνα μπορούν να οδηγήσουν σε παραγωγή B κυττάρων οριακής ζώνης. Ισχυρή σηματοδότηση στον BCR σε συνδυασμό με ενεργοποίηση της οδού NF- κB, απαιτείται για την ωρίμανση των T2 κυττάρων σε B κύτταρα του λεμφοζιδίου. Περίπου 1-3% των μεταναστευτικών σπληνικών κυττάρων θα ωριμάσει σε παρθένα B κύτταρα. Τα ώριμα, παρθένα B κύτταρα, κυκλοφορούν και εγκαθίστανται σε

περιφερικούς λεμφικούς ιστούς, συμπεριλαμβανομένων των λεμφαδένων, των πλακών Peyer και του ίδιου του σπληνός. Στους ιστούς αυτούς, τα B κύτταρα συναθροίζονται σε πρωτογενή οζίδια.

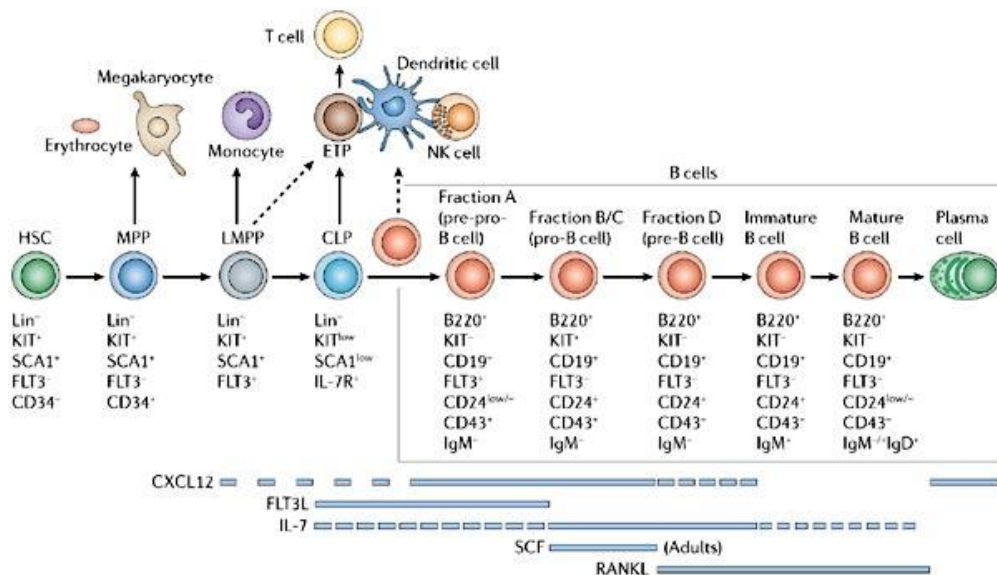
Τα οριακής ζώνης B κύτταρα όπως προαναφέρθηκε απαντούν στην επαφή με το αντιγόνο (κυρίως βακτήρια και άλλα επιλεγμένα παθογόνα) άμεσα, παράγοντας χαμηλής συγγένειας IgM αντισώματα, παρέχοντας την πρώτη γραμμή άμυνας. Η απάντηση αυτή είναι ανεξάρτητη από την ύπαρξη T λεμφοκυττάρων. Ωστόσο μερικά B κύτταρα οριακής ζώνης, μπορούν να απαντήσουν σε T- εξαρτώμενα αντιγόνα, αν και αυτή είναι δράση των ώριμων παρθένων B κυττάρων του λεμφοζιδίου που εντοπίζονται στα πρωτογενή οζίδια. Τα κύτταρα του λεμφοζιδίου, μετά τη σύνδεση ενός T- εξαρτώμενου αντιγόνου, ωριμάζουν σε πλασματοκύτταρα που εκκρίνουν αρχικά χαμηλής συγγένειας IgM, για να υπάρξει άμεση απόκριση στη λοίμωξη. Ακολουθεί περαιτέρω πολλαπλασιασμός και διαφοροποίηση των B κυττάρων. Κάποια από τα προαναφερθέντα B κύτταρα, μετατρέπονται σε B κύτταρα μνήμης, τα οποία αποτελούν περίπου το 40% των B κυττάρων, και είναι υπεύθυνα για την άμεση ανταπόκριση που παρατηρείται σε δεύτερη έκθεση στο ίδιο αντιγόνο (Εικόνα 6).

Ο διαχωρισμός των κυττάρων σε πρόδρομο B κύτταρο, προ- B κύτταρο, ώριμο B κύτταρο και πλασματοκύτταρο, γίνεται μέσω της διαφορετικής έκφρασης των αντιγόνων επιφανείας. Στο πρόδρομο B κύτταρο εκφράζονται οι δείκτες CD10, CD34 και CD19. Μετά την αναδιάταξη της βαριάς αλυσίδας της ανοσοσφαιρίνης, η βαριά αλυσίδα ανιχνεύεται στο κυτταρόπλασμα των προ- B κυττάρων, τα οποία δεν εκφράζουν πλέον CD34. Καθώς ωριμάζει περαιτέρω το B κύτταρο, ανιχνεύεται ανοσοσφαιρίνη επιφανείας και μια σειρά δεικτών επιφανείας, CD20, CD21, CD22, CD24, CD38 και CD40 (Εικόνα 7).



Nature Reviews | Immunology

Εικόνα 6. Διαφοροποίηση του Β κυττάρου. Τροποποιημένη εικόνα από Cambier J et al. (160)



Copyright © 2006 Nature Publishing Group
Nature Reviews | Immunology

Εικόνα 7. Αντιγόνα επιφανείας κατά την ωρίμανση του Β κυττάρου. Τροποποιημένη εικόνα από Nagasawa T. (161)

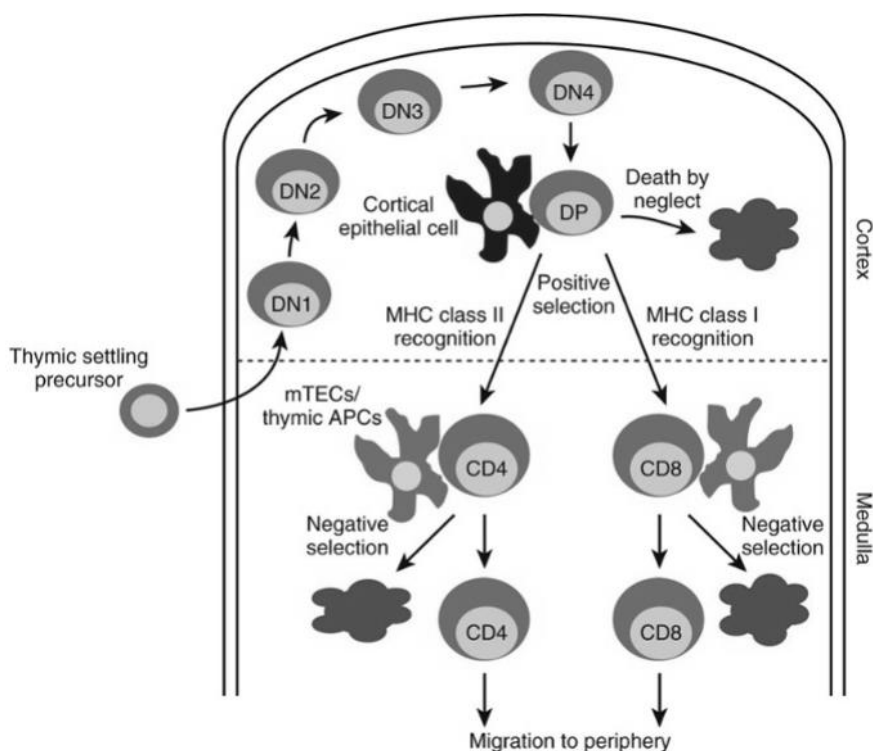
Στα ώριμα Β λεμφοκύτταρα εκφράζονται οι δείκτες επιφανείας CD19 και CD20. Τα T2 μεταβατικά Β λεμφοκύτταρα, τα οποία χρειάζονται για να δράσουν συνεργασία με το T- λεμφοκύτταρο, καθώς και η πλειοψηφία των ώριμων Β κυττάρων δεν φέρουν το CD5 αντιγόνο επιφανείας. Τα Β λεμφοκύτταρα, στα οποία εκφράζεται ο δείκτης CD5 στην επιφάνειά τους, αποτελούν τη μειοψηφία των Β κυττάρων, δεν χρειάζονται τη

βοήθεια του T λεμφοκυττάρου για να δράσουν και συνεισφέρουν στην πλευριτική και περιτοναϊκή ανοσία. [19]

T ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΑ

Τα προγονικά θυμοκύτταρα, τα οποία είναι CD4-CD8- διπλά αρνητικά T κύτταρα (double negative – DN), αφού μεταναστεύσουν από το μυελό των οστών και εισέλθουν στο θύμο, εκφράζουν σταδιακά κατά τη διάρκεια της ανάπτυξής τους διάφορους δείκτες επιφανείας που τα κατηγοριοποιούν περαιτέρω σε DN1, DN2, DN3 και DN4 κύτταρα. Κατά τη διάρκεια του σταδίου DN1 τα προγονικά θυμοκύτταρα χάνουν την ικανότητα να διαφοροποιηθούν σε μη-T κύτταρα και αρχίζουν να πολλαπλασιάζονται στη φλοιώδη μοίρα του θύμου. Καθώς τα προγονικά θυμοκύτταρα διαφοροποιούνται σε DN2 κύτταρα, αρχίζουν να εκφράζουν ειδικούς δείκτες των T κυττάρων (CD90, CD24, CD25) και αρχίζει η αναδιάταξη του υποδοχέα των T κυττάρων (TCR- T cell receptor) στις περιοχές του TCR γ , TCR δ και TCR β . Στο στάδιο του DN3 εκφράζονται οι πρωτεΐνες που κωδικοποιούνται από το γονίδιο του TCR. Από το στάδιο αυτό η ανάπτυξη, ο πολλαπλασιασμός και η επιβίωση των θυμοκυττάρων εξαρτάται από τη σηματοδότηση του TCR. Η σηματοδότηση αυτή επάγει τη συνεχή ανάπτυξη των T κυττάρων μέσω προαγωγής των αναδιατάξεων της περιοχής α του TCR, διατήρησης της επιβίωσης των κυττάρων και επαγωγής της έκφραση των CD4 και CD8. Τα αναπτυσσόμενα αβ T κύτταρα, τα οποία έχουν λειτουργική αναδιαταγμένη β αλυσίδα στο στάδιο του διπλά θετικού CD4+CD8+ T κυττάρου (double positive – DP) και πλήρως αναδιαταγμένο TCR α , παράγουν ένα ώριμο αβ TCR ετεροδιμερές. [20] Το ετεροδιμερές αυτό του TCR αναγνωρίζει αυτοσυνδέτες του μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας (MHC) σε ποικίλου βαθμού ένταση και διάρκεια. Η αντιδραστικότητα των TCRs στους συνδέτες του MHC καθορίζει τη μοίρα του κυττάρου. Τα κύτταρα που δεν εκφράζουν τον υποδοχέα TCR ή φέρουν TCR που δεν έχει ικανότητα σύνδεσης με τους συνδέτες του θύμου, οδηγούνται σε 'θάνατο από παραμέληση'. Τα κύτταρα με χαμηλή συγγένεια στον TCR υπόκεινται σε 'θετική επιλογή' και γίνονται CD4+ βοηθητικά ή CD8+ κυτταροτοξικά κύτταρα και αποτελούν την πλειοψηφία των κυτταρικών προϊόντων του θύμου. Αντιθέτως πολύ υψηλής συγγένειας συνδέτες ως προς τον TCR πυροδοτούν την απάλειψη του κλώνου μέσω άμεσης επαγωγής της απόπτωσης, με σκοπό να διατηρηθεί η αυτό-ανοχή. Αυτή η διαδικασία ονομάζεται 'αρνητική επιλογή'. [21] Η ειδικότητα του MHC στον TCR στα θετικά επιλεγμένα DP θυμοκύτταρα επηρεάζει τη μοίρα του κυττάρου. Τα κύτταρα τα οποία σηματοδοτούνται μέσω του

MHC I αναπτύσσονται σε CD8+ μονά θετικά (single positive- SP) κύτταρα (CD4-CD8+), ενώ αυτά που λαμβάνουν σηματοδότηση από το MHC τάξεως II αναπτύσσονται σε CD4+ SP κύτταρα. (Εικόνα 8) Ακολούθως τα CD4⁺ ή CD8⁺ SP κύτταρα μεταναστεύουν στην περιφέρεια σαν παρθένα T κύτταρα. Μετά την έξοδό τους από το θύμο, τα παρθένα αυτά κύτταρα έρχονται σε επαφή με αντιγονικά πεπτίδια τα οποία αν προέρχονται από ενδοκυττάρους παράγοντες διεγείρουν τα CD8⁺T κύτταρα, ενώ αν προέρχονται από εξωκυττάρους διεγείρουν τα CD4⁺T κύτταρα. Το είδος του T κυττάρου (CD4+ ή CD8+) που θα ενεργοποιηθεί από ένα συγκεκριμένο αντιγονικό πεπτίδιο καθορίζεται από το ποιές πρωτεΐνες του MHC θα παρουσιάσουν αυτό το πεπτίδιο στον TCR. Οι τάξεως II πρωτεΐνες του MHC ανευρίσκονται στα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα καθώς και στα B κύτταρα και στο επιθήλιο του θύμου. Τα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα περιλαμβάνουν τα δενδρική κύτταρα καθώς και ποικίλα ιστικά μακροφάγα, τα οποία ενδοκυτταρώνουν εξωκυττάρους οργανισμούς (συχνά αφού έχουν καλυφθεί με αντισώματα του ξενιστή), κύτταρα του ξενιστή τα οποία έχουν αποπέσει και κατάλοιπα κυττάρων μέσω ενδοκυττάρωσης. Τα πεπτίδια τα οποία δημιουργούνται στις ανωτέρω συνθήκες συνδέονται με πρωτεΐνες του MHC II και παρουσιάζονται σε CD4⁺ T κύτταρα. Αντιθέτως όλα τα εμπύρνηνα κύτταρα του οργανισμού εκφράζουν πρωτεΐνες του MHC I για να μπορούν, σε περίπτωση που μολυνθούν από ενδοκυττάριο παθογόνο ή μεταλλαχθούν, να παρουσιάσουν το αντιγόνο αυτό στα CD8⁺ T κύτταρα. Αντίστοιχη οδό ανάπτυξης με τα αβ T κύτταρα εμφανίζουν και τα γδ T κύτταρα. Σε αυτά τα κύτταρα οι αναδιαταγμένες αλυσίδες γδ προάγουν την παραγωγή CD3+CD4+CD8- T κυττάρων στο θύμο και στο έντερο. Τα γδ T κύτταρα αποτελούν μόλις το 1-5% των κυκλοφορούντων T κυττάρων αλλά ο αριθμός τους μπορεί να φτάσει στο 50% των T κυττάρων στο γαστρεντερικό σωλήνα, όπου η δραστηριότητά τους επηρεάζεται από την τοπική φλεγμονή. Τα γδ T κύτταρα ως απάντηση σε βακτηριακές και ιογενείς λοιμώξεις εμφανίζουν διεγερτικό αλλά και κατασταλτικό ρόλο, ενώ έχουν ενοχοποιηθεί για κακοήγη μεταλλαγή. [20]



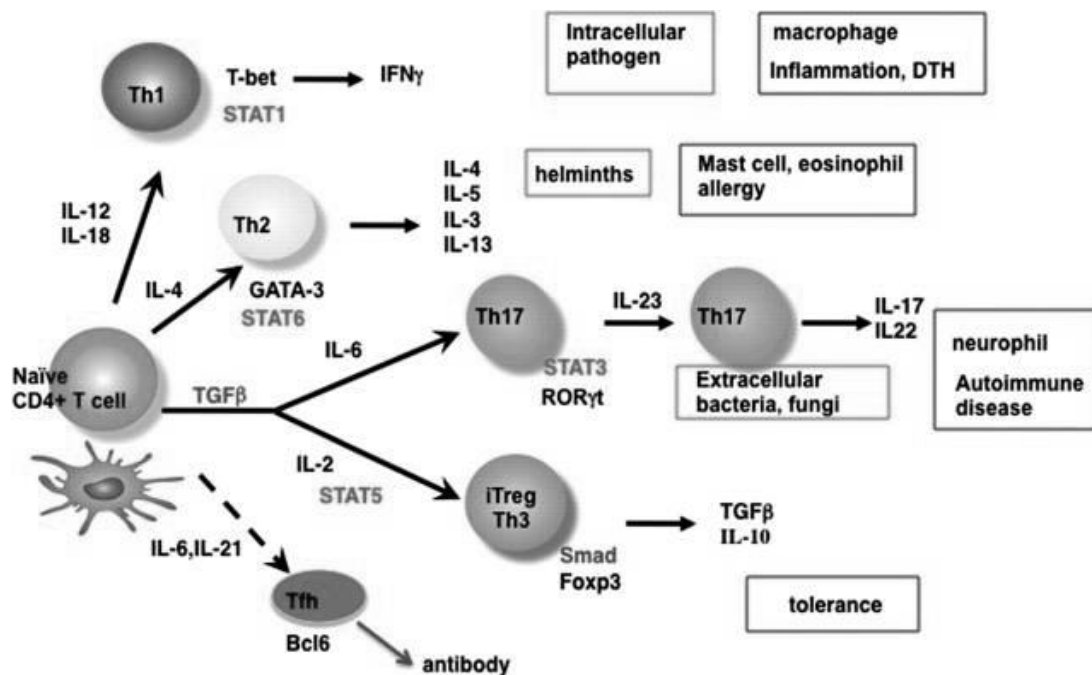
Εικόνα 8. Η ανάπτυξη των T κυττάρων στο θύμο. Τροποποιημένη εικόνα από Carty S et al. (20)

Τα παρθένα κύτταρα είτε είναι CD4+ είτε CD8+ ενεργοποιούνται μέσω αλληλεπίδρασης του πεπτιδίου-MHC με τον TCR και η διαφοροποίησή τους επηρεάζεται από συνδυασμό σημάτων συμπεριλαμβανομένης της ισχύος της σηματοδότησης του TCR, της συνδιέγερσης από συνδέσμους που αλληλεπιδρούν με άλλους υποδοχείς επιφανείας των T κυττάρων και του περιβάλλοντος των τοπικών κυτοκινών. Τα παρθένα T κύτταρα ενεργοποιούνται από αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα (APCs) και διαφοροποιούνται σε δραστικά βοηθητικά T κύτταρα (effector T helper cells- Th) ή σε T κύτταρα μνήμης (T memory cells). Μετά την ενεργοποίησή τους, τα CD4+ Th κύτταρα ακολουθούν διαφορετικές οδούς ανάπτυξης ώστε να επιτύχουν εξειδικευμένες ικανότητες και λειτουργίες. Τα Th κύτταρα διαφοροποιούνται σε τέσσερις υποομάδες, τα Th1, Th2, Th17 και T βοηθητικά του λεμφοζιδίου (follicular helper/ Tfh) κύτταρα. (Εικόνα 9) Τα κύτταρα που ανήκουν στην Th1 κυτταρική σειρά προάγουν την εκρίζωση ενδοκυττάρων παθογόνων, όπως ενδοκυττάρια βακτήρια, ιοί και μερικά πρωτόζωα, μέσω ενεργοποίησης των μακροφάγων, των NK κυττάρων και των CD8+ T κυττάρων. Οι κύριες κυττοκίνες που ενέχονται στη διαφοροποίησή τους είναι η ιντερφερόνη γ (interferon-γ / IFN-γ) και η ιντερλευκίνη 12 (IL-12). Η IFN-γ προάγει τη διαφοροποίηση των Th1 κυττάρων μέσω ενεργοποίησης μεταγραφικών παραγόντων και ειδικότερα του STAT1, ενώ η IL-12

παράγεται από τα ενεργοποιημένα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα και προάγει την παραγωγή IFN- γ . Μετά την ενεργοποίησή τους τα Th1 κύτταρα χαρακτηρίζονται από την παραγωγή προφλεγμονωδών κυττοκινών, όπως ιντερφερόνης- γ , έναν πιθανό ενεργοποιητή της κυτταρικής ανοσίας, και παράγοντα νέκρωσης των όγκων α (Tumor necrosis factor α / TNF- α). Τα Th2 κύτταρα συμμετέχουν στον περιορισμό των παρασιτικών λοιμώξεων και χαρακτηρίζονται από την παραγωγή των ιντερλευκινών IL-4, IL-5 και IL-13, οι οποίες αντίστοιχα έχουν την ικανότητα να ενεργοποιούν την παραγωγή ανοσοσφαιρίνης IgE από τα B κύτταρα, να επιστρατεύουν ηωσινόφιλα και να απομακρύνουν τα παράσιτα με αύξηση παραγωγής βλέννης από τους βλεννογόνους. Οι κυττοκίνες αυτές επάγουν επίσης την περαιτέρω διαφοροποίηση των CD4+ T κυττάρων σε Th2 κύτταρα μέσω δράσης στα δενδριτικά κύτταρα αλλά και απευθείας στα CD4+ κύτταρα. Εκτός από τις κυττοκίνες που καθορίζουν τη διαφοροποίηση σε Th1 ή Th2 κύτταρα, η ισχύς της σηματοδότησης από τον TCR, αλλά και τα μόρια CD28 και CD80/CD86 εμπλέκονται στον καθορισμό της μοίρας του παρθένου T κυττάρου, χωρίς ωστόσο η δράση τους να έχει αποσαφηνιστεί. Συνεχής διέγερση των Th1 κυττάρων από αυτοαντιγόνα ή συγγενή αντιγόνα, μπορεί να οδηγήσει σε απορρύθμιση της ανοσιακής απάντησης και εν συνεχεία σε χρόνια φλεγμονώδη νόσο, ενώ η απορρύθμιση της απάντησης των Th2 κυττάρων προκαλεί αλλεργία και άσθμα λόγω υπερευαισθησίας των αεραγωγών. Τα Th17 κύτταρα αποτελούν μία ακόμα υποομάδα Th κυττάρων με δυνατότητα παραγωγής ιντερλευκίνης 17 (IL-17), τα οποία επάγονται κατά τη διάρκεια της απάντησης σε εξωκυττάρια βακτήρια και μύκητες, όπως *Klebsiella pneumoniae*, *Bacteroides spp* και *Candida albicans*. Τα Th17 κύτταρα εκκρίνουν μια σειρά χαρακτηριστικών ανοσορρυθμιστικών κυττοκινών, που περιλαμβάνουν τις IL-17A, IL-17F, IL-22 και IL-21. Αυτές οι κυττοκίνες διαδραματίζουν ρόλο στη φλεγμονή, την αυτοανοσία και στον περιορισμό των εξωκυττάρων βακτηριακών και μυκητιασικών παθογόνων. Τα Tfh κύτταρα ενισχύουν τη χυμική ανοσία παρέχοντας βοήθεια στα B κύτταρα. Εκφράζουν υψηλά επίπεδα CXCR5, το οποίο επιτρέπει στα διαφοροποιημένα Tfh κύτταρα να μεταναστεύσουν από τη ζώνη των T κυττάρων στα οζίδια των B κυττάρων, επάγοντας την αλληλεπίδρασή τους. Τα Tfh κύτταρα εκφράζουν υψηλότερα επίπεδα πολλαπλών συνδιεγερτικών μορίων όπως το CD40L, ICOS και OX40, τα οποία προάγουν τη διαφοροποίηση των B κυττάρων, συγκριτικά με τα υπόλοιπα T κύτταρα. [20]

Τα Th1 κύτταρα παράγουν όπως αναφέρθηκε IFN- γ , η οποία προάγει τη διαφοροποίησή τους μέσω καταστολής της μεσολαβούμενης από την IL-4 διαφοροποίησης των Th2 κυττάρων. Αντίστοιχα τα Th2 κύτταρα παράγουν IL-4 και

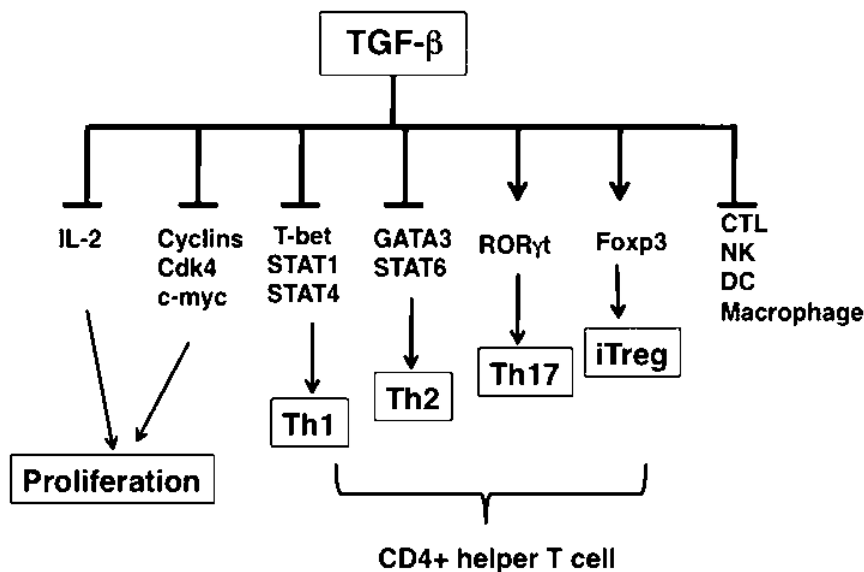
IL-10, οι οποίες καταστέλλουν ισχυρά την μεσολαβούμενη από IL-12 και IFN- γ διαφοροποίηση των Th1 κυττάρων. Τέλος η διαφοροποίηση των Th17 κυττάρων από τα παρθένα T κύτταρα εκκινείται από την IL-6 και τον TGF- β , ενώ η IL-23, όπως και η IL-21, θεωρείται κυττοκίνη κλειδί για την ωρίμανση ή/και τη διατήρηση των Th17 κυττάρων. Αντίστοιχο ρόλο κλειδί εμφανίζει η Bcl-6 για τη διαφοροποίηση των Tfh κυττάρων, καθώς μελέτες in vivo έδειξαν ότι αποτελεί απαραίτητο και επαρκή παράγοντα για την διαφοροποίησή τους.



Εικόνα 9. Διαφοροποίηση των παρθένων CD4+ T κυττάρων. Τροποποιημένη εικόνα από Yoshimura et al. (22)

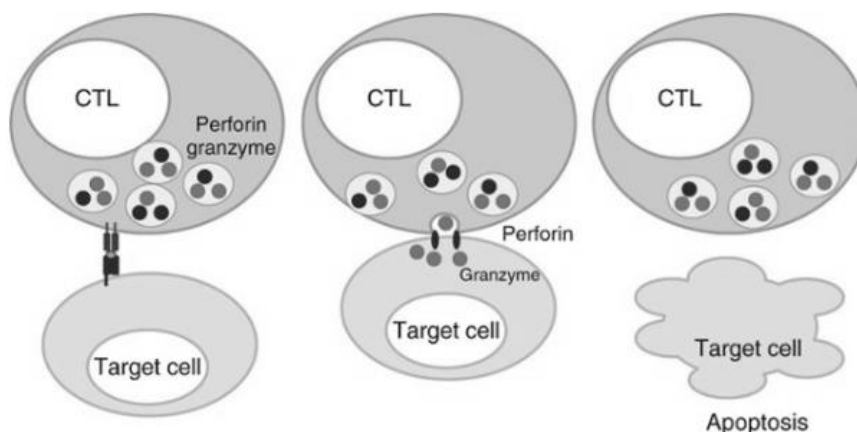
Ο TGF- β ο οποίος προάγει τη διαφοροποίηση των Th17 κυττάρων, εμφανίζει διπλό ρόλο. Αφενός επάγει όπως προαναφέρθηκε τη διαφοροποίηση των παρθένων T κυττάρων, αφετέρου καταστέλλει τον πολλαπλασιασμό και την ωρίμανση ποικίλων κυττάρων. Αναλυτικότερα, ο TGF- β επάγει τη διαφοροποίηση των Th17 κυττάρων, ενώ ταυτόχρονα καταστέλλει τη διαφοροποίηση των Th1 και Th2 κυττάρων από τα παρθένα κύτταρα, μέσω καταστολής της παραγωγής IFN- γ και IL-4, καθώς οι ανωτέρω κυττοκίνες καταστέλλουν ισχυρά τη διαφοροποίηση των Th17. Επίσης ο TGF- β επάγει την παραγωγή Foxp3, ενός μεταγραφικού παράγοντα των T ρυθμιστικών κυττάρων. Με αυτόν τον τρόπο επάγει τη διαφοροποίηση των παρθένων T κυττάρων σε Foxp3⁺ T ρυθμιστικά κύτταρα στην περιφέρεια [induced T regulatory cells (iTregs)]. Ο TGF- β επιπροσθέτως καταστέλλει την ωρίμανση και

άλλων κυττάρων όπως τα CD8+ κυτταροτοξικά T κύτταρα (CTL), τα κύτταρα φυσικοί φονείς (NK), τα δενδρική κύτταρα (DC) και τα μακροφάγα. [22]



Εικόνα 10. Επίδραση του TGF-β στα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος. Τροποποιημένη εικόνα από Yoshimura et al. (22)

Τα παρθένα CD8+ T κύτταρα ενεργοποιούνται μέσω αλληλεπίδρασης του πεπτιδίου-MHC I στην επιφάνεια των αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων με τον TCR και διαφοροποιούνται σε κυτταροτοξικά T λεμφοκύτταρα (Cytotoxic T cells/ CTLs). Ακολούθως τα κυτταροτοξικά T κύτταρα τροποποιούν την έκφραση σε υποδοχείς χημειοκινών και ιντεγκρίνες, ώστε να μπορούν να απομακρυνθούν από την κυκλοφορία και να εισέλθουν στους ιστούς αναζητώντας τα κύτταρα που φέρουν το αντιγόνο που προκάλεσε την ενεργοποίησή τους από τα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα. Μετά την αναγνώριση του κυττάρου στόχου, τα ειδικά κοκκία που περιέχονται στα κυτταροτοξικά T κύτταρα μεταφέρονται στο σημείο επαφής των κυττάρων αυτών με το κύτταρο στόχο. Τα κοκκία αυτά περιέχουν δραστικές πρωτεΐνες όπως περφορίνες (perforin), πρωτεάσες (granzymes A,B,H,K,M) και κοκκιολυσίνη (granulysin), οι οποίες αποδομούν τις πρωτεΐνες του κυττάρου ξενιστή. (Εικόνα 11) Τα κυτταροτοξικά κύτταρα παράγουν επίσης κυττοκίνες, όπως IFN-γ, TNF-α και IL-2, οι οποίες καταστέλλουν τον πολλαπλασιασμό του ιού στις προσβεβλημένες περιοχές και προάγουν την ενεργοποίηση των μακροφάγων. [20]



Εικόνα 11. Η δράση των CD8+ κυτταροτοξικών T κυττάρων. Τροποποιημένη εικόνα από Carty S et al. (20)

Τα T κύτταρα μνήμης (T memory cells) είναι κύτταρα μακράς επιβίωσης που προέρχονται από ενεργοποιημένα T κύτταρα μετά την εξάλειψη του παθογόνου και έχουν διακριτές ιδιότητες από τα ενεργοποιημένα κύτταρα. Έχουν την ικανότητα να αυτοανανεώνονται, να πολλαπλασιάζονται ταχέως και να επανακτούν τη δραστηρική τους λειτουργία μετά από επανέκθεση στο αντιγόνο. Μετά από μία λοίμωξη μπορούν να αναγνωριστούν ενεργοποιημένα δραστικά T κύτταρα με διαφορετική μοίρα, αυτά που έχουν υποστεί την τελική διαφοροποίηση και αυτά που έχουν την ικανότητα να εξελιχθούν σε κύτταρα μνήμης. Ομοίως με τα δραστικά T κύτταρα, οι κυττοκίνες διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη και διατήρηση των T κυττάρων μνήμης. Η IL-2 είναι απαραίτητη για την αρχική διαφοροποίηση των κυττάρων μνήμης, ενώ οι IL-7 και IL-15 είναι απαραίτητες για την παραμονή των κυττάρων μνήμης.

Όπως προαναφέρθηκε οι πολύ υψηλής συγγένειας συνδέτες ως προς τον TCR κατά τη διάρκεια της διαφοροποίησης των προγονικών θυμοκυττάρων πυροδοτούν την απάλειψη του κλώνου μέσω της 'αρνητικής επιλογής'. Απαραίτητο μόριο για την απάλειψη αυτή αποτελεί το CD28, το οποίο είναι το κύριο συνδιεγερτικό μόριο των T κυττάρων. Απουσία συν-διέγερσης από το CD28 οδηγεί κάποια θυμοκύτταρα που συνδέονται ισχυρά με αυτοαντιγόνα να επιβιώνουν της αρνητικής επιλογής και να αναπτύσσονται σε ώριμα θυμικής προέλευσης διπλά αρνητικά T κύτταρα (CD4-CD8-). [23]

Τα CD4-CD8- διπλά αρνητικά (Double Negative- DN) T κύτταρα αποτελούν το 1-3% του συνόλου των T κυττάρων. Φαινοτυπικά, αυτή η σπάνια υποομάδα των T κυττάρων εκφράζει πολυκλωνικό αβ ρεπερτόριο υποδοχέα T κυττάρων (TCRαβ), δεν

εκφράζει Foxp3, όπως τα κύτταρα φυσικοί φονείς (NK) και κυρίως εμφανίζει φαινότυπο παρθένου T κυττάρου. Καθώς τα συγκεκριμένα T κύτταρα δεν εκφράζουν ούτε CD4 ούτε CD8, δεν μπορούν να αναγνωρίσουν συνδέτες του μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας I ή II (MHC I/II). Ο Van Laethem και οι συνεργάτες του έδειξαν το 2007 ότι τα DN T κύτταρα αναπτύσσονται με τρόπο ανεξάρτητο από το MHC. Συγκεκριμένα απουσία έκφρασης CD4 ή CD8 συν-υποδοχέα, η ενδοκυττάρια τυροσινική κινάση Lck σταματά να απομονώνεται από τους συν-υποδοχείς και είναι διαθέσιμη να προάγει TCR σηματοδότηση στα θυμοκύτταρα ανεξάρτητη από το MHC. Συνεπώς αυτά τα θυμοκύτταρα αναπτύσσονται σε ώριμα DN T κύτταρα και απελευθερώνονται στην κυκλοφορία. [24]

Τα DN T κύτταρα συνθέτουν ένα ετερογενές υποσύνολο κυττάρων που περιλαμβάνει όλα τα CD4-CD8-CD3+ κύτταρα, δηλαδή τα TCRγδ T κύτταρα, τα NK T κύτταρα και τα ανοσορρυθμιστικά TCRαβ DN T κύτταρα. [26]

ΚΥΤΤΑΡΑ ΦΥΣΙΚΟΙ ΦΟΝΕΙΣ (NATURAL KILLER CELLS - NK)

Τα κύτταρα φυσικοί φονείς (natural killer cells - NK) αποτελούν περίπου το 5-10% των κυκλοφορούντων λεμφοκυττάρων. Είναι αρχέγονα κυτταροτοξικά κύτταρα και χαρακτηρίζονται από την ικανότητα να λύουν ταχέως κύτταρα στόχους και να εκκρίνουν κυττοκίνες, δρώντας ενάντια σε κύτταρα που έχουν μολυνθεί από ιούς ή καρκινικά κύτταρα, χωρίς να έχει προηγηθεί ευαισθητοποίηση από το μείζον σύμπλεγμα ιστοσυμβατότητας. Τα NK κύτταρα είναι απαραίτητα στην πρώιμη άμυνα του ξενιστή έναντι ποικίλων ιών, βακτηρίων, παρασίτων, καθώς και έναντι καρκινικών κυττάρων. Ενεργοποιούνται από την INF-α (ιντερφερόνη- α), την INF-γ (ιντερφερόνη- γ), τον TNF (tumor necrosis factor) και την IL-2 (ιντερλευκίνη- 2). Η αναγνώριση του παθογόνου γίνεται μέσω υποδοχέων ενεργοποίησης ή καταστολής, οι οποίοι αναγνωρίζουν μόρια που ενεργοποιούν παθογόνα (αναγνώριση κυττάρων που δεν ανήκουν στον ξενιστή- 'non-self recognition'), πρωτεΐνες του ξενιστή των οποίων η έκφραση αυξάνεται σε μεταλλαγμένα ή μολυσμένα κύτταρα (επαγόμενη από στρες αυτοαναγνώριση –'stress induced-self recognition') ή πρωτεΐνες που εκφράζονται στα υγιή κύτταρα του ξενιστή αλλά η έκφρασή τους μειώνεται στα μολυσμένα ή μεταλλαγμένα κύτταρα (έλλειψη αυτοαναγνώρισης- 'missing-self recognition'). Οι υποδοχείς αυτοί είναι τριών τάξεων υποδοχείς, και περιλαμβάνουν υποδοχείς Ig των φονικών κυττάρων (KIRs), λεκτίνη τύπου C (CD94/ NKG2s) και φυσικούς κυτταροτοξικούς υποδοχείς (NCRs). Η δυναμική ισορροπία μεταξύ σημάτων ενεργοποίησης και καταστολής ελέγχει την ενεργοποίηση των κυττάρων NK. Η

ενεργοποίηση των NK κυττάρων εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τα δενδριτικά κύτταρα. Αναλυτικότερα, τα κύτταρα NK και τα δενδριτικά κύτταρα αποτελούν δύο τύπους ειδικών κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος, των οποίων η αλληλεπίδραση οδηγεί σε ισχυρή διασταυρούμενη ενεργοποίηση, ενώ παράλληλα το ένα επηρεάζει την ωρίμανση του άλλου. Τα δενδριτικά κύτταρα δρουν στην αρχική φάση της ενεργοποίησης των NK και διαμορφώνουν το μέγεθος της ανοσιακής απάντησης, ρυθμίζοντας το κυτταρολυτικό αποτέλεσμα των κυττάρων NK σε καρκινικά κύτταρα, καθώς και σε κύτταρα προσβεβλημένα από ιούς, βακτήρια ή παράσιτα. Αντιστοίχως τα NK κύτταρα παρέχουν σήματα που επάγουν τη δημιουργία ώριμων δενδριτικών κυττάρων, προάγουν την ωρίμανση των δενδριτικών και την παραγωγή κυττοκινών. Επάγοντας την ενεργοποίηση των δενδριτικών, η επαγόμενη από τα καρκινικά κύτταρα ενεργοποίηση των NK κυττάρων, προάγει εμμέσως την απάντηση των T κυττάρων έναντι των κυττάρων του όγκου.

Τα NK κύτταρα επηρεάζουν τη λειτουργία των δενδριτικών κυττάρων με ποικίλους μηχανισμούς. Αρχικά η μεσολαβούμενη από τα NK κύτταρα λύση των προσβεβλημένων ή καρκινικών κυττάρων μπορεί να απελευθερώσει κυτταρικά υπολείμματα και παράγωγα μικροβίων, τα οποία προσλαμβάνονται από τα δενδριτικά κύτταρα και δίνουν τη δυνατότητα διασταυρούμενης παρουσίασης των αντιγόνων. Επιπροσθέτως η μεσολαβούμενη από τα NK κύτταρα λύση των ανώριμων δενδριτικών κυττάρων αυξάνει την αποτελεσματικότητα της αντιγονοπαρουσίασης, ανανεώνοντας τις πηγές των ώριμων δενδριτικών κυττάρων. Επίσης τα ενεργοποιημένα NK κύτταρα ενισχύουν την αντιγονοπαρουσίαση των δενδριτικών κυττάρων μέσω παραγωγής IFN- γ , προάγουν την ωρίμανση των δενδριτικών κυττάρων και την παραγωγή IL-12, η οποία επάγει την αποτελεσματική απάντηση των κυτταροτοξικών T κυττάρων, και προάγουν την επιβίωση και τη διαφοροποίηση των δενδριτικών κυττάρων από τους μονοκυτταρικούς τους προγόνους μέσω έκκρισης GM-CSF (granulocyte-macrophage-colony stimulating factor). Τα NK κύτταρα συνεπώς διαδραματίζουν βοηθητικό ρόλο στην αντικαρκινική ανοσολογική απάντηση αλληλεπιδρώντας με τα δενδριτικά κύτταρα και προάγοντας την ειδική για τον όγκο απάντηση από τα CD4+ και CD8+ T κύτταρα.[26]

Τα NK κύτταρα αναγνωρίζονται μέσω της έκφρασης του CD56 και μη έκφρασης του CD3 στην επιφάνειά τους. Ανάλογα με την έκφραση του CD56, αυξημένη ή ασθενής, χωρίζονται σε δύο κατηγορίες. Η πλειοψηφία (περίπου 90%) των ανθρωπίνων NK κυττάρων εμφανίζουν ασθενή έκφραση CD56 (CD56^{dim}) και εκφράζουν υψηλά επίπεδα Fc γ RIII (CD16), ενώ η μειοψηφία (περίπου 10%) εκφράζει ισχυρά CD56 και ασθενώς ή καθόλου CD16 (CD56^{bright} CD16^{dim/neg}). Οι δύο αυτές κατηγορίες NK

κυττάρων διαφέρουν ως προς την πολλαπλασιαστική απάντηση στην IL-2, την εγγενή κυτταροτοξική ικανότητα, το ρεπερτόριο των υποδοχέων NK και την έκφραση των μορίων προσκόλλησης. [27] Τα CD56^{bright} NK κύτταρα εκφράζουν συνεχώς υποδοχείς υψηλής αλλά και ενδιάμεσης συγγένειας με την IL-2 και εξαπλώνονται in vitro αλλά και in vivo σε απάντηση σε χαμηλές δόσεις IL-2. Αντιθέτως τα CD56^{dim} NK κύτταρα εκφράζουν υποδοχείς μόνο ενδιάμεσης συγγένειας για την IL-2 και πολλαπλασιάζονται ασθενώς σε απάντηση σε υψηλές δόσεις IL-2. Επιπροσθέτως τα CD56^{dim} NK κύτταρα είναι περισσότερο κυτταροτοξικά ενάντια σε ευαίσθητους στα NK στόχους, συγκριτικά με τα CD56^{bright} NK κύτταρα. Η επαγωγή των τελευταίων από τους προδρόμους των NK κυττάρων γίνεται μέσω της IL-15. Εν συνεχεία διαφοροποιούνται σε CD56^{dim} NK κύτταρα. Ωστόσο δεν μπορεί να αποκλειστεί η ύπαρξη μοναδικού CD56^{dim} NK κυτταρικού προδρόμου ή μιας διαφορετικής σηματοδότησης (παραδείγματος χάριν μια κυττοκίνη άγνωστη έως τώρα) που θα μπορούσε να επάγει τη διαφοροποίηση των CD56^{dim} NK κυττάρων από έναν κοινό NK πρόδρομο. Τόσο η IL-2 όσο και η IL-15 προάγουν τη διαφοροποίηση των NK κυττάρων από μονοκύτταρα ομφαλίου αίματος. Ωστόσο η IL-15 διατηρεί τη διαφοροποίηση ή την επιβίωση και των δύο υποομάδων των NK κυττάρων (CD56^{bright}, CD56^{dim}), σε αντίθεση με την IL-2 που προκαλεί τον πολλαπλασιασμό μόνο των CD56^{bright} NK κυττάρων ενώ τα CD56^{dim} κύτταρα χάνονται από τις καλλιέργειες με IL-2 μετά από μερικές διαιρέσεις. Αυτά καταδεικνύουν ότι η IL-15 αλλά όχι η IL-2, διατηρούν την τελική διαφοροποίηση και επιβίωση των CD56^{dim} NK κυττάρων από προγονικά κύτταρα. [26]

Τα NK κύτταρα με ασθενή έκφραση του CD56, παρουσιάζουν κυτταρολυτική δραστηριότητα και είναι ικανά να καταστρέψουν καρκινικά κύτταρα στόχους χωρίς προηγούμενη ευαισθητοποίηση. Η δράση αυτή επιτελείται με τρεις μηχανισμούς. Ο πρώτος είναι κυτταροτοξικότητα μέσω εξωκύττωσης περφορινών και ενζύμων. Ο δεύτερος είναι κυτταροτοξικότητα μέσω παραγωγής κυττοκινών, συμπεριλαμβανομένου του παράγοντα νέκρωσης όγκων α (TNF- α), της ιντερφερόνης γ (INF- γ) και του αυξητικού παράγοντα κοκκιοκυττάρων / μακροφάγων (GM- CSF). Ο τρίτος είναι κυτταροτοξικότητα εξαρτημένη από αντίσωμα (ADCC) μέσω υψηλής πυκνότητας επιφανειακής έκφρασης του CD16 (υποδοχέας για το Fc τμήμα της IgG ανοσοσφαιρίνης).

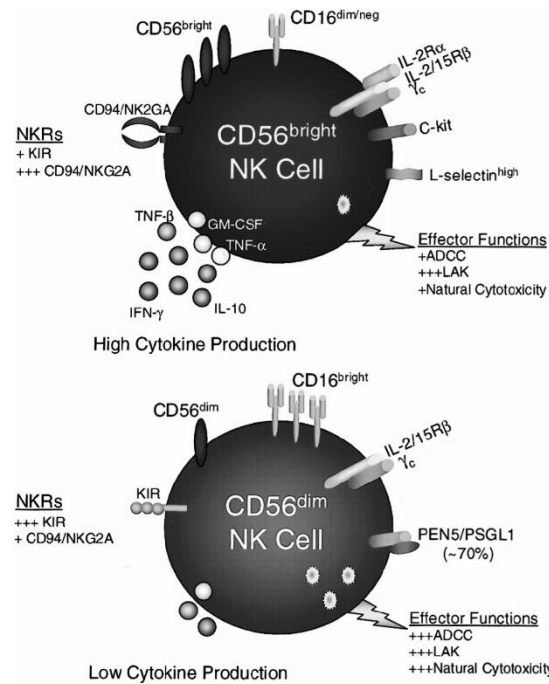
Τα NK κύτταρα με αυξημένη έκφραση του CD56 διαδραματίζουν ανοσορρυθμιστικό ρόλο μέσω παραγωγής κυττοκινών και χημειοκινών. Δεν εκφράζουν CD16 όπως τα NK με ασθενή έκφραση του CD56, αλλά εκφράζουν πιο ισχυρά το CD2.

Τα NK CD56^{bright} κύτταρα στον άνθρωπο μπορούν να καταταχθούν σε δύο υποομάδες, NK1 και NK2, αντίστοιχα με τις Th1 και Th2 υποομάδες των CD4+ T κυττάρων. Ο διαχωρισμός αυτός των NK γίνεται ανάλογα με την παραγωγή ή μη IFN-γ από τα κύτταρα NK. Τα NK1 κύτταρα παράγουν IL-10 και IFN-γ ως απάντηση στην παρουσία IL-12, ενώ τα NK2 κύτταρα ανταποκρίνονται στην παρουσία της IL-4 με καταστολή της παραγωγής IFN-γ και αύξηση της παραγωγής IL-5 και IL-13. Συνεπώς και οι δύο τύποι NK κυττάρων εκκρίνουν ποικίλες κυτοκίνες μέσω των οποίων παρουσιάζουν ρυθμιστικές ιδιότητες στο ανοσοποιητικό σύστημα και μπορούν να εμφανίσουν διαφορετικές φλεγμονώδεις ιδιότητες. [28]

	CD56 ^{bright}	CD56 ^{dim}
NK receptors		
FcγRIII (CD16)	-/+	+++
KIR	-/+	+++
CD94/NKG2	+	-/+
Cytokine receptors		
IL-2Rαβγ	++	-
IL-2Rβγ	++	++
CCR7	++	-
Adhesion molecules	++	-/+
Effector functions		
ADCC	-/+	+++
Natural cytotoxicity	-/+	+++
Cytokine production	+++	-/+

*KIR indicated killer immunoglobulin-like receptor; IL, interleukin; ADCC, antibody-dependent cellular cytotoxicity.

Πίνακας 1. Διαφορές των CD56^{bright} και CD56^{dim} NK κυττάρων. Τροποποιημένος πίνακας από Hiroguki A. et al. (162)



Εικόνα 12. Τα CD56^{bright} and CD56^{dim} NK κύτταρα φέρουν διαφορετικούς υποδοχείς στην επιφάνειά τους και εμφανίζουν διαφορετική δράση. Τροποποιημένη εικόνα από Cooper MA et al. (27)

ΜΟΝΟΚΥΤΤΑΡΑ

Τα μονοκύτταρα παράγονται στο μυελό των οστών από τον κοινό μυελοειδή πρόγονο και αποτελούν περίπου το 3% του συνόλου των κυττάρων του μυελού των οστών. Μετά την παραγωγή τους, κυκλοφορούν μέσω της αιματικής και της λεμφικής κυκλοφορίας, με μέσο χρόνο ημίσειας ζωής 1-3 ημέρες, πριν μεταναστεύσουν σε ιστούς και ωριμάσουν σε μακροφάγα, τα οποία επιβιώνουν 2-3 μήνες. Μακροφάγα μπορούν να ανευρεθούν σε όλους τους ιστούς και ειδικότερα στα σημεία εισόδου των παθογόνων, όπως δέρμα, αναπνευστική οδός, γαστρεντερικό σύστημα και ουρογεννητικό σύστημα. Πληθυσμοί ειδικών ιστικών μακροφάγων ανευρίσκονται στους πνεύμονες (κυψελιδικά μακροφάγα), στο ήπαρ (κύτταρα Kupffer), στο σπλήνα, στα οστά (οστεοκλάστες) και στο κεντρικό νευρικό σύστημα (μικρογλοία). Τα μονοκύτταρα αποτελούν πρόδρομα κύτταρα μιας υποομάδας των δενδριτικών κυττάρων. Τα δενδριτικά κύτταρα είναι αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα και προέρχονται είτε από το μυελοειδή είτε από το λεμφοειδή πρόγονο. [29]

Η παραγωγή μονοκυττάρων από τον κοινό μυελοειδή πρόγονο διεγείρεται από τον αυξητικό παράγοντα των μονοκυττάρων (M-CSF), ο οποίος είναι απαραίτητος για την ενεργοποίηση των μονοκυττάρων και των μακροφάγων αλλά όχι επαρκής. Η IL-3, ο αυξητικός παράγοντας της κοκκιδώδους σειράς (G-CSF) και ο παράγοντας

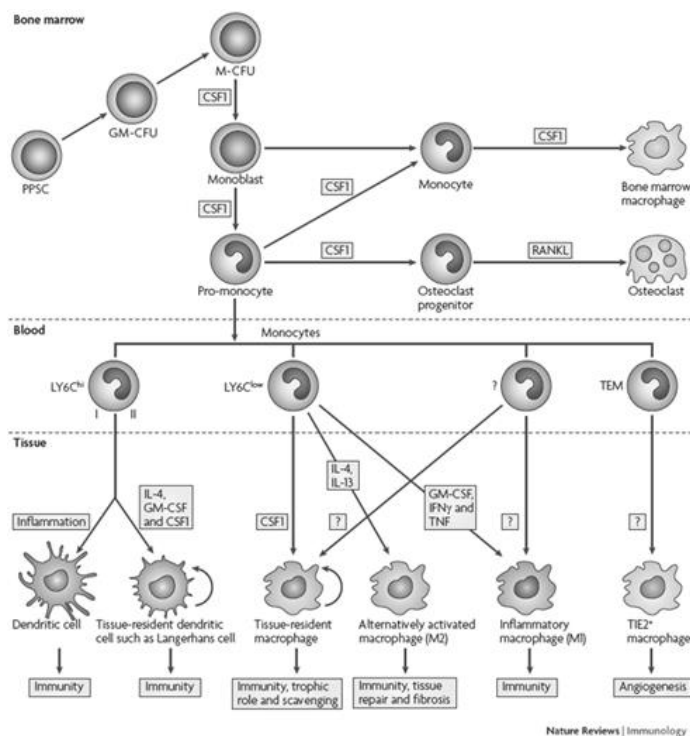
νέκρωσης όγκων (TNF) έχουν συνεργιστική δράση με τον αυξητικό παράγοντα των μονοκυττάρων στον πολλαπλασιασμό των μακροφάγων. Ο G-CSF επάγει την απελευθέρωση των μονοκυττάρων, φαινόμενο έμμεσο ωστόσο, λόγω της παρουσίας του M-CSF. Τα μονοκύτταρα έχουν λειτουργικούς υποδοχείς για τον G-CSF, ωστόσο ο G-CSF φαίνεται να δρα μειώνοντας την έκκριση μονοκινών παρά αυξάνοντας τον πολλαπλασιασμό των μονοκυττάρων. Η ιντερφερόνη-γ (INF-γ), σε συνέργεια με τις IL-2, IL-4, M-CSF και G-CSF είναι υπεύθυνη για την ενεργοποίηση των μακροφάγων. Διεγείρει τον πολλαπλασιασμό των μονοκυττάρων/ μακροφάγων, αυξάνει την έκφραση των υποδοχέων προσκόλλησης και διεγείρει την παραγωγή πρωτεολυτικών παραγόντων υπεύθυνων για την εκκαθάριση των παθογόνων.

Κύρια δράση των μακροφάγων είναι η φαγοκυττάρωση. Τα μακροφάγα φέρουν υποδοχείς για το Fc τμήμα των ανοσοσφαιρινών και μπορούν να φαγοκυτταρώσουν το αντιγόνο που είναι συνδεδεμένο με την ανοσοσφαιρίνη. Φαγοκυτταρώνουν επίσης τα βακτήρια που προσκολλώνται πάνω στα μακροφάγα. Ακολουθώς, παρουσιάζουν τα θραύσματα του αντιγόνου στα T λεμφοκύτταρα, διεγείροντας τον πολλαπλασιασμό των T λεμφοκυττάρων που φέρουν τον ειδικό υποδοχέα για αυτά τα πεπτίδια. Υπό την επίδραση της ιντερφερόνης-γ (INF-γ), η οποία παράγεται από τα T βοηθητικά λεμφοκύτταρα τάξης 1, εκφράζουν μεγαλύτερες ποσότητες υποδοχέα για το Fc τμήμα των ανοσοσφαιρινών, προάγοντας την κυτταροτοξική δραστηριότητα. Η IL-4 και η IL-13, οι οποίες παράγονται από τα T βοηθητικά λεμφοκύτταρα τάξης 2, διεγείρουν την αντιγονοπαρουσιαστική δραστηριότητα των μακροφάγων. Οι κυττοκίνες αυτές προάγουν τη διέγερση των μακροφάγων από τα T λεμφοκύτταρα, ενώ τα ενεργοποιημένα μακροφάγα με τη σειρά τους, παράγουν κυττοκίνες που διεγείρουν και τους δύο τύπους των βοηθητικών T λεμφοκυττάρων. Με αυτόν τον τρόπο ευοδώνεται η φυσική ανοσία.

Μοναδικοί επιφανειακοί δείκτες της ωρίμανσης των μονοκυττάρων στάθηκε δύσκολο να ανευρεθούν. Οι πρόδρομοι των μονοκυττάρων εκφράζουν τον υποδοχέα του αυξητικού παράγοντα των μονοκυττάρων (M-CSF), λυσοζύμη και υποδοχείς για το Fc τμήμα των ανοσοσφαιρινών. Τα ώριμα μονοκύτταρα, ομοίως με τα ουδετερόφιλα, εμφανίζουν αυξημένη έκφραση του CD11b/CD18. Μετά τη διαφοροποίησή τους σε μακροφάγα, τα κύτταρα εμφανίζουν έκφραση της μακροσιαλίνης (CD68) και της σιαλοπροσκολλητίνης (sialoadhesin), μέλος της οικογένειας υποδοχέων σύνδεσης σιαλικού οξέος, η οποία διαδραματίζει ρόλο στην αλληλεπίδραση του μακροφάγου με άλλα κύτταρα και με την εξωκυττάρια ουσία. Το CD14 είναι λειτουργική επιφανειακή πρωτεΐνη τόσο των μονοκυττάρων, όσο και των μακροφάγων. Είναι ο υποδοχέας της

λιποπολυσακχαρίδης (LPS) που οδηγεί στην ενεργοποίηση μονοκυττάρων και μακροφάγων, αλλά διαδραματίζει σημαντικό ρόλο και στην απόπτωσή τους.

Τα μονοκύτταρα περιέχουν κοκκία δύο ειδών, τα πρωτογενή και τα δευτερογενή. Τα πρωτογενή κοκκία, είναι όμοια με αυτά των ουδετεροφίλων και περιέχουν μυελοπεροξειδάση, ενώ τα δευτερογενή κοκκία είναι αρνητικά στην περοξειδάση και διαδραματίζουν ρόλο στην προσκόλληση των διεγερμένων μονοκυττάρων. [30]



Εικόνα 13. Η ελεγχόμενη από τους αυξητικούς παράγοντες ανάπτυξη των μακροφάγων. Τροποποιημένη εικόνα από Pollard J. (30)

ΔΕΝΔΡΙΤΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ

Τα δενδριτικά κύτταρα (dendritic cells/ DCs) αποτελούν αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα που προέρχονται από τα μονοκύτταρα και υφίστανται σε όλους τους ιστούς σε 'άνωριμη μορφή'. Ανιχνεύουν και αιχμαλωτίζουν σήματα προερχόμενα από μικροοργανισμούς στα όργανα στα οποία βρίσκονται και ακολούθως υπόκεινται σε μία σειρά αλλαγών που οδηγούν στην ωρίμανσή τους. Η ωρίμανσή τους χαρακτηρίζεται από τη μετανάστευσή τους στους λεμφαδένες που παροχετεύουν την προσβεβλημένη περιοχή και έκθεση του αντιγόνου μέσω του μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας (MHC) στα παρθένα T, B και NK κύτταρα και ενεργοποίηση αυτών. Τα βασικά στάδια ανάπτυξης των δενδριτικών κυττάρων είναι τέσσερα. Το

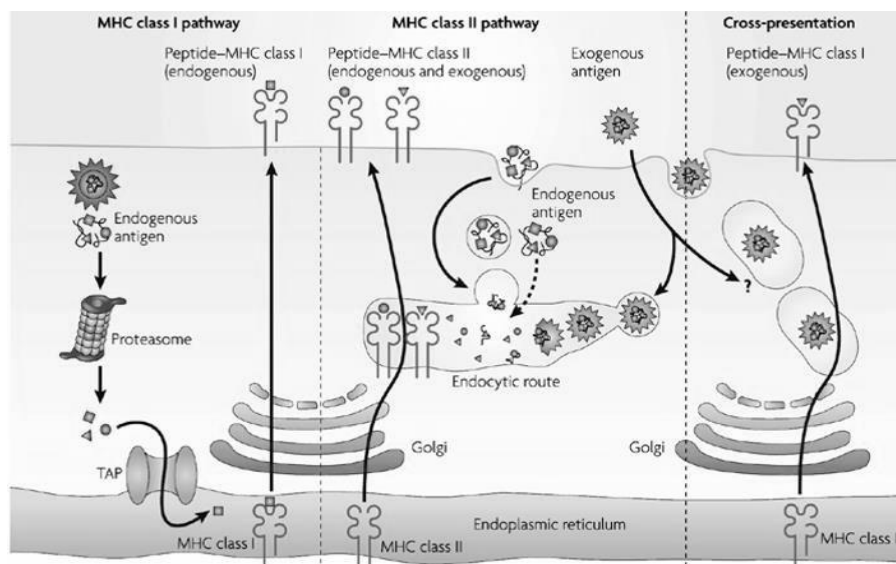
πιο πρώιμο κύτταρο, ο κοινός αιμοποιητικός πρόγονος, ακολουθείται από το πρόδρομο δενδριτικό κύτταρο, το οποίο κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης εξελίσσεται σε ανώριμο δενδριτικό κύτταρο και ακολούθως σε ώριμο δενδριτικό κύτταρο. Δύο τύποι ανώριμων δενδριτικών κυττάρων δημιουργούνται κατά τη διαφοροποίηση των CD34+ αιμοποιητικών προγονικών κυττάρων, τα CD11c+CD1a+ και τα CD11c+CD1a- ανώριμα DCs, των οποίων ο διαχωρισμός γίνεται βάσει της μεταναστευτικής τους ικανότητας. Τα πρώτα μεταναστεύουν στην επιδερμίδα και διαφοροποιούνται σε κύτταρα Langerhans ενώ τα δεύτερα εντοπίζονται σε εν τω βάθει στιβάδες του δέρματος και σε άλλους ιστούς και αποτελούν τα ενδιάμεσα ανώριμα DCs. Ο διαχωρισμός των δενδριτικών κυττάρων βάσει της προέλευσής τους δημιουργεί δύο υποπληθυσμούς δενδριτικών κυττάρων, τα δενδριτικά κύτταρα που προέρχονται από τον κοινό μυελικό πρόγονο, και ονομάζονται μυελικά (myeloid DCs) ή συμβατικά (conventional DCs/ cDCs) δενδριτικά κύτταρα και τα δενδριτικά κύτταρα που περιέχουν μετάγραφα mRNA λεμφικής προέλευσης, και αποτελούν τα πλασματοκυτταρικά δενδριτικά κύτταρα (plasmacytoid DCs/ pDCs). Τα cDCs ανιχνεύονται στο αίμα και εκφράζουν μυελικούς δείκτες όπως CD11b, CD11c, CD13, CD14, CD33. Τα pDCs ανιχνεύονται στο αίμα, στο θύμο αδένι και σε λεμφικούς ιστούς, περιέχουν άφθονο ενδοπλασματικό δίκτυο και εκφράζουν CD4 και υψηλά επίπεδα IL-3αP, χωρίς να εκφράζουν μυελικούς δείκτες όπως το CD11c. Τα κύτταρα αυτά αποκτούν τη χαρακτηριστική δενδριτική μορφολογία μετά την ενεργοποίησή τους που συνοδεύεται από αυξημένη παραγωγή ιντερφερόνης-α (IFN-α) η οποία προκαλεί την έναρξη ισχυρής αντιϊικής απάντησης και την ωρίμανση των CD11c+ cDCs, προστατεύοντάς τα από την επίδραση των ιών. Μετά την ενεργοποίησή τους τα pDCs διαφοροποιούνται σε κύτταρα που φέρουν τα ίδια χαρακτηριστικά με τα ενεργοποιημένα cDCs, δηλαδή αυξημένη έκφραση μορίων MHC II και ικανότητα να ενεργοποιούν τα παρθένα T κύτταρα. [31] Τα ανώριμα cDCs μετά την ενεργοποίησή τους μεταναστεύουν μέσω της λέμφου από τους μη λεμφικούς ιστούς στις πλούσιες σε T λεμφοκύτταρα περιοχές των λεμφαδένων. Τα pDCs μεταναστεύουν επίσης στις πλούσιες σε T κύτταρα περιοχές των δευτερογενών λεμφικών οργάνων μέσω των ενδοθηλιακών φλεβιδίων των λεμφαδένων και της οριακής ζώνης του σπληνός.

Η διαδικασία της ενεργοποίησης των δενδριτικών κυττάρων επάγεται από ποικίλα σήματα και σημεία λοίμωξης από παθογόνα, όπως κυτοκίνες (IFN-α, TNF-α, IL-1), παράγωγα μικροβίων (όπως λιποπολυσακχαρίτες), ενδοκυττάρια παράγωγα (όπως πρωτεΐνες θερμικού σοκ), αυξητικούς παράγοντες, ανοσοσυμπλέγματα και μόρια των T κυττάρων (όπως CD40). Χαρακτηρίζεται από αυξημένη προσκόλληση και παρουσία συνδιεγερτικών μορίων όπως τα CD54, CD80, CD86, MHC I και II,

κυττοκίνες και χημειοκίνες. Οι τελευταίες προκαλούν τη στρατολόγηση των Τ κυττάρων, των μονοκυττάρων και άλλων δενδριτικών κυττάρων. Στο στάδιο πλέον του ώριμου δενδριτικού κυττάρου εκφράζουν δείκτες διακριτούς από αυτούς των ανώριμων δενδριτικών, όπως το μόριο CD83 και τη λυσοσωμική πρωτεΐνη DC-LAMP. Εκφράζουν επίσης το CCR7 μόριο και αποκτούν ικανότητα απάντησης στις χημειοκίνες CCL19 και CCL21 που εκφράζονται στις πλούσιες σε Τ κύτταρα περιοχές των λεμφαδένων. Ωστόσο, παρόλο που όπως αναφέρθηκε η έκφραση των συνδεδεμένων μορίων και η μετανάστευση των δενδριτικών κυττάρων στα δευτερογενή λεμφικά όργανα σχετίζεται με την επαγωγή της ανοσιακής απάντησης από τα Τ κύτταρα, τα ενεργοποιημένα δενδριτικά κύτταρα μπορούν να επάγουν τη δημιουργία των Τ ρυθμιστικών κυττάρων και την ανοχή των Τ κυττάρων, χωρίς να έχουν αποσαφηνιστεί οι μηχανισμοί που οδηγούν στη ανοχή αντί για τη διέγερση των Τ κυττάρων.

Άρρηκτα συνδεδεμένη με την ενεργοποίηση των δενδριτικών κυττάρων είναι η ικανότητά τους να επεξεργάζονται και να εκθέτουν αντιγόνα μέσω του μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας και του μορίου CD1. Η διαδικασία της αντιγονοπαρουσίασης στα CD8+ Τ κύτταρα μέσω μορίων του μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας I (ενδογενής οδός) άρχεται με την αποδόμηση των πρωτεϊνών που συντίθενται στο κυτταρόπλασμα σε ολιγοπεπτίδια μέσω της οδού ουμπικιτίνης- πρωτεασώματος. Εναλλακτικά τα δενδριτικά κύτταρα έχουν την ικανότητα να αποκτήσουν αντιγόνα εξωγενώς με τη μορφή αποπτωτικών/νεκρωτικών κυττάρων, ανοσοσυμπλεγμάτων και πρωτεϊνών θερμικού σοκ, και να τα εκθέσουν σε μόρια του MHC I, μια διαδικασία που ονομάζεται διασταυρούμενη παρουσίαση (cross-presentation). Αντιγόνα τα οποία έχουν απελευθερωθεί από ενδοκυττάρια κυστίδια μπορούν επίσης να φαγοκυτταρωθούν και να αποκτηθούν από τα δενδριτικά κύτταρα. Η εξωγενής οδός αντιγονοπαρουσίασης στα CD4+ Τ κύτταρα μέσω του MHC II λαμβάνει χώρα στο ενδοπλασματικό δίκτυο των δενδριτικών κυττάρων. Αφού δημιουργηθούν τα μόρια του MHC II μεταφέρονται σε ειδικά διαμερίσματα του λυσοσωμικού συστήματος τα οποία εμπλέκονται στην επεξεργασία εξωγενών αντιγόνων. Τα αντιγόνα αυτά αποδομούνται μέσω ενεργοποίησης πρωτεασών όπως οι κατεψίνες και εκτίθενται σε μόρια του MHC II προκαλώντας την ενεργοποίηση των CD4+ Τ κυττάρων. (Εικόνα 14) Εκτός από την ικανότητα να επηρεάζουν τη λειτουργία των Τ κυττάρων, τα δενδριτικά κύτταρα μπορούν να επηρεάσουν τον πολλαπλασιασμό των Β κυττάρων καθώς και τη διαφοροποίησή τους σε πλασματοκύτταρα. Επιπροσθέτως η αλληλεπίδραση των ώριμων δενδριτικών κυττάρων με τα NK κύτταρα οδηγεί σε ενεργοποίηση των NK

κυττάρων, αυξάνοντας την κυτταροτοξική τους δραστηριότητα, ενώ τα NK κύτταρα με τη σειρά τους επάγουν την ωρίμανση των δενδριτικών κυττάρων. [32]



Εικόνα 14. Οδοί αντιγονοπαρουσίασης από τα δενδριτικά κύτταρα. Τροποποιημένη εικόνα από Villadangos J et al. (31)

ΚΟΚΚΙΟΚΥΤΤΑΡΑ

Τα κοκκιοκύτταρα παράγονται στο μυελό των οστών από το πολυδύναμο αρχέγονο αιμοποιητικό κύτταρο και μπορούν να κατηγοριοποιηθούν περαιτέρω σε ουδετερόφιλα, βασεόφιλα και ηωσινόφιλα, ανάλογα με τον τύπο των κοκκίων που περιέχουν στο κυτταρόπλασμά τους. Η ανάπτυξη των κοκκιοκυττάρων υπόκειται σε πληθώρα εξωτερικών ερεθισμάτων, συμπεριλαμβανομένων κυττοκινών, πρωτεϊνών του στρώματος και άλλων κυτταρικών προϊόντων του μικροπεριβάλλοντος του μυελού των οστών. Συνδυασμός κυττοκινών και αυξητικών παραγόντων επηρεάζουν την ωρίμανση των κοκκιοκυττάρων στις προαναφερθείσες κατηγορίες.

Η διαδικασία της διαφοροποίησης του προγονικού κυττάρου στο μυελό των οστών σε κοκκιοκύτταρο διαρκεί 7- 10 ημέρες. Τα κύτταρα διέρχονται από διάφορα στάδια ωρίμανσης, κατά τη διάρκεια των οποίων αποκτούν τη μορφολογία και τον τύπο των κοκκίων που χαρακτηρίζει τα ώριμα κοκκιοκύτταρα. Ο πρώτος αναγνωρίσιμος πρόδρομος της κοκκιοκύτταρου σειράς που έχει περιγραφεί είναι η μυελοβλάστη, ένα κύτταρο με υψηλή αναλογία πυρήνα / κυτταροπλάσματος και παρουσία ελάχιστων κοκκίων, μη ορατά στο οπτικό μικροσκόπιο. Καθώς η μυελοβλάστη ωριμάζει σε

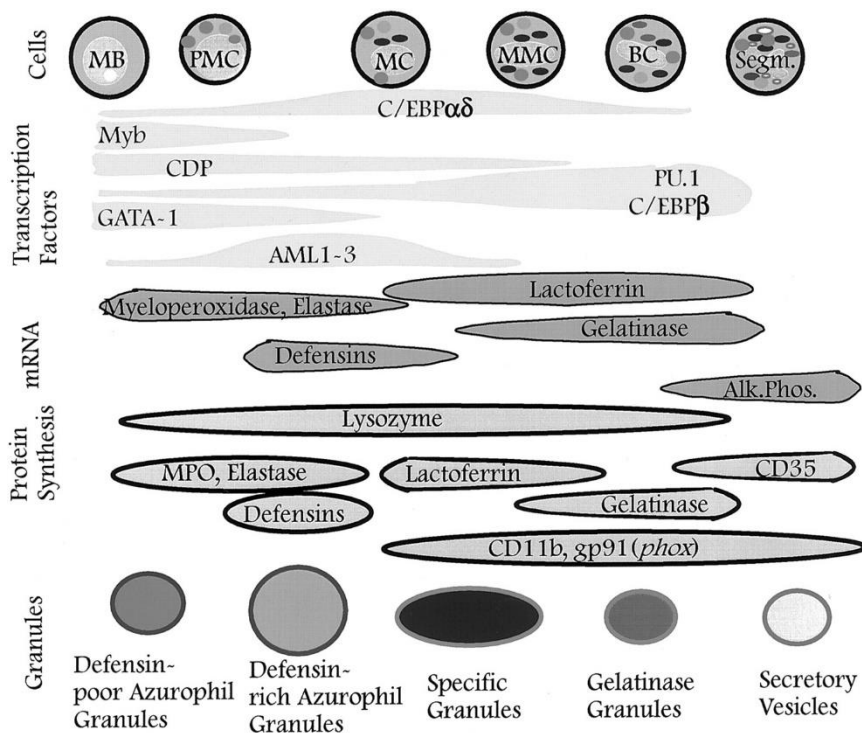
προμυελοκύτταρο αποκτά άφθονα πρωτογενή αζουρόφιλα κοκκία που περιβάλλουν τη συσκευή Golgi και διασκορπίζονται σε όλο το κυτταρόπλασμα. Τα πρωτογενή κοκκία απαντώνται τόσο στα κοκκιοκύτταρα όσο και στα μονοκύτταρα και περιέχουν πρωτεΐνες απαραίτητες για τον ενδοκυττάριο θάνατο των μικροβίων. Συγκριτικά με τη μυελοβλάστη ο λόγος πυρήνα / κυτταροπλάσματος στο προμυελοκύτταρο είναι μικρότερος, ο πυρήνας παρουσιάζει ελαφρά συμπύκνωση και το πυρήνιο είναι ευδιάκριτο. Η ωρίμανση σε μυελοκύτταρο συνδέεται με την απόκτηση δευτερογενών ή ειδικών κοκκίων τα οποία δίνουν και την χαρακτηριστική χρώση που διακρίνει τα μυελοκύτταρα σε ουδετερόφιλα, ηωσινόφιλα και βασεόφιλα. Ο πυρήνας του μυελοκυττάρου εμφανίζει αβαθή εντομή στη μια πλευρά και τα πυρήνια δεν είναι εμφανή. Το κυτταρόπλασμα είναι πιο οξεόφιλο από αυτό του προμυελοκυττάρου και η συσκευή Golgi είναι δυσδιάκριτη. Το στάδιο του μεταμυελοκυττάρου ακολουθεί αυτό του μυελοκυττάρου, όπου ο πυρήνας του εμφανίζει βαθιά εντομή. Ακολουθεί το στάδιο του ραβδοπυρήνου ουδετεροφίλου. Το ραβδοπύρηνο φέρει πυρήνα ως επί σπειροειδούς ταινίας, χωρίς να διαχωρίζεται από ινίδια όπως το πολυμορφοπύρηνο. Φέρει βαθύτερη εντομή από το μεταμυελοκύτταρο και ένα σημαντικό μέρος του πυρήνα έχει παράλληλες πλευρές. Το ραβδοπύρηνο ουδετερόφιλο ακολουθείται στην ωρίμανση από το ουδετερόφιλο πολυμορφοπύρηνο. [33]

ΟΥΔΕΤΕΡΟΦΙΛΑ:

Οι πρόδρομοι των ουδετεροφίλων αποτελούν περίπου το μισό του αριθμού των κυττάρων ενός φυσιολογικού μυελού των οστών, με την πλειοψηφία αυτών να είναι στο στάδιο του μεταμυελοκυττάρου και των πιο διαφοροποιημένων μορφών. Τα προμυελοκύτταρα και τα μυελοκύτταρα αντιπροσωπεύουν την κύρια δεξαμενή πολλαπλασιασμού των προγονικών κοκκιοκυττάρων στο μυελό των οστών. Μετά το στάδιο του μυελοκυττάρου τα κύτταρα ωριμάζουν σε μεταμυελοκύτταρα, ραβδοπύρηνα και τελικώς ουδετερόφιλα πολυμορφοπύρηνα, ως μη διαιρούμενα. Στο στάδιο του μεταμυελοκυττάρου η πρωτεΐνοσύνθεση έχει διακοπεί. Ο πυρήνας του ουδετερόφилου μεταμυελοκυττάρου παρουσιάζει βαθιά εντομή και το κυτταρόπλασμα είναι οξεόφιλο. Τα ραβδοπύρηνα και τα ουδετερόφιλα πολυμορφοπύρηνα αποτελούν περίπου το 50% της μάζας των κοκκιοκυττάρων στο μυελό των οστών. Μόνο το 5% του συνόλου των ουδετεροφίλων κυκλοφορούν στο περιφερικό αίμα. Τα ουδετερόφιλα αυτά χωρίζονται σε μια κυκλοφορούσα και σε μία περιφερική δεξαμενή. Την πρώτη αποτελούν ουδετερόφιλα που βρίσκονται σε μικρά και μεγάλα αγγεία και κυκλοφορούν ελεύθερα, ενώ τη δεύτερη ουδετερόφιλα που είναι προσκολλημένα στα τοιχώματα μικρών αγγείων και κυρίως των τριχοειδών. Τα

ώριμα πολυμορφοπύρρηνα κυκλοφορούν στο περιφερικό αίμα για 3 έως 12 ώρες και μετέπειτα μεταναστεύουν στους ιστούς όπου επιβιώνουν για 2 -3 ημέρες.

Την εξέλιξη των κοκκιοκυττάρων από τις άωρες μορφές ως το στάδιο του πολυμορφοπυρήνου συνοδεύουν βιοχημικά γεγονότα που περιλαμβάνουν την απόκτηση πρωτογενών κοκκίων και πρωτεϊνών που περιέχονται σε αυτά (παραδείγματος χάριν μυελοπεροξειδάση, λυσοζύμη, ουδετεροφιλική ελαστάση), δευτερογενών κοκκίων και των πρωτεϊνών τους (λακτοφερρίνη, ουδετεροφιλική κολλαγενάση, ουδετεροφιλική ζελατινάση, τρανσκοβαλαμίνη) και τριτογενών κοκκίων που περιέχουν ουδετεροφιλική ζελατινάση. (Εικόνα 15) Η προοδευτική απόκτηση χαρακτηριστικών διαφοροποιημένου κυττάρου από τα κοκκιοκύτταρα συνοδεύεται από απώλεια της ικανότητας πολλαπλασιασμού. Αυτή η διαδικασία διακόπτεται στην οξεία μυελογενή λευχαιμία, όπου εμποδίζεται η διαδικασία ωρίμανσης και καταλήγουν στην κυκλοφορία ανώριμα βλαστικά κύτταρα.



Εικόνα 15. Το είδος των κοκκίων που περιέχονται αναλόγως του σταδίου διαφοροποίησης του κοκκιοκυττάρου. Τροποποιημένη εικόνα από Borregaard N και Cowland J. (163)

Σε συνθήκες φλεγμονής και έκθεσης σε ενδοτοξίνες βακτηρίων επιστρατεύονται ουδετερόφιλα από το μυελό των οστών στην κυκλοφορία και στους φλεγμαίνοντες ιστούς. Τα ουδετερόφιλα έχουν πολλαπλές λειτουργίες συμπεριλαμβανομένης της

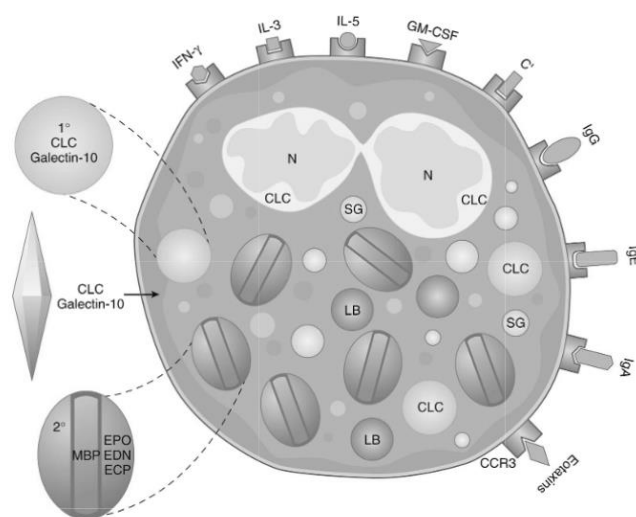
άμεσης θανάτωσης των ξένων οργανισμών μέσω φαγοκυττάρωσης ή απελευθέρωσης υδροξυλασών και οξειδωτικών ενζύμων από τα πρωτογενή και δευτερογενή κοκκία, απελευθέρωσης υποδοχέων αναγνώρισης παθογόνου (Pathogen Recognition Receptors - PPRs), και σχηματισμό εξωκυττάρου δικτύου ουδετεροφίλων που παγιδεύει οργανισμούς. Τα ουδετερόφιλα (μέσω χημειοκινών και κυττοκινών) επιστρατεύουν και ενεργοποιούν κύτταρα της ειδικής ανοσιακής απάντησης, δηλαδή λεμφοκύτταρα και δενδριτικά κύτταρα.

Ο φαινότυπος των κοκκιοκυττάρων εξαρτάται από το στάδιο της ωρίμανσης αυτού. Στον κοινό μυελοειδή πρόγονο εκφράζονται οι δείκτες CD34 και CD33. Η έκφραση του CD33 ασθενεί κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης του κοκκιοκυττάρου και εξαφανίζεται από το στάδιο του μυελοκυττάρου και έπειτα. Χαρακτηριστικοί δείκτες των κοκκιοκυττάρων που αποκτούνται κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης του μυελοειδή προγόνου σε ουδετερόφιλο είναι το CD45RA, η μυελοπεροξειδάση (MPO) και το CD38, οι οποίοι εκφράζονται όλοι στο στάδιο της μυελοβλάστης. Περαιτέρω διαφοροποίηση οδηγεί σε αύξηση της έκφρασης του CD16, του CD11b/ CD18 και της λευκοκυτταρικής αλκαλικής φωσφατάσης (LAP), οι οποίοι εκφράζονται σε υψηλά επίπεδα στο στάδιο του ώριμου ουδετεροφίλου. [34]

ΗΩΣΙΝΟΦΙΛΑ:

Οι πρόδρομοι των ηωσινοφίλων απαρτίζουν περίπου το 3% των κυττάρων του μυελού των οστών. Από αυτούς τα 2/3 είναι στο στάδιο του μυελοκυττάρου και το 1/3 είναι ώριμα ηωσινόφιλα. Τα ηωσινόφιλα συνήθως εμφανίζουν δίλοβο πυρήνα ενώ χαρακτηριστικό τους είναι τα κοκκία που προσλαμβάνουν πορτοκαλί χρώμα με τις συνήθεις χρωστικές. Τα κοκκία που περιέχονται διαχωρίζονται σε πρωτογενή, δευτερογενή και μικρά κοκκία (small granules - SG). Τα δευτερογενή κοκκία περιέχουν ειδικές κατιονικές πρωτεΐνες, στις οποίες περιλαμβάνονται η μείζων βασική πρωτεΐνη (major basic protein - MBP), η ηωσινοφιλική περοξειδάση (eosinophil peroxidase - EPX), η ηωσινοφιλική κατιονική πρωτεΐνη (eosinophil cationic protein - ECP) και η ηωσινοφιλική νευροτοξίνη (eosinophil-derived neurotoxin - EDN). Τα ηωσινόφιλα επίσης περιέχουν μη μεμβρανικά- συνδεδεμένα πλούσια σε λιπίδια οργανίδια (lipid bodies - LB), τα οποία συχνά συγχέονται με τα κοκκία που ανευρίσκονται σε πολλούς τύπους λευκοκυττάρων. (Εικόνα 16) Τα φυσιολογικά ηωσινόφιλα περιέχουν μεγαλύτερο αριθμό λιπιδίων συγκριτικά με τα ουδετερόφιλα, και ο αριθμός των λιπιδίων αυξάνεται κατά τη διάρκεια της ενεργοποίησης των ηωσινοφίλων. Μετά την απελευθέρωσή τους από το μυελό τα

ώριμα ηωσινόφιλα κυκλοφορούν για περίπου 18 ώρες πριν μεταναστεύσουν στους ιστούς. Τα ηωσινόφιλα πολλαπλασιάζονται και ωριμάζουν υπό την επίδραση της ιντερλευκίνης 3 (IL-3), της ιντερλευκίνης 5 (IL-5) και του αυξητικού παράγοντα των κοκκιοκυττάρων και των μακροφάγων (Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor GM-CSF). Υπάρχουν ενδείξεις ότι οι κυττοκίνες αυτές εκκρίνονται από τα Τ λεμφοκύτταρα, καθώς παρατηρήθηκε ότι πολλές διαταραχές των Τ λεμφοκυττάρων συνδέονται με ηωσινοφιλία. Μελέτες σχετικά με το ιδιοπαθές υπερηωσινοφιλικό σύνδρομο ανέδειξαν μεταλλάξεις του PDGFR-α (Platelet derived growth factor receptor-α) που οδηγούν σε διαρκή ενεργοποίηση τυροσινικής κινάσης και πολλαπλασιασμό ηωσινοφίλων. Μετά την διέγερσή τους από τους προαναφερθέντες παράγοντες σε αλλεργικές ή μη φλεγμονώδεις συνθήκες, καθώς και σε συνθήκες κακοήθειας, τα ηωσινόφιλα πολλαπλασιάζονται, ωριμάζουν και εκκρίνουν τα προσχηματισμένα κοκκία τους και τα νεοσχηματισμένα λιπίδια, κυττοκίνες και πεπτιδικούς μεσολαβητές της φλεγμονής. [35] Ο κύριος ρόλος των ηωσινοφίλων είναι η προστασία του ξενιστή μέσω καταστροφής των παρασίτων. Τα ηωσινόφιλα αποκοκκιώνονται ταχέως έπειτα από διέγερση από αντιγόνα, κυττοκίνες και εκκριτικές IgA, IgE και IgG. Οι πρωτεΐνες που απελευθερώνονται από τα ηωσινόφιλα προκαλούν την απελευθέρωση ισταμίνης από τα βασεόφιλα και τα μαστοκύτταρα και ενισχύουν την απάντηση στη φλεγμονή. Ωστόσο αποτελούν ισχυρές τοξίνες έναντι των κυττάρων του ξενιστή, οδηγώντας σε ιστική βλάβη. [36]



Εικόνα 16. Δομή του ώριμου ηωσινοφίλου. Τροποποιημένη εικόνα από Kremyanskaya M et al. (164)

ΒΑΣΕΟΦΙΛΑ:

Τα βασεόφιλα λευκοκύτταρα (μαστοκύτταρα και βασεόφιλα) αποτελούν μεσολαβητές των αλλεργικών και φλεγμονωδών απαντήσεων, με τα μαστοκύτταρα να έχουν κυρίαρχο ρόλο στους ιστούς και τα βασεόφιλα στην κυκλοφορία. Και οι δύο τύποι φέρουν κοκκία που περιέχουν ισταμίνη, παράγοντα ενεργοποίησης αιμοπεταλίων και βιοδραστικές πρωτεογλυκάνες, και εκφράζουν τον υποδοχέα που συνδέεται με υψηλή συγγένεια με το Fc τμήμα της IgE (FcεR) και επάγει την ταχεία αποκοκκίωσή τους κατόπιν έκθεσης στην IgE, ως απάντηση σε παράσιτα ή άλλα αλλεργιογόνα. Η αποκοκκίωση μπορεί να είναι ταχεία, προκαλώντας αναφυλαξία, ή παρατεταμένη, επάγοντας παρατεταμένη φλεγμονώδη απάντηση. Οι διαφορές μεταξύ των βασεοφίλων και των μαστοκυττάρων περιλαμβάνουν τις παραγόμενες κυττοκίνες και την έκφραση διαφορετικών υποδοχέων από κάθε κύτταρο. Αναλυτικότερα, στα βασεόφιλα εκφράζονται υποδοχείς για IgG, C3a και C5a, ενώ στα μαστοκύτταρα υποδοχείς για τον παράγοντα των αρχέγονων κυττάρων, τις ιντερλευκίνες 2 (IL-2) και 3 (IL-3). Τα βασεόφιλα έχουν δίλοβο πυρήνα και τα προαναφερθέντα κοκκία, μωβ χρώματος, μπορούν να καλύψουν τον πυρήνα. Τα βασεόφιλα προέρχονται από το μυελικό πρόγονο και απελευθερώνονται από το μυελό των οστών στην κυκλοφορία ως ώριμα κύτταρα, με χρόνο ζωής όμοιο με αυτό των ουδετεροφίλων. Η ωρίμανσή τους επέρχεται σε απάντηση στην IL-3, η οποία επάγει την διαφοροποίηση των βασεοφίλων αλλά και την ενεργοποίηση των ώριμων βασεοφίλων.[34] Τα βασεόφιλα αποτελούν μεσολαβητές των άμεσων αντιδράσεων υπερευαισθησίας, όπως το άσθμα, η κνίδωση και η αναφυλαξία. Εμπλέκονται επίσης στην καθυστερημένη δερματική αντίδραση υπερευαισθησίας. Η διέγερσή τους προκαλείται από μία σειρά μεσολαβητών, όπως οι IgE, IL-3, C5a, GM-CSF, δήγματα εντόμων και μορφίνη, για να απελευθερώσουν το περιεχόμενο των κοκκίων τους, κυρίως ισταμίνη. [37] Τα μαστοκύτταρα σε αντίθεση με τα βασεόφιλα, απελευθερώνονται στην κυκλοφορία ως ανώριμα κύτταρα, ενώ προέρχονται και αυτά από το μυελικό πρόγονο. Κυκλοφορούν βραχέως στο περιφερικό αίμα πριν τη μετανάστευσή τους στους ιστούς, όπου ολοκληρώνεται η ωρίμανσή τους. Ανευρίσκονται σχεδόν σε όλους τους ιστούς, αλλά στις ανατομικές θέσεις όπου έρχονται σε επαφή με το περιβάλλον, όπως στο βλεννογόνο των αεραγωγών και του εντέρου και στο δέρμα, είναι αυξημένα στον αριθμό. Αποτελούν μεσολαβητές της αλλεργικής φλεγμονώδους απάντησης, τόσο στην οξεία φάση (αναφυλαξία, ασθματική κρίση) όσο και στις όψιμες αλλεργικές αντιδράσεις, καθώς και στις αντιδράσεις υπερευαισθησίας. Επιπλέον τα μαστοκύτταρα μεσολαβούν στην αύξηση της Th2 απάντησης και της σύνθεσης της

ειδικής για το αλλεργιογόνο IgE, τα οποία συμβάλλουν στην άμυνα του οργανισμού ενάντια στις παρασιτικές λοιμώξεις. [38]

1.3 ΑΝΟΣΙΑΚΗ ΑΠΑΝΤΗΣΗ

Η ανοσιακή απάντηση μπορεί να διαχωριστεί στη φυσική ανοσία (natural or native or innate immunity) και στην επίκτητη ή ειδική ανοσία (acquired or specific or adaptive immunity). Στόχο και των δύο συστημάτων αποτελεί η άμυνα κατά των παθογόνων που επιδιώκουν την είσοδο μέσω ενός εκ των τεσσάρων ανατομικών περιοχών: αναπνευστικό, γαστρεντερικό, ουρογεννητική οδό και δέρμα. Η φυσική ανοσία περιλαμβάνει κύτταρα και διαρκώς εκφραζόμενους μεμβρανικούς ή διαλυτούς υποδοχείς των κυττάρων αυτών, που αναγνωρίζουν ειδικά παθογόνα χωρίς να προηγηθεί έκθεση στα παθογόνα αυτά. Η σύνδεση του παθογόνου με τον υποδοχέα οδηγεί στην άμεση ενεργοποίηση της ανοσιακής απάντησης. Τα κύρια στοιχεία της φυσικής ανοσίας είναι το επιθήλιο, τα φαγοκύτταρα (μακροφάγα, ουδετερόφιλα), τα NK κύτταρα και το συμπλήρωμα. Εν αντιθέσει, τα κύτταρα της ειδικής ανοσίας δεν δημιουργούν ικανή ανοσιακή απάντηση στην πρώτη έκθεση με το αντιγόνο λόγω του περιορισμένου αριθμού των ειδικών για το αντιγόνο T και B κυττάρων που απαντώνται στον ξενιστή. Ωστόσο σε επαναλαμβανόμενες λοιμώξεις ή σε λοιμώξεις από παθογόνα που διαλάθουν της φυσικής ανοσίας, αυξάνεται ο πληθυσμός των ειδικών για το αντιγόνο λεμφοκυττάρων. (Πίνακας 2)

Η σύνδεση των μορίων ή των υποδοχέων αναγνώρισης του παθογόνου με το παθογόνο προκαλεί την έναρξη της φυσικής ανοσιακής απάντησης. Αρχικά η σύνδεση αυτή επάγει την εκκαθάριση των παθογόνων από τα μονοκύτταρα, μακροφάγα και ουδετερόφιλα. Η διαδικασία αυτή προκαλείται μέσω φαγοκυττάρωσης και απελευθέρωσης στους ιστούς βακτηριοτοξικών μορίων, όπως λυσοζύμη, λακτοφερρίνη, μυελοπεροξειδάση, αντιμικροβιακά πεπτιδία, νιτρώδες οξειδίου και ρίζες υπεροξειδίου. Τα μόρια αυτά είναι τοξικά στα παθογόνα και επάγουν την τοπική φλεγμονώδη απάντηση, η οποία οδηγεί σε ιστική βλάβη. Ακολουθεί η παραγωγή και η έκκριση προφλεγμονωδών κυττοκινών, χημειοκινών και ιντερφερονών τύπου I. Οι ιντερφερόνες δρουν στα T και NK κύτταρα και επάγουν την αντιιική και αντικαρκινική απάντηση. Το τελικό στάδιο της φυσικής ανοσίας επέρχεται με την ενεργοποίηση της ειδικής ανοσιακής απάντησης. Η ενεργοποίηση αυτή επιτελείται μέσω των κυττοκινών οι οποίες ενεργοποιούν τα λεμφοκύτταρα, αλλά και μέσω της έκθεσης, μεταφοράς και παρουσίασης των αντιγόνων άμεσα στα T κύτταρα (κυρίως μέσω των δενδριτικών κυττάρων).

Η ειδική ανοσιακή απάντηση επιτυγχάνει δύο στόχους, τη δημιουργία του ειδικού για το παθογόνο υποδοχέα και την ενίσχυση των ειδικών για το παθογόνο κυττάρων. Οι στόχοι αυτοί επιτυγχάνονται μέσω της δημιουργίας ποικίλων υποδοχέων Τ κυττάρων (TCR), υποδοχέων Β κυττάρων (BCR) και ανοσοσφαιρίνης (Ig). Η αρχική απάντηση προκαλείται μέσω της φαγοκυττάρωσης από τα δενδριτικά κύτταρα των παθογόνων και της αποδόμησής τους σε μικρά πεπτίδια. Τα πεπτίδια αυτά ακολούθως παρουσιάζονται στην επιφάνεια των δενδριτικών κυττάρων συνδεδεμένα με μόρια του μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας. Τα Τ και τα Β κύτταρα που αναγνωρίζουν αυτά τα πεπτίδια, ενεργοποιούνται και διαιρούνται. Η τοπική φλεγμονή που έχει προκληθεί κατά τη φάση της φυσικής ανοσίας προάγει τη στρατολόγηση συμπληρωματικών λεμφοκυττάρων στο σημείο εισόδου του παθογόνου. Συνέπεια της ενεργοποίησης των λεμφοκυττάρων αποτελεί η παραγωγή ειδικών για το διαλυτό αντιγόνο αντισωμάτων (μέσω διαφοροποίησης των Β κυττάρων) ή άμεση λύση των προσβεβλημένων κυττάρων (μέσω των Τ κυττάρων και των εκκρινόμενων από αυτά κυττοκινών). [29]

Feature	Innate	Adaptive
Response time	Hours to days	>5 days
Expression	Constitutive	Induced by pathogen exposure
Shaped by pathogen exposure	No	Yes
Approximate number of gene products involved in direct pathogen recognition	10^2 to 10^3	10^{10} to 10^{14}
Clonal response	No	Yes

Πίνακας 2. Χαρακτηριστικά της φυσικής και ειδικής ανοσίας. Τροποποιημένος πίνακας από Powell LD et al. (29)

2. ΟΞΕΙΑ ΛΕΥΧΑΙΜΙΑ

Η οξεία λευχαιμία (ΟΛ) αποτελεί μία κλωνική διαταραχή του αιμοποιητικού ιστού, που χαρακτηρίζεται από ανεξέλεγκτη παραγωγή άωρων κλωνικών κυττάρων που καθιστούν το μυελό των οστών ανεπαρκή για φυσιολογική αιμοποίηση. Πρόκειται για εξαιρετικά θανατηφόρο νόσημα με άκρως αναγκαία τη χορήγηση θεραπευτικής αγωγής στον ασθενή, καθώς η επιβίωση χωρίς θεραπεία ανέρχεται σε χρονικό διάστημα μικρότερο των τριών μηνών [39]. Τα βλαστικά κύτταρα παρουσιάζουν αδυναμία διαφοροποίησης και απουσία ωρίμανσης, στοιχείο που αποτελεί ειδοποιό διαφορά της οξείας από τις χρόνιες λευχαιμίες και τα μυελοϋπερπλαστικά – μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα. Η οξεία λευχαιμία μπορεί να είναι πρωτοπαθής ή δευτεροπαθής λόγω εξέλιξης μυελοδυσπλαστικού συνδρόμου ή συνέπεια θεραπείας με αλκυλιούντες παράγοντες, ακτινοβολία ή αναστολείς τοποϊσομεράσης II. [40]

2.1 ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ

Η οξεία λευχαιμία διαιρείται σε δύο κατηγορίες βάσει της φύσης του κυριαρχούντος κυττάρου, οξεία μυελογενής και οξεία λεμφοβλαστική λευχαιμία, και ταξινομείται σύμφωνα με τη μορφολογία, τον ανοσοφαινότυπο και τα κυτταρογενετικά χαρακτηριστικά του κυττάρου αυτού. Η κατάταξη βάσει μορφολογίας (French-American-British classification / FAB) χρησιμοποιείται στην οξεία μυελογενή λευχαιμία αλλά έχει μικρή προγνωστική αξία και με την ανάπτυξη των γενετικών δεικτών τείνει να αντικατασταθεί από την κατάταξη του παγκόσμιου οργανισμού υγείας (World Health Organization / WHO). Στην οξεία λεμφοβλαστική λευχαιμία τείνει να εγκαταλειφθεί η μορφολογική κατάταξη, ενώ εκτός από την κατάταξη του WHO χρησιμοποιείται ευρέως και η ανοσοφαινοτυπική κατάταξη κατά EGIL (European Group for the Immunological Characterization of Acute Leukaemia).

2.1.1 ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ ΟΞΕΙΑΣ ΛΕΥΧΑΙΜΙΑΣ ΚΑΤΑ WHO

Η ταξινόμηση κατά WHO κατατάσσει τις οξείες λευχαιμίες σε τρεις κύριες κατηγορίες με βάση την κυτταρική προέλευση:

- A. Οξεία Μυελογενής Λευχαιμία (ΟΜΛ)
- B. Οξεία Λεμφοβλαστική Λευχαιμία (ΟΛΛ)
- C. Οξεία Λευχαιμία Απροσδιόριστης Προέλευσης

A. Ταξινόμηση οξείας μυελογενούς λευχαιμίας κατά WHO

- i. Οξεία μυελογενής λευχαιμία με επαναλαμβανόμενες κυτταρογενετικές ανωμαλίες
 - Οξεία μυελογενής λευχαιμία με t(8;21)(q22;q22) [RUNX1- RUNX1T1]
 - Οξεία μυελογενής λευχαιμία με inv(16)(p13.1;q22) ή t(16;16)(p13.1;q22) [CBFB-MYH11]
 - Οξεία Προμυελοκυτταρική Λευχαιμία με PML-RARA [t(15;17)(q22;q11-12) ή κρυπτικό ή με σύμπλοκες αναδιατάξεις PML-RARA]
 - Οξεία μυελογενής λευχαιμία με t(9;11)(p21.3;q23.3) [KMT2A-MLLT3]
 - Οξεία μυελογενής λευχαιμία με t(6;9)(p23;q34.1) [DEK-NUP214]
 - Οξεία μυελογενής λευχαιμία με inv(3)(q21.3;q26.2) ή t(3;3)(q21.3;q26.2) [GATA2, MECOM]
 - Οξεία μυελογενής λευχαιμία (μεγακαρουοβλαστική) με t(1;22)(p13.3;q13.1); [RBM15-MLK1]
 - Οξεία μυελογενής λευχαιμία με μεταλλαγμένο NPM1
 - Οξεία μυελογενής λευχαιμία με διαλληλικές μεταλλάξεις του CEBPA
 - Οξεία μυελογενής λευχαιμία με BCR-ABL1 (προσωρινή οντότητα)
 - Οξεία μυελογενής λευχαιμία με μεταλλαγμένο RUNX1 (προσωρινή οντότητα)
- ii. Οξεία μυελογενής λευχαιμία με αλλοιώσεις σχετιζόμενες με μυελοδυσπλασία
- iii. Μυελικά νεοπλάσματα σχετιζόμενα με προηγηθείσα θεραπεία
- iv. Οξεία μυελογενής λευχαιμία μη αλλιώς καθοριζόμενη (NOS- not otherwise specified)
- v. Μυελοειδές σάρκωμα
- vi. Μυελικές υπερπλασίες σχετιζόμενες με σύνδρομο Down

B. Ταξινόμηση οξείας λεμφοβλαστικής λευχαιμίας κατά WHO

B Λεμφοβλαστική λευχαιμία/λέμφωμα

- i. B Λεμφοβλαστική λευχαιμία/λέμφωμα με επαναλαμβανόμενες κυτταρογενετικές ανωμαλίες:
- B Λεμφοβλαστική λευχαιμία/λέμφωμα με t(9;22)(q34.1;q11.2) [BCR-ABL1]
 - B Λεμφοβλαστική λευχαιμία/λέμφωμα με t(v;11q23.3) [KMT2A αναδιάταξη]
 - B Λεμφοβλαστική λευχαιμία/λέμφωμα με t(12;21)(p13.2;q22.1) [TEL- AML1] ή [ETV6-RUNX1]
 - B Λεμφοβλαστική λευχαιμία/λέμφωμα με υπερδιπλοειδία
 - B Λεμφοβλαστική λευχαιμία/λέμφωμα με υποδιπλοειδία
 - B Λεμφοβλαστική λευχαιμία/λέμφωμα με t(5;14)(q31.1;q32.1) [IGH/IL3]
 - B Λεμφοβλαστική λευχαιμία/λέμφωμα με t(1;19)(q23;p13.3) TCF3-PBX1
 - B Λεμφοβλαστική λευχαιμία/λέμφωμα ομοιάζουσα με BCR-ABL1
 - B Λεμφοβλαστική λευχαιμία/λέμφωμα με iAMP21
- ii. B Λεμφοβλαστική λευχαιμία/λέμφωμα μη αλλιώς καθοριζόμενη

T Λεμφοβλαστική λευχαιμία/λέμφωμα

NK Λεμφοβλαστική λευχαιμία/λέμφωμα

C. Ταξινόμηση οξείας λευχαιμίας απροσδιόριστης προέλευσης κατά WHO

- Οξεία αδιαφοροποίητη λευχαιμία
- Μεικτού φαινοτύπου οξεία λευχαιμία με t(9;22)(q34.1;q11.2) [BCR-ABL1]
- Μεικτού φαινοτύπου οξεία λευχαιμία με t(v;11q23.3) [KMT2A αναδιάταξη]
- Μεικτού φαινοτύπου οξεία λευχαιμία B – μυελοειδής μη αλλιώς καθοριζόμενη
- Μεικτού φαινοτύπου οξεία λευχαιμία T – μυελοειδής μη αλλιώς καθοριζόμενη
- Μεικτού φαινοτύπου οξεία λευχαιμία μη αλλιώς καθοριζόμενη, σπάνιοι τύποι
- Οξεία λευχαιμία απροσδιόριστης προέλευσης, μη αλλιώς καθοριζόμενη

[41]

2.1.2 ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ ΟΞΕΙΑΣ ΛΕΥΧΑΙΜΙΑΣ ΚΑΤΑ FAB (ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΚΗ):

Οξεία μυελογενής λευχαιμία

- M0 : Αδιαφοροποίητη μυελοβλαστική λευχαιμία
- M1 : Μυελοβλαστική μη καλά διαφοροποιημένη λευχαιμία
- M2 : Μυελοβλαστική καλά διαφοροποιημένη λευχαιμία
- M3 : Προμυελοκυτταρική λευχαιμία
- M4 : Μυελομονοκυτταρική λευχαιμία
- M5 : Μονοκυτταρική λευχαιμία
- M6 : Ερυθρολευχαιμία
- M7 : Μεγακαρυοβλαστική λευχαιμία

Οξεία λεμφοβλαστική λευχαιμία

- L1: Οξεία λεμφοβλαστική λευχαιμία με μικρά ομοιόμορφα κύτταρα
- L2: Οξεία λεμφοβλαστική λευχαιμία με μεγάλα ποικιλόμορφα κύτταρα
- L3: Οξεία λεμφοβλαστική λευχαιμία με μεγάλα ποικιλόμορφα κύτταρα με κενोटόπια

2.1.3 ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ ΟΞΕΙΑΣ ΛΕΜΦΟΒΛΑΣΤΙΚΗΣ ΛΕΥΧΑΙΜΙΑΣ ΚΑΤΑ EGIL (ΑΝΟΣΟΦΑΙΝΟΤΥΠΙΚΗ):

B- Οξεία λεμφοβλαστική λευχαιμία (B-ΟΛΛ)

- BI : Πρωίμη B-ΟΛΛ (pro-B-ALL)
- BII : Κοινή B-ΟΛΛ (common- ALL)
- BIII : Προ-B ΟΛΛ (pre-B-ALL)
- BIV: Ώριμη B-ΟΛΛ (mature ALL)

T- Οξεία λεμφοβλαστική λευχαιμία (T-ΟΛΛ)

- Tia : Προθυμική T-ΟΛΛ (pro-T-ALL)
- Tib : Προθυμική T-ΟΛΛ (pro-T-ALL)
- TII : Υποφλοιώδης T-ΟΛΛ (pre-T-ALL)
- TIII : Φλοιώδης T-ΟΛΛ (cortical T-ALL)
- TIV : Μυελώδης- ώριμη T-ΟΛΛ (mature T-ALL)

[42]

2.2 ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ

Η οξεία λευχαιμία είναι η πιο συχνή κακοήθεια σε παιδιά ηλικίας κάτω των 15 ετών, με επίπτωση 4.3 περιστατικά ανά 100.000 άτομα, με την πλειοψηφία των πασχόντων να είναι ηλικίας 2-5 ετών. Η οξεία λεμφοβλαστική λευχαιμία είναι πέντε φορές πιο συχνή από την οξεία μυελογενή λευχαιμία σε παιδιά ηλικίας κάτω των 15 ετών, με το 75-80% των λευχαιμιών σε παιδιά αυτής της ηλικίας να είναι λεμφοβλαστικές. Εν αντιθέσει η μέση ηλικία διάγνωσης της οξείας μυελογενούς λευχαιμίας είναι τα 65 έτη, με αυξημένη επίπτωση στους άνδρες συγκριτικά με τις γυναίκες.

2.3 ΣΥΜΠΤΩΜΑΤΟΛΟΓΙΑ

Η πλειοψηφία των ασθενών παρουσιάζονται με συνδυασμό συμπτωμάτων λόγω της ανεπάρκειας του μυελού. Η έλλειψη φυσιολογικών λευκών αιμοσφαιρίων καθιστά τους ασθενείς ευπαθείς σε λοιμώξεις με προέχον σύμπτωμα τον πυρετό. Η έλλειψη λειτουργικών ερυθροκυττάρων προκαλεί αναιμία με εύκολη κόπωση, ωχρότητα και δυσχέρεια στην αναπνοή, ενώ η έλλειψη αιμοπεταλίων προκαλεί αιμορραγικές εκδηλώσεις. Διάχυτη ενδοαγγειακή πήξη, συχνά συνοδευόμενη από αιμορραγίες δέρματος και βλεννογόνων λόγω κατανάλωσης αιμοπεταλίων και παραγόντων πήξης, αποτελεί συχνό εύρημα στην οξεία προμυελοκυτταρική λευχαιμία, ενώ διήθηση ούλων και δέρματος παρατηρείται συχνά στις μονοκυτταρικές λευχαιμίες. [43]

Περίπου 10% των πασχόντων από λεμφοβλαστική λευχαιμία εμφανίζουν σημεία συμμετοχής οργάνων κατά τη διάγνωση, όπως σπληνομεγαλία, ηπατική βλάβη, λεμφαδενοπάθεια, οίδημα όρχεων ή συμμετοχή των μηνίγγων με νευρολογικές εκδηλώσεις (ναυτία, έμετο, πονοκέφαλο, φωτοφοβία και παράλυση εγκεφαλικών νεύρων). Οι ασθενείς με T λεμφοβλαστική λευχαιμία μπορεί να φέρουν στη διάγνωση μάζες στο μεσοθωράκιο, οι οποίες δύνανται να προκαλέσουν σύνδρομο άνω κοίλης φλέβας. Στα παιδιά όταν διηθούνται οι κοιλότητες των οστών προκαλείται άλγος και η κλινική εικόνα είναι ομοιάζουσα με αυτή της ρευματοειδούς αρθρίτιδας. [44]

Σε αυξημένο αριθμό βλαστικών κυττάρων, συνήθως $>100.000/\mu\text{L}$, οι ασθενείς μπορεί να εμφανίσουν επιπλοκές από το αναπνευστικό και το κεντρικό νευρικό σύστημα λόγω υπεργλοιοποίησης και αιμορραγίας. Αποτελεί επείγουσα κατάσταση και μπορεί να οδηγήσει σε αναπνευστική ανεπάρκεια, σύγχυση, σπασμούς, κώμα και θάνατο. [45]

2.4 ΟΞΕΙΑ ΜΥΕΛΟΓΕΝΗΣ ΛΕΥΧΑΙΜΙΑ (ΟΜΛ)

Η διάγνωση της οξείας μυελογενούς λευχαιμίας τίθεται με την ανίχνευση βλαστών μυελικής προέλευσης σε ποσοστό άνωθεν του 20%. Οι μυελοβλάστες, οι μονοβλάστες και οι μεγακαρυοβλάστες περιλαμβάνονται στον αριθμό των βλαστικών κυττάρων. Επίσης στην ΟΜΛ με μονοκυτταρική ή μυελομονοκυτταρική διαφοροποίηση οι μονοβλάστες και τα προμονοκύτταρα προσμετρούνται σαν ανάλογα βλαστών. Αυτό δεν ισχύει βέβαια για τα παθολογικά μονοκύτταρα. Η προέλευση των βλαστών (προγονική, κοκκιοκυτταρική, μονοκυτταρική, μεγακαρυοκυτταρική, ερυθρά) καθορίζεται μέσω χρήσης δεικτών επιφανείας αλλά και κυτταροπλασματικών δεικτών με κυτταρομετρία ροής. (Πίνακας 3) Ο έλεγχος για παρουσία κυτταρογενετικών ανωμαλιών είναι υποχρεωτικός στη διάγνωση της οξείας μυελογενούς λευχαιμίας. Σε ανίχνευση των ανωμαλιών t(8;21)(q22;q22) ή inv(16)(p13.1;q22) ή t(16;16)(p13.1;q22) ή στην οξεία προμυελοκυτταρική λευχαιμία με PML-RARA, η διάγνωση τίθεται ανεξαρτήτως του ποσοστού των βλαστών, δηλαδή δεν είναι απαραίτητη η παρουσία ποσοστού βλαστών >20%.

Expression of markers for diagnoses	
Diagnosis of acute myeloid leukaemia (AML)	
Precursor stage	CD34, CD38, CD117, CD133, HLA-DR
Granulocytic markers	CD13, CD15, CD16, CD33, CD65, cytoplasmic myeloperoxidase (cMPO)
Monocytic markers	Nonspecific esterase (NSE), CD11c, CD14, CD64, lysozyme, CD4, CD11b, CD36, NG2 homologue
Megakaryocyte markers	CD41 (glycoprotein IIb/IIIa), CD61 (glycoprotein IIIa), CD42 (glycophorin 1b)
Erythroid marker	CD235a (glycophorin A)

Πίνακας 3. Έκφραση δεικτών αναλόγως της προέλευσης των βλαστών στην ΟΜΛ. Τροποποιημένος πίνακας από Burnett AK et al. (43)

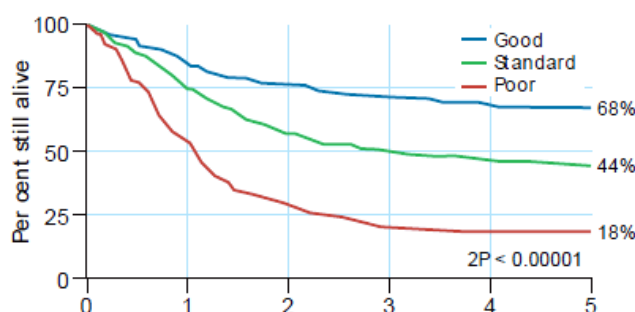
Στο 60% των πασχόντων από οξεία μυελογενή λευχαιμία αναγνωρίζονται επίκτητες χρωμοσωμικές ανωμαλίες, οι οποίες καθορίζουν διαφορετικές βιολογικές και προγνωστικές υποομάδες της νόσου. Οι ισορροπημένες χρωμοσωμικές αναδιατάξεις [μετατόπιση (translocation / t) και αναστροφή (inversion / inv)], οι οποίες οδηγούν στο σχηματισμό χιμαιρικών ογκοπρωτεϊνών, είναι πιο συχνές στα νεογνά, στα παιδιά και στους νέους ενήλικες, αλλά είναι σπάνιες στους ασθενείς μεγαλύτερης ηλικίας όπου ο σύνθετος καρυότυπος (complex karyotype) είναι πιο συχνός. Η ανίχνευση συγκεκριμένων κυτταρογενετικών ανωμαλιών διαχωρίζει τους ασθενείς σε τρεις προγνωστικές ομάδες κινδύνου (ευνοϊκού, ενδιάμεσου και αυξημένου) και καθορίζει το θεραπευτικό πλάνο. Ευνοϊκού κινδύνου είναι οι ΟΜΛ στις οποίες ανιχνεύεται κάποια από τις ακόλουθες ανωμαλίες: t(15;17)(q22;q11-12), t(8;21)(q22;q22),

inv(16)(p13.1;q22), t(16;16)(p13.1;q22), μεταλλαγμένο NPM1 χωρίς FLT3-ITD ή με FLT3-ITD^{low} και διαλληλικές μεταλλάξεις του CEBPA. Αντιθέτως η ανίχνευση των: t(6;9)(p23;q34.1), t(v;11q23.3), t(9;22), inv(3)(q21.3;q26.2), t(3;3)(q21.3;q26.2), -5, del(5q), -7, σύμπλοκος καρυότυπος, μονοσωμικός καρυότυπος, αμετάλλακτο NPM1 FLT3-ITD^{high}, μεταλλαγμένο RUNX1, μεταλλαγμένο ASXL1 και μεταλλαγμένο TP53 κατατάσσει τους ασθενείς στην ομάδα αυξημένου κινδύνου. (Πίνακας 4) Με τον όρο σύμπλοκος καρυότυπος ορίζεται η ανίχνευση τριών ή περισσότερων χρωμοσωμικών ανωμαλιών χωρίς να ανιχνεύεται κάποια από τις επαναλαμβανόμενες κυτταρογενετικές ανωμαλίες όπως αυτές περιγράφονται στην ταξινόμηση του WHO. Ως μονοσωμικός καρυότυπος ορίζεται η ανίχνευση δύο αυτοσωμικών μονοσωμιών ή μιας αυτοσωμικής μονοσωμίας και μίας τουλάχιστον δομικής καρυοτυπικής ανωμαλίας. Αξίζει να σημειωθεί ότι η καλή πρόγνωση των πασχόντων από CBF λευχαιμία [t(8;21)(q22;q22), inv(16)(p13.1;q22), t(16;16)(p13.1;q22)] ή οξεία προμυελοκυτταρική λευχαιμία (APL) δεν αλλάζει με την ανίχνευση άλλων κυτταρογενετικών ανωμαλιών. Οι ασθενείς με OML που δεν φέρουν ανωμαλίες ώστε να κατατάσσονται σε ευνοϊκού ή αυξημένου κινδύνου, θεωρείται ότι πάσχουν από σταθερού κινδύνου νόσημα και η πενταετής επιβίωση των ασθενών κάτω των 60 ετών είναι της τάξης του 40-45%. (Εικόνα 17) [46]

Επιπρόσθετοι προγνωστικοί παράγοντες που επηρεάζουν δυσμενώς την επιβίωση των πασχόντων από οξεία μυελογενή λευχαιμία είναι η προχωρημένη ηλικία, η μειωμένη κατάσταση ικανότητας, ο αυξημένος αριθμός των λευκοκυττάρων στη διάγνωση (ενδεικτικό αυξημένου φορτίου νόσου), η προηγούμενη έκθεση σε κυτταροτοξικούς παράγοντες ή ακτινοβολία (μυελικά νεοπλάσματα σχετιζόμενα με προηγηθείσα θεραπεία) και το ιστορικό μυελοδυσπλασίας (οξεία μυελογενής λευχαιμία με αλλοιώσεις σχετιζόμενες με μυελοδυσπλασία). Οι ηλικιωμένοι ή με μειωμένη κατάσταση ικανότητας ασθενείς παρουσιάζουν αυξημένη αναλογία πρώιμων θανάτων συγκριτικά με του νέους και σε καλή κατάσταση ασθενείς, ενώ οι προηγηθείσες θεραπείες και η μυελοδυσπλασία σχετίζονται με ανθεκτική νόσο ή πρώιμη υποτροπή. Επίσης με την πάροδο της ηλικίας αυξάνεται η συχνότητα έκφρασης πρωτεϊνών που εμπλέκονται στη μεταφορά των φαρμάκων και οδηγούν χημειοαντοχή σε φάρμακα όπως η ετοποσιδίνη και οι ανθρακυκλίνες και κατά συνέπεια μικραίνει η πιθανότητα επίτευξης ύφεσης και αυξάνει ο κίνδυνος υποτροπής της νόσου. [43]

Risk category*	Genetic abnormality
Favorable	t(8;21)(q22;q22.1); <i>RUNX1-RUNX1T1</i> inv(16)(p13.1q22) or t(16;16)(p13.1;q22); <i>CBFB-MYH11</i> Mutated <i>NPM1</i> without <i>FLT3</i> -ITD or with <i>FLT3</i> -ITD ^{low} † Biallelic mutated <i>CEBPA</i>
Intermediate	Mutated <i>NPM1</i> and <i>FLT3</i> -ITD ^{high} † Wild-type <i>NPM1</i> without <i>FLT3</i> -ITD or with <i>FLT3</i> -ITD ^{low} † (without adverse-risk genetic lesions) t(9;11)(p21.3;q23.3); <i>MLLT3-KMT2A</i> ‡
Adverse	Cytogenetic abnormalities not classified as favorable or adverse t(6;9)(p23;q34.1); <i>DEK-NUP214</i> t(v;11q23.3); <i>KMT2A</i> rearranged t(9;22)(q34.1;q11.2); <i>BCR-ABL1</i> inv(3)(q21.3q26.2) or t(3;3)(q21.3;q26.2); <i>GATA2,MECOM(EV11)</i> -5 or del(5q); -7; -17/abn(17p) Complex karyotype,§ monosomal karyotypell Wild-type <i>NPM1</i> and <i>FLT3</i> -ITD ^{high} † Mutated <i>RUNX1</i> ¶ Mutated <i>ASXL1</i> ¶ Mutated <i>TP53</i> #

Πίνακας 4. Κατηγορίες κινδύνου της ΟΜΛ σύμφωνα με το Ευρωπαϊκό Δίκτυο Λευχαιμίας (European Leukemia Net / ELN). Τροποποιημένος πίνακας από Döhner H et al. (46)



Εικόνα 17. Πενταετής επιβίωση πασχόντων από ΟΜΛ ηλικίας <60 ετών σύμφωνα με την ομάδα κινδύνου. Τροποποιημένη εικόνα από Burnett AK et al. (43)

Η θεραπεία της οξείας μυελογενούς λευχαιμίας περιλαμβάνει το στάδιο της εφόδου, όπου στόχος είναι η επίτευξη πλήρους ύφεσης (βλάστες <5% στο μυελό των οστών, ουδετερόφιλα στο περιφερικό αίμα > 1500/μL, αιμοπετάλια >100.000/μL και απουσία εξωμυελικής νόσου) και το στάδιο της σταθεροποίησης με στόχο την εδραίωση της ύφεσης. Το θεραπευτικό σχήμα εφόδου στην ΟΜΛ περιλαμβάνει χορήγηση ανθρακυκλίνης για τρεις ημέρες και αρασιτίνης σε συνεχή έγχυση για επτά ημέρες. Σε ασθενείς με παρουσία μεταλλάξεων του FLT3, η προσθήκη του αναστολέα του FLT3 midostaurin στη συμβατική χημειοθεραπεία αυξάνει την επιβίωση ελεύθερη νόσου και την ολική επιβίωση. Αντίστοιχα η προσθήκη του μονοκλωνικού αντισώματος gemtuzumab ozogamycin (IgG anti-CD33) αυξάνει την επιβίωση ελεύθερη νόσου και την ολική επιβίωση των πασχόντων από οξεία μυελογενή

λευχαιμία ευνοϊκού ή ενδιάμεσου κινδύνου. Οι ασθενείς που επιτυγχάνουν πλήρη ύφεση με τη θεραπεία εφόδου λαμβάνουν άλλον έναν κύκλο θεραπείας όμοιο με τον πρώτο (επανεφόδος). Αντιθέτως, οι ασθενείς που δεν επιτύχουν πλήρη ύφεση ή πλήρη ύφεση με ατελή αιματολογική ανάκτηση (είτε σε ουδετερόφιλα είτε σε αιμοπετάλια) μετά από δύο κύκλους εφόδου θεωρείται ότι πάσχουν από πρωτοπαθώς ανθεκτική νόσο και η μόνη θεραπεία που μπορεί να προσφέρει μακρά επιβίωση χωρίς νόσο είναι η αλλογενής μεταμόσχευση αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων (alloHSCT / Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation). Οι θεραπευτικές επιλογές για το σχήμα της σταθεροποίησης, που ακολουθεί το σχήμα εφόδου και επανεφόδου, είναι η χορήγηση ενδιάμεσων δόσεων αρασιτίνης (2-4 κύκλοι) και η alloHSCT. Η αλλογενής μεταμόσχευση δεν έχει ένδειξη σε ασθενείς με ευνοϊκό καρυότυπο, αλλά είναι η προτιμότερη θεραπευτική επιλογή για τους ασθενείς <60 ετών με OML ενδιάμεσου ή υψηλού κινδύνου σε πλήρη ύφεση. [47]

Στους ασθενείς με πρωτοπαθώς ανθεκτική νόσο ή με υποτροπή της OML έχει ένδειξη η χορήγηση θεραπείας διάσωσης με στόχο την επίτευξη πλήρους ύφεσης και ακολούθως αλλογενή μεταμόσχευση αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων. Τα συνήθη χημειοθεραπευτικά σχήματα διάσωσης είναι το FLAG-IDA όπου περιέχει φλουνταραμπίνη, αρασιτίνη και ιδαρουμπικίνη, το MEC όπου περιλαμβάνει μιτοξαντρόνη, ετοποσίδη και αρασιτίνη και η χορήγηση ενδιάμεσων δόσεων αρασιτίνης. Στόχος είναι να τεθεί το νόσημα σε πλήρη ύφεση αλλά και ως γέφυρα για την αλλογενή μεταμόσχευση. Το 20% των ασθενών με πρωτοπαθώς ανθεκτικό νόσημα επιτυγχάνει ίαση μετά την αλλογενή μεταμόσχευση. Οι ασθενείς που υποτροπιάζουν μετά την αλλογενή μεταμόσχευση ωστόσο, είτε μεταμοσχεύτηκαν στην πρώτη είτε στη δεύτερη πλήρη ύφεση, έχουν δυσμενή πρόγνωση, με την τριετή επιβίωση των ασθενών που υποτροπιάσαν στο πρώτο εξάμηνο μετά τη μεταμόσχευση να είναι περίπου 4%. [46]

Στους ηλικιωμένους ασθενείς η θεραπεία εξατομικεύεται κυρίως με βάση ειδικούς προγνωστικούς παράγοντες που σχετίζονται με τη νόσο, την κατάσταση ικανότητας του ασθενούς και τη συννοσηρότητα και όχι με τη χρονολογική ηλικία του ασθενούς. Οι ασθενείς με καλή κατάσταση ικανότητας μπορούν να λάβουν θεραπεία όμοια με αυτή των νεότερων ασθενών με αρασιτίνη και ανθρακυκλίνη και να υποβληθούν (όσοι πάσχουν από υψηλού κινδύνου νόσο) σε αλλογενή μεταμόσχευση με προπαρασκευαστικό σχήμα μειωμένης έντασης, εφόσον πετύχουν πλήρη ύφεση με τη θεραπεία εφόδου. Οι ασθενείς οι οποίοι δεν είναι υποψήφιοι για εντατική χημειοθεραπεία μπορούν να λάβουν θεραπεία με υπομεθυλιωτικούς παράγοντες (αζακυτιδίνη ή δεσιταβίνη) ή με χαμηλές δόσεις αρασιτίνης. [48]

Η οξεία προμυελοκυτταρική λευχαιμία χαρακτηρίζεται από αναστολή της ωρίμανσης στο στάδιο του προμυελοκυττάρου. Η αναστολή αυτή οφείλεται στο γεγονός ότι φέρει μεταλλαγμένο γονίδιο PML-RARA [αναδιάταξη t(15;17)(q22;q11-12) ή κρυπτικό ή με σύμπλοκες αναδιατάξεις PML-RARA] το οποίο εμποδίζει την παραγωγή ρετινοϊκού οξέος και την ωρίμανση των κυττάρων. Η αναστολή αυτή της ωρίμανσης ωστόσο αίρεται με τη χορήγηση ρετινοϊκού οξέος, το οποίο αποτελεί βασικό στοιχείο της θεραπευτικής αγωγής, και μπορεί να επιτευχθεί πλήρης ύφεση στο 95% των ασθενών και ίαση στο 80%. Η θεραπεία εφόδου περιλαμβάνει τη χορήγηση ρετινοϊκού οξέος - ATRA (all-trans retinoic acid) σε συνδυασμό με ανθρακυκλίνη με προσθήκη ή μη αρασιτίνης σε παρουσία αυξημένου αριθμού λευκών στη διάγνωση. Εναλλακτικά χρησιμοποιείται ο συνδυασμός ATRA με ATO (arsenic trioxide / αρσενικό τριοξείδιο) στην αγωγή εφόδου. Ακολουθούν 2-3 κύκλοι θεραπείας σταθεροποίησης με συνδυασμό των ανωτέρω παραγόντων και θεραπεία συντήρησης με ATRA για 1-2 έτη. Η παρακολούθηση του νοσήματος γίνεται μοριακά με RT-qPCR για το PML-RARA κάθε 3-6 μήνες για τρία έτη. Η παραμονή θετικής PCR μετά την ολοκλήρωση της θεραπείας σταθεροποίησης σχετίζεται με αυξημένο κίνδυνο υποτροπής. Η πλειοψηφία των υποτροπών λαμβάνει χώρα εντός τριετίας από το πέρας της θεραπείας. Θεραπευτική επιλογή στην υποτροπή αποτελεί η χορήγηση ATO με στόχο την επίτευξη ύφεσης εκ νέου. Σε περίπτωση αποτυχίας επίτευξης δεύτερης ύφεσης επιλογή αποτελεί η αλλογενής μεταμόσχευση αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων σε επιλεγμένους ασθενείς. [49]

2.5 ΟΞΕΙΑ ΛΕΜΦΟΒΛΑΣΤΙΚΗ ΛΕΥΧΑΙΜΙΑ (ΟΛΛ)

Η οξεία λεμφοβλαστική λευχαιμία αποτελεί επιθετική κακοήθεια των T ή B λεμφοκυττάρων, με ταχεία έναρξη και εμφάνιση σημείων και συμπτωμάτων ανεπάρκειας του μυελού των οστών. Ενίοτε οι ασθενείς εμφανίζονται με πρωτοπαθή λεμφαδενική ή εξωλεμφαδενική συμμετοχή και ελάχιστα στοιχεία νόσου στο μυελό των οστών. Σε αυτές τις περιπτώσεις η διάγνωση είναι λεμφοβλαστικό λέμφωμα. Ο διαχωρισμός ωστόσο λεμφοβλαστικού λεμφώματος από λευχαιμία είναι αυθαίρετος. Σε ασθενείς με ογκόμορφη νόσο και διήθηση από βλαστικά κύτταρα κάτω του 25%, η διάγνωση είναι λεμφοβλαστικό λέμφωμα. Σε διήθηση μεγαλύτερη του 25% είναι λεμφοβλαστική λευχαιμία. Οι λεμφοβλάστες τόσο στην B όσο και στη T λεμφοβλαστική λευχαιμία ποικίλουν από μικρού μεγέθους κύτταρα με ελάχιστο κυτταρόπλασμα, συμπυκνωμένη χρωματίνη πυρήνα και δυσδιάκριτο πυρήνιο, έως μεγαλύτερα κύτταρα με μέτρια ποσότητα ανοιχτού μπλε έως μπλε-γκρι

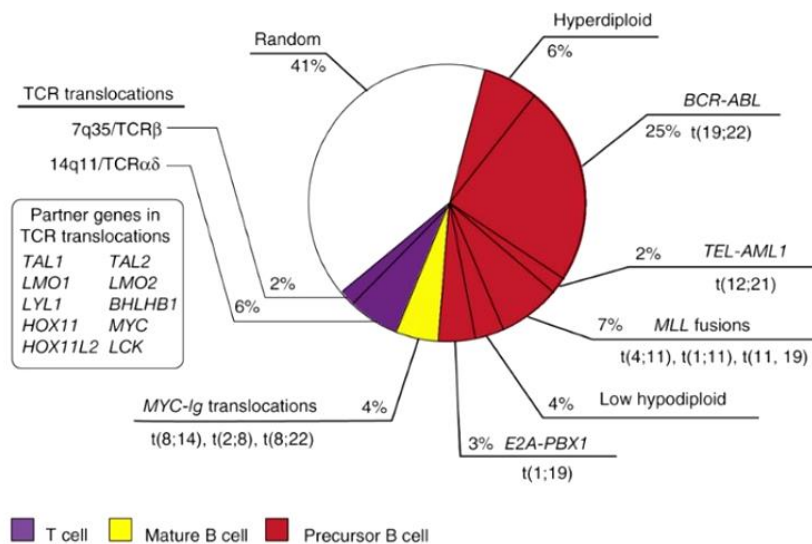
κυτταροπλάσματος, περιστασιακά κενοτοπιώδεις, με αδρή πυρηνική χρωματίνη και πολλαπλά πυρήνια. Η διάγνωση τίθεται ανοσοφαινοτυπικά μέσω έκφρασης συγκεκριμένων δεικτών επιφανείας και ταξινομείται βάσει της έκφρασης των δεικτών αυτών (ταξινόμηση κατά EGIL). Ταξινομείται επίσης βάσει των κυτταρογενετικών αλλοιώσεων που φέρει σύμφωνα με την κατάταξη του WHO.

Τα βλαστικά κύτταρα στη B- οξεία λεμφοβλαστική λευχαιμία εκφράζουν HLA-DR, TdT και CD19. Οι δείκτες CD79α, CD22 και CD34 εκφράζονται συχνά αλλά όχι πάντα. Η παρουσία του CD10 και της κυτταροπλασματικής ανοσοσφαιρίνης ή της ανοσοσφαιρίνης επιφανείας καθορίζει την κατάταξη κατά EGIL. Αντίστοιχα στην T- λεμφοβλαστική λευχαιμία, η οποία αποτελεί το 25% των ΟΛΛ των ενηλίκων, τα βλαστικά κύτταρα εκφράζουν TdT, CD34, CD7 και κυτταροπλασματικό CD3. Η έκφραση των CD2 και CD1 εξαρτάται από το στάδιο της ωρίμανσης του κυττάρου, ενώ βασικοί δείκτες που καθορίζουν την ταξινόμηση κατά EGIL αποτελούν η έκφραση του CD1α, του κυτταροπλασματικού (cCD3) και του επιφανειακού CD3 (sCD3). (Πίνακας 5)

B Lineage	CD10	CD19	CD22	CD79a	TdT	IgM	
Early precursor (pro-B)	-	+	+	+	+	-	
Intermediate (common)	+	+	+	+	+	-	
Pre-B	+/-	+	+	+	+	C	
T Lineage	CD1a	CD2	CD3	CD4	CD7	CD8	CD34
Pro-T	-	-	C	-	+	-	+/-
Pre-T	-	+	C	-	+	-	+/-
Cortical T	+	+	C	+	+	+	-
Medullary T	-	+	C, S	*	+	*	-

Πίνακας 5. Ανοσοφαινοτυπικοί δείκτες των B και T κυττάρων αναλόγως της ωρίμανσής του. Τροποποιημένος πίνακας από Jain N et al. (165)

Οι κυτταρογενετικές ανωμαλίες, οι οποίες καθορίζουν την ταξινόμηση του WHO, αποτελούν ανεξάρτητο προγνωστικό δείκτη της έκβασης της ΟΛΛ. Το 41% των μεταλλάξεων που εμφανίζονται στους ενήλικες είναι τυχαίες, ενώ από τους υπόλοιπους ασθενείς που φέρουν κάποια συχνή μετάλλαξη η πλειοψηφία φέρει την αναδιάταξη t (9;22), αναδιατάξεις του TCR ή υπερδιπλοειδία. (Εικόνα 18)



Εικόνα 18. Συχνότητα ανίχνευσης μεταλλάξεων στους πάσχοντες από ΟΛΛ. Τροποποιημένη εικόνα από Gutierrez A. et al. (166)

Καλής προγνωστικής σημασίας θεωρούνται οι αναδιατάξεις στο t(12;21)(p12;q22) [TEL-AML1] και η υπερδιπλοειδία (παρουσία 51-65 χρωμοσωμάτων στα βλαστικά κύτταρα), ενώ η παρουσία του χρωμοσώματος Φιλαδέλφεια [t(9;22)(q34.1;q11.2) [BCR-ABL1]], η υποδιπλοειδία (παρουσία <46 χρωμοσωμάτων στα βλαστικά κύτταρα), η αναδιάταξη του t(4;11)[MLL/AF4] και ο σύνθετος καρυότυπος σχετίζονται με δυσμενή πρόγνωση του νοσήματος. Δυσμενούς προγνωστικής σημασίας επίσης είναι η παρουσία αυξημένου αριθμού λευκοκυττάρων στη διάγνωση, η προχωρημένη ηλικία, η παρουσία νόσου στο κεντρικό νευρικό σύστημα, ο φαινότυπος T λευχαιμίας (συγκριτικά με το φαινότυπο B λευχαιμίας), η ανίχνευση συγκεκριμένων γενετικών ανωμαλιών (γονίδιο Ίκαρος/ IKZF1), η πτωχή ανταπόκριση στα κορτικοειδή κατά τη διάρκεια του προσχήματος θεραπείας και η ανίχνευση ελάχιστης υπολειμματικής νόσου μετά τη θεραπεία εφόδου. (Πίνακας 6)

Factor	Poor risk	Neutral or good risk
Presenting WCC	$30 \times 10^9/1$ B ALL $>100 \times 10^9/1$ T-ALL	Low presenting WCC
Age	Worse outcome with advancing age	Younger age
Immunophenotype	T-cell phenotype better outcome than B-cell phenotype Early T precursor ALL (ETP) Expression of CD20 worse outcome (some studies)	Expression of myeloid antigens generally not associated with worse outcome
Cytogenetics	t(9;22) (BCR-ABL1) t(4;11) (MLL/AF4) Complex karyotype (five or more chromosomal abnormalities) Low hypodiploidy/near triploidy	t(12;21) (ETV6/RUNX1) Hyperdiploidy
Specific genetic abnormalities	IKZF1 deletions, particularly in Ph+ ALL	NOTCH1 and FBXW7 mutations in T-ALL
Early response to steroid	Poor initial response to steroid therapy	
MRD	Positive signal at protocol-relevant time point	Negative signal at protocol-relevant time point

Πίνακας 6. Παράγοντες κινδύνου στην ΟΛΛ. Τροποποιημένος πίνακας από Rowntree C et al. (44)

Στόχος της θεραπεία της οξείας λεμφοβλαστικής λευχαιμίας είναι η επίτευξη πλήρους ύφεσης (βλάστες <5% στο μυελό των οστών, ουδετερόφιλα στο περιφερικό αίμα > 1000/μL, αιμοπετάλια >100.000/μL) και περιλαμβάνει το στάδιο του προσχήματος, τη θεραπεία εφόδου, το στάδιο της σταθεροποίησης και τη θεραπεία συντήρησης. Το προ-σχήμα θεραπείας περιλαμβάνει χορήγηση κορτικοειδών για 5-7 ημέρες, συνήθως σε συνδυασμό με κυκλοφωσφαμίδη, με στόχο να μειώσει το φορτίο της νόσου και να βελτιώσει την κατάσταση ικανότητας του ασθενούς ώστε να δεχθεί τη χημειοθεραπευτική αγωγή εφόδου. Η θεραπεία εφόδου έχει ως στόχο την πλήρη εξάλειψη των λευχαιμικών κυττάρων από το αίμα, το μυελό των οστών, το κεντρικό νευρικό σύστημα και τις λοιπές εξωμυελικές εστίες του νοσήματος. Περιλαμβάνει τη χρήση κορτικοστεροειδών, βινκριστίνης, ανθρακυκλίνης και L- ασπαριγινάσης. Μετά τη θεραπεία εφόδου το 90% των ασθενών επιτυγχάνει πλήρη ύφεση. Ακολουθεί η θεραπεία σταθεροποίησης, η οποία έχει στόχο τον περιορισμό των υπολειμματικών λευχαιμικών κυττάρων και την πρόληψη επανεμφάνισης χημειοανθεκτικής νόσου στους ασθενείς που βρίσκονται σε ύφεση. Η θεραπεία σταθεροποίησης περιλαμβάνει πολλαπλούς χημειοθεραπευτικούς παράγοντες, συμπεριλαμβανομένης στοχευμένης θεραπείας για το κεντρικό νευρικό σύστημα και επιπλέον L- ασπαριγινάσης. Η θεραπεία συντήρησης είναι υποχρεωτική σε όλους τους ενήλικες οι οποίοι δεν υποβλήθηκαν σε αλλογενή μεταμόσχευση αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων κατά τη διάρκεια ή μετά το πέρας της θεραπείας σταθεροποίησης. Περιλαμβάνει την καθημερινή χορήγηση 6-μερκαπτοπουρίνης και εβδομαδιαίας μεθοτρεξάτης με ώσεις βινκριστίνης και κορτικοστεροειδών για περίπου 2 έτη μετά τη θεραπεία σταθεροποίησης. Στους πάσχοντες από οξεία λεμφοβλαστική λευχαιμία με παρουσία

της πρωτεΐνης BCR-ABL (Ph⁺ ΟΛΛ) έχει ένδειξη η χορήγηση αναστολέων της τυροσινικής κινάσης συμπληρωματικά στην χημειοθεραπευτική αγωγή. Οι αναστολείς που ενδείκνυνται είναι οι imatinib και dasatinib, και οι ασθενείς λόγω της δυσμενούς πρόγνωσης του νοσήματος συνίσταται να υποβάλλονται σε αλλογενή μεταμόσχευση όταν το νόσημά τους τεθεί σε πλήρη ύφεση.

Σε περίπτωση που η οξεία λεμφοβλαστική λευχαιμία δεν ανταποκριθεί στη θεραπεία ή υποτροπιάσει, η επιβίωση είναι πτωχή και η μόνη θεραπευτική επιλογή που μπορεί να οδηγήσει σε ίαση είναι η αλλογενής μεταμόσχευση. Η χημειοθεραπευτική αγωγή διάσωσης που χορηγείται θέτει σε ύφεση το 40-50% των ασθενών. Για τους πάσχοντες από Β-ΟΛΛ ως γέφυρα για τη μεταμόσχευση μπορούν να χρησιμοποιηθούν νέοι μη χημειοθεραπευτικοί παράγοντες με στόχο την επίτευξη ύφεσης προ της μεταμόσχευσης. Οι παράγοντες αυτοί περιλαμβάνουν το inotuzumab (μονοκλωνικό αντίσωμα anti-CD22 συνδεδεμένο με καλιχεαμυκίνη), το blinatumomab (μονοκλωνικό αντίσωμα διπλής ειδίκευσης anti-CD19 συνδεδεμένο με anti-CD3, όπου ενεργοποιεί τα Τ λεμφοκύτταρα και επάγει την κυτταρική λύση των Β λεμφοβλαστών) και ανοσοθεραπεία με anti-CD19 CAR-Tcells. [44]

3. ΕΛΑΧΙΣΤΗ ΥΠΟΛΕΙΜΜΑΤΙΚΗ ΝΟΣΟΣ

Ως ελάχιστη υπολειμματική νόσος (minimal residual disease / MRD) ορίζεται η παρουσία λευχαιμικών κυττάρων σε $1:10^4$ έως $1:10^6$ λευκοκύτταρα συγκριτικά με το επίπεδο του 1:20 που είναι το κατώτατο όριο ανίχνευσης της νόσου με μορφολογικά κριτήρια κατά τη μικροσκοπική εξέταση και μπορεί να ανιχνευτεί μόνο με εργαστηριακές τεχνικές, πιο ευαίσθητες από τη μορφολογία, όπως η κυτταρομετρία ροής (ανοσολογική MRD) ή η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (polymerase chain reaction / PCR) (μοριακή MRD). [50]

Ο στόχος των μεθόδων ανίχνευσης της MRD είναι η καθοδήγηση θεραπευτικών αποφάσεων μέσω αναγνώρισης των ασθενών που ανταποκρίθηκαν στη θεραπεία και μπορούν να μείνουν χωρίς αγωγή, από τους ασθενείς στους οποίους πρέπει να συνεχιστεί ή να εντατικοποιηθεί η θεραπεία για να μειωθεί η πιθανότητα κλινικής υποτροπής του νοσήματος. Ωστόσο όταν ερμηνεύεται η MRD πρέπει να γίνεται διαχωρισμός του σταδίου μετά την έφοδο, όπου οι ασθενείς έχουν πετύχει μορφολογική αλλά πιθανότατα μη πλήρη ύφεση από το στάδιο όπου οι ασθενείς έχουν τη μέγιστη ανταπόκριση στη θεραπεία και εμφανίζουν αληθή ελάχιστη υπολειμματική νόσο. Στην μετά την έφοδο φάση, η κυτταρομετρία ροής, η οποία έχει την ικανότητα να ανιχνεύσει 1-5 βλαστικά κύτταρα στα 10000 φυσιολογικά κύτταρα, μπορεί να είναι εξίσου αποτελεσματική στην ανίχνευση της MRD στην οξεία λεμφοβλαστική λευχαιμία με τη χρήση ειδικών ολιγονουκλεοτιδικών αλληλίων με PCR. Τα προγνωστικά επίπεδα για την μετά την έφοδο MRD με κυτταρομετρία ροής σε οξείες λευχαιμίες (μυελογενείς και λεμφοβλαστικές) ανιχνεύουν διήθηση ανάμεσα σε 0,01% και 0,035% λευχαιμικά κύτταρα σε μορφολογικά φυσιολογικό μυελό. Η ανίχνευση της MRD ωστόσο, με όποια μέθοδο και αν επιλεγεί, είναι σημαντικό να μελετάται στον ίδιο ιστό, είτε περιφερικό αίμα, είτε μυελό των οστών, όταν οι ασθενείς παρακολουθούνται συστηματικά. Υπάρχουν αναφορές ότι τα επίπεδα της MRD είναι υψηλότερα στο μυελό των οστών συγκριτικά με αυτά του περιφερικού αίματος, τουλάχιστον στην ΟΜΛ και Β-ΟΛΛ. [51]

Ανοσοφαινοτυπική παρακολούθηση της MRD

Όταν επιλέγεται η κυτταρομετρία ροής ως μέθοδος παρακολούθησης της MRD, η χρήση πολλών διαφορετικών φθοριοχρωμάτων είναι απαραίτητη για την αναγνώριση του μικρού αριθμού των λευχαιμικών κυττάρων ανάμεσα στο μεγάλο αριθμό των φυσιολογικών κυττάρων. Για να διεξαχθεί η παρακολούθηση της MRD μέσω κυτταρομετρίας ροής είναι χρήσιμη η γνώση της αντιγονικής έκφρασης των λευχαιμικών κυττάρων στη διάγνωση του νοσήματος. Με αυτόν τον τρόπο

καθορίζεται ο σχετιζόμενος με τη λευχαιμία ανοσοφαινότυπος (leukemia associated immunophenotype- LAIP) στη διάγνωση της οξείας λευχαιμίας, ο οποίος μπορεί να χρησιμοποιηθεί μετά την έφοδο ή στη φάση της ύφεσης για την ανίχνευση των υπολειμματικών λευχαιμικών κυττάρων με τα συγκεκριμένα αντιγονικά χαρακτηριστικά. Ο κατάλληλος LAIP για την ΟΜΛ είναι επιθυμητό να περιλαμβάνει έναν δείκτη προγονικών κυττάρων, έναν μυελικό δείκτη και τον μη αναμενόμενο δείκτη. Η ειδικότητα της ανίχνευσης MRD βάσει του LAIP εξαρτάται από το ποσοστό έκφρασής του σε φυσιολογικά κύτταρα (συνήθως εκφράζεται <0,1%), ενώ η ευαισθησία της ανίχνευσης εξαρτάται από το ποσοστό έκφρασης του LAIP στο βλαστικό πληθυσμό στη διάγνωση. [50] Με τη χρήση LAIP υψηλής ευαισθησίας και ειδικότητας, επιτρέπεται η ανίχνευση 1 βλαστικού κυττάρου στα 10000 φυσιολογικά κύτταρα με κυτταρομετρία ροής. Ωστόσο υπάρχουν δύο περιορισμοί στην ανίχνευση της MRD με κυτταρομετρία ροής, ο ένας αφορά την παρουσία αιματογονίων, τα οποία μπορεί να παρερμηνευθούν ως βλαστικά λόγω των κοινών αντιγόνων που εκφράζουν με τα βλαστικά, και ο άλλος αφορά την πιθανότητα να αλλάξει η αντιγονική έκφραση των βλαστικών κυττάρων και να μην εκφράζουν πλέον τον LAIP. [51]

Μία διαφορετική προσέγγιση από αυτή του LAIP για την ανίχνευση της MRD με κυτταρομετρία ροής αποτελεί η προσέγγιση 'διαφορετικό από το φυσιολογικό' (different from-normal / DfN), η οποία βασίζεται στην αναγνώριση προφίλ ανώμαλης διαφοροποίησης ή ωρίμανσης κατά την παρακολούθηση. Η DfN προσέγγιση μπορεί να χρησιμοποιηθεί όταν δεν είναι διαθέσιμες πληροφορίες από τη διάγνωση του νοσήματος καθώς και για την ανίχνευση νέων ανωμαλιών ή εξαφάνισης των ανωμαλιών που υπήρχαν στη διάγνωση, γνωστές ως αλλαγές ανοσοφαινοτύπου (immunophenotype shifts). [52]

Μοριακή παρακολούθηση της MRD

Όταν επιλέγεται η μοριακή παρακολούθηση της MRD δύο είναι οι βασικές μέθοδοι: η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο και η μέθοδος της αλληλούχισης (next generation DNA sequencing / NGS), όπου δημιουργούνται αλληλουχίες από εξατομικευμένα μόρια DNA / συμπληρωματικού DNA (complementary DNA - cDNA).

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (polymerase chain reaction / PCR) έχει την ικανότητα να ανιχνεύει στοχευμένες αναδιατάξεις γονιδίων, είτε αυτές εκφράζονται ενεργά είτε όχι, όπως μεταλλάξεις που υπάρχουν σε επίπεδο DNA αλλά δεν μεταγράφονται σε RNA. Η τεχνική της PCR επικεντρώνεται κυρίως στο ποικίλο

μέγεθος και τη σύνθεση των διασταυρούμενων περιοχών, αυξάνοντας με τον τρόπο αυτό την ευαισθησία της μεθόδου. Ειδικότερα όταν οι ολιγονουκλεοτιδικοί εκκινητές σχεδιάζονται συμπληρωματικά στις αλληλουχίες των ανωτέρω περιοχών μπορεί να επιτευχθεί ευαισθησία της τάξεως του 10^{-4} έως 10^{-5} . Η μέθοδος αυτή που ονομάζεται ολιγονουκλεοτιδική ειδική για το αλληλίο PCR (allele-specific oligonucleotide PCR/ASO-PCR) εξελίχθηκε περαιτέρω με την εισαγωγή της ποσοτικής σε πραγματικό χρόνο PCR (real-time quantitative PCR / RT-qPCR), η οποία χρησιμοποιεί σημασμένους φθορίζοντες εκκινητές σε σύστημα ανάγνωσης για βελτιωμένη ποσοτικοποίηση. [53]. Η RT-qPCR χρησιμοποιείται για να ανιχνεύσει και να ποσοτικοποιήσει γενετικές ανωμαλίες σχετιζόμενες με την οξεία λευχαιμία. Η τεχνική της RT-qPCR εμφανίζει μεγαλύτερη ευαισθησία από την κυτταρομετρία ροής με εύρος ανίχνευσης από 10^{-4} έως 10^{-6} . Επιπροσθέτως, η μέτρηση του αριθμού των λευχαιμικών μεταγράφων παρέχει πληροφορίες για το αν τα επίπεδα των μεταγράφων έχουν αυξητική ή μειούμενη πορεία και μπορεί να κατευθύνει θεραπευτικές αποφάσεις. Ο περιορισμός της MRD που βασίζεται στην RT-qPCR είναι η εξάρτηση από συγκεκριμένες μεταλλάξεις, οι οποίες απαιτούν εξατομικευμένες καμπύλες αναφοράς. [54]

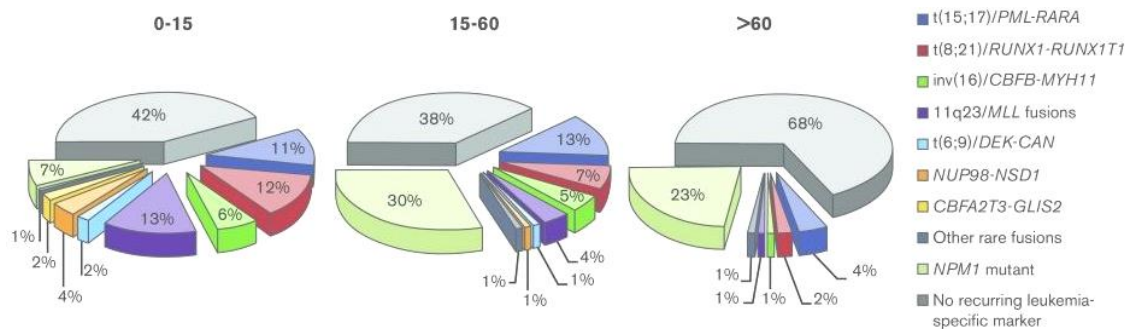
Η ανίχνευση της MRD με τη μέθοδο της NGS, η οποία επιτρέπει την παράλληλη και επαναλαμβανόμενη αλληλούχιση εκατομμυρίων μικρών θραυσμάτων DNA, μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την αξιολόγηση μερικών γονιδίων ή ολόκληρου του γονιδιώματος και θεωρητικά μπορεί να εφαρμοστεί σε όλες τις λευχαιμίες με ειδικές γενετικές ανωμαλίες. Η γενετική κλωνική ετερογένεια της OML στη διάγνωση και στην πορεία του νοσήματος περιπλέκει τη χρήση της NGS ως μέθοδο παρακολούθησης της MRD. Πιο συγκεκριμένα ο επικρατών λευχαιμικός κλώνος στη διάγνωση μπορεί να μην είναι ο κλώνος που προκαλεί κλινική υποτροπή και θνητότητα. Ωστόσο ο λόγος που αυτή η μέθοδος δεν χρησιμοποιείται στην καθ' ημέρα πράξη είναι το γεγονός ότι αποτελεί χρονοβόρα και δαπανηρή διαδικασία. Συνεπώς η χρήση της περιορίζεται σε κλινικές δοκιμές, ωστόσο μελλοντικά αναμένεται να χρησιμοποιείται στο 40-50% των πασχόντων από OML. [54]

MRD στην Οξεία Μυελογενή Λευχαιμία

Η χρήση της MRD στην OML παρέχει αντικειμενική μεθοδολογία για τον καθορισμό του επιπέδου της ύφεσης, καθορίζει την πρόγνωση της OML και την αγωγή μετά την ύφεση, αναγνωρίζει επικείμενη υποτροπή και επιτρέπει την έγκαιρη παρέμβαση. Επιτρέπει επίσης, πιο ισχυρή παρακολούθηση μετά τη μεταμόσχευση και μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως τελικό σημείο στις μελέτες έγκρισης νέων φαρμάκων. [52]

Η παρακολούθηση της MRD θεωρείται απαραίτητη κλινική πρακτική στους πάσχοντες από ΟΜΛ. Η MRD αξιολογείται ανοσοφαινοτυπικά με κυτταρομετρία ροής, εκτός αν ο ασθενής πάσχει από ΟΜΛ με μετάλλαξη σε συγκεκριμένα γονίδια (APL, CBF ΟΜΛ και ΟΜΛ με μεταλλαγμένο NPM1) όπου η MRD αξιολογείται με PCR. (Εικόνα 21) [52]

Στόχο για μοριακή παρακολούθηση της MRD στην ΟΜΛ αποτελούν γονίδια σύντηξης όπως τα PML-RARA (promyelocytic leukemia gene retinoic acid receptor- α), CBFB-MYH11 (core-binding factor subunit β myosin heavy chain 11), RUNX1/RUNX1T1 (runt-related transcription factor 1 / RUNX1 translocated to 1) και το μεταλλαγμένο NPM1. Η παραμονή μεταλλαγμένου NPM1 και των γονιδίων RUNX1-RUNX1T1, CBFB-MYH11 και PML-RARA μετά το πέρας της θεραπείας είναι ισχυρός προγνωστικός δείκτης υποτροπής της ΟΜΛ. Επιπλέον, οι ασθενείς με παρουσία αυτών των γενετικών ανωμαλιών στη διάγνωση, χρήζουν μοριακής παρακολούθησης της MRD με ποσοτική PCR (ευαισθησία 10^{-4} έως 10^{-6}) στη διάγνωση, μετά από δύο κύκλους χημειοθεραπευτικής αγωγής (έφοδος και επανέφοδος) και μετά το πέρας της θεραπείας. Το γονίδιο του όγκου Wilms (Wilms' tumor gene / *WT1*) δεν χρησιμοποιείται σα δείκτης για την ανίχνευση της MRD λόγω φτωχής ευαισθησίας και ειδικότητας, εκτός εάν δεν υπάρχει άλλος διαθέσιμος δείκτης για παρακολούθηση της MRD. Σύμφωνα με την ευρωπαϊκή ομάδα μελέτης της MRD στην οξεία λευχαιμία (ELN MRD Working Party) δε συστήνεται η χρήση των FLT3-ITD, FLT3-TKD, NRAS, KRAS, IDH1, IDH2, MLL-PTD, και τα επίπεδα έκφρασης του EVI1 σα μοναδικός δείκτης παρακολούθησης της MRD, λόγω του γεγονότος ότι είναι επιρρεπείς σε συχνές απώλειες ή προσθήκες. Ωστόσο αυτοί οι δείκτες έχουν προγνωστική σημασία όταν συνοδεύονται από άλλους δείκτες παρακολούθησης της MRD. Σε ύπαρξη διαθέσιμων μοριακών στόχων, η εκτίμηση της MRD με RT-qPCR μπορεί να εφαρμοστεί στο 50% των περιπτώσεων ΟΜΛ και σε λιγότερο από το 35% σε ηλικιωμένους ασθενείς, ενώ η κυτταρομετρία ροής μπορεί να ανιχνεύσει την MRD στο 90% των ασθενών. (Εικόνα 19) [54] Ωστόσο από τις δημοσιευμένες μελέτες σύγκρισης της PCR με την κυτταρομετρία ροής στην ανίχνευση της MRD στην ΟΜΛ, έχει αναδειχθεί ότι είναι το ίδιο αποτελεσματικές στην ανίχνευση των ασθενών με υψηλό κίνδυνο υποτροπής. [55]

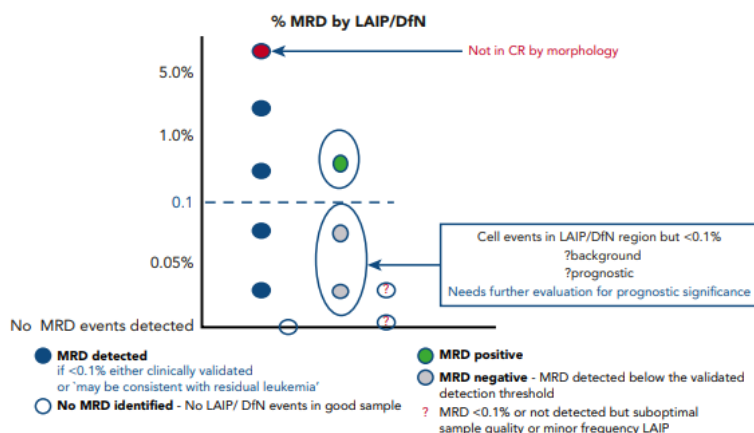


Εικόνα 19. Αναλογία των ειδικών για τη λευχαιμία στόχων της MRD που ανιχνεύονται με RT-qPCR σε πάσχοντες από ΟΜΛ ανάλογα με την ηλικία. Τροποποιημένη εικόνα από Farhad Ravandi et al. (54)

Ο χρόνος στον οποίο ελέγχεται η ύπαρξη MRD έχει μεταβλητή προγνωστική αξία. Παρόλο που η γρήγορη εξαφάνιση των λευχαιμικών κυττάρων μετά τη θεραπεία εφόδου είναι σημαντική, έχει βρεθεί ότι τα επίπεδα της MRD μετά τη θεραπεία σταθεροποίησης εμφανίζουν ανώτερη προγνωστική αξία. Διακριτές προσεγγίσεις υπάρχουν για την αξιολόγηση της MRD. Η μία στηρίζεται στην ανίχνευση της MRD μετά τη θεραπεία εφόδου, ώστε να επαναπροσδιορίσει την ομάδα κινδύνου στην οποία έχει ενταχθεί ο ασθενής βάσει κριτηρίων πριν την έναρξη της χημειοθεραπευτικής αγωγής. Η θεραπεία που κατευθύνεται από την ομάδα κινδύνου βελτιώνει την έκβαση του νοσήματος και προφυλάσσει τον ασθενή από την έκθεση σε υπερβολική τοξικότητα λόγω μη απαραίτητης πρόσθετης θεραπείας. Η εναλλακτική προσέγγιση χρησιμοποιεί τακτική παρακολούθηση της MRD κατά τη διάρκεια της αιματολογικής ύφεσης, σε μια προσπάθεια πρόληψης της κλινικής υποτροπής με άμεση παρέμβαση, σε παρουσία αυξημένων επιπέδων MRD, με προληπτική θεραπεία. [55]

Οι οδηγίες της ευρωπαϊκής ομάδας για τη λευχαιμία (European Leukemia Net) προτείνουν τη χρήση των επιπέδων της MRD πριν τη θεραπεία σταθεροποίησης για τον επαναπροσδιορισμό της ομάδας κινδύνου στην οποία ανήκει ο ασθενής. Συγκεκριμένα προτείνουν τον έλεγχο της MRD μετά από δύο κύκλους χημειοθεραπευτικής αγωγής (έφοδος και επανέφοδος) καθώς και μετά το πέρας της θεραπείας. Έχοντας λάβει υπόψιν τον μεγάλο αριθμό ανωμαλιών, προτείνεται η χρήση του 0,1% ως όριο θετικότητας της MRD για το διαχωρισμό των MRD+ ασθενών από τους MRD- ασθενείς, είτε αυτή ανιχνεύεται με κυτταρομετρία ροής είτε με PCR. Ωστόσο υπάρχουν αναφορές υπολειμματικής λευχαιμικής νόσου ακόμα και σε επίπεδα MRD κάτω από 0,1% όταν αυτή ελέγχεται με κυτταρομετρία ροής, αλλά το επίπεδο του 0,1% καθορίζει τους ασθενείς με καλή επιβίωση. (Εικόνα 20) Το όριο αυτό της θετικότητας ισχύει και για τα επίπεδα της MRD μετά τη θεραπεία

σταθεροποίησης, χωρίς ωστόσο να καθορίζεται ο ιδανικός χρόνος για τη μέτρηση της MRD. Επιπροσθέτως, η επιλογή δείγματος μυελού των οστών για την ανίχνευση της MRD παρέχει καλύτερη ευαισθησία από ότι η χρήση περιφερικού αίματος. Ωστόσο σε απρόθυμους ασθενείς να υποβάλλονται σε συχνές αναρροφήσεις μυελού των οστών μπορεί να χρησιμοποιηθεί περιφερικό αίμα για την ανίχνευση MRD. [52]



Εικόνα 20. Πιθανά σενάρια ανιχνεύσιμης MRD. Τροποποιημένη εικόνα από Schuurhuis GJ et al. (52)

Recommendations	
Flow cytometry	
1	Use the following markers in an MRD panel: CD7, CD11b, CD13, CD15, CD19, CD33, CD34, CD45, CD56, CD117, HLA-DR (backbone: CD45, CD34, CD117, CD13, CD33, forward scatter/sideward scatter) If necessary, add a "monocytic tube" containing: CD64/CD11b/CD14/CD4/CD34/HLA-DR/CD33/CD45.
2	Integrate the classic LAIP approach with the DfN approach. To trace all aberrancies (at and beyond diagnosis, including newly formed postdiagnosis aberrancies) apply a full panel both at diagnosis and at follow-up.
3	Aspirate 5-10 mL of BM and use the first pull for MRD assessment. At present, PB, with its lower MRD content, should not be used for MRD assessment. Pull as low as desirable BM volume because contamination with PB increases with BM volume
4	Estimate the contamination with PB, especially when a first pool of BM was impossible.
5	Use 500 000 to 1 million WBCs; use the best aberrancy available and relate it to CD45 ⁺ WBCs.
6	To define "MRD-negative" and "MRD-positive" patient group, a cutoff of 0.1% is recommended.
7	If true MRD <0.1% is found, report this as "MRD-positive <0.1%, may be consistent with residual leukemia." If applicable, the comment "this level has not been clinically validated" should be added.
8	In a multicenter setting, transport and storage of full BM at room temperature for a period of 3 d are acceptable.
9	Single center studies with no extensive experience on MFC MRD are strongly discouraged.
Molecular biology	
1	Molecular MRD analysis is indifferent to the anticoagulant used during cell sampling, and thus both heparin and EDTA can be used as anticoagulant.
2	Aspirate 5-10 mL of BM, and use the first pull for molecular MRD assessment.
3	WT1 expression should not be used as MRD marker, unless no other MRD marker is available in the patient.
4	Do not use mutations in FLT3-ITD, FLT3-TKD, NRAS, KRAS, DNMT3A, ASXL1, IDH1, IDH2, MLL-PTD and expression levels of EVI1 as single MRD markers. However, these markers may be useful when used in combination with a second MRD marker.
5	We define molecular progression in patients with molecular persistence as an increase of MRD copy numbers $\geq 1 \log_{10}$ between any 2 positive samples. Absolute copy numbers should be reported in addition to the fold increase to enable the clinician to make his/her own judgments.
6	We define molecular relapse as an increase of the MRD level of $\geq 1 \log_{10}$ between 2 positive samples in a patient who was previously tested negative. The conversion of negative to positive MRD in PB or BM should be confirmed 4 wk after the initial sample collection in a second sample from both BM and PB. If MRD increases in the follow-up samples $\geq 1 \log_{10}$, molecular relapse should be diagnosed.

Εικόνα 21. Συστάσεις της ELN για την παρακολούθηση της MRD σε πάσχοντες από ΟΜΛ. Τροποποιημένη εικόνα από Schuurhuis GJ et al. (52)

MRD στην Οξεία Λεμφοβλαστική Λευχαιμία

Στην ΟΛΛ όπως και στην ΟΜΛ η παρακολούθηση της MRD μπορεί να γίνει είτε με κυτταρομετρία ροής, είτε με RT-PCR. Η ανοσοφαινοτυπική εκτίμηση της ανταπόκρισης στη θεραπεία με κυτταρομετρία ροής προϋποθέτει ότι το αντιγονικό προφίλ των λευχαιμικών κυττάρων διαφέρει από αυτό των φυσιολογικών αιμοποιητικών προγονικών κυττάρων που αναμένεται να είναι παρόντα στο μυελό των οστών κατά την ύφεση. Ο σχετιζόμενος με τη λευχαιμία ανοσοφαινότυπος (LAIP) μπορεί να περιέχει είτε άτυπη συνέκφραση δεικτών άλλης σειράς (κυρίως μυελικής) ή διαφορές στην ένταση του φθορισμού των εκφραζόμενων δεικτών (υπερέκφραση, υποέκφραση) είτε ασύγχρονη έκφραση δεικτών που φυσιολογικά συνδέονται με διαφορετικά στάδια ωρίμανσης. Η ανίχνευση αυτού του προφίλ στα λευχαιμικά κύτταρα είναι εφικτή στην πλειοψηφία των πασχόντων από ΟΛΛ (>90% των πασχόντων). [56]

Η μοριακή παρακολούθηση της MRD στην ΟΛΛ είναι εφικτή σε μεγαλύτερο αριθμό πασχόντων συγκριτικά με την ΟΜΛ. Πιο συγκεκριμένα το ένα τέταρτο των ενηλίκων με ΟΛΛ εκφράζουν το BCR/ABL μετάγραφο (αποτέλεσμα του χρωμοσώματος Φιλαδέλφεια), ενώ μεγάλο ποσοστό ασθενών φέρει μεταλλάξεις στο γονίδιο MLL, συνέπεια αντιμετάθεσης ή έλλειψης στη θέση q23.2 του χρωμοσώματος 11. Τόσο το BCR/ABL όσο και το μεταλλαγμένο MLL αποτελούν στόχο για παρακολούθηση της MRD με PCR. Επιπροσθέτως στην ΟΛΛ μπορεί να παρακολουθηθεί με PCR η κλωνικότητα της ανοσοσφαιρίνης ή των αναδιατάξεων του γονιδίου του υποδοχέα των T κυττάρων (T cell receptor / TCR). [51]

Ο κατάλληλος χρόνος παρακολούθησης της MRD στην ΟΛΛ των ενηλίκων ορίζεται από το θεραπευτικό πρωτόκολλο που ακολουθείται. Ωστόσο η μετά την ύφεση παρακολούθηση της MRD για έγκαιρη ανίχνευση της υποτροπής κρίνεται απαραίτητη. Σε μία προοπτική πολυκεντρική μελέτη της γερμανικής ομάδας (German Multicenter ALL Study Group / GMALL) οι ασθενείς με μη ανιχνεύσιμη MRD θετικοποίησαν την MRD 4,1 μήνες πριν την κλινική υποτροπή, ενισχύοντας την θεωρία ότι η υποτροπή μπορεί να προβλεφθεί μέσω της παρακολούθησης της MRD. Η πλειοψηφία των θεραπευτικών πρωτοκόλλων για την ΟΛΛ ελέγχει την MRD μετά το πέρας της αγωγής εφόδου, όπου κατατάσσει τους πάσχοντες σε ομάδες κινδύνου και καθορίζει τη συνέχεια της αγωγής, και κατά τη διάρκεια της θεραπείας σταθεροποίησης, όπου επιτρέπει τη χορήγηση προληπτικής θεραπείας διάσωσης σε περίπτωση θετικοποίησης της MRD. Στο πρωτόκολλο GMALL, η μη ανιχνεύσιμη

MRD μετά την έφοδο II ή τη σταθεροποίηση I σχετίζεται με κλινικό όφελος ανεξάρτητα από τους παράγοντες κινδύνου προ της θεραπείας. Αντιθέτως η παραμονή θετικής MRD σε επίπεδο $>10^{-4}$ μετά τη σταθεροποίηση I κατέταξε τους ασθενείς με ΟΛΛ σε υψηλού κινδύνου με μοριακή αποτυχία. Επίπεδα MRD $>10^{-4}$ είναι ενδεικτικά νοσήματος με φτωχή πρόγνωση, η οποία βελτιώνεται αν οι πάσχοντες υποβληθούν σε αλλογενή μεταμόσχευση μυελού των οστών. Εν αντιθέσει επίπεδα MRD $<10^{-4}$ την ημέρα 11 του πρωτοκόλλου GMALL (δηλαδή κατά τη διάρκεια της εφόδου I), αναγνωρίζουν μία μικρή υποομάδα ασθενών με ταχεία ανταπόκριση στη θεραπεία και άριστη πρόγνωση. [53]

4. T- ΡΥΘΜΙΣΤΙΚΑ ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΑ

Τα T ρυθμιστικά λεμφοκύτταρα (regulatory T cells/ Tregs) αποτελούν υποπληθυσμό των CD4+ T κυττάρων με ικανότητα καταστολής του πολλαπλασιασμού και της παραγωγής κυττοκινών από τα ενεργοποιημένα T κύτταρα, των οποίων ο TCR είναι συνδεδεμένος με πεπτιδίο- MHC. Τα Tregs δημιουργούνται με δύο τρόπους, είτε παράγονται στο θύμο αδένα (φυσικά Tregs/ natural Tregs), είτε στην περιφέρεια από διαφοροποίηση των παρθένων CD4+ T κυττάρων (επαγόμενα Tregs/ inducible Tregs). [20]

Τα Tregs που προέρχονται από το θύμο αδένα αποτελούν το 5-10% των CD4+ περιφερικών T λεμφοκυττάρων και εκφράζουν την α αλυσίδα του υποδοχέα της ιντερλευκίνης 2 (CD25), το σχετιζόμενο με τα κυτταροτοξικά T λεμφοκύτταρα αντιγόνο 4 (CTLA-4) και το γονίδιο που σχετίζεται με την επαγόμενη από τα γλυκοκορτικοειδή οικογένεια του υποδοχέα του TNF (GITR) [57,58]

Ο φυσιολογικός θύμος παράγει συνεχώς έναν πληθυσμό CD4+ T κυττάρων με δραστηριότητα κατασταλτική για την αυτοανοσία και μερικά δυνητικά αυτοαντιδραστικά T λεμφοκύτταρα. Η θυμεκτομή στα νεογνικά ποντίκια, καταργεί την αναπτυξιακά καθορισμένη παραγωγή CD4+ T κυττάρων με ικανότητα καταστολής της αυτοανοσίας, επιτρέποντας στα αυτοδραστικά CD4+ T κύτταρα που παράχθηκαν προ της θυμεκτομής να ενεργοποιηθούν και να προκαλέσουν αυτοάνοσα νοσήματα εξαιτίας της παρουσίας ελάχιστων κατασταλτικών CD4+ T κυττάρων στην περιφέρεια. Τα ανωτέρω είναι ενδεικτικά συνύπαρξης δύο πληθυσμών CD4+ T κυττάρων στην περιφέρεια των φυσιολογικών ποντικών, ενός εν δυνάμει ικανού να προάγει αυτοάνοσα νοσήματα και ενός κυρίαρχου που τα καταστέλλει. [59]

Για τον προσδιορισμό αυτών των κατασταλτικών CD4+ κυττάρων το 1995 ο Sakaguchi και οι συνεργάτες του αναγνώρισαν το CD25 μόριο επιφανείας, το οποίο είναι η α αλυσίδα του υποδοχέα της ιντερλευκίνης 2. Τα CD25+ T κύτταρα αποτελούν το 5-10% των περιφερικών CD4+ T κυττάρων και λιγότερο από το 1% των περιφερικών CD8+ T κυττάρων στα υγιή παρθένα ποντίκια. Η απομάκρυνση των CD4+CD25+ T κυττάρων από ποντικούς όχι μόνο προκάλεσε αυτοάνοσα νοσήματα, αλλά ενίσχυσε την ανοσιακή απάντηση σε αλλοαντιγόνα, ενώ η εκ νέου προσθήκη CD4+CD25+ T κυττάρων επανέφερε την ανοσιακή απάντηση σε φυσιολογικά επίπεδα. Με αυτό τον τρόπο ανακαλύφθηκε ένας νέος υποπληθυσμός κατασταλτικών T λεμφοκυττάρων (CD4+), γνωστός πλέον ως ρυθμιστικά T λεμφοκύτταρα, ο οποίος εκφράζει υψηλά επίπεδα της α αλυσίδας του υποδοχέα της ιντερλευκίνης 2 (CD25) και προλαμβάνει την αυτοανοσία. [60]

Ενισχυτικό της επίδρασης της παρουσίας του CD25 στην πρόληψη της αυτοανοσίας αποτέλεσε η παρατήρηση ότι ποντίκια με έλλειψη CD25 ή CD122 (β αλυσίδα του υποδοχέα της ιντερλευκίνης 2) παρουσίαζαν αυτοανοσία ή φλεγμονή, η οποία παρέρχονταν με τον ενοφθαλμισμό φυσιολογικών CD25+CD4+ T κυττάρων. [61] Αντιστοίχως παρατηρήθηκε ότι με τη χορήγηση μονοκλωνικού αντισώματος έναντι της ιντερλευκίνης 2 (IL-2) μειώθηκε ο αριθμός των CD25+CD4+ T κυττάρων σε φυσιολογικά ποντίκια και κατά συνέπεια προκλήθηκε αυτοάνοσο νόσημα. [62] Αυτά τα ευρήματα καταδεικνύουν ότι η IL-2 είναι ένας παράγοντας κλειδί για την ανάπτυξη και την επιβίωση των T ρυθμιστικών λεμφοκυττάρων και ότι το CD25 ως ένα στοιχείο του υποδοχέα της IL-2 είναι όχι μόνο ένας δείκτης των T ρυθμιστικών κυττάρων αλλά ένα απαραίτητο μόριο για την συντήρησή τους. [63]

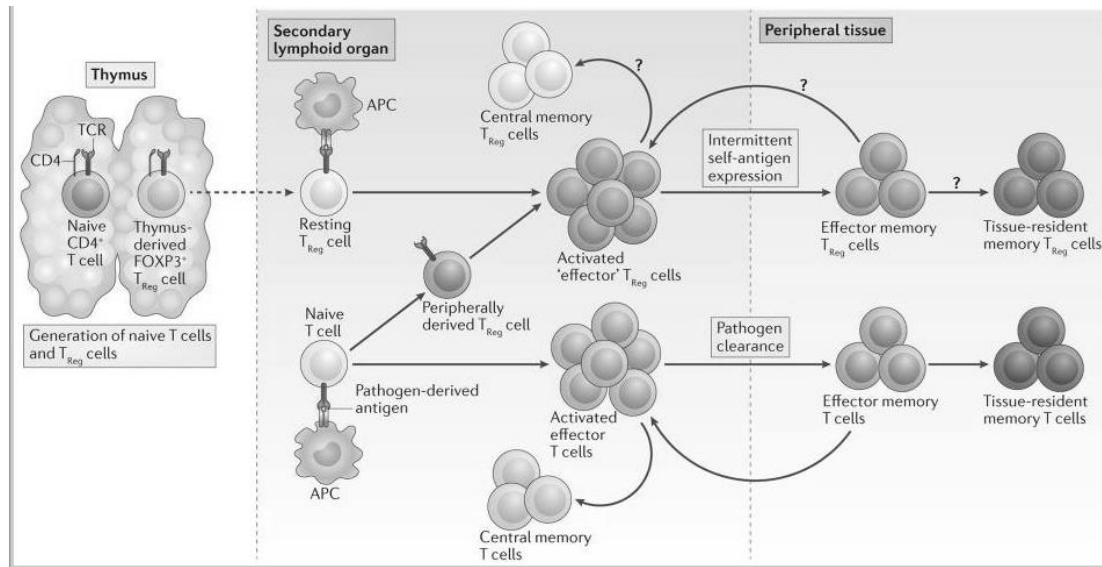
Δύο είναι οι βασικοί πληθυσμοί Tregs που έχουν οριστεί, όπως προαναφέρθηκε, τα φυσικά T ρυθμιστικά λεμφοκύτταρα (natural Tregs - nTregs) που προέρχονται από το θύμο αδένος και πλέον ονομάζονται tTregs (thymus-derived Foxp3+ Treg cells) για να τονιστεί η προέλευσή τους και τα επαγόμενα στην περιφέρεια T ρυθμιστικά λεμφοκύτταρα (inducible Tregs – iTregs) που ονομάζονται πλέον pTregs (periphery-derived CD4+Foxp3+ Treg cells). Τα CD4+CD25+ tTregs εκφράζουν συνεχώς το κυτταροτοξικό αντιγόνο των T λεμφοκυττάρων (CTLA-4 ή CD152), τον επαγόμενο από γλυκοκορτικοειδή υποδοχέα του παράγοντα νέκρωσης των όγκων (GITR), την L-σελεκτίνη (CD62L) και τον OX40 (CD134). Ωστόσο κανείς από τους ανωτέρω δείκτες δεν είναι ειδικός για τα tTregs, καθώς οι δείκτες αυτοί εκφράζονται και σε ενεργοποιημένα T κύτταρα καθώς και σε ποικίλα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα. Ο πιο ειδικός δείκτης αναγνώρισης των Tregs είναι ο ενδοκυττάριος δείκτης Foxp3, ένας μεταγραφικός παράγοντας κλειδί για την ανάπτυξη και τη λειτουργία των ρυθμιστικών T λεμφοκυττάρων. [64] Εν αντιθέσει με τα tTregs, τα επαγόμενα T ρυθμιστικά κύτταρα προέρχονται από διαφοροποίηση των naïve CD4+Foxp3- T κυττάρων στην περιφέρεια, αφού έλθουν σε επαφή με συγκεκριμένα αντιγόνα και υπό την επίδραση συγκεκριμένων παραγόντων, όπως ο TGF-β και η IL-2. Χωρίζονται δε σε δύο βασικές κατηγορίες στον άνθρωπο, τα βοηθητικά T3 κύτταρα (T helper 3 – Th3), που παράγουν TGF-β και τα ρυθμιστικά T1 κύτταρα (T regulatory 1 - Tr1) που εκκρίνουν ιντερλευκίνη-10 (IL-10). [65].

Cell type	Phenotype	Suggested immunosuppressive mechanisms
CD4 ⁺		
nTreg	CD25 ⁺ FOXP3 ⁺ 45RO ⁺ CTLA-4 ⁺ GITR ⁺ CD134 ⁺ CD62L ⁺ CD103 ⁺ lymphocyte activation gene-3 ⁺ CD127 ^{lo} CD26 ⁺	Cell-to-cell contact-dependent <i>in vitro</i> (CTLA-4) Cell-to-cell contact- and cytokine-dependent <i>in vivo</i> (IL-10 and TGF-β)
iTreg		
Th3	CD25 ⁺ FOXP3 ⁺ 45RO ⁺ CTLA-4 ⁺	Cytokine-mediated (TGF-β production >> IL-10)
Tr1	CD25 ⁺ FOXP3 ⁺ 45RO ⁺ CTLA-4 ⁻	Cell-to-cell contact Cytokine-mediated (IL-10 >> TGF-β, IL-5, IFN-γ production)
TGF-β/IL-10 double-positive Treg	CD25 ⁻ FOXP3 ⁻	Cytokine-mediated (IL-10 and TGF-β production)

Πίνακας 7. Βασικοί πληθυσμοί των Tregs. Τροποποιημένη εικόνα από Ustun C et al. (145)

Ο μεταγραφικός παράγων Foxp3 (Forkhead/winged-helix transcription factor box P3) είναι βασικός ρυθμιστής της ανάπτυξης και της λειτουργίας των CD4⁺CD25⁺ T ρυθμιστικών κυττάρων (Tregs) και καθορίζει τους υποπληθυσμούς αυτών. [66] Τα tTregs χαρακτηρίζονται από συνεχή έκφραση του FOXP3, εν αντιθέσει με τα περιφερικά Tregs όπου η έκφραση του FOXP3 είναι ασταθής. [67] Ωστόσο όπως έδειξε ο Komatsu και οι συνεργάτες του, τα φυσικά Tregs μπορούν κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες να οδηγηθούν σε απώλεια της έκφρασης του Foxp3. Μετά την απώλειά του, κάποια Tregs υιοθετούν τις λειτουργίες των δραστικών βοηθητικών T κυττάρων (effector helper T cell (Th)), ενώ κάποια άλλα διατηρούν τη μνήμη της προηγούμενης έκφρασης του Foxp3 και επανεκφράζουν τον Foxp3 μετά την ενεργοποίησή τους. Αυτή η μειοψηφία ασταθούς πληθυσμού εμφανίζει ευέλικτες απαντήσεις στα ληφθέντα από κυτταροκίνες σήματα. Η σηματοδότηση από τον TGFβ οδηγεί στη διατήρηση της έκφρασης του Foxp3, ενώ η απάντηση σε άλλες κυτταροκίνες οδηγεί στη διαφοροποίηση σε δραστικά βοηθητικά T κύτταρα (Th), όπως τα Th1, Th17 και οζώδη T βοηθητικά κύτταρα (Tfh), τουλάχιστον *in vitro*. Τα ανωτέρω σύμφωνα με τους Komatsu et al καταδεικνύουν ότι τα φυσικά Foxp3(+) T κύτταρα είναι ένας ετερογενής πληθυσμός που αποτελείται από κύτταρα πιστά στην προέλευσή τους και κύτταρα με ικανότητα αναπτυξιακής πλαστικότητας.[68] Εν αντιθέσει, οι Miyao et al έδειξαν ότι τα Tregs αποτελούν κύτταρα πιστά στην προέλευσή τους μετά από πολλούς κύκλους κυτταρικής διαίρεσης, ακόμα και σε περιβάλλον με πολλές αλλαγές. Αυτό διασφαλίζεται μέσω της απομεθυλίωσης του DNA στην περιοχή του Foxp3 ανεξάρτητα από τη συνεχή έκφραση του Foxp3. Σε αντίθεση με τη διαδεδομένη πεποίθηση ότι η έκφραση του Foxp3 καθορίζει την προέλευση του κυττάρου, οι Miyao et al ταυτοποίησαν έναν μικρό πληθυσμό μη ρυθμιστικών Foxp3⁺ T κυττάρων από τον οποίο προήλθαν Foxp3⁻ T βοηθητικά κύτταρα τα οποία επιλεκτικά συσσωρεύονταν σε περιοχές πλούσιες σε φλεγμονώδεις κυτταροκίνες ή σε λεμφοπενικές περιοχές. Αντιθέτως, τα Tregs ανεξαρτήτως της

προέλευσής τους, θυμικής ή περιφερικής, δεν υπόκειντο σε επαναπρογραμματισμό κάτω από τις προαναφερθείσες συνθήκες. Επιπροσθέτως, παρόλο που μερικά Tregs παροδικά έχασαν την έκφραση του Foxp3, διατήρησαν τη μνήμη τους και εξέφρασαν εκ νέου Foxp3 και διατήρησαν την κατασταλτική τους δράση όταν ενεργοποιήθηκαν. Συνεπώς τα Tregs αποτελούν μία σταθερή κυτταρική σειρά και η έκφραση του Foxp3 δεν καθορίζει την σειρά αυτή, καθώς τα συμβατικά T κύτταρα μπορούν να εκφράσουν Foxp3 και τα Tregs μπορούν αναστρέψιμα να υποεκφράσουν Foxp3. [69]

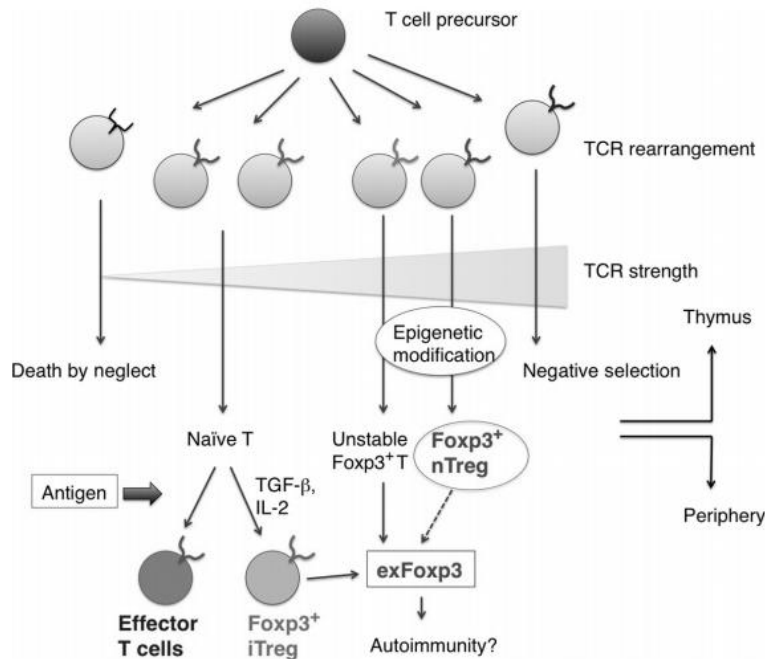


Εικόνα 22. Ο κύκλος ζωής των ρυθμιστικών και συμβατικών CD4+ T κυττάρων. Τροποποιημένη εικόνα από Rosenblum et al. (167)

Τα φυσικά Tregs (nTregs), όπως προαναφέρθηκε, προέρχονται από το θύμο, εκφράζουν συνεχώς CD25 και ο μηχανισμός της κατασταλτικής τους δράσης είναι εξαρτώμενος από την επαφή των κυττάρων. [70] Ωστόσο, παρόλο που η λειτουργία του θύμου μειώνεται μετά την εφηβεία, τα Tregs δε μειώνονται αλλά παραμένουν καθ' όλη τη διάρκεια της ζωής. Για να εξηγηθεί η παρατήρηση αυτή αρχικά αναπτύχθηκε η θεωρία ότι τα Tregs προέρχονται από μία δεξαμενή από αυτό-ανανεώσιμους μακράς επιβίωσης θυμικούς μετανάστες. Ο Vukmanovic-Stejić και οι συνεργάτες του ωστόσο, παρατήρησαν ότι τα ανθρώπινα CD4⁺CD25^{hi}Foxp3⁺ T κύτταρα είναι ευαίσθητα στην απόπτωση μέσω μειωμένης έκφρασης Bcl-2 και έχουν περιορισμένη ικανότητα αντιγραφής λόγω μειωμένης επαγωγής και αυξημένης καταστροφής της τελομεράσης. Τα ευρήματα αυτά σε συνδυασμό με την υποστροφή του θύμου, θα αναμένετο να οδηγούν σε μειωμένο αριθμό CD4⁺CD25^{hi} κυττάρων με την πάροδο της ηλικίας. Εν αντιθέσει η ίδια ομάδα επιβεβαίωσε προηγούμενες αναφορές για αύξηση των CD4⁺CD25^{hi} Tregs σε ηλικιωμένους. Η διατήρηση αυτή του

πληθυσμού των CD4⁺CD25^{hi}Foxp3⁺ T κυττάρων οφείλεται στην διέγερση ενός πληθυσμού CD4⁺ T κυττάρων μνήμης στην περιφέρεια (CD4⁺CD45RO⁺CD25⁻FOXP3⁻ memory T cells) που προάγει τη δημιουργία CD4⁺ Tregs, τα οποία ωστόσο έχουν μικρότερη επιβίωση. Αυτή η ταχεία μετατροπή των περιφερικών T κυττάρων είναι υπεύθυνη για τη διατήρηση των Tregs με την πάροδο της ηλικίας. [71]

Τα επαγόμενα Tregs (iTregs) που αναπτύσσονται στην περιφέρεια από CD4⁺CD25⁻Foxp3⁻ πρόδρομα T κύτταρα, εμφανίζουν ποικίλη έκφραση CD25 και η κατασταλτική τους δράση είναι ανεξάρτητη από την επαφή των κυττάρων, αλλά σχετιζόμενη με τις κυτταροκίνες που εκκρίνουν (IL-10 και TGF-β). [72] Τα CD4⁺ ρυθμιστικά T κύτταρα τύπου 1 (Tr1) εκφράζουν υψηλά επίπεδα IL-10 και μέτρια επίπεδα IL-5, IFN-γ και TGF-β, ενώ δεν εκφράζουν IL-2 και IL-4. Τα T3 βοηθητικά ρυθμιστικά T κύτταρα (Th3), εν αντιθέσει με τα Tr1, εκφράζουν υψηλά επίπεδα TGF-β. Και οι δύο τύποι iTregs ωστόσο, καταστέλλουν εξίσου τη μεσολαβούμενη από Th1 και Th2 ανοσιακή απάντηση, ενώ έχει περιγραφεί ότι προέρχονται από παρθένα T κύτταρα έπειτα από διέγερση από δένδριτικά κύτταρα. Εκτός από τα CD4⁺ tTregs και iTregs, στον έλεγχο της λειτουργίας του ανοσοποιητικού συστήματος ενέχεται και ένας πληθυσμός CD8⁺ T κατασταλτικών κυττάρων, καθώς και ειδικός πληθυσμός κυττάρων NK και T NK. Τα CD8⁺ T κατασταλτικά κύτταρα προέρχονται από ολιγοκλωνικό πληθυσμό T κυττάρων, δεν εκφράζουν CD28, ενώ εκφράζουν FOXP3, GITR, CTLA-4, OX-40, και CD62L στο ίδιο επίπεδο συγκριτικά με τα CD4⁺CD25⁺ Tregs. Επίσης είναι ικανά να καταστέλλουν τον πολλαπλασιασμό των T κυττάρων και επάγονται από αλλογενή αντιγονοπαρουσιαστικά ή αυτόλογα αντιγονοπαρουσιαστικά συνδεδεμένα με πεπτιδίο κύτταρα. Τα NK και T NK κύτταρα με ρυθμιστική λειτουργία, παρουσιάζουν κατασταλτική δραστηριότητα μεσολαβούμενη είτε από ποικίλες κυττοκίνες (IL-13, IL-4, IL-10) είτε από άμεση επαφή μεταξύ των κυττάρων (cell-cell contact). [64]

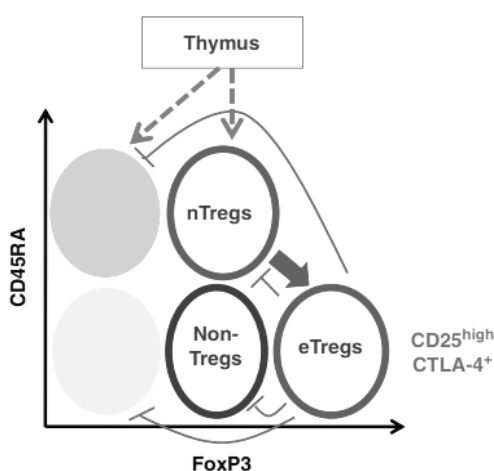


Εικόνα 23. Ανάπτυξη των T ρυθμιστικών κυττάρων στο θύμο και στην περιφέρεια. Τροποποιημένη εικόνα από Okada M et al. (77)

Τα tTregs παράγονται στο θύμο από προγονικά CD4+CD8+ διπλά θετικά T κύτταρα (double positive – DP). Τα προγονικά αυτά κύτταρα είναι ευαίσθητα στη διέγερση από τον υποδοχέα των T κυττάρων (TCR- T cell receptor). Αφού αναδιαταχθεί το γονίδιο του TCR, παράγονται ποικίλοι υποδοχείς T κυττάρων (TCRs) οι οποίοι αναγνωρίζουν αυτοσυνδέτες του μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας (MHC) σε ποικίλου βαθμού ένταση και διάρκεια. Η αντιδραστικότητα των TCRs στους συνδέτες του MHC καθορίζει τη μοίρα του κυττάρου. Τα κύτταρα που δεν εκφράζουν τον υποδοχέα TCR ή εκφράζουν TCR που δεν έχει ικανότητα σύνδεσης με τους συνδέτες του θύμου, οδηγούνται σε ‘θάνατο από παραμέληση’. Τα κύτταρα με χαμηλή συγγένεια στον TCR υπόκεινται σε ‘θετική επιλογή’ και γίνονται CD4+ βοηθητικά ή CD8+ κυτταροτοξικά και αποτελούν την πλειοψηφία των κυτταρικών προϊόντων του θύμου. Αντιθέτως πολύ υψηλής συγγένειας συνδέτες ως προς τον TCR πυροδοτούν την απάλειψη του κλώνου μέσω άμεσης επαγωγής της απόπτωσης, με σκοπό να διατηρηθεί η αυτό-ανοχή. Αυτή η διαδικασία ονομάζεται ‘αρνητική επιλογή’. Ωστόσο μερικοί υποπληθυσμοί λεμφοκυττάρων που αναπτύσσονται στο θύμο εμφανίζουν ισχυρή αλληλεπίδραση με τους αυτό-συνδέτες κατά τη διάρκεια της ανάπτυξής τους χωρίς να οδηγούνται σε απόπτωση (επιλογή αγωνιστή). Σ αυτή την κατηγορία ανήκουν τα φυσικά Foxp3+ Tregs (nTregs) και τα φυσικά T βοηθητικά κύτταρα που παράγουν ιντερλευκίνη 17 (nTh17). Τα κύτταρα

αυτά παράγονται παρουσία διαφορετικών παραγόντων, ωστόσο έχουν κάποια κοινά χαρακτηριστικά. Αυτά τα χαρακτηριστικά περιλαμβάνουν ενεργοποιημένο φαινότυπο ή φαινότυπο μνήμης, στοιχεία διέγερσης από υψηλής συγγένειας αυτό-συνδέτη κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης, παρουσία TGF-β και ρυθμιστικό ρόλο στην ανοσία. [21]

Τα Tregs που απαντώνται στον ανθρώπινο οργανισμό αποτελούνται από τρεις φαινοτυπικά και λειτουργικά διακριτούς υποπληθυσμούς, CD45RA(+)Foxp3(lo) T ρυθμιστικά κύτταρα ανάπαυσης ή φυσικά/ παρθένα Tregs (resting Tregs, rTregs / naïve, nTregs), CD45RA(-)Foxp3(hi) δραστικά ή ενεργοποιημένα T ρυθμιστικά κύτταρα (effector or activated Tregs, eff Tregs or aTregs) και CD45RA(-)Foxp3(lo) μη κατασταλτικά CD4+ T κύτταρα που εκκρίνουν κυτταροκίνες. [73]

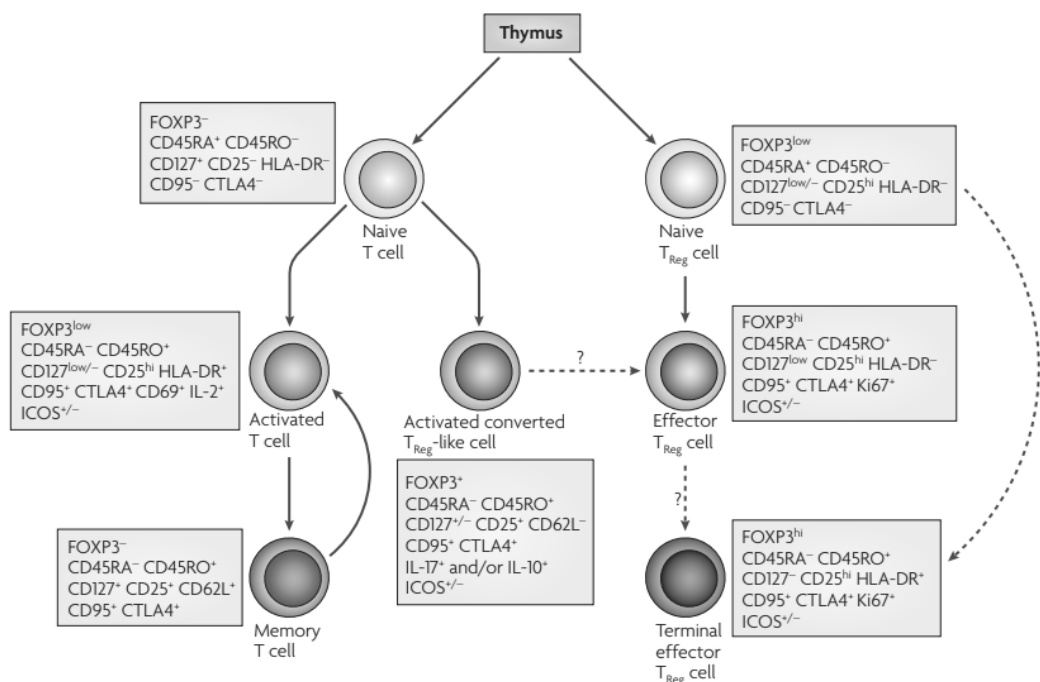


Εικόνα 24. Η διαφοροποίηση των Tregs και η έκφραση των CD45RA και Foxp3 αναλόγως της διαφοροποίησης. Ο θύμος παράγει CD45RA+FoxP3^{lo} nTregs καθώς και παρθένα CD45RA+ non-Treg κύτταρα. Μετά την αντιγονική διέγερση, τα nTregs διαφοροποιούνται σε CD45RA-FoxP3^{hi} eTregs, τα οποία έχουν κατασταλτική δράση και είναι ικανά να καταστείλουν τον πολλαπλασιασμό άλλων Tregs καθώς και non-Tregs κυττάρων *in vitro*. Τροποποιημένη εικόνα από Miyara M and Sakaguchi S. (109)

Τα φυσικά (naive) Tregs χαρακτηρίζονται από την αυξημένη έκφραση του επιφανειακού CD45RA και τη χαμηλή έκφραση του ενδοκυττάριου Foxp3. Η έκφραση του CD45RA απουσία έκφρασης του CD45RO είναι ένας φαινοτυπικός δείκτης για τα nTregs που δεν έχουν υποστεί ωρίμανση μεσολαβούμενη από τη διέγερση του TCR. Η πλειοψηφία, αν όχι όλα, τα θυμικής προέλευσης Tregs που ανευρίσκονται στην περιφέρεια είναι CD45RA⁺FOXP3^{lo} nTregs. Η απουσία έκφρασης του δείκτη Ki67, ενός δείκτη πολλαπλασιασμού του πυρήνα, καταδεικνύει ότι αυτά τα nTregs είναι σε στάδιο αδράνειας, αιτιολογώντας την εναλλακτική τους ονομασία ως Tregs ανάπαυσης (resting Tregs). Τα nTregs πολλαπλασιάζονται *in vitro* μετά από διέγερση του υποδοχέα TCR και είναι ανθεκτικά στην απόπτωση. Αυτό έρχεται σε αντίθεση με τα CD45RO⁺CD25^{hi}FOXP3⁺ Tregs, τα οποία τείνουν να αποπίπτουν

μετά από *in vitro* ενεργοποίηση. Αφού ενεργοποιηθούν τα nTregs πολλαπλασιάζονται, αυξάνουν την έκφραση του Foxp3 και μετατρέπονται σε CD45RO⁺CD25^{hi}FOXP3^{hi} Tregs.

Τα δραστικά ή ενεργοποιημένα CD45RO⁺CD45RA⁻FOXP3^{hi} Tregs (effTregs) όπως προαναφέρθηκε προέρχονται κυρίως από CD45RA⁺FOXP3^{lo} nTregs και εμφανίζουν αυξημένη έκφραση δεικτών που χαρακτηρίζουν τα προσφάτως ενεργοποιημένα T κύτταρα, όπως CD25, GITR, CD95 και CTLA4. Τα κύτταρα αυτά έχουν υψηλή ικανότητα πολλαπλασιασμού, όπως τεκμηριώνεται από την έκφραση του Ki67 και την κλωνική έκπτυξη των T κυττάρων που εκφράζουν συγκεκριμένους TCRs. Επιπλέον σε αντίθεση με τα nTregs τα οποία είναι σε κατάσταση ανάπαυσης, τα CD45RO⁺FOXP3^{hi} T κύτταρα αποτελούν μία ενεργοποιημένη και λειτουργικά διαφοροποιημένη υποομάδα των Tregs, παρόλο που απαιτείται περαιτέρω διέγερση μέσω του υποδοχέα τους TCR για να ασκήσουν την κατασταλτική τους δράση. Χαρακτηριστικό των effTregs είναι η έκφραση CD45RO, ενός δείκτη των συμβατικών T κυττάρων μνήμης. Ωστόσο δεν υπάρχουν ενδείξεις για απαντήσεις μνήμης από τα Tregs, ενώ υπόκεινται σε ταχεία ανανέωση, κάτι το οποίο δεν αποτελεί ικανότητα των μακράς επιβίωσης T κυττάρων μνήμης. Ένας άλλος δείκτης που εκφράζεται από το ένα τρίτο των effTregs στο περιφερικό αίμα είναι το HLA-DR, ο οποίος είναι ενδεικτικός της τελικής διαφοροποίησης υποπληθυσμού των effTregs. Η κινητική της έκφρασης του HLA-DR από τα effTregs διαφέρει από αυτή των συμβατικών CD4⁺ T κυττάρων. Τα συμβατικά T κύτταρα εκφράζουν παροδικά HLA-DR μετά την ενεργοποίησή τους, ενώ τα effTregs διατηρούν σταθερή την έκφραση του HLA-DR μετά την ενεργοποίησή τους. [74]

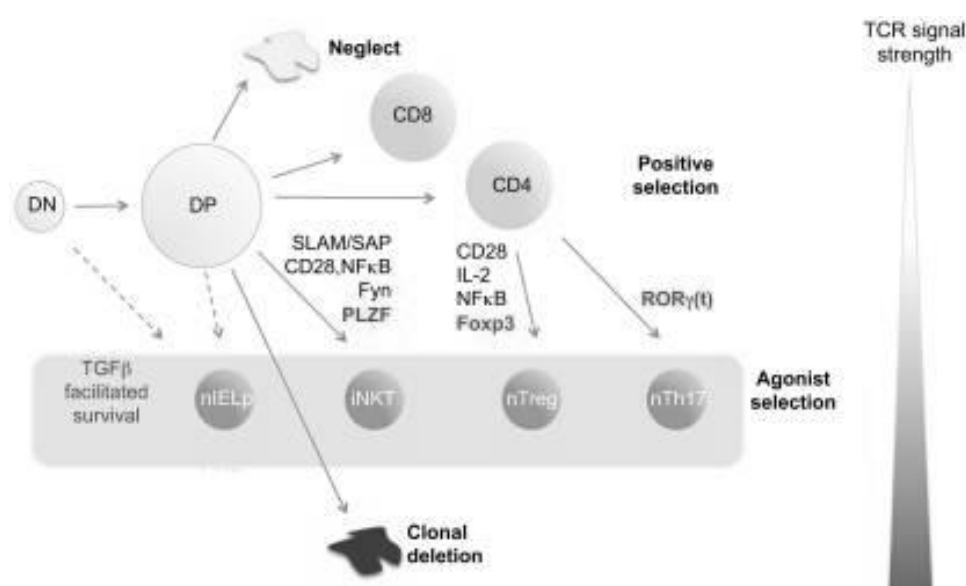


Εικόνα 25. Διαφοροποίηση των Tregs. Τροποποιημένη εικόνα από Shimon Sakaguchi et al. (74)

Η αποτελεσματική παραγωγή T ρυθμιστικών κυττάρων στο θύμο απαιτεί τη συνδιέγερση από το μόριο CD28. Το CD28 είναι το κύριο συνδιεγερτικό μόριο των T κυττάρων, και οι συνδέτες του, B7-1 (CD80) και B7-2 (CD86), εκφράζονται κυρίως στα B κύτταρα, στα δενδριτικά κύτταρα και στα επιθηλιακά κύτταρα της μυελικής μοίρας του θύμου, παρόλο που και άλλα κύτταρα μπορεί να εμφανίζουν χαμηλή έκφραση του B7. Οι Tai et al έδειξαν ότι η in vitro συνδιέγερση των CD4⁺CD8⁺ διπλά θετικών (DP) θυμοκυττάρων, που έχουν ήδη λάβει σηματοδότηση από τον TCR, με CD28 επάγει την έκφραση του Foxp3 και αυξάνει την έκφραση των GITR και CTLA-4 στα επιζήσαντα DP θυμοκύτταρα κατά τη διάρκεια της διαφοροποίησής τους σε CD4⁺CD8⁻ κύτταρα. Αυτά τα Foxp3⁺GITR⁺CTLA-4⁺ θυμοκύτταρα είναι ανώριμα Tregs, επειδή δεν εκφράζουν ακόμα το CD25 μόριο και δεν έχουν ακόμα κατασταλτική δράση. Έδειξαν επίσης ότι τα συνδιεγερτικά σήματα που μεταδίδονται από το συνδεδεμένο στην τυροσινική κινάση Lck μοτίβο στην κυτταροπλασματική περιοχή του CD28, εισάγουν τη διαφοροποίηση των Tregs στα αναπτυσσόμενα θυμοκύτταρα, εξηγώντας την εξάρτηση της δημιουργίας των Tregs από τη συνδιέγερση από το μόριο CD28. Επίσης τόσο η in vivo παραγωγή των Tregs, όσο και η παραγωγή IL-2 απαιτεί ένα πανομοιότυπο σηματοδοτικό μοτίβο στην κυτταροπλασματική περιοχή του CD28. Τα συνδιεγερτικά σήματα μεταδίδονται στα

αναπτυσσόμενα θυμοκύτταρα, όπως και *in vitro*, μέσω του CD28, επάγουν την έκφραση του Foxp3 και εισάγουν τη διαφοροποίηση σε Tregs. [75]

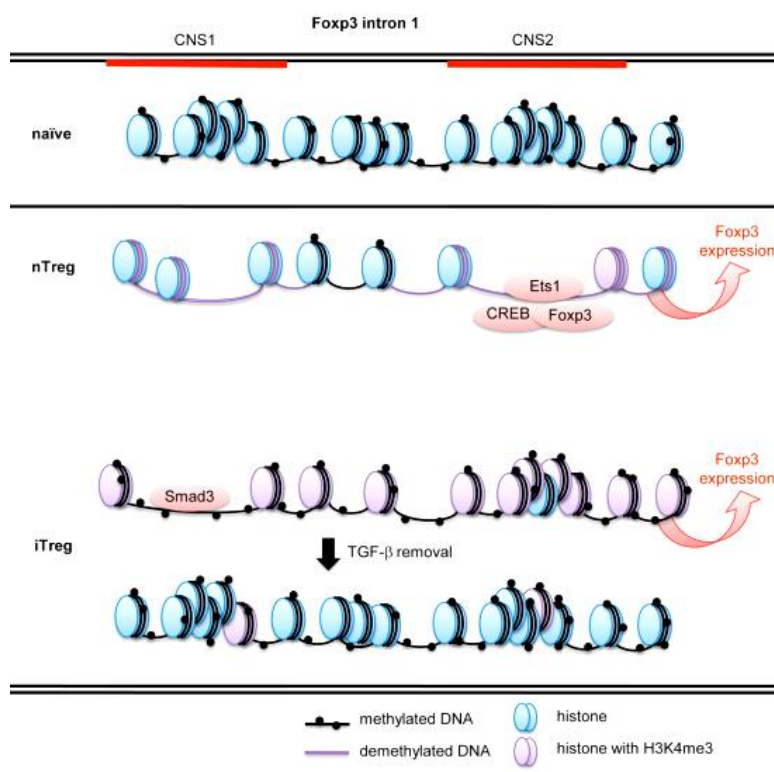
Ο υποδοχέας των T κυττάρων (TCR) σε συνεργασία με το CD28 μόριο επάγουν πολλαπλά ενδοκυττάρια σήματα που οδηγούν στην παραγωγή μεταγραφικών παραγόντων, συμπεριλαμβανομένου του NF-κB. Η c-Rel υποομάδα του NF-κB έχει περιγραφεί ότι συνδέεται με τον εκκινητή του γονιδίου Foxp3 και επάγει την παραγωγή Foxp3 και τη διαφοροποίηση του T κυττάρου σε T ρυθμιστικό κύτταρο. [76]



Εικόνα 26. Μοντέλο επιλογής σύμφωνα με την συγγένεια στον TCR στο θύμο. Τροποποιημένη εικόνα από Stritesky et al. (21)

Η διαδικασία παραγωγής των Tregs από το θύμο περιλαμβάνει όχι μόνο σχετικά ισχυρή διέγερση του υποδοχέα TCR που επάγει την έκφραση Foxp3, αλλά και επιγενετική τροποποίηση με υπομεθυλίωση του DNA στην ειδική περιοχή των Tregs (TSDR- Treg- specific demethylated region). Τα αναπτυσσόμενα T κύτταρα που εκφράζουν Foxp3 και έχουν υποστεί επιγενετική τροποποίηση, οδηγούνται σε μία σταθερή κυτταρική σειρά nTregs. Αντιθέτως τα Foxp3+ T κύτταρα που δεν υπόκεινται σε επιγενετική τροποποίηση, είναι ασταθή και μπορούν να χάσουν την έκφραση του Foxp3 στην περιφέρεια. Τα παρθένα T κύτταρα μπορούν να γίνουν T βοηθητικά κύτταρα, όπως Th1, Th2, Th17 και Tfh (follicular B helper T cells) κύτταρα, έπειτα από έκθεση σε αντιγόνα ή να γίνουν Foxp3+ επαγόμενα Tregs (iTregs)

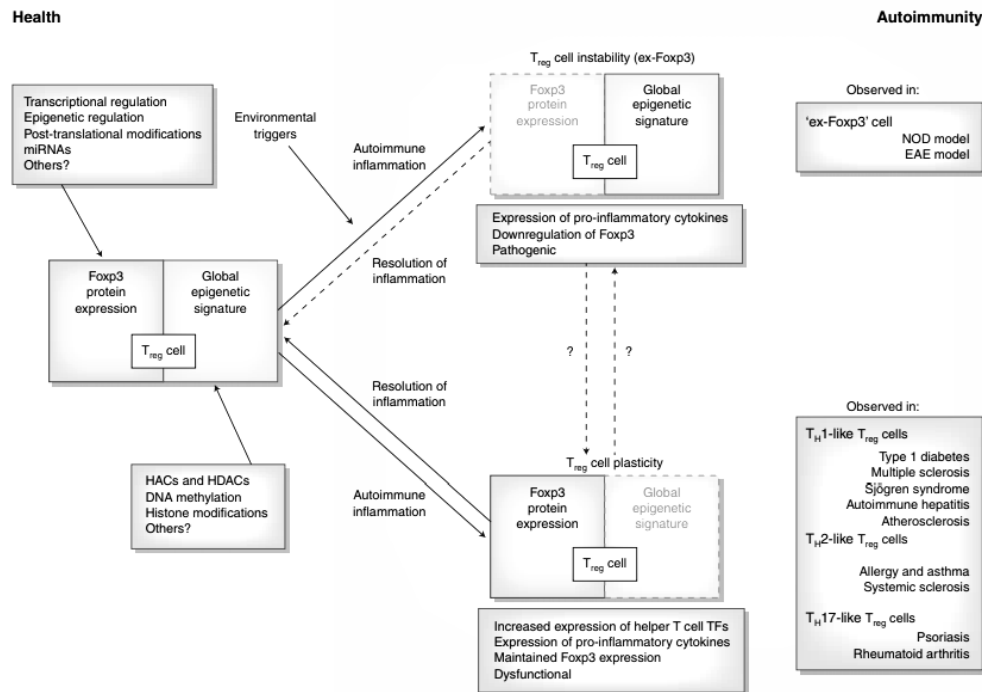
παρουσία TGF- β και ιντερλευκίνης 2 (IL-2) στην περιφέρεια. Τα iTregs είναι ασταθή και εύκολα χάνουν την έκφραση του Foxp3. Σε συνθήκες λεμφοπενίας καθώς και σε φλεγμονώδη νοσήματα, τα Foxp3+ nTregs μπορούν επίσης να χάσουν την έκφραση του Foxp3 και να αρχίσουν να παράγουν IL-2 και ιντερφερόνη- γ (IFN- γ). Αυτά τα T κύτταρα, τα οποία ονομάζονται exFoxp3 κύτταρα λόγω της προηγούμενης έκφρασης Foxp3, αναπτύσσουν φαινότυπο δραστικού / μνήμης κυττάρου, παράγουν κυτοκίνες και ενέχονται στην ανάπτυξη της αυτοανοσίας.[77]



Εικόνα 27. Οι επιγενετικές τροποποιήσεις καθορίζουν τον τύπο των Tregs. Τροποποιημένη εικόνα από Ohkura N et al. (168)

Ωστόσο η έκφραση του Foxp3 έχει φανεί να είναι σχετικά σταθερή και τα προαναφερθέντα ασταθή Foxp3 θετικά κύτταρα αποτελούν τη μειοψηφία των T κυττάρων. Αυτό οφείλεται σε ύπαρξη μηχανισμών που προλαμβάνουν την απώλεια του Foxp3. Εκτός από την υπομεθυλίωση του DNA στην TSDR, που αναφέρθηκε ήδη, η οδός μεταγωγής σήματος του NF- κ B διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη σταθερότητα των Tregs συμβάλλοντας στη μεταγραφή του Foxp3. Συγκεκριμένα ο TRAF6 παράγοντας (Tumor necrosis factor receptor (TNFR)-associated factor 6), ο οποίος μετáγει σηματοδότηση από πολλά μέλη της υπερικογένειας του υποδοχέα του TNF (TNFR) και ενεργοποιεί το μεταγραφικό παράγοντα NF- κ B, είναι απαραίτητος για τη διατήρηση των Tregs και την καταστολή της παραγωγής IL-4 από αυτά. Αυτό περιγράφηκε το 2013 από το Muto και τους συνεργάτες του, οι οποίοι παρατήρησαν ταχεία μετατροπή των Foxp3+ Tregs σε Foxp3- exFoxp3 κύτταρα σε

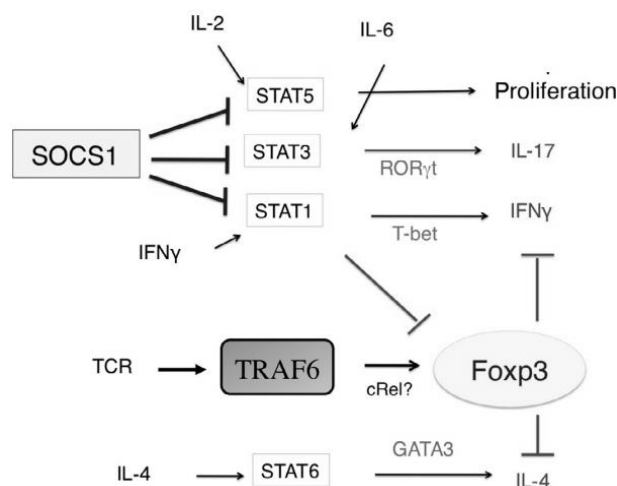
ποντίκια με ανεπάρκεια του TRAF6. Επίσης παρατήρησαν ότι η απώλεια της έκφρασης του Foxp3 στα nTregs προκάλεσε αυτοάνοσο νόσημα στα ανωτέρω ποντίκια λόγω μειωμένου αριθμού Tregs που εκφράζουν Foxp3. [78]



Εικόνα 28. Δράση των Tregs σε υγιείς και στην αυτοανοσία. Δύο βασικοί παράγοντες ελέγχουν τη δράση αυτή: η έκφραση του Foxp3 και οι επιγενετικές τροποποιήσεις. Τροποποιημένη εικόνα από Dominguez-Villar M et al. (116)

Μία ακόμη σηματοδοτική οδός που διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη διατήρηση των nTregs είναι αυτή των φλεγμονωδών κυττοκινών, συμπεριλαμβανομένης της ιντερλευκίνης 6 (IL-6) και της ιντερφερόνης-γ (IFN -γ). Ο παράγων Socs1 (suppressor of cytokine signaling 1), ο οποίος αποτελεί αρνητικό ρυθμιστή της σηματοδότησης των κυττοκινών, είναι απαραίτητος για την κατασταλτική λειτουργία των Tregs in vivo. Οι Takahashi et al έδειξαν το 2011 αυξημένη παραγωγή IFN-γ και ταχεία απώλεια του Foxp3 σε ποντίκια που δεν εξέφραζαν Socs1 στα T κύτταρά τους. Τα *Socs1*^{-/-} Tregs εμφάνισαν αυξημένη ενεργοποίηση των οδών STAT1 και STAT3. Ωστόσο η έκφραση του Foxp3 ήταν σταθερή και η ενεργοποίηση του STAT1 ήταν σε φυσιολογικά επίπεδα σε ποντίκια με ανεπάρκεια αμφοτέρων των IFN -γ και Socs1 (*Ifng*^{-/-} *Socs1*^{-/-} Tregs). Αντίστοιχα σταθερή ήταν η έκφραση του Foxp3 στα ανωτέρω ποντίκια (*Ifng*^{-/-} *Socs1*^{-/-}) ακόμα και σε υπερενεργοποίηση του STAT3. Αυτό καταδεικνύει ότι η οδός IFN-γ-STAT1 αυξάνει τον επαναπρογραμματισμό των

Tregs με ανεπάρκεια SOCS1 σε T δραστικά κύτταρα. Ο SOCS1 συνεπώς διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην ακεραιότητα και τη λειτουργία των Tregs διατηρώντας την έκφραση του Foxp3 και καταστέλλοντας την καθοδηγούμενη από STAT1 και STAT3 παραγωγή IFN- γ και IL-17 αντίστοιχα. [79]



Εικόνα 29. Ο ρόλος του SOCS1 και του TRAF6 στη έκφραση του Foxp3. Τροποποιημένη εικόνα από Okada M et al. (77)

Το 2013 ο van Loosdregt και οι συνεργάτες του έδειξαν ότι η έκφραση του Foxp3 μπορεί να ρυθμιστεί μέσω πολυουμπικιτίνωσης (polyubiquitination) των πολλαπλών καταλοίπων λυσίνης, οδηγώντας σε μεσολαβούμενη από το πρωτεάσωμα αποδόμηση. Η έκφραση της αποουμπικιτινάσης (deubiquitinase - DUB) USP7 βρέθηκε να αυξάνει και να ενεργοποιείται στα Tregs, ενώ σχετίζεται με τον παράγοντα Foxp3 στον πυρήνα. Η έκτοπη έκφραση της USP7 μείωσε την πολυουμπικιτίνωση του Foxp3 και αύξησε την έκφρασή του. Αυτό καταδεικνύει ότι η USP7, ρυθμίζει τον αριθμό αλλά και τη λειτουργία των Tregs. [80]

Οι Liu et al έδειξαν ότι η σηματοδότηση μέσω του TGF- β ήταν καθοριστική για την ανάπτυξη των CD4+CD25+Foxp3+ Tregs στο θύμο και ότι η IL-2 ήταν η κινητήριος δύναμη για τον πολλαπλασιασμό των φυσικών CD4+CD25+Foxp3+ θυμοκυττάρων που παρήχθησαν απουσία σηματοδότησης από τον TGF- β . Χρησιμοποίησαν ποντίκια με ανεπάρκεια TGF- β και παρατήρησαν μειωμένη επαγωγή Foxp3+ T κυττάρων από θυμοκύτταρα 3-5 ημέρες μετά τη γέννησή τους. Ωστόσο παρατήρησαν ότι τα ίδια ποντίκια πριν την έναρξη κάποιας φλεγμονώδους διαδικασίας είχαν σχετικά φυσιολογικό αριθμό CD4+CD25+ θυμοκυττάρων. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι τα CD4+ θυμοκύτταρα ενεργοποιούνται με επιταχυνόμενο τρόπο απουσία σηματοδότησης από τον TGF- β και συνεπώς παράγουν περισσότερη IL-2 και εκφράζουν υψηλότερα επίπεδα CD25. Η αυξημένη IL-2 οδηγεί σε επιτάχυνση της επέκτασης των λιγοστών CD4+CD25+Foxp3+ θυμοκυττάρων. Επιπροσθέτως,

μικρός αριθμός περιφερικών CD4+Foxp3+ Tregs επανεισέρχεται στο θύμο για να συμβάλει στη δεξαμενή των Foxp3+ κυττάρων σε ποντίκια με έλλειψη TGF-β και φλεγμονή. [81]

Ο TGF-β επάγει την παραγωγή του μεταγραφικού παράγοντα Foxp3, ο οποίος με τη σειρά του καταστέλλει την έκκριση προφλεγμονωδών κυττοκινών, συμπεριλαμβανομένων των IL-2, IFN-γ, IL-4 και IL-17, ενώ επάγει την έκφραση αντιφλεγμονωδών κυττοκινών, όπως η IL-10 και ο TGF-β, και αυξάνει την παραγωγή του καταστολέα CTLA4. Επίσης ο TGF-β επάγει τη διαφοροποίηση των παρθένων T κυττάρων σε Foxp3⁺ T ρυθμιστικά κύτταρα στην περιφέρεια [induced T regulatory cells (iTregs)] και εμπλέκεται στη διατήρηση της έκφρασης του Foxp3 στα θυμικής προέλευσης nTregs. Σε ποντίκια με έλλειψη του TGF-β1, ανεδείχθη φυσιολογική ανάπτυξη των nTregs στο θύμο ενώ τα περιφερικά Tregs ήταν σημαντικά μειωμένα σε αριθμό. Αντιστοίχως όταν προκλήθηκε διέγερση παρθένων T κυττάρων με δενδριτικά κύτταρα (DCs) παρουσία TGF-β, παρήχθησαν ειδικά για το αντιγόνο Foxp3+ iTregs. Η επέκταση αυτή των nTregs παρουσία δενδριτικών κυττάρων (DCs) ή TGF-β οφείλεται σε επιλεκτική αύξηση των δραστικών κατασταλτικών T κυττάρων. Συνεπώς η συμβολή του ενδογενούς TGF-β κατά τη διάρκεια της αλληλεπίδρασης των T κυττάρων με τα δενδριτικά κύτταρα είναι στη διατήρηση της ισορροπίας ανάμεσα στα δραστικά T κύτταρα και στα ρυθμιστικά T κύτταρα (Tregs). [22]

Επιπροσθέτως, τα iTregs και τα nTregs έχει περιγραφεί ότι αποτελούν γενετικά διακριτούς πληθυσμούς. Τα iTregs προάγουν την παραγωγή της ιντερλευκίνης 10 (IL-10), ενώ τα nTregs εμφανίζουν αυξημένη παραγωγή του ενζύμου Granzyme B. Αυτό είναι ενδεικτικό διαφορετικού μηχανισμού κατασταλτικής δράσης από τα ανωτέρω κύτταρα. [77]

Τα CD4+CD25+ Tregs αρχικά αναγνωρίστηκαν στο λεμφικό ιστό, συμπεριλαμβανομένου του θύμου, του σπληνός και των λεμφαδένων, καθώς και στο περιφερικό αίμα σε ποσοστό της τάξης του 5–10% του συνόλου των CD4+ T κυττάρων όπως προαναφέρθηκε.[60] Κάτω από σταθερές συνθήκες τα CD4+CD25+FOXP3+ Tregs κατανέμονται εξίσου στις T περιοχές του λεμφικού ιστού στον άνθρωπο, ενώ σπάνια ανιχνεύονται στα οζίδια των B κυττάρων. Ωστόσο έχει περιγραφεί ότι αυτή η τάση αλλάζει σε περίπτωση ενεργοποίησής τους, όπου επιτρέπεται η μετανάστευση στο βλαστικό κέντρο και η καταστολή της παραγωγής αντισωμάτων. [82]

Τα T ρυθμιστικά κύτταρα λειτουργούν ελέγχοντας και ισορροπώντας ανάμεσα στην αυτοανοσία και στην αυτοανοχή. Μπορούν να καταστείλουν τη λειτουργία των

CD4+CD25- T κυττάρων, CD8+ T κυττάρων, δένδριτικών κυττάρων, κυττάρων φυσικοί φονείς, φυσικοί φονείς T κυττάρων και B κυττάρων. [66] Επίσης καταστέλλουν τη λειτουργία των T δραστικών κυττάρων άμεσα μέσω μεταφοράς του κατασταλτικού κυκλικού AMP στα ανωτέρω μέσω των κενών σύνδεσης της μεμβράνης. [83] Ο Mahajan και οι συνεργάτες του, έδειξαν ότι η κατασταλτική δράση των CD4+CD25+ Tregs στα μακροφάγα εξαρτάται από την παρουσία του ενδογενούς παράγοντα TGF-β. Παρουσία του, τα Tregs καταστέλλουν την ενεργοποίηση των μακροφάγων, οδηγώντας σε μείωση της παραγωγής και έκφρασης προφλεγμονωδών κυτταροκινών όπως TNF-α, IL-12, CCL3 και INOS από τα μακροφάγα. Αυτή η ικανότητα των Tregs να επηρεάζουν την ανοσολογική απάντηση επισημάνθηκε με περαιτέρω μελέτες όπου ανεδείχθη η ικανότητα των CD4+CD25+ Tregs να προστατεύουν από βλάβη εξαρτώμενη από μακροφάγα. [84]. Οι Hoves et al καλλιέργησαν παρθένα T κύτταρα παρουσία μακροφάγων προερχόμενων από περιφερικά μονοκύτταρα και παρατήρησαν διαφοροποίηση των T κυττάρων σε CD4+ T1 ρυθμιστικά κύτταρα που εκκρίνουν IL-10, χωρίς ωστόσο να αναδειχθεί συσχέτιση αυτών με τα CD4+CD25+ Tregs που φυσιολογικά κυκλοφορούν στην περιφέρεια σαν ένας υπότυπος των CD4+ T κυττάρων. [85]

4.1 ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ ΔΡΑΣΗΣ Τ ΡΥΘΜΙΣΤΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

Τα T ρυθμιστικά λεμφοκύτταρα είναι απαραίτητα για τη διατήρηση της περιφερικής ανοχής, την πρόληψη των αυτοάνοσων νοσημάτων και τον περιορισμό των χρόνιων φλεγμονωδών νοσημάτων. Για να δράσουν τα Tregs απαιτείται αρχικά ενεργοποίησή τους, είτε μέσω σύνδεσης ειδικού αντιγόνου στον υποδοχέα του T κυττάρου (T-cell receptor (TCR)) είτε μέσω πολυκλωνικών ερεθισμάτων. Όταν ενεργοποιηθούν τα Tregs είναι ικανά να ασκήσουν την κατασταλτική τους δράση ανεξάρτητα από την ειδικότητα του αντιγόνου. Τα περιφερικά Tregs (pTregs) είναι καλά διαφοροποιημένα και συνεπώς ικανά να καταστείλουν ειδικά αντιγόνα. Αντιθέτως, τα παρθένα Tregs που δεν έχουν συναντήσει αντιγόνο, είναι ικανά να ασκήσουν κατασταλτική δράση, αφού έλθουν σε επαφή με αντιγόνα. [86] Οι βασικοί μηχανισμοί λειτουργίας των T ρυθμιστικών λεμφοκυττάρων μπορούν να ενταχθούν σε τέσσερα βασικά μοντέλα δράσης: καταστολή μέσω κατασταλτικών κυτταροκινών, καταστολή μέσω κυτταρόλυσης, καταστολή του μεταβολικού μηχανισμού των T δραστικών κυττάρων και καταστολή μέσω τροποποίησης της ωρίμανσης ή της λειτουργίας των δένδριτικών κυττάρων. [87]

Key molecule(s)	Function
<i>Mechanisms of contact-dependent suppression</i>	
CTLA4	Downregulation of APC co-stimulatory function Interaction with CD80 and CD86 on conventional T cells
CD73–CD39	Hydrolysis of inflammatory extracellular ATP
LAG3	Induction of inhibitory signalling through MHC class II molecules
Granzyme B (mouse) and granzyme A (human)	Lysis of conventional T cells
CD95–CD95 ligand	Induction of apoptosis in conventional T cells
<i>Mechanisms of cytokine-mediated suppression</i>	
TGFβ and LAP	Induction of FOXP3 in conventional T cells
IL-10	Attenuation of DC function Conversion of conventional T cells to T _R 1 cells
Galectin 1	Cell cycle arrest and apoptosis in conventional T cells
CD25	Adsorption of IL-2
IL-35	Induction of conventional T cell expression of IL-35 by T _{Reg} cells enhances suppression (IL-35 is not expressed by human T _{Reg} cells)

Πίνακας 8. Οι κατασταλτικοί μηχανισμοί των Tregs. Τροποποιημένος πίνακας από Shimon Sakaguchi et al. (74)

Οι κύριες κατασταλτικές κυτταροκίνες οι οποίες εκφράζονται από τα Tregs και έχουν την ικανότητα να επάγουν τη δημιουργία πληθυσμών Tregs (επαγόμενα Tregs) είναι η ιντερλευκίνη 10 (IL-10) και ο TGFβ.[88] Η IL-10 μειώνει την αντιγονοπαρουσιαστική ικανότητα των δενδριτικών κυττάρων μειώνοντας τα συν-διεγερτικά μόρια και τα μόρια του MHC τάξης II. Ο TGFβ προκαλεί αρνητική ρύθμιση των μορίων του MHC II και αποτρέπει την αύξηση των συνδιεγερτικών μορίων στα δενδριτικά κύτταρα. [64] Εσχάτως μία νέα κατασταλτική κυτταροκίνη, η IL-35, περιγράφηκε ότι εκφράζεται στα Tregs και είναι απαραίτητη για τη μέγιστη κατασταλτική δραστηριότητα αυτών. [89] Παρόλο που όλες οι προαναφερθείσες κυτταροκίνες είναι κατασταλτικές, ο βαθμός στον οποίο χρησιμοποιούνται σε διαφορετικές νοσολογικές οντότητες και μηχανισμούς ομοιόστασης, διαφέρει, δείχνοντας μη αλληλεπικαλυπτόμενη δράση αυτών.

Η κυτταρόλυση διενεργείται μέσω έκκρισης ενζύμων, τα οποία έως πρότινος αναγνωρίζονταν στα κύτταρα φυσικοί φονείς (NK cells) και στα CD8+ κυτταροτοξικά T λεμφοκύτταρα (CTLs). Τα ένζυμα που εκφράζονται και επάγουν την κυτταρόλυση είναι οι πρωτεάσες (granzyme A και B) [90] και η περφορίνη. [91]. Ένας άλλος πιθανός μηχανισμός κυτταρόλυσης είναι μέσω της οδού TRAIL-DR5 (tumour-necrosis factor-related apoptosis inducing ligand–death receptor 5), όπου τα

ενεργοποιημένα Tregs επάγουν την απόπτωση των T δραστικών κυττάρων (T effector cells).[92].

Η Nikolova M. και οι συνεργάτες της το 2009 περιέγραψαν το μηχανισμό με τον οποίο τα Tregs καταστέλλουν τα CD8⁺ T δραστικά κύτταρα. Συγκεκριμένα τα Tregs καταστέλλουν τον πολλαπλασιασμό και τη δραστικότητα των CD8⁺ T κυττάρων έπειτα από πολυκλωνική και ειδική για το αντιγόνο διεγερτική σηματοδότηση. Επίσης επηρεάζουν την ομοιοστάση των CD8⁺ T κυττάρων μέσω καταστολής των δραστικών CD8⁺ T κυττάρων αλλά όχι των CD8⁺ T κυττάρων μνήμης. Ο διαχωρισμός του τύπου των CD8⁺ T κυττάρων στους υποτύπους τους γίνεται βάσει των υποδοχέων που εκφράζουν. Τα παρθένα CD8⁺ T κύτταρα συνεκφράζουν CD45RA, CD28 και CD27 συν-διεγερτικούς υποδοχείς, και CCR7 υποδοχέα χημειοκινών, ενώ τα CD8⁺ T κύτταρα που έχουν συναντήσει αντιγόνο, σταδιακά χάνουν την έκφραση του CD45RA και του CD28. Τα κυκλοφορούντα μακράς επιβίωσης κύτταρα μνήμης εκφράζουν CCR7, ενώ τα πιο διαφοροποιημένα δραστικά- μνήμης κύτταρα χάνουν την έκφραση του CCR7. Η μη αναστρέψιμη απώλεια του CD27 καταδεικνύει μειωμένη ικανότητα πολλαπλασιασμού, αυξημένη κυτταροτοξικότητα και οριστική μετάβαση στο στάδιο του δραστικού κυττάρου. Αντιστοίχως, η επανέκφραση του CD45RA ορίζει ένα στάδιο υψηλής κυτταροτοξικότητας και ικανότητας να προκαλεί απόπτωση. Τα Tregs καταστέλλουν τον πολλαπλασιασμό των CD8⁺ T δραστικών κυττάρων (CD27⁻CD45RA⁺) αλλά όχι των T κυττάρων μνήμης (CD27⁺CD45RA⁻). Καταστέλλουν επίσης τη διαφοροποίηση των T κυττάρων μνήμης σε T δραστικά κύτταρα, καθώς και την απόπτωση των CD27⁺ CD8 T κυττάρων, μειώνοντας την έκφραση του συνδέτη του PD-1 (PD-L1 - Programmed death-ligand 1). Συνεπώς τα Tregs διατηρούν την ισορροπία μεταξύ των CD8⁺T δραστικών κυττάρων και κυττάρων μνήμης και προάγουν τη συσσώρευση των μακράς επιβίωσης κυττάρων μνήμης. Αυτό επιτελείται σε μεγάλο βαθμό από την αλληλεπίδραση του PD-1 με τον συνδέτη του, PD-L1. [93] Το 2012 ο Jian Ye και οι συνεργάτες του έδειξαν ότι τα Tregs επάγουν το γήρας των T κυττάρων μέσω σημαντικής μείωσης της έκφρασης των συνδιεγερτικών μορίων CD27 και CD28, καταδεικνύοντας τη δυσλειτουργία τους. Τα γηρασμένα T κύτταρα μπορούσαν να ενισχύσουν την ανοσοκατασταλτική δράση των Tregs έμμεσα. Η δράση αυτή στον άνθρωπο επικεντρώνεται στην καταστολή του πολλαπλασιασμού των παρθένων και δραστικών T κυττάρων και στην άμεση επαγωγή του γήρατος στα T κύτταρα που αποκρίνονται στη δράση αυτή. [94]

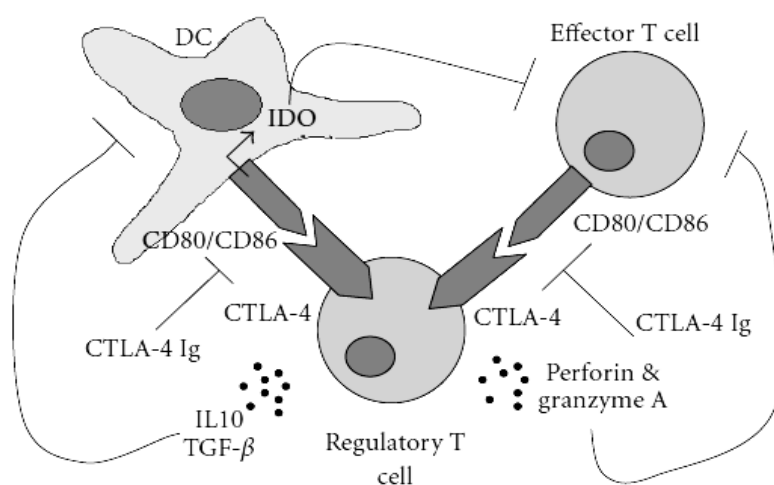
Η καταστολή μέσω διαταραχής του μεταβολικού μηχανισμού των T δραστικών κυττάρων που προκαλείται από τα Tregs επέρχεται μέσω δύο γνωστών μηχανισμών.

Ο πρώτος περιλαμβάνει επαγωγή από τα Tregs της απόπτωσης των δραστικών Τ λεμφοκυττάρων μέσω στέρησης κυτταροκινών (κυρίως ιντερλευκίνης 2) [95], ενώ ο δεύτερος σχετίζεται με την επαγωγή από τα Tregs της απελευθέρωσης νουκλεοτιδίων αδενοσίνης ενδοκυττάρια ή εξοκυττάρια. Η σύγχρονη έκφραση των CD39 και CD73 φαίνεται να δίνει γένεση στην περικυτταρική αδενοσίνη, η οποία καταστέλλει τα δραστικά Τ λεμφοκύτταρα μέσω ενεργοποίησης του υποδοχέα της αδενοσίνης A2A [96, 97, 98] Τα Tregs μπορούν επίσης να καταστείλουν τον πολλαπλασιασμό των δραστικών Τ κυττάρων μέσω άμεσης επαφής μεταξύ των δύο ειδών κυττάρων (κατασταλτικών και δραστικών), μεσολαβούμενης από την έκφραση επιφανειακών δεικτών από τα Tregs και κυρίως των GITR και CTLA-4. Επιπροσθέτως, η σύνδεση του CD80/CD86 στα δραστικά κύτταρα μπορεί να διαβιβάζει κατασταλτική σηματοδότηση έπειτα από σύνδεση με τον CTLA-4 επιφανειακό δείκτη στα κατασταλτικά κύτταρα, προκαλώντας καταστολή της λειτουργίας των Τ δραστικών κυττάρων. [64]

Τύπος κυττάρου	Φαινότυπος	Μηχανισμός ανοσοκατασταλτικής δράσης
CD4+ ρυθμιστικά Τ κύτταρα		
• tTregs	CD4+CD25+FOXP3+	Διακυτταρική επαφή-εξαρτημένη in vitro από CTLA-4 και in vivo από IL-10 και TGF-β
• pTregs	CD4+CD25+FOXP3+	Διακυτταρική επαφή,
• Tr1 cells	CD4+CD25+FOXP3-IL-10hi	Μεσολαβούμενη από κυττοκίνες (παραγωγή IL-10)
• Th3 cells	CD4+CD25+FOXP3-TGF-βhi	Μεσολαβούμενη από κυττοκίνες (παραγωγή TGF-β)
• TGF-β/IL-10 double-positive CD4+ Treg	TGF-β/IL-10 double-positive CD4+CD25-FOXP3-	Μεσολαβούμενη από κυττοκίνες (IL-10) και (TGF-β)
CD8+ ρυθμιστικά Τ κύτταρα		
• Τ κατασταλτικά κύτταρα (Ts)	CD8+CD28-	Διακυτταρική επαφή-εξαρτημένη από CTLA-4
• IL-10 παραγωγά CD8 Τ κύτταρα	CD8+IL-10+	Μεσολαβούμενη από κυττοκίνες (παραγωγή IL-10)

Πίνακας 9. Φαινότυπος και πιθανός μηχανισμός κατασταλτικής δράσης ανάλογα με τον τύπο του κατασταλτικού κυττάρου. Τροποποιημένος πίνακας από Cools N et al. (64)

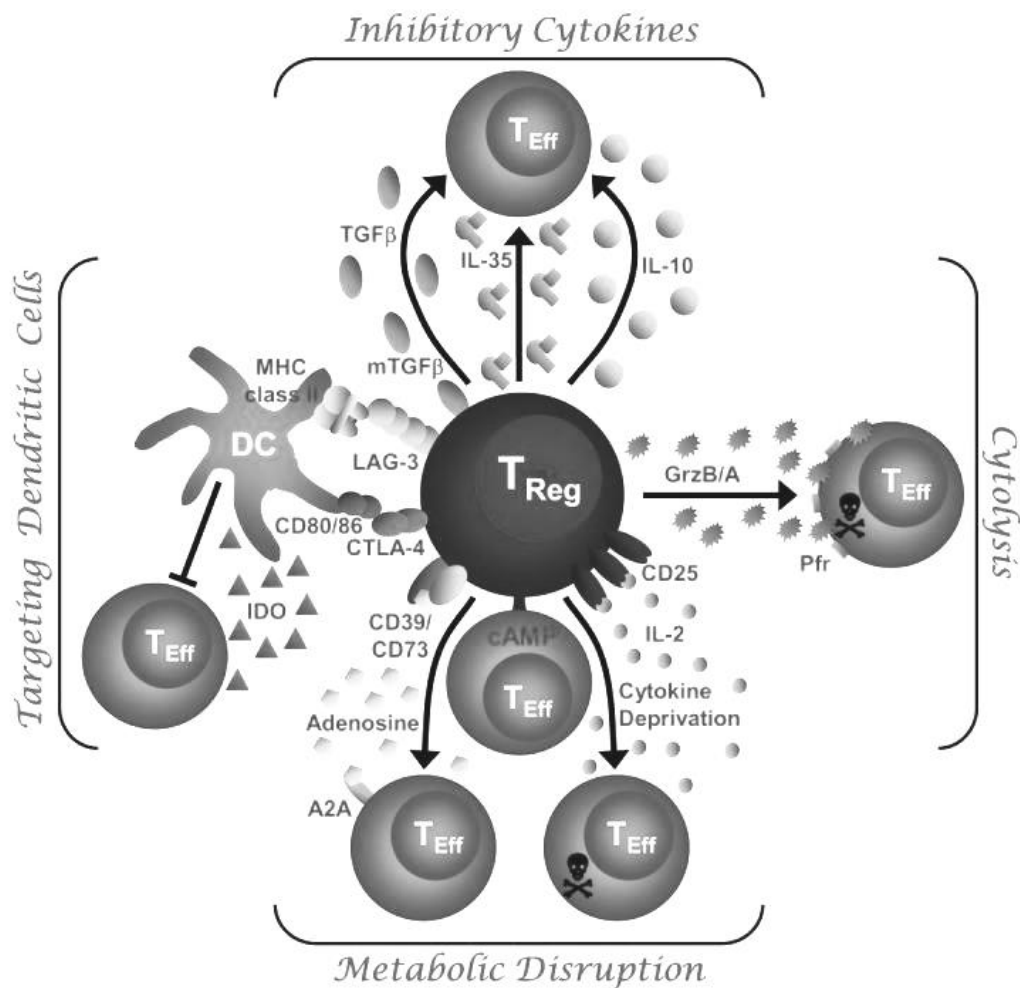
Επιπλέον της άμεσης επιρροής των Tregs στη λειτουργία των δραστικών Τ λεμφοκυττάρων (Teffs), τα Tregs ρυθμίζουν την ωρίμανση και τη λειτουργία των δενδριτικών κυττάρων, που απαιτούνται για την ενεργοποίηση των δραστικών Τ λεμφοκυττάρων.[99] Η σύνδεση του CD80/CD86 στα δενδριτικά κύτταρα με τον CTLA-4 των κατασταλτικών μορίων οδηγεί σε ενεργοποίηση και αυξημένη έκφραση της IDO (indoleamine 2,3-dioxygenase) από τα δενδριτικά κύτταρα, ενός καταβολικού ενζύμου που εμπλέκεται στην αποδόμηση της τρυπτοφάνης. Η μειωμένη συγκέντρωση τρυπτοφάνης σχετίζεται με μειωμένη ενεργοποίηση των Τ κυττάρων και οδηγεί σε καταστολή των δραστικών Τ κυττάρων. [100, 101] Ενισχυτικό του λειτουργικού ρόλου του CTLA-4 στην κατασταλτική δράση των Tregs αποτελεί η παρατήρηση ότι ο αποκλεισμός του CTLA-4 κατήργησε την κατασταλτική τους δράση. Ωστόσο ποντίκια με παντελή έλλειψη CTLA-4, φαίνεται να εκφράζουν τον μεταγραφικό παράγοντα Foxp3 και να είναι ικανά να προκαλέσουν καταστολή. Η παρατήρηση αυτή καταδεικνύει ότι το CTLA-4 δεν είναι το μόνο μόριο που απαιτείται για τη δράση των Tregs. [64]



Εικόνα 30. Μηχανισμοί καταστολής των Τ δραστικών λεμφοκυττάρων από τα Τ ρυθμιστικά λεμφοκύτταρα. Τροποποιημένη εικόνα από Cools N et al. (64)

Ένας ακόμη έμμεσος τρόπος δράσης των Tregs περιγράφηκε το 2006 από τους Venet et al και καταδεικνύει την καταστολή της επιβίωσης των μονοκυττάρων μέσω ενός προαποπτωτικού μηχανισμού που περιλαμβάνει την οδό μεταγωγής σήματος Fas/FasL. [102] Ο ανωτέρω μηχανισμός έρχεται να ενισχύσει την περιγραφή των Janssens et al ότι τα CD4+CD25+ κύτταρα αυξάνουν την έκφραση του FasL μέσω

της οποίας επάγεται η απόπτωση των αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων στόχων. [103] Σε μια δεδομένη χρονική στιγμή ο συνολικός αριθμός των Tregs ορίζεται από την ισορροπία παραγωγής και απόπτωσης των ανωτέρω. Ο κυτταρικός θάνατος που επάγεται από ενεργοποίηση μέσω της CD95/CD95L οδού (Activation-induced cell death (AICD)) έχει περιγραφεί ως ένας μηχανισμός επαγωγής της απόπτωσης. Τα παρθένα T κύτταρα είναι CD95⁻ και ως εκ τούτου ανθεκτικά στην απόπτωση μέσω AICD. Αντιθέτως τα ενεργοποιημένα T κύτταρα (CD45RO^{hi}) παρουσιάζουν αυξημένη έκφραση του CD95 και είναι ευαίσθητα στην απόπτωση. Με την επαναδιέγερση του υποδοχέα των T κυττάρων (TCR), τα ενεργοποιημένα δραστικά T κύτταρα (Teffs) αυξάνουν την έκφραση CD95L και επάγουν την AICD μέσω αλληλεπίδρασης του CD95 με τον CD95L. Με αυτό τον τρόπο η AICD περιορίζει τα T δραστικά κύτταρα (Teffs) μετά από την ανοσολογική απάντηση και συμβάλλει στη διατήρηση της ομοιόστασης των T κυττάρων. Οι Fritzsching et al ανέλυσαν την έκφραση του CD95 και την ευαισθησία στην απόπτωση των υποπληθυσμών των T ρυθμιστικών λεμφοκυττάρων και έδειξαν ότι τα παρθένα Tregs (nTregs) εκφράζουν χαμηλά επίπεδα CD95 και είναι ανθεκτικά στη μεσολαβούμενη από το CD95L απόπτωση, σε αντίθεση με τα Tregs μνήμης που είναι ευαίσθητα. Πιο συγκεκριμένα παρατήρησαν ότι ο CD95L προκαλεί απόπτωση στα ενεργοποιημένα T κύτταρα (CD45RO^{hi}), χωρίς αυτό να παρατηρείται σε υποπληθυσμό των Tregs με φαινότυπο παρθένου κυττάρου στο περιφερικό αίμα, που εκφράζει χαμηλότερα επίπεδα CD25 συγκριτικά με τα ενεργοποιημένα T κύτταρα. Έδειξαν επίσης ότι τα Tregs πριν αφήσουν το θύμο (παρθένα – naïve Tregs) εκφράζουν χαμηλότερα επίπεδα CD25 και συγκεκριμένα εμφανίζουν το φαινότυπο CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺CD45RO^{lo}CD95^{lo}, συγκριτικά με τα Tregs που ανευρίσκονται στο περιφερικό αίμα ή στα λεμφικά όργανα, και τα οποία εκφράζουν υψηλά επίπεδα CD25 (CD25^{hi}) και εμφανίζουν φαινότυπο κυττάρων μνήμης CD4⁺FOXP3⁺CD45RO^{hi}CD95^{hi}CD45RA^{lo}. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι στην περιφέρεια τα Tregs αναγνωρίζουν αυτό-αντιγόνα και ενεργοποιούνται. Η ενεργοποίηση των nTregs από αυτοαντιγόνα πυροδοτεί την κατασταλτική δράση των Tregs και ανανεώνει συνεχώς τη δεξαμενή των CD4⁺CD25^{hi} Tregs. Τα ενεργοποιημένα Tregs ωστόσο εμφανίζουν όπως προαναφέρθηκε αυξημένη έκφραση του CD95 και κατ' επέκταση αυξημένη ευαισθησία στον επαγόμενο από τον CD95L κυτταρικό θάνατο, και με αυτό τον τρόπο περιορίζεται ο αριθμός των ειδικών για αντιγόνα Tregs.[104]

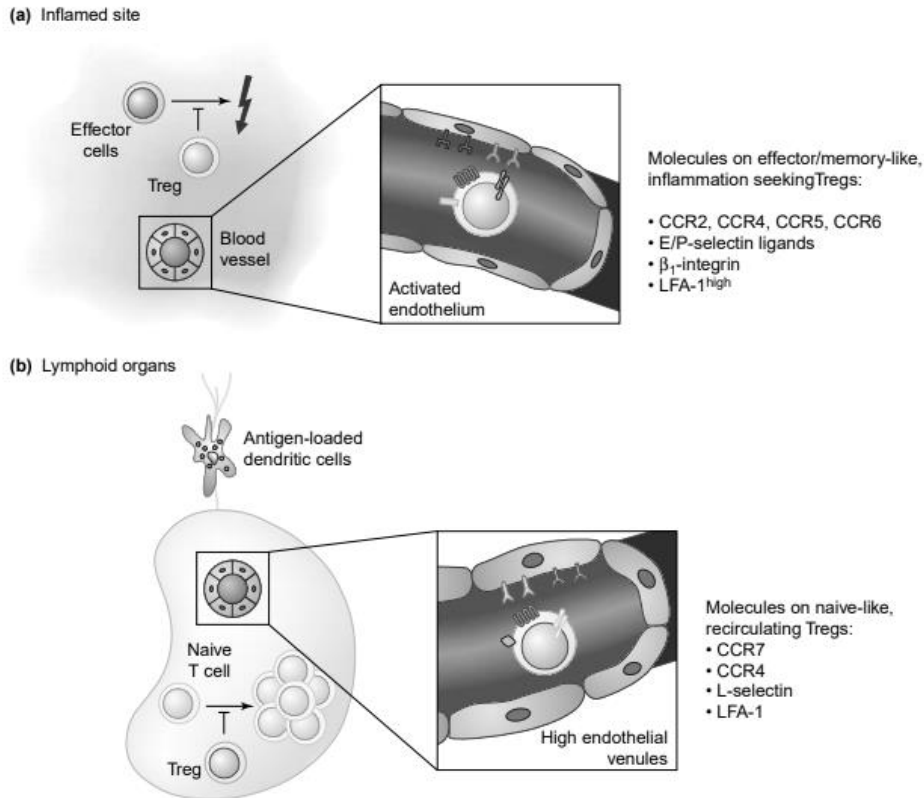


Εικόνα 31. Βασικοί μηχανισμοί λειτουργίας των T ρυθμιστικών λεμφοκυττάρων. Τροποποιημένη εικόνα από Dario Vignali et al. (87)

Τα Tregs είναι απαραίτητα για τη διατήρηση της περιφερικής ανοχής, την πρόληψη αυτοάνοσων νοσημάτων και τον περιορισμό των χρόνιων φλεγμονωδών νόσων. Περιορίζουν ωστόσο ωφέλιμες απαντήσεις του οργανισμού, καταστέλλοντας την ανοσία και περιορίζοντας τη δραστηριότητα έναντι των όγκων. [105, 87,106] Τα καρκινικά κύτταρα είναι απαραίτητα και επαρκή για να μετατρέψουν τα δενδριτικά κύτταρα σε ρυθμιστικά κύτταρα που εκκρίνουν βιοδραστικό TGF-β και διεγείρουν τον πολλαπλασιασμό των Tregs. [107]. Η αύξηση του αριθμού των T ρυθμιστικών κυττάρων επιτρέπει την πρόοδο (καρκινικής) νόσου, επιτρέποντας στα καρκινικά κύτταρα να αποφύγουν την αναγνώριση και την καταστροφή από κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος. [66]

Για να ασκήσουν την δράση τους τα Tregs προσελκύονται από χημειοκίνες που εκκρίνονται από αντιγονοπαρουσιαστικά και T δραστικά κύτταρα και μεταναστεύουν στις κατάλληλες θέσεις. Η δεξαμενή των Tregs αποτελείται από ετερογενείς υποομάδες με έκφραση διαφορετικών υποδοχέων και διαφορετική ανταπόκριση στις

χημειοκίνες. Ενώ μια υποομάδα των Tregs φαίνεται να καταστέλλει την έναρξη ανοσιακής απάντησης εντός των λεμφικών ιστών, άλλη που έχει την ικανότητα να εισέρχεται σε φλεγμαίνοντα σημεία, έχει καθοριστικό ρόλο στο έλεγχο της ανοσιακής αντίδρασης. Η μία υποομάδα εκφράζει L-σελεκτίνη, CCR4 και CCR7 και εντοπίζεται κυρίως στα δευτερογενή λεμφικά όργανα (naive CD4+CD25+ Tregs/ nTregs) και η άλλη εκφράζει συνδέτες για E και P σελεκτίνη, CCR2, CCR4, CCR5 και CCR6 που επιτρέπουν τη μετανάστευση σε σημεία φλεγμονής (δραστικά/ μνήμης CD4+CD25+ Tregs). [65]. Αναλυτικότερα, τα περιφερικά αντιγόνα, τα οποία με τη βοήθεια των αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων μεταφέρονται από τις θέσεις φλεγμονής στους επιχώριους λεμφαδένες, οδηγούν σε επέκταση και διαφοροποίηση των παρθένων T κυττάρων. Αυτό το πρωτεύον στάδιο υπόκειται στον έλεγχο των nTregs, τα οποία εκφράζουν L-σελεκτίνη (CD62L) και CCR7. Αυτό επιτρέπει την αποτελεσματική μετανάστευση των κυκλοφορούντων Tregs στα λεμφικά όργανα μέσω ενδοθηλιακών φλεβιδίων που εκφράζουν συνδέτες για την L – σελεκτίνη και το CCR7 στην επιφάνειά τους. Ο CCR4 υποδοχέας χημειοκινών φαίνεται να διαδραματίζει ρόλο στην αλληλεπίδραση ανάμεσα στα nTregs και στα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα εντός του λεμφικού ιστού. Αντιθέτως, τα δραστικά / μνήμης Tregs εμφανίζουν έναν ειδικό για τη φλεγμονή φαινότυπο μέσω έκφρασης ποικίλων CCRs, E/P σελεκτίνης συνδετών, B1-ιντεγκρινών και υψηλά επίπεδα LFA-1. Αυτό επιτρέπει αποτελεσματική είσοδο στα σημεία φλεγμονής, μιας κ ως αναμένεται το ενεργοποιημένο ενδοθήλιο εκφράζει υψηλά επίπεδα E-σελεκτίνης, P-σελεκτίνης, ICAM-1 και VCAM-1 και παρουσιάζει φλεγμονώδεις χημειοκίνες στην επιφάνειά του. Έτσι τα ειδικά για τη φλεγμονή Tregs προορίζονται για τον έλεγχο της φλεγμονώδους δράσης των δραστικών κυττάρων στην περιφέρεια. [Εικόνα 32]. Αυτές οι διακριτές δράσεις ανάμεσα στις διάφορες υποομάδες των Tregs συνιστούν ένα ισχυρό σύστημα όπου υπάρχει μία γραμμή άμυνας που προλαμβάνει την ανάπτυξη αυτοανοσίας και μία δεύτερη γραμμή που ενεργοποιείται σε περίπτωση που η ανοσιακή απάντηση γίνει ανεξέλεγκτη. [108]



Εικόνα 32. Καθορισμός της κατασταλτικής δράσης των Tregs *in vivo*, ανάλογα με την κατανομή τους. Τροποποιημένη εικόνα από Huehn J et Hamann A. (108)

4.2 ΣΗΜΑΝΤΙΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ ΤΩΝ Τ ΡΥΘΜΙΣΤΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ CD25/ CD122

Ο υποδοχέας της IL-2 αποτελείται από 3 αλυσίδες, την α (CD25), τη β (CD122) και τη γ (CD132). Όπως προαναφέρθηκε το μόριο CD25 που αποτελεί την α αλυσίδα του υποδοχέα της ιντερλευκίνης 2 αναγνωρίστηκε αρχικά το 1995 από τον Sakaguchi και τους συνεργάτες του, οι οποίοι έδειξαν ότι τα CD25⁺ T κύτταρα αποτελούν το 5-10% των περιφερικών CD4⁺ T κυττάρων καθώς και ότι η συνέκφραση των CD4 και CD25 μπορεί να καθορίσει τα λειτουργικά Tregs στο περιφερικό αίμα. Η *ex vivo* απομόνωση CD4⁺CD25⁺ T κυττάρων στον άνθρωπο μπορεί να καταστείλει *in vitro* τον πολλαπλασιασμό άλλων T κυττάρων καθώς και την παραγωγή IL2 με τρόπο εξαρτώμενο από τη διακυτταρική επαφή. Ωστόσο μόνο τα CD4⁺ T κύτταρα με τα υψηλότερα επίπεδα έκφρασης CD25 εμφανίζουν κατασταλτική δράση στον άνθρωπο, κυρίως επειδή στα CD4⁺CD25⁺ T λεμφοκύτταρα του περιφερικού αίματος εμπεριέχονται CD25⁺ ενεργοποιημένα T κύτταρα χωρίς κατασταλτική ικανότητα. [109] Τα Tregs όπως αναφέρθηκε εκφράζουν την α αλυσίδα του υποδοχέα της IL-2 σε αφθονία αλλά δεν είναι ικανά να παράγουν IL-2. Η IL-2 συνδέεται με χαμηλή

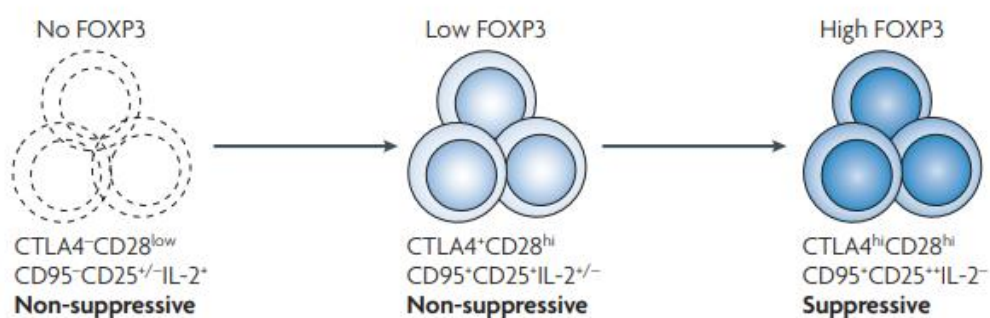
συγγένεια με την α αλυσίδα του υποδοχέα της (IL-2Rα) ή με το ετεροδιμερές της β και γ αλυσίδας (IL-2Rβ/γ), αλλά η συγγένεια ως προς τον υποδοχέα αυξάνεται ~1000 φορές όταν και οι τρεις αλυσίδες του υποδοχέα αλληλεπιδράσουν με την IL-2. Η κατανάλωση της IL-2 από τα Tregs διαδραματίζει ουσιαστικό ρόλο στην κατασταλτική δράση των Tregs, μέσω καταστολής του πολλαπλασιασμού και θανάτωσης των ενεργοποιημένων CD4+ T κυττάρων λόγω στέρησης IL-2 ενώ η σηματοδότηση μέσω του IL-2R συμβάλλει στη διατήρηση των ώριμων Tregs. [110] Επιπροσθέτως η απώλεια IL-2, IL-2Rα ή IL-2Rβ οδηγεί σε ανάπτυξη θανατηφόρου αυτοάνοσου νοσήματος, λόγω της έλλειψης λειτουργικών Tregs. [111]

FOXP3

Το γονίδιο του Foxp3 ανακαλύφθηκε το 2001, ως ένα φυλοσύνδετο γονίδιο του οποίου η μετάλλαξη προκαλεί βαριά αυτοανοσία και φλεγμονή σε ποντικούς. [112] Μεταλλάξεις στο ανθρώπινο γονίδιο του Foxp3 προκαλούσαν αυτοάνοσο νόσημα αντίστοιχο με αυτό των ποντικών, που χαρακτηρίζεται από σοβαρή αλλεργία, φλεγμονώδη νόσο του εντέρου και αυτοανοσία σε πολλαπλά ενδοκρινή όργανα. [113]

Το 2003 περιγράφηκε ότι ο παράγων Foxp3 είναι ένας μεταγραφικός παράγοντας κλειδί για την ανάπτυξη και τη λειτουργία των ρυθμιστικών T λεμφοκυττάρων, και θεωρείται ο πιο αξιόπιστος δείκτης αναγνώρισης αυτών. Επάγεται κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης των T κυττάρων στο θύμο υπό την επίδραση υψηλής συγγένειας αλληλεπίδραση του υποδοχέα του T κυττάρου με αυτοαντιγόνα ή με την ενεργοποίηση των περιφερικών CD4+ T κυττάρων ως απάντηση στη διέγερση του υποδοχέα του T κυττάρου (TCR) παρουσία της IL-2 και του TGF-β. Ο R.M. Samstein και οι συνεργάτες του έδειξαν ότι ο Foxp3 ελέγχει τη λειτουργία και τη διαφοροποίηση των Tregs ρυθμίζοντας τη γονιδιακή έκφραση μέσω αυξημένης σύνδεσης σε προϋπάρχοντες ενισχυτές, οι οποίοι δεσμεύονται από συμπαράγοντες στα πρόδρομα κύτταρα ή σε δομικά συγγενείς προκατόχους. Για το σκοπό αυτό έγινε ανάλυση χρωματίνης σε Tregs όπου οι ενισχυτές ήταν συνδεδεμένοι με Foxp3 και σε T κύτταρα Foxp3 αρνητικά. Η έλλειψη των συμπλόκων Foxp3 με ενισχυτές των Tregs στα Foxp3- CD4+ κύτταρα έγινε εφικτή με ενεργοποίηση των T κυττάρων πριν την έκφραση του Foxp3. Επιπλέον ανεδείχθη ότι σε μια διαδικασία καθυστερημένης κυτταρικής διαφοροποίησης, ο Foxp3 καθορίζει τη λειτουργικότητα των Tregs κυττάρων εκμεταλλευόμενος σε μεγάλο βαθμό το προσχηματισμένο δίκτυο ενισχυτή αντί να δημιουργήσει ένα νέο ενισχυτή. [144]

Ο παράγων Foxp3 είναι απαραίτητος και επαρκής για την παροχή κατασταλτικής ικανότητας στα παρθένα CD4+T κύτταρα. Ο Fontenot JD και οι συνεργάτες του το 2003 παρατήρησαν θανατηφόρο αυτοάνοσο σύνδρομο σε ποντίκια με μετάλλαξη ή έλλειψη του Foxp3, λόγω ανεπάρκειας των CD4+CD25+ ρυθμιστικών T κυττάρων, και όχι λόγω κυτταρογενετικού ελλείμματος των CD4+CD25- T κυττάρων. Παρατήρησαν επίσης ότι τα CD4+CD25+ ρυθμιστικά T κύτταρα διαφεύγουν της ανάπτυξης νόσου και εξαπλώνονται όταν μεταφέρονται σε νεογνικά ποντίκια με ανεπάρκεια Foxp3. Επιπροσθέτως, έκτοπη έκφραση του Foxp3 αποδίδει κατασταλτική λειτουργία στα περιφερικά CD4+CD25- T κύτταρα.[115]



Εικόνα 33. Η έκφραση του Foxp3 στα Tregs στον άνθρωπο. Χαμηλή έκφραση του Foxp3 επάγει ένα περιορισμένο αριθμό κυττάρων με φαινότυπο Treg χωρίς κατασταλτική δράση. Η κατασταλτική δράση αποκτάται μόνο σε υψηλή έκφραση Foxp3. Τροποποιημένη εικόνα από Shimon Sakaguchi et al. (74)

Ο παράγων Foxp3 υπόκειται κυρίως σε τρεις μετά-μεταφραστικές τροποποιήσεις: ακετυλίωση, φωσφορυλίωση και ουμπικιτίνωση. Οι τροποποιήσεις αυτές επηρεάζουν τη σταθερότητα και την ικανότητα σύνδεσης του Foxp3, ενώ επιπλέον ρυθμίζουν τη δράση των Tregs και την ανάπτυξη αυτοανοσίας. Η ακετυλίωση ειδικών καταλοίπων λυσίνης από την ακετυλτρανσφεράση της λυσίνης σταθεροποιεί την έκφραση του Foxp3 και προάγει τη δράση των Tregs, ευνοώντας τη σύνδεση του Foxp3 στο μεταγραφικό του στόχο και επιτρέποντας με αυτό τον τρόπο την αποφυγή της αποδόμησής του από το πρωτεάσωμα. Πολλές ακετυλάσες και αποακετυλάσες, όπως η TIP60 και η p300, έχει φανεί να αλληλεπιδρούν με τον παράγοντα Foxp3 και να ελέγχουν την ακετυλίωσή του. Άλλες μετά-μεταφραστικές διαδικασίες περιλαμβάνουν τη φωσφορυλίωση στα κατάλοιπα σερίνης και θρεονίνης από διάφορες κινάσες, όπως οι PIM-1, PIM-2 και CDK2, και την ουμπικιτίνωση στα κατάλοιπα λυσίνης, οι οποίες στοχεύουν τον Foxp3 και προάγουν την αποδόμησή του από το πρωτεάσωμα. Οι φλεγμονώδεις διαδικασίες οδηγούν σε μεσολαβούμενη από το πρωτεάσωμα αποδόμηση του Foxp3 από την ουμπικιτινάση Stub1, η οποία

συνδέεται στον Foxp3 και προάγει την ουμπικιτίνωσή του. Υπερέκφραση της Stub1 καταργεί την κατασταλτική ικανότητα των Tregs in vitro και in vivo και προσδίδει στα Tregs φαινότυπο όμοιο με αυτόν των TH1 βοηθητικών T κυττάρων. Αντιθέτως το ένζυμο αποουμπικιτίνωσης USP7 εμφανίζει αυξημένη έκφραση στα Tregs και σχετίζεται με τον Foxp3 του πυρήνα, όπου ρυθμίζει τη σύνθεση / αποδόμηση του Foxp3. Σε συνθήκες φλεγμονής το ένζυμο αυτό υποεκφράζεται, διευκολύνοντας έτσι την αποδόμηση του Foxp3. Επιπλέον η αφαίρεση του USP7 από τα Tregs οδηγεί σε θανατηφόρο αυτοανοσία με μειωμένο αριθμό Tregs στην περιφέρεια με φαινότυπο όμοιο με αυτό των TH1 in vitro και in vivo. Επιπροσθέτως, ο HIF-1α παράγοντας έχει περιγραφεί ότι ελέγχει την έκφραση του Foxp3. Ο παράγων αυτός επάγεται από την IL-6 και τον TCR και καταστέλλει τον Foxp3 μέσω ουμπικιτίνωσης. Τόσο η ουμπικιτίνωση όσο και η ακετυλίωση στοχεύουν σε κατάλοιπα λυσίνης και ανταγωνίζονται στην έκφραση του Foxp3. Η υπερακετυλίωση του Foxp3 εμποδίζει την πολουμπικιτίνωσή του και την αποδόμηση του από το πρωτεάσωμα, αυξάνοντας έτσι τη σταθερότητά του. [116]

Παρόλο που η λειτουργία του Foxp3 απαιτείται για την κατασταλτική δράση των T ρυθμιστικών λεμφοκυττάρων, ο Foxp3 σε μεγάλο βαθμό ενισχύει και διορθώνει τα προκαθορισμένα μοριακά χαρακτηριστικά των T ρυθμιστικών κυττάρων, συμπεριλαμβανομένης της ανεργίας και της εξάρτησης από την παρακρινή IL-2. Επιπροσθέτως ο Foxp3 παγιώνει τη σταθερότητα της κυτταρικής σειράς των ρυθμιστικών λεμφοκυττάρων, μέσω της τροποποίησης της κυτταρικής επιφάνειας και των σηματοδοτικών μορίων, με αποτέλεσμα την προσαρμογή στα σήματα που απαιτούνται για την επαγωγή και τη διατήρηση των T ρυθμιστικών κυττάρων. [117]

Ενισχυτικό των ανωτέρω είναι η διαπίστωση ότι η αφαίρεση του αλληλίου του Foxp3 στα ώριμα Tregs οδηγεί στην απώλεια της κυτταρικής τους ταυτότητας, απώλεια της κατασταλτικής τους λειτουργίας in vivo και στην απόκτηση της ικανότητας να παράγουν ιντερλευκίνη 2 (IL-2) και κυτταροκίνες των T βοηθητικών κυττάρων τύπου 1 (Th1). Μετά τη μεταφορά τους σε λεμφοπενικούς ασθενείς, απουσία λειτουργικών Tregs, τα Tregs με έλλειψη του Foxp3 πολλαπλασιάστηκαν και αποτελούσαν το κυρίαρχο κύτταρο ανάμεσα στις ιστικές διηθήσεις. Ανευρέθη επίσης απορρύθμιση της έκφρασης του γονιδίου στόχου του Foxp3 μετά από εξάλειψη του Foxp3. Έτσι η συνεχής έκφραση του Foxp3 στα ώριμα T ρυθμιστικά λεμφοκύτταρα είναι απαραίτητη για τη διατήρηση του μεταγραφικού και λειτουργικού προγράμματος που καθιερώθηκε κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης του T ρυθμιστικού λεμφοκυττάρου. [118]

Η IL-2 επιπροσθέτως διευκολύνει τη διαφοροποίηση των παρθένων CD4⁺ T κυττάρων σε T ρυθμιστικά Foxp3⁺ κύτταρα, αλλά καταστέλλει τη διαφοροποίησή τους σε Th17. [119] Μπλοκάροντας τον υποδοχέα της IL-2 μειώνεται η έκφραση του Foxp3 ανά κύτταρο στα ώριμα tTregs και ένας μικρός πληθυσμός αυτών χάνει ολοκληρωτικά την έκφραση του Foxp3. [116]. Αντιστοίχως η παρουσία του TGF-β διαφοροποιεί τα CD4⁺ T κύτταρα σε Foxp3⁺ Tregs, ενώ η ταυτόχρονη παρουσία TGF-β και ιντερλευκίνης 6 (IL-6) μετατρέπει τα CD4⁺ T κύτταρα σε Th17 κύτταρα, ικανά να εκκρίνουν ιντερλευκίνη 17. [120]

CD127

Η ταυτοποίηση του Foxp3 ως ένας ειδικός μεταγραφικός παράγοντας που καθορίζει την δραστηριότητα των Tregs, ανέδειξε αρχικά ότι ο πληθυσμός των Tregs στην περιφέρεια είχε υποεκτιμηθεί, ενώ η δραστηριότητά τους εξαρτάται από τα επίπεδα της έκφρασης του Foxp3 και τις ισομορφές της εκφραζόμενης πρωτεΐνης. Ωστόσο ο Foxp3 δεν εκφράζεται μόνο στα Tregs αλλά και σε έναν υποπληθυσμό T κυττάρων CD25⁻. Κατ' επέκταση δεν είναι όλα τα Foxp3⁺ T κύτταρα Tregs. Αυτό έκανε επιτακτική την ανάγκη επιστράτευσης και άλλου δείκτη για τον ακριβέστερο διαχωρισμό των Tregs. Η αλυσίδα του υποδοχέα της ιντερλευκίνης 7 (CD127) παρουσιάζει μειωμένη έκφραση σε όλα τα ανθρώπινα T κύτταρα μετά την ενεργοποίησή τους. Ωστόσο η πλειοψηφία των T δραστικών κυττάρων και κυττάρων μνήμης επανεκφράζει το CD127. Αυτό δεν ισχύει βέβαια για τα Foxp3⁺ T κύτταρα, στα οποία η έκφραση του CD127 παραμένει χαμηλή (CD127^{lo/-}). Οι Liu et al έδειξαν ότι ο Foxp3 αλληλεπιδρά με τον CD127 και δεδομένης της κατασταλτικής του δράσης συμβάλλει στη μειωμένη έκφραση του CD127 στα Tregs. Η έκφραση του CD127 αποτελεί έναν εξαιρετικό δείκτη των ανθρώπινων Tregs, ειδικά σε συνδυασμό με το CD25. Ο συνδυασμός αυτών των δεικτών ταυτοποιεί τα Tregs, που αποτελούν το 7-8% των CD4⁺ κυττάρων, ποσοστό μεγαλύτερο από αυτό που προηγούμενες μελέτες αναγνώριζαν. Όπως προαναφέρθηκε η έκφραση του CD127 είναι σημαντικά μειωμένη στα CD4⁺CD25^{hi} κύτταρα συγκριτικά με τα CD4⁺CD25⁻ T κύτταρα. Επίσης σε αντίθεση με την πλειοψηφία των ενεργοποιημένων T κυττάρων που ταχέως επανεκφράζουν CD127 και τα T κύτταρα μνήμης που εκφράζουν υψηλά επίπεδα CD127, τα Tregs παραμένουν CD127^{lo/-}. Δύο είναι οι επικρατούσες θεωρίες που εξηγούν τη χαμηλή έκφραση του CD127. Η μία περιγράφει ότι τα Tregs υπόκεινται σε συνεχή αντιγονική διέγερση, η οποία είναι εξαρτώμενη από το CD28 και οδηγεί σε συνεχή σηματοδότηση η οποία καταστέλλει τη μεταγραφή του CD127. Η άλλη αναφέρει ότι η έκφραση του Foxp3 σε αυτή την υποομάδα των T κυττάρων ελέγχει

την έκφραση του CD127. Όπως έχει περιγραφεί σε αναλύσεις με κυτταρομετρία ροής, όσο μεγαλύτερη η έκφραση του Foxp3 τόσο μικρότερη η έκφραση του CD127. [121]

Οι Simonetta et al έδειξαν ότι τα Tregs μπορούν να εμφανίσουν υψηλή έκφραση CD127 εφόσον ενεργοποιηθούν. Παρατήρησαν επίσης, ότι η έκφραση του CD127 διαφέρει στα Tregs που απομονώθηκαν από διαφορετικά όργανα (λεμφαδένες, περιφερικό αίμα, δευτερογενή λεμφικά όργανα). Πιο συγκεκριμένα η έκφραση του CD127 στα Tregs που απομονώθηκαν από περιφερικό αίμα ή δευτερογενή λεμφικά όργανα είναι χαμηλότερη συγκριτικά με αυτή των Tregs των λεμφαδένων. Εν αντιθέσει τα Tregs στο μυελό των οστών και στο δέρμα εκφράζουν υψηλά επίπεδα CD127. Αυτή η διαφορά στην έκφραση του CD127 αναλόγως του ιστού προέλευσης των Tregs φαίνεται να οφείλεται σε διαφορετική αντιγονική διέγερση, σε διαφορετικά μονοπάτια ενεργοποίησης ή διαφοροποίησης των κυττάρων, σε ειδική σηματοδότηση που παρέχεται σε συγκεκριμένες θέσεις, στη διαφορετική ικανότητα μετανάστευσης των Tregs με υψηλή έκφραση CD127 και στη διαφοροποιημένη παραγωγή της IL-7 ανάλογα με τη θέση. [122]

Η απουσία του CD127 σε συνδυασμό με την υψηλή έκφραση του CD25^{+/high} έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως για τον καθορισμό των λειτουργικών T ρυθμιστικών λεμφοκυττάρων στον άνθρωπο. Έχει φανεί ότι ο συνδυασμός CD4⁺CD25⁺CD127⁻ προσδιορίζει τα ανθρώπινα FoxP3⁺ Tregs ακόμα και σε ασθενείς με ενεργό φλεγμονώδη νόσο. Ωστόσο μόνο το 40% του πληθυσμού των CD127^{low} κυττάρων εκφράζουν Foxp3 ενώ έχουν προσδιοριστεί και μη κατασταλτικά FoxP3^{low}CD45RO⁺ T κύτταρα τα οποία εκφράζουν χαμηλά επίπεδα CD127. Επιπροσθέτως η έκφραση του CD127 περιορίζεται νωρίς κατά τη διάρκεια της ενεργοποίησης των T δραστικών κυττάρων (Teffs). Συνέπεια των ανωτέρω είναι η χρήση συμπληρωματικών δεικτών στους CD25 και CD127 για τον καθορισμό των Tregs στον άνθρωπο (CD127^{-/low}CD25^{high}), όπως ο CD62L, η θετικότητα του οποίου μπορεί να διαχωρίσει τα Tregs από τα πρόσφατα ενεργοποιημένα Teffs. [123]

GITR / CTLA-4

Ανάμεσα στους δείκτες επιφανείας που σχετίζονται με το φαινότυπο και τη λειτουργία των Tregs, σημαντικά μόρια είναι ο CTLA-4 (cytotoxic T lymphocyte- associated protein 4) και ο GITR (glucocorticoid- induced TNFR- related protein). Ο παράγων GITR (glucocorticoid-induced tumor necrosis factor-related receptor) αποτελεί μέλος της υπερικογένειας των υποδοχέων του παράγοντα νέκρωσης όγκων (TNF receptor superfamily (TNFRSF)) και εκφράζεται σε υψηλά επίπεδα στην πλειοψηφία των

Foxp3⁺ Tregs, στα ενεργοποιημένα CD4⁺ και CD8⁺ T δραστικά κύτταρα (Teff) και σε χαμηλότερα επίπεδα σε άλλους τύπους κυττάρων, συμπεριλαμβανομένων των B κυττάρων, των NK κυττάρων, των μακροφάγων, των δενδριτικών κυττάρων, των ηωσινοφίλων, των βασεοφίλων και των μαστοκυττάρων. Ο συνδέτης του GITR (GITR ligand - GITR-L) εκφράζεται επίσης ευρέως στο ανοσοποιητικό σύστημα και μπορεί να ανιχνευθεί σε βασικά επίπεδα στα δενδριτικά κύτταρα, στα B κύτταρα, στα μονοκύτταρα και στα μακροφάγα ενώ εμφανίζει ιδιαίτερα αυξημένη έκφραση στα πλασματοκυτταρικά δενδριτικά κύτταρα (plasmacytoid DCs) και σε συνθήκες φλεγμονής. Ο GITR ενέχεται στη ρύθμιση της ανοσιακής απάντησης *in vivo*, συμπεριλαμβανομένης της ειδικής αντιικής απάντησης από τα CD4⁺ και CD8⁺ T κύτταρα τόσο σε οξεία όσο και σε χρόνια φλεγμονή. [124] Ο GITR διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην ενεργοποίηση αλλά και στην αυξημένη κατασταλτική δράση των Tregs. Συμβάλλει στη διαφοροποίηση των θυμικής προέλευσης Tregs (tTregs), στην εξάπλωση τόσο των tTregs όσο και των επαγόμενων στην περιφέρεια Tregs (pTregs), ενώ υπάρχουν δεδομένα στα οποία αναφέρεται η σύνδεσή του με δείκτες των κυττάρων μνήμης. Εμφανίζει αυξημένη έκφραση στα ώριμα tTregs αλλά και στα pTregs. Σε υγιείς μάρτυρες ανευρέθη υψηλή έκφραση του GITR σε CD4⁺ T κύτταρα που εκφράζουν Foxp3 αλλά όχι CD25 και εμφανίζουν κατασταλτική δράση. Αυτά τα κύτταρα εκφράζουν επίσης CD45RO, IL-10 και TGF-β, και πιθανότατα αποτελούν pTregs. Ο GITR εκφράζεται επίσης από τα Tr1 Tregs, τα οποία ορίζονται από την ικανότητά τους να παράγουν υψηλά επίπεδα IL-10, αλλά και από την έλλειψη έκφρασης Foxp3. Λόγω του γεγονότος ότι ο GITR εκφράζεται σε υποομάδες των Tregs που εμφανίζουν χαμηλή έκφραση CD25 και Foxp3, δε μπορεί να χρησιμοποιηθεί η έκφραση του GITR ως μοναδικός δείκτης ταυτοποίησης των Tregs, αλλά η αξιολόγηση της έκφρασής του κρίνεται σκόπιμο να γίνεται σε συνδυασμό με άλλους δείκτες των Tregs (CD25, Foxp3). [125] Επιπροσθέτως, ο GITR είναι συνεχώς παρών στα μη ενεργοποιημένα T κύτταρα και η διέγερσή του μπορεί να καταργήσει τη μεσολαβούμενη από τα Tregs καταστολή. [57]. Η σηματοδότηση μέσω GITR μπορεί να αυξήσει την απάντηση στην IL-2 στα CD4⁺ και CD8⁺ T κύτταρα. Αυτή η παρατήρηση ενισχύει την πρόταση ότι διακοπή της σηματοδότησης του GITR μπορεί να ενισχύσει τη δράση των Tregs *in vivo*. Ωστόσο η έκφραση του GITR, όπως προαναφέρθηκε, δεν αποτελεί αποκλειστικότητα των CD4⁺CD25⁺ Tregs. Τα CD8⁺ και τα CD4⁺CD25⁻ T κύτταρα, εκφράζουν GITR σε χαμηλά επίπεδα, τα οποία αυξάνονται μετά την ενεργοποίησή τους, αλλά δεν έχουν ρυθμιστική δραστηριότητα. Αυτό ωστόσο έρχεται σε αντίθεση με την παρατήρηση σε ασθενείς με κολίτιδα όπου ένας πληθυσμός περιφερικών CD4⁺CD25⁻ T κυττάρων εκφράζει υψηλά επίπεδα GITR και ασκεί κατασταλτική δράση. [86]

Ο δείκτης CTLA-4 (CD152) ρυθμίζει την ενεργοποίηση των T κυττάρων ανταγωνιζόμενος τον CD28 στη σύνδεση με τον B7 παράγοντα. Εκφράζεται συνεχώς από το 40% των Tregs στους ποντικούς, αλλά και από τα Teffs μετά την ενεργοποίησή τους. Η έκφραση του CTLA-4 είναι ενδεικτική της κατάστασης λειτουργικότητας των Tregs, καθώς έχει φανεί ότι τα Tregs που εμφανίζουν τη μέγιστη κατασταλτική ικανότητα, εκφράζουν υψηλότερα επίπεδα CTLA-4, συγκριτικά με τα ανενεργά CTLA-4^{lo} Tregs. [123]

Η έκφραση του CTLA-4 είναι συνεχής στα FoxP3⁺ Tregs, ειδικά στα τελικής διαφοροποίησης Foxp3^{hi} Tregs στον άνθρωπο. Ο CTLA-4 είναι απαραίτητος για τη δράση των Tregs, όπως φαίνεται από μια σειρά αναφορών όπου πολυμορφισμοί στο γονίδιο του CTLA-4 συνδέθηκαν με γενετική ευαισθησία σε πολλές αυτοάνοσες ασθένειες, συμπεριλαμβανομένου του σακχαρώδους διαβήτη τύπου I. [109] Ο CTLA-4 αποτελεί αρνητικό ρυθμιστή των παρθένων T κυττάρων και η έκφρασή του αυξάνεται με την ενεργοποίηση των T κυττάρων. Κύρια δράση του είναι η καταστολή της ανοσιακής απάντησης, ενώ η έλλειψή του οδηγεί στην ανάπτυξη συστηματικής λεμφοϋπερπλασίας και θανατηφόρου αυτοάνοσης νόσου μεσολαβούμενης από τα T κύτταρα. [126] Η σηματοδότηση μέσω της οδού CTLA-4 στα Tregs προκαλεί καταβολισμό της τρυπτοφάνης μέσω αύξησης της παραγωγής IDO (indoleamine 2,3-dioxygenase) στα δενδριτικά κύτταρα, οδηγώντας είτε σε έλλειψη τρυπτοφάνης είτε σε αύξηση των καταβολιτών της τρυπτοφάνης, οι οποίοι μειώνουν τον πολλαπλασιασμό των T δραστικών κυττάρων (Teff) και καταστέλλουν την παραγωγή προφλεγμονωδών κυττοκινών. Η παρατήρηση αυτή έχει οδηγήσει στη θεωρία ότι ο κατασταλτικός ρόλος των Tregs στην ωρίμανση των δενδριτικών κυττάρων, ο οποίος οδηγεί σε μη αποτελεσματική ενεργοποίηση των Teffs, επιτελείται μέσω της CTLA-4 οδού μεταγωγής σήματος. [86]

Εκτός από τα προαναφερθέντα σηματοδοτικά μόρια που χαρακτηρίζουν τα Tregs, σημαντικός είναι ο ρόλος των υποδοχέων TLR (Toll-like receptors) στη μεταγωγή σήματος. Οι υποδοχείς αυτοί εκφράζονται κυρίως στα ώριμα δενδριτικά κύτταρα και αναγνωρίζουν διατηρημένα παθογόνα που σχετίζονται είτε με μοριακά πρότυπα που βρίσκονται στα περισσότερα μικρόβια είτε με ενδογενή μόρια που απελευθερώνονται κατά τη διάρκεια της φλεγμονής. Σε μελέτες με μοντέλα ποντικών, η σύνδεση του TLR οδήγησε στην παραγωγή IL-6 από τα δενδριτικά κύτταρα, η οποία παρείχε αντίσταση των T δραστικών κυττάρων (Teff) έναντι της κατασταλτικής δράσης των CD4⁺CD25⁺ Tregs. Στα ποντίκια, τα CD4⁺CD25⁺ Tregs εκφράζουν επιλεκτικά TLR-4, -5, -7, και -8. Μετά την ενεργοποίησή τους με έναν TLR-4 συνδέτη τα CD4⁺CD25⁺ T κύτταρα πολλαπλασιάζονται και εμφανίζουν μεγαλύτερη κατασταλτική ισχύ *in vivo*.

Στον άνθρωπο, *in vitro* ενεργοποίηση του TLR-8 από φυσικούς συνδέτες οδηγεί σε αντιστροφή της κατασταλτικής δράσης των Tregs, ενώ η μεταφορά αυτών των διεγερμένων από τον TLR-8 Tregs σε ξενιστή πάσχων από κακοήθεια οδήγησε σε αυξημένη κάθαρση του όγκου. [127]

HLA-DR

Ο δείκτης HLA-DR εκφράζεται από το ένα τρίτο των T δραστικών κυττάρων (Teff) στο περιφερικό αίμα. Τα HLA-DR⁺ Tregs εκφράζουν υψηλότερα επίπεδα Foxp3 και είναι υπεύθυνα για την εξαρτώμενη από την επαφή των κυττάρων καταστολή *in vitro*, ενώ η καταστολή από τα HLA-DR⁻ Tregs επιτελείται αρχικά μέσω της IL-4 και της IL-10 και αργότερα μέσω του μηχανισμού επαφής των κυττάρων. Η ενεργοποίηση και η εξάπλωση των HLA-DR⁻ Tregs *in vitro* οδηγεί στη δημιουργία των HLA-DR⁺ Tregs, τα οποία παρουσιάζουν αποτελεσματικότερη κατασταλτική δράση συγκριτικά με τα HLA-DR⁻ Tregs. Επιπροσθέτως ο HLA-DR, ο οποίος εκφράζεται μόνο στα ανθρώπινα Tregs, καθορίζει το στάδιο της τελικής διαφοροποίησης των λειτουργικών Tregs. [123]

CD45RO/CD45RA

Ο CD45RO και ο CD45RA είναι δείκτες που εκφράζονται αποκλειστικά από διακριτές υποομάδες των CD4⁺ κυττάρων στον άνθρωπο και μπορούν να χρησιμοποιηθούν για το διαχωρισμό των CD4⁺FoxP3⁺ T κυττάρων σε τρεις φαινοτυπικά και λειτουργικά διακριτούς υποπληθυσμούς: τα CD45RA⁺CD25⁺FoxP3^{low} Tregs ανάπαυσης και τα CD45RO⁺CD25^{high}FoxP3^{high} ενεργοποιημένα Tregs, τα οποία εμφανίζουν κατασταλτική δράση, και τα CD45RO⁺CD25⁺FoxP3^{low} μη κατασταλτικά Teffs που παράγουν προφλεγμονώδεις κυττοκίνες. Στον άνθρωπο τα CD4⁺ FoxP3⁺ T κύτταρα που εκφράζουν CD45RA (nTregs) εμφανίζουν μέτρια κατασταλτική δράση, επικρατούν στο ομφάλιο αίμα και είναι παρόντα στο περιφερικό αίμα. Τα CD45RO⁺CD25^{high}FOXp3^{high} κύτταρα είναι ενεργοποιημένα και λειτουργικά διαφοροποιημένα Tregs. Έχουν αυξημένη ικανότητα πολλαπλασιασμού, έχουν ισχυρή κατασταλτική δράση και προέρχονται κυρίως από τα CD45RA⁺CD25⁺FOXp3^{low} nTregs. [123]

CD62L

Η L-σελεκτίνη (L-selectin) ή CD62L αποτελεί ένα σημαντικό μόριο προσκόλλησης για τη μετανάστευση των λεμφοκυττάρων και εκφράζεται από την πλειοψηφία των παρθένων T κυττάρων μετά την έξοδό τους από το θύμο. Είναι απαραίτητο μόριο για την είσοδο των κυκλοφορούντων λεμφοκυττάρων στους περιφερικούς λεμφαδένες, ενώ συμβάλλει σημαντικά στη μετανάστευση στους μεσεντέριους λεμφαδένες καθώς

και στην μετανάστευση των ενεργοποιημένων, δραστικών και μνήμης λεμφοκυττάρων. Επιπροσθέτως η L-σελεκτίνη συνεργάζεται με άλλες σελεκτίνες και ιντεγκρίνες για τη διέλευση των λευκοκυττάρων από το φλεγμονώδες ενδοθήλιο των αγγείων, πριν τη σταθερή τους προσκόλληση και μετανάστευση σε λεμφικούς ή μη ιστούς. Τα θυμικής προέλευσης tTregs χρειάζονται την έκφραση της L-σελεκτίνης για τον εντοπισμό του φυσιολογικού ιστού, ενώ η λειτουργία της L-σελεκτίνης διατηρείται μέσω μιας μοναδικής ισορροπίας μεταξύ της αυξημένης μεταγραφής της L-σελεκτίνης και της επιταχυνόμενης ενδοπρωτεολυτικής απελευθέρωσης της από Tregs. [128]

Επιπροσθέτως η L-σελεκτίνη συμβάλλει στο διαχωρισμό των ρυθμιστικών CD4+ T κυττάρων από τα T δραστικά κύτταρα. Τα Tregs εμφανίζουν υψηλή έκφραση CD62L, ένα χαρακτηριστικό των παρθένων κυττάρων, ενώ μετά τη διέγερσή τους *in vitro* παράγουν χαμηλά επίπεδα IL-2 και IFN- γ και καθόλου IL-4 ή IL-10, εν αντιθέσει με τα CD62L- T κύτταρα που παράγουν ποικιλία κυττοκινών. [129]

CD31

Το CD31 μόριο, γνωστό και ως PECAM-1 (platelet endothelial cell adhesion molecule-1), αποτελεί δείκτη των κυττάρων που έχουν μεταναστεύσει προσφάτως από το θύμο και εκφράζεται από την πλειοψηφία των κυκλοφορούντων nTregs στον άνθρωπο. [109] Τα nTregs αποτελούν ετερογενή ομάδα και μπορούν να διαχωριστούν βάσει του CD31 σε nTregs που μετανάστευσαν πρόσφατα από το θύμο (CD31+) και σε άλλα nTregs (CD31-), χωρίς ωστόσο να έχει διερευνηθεί αν τα CD31- nTregs εμφανίζουν αναπτυξιακές ή λειτουργικές διαφορές από τα CD31+ nTregs. [130]

Helios

Ο μεταγραφικός παράγων Helios, ο οποίος είναι μέλος της οικογένειας Icaros, έχει ταυτοποιηθεί ως δείκτης διαχωρισμού των θυμικής προέλευσης Tregs από τα επαγόμενα στην περιφέρεια Tregs. Τα tTregs εκφράζουν τον παράγοντα Helios, ενώ τα pTregs (FoxP3+CD4+) όχι. Οι δείκτες επιφανείας οι οποίοι επιτρέπουν την απομόνωση των Helios+ Tregs στον άνθρωπο είναι οι TIGIT ((T-cell immunoreceptor with Ig and ITIM domain) και FCRL3 (Fc receptor-like protein 3). Ωστόσο ο FCRL3 στον άνθρωπο έχει περιγραφεί ως ένας δείκτης των Tregs με μειωμένη ικανότητα πολλαπλασιασμού παρουσία IL-2 και με μειωμένη κατασταλτική ικανότητα. Ως εκ τούτου, δεν έχει αποσαφηνιστεί αν η έκφραση του Helios στον άνθρωπο είναι τόσο διακριτή όσο στους ποντικούς. [130]

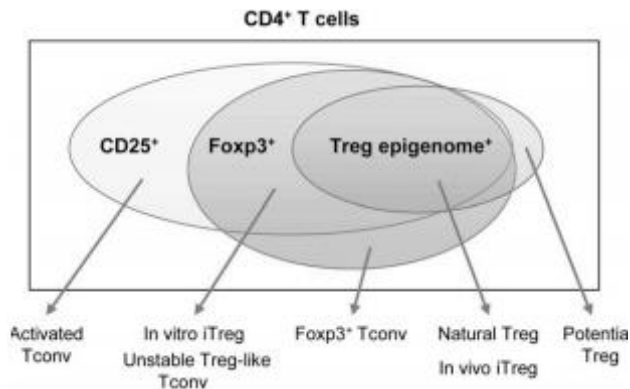
Transcription factor	Activation and memory	Homing and origin	Suppressive and effector function	Apoptosis, survival or other
FOXP3	CD45RA CD45RO CD25 HLA-DR Lack of CD127 CD69	CD62L CCR4 CCR6 CCR9 CD103 CD304 CD31 Lack of CD49d	CTLA4 ICOS CD39–CD73 LAP Granzyme B Galectin 1 Galectin 10 TRANCE CD80 and CD86 IL-10 IL-17 CD2 Lack of IL-2	CD27 OX40 CD95 PD1 GITR Galectin 3 GARP MS4A4B IL-1R CD6

Πίνακας 10. Δείκτες των Tregs. Τροποποιημένος πίνακας εικόνα από Shimon Sakaguchi et al. (74)

4.3 ΑΝΟΣΟΦΑΙΝΟΤΥΠΙΚΗ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ Τ ΡΥΘΜΙΣΤΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

Αρχικά για την ταυτοποίηση των Tregs χρησιμοποιήθηκε ο δείκτης επιφανείας CD25. Ωστόσο ο δείκτης αυτός δε μπορεί να χρησιμοποιηθεί μόνος του, καθώς στο περιφερικό αίμα ανευρίσκονται περίπου 30% CD4+CD25+ Τ κύτταρα, ενώ μόνο 1-2% αυτών των κυττάρων με την υψηλότερη έκφραση του CD25 εμφανίζουν κατασταλτική δράση και μπορούν να θεωρηθούν Τ ρυθμιστικά λεμφοκύτταρα (Tregs). Η χρήση του CD25 σε συνδυασμό με το CD45RA διευκόλυνε το διαχωρισμό των naïve Tregs από τα Tregs που έχουν υποστεί αντιγονική διέγερση. Τα nTregs εκφράζουν CD25⁺CD45RA^{hi}, τα Tregs που έχουν υποστεί αντιγονική διέγερση δεν εκφράζουν CD45RA ενώ τα άλλα παρθένα CD4+ Τ κύτταρα που δεν είναι Tregs δεν εκφράζουν CD25. [109] Με την προσθήκη του ενδοκυττάρου Foxp3 στην ταυτοποίηση των Tregs και την επιλογή των Foxp3+ κυττάρων με υψηλή έκφραση CD25, αποκλείονται τα FOXP3^{low}CD25^{mid} Tregs, τα οποία εμφανίζουν φαινότυπο παρθένου κυττάρου (CD45RA^{hi}CD45RO⁻), ενώ επιλέγονται τα CD45RA⁻CD45RO⁺FOXP3^{hi}CD25^{hi} που αποτελούν τα Τ ρυθμιστικά λεμφοκύτταρα με κατασταλτική δράση. Ένας άλλος χρήσιμος παράγοντας για την ταυτοποίηση των Tregs αποτελεί η έλλειψη του επιφανειακού δείκτη CD127. Έχει φανεί ότι χαμηλή έκφραση του CD127 σε CD4+ Τ κύτταρα που εκφράζουν Foxp3, προσδίδει στα κύτταρα αυτά κατασταλτική ικανότητα. Ωστόσο κύτταρα που δεν είναι Tregs αλλά συμβατικά CD4+ Τ κύτταρα, μπορούν να μειώσουν την έκφραση του CD127 μετά την

ενεργοποίησή τους. Συνεπώς η έκφραση μόνο του CD127 δε δύναται να διαχωρίσει τα Tregs από τα ενεργοποιημένα T κύτταρα με ακρίβεια. Ο δείκτης CD62L (L-σελεκτίνη) εμφανίζει υψηλή έκφραση στα Tregs παρόλο που δεν ειδικός δείκτης για αυτά. Ωστόσο σε συνδυασμό με τους δείκτες CD25 και CD127 μπορεί να χρησιμοποιηθεί για το διαχωρισμό των Tregs από τα ενεργοποιημένα T κύτταρα. Πιο συγκεκριμένα τα Tregs εμφανίζουν φαινότυπο $CD25^{hi}CD127^{lo}CD62L^{+}$ ενώ τα ενεργοποιημένα T κύτταρα εμφανίζουν χαμηλή έκφραση CD62L. Επιπροσθέτως η συνδυασμένη χρήση του CD25 και του CD127 στην απομόνωση των Tregs διακυβεύεται από την ύπαρξη μη ρυθμιστικών $Foxp3^{+} CD4^{+}$ T κυττάρων στην περιφέρεια. Τα κύτταρα αυτά που εκφράζουν CD45RO και χαμηλά επίπεδα FOXP3, εμφανίζουν χαμηλή ή ενδιάμεση έκφραση του CD127 και παράγουν προφλεγμονώδεις κυττοκίνες, συμπεριλαμβανομένων των IL-2, IFN γ και IL-17. Αυτά τα μη ρυθμιστικά $FOXP3^{lo}$ T κύτταρα μπορεί να είναι ενεργοποιημένα $CD4^{+}$ δραστικά T κύτταρα που έχουν αυξήσει την έκφραση του Foxp3 χωρίς να αποκτήσουν κατασταλτική δραστηριότητα. Η ύπαρξη αυτού του μη ρυθμιστικού $FOXP3^{lo}$ T πληθυσμού κάνει απαγορευτική τη χρήση του Foxp3 ως μοναδικό δείκτη των Tregs και κάνει επιτακτική την ανάγκη χρήσης συνδυασμού μονοκλωνικών αντισωμάτων. [74]



Εικόνα 34. Οι υποπληθυσμοί των T κυττάρων όπως καθορίζονται από την έκφραση CD25, Foxp3 και επιγενετικές τροποποιήσεις. Τα Tregs εμφανίζουν υψηλή έκφραση του CD25 και του Foxp3 και έχουν υποστεί επιγενετικές τροποποιήσεις. Τροποποιημένη εικόνα από Ohkura N et al. (168)

Marker	Function/comments
CD25 ^{high}	Top 1~2% of brightest CD25-expressing, FoxP3 ^{high} and CD45RO ⁻ CD4 cells are highly suppressive Tregs
FoxP3 ⁺	FoxP3 expression is necessary but not sufficient to identify human Tregs. Tregs can express FoxP3 upon activation, especially in the presence of TGFβ. Functional suppressive FoxP3 ⁺ Tregs can be identified by using other markers, e.g.: CD45RO ⁻ FoxP3 ^{high}
CTLA-4 ⁺	Constitutively and preferentially expressed intracellularly by Tregs. Expression levels correlate with the suppressive potency of Tregs
CD103 ⁺	Expressed very low levels on human Tregs, which may be up-regulated in inflammatory responses or by TGFβ
HLA-DR ⁺	Identify mature, terminally differentiated, high FoxP3-expressing Tregs responsible for contact dependent inhibition.
CCR6 ⁺	Identifies memory Tregs and IL-17-producing suppressive Tregs
CD127 ^{low}	Human Tregs are characterized by low CD127 expression. CD4 ⁺ , CD25 ⁺ and CD127 ⁻ are generally used to define human Tregs. This combination may be further improved by additional marker, such as CD62L ⁺ . Tregs also down-regulate their CD127 expression upon activation
CD45RO ⁺ (or CD45RA ⁻)	CD45RO ⁺ CD25 ^{high} FoxP3 ⁺ identify effector Tregs with highly potent suppressive capacity; CD45RA ⁺ CD25 ⁺ FoxP3 ^{low} identify resting Tregs with moderate suppressive function; CD45RO ⁺ CD25 ⁺ FoxP3 ^{low} identify non-suppressive FoxP3 ⁺ T cells which can produce proinflammatory cytokines

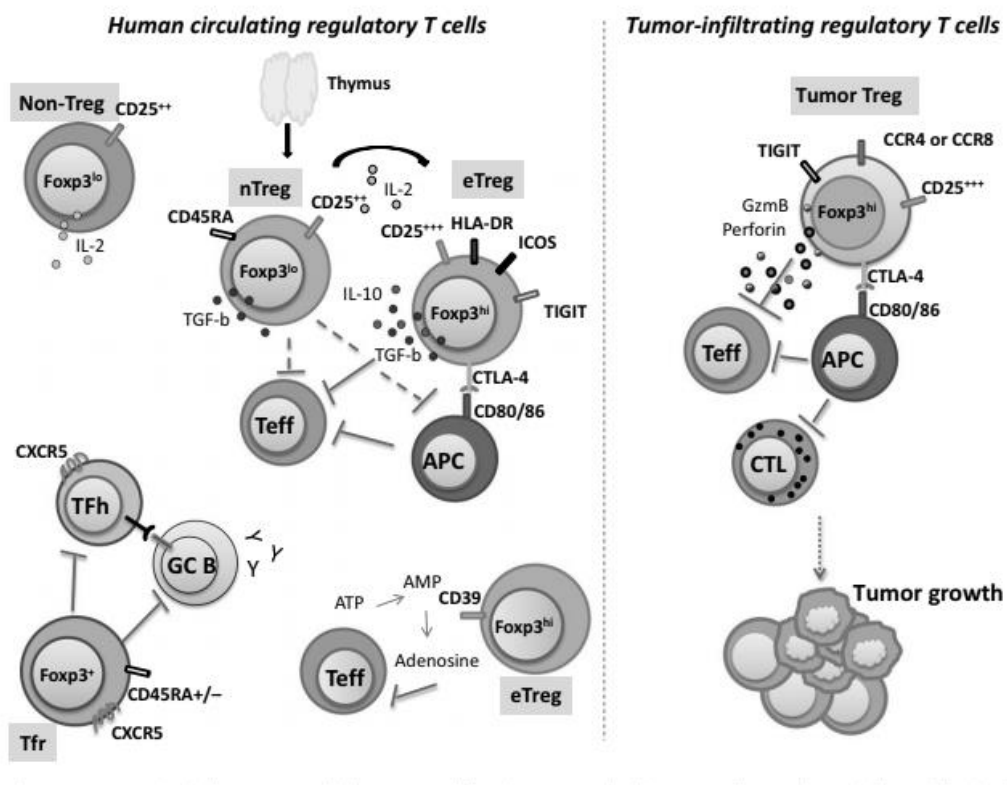
Πίνακας 11. Δείκτες των λειτουργικών Tregs στον άνθρωπο. Τροποποιημένος πίνακας από Xin Chen and Joost J. (123)

4.4 Τ ΡΥΘΜΙΣΤΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ ΣΤΗΝ ΑΝΟΣΙΑ ΤΗΣ ΚΑΚΟΗΘΕΙΑΣ

Μεγάλος αριθμός μελετών έχει επιβεβαιώσει τη συσχέτιση μεταξύ κακοήθειας και Τ ρυθμιστικών λεμφοκυττάρων. Πιο συγκεκριμένα έχει φανεί η παρουσία CD4+CD25+ κυττάρων εντός των όγκου και αυξημένος αριθμός CD4+CD25+ Tregs στο αίμα ασθενών με κακοήθεια. Ένας βασικός μηχανισμός της ανωτέρω αύξησης των Tregs είναι η στρατολόγηση των υπαρχόντων θυμικής προέλευσης Τ ρυθμιστικών λεμφοκυττάρων (tTregs), μέσω χημειοκινών που παράγονται από τα καρκινικά κύτταρα, όπως η CCL22, που προσελκύει τα Tregs που εκφράζουν τον αντίστοιχο για τη χημειοκίνη υποδοχέα. Ωστόσο, καθώς και τα Τ δραστικά λεμφοκύτταρα φέρουν υποδοχείς χημειοκινών, η έκκριση χημειοκινών δεν επαρκεί σε μοναδικός μηχανισμός για την εκλεκτική προσέλκυση των Tregs στις θέσεις ύπαρξης όγκου. Δύο επιπλέον μηχανισμοί έχουν περιγραφεί για την στρατολόγηση αυτή. Ο ένας αποτελεί την επαγωγή των Tregs στην περιφέρεια (pTregs) από τα δραστικά Τ κύτταρα και ο άλλος την κλωνική ανάπτυξη, επαγόμενη από κυττοκίνες ή/ και αντιγόνα, και τον πολλαπλασιασμό των θυμικών Tregs που βρίσκονται στην περιφέρεια (tTregs). Τα αντιγόνα που προέρχονται από τον όγκο και είναι ικανά να προκαλέσουν τη διέγερση των Tregs είναι αυτοαντιγόνα, παρατήρηση που ενισχύθηκε από το γεγονός ότι σε καρκινικά κύτταρα που δεν φέρουν συγγενές αυτοαντιγόνο αναγνωρίσιμο από τα tTregs, δεν παρατηρήθηκε ανάπτυξη των Tregs έναντι των καρκινικών κυττάρων. [131]

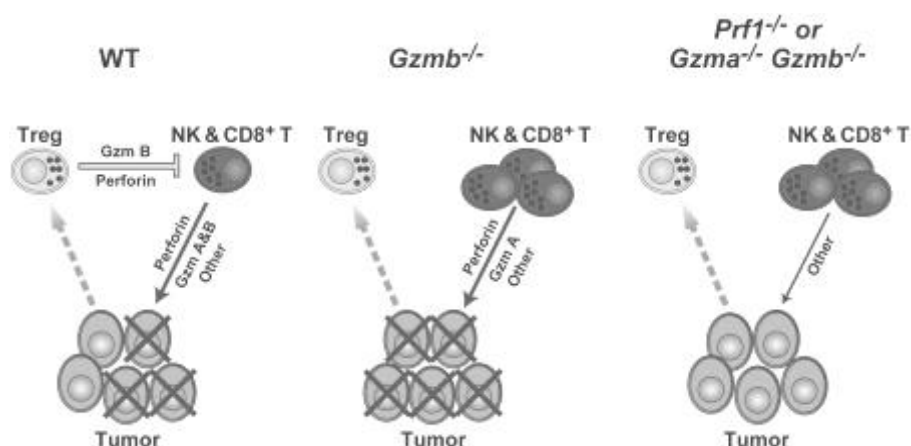
Για πολλές κακοήθειες στον άνθρωπο, η πυκνότητα της παρουσίας των Tregs στις καρκινικές μάζες είναι προγνωστική του φτωχού κλινικού αποτελέσματος, καταδεικνύοντας ότι τα Tregs διαδραματίζουν λειτουργικό ρόλο στην πρόοδο

καρκινικής νόσου. [66]. Οι κακοήθεις όγκοι δεν κατευθύνουν τη μετατροπή ενός ειδικού για την κακοήθεια T δραστικού κυττάρου σε επαγόμενο Foxp3+ T ρυθμιστικό κύτταρο, αλλά επιστρατεύουν προϋπάρχοντα, προερχόμενα από το θύμο, Tregs αντιδραστικά σε αυτοαντισώματα που σχετίζονται με το όργανο προέλευσης της κακοήθειας. [132. Συνεπώς σύμφωνα με τον τύπο του όγκου αναγνωρίζονται ετερογενή Tregs με φαινότυπο διαφορετικό από αυτόν των κυκλοφορούντων Tregs. Πιο συγκεκριμένα τα Tregs που διηθούν όγκους τόσο πρωτοπαθείς όσο και μεταστατικούς υπερεκφράζουν μόρια επιφανείας όπως τα LAG3, TIGIT, CTLA4 και ICOS, σε σύγκριση με τα κυκλοφορούντα Tregs. [130] Επιπροσθέτως, έχει περιγραφεί ότι τα καρκινικά κύτταρα μπορούν να διαφύγουν της δράσης των κυτταροτοξικών CD8+ T κυττάρων αποτρέποντας την έκθεση των αντιγόνων του όγκου στα κύτταρα του μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας I (MHC I) και της απόρριψης μεσολαβούμενης από τα CD4+ T κύτταρα, μέσω παρεμπόδισης της έμμεσης παρουσίασης των αντιγόνων του όγκου από διηθημένα μακροφάγα. [133].



Εικόνα 35. Η ετερογένεια των κυκλοφορούντων Tregs ως προς το φαινότυπο και τις λειτουργίες τους. Τροποποιημένη εικόνα από Audrey Mohr et al. (130)

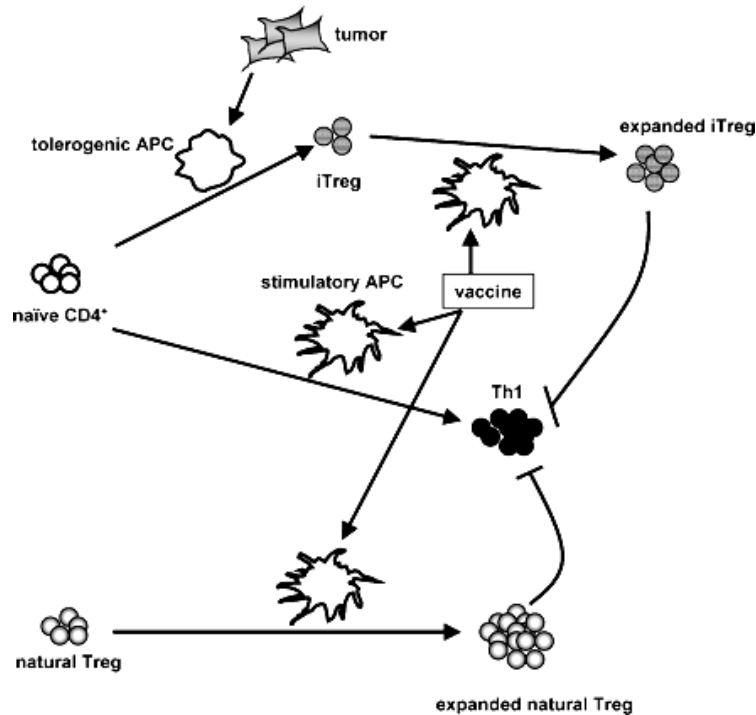
Το 2007 ο Cao και οι συνεργάτες του περιέγραψαν το μοντέλο δράσης των Τ ρυθμιστικών κυττάρων στην καταστολή της αντικαρκινικής δραστηριότητας. Για τη μελέτη αυτή χρησιμοποίησαν ποντίκια χωρίς έλλειψη περφορίνης ή granzyme A ή B (wild type), ποντίκια με έλλειψη granzyme B και ποντίκια με έλλειψη περφορίνης ή granzyme A και B. Στα wild type ποντίκια τα καρκινικά κύτταρα επάγουν την έκφραση granzyme B στα Tregs μέσω άγνωστου για την ώρα μηχανισμού. Τα ενεργοποιημένα Tregs χρησιμοποιούν granzyme B και περφορίνη για να καταστείλουν την επαγόμενη από τα NK κύτταρα ή/και τα CD8+ T κύτταρα αντικαρκινική δράση in vivo. Τα κυτταροτοξικά Τ λεμφοκύτταρα (CD8+ T cells) και τα κύτταρα φυσικοί φονείς (NK cells) χρησιμοποιούν το μονοπάτι perforin/ granzyme, καθώς και περφορίνη/ granzyme ανεξάρτητους μηχανισμούς για να θανατώσουν τα καρκινικά κύτταρα in vivo. Στα Tregs των ποντικών με έλλειψη granzyme B, απουσιάζει το απαραίτητο μόριο για την καταστολή της λειτουργίας των NKs και των CD8+ T κυττάρων. Ωστόσο τα Τ δραστικά κύτταρα (Teffs) μπορούν να χρησιμοποιήσουν εναλλακτικούς μηχανισμούς για να εξολοθρεύσουν τον όγκο, και συνεπώς αυτά τα ποντίκια είναι σχετικά ανθεκτικά στην ανάπτυξη όγκων. Τέλος, στα ποντίκια που απουσιάζει η περφορίνη ή και τα δύο ένζυμα (granzymes A και B), τόσο τα ρυθμιστικά όσο και τα δραστικά κύτταρα είναι μη λειτουργικά. Έτσι τα καρκινικά κύτταρα μπορούν να πολλαπλασιαστούν γιατί δεν καθίσταται δυνατόν να ελεγχθούν από τους εναλλακτικούς μηχανισμούς θανάτωσης των Τ δραστικών κυττάρων, παρόλο που δεν είναι κατεσταλμένα από τα Tregs. Συνεπώς τα Τ ρυθμιστικά κύτταρα φαίνεται ότι καταστέλλουν την ικανότητα των NK και των κυτταροτοξικών Τ κυττάρων (CTLs) να εξολοθρεύσουν τον όγκο μέσω θανάτωσης των καρκινικών κυττάρων με χρήση των οδών περφορίνης και granzyme- B. [91]



Εικόνα 36. Τα Τ κύτταρα διηθούν τον όγκο και αποτελούν βασικό στοιχείο της αντικαρκινικής δραστηριότητας. Παράγων κλειδί στην διευκόλυνση του όγκου να αποφύγει το ανοσοποιητικό σύστημα είναι η μεσολαβούμενη από τα Tregs ανοσοκαταστολή. Τα Tregs εμπλουτίζουν το αίμα, τις κακοήθεις συλλογές

(πλευριτικές, ασκτικές), λεμφαδένες και ιστούς διηθημένους από διάφορους τύπους καρκίνου, δείχνοντας ότι το μικροπεριβάλλον του όγκου μπορεί να ενισχύσει την ανοσολογική ανοχή, προσελκύοντας ή/και επάγοντας κυρίαρχα κατασταλτικά κύτταρα. Τροποποιημένη εικόνα από Zou W. et al. (169)

Σημαντικό ρόλο στην επαγωγή των ειδικών για τον όγκο Tregs διαδραματίζουν τα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα (APC), όπως τα ανώριμα δένδριτικά κύτταρα, τα οποία μετατρέπουν τα παρθένα T κύτταρα σε T ρυθμιστικά κύτταρα. Αυτά τα δένδριτικά κύτταρα παρουσιάζουν αντιγόνα προερχόμενα είτε από πρωτεΐνες που εκκρίνονται από τα καρκινικά κύτταρα είτε από καρκινικά κύτταρα που αποπίπτουν. Επίσης μικροκυστίδια που απελευθερώνονται από τον όγκο, μπορούν να παγιδευτούν από τα δένδριτικά κύτταρα και να χρησιμοποιηθούν για αντιγονοπαρουσίαση, επάγοντας με αυτό τον τρόπο την ανάπτυξη και την ενεργοποίηση των Tregs. [131] Το 2003 οι Yamazaki et al έδειξαν ότι με την προσθήκη υψηλού αριθμού δένδριτικών κυττάρων προκλήθηκε εκτεταμένος πολλαπλασιασμός των CD25⁺CD4⁺ T κυττάρων σε ένα αντιγονο-εξαρτώμενο μοντέλο, ακόμα και απουσία εξωγενούς IL-2. Επίσης τα δένδριτικά κύτταρα μπορούσαν να επάγουν την αύξηση των CD25⁺ CD4⁺ T κυττάρων ακόμα και απουσία ειδικού αντιγόνου αλλά με παρουσία εξωγενούς IL-2. Η ικανότητα αυτή των δένδριτικών κυττάρων να προκαλούν αύξηση του πληθυσμού των CD25⁺ CD4⁺ T κυττάρων, παρέχει στα δένδριτικά κύτταρα ένα πρόσθετο μηχανισμό ρύθμισης της αυτοανοσίας και άλλων ανοσολογικών απαντήσεων. [135] Ακολούθως το 2005 οι Ghiringhelli et al έδειξαν ότι κατά τη διάρκεια της εξέλιξης του όγκου, ένας υποπληθυσμός των δένδριτικών κυττάρων επιλεκτικά προάγει τον πολλαπλασιασμό των Tregs με τρόπο εξαρτώμενο από τον TGF-β. Τα καρκινικά κύτταρα είναι αναγκαία και επαρκή για να μετατρέψουν τα δένδριτικά κύτταρα σε ρυθμιστικά κύτταρα που εκκρίνουν TGF-β και να διεγείρουν τον πολλαπλασιασμό των Tregs. [107] Οι Zhou και Levitsky το 2007 έδειξαν ότι η παρουσία παρθένων T ρυθμιστικών κυττάρων οδήγησε σε υψηλότερη συχνότητα CD25⁺GITR^{high}Foxp3⁺ κυττάρων συγκριτικά με τη συχνότητα των ανωτέρω όταν απουσίαζαν τα παρθένα T ρυθμιστικά κύτταρα. Αυτή η αύξηση μπορεί να οφείλεται σε άμεση επέκταση των παρθένων Tregs ή σε ενίσχυση της μετατροπής των επαγόμενων Tregs από παρθένα κύτταρα, παρουσία παρθένων Tregs. Η μετατροπή των παρθένων κυττάρων σε επαγόμενα Tregs είναι εγγενής, παρουσία όγκου, ενώ τα προϋπάρχοντα παρθένα Tregs δεν επηρεάζουν το βαθμό της μετατροπής σε επαγόμενα Tregs, αλλά περιορίζουν σημαντικά την απάντηση των παρθένων κυττάρων του ξενιστή. [135]



Εικόνα 37. Μοντέλο επαγωγής των Tregs και επέκτασης των παρθένων Tregs στο περιβάλλον του όγκου. Τα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα (APC), πιθανώς μέσω παραγόντων προερχόμενων από τον όγκο, όπως VEGF, IL-10, και TGF- β , μπορούν να αποκτήσουν αντιγόνα του όγκου και να τα παρουσιάσουν σε παρθένα CD4⁺ T κύτταρα. Αυτή η αντιγονική έκθεση μετατρέπει κάποια παρθένα κύτταρα σε επαγόμενα T ρυθμιστικά κύτταρα (iTregs). Ο εμβολιασμός επεκτείνει τα iTregs και ενισχύει τα προϋπάρχοντα φυσικά Tregs (nTregs). Τροποποιημένη εικόνα από G. Zhou et H. I. Levitsky. (135)

Το 2005 οι Huehn και Hamann περιέγραψαν την μετανάστευση των Tregs σε πάσχοντες από κακοήθεια. Ανέδειξαν ότι στους ανωτέρω ασθενείς, τα Tregs συσσωρεύονται στον όγκο και στην ασκτική συλλογή αλλά σπάνια εισέρχονται στους λεμφαδένες στα τελευταία στάδια της νόσου. Αυτή η συσσώρευση των Tregs εντός του όγκου οδήγησε σε μειωμένη επιβίωση των ασθενών, καταδεικνύοντας αποτελεσματική καταστολή των αντικαρκινικών απαντήσεων απευθείας εντός του όγκου. [108]

Το 2009 οι Zhou et al μελέτησαν τους μηχανισμούς συσσώρευσης των Foxp3⁺ Tregs εντός του όγκου σε ασθενείς με ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα (ΗΚΚ) καθώς και την προγνωστική αξία της συσσώρευσης αυτής. Επιπροσθέτως της αύξησης του αριθμού των κυκλοφορούντων Foxp3⁺ Tregs, ανέδειξαν συσσώρευση των Foxp3⁺ Tregs στην περιοχή του όγκου, όπου προκαλούσαν καταστολή της ενεργοποίησης των προερχόμενων από τον ιστό CD4⁺CD25⁻ T κυττάρων, προάγοντας την πρόοδο της νόσου και φτωχή πρόγνωση σε ασθενείς με ΗΚΚ. Επιπλέον, η παρουσία των Foxp3⁺ Tregs εντός του όγκου, σχετίστηκε με αύξηση των μακροφάγων. Παρατηρήθηκε επίσης ότι η εξάντληση των ιστικών μακροφάγων, μείωσε τη

συσσώρευση των Foxp3+ Tregs του ήπατος. Αντιθέτως, η έκθεση μακροφάγων σε καλλιέργεια κυττάρων όγκου προερχόμενα από ήπατωμα, αύξησε τα επίπεδα των Foxp3+ Tregs in vitro. Αυτή η αύξηση, αναχαιτίστηκε μερικώς με την προσθήκη αντισώματος έναντι της IL-10. Με αυτό τον τρόπο έδειξαν ότι τα μακροφάγα που σχετίζονται με τον όγκο μπορούν να πυροδοτήσουν αύξηση των Foxp3+ Tregs εντός του όγκου, τα οποία με τη σειρά τους προκαλούν πρόοδο καρκινικής νόσου. [136]

Οι Darrasse-Jeze et al για να ελέγξουν την αιτία της ανοχής στους όγκους και αν αυτή οφείλεται σε ανισορροπία μεταξύ των T ρυθμιστικών και των T δραστικών (Teffs) κυττάρων, λόγω καθυστερημένης ανάπτυξης και ενεργοποίησης, μετέφεραν μεγάλο αριθμό ειδικών Teffs για συγκεκριμένο αντιγόνο σε ποντίκια που φέρουν καρκινικά κύτταρα που εκφράζουν το αντιγόνο αυτό και παρατήρησαν πλήρη ύφεση στα ανωτέρω ποντίκια. Τα ενεργοποιημένα/ μνήμης T δραστικά λεμφοκύτταρα ήταν ικανά να εκριζώσουν όγκους, ανεξαρτήτως του αριθμού των Tregs που υπήρχαν στα ποντίκια. Ακόμα και η μεταφορά ειδικών για τον όγκο ιδιαιτέρως κατασταλτικών Tregs δεν ήταν ικανή να αντιστρέψει την αντικαρκινική απάντηση των κυττάρων μνήμης. [137]

Οι Nishikawa et al παρατήρησαν ότι τα κύτταρα που ήταν ανθεκτικά στην καταστολή που προέρχεται από τα Tregs ήταν CD45RO+ αλλά όχι CD45RA+ ειδικά για τον όγκο CD4+ T κύτταρα. Αυτή η αντίσταση μπορεί να οφείλεται στο γεγονός ότι τα ενεργοποιημένα Tregs ρυθμίζουν την έκφραση των συνδιεγερτικών μορίων από τα δενδριτικά κύτταρα, αλλά η ενεργοποίηση / δράση των ενεργοποιημένων T δραστικών κυττάρων μνήμης είναι λιγότερο εξαρτημένη από τα συνδιεγερτικά μόρια συγκριτικά με αυτή των παρθένων T κυττάρων. Ο συγκερασμός των ανωτέρω καταδεικνύει ότι τα αντικαρκινικά T δραστικά κύτταρα μνήμης μπορούν εκ φύσεως να είναι πιο ανθεκτικά από τα Tregs και εξηγεί τη συσχέτιση της ανίχνευσης των ενεργοποιημένων Teffs μνήμης με την καλή πρόγνωση σε ασθενείς που πάσχουν από κακοήθεια. [138, 139]

4.5 Τ ΡΥΘΜΙΣΤΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ ΣΤΗΝ ΟΞΕΙΑ ΜΥΕΛΟΓΕΝΗ ΛΕΥΧΑΙΜΙΑ (ΟΜΛ)

Το μικροπεριβάλλον στην οξεία μυελογενή λευχαιμία όπως ανέδειξαν οι Buggins et al εμφανίζει κατασταλτική δράση έναντι των T κυττάρων. Πιο συγκεκριμένα έδειξαν ότι το υπερκείμενο των λευχαιμικών κυττάρων μυελικής σειράς καταστέλλει την ενεργοποίηση των T κυττάρων και την παραγωγή κυτοκινών από τα T βοηθητικά κύτταρα, ενώ εμποδίζει τα ήδη ενεργοποιημένα T κύτταρα να εισέλθουν στον

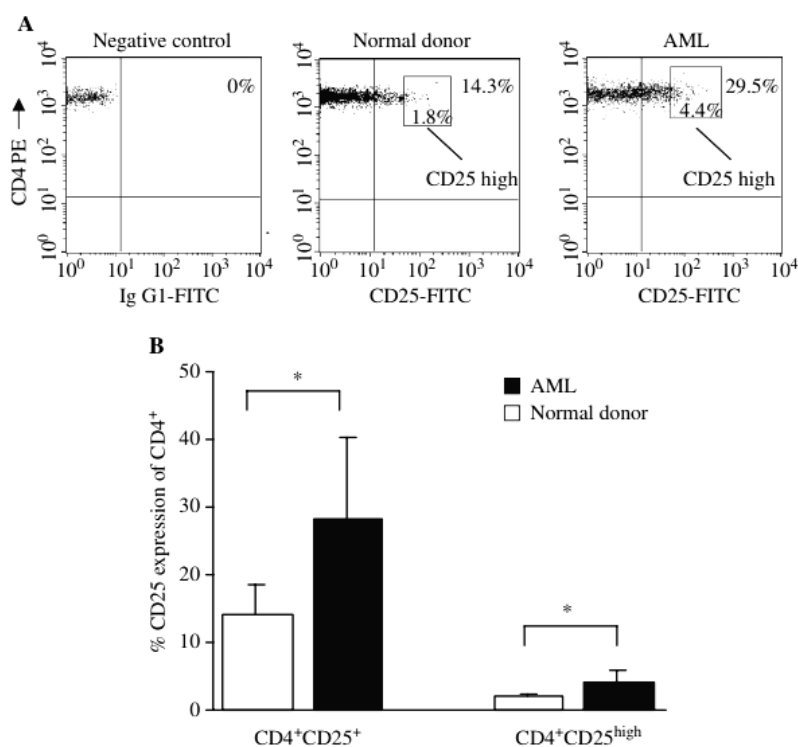
κυτταρικό κύκλο, χωρίς να απαιτείται επαφή των T κυττάρων με τα λευχαιμικά κύτταρα για την καταστολή αυτή. Με αυτό τον τρόπο παρέχεται ένας μηχανισμός διαφυγής του λευχαιμικού κλώνου από τη μεσολαβούμενη από τα T κύτταρα θανάτωση. [140]

Τα CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ T ρυθμιστικά λεμφοκύτταρα αποτελούν το 30% των CD4⁺ T κυττάρων του μυελού των οστών [141] και παρέχουν μία ανοσολογικά προνομιούχο περιοχή στο μυελό των οστών, όπου προστατεύει τα αρχέγονα αιμοποιητικά κύτταρα από καταστροφή μέσω του ανοσοποιητικού συστήματος. [142] Ακόμη, τα T ρυθμιστικά λεμφοκύτταρα καταστέλλουν τη δημιουργία αποικιών και τη μυελική διαφοροποίηση του αρχέγονου αιμοποιητικού κυττάρου. [143] Κατά τη διάρκεια της ομοιόστασης επηρεάζουν τον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση των αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων μέσω ρύθμισης των κυττοκινών στο μυελό των οστών. Επιπροσθέτως, τα ρυθμιστικά αυτά κύτταρα καταστέλλουν τα T δραστικά κύτταρα (Teffs), καταστέλλουν τον πολλαπλασιασμό των παρθένων T κυττάρων και την αντιγονοεξαρτώμενη ανοσολογική απόκριση έναντι του λευχαιμικού βλαστικού κυττάρου, συμβάλλοντας στην εξέλιξη της νόσου. [144]

Οι Ustun et al έδειξαν ότι η σχέση των T ρυθμιστικών κυττάρων (Tregs) με τα βλαστικά κύτταρα στο μυελό των οστών είναι αμφίδρομη. Τα Tregs προστατεύουν τα βλαστικά κύτταρα από την απάντηση του ανοσοποιητικού συστήματος και τα βλαστικά κύτταρα προάγουν τη δημιουργία των Tregs. Σε ασθενείς με ΟΜΛ όπου οι μυελοβλάστες εκφράζουν IDO (indoleamine 2,3-dioxygenase), παρατηρήθηκε αυξημένος αριθμός Tregs συγκριτικά με ασθενείς με αρνητικούς για IDO μυελοβλάστες. Τα αυξημένα Tregs στους ανωτέρω ασθενείς προκαλούσαν καταστολή του πολλαπλασιασμού των παρθένων T κυττάρων και της ωρίμανσης των δενδριτικών κυττάρων, με αποτέλεσμα την περιορισμένη επαγωγή των κυτταροτοξικών δραστικών κυττάρων. Επιπροσθέτως, τα Tregs εκφράζουν στην επιφάνειά τους τον υποδοχέα PD-1 (programmed death-1) ενώ τα λευχαιμικά κύτταρα εκφράζουν το συνδότη του ανωτέρου υποδοχέα (PD-L1), προάγοντας με αυτό τον τρόπο την ανάπτυξη, τη διατήρηση και τη λειτουργία των Tregs. [145]

Οι Wang et al το 2005 παρατήρησαν ότι η αναλογία των CD4⁺CD25^{hi} T κυττάρων στο περιφερικό αίμα και στο μυελό των οστών των πασχόντων από οξεία μυελογενή λευχαιμία είναι αυξημένη συγκριτικά με αυτή των υγιών μαρτύρων. [Εικόνα 38] Έδειξαν επίσης ότι τα κύτταρα αυτά που απομονώθηκαν δύνανται να ρυθμίσουν την παραγωγή κυττοκινών καθώς και να καταστείλουν τα CD4⁺CD25⁻ T κύτταρα in vitro.

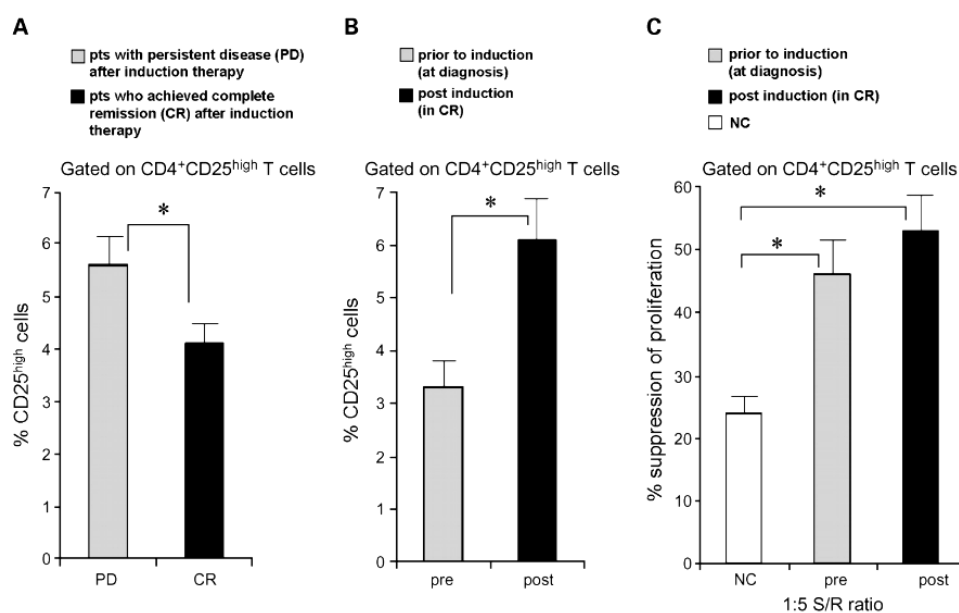
Οι παρατηρήσεις αυτές συνηγορούν στο γεγονός ότι τα $CD4^+CD25^{hi}$ T λεμφοκύτταρα που απομονώθηκαν στους πάσχοντες από οξεία μυελογενή λευχαιμία είναι όμοια με τα T ρυθμιστικά λεμφοκύτταρα (Tregs). Τα Tregs δύνανται να καταστείλουν την ενεργοποίηση και τον πολλαπλασιασμό των άλλων $CD4^+$ και $CD8^+$ κυττάρων μέσω επαφής των κυττάρων και με τρόπο ανεξάρτητο από την παραγωγή ανοσοκατασταλτικών κυττοκινών. Αρκετοί είναι οι πιθανοί αιτιολογικοί παράγοντες για την ανεύρεση υψηλών Tregs στους πάσχοντες από ΟΜΛ. Οι Wang et al στην ίδια μελέτη έδειξαν το ποσοστό της απόπτωσης των $CD4^+CD25^{hi}$ T κυττάρων ήταν μικρότερο συγκριτικά με αυτό των $CD4^+CD25^{lo}$ και $CD4^+CD25^{-}$ T κυττάρων σε υγιείς μάρτυρες. Ωστόσο παρόλο που η συχνότητα των $CD4^+CD25^{hi}$ Tregs στους πάσχοντες από ΟΜΛ ήταν αυξημένη, το αποπτωτικό κλάσμα των κυττάρων αυτών ήταν παραδόξως αυξημένο συγκριτικά με αυτό των υγιών μαρτύρων. Αυξημένη βέβαια ήταν και η επαγωγή των Tregs από τα δενδριτικά κύτταρα που ανιχνεύονται σε περίσσεια στο περιφερικό αίμα των πασχόντων από ΟΜΛ. Τα ανωτέρω είναι ενδεικτικά αυξημένης ανανέωσης των Tregs στους πάσχοντες από ΟΜΛ. [146]



Εικόνα 38. Σύγκριση των Tregs ($CD4^+CD25^{hi}$) σε πάσχοντες από ΟΜΛ και υγιείς δότες. Τροποποιημένη εικόνα από Wang X et al. (146)

Ακολούθως το 2009 ο Szczepanski και οι συνεργάτες του εκτίμησαν το ποσοστό, το φαινότυπο και τα λειτουργικά χαρακτηριστικά των Tregs που ανιχνεύθηκαν στο

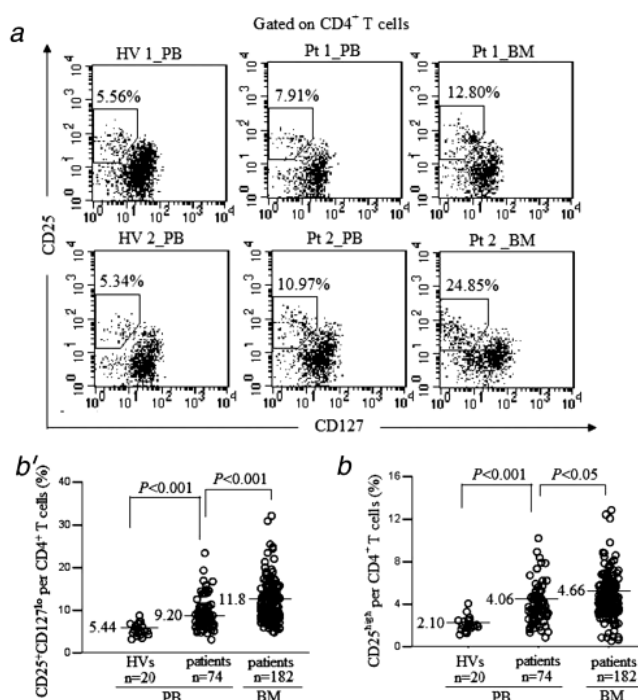
περιφερικό αίμα πασχόντων από ΟΜΛ τόσο κατά τη διάγνωση όσο και μετά τη χημειοθεραπευτική αγωγή εφόδου, σε όσους ασθενείς πέτυχαν πλήρη ύφεση του νοσήματος μετά την αγωγή αυτή. Παρατήρησαν ότι εν συγκρίσει με τους υγιείς μάρτυρες, οι ασθενείς με νεοδιαγνωσμένη ΟΜΛ παρουσίαζαν αυξημένη συχνότητα Tregs στο περιφερικό αίμα. Παρατήρησαν επίσης ότι οι ασθενείς που πέτυχαν πλήρη ύφεση μετά τη χημειοθεραπεία εφόδου είχαν σημαντικά μικρότερα ποσοστά Tregs στη διάγνωση συγκριτικά με τους ασθενείς που δεν ανταποκρίθηκαν και είχαν ανθεκτική νόσο. Ωστόσο το ποσοστό των Tregs ανευρέθη αυξημένο στους ασθενείς μετά την επίτευξη ύφεσης μετά την αγωγή εφόδου συγκριτικά με το ποσοστό στη διάγνωση και συγκριτικά με τους υγιείς, ενώ υψηλή παρέμεινε και η κατασταλτική δραστηριότητα των Tregs. (Εικόνα 39) Μία πιθανή εξήγηση είναι ότι ο αριθμός των Tregs μετά τη θεραπεία αντικατοπτρίζει δευτερογενή απάντηση στη φλεγμονή που προκλήθηκε μέσω της χημειοθεραπευτικής αγωγής και της έκκρισης κυττοκινών, προάγοντας τον πολλαπλασιασμό των περιφερικών Tregs. [147]



Εικόνα 39. Ποσοστό και ικανότητα καταστολής των Tregs σε πάσχοντες από ΟΜΛ στη διάγνωση και μετά την επίτευξη πλήρους ύφεσης συνέπεια της αγωγής εφόδου. Τροποποιημένη εικόνα από Miroslaw J. Szczepanski et al. (147)

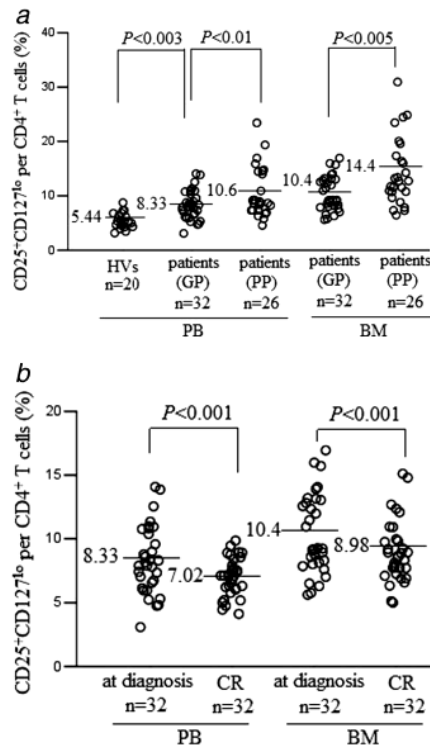
Ο Shenghui και οι συνεργάτες του το 2010 μελέτησαν το ποσοστό των Tregs σε πάσχοντες από ΟΜΛ αλλά και την προγνωστική σημασία του ποσοστού αυτού. Για τον προσδιορισμό των Tregs ωστόσο δεν περιορίστηκαν στη χρήση των δεικτών CD4 και CD25 και την επιλογή των CD4⁺CD25^{hi} T κυτάρων όπως οι ερευνητικές ομάδες των Wang και Szczepanski, αλλά πρόσθεσαν και το δείκτη CD127. Πιο

συγκεκριμένα μελέτησαν το ποσοστό των $CD4^+CD25^+CD127^{lo}$ Tregs στο μυελό των οστών και στο περιφερικό αίμα 182 ασθενών με νεοδιαγνωσθείσα ΟΜΛ και το συνέκριναν με την έκβαση του νοσήματος αλλά και με το ποσοστό σε υγιείς εθελοντές. Παρατήρησαν ότι το ποσοστό των Tregs στο μυελό των οστών των ασθενών ήταν σημαντικά αυξημένο συγκριτικά με αυτό στο περιφερικό αίμα των ίδιων, ενδεικτικό της προτίμησης των Tregs να συσσωρεύονται στο μυελό των οστών. Επίσης η σύγκριση των κυκλοφορούντων Tregs των πασχόντων με αυτά των εθελοντών, έδειξε ήπια αλλά σημαντική αύξηση στην ομάδα των πασχόντων. (Εικόνα 40)



Εικόνα 40. Προτίμηση των Tregs να συσσωρεύονται στο μυελό των οστών (BM) συγκριτικά με το περιφερικό αίμα (PB) και αυξημένο ποσοστό σε ασθενείς συγκριτικά με υγιείς δότες (HV). Τροποποιημένη εικόνα από Shenghui Z et al. (148)

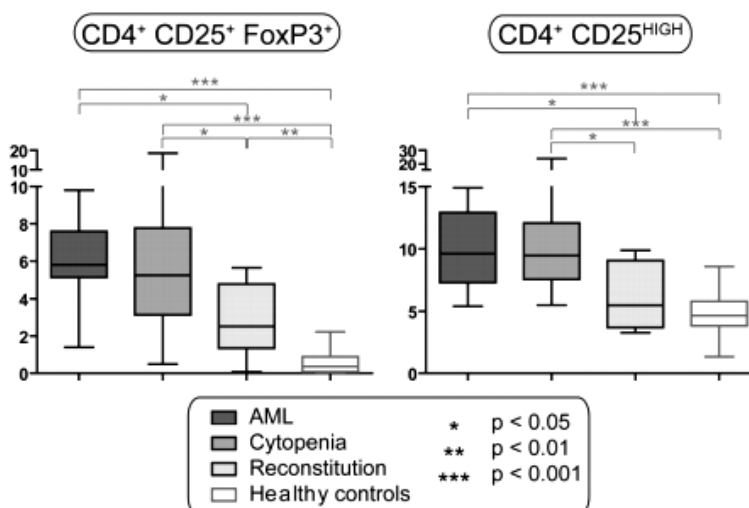
Στη σύγκριση των πασχόντων που πέτυχαν πλήρη ύφεση μετά τη θεραπεία με τους πάσχοντες με ανθεκτική νόσο, το ποσοστό των Tregs στη διάγνωση ήταν χαμηλότερο στην πρώτη ομάδα. (Εικόνα 41) Επιπροσθέτως παρατηρήθηκε αυξημένη κατασταλτική ικανότητα των Tregs που απομονώθηκαν από το μυελό των οστών των ασθενών συγκριτικά με αυτά που απομονώθηκαν από το περιφερικό αίμα ή από υγιείς εθελοντές. [148]



Εικόνα 41. Τα Tregs στη διάγνωση πασχόντων από καλής πρόγνωσης ΟΜΛ (GP) που πέτυχαν πλήρη ύφεση (CR) σε σύγκριση με πάσχοντες από κακής πρόγνωσης νόσημα (PP) και υγιείς δότες (HV). Τροποποιημένη εικόνα από Shenghui Z et al. (148)

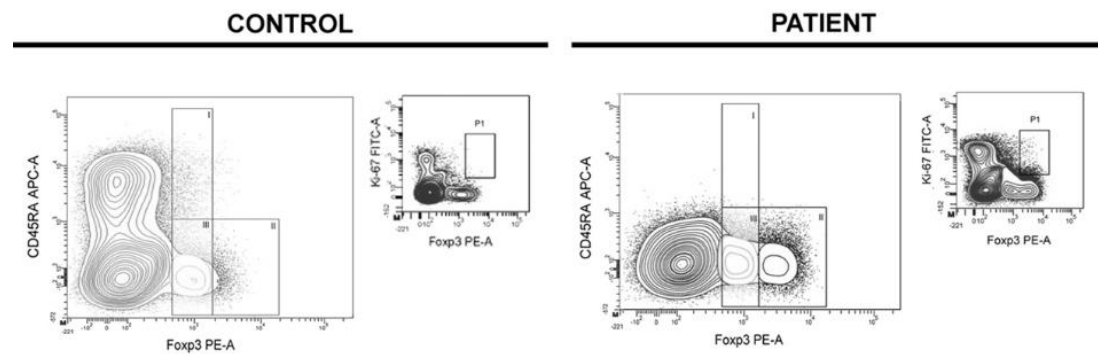
Την ίδια χρονική περίοδο ο Ersvaer και οι συνεργάτες του μελέτησαν την κατανομή των υποπληθυσμών των Τ λεμφοκυττάρων σε 20 πάσχοντες από ΟΜΛ πριν την έναρξη χημειοθεραπευτικής αγωγής, κατά τη διάρκεια της κυτταροπενίας που ακολουθεί την αγωγή και κατά την αποκατάσταση της αιμοποίησης μετά τη θεραπεία. Οι υποπληθυσμοί που μελετήθηκαν ήταν τα λεμφοκύτταρα που εκκρίνουν IFN γ , CD8⁺ κυτταροτοξικά Τ (TC1) και CD4⁺ βοηθητικά Τ (TH1), τα CD4⁺ βοηθητικά Τ που εκκρίνουν IL17-A (TH17) και τα CD4⁺ CD25⁺ FoxP3⁺ ρυθμιστικά Τ λεμφοκύτταρα (Tregs). Η κατανομή των προαναφερθέντων υποπληθυσμών των Τ κυττάρων σε πάσχοντες από ΟΜΛ στο στάδιο της κυτταροπενίας μετά τη χημειοθεραπεία συγκρίθηκε με αυτή σε ασθενείς που δεν έχουν λάβει θεραπεία ή που βρίσκονται στο στάδιο της αποκατάστασης της αιμοποίησης και σε υγιείς εθελοντές. Οι ασθενείς στο στάδιο της κυτταροπενίας εμφάνισαν αυξημένα επίπεδα κυκλοφορούντων Tregs, ενώ τα επίπεδα των TC1 και TH1 κυττάρων ήταν μειωμένα. Μόνο τα επίπεδα των TH17 κυττάρων έμειναν αμετάβλητα. Τα επίπεδα των nTregs καθορίστηκαν από το φαινότυπο CD3⁺CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ και ήταν αυξημένα στους ασθενείς που είτε δεν είχαν λάβει θεραπεία είτε βρίσκονταν στο στάδιο της κυτταροπενίας, ενώ στο στάδιο της αποκατάστασης της αιμοποίησης παρουσίασαν

σημαντική μείωση, παραμένοντας ωστόσο υψηλότερα από αυτά της ομάδας ελέγχου. (Εικόνα 42) Συνέπεια των ανωτέρω σύμφωνα με τους ερευνητές είναι ότι τα Tregs παρουσιάζουν σχετική ανθεκτικότητα στη χημειοθεραπευτική αγωγή, καθώς υψηλά επίπεδα Tregs ανιχνεύονται ακόμα και στη διάρκεια της κυτταροπενίας. [149]



Εικόνα 42. Σύγκριση των κυκλοφορούντων Tregs σε πάσχοντες από ΟΜΛ και υγιείς εθελοντές. Τροποποιημένη εικόνα από Ersvaer E et al. (149)

Ο Kanakry και οι συνεργάτες του κατέγραψαν τον τύπο των λεμφοκυττάρων που επικρατούν στο περιφερικό αίμα πασχόντων από ΟΜΛ στο στάδιο της αποκατάστασης της αιμοποίησης μετά τη χημειοθεραπευτική αγωγή εφόδου. Τα Τ λεμφοκύτταρα που επικρατούσαν ήταν κυρίως CD4+, με μεγάλο ποσοστό αυτών να είναι CD3⁺CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Τ κύτταρα. Τα κύτταρα αυτά φαινοτυπικά ήταν ενεργοποιημένα Τ ρυθμιστικά λεμφοκύτταρα CD45RA⁻Foxp3^{hi}CD27⁺GITR⁺ και παρουσίαζαν ισχυρή κατασταλτική δράση. (Εικόνα 43) Η αύξηση αυτή των Tregs μετά τη χημειοθεραπεία εφόδου μπορεί σύμφωνα με τους ερευνητές να οφείλεται είτε σε ανάπτυξη των εξαρτώμενων από το θύμο Τ κυττάρων, είτε σε έκπτωση των κυκλοφορούντων στην περιφέρεια Τ κυττάρων που επιβίωσαν της χημειοθεραπείας. [150]

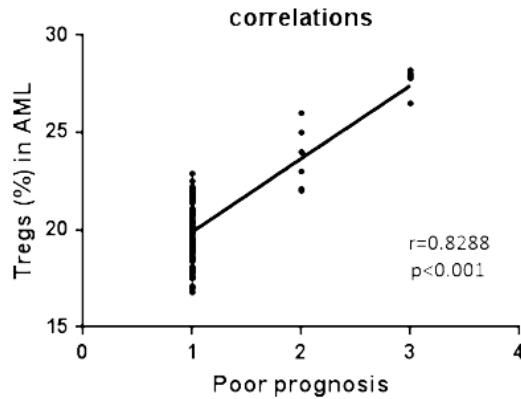


SUBSET ANALYSIS

Fraction	Subset	Controls (n= 4)				Patients (n= 4)			
		A	B	C	D	A	B	C	D
I	Naïve T regs	0.15	0.47	1.17	0.56	0	0	0	0
II	Activated T regs	0.33	0.93	1.53	2.85	8.9	9.8	7.9	8.5
III	Activated effector T cells	2.31	3.94	2.33	2.91	2.9	4.7	0.3	2.9
	Ki-67+Foxp3 ^{hi} Proliferating activated T regs	0.05	0.19	0.25	0.42	12.9	14.4	5.2	12.3

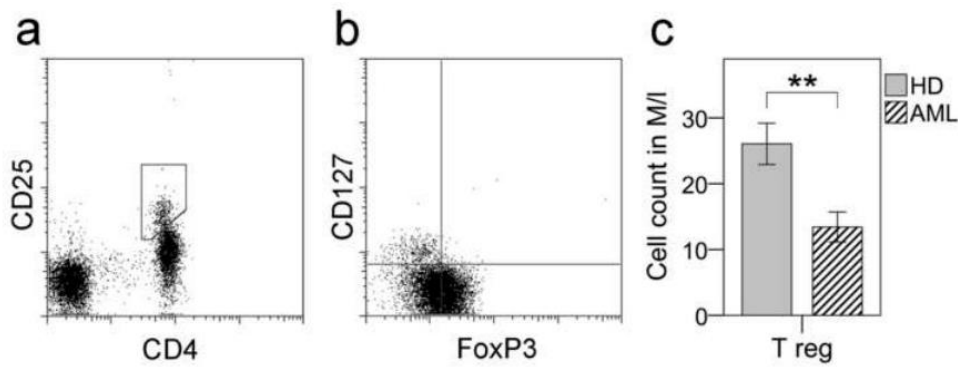
Εικόνα 43. Τα Foxp3⁺ T κύτταρα που επικρατούν στο στάδιο της αποκατάστασης της αιμοποίησης μετά την αγωγή εφόδου εμφανίζουν φαινότυπο ενεργοποιημένου Treg. Τροποποιημένη εικόνα από Christopher G. Kanakry et al. (150)

Οι ανωτέρω μελέτες περιλάμβαναν ασθενείς με ΟΜΛ στο στάδιο της διάγνωσης ή της αποκατάστασης της αιμοποίησης μετά τη χημειοθεραπεία εφόδου ή σε πλήρη ύφεση του νοσήματος. Ωστόσο δεν είχαν συσχετιστεί τα επίπεδα των Tregs με την έκβαση της χημειοθεραπευτικής αγωγής, έως ότου οι Yang και Xu μελετήσουν το ποσοστό των κυκλοφορούντων στο περιφερικό αίμα CD4⁺CD25⁺CD127^{lo} Tregs σε ασθενείς πάσχοντες από ΟΜΛ τόσο στη διάγνωση όσο και μετά τη θεραπεία εφόδου σε ασθενείς με νόσημα σε πλήρη ύφεση ή ανθεκτικό στη θεραπεία ή σε υποτροπή. Εν συγκρίσει με υγιείς εθελοντές, οι πάσχοντες από ΟΜΛ παρουσίαζαν αυξημένα ποσοστά Tregs στο περιφερικό αίμα κατά τη διάγνωση. Παρατηρήθηκε επίσης ότι το ποσοστό των Tregs σε ασθενείς που το νόσημά τους τέθηκε σε πλήρη ύφεση ήταν σημαντικά μειωμένο μετά από έξι κύκλους χημειοθεραπευτικής αγωγής σε σύγκριση με το ποσοστό στη διάγνωση του νοσήματος. Αντιθέτως σε πάσχοντες από ανθεκτικό ή υποτροπιάζον νόσημα δεν υπήρχε σημαντική διαφοροποίηση του ποσοστού των Tregs μετά από έξι κύκλους αγωγής. Τα αποτελέσματα αυτά σύμφωνα με τους ερευνητές συνηγορούν στο γεγονός ότι οι ασθενείς με υψηλό αριθμό Tregs στο περιφερικό αίμα έχουν μειωμένη ευαισθησία στη χημειοθεραπευτική αγωγή και προτείνουν τη μέτρηση του αριθμού των Tregs κατά τη διάγνωση ως προγνωστικό δείκτη του νοσήματος. (Εικόνα 44) [151]



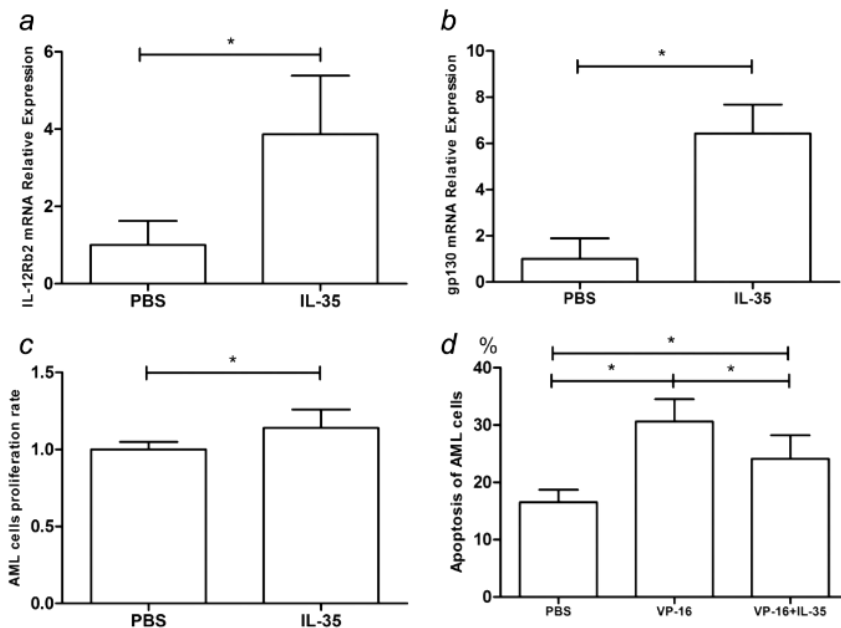
Εικόνα 44. Συσχετισμός Tregs με πρόγνωση νοσήματος. Υψηλά επίπεδα Tregs σχετίζονται με φτωχή πρόγνωση στους πάσχοντες από ΟΜΛ. Τροποποιημένη εικόνα από Yang W et al. (151)

Εν αντιθέσει με τις προαναφερθείσες μελέτες όπου τα επίπεδα των Tregs στους πάσχοντες από ΟΜΛ ήταν αυξημένα συγκριτικά με αυτά στους υγιείς δότες, ακόμα και μετά την επίτευξη πλήρους ύφεσης, ο Lichtenegger και οι συνεργάτες του έδειξαν ότι ο αριθμός των Tregs στους πάσχοντες από ΟΜΛ σε πλήρη ύφεση ήταν μειωμένος συγκριτικά με αυτόν στην ομάδα ελέγχου. Αναλυτικότερα σε δείγμα περιφερικού αίματος ασθενών με ΟΜΛ σε πλήρη ύφεση μετρήθηκε ο συνολικός αριθμός των T κυττάρων (CD3+), ο αριθμός των CD4+ κυττάρων, των CD8+ κυττάρων, των Tregs (CD4⁺CD25^{hi}Foxp3⁺CD127^{lo}) και των NK κυττάρων πριν και κατά τη διάρκεια της χορήγησης θεραπείας συντήρησης. Πριν τη θεραπεία συντήρησης ο συνολικός αριθμός των T κυττάρων όπως και των CD4+ κυττάρων ήταν ελαφρώς μειωμένος, ενώ ο αριθμός των CD8+ κυττάρων δεν παρουσίασε σημαντική διαφοροποίηση. Σημαντική μείωση παρατηρήθηκε και στον αριθμό των Tregs και των NK κυττάρων, με τα τελευταία να εμφανίζουν μειωμένη λειτουργικότητα, σε σύγκριση με αυτά των υγιών εθελοντών. (Εικόνα 45) Κατά τη διάρκεια της θεραπείας συντήρησης παρατηρήθηκε περαιτέρω μείωση των NK κυττάρων, σε αντίθεση με τα υπόλοιπα υπό μελέτη κύτταρα όπου παρατηρήθηκε αύξηση του αριθμού τους, με πιο προφανή την αύξηση των Tregs που τριπλασίασαν το ποσοστό τους. [152]



Εικόνα 45. Μειωμένα επίπεδα των Tregs σε πάσχοντες από ΟΜΛ σε πλήρη ύφεση πριν τη θεραπεία συντήρησης συγκριτικά με τα επίπεδα σε υγιείς δότες. Τροποποιημένη εικόνα από Lichtenegger FS et al. (152)

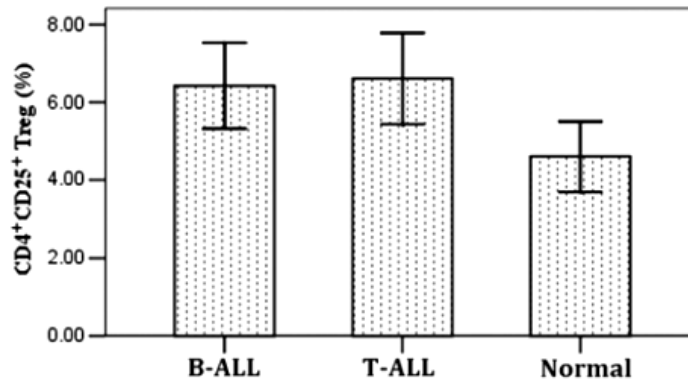
Ο Ταο και οι συνεργάτες του το 2015 μελέτησαν την έκφραση της παραγόμενης από τα Tregs IL-35 σε πάσχοντες από ΟΜΛ και την επίδρασή της στα βλαστικά κύτταρα. Αρχικά συνέκριναν το ποσοστό των κυκλοφορούντων Tregs σε 28 ασθενείς με νεοδιαγνωσθείσα ΟΜΛ και 30 υγιείς δότες, και έδειξαν ότι τα Tregs είναι σημαντικά αυξημένα στους πάσχοντες από ΟΜΛ. Έδειξαν επίσης ότι τα αυξημένα επίπεδα IL-35 που παρατηρήθηκαν στους ασθενείς σχετίζονταν με τα αυξημένα επίπεδα των Tregs. Η IL-35 προέρχεται από τα Tregs αλλά έχει και την ικανότητα να προάγει τη διαφοροποίηση και τον πολλαπλασιασμό των Tregs και να επάγει τη μετατροπή των συμβατικών T δραστικών κυττάρων σε επαγόμενα Tregs (iTRegs). Ακόμη παρατηρήθηκε ότι προήγαγε τον πολλαπλασιασμό των βλαστικών κυττάρων και κατέστειλε την απόπτωσή τους *in vitro*. (Εικόνα 46) Συνεπώς σύμφωνα με την παρούσα μελέτη η IL-35 στην ΟΜΛ προάγει τη διαφυγή των μυελοβλαστών από το ανοσοποιητικό σύστημα μέσω αύξησης των επιπέδων των Tregs, καταστολής των CD4+CD25- T δραστικών κυττάρων, αύξησης του πολλαπλασιασμού και μείωση της απόπτωσης των βλαστικών κυττάρων. [153]



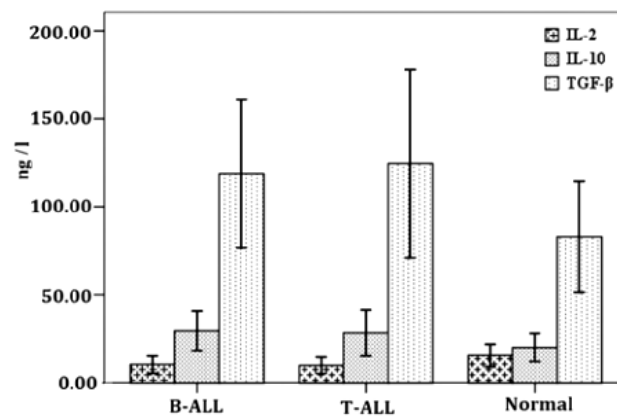
Εικόνα 46. Η επίδραση της IL-35 στην έκφραση των υποομάδων του υποδοχέα της IL-35R (IL-12Rβ2 και gp130) στα βλαστικά κύτταρα αλλά και στον πολλαπλασιασμό και την επαγόμενη από το μόριο VP-16 απόπτωση των μυελοβλαστών. Τροποποιημένη εικόνα από Tao Q et al. (153)

4.6 Τ ΡΥΘΜΙΣΤΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ ΣΤΗΝ ΟΞΕΙΑ ΛΕΜΦΟΒΛΑΣΤΙΚΗ ΛΕΥΧΑΙΜΙΑ (ΟΛΛ)

Εν αντιθέσει με τις μελέτες για τον προσδιορισμό των επιπέδων των Tregs στην οξεία μυελογενή λευχαιμία ελάχιστες μελέτες έχουν συμπεριλάβει πάσχοντες από οξεία λεμφοβλαστική λευχαιμία. Ο Wu και οι συνεργάτες του ήταν οι πρώτοι που μελέτησαν το 2011 το ποσοστό των T ρυθμιστικών κυττάρων στην οξεία λεμφοβλαστική λευχαιμία. Σε 35 πάσχοντες από νεοδιαγνωσθείσα ΟΛΛ (22 με Β-ΟΛΛ και 13 με Τ-ΟΛΛ) μέτρησαν το ποσοστό των κυκλοφορούντων στο περιφερικό αίμα CD4⁺CD25⁺ Tregs και το συνέκριναν με αυτό 18 εθελοντών δοτών. Παρατήρησαν ότι το ποσοστό των Tregs ήταν σημαντικά αυξημένο στους ασθενείς συγκριτικά με τους υγιείς, χωρίς ωστόσο να υπάρχει σημαντική διαφορά ανάλογα με τον τύπο της ΟΛΛ (Β ή Τ). (Εικόνα 47) Επίσης στις καλλιέργειες των ανωτέρω Tregs παρατηρήθηκε σημαντική μείωση της έκκρισης IL-2 και αύξηση της έκκρισης IL-10 και TGF-β συγκριτικά με τις εκκρινόμενες κυττοκίνες από τα Tregs των υγιών δοτών. (Εικόνα 48) Τα ανωτέρω ευρήματα σύμφωνα με τους ερευνητές είναι ενδεικτικά του μηχανισμού μέσω του οποίου τα Tregs προκαλούν καταστολή της ανοσολογικής απάντησης έναντι της οξείας λευχαιμίας. [154]



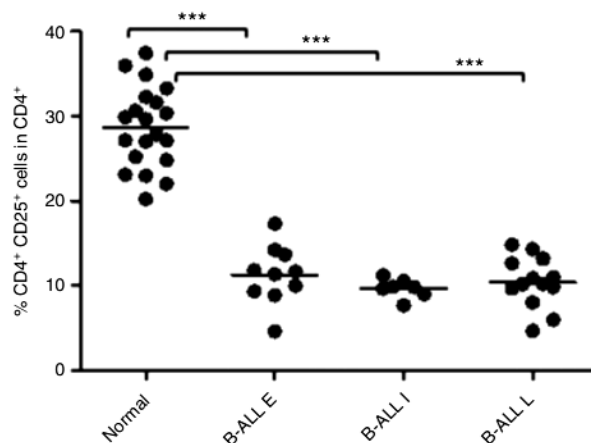
Εικόνα 47. Σύγκριση των Tregs σε πάσχοντες από T και B- ΟΛΛ και σε υγιείς δότες. Τροποποιημένη εικόνα από Wu CP et al. (154)



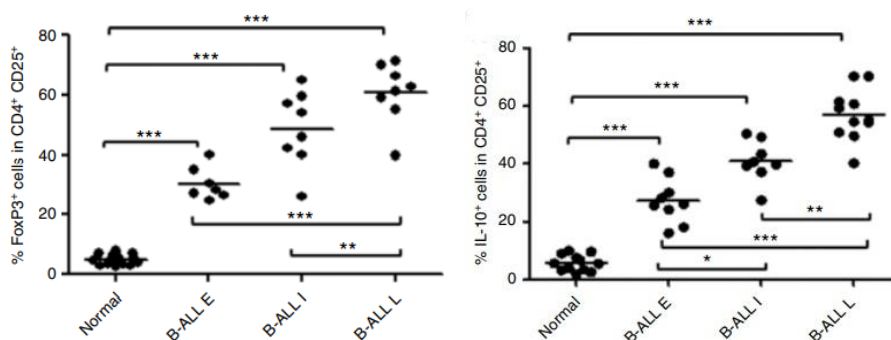
Εικόνα 48. Εκκρινόμενα επίπεδα IL-2, IL-10 και TGF-β σε πάσχοντες από T και B- ΟΛΛ και σε υγιείς δότες. Τροποποιημένη εικόνα από Wu CP et al. (154)

Εν αντιθέσει με τα αποτελέσματα των Wu et al, οι Bhattacharya et al έδειξαν ότι το ποσοστό των CD4+CD25+ T κυτάρων είναι μειωμένο στους πάσχοντες από νεοδιαγνωσθείσα Β-ΟΛΛ. Πιο συγκεκριμένα συνέκριναν τα επίπεδα των CD4+CD25+ T κυτάρων σε 54 ασθενείς στη φάση της διάγνωσης της Β-ΟΛΛ αλλά και στην επίτευξη της πλήρους ύφεσης με τα επίπεδα σε 35 υγιείς μάρτυρες. Παρατήρησαν ότι το ποσοστό των CD4+CD25+ Tregs ήταν μειωμένο στη διάγνωση του νοσήματος συγκριτικά με το ποσοστό στους υγιείς. (Εικόνα 49) Παρατήρησαν επίσης ότι αυτά τα T ρυθμιστικά κύτταρα εμφανίζουν αυξημένη έκφραση Foxp3 και IL-10 παρά το μειωμένο αριθμό τους. (Εικόνα 50) Αυτό είναι ενδεικτικό αυξημένης κατασταλτικής ικανότητας των Tregs που απομονώθηκαν από τους πάσχοντες συγκριτικά με αυτά που απομονώθηκαν από τους υγιείς. Με το πέρας της χημειοθεραπευτικής αγωγής για την ΟΛΛ ωστόσο, το ποσοστό των CD4+CD25+

κυττάρων αυξήθηκε εν συγκρίσει με το ποσοστό στη διάγνωση, και πλησίασε αυτό των υγιών εθελοντών μετά την επίτευξη πλήρους ύφεσης του νοσήματος. [155]

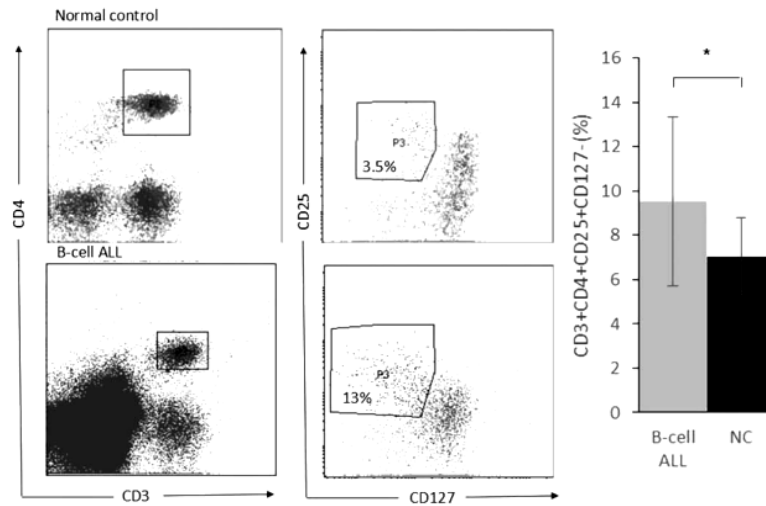


Εικόνα 49. Μειωμένο ποσοστό των CD4+CD25+ κυττάρων στους πάσχοντες από ΟΑΛ. Τροποποιημένη εικόνα από Bhattacharya K et al. (155)



Εικόνα 50. Αυξημένη έκφραση Foxp3 και IL-10 στα CD4+CD25+ κύτταρα των πασχόντων από ΟΑΛ. Τροποποιημένη εικόνα από Bhattacharya K et al. (155)

Οι Idris et al το 2015 μελέτησαν, όπως και οι Bhattacharya et al, τα επίπεδα των Tregs σε πάσχοντες από νεοδιαγνωσθείσα Β-ΟΑΛ. Για τον ανοσοφαινοτυπικό προσδιορισμό των Tregs επέλεξαν τα CD3+CD4+CD25+CD127⁻ κύτταρα. Συνέκριναν το ποσοστό των Tregs σε 17 ασθενείς πάσχοντες από Β-ΟΑΛ με το ποσοστό σε 35 υγιείς εθελοντές και ανέδειξαν σημαντική αύξηση αυτού στους πάσχοντες [156], παρατήρηση που ενισχύει τα ευρήματα της ερευνητικής ομάδας του Wu (Εικόνα 51) [154] και έρχεται σε αντίθεση με τα ευρήματα του Bhattacharya και των συνεργατών του.[155]



Εικόνα 51. Αυξημένο ποσοστό των Tregs σε πάσχοντες από Β-ΟΛΛ εν συγκρίσει με υγιείς εθελοντές. Τροποποιημένη εικόνα από Idris SZ et al. (156)

5. ΣΚΟΠΟΣ

Ο σκοπός της παρούσας ερευνητικής μελέτης είναι:

- I. Να αναδείξει την προγνωστική αξία των επιπέδων των ρυθμιστικών Τ λεμφοκυττάρων σε ασθενείς με νεοδιαγνωσθείσα Οξεία Λευχαιμία και τη συσχέτισή τους με ύφεση, υποτροπή, ανθεκτική νόσο ή ανιχνεύσιμη ελάχιστη υπολειμματική νόσο
- II. Να μελετήσει το ρόλο των Τ ρυθμιστικών κυττάρων στη λευχαιμογένεση καθώς και στην ικανότητα του ανοσοποιητικού συστήματος να παρεμποδίζει την εξέλιξη της νόσου
- III. Να μελετήσει τη συσχέτιση των επιπέδων των κυκλοφορούντων Τ ρυθμιστικών λεμφοκυττάρων με την ανταπόκριση στη χημειοθεραπευτική αγωγή και την επιβίωση σε ασθενείς με οξεία λευχαιμία
- IV. Να προτείνει ανοσοφαινοτυπικές προσεγγίσεις διάγνωσης και παρακολούθησης της νόσου που να πληρούν τα κριτήρια της ευαισθησίας και αξιοπιστίας, αλλά και να συμβαδίζουν με τις απαιτήσεις της σύγχρονης εποχής
- V. Να προτείνει την ανοσοφαινοτυπική στρατηγική προσδιορισμού των επιπέδων των Τ ρυθμιστικών λεμφοκυττάρων στο περιφερικό αίμα με την μέγιστη ευαισθησία

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

6. ΑΣΘΕΝΕΙΣ

Η παρούσα μελέτη περιλαμβάνει ασθενείς με Οξεία Λευχαιμία (Μυελογενή και Λεμφοβλαστική), οι οποίοι διαγνώστηκαν και τέθηκαν υπό παρακολούθηση από την Αιματολογική Κλινική του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Ιωαννίνων και το Αιματολογικό Εργαστήριο του ίδιου νοσοκομείου. Η πλειοψηφία των βιολογικών δειγμάτων προήλθε από την Αιματολογική Κλινική του Π.Γ.Ν. Ιωαννίνων, ενώ το υπόλοιπο υλικό συλλέχθηκε από τις Παθολογικές Κλινικές του Γενικού Νοσοκομείου Γ. Χατζηκώστα – Ιωαννίνων και του Γενικού Νοσοκομείου Κέρκυρας.

Μελετήθηκαν συνολικά 75 ασθενείς, 60 πάσχοντες από οξεία μυελογενή λευχαιμία και 15 πάσχοντες από οξεία λεμφοβλαστική λευχαιμία, κατά πλειοψηφία καταγόμενοι από την ευρύτερη περιοχή της Δυτικής Ελλάδας, οι οποίοι διακομίσθηκαν στην Αιματολογική Κλινική του ΠΓΝ Ιωαννίνων όπου και διαπιστώθηκε η ύπαρξη οξείας λευχαιμίας και έλαβαν χημειοθεραπευτική αγωγή. Οι ασθενείς τέθηκαν σε τακτική παρακολούθηση για ανίχνευση ελάχιστης υπολειμματικής νόσου, οπότε και μελετήθηκε η συνολική κλινική τους πορεία. Στην ομάδα ελέγχου συμμετείχαν 50 υγιή άτομα, όλα Ελληνικής καταγωγής.

	Αριθμός Πασχόντων	Ηλικία (Μ.Ο.)	Ηλικιακό εύρος
Οξεία Μυελογενής Λευχαιμία	60	62.3 έτη	20 - 99 έτη
Οξεία Λεμφοβλαστική Λευχαιμία	15 (B-ΟΛΛ: 12) (T- ΟΛΛ:3)	35.7 έτη	17 – 85 έτη
Υγιείς Εθελοντές	50	46.2 έτη	18 – 80 έτη

Πίνακας 12. Χαρακτηριστικά των υπό μελέτη ασθενών

7. ΜΕΘΟΔΟΙ

7.1 ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΙΑ ΡΟΗΣ

Με τη χρήση της Κυτταρομετρίας Ροής προσδιορίστηκαν:

- i. Η τυποποίηση της Οξείας Λευχαιμίας με βάση τα ανοσοφαινοτυπικά χαρακτηριστικά
- ii. Η ανίχνευση ή μη ελάχιστης υπολειμματικής νόσου
- iii. Τα επίπεδα των T ρυθμιστικών λεμφοκυττάρων

7.1.1 ΔΙΑΓΝΩΣΗ ΚΑΙ ΤΥΠΟΠΟΙΗΣΗ ΟΞΕΙΑΣ ΛΕΥΧΑΙΜΙΑΣ

Για τη διάγνωση της οξείας λευχαιμίας και τον προσδιορισμό του τύπου αλλά και του ποσοστού των βλαστικών κυττάρων χρησιμοποιήθηκαν οι συνδυασμοί μονοκλωνικών αντισωμάτων όπως φαίνονται στον ακόλουθο πίνακα.

ΣΥΝΔΥΑΣΜΟΣ	1ο αντίσωμα (PerCP)	2ο αντίσωμα (PE)	3ο αντίσωμα (FITC)
1	CD45	CD33	CD34
2	CD45	CD117	CD34
3	CD45	CD133	HLA-DR
4	CD45	CD14	CD7
5	CD45	CD13	CD2
6	CD45	CD19	CD3
7	CD45	CD4	CD8
8	CD45	CD3	Tdt*
9	CD45	CD33	MPO*
10	CD45	CD11c	CD15
11	CD45	CD10	HLA-DR
12	CD45	CD20	CD22

*Ενδοκυττάρια χρώση

Πίνακας 13. Συνδυασμοί μονοκλωνικών αντισωμάτων, τριπλού φθορισμού κατά τη διάγνωση Οξείας Λευχαιμίας

Με τη χρήση των ανωτέρω σημασμένων με φθοριόχρωμα μονοκλωνικών αντισωμάτων στους νεοδιαγνωσθέντες ασθενείς με οξεία λευχαιμία ταυτοποιήθηκε ο τύπος της λευχαιμίας (λεμφοβλαστική ή μυελογενής). Οι λεμφοβλαστικές λευχαιμίες

κατατάχθηκαν εκ νέου σε υποκατηγορίες σύμφωνα με την κατάταξη κατά EGIL και οι μυελογενείς σύμφωνα με την κατάταξη κατά FAB. Προσδιορίστηκε επίσης το ποσοστό των βλαστικών κυττάρων στη διάγνωση του νοσήματος. Ακολούθως δημιουργήθηκε ο σχετιζόμενος με τη λευχαιμία ανοσοφαινότυπος (leukemia associated immunophenotype- LAIP) για κάθε λευχαιμία, βάσει του οποίου ελέγχθηκε η παρουσία ή μη ανιχνεύσιμης ελάχιστης υπολειμματικής νόσου κατά τη διάρκεια της παρακολούθησης των ασθενών.

Στη διάγνωση της οξείας λευχαιμίας επιλέχθηκε δείγμα μυελού των οστών για τον προσδιορισμό της λευχαιμίας. Δείγμα μυελού των οστών επιλέχθηκε και κατά τη διάρκεια της παρακολούθησης της υπολειμματικής νόσου.

Το δείγμα του μυελού των οστών συλλέχθηκε σε σωληνάριο με αντιπηκτικό EDTA (Αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό οξύ) και η επεξεργασία πραγματοποιήθηκε σε θερμοκρασία περιβάλλοντος (18° – 25°C). Η επεξεργασία αυτή διενεργήθηκε βάσει του είδους των μονοκλωνικών αντισωμάτων (επιφανείας ή ενδοκυττάρων) και χρήση των αντίστοιχων πρωτοκόλλων, όπως περιγράφονται κάτωθι.

➤ *Πρωτόκολλο επιφανειακής χρώσης:*

1. 100μl δείγματος (αίμα ή μυελός των οστών) επωάζονται με 10μl του αντίστοιχου μονοκλωνικού αντισώματος για 20 λεπτά σε συνθήκες σκότους και θερμοκρασία δωματίου
2. Ακολουθεί λύση των ερυθροκυττάρων με προσθήκη 1ml διαλύματος λύσης (BD FACS Lysing Solution, BD Biosciences), το οποίο έχει υποστεί αραίωση 1:10 με απεσταγμένο νερό, και το διάλυμα φυλάσσεται στους 4 °C έως ότου γίνει διαυγές (~10 λεπτά)
3. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 3000 στροφές / λεπτό για 10 λεπτά και αφαίρεση του υπερκείμενου
4. Στη συνέχεια πραγματοποιείται έκπλυση των κυττάρων με PBS (Phosphate Buffer Saline - ρυθμιστικό φωσφορικών σε ισότονο διάλυμα NaCl 0.85%) για την απομάκρυνση του αδέσμευτου αντισώματος και ακολουθεί φυγοκέντρηση εκ νέου, με τη διαδικασία αυτή να επαναλαμβάνεται εις διπλούν
5. Απομακρύνεται το υπερκείμενο και γίνεται επαναραίωση σε 500μl PBS. Το διάλυμα είναι πλέον έτοιμο για ανάλυση

➤ *Πρωτόκολλο ενδοκυττάριας χρώσης:*

1. 100μl δείγματος (αίμα ή μυελός των οστών) επωάζονται με 10μl του αντίστοιχου επιφανειακού μονοκλωνικού αντισώματος για 20 λεπτά σε συνθήκες σκότους και θερμοκρασία δωματίου
2. Ακολουθεί λύση των ερυθροκυττάρων με προσθήκη 1ml διαλύματος λύσης, το οποίο έχει υποστεί αραίωση 1:10 με απεσταγμένο νερό, και το διάλυμα φυλάσσεται στους 4 °C έως ότου γίνει διαυγές (~10 λεπτά)
3. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 3000 στροφές / λεπτό για 10 λεπτά και αφαίρεση του υπερκείμενου
4. Προστίθεται 1ml διαλύματος διαπερατοποίησης (BD FACS Permeabilizing Solution - BD Biosciences) και το διάλυμα επωάζεται για 15 λεπτά, ενώ ακολουθεί φυγοκέντρηση και καταβύθιση των κυττάρων
5. Ακολουθεί επώαση των κυττάρων με 10μl του αντίστοιχου ενδοκυττάρου μονοκλωνικού αντισώματος για 20 λεπτά σε συνθήκες σκότους και θερμοκρασία δωματίου
6. Επόμενο στάδιο αποτελεί η έκπλυση των κυττάρων με PBS για την απομάκρυνση του αδέσμευτου αντισώματος και ακολούθως φυγοκέντρηση του δείγματος, με τη διαδικασία αυτή να επαναλαμβάνεται εις διπλούν
7. Απομακρύνεται το υπερκείμενο και γίνεται επαναραίωση σε 500μl PBS. Το διάλυμα είναι πλέον έτοιμο για ανάλυση

➤ *Ανάλυση δειγμάτων:*

Η ανάλυση των δειγμάτων έλαβε χώρα στον κυτταρομετρητή ροής FACS Calibur (Becton Dickinson) και η επεξεργασία των δεδομένων πραγματοποιήθηκε με το πακέτο λογισμικού Cell Quest.

Με βάση την πλάγια σκέδαση (SSC) και την ένταση του CD45 PerCP οριοθετήθηκαν και συλλέχθηκαν στο ηλεκτρονικό παράθυρο 10000 κύτταρα στη βλαστική περιοχή, ενώ σε ένα δεύτερο στικτόγραμμα (dot plot) εμφανίστηκε η έκφραση των κυττάρων αυτών στα αντιγόνα του κάθε συνδυασμού. Με τον τρόπο αυτό και βάσει των εκφραζόμενων δεικτών από τα βλαστικά κύτταρα έγινε ο προσδιορισμός του τύπου της λευχαιμίας και του ποσοστού των βλαστικών κυττάρων.

7.1.2 T- ΡΥΘΜΙΣΤΙΚΑ ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΑ ΠΕΡΙΦΕΡΙΚΟΥ ΑΙΜΑΤΟΣ

Τα T ρυθμιστικά λεμφοκύτταρα προσδιορίστηκαν σε δείγμα περιφερικού αίματος την ίδια χρονική στιγμή με τη διάγνωση της οξείας λευχαιμίας καθώς κατά την

υπολειμματική νόσο. Για τον προσδιορισμό αυτό χρησιμοποιήθηκαν οι ακόλουθοι συνδυασμοί μονοκλωνικών αντισωμάτων (Beckman Coulter):

CD4-PerCP/ CD25-APC/ AlexaFluor488FoxP3*/ CD127-PE

CD4-PerCP/ CD25-APC/ CD45RO- FITC / CD127-PE

CD4-PerCP/ CD25-APC/ CD45RO- FITC / HLA-DR-PE

CD4-PerCP/ CD25-APC/ CD45RO- FITC / CD62L-PE

CD45-APC / CD4-FITC/ CD25-PE

CD45-APC / CD4-FITC/ HLA-DR-PE

CD45-APC / CD4-FITC/ CD62L-PE

CD45-APC / CD8-FITC/ CD62L-PE

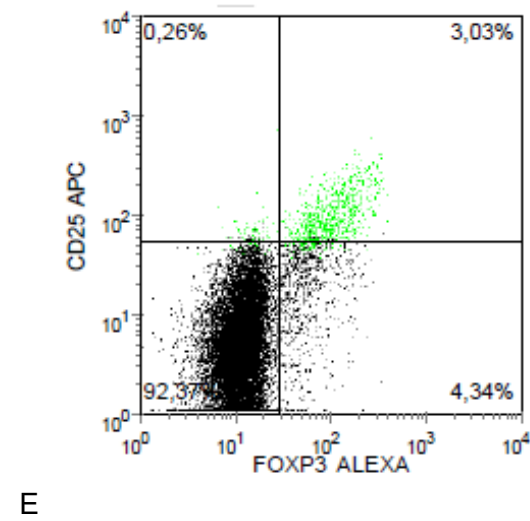
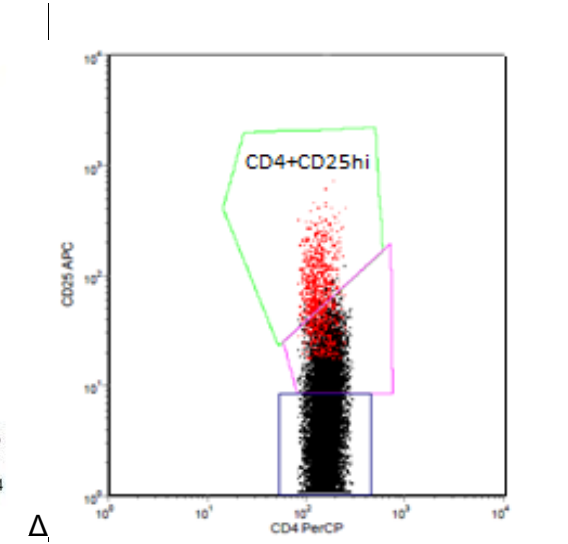
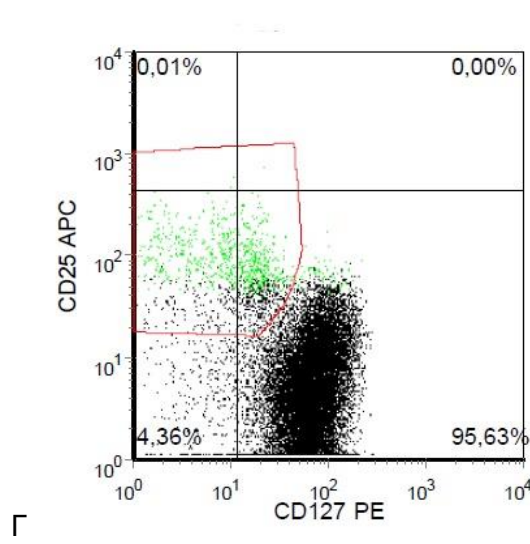
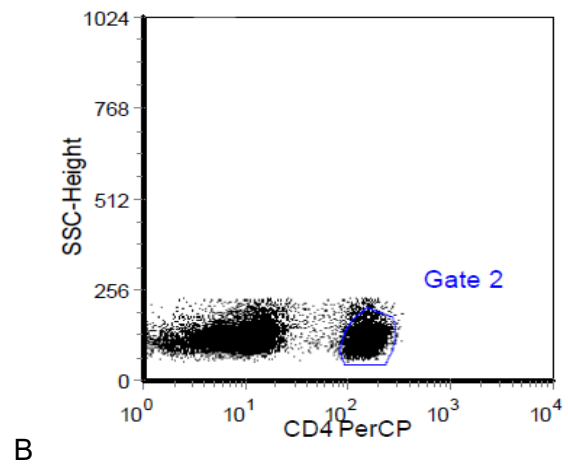
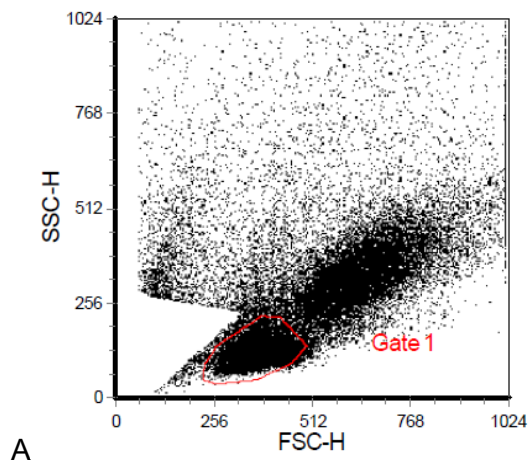
**Ενδοπυρηνικό αντίσωμα*

Η προετοιμασία των δειγμάτων για χρώσεις επιφανείας είναι όμοια με αυτή που χρησιμοποιήθηκε για τη διάγνωση και την παρακολούθηση της οξείας λευχαιμίας. Ωστόσο διαφέρει η προετοιμασία του δείγματος που περιέχει το συνδυασμό μονοκλωνικών αντισωμάτων επιφανείας με το μονοκλωνικό αντίσωμα FOXP3 το οποίο είναι ενδοπυρηνικό αντίσωμα. Για την προετοιμασία του δείγματος αυτού, αρχικά σε σωληνάριο με αντιπηκτικό ηπαρίνης προστέθηκαν 5ml περιφερικού αίματος και 5 ml ισότονου διαλύματος PBS (Phosphate Buffer Saline). 10ml αυτού του διαλύματος προστέθηκαν πάνω σε 10ml φικόλης. Ακολούθησε φυγοκέντρηση για 15 min στις 2200 στροφές/λεπτό. Αποτέλεσμα της φυγοκέντρησης ήταν ο διαχωρισμός τεσσάρων στιβάδων. Η κατώτερη αποτελούνταν από ερυθρά αιμοσφαίρια και πολυμορφοπύρρηνα που καθιζάνουν, ακολουθούσε η φικόλη, πάνω στη φικόλη μία λεπτή στιβάδα από λεμφοκύτταρα και μονοκύτταρα και το υπερκείμενο. Απορρίφθηκε το υπερκείμενο και η στιβάδα των λεμφοκυττάρων και μονοκυττάρων μεταφέρθηκε σε σωληνάριο με 50ml PBS και φυγοκεντρήθηκε για 10 λεπτά στις 1500 στροφές/λεπτό. Απορρίφθηκε το υπερκείμενο, έγινε εκ νέου πλύση με 50ml PBS και το ίζημα αραιώθηκε σε 1 ml PBS στο οποίο είχε προστεθεί FBS (Fetal Bovine Serum) ώστε η τελική συγκέντρωση να είναι 1%. Στη συνέχεια έγινε μέτρηση του αριθμού των κυττάρων και εκ νέου αραιώση με FBS με στόχο συγκέντρωση 10^7 κυττάρων / ml. 100μl αυτού του διαλύματος επωάστηκαν με 10μl επιφανειακού μονοκλωνικού αντισώματος (CD4-PerCP/ CD25-APC/ CD127-PE) για 20 λεπτά σε συνθήκες σκότους και θερμοκρασία δωματίου. Ακολούθως προστέθηκαν 2ml FBS, φυγοκέντρηση για 10 λεπτά στις 1500 στροφές/λεπτό,

απόρριψη του υπερκείμενου και μονιμοποίηση των κυττάρων με 2ml Human FoxP3 Buffer A. Ακολούθως το δείγμα επώαστηκε σε συνθήκες σκότους για 10 λεπτά, φυγοκεντρήθηκε για 5 λεπτά στις 2115 στροφές/ λεπτό, απορρίφθηκε το υπερκείμενο, προστέθηκαν άλλα 2ml FBS, φυγοκεντρήθηκε για 5 λεπτά στις 2115 στροφές/ λεπτό, απορρίφθηκε το υπερκείμενο και προστέθηκαν 0.5 ml Human FoxP3 Buffer B. Ακολούθησε 30 λεπτά επώαση σε συνθήκες σκότους, πλύση με 2 ml FBS, προσθήκη 20 μl FoxP3 αντισώματος και επώαση σε συνθήκες σκότους για 30 λεπτά. Ακολούθως το δείγμα πλύθηκε με 2ml FBS, όπως έχει ήδη περιγραφεί. Το τελικό δείγμα επαναιωρήθηκε σε 0.5ml FBS και ήταν πλέον έτοιμο για ανάλυση.

Κυτταρομετρική ανάλυση για τον προσδιορισμό των T ρυθμιστικών κυττάρων του περιφερικού αίματος

Με χρήση του λογισμικού Cell Quest και σύμφωνα με την ένταση του πρόσθιου σκεδασμού (FSC) και του πλάγιου σκεδασμού (SSC), όπου διαχωρίζουν τα κύτταρα βάσει μεγέθους και κοκκίωσης αντίστοιχα, οριοθετήθηκε η περιοχή (gate) των λεμφοκυττάρων (gate 1) (Εικόνα 52.A). Ακολούθησε οριοθέτηση των CD4+ λεμφοκυττάρων όπου έχουν μειωμένη κοκκίωση και αυξημένη έκφραση του δείκτη CD4 (gate 2), αφού συλλέχθηκαν στο ηλεκτρονικό παράθυρο 10000 κύτταρα (Εικόνα 52.B). Από τα επιλεγμένα CD4+ κύτταρα οριοθετήθηκαν αυτά με χαμηλή έκφραση του CD127 και υψηλή έκφραση του CD25 στο κοκκιογράμμα όπου φαίνεται η έκφραση του CD25 και του CD127 (Εικόνα 52.Γ). Από τα CD4⁺CD127^{lo}CD25⁺ κύτταρα επιλέχθηκαν και οριοθετήθηκαν αυτά που έχουν αυξημένη έκφραση CD25 (CD25^{hi}) (Εικόνα 52.Δ). Ο επιλεγμένος πληθυσμός λεμφοκυττάρων αποτελεί τα CD4⁺CD127^{lo}CD25^{hi} κύτταρα. Από τα κύτταρα αυτά επιλέχθηκαν αυτά που εκφράζουν τον παράγοντα Foxp3 και τα οποία στο κοκκιογράμμα έκφρασης των δεικτών CD25 και FoxP3 απεικονίζονται στο δεξί άνω τεταρτημόριο (Εικόνα 52.E) και αποτελούν τα υπό μελέτη T ρυθμιστικά λεμφοκύτταρα (CD4⁺CD127^{lo}CD25^{hi}FoxP3+).



Εικόνα 52. Προσδιορισμός των T ρυθμιστικών λεμφοκυττάρων CD4+CD127^{lo}CD25^{hi}FoxP3⁺ με κυτταρομετρία ροής. Αρχικά επιλέχθηκαν τα CD4+ λεμφοκύτταρα (Β) και ακολούθως αυτά τα CD4+ που εκφράζουν το CD25 και εμφανίζουν χαμηλή έκφραση του CD127 (Γ). Από αυτά τα κύτταρα επιλέχθηκαν αυτά με την αυξημένη έκφραση του CD25 (CD25^{hi}) (Δ). Όσα από τα κύτταρα αυτά εκφράζουν Foxp3, αποτελούν τα υπό μελέτη T ρυθμιστικά λεμφοκύτταρα (Ε).

7.2 ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

Για τη στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα της IBM SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) Statistics version 23.0 στα Microsoft Windows 10. Η στατιστική σημαντικότητα ορίστηκε με την παρουσία p-value < 0.05.

8. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

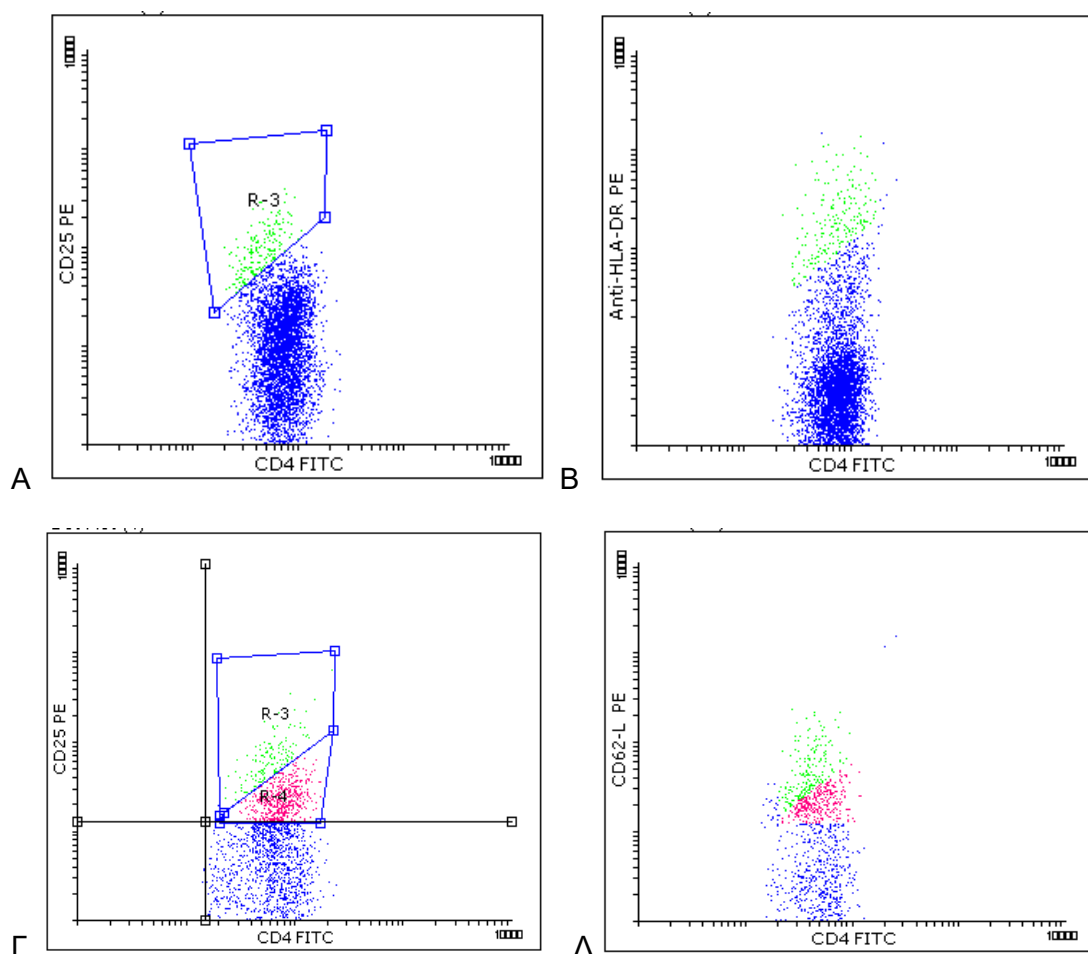
Με την κυτταρομετρική ανάλυση που περιγράφηκε ανωτέρω για τον προσδιορισμό των T ρυθμιστικών κυττάρων του περιφερικού αίματος, προσδιορίστηκαν τα CD4⁺CD127^{lo}CD25^{hi} Foxp3⁺ κύτταρα σε δείγμα περιφερικού αίματος ασθενών με νεοδιαγνωσθείσα οξεία λευχαιμία καθώς και σε δείγμα των ιδίων ασθενών στο στάδιο του ελέγχου για ανίχνευση ελάχιστης υπολειμματικής νόσου (μετά τη θεραπεία εφόδου, τη σταθεροποίηση και στην ολοκλήρωση της θεραπείας) καθώς και στην υποτροπή του νοσήματος και στην παρακολούθησή του μετά τη θεραπεία διάσωσης. Τα ρυθμιστικά κύτταρα προσδιορίστηκαν επίσης στην ομάδα ελέγχου, που απαρτίζεται από υγιείς δότες.

	Αριθμός Ασθενών (N)		
	Οξεία Μυελογενής Λευχαιμία (N)	B-Οξεία Λεμφοβλαστική Λευχαιμία (N)	T-Οξεία Λεμφοβλαστική Λευχαιμία (N)
Προσδιορισμός T ρυθμιστικών κυττάρων στη διάγνωση	60	12	3
Προσδιορισμός T ρυθμιστικών κυττάρων στην υπολειμματική νόσο	41	11	3
Ασθενείς που τέθηκαν σε ύφεση μετά την αγωγή εφόδου	11	8	2
Ασθενείς που υποτροπίασαν μετά την επίτευξη ύφεσης	20	2	2

Πίνακας 14. Αριθμός ασθενών (N) στους οποίους προσδιορίστηκαν T ρυθμιστικά λεμφοκύτταρα στη διάγνωση της οξείας λευχαιμίας και στην υπολειμματική νόσο

Παρατηρήθηκε αρχικά ότι τα CD4⁺CD127^{lo}CD25^{hi} Foxp3⁺ κύτταρα εκφράζουν το δείκτη HLA-DR και εμφανίζουν αυξημένη έκφραση του δείκτη CD62L. Συγκεκριμένα διαπιστώθηκε ότι η έκφραση του CD62L είναι υψηλότερη στα CD25^{hi} κύτταρα συγκριτικά με τα CD25⁺ κύτταρα. (Εικόνα 53) Συνεπώς ο δείκτης CD62L μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως δείκτης για τον προσδιορισμό των T ρυθμιστικών κυττάρων, σε

συνδυασμό με τους δείκτες CD25 και CD127 ($CD4^+CD25^{hi}CD127^{lo}$), ώστε να συμβάλλει στο διαχωρισμό των T κυττάρων με κατασταλτική δράση από τα $CD4^+$ ενεργοποιημένα T κύτταρα χωρίς κατασταλτική δράση ($CD62L^{lo}$)



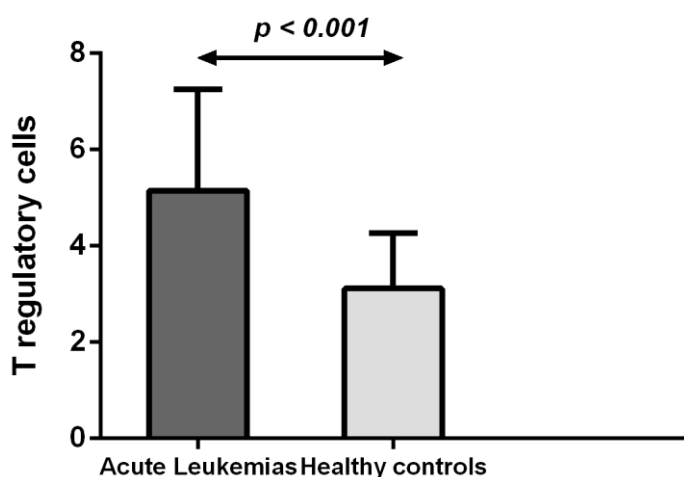
Εικόνα 53. Έκφραση των HLA-DR και CD62L στα T ρυθμιστικά λεμφοκύτταρα. Τα T ρυθμιστικά λεμφοκύτταρα ($CD4^+CD25^{hi}$), πεδίο R3 στην εικόνα A, όπου φαίνεται η έκφραση του CD25 στα $CD4$ θετικά κύτταρα, εκφράζουν το δείκτη HLA-DR, όπως φαίνεται στην εικόνα B. Αντίστοιχα, αν οριστεί ως R4 το πεδίο όπου περιέχονται τα $CD4^+$ κύτταρα με ενδιάμεση έκφραση του CD25 (εικόνα Γ), φαίνεται ότι τα κύτταρα αυτά ($CD4^+CD25^+$) εμφανίζουν χαμηλότερη έκφραση του CD62L συγκριτικά με τα T ρυθμιστικά κύτταρα ($CD4^+CD25^{hi}$) (Εικόνα Δ).

Ακολούθως με τη χρήση του ανοσοφαινοτύπου $CD4^+CD25^{hi}CD127^{lo}FoxP3^+$ προσδιορίστηκε το ποσοστό των T ρυθμιστικών λεμφοκυττάρων σε οξείες λεμφοβλαστικές και μυελογενείς λευχαιμίες κατά τη διάγνωση του νοσήματος και συγκρίθηκε με το ποσοστό τους σε υγιείς μάρτυρες. (Πίνακας 15) Η σύγκριση αυτή ανέδειξε στατιστικά σημαντική αύξηση των T ρυθμιστικών κυττάρων στη διάγνωση

τόσο των λεμφοβλαστικών όσο και των μυελογενών λευχαιμιών, συγκριτικά με το ποσοστό των T ρυθμιστικών στους μάρτυρες ($p < 0.001$). (Εικόνα 54)

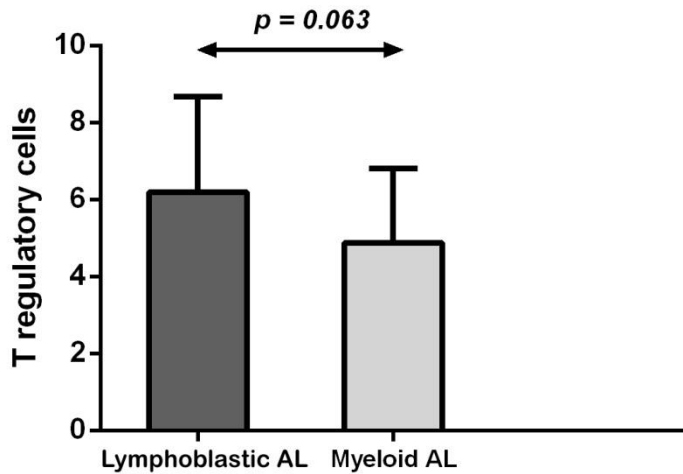
group_pts_vs_ctrl	N	Mean	Std. Deviation
Tregs Controls	50	3.11940	1.150839
Myeloid	60	4.88982	1.943309
Lymphoblastic	15	6.19340	2.473674
All patients	75	5.11765	2.098604

Πίνακας 15. Σύγκριση των T ρυθμιστικών στους υγιείς έναντι των νεοδιαγνωσθέντων με οξεία λευχαιμία. N: αριθμός δειγμάτων, Mean: μέσος όρος του ποσοστού των Tregs, Std. Deviation: τυπική απόκλιση από το μέσο όρο



Εικόνα 54. Σύγκριση του ποσοστού των T ρυθμιστικών κυττάρων στη διάγνωση της οξείας λευχαιμίας έναντι των μαρτύρων.

Από τους ανωτέρω πίνακες παρατηρείται η τάση των T ρυθμιστικών κυττάρων στη διάγνωση της οξείας λεμφοβλαστικής λευχαιμίας να είναι υψηλότερα από ότι στη διάγνωση της οξείας μυελογενούς λευχαιμίας. Η διαφορά αυτή ωστόσο δεν είναι στατιστικώς σημαντική ($p = 0.063$). (Εικόνα 55)

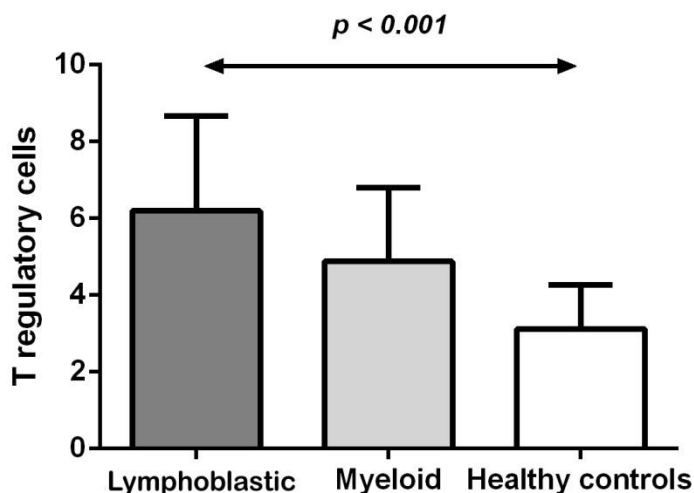


Εικόνα 55. Σύγκριση των T ρυθμιστικών κυττάρων στη διάγνωση της οξείας λεμφοβλαστικής έναντι της οξείας μυελογενούς λευχαιμίας

Στατιστικά σημαντική ωστόσο είναι η διαβάθμιση των επιπέδων των T ρυθμιστικών κυττάρων με το μικρότερο ποσοστό να παρουσιάζεται στους υγιείς μάρτυρες, να ακολουθεί το ποσοστό στη διάγνωση της οξείας μυελογενούς λευχαιμίας και τέλος το ποσοστό στη διάγνωση της οξείας λεμφοβλαστικής λευχαιμίας (Tregs μάρτυρες < Tregs μυελογενείς < Tregs λεμφοβλαστικές) ($p < 0.001$).

group_type_all	N	Mean	Std. Deviation
controls	50	3.11940	1.150839
Tregs myeloid	60	4.88982	1.943309
lymphoblastic	15	6.19340	2.473674

Πίνακας 16. Σύγκριση των T ρυθμιστικών στους υγιείς έναντι των πασχόντων από οξεία λεμφοβλαστική και μυελογενή λευχαιμία στη διάγνωση N: αριθμός δειγμάτων, Mean: μέσος όρος του ποσοστού των Tregs, Std. Deviation: τυπική απόκλιση από το μέσο όρο



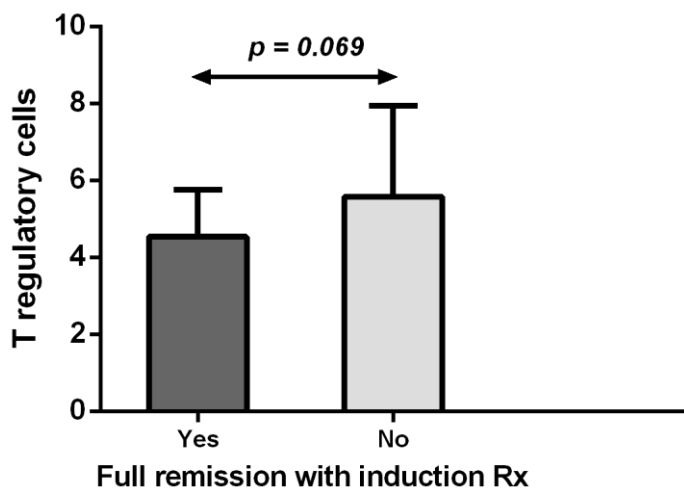
Εικόνα 56. Σημαντική διαβάθμιση των T ρυθμιστικών κυττάρων στη διάγνωση της οξείας λευχαιμίας έναντι των υγιών

Ο έλεγχος για συσχέτιση των επιπέδων των T ρυθμιστικών κυττάρων στη διάγνωση της οξείας λευχαιμίας με την πιθανότητα να υποτροπιάσει το νόσημα δεν ανέδειξε στατιστικώς σημαντική διαφορά. Ομοίως η σύγκριση των T ρυθμιστικών στην υποτροπή του νοσήματος με αυτά των υγιών μαρτύρων δεν ανέδειξε στατιστικά σημαντική διαφορά. Στους ίδιους ασθενείς, στους οποίους το νόσημα υποτροπιάσε, η σύγκριση των T ρυθμιστικών στη διάγνωση με τα T ρυθμιστικά στη διάγνωση των ασθενών των οποίων το νόσημα τέθηκε σε μακροχρόνια ύφεση, δεν παρουσίασε διαφορά.

Διαφορά ταυτοποιήθηκε στα T ρυθμιστικά της διάγνωσης των πασχόντων από οξεία μυελογενή λευχαιμία που πέτυχαν πλήρη ύφεση μετά τη θεραπεία εφόδου, συγκριτικά με τα T ρυθμιστικά όσων παρουσίασαν πρωτοπαθώς ανθεκτική νόσο, χωρίς όμως αυτή η διαφορά να είναι στατιστικώς σημαντική ($p=0.069$). Συγκεκριμένα οι ασθενείς που πέτυχαν πλήρη ύφεση είχαν χαμηλότερα ποσοστά Tregs στη διάγνωση του νοσήματος, συγκριτικά με όσους είχαν ανθεκτική νόσο.

group_initial_response (remission with induction	N	Mean	Std. Deviation
Tregs no	30	5.62237	2.435414
yes	11	4.53818	1.220933

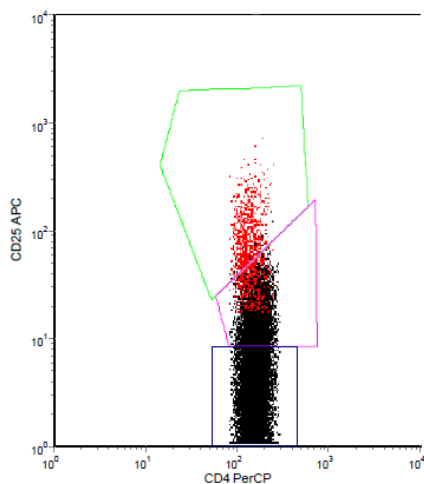
Πίνακας 17. Σύγκριση των ποσοστών των T ρυθμιστικών κυττάρων στη διάγνωση της οξείας λευχαιμίας βάσει της ανταπόκρισης στη θεραπεία εφόδου N: αριθμός δειγμάτων, Mean: μέσος όρος του ποσοστού των Tregs, Std. Deviation: τυπική απόκλιση από το μέσο όρο



Εικόνα 57. Σύγκριση των T ρυθμιστικών κυττάρων στη διάγνωση της οξείας λευχαιμίας όσων πέτυχαν πλήρη ύφεση μετά τη θεραπεία εφόδου έναντι όσων παρουσίασαν πρωτοπαθώς ανθεκτική νόσο.

9. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Ένας από τους βασικούς σκοπούς της μελέτης είναι να προτείνει την ανοσοφαινοτυπική στρατηγική προσδιορισμού των επιπέδων των T ρυθμιστικών λεμφοκυττάρων στο περιφερικό αίμα με την μέγιστη ευαισθησία. Τα T ρυθμιστικά λεμφοκύτταρα έχουν προσδιοριστεί στη βιβλιογραφία με τη χρήση ενός από τους ακόλουθους συνδυασμούς δεικτών στις οξείες λευχαιμίες: $CD4^+CD25^{hi}$ κύτταρα, $CD4^+CD25^{hi}CD127^{lo}$ κύτταρα, $CD4^+CD25^{hi}FoxP3^+$ κύτταρα. Στην παρούσα μελέτη τα T λεμφοκύτταρα με τη ρυθμιστική δράση προσδιορίστηκαν στο περιφερικό αίμα με τη χρήση όλων των ανωτέρω δεικτών, δηλαδή επιλέχθηκαν τα $CD4^+CD25^{hi}CD127^{lo}FoxP3^+$ κύτταρα. Τα ρυθμιστικά αυτά κύτταρα παρουσιάζουν την υψηλότερη έκφραση του δείκτη CD25 (CD25^{hi}) συγκριτικά με την ενδιάμεση έκφραση που χαρακτηρίζει τα δραστικά (CD25⁺) και τη χαμηλή έκφραση που χαρακτηρίζει τα παρθένα T κύτταρα (CD25^{lo}). (Εικόνα 58)



Εικόνα 58. Διαχωρισμός των υποπληθυσμών των T λεμφοκυττάρων αναλόγως της έκφρασης του CD25. Τα T ρυθμιστικά κύτταρα εμφανίζουν υψηλή έκφραση CD25 (CD25^{hi}), τα T δραστικά λεμφοκύτταρα εμφανίζουν ενδιάμεση έκφραση του CD25 (CD25⁺) και τα παρθένα T κύτταρα χαμηλή έκφραση CD25 (CD25^{lo})

Επιπροσθέτως τα ρυθμιστικά αυτά κύτταρα ($CD4^+CD25^{hi}CD127^{lo}FoxP3^+$ κύτταρα) παρουσιάζουν αυξημένη έκφραση του δείκτη CD62L συγκριτικά με τα CD25⁺ κύτταρα. Κατά συνέπεια, ο δείκτης CD62L μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως δείκτης προσδιορισμού των T ρυθμιστικών κυττάρων, σε συνδυασμό με τους δείκτες CD25 και CD127 ($CD4^+CD25^{hi}CD127^{lo}$), και να συμβάλλει στο διαχωρισμό των T κυττάρων

με κατασταλτική δράση από τα CD4⁺ ενεργοποιημένα T κύτταρα χωρίς κατασταλτική δράση (CD62L^{lo}).

Συνεπώς με τη χρήση του ανοσοφαινοτύπου CD4⁺CD25^{hi}CD127^{lo}FoxP3⁺, ο οποίος χαρακτηρίζει τα T κύτταρα με κατασταλτική δράση, προσδιορίστηκε το ποσοστό των T ρυθμιστικών λεμφοκυττάρων σε οξείες λεμφοβλαστικές και μυελογενείς λευχαιμίες κατά τη διάγνωση του νοσήματος και συγκρίθηκε με την ποσοστό τους σε υγιείς εθελοντές. Παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική αύξηση του ποσοστού των T ρυθμιστικών κυττάρων στη διάγνωση τόσο των λεμφοβλαστικών όσο και των μυελογενών λευχαιμιών, συγκριτικά με το ποσοστό στους μάρτυρες (p<0.001). Η παρατήρηση αυτή εξηγείται από τη θεωρία των Fujisaki et al ότι τα CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ T ρυθμιστικά λεμφοκύτταρα παρέχουν μία ανοσολογικά προνομιούχο περιοχή στο μυελό των οστών, όπου προστατεύει τα αρχέγονα αιμοποιητικά κύτταρα από καταστροφή μέσω του ανοσοποιητικού συστήματος [142]. Εξηγείται επίσης από τη θεωρία των Ustun et al ότι η σχέση των T ρυθμιστικών κυττάρων με τα βλαστικά κύτταρα στο μυελό των οστών είναι αμφίδρομη. Τα T ρυθμιστικά κύτταρα προστατεύουν τα βλαστικά κύτταρα από την απάντηση του ανοσοποιητικού συστήματος και τα βλαστικά κύτταρα προάγουν τη δημιουργία T ρυθμιστικών κυττάρων [145].

Η παρατήρηση αυτή ενισχύει επίσης προηγούμενες μελέτες όπου καταδεικνύουν αύξηση του ποσοστού των T ρυθμιστικών λεμφοκυττάρων στη διάγνωση της οξείας μυελογενούς λευχαιμίας συγκριτικά με τους υγιείς μάρτυρες. Αναλυτικότερα ενισχύει την αρχική παρατήρηση των Wang et al οι οποίοι με χρήση διχρωμίας (CD4/CD25) για τον ανοσοφαινοτυπικό προσδιορισμό των T ρυθμιστικών κυττάρων ανέδειξαν αυξημένο ποσοστό των CD4⁺CD25^{hi} T κυττάρων στη διάγνωση της οξείας μυελογενούς λευχαιμίας [146]. Ακολούθως οι Shenghui et al οι οποίοι μελέτησαν τα T ρυθμιστικά λεμφοκύτταρα με χρήση του ανοσοφαινοτύπου CD4⁺CD25⁺CD127^{lo} στο περιφερικό αίμα ασθενών με νεοδιαγνωσθείσα ΟΜΛ παρατήρησαν ότι η σύγκριση των κυκλοφορούντων T ρυθμιστικών των πασχόντων με αυτά των εθελοντών, έδειξε ήπια αλλά σημαντική αύξηση των T ρυθμιστικών στην ομάδα των πασχόντων [148].

Εν αντιθέσει με τις μυελογενείς λευχαιμίες ελάχιστα βιβλιογραφικά δεδομένα παρουσιάζονται για τα ποσοστά των T ρυθμιστικών λεμφοκυττάρων στη διάγνωση της οξείας λεμφοβλαστικής λευχαιμίας και αυτά μάλιστα είναι αντιφατικά. Αναλυτικότερα ο Wu και οι συνεργάτες του ήταν οι πρώτοι που μελέτησαν το 2011 το ποσοστό των T ρυθμιστικών κυττάρων, με χρήση του φαινοτύπου CD4⁺CD25⁺, στην οξεία λεμφοβλαστική λευχαιμία και παρατήρησαν αυξημένο ποσοστό των κυττάρων

αυτών στους πάσχοντες συγκριτικά με τους υγιείς εθελοντές. [154] Εν αντιθέσει, ο Bhattacharya και οι συνεργάτες του, οι οποίοι μελέτησαν μόνο πάσχοντες από Β-ΟΛΛ, έδειξαν ότι το ποσοστό των $CD4^+CD25^+$ T ρυθμιστικών κυττάρων είναι μειωμένο στους ασθενείς στη διάγνωση του νοσήματος συγκριτικά με το ποσοστό στους υγιείς μάρτυρες. [155] Πάσχοντες με Β-ΟΛΛ μελέτησαν και οι Idris et al το 2015, όπου προσδιόρισαν τα ποσοστά των T ρυθμιστικών κυττάρων βάσει του ανοσοφαινοτύπου $CD3^+CD4^+CD25^+CD127^-$ στη διάγνωση του νοσήματος και τα συνέκριναν με εκείνα των υγιών εθελοντών. Ανέδειξαν σημαντικά αυξημένα επίπεδα στους πάσχοντες, παρατήρηση που ενισχύει τα ευρήματα της ερευνητικής ομάδας του Wu. [156] Στην παρούσα μελέτη προσδιορίστηκε το ποσοστό των T ρυθμιστικών λεμφοκυττάρων σε πάσχοντες τόσο από Β-ΟΛΛ όσο και από Τ- ΟΛΛ βάσει του ανοσοφαινοτύπου $CD4^+CD25^{hi}CD127^{lo}FoxP3^+$, και συγκρίθηκε με το ποσοστό σε υγιείς δότες. Ανευρέθη σημαντικά αυξημένο ποσοστό των T ρυθμιστικών κυττάρων στη διάγνωση του νοσήματος, δεδομένα συμβατά με τις δύο από τις τρεις μελέτες που έχουν δημοσιευτεί. Παρατηρήθηκε επίσης η τάση το ποσοστό των T ρυθμιστικών στη διάγνωση των λεμφοβλαστικών λευχαιμιών να είναι υψηλότερο εν συγκρίσει με τις μυελογενείς λευχαιμίες. Η διαφορά αυτή ωστόσο δεν ήταν στατιστικώς σημαντική ($p=0.068$). Μία πιθανή εξήγηση των αυξημένων επιπέδων των T ρυθμιστικών κυττάρων στη διάγνωση της οξείας λεμφοβλαστικής λευχαιμίας είναι η προκαλούμενη από τα κύτταρα αυτά καταστολή της ανοσολογικής απάντησης έναντι της οξείας λευχαιμίας και κατά συνέπεια εκδήλωση του νοσήματος.

Συνεπώς, στην παρούσα μελέτη παρατηρήθηκε ότι τα T ρυθμιστικά λεμφοκύτταρα προστατεύουν τα βλαστικά κύτταρα από την απάντηση του ανοσοποιητικού συστήματος και αυτό εξηγεί τη σημαντική αύξηση των κυττάρων αυτών στη διάγνωση της οξείας λευχαιμίας (μυελογενούς, T και Β λεμφοβλαστικής). Προσδιορίστηκε επίσης στατιστικά σημαντική διαβάθμιση του ποσοστού των T ρυθμιστικών κυττάρων με το μικρότερο ποσοστό να παρουσιάζεται στους υγιείς μάρτυρες, να ακολουθεί το ποσοστό στη διάγνωση της οξείας μυελογενούς λευχαιμίας και τέλος το ποσοστό στη διάγνωση της οξείας λεμφοβλαστικής λευχαιμίας (Tregs μάρτυρες < Tregs μυελογενείς < Tregs λεμφοβλαστικές) ($p<0.001$).

Οι Yang και Xu δημοσίευσαν ότι τα επίπεδα των $CD4^+CD25^+CD127^{lo}$ T ρυθμιστικών κυττάρων σε πάσχοντες από οξεία μυελογενή λευχαιμία ανθεκτική ή υποτροπιάζουσα δεν διαφοροποιούνται μετά από έξι κύκλους χημειοθεραπευτικής αγωγής. Αντιθέτως το ποσοστό των κυττάρων αυτών μειώνεται σε ασθενείς που το νόσημά τους τέθηκε σε πλήρη ύφεση μετά από έξι κύκλους χημειοθεραπευτικής αγωγής σε σύγκριση με το ποσοστό τους στη διάγνωση του νοσήματος. Τα

αποτελέσματα αυτά σύμφωνα με τους ερευνητές συνηγορούν στο γεγονός ότι οι ασθενείς με υψηλό αριθμό T ρυθμιστικών κυττάρων στο περιφερικό αίμα έχουν μειωμένη ευαισθησία στη χημειοθεραπευτική αγωγή και προτείνουν τον προσδιορισμό των T ρυθμιστικών κυττάρων στη διάγνωση ως προγνωστικό δείκτη του νοσήματος. [151] Σε αντίθεση με τη δημοσίευση των Yang και Xu, στην παρούσα μελέτη δεν παρατηρήθηκε σημαντική συσχέτιση του ποσοστού των T ρυθμιστικών κυττάρων στη διάγνωση της οξείας λευχαιμίας με το ποσοστό τους στην ύφεση ή στην υποτροπή του νοσήματος. Αναλυτικότερα, δεν παρατηρήθηκε σημαντική μείωση των επιπέδων των T ρυθμιστικών κυττάρων σε ασθενείς που ετέθησαν σε πλήρη ύφεση μετά τη χημειοθεραπευτική αγωγή όταν συγκρίθηκαν τα επίπεδα της διάγνωσης με τα επίπεδα μετά την επίτευξη ύφεσης. Επίσης τα T ρυθμιστικά κύτταρα στην υποτροπή της οξείας λευχαιμίας δεν ήταν σημαντικά αυξημένα συγκριτικά με τα T ρυθμιστικά κύτταρα των υγιών μαρτύρων. Επιπροσθέτως ο έλεγχος των T ρυθμιστικών κυττάρων της διάγνωσης στους ασθενείς που υποτροπίασαν δεν ανέδειξε σημαντική διαφορά συγκριτικά με τα κύτταρα της διάγνωσης όσων τέθηκαν σε μακροχρόνια ύφεση. Τα ανωτέρω καταδεικνύουν ότι η μέτρηση των επιπέδων των κυκλοφορούντων T ρυθμιστικών κυττάρων δεν αποτελεί ασφαλή μέθοδο παρακολούθησης της ανταπόκρισης του νοσήματος στη χημειοθεραπευτική αγωγή και την ανίχνευση πιθανής υποτροπής του νοσήματος.

Ωστόσο, παρατηρήθηκε ότι τα T ρυθμιστικά κύτταρα της διάγνωσης των ασθενών που πέτυχαν πλήρη ύφεση μετά τη θεραπεία εφόδου ήταν χαμηλότερα συγκριτικά με τα ρυθμιστικά κύτταρα όσων παρουσίασαν πρωτοπαθώς ανθεκτική νόσο. Η παρατήρηση αυτή, η οποία έχει δημοσιευτεί και από την ερευνητική ομάδα του Shenghui [148], είναι ενδεικτική ότι τα T ρυθμιστικά λεμφοκύτταρα, τα οποία διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη λευχαιμογένεση, θα μπορούσαν να αποτελέσουν προγνωστικό δείκτη για την ανταπόκριση στη θεραπεία εφόδου αλλά όχι για την εξέλιξη του νοσήματος.

10. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Στην παρούσα μελέτη για τον προσδιορισμό των T ρυθμιστικών λεμφοκυττάρων χρησιμοποιήθηκε ο ανοσοφαινότυπος $CD4^+CD25^{hi}CD127^{lo}FoxP3^+$, ο οποίος φαίνεται να προσδιορίζει με ακρίβεια τα επίπεδα των T κυττάρων με κατασταλτική δράση. Ωστόσο σε αδυναμία χρήσης του ενδοκυττάρου δείκτη Foxp3, ο προσδιορισμός των ανωτέρω κυττάρων μπορεί να γίνει με τη χρήση του δείκτη επιφανείας CD62L και επιλογή των κυττάρων με υψηλή έκφραση του δείκτη αυτού. Ο δείκτης CD62L μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε συνδυασμό με τους δείκτες CD4, CD25 και CD127 και να επιλεγούν τα $CD4^+CD25^{hi}CD127^{lo}CD62L^+$ κύτταρα, τα οποία αποτελούν τα T ρυθμιστικά κύτταρα.

Ο προσδιορισμός των T ρυθμιστικών κυττάρων σε νεοδιαγνωσθείσες οξείες λευχαιμίες, με χρήση του φαινοτύπου $CD4^+CD25^{hi}CD127^{lo}FoxP3^+$, ανέδειξε αύξηση του ποσοστού τους εν συγκρίσει με το ποσοστό σε υγιείς εθελοντές. Το ποσοστό αυτό εμφανίζει σημαντική διαβάθμιση, με το μικρότερο ποσοστό να παρουσιάζεται στους υγιείς μάρτυρες, να ακολουθεί το ποσοστό στη διάγνωση της οξείας μυελογενούς λευχαιμίας και τέλος το ποσοστό στη διάγνωση της οξείας λεμφοβλαστικής λευχαιμίας. Η σημαντική αυτή αύξηση των T ρυθμιστικών κυττάρων στη διάγνωση της οξείας λευχαιμίας είναι ενδεικτική του ρόλου που διαδραματίζουν τα κύτταρα αυτά στη λευχαιμογένεση, μέσω της προστασίας που παρέχουν στα βλαστικά κύτταρα από την απάντηση του ανοσοποιητικού συστήματος, την οποία καταστέλλουν.

Ωστόσο η μελέτη των κυκλοφορούντων στην περιφέρεια T ρυθμιστικών κυττάρων στη διάγνωση και στη διάρκεια της παρακολούθησης για ανίχνευση ελάχιστης υπολειμματικής νόσου (δηλαδή μετά τη θεραπεία εφόδου, τη θεραπεία σταθεροποίησης και στην ολοκλήρωση της θεραπείας) καθώς και στην υποτροπή του νοσήματος και στην παρακολούθηση μετά τη θεραπεία διάσωσης, δεν ανέδειξε συσχέτιση των επιπέδων των κυττάρων αυτών με την εξέλιξη του νοσήματος. Συνεπώς η μέτρηση των επιπέδων των κυκλοφορούντων T ρυθμιστικών κυττάρων δεν αποτελεί ασφαλή μέθοδο παρακολούθησης της ανταπόκρισης του νοσήματος στη χημειοθεραπευτική αγωγή και πρώιμης ανίχνευσης πιθανής υποτροπής του νοσήματος και δεν είναι δόκιμο να χρησιμοποιείται ως προγνωστικός δείκτης για την πορεία του νοσήματος.

Παρατηρήθηκε ωστόσο ότι τα T ρυθμιστικά κύτταρα της διάγνωσης των ασθενών που πέτυχαν πλήρη ύφεση μετά τη θεραπεία εφόδου ήταν χαμηλότερα συγκριτικά με τα ρυθμιστικά κύτταρα όσων παρουσίασαν πρωτοπαθώς ανθεκτική νόσο. Η

παρατήρηση αυτή είναι ενδεικτική ότι τα T ρυθμιστικά λεμφοκύτταρα, τα οποία διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη λευχαιμογένεση, θα μπορούσαν να αποτελέσουν προγνωστικό δείκτη για την ανταπόκριση στη θεραπεία εφόδου αλλά όχι για την εξέλιξη του νοσήματος.

11. ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στον όρο ανοσορρύθμιση εσωκλείονται όλοι εκείνοι οι ανοσολογικοί μηχανισμοί που συμβάλλουν στην επίτευξη και διατήρηση της ομοιόστασης του οργανισμού. Σημαντικό ρόλο στη διατήρηση της ομοιόστασης διαδραματίζουν τα T ρυθμιστικά λεμφοκύτταρα (Tregs), ο προσδιορισμός των οποίων κατέστη δυνατός μετά το 1995 όπου ο Sakaguchi και οι συνεργάτες του αναγνώρισαν το CD25 μόριο επιφανείας, το οποίο είναι η αλυσίδα του υποδοχέα της ιντερλευκίνης 2 και εκφράζεται στα κύτταρα αυτά. Δύο είναι οι βασικοί πληθυσμοί Tregs που έχουν περιγραφεί, τα φυσικά T ρυθμιστικά λεμφοκύτταρα (natural Tregs / nTregs ή thymus-derived Tregs / tTregs) που προέρχονται από το θύμο αδένος και τα επαγόμενα στην περιφέρεια T ρυθμιστικά λεμφοκύτταρα (inducible Tregs / iTregs ή periphery-derived Tregs / pTregs). Η περιγραφή το 2003 του μεταγραφικού παράγοντα Foxp3, ο οποίος είναι παράγοντας κλειδί για την ανάπτυξη και τη λειτουργία των ρυθμιστικών T λεμφοκυττάρων, και θεωρείται ο πιο αξιόπιστος δείκτης αναγνώρισης αυτών, οδήγησε στο διαχωρισμό των T ρυθμιστικών κυττάρων στον άνθρωπο σε τρεις φαινοτυπικά και λειτουργικά διακριτούς υποπληθυσμούς βάσει της έκφρασής του. Τα T ρυθμιστικά κύτταρα ανάπαυσης ή φυσικά / παρθένα Tregs (resting Tregs, rTregs / naive, nTregs) εμφανίζουν χαμηλή έκφραση του FoxP3 και εκφράζουν CD45RA (CD45RA⁺FoxP3^{lo} κύτταρα), τα δραστικά ή ενεργοποιημένα T ρυθμιστικά κύτταρα (effector or activated Tregs, eff Tregs or aTregs) εμφανίζουν υψηλή έκφραση του FoxP3 και δεν εκφράζουν CD45RA (CD45RA⁻Foxp3^{hi} κύτταρα) και τα μη κατασταλτικά CD4⁺ T κύτταρα που εκκρίνουν κυτταροκίνες και δεν εκφράζουν ούτε FoxP3 ούτε CD45RA (CD45RA⁻Foxp3^{lo} κύτταρα). Τα T ρυθμιστικά λεμφοκύτταρα με τη μέγιστη κατασταλτική δράση εμφανίζουν την ακόλουθη έκφραση δεικτών: CD4⁺CD45RA⁻CD45RO⁺FOXp3^{hi}CD25^{hi}CD127^{lo}CD62L⁺.

Τα T ρυθμιστικά λεμφοκύτταρα παρέχουν μία ανοσολογικά προνομιούχο περιοχή στο μυελό των οστών όπου προστατεύει τα αρχέγονα αιμοποιητικά κύτταρα από καταστροφή μέσω του ανοσοποιητικού συστήματος, καταστέλλουν τη δημιουργία αποικιών και τη μυελική διαφοροποίηση του αρχέγονου αιμοποιητικού κυττάρου, ενώ κατά τη διάρκεια της ομοιόστασης επηρεάζουν τον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση των αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων μέσω ρύθμισης των κυττοκινών στο μυελό των οστών. Επιπροσθέτως, καταστέλλουν τα T δραστικά κύτταρα, καταστέλλουν τον πολλαπλασιασμό των παρθένων T κυττάρων και την αντιγονοεξαρτώμενη ανοσολογική απόκριση έναντι του λευχαιμικού βλαστικού κυττάρου, συμβάλλοντας στην εξέλιξη της νόσου. Στην οξεία λευχαιμία (μυελογενή

και λεμφοβλαστική) έχουν περιγραφεί αντιφατικά αποτελέσματα στην προσπάθεια προσδιορισμού των επιπέδων των T ρυθμιστικών κυττάρων. Οι περισσότερες ερευνητικές ομάδες περιγράφουν αύξηση των ρυθμιστικών κυττάρων στη διάγνωση, ενώ υπάρχουν και ομάδες που αναφέρουν μειωμένο ποσοστό των κυττάρων αυτών. Οι συνήθεις συνδυασμοί μονοκλωνικών αντισωμάτων που έχουν περιγραφεί στη βιβλιογραφία για τον προσδιορισμό των T ρυθμιστικών στις οξείες λευχαιμίες είναι οι: $CD4^+CD25^{hi}$, $CD4^+CD25^{hi}CD127^{lo}$, και $CD4^+CD25^{hi}FoxP3^+$.

Σκοπός της παρούσας μελέτης είναι να προτείνει την ανοσοφαινοτυπική στρατηγική προσδιορισμού των επιπέδων των T ρυθμιστικών λεμφοκυττάρων στο περιφερικό αίμα με την μέγιστη ευαισθησία, να μελετήσει το ρόλο των T ρυθμιστικών κυττάρων στη λευχαιμογένεση και τη συσχέτιση των επιπέδων των κυττάρων αυτών με την ανταπόκριση στη χημειοθεραπευτική αγωγή και να αναδείξει πιθανή προγνωστική αξία του προσδιορισμού των επιπέδων τους.

Σε 60 ασθενείς με νεοδιαγνωσθείσα οξεία μυελογενή λευχαιμία, 15 ασθενείς με νεοδιαγνωσθείσα οξεία λεμφοβλαστική λευχαιμία και σε 50 υγιείς εθελοντές προσδιορίστηκαν στο περιφερικό αίμα τα T ρυθμιστικά λεμφοκύτταρα με τη χρήση των δεικτών CD4,CD25,CD127 και FoxP3 και επιλογή των $CD4^+CD25^{hi}CD127^{lo}FoxP3^+$ κυττάρων. Ο προσδιορισμός των T ρυθμιστικών κυττάρων σε νεοδιαγνωσθείσες οξείες λευχαιμίες, με χρήση του ανωτέρω φαινοτύπου ανέδειξε αύξηση των επιπέδων τους εν συγκρίσει με τα επίπεδα σε υγιείς εθελοντές. Η αύξηση αυτή εμφανίζει σημαντική διαβάθμιση, με το μικρότερο ποσοστό των T ρυθμιστικών να παρουσιάζεται στους υγιείς μάρτυρες, να ακολουθεί το ποσοστό στη διάγνωση της οξείας μυελογενούς λευχαιμίας και τέλος το ποσοστό στη διάγνωση της οξείας λεμφοβλαστικής λευχαιμίας. Η σημαντική αυτή αύξηση των T ρυθμιστικών κυττάρων στη διάγνωση της οξείας λευχαιμίας είναι ενδεικτική του ρόλου που διαδραματίζουν τα κύτταρα αυτά στη λευχαιμογένεση, μέσω της προστασίας που παρέχουν στα βλαστικά κύτταρα από την απάντηση του ανοσοποιητικού συστήματος, την οποία καταστέλλουν.

Προσδιορίστηκαν επίσης τα κυκλοφορούντα στην περιφέρεια T ρυθμιστικά κύτταρα στη διάρκεια της παρακολούθησης της λευχαιμίας για ανίχνευση ελάχιστης υπολειμματικής νόσου, στην υποτροπή του νοσήματος και στην παρακολούθηση του νοσήματος μετά τη θεραπεία διάσωσης, χωρίς ωστόσο να αναδειχθεί συσχέτιση των επιπέδων των κυττάρων αυτών με την εξέλιξη του νοσήματος. Παρατηρήθηκε ωστόσο ότι τα T ρυθμιστικά κύτταρα της διάγνωσης των ασθενών που πέτυχαν πλήρη ύφεση μετά τη θεραπεία εφόδου ήταν χαμηλότερα συγκριτικά με τα

ρυθμιστικά κύτταρα όσων παρουσίασαν πρωτοπαθώς ανθεκτική νόσο. Η παρατήρηση αυτή είναι ενδεικτική ότι τα T ρυθμιστικά λεμφοκύτταρα, τα οποία διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη λευχαιμογένεση, θα μπορούσαν να αποτελέσουν προγνωστικό δείκτη για την ανταπόκριση στη θεραπεία εφόδου αλλά δεν αποτελούν ασφαλή μέθοδο παρακολούθησης της ανταπόκρισης του νοσήματος στη χημειοθεραπευτική αγωγή και πρώιμης ανίχνευσης υποτροπής του νοσήματος και δεν είναι δόκιμο να χρησιμοποιούνται ως προγνωστικός δείκτης για την πορεία του νοσήματος.

12.ABSTRACT

The aim of this study is to propose an immunophenotypic strategy of determining the levels of T regulatory cells in peripheral blood with maximum sensitivity, to study the role of T-regulatory cells in leukemogenesis and the correlation of their levels with the response to chemotherapy and finally, to define the predictive value of the determination of their levels.

The term immunomodulation refers to all those immunological mechanisms that contribute to the achievement and maintenance of homeostasis of the organism. T-regulatory cells (Tregs), play an important role in the maintenance of homeostasis and their identification was made feasible after 1995 when Sakaguchi et al. recognized the CD25 surface molecule, which is the α chain of the interleukin 2 receptor and is expressed in Tregs.

Two fundamental populations of Tregs have been described; naturally-occurring Tregs (nTregs) or thymus-derived Tregs (tTregs) and inducible Tregs (iTregs) or periphery - derived Tregs (pTregs). The first ones derive from thymus, whereas the later ones originate from the differentiation of naive CD4+Foxp3- T cells in periphery, after their exposure to certain antibodies. The separation of human T-regulatory cells into three phenotypically and functionally distinct subpopulations is based on the factor Foxp3 expression. This transcription factor was described back in 2003, is a key factor in the development and functionality of regulatory T cells and constitutes the most reliable marker of Tregs. Resting or naive Tregs exhibit low expression of FoxP3 and express CD45RA (CD45RA⁺FoxP3^{lo} cells), effector or activated Tregs exhibit high expression of FoxP3 and do not express CD45RA (CD45RA⁻Foxp3^{hi} cells) and non-suppressing CD4+ T cells which secrete cytokines, do not express FoxP3 nor CD45RA (CD45RA⁻FoxP3^{lo} cells). Moreover, T-lymphocytes with maximum suppressive activity express the following markers: CD4⁺CD45RA⁻CD45RO⁺FOXP3^{hi}CD25^{hi}CD127^{lo}CD62L⁺.

T-regulatory cells provide an immunologically privileged area in the bone marrow where the primary hematopoietic progenitor cells are protected from immune system destruction. Tregs suppress colonization and medullary differentiation of hematopoietic stem cells and affect during homeostasis proliferation and differentiation of stem hematopoietic cells through the regulation of cytokines in the bone marrow. In addition, Tregs suppress T effector cells, viral T cell proliferation and antigen-dependent immune response against leukemic stem cells, contributing to the progression of the leukemia. Moreover, attempts to determine the expression of T-

regulatory cells for patients with acute leukemia (myeloid and lymphoblastic) have been made. The majority of research groups describe the expansion of regulatory cells in the diagnosis. Nevertheless, some research groups are reporting reduced levels of these cells in acute leukemia. The most common combinations of monoclonal antibodies for the determination of T-regulator cells in acute leukemias are: CD4⁺CD25^{hi}, CD4⁺CD25^{hi}CD127^{lo}, and CD4⁺CD25^{hi}FoxP3⁺, according to literature.

In this study, Tregs were identified in peripheral blood, using the CD4, CD25, CD127 and FoxP3 markers, of 60 patients with newly diagnosed acute myeloid leukemia, 15 patients with newly diagnosed acute lymphoblastic leukemia and 50 healthy volunteers. More specifically, cells expressing CD4⁺CD25^{hi}CD127^{lo}FoxP3⁺ were selected. The identification of T-regulatory cells in newly diagnosed acute leukemia, using the above phenotype, showed increased levels of Tregs at diagnosis in comparison to healthy volunteers. These levels revealed a significant gradient, with the lowest being present in healthy controls, followed by levels at diagnosis of acute myeloid leukemia and finally levels at diagnosis of acute lymphoblastic leukemia.

In addition, the significant increase of T-regulatory cells at diagnosis of acute leukemia is indicative of the role of Tregs in leukemogenesis through suppression of immune responses and thus the protection of stem cells from immune responses.

Circulating T regulatory cells were also determined during the monitoring of leukemia for detection of minimal residual disease, disease relapse and monitoring post salvage treatment. However, no correlation of the levels of these cells with the progression of the disease was detected. Despite this, it was observed that T-regulatory cells at diagnosis of leukemia in patients who achieved complete remission after the induction therapy were at lower ebb in comparison to the regulatory cells of those who had primary refractory disease. This observation is indicative that T-regulatory cells, which play an important role in leukemogenesis, could act as a predictive marker for response to induction therapy but cannot be used as a prognostic marker for the course of the disease, the response to chemotherapy and the early detection of relapse.

13. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Priyanka Saroj, Verma Mansi, Jha KK et al. An overview on immunomodulation. *J Adv Scient Res.* 2012; 3: 07-12
2. Βλαχογιαννόπουλος Π, Σκοπούλη Φ, Τζιούφας Α, Μουτσόπουλος Χ. Ανοσολογία. Παθολογική φυσιολογία. Εκδόσεις Λίτσας. 2000;3:43-93
3. Turgeon M.L. Hematopoiesis. *Clinical hematology theory and procedures.* 5th Edition Lippincott Williams & Wilkins. 2012; 4: 73-88
4. Kondo M, Weissman IL, Akashi K. Identification of clonogenic common lymphoid progenitors in mouse bone marrow. *Cell.* 1997; 91: 661-672.
5. Allman D, Sambandam A, Kim S, et al. Thymopoiesis independent of common lymphoid progenitors. *Nat Immunol.* 2003; 4: 168-174.
6. Myrtle Gordon Stem cells and haemopoiesis. *Postgraduate Haematology* 5th edition Blackwell Publishing Ltd.2005;1:1-12
7. Mebius RE, Kraal G Structure and function of the spleen. *Nat Rev Immunol.* 2005 Aug;5(8):606-16
8. Steiniger, B. Human spleen microanatomy: why mice do not suffice. *Immunology* 2015 Jul; 145(3): 334–346
9. Groom, A. C., Schmidt, E. E. & MacDonald, I. C. Microcirculatory pathways and blood flow in spleen: new insights from washout kinetics, corrosion casts, and quantitative intravital videomicroscopy. *Scanning Microsc.*1991; 5, 159–174
10. Bratosin, D. Mazurier J. Tissier JP. Estaquier J.Huart JJ. Ameisen JC. Aminoff D. Montreuil J. Cellular and molecular mechanisms of senescent erythrocyte phagocytosis by macrophages. A review. *Biochimie*1998; 80 (2), 173–195
11. Ansel K.M. Ngo VN. Hyman PL. Luther SA. Forster R. Sedgwick JD.Browning JL. Lipp M. Cyster JG. A chemokine-driven positive feedback loop organizes lymphoid follicles. *Nature* 2000; 406, 309–314
12. Martin, F. & Kearney, J. F. Marginal-zone B cells. *Nature Rev. Immunol.*2002; 2, 323–335
13. Nolte, M. A. Arens R. Kraus M. van Oers MH.Kraal G. van Lier RA. Mebius RE. B cells are crucial for both development and maintenance of the splenic marginal zone. *J. Immunol.* 2004; 172, 3620–3627
14. Crowley, M. T., Reilly, C. R. & Lo, D. Influence of lymphocytes on the presence and organization of dendritic cell subsets in the spleen. *J. Immunol.*1999; 163, 4894–4900
15. Lewis SM. The spleen. *Postgraduate Haematology* 5th edition Blackwell Publishing Ltd 2005;21; 358- 369
16. Turgeon M.L. Hematopoiesis. *Clinical hematology theory and procedures.* 5th Edition Lippincott Williams & Wilkins. 2012; 4: 73-88
17. Hoffman R., Benz E., Silberstein L., Heslop H., Weitz J., Anastasi J. *Hematology Basic principles and practice* 6th edition Elsevier Inc 2013;18:182-192
18. Moss P, Drayson M. Normal lymphocytes and non-neoplastic lymphocyte disorders. *Postgraduate Haematology* 7th edition John Wiley&Sons Ltd 2016;16;278-302
19. Dorshkind K, Rawlings D. B-cell development. *Hematology basic principles and practice,* 6th Edition Elsevier Ltd 2013, 18:182-192
20. Carty S, Riese M, Koretzky G. T- cell immunity. *Hematology basic principles and practice,* 6th Edition Elsevier Ltd 2013,19: 193-205

21. Stritesky, G. L., Jameson, S. C., & Hogquist, K. A., Selection of self-reactive T cells in the thymus, *Annual Review of Immunology*, 2012;30: 95–114
22. Yoshimura, A., Wakabayashi, Y., & Mori, T. Cellular and molecular basis for the regulation of inflammation by TGF-beta. *Journal of Biochemistry*, 2010;147(6), 781–792
23. Pobezinsky L.A., Angelov G.S., Tai X., Jeurling S., VanLaethem F., Feigenbaum L., et al. Clonal deletion and the fate of autoreactive thymocytes that survive negative selection. *Nat.Immunol.* 2012;13, 569–578
24. VanLaethem F., Sarafova S.D., Park J.H, Tai X., Pobezinsky L., Guintier T.I. et al. Deletion of CD4 and CD8 coreceptors permits generation of alphabeta T cells that recognize antigens independently of the MHC. *Immunity*, 2007: 27, 735–750
25. Hillhouse EE, Delisle JS, Lesage S. Immunoregulatory CD4- CD8- T cells as a potential therapeutic tool for transplantation, autoimmunity, and cancer. *Front Immunol.* 2013 Jan 24;4:6
26. Zhang C, Zhang J, Tian Z, The regulatory effect of natural killer cells: do "NK-reg cells" exist? *Cell Mol Immunol.* 2006 Aug;3(4):241-54
27. Cooper MA, Fehniger TA, Turner SC, et al. Human natural killer cells: a unique innate immunoregulatory role for the CD56bright subset. *Blood.* 2001;97:3146-3151
28. Deniz G, Akdis M, Aktas E, Blaser K, Akdis CA. Human NK1 and NK2 subsets determined by purification of IFN- γ -secreting and IFN- γ -nonsecreting NK cells. *Eur J Immunol.* 2002;32:879-884
29. Powell L, Chung P, Baum L. Overview and compartmentalization of the immune system. *Hematology basic principles and practice*, 6th Edition Elsevier Ltd 2013, 17, 172-181
30. Pollard J., Trophic macrophages in development and disease, *Nature Reviews Immunology*, 2009, 9, 259-270
31. Villadangos J, Schnorrer P. Intrinsic and cooperative antigen-presenting functions of dendritic-cell subsets in vivo. *Nature Reviews Immunology* 2007, 7, 543–555
32. Manches O, Lakshmanan V, Szczepiorkowski Z, Bhardwaj N. Dendritic cell biology. *Hematology basic principles and practice*, 6th Edition Elsevier Ltd 2013, 21, 217-227
33. Bain BJ. *Blood Cells, A practical guide*, Blackwell Ltd 2nd 1995;3:45-134
34. Khanna-Gupta A, Berliner N. Granulocytopoiesis and Monocytopoiesis. *Hematology basic principles and practice*, 6th Edition Elsevier Ltd 2013; 25, 280-291
35. M, Ackerman SJ, Butterfield JH, Mascarenhas J, Hoffman R. Eosinophilia, eosinophil-associated diseases, chronic eosinophil leukemia and the hypereosinophilic syndromes. *Hematology basic principles and practice*, 6th Edition Elsevier Ltd 2013, 70, 1077-1094
36. Ravandi F, Hoffman R. Phagocytes. *Postgraduate Haematology* 5th edition Blackwell Publishing Ltd 2005;17;277-302
37. Mascarenhas J, Kremyanskaya M, Hoffman R. Phagocytes. *Postgraduate Haematology*, 7th Edition John Wiley&Sons Ltd 2016, 14, 246-269
38. Mascarenhas J, Pardanani A, Kremyanskaya M, Hoffman R. Mast cells and systemic mastocytosis. *Hematology basic principles and practice*, 6th Edition Elsevier Ltd 2013, 71, 1095-1111
39. Cripe LD. Adult acute leukemia. *Curr Probl Cancer* 1997;21:1-64

40. Betz BL, Hess JL. Acute myeloid leukemia diagnosis in the 21st century. *Arch Pathol Lab Med* 2010;134:1427-33
41. Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, Thiele J, Arber DA, Hasserjian RP, Le Beau MM, Orazi A, Siebert R. *Who classification of tumors of Haemopoietic and Lymphoid Tissues. 2017 Revised Edition*
42. Μπουραντάς ΚΛ. Οξείες Λευχαιμίες. Μαθήματα Αιματολογίας. Ιατρική σχολή πανεπιστημίου Ιωαννίνων 2008;167-183
43. Burnett AK, Grimwade D. Acute myeloid leukemia. *Postgraduate Haematology 7th Edition Johnn Wiley & Sons Ltd* 2016;20;352-370
44. Rowntree C, Fielding AK. Adult acute lymphoblastic leukemia. *Postgraduate Haematology 7th Edition Johnn Wiley & Sons Ltd* 2016;21;371-383
45. Faderl S, Kantarjian HM. Clinical manifestations and treatment of acute myeloid leukemia. *Hematology basic principles and practice, 6th Edition Elsevier Ltd* 2013, 58;863-881
46. Döhner H, Estey E, Grimwade D, Amadori S, Appelbaum FR, Büchner T, Dombret H, Ebert BL, Fenaux P, Larson RA, Levine RL, Lo-Coco F, Naoe T, Niederwieser D, Ossenkoppele GJ, Sanz M, Sierra J, Tallman MS, Tien H, Wei AH, Löwenberg B, Bloomfield CD. Diagnosis and management of AML in adults: 2017 ELN recommendations from an international expert panel. *Blood* 2017 129:424-447
47. Skandali A, Tsirigotis P. Induction and Post- Remission Treatment of Acute Myeloid Leukemia. *Haema* 2017;8;2; 168-178
48. Tzannou I, Charchalakis N. Acute myeloid Leukemia in the Elderly. *Haema* 2017;8;2; 188-199
49. Sanz M, Grimwade D, Tallman MS, Lowenberg B, Fenaux P, Estey EH, Naoe T, Lengfelder E, Büchner T, Döhner H, Burnett AK, Lo-Coco F. Management of acute promyelocytic leukemia: recommendations from an expert panel on behalf of the European LeukemiaNet. *Blood* 2009 113:1875-1891
50. Papadaki C, Garofalaki M, Psarra A. Minimal residual disease in acute myeloid leukemia, Methology of detection and clinical importance, *Haema* 2017;8;2; 179-185
51. E Paietta. Assessing minimal residual disease (MRD) in leukemia: a changing definition and concept? *Bone Marrow Transplantation* (2002) 29, 459–465
52. Schuurhuis GJ, Heuser M, Freeman S, et al. Minimal/measurable residual disease in AML: a consensus document from the European LeukemiaNet MRD Working Party. *Blood*. 2018;131(12):1275-1291
53. van Dongen JJ, van der Velden VH, Brüggemann M, Orfao A. Minimal residual disease diagnostics in acute lymphoblastic leukemia: need for sensitive, fast, and standardized technologies. *Blood*. 2015 Jun 25;125(26):3996-4009
54. Farhad Ravandi, Roland B. Walter, Sylvie D. Freeman. Evaluating measurable residual disease in acute myeloid leukemia. *Blood Adv*. 2018 Jun 12; 2(11): 1356–1366
55. Paietta E. Minimal residual disease in acute myeloid leukemia: coming of age. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2012;2012:35-42
56. Porwit A, Béné M-C. Acute lymphoblastic leukemia/lymphoma and mixed phenotype acute leukemias. *Blood and Bone Marrow Pathology (Second Edition) Elsevier Ltd* 2011, 289-301

57. R.S. McHugh, M.J. Whitters, C.A. Piccirillo, D.A. Young, E.M. Shevach, M. Collins, M.C. Byrne, CD4(+)CD25(+) immunoregulatory T cells: gene expression analysis reveals a functional role for the glucocorticoid-induced TNF receptor, *Immunity* 16 (2) (2002) 311–323
58. J. Shimizu, S. Yamazaki, T. Takahashi, Y. Ishida, S. Sakaguchi, Stimulation of CD25+CD4+ regulatory T cells through GITR breaks immunological selftolerance, *Nat. Immunol.* 3 (2) (2002) 135–142
59. Sakaguchi, S., Fukuma, K., Kuribayashi, K. and Masuda, T. (1985) Organ-specific autoimmunediseases induced in mice by elimination of T-cell subset. I. Evidence for the active participation of T cells in natural self-tolerance: deficit of a T-cell subset as a possible cause of autoimmune disease. *J. Exp. Med.* 161,72–87
60. S. Sakaguchi, N. Sakaguchi, M. Asano, M. Itoh, M. Toda, Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases, *J. Immunol.* 155 (3) (1995) 1151–1164
61. Malek. T. R., Yu, A., Vincek, V., Scibelli, P. and Kong, L. (2002) CD4 regulatory T cells prevent lethal autoimmunity in IL-2Rbeta-deficient mice. Implications for the nonredundant function of IL-2. *Immunity* 17, 167–178
62. Setoguchi, R., Hori, S., Takahashi, T. and Sakaguchi, S. (2005) Homeostatic maintenance of natural Foxp3+CD25+CD4+ regulatory T cells by interleukin (IL)-2 and induction of autoimmune disease by IL-2 neutralization. *J. Exp. Med.* 201, 723–735
63. *Regulatory T Cells Methods and Protocols* Editors: Kassiotis, George, Liston, Adrian 2011 pg 8
64. Cools N, Ponsaerts P, Van Tendeloo VF, Berneman ZN, Regulatory T cells and human disease. *Clin Dev Immunol.* 2007;2007:89195
65. Zhen Y, Zheng J, Zhao Y, Regulatory CD4+CD25+ T cells and macrophages: communication between two regulators of effector T cells, *Inflamm Res.* 2008 Dec;57(12):564-70
66. Xin Chen, Yong Du, XiuQing Lin, Yan Qian, Ting Zhou, ZhiMing Huang, CD4 + CD25 + regulatory T cells in tumor immunity, *International Immunopharmacology* 34 (2016) 244-249
67. N. Ohkura, M. Hamaguchi, H. Morikawa, et al., T cell receptor stimulation-induced epigenetic changes and Foxp3 expression are independent and complementary events required for Treg cell development, *Immunity* 37 (2012) 785–799.
68. Komatsu, N., Mariotti-Ferrandiz, M. E., Wang, Y., Malissen, B., Waldmann, H., & Hori, S. (2009). Heterogeneity of natural Foxp3+ T cells: A committed regulatory T-cell lineage and an uncommitted minor population retaining plasticity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(6), 1903–1908.
69. Miyao, T., Floess, S., Setoguchi, R., Luche, H., Fehling, H. J., Waldmann, H., et al. Plasticity of Foxp3(+) T cells reflects promiscuous Foxp3 expression in conventional T cells but not reprogramming of regulatory T cells. *Immunity*, 2012, 36(2), 262–275

70. S. Sakaguchi, Naturally arising CD4⁺ regulatory T cells for immunologic selftolerance and negative control of immune responses, *Annu. Rev. Immunol.* 22 (2004) 531–562
71. Vukmanovic-Stejic M, Zhang Y, Cook JE, Fletcher JM, McQuaid A, Masters JE, Rustin MH, Taams LS, Beverley PC, Macallan DC, Akbar AN, Human CD4⁺ CD25^{hi} Foxp3⁺ regulatory T cells are derived by rapid turnover of memory populations in vivo, *J Clin Invest.* 2006 Sep;116(9):2423-33
72. S. Zelenay, T. Lopes-Carvalho, I. Caramalho, M.F. Moraes-Fontes, M. Rebelo, J. Demengeot, Foxp3⁺CD25⁻ CD4⁺ T cells constitute a reservoir of committed regulatory cells that regain CD25 expression upon homeostatic expansion, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102 (2005) 4091–4096.
73. M. Miyara, Y. Yoshioka, A. Kitoh, et al., Functional delineation and differentiation dynamics of human CD4⁺ T cells expressing the Foxp3 transcription factor, *Immunity* 30 (6) (2009) 899–911
74. Shimon Sakaguchi, Makoto Miyara, Cristina M. Costantino, David A. Hafler, FOXP3⁺ regulatory T cells in the human immune system, *Nat Rev Immunol.* 2010 Jul;10(7):490-500
75. Tai, X., Cowan, M., Feigenbaum, L., & Singer, A. CD28 costimulation of developing thymocytes induces Foxp3 expression and regulatory T cell differentiation independently of interleukin 2. *Nature Immunology*, 2005 6(2), 152–162
76. Luo, C.T., & Li, M.O. Transcriptional control of regulatory T cell development and function. *Trends in Immunology*, 2013, 34(11), 531–539
77. Okada M, Hibino S, Someya K, Yoshimura A, Regulation of regulatory T cells: epigenetics and plasticity, *Adv Immunol.* 2014;124:249-73
78. Muto, G., Kotani, H., Kondo, T., Morita, R., Tsuruta, S., Kobayashi, T., et al. TRAF6 is essential for maintenance of regulatory T cells that suppress Th2 type autoimmunity. *PLoS One*, 2013, 8(9), e74639
79. Takahashi R, Nishimoto S, Muto G, Sekiya T, Tamiya T et al. SOCS1 is essential for regulatory T cell functions by preventing loss of Foxp3 expression as well as IFN- γ and IL-17A production. *J Exp Med* 2011, 208: 2055-2067
80. van Loosdregt, J., Fleskens, V., Fu, J., Brenkman, A. B., Bekker, C. P., Pals, C. E., et al. Stabilization of the transcription factor Foxp3 by the deubiquitinase USP7 increases Treg-cell-suppressive capacity. *Immunity*, 2013, 39(2), 259–271
81. Liu, Y., Zhang, P., Li, J., Kulkarni, A. B., Perruche, S., & Chen, W. (2008). A critical function for TGF- β signaling in the development of natural CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ regulatory T cells. *Nature Immunology*, 9(6), 632–640
82. Lim, H.W. et al. Regulatory T cells can migrate to follicles upon T cell activation and suppress GC-Th cells and GC-Th cell-driven B cell responses. *J. Clin. Invest.* 2004; 114, 1640–1649
83. T. Bopp, C. Becker, M. Klein, et al., Cyclic adenosine monophosphate is a key component of regulatory T cell-mediated suppression, *J. Exp. Med.* 204 (2007) 1303–1310
84. Mahajan D, Wang Y, Qin X, Wang Y, Zheng G, Wang YM, Alexander SI, Harris DC: CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells protect against injury in an innate murine model of chronic kidney disease. *J Am Soc Nephrol* 2006; 17: 2731–2741

85. Hoves S, Krause SW, Schutz C, Halbritter D, Scholmerich J, Herfarth H, Fleck M: Monocyte-derived human macrophages mediate anergy in allogeneic T cells and induce regulatory T cells. *J Immunol* 2006; 177: 2691–2698
86. Nguyen VH, Zeiser R, Negrin RS, Role of naturally arising regulatory T cells in hematopoietic cell transplantation, *Biol Blood Marrow Transplant*. 2006 Oct;12(10):995-1009
87. Dario Vignali et al. How Regulatory T cells work. *Nature Reviews Immunology* volume 8, pages 523–532 (2008)
88. Shevach EM. From vanilla to 28 flavors: multiple varieties of T regulatory cells. *Immunity*. 2006;25:195–201
89. Collison LW, et al. The inhibitory cytokine IL-35 contributes to regulatory T-cell function. *Nature*. 2007;450:566–569. This paper was the first to describe the inhibitory cytokine IL-35 and its requirement by Treg cells for their maximal regulatory activity
90. Grossman WJ, et al. Differential expression of granzymes A and B in human cytotoxic lymphocyte subsets and T regulatory cells. *Blood*. 2004;104:2840–2848
91. Cao X, et al. Granzyme B and perforin are important for regulatory T cell-mediated suppression of tumor clearance. *Immunity*. 2007;27:635–646
92. Ren X, et al. Involvement of cellular death in TRAIL/DR5-dependent suppression induced by CD4(+)CD25(+) regulatory T cells. *Cell Death. Differ.* 2007;14:2076–2084
93. Nikolova M, Lelievre JD, Carriere M, Bensussan A, Lévy Y., Regulatory T cells differentially modulate the maturation and apoptosis of human CD8+ T-cell subsets, *Blood*. 2009 May 7;113(19):4556-65
94. Jian Ye, Xingxu Huang, Eddy C. Hsueh, Qunyuan Zhang, Chunling Ma, Yanping Zhang, Mark A. Varvares, Daniel F. Hoft and Guangyong Peng, Human regulatory T cells induce T-lymphocyte senescence, *Blood* 2012 ;120: 2021-2031
95. Pandiyan P, Zheng L, Ishihara S, Reed J, Lenardo MJ. CD4(+)CD25(+)Foxp3(+) regulatory T cells induce cytokine deprivation-mediated apoptosis of effector CD4(+) T cells. *Nat Immunol*. 2007;8:1353–1362
96. Deaglio S, et al. Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression. *J Exp. Med.* 2007;204:1257–1265
97. Borsellino G, et al. Expression of ectonucleotidase CD39 by Foxp3+ Treg cells: hydrolysis of extracellular ATP and immune suppression. *Blood*. 2007;110:1225–1232
98. Kobie JJ, et al. T regulatory and primed uncommitted CD4 T cells express CD73, which suppresses effector CD4 T cells by converting 5'-adenosine monophosphate to adenosine. *J Immunol*. 2006;177:6780–6786
99. Kryczek I, et al. Cutting edge: induction of B7-H4 on APCs through IL-10: novel suppressive mode for regulatory T cells. *J Immunol*. 2006;177:40–44
100. Fallarino F, et al. Modulation of tryptophan catabolism by regulatory T cells. *Nat Immunol*. 2003;4:1206–1212
101. Mellor AL, Munn DH. IDO expression by dendritic cells: tolerance and tryptophan catabolism. *Nat Rev. Immunol*. 2004;4:762–774
102. Venet F, Pachot A, Debard AL, Bohe J, Bienvenu J, Lepape A, Powell WS, Monneret G: Human CD4+CD25+ regulatory T lymphocytes inhibit

- lipopolysaccharide-induced monocyte survival through a Fas/Fas ligand-dependent mechanism. *J Immunol* 2006; 177: 6540–6547
103. Janssens, W., V. Carlier, B. Wu, L. VanderElst, M. G. Jacquemin, J. M. Saint-Remy. 2003. CD4+CD25+ T cells lyse antigen-presenting B cells by Fas-Fas ligand interaction in an epitope-specific manner. *J. Immunol.* 171: 4604-4612
 104. Benedikt Fritzsching, Nina Oberle, Eva Pauly, Robert Geffers, Jan Buer, Johannes Poschl, Peter Krammer, Otwin Linderkamp and Elisabeth Suri-Payer. Naive regulatory T cells: a novel subpopulation defined by resistance toward CD95L-mediated cell death, *Blood*, 2006 108: 3371-3378
 105. K. Kretschmer, I. Apostolou, E. Jaeckel, K. Khazaie, H. von Boehmer, Making regulatory T cells with defined antigen specificity: role in autoimmunity and cancer, *Immunol. Rev.* 212 (2006) 163–169
 106. S.Z. Josefowicz, L.F. Lu, A.Y. Rudensky, Regulatory T cells: mechanisms of differentiation and function, *Annu. Rev. Immunol.* 30 (2012) 531–564
 107. F. Ghiringhelli, P.E. Puig, S. Roux, A. Parcellier, E. Schmitt, E. Solary, G. Kroemer, F. Martin, B. Chauffert, L. Zitvogel, Tumor cells convert immature myeloid dendritic cells into TGF-beta-secreting cells inducing CD4+CD25+ regulatory T cell proliferation, *J Exp Med* 2005; 202: 919–929
 108. Huehn J, Hamann A: Homing to suppress: address codes for Treg migration. *Trends Immunol* 2005; 26: 632–636
 109. Miyara M, Sakaguchi S, Human FoxP3(+)/CD4(+) regulatory T cells: their knowns and unknowns, *Immunol Cell Biol.* 2011 Mar;89(3):346-51
 110. Takatoshi Chinen, Arun K. Kannan, Andrew G Levine, Xiyang Fan, Ulf Klein, Ye Zheng, Georg Gasteiger, Yongqiang Feng, Jason D. Fontenot, Alexander Y. Rudensky, An essential role for IL-2 receptor in regulatory T cell function, *Nat Immunol.* 2016 Nov; 17(11): 1322–1333
 111. Burchill MA, Yang J, Vogtenhuber C, Blazar BR, Farrar MA, IL-2 receptor beta-dependent STAT5 activation is required for the development of Foxp3+ regulatory T cells, *J Immunol.* 2007 Jan 1;178(1):280-90
 112. Brunkow, M. E., Jeffery, E. W., Hjerrild, K. A., Paeper, B., Clark, L. B., Yasayko, S. A., Wilkinson, J. E. et al., Disruption of a new forkhead/ winged-helix protein, scurfy, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse. *Nat. Genet.* 2001. 27: 68–73
 113. Wildin, R. S., Ramsdell, F., Peake, J., Faravelli, F., Casanova, J. L., Buist, N., Levy-Lahad, E. et al., X-linked neonatal diabetes mellitus, enteropathy and endocrinopathy syndrome is the human equivalent of mouse scurfy. *Nat. Genet.* 2001. 27: 18–20
 114. R.M. Samstein, A. Arvey, S.Z. Josefowicz, et al., Foxp3 exploits a pre-existent enhancer landscape for regulatory T cell lineage specification, *Cell* 151 (1) (2012) 153–166
 115. Fontenot JD, Gavin MA, Rudensky AY, Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells *Nat Immunol.* 2003 Apr;4(4):330-6
 116. Dominguez-Villar M, Hafler D, Regulatory T cells in autoimmune disease, *Nature Immunology*, 2018,19: 665–673
 117. Gavin MA, Rasmussen JP, Fontenot JD, Vasta V, Manganiello VC, Beavo JA, Rudensky AY, Foxp3-dependent programme of regulatory T-cell differentiation, *Nature.* 2007 Feb 15;445(7129):771-5

118. Williams LM, Rudensky AY, Maintenance of the Foxp3-dependent developmental program in mature regulatory T cells requires continued expression of Foxp3, *Nat Immunol.* 2007 Mar;8(3):277-84
119. Laurence, A., Tato, C. M., Davidson, T. S, Kanno, Y., Chen, Z., Yao, Z., Blank, R. B. et al., Interleukin-2 signaling via STAT5 constrains T helper 17 cell generation. *Immunity* 2007. 26: 371–381.
120. Bettelli, E., Carrier, Y., Gao, W., Korn, T., Strom, T. B., Oukka, M., Weiner, H. L. and Kuchroo, V. K. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature* 2006. 441: 235–238
121. Weihong Liu, Amy L. Putnam, Zhou Xu-yu, Gregory L. Szot, Michael R. Lee, Shirley Zhu, Peter A. Gottlieb, Philipp Kapranov, Thomas R. Gingeras, Barbara Fazekas de St. Groth, Carol Clayberger, David M. Soper, Steven F. Ziegler, and Jeffrey A. Bluestone, CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4+ T reg cells, *JEM* 2006; 203;7;1701-1711
122. Federico Simonetta, Amel Chiali, Corinne Cordier, Alejandra Urrutia, Isabelle Girault, Stephane Bloquet, Corinne Tanchot and Christine Bourgeois, Increased CD127 expression on activated FOXP3+CD4+ regulatory T cells, *Eur. J. Immunol.* 2010. 40: 2528–2538
123. Xin Chen and Joost J. Oppenheim, Resolving the identity myth: key markers of functional CD4+FoxP3+ regulatory T cells, *Int Immunopharmacol.* 2011; 11(10): 1489–1496
124. Ephrem A, Epstein AL, Stephens GL, Thornton AM, Glass D, Shevach EM. Modulation of Treg cells/T effector function by GITR signaling is context-dependent, *Eur J Immunol.* 2013 Sep;43(9):2421-9
125. Ronchetti S, Ricci E, Petrillo MG, Cari L, Migliorati G, Nocentini G, Riccardi C, Glucocorticoid-induced tumour necrosis factor receptor-related protein: a key marker of functional regulatory T cells, *J Immunol Res.* 2015; 2015: 171520
126. K. Wing, T. Yamaguchi, S. Sakaguchi, Cell-autonomous and non-autonomous roles of CTLA-4 in immune regulation, *Trends Immunol.* 32 (9) (2011) 428–433
127. Pasare C, Medzhitov R. Toll pathway-dependent blockade of CD4+CD25+ T cell-mediated suppression by dendritic cells. *Science.* 2003;299:1033-1036
128. Venturi GM1, Conway RM, Steeber DA, Tedder TF., CD25+CD4+ regulatory T cell migration requires L-selectin expression: L-selectin transcriptional regulation balances constitutive receptor turnover, *J Immunol.* 2007 Jan 1;178(1):291-300
129. Lepault, F., and M. C. Gagnerault. 2000. Characterization of peripheral regulatory CD4 T cells that prevent diabetes onset in nonobese diabetic mice. *J. Immunol.* 164: 240 –247
130. Audrey Mohr, Rajneesh Malhotra, Gaell Mayer, Guy Gorochov, Makoto Miyara, Human FOXP3+ T regulatory cell heterogeneity, *Clin Transl Immunology.* 2018; 7(1): e1005
131. Darrasse-Jèze G., Podsypanina K, How numbers, nature, and immune status of Foxp3+ regulatory T-cells shape the early immunological events in tumor development, *Front Immunol.* 2013 Sep 26;4:292
132. S. Malchow, D.S. Leventhal, S. Nishi, et al., Aire-dependent thymic development of tumor-associated regulatory T cells, *Science* 339 (2013) 1219–1224

133. A.A. Tveita, F. Schjesvold, O.A. Haabeth, M. Fauskanger, B. Bogen, Tumors escape CD4+ T-cell-mediated immunosurveillance by impairing the ability of infiltrating macrophages to indirectly present tumor antigens, *Cancer Res.* 75 (16) (2015) 3268–3278
134. S. Yamazaki, T. Iyoda, K. Tarbell, K. Olson, K. Velinzon, K. Inaba, R.M. Steinman, Direct expansion of functional CD25+CD4+ regulatory T cells by antigenprocessing dendritic cells, *J. Exp. Med.* 198 (2) (2003) 235–247
135. G. Zhou, H.I. Levitsky, Natural regulatory T cells and de novo-induced regulatory T cells contribute independently to tumor-specific tolerance, *J. Immunol.* 178 (2007) 2155–2162
136. J. Zhou, T. Ding, W. Pan, L.Y. Zhu, L. Li, L. Zheng, Increased intratumoral regulatory T cells are related to intratumoral macrophages and poor prognosis in hepatocellular carcinoma patients, *Int. J. Cancer* 125 (7) (2009) 1640–1648
137. Darrasse-Jeze G, Bergot AS, Durgeau A, Billiard F, Salomon BL, Cohen JL, et al. Tumor emergence is sensed by self-specific CD44hi memory Tregs that create a dominant tolerogenic environment for tumors in mice. *J Clin Invest* (2009) 119:2648–62
138. Nishikawa H, Jager E, Ritter G, Old LJ, Gnjatich S. CD4+CD25+ regulatory T cells control the induction of antigen-specific CD4+ helper T cell responses in cancer patients. *Blood* (2005) 106:1008–11
139. Pages F, Berger A, Camus M, Sanchez-Cabo F, Costes A, Molidor R, et al. Effector memory T cells, early metastasis, and survival in colorectal cancer. *N Engl J Med* (2005) 353:2654–66
140. Buggins AG, Milojkovic D, Arno MJ, Lea NC, Mufti GJ, Thomas NS, Hirst WJ, Microenvironment produced by acute myeloid leukemia cells prevents T cell activation and proliferation by inhibition of NF-kappaB, c-Myc, and pRb pathways, *J Immunol.* 2001 Nov 15;167(10):6021-30
141. Zhao E, Xu H, Wang L, Kryczek I, Wu K, Hu Y et al. Bone marrow and the control of immunity. *Cell Mol Immunol* 2012; 9: 11–19
142. Fujisaki J, Wu J, Carlson AL, Silberstein L, Putheti P, Larocca R et al. *In vivo* imaging of Treg cells providing immune privilege to the haematopoietic stem-cell niche. *Nature* 2011; 474: 216–219
143. Urbietta M, Barao I, Jones M, Jurecic R, Panoskaltsis-Mortari A, Blazar BR et al. Hematopoietic progenitor cell regulation by CD4+CD25+ T cells. *Blood* 2010; 115: 4934–4943
144. C Riether, CM Schurch, AF Ochsenbein. Regulation of hematopoietic and leukemic stem cells by the immune system. *Cell Death and Differentiation* (2015) 22, 187–198
145. Ustun C, Miller JS, Munn DH, Weisdorf DJ, Blazar BR. Regulatory T cells in acute myelogenous leukemia: is it time for immunomodulation? *Blood.* 2011 Nov 10;118(19):5084-95
146. Wang X, Zheng J, Liu J, Yao J, He Y, Li X, Yu J, Yang J, Liu Z, Huang S, Increased population of CD4(+)/CD25(high), regulatory T cells with their higher apoptotic and proliferating status in peripheral blood of acute myeloid leukemia patients, *Eur J Haematol.* 2005 Dec;75(6):468-76
147. Miroslaw J. Szczepanski, Marta Szajnik, Malgorzata Czystowska, Magis Mandapathil, Laura Strauss, Ann Welsh, Kenneth A. Foon, Theresa L. Whiteside and Michael Boyiadzis, Increased Frequency and Suppression by Regulatory T

- Cells in Patients with Acute Myelogenous Leukemia, *Clin Cancer Res* 2009;15(10):3325-3332
148. Shenghui Z, Yixiang H, Jianbo W, Kang Y, Laixi B, Yan Z, Xi X. Elevated frequencies of CD4⁺ CD25⁺ CD127^{lo} regulatory T cells is associated to poor prognosis in patients with acute myeloid leukemia. *Int J Cancer*. 2011 Sep 15;129(6):1373-81
 149. Ersvaer E, Liseth K, Skavland J, Gjertsen BT, Bruserud Ø. Intensive chemotherapy for acute myeloid leukemia differentially affects circulating TC1, TH1, TH17 and TREG cells. *BMC Immunol*. 2010 Jul 9;11:38
 150. Christopher G. Kanakry, Allan D. Hess, Christopher D. Gocke, Christopher Thoburn, Ferdynand Kos, Christian Meyer, Janet Briel, Leo Luznik, B. Douglas Smith, Hyam Levitsky and Judith E. Karp. Early lymphocyte recovery after intensive timed sequential chemotherapy for acute myelogenous leukemia: peripheral oligoclonal expansion of regulatory T cells. *Blood* 2011 117:608-617
 151. Yang W, Xu Y. Clinical significance of Treg cell frequency in acute myeloid leukemia. *Int J Hematol*. 2013 Nov;98(5):558-62
 152. Lichtenegger FS, Lorenz R, Gellhaus K, Hiddemann W, Beck B, Subklewe M. Impaired NK cells and increased T regulatory cell numbers during cytotoxic maintenance therapy in AML. *Leuk Res*. 2014 Aug;38(8):964-9
 153. Tao Q, Pan Y, Wang Y, Wang H, Xiong S, Li Q, Wang J, Tao L, Wang Z, Wu F, Zhang R, Zhai Z. Regulatory T cells-derived IL-35 promotes the growth of adult acute myeloid leukemia blasts. *Int J Cancer*. 2015 Nov 15;137(10):2384-93
 154. Wu CP, Qing X, Wu CY, Zhu H, Zhou HY. Immunophenotype and increased presence of CD4(+)CD25(+) regulatory T cells in patients with acute lymphoblastic leukemia. *Oncol Lett*. 2012 Feb;3(2):421-424
 155. Bhattacharya K, Chandra S, Mandal C. Critical stoichiometric ratio of CD4(+) CD25(+) FoxP3(+) regulatory T cells and CD4(+) CD25(-) responder T cells influence immunosuppression in patients with B-cell acute lymphoblastic leukaemia. *Immunology*. 2014 May;142(1):124-39
 156. Idris SZ, Hassan N, Lee LJ, Md Noor S, Osman R, Abdul-Jalil M, Nordin AJ, Abdullah M. Increased regulatory T cells in acute lymphoblastic leukemia patients. *Hematology*. 2015 Oct;20(9):523-9
 157. Hill M.A. Thymus Histology. *Embryology* 2017
 158. Drayson MT, Moss AH. Normal lymphocytes and non-neoplastic lymphocyte disorders. *Postgraduate Haematology* 5th edition Blackwell Publishing Ltd 2005;20; 330-357
 159. Digikalla.info. Spleen anatomy. 2017;6
 160. Cambier J, Gauld S, Merrell KT, Vilen BJ. B-cell anergy: from transgenic models to naturally occurring anergic B cells? *Nature Reviews Immunology* 2007; 7 (8), 633-643
 161. Nagasawa T. Microenvironmental niches in the bone marrow required for B-cell development. *Nature Reviews Immunology* 2006; 6, 107–116
 162. Hiroyuki A. et al, Targeted Cancer Therapy by Dendritic Cell Vaccine. *Intech* 2013;14;299-317 doi:10.5772/55450
 163. Borregaard N and Cowland J. Granules of the Human Neutrophilic Polymorphonuclear Leukocyte. *Blood* 1997;89:3503-3521
 164. Kremyanskaya M, Ackerman SJ, Butterfield JH, Mascarenhas J, Hoffman R. Eosinophilia, eosinophil-associated diseases, chronic eosinophil leukemia and

- the hypereosinophilic syndromes. *Hematology basic principles and practice*, 6th Edition Elsevier Ltd 2013, 70, 1077-1094
165. Jain N, Gurbuxani S, Rhee C, Stock W. Acute Lymphoblastic Leukemia in Adults. *Hematology basic principles and practice*, 6th Edition Elsevier Ltd 2013, 65;960-980
166. Gutierrez A, Armstrong SA, Look AT. Pathobiology of Acute Lymphoblastic Leukemia. *Hematology basic principles and practice*, 6th Edition Elsevier Ltd 2013, 63;935-950
167. Rosenblum et al, Regulatory T cell memory, *Nat Rev Immunol*. 2016 Feb; 16(2): 90–101
168. Ohkura N, Kitagawa Y, Sakaguchi S, Development and maintenance of regulatory T cells, *Immunity*. 2013 Mar 21;38(3):414-23
169. Zou W. 2005. Immunosuppressive networks in the tumour environment and their therapeutic relevance. *Nat. Rev. Cancer* 5: 263-274

14. ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

AICD : Activation-induced cell death- Επαγόμενος από ενεργοποίηση κυτταρικός θάνατος
ADCC: Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity – Κυτταροτοξικότητα αντιγονοεξαρτώμενη μεσολαβούμενη από κύτταρα

APCs: Antigen Presenting Cells – Αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα

BCR: B cell Receptor – Υποδοχέας B κυττάρου

cAMP: cyclic Adenosine Monophosphate – κυκλική μονοφωσφορική αδενοσίνη

CTLs: Cytotoxic T Lymphocytes – Κυτταροτοξικά T λεμφοκύτταρα

CTLA-4: Cytotoxic T Lymphocyte- associated antigen 4 – Σχετιζόμενο με τα κυτταροτοξικά T λεμφοκύτταρα αντιγόνο 4

cDCs : conventional Dendritic Cells – Συμβατικά δενδριτικά κύτταρα

DCs: Dendritic Cells – Δενδριτικά κύτταρα

DNs: Double negative cells – Διπλά αρνητικά κύτταρα

DPs: Double positive cells - Διπλά θετικά κύτταρα

ETPs: Early thymic progenitors – Πρώιμοι πρόγονοι Θυμοκυττάρων

GITR: Glycocorticoid- induced TNF receptor family –related gene – Γονίδιο σχετιζόμενο με την οικογένεια του επαγόμενου από τα γλυκοκορτικοειδή υποδοχέα του TNF

GM-CSF: Granulocyte-Macrophage-colony stimulating factor – Αυξητικός παράγοντας των κοκκιοκυττάρων και των μακροφάγων

IFN- γ: Interferon- γ – Ιντερφερόνη-γ

IL: Interleukin – Ιντερλευκίνη

iTregs: induced T regulatory cells – Επαγόμενα T ρυθμιστικά λεμφοκύτταρα

LAIP : Leukemia Associated Immunophenotype - Σχετιζόμενος με τη λευχαιμία ανοσοφαινότυπος

MEP: megakaryocyte–erythroid progenitor - Μεγακαρυοκυτταρικός και Ερυθροειδής πρόγονος

MHC: Major histocompatibility complex - Μείζον σύμπλεγμα ιστοσυμβατότητας

MRD: Minimal residual disease – Ελάχιστη υπολειμματική νόσος

NGS: next generation DNA sequencing - Μέθοδος της αλληλούχισης DNA επόμενης γενιάς

NKs: Natural Killer cells – Κύτταρα φυσικοί φονείς

pDCs: plasmacytoid Dendritic Cells – Πλασματοκυτταρικά δενδριτικά κύτταρα

PPRs: Pathogen Recognition Receptors – Υποδοχείς αναγνώρισης παθογόνου

RT-qPCR: real-time quantitative PCR – Ποσοτική PCR σε πραγματικό χρόνο

SOCS1: Suppressor of cytokine signaling 1- Καταστέλλων την σηματοδότηση από κυττοκίνες-1

SPs: Single positive cells - Μονά θετικά κύτταρα

TCR: T cell Receptor – Υποδοχέας T κυτάρου

Tfh : follicular helper T cells - T οζώδη βοηθητικά κύτταρα

TGFβ: Transforming growth factor β – Αυξητικός παράγων μετατροπής β

Th: effector T helper cells - Δραστικά βοηθητικά T κύτταρα

TNF: Tumor Necrosis Factor – Παράγοντας νέκρωσης όγκων

TRAF6: Tumor necrosis factor receptor (TNFR)-associated factor 6 – Παράγοντας 6 σχετιζόμενος με τον παράγοντα νέκρωσης όγκων

TRAIL-DR5: tumour-necrosis factor-related apoptosis inducing ligand–death receptor 5 – Απόπτωση σχετιζόμενη με τον παράγοντα νέκρωσης όγκων επάγει το θάνατο του συνδέτη του υποδοχέα 5

Tregs: T regulatory cells – T ρυθμιστικά λεμφοκύτταρα

tTregs: thymus derived Tregs - Θυμικής προέλευσης T ρυθμιστικά λεμφοκύτταρα

TSDR- Treg- specific demethylated region- Ειδική περιοχή απομεθυλίωσης των T ρυθμιστικών κυττάρων

VEGF: Vascular Endothelial Growth Factor – Αγγειακός/ Ενθοληθιακός αυξητικός παράγοντας

15. APPENDIX

15.1 ΕΙΚΟΝΕΣ

- Εικόνα 1. Τα κύρια διαμερίσματα του θύμου. Τροποποιημένη εικόνα από Hill M.A. (157) _____ - 8 -
- Εικόνα 2. Τα κύρια διαμερίσματα ενός λεμφαδένα. Τροποποιημένη εικόνα από Drayson MTet al. (158) _____ - 9 -
- Εικόνα 3. Τα κύρια διαμερίσματα του σπλήνα. Τροποποιημένη εικόνα από Digikalla (159) _____ - 10 -
- Εικόνα 4. Μοντέλο αιμοποίησης. Τροποποιημένη εικόνα από Turgeon M.L. (16) _____ - 13 -
- Εικόνα 5. Ο υποδοχέας του B κυττάρου. Τροποποιημένη εικόνα από Moss P et al. (18) _____ - 15 -
- Εικόνα 6. Διαφοροποίηση του B κυττάρου. Τροποποιημένη εικόνα από Cambier J et al. (160) _____ - 17 -
- Εικόνα 7. Αντιγόνα επιφανείας κατά την ωρίμανση του B κυττάρου. Τροποποιημένη εικόνα από Nagasawa T. (161) _____ - 17 -
- Εικόνα 8. Η ανάπτυξη των T κυττάρων στο θύμο. Τροποποιημένη εικόνα από Carty S et al. (20) _____ - 20 -
- Εικόνα 9. Διαφοροποίηση των παρθένων CD4+ T κυττάρων. Τροποποιημένη εικόνα από Yoshimura et al. (22) _____ - 22 -
- Εικόνα 10. Επίδραση του TGF-β στα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος. Τροποποιημένη εικόνα από Yoshimura et al. (22) _____ - 23 -
- Εικόνα 11. Η δράση των CD8+ κυτταροτοξικών T κυττάρων. Τροποποιημένη εικόνα από Carty S et al. (20) _____ - 24 -
- Εικόνα 12. Τα CD56bright and CD56dim NK κύτταρα φέρουν διαφορετικούς υποδοχείς στην επιφάνειά τους και εμφανίζουν διαφορετική δράση. Τροποποιημένη εικόνα από Cooper MA et al. (27) _____ - 29 -
- Εικόνα 13. Η ελεγχόμενη από τους αυξητικούς παράγοντες ανάπτυξη των μακροφάγων. Τροποποιημένη εικόνα από Pollard J. (30) _____ - 31 -
- Εικόνα 14. Οδοί αντιγονοπαρουσίασης από τα δενδριτικά κύτταρα. Τροποποιημένη εικόνα από Villadangos J et al. (31) _____ - 34 -
- Εικόνα 15. Το είδος των κοκκίων που περιέχονται αναλόγως του σταδίου διαφοροποίησης του κοκκιοκυττάρου. Τροποποιημένη εικόνα από Borregaard N και Cowland J. (163) _____ - 36 -
- Εικόνα 16. Δομή του ώριμου ηωσινοφίλου. Τροποποιημένη εικόνα από Kremyanskaya M et al. (164) - 38 -
- Εικόνα 17. Πενταετής επιβίωση πασχόντων από ΟΜΛ ηλικίας <60 ετών σύμφωνα με την ομάδα κινδύνου. Τροποποιημένη εικόνα από Burnett AK et al. (43) _____ - 49 -
- Εικόνα 18. Συχνότητα ανίχνευσης μεταλλάξεων στους πάσχοντες από ΟΛΛ. Τροποποιημένη εικόνα από Gutierrez A. et al. (166) _____ - 53 -
- Εικόνα 19. Αναλογία των ειδικών για τη λευχαιμία στόχων της MRD που ανιχνεύονται με RT-qPCR σε πάσχοντες από ΟΜΛ ανάλογα με την ηλικία. Τροποποιημένη εικόνα από Farhad Ravandi et al. (54) _____ - 60 -
- Εικόνα 20. Πιθανά σενάρια ανιχνεύσιμης MRD. Τροποποιημένη εικόνα από Schuurhuis GJ et al. (52) _____ - 61 -
- Εικόνα 21. Συστάσεις της ELN για την παρακολούθηση της MRD σε πάσχοντες από ΟΜΛ. Τροποποιημένη εικόνα από Schuurhuis GJ et al. (52) _____ - 61 -
- Εικόνα 22. Ο κύκλος ζωής των ρυθμιστικών και συμβατικών CD4+ T κυττάρων. Τροποποιημένη εικόνα από Rosenblum et al. (167) _____ - 67 -
- Εικόνα 23. Ανάπτυξη των T ρυθμιστικών κυττάρων στο θύμο και στην περιφέρεια. Τροποποιημένη εικόνα από Okada M et al. (77) _____ - 69 -
- Εικόνα 24. Η διαφοροποίηση των Tregs και η έκφραση των CD45RA και Foxp3 αναλόγως της διαφοροποίησης. Ο θύμος παράγει CD45RA+Foxp3lo nTregs καθώς και παρθένα CD45RA+ non-Treg κύτταρα. Μετά την αντιγονική διέγερση, τα nTregs διαφοροποιούνται σε CD45RA-Foxp3hi eTregs, τα οποία έχουν κατασταλτική δράση και είναι ικανά να καταστείλουν τον πολλαπλασιασμό άλλων Tregs καθώς και non-Tregs κυττάρων in vitro. Τροποποιημένη εικόνα από Miyaga M and Sakaguchi S. (109) - 70 -
- Εικόνα 25. Διαφοροποίηση των Tregs. Τροποποιημένη εικόνα από Shimon Sakaguchi et al. (74) _____ - 72 -

Εικόνα 26. Μοντέλο επιλογής σύμφωνα με την συγγένεια στον TCR στο θύμο. Τροποποιημένη εικόνα από Stritesky et al. (21)	- 73 -
Εικόνα 27. Οι επιγενετικές τροποποιήσεις καθορίζουν τον τύπο των Tregs. Τροποποιημένη εικόνα από Ohkura N et al. (168)	- 74 -
Εικόνα 28. Δράση των Tregs σε υγιείς και στην αυτοανοσία. Δύο βασικοί παράγοντες ελέγχουν τη δράση αυτή: η έκφραση του Foxp3 και οι επιγενετικές τροποποιήσεις. Τροποποιημένη εικόνα από Dominguez-Villar M et al. (116)	- 75 -
Εικόνα 29. Ο ρόλος του SOCS1 και του TRAF6 στη έκφραση του Foxp3. Τροποποιημένη εικόνα από Okada M et al. (77)	- 76 -
Εικόνα 30. Μηχανισμοί καταστολής των T δραστικών λεμφοκυττάρων από τα T ρυθμιστικά λεμφοκύτταρα. Τροποποιημένη εικόνα από Cools N et al. (64)	- 82 -
Εικόνα 31. Βασικοί μηχανισμοί λειτουργίας των T ρυθμιστικών λεμφοκυττάρων. Τροποποιημένη εικόνα από Dario Vignali et al. (87)	- 84 -
Εικόνα 32. Καθορισμός της κατασταλτικής δράσης των Tregs in vivo, ανάλογα με την κατανομή τους. Τροποποιημένη εικόνα από Huehn J et Hamann A. (108)	- 86 -
Εικόνα 33. Η έκφραση του Foxp3 στα Tregs στον άνθρωπο. Χαμηλή έκφραση του Foxp3 επάγει ένα περιορισμένο αριθμό κυττάρων με φαινότυπο Treg χωρίς κατασταλτική δράση. Η κατασταλτική δράση αποκτάται μόνο σε υψηλή έκφραση Foxp3. Τροποποιημένη εικόνα από Shimon Sakaguchi et al. (74)	- 88 -
Εικόνα 34. Οι υποπλυθυσμοί των T κυττάρων όπως καθορίζονται από την έκφραση CD25, Foxp3 και επιγενετικές τροποποιήσεις. Τα Tregs εμφανίζουν υψηλή έκφραση του CD25 και του Foxp3 και έχουν υποστεί επιγενετικές τροποποιήσεις. Τροποποιημένη εικόνα από Ohkura N et al. (168)	- 97 -
Εικόνα 35. Η ετερογένεια των κυκλοφορούντων Tregs ως προς το φαινότυπο και τις λειτουργίες τους. Τροποποιημένη εικόνα από Audrey Mohr et al. (130)	- 99 -
Εικόνα 36. Τα T κύτταρα διηθούν τον όγκο και αποτελούν βασικό στοιχείο της αντικαρκινικής δραστηριότητας. Παράγων κλειδί στην διευκόλυνση του όγκου να αποφύγει το ανοσοποιητικό σύστημα είναι η μεσολαβούμενη από τα Tregs ανοσοκαταστολή. Τα Tregs εμπλουτίζουν το αίμα, τις κακοήθεις συλλογές (πλευριτικές, ασκτικές), λεμφαδένες και ιστούς διηθημένους από διάφορους τύπους καρκίνου, δείχνοντας ότι το μικροπεριβάλλον του όγκου μπορεί να ενισχύσει την ανοσολογική ανοχή, προσελκύοντας ή/και επάγοντας κυρίαρχα κατασταλτικά κύτταρα. Τροποποιημένη εικόνα από Zou W. et al. (169)	- 100 -
Εικόνα 37. Μοντέλο επαγωγής των Tregs και επέκτασης των παρθένων Tregs στο περιβάλλον του όγκου. Τα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα (APC), πιθανώς μέσω παραγόντων προερχόμενων από τον όγκο, όπως VEGF, IL-10, και TGF-β, μπορούν να αποκτήσουν αντιγόνα του όγκου και να τα παρουσιάσουν σε παρθένα CD4+ T κύτταρα. Αυτή η αντιγονική έκθεση μετατρέπει κάποια παρθένα κύτταρα σε επαγόμενα T ρυθμιστικά κύτταρα (iTregs). Ο εμβολιασμός επεκτείνει τα iTregs και ενισχύει τα προϋπάρχοντα φυσικά Tregs (nTregs). Τροποποιημένη εικόνα από G. Zhou et H. I. Levitsky. (135)	- 102 -
Εικόνα 38. Σύγκριση των Tregs (CD4+CD25hi) σε πάσχοντες από ΟΜΛ και υγιείς δότες. Τροποποιημένη εικόνα από Wang X et al. (146)	- 105 -
Εικόνα 39. Ποσοστό και ικανότητα καταστολής των Tregs σε πάσχοντες από ΟΜΛ στη διάγνωση και μετά την επίτευξη πλήρους ύφεσης συνέπεια της αγωγής εφόδου. Τροποποιημένη εικόνα από Miroslaw J. Szczepanski et al. (147)	- 106 -
Εικόνα 40. Προτίμηση των Tregs να συσσωρεύονται στο μυελό των οστών (BM) συγκριτικά με το περιφερικό αίμα (PB) και αυξημένο ποσοστό σε ασθενείς συγκριτικά με υγιείς δότες (HV). Τροποποιημένη εικόνα από Shenghui Z et al. (148)	- 107 -
Εικόνα 41. Τα Tregs στη διάγνωση πασχόντων από καλής πρόγνωσης ΟΜΛ (GP) που πέτυχαν πλήρη ύφεση (CR) σε σύγκριση με πάσχοντες από κακής πρόγνωσης νόσημα (PP) και υγιείς δότες (HV). Τροποποιημένη εικόνα από Shenghui Z et al. (148)	- 108 -
Εικόνα 42. Σύγκριση των κυκλοφορούντων Tregs σε πάσχοντες από ΟΜΛ και υγιείς εθελοντές. Τροποποιημένη εικόνα από Ersvaer E et al. (149)	- 109 -

Εικόνα 43. Τα Foxp3+ T κύτταρα που επικρατούν στο στάδιο της αποκατάστασης της αιμοποίησης μετά την αγωγή εφόδου εμφανίζουν φαινότυπο ενεργοποιημένου Treg. Τροποποιημένη εικόνα από Christopher G. Kanakry et al. (150)	- 110 -
Εικόνα 44. Συσχετισμός Tregs με πρόγνωση νοσήματος. Υψηλά επίπεδα Tregs σχετίζονται με φτωχή πρόγνωση στους πάσχοντες από ΟΜΛ. Τροποποιημένη εικόνα από Yang W et al. (151)	- 111 -
Εικόνα 45. Μειωμένα επίπεδα των Tregs σε πάσχοντες από ΟΜΛ σε πλήρη ύφεση πριν τη θεραπεία συντήρησης συγκριτικά με τα επίπεδα σε υγιείς δότες. Τροποποιημένη εικόνα από Lichtenegger FS et al. (152)	- 112 -
Εικόνα 46. Η επίδραση της IL-35 στην έκφραση των υποομάδων του υποδοχέα της IL-35R (IL-12Rβ2 και gp130) στα θλαστικά κύτταρα αλλά και στον πολλαπλασιασμό και την επαγόμενη από το μόριο VP-16 απόπτωση των μυελοβλαστών. Τροποποιημένη εικόνα από Tao Q et al. (153)	- 113 -
Εικόνα 47. Σύγκριση των Tregs σε πάσχοντες από T και B- ΟΛΛ και σε υγιείς δότες. Τροποποιημένη εικόνα από Wu CP et al. (154)	- 114 -
Εικόνα 48. Εκκρινόμενα επίπεδα IL-2, IL-10 και TGF-β σε πάσχοντες από T και B- ΟΛΛ και σε υγιείς δότες. Τροποποιημένη εικόνα από Wu CP et al. (154)	- 114 -
Εικόνα 49. Μειωμένο ποσοστό των CD4+CD25+ κυττάρων στους πάσχοντες από ΟΛΛ. Τροποποιημένη εικόνα από Bhattacharya K et al. (155)	- 115 -
Εικόνα 50. Αυξημένη έκφραση Foxp3 και IL-10 στα CD4+CD25+ κύτταρα των πασχόντων από ΟΛΛ. Τροποποιημένη εικόνα από Bhattacharya K et al. (155)	- 115 -
Εικόνα 51. Αυξημένο ποσοστό των Tregs σε πάσχοντες από B-ΟΛΛ εν συγκρίσει με υγιείς εθελοντές. Τροποποιημένη εικόνα από Idris SZ et al. (156)	- 116 -
Εικόνα 52. Προσδιορισμός των T ρυθμιστικών λεμφοκυττάρων CD4+CD127 ^{lo} CD25 ^{hi} FoxP3+ με κυτταρομετρία ροής. Αρχικά επιλέχθηκαν τα CD4+ λεμφοκύτταρα (B) και ακολούθως αυτά τα CD4+ που εκφράζουν το CD25 και εμφανίζουν χαμηλή έκφραση του CD127 (Γ). Από αυτά τα κύτταρα επιλέχθηκαν αυτά με την αυξημένη έκφραση του CD25 (CD25 ^{hi}) (Δ). Όσα από τα κύτταρα αυτά εκφράζουν Foxp3, αποτελούν τα υπό μελέτη T ρυθμιστικά λεμφοκύτταρα (E).	- 126 -
Εικόνα 53. Έκφραση των HLA-DR και CD62L στα T ρυθμιστικά λεμφοκύτταρα. Τα T ρυθμιστικά λεμφοκύτταρα (CD4+CD25 ^{hi}), πεδίο R3 στην εικόνα Α, όπου φαίνεται η έκφραση του CD25 στα CD4 θετικά κύτταρα, εκφράζουν το δείκτη HLA-DR, όπως φαίνεται στην εικόνα Β. Αντίστοιχα, αν οριστεί ως R4 το πεδίο όπου περιέχονται τα CD4+ κύτταρα με ενδιάμεση έκφραση του CD25 (εικόνα Γ), φαίνεται ότι τα κύτταρα αυτά (CD4+CD25 ⁺) εμφανίζουν χαμηλότερη έκφραση του CD62L συγκριτικά με τα T ρυθμιστικά κύτταρα (CD4+CD25 ^{hi}) (Εικόνα Δ).	- 128 -
Εικόνα 54. Σύγκριση του ποσοστού των T ρυθμιστικών κυττάρων στη διάγνωση της οξείας λευχαιμίας έναντι των μαρτύρων.	- 129 -
Εικόνα 55. Σύγκριση των T ρυθμιστικών κυττάρων στη διάγνωση της οξείας λεμφοβλαστικής έναντι της οξείας μυελογενούς λευχαιμίας	- 130 -
Εικόνα 56. Σημαντική διαβάθμιση των T ρυθμιστικών κυττάρων στη διάγνωση της οξείας λευχαιμίας έναντι των υγιών	- 131 -
Εικόνα 57. Σύγκριση των T ρυθμιστικών κυττάρων στη διάγνωση της οξείας λευχαιμίας όσων πέτυχαν πλήρη ύφεση μετά τη θεραπεία εφόδου έναντι όσων παρουσίασαν πρωτοπαθώς ανθεκτική νόσο.	- 132 -
Εικόνα 58. Διαχωρισμός των υποπληθυσμών των T λεμφοκυττάρων αναλόγως της έκφρασης του CD25. Τα T ρυθμιστικά κύτταρα εμφανίζουν υψηλή έκφραση CD25 (CD25 ^{hi}), τα T δραστικά λεμφοκύτταρα εμφανίζουν ενδιάμεση έκφραση του CD25 (CD25 ⁺) και τα παρθένα T κύτταρα χαμηλή έκφραση CD25 (CD25 ^{lo})	- 133 -

15.2 ΠΙΝΑΚΕΣ

Πίνακας 1. Διαφορές των CD56 ^{bright} και CD56 ^{dim} NK κυττάρων. Τροποποιημένος πίνακας από Hiyoyuki A. et al. (162)	- 28 -
Πίνακας 2. Χαρακτηριστικά της φυσικής και ειδικής ανοσίας. Τροποποιημένος πίνακας από Powell LD et al. (29)	- 41 -

Πίνακας 3. Έκφραση δεικτών αναλόγως της προέλευσης των βλαστών στην ΟΜΛ. Τροποποιημένος πίνακας από Burnett AK et al. (43).....	- 47 -
Πίνακας 4. Κατηγορίες κινδύνου της ΟΜΛ σύμφωνα με το Ευρωπαϊκό Δίκτυο Λευχαιμίας (European Leukemia Net / ELN). Τροποποιημένος πίνακας από Döhner H et al. (46)	- 49 -
Πίνακας 5. Ανοσοφαινοτυπικοί δείκτες των Β και Τ κυττάρων αναλόγως της ωρίμανσής του. Τροποποιημένος πίνακας από Jain N et al. (165).....	- 52 -
Πίνακας 6. Παράγοντες κινδύνου στην ΟΛΛ. Τροποποιημένος πίνακας από Rowntree C et al. (44) -	54 -
Πίνακας 7. Βασικοί πληθυσμοί των Tregs. Τροποποιημένη εικόνα από Ustun C et al. (145).....	- 66 -
Πίνακας 8. Οι κατασταλτικοί μηχανισμοί των Tregs. Τροποποιημένος πίνακας από Shimon Sakaguchi et al. (74)	- 79 -
Πίνακας 9. Φαινότυπος και πιθανός μηχανισμός κατασταλτικής δράσης ανάλογα με τον τύπο του κατασταλτικού κυττάρου. Τροποποιημένος πίνακας από Cools N et al. (64).....	- 81 -
Πίνακας 10. Δείκτες των Tregs. Τροποποιημένος πίνακας εικόνα από Shimon Sakaguchi et al. (74) .-	96 -
-	
Πίνακας 11. Δείκτες των λειτουργικών Tregs στον άνθρωπο. Τροποποιημένος πίνακας από Xin Chen and Joost J. (123).....	- 98 -
Πίνακας 12. Χαρακτηριστικά των υπό μελέτη ασθενών.....	- 119 -
Πίνακας 13. Συνδυασμοί μονοκλωνικών αντισωμάτων, τριπλού φθορισμού κατά τη διάγνωση Οξείας Λευχαιμίας	- 120 -
Πίνακας 14. Αριθμός ασθενών (N) στους οποίους προσδιορίστηκαν Τ ρυθμιστικά λεμφοκύτταρα στη διάγνωση της οξείας λευχαιμίας και στην υπολειμματική νόσο	- 127 -
Πίνακας 15. Σύγκριση των Τ ρυθμιστικών στους υγιείς έναντι των νεοδιαγνωσθέντων με οξεία λευχαιμία. N: αριθμός δειγμάτων, Mean: μέσος όρος του ποσοστού των Tregs, Std. Deviation: τυπική απόκλιση από το μέσο όρο.....	- 129 -
Πίνακας 16. Σύγκριση των Τ ρυθμιστικών στους υγιείς έναντι των πασχόντων από οξεία λεμφοβλαστική και μυελογενή λευχαιμία στη διάγνωση N: αριθμός δειγμάτων, Mean: μέσος όρος του ποσοστού των Tregs, Std. Deviation: τυπική απόκλιση από το μέσο όρο	- 130 -
Πίνακας 17. Σύγκριση των ποσοστών των Τ ρυθμιστικών κυττάρων στη διάγνωση της οξείας λευχαιμίας βάσει της ανταπόκρισης στη θεραπεία εφόδου N: αριθμός δειγμάτων, Mean: μέσος όρος του ποσοστού των Tregs, Std. Deviation: τυπική απόκλιση από το μέσο όρο	- 131 -