

# ΜΕΛΕΤΗ ΜΟΝΟΚΥΤΤΑΡΩΣΗΣ ΜΕ ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΙΑ ΡΟΗΣ - ΑΝΟΣΟΦΑΙΝΟΤΥΠΟΣ ΧΡΟΝΙΑΣ ΜΥΕΛΟΜΟΝΟΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΛΕΥΧΑΙΜΙΑΣ (ΧΜΜΛ)

Σ. Καραθάνος<sup>1,2</sup>, Κ. Ψαρρά<sup>2</sup>, Ε.Γρηγορίου<sup>2</sup>, Α. Τσιρογιάννη<sup>2</sup>, Ι. Τσώνης<sup>3</sup>, Μ. Παγώνη<sup>3</sup>,  
Σ. Δελήμπαση<sup>3</sup>, Θ. Καρμίρης<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Τμήμα Βιολογίας, Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών, Αθήνα.

<sup>2</sup>Τμήμα Ανοσολογίας-Ιστοσυμβατότητας, Γ.Ν.Α. «Ο Ευαγγελισμός», Αθήνα.

<sup>3</sup>Αιματολογική Κλινική και Λεμφωμάτων, Γ.Ν.Α. «Ο Ευαγγελισμός», Αθήνα.



ΕΝΩΣΗ ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΟΥ ΠΡΟΣΩΠΙΚΟΥ  
Γ.Ν.Α. «Ο ΕΥΑΓΓΕΛΙΣΜΟΣ» (Ε.Ε.Π.Ν.Ε.)

25<sup>ο</sup>

ΕΤΗΣΙΟ ΣΕΜΙΝΑΡΙΟ  
ΣΥΝΕΧΙΖΟΜΕΝΗΣ  
ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗΣ  
Γ.Ν.Α. «Ο ΕΥΑΓΓΕΛΙΣΜΟΣ»

## Δεν υπάρχει σύγκρουση συμφερόντων με τις Χορηγούς Εταιρείες:



# ΜΟΝΟΚΥΤΤΑΡΑ

- συγκαταλέγονται στα λευκά αιμοσφαίρια του αίματος, είναι πρόδρομα των μακροφάγων και ανήκουν στο σύστημα των φαγοκυττάρων
- αποτελούν το 5-10% των λευκών αιμοσφαιρίων ( $0.2 - 0.6 \times 10^9 / L$ )
- έχουν σφαιρικό σχήμα, με νεφροειδή πυρήνα και ελαφρώς βασεόφιλο κυτταρόπλασμα
- παράγονται στο μυελό των οστών και μετά τη σύντομη παραμονή τους στο αίμα (16-100 ώρες), μεταναστεύουν στους ιστούς μέσω της κυκλοφορίας
- με βάση την έκφραση των δεικτών επιφανείας CD14 και CD16, διακρίνονται 3 υποπληθυσμοί:
  1. CD14+ CD16- (κλασικά) → 85% του πληθυσμού των μονοκυττάρων
  2. CD14+ CD16+ (ενδιάμεσα) → 5% του πληθυσμού των μονοκυττάρων
  3. CD14+(low) CD16+ (μη κλασικά) → 10% του πληθυσμού των μονοκυττάρων

# ΜΟΝΟΚΥΤΤΑΡΑ

## 1. CD14+ CD16- (κλασικά):

- Αυξημένη φαγοκυτταρική δραστηριότητα
- Παραγωγή κυρίως IL-10 (LPS)

## 2. CD14+CD16+ (ενδιάμεσα):

- Έκφραση Fc υποδοχέων όπως CD64 και CD32
- Αυξημένη φαγοκυτταρική δραστηριότητα
- Παραγωγή προφλεγμονωδών κυτταροκινών όπως TNF-α, IL-1β και IL-6 (LPS)

## 3. CD14+(low) CD16+ (μη κλασικά):

- Ελαττωμένη έκφραση Fc υποδοχέων και μικρή φαγοκυτταρική δραστηριότητα
- Ελαττωμένη παραγωγή φλεγμονωδών κυτταροκινών
- "Επιτήρηση" της ενδοθηλιακής ακεραιότητας

# ΜΟΝΟΚΥΤΤΑΡΩΣΕΙΣ

$> 1 \times 10^9 / L$

## ΑΙΤΙΑ:

- ΟΥΔΕΤΕΡΟΠΕΝΙΑ ΚΑΙ ΠΡΩΙΜΗ ΑΝΑΓΕΝΝΗΣΗ ΜΥΕΛΟΥ
- ΦΛΕΓΜΟΝΩΔΕΙΣ ΔΙΑΤΑΡΑΧΕΣ/ ΔΙΑΤΑΡΑΧΕΣ ΑΝΟΣΟΠΟΙΗΤΙΚΟΥ (ΠΧ. ΠΑΘΗΣΕΙΣ ΚΟΛΛΑΓΟΝΟΥ, ΦΛΕΓΜΟΝΩΔΗΣ ΝΟΣΟΣ ΕΝΤΕΡΟΥ, ΣΑΡΚΟΕΙΔΩΣΗ, ΙΔΙΟΠΑΘΗΣ ΘΡΟΜΒΟΠΕΝΙΚΗ ΠΟΡΦΥΡΑ)
- ΧΡΟΝΙΕΣ ΛΟΙΜΩΞΕΙΣ (ΠΧ. ΙΟΓΕΝΕΙΣ, ΦΥΜΑΤΙΩΣΗ, ΕΛΟΝΟΣΙΑ, ΥΠΟΞΕΙΑ ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΗ ΕΝΔΟΚΑΡΔΙΤΙΔΑ, ΣΥΓΓΕΝΗΣ ΣΥΦΙΛΗ)
- ΕΜΦΡΑΓΜΑ ΜΥΟΚΑΡΔΙΟΥ
- ΑΙΜΟΛΥΤΙΚΕΣ ΑΝΑΙΜΙΕΣ
- STRESS
- ΙΑΤΡΟΓΕΝΕΙΣ ΛΟΓΟΙ (ΠΧ. ΘΕΡΑΠΕΙΑ ΜΕ ΚΥΤΟΚΙΝΕΣ, ΖΙΠΡΑΣΙΔΟΝΗ, ΣΤΕΡΟΕΙΔΗ, ΑΚΤΙΝΟΘΕΡΑΠΕΙΑ)
- ΑΙΜΑΤΟΛΟΓΙΚΕΣ ΚΑΚΟΗΘΕΙΕΣ (ΠΧ. ΜΡΝ, ΜDΣ, ΜDΣ/ΜΡΝ, ΑΜL)
- ΣΥΜΠΑΓΕΙΣ ΟΓΚΟΙ (ΠΧ. ΚΑΡΚΙΝΩΜΑΤΑ)

# ΧΡΟΝΙΑ ΜΥΕΛΟΜΟΝΟΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΛΕΥΧΑΙΜΙΑ (ΧΜΜΛ)

- Ο συχνότερος υπότυπος μυελοδυσπλαστικών συνδρόμων/ μυελοϋπερπλαστικών νεοπλασμάτων (ΜΔΣ/ΜΥΝ)
- Αποτελεί κλωνική διαταραχή του στελεχιαίου αιμοποιητικού κυττάρου και χαρακτηρίζεται από εμμένουσα (>3μήνες) μονοκυττάρωση ( $\geq 1 \times 10^9$  /L ) στο περιφερικό αίμα
- Συνδυάζει πολλαπλασιασμό μυελικών κυττάρων με δυσπλασία αυτών και αναποτελεσματική αιμοποίηση
- Μέση ηλικία διάγνωσης 71-74 έτη με υπεροχή αρρένων έναντι των θηλέων (1.5-3: 1)
- Συχνότητα 4/1.000.000

# ΔΙΑΓΝΩΣΗ ΧΜΜΛ

1. Αξιολόγηση περιφερικού αίματος:

$\geq 1 \times 10^9$  /L για >3 μήνες

Βλάστες < 20%

2. Οστεομυελική βιοψία

Βλάστες < 20%

3. Κυτταρογενετικές και μοριακές αναλύσεις

BCR-ABL1 (CML)

PDGFRA/B + ηωσινοφιλία (μυελογενή νεοπλάσματα εκτός ΧΜΜΛ) } ΑΠΟΚΛΕΙΣΜΟΣ

30% → τρισωμία 8, απώλεια Y, μονοσωμία 7, del (7q), τρισωμία 21, del (20q)

Μεταλλάξεις → TET2, SRSF2, ASXL1 και γονδίων του σηματοδοτικού μονοπατιού RAS (NRAS, KRAS, CBL)

## ΜΕΛΕΤΕΣ:

- Ποσοστό κλασικών (CD14+CD16-) μονοκυττάρων  $\geq 94\%$
  - Ελάττωση του ποσοστού των μη κλασικών (CD14+lowCD16+) μονοκυττάρων
- } ΧΜΜΛ

\* ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΙΚΗ ΜΟΝΟΚΥΤΤΑΡΩΣΗ → ΣΥΣΣΩΡΕΥΣΗ ΕΝΔΙΑΜΕΣΩΝ & ΜΗ ΚΛΑΣΙΚΩΝ ΜΟΝΟΚΥΤΤΑΡΩΝ

## ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

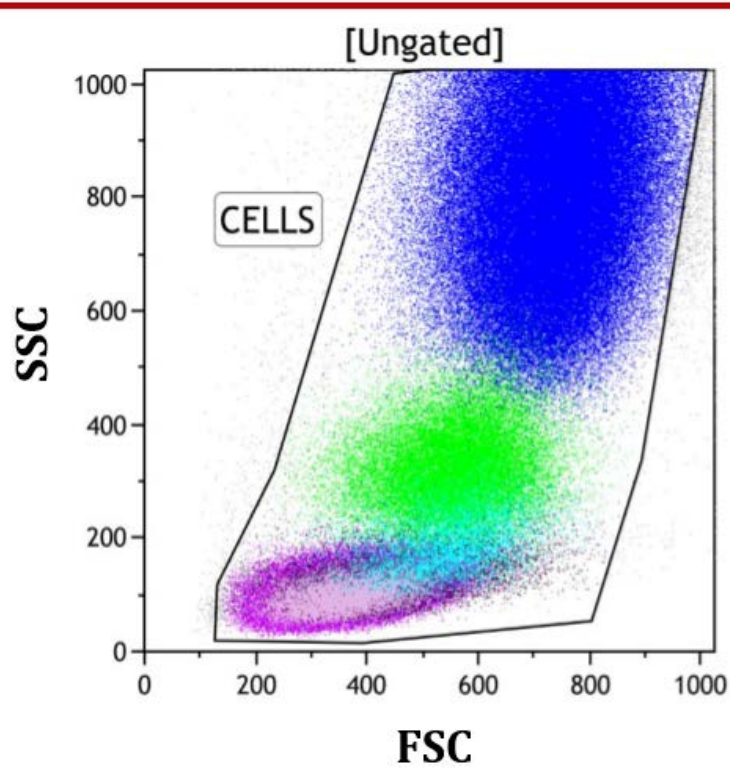
Μελέτη των μονοκυτταρικών υποπληθυσμών και η συσχέτιση του ανοσοφαινοτύπου των μονοκυττάρων με τη διάγνωση της ΧΜΜΛ.



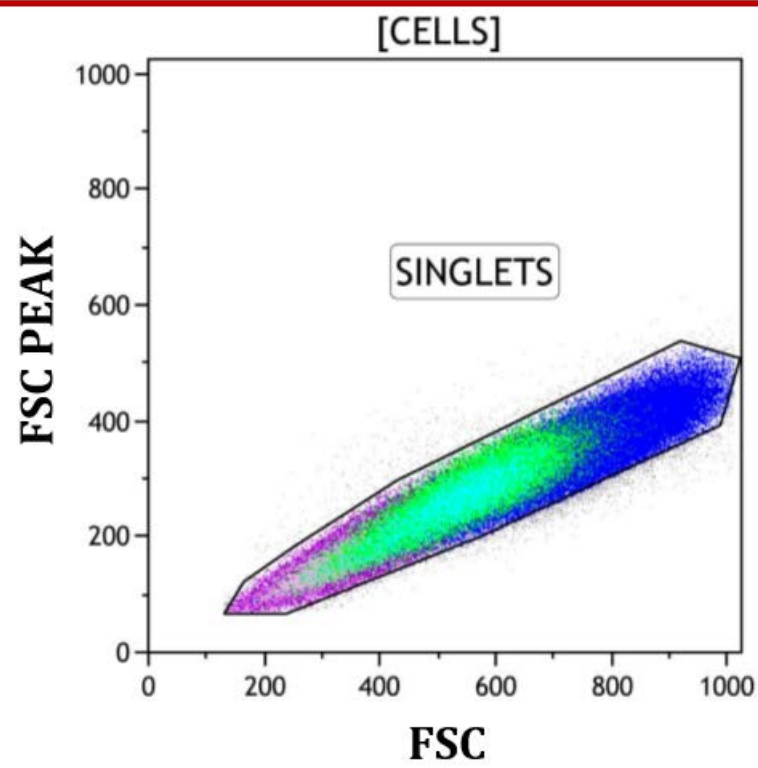
## ΥΛΙΚΟ & ΜΕΘΟΔΟΣ

- 1) Δείγματα περιφερικού αίματος από 52 ασθενείς με απόλυτη μονοκυττάρωση
- 2) Μονοκλωνικά αντισώματα: CD7-A700, CD24-PE, CD16-PB, CD14-PC7, CD45-Krm, CD56-PC5,5.
- 3) Ανάλυση με κυτταρομετρία ροής (Navios EX Beckman Coulter)
- 4) Ανάλυση των αποτελεσμάτων με το λογισμικό Kaluza (Beckman Coulter)

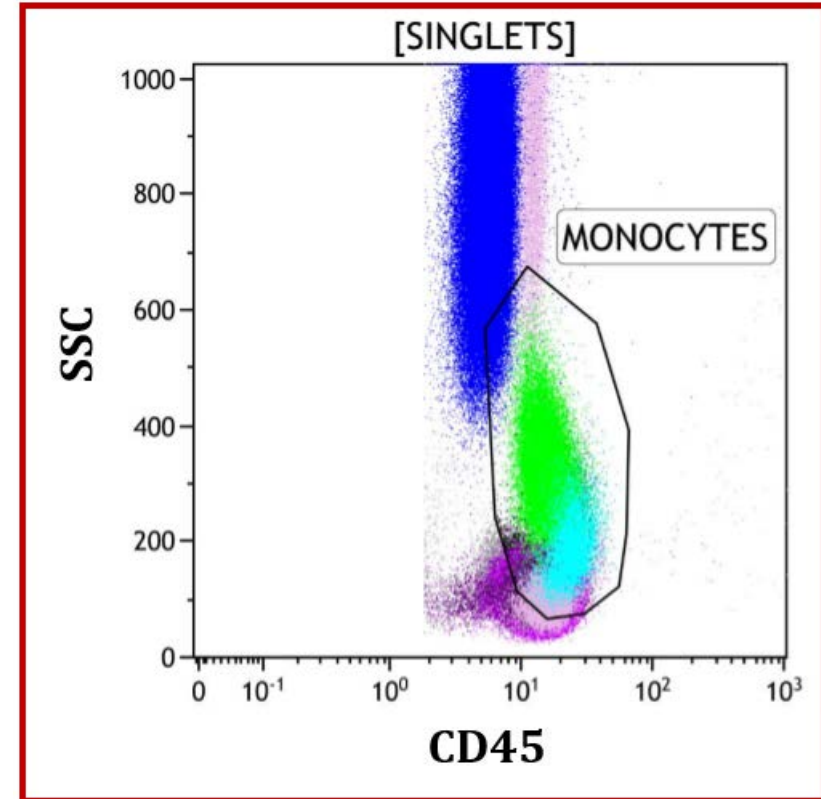
# ΥΛΙΚΟ & ΜΕΘΟΔΟΣ (ΣΤΡΑΤΗΓΙΚΗ ΟΡΙΟΘΕΤΗΣΗΣ)



Στικτόγραμμα SSC/ FSC, επιλογή των ζώντων κυττάρων (λεμφοκύτταρα, μονοκύτταρα, πολυμορφοπύρηνα) εξαιρώντας τα θραύσματα ερυθροκυττάρων (debris).

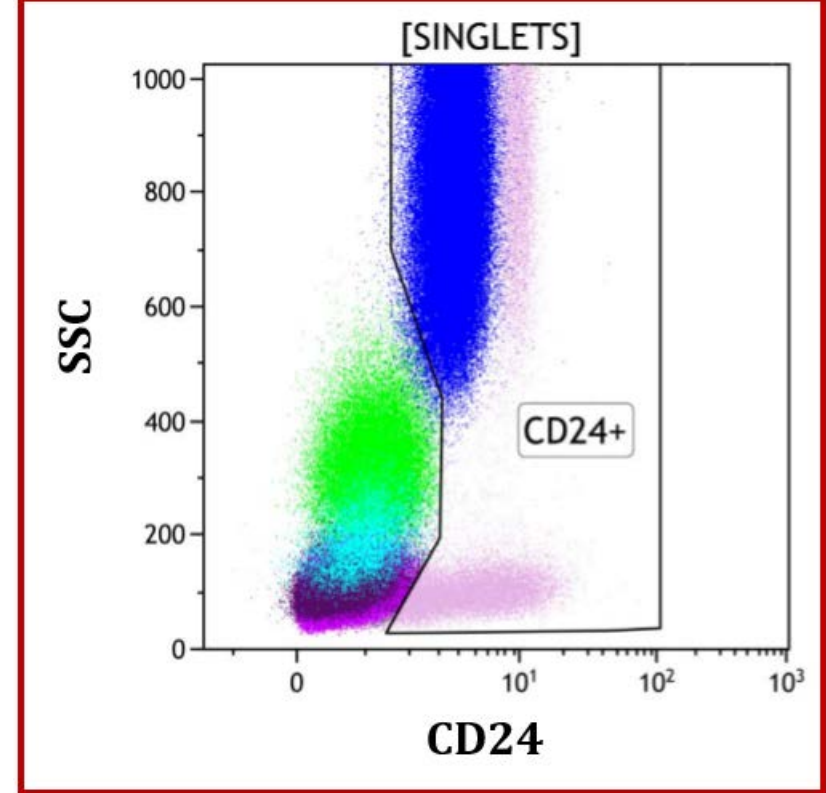
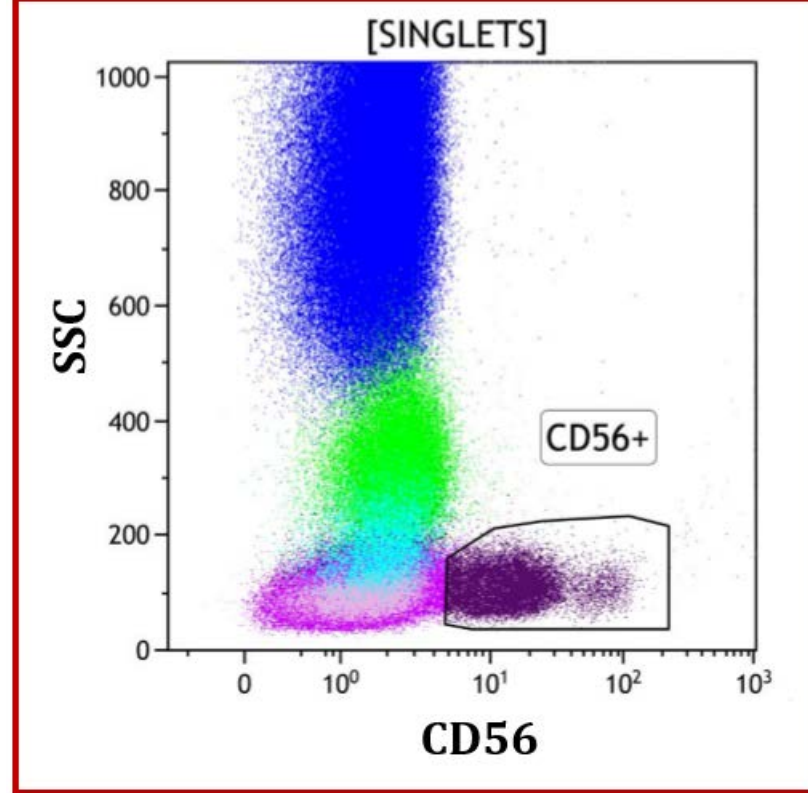
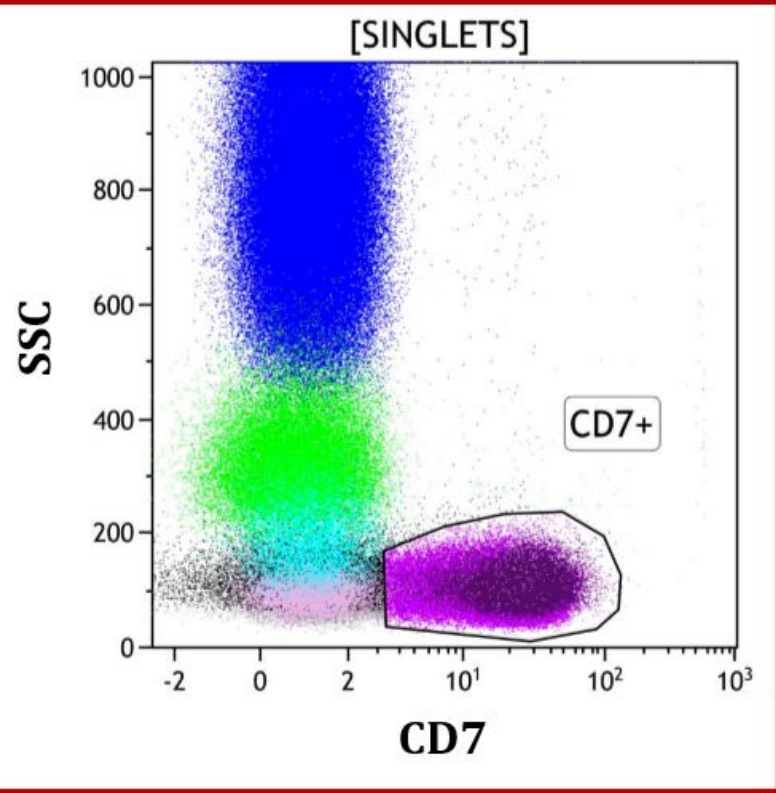


Στικτόγραμμα FSC TIME/ FCS γίνεται οριοθέτηση των μοναδικών κυττάρων (singlets) εξαιρώντας τα κυτταρικά συσσωματώματα.



Στικτόγραμμα SSC/ CD45, οριοθέτηση μονοκυττάρων. Τα μη επιθυμητά κύτταρα που θα συμπεριληφθούν πιθανά σε αυτό το gate εξαιρούνται παρακάτω.

# ΥΛΙΚΟ & ΜΕΘΟΔΟΣ (ΣΤΡΑΤΗΓΙΚΗ ΟΡΙΟΘΕΤΗΣΗΣ)

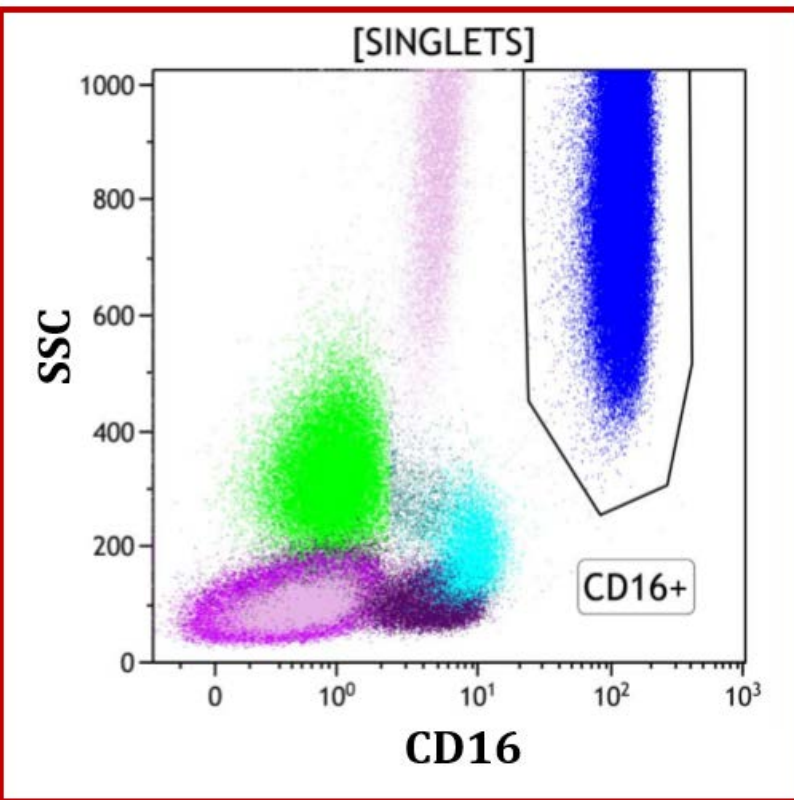


Στικτόγραμμα SSC/ CD7,  
οριοθέτηση λεμφοκυττάρων  
(έντονη έκφραση CD7 χαμηλό SSC).

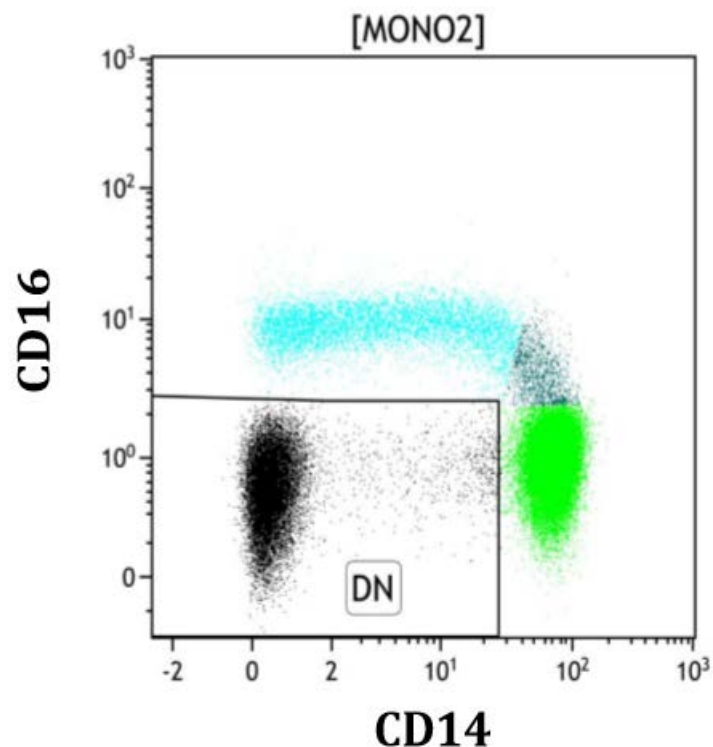
Στικτόγραμμα SSC/ CD56,  
οριοθέτηση των NK κυττάρων χωρίς  
να συμπεριλαμβάνονται τα  
μονοκύτταρα που μπορεί να  
εκφράζουν CD56 σε παθολογικές  
καταστάσεις όπως στη CMML και  
στην αντιδραστική μονοκυττάρωση.

Στικτόγραμμα SSC/ CD24,  
οριοθέτηση B λεμφοκυττάρων  
(χαμηλό SSC και CD24++), ώριμων  
και ανώριμων κοκκικοκυττάρων  
(χαμηλό και υψηλό SSC και  
CD24++).

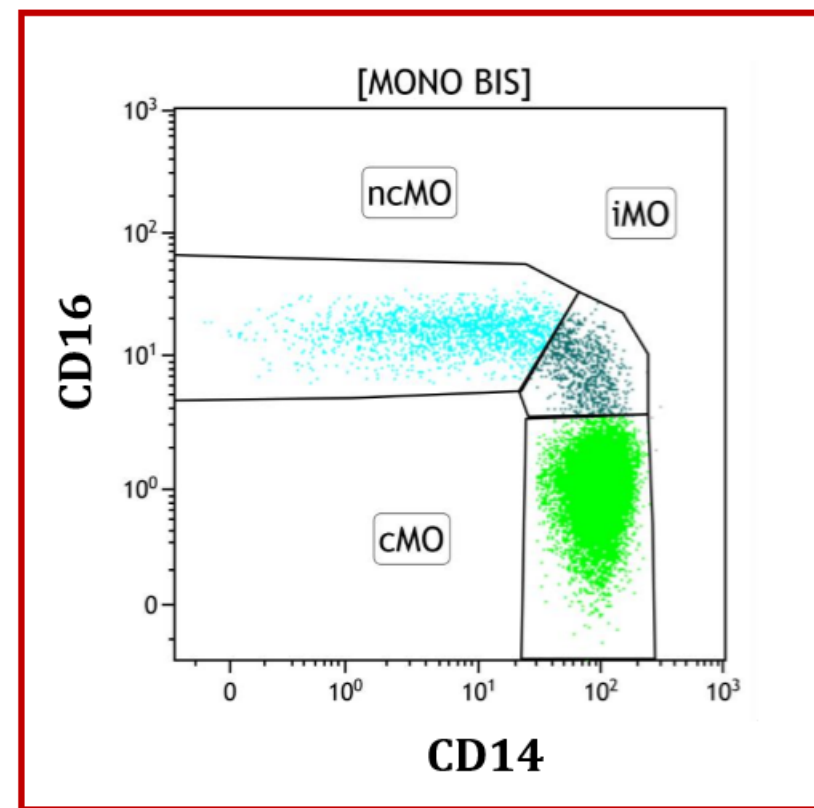
# ΥΛΙΚΟ & ΜΕΘΟΔΟΣ (ΣΤΡΑΤΗΓΙΚΗ ΟΡΙΟΘΕΤΗΣΗΣ)



Στικτόγραμμα SSC/ CD16, οριοθέτηση των υπολειπόμενων ουδετερόφιλων που μπορεί να μην συμπεριλήφθηκαν στο προηγούμενως.

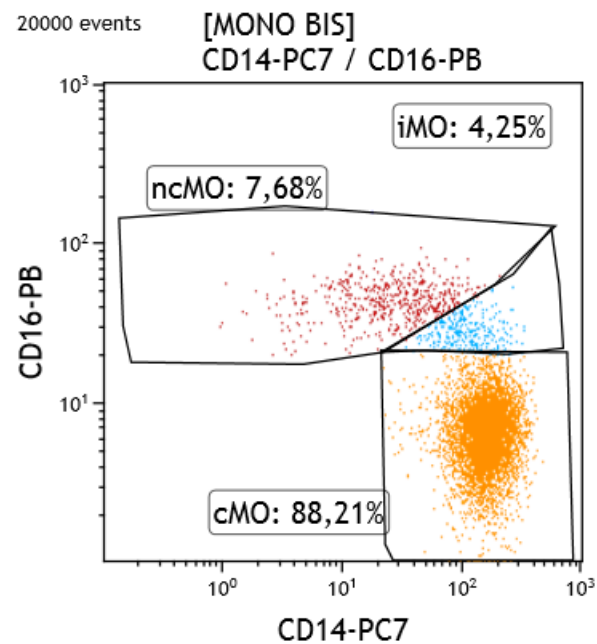
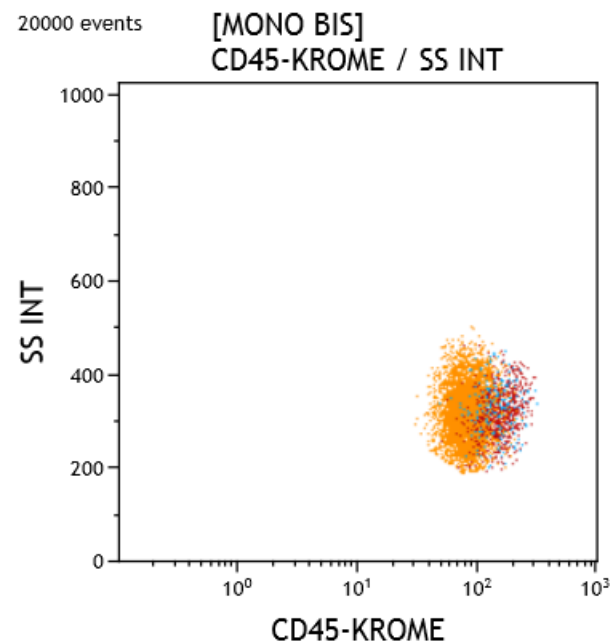
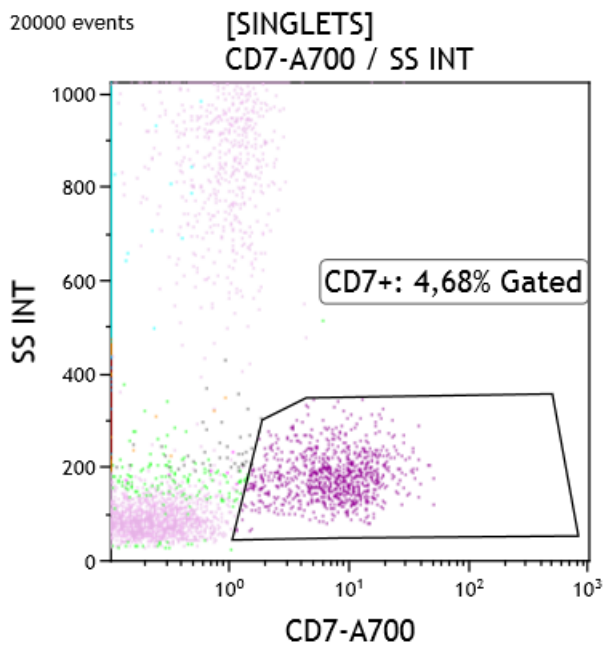
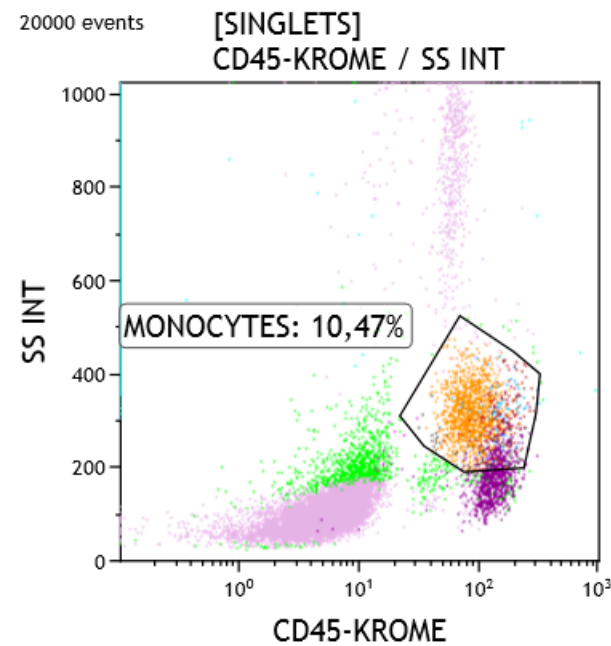
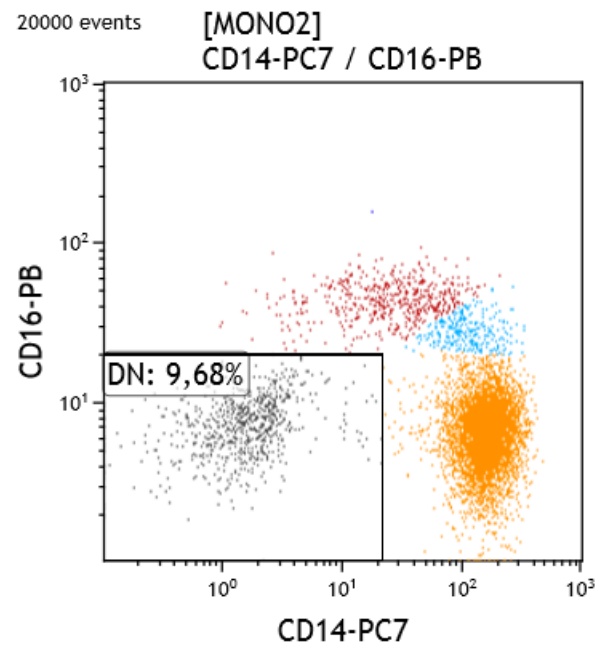
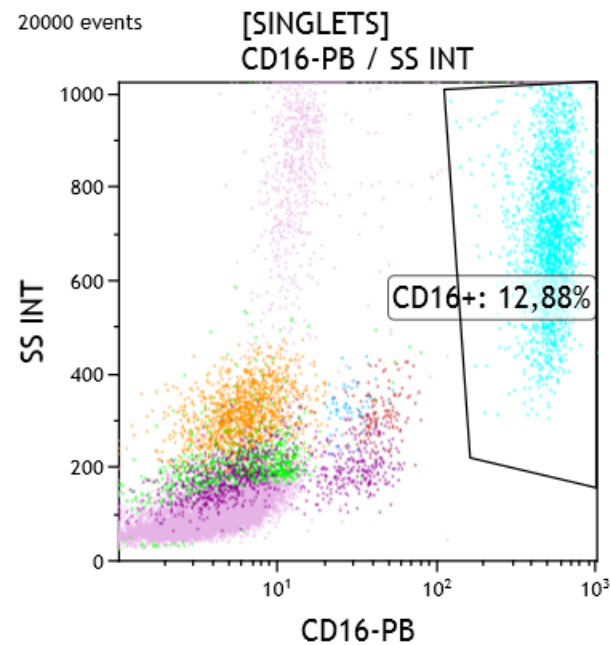
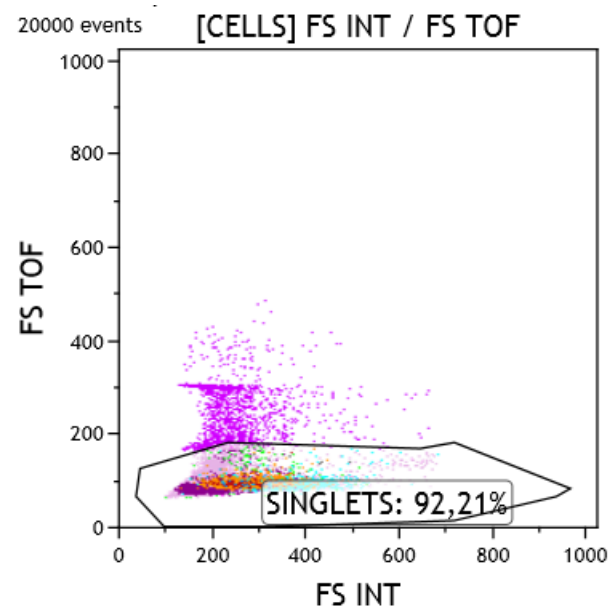
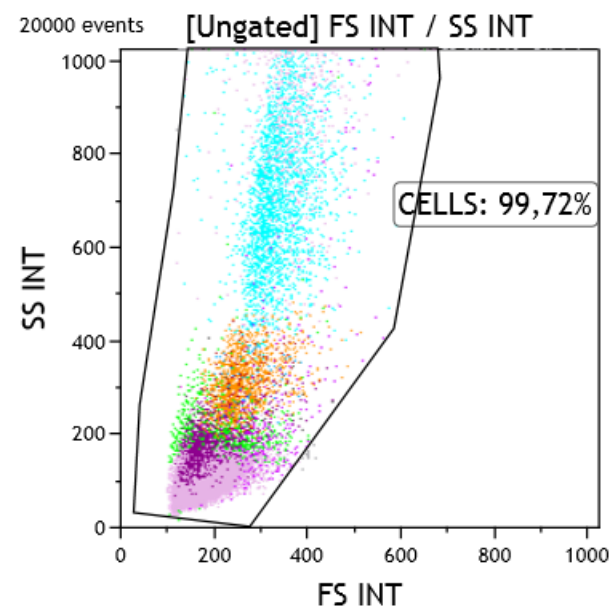


Στικτόγραμμα CD16/ CD14. Με boolean εξίσωση εξαιρούνται οι παραπάνω CD7+, CD56+, CD24+, CD16+ πληθυσμοί, καταλήγοντας έτσι σε αμιγή πληθυσμό μονοκυττάρων (MONO2). Οριοθέτηση διπλά αρνητικών (CD14-/CD16- DN).

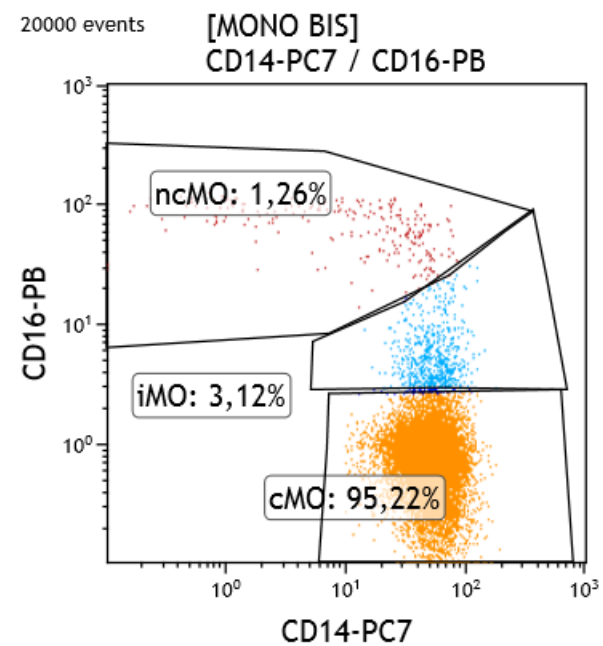
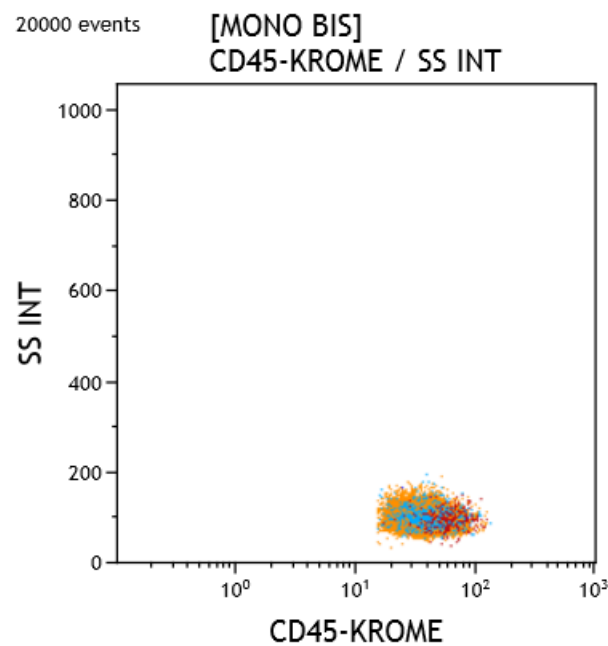
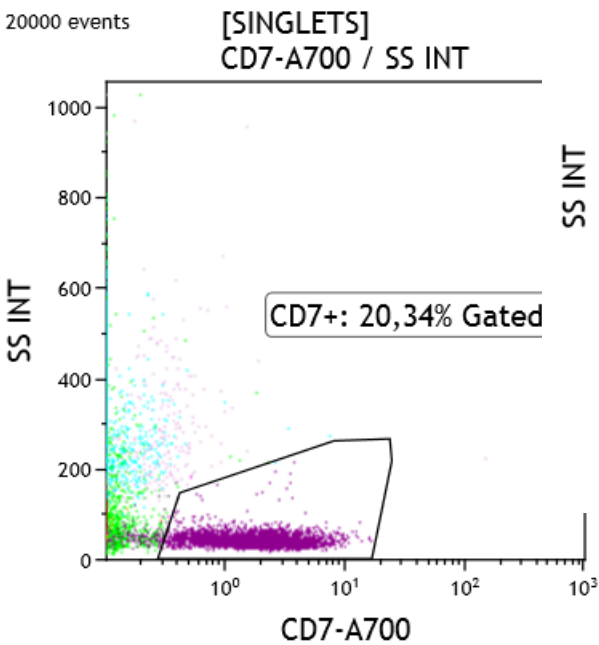
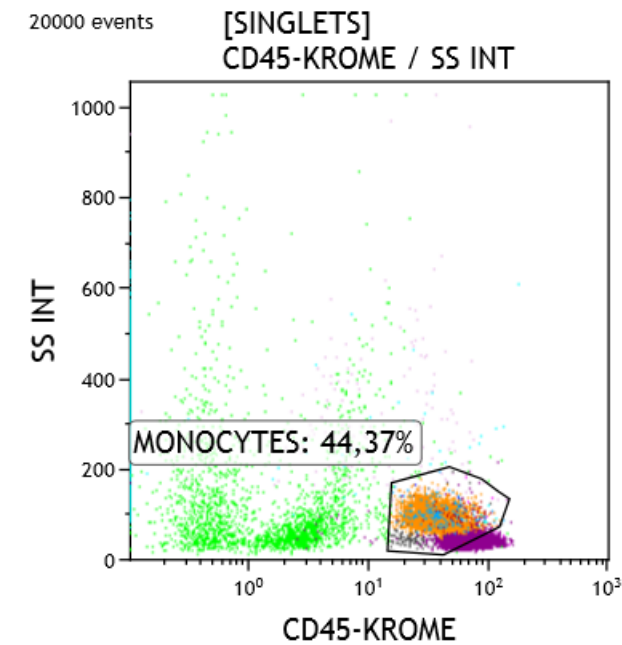
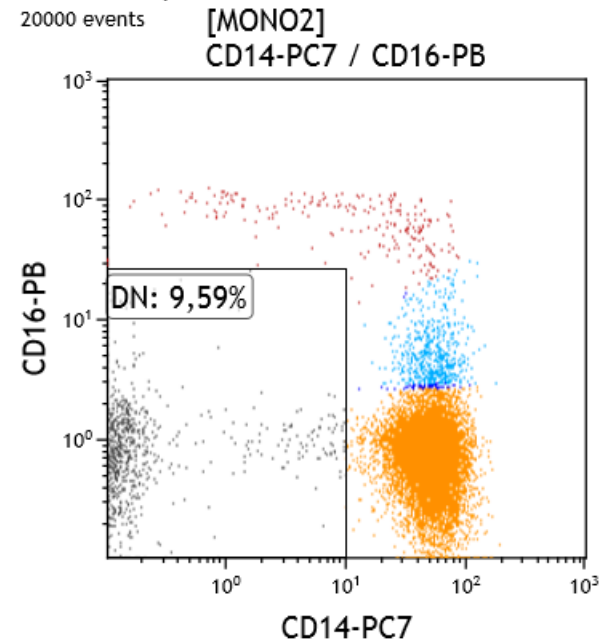
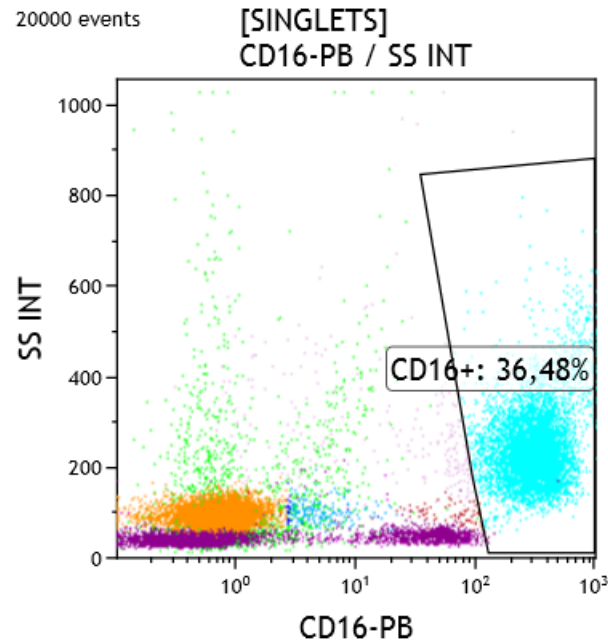
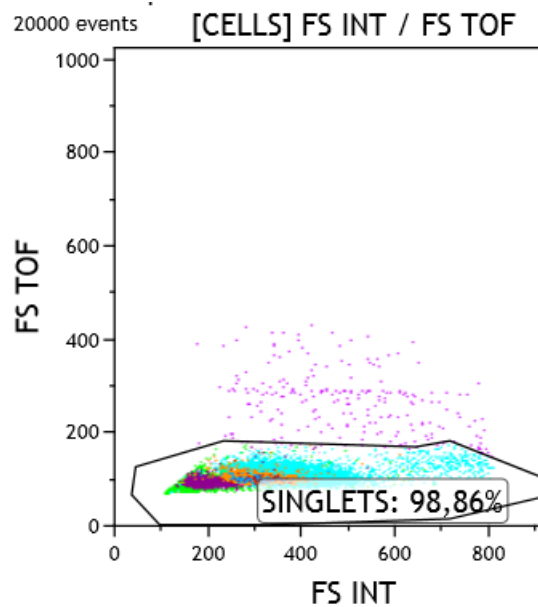
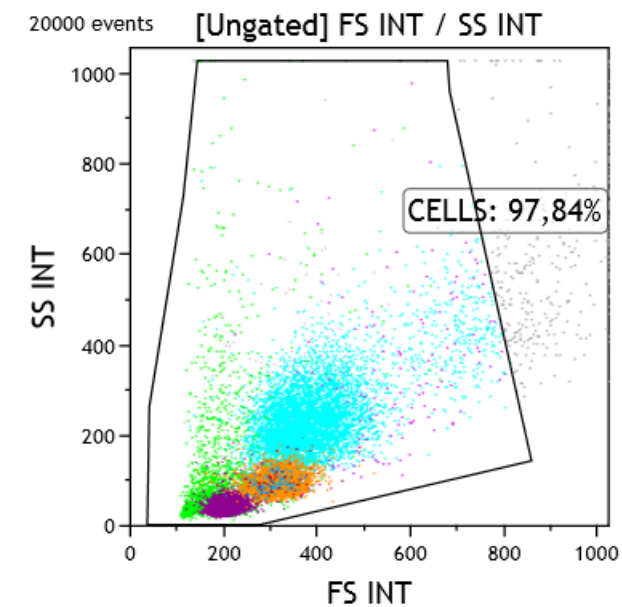


Στικτόγραμμα CD16/ CD14 δημιουργία νέου gate (MONO BIS), με εξαίρεση των CD7+, CD56+, CD24+, CD16+ και DN. Οριοθέτηση των τριών μονοκυτταρικών υποσυνόλων (cMo, iMo, ncMo).

# ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ



# ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ



# ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

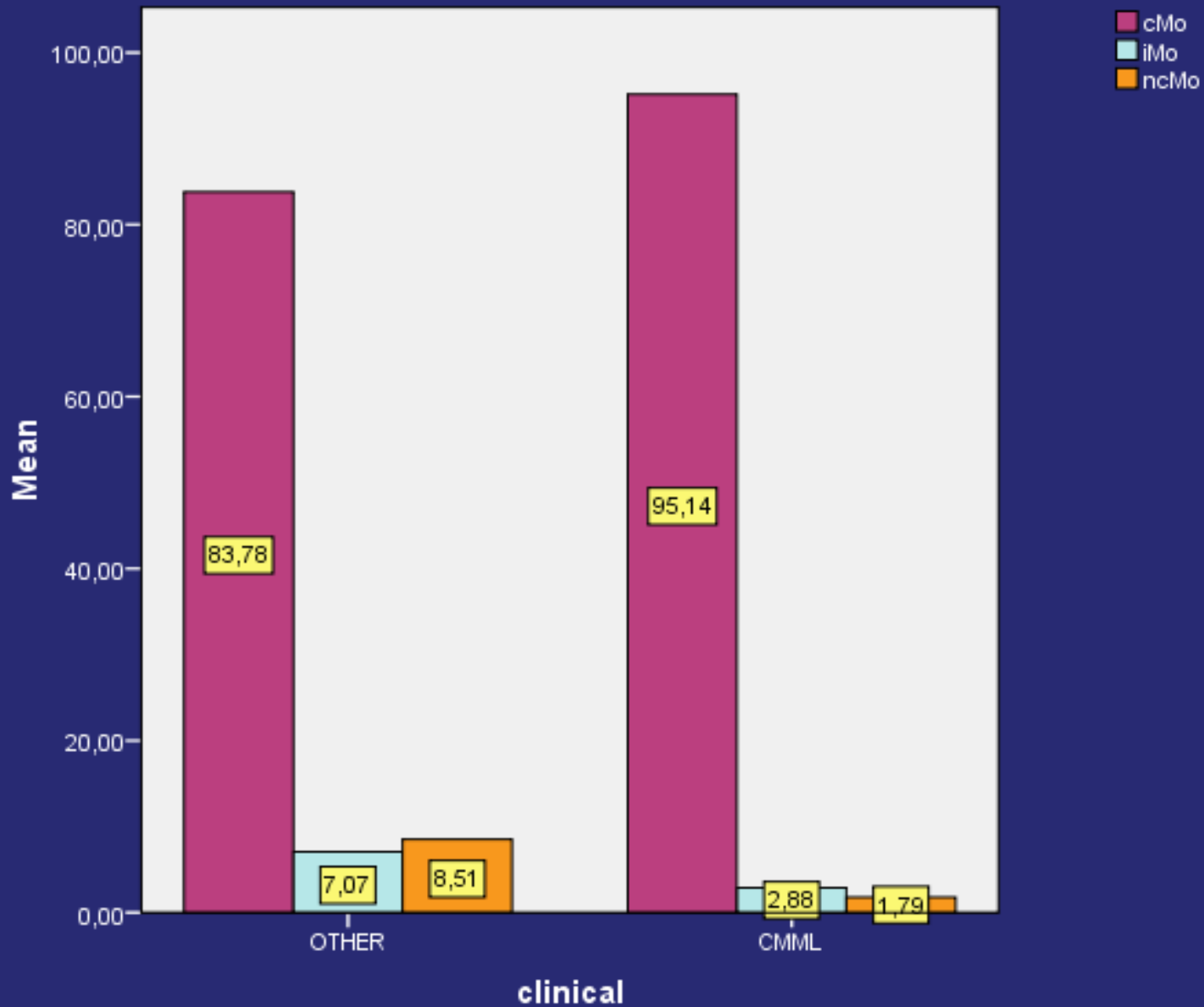
## FC \* CLINICAL Crosstabulation

		CLINICAL		
		OTHER	CMML	Total
FC	OTHER	28	1	29
	CMML	3	20	23
	Total	31	21	52

Πίνακας 1. Πίνακας διπλής εισόδου (Crosstab) για τη συσχέτιση των κλινικοεργαστηριακών αποτελεσμάτων με εκείνα από την ανάλυση με κυτταρομετρία ροής.

Υπήρξε συμφωνία του ανοσοφαινότυπου με την κατά WHO διάγνωση της νόσου για τους 48 από τους 52 ασθενείς ( $p < 0,001$ ). Από τους υπόλοιπους, οι τρεις εμφάνισαν ποσοστό κλασικών μονοκυττάρων  $>94\%$  αλλά τα υπόλοιπα κλινικοεργαστηριακά ευρήματα δεν συνηγόρησαν υπέρ της διάγνωσης για ΧΜΜΛ, ενώ για τον έναν η διάγνωση κατά WHO ήταν ΧΜΜΛ και το ποσοστό των κλασικών μονοκυττάρων το οποίο προσδιορίστηκε με κυτταρομετρία ροής ήταν  $64,06\%$ .

# ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

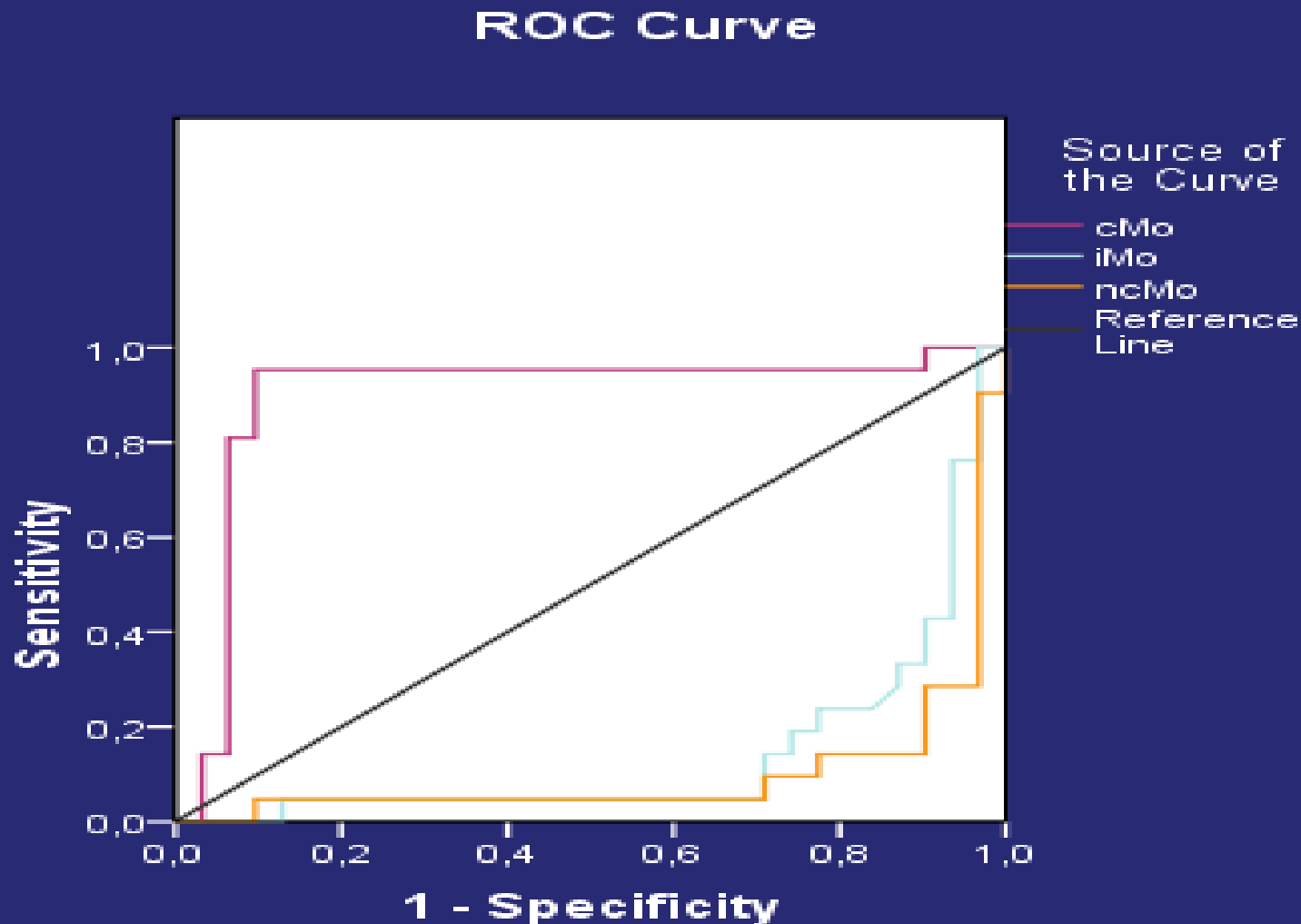


Σχήμα 1. Γραφική αναπαράσταση των μέσων τιμών των ποσοστών των μονοκυτταρικών υποπληθυσμών στο περιφερικό αίμα ατόμων με ΧΜΜΛ και σε άτομα χωρίς το νόσημα.

Αυξημένο ποσοστό κλασικών μονοκυττάρων στους ασθενείς με ΧΜΜΛ σε σχέση με τους ασθενείς χωρίς διάγνωση της νόσου ( $95,14 \pm 7,28$  vs  $83,78\% \pm 13,35$ ,  $p < 0,0001$ ).



# ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ



Diagonal segments are produced by ties.

Σχήμα 3. Καμπύλες ROC κλασικών, ενδιάμεσων και μη κλασικών μονοκυττάρων.

Από την καμπύλη ROC των κλασικών μονοκυττάρων περιφερικού αίματος, παρατηρείται ότι ο συγκεκριμένος μονοκυτταρικός υποπληθυσμός εμφανίζει  $AUC=0,896$  με  $p<0,001$ , κάτι που δηλώνει πως η διαγνωστική αξία του είναι στατιστικά σημαντική. Επιπλέον εμφανίζει  $95\% CI=0,78- 1$ .

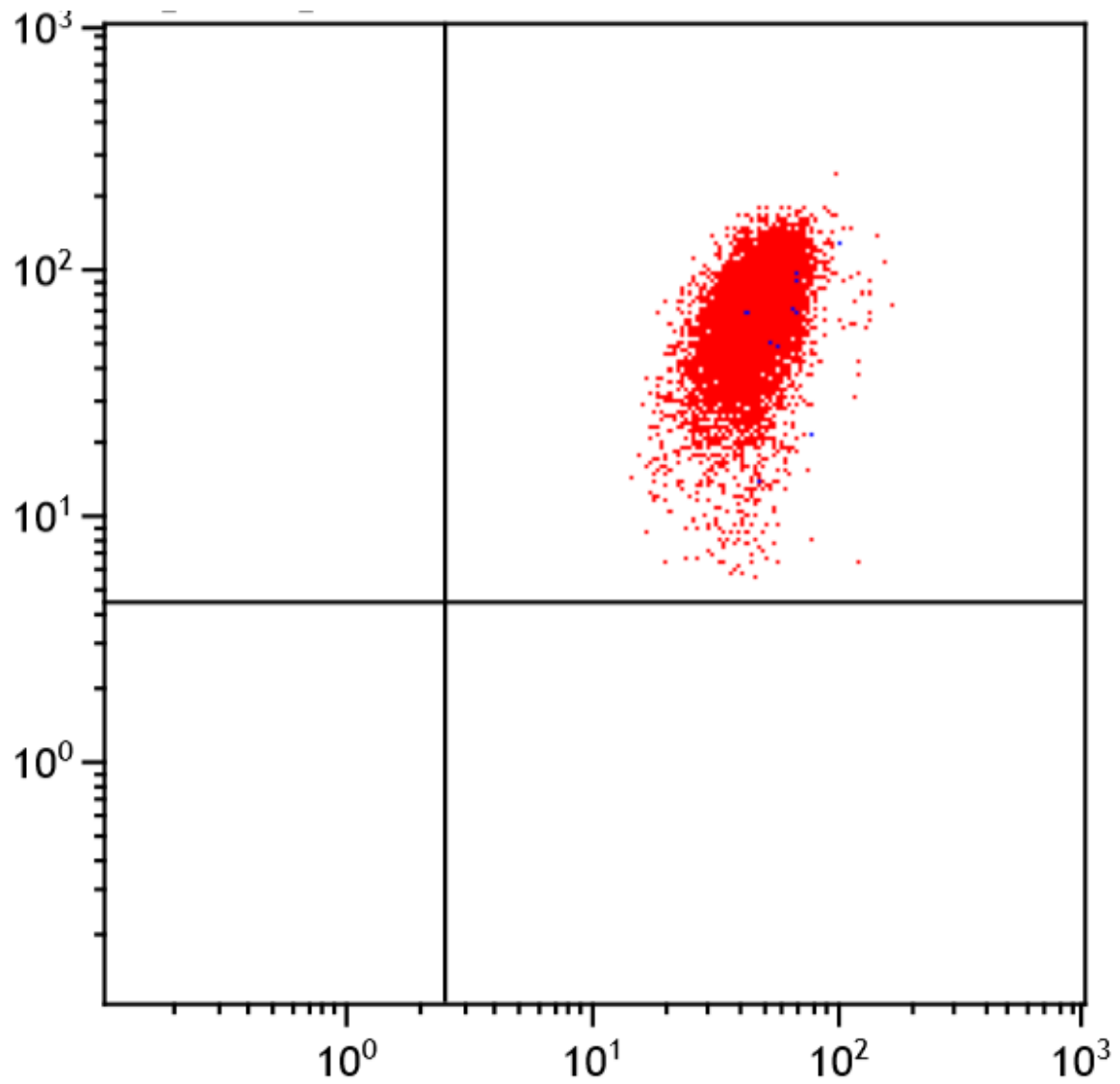
# ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

- ▶ Οι ασθενείς με ΧΜΜΛ εμφανίζουν αυξημένο ποσοστό κλασικών μονοκυττάρων, έναντι των υπόλοιπων μονοκυτταρικών υποπληθυσμών, σε σχέση με τους λοιπούς ασθενείς με μονοκυττάρωση
- ▶ Η αύξηση του ποσοστού των κλασικών μονοκυττάρων στη ΧΜΜΛ συνοδεύεται κυρίως από μείωση του ποσοστού των μη κλασικών μονοκυττάρων
- ▶ Το ποσοστό 94% των κλασικών μονοκυττάρων αποτελεί ιδανική τιμή cutoff με αυξημένη ειδικότητα και ευαισθησία
- ▶ Ανάλυση μεγαλύτερου αριθμού δειγμάτων από ασθενείς με ΧΜΜΛ καθώς και σύγκριση αυτών με τον ανοσοφαινότυπο ασθενών με μονοκυττάρωση και άλλα ΜΔΣ/ΜΥΝ θα βοηθήσει στην πιο ακριβή διάγνωση της ΧΜΜΛ με κυτταρομετρία ροής καθώς και στην παρακολούθηση της θεραπευτικής προσέγγισης.

# ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Germing, U., et al. (2007). "Chronic myelomonocytic leukemia in the light of the WHO proposals." *Haematologica* 92(7): 974-977.
- Kawamura, S. and T. Ohteki (2018). "Monopoiesis in humans and mice." *Int Immunol* 30(11): 503-509.
- Lynch, D. T., et al. (2018). "How I investigate monocytosis." *Int J Lab Hematol* 40(2): 107-114.
- Selimoglu-Buet, D., et al. (2017). "Accumulation of classical monocytes defines a subgroup of MDS that frequently evolves into CMML." *Blood* 130(6): 832-835.
- Selimoglu-Buet, D., et al. (2015). "Characteristic repartition of monocyte subsets as a diagnostic signature of chronic myelomonocytic leukemia." *Blood* 125(23): 3618-3626.
- Solary, E. and R. Itzykson (2017). "How I treat chronic myelomonocytic leukemia." *Blood* 130(2): 126-136.

**ΕΥΧΑΡΙΣΤΩ ΠΟΛΥ**



**ΓΙΑ ΤΗΝ ΠΡΟΣΟΧΗ ΣΑΣ**