

ΝΟΣΟΚΟΜΕΙΑΚΑ ΧΡΟΝΙΚΑ

ΤΡΙΜΗΝΙΑΙΑ ΕΚΔΟΣΗ ΤΗΣ ΕΝΩΣΕΩΣ ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΟΥ ΠΡΟΣΩΠΙΚΟΥ
ΝΟΣΟΚΟΜΕΙΟΥ «Ο ΕΥΑΓΓΕΛΙΣΜΟΣ»
ΕΤΟΣ ΙΔΡΥΣΕΩΣ: 1945

ΙΟΥΛΙΟΣ-ΔΕΚΕΜΒΡΙΟΣ 2004
ΤΟΜΟΣ 66 ΤΕΥΧΗ 3-4

ΕΠΑΙΝΟΣ ΑΚΑΔΗΜΙΑΣ ΑΘΗΝΩΝ

JULY-DECEMBER 2004
VOLUME 66 NUMBERS 3-4



Υπερφάντρου 45 - 105 76 Αθήνα

NOSOKOMIAKA CHRONIKA
Official publication of the Scientific Society
of Evangelismos Hospital

ΝΟΣΟΚΟΜΕΙΑΚΑ ΧΡΟΝΙΚΑ
2004
ΤΟΜΟΣ 66
ΤΕΥΧΗ 3-4
ΣΕΛ. 157-204

ΙΔΙΟΚΤΗΤΗΣ - ΕΚΔΟΤΗΣ

ΕΝΩΣΗ ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΟΥ ΠΡΟΣΩΠΙΚΟΥ ΘΕΡΑΠΕΥΤΗΡΙΟΥ
«Ο ΕΥΑΓΓΕΛΙΣΜΟΣ», Υψηλάντου 45, 106 76 Αθήνα
Τηλ.: 210 7201744, 210 7205102, Fax: 210 7253912
e-mail: sseh@evaggelismos-hosp.gr - info@sseh.gr
site: www.sseh.gr - www.sseh.org

**ΔΙΟΙΚΗΤΙΚΟ ΣΥΜΒΟΥΛΙΟ ΕΝΩΣΕΩΣ ΕΠΙΣΤ/ΚΟΥ
ΠΡΟΣΩΠΙΚΟΥ****ΠΡΟΕΔΡΟΣ**

ΑΛΕΞΟΠΟΥΛΟΣ Κωνσταντίνος

ΑΝΤΙΠΡΟΕΔΡΟΣ

ΘΕΟΔΩΡΟΠΟΥΛΟΥ Σταυρούλα

ΓΡΑΜΜΑΤΕΑΣ

ΒΑΣΛΑΜΑΤΖΗΣ Μιχαήλ

ΤΑΜΙΑΣ

ΚΟΤΣΩΡΗ Αικατερίνη

ΜΕΛΗ

ΑΠΟΣΤΟΛΟΥ Θεοφάνης

ΠΑΡΑΡΑ Μυρσίνη

ΡΟΝΤΟΓΙΑΝΝΗ Δήμητρα

ΣΑΜΑΡΚΟΣ Μιχάλης

ΣΤΑΣΙΝΟΠΟΥΛΟΥ Παναγιώτα

ISSN 0369-5700**ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ ΣΥΝΤΑΞΗΣ**

ΑΛΕΞΟΠΟΥΛΟΣ Κωνσταντίνος

ΑΝΑΠΛ. ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ ΣΥΝΤΑΞΗΣ

ΜΑΝΩΛΗΣ Αντώνης

ΓΡΑΜΜΑΤΕΑΣ ΣΥΝΤΑΞΗΣ

ΒΑΣΛΑΜΑΤΖΗΣ Μιχαήλ

ΜΕΛΗ ΣΥΝΤΑΚΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ

ΑΠΟΣΤΟΛΟΥ Θεοφάνης

ΒΛΑΧΟΓΙΑΝΝΑΚΟΣ Ιωάννης

ΠΑΛΛΟΥΡΗΣ Αθανάσιος

ΔΙΠΛΑΣ Διονύσιος

ΘΕΟΔΩΡΟΠΟΥΛΟΥ Σταυρούλα

ΚΑΡΑΚΑΣΗΣ Δημήτριος

ΚΟΤΣΩΡΗ Αικατερίνη

ΜΑΥΡΟΜΑΤΗΣ Θεόδωρος

ΠΑΡΑΡΑ Μυρσίνη

ΠΕΠΠΑΣ Χρήστος

ΠΕΤΡΑΚΗ Κωνσταντίνα

ΠΛΑΤΣΟΥΚΑ Ευαγγελία

ΡΟΝΤΟΓΙΑΝΝΗ Δήμητρα

ΣΑΜΑΡΚΟΣ Μιχάλης

ΣΤΑΜΑΤΗΣ Δημήτρης

ΣΤΑΣΙΝΟΠΟΥΛΟΥ Παναγιώτα

ΦΙΛΑΔΙΤΑΚΗ Βασιλική

ΧΑΤΖΗΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΥ Βαλασαμάκης

ΕΚΤΥΠΩΣΗ**ΤΕΧΝΟΓΡΑΜΜΑ**

Μ. Αυγέρη 12, 153 43 Αγία Παρασκευή, Αθήνα

Τηλ.: 210.6000.643 - Fax: 210.600.22.95

e-mail: techn@hol.gr

Ετήσια συνδρομή εσωτερικού 20 €

Εταιρείες - Οργανισμοί 30 €

Συνδρομές εξωτερικού 35 €

Φοιτητές 10 €

Διεύθυνση υπεύθυνου σύμφωνα με το νόμο:

Κ.Γ. Αλεξόπουλος, Θεραπευτήριο "Ο ΕΥΑΓΓΕΛΙΣΜΟΣ"

ΝΟΣΟΚΟΜΕΙΑΚΑ ΧΡΟΝΙΚΑ

ΤΟΜΟΣ 66, ΤΕΥΧΗ **3-4**
ΙΟΥΛΙΟΣ-ΔΕΚΕΜΒΡΙΟΣ 2004

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΜΙΑ ΓΡΗΓΟΡΗ ΜΑΤΙΑ ΣΤΑ ΝΟΣΟΚΟΜΕΙΑΚΑ ΧΡΟΝΙΚΑ _____	161
ΕΝΔΙΑΦΕΡΟΥΣΑ ΠΕΡΙΠΤΩΣΗ	
Εμμένουσα αγκυλοστομίαση σε διαβητικό ασθενή με μεμβρανώδη σπειραματονεφρίτιδα	
Ε. Περιβολιώτη, Π. Βρύσης, Θ. Αποστόλου, Δ. Πρωτόπαπα, Ε. Πλατσούκα, Β. Χατζηκωνσταντίνου, Ο. Πανιάρα _____	162
ΣΕΜΙΝΑΡΙΑ ΣΕ ΣΥΝΕΧΕΙΕΣ	
Εντοπισμένος καρκίνος προστάτη - Αντιμετώπιση με ακτινοθεραπεία	
Β.Λ. Τάραντο _____	166
"ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΙΑ ΡΟΗΣ" - Μέρος 1^ο	
Εισαγωγή	
Συντονίστρια: Β. Καψιμάλη-Βαϊοπούλου _____	175
Εισαγωγή στις Αρχές της Κυτταρομετρίας Ροής	
Μ. Γεωργίου _____	176
Δείκτες Διαφοροποίησης των Αιμοποιητικών Κυττάρων	
Ι. Κάκκας _____	180
Οξεία Λεμφοβλαστική Λευκαμία	
Β. Καψιμάλη-Βαϊοπούλου _____	187
Τυποποίηση Οξείας Μυελοβλαστικής Λευκαμίας	
Φ. Κοντοπίδου _____	189
ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ	
Γονίδια και σακχαρώδης διαβήτης	
Α.Δ. Παναγή _____	195
THE LANCET _____	202

Οδηγίες για τους συγγραφείς

Στις οδηγίες που ακολουθούν ελήφθησαν υπόψη οι τελευταίες υποδείξεις (1997) της Διεθνούς Επιτροπής των Εκδοτών Ιατρικών Περιοδικών (International Committee of Medical Journal Editors - ICM - JE): Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals.

1. ΕΙΔΗ ΕΡΓΑΣΙΩΝ. Στα "Νοσοκομειακά Χρονικά" δημοσιεύονται εργασίες πάνω σε θέματα της Ιατρικής και των συναφών κλάδων καθώς και γενικότερα θέματα με ιατρικό ενδιαφέρον. Ειδικότερα:

Ανασκοπήσεις, από δύο το πολύ συγγραφείς. Περιέχουν μέχρι 20 δακτυλογραφημένες σελίδες και μέχρι 100 παραπομπές το πολύ.

Πρωτότυπες εργασίες, βασικής ή κλινικής έρευνας. Περιέχουν πρωτοδημοσιευόμενα στοιχεία. Απαραίτητη η στατιστική ανάλυση.

Κλινικές μελέτες, για την παρουσίαση κλινικής εμπειρίας, μέχρι 15 σελίδες το πολύ και ανάλογη βιβλιογραφία. Στατιστική ανάλυση επιθυμητή.

Ενδιαφέρουσες περιπτώσεις, για σύντομη (6-8 σελίδες) παρουσίαση σπάνιας νόσου ή εκδήλωσης ή ασυνήθους κλινικής πορείας. Η συζήτηση περιορίζεται στην υποστήριξη της παρουσίας και δεν πλατειάζει σε βιβλιογραφική ανασκόπηση.

Εργαστηριακά διαγνωστικά θέματα, για παρουσίαση ειδικών τεχνικών ή μεθόδων (μέχρι 15 σελίδες).

Άρθρα σύνταξης, για σύντομο σχολιασμό επίκαιρων θεμάτων ή δημοσιευόμενων εργασιών, μετά από επιλογή του συγγραφέα από τη Συντακτική Επιτροπή. Αν εκφράζουν συλλογικά τη Σύνταξη του περιοδικού είναι ανυπόγραφα.

Επίκαιρα θέματα, για σύντομη (μέχρι 4-5 σελίδες) αναφορά τελευταίων απόψεων σε συγκεκριμένο θέμα, με πολύ περιορισμένη βιβλιογραφία.

Γραπτά σεμινάρια, γραπτά συμπόσια, στρογγυλά τραπέζια, κλινικοπαθολογοανατομικές συζητήσεις, κατά την κρίση της Σύνταξης.

Ειδικά θέματα, που αφορούν τις επιστήμες υγείας και δεν κατατάσσονται σε άλλη κατηγορία εργασιών, καθώς και γενικότερου ενδιαφέροντος που άπτονται της ιατρικής, έκτασης μέχρι 15-20 σελίδες.

Γράμματα αναγνωστών, πάντοτε ενυπόγραφα και έκτασης 1-2 σελίδων, με κρίσεις για δημοσιευόμενη εργασία ή γενικότερες γνώμες, σύντομες παρατηρήσεις, πρόδρομα αποτελέσματα σε συντομία κ.λπ. Αν αφορούν κρίσεις δημοσιευμένης εργασίας, τίθενται υπόψη του συγγραφέα, που μπορεί να απαντήσει.

2. ΑΛΛΕΣ ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ

- Η γλώσσα των εργασιών αφήνεται στο συγγραφέα, αρκεί να είναι ορθή και ομοιογενής. Πάντως συνιστούμε τη χρήση σωστής δημοτικής.
- Συνίσταται η αποφυγή αναγραφής μεγάλου αριθμού συγγραφέων, ιδιαίτερα στις "Ενδιαφέρουσες Περιπτώσεις", στις οποίες οι συγγραφείς δεν πρέπει να υπερβαίνουν τους πέντε. Όλοι οι εμφανιζόμενοι συγγρα-

φείς μιας εργασίας, ιδίως πρωτότυπης, οφείλουν να έχουν συμβάλει ουσιωδώς στην εκπόνησή της και συγκεκριμένα α) στη σύλληψη, το σχεδιασμό και την εκτέλεσή της, τη συλλογή και επεξεργασία αποτελεσμάτων, και β) στη συγγραφή ή/και επιμέλεια κειμένου. Εξυπακούεται ότι πρέπει να έχουν λάβει γνώση της τελικής μορφής του κειμένου και να έχουν εγκρίνει την υποβολή του προς δημοσίευση. Άλλη συμμετοχή, όπως αυτή της χρηματοδότησης, της συλλογής υλικού ή της γενικής εποπτείας της ερευνητικής ομάδας δεν δικαιολογεί την εμφάνιση ονόματος στη συγγραφική ομάδα. Γ' αυτές τις περιπτώσεις προβλέπεται η δυνατότητα γραπτής αναγνώρισης της όποιας συμβολής, η οποία βεβαίως δημοσιεύεται μαζί με το κείμενο. Η σειρά δημοσίευσης των ονομάτων των συγγραφέων συναποφασίζεται από τους ίδιους.

- Όλες οι εργασίες αποστέλλονται για κρίση σε δύο ανεξάρτητους κριτές και επί διαφωνίας σε τρίτον. Τα ονόματα των κριτών και των συγγραφέων είναι απόρρητα. Η τελική απόφαση για δημοσίευση και ο χρόνος της ανήκει στη Συντακτική Επιτροπή.
- Εάν η εργασία έχει ανακοινωθεί προφορικά ή δημοσιευθεί σε περίληψη (π.χ. πρακτικά συνεδρίων) ή έχει δημοσιευθεί αλλού, αλλά παρουσιάζεται με πρόσθετα ή νεότερα στοιχεία, αυτό υποσημειώνεται στη σελίδα του τίτλου. Θεωρούμε ηθική δέσμευση των συγγραφέων να μην υποβάλλουν εργασία αυτούσια δημοσιευμένη αλλού. Η τελευταία δεν γίνεται δεκτή προς δημοσίευση, εκτός από εξαιρετικές περιπτώσεις κατά την κρίση της Συντακτικής Επιτροπής και με σχετική σημείωση. Η δημοσίευση μιας εργασίας σε ξενόγλωσσο περιοδικό δεν αποκλείει τη δημοσίευσή της στην ελληνική γλώσσα στο παρόν περιοδικό, στο σύνολό της ή μέρος αυτής, φυσικά μετά από τη σχετική διαδικασία κρίσης.
- Πειραματικές κλινικές εργασίες (φάση 1, 2, 3) σε ανθρώπους πρέπει να συνοδεύονται από έγγραφη δήλωση ότι η έρευνα έγινε σύμφωνα με τους διεθνείς δεοντολογικούς κανόνες και τη νομοθεσία (συγκατάθεση ασθενών, έγκριση από επιτροπή δεοντολογίας ή φαρμάκων, έγκριση φαρμάκου από τον ΕΟΦ κ.λπ.).
- Οι εργασίες υποβάλλονται δακτυλογραφημένες σε διπλό διάστημα σε τρία αντίτυπα. Η Σύνταξη του περιοδικού θεωρεί δεδομένο ότι η εργασία είναι σε γνώση και έχει την έγκριση όλων των συγγραφέων και του διευθυντή του τμήματος από το οποίο προέρχεται. Το τυχόν αντίθετο αφορά στις σχέσεις των ενδιαφερομένων και η Συντακτική Επιτροπή (η οποία κρίνει εργασίες και όχι διαπρωσοπικές σχέσεις) δεν έχει καμιά ανάμειξη.
- Οι αναφερόμενες ουσίες πρέπει να αναγράφονται με την κοινόχρηστη ονομασία ή το χημικό όνομα. Για τις μονάδες, ενθαρρύνουμε τη χρήση του διεθνούς *Système International* (SI) - βλ. ΙΑΤΡΙΚΗ 1980, 37:139.

OWNER - PUBLISHER

SCIENTIFIC SOCIETY OF EVANGELISMOS HOSPITAL
45, Ipsilantou Str., 106 76 Athens, GREECE
Tel.: 210 7201744, 210 7205102, Fax: 210 7253912
e-mail: sseh@evangelismos-hosp.gr - info@sseh.gr
site: www.sseh.gr - www.sseh.org

BOARD OF THE SCIENTIFIC SOCIETY**PRESIDENT**

ALEXOPOULOS Constantine

VICE PRESIDENT

THEODOROPOULOU Stavroula

SECRETARY

VASLAMATZIS Michael

TREASURER

KOTSORI Aekaterini

MEMBERS

APOSTOLOU Theofanis

PARARA Myrsini

RONTOGIANNI Dimitra

SAMARKOS Michael

STASINOPOULOU Panayiota

ISSN 0369-5700**EDITOR IN CHIEF**

ALEXOPOULOS Constantine

VICE EDITOR IN CHIEF

MANOLIS Antonis

ASSOCIATE EDITOR

VASLAMATZIS Michael

EDITORIAL BOARD

APOSTOLOU Theofanis

DIPLAS Dionysios

FILADITAKI Vassiliki

GIALOURIS Athanasios

CHATZIKONSTANTINOOU Valsamakis

KARAKASIS Dimitrios

KOTSORI Aekaterini

MAVROMATIS Theodore

PARARA Myrsini

PEPPAS Christos

PETRAKI Konstantina

PLATSOUKA Evangelia

RONTOGIANNI Dimitra

SAMARKOS Michael

STAMATIS Dimitrios

STASINOPOULOU Panayiota

THEODOROPOULOU Stavroula

VLACHOGIANNAKOS Ioannis

PRODUCTION

TECHNOGRAMMA

12, Markou Avgeri str.

GR-153 43 Ag. Paraskevi

Tel.: +30 210.6000.643 - Fax: +30 210.600.22.95

e-mail: techn@hol.gr

Annual subscription in Greece 20 €

Societies - Organisations 30 €

Annual subscription for other countries 35 €

Students 10 €

NOSOKOMIAKA CHRONIKA

VOLUME 66, NUMBERS **3-4**
JULY-DECEMBER 2004

CONTENTS

A QUICK LOOK AT NOSOKOMIAKA CHRONIKA	161
CLINICAL-LABORATORY STUDY	
Persistent ancylostomiasis in a diabetic patient with membranous glomerulonephritis	
E. Perivoliotis, P. Vryssis, Th. Apostolou, D. Protopapa, E. Platsouka, V. Hadjikonstantinou, O. Paniara	162
SEMINARS IN SERIES	
"CARCINOMA OF THE PROSTATE"	
Localized Prostate Cancer, External Radiation Therapy	
V.L. Tarando	166
"THE CLINICAL UTILITY OF FLOW CYTOMETRY IN THE DIAGNOSIS OF HAEMATOLOGICAL DISORDERS" - 1ST PART	
Introduction	
Moderator: V. Kapsimalis-Vaiopoulos	175
Introduction to flow cytometry	
M. Georgiou	176
Differentiation markers of haemopoietic cells	
J. Kakkas	180
Immunophenotypic analysis of acute lymphoblastic leukemia	
V. Kapsimalis-Vaiopoulos	187
Immunophenotypic analysis of acute myeloblastic leukemia	
F. Kontopidou	189
REVIEW	
Genes and Diabetes mellitus	
D.A. Panani	195
THE LANCET	202

Οδηγίες για τους συγγραφείς

ΔΟΜΗ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ: Το χειρόγραφο πρέπει να έχει:

1. Σελίδα τίτλου, με τον τίτλο της εργασίας (μέχρι 15 λέξεις), τα ονόματα των συγγραφέων και σε υποσημείωση το τμήμα από το οποίο προέρχεται, τη θέση ή τον ανώτερο ακαδημαϊκό τίτλο κάθε συγγραφέα και τυχόν υποσημείωση για το εάν η εργασία έχει ανακοινωθεί ή δημοσιευθεί σε περιλήψη αλλού (βλ. παραπάνω). Να σημειώνεται ο υπεύθυνος της αλληλογραφίας και τα τηλέφωνα του.
2. Σελίδα περιλήψης στα ελληνικά με τις λέξεις ευρετηρίου (key words).
3. Το κείμενο της εργασίας με κατάλληλο χωρισμό σε διάφορα «κεφάλαια».
4. Σελίδα με την αγγλική περιλήψη, με τον τίτλο της εργασίας και τα ονόματα των συγγραφέων στα αγγλικά, με τη μορφή abstract (μέχρι 300 λέξεις), δομημένου με συγκεκριμένο τρόπο: background, material and methods, results, conclusions.
5. Βιβλιογραφία με το σύστημα Vancouver: Ο κατάλογος δεν είναι αλφαβητικός αλλά με τη σειρά που οι παραπομπές ευρίσκονται στο κείμενο. Στο κείμενο αναφέρονται με τον αριθμό του καταλόγου και όχι με όνομα συγγραφέα. Για άρθρα περιοδικών, τα επώνυμα των συγγραφέων γράφονται μέχρι τρία – τα παραπάνω γράφονται et al ή κ.ά. (με τα αρχικά χωρίς τελείες) – ο τίτλος του άρθρου, το περιοδικό γραμμένο με τη διεθνή μορφή σύντμησης όπως στο Index Medicus, η χρονολογία, ο αριθμός τόμου και η πρώτη και τελευταία σελίδα του άρθρου (π.χ. Smith A: Intestinal bleeding. JAMA 1988, 215: 101-103). Για μονογραφία, το όνομα, ο τίτλος, ο εκδότης, ο τόπος και το έτος έκδοσης (π.χ. Smith A: Intestinal bleeding. Saunders Co, London, 1988). Για κεφάλαιο βιβλίου, τα ονόματα, ο τίτλος του κεφαλαίου, ο τίτλος του βιβλίου, ο επιμελητής σύνταξης (editor), ο εκδότης, ο τόπος και το έτος έκδοσης (π.χ. Smith A: Intestinal bleeding. In: Practice of Surgery, H. Kim, ed, Saunders Co, London 1988). Οι βιβλιογραφικές παραπομπές θα πρέπει να μπορούν να ελεγχθούν από τον κριτή και - κυρίως - από τον αναγνώστη. Έτσι, εάν η βιβλιογραφική αναφορά ευρίσκεται σε άρθρο, βιβλίο κ.λπ. που δεν συμβουλευθήκε άμεσα ο συγγραφέας αλλά αναφέρεται αλλού, ιδιαίτερα

για παλιά ή δυσεύρετα στοιχεία, τότε δεν αναγράφεται σαν ξεχωριστή αναφορά διογκώνοντας άσκοπα και τεχνητά το βιβλιογραφικό πίνακα, αλλά αποδίδεται στο στοιχείο που άμεσα μελέτησε ο συγγραφέας (π.χ. “ο Crohn το 1932 ανέφερε¹⁰” - όπου 10 είναι το άρθρο του Smith που πράγματι συμβουλεύτηκε ο συγγραφέας). Ιδιαίτερη σύσταση γίνεται για τη χρησιμοποίηση και της ελληνικής βιβλιογραφίας που είναι ήδη αρκετά πλούσια.

6. Πίνακες και σχήματα σε ξεχωριστή σελίδα το καθένα, σε τρία αντίτυπα, με διαδοχική αρίθμηση και σύντομη επεξήγηση. Πίνακες δακτυλογραφημένοι σε διπλό διάστημα χωρίς διαχωριστικές γραμμές, σχήματα με σινική μελάνη.
7. Φωτογραφίες καλής ποιότητας σε στιλπνό χαρτί. Πίσω από τη φωτογραφία σημειώνεται με μαλακό μολύβι βέλος που δείχνει το πάνω μέρος και ο αύξων αριθμός και σε αυτοκόλλητο τα ονόματα των συγγραφέων της εργασίας. Σε ξεχωριστή σελίδα γράφονται οι υπότιτλοι των φωτογραφιών κατά σειρά. Συνιστούμε τη χρησιμοποίηση των τελείως απαραίτητων για κάθε περίπτωση φωτογραφιών, το μέγεθος των οποίων στην τελική εκτύπωση ανήκει στην κρίση του υπεύθυνου έκδοσης. Σημειώνεται ότι κατά τη δημοσίευση φωτογραφίας ασθενούς θα πρέπει να λαμβάνεται μέριμνα ώστε να μην αποκάλυπτεται η ταυτότητα του ατόμου. Το ονοματεπώνυμο σε καμιά περίπτωση δεν πρέπει να αναγράφεται (π.χ. σε ακτινογραφίες, κ.λπ.), ενώ στις δημοσιευόμενες φωτογραφίες η απλή επικάλυψη των οφθαλμών δεν αποτελεί επαρκή διαφύλαξη της ανωνυμίας του εικονιζόμενου προσώπου.

ΔΙΟΡΘΩΣΕΙΣ-ΑΝΑΤΥΠΑ

Ο υπεύθυνος για την αλληλογραφία συγγραφέας κάνει την τελευταία διόρθωση του δοκιμίου κατά την οποία αποκλείονται μεταβολές ή προσθήκες στην εργασία. Η διόρθωση αυτή πρέπει να γίνεται σε 2-3 ημέρες και να επιστρέφεται με την τυχόν αίτηση ανατύπων, τα έξοδα των οποίων βαρύνουν τους συγγραφείς και καθορίζονται από τον εκδότη, χωρίς ανάμειξη της Σύνταξης.

ΜΙΑ ΓΡΗΓΟΡΗ ΜΑΤΙΑ ΣΤΑ ΝΟΣΟΚΟΜΕΙΑΚΑ ΧΡΟΝΙΚΑ

Στο περιοδικό που κρατάτε στα χέρια σας - και όπου “συστεγάζονται” το 3ο και το 4ο τεύχος των Ν.Χ. για το 2004 - μπορείτε μεταξύ άλλων να διαβάσετε:

- Ποιες γονιδιακές διαταραχές έχουν μέχρι σήμερα αναγνωρισθεί σε άτομα με σακχαρώδη διαβήτη και ποιους δρόμους ανοίγουν για την καλύτερη πρόληψη ή αντιμετώπιση της νόσου.

- Ποια ήταν η απροσδόκητη αιτία καταβολής και απώλειας βάρους σε διαβητικό ασθενή με ήδη γνωστή μεμβρανώδη σπειραματονεφρίτιδα...

- Ενα εκτενές γραπτό Συμπόσιο που αφορά την κυτταρομετρία ροής, μία σημαντική εργαστηριακή μέθοδο τα αποτελέσματα της οποίας πολλοί κλινικοί γιατροί αξιοποιούν έστω κι αν γνωρίζουν πολύ λίγα για τη φύση της. Διαβάζοντας το 1ο μέρος του σχετικού Συμποσίου θα γνωρίσετε τις βασικές αρχές και το θεωρητικό της υπόστρωμα καθώς και τη συμβολή της στην προσέγγιση των οξειών λευχαιμιών.

- Και φυσικά η συνέχεια του “σήριαλ” -ή ακριβέστερα σεμινάριου σε συνέχειες- που αφορά τον καρκίνο του προστάτη. Σε τούτο το τεύχος μπορείτε να πληροφορηθείτε ποιες δυνατότητες παρέχει σήμερα η ακτινοθεραπεία - ιδίως μετά τις σημαντικές τεχνολογικές προόδους των τελευταίων ετών- για τη ριζική αντιμετώπιση των πρώιμων σταδίων του καρκίνου του προστάτη.

Αυτά για τώρα. Ραντεβού στο επόμενο τεύχος των Ν.Χ.

A. Γ. Γ.

Εμμένουσα αγκυλοστομίαση σε διαβητικό ασθενή με μεμβρανώδη σπειραματονεφρίτιδα

Ε Περιβολιώτη¹, Π Βρύσης², Θ Αποστόλου², Δ Πρωτόπαπα³,
Ε Πλατσούκα¹, Β Χατζηκωνσταντίνου², Ο Πανιάρα¹

SUMMARY

E. PERIVOLIOTIS, P. VRYSSIS, TH. APOSTOLOU, D. PROTOPAPA, E. PLATSOUKA, V. HADJIKONSTANTINOU, O. PANIARA. Persistent ancylostomiasis in a diabetic patient with membranous glomerulonephritis. A 77-year old male patient with diabetes mellitus and membranous nephropathy, complaining of severe weakness, loss of weight and ankle edema, with laboratory findings of hypoalbuminemia, iron-deficiency anemia and eosinophilia is presented. Initially, sections of hookworms into the duodenal mucosa were identified in biopsy specimens. Subsequently a substantial number of *Ancylostoma* adults and eggs was directly detected from gastric fluid. The patient received mebendazole 100 mg twice daily for 3 days and continued with a single 400 mg dose of albendazole. His clinical condition and laboratory findings gradually improved, but gastric fluid continued to host *Ancylostoma duodenale* for another three months. During the above period he received again several courses of albendazole. He had no relapse of the nephrotic syndrome during this hookworm disease. **Nosokomiaka Chronika, 66, 162-165, 2004.**

Key words: *Ancylostoma duodenale*, iron-deficiency anemia, eosinophilia, immunosuppression

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Περιγράφεται περίπτωση διαβητικού ασθενούς 77 ετών με μεμβρανώδη νεφροπάθεια που παρουσίασε έντονη καταβολή δυνάμεων, απώλεια σωματικού βάρους, οιδήματα κάτω άκρων, υπολευκωματιναιμία, σιδηροπενική αναιμία και ηωσινοφιλία. Αρχικά σε ιστολογικά παρασκευάσματα του 12λου εντοπίστηκαν τομές σκωλήκων, εικόνα συμβατή με παρασίτωση. Παράλληλα, στην άμεση μικροσκόπηση νωπών παρασκευασμάτων γαστρικού υγρού βρέθηκε μεγάλος αριθμός ώριμων σκωλήκων και ωαρίων Αγκυλοστόματος. Στον ασθενή χορηγήθηκε αντιπαρασιτική αγωγή αρχικά με μεβενδαζόλη και στη συνέχεια με αλβενδαζόλη. Παρουσίασε βαθμιαία βελτίωση της κλινικής του κατάστασης και των εργαστηριακών τιμών. Το Αγκυλόστομα το δωδεκαδακτυλικόν συνέχιζε να ανευρίσκεται στο γαστρικό υγρό για τρεις μήνες. Ο ασθενής κατά το παραπάνω διάστημα ελάμβανε εκ νέου θεραπεία με αλβενδαζόλη. Δεν υπήρξε υποτροπή του νεφρωσικού συνδρόμου σε όλη την πορεία του ασθενούς. **Νοσοκ. Χρονικά, 66, 162-165, 2004.**

Λέξεις ευρετηρίου: Αγκυλόστομα το δωδεκαδακτυλικόν, σιδηροπενική αναιμία, ηωσινοφιλία, ανοσοκαταστολή

¹Μικροβιολογικό Εργαστήριο ΓΝΑ «Ο ΕΥΑΓΓΕΛΙΣΜΟΣ», ²Νεφρολογικό Τμήμα ΓΝΑ «Ο ΕΥΑΓΓΕΛΙΣΜΟΣ», ³Παθολογοανατομικό Εργαστήριο ΓΝΑ «Ο ΕΥΑΓΓΕΛΙΣΜΟΣ»

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η αγκυλοστομίαση είναι μια παρασίτωση που αφορά στο 1/5 του πληθυσμού της γης (1), αναφέρεται ως η συνηθέστερα μεταδιδόμενη διά του εδάφους ελμινθίαση, είναι ευρέως διαδεδομένη στις τροπικές και υποτροπικές χώρες, αλλά απαντά και στις υγρές και εύκρατες περιοχές (2). Προκαλείται από τους νηματώδεις σκώληκες Νεκάτορ ο αμερικάνικος και Αγκυλόστομα το δωδεκαδακτυλικόν, που αποτελούν την ομάδα ελμίνθων γνωστή ως αγκυλοσκώληκες (hookworms). Το Αγκυλόστομα το δωδεκαδακτυλικόν ενδημεί στις χώρες της Μεσογείου, Βόρεια Αφρική, Βόρεια Ινδία, Βόρεια Κίνα και Ιαπωνία. Ο Νεκάτορ ο αμερικάνικος ενδημεί στην Κεντρική και Νότια Αφρική, Νότια Ασία, ΗΠΑ και στο νησιωτικό συγκρότημα της Καραϊβικής (3,4). Κύριος ξενιστής του παρασίτου είναι ο άνθρωπος και οι τέλειοι σκώληκες παρασιτούν στο βλεννογόνο του λεπτού εντέρου, κυρίως της νήστιδας, απ' όπου απομυζούν αίμα και εντερικά υγρά. Περιγράφεται περίπτωση σοβαρής αγκυλοστομίας σε διαβητικό ασθενή με μεμβρανώδη σπειραματονεφρίτιδα και επιτυχή έκβαση που νοσηλεύθηκε στο νοσοκομείο μας.

ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΠΕΡΙΠΤΩΣΕΩΣ

Πρόκειται για άνδρα 77 ετών, κάτοικο νήσου Αιγαίου, αγρότη που εισήχθη στο νοσοκομείο με αδυναμία, καταβολή δυνάμεων και σημαντική απώλεια σωματικού βάρους.

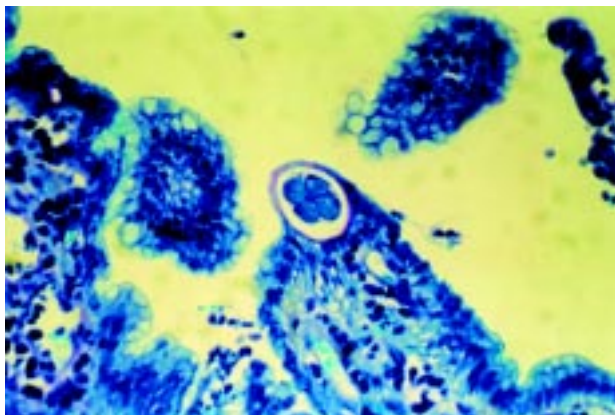
Από το ατομικό αναμνηστικό ανέφερε χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια σε βρογχοδιασταλτική αγωγή, σακχαρώδη διαβήτη τύπου II με ινσουλινοθεραπεία από 1 έτος, γαστρεκτομή (Billroth II) προ 40ετίας λόγω έλκους στομάχου, νοσηλεία το Σεπτέμβριο του 1998 σε Παθολογικό τμήμα του Νοσοκομείου μας με διάγνωση "ηωσινοφιλική πνευμονία" και προ 5μήνου εκ νέου εισαγωγή στο νοσοκομείο με κλινική εικόνα νεφρωσικού συνδρόμου (εμμένουσα λευκωματουρία >10g/24ωρο). Η διαδερμική βιοψία νεφρού ανέδειξε κλασικές αλλοιώσεις μεμβρανώδους σπειραματονεφρίτιδας σταδίου 0-1, με ενδείξεις δευτεροπαθούς φύσης της νόσου από τον ανοσοφθορισμό (κοκκιώδεις ανοσοεναποθέσεις IgG, IgA και C3 επί του τοιχώματος των τριχοειδών και μεσαγγειακές IgM). Λόγω της βαρύτητας του νεφρωσικού συνδρόμου αποφασίστηκε έναρξη αγωγής με κορτικοειδή (Solu-medrol σε συνολική δόση εφόδου 500mg σε 5 ημέρες) και κυκλοφωσφαμίδη (Endoxan 1gr i.v.) σε μηνιαία σχήματα για 6 μήνες, με σταδιακή μείωση της δόσης της κορτιζόνης και έλεγχο του σακχαρώ-

δη διαβήτη. Η λευκωματουρία παρουσίασε πτωτική πορεία μέχρι σχεδόν πλήρους ύφεσής της (λεύκωμα ούρων 24ώρου <300 mg). Παρά την αρχική βελτίωση της κλινικής κατάστασης και την προοδευτική ύφεση του νεφρωσικού συνδρόμου ο ασθενής στο τέλος της θεραπείας παρουσίασε βαθμιαία έντονη καταβολή δυνάμεων, μυϊκή αδυναμία, ανορεξία, δυσκαταποσία με συνοδό σημαντική απώλεια σωματικού βάρους και οίδημα κάτω άκρων και οσφύς.

Από τη φυσική εξέταση του ασθενούς σημειώνεται το έντονο ζυμώδες οίδημα των κάτω άκρων έως τη μεσότητα των κνημών και το οίδημα της οσφύς. Ο εργαστηριακός έλεγχός του έδειξε σοβαρή υπολευκωματιναιμία (λευκωματίνη ορού 2,2g/dl) χωρίς λευκωματουρία, σιδηροπενική αναιμία Hct: 34,2%, Hb: 10,3 g/dl, σίδηρος ορού 36 μg/dl, φερριτίνη ορού 9 ng/ml, Λευκά: 6.890 κκx (πολυμορφοπύρρηνα 65%, λεμφοκύτταρα 23%, μονοπύρρηνα 7%, ηωσινόφιλα 16%), αιμοπετάλια 273.000 κκx. Ο ενδοσκοπικός έλεγχος του πεπτικού ήταν αρνητικός για παθολογικά ευρήματα. Η ιστολογική εξέταση τεμαχίου του 12δακτυλικού βλεννογόνου έδειξε παθολογοανατομικά ευρήματα συμβατά με παρασιτική λοίμωξη και συγκεκριμένα αναγνωρίστηκαν τομές σώματος σκωλήκων μέσα στο βλεννογόνο. Στη μικροσκοπική εξέταση άμεσων νωπών παρασκευασμάτων γαστρικού υγρού βρέθηκε πολύ μεγάλος αριθμός (5-10 κ.ο.π. με μεγέθυνση x100) ώριμων σκωλήκων (Εικ. 1) και ωαρίων Αγκυλοστόματος του δωδεκαδακτυλικού. Στην εικόνα 2 φαίνεται ένα από τα ωάρια, τα οποία ήταν ωοειδή με διαστάσεις 60x40 μm και περιείχαν 4 κύτταρα. Σε επανειλημμένες παρασιτολογικές εξετάσεις κοπράνων δεν βρέθηκαν ωάρια ή βλαστικές μορφές του παρασίτου (5). Στον ασθενή χορηγήθηκε κατάλ-



Εικόνα 1. Όριμοι σκώληκες αγκυλοστομάτων σε γαστρικό υγρό (x100).



Εικόνα 2. Ωάριο αγκυλοστομάτων σε γαστρικό υγρό.

ληλη αντιπαρασιτική αγωγή αρχικά με μεβενδαζόλη, σε δόση 100mg δύο φορές την ημέρα για τρεις συνεχείς ημέρες και στη συνέχεια αλβενδαζόλη, σε δόση 400mg εφάπαξ, με προοδευτική βελτίωση της κλινικής του κατάστασης, της εργαστηριακής εικόνας (Hct: 41,9%, Hb: 12g/dl, MCV: 82,3 fl, MCH: 23,6 pg, MCHC: 28,6, ολικά λευκώματα: 5,8 g/dl) και βαθμιαία ανάκτηση του σωματικού του βάρους. Παρόλα αυτά η τακτική επανεξέταση του γαστρικού υγρού για τρεις μήνες παρουσίαζε συνεχή παραμονή του παρασίτου. Κατά τους τακτικούς επανελέγχους ο ασθενής ελάμβανε εκ νέου θεραπεία με αλβενδαζόλη. Σε επανειλημμένες μικροσκοπικές εξετάσεις άμεσων νωπών παρασκευασμάτων γαστρικού υγρού δεν ανευρέθησαν ωάρια ή βλαστικές μορφές του παρασίτου έξι μήνες από την αρχική θεραπεία. Δεν υπήρξε υποτροπή του νεφρωσικού συνδρόμου κατά τους τακτικούς επανελέγχους του ασθενούς.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η αγκυλοστομίαση είναι μια χρόνια παρασίτωση του λεπτού εντέρου που συνήθως διαδράμει με ήπιες πεπτικές διαταραχές. Σε σοβαρές μολύνσεις, η ιδιότητα του παρασίτου να τρέφεται με το αίμα του ξενιστή οδηγεί σε έντονη σιδηροπενική αναιμία (6). Παιδιά με βαριά μακρόχρονη λοίμωξη μπορεί να παρουσιάσουν υποπρωτεΐναιμία και να εμφανίσουν υστέρηση στη φυσική και διανοητική τους ανάπτυξη. Περιστασιακά σοβαρές και οξείες αντιδράσεις μπορεί να εκδηλωθούν και από τους πνεύμονες ή από το γαστρεντερικό σύστημα αμέσως μετά την έκθεση στις μολυσματικές προνύμφες του Αγκυλοστόματος του δωδεκαδακτυλικού (1,7,8). Στη βιβλιογραφία δεν αναφέρονται εκδηλώσεις από τους νεφρούς σε μό-

λυση από αγκυλοσκώληκα, ενώ έχουν περιγραφεί νεφροπάθειες σε λοίμωξη από φιλάριας του αίματος Ioa-Ioa (νεφρωσικό σύνδρομο) και τρηματώδεις σκώληκες, ιδιαίτερα από Σχιστόσωμα το αιματοβίον (σωληναριακή και διάμεση νεφρίτις) (9-11).

Αναφέρεται ότι 900 εκατομμύρια άνθρωποι πάσχουν σήμερα από αγκυλοστομίαση. Η αγκυλοστομίαση ενδημεί κυρίως σε τροπικές και υποτροπικές περιοχές όπου η θερμοκρασία, η υγρασία και η σύσταση του εδάφους ευνοούν την ανάπτυξη των μολυσματικών προνυμφών (12,13). Στο περιβάλλον εκκολάπτονται οι ραβδίτοειδείς προνύμφες που εξελίσσονται σε φιλαριοειδείς (λοιμογόνο στάδιο) (1).

Ο άνθρωπος μολύνεται συνήθως με διείσδυση της φιλαριοειδούς προνύμφης από το δέρμα (συνήθως των γυμνών ποδιών) μετά από επαφή με μολυσμένο χώμα. Κατά την αιματογενή διασπορά τους οι φιλαριοειδείς προνύμφες φθάνουν στις κυψελίδες των πνευμόνων με την πνευμονική κυκλοφορία, μεταναστεύουν κατά μήκος των βρόγχων και της τραχείας και διά του οισοφάγου φθάνουν στο λεπτό έντερο όπου ενηλικιώνονται σε ώριμους σκώληκες που έχουν μήκος περίπου 1-2 εκατοστά του μέτρου. Οι θηλυκοί σκώληκες παράγουν ωάρια, τα οποία αποβάλλονται με τα κόπρανα στο έδαφος. Αγροτικοί πληθυσμοί λόγω της αναγκαστικής στενής επαφής με το έδαφος, είναι πιο ευάλωτοι στη μόλυνση (14).

Στην Ελλάδα, μελέτες του 1954 έδειξαν ότι η αγκυλοστομίαση ενδημούσε σε 14 χωριά του κεντρικού τμήματος της νήσου Κέρκυρας (15,16) (ποσοστό 5-15% σε παιδιά κάτω των 15 ετών, έως 30-45% σε ενήλικους αγρότες, άνδρες και γυναίκες) και μάλιστα ότι υφίστατο από τον Α΄ Παγκόσμιο Πόλεμο, εισαχθείσα πιθανώς από γαλλικά αποικιακά στρατεύματα ή από πρόσφυγες της Βαλκανικής. Έκτοτε έχουν καταγραφεί στη χώρα μας περιπτώσεις αγκυλοστομίας σε οικονομικούς μετανάστες από το Πακιστάν (17-19). Το Αγκυλόστομα το δωδεκαδακτυλικόν συνήθως παραμένει στον άνθρωπο για ένα χρόνο περίπου, έχουν όμως αναφερθεί περιπτώσεις στις οποίες η διάρκεια της λοίμωξης ήταν πολύ μεγαλύτερη λόγω παραμονής του παρασίτου στους ιστούς (3).

Σπάνια είναι η εμφάνιση αγκυλοστομίας σε ανοσοκατασταλμένους ασθενείς, καθώς και η επιμονή αυτής της λοίμωξης παρά την ενδεδειγμένη θεραπεία (1,6) όπως στην παρούσα περίπτωση που ο ασθενής παρουσίασε υπολευκωματιναιμία, ηωσινοφιλία και σιδηροπενική αναιμία που αποδόθηκαν στην παρουσία του παρασίτου στο γαστρεντερικό του σύστημα. Η ανοσοκατασταλτική αγωγή που εφαρμόστηκε μπορεί να θεωρηθεί επιτυχής ως προς την αντιμετώπιση (ύφεση) του νεφρωσικού συνδρόμου

παρά τη συνεχή παρουσία της σπάνιας και σοβαρής αυτής παρασίτωσης και η παραμονή του παρασίτου αποκλείει την αιτιολογική συσχέτιση της παρασίτωσης με τη μεμβρανώδη σπειραματονεφρίτιδα. Η έλλειψη ανταπόκρισης στη θεραπεία με μεβενδαζόλη, αποδόθηκε είτε σε μη πιστή τήρηση των οδηγιών λήψεως του φαρμάκου είτε στην υπάρχουσα προσιούσα τυφλή έλικα της γαστρεντεροαναστόμωσης που λειτούργησε σαν αποθήκη του παρασίτου και όπου δεν έφτασε η μεβενδαζόλη. Ακόμη έχει αναφερθεί στη βιβλιογραφία η υπεροχή της αλβενδαζόλης έναντι της μεβενδαζόλης στη θεραπεία των παρασιτώσεων από αγκυλοσκόληκες (20). Η υπάρχουσα ανοσοκαταστολή λόγω του διαβήτη και της λήψεως των ανοσοκατασταλτικών φαρμάκων στον ασθενή πιθανόν ερμηνεύει τον πολύ μεγάλο αριθμό παρασίτων που βρέθηκαν στο γαστρικό υγρό. Η μη ανεύρεση του αγκυλοστόματος του δωδεκαδακτυλικού στις παρασιτολογικές εξετάσεις κοπράνων του ασθενούς μας αποδίδεται στον περιορισμένο αριθμό ωαρίων του παρασίτου στα κόπρανα (5). Αξιοσημείωτο επίσης είναι το γεγονός ότι παρά την ύπαρξη ιστολογικών ενδείξεων δευτεροπαθούς φύσης της μεμβρανώδους σπειραματονεφρίτιδας, η επιμονή της αγκυλοστομίας δεν συνοδεύτηκε από μη ανταπόκριση ή υποτροπή του νεφρωσικού συνδρόμου κάτι που απομακρύνει την πιθανή αιτιολογική συσχέτισή του με την παρασίτωση.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Loukas A, Procviv P. Immune responses in hookworm infections. *Clin Microbiol Rev* 2001; 14(4):689-703.
2. Crompton DWT, Whitehead RR. Hookworm infections and human iron metabolism. *Parasitology* 1993; 107: S137.
3. Garcia LS, Bruckner DA. *In: Diagnostic Medical Parasitology*, 2nd edition American Society for Microbiology, Washington D.C. 1993.
4. Hotef PJ, Pritchard DI. Hookworm infection. *Scientific American* 1995; 272:68-74.
5. Kato T, Kamoi R, Iida M et al. Endoscopic diagnosis of hookworm disease of the duodenum. *J Clin Gastroenterol* 1997; 25(4):719-720.
6. Levi I, Gaspar N, Riesenber K et al. Iron deficiency anemia related to angylostoma duodenale infection among Ethiopian immigrants to Israel. *Harefuah* 2003; 142(8-9):606-608.
7. Changhua L, Xiaorong Z, Dongchuan Q et al. Epidemiology of human hookworm infections among adult villagers in Hejiang and Santai Counties, Sichuan Province, China. *Acta Trop* 1999; 73(3):243-9.
8. Yong W, Guangjin S, Weituo W et al. Epidemiology of human angylostomiasis among rural villagers Nanlin County (Zhongzhou village), Anhui Province China: associated prevalence, intensity and hookworm species identification. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 1999; 30(4):692-697.
9. Duvic C, Nedelec G, Debord T et al. Important parasitic nephropathies, update from the recent literature. *Nephrologie* 1999; 20(2):65-74.
10. Pakasa NM, Nseka NM, Nyimi LM. Secondary collapsing glomerulopathy associated with loa loa filariasis. *Am J Kidney Dis* 1997; 30(6):836-839.
11. Δουβαρά-Πάπαρη Γ, Χατζηκωνσταντίνου Β, Πιτσιγαιδάκη Ε, Μπίλλης Α. Φιλαρίαση loa-loa και χρόνια νεφρική ανεπάρκεια. *Δελτίο Ελληνικής Μικροβιολογικής Εταιρείας* 1979; 24:53-60.
12. Walsh JA, Warren KS. Selective primary health care, an interim strategy for disease control in developing countries. *N Engl J Med* 1979; 301:967-74.
13. Agi PI. Comparative helminth infections of man in two rural communities of Nigeria. *West Afr J Med* 1997; 16(4):232-6.
14. Albonico M, Savioli L. Hookworm infection and disease: advances for control. *Ann Ist Super Sanita* 1997; 33(4):567-79.
15. Παπαδάκη ΑΜ. Η Αγκυλοστομίαση εν Ελλάδι. Στην Παρασιτολογία, σελ. 651-653, Αθήναι 1956.
16. Λαζανάς Γ, Μωραΐτης Ι. Ενδημική εστία αγκυλοστομιάσεως εν τη νήσω Κέρκυρα. Πρακτικά Ιατρικής Εταιρείας, Αθήναι 1954.
17. Σαββάλα Μ, Νικολάου Ν, Μπέλεση Χ και συν. Necator americanus ως αίτιο σιδηροπενικής αναιμίας: Δελτίο Ελληνικής Μικροβιολογικής Εταιρείας 2000; 45(4):446-450.
18. Βασσάλου Ε, Τσελεπατιώτης Ε, Ξεκούκη Π και συν. Βαριά σιδηροπενική αναιμία σε εντερική παρασίτωση από Ancylostoma duodenale: Δελτίο Ελληνικής Μικροβιολογικής Εταιρείας 2001; 46(2):148-153.
19. Πρίφτη Ε, Αυδίκου Α, Γιάγκου Δ κ.ά. Εμπύρετη γαστρεντερίτιδα σε αλλοδαπό: Σύγχρονη λοίμωξη από σαλμονέλλα και αγκυλόστομα. *Εφαρμοσμένη Κλινική Μικροβιολογία και Εργαστηριακή Διαγνωστική* 2001; 6(2):80-85.
20. Rahman WA. Comparative trials using albendazole and mebendazole in the treatment of soil-transmitted helminths in schoolchildren on Penang, Malaysia. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 1996; 27(4):765-767.

Εντοπισμένος καρκίνος προστάτη - Αντιμετώπιση με ακτινοθεραπεία

Βλ Τάραντο

SUMMARY

TARANDO V. Localized Prostate Cancer, External Radiation Therapy. The discussion of treatment options for localized disease should include risks and benefits of surgery or radiation (either external beam or brachy-therapy). The 5-year disease-free survival for both radiation prostatectomy and radiation therapy is approximately 60-70%. Radiation therapy for the prostate is a continually evolving field as new and better technologies make it possible to deliver higher doses of targeted local radiation, sparing normal tissues with fewer local toxicities. A major advance in radiotherapy is the use of 3D-conformal radiotherapy. This allows treatment with an increased local dose of radiotherapy with promising early results. Advanced computer modeling has led to the development of intensely modulated radiation therapy (IMRT). This technique uses complicated tools that precisely control both the dose of radiation and the tissue targeted. **Nosokomiaka Chronika, 66, 166-174, 2004.**

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο προβληματισμός μας ως προς την επιλογή θεραπείας για τον εντοπισμένο καρκίνο του προστάτη θα πρέπει να αφορά όχι μόνο στα θεραπευτικά αποτελέσματα της ριζικής προστατεκτομής και ακτινοθεραπείας (είτε εξωτερικής είτε βραχυθεραπείας), αλλά και στην πιθανή νοσηρότητα που συνοδεύει εκάστη εξ αυτών των θεραπευτικών μεθόδων. Η 5ετής επιβίωση – άνευ νόσου – τόσο για τη ριζική προστατεκτομή, όσο και για την ακτινοθεραπεία, είναι περίπου 60-70%. Η ακτινοθεραπεία του προστάτη είναι ένα συνεχές αναπτυσσόμενο κεφάλαιο της θεραπευτικής, καθώς καινούργιες και καλύτερες τεχνολογικές λύσεις είναι δυνατόν να χορηγήσουν υψηλότερες δόσεις ακτινοβολίας στον ακριβέστερα σχεδιασμένο στόχο, προφυλάσσοντας συγχρόνως τους φυσιολογικούς ιστούς και ελαττώνοντας τη νοσηρότητα εξ αυτών. Μία μεγάλη πρόοδος στην ακτινοθεραπεία είναι η χρησιμοποίηση της Τρισδιάστατης Σύμμορφης Ακτινοθεραπείας. Αυτή η μέθοδος επιτρέπει τη χορήγηση υψηλών δόσεων ακτινοβολίας και τα αρχικά αποτελέσματά της είναι πολύ ενθαρρυντικά. Υψηλής τεχνολογίας λογισμικά συστήματα οδήγησαν επίσης στην ανάπτυξη και εφαρμογή στην εντόνως (υψηλών δόσεων) διαμορφούμενη ακτινοθεραπεία (IMRT). Αυτή η τεχνική χρησιμοποιεί πολύπλοκους μηχανισμούς με τη βοήθεια υπολογιστικών συστημάτων που επιτυγχάνει με μεγάλη ακρίβεια, τόσο τη χορήγηση επιλεγμένης δόσης ακτινοβολίας, όσο και την ακριβή στόχευση των υπό θεραπεία ιστών. **Νοσοκ. Χρονικά, 66, 166-174, 2004.**

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Τα τελευταία είκοσι χρόνια έχουν αυξηθεί σημαντικά, σε ολόκληρο τον κόσμο, τα περιστατικά με καρκίνο του προστάτη (ΚΠ).

Ο ΚΠ είναι μία από τις κυριότερες αιτίες νοσηρότητας αλλά και θνησιμότητας μεταξύ των ασθενών που πάσχουν από κάποιας μορφής καρκίνο.

Ο ΚΠ είναι ο πιο συνηθής καρκίνος που διαγιγνώσκεται στους άνδρες (αφορά το 40% περίπου όλων των καρκίνων στους άνδρες) και είναι πλέον η δεύτερη αιτία θανάτου από καρκίνο στους άνδρες στις Η.Π.Α. Υπολογίζεται ότι 220.000 νέες περιπτώσεις αναμένεται να διαγνωστούν στις Η.Π.Α. μέσα στο 2003 (1).

Στη Μεγάλη Βρετανία διαγιγνώσκονται 22.000 περίπου νέες περιπτώσεις τον χρόνο ενώ 10.000 αναμένεται να είναι οι θάνατοι εις τρόπον ώστε να είναι η τρίτη αιτία θανάτου σε ασθενείς με καρκίνο μετά από εκείνους του πνεύμονος και του παχέος εντέρου (2).

Παρουσιάζεται κυρίως σε άνδρες 65 ετών και άνω με μέσο όριο ηλικίας στη διάγνωση τα 72 χρόνια, ενώ είναι σπάνιος στους άνδρες κάτω των 40 ετών. Υπάρχουν σημαντικές διαφορές στις διάφορες εθνότητες λαών ως προς τη συχνότητα εμφάνισης του ΚΠ με πλέον υψηλή εκείνη των μαύρων της Αμερικής και χαμηλότερη των Ιαπώνων.

Παρά το γεγονός ότι η πρόωμη διάγνωσή του πιστεύεται ότι είναι δυνατόν να βελτιώσει αξιόλογα την επιβίωση των ασθενών, εν τούτοις σε ένα μεγάλο αριθμό των περιπτώσεων, ατυχώς, οι ασθενείς παρουσιάζονται ήδη με τοπικά προχωρημένη νόσο ή έχουν αναπτύξει ακόμη και μεταστάσεις.

ΚΛΙΝΙΚΗ ΕΙΚΟΝΑ

Οι ασθενείς οι οποίοι έχουν εντοπισμένο (αρχικό) καρκίνο του προστάτη (ΚΠ) είναι συνήθως ασυμπτωματικοί. Η διάγνωση της νόσου είτε τίθεται τυχαίως μετά από έλεγχο του ασθενούς για καλοήγη υπερτροφία του προστάτη, είτε επίσης σαν τυχαίο εύρημα μετά από ένα προκαθορισμένο έλεγχο του PSA. Ένας ΚΠ σταδίου Α ή Β είναι επίσης δυνατόν να διαγνωσθεί μετά από μία διουρηθρική αφαίρεση τμήματος προστάτη λόγω καλοήθους υπερτροφίας.

Ασθενείς με ευμεγέθη όγκο μπορεί να παρουσιάσουν συχνουρία, νυκτουρία ή δυσουρία λόγω πίεσης και απόφραξης της ουρήθρας. Αντίθετα, περιοδική αιματουρία ή ακόμη και σπερματοουρία είναι εντελώς σπάνιο γεγονός στα αρχικά στάδια.

ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ

Για να τεθεί η διάγνωση και να γίνει εν συνεχεία η απαραίτητη σταδιοποίηση της νόσου, αναγκαίο είναι να ληφθεί πλήρες ιστορικό, να γίνει κλινική εξέταση και κυρίως προσεκτική δακτυλική εξέταση του προστάτη. Σε ένα ποσοστό περίπου 50% των όζων που ψηλαφούνται, κατά τη δακτυλική εξέταση, αποδεικνύεται ότι είναι κακοήθεις. Η με βελόνη βιοψία του προστάτη είτε διά του περινέου ή ακόμη καλύτερα καθοδηγούμενη από εξέταση με διορθικό υπερηχο παραμένει η κύρια και τελική διαγνωστική μέθοδος.

Ένας πλήρης διαγνωστικός έλεγχος περιλαμβάνει τις εξής εξετάσεις (Πίνακας 1).

ΠΡΟΓΝΩΣΤΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ

Διακρίνονται σε εκείνους που έχουν άμεση σχέση με τον ίδιο τον όγκο και σε εκείνους που έχουν σχέση με τον ξενιστή (ασθενή).

- Οι κύριοι προγνωστικοί παράγοντες φαίνεται ότι είναι το προθεραπευτικό PSA, η διαφοροποίηση των κυττάρων (grade) και το στάδιο της νόσου.
- Σε συνδυασμό πάντοτε με τα ανωτέρω, ο DNA πλοειδισμός φαίνεται ότι έχει ιδιαίτερη προγνωστική σημασία. Εικόνα DNA ανευπλοειδισμού συνοδεύεται συνήθως με πλέον επιθετικούς όγκους.
- Υπερέκθεση στο γονίδιο p53 μπορεί να συνοδεύεται από μειωμένη ανταπόκριση στην ακτινοβολία.

ΠΙΝΑΚΑΣ 1. Διαγνωστικός έλεγχος για καρκίνο του προστάτη

Κλινικός έλεγχος:

- Λήψη ιστορικού
- Κλινική εξέταση
- Δακτυλική εξέταση

Εργαστηριακός έλεγχος:

- Αιματολογικός
- Βιοχημικός
- PSA
- Προστατικό κλάσμα οξ.φωσφατάσης (PAP)

Απεικονιστικός έλεγχος:

- Διορθικό υπερηχογράφημα
- Αξονική τομογραφία κοιλίας και πυέλου
- Μαγνητική τομογραφία
- Ραδιοϊσοτοπικός έλεγχος

Βιοψία:

- Διορθική
- Περινεϊκή

ΘΕΡΑΠΕΙΑ ΣΤΗΝ ΕΝΤΟΠΙΣΜΕΝΗ ΝΟΣΟ

Χρησιμοποιώντας τον όρο «εντοπισμένη νόσος» εννοούμε τις περιπτώσεις εκείνες που ο ΚΠ παραμένει σε έναν ή και τους δύο λοβούς του προστάτη, που μπορεί να έχει διηθήσει την κάψα (T3a) ή ακόμη και τις σπερματοδόχους ληκύθους (T3b) χωρίς όμως να έχει δημιουργήσει μεταστάσεις στους λεμφαδένες ή άλλα όργανα. Πρόκειται δηλαδή για στάδια T1 ως και T3NoMo.

Οι συνήθεις μέθοδοι θεραπείας είναι η ριζική προστατεκτομή (ΡΠ), η ριζική ακτινοθεραπεία είτε σαν εξωτερική, είτε σαν βραχυθεραπεία και η απλή παρακολούθηση του ασθενούς.

Η απόφαση επιλογής θεραπείας θα γίνει αφού λάβουμε υπόψη όλους τους κινδύνους, αλλά και τα πλεονεκτήματα που περικλείουν τόσο η ΡΠ όσο και η ΑΘ (εξωτερική ή βραχυθεραπεία). Θα πρέπει να ληφθεί υπόψη ότι η πενταετής επιβίωση χωρίς νόσο τόσο για τη ΡΠ όσο και για την ΑΘ κυμαίνεται μεταξύ 60% και 70%. Σημαντικά κριτήρια που θα πρέπει να επηρεάσουν την απόφασή μας είναι η ηλικία και η γενική κατάσταση του ασθενούς και κυρίως η επιθυμία του ασθενούς ως προς την επιλογή της μιας ή της άλλης θεραπευτικής αντιμετώπισης.

Για τον λόγο αυτό θα πρέπει να εκτεθούν στον ασθενή και εάν είναι δυνατόν και στη σύντροφό του, με κάθε ειλικρίνεια όλα τα προτερήματα, αλλά, κυρίως, και τα μειονεκτήματα της μιας ή της άλλης θεραπείας εις τρόπον ώστε η τελική απόφαση να βαρύνει αποκλειστικά τον ίδιο.

Σε μεγάλης ηλικίας ασθενείς που έχουν συνήθως καρκίνο με βραδεία εξέλιξη, το ενδεχόμενο απόφασης να παρακολουθείται ο ασθενής χωρίς καμία θεραπεία, θα πρέπει σοβαρά να ληφθεί υπόψη.

ΡΙΖΙΚΗ ΠΡΟΣΤΑΤΕΚΤΟΜΗ

Σε ένα μεγάλο αριθμό ασθενών με αρχικό στάδιο νόσου, η ΡΠ παραμένει η θεραπεία εκλογής. Η ΡΠ γνωστή και ως υπερηβική προστατεκτομή είναι η σύγχρονη συνήθης εγχείρηση, η οποία μάλιστα συνδυάζεται και με τη διατήρηση των νεύρων του ανελκτικός μυός, μέθοδος η οποία αυξάνει την πιθανότητα της διατήρησης τόσο της σεξουαλικής ικανότητας απ' ενός, όσο και την αποφυγή ακράτειας απ' ετέρου. Η επέμβαση γίνεται με μία διάμεσο χαμηλή διατομή που μπορεί συγχρόνως να επιτρέπει την αφαίρεση των πυελικών (υπογαστρίων και θυρεοειδούς τμήματος) λεμφαδένων. Οι έξω λαγόνιοι λεμφαδένες συνήθως δεν αφαιρούνται και τούτο για να αποφεύγεται ο κίνδυνος ενός μελλοντικού οιδήμα-

τος των κάτω άκρων. Η διατήρηση του νεύρου επιτρέπει επίσης και τη διατήρηση των αγγείων και νεύρων των πτυχών που περικλείουν τον προστάτη. Σε περίπτωση που υπάρχει διήθηση και καθήλωση των περι τον προστάτη ιστών ή σκλήρυνση της πλάγιας πυελικής περιτονίας, τότε οι νευρο-αγγειωματώδεις πτυχές αφαιρούνται.

Η αφαίρεση των πυελικών λεμφαδένων φαίνεται ότι δεν προσθέτει στην επιβίωση των ασθενών, πιθανότατα όμως να συμβάλλει στη συλλογή πληροφοριών ως προς την πρόγνωση του καρκίνου. Φαίνεται ότι είναι ιδιαίτερα χρήσιμη σε υψηλού κινδύνου ασθενείς ή σε ασθενείς με τοπικά προκεχωρημένη νόσο στους οποίους η χρησιμοποίηση ορμονοθεραπείας είναι αναπόφευκτη, ενώ πιθανότατα είναι άνευ αντικειμένου στους ασθενείς χαμηλού κινδύνου.

Τα τελευταία χρόνια ένας μεγάλος αριθμός ουρολόγων καταφεύγει σε λαπαροσκοπική τεχνική για την αφαίρεση των λεμφαδένων. Η ανεύρεση διηθημένων λεμφαδένων θα πρέπει να απομακρύνει τον ασθενή από την εγχείρηση και αντίθετα να τον οδηγήσει σε συνδυασμό φαρμακευτικής αγωγής και ΑΘ.

Η ΡΠ είναι η συνήθης θεραπεία εκλογής στις περιπτώσεις εκείνες που η νόσος περιορίζεται στον προστάτη και λιγότερο εκλεκτική όταν η νόσος είναι τοπικά εκτεταμένη με διήθηση της κάψας ή υψηλό >7 Gleason.

Η ΡΠ ουδέποτε συνιστάται στις περιπτώσεις όπου η νόσος έχει δημιουργήσει μεταστάσεις είτε στους λεμφαδένες είτε σε άλλη περιοχή.

Η κλασική ΡΠ παραμένει η χειρουργική μέθοδος εκλογής της νόσου αν και τελευταίως έχουν παρουσιασθεί πρώιμες εργασίες με λαπαροσκοπική προσέγγιση. Η νέα τεχνική παρουσιάζει σημαντικά στοιχεία ευκολίας τα δε αρχικά αποτέλεσμα παρουσιάζονται εφάμιλλα με εκείνα της κλασικής χειρουργικής επέμβασης.

ΑΚΤΙΝΟΘΕΡΑΠΕΙΑ

Η ακτινοθεραπεία σαν κύρια μέθοδος θεραπείας πρωτοεμφανίσθηκε το 1915 στο Johns Hopkins University από τους Young και Frontz (3). Η θεραπεία συνίστατο σε εφαρμογή ραδιενεργών πηγών ραδίου στην ουρήθρα, την ουροδόχο κύστη και το ορθό, κοιλότητες που είχαν άμεση επαφή με τον προστάτη.

Όμως τόσο τα ανεπαρκή και χαμηλής διεισδυτικότητας μηχανήματα της εποχής, όσο και η αναξιόπιστη δοσιμετρία έφεραν γρήγορα σε μειονεκτική θέση την ακτινοθεραπεία εν σχέσει με τη χειρουργική αφαίρεση. Η ακτινοθεραπεία πέρασε σε αφάνεια ώσπου

περί τα τέλη της δεκαετίας του '50 ο Bagshaw από το Stanford University χάρη και στους πρωτοεμφανιζόμενους Γραμμικούς Επιταχυντές έδωσε το έναυσμα για νέα προσπάθεια της ΑΘ. Η πρόοδος στην τεχνολογία των ακτινοθεραπευτικών μηχανημάτων συνοδευόμενη από αντίστοιχη βελτίωση στη δοσιμετρία, αλλά και τον ακριβέστερο σχεδιασμό της θεραπείας άλλαξε τη φιλοσοφία της θεραπείας.

Διάφορες τεχνικές ΑΘ έχουν χρησιμοποιηθεί κατά το παρελθόν. Κατ' αρχήν εφαρμόστηκαν δύο παράλληλα και αντίθετα πεδία (προσθιοπίσθιο και οπισθοπρόσθιο) και εν συνεχεία προστέθηκαν και δύο πλάγια. Η τεχνική έμεινε γνωστή ως box technique διότι περιέκλειε σαν κουτί τον προστάτη. Σε ορισμένα κέντρα χρησιμοποιείτο και η περιστροφική τεχνική όπου η κεφαλή του μηχανήματος περιστρέφετο ή κατά 120 μοίρες ή και πλήρως κατά 360 μοίρες γύρω από τον ασθενή. Τα τελευταία χρόνια άρχισε να εφαρμόζεται η τριών διαστάσεων σύμμορφος ακτινοθεραπεία (3D-ΣΑΘ) και εντελώς πρόσφατα, αλλά σε λίγα μόνο κέντρα διεθνώς, προσετέθη η διαμορφούμενης έντασης ακτινοβολία (intensity modulated radiation therapy – IMRT).

Όποια τεχνική πάντως και να εφαρμοσθεί θα πρέπει να έχουμε υπόψη ότι σε ασθενείς που υποβάλλονται σε προθεραπευτική ορμονοθεραπεία θα πρέπει να αρχίσουμε την ΑΘ μετά την πάροδο τουλάχιστον 2 μηνών εις τρόπον ώστε να δοθεί χρόνος να μικρύνει σε μέγεθος ο προστάτης και επομένως το πεδίο θεραπείας να σχεδιασθεί μικρότερο. Επίσης σε ασθενείς οι οποίοι πρόσφατα υπεβλήθησαν σε διουρητική αφαίρεση προστάτη λόγω αποφρακτικών φαινομένων, θα πρέπει να μεσολαβεί διάστημα 4 εβδομάδων πριν από την έναρξη της ΑΘ, με σκοπό να ελαττωθούν, όσο είναι δυνατό, δυσάρεστες παρενέργειες όπως είναι η ακράτεια ούρων ή η ανάπτυξη ουρηθρικών συμφύσεων.

ΡΑΔΙΟΒΙΟΛΟΓΙΑ

1. Γενικά

Η Ραδιοβιολογία είναι η επιστήμη που ασχολείται με την ανταπόκριση των φυσιολογικών ιστών και των νεοπλασματικών κυττάρων στην Ακτινοθεραπεία. Επί μέρους ασχολείται με την ανάλυση της επιβίωσης των κυττάρων μετά από ακτινοθεραπεία, τη δόση ανταπόκρισης, τον ρυθμό δόσης, την κλασματοποίηση, την οξυγόνωση και θερμοκρασία των κυττάρων. Συσχετίζοντας όλες αυτές τις παραμέτρους είναι δυνατόν να προβλέψουμε κατά κάποιο τρόπο τις οξείες και χρόνιες παρενέργειες των ιστών από την ΑΘ.

2. Ραδιοβιολογία προστάτη

Η συνηθέστερη ημερήσια δόση ακτινοβολίας στον ΚΠ είναι 1,8 με 2,0 Gy, δόση η οποία χορηγείται συνεχώς 5 ημέρες την εβδομάδα για ένα διάστημα 7-8 εβδομάδων. Η συνολική δόση ανέρχεται, ανάλογα με τον ασθενή, το στάδιο της νόσου και την τεχνική θεραπείας, σε 65-80 Gy. Η θεραπεία σχεδιάζεται με κύριο σκοπό την ανεύρεση της χρυσής τομής μεταξύ του επιθυμητού τοπικού ελέγχου της νόσου και των όσο το δυνατόν μικρότερου βαθμού παρενεργειών από τους φυσιολογικούς ιστούς.

Αν και η βιολογικά ισοδύναμη δόση ακτινοβολίας μπορεί να χορηγηθεί σε πολύ μικρότερο χρονικό διάστημα (3 με 6 εβδομάδες) εν τούτοις επειδή τούτο μπορεί να γίνει μόνο με τη χορήγηση πολύ υψηλότερης του συνήθους ημερήσιας δόσης υπάρχει κίνδυνος σοβαρών παρενεργειών από τους γειτονικούς ιστούς, για τον λόγο αυτό υψηλές ημερήσιες δόσεις (άνω των 20 Gy) ακτινοβολία δεν χρησιμοποιούνται στη συνήθη θεραπεία ΚΠ, εκτός και εάν υπάρχει μελέτη με κάποιο ερευνητικό πρωτόκολλο.

Οι φυσιολογικοί ιστοί που επηρεάζονται κατ' εσχάτην σε μια ΑΘ του προστάτη είναι η ουροδόχος κύστη, η προστατική μοίρα της ουρήθρας, η βάση του πέους και το ορθό. Η προσοχή μας πρέπει να εστιασθεί, ώστε οι ιστοί αυτοί να λάβουν όσο είναι δυνατόν τη μικρότερη ακτινική δόση. Είναι γενικά αποδεκτό ότι δόση 60 Gy σε ολόκληρο το ορθό έχει σαν αποτέλεσμα να εμφανισθούν σοβαρές παρενέργειες σε ποσοστό 5% των περιπτώσεων αν και πιστεύεται ότι μικρό τμήμα του ορθού είναι δυνατόν να ακτινοβοληθεί και με πολύ μεγαλύτερη δόση.

Με την ανάπτυξη των υπολογιστικών συστημάτων και τον σχεδιασμό 3 διαστάσεων σύμμορφης θεραπείας όλο και μικρότερα τμήματα φυσιολογικών ιστών περιλαμβάνονται στο πεδίο θεραπείας ώστε να επιτρέπεται η χορήγηση υψηλότερων δόσεων ακτινοβολίας. Είναι δε γνωστό ότι θεωρητικά υψηλότερες δόσεις ακτινοβολίας οδηγούν σε καλύτερο τοπικό έλεγχο της νόσου.

Εάν στην πράξη, οι υψηλότερες χορηγούμενες δόσεις αντανακλούν σε καλύτερα κλινικά αποτελέσματα όπως η συνολική επιβίωση ή η ελεύθερης νόσου επιβίωση είναι θέματα που συζητούνται ακόμη.

Ο ΚΠ είναι ένας από τους πλέον αργά αναπτυσσόμενους όγκους του ανθρώπου. Ο ρυθμός ανάπτυξης του ΚΠ συνδέεται άμεσα με την κατά Gleason κατηγορία. Ασθενείς με υψηλό Gleason (8-11) παρουσιάζουν ταχύτερο πολλαπλασιασμό του όγκου απ' ότι ασθενείς με Gleason κάτω του 6. Η πλέον συνηθής μορφή ΚΠ είναι εκείνη της χαμηλής κακοήθειας

και επομένως αργής ανάπτυξης.

Από τεχνικής πλευράς το γεγονός αυτό οδηγεί στη σκέψη ότι η υπερκλασματοποίηση της ακτινοθεραπείας (δηλαδή δύο θεραπείες την ημέρα), τεχνική η οποία έχει αποδειχθεί ότι είναι ωφέλιμη για τους ταχέως αναπτυσσόμενους όγκους, είναι πολύ πιθανό να μην έχει ωφέλιμη εφαρμογή στους βραδέως αναπτυσσόμενους όγκους του προστάτη.

ΤΡΙΣΔΙΑΣΤΑΤΗ ΣΥΜΜΟΡΦΟΣ ΑΚΤΙΝΟΘΕΡΑΠΕΙΑ (3Δ-ΣΑΘ)

Με την κλασική ΑΘ είχε αποδειχθεί ότι παρά τις φιλότιμες προσπάθειες ακτινοφυσικών και θεραπειών, συχνά το πεδίο θεραπείας δεν περιελάμβανε όλους τους ιστούς που θεωρητικά θα έπρεπε να ακτινοβοληθούν και ότι επίσης υπήρχε μια μεγάλη απόκλιση ως προς την επιθυμητή χορηγούμενη δόση ακτινοβολίας, συνήθως μικρότερης, της τάξεως του $28 \pm 7\%$ (4).

Στην κλασική εξωτερική ΑΘ ο σχεδιασμός θεραπείας είναι απλός και αφορά τις δύο μόνο διαστάσεις του όγκου, η δε χορηγούμενη δόση ακτινοβολίας είναι μάλλον μικρή λόγω του φόβου των παρενεργειών από τους γειτονικούς ιστούς. Τα δύο αυτά μειονεκτήματα της κλασικής ΑΘ, αλλά και τα υψηλά ποσοστά τοπικών υποτροπών οδήγησαν στην ανάγκη όπως αναπτυχθεί τεχνική υψηλής ακρίβειας στη στόχευση του όγκου που και μεγαλύτερη δόση θα χορηγούσε τοπικά και συγχρόνως θα κάλυπτε τα επίμαχα γειτονικά όργανα από την ακτινική βλάβη. Η προσπάθεια επικεντρώθηκε κυρίως στη δημιουργία θεραπευτικού πλάνου που να αφορά και τις τρεις διαστάσεις του όγκου. Έτσι δημιουργήθηκε η Τριών Διαστάσεων Σύμμορφος Ακτινοθεραπεία (3Δ-ΣΑΘ).

Η όλη τεχνική υποστηρίζεται από υψηλής τεχνολογίας υπολογιστικό σύστημα προγραμματισμένο να χορηγεί την επιθυμητή υψηλή δόση ακτινοβολίας σε όλο το πεδίο-στόχο, ενώ συγχρόνως την ελαττώνει ή και την αποκλείει εντελώς στην περιφέρεια (και κατά τις τρεις διαστάσεις του όγκου) σύμφωνα με το σχέδιο θεραπείας του ακτινοθεραπευτή.

Για τον λόγο αυτό χρησιμοποιούνται τα νέα, ενσωματωμένα στον Γραμμικό Επιταχυντή διαφράγματα πολλαπλών φύλλων μολύβδου (multi-leaf collimator). Μέχρι τώρα τα διαφράγματα των επιταχυντών ήταν τεσσάρων φύλλων με αποτέλεσμα τα πεδία ακτινοβολίας να διαμορφώνονται μόνο τετράγωνα ή ορθογώνια. Με τα νέου τύπου διαφράγματα τα πεδία μπορούν να αποκτήσουν οποιοδήποτε σχήμα ανάλογα με το πλάνο θεραπείας που θέλει να χορηγήσει ο ακτινοθεραπευτής.

ΒΑΘΜΙΑΙΩΣ ΑΥΞΑΝΟΜΕΝΕΣ ΔΟΣΕΙΣ ΑΚΤΙΝΟΒΟΛΙΑΣ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΟΥΝΤΑΣ ΤΡΙΩΝ ΔΙΑΣΤΑΣΕΩΝ ΣΥΜΜΟΡΦΗΣ ΑΚΤΙΝΟΘΕΡΑΠΕΙΑΣ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑ

Η 3-διαστάσεων σύμμορφος ακτινοθεραπεία (3Δ-ΣΑΘ) άρχισε να χρησιμοποιείται στην ΗΠΑ ήδη από το 1988. Οι εργασίες από το Memorial Sloan-Kettering Cancer (MSKCC) αφορούσαν ασθενείς που το πεδίο θεραπείας τους περιελάμβανε τον προστάτη και τις σπερματοδόχους κύστες. Οι πυλαίοι λεμφαδένες δεν περιελαμβάνοντο, δεδομένου ότι είχε αποδειχθεί το άσκοπο μιας τέτοιας ακτινοβολίας η οποία ούτε βελτίωση στην επιβίωση προσέφερε (5), αλλά αντίθετα εγκυμονούσε κινδύνους από την υψηλή τοξικότητα μιας τέτοιας εκτεταμένης ακτινοβολίας.

Οι νέες τεχνικές που συνδυάζουν την τρισδιάστατη διαγνωστική απεικόνιση με τον επίσης τρισδιάστατο θεραπευτικό σχεδιασμό (three-dimensional treatment planning) είναι ικανές να σχεδιάσουν θεραπεία όπου και όλα τα επιθυμητά ανατομικά στοιχεία να περιλαμβάνονται και πληροφορίες για τη χορηγούμενη ακτινοβολία σε κάθε σημείο του σχεδιασμένου πεδίου να παρέχονται. Με τον τρόπο αυτό είναι πολύ εύκολο ανά πάσα στιγμή να γνωρίζουμε πόση δόση ακτινοβολίας λαμβάνουν οι πέριξ φυσιολογικοί ιστοί που περιλαμβάνονται στο πεδίο και ανάλογα αποκλείουμε ή όχι το συγκεκριμένο σημείο.

Διάφορες αναδρομικές εργασίες και κυρίως των Hanks και συν. (6) απέδειξαν ότι υπάρχει μια άμεση σχέση, όσον αφορά στον τοπικό έλεγχο της νόσου και της χορηγούμενης δόσης ακτινοβολίας. Σε μια σειρά 624 ασθενών με ΚΠ σταδίου C παρατήρησαν ότι η τοπική υποτροπή στα 7 χρόνια ήταν 36% για τους ασθενείς που έλαβαν 60-75 Gy, 32% για εκείνους που έλαβαν 65-70% Gy και 24% για εκείνους που έλαβαν 70% και πλέον. Εν τούτοις οι ασθενείς που έλαβαν υψηλή δόση 70 Gy και πλέον παρουσίασαν τουλάχιστον διπλάσιες μακροχρόνιες παρενέργειες από εκείνους που έλαβαν χαμηλότερη δόση, δηλαδή προσφέρουν καλύτερα αποτελέσματα, τουλάχιστον ως προς τον τοπικό έλεγχο της νόσου, όμως το γεγονός ότι ο προστάτης γειτνιάζει με ευαίσθητα όργανα, όπως η ουροδόχος κύστη και το ορθό, περιορίζει σημαντικά τη χορήγηση υψηλών δόσεων για τον φόβο ακριβώς σοβαρών παρενεργειών στη χρησιμοποιούμενη κλασική ΑΘ.

Η 3ΔΣΑΘ επιτρέπει όχι μόνον ακριβή εστίαση μιας υψηλής δόσης ακτινοβολίας και κατά τις τρεις διαστάσεις στα όργανα-στόχους, αλλά επίσης και τον αποκλεισμό φυσιολογικών ιστών ή οργάνων από το υψηλών δόσεων ακτινοβλούμενο πεδίο. Αυτή η τε-

χνική επιτρέπει την αύξηση της δόσης όγκου (tumor dose) σε επίπεδα αρκετά πιο υψηλά από εκείνα που μπορούσαμε να χορηγήσουμε με τις παλιές τεχνικές με επί πλέον κέρδος την ελάττωση των παρενεργειών. Το εάν αυτή η νέα τεχνική χορήγησης υψηλότερων δόσεων ακτινοβολίας είναι ικανή να επηρεάσει τη συγκεκριμένη αντοχή των προστατικών καρκινικών κυττάρων ερευνάται συνεχώς με διάφορες προοπτικές μελέτες χορήγησης όλων και υψηλότερων δόσεων, εις τρόπον ώστε να επιτευχθεί αφ' ενός η ανεύρεση της κυτταροκτόνου δόσης για τον καρκίνο και αφ' ετέρου η δόση αυτή να είναι ανεκτή για τους φυσιολογικούς ιστούς.

Ατυχώς, όσο και αν φαίνεται παράξενο, μέχρι σήμερα δεν έχουν γίνει προοπτικές, τυχαίοποιημένες μελέτες οι οποίες συγκρίνουν μεταξύ τους τη ριζική προστατεκτομή και τη σύγχρονη ΑΘ. Οσες έγιναν κατά το παρελθόν συνήθως είχαν σημαντικά λάθη στη μεθοδολογία τους και γενικά συνέκριναν περιπτώσεις με διαφορετικά στάδια της νόσου και κυρίως ασθενείς με διαφορετικούς προγνωστικούς παράγοντες (PSA, Gleason, ηλικία κ.λπ).

Η πιο πρόσφατη εργασία που συγκρίνει κατά κάποιο τρόπο τα αποτελέσματα των δύο κυριότερων τοπικών θεραπειών (εγχείρηση και εξωτερική ακτινοθεραπεία) σε εντοπισμένο ΚΠ είναι αυτή από το Cleveland Clinic Foundation (7).

Η εργασία αναφέρεται στα αποτελέσματα 1685 ασθενών με εντοπισμένο ΚΠ, οι οποίοι αντιμετώπισθηκαν από το 1990 έως το 1998 με ΡΠ ή ριζική ακτινοθεραπεία μετά από δική τους επιλογή.

Η εργασία έχει ουσιαστικά δύο σκέλη μελέτης. Στο πρώτο σκέλος γίνεται σύγκριση των χειρουργικών μόνο αποτελεσμάτων μεταξύ δικής της σειράς και άλλων χειρουργικών αποτελεσμάτων από το John Hopkins (8), το Πανεπιστήμιο του Washington (9) και το Baylor College (10). Σαν κύριο κριτήριο ελήφθη η ελεύθερη νόσου επιβίωση των ασθενών (χωρίς αύξηση του PSA). Στο δεύτερο σκέλος η σύγκριση αφορούσε ασθενείς οι οποίοι κατετάγησαν σε ομάδες όπως ευνοϊκής πρόγνωσης, διάμεσης πρόγνωσης και δυσμενούς πρόγνωσης, ανάλογα με το αρχικό PSA, την ιστολογική κλίμακα κατά Gleason και το στάδιο της νόσου.

Η τελική απόφαση της επιλογής θεραπείας των ασθενών αφορούσε εντελώς τους ίδιους οι οποίοι και επέλεξαν θεραπεία ανάλογα με την επιθυμία τους. Η χορήγηση ΑΘ ήταν υψηλών δόσεων.

Μετά από παρακολούθηση 8 ετών τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η επιβίωση χωρίς άνοδο του PSA ήταν παρόμοια για τις τρεις, βάσει των ιδίων προγνωστικών χαρακτηριστικών, ομάδες ασθενών, είτε

είχαν χειρουργηθεί, είτε είχαν υποβληθεί σε εξωτερική ΑΘ υψηλών δόσεων.

Η χορήγηση υψηλών δόσεων ακτινοβολίας είναι πολύ σημαντική στη σύγχρονη ΑΘ η αποτελεσματικότητα δε της οποίας επιβεβαιώνεται συνεχώς αν λάβουμε υπόψη και τις εργασίες των Hanks και συν. (11) του Zelefsky και συν. (12) από το Memorial Sloan Kettering της Ν.Υόρκης και του Pollack και συν. (13) από το MD Anderson του Houston. Οι χορηγούμενες πλέον δόσεις ακτινοβολίας είναι άνω των 72 Gy και φθάνουν ακόμη και τα 90 Gy σε επιλεγμένες περιπτώσεις όπως αυτές του Χία και συν. από το San Francisco. Οι παρενέργειες από τη θεραπεία είναι απόλυτα αποδεκτές και συγκρίσιμες με αυτές της ριζικής προστατεκτομής.

ΜΕΤΕΓΧΕΙΡΗΤΙΚΗ ΑΚΤΙΝΟΘΕΡΑΠΕΙΑ

Εχει αποδειχθεί ότι μετά από ΡΠ για εντοπισμένο ΚΠ (στάδια Α ή Β, T1 ή T2) πολλές φορές τα εγχειρητικά όρια είναι θετικά ή υπάρχει μικροσκοπική διήθηση των σπερματοδόχων κύστεων. Και τα δύο μετεγχειρητικά ιστολογικά ευρήματα έχουν δυσμενή πρόγνωση ως προς την επιβίωση των ασθενών.

Τόσο ο Catalona (9), όσο και ο Gibbons (14) αναφέρουν ότι 10% των χειρουργημένων ασθενών σταδίου A2 (T1b) και 18% των ασθενών με στάδιο B1 (T2a) εμφανίζουν θετικά ιστολογικά όρια. Τα αντίστοιχα ποσοστά στο στάδιο B2 (T2b) ανέρχονται στο 55% περίπου των ασθενών. Τα διηθημένα από καρκίνο χειρουργικά όρια θεωρούνται ότι είναι ένα σαφώς αρνητικό προγνωστικό στοιχείο, ακόμη μεγαλύτερο και από τη διήθηση της κάψας και προδιαθέτουν την ανάπτυξη απομεμακρυσμένων μεταστάσεων.

Αλλά και η μικροσκοπική διήθηση των σπερματοδόχων κύστεων θεωρείται επίσης αρνητικό προγνωστικό στοιχείο, δεδομένου ότι παρουσιάζει μεγαλύτερη συχνότητα τοπικών υποτροπών και μεταστατικών διηθήσεων με αποτέλεσμα τη σαφώς μικρότερη επιβίωση των ασθενών (15). Η προσθήκη μετεγχειρητικής ΑΘ φαίνεται ότι είναι χρήσιμη σε μια προσπάθεια να επιτευχθεί τοπικός έλεγχος της νόσου καταστρέφοντας τόσο τα μικροσκοπικά υπολείμματα του προστάτη και των περιπροστατικών ιστών, όσο και των επιχωρίων λεμφαδένων με τελικό αποτέλεσμα λιγότερες μεταστάσεις και μεγαλύτερη επιβίωση (16).

Μερικοί συγγραφείς όπως ο Auscher (17) υποστηρίζουν ότι ιστολογικά ευρήματα όπως, πτωχής διαφοροποίησης μορφολογία κυττάρων, διήθηση των σπερματοδόχων κύστεων και θετικά όρια εκτομής, είναι σημαντικά στοιχεία για να φοβόμαστε τοπικές

υποτροπές μετά τη ΡΠ. Ο Walsh (18) επίσης πιστεύει ότι είναι πολύ λογικό να χορηγήσουμε μετεγχειρητική ΑΘ στους ασθενείς που παρουσιάζουν θετικά χειρουργικά όρια, κυρίως δε σε αυτούς με διήθηση της ουρήθρας ή του αυχένα της ουροδόχου κύστεως.

Από ακτινοθεραπευτικής σκοπιάς εάν θα πρέπει να ακτινοβολούμε και τους πυελικούς λεμφαδένες εκτός από την κοίτη του προστάτη, δεν έχει πλήρως αποσαφηνιστεί.

Προσωπικά, εάν υπάρχει διήθηση των σπερματοδόχων κύστεων ή της βάσεως του προστάτη, ακτινοβολώ την κοίτη του προστάτη και τους πυελικούς λεμφαδένες μ' ένα πεδίο με δόση 45 Gy και εν συνεχεία δίνω συμπληρωματική δόση μόνο στη θέση του προστάτη πάντοτε με τεχνική 3 διαστάσεων σύμμορφης ακτινοβολίας. Αντίθετα, εάν μόνον η κορυφή του προστάτη είναι διηθημένη, ακτινοβολούμε μόνο την κοίτη του προστάτη με δόση που κυμαίνεται από 60-65 Gy.

ΕΞΩΤΕΡΙΚΗ ΑΚΤΙΝΟΘΕΡΑΠΕΙΑ – ΕΠΙΠΛΟΚΕΣ

Όταν χρησιμοποιούμε τεχνικές κλασικής ΑΘ οι παρενέργειες, συνήθως, είναι ήπιες και σχετικά καλά ανεκτές από τον ασθενή.

Τα οξέα συμπτώματα που εμφανίζονται είτε είναι από το ουροποιητικό, είτε από το ορθό. Συνήθως αρχίζουν να παρουσιάζονται κατά την 3^η εβδομάδα της ΑΘ, ενώ υποχωρούν μερικές ημέρες ή και εβδομάδες μετά το τέλος της θεραπείας.

Γενικά, το 60% περίπου των ασθενών μας θα παρουσιάσει κατά τη διάρκεια της θεραπείας τους μια κάποια οξεία κατάσταση, είτε από το ορθό, είτε από την ουροδόχο κύστη, είτε και από τα δύο γειτονικά στον προστάτη όργανα. Οι παρενέργειες είναι μάλλον βαθμού 2 και 3 και οι συνηθέστερες εξ αυτών είναι ο τεινεσμός και ο ερεθισμός του δακτυλίου και του βλεννογόνου του κάτω τμήματος του ορθού και η διάρροια. Το τελευταίο συμβαίνει όταν το πεδίο ακτινοβολίας είναι μεγαλύτερο του συνήθους διότι ακτινοβολούμε συγχρόνως και τους πυελικούς λεμφαδένες.

Σπανίως είναι δυνατόν να παρουσιασθεί και αιμορραγία η οποία οφείλεται σε μία παροδική εντερο-πρωκτίτιδα. Η αντιμετώπιση των συμπτωμάτων γίνεται ή με μικρή διακοπή της θεραπείας ή με ελάττωση της ημερήσιας δόσης της ακτινοβολίας ή με τη χορήγηση φαρμάκων (Λοπαραμίδης ή σκευάσματα καολίνης και πεκτίνης).

Τα κυριότερα συμπτώματα από το ουροποιητικό οφείλονται κυρίως στην κυστεο-ουρηθρίτιδα και οι ασθενείς μας παραπονούνται για δυσουρία, συχνου-

ρία ή ξαφνική και έντονη επιθυμία ούρησης που πολλές φορές οδηγεί σε απώλεια ούρων. Μπορεί να υπάρχει συγχρόνως μικροσκοπική αιματουρία ή να παρουσιασθεί έντονη μακροσκοπική αιματουρία.

Σε όλες τις περιπτώσεις πάντως καλό είναι να γίνεται εξέταση και καλλιέργεια ούρων όπως και αντιβιογράμματα για την καλύτερη αντιμετώπιση της φλεγμονής. Στον ασθενή συστήνεται όπως λαμβάνει άφθονα υγρά – τουλάχιστον 2 λίτρα νερού ημερησίως – και του χορηγούμε αντιφλεγμονώδη και ελαφρά αντισπασμωδικά.

Πρωκτίτιδα και ενοχλήσεις από το ορθό μπορούν να αντιμετωπισθούν με τη χορήγηση είτε υποθέτων που περιέχουν βισμούθιο ή οξείδιο του ψευδαργύρου ή κάνοντας χρήση υποκλυσμού με υδροκορτιζόνη.

Η συχνότητα των χρονίων παρενεργειών που είναι πιο σοβαρές, ευτυχώς, είναι μικρότερη. Οι χρόνιες παρενέργειες παρουσιάζονται συνήθως 6 μήνες μετά το τέλος της θεραπείας.

Αν και σπάνια, μερικές από τις χρόνιες παρενέργειες είναι τόσο σοβαρές που χρειάζονται χειρουργική επέμβαση και αποκατάσταση της βλάβης.

Σε δύο μεγάλες σειρές ασθενών (μελέτες της RTOG) (19) έγινε ανάλυση 1.020 ακτινοβοληθέντων με κλασικές τεχνικές, ασθενών, η οποία απέδειξε ότι η συχνότητα εμφάνισης χρονίων προβλημάτων από την κύστη δηλ. αιματουρία, χρονία κυστίτιδα, συμφύσεις ουρήθρας ή ρίκνωση της ουροδόχου κύστεως που είχαν ανάγκη νοσηλείας ήταν της τάξεως του 7,3% των περιπτώσεων και μόνον 0,5% είχαν την ατυχία μίας μείζονος χειρουργικής επέμβασης. Αξιοσημείωτο όμως είναι, και τούτο πρέπει σοβαρά να ληφθεί υπόψη, ότι περίπου το 50% και πλέον των ασθενών οι οποίοι είχαν χρόνια ουρολογικά προβλήματα πριν από την έναρξη ΑΘ παρουσιάζουν ήδη συμφύσεις και ρίκνωση της ουρήθρας και οι περισσότεροι, εάν όχι όλοι εξ αυτών, είχαν υποβληθεί σε μία ή περισσότερες κυστεοκοοπήσεις ή σε προηγούμενη διουρηθρική αφαίρεση τμήματος του προστάτη λόγω καλοήθους υπερπλασίας πριν από την έναρξη της ακτινοθεραπείας.

Τα συνήθη χρόνια προβλήματα από το ορθό ήσαν πρωκτίτιδα, συμφύσεις και εξελκώσεις του ορθού και του απευθυσμένου, αιμορραγία λόγω των εξελκώσεων και τέλος χρόνια διάρροια. Το 3,3% των ασθενών είχε ανάγκη μιας νοσηλείας για διάγνωση και θεραπεία, ενώ το 0,6% των ασθενών παρουσίασε μεγαλύτερο πρόβλημα, όπως απόφραξη ή διάτρηση του ακτινοβοληθέντος τμήματος του εντέρου.

Νοσηρότητα με επιπλοκές που ατυχώς οδήγησαν στο θάνατο ήταν σπάνιες (0,2%) (19).

Η σεξουαλική λειτουργία διτηρήθη στο 73-82% των ασθενών μετά από παρακολούθηση 12-15 μηνών. Σε μία υποομάδα ασθενών που πριν από την ΑΘ παρουσίαζε οριακή σεξουαλική ικανότητα μόνο το 43% εξ αυτών παρέμεινε ικανό για στύση μετά τη θεραπεία (20). Γενικά η ικανότητα στύσης φαίνεται ότι βαθμιαία ελαττώνεται με την πάροδο του χρόνου και μόνον το 50% των ασθενών μας παραμένει ικανό 7 χρόνια μετά την ΑΘ.

Χρησιμοποιώντας τη δύο διαστάσεων ΑΘ η συνολική συχνότητα εμφάνισης χρόνιων παρενεργειών, τόσο από το ουροποιητικό, όσο και από το ορθό κυμαίνεται από 3 έως 5% όσον αφορά τις σοβαρές επιπλοκές και 7 με 10% τις μετρίου βαθμού (21). Να σημειωθεί ότι οι αναφερόμενες παρενέργειες σε ασθενείς που υπεβλήθησαν σε 3 διαστάσεων-σύμμορφο ακτινοθεραπεία (3Δ-ΣΑΘ) είναι σημαντικά χαμηλότερες (22).

Γενικά η έκταση του πεδίου ακτινοβολίας, η συνολική χορηγηθείσα δόση, η τεχνική ΑΘ αλλά και η προηγηθείσα εγχείρηση παίζουν σημαντικό ρόλο ως προς τις μελλοντικές παρενέργειες της ΑΘ στον προστάτη. Επί παραδείγματι, δόσεις άνω των 70 Gy χορηγούμενες με κλασική τεχνική δύο διαστάσεων φαίνεται ότι συνοδεύονται από υψηλότερη του συνήθους νοσηρότητα. Οίδημα των κάτω άκρων, του σσχέου ή του πέους είναι εντελώς σπάνια σε ασθενείς που υπεβλήθησαν μόνο σε ΑΘ (<1%). Αντίθετα η συχνότητα μπορεί να ανέβει και μέχρι 30% εάν ο ασθενής έχει υποβληθεί προηγουμένως σε ευρεία χειρουργική αφαίρεση των λεμφαδένων (21).

Ο Jonler και συν. (23) εκτίμησε τις παρενέργειες αλλά και την ποιότητα ζωής 115 ασθενών που υπεβλήθησαν μόνο σε ΑΘ για ΚΠ.

Εξ αυτών το 9% παρεπνοείτο για μία κάποιοι βαθμού ακράτεια ούρων. Όσον αφορά τη σεξουαλική λειτουργία το 77% των ασθενών ανέφερε ότι είχε πλήρη ή μερική στύση πριν από την ΑΘ, αλλά εξ αυτών μόνο το 22% (15 από τους 68 ικανούς ασθενείς) ήταν ικανό για μια πλήρη στύση, ενώ το 41% (28 από τους 68) είχαν μέτρια στύση.

ΣΥΝΔΥΑΣΜΟΣ ΕΓΧΕΙΡΗΣΗΣ ΚΑΙ ΑΚΤΙΝΟΘΕΡΑΠΕΙΑΣ

Παρενέργειες

Οι παρενέργειες που παρουσιάζονται μετά από μετεγχειρητική ΑΘ είναι ανάλογες με την έκταση της προηγηθείσης λεμφαδεκτομής.

Οι παρενέργειες αφορούν κυρίως στο ουροποιητικό σύστημα. 5-10% των ασθενών θα παρουσιάσουν στένωση της ουρήθρας ενώ 12-15% θα παρα-

πονείται για ακράτεια ούρων. Οίδημα του πέους και του σσχέου, αλλά και των κάτω άκρων παρατηρείται στο 10% με 20% των ασθενών μας. Σε 236 ασθενείς που υπεβλήθησαν μόνο σε ριζική ΑΘ δεν παρατηρήθηκε οίδημα κάτω άκρων, αντίθετα με 18 ασθενείς εκ των 116 (ποσοστό 15,5%) που είχαν υποβληθεί σε περιορισμένη αφαίρεση λεμφαδένων της πυέλου (16).

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Jemal A, Thomas A, Murray T, et al. Cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin* 2002, 52:23-47.
2. Cancer Research Campaign. Cancer Stats-Prostate Cancer UK. 2002.
3. Young HH, Fronz WA. Some new methods in the treatment of carcinoma of the lower genitourinary tract. *J Urol* 1917, 1:505.
4. Ten Haken RK, Perez Tamayo, et al. Boost treatment of the prostate using shaped Fixed Fields. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1989, 16:193-200.
5. Leibel SA, Fuks Z, Zelefsky MJ, et al. The effects of local and regional treatment on the metastatic outcome in prostatic carcinoma with pelvic lymph node involvement. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1994, 28:7-16.
6. Hanks GE, Mertz KL, Diamand JJ. The effect of dose on local control of prostate cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1988, 15:1299-1305.
7. Kupelian, et al. Comparison of the efficacy of local therapies for localized prostate cancer in the Prostate Specific antigen Era: A large single institution Experience with radical prostatectomy and external beam radiotherapy. *J Clin Oncol* 2002, 20:3376-85.
8. Pound CR, et al. Prostate Specific Antigen after anatomic radical retropubic prostatectomy: Patterns of recurrence and cancer control. *Urol Clin North Am* 1997, 24:395-406.
9. Catalona WJ, et al. Contemporary results of anatomic radical prostatectomy. *CA Cancer J Clin* 1999, 49:282-296.
10. Pilepich MV, Pajak T, George FW, et al. Preliminary report on phase III RTOG studies on extended field irradiation in carcinoma of the prostate. *Am J Clin Oncol* 1983, 6:485-491.
11. Hanks GE, Lee WR, Hanlon AL, et al. Conformal technique dose escalation for prostate cancer: chemical evidence of improved cancer control with higher doses in patients with pretreatment prostate-specific antigen ≥ 10 ng/ml. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1996, 35:861-868.
12. Zelefsky MJ, Leibel SA. Comparing contemporary surgery to external beam radiotherapy for clinically localized prostate cancer. Editorial. *J Clin Oncol* 2002, 20:3363-64.
13. Eastham J, Scardino P. Radical prostatectomy for clinical stage T1 and T2 prostate cancer. *In: Vogelzang N,*

- et al (Eds) *Comprehensive Textbook of Genitourinary Oncology*. Philadelphia PA, Lippincott Williams and Wilkins, 1999, pp 722-738.
14. Gibbons RP. Total prostatectomy for clinically localized prostate cancer: long-term surgical results and current morbidity. *NCI Monogr* 1988, 7:123-126.
 15. Lepor H, Walsh PC. Long-term results of radical prostatectomy in clinically localized prostate cancer: experience at the Johns Hopkins Hospital. *NCI Monogr* 1988, 7:117-122.
 16. Eisbruch A, Perez CA, Roessler E, et al. Adjuvant irradiation after prostatectomy for carcinoma of prostate with positive surgical margins. *Cancer* 1994, 73:884-887.
 17. Anscher MS. Adjuvant therapy for pathologic stage C prostate cancer: a casualty of the PSA revolution? *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1996, 34:745-747.
 18. Walsh PC. Adjuvant radiotherapy after radical prostatectomy: is it indicated? *J Urol* 1987, 138:1427-1428.
 19. Lawton CA, Wong M, Pilepich MW, et al. Long-term sequelae following external beam irradiation for adenocarcinoma of the prostate: analysis of RTOG studies 7506 and 7706. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1991, 21:935-936.
 20. Banker FL. The preservation of potency after external beam irradiation for prostate cancer. *Int J Radiat Biol* 1991, 15:219-220.
 21. Pilepich MV, Asbell SO, Krall JM, et al. Correlation of radiotherapeutic parameters and treatment related morbidity: analysis of RTOG study 77-06. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1987, 13:1007-1002.
 22. Leibel SA, Zelefsky MJ, Kutcher GJ, et al. Three-dimensional conformal radiation therapy in localized carcinoma of the prostate: interim report of a phase I dose-escalation study. *J Urol* 1994, 152:1792-1798.
 23. Jonler M, Ritter MA, Brinkmann R, et al. Sequelae of definitive radiation therapy for prostate cancer localized to the pelvis. *Urology* 1994, 44:876-882.

“ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΙΑ ΡΟΗΣ”

Μέρος 1^ο

Συντονίστρια: **Β Καψιμάλη-Βαϊτοπούλου**

Εισαγωγή

Η κυτταρομετρία ροής (Flow Cytometry - FC) είναι μια τεχνική αυτοματοποιημένης κυτταρικής ανάλυσης, που επιτρέπει τη μέτρηση μεμονωμένων σωματιδίων (κυττάρων, πυρήνων, χρωμοσωμάτων κ.λπ.), καθώς διέρχονται σε νηματική ροή από ένα σταθερό σημείο, όπου προσπίπτει μια ακτίνα LAZER.

Η εφαρμογή μεθόδων ανοσοφθορισμού για τον εντοπισμό ιστικών ή κυτταρικών αντιγόνων, χρονολογείται αιτώ ης δεκαετίας του '50 και του '60, ενώ κατά τη δεκαετία του '70 άρχισαν να εφαρμόζονται στην κυτταρομετρία ροής, που είχε αναπτυχθεί σταδιακά με διαφορές ανακαλύψεις σε ποικίλες τεχνολογίες. Η ανακάλυψη της τεχνολογίας των υβριδωμάτων και μονοκλωνικών αντισωμάτων το 1975 από τους Kohler και Milstein έδωσε νέα ώθηση στις εφαρμογές της FC.

Η κυτταρομετρία ροής ξεκίνησε σαν εργαλείο κυτταρικής ανάλυσης στο πεδίο της βασικής έρευνας, αλλά γρήγορα, άρχισαν να αναπτύσσονται πρακτικές εφαρμογές και στο κλινικό επίπεδο. Σ' αυτό συνετέλεσε η εξέλιξη της τεχνολογίας, δηλαδή η κατασκευή νέων γενεών μηχανημάτων, που απαιτούν ελαχίστη παρέμβαση για τη ρύθμιση του οργάνου από την πλευρά του χειριστή, η χρησιμοποίηση ποικιλίας φθοριζουσών ουσιών με δυνατότητες ανάλυσης διπλού, τριπλού ή και τετραπλού ανοσοφθορισμού με μία ή δύο δέσμες ακτίνων LAZER, καθώς και η ανάπτυξη εξειδικευμένων προγραμμάτων ηλεκτρονικού υπολογιστή για την πολυπαραμετρική ανάλυση των αποτελεσμάτων και την ανάλυση πρωτογενών δεδομένων. Τέλος, η δυνατότητα αυτοματοποίησης στο χειρισμό των δειγμάτων και εφαρμογή αυστηρών κριτηρίων ελέγχου ποιότητας, συνέβαλε στην ταχύτητα

και στην αξιοπιστία των μετρήσεων.

Τα τελευταία χρόνια η FC έχει καθιερωθεί στην ανοσοφαινοτυπική τυποποίηση λευκαιμιών λεμφωμάτων, αλλά χρησιμοποιείται ευρέως και σαν μέθοδος μελέτης και ανάλυσης πληθυσμών κυττάρων σε διάφορα άλλα αιματολογικά νοσήματα.

Τα θέματα, που αναπτύσσονται στο γραπτό σύμπλοιο: “Η συμβολή της FC στη μελέτη και διάγνωση αιματολογικών νοσημάτων” αποτέλεσαν αντικείμενο της ημερίδας FC, που διοργανώθηκε στα Ιωάννινα από την Ελληνική Εταιρεία Κυτταρομετρίας και το Αιματολογικό Εργαστήριο του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ιωαννίνων τον Οκτώβριο του 2003 με σκοπό να γίνει ευρύτερα γνωστή αυτή η αξιόλογη διαγνωστική μεθοδολογία.

Τα θέματα του γραπτού αυτού σεμιναρίου θα αναπτυχθούν σε δύο συνέχειες. Στο παρόν τεύχος δημοσιεύονται οι παρακάτω εισηγήσεις:

- “Εισαγωγή”
Β. Καψιμάλη-Βαϊτοπούλου
 - “Εισαγωγή στις αρχές της κυτταρομετρίας ροής”
Μ. Γεωργίου
 - “Δείκτες διαφοροποίησης των αιμοποιητικών κυττάρων”
Ι. Κάκας
 - “Οξεία λεμφοβλαστική λευχαιμία”
Β. Καψιμάλη-Βαϊτοπούλου
 - “Τυποποίηση οξείας μυελοβλαστικής λευχαιμίας”
Φ. Κοντοπίδου
- Και στο επόμενο τεύχος θα δημοσιευθούν οι εισηγήσεις:
- “Τυποποίηση Β' Λεμφοϋπερπλαστικών Συνδρόμων”
Σ. Αλεξιά
 - “Πολλαπλούν Μυέλωμα”
Α. Ψαρρά
 - “Παροξυσμική Νυκτερινή Αιμοσφαιρινουρία (PNH)”
Α. Φλέβα

Εισαγωγή στις Αρχές της Κυτταρομετρία Ροής

Μ Γεωργίου

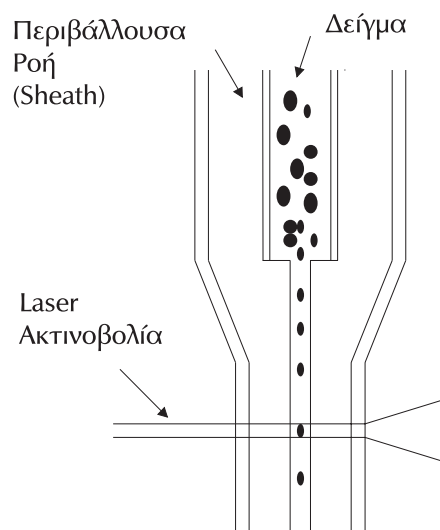
Αν και οι ρίζες της κυτταρομετρίας ροής εντοπίζονται στις αρχές και στα μέσα του 20ου αιώνα, η εκτενής χρήση της αρχίζει στη δεκαετία του 1970 με την εμφάνιση και των πρώτων εμπορικών συστημάτων. Στο κλινικό εργαστήριο αποκτά όμως σημαντική θέση στα μέσα της δεκαετίας του 1980 λόγω της εξάπλωσης του AIDS και ταυτόχρονα της βελτίωσης των τεχνικών συστημάτων (υδραυλικών και οπτικών), των ηλεκτρονικών υπολογιστών και της τεχνολογίας παρασκευής και σήμανσης μονοκλωνικών αντισωμάτων. Το αποτέλεσμα είναι ότι σήμερα έχουν εγκατασταθεί περισσότεροι από 30.000 κυτταρομετρητές ροής αλλά και κυτταροδιαχωριστές ροής διεθνώς. Τα μηχανήματα αυτά έχουν υψηλό κόστος αλλά παράλληλα είναι φιλικά προς το χρήστη σε σχέση με το παρελθόν, ιδιαίτερα εξειδικευμένα και με υψηλό βαθμό αυτοματοποίησης.

Η κυτταρομετρία ροής αποτελεί μία γρήγορη τεχνική, ποσοτική, δυναμική και πολυπαραμετρική και βασίζεται στην ανάλυση του κάθε κυττάρου ξεχωριστά. Σχεδιάστηκε για να ενισχύσει τη μικροσκοπική ανάλυση των κυττάρων με χρήση φθορίζοντων ικνηθετών και υποστρωμάτων. Αρχικά αναπτύχθηκε με κύριο σκοπό τον κυτταροδιαχωρισμό, στον οποίο οφείλει και το όνομα FACS (Fluorescence activated Cell Sorter). Σήμερα αποτελεί πλέον ένα διαγνωστικό εργαλείο στα κλινικά εργαστήρια αλλά και εξαιρετικά χρήσιμη τεχνική στα ερευνητικά εργαστήρια.

Για τη μέτρηση των δειγμάτων αυτό που απαιτείται καταρχήν, είναι το δείγμα μας, το οποίο συνήθως είναι ολικό αίμα, να βρίσκεται σε μορφή κυτταρικού εναιωρήματος. Στη συνέχεια προσθέτουμε το ή τα μονοκλωνικά αντισώματα που έχουν σημειωθεί με τις κατάλληλες φθορίζουσες χρωστικές και το δείγμα υφίσταται κατεργασία, ανάλογα με τον προσδιορισμό, 15-45 min συνήθως. Ο στόχος μας είναι τα αντισώματα να συνδεθούν στην επιφάνεια ή στο εσωτερικό των κυττάρων με τα αντίστοιχα αντιγόνα.

Κατά την ανάλυση των δειγμάτων οι φυσικές παράμετροι που αξιοποιούνται είναι η σκέδαση της προσπίπτουσας ακτινοβολίας στα κύτταρα καθώς και η παραγόμενη φθορίζουσα ακτινοβολία. Προϋπόθεση είναι τα κύτταρα να διέρχονται ένα-ένα μέσα από την κυψελίδα ροής και κατά συνέπεια και από το σημείο που συναντώνται με την προσπίπτουσα ακτινοβολία, γεγονός που επιτυγχάνεται μέσω της υδροδυναμικής εστίασης. Όπως βλέπουμε και στην εικόνα 1, στην κυψελίδα ροής υπάρχουν δύο ρεύματα: η κεντρική ροή του δείγματος, που ρυθμίζεται έτσι ώστε να είναι στρωτή και νηματική και η περιβάλλουσα ροή (sheath flow) που δεν αναμιγνύεται με το δείγμα.

Η ακτινοβολία, που συνήθως προέρχεται από ένα laser (συνήθως ιόντων αργού 488 nm), ως πηγή ενέρ-

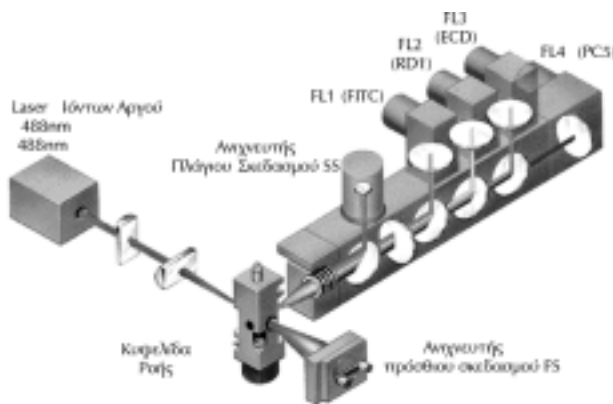


Εικόνα 1. Διάταξη κυψελίδας ροής σε κυτταρομετρητή ροής. Διακρίνεται η κεντρική ροή του δείγματος, η περιβάλλουσα ροή (sheath), η προερχόμενη από laser φωτεινή δέσμη ακτινοβολίας και η σκέδαση της ακτινοβολίας μετά από πρόσπτωση σε ένα κύτταρο.

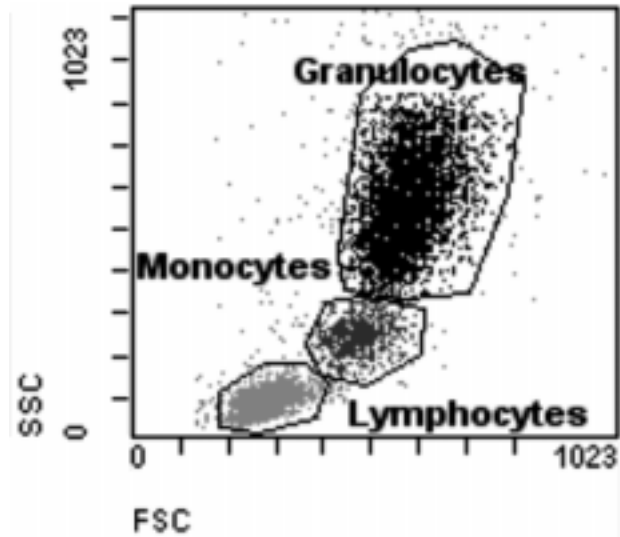
γείας είναι απαραίτητη για τη διέγερση των φθορίζουσων χρωστικών. Ταυτόχρονα όμως καθώς προπίπτει πάνω στα κύτταρα σκεδάζεται στο χώρο. Το σκεδαζόμενο φως μετρείται από τον κυτταρομετρική ροής σε μικρή γωνία (1-19°), Πρόσθια Σκέδαση (FS, Forward Scatter) αλλά και σε 90°. Πλάγια Σκέδαση (Side Scatter). Η σκέδαση εξαρτάται από τα φυσικά χαρακτηριστικά των κυττάρων (Εικόνα 2).

Το αποτέλεσμα είναι να διαχωρίζεται ο κυτταρικός πληθυσμός ανάλογα με το μέγεθος (FS) και την κοκκίωση (SS). Κατά αυτόν τον τρόπο είναι εφικτό μέσω του λογισμικού να απομονωθεί ηλεκτρονικά ο πληθυσμός που μας ενδιαφέρει σχηματίζοντας γύρω από αυτόν μία περίφραξη (gate), εικόνα 3.

Το επόμενο βήμα στην ανάλυση είναι ο προσδιορισμός των αντιγόνων των κυττάρων μέσω των παραγόμενων σημάτων φθορισμού, από τα σημασμένα μονοκλωνικά αντισώματα. Για να παρατηρηθεί το φαινόμενο του φθορισμού, οι φθορίζουσες ουσίες απαιτούν μία πηγή ενέργειας συγκεκριμένου μήκους κύματος, δηλαδή ακτινοβολία, η οποία προέρχεται από laser με πλεονέκτημα την παραγωγή μονοχρωματικής και σταθερής ακτινοβολίας. Οι φθορίζουσες χρωστικές, αφού διεγερθούν εκπέμπουν σε διάφορα μήκη κύματος, μεγαλύτερα της διέγερσης. Η εκπομπή αποτελεί ένα φάσμα ακτινοβολίας, για το λόγο αυτό πιθανό να υπάρχει και επικάλυψη φθοριοχρωμάτων, η οποία μπορεί να διορθωθεί μέσω του λογισμικού (compensation). Το πλεονέκτημα στους κυτταρομετρικές ροής είναι ότι από μία πηγή ενέργειας (ένα laser), μπορούμε να έχουμε ταυτόχρονη εκπο-



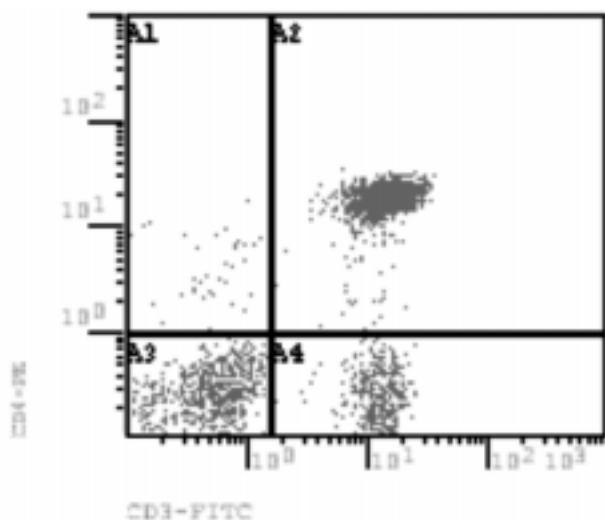
Εικόνα 2. Σχηματική απεικόνιση της οπτικής διάταξης του κυτταρομετρική ροής Beckman Coulter Epics XL-MCL. Διαθέτει μία φωτεινή πηγή Laser ιόντων Αργού (488 nm) και τέσσερις φωτοπολλαπλασιαστές για την ταυτόχρονη ανίχνευση 4 φθοριοχρωμάτων (FITC, PE, ECD/PI και PC5/PercP/PC5.5)



Εικόνα 3. Τυπικό στικτόγραμμα (dot plot) ολικού αίματος μετά από λύση ερυθρών. Διακρίνονται οι τρεις κυτταρικοί πληθυσμοί των λευκών αιμοσφαιρίων.

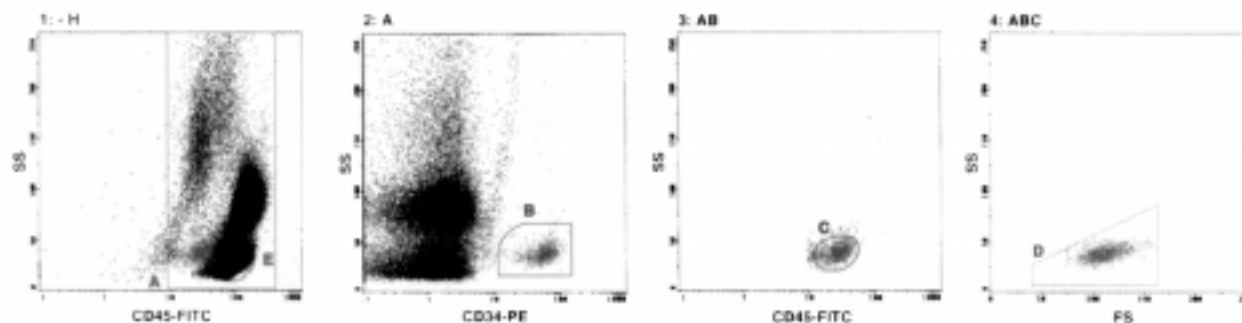
μπή και προσδιορισμό 3-5 φθοριοχρωμάτων, ανάλογα με το σύστημα που διαθέτουμε. Αυτό μεταφράζεται, στο ότι με την τεχνική αυτή μπορούμε να προσδιορίσουμε σε ένα σωληνάριο δείγματος από 3-5 αντιγόνα ταυτόχρονα στην κυτταρική μεμβράνη ενός κυττάρου καθώς και τυχόν συνέκφρασή τους. Η ταχύτητα ανάλυσης φτάνει έως και 3500 κύτταρα/sec. Στους κυτταροδιαχωριστές ροής η ταχύτητα ροής μπορεί να ξεπερνά και 10-15 φορές τους κυτταρομετρικές ροής. Αυτό έχει ως άμεση συνέπεια την ταυτόχρονη και γρήγορη συλλογή πολλών πληροφοριών κατά την τυποποίηση των κυτταρικών πληθυσμών. Οι χρωστικές που χρησιμοποιούνται και διεγείρονται από laser 488 nm είναι συνήθως η φλουορεσκεΐνη (FITC), η φυκοερυθρίνη (PE), η φυκοερυθρίνη-ερυθρό του Τέξας (ECD) και η φυκοερυθρίνη-κυανίνη 5 (PC5) ή η Peridinin Chlorophyll Protein (PerCP) με κορυφές στο φάσμα εκπομπής στα 525 nm (πράσινο), 575 nm (κίτρινο), 620 nm (πορτοκαλί) και 670 nm (κόκκινο) αντίστοιχα. Στο επόμενο σχήμα (4) παρατηρούμε την έκφραση των T κυττάρων, σε φυσιολογικό δείγμα, όπως προκύπτει με χρήση μονοκλωνικών αντισωμάτων CD3-FITC και CD4-PE, και με περίφραξη στα λεμφοκύτταρα.

Τα σήματα τα οποία μπορούν να συνυπάρξουν σε ένα ιστόγραμμα δεν είναι αποκλειστικά φθορισμοί είτε σκέδαση, όπως παρουσιάζονται στα σχήματα 3 και 4. Ιδιαίτερα χρήσιμες πληροφορίες προκύπτουν από το συνδυασμό των σημάτων SS και κάποιου



Εικόνα 4. CD3-FITC έναντι CD4-PE, σε δείγμα ολικού αίματος με περίφραξη στα λεμφοκύτταρα. A1: CD3⁻CD4⁺, A2: CD3⁺CD4⁺, A3: CD3⁻CD4⁻, A4: CD3⁺CD4⁻

φθορισμού (FL1-5), ανάλογα με τι φθοριόχρωμα έχει σημανθεί ο πληθυσμός υπό μελέτη. Πολλές φορές για να εξαχθεί ένα αποτέλεσμα είναι απαραίτητη η χρήση περισσότερων της μίας περίφραξης. Κλασικό σχετικό παράδειγμα αποτελεί ο προσδιορισμός των CD34⁺ κυττάρων, μέσω μίας “στρατηγικής” από διαγράμματα/παράθυρα (Εικόνα 5).



Εικόνα 5. Προσδιορισμός του Απόλυτου Αριθμού των CD34⁺ κυττάρων, με βάση το διαδοχικό σχηματισμό περιφράξεων (κατά ISHAGE). Στο 1^ο στικτόγραμμα CD45-FITC/SS ορίζεται η περιοχή A (περίφραξη) που περικλείει τα CD45⁺ (λευκοκύτταρα). Στο δεύτερο στικτόγραμμα CD34-PE/SS που χρησιμοποιεί την περιοχή A ως περίφραξη, και συνεπώς όλα τα δεδομένα προέρχονται μόνο από την περιοχή/περίφραξη A, σχεδιάζεται μία νέα περιοχή B, στην οποία περιλαμβάνονται τα ολικά CD34⁺ κύτταρα. Η τομή των A και B (AB) λειτουργεί πλέον ως η νέα περίφραξη για το τρίτο στικτόγραμμα CD45-FITC/SS. Στην περιοχή C απομονώνονται τα CD34⁺ κύτταρα χαμηλού σκεδασμού SS. Τέλος στο 4^ο στικτόγραμμα FS/SS, γίνεται και η τελική περίφραξη (D) των πραγματικών CD34⁺ κυττάρων που προέρχονται από τα προγονικά αιμοποιητικά, με δεδομένα αποκλειστικά από τα κοινά στοιχεία των A, B και C περιφράξεων.

Όπως προκύπτει από τα ανωτέρω παραδείγματα, η ανάλυση των δειγμάτων με κυτταρομετρία ροής δεν γίνεται όπως σε ένα κλειστό σύστημα αναλυτή, όπως πχ στους βιοχημικούς ή ακόμα και στους αιματολογικούς αναλυτές. Ανάλογα με το σύστημα που διαθέτουν οι χρήστες, την εμπειρία τους και τη διάθεση των μονοκλωνικών αντισωμάτων μπορεί ο τρόπος ανάλυσης του ίδιου δείγματος να διαφοροποιείται από εργαστήριο σε εργαστήριο. Επίσης, επειδή ο χρήστης μέσω του λογισμικού έχει τη δυνατότητα να επεμβαίνει στην ανάλυση, όπως με το σχεδιασμό περιφράξεων, και την τοποθέτηση των δρομέων, η κυτταρομετρία ροής ως τεχνική συναπάγεται και υποκειμενικότητα σε κάποιο βαθμό. Διεθνώς, η μόνη εξέταση με αυστηρά κριτήρια ως προς τη χρήση των αντισωμάτων και τον τρόπο ανάλυσης, είτε ένα εργαστήριο χρησιμοποιεί διπλό, τριπλό είτε τετραπλό φθορισμό είναι ο προσδιορισμός των CD4⁺ κυττάρων στους HIV⁺ ασθενείς. Για τον τρόπο μέτρησης, την παρακολούθηση και τον έλεγχο των υπόλοιπων νοσημάτων ή υποπληθυσμών υπάρχουν μεν κατευθυντήριες γραμμές αλλά δεν είναι και επιβεβλημένες. Βέβαια, τα εργαστήρια κυτταρομετρίας ροής μπορούν να συμμετέχουν σε ελέγχους διασφάλισης ποιότητας προκειμένου να έχουν αξιόπιστα αποτελέσματα.

Η κυτταρομετρία ροής μπορεί να βοηθήσει στη διάγνωση σε διάφορους τομείς της ιατρικής. Η αιματολογία και η ογκολογία κατέχουν την κύρια θέση ως προς την αξιοποίηση της τεχνικής αυτής. Επειδή

όμως αυτό που απαιτείται είναι το δείγμα να έχει τη μορφή εναιωρήματος κυττάρων μπορεί να χρησιμεύσει ακόμα στη γενική παθολογία και στην παιδιατρική ως προς την ανοσολογική διαγνωστική πλευρά. Χρήσιμο βοήθημα μπορεί ακόμα να αποτελέσει στην κυτταρολογία αλλά και στη μελέτη των συμπαγών όγκων. Άλλα βιολογικά υγρά όπως βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα, ENY, υαλοειδές και υδατοειδές υγρό ή ούρα μπορούν επίσης να αναλυθούν με κυτταρομετρία ροής.

Παρακάτω αναφέρονται μερικές από τις εξετάσεις που γίνονται με κυτταρομετρία ροής:

- Τυποποίηση οξείας λευχαιμίας και λεμφοϋπερπλαστικών συνδρόμων, μυελωμάτων.
- Έλεγχος PNH.
- Τυποποίηση ανοσοανεπαρκειών (πρωτοπαθών και δευτεροπαθών).
- Υποπληθυσμοί λεμφοκυττάρων.
- Ανίχνευση ελαχίστης υπολλειματικής νόσου.
- Προσδιορισμός δεικτών ενεργοποίησης (HLA-Dr, CD38, CD25 κα).
- DNA ανάλυση (έλεγχος πλοειδίας, S φάσης) σε κακοήθειες.
- Έλεγχος ατόμων με πολλαπλές αποβολές αγνώστου αιτιολογίας, ανίχνευση εμβρυϊκών ερυθροκυττάρων.
- Ποσοτικός προσδιορισμός της έκφρασης αντιγόνων επιφανείας καθώς και κυτταροπλασματικών αντιγόνων.
- Μελέτη ιστοσυμβατότητας στις μεταμοσχεύσεις οργάνων (Crossmatch).
- Προσδιορισμός κυτταροτοξικών αντισωμάτων
- Μέτρηση απόλυτου αριθμού CD34.
- Έλεγχος απόπτωσης.
- Οξειδωτική έκρηξη, φαγοκυττάρωση, προσδιορισμός ενζύμων
- Προσδιορισμός ποσοστού κυττάρων που παράγουν κυτταροκίνες σε βιολογικά υγρά.
- Ενεργοποίηση αιμοπεταλίων.
- Έλεγχος υπολειπόμενων λευκών σε παράγωγα αίματος.
- Έλεγχος κλωνικότητας TCR υποδοχέων.

Στις μέρες μας, η ανάλυση κυτταρομετρίας ροής με τρία σήματα φθορισμού είναι εφικτή πλέον σε επίπεδο ρουτίνας στα περισσότερα κλινικά εργαστήρια, όπως και τεσσάρων με χρήση ενός ή δύο Laser. Η νέα γενιά κυτταρομετρητών ροής δε θυμίζει σε τίποτα τα ογκώδη και δύσχρηστα μηχανήματα της δεκαετίας του 1980. Η ταυτόχρονη επεξεργασία 5 σημάτων φθορισμού από ένα laser, η πλήρης ψηφιακή ανάλυση των σημάτων (20 bit) έχει πλέον γίνει

πράξη από το 2002 (αναλυτής FC500 Beckman Coulter). Παράλληλα η τεχνολογία αυτή είναι η βάση για την κατασκευή κυτταροδιαχωριστών ροής, οι οποίοι έχουν την ικανότητα να διαχωρίζουν τους υπό μελέτη πληθυσμούς, με χρήση των κατάλληλων περιφράξεων και δυνατότητα για περαιτέρω χρήση των διαχωρισμένων κυττάρων. Η χρησιμότητά τους είναι πιο εμφανής σε ερευνητικά εργαστήρια, και η χρήση 2 και 3 laser είναι συνήθης.

Συνοψίζοντας, διαπιστώνουμε πόσα πολλά πεδία εφαρμογών διαθέτει η κυτταρομετρία ροής. Η δυναμική της και η αξία της ενισχύονται από τον υψηλό αριθμό σωματιδίων (δεκάδες χιλιάδες) που μπορούν να αναλυθούν μέσα σε λίγα λεπτά, την ευαισθησία της, και την ευελιξία της ως προς τον αριθμό των αντισωμάτων που μπορούν να χρησιμοποιηθούν. Πλεονέκτημα επίσης αποτελεί το γεγονός, ότι τα αποτελέσματα αποθηκεύονται και μπορούν να ανακληθούν ανά πάσα στιγμή για περαιτέρω μελέτη. Παράλληλα, να τονίσουμε ότι επειδή η κυτταρομετρία ροής στερείται της δυνατότητας της μορφολογικής ανάλυσης, μπορεί συχνά να είναι απαραίτητη η συνεισφορά του μικροσκοπίου καθώς και μοριακών τεχνικών.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Riley RS. Hematology/Oncology Clinics of North America, Flow Cytometry and Its Applications in Hematology and Oncology, 2002 16(2).
2. Πατεράκης Γ. Κυτταρομετρία ροής, μία τεχνολογία με καθημερινές εφαρμογές των Σύγχρονων Εργαστηριακών Εξελίξεων, Σεμινάριο 29^ο Πανελλήνιο Ιατρικό Συνέδριο, Αθήνα 2003.
3. Γερμενής Α. Κυτταρομετρία Ροής. Διαγνωστική Ανοσολογία & Ιστοσυμβατότητα, Εντατικό Μετεκπαιδευτικό Σεμινάριο, Λάρισα 2003.
4. Keeney M, Chin-Yee I, Weir K, Popma J, Nayar R, Sutherland DR. Single Platform Flow Cytometric Absolute CD34+ Cell Counts Based on the ISHAGE Guidelines. Cytometry (Communications in Clinical Cytometry) 1998, 34:61-70.
5. Ibrahim SF, van den Engh G. High-speed cell sorting: fundamentals and recent advances. *Current Opinion in Biotechnology* 2003, 14:5-12.
6. Herzenberg LA, De Rosa SC, Herzenberg LA. Monoclonal antibodies and the FACS: complementary tools for immunobiology and medicine. *Immunology Today*, 2000, 21(8):383-390.
7. Marti GE, Stetler-Stevenson M, Bleesing JJH, Fleisher TA. Introduction to Flow Cytometry. *Seminars in Hematology* 2001, 38(2).

Δείκτες Διαφοροποίησης των Αιμοποιητικών Κυττάρων

I Κάκκας

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Είναι γνωστό ότι τόσο τα εμπύρηννα κύτταρα του περιφερικού αίματος, όσο και τα ερυθροκύτταρα αλλά και τα αιμοπετάλια, έχουν περιορισμένο χρόνο ζωής. Η αναπλήρωση των “απωλειών” επιτυγχάνεται με τη συνεχή παραγωγή των εμμόρφων στοιχείων του περιφερικού αίματος από τα αιμοποιητικά όργανα (μυελός των οστών, θύμος) μετά από τον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση μορφολογικά αναγνωρίσιμων προγονικών κυττάρων (precursors), τα οποία μαζί με τις ώριμες μορφές τους (mature cells) αποτελούν τις γνωστές αιμοποιητικές κυτταρικές σειρές (ερυθρά, μεγακαρυοκυτταρική, κοκκιώδης, μονοκυτταρική, λεμφική). Τα μορφολογικά αναγνωρίσιμα προγονικά κύτταρα των αιμοποιητικών σειρών, προκύπτουν από τον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση μη αναγνωρίσιμων μορφολογικά προγονικών αιμοποιητικών κυττάρων τα οποία διακρίνονται σε: Πολυδύναμα Αρχέγονα Αιμοποιητικά Κύτταρα (Pluripotent Hematopoietic Stem Cells, PHSC) και σε ολιγοδύναμα ή μονοδύναμα προγονικά αιμοποιητικά κύτταρα “δεσμευμένα” για διαφοροποίηση προς συγκεκριμένες αιμοποιητικές κυτταρικές σειρές (Committed Progenitors).

Ο έλεγχος της έκφρασης συγκεκριμένων μεμβρανικών αλλά και κυτταροπλασματικών αντιγόνων με την τεχνική της κυτταρομετρίας ροής άνοιξε νέους ορίζοντες στη μελέτη της αιμοποίησης, οι οποίοι σήμερα διευρύνονται ακόμη περισσότερο με τη μελέτη της έκφρασης συγκεκριμένων γονιδίων χρησιμοποιώντας την τεχνολογία των γενετικών μικροσυστοιχιών (Gene Microarray Technology).

Στην παρούσα ανασκόπηση θα επιχειρηθεί μία συνοπτική παρουσίαση της διαφοροποίησης των αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων και των μορφολογικά αναγνωρίσιμων προβαθμίδων της αιμοποίησης προς τα έμμορφα στοιχεία του περιφερικού αίματος, παραθέτοντας παράλληλα και τους κυτταρικούς

δείκτες με ειδικότητα για τα διάφορα στάδια ωρίμανσης των κυτταρικών αιμοποιητικών σειρών, οι οποίοι είναι δυνατόν να ταυτοποιηθούν με την τεχνική της κυτταρομετρίας ροής.

2. ΠΡΟΓΟΝΙΚΑ ΑΙΜΟΠΟΙΗΤΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ

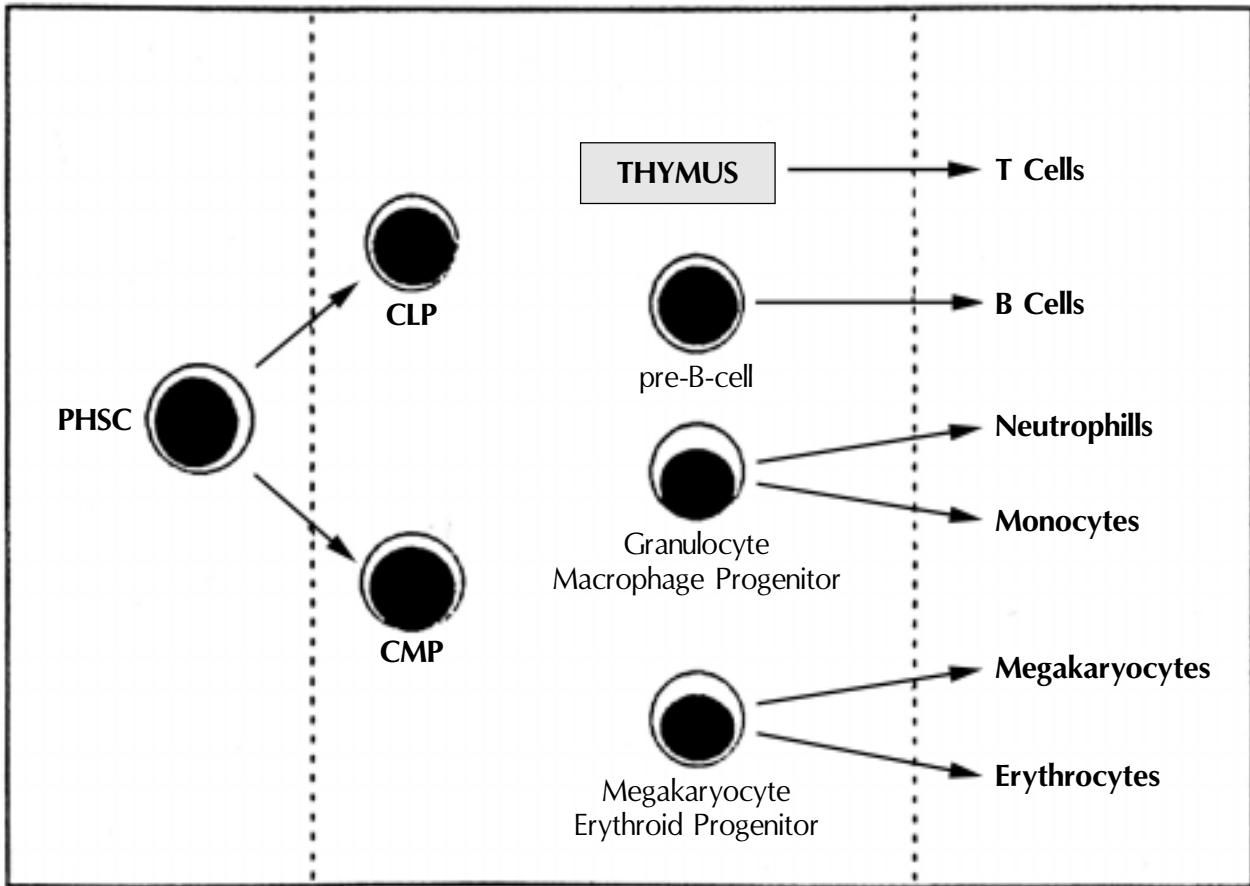
2.1. Πολυδύναμο Αρχέγονο Αιμοποιητικό Κύτταρο

Τα πολυδύναμα αρχέγονα αιμοποιητικά κύτταρα (PHSC's) αποτελούν την “κορυφή” της ιεραρχίας των αιμοποιητικών προβαθμίδων. Το ποσοστό τους κυμαίνεται μεταξύ 0,001%-0,01% επί του συνόλου των εμπυρήνων κυττάρων του μυελού. Χαρακτηρίζονται από μεγάλη ικανότητα “αυτοανανέωσης” (Self Renewal Capacity). Εκτιμάται ότι το 95% περίπου των PHSC's βρίσκεται σε φάση κυτταρικού κύκλου G₀. Έχουν ικανότητα διαφοροποίησης προς: α) Το Πολυδύναμο Κοινό Μυελικό Προγονικό Κύτταρο (Common Myeloid Progenitor, CMP) και β) Το Κοινό Λεμφικό Προγονικό Κύτταρο (Common Lymphoid Progenitor) (Εικόνα 1). Τα PHSC's συνήθως χαρακτηρίζονται από την έκφραση των παρακάτω δεικτών: CD34, CD90, CD133, CD117, CD135, CD123, CD243.

2.2. Πολυδύναμο και Ολιγοδύναμο Αρχέγονα Αιμοποιητικά Κύτταρα

A) Πολυδύναμο Κοινό Μυελικό Προγονικό Κύτταρο

Τα πολυδύναμα κοινά μυελικά προγονικά κύτταρα (CMP's) είναι όπως προαναφέραμε άμεσοι απόγονοι των PHSC's και αποτελούν τα “μητρικά” κύτταρα των παρακάτω αιμοποιητικών κυτταρικών σειρών: ερυθράς, μεγακαρυοκυτταρικής, ουδετερόφιλης κοκκιώδους, ηωσινόφιλης, βασεόφιλης και μονοκυτταρικής. Αδυνατούν δηλαδή να διαφοροποιηθούν προς κύτταρα της λεμφικής σειράς. Χαρακτηρίζονται από ικανοποιητική δυνατότητα αυτοανανέωσης. Εκτιμάται ότι τα 2/3 περίπου των CMP's βρίσκονται σε φάση κυτταρικού κύκλου G₀. Έχουν ικανότητα διαφοροποίησης προς: α) Το Διδύναμο Προγονικό Κύτταρο



Εικόνα 1. Ιεραρχική διάταξη της αιμοποίησης.

ταρο της Ουδετερόφιλης Κοκκιάδους και της Μονοκυτταρικής σειράς (Colony Forming Unit - Granulocyte/Monocyte, CFU-GM), β) Το Διδύναμο Προγονικό Κύτταρο της Μεγακαρυοκυτταρικής και της Ερυθράς σειράς (Megakaryocyte/Erythroid Progenitor, MEP), γ) Το Μονοδύναμο Προγονικό Κύτταρο των Ηωσινοφίλων (Colony Forming Unit – Eosinophils, CFU-Eo), δ) Το Μονοδύναμο Προγονικό Κύτταρο των Βασεοφίλων (Colony Forming Unit – Basophils, CFU-Bas) και ε) Το Μονοδύναμο Προγονικό Κύτταρο των Μυελικής Προέλευσης Δενδριτικών Κυττάρων (Myeloid Derived Dendritic Cell Progenitor, My DCP). Τα CMP's συνήθως χαρακτηρίζονται από την έκφραση των παρακάτω δεικτών: CD34, CD133, CD117, CD123, CD135, CD33, CD64.

Β) Πολυδύναμο Κοινό Λεμφικό Προγονικό Κύτταρο

Το πολυδύναμο κοινό λεμφικό προγονικό κύτταρο (CLP) αποτελεί την “κορυφή” της ιεραρχίας των λεμφικών αιμοποιητικών προβαθμίδων. Είναι άμεσος απόγονος του PHSC και αποτελεί την “απαρχή” των

Β-λεμφοκυττάρων, των Τ-λεμφοκυττάρων, των ΝΚ-λεμφοκυττάρων και των λεμφικής προέλευσης δενδριτικών κυττάρων. Τα CLP's χαρακτηρίζονται από ικανοποιητική δυνατότητα αυτοανέωσης. Εκτιμάται ότι τα 2/3 περίπου του πληθυσμού τους βρίσκονται σε φάση κυτταρικού κύκλου G₀. Τα CLP's έχουν δυνατότητα διαφοροποίησης προς: α) Το Μονοδύναμο Προγονικό Κύτταρο της Β-λεμφικής σειράς (B-Lymphoid Stem Cell, B-LSC) και β) Το Ολιγοδύναμο Προγονικό Κύτταρο των Τ/ΝΚ λεμφοκυττάρων και των λεμφικής προέλευσης Δενδριτικών Κυττάρων (T/NK/DC progenitor). Τα CLP's συνήθως χαρακτηρίζονται από την έκφραση των παρακάτω δεικτών: CD34, Tdt, HLA-DR, CD117, CD123, CD135, CD127, CD90. Τα Τ/ΝΚ/DC progenitors πρακτικά δεν είναι δυνατόν να διαχωριστούν ανοσοφαινοτυπικά από τα CLP's.

Γ) Διδύναμο Προγονικό Κύτταρο της Ουδετερόφιλης Κοκκιάδους και της Μονοκυτταρικής σειράς (CFU-GM)

Τα CFU-GM είναι όπως προαναφέραμε άμεσοι απόγονοι των CMP's και αποτελούν πρόδρομες μορ-

φές τόσο της ουδετερόφιλης κοκκιώδους όσο και της μονοκυτταρικής σειράς. Χαρακτηρίζονται από μικρή σχετικά ικανότητα αυτοανανέωσης. Εκτιμάται ότι μόνο το 1/3 περίπου των CFU-GM βρίσκονται σε φάση κυτταρικού κύκλου G₀. Έχουν ικανότητα διαφοροποίησης προς: α) Το Μονοδύναμο Προγονικό Κύτταρο της Ουδετερόφιλης Κοκκιώδους σειράς (Colony Forming Unit - Granulocyte, CFU-G), και β) Το Μονοδύναμο Προγονικό Κύτταρο της Μονοκυτταρικής σειράς (Colony Forming Unit - Monocyte, CFU-M). Τα CFU-GM συνήθως χαρακτηρίζονται από την έκφραση των παρακάτω δεικτών: CD34, CD33, CD13, CD64, CD117, CD123, CD135, CD116.

Δ) Διδύναμο Προγονικό Κύτταρο της Μεγακαρουκυτταρικής και της Ερυθράς σειράς (MEP)

Τα MEP's είναι άμεσοι απόγονοι των CMP's. Χαρακτηρίζονται από μικρή σχετικά ικανότητα αυτοανανέωσης. Εκτιμάται ότι μόνο το 1/3 περίπου των MEP's βρίσκεται σε φάση κυτταρικού κύκλου G₀. Έχουν ικανότητα διαφοροποίησης προς: α) Τα Μονοδύναμα Προγονικά Κύτταρα της Ερυθράς σειράς (Burst/Colony Forming Unit-Erythroid, BFU-E και CFU-E) και β) Τα Μονοδύναμα Προγονικά Κύτταρα της Μεγακαρουκυτταρικής σειράς (Burst/Colony Forming Unit - Megakaryocyte, BFU-Meg και CFU-Meg). Τα MEP's συνήθως χαρακτηρίζονται από την έκφραση των παρακάτω δεικτών: CD34, CD33, CD117, CD123, CD135, CD110.

Ε) Διδύναμο Προγονικό Κύτταρο των Τ και ΝΚ λεμφοκυττάρων (T/NK progenitor)

Τα T/NK progenitors χαρακτηρίζονται από μικρή ικανότητα αυτοανανέωσης. Έχουν ικανότητα διαφοροποίησης προς: α) Το Μονοδύναμο Προγονικό Κύτταρο της Τ-λεμφικής σειράς (T-Lymphoid Stem Cell, T-LSC) και β) Το Μονοδύναμο Προγονικό Κύτταρο των ΝΚ λεμφοκυττάρων (NK progenitor). Τα T/NK progenitors συνήθως χαρακτηρίζονται από την έκφραση των παρακάτω δεικτών: CD34, Tdt, HLA-DR, CD117, CD135, CD127, CD90.

3. ΔΙΑΦΟΡΟΠΟΙΗΣΗ ΤΗΣ ΚΟΚΚΙΩΔΟΥΣ ΣΕΙΡΑΣ

Α) Ουδετερόφιλη Κοκκιώδης σειρά

Το Μονοδύναμο Προγονικό Κύτταρο της Ουδετερόφιλης Κοκκιώδους σειράς (CFU-G) είναι ο άμεσος πρόγονος των ουδετεροφίλων και των μορφολογικά αναγνωρίσιμων προβαθμίδων τους. Η ικανότητα αυτοανανέωσης των CFU-G είναι ελάχιστη έως μηδενική. Εκτιμάται ότι ποσοστό μικρότερο του 5% του

συνόλου των CFU-G βρίσκεται σε φάση κυτταρικού κύκλου G₀. Χαρακτηρίζονται συνήθως από την έκφραση των παρακάτω δεικτών: CD34, CD33, CD13, CD123, CD117, CD135, CD116, CD114. Από τον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση των CFU-G προέρχονται τα πρώτα μορφολογικά αναγνωρίσιμα κύτταρα της ουδετερόφιλης κοκκιώδους σειράς, οι μυελοβλάστες, που συνήθως χαρακτηρίζονται από την έκφραση των παρακάτω δεικτών: CD33, CD13, CD11b, CD15, CDw65, CD114, CD116, MPO. Από τον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση των μυελοβλαστών προκύπτουν τα προμυελοκύτταρα, τα οποία συνήθως χαρακτηρίζονται από την έκφραση των εξής δεικτών: CD33, CD13, CD11b, CD15, CDw65, MPO, CD114, CD116, λακτοφερρίνη. Από τον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση των προμυελοκυττάρων προκύπτουν τα μυελοκύτταρα, τα οποία συνήθως χαρακτηρίζονται από την έκφραση των ακόλουθων δεικτών: CD13, CD15, CD11b, CDw65, MPO, λακτοφερρίνη, CD114, CD116. Το 1/3 περίπου των μυελοκυττάρων δεν πολλαπλασιάζεται περαιτέρω, ενώ ένα άλλο 1/3 "πεθαίνει" μέσα στο μυελό. Το υπόλοιπο 1/3 διατηρεί την ικανότητα μιτωτικής διαίρεσης. Τόσο τα μυελοκύτταρα που προκύπτουν από τον πολλαπλασιασμό άλλων μυελοκυττάρων, όσο κι εκείνα που δεν έχουν ικανότητα μιτωτικής διαίρεσης διαφοροποιούνται προς μεταμυελοκύτταρα. Τα μεταμυελοκύτταρα δεν έχουν ικανότητα μιτωτικής διαίρεσης και διαφοροποιούνται προς ραβδοκύτταρα. Συνήθως δεν είναι δυνατός ο ανοσοφαινοτυπικός διαχωρισμός μυελοκυττάρων, μεταμυελοκυττάρων και ραβδοκυττάρων. Πρακτικά, εκφράζουν τους ίδιους δείκτες. Τελικά, τα ραβδοκύτταρα διαφοροποιούνται προς ώριμα ουδετερόφιλα πολυμορφοκύτταρα. Συμπληρωματικά, στα πολυμορφοκύτταρα εκφράζονται οι δείκτες CD16 και CD128 πέραν αυτών που αναφέραμε για τα μυελοκύτταρα/μεταμυελοκύτταρα/ραβδοκύτταρα.

Β) Ηωσινόφιλη Κοκκιώδης σειρά

Το πρώτο μορφολογικά αναγνωρίσιμο κύτταρο της ηωσινόφιλης κοκκιώδους σειράς, είναι το ηωσινόφιλο μυελοκύτταρο. Ωστόσο, είναι γνωστό, ότι "μητρικά" κύτταρα των ηωσινοφίλων είναι τα μονοδύναμα προγονικά κύτταρα της ηωσινόφιλης σειράς (CFU-Eo) τα οποία προκύπτουν από τον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση των CMP's. Από τον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση των CFU-Eo προκύπτουν μυελοβλάστες που δεν διαχωρίζονται μορφολογικά από αυτούς της ουδετερόφιλης κοκκιώδους σειράς. Ο πολλαπλασιασμός και η διαφοροποίηση αυτών των μυελοβλαστών οδηγεί στην πλήρη ανάπτυξη της ηω-

σινόφιλης σειράς, σε απόλυτη αντιστοιχία με την ουδετερόφιλη κοκκιώδη σειρά. Τα κύτταρα της ηωσινόφιλης κοκκιώδους σειράς, χαρακτηρίζονται ανοσοφαινοτυπικά από την επιπρόσθετη έκφραση του CD125 σε όλα τα στάδια διαφοροποίησης, πέραν των λοιπών γνωστών δεικτών της ουδετερόφιλης κοκκιώδους σειράς στους οποίους έχουμε ήδη αναφερθεί.

Γ) Βασεόφιλη Κοκκιώδης σειρά

Και στην περίπτωση της βασεόφιλης κοκκιώδους σειράς, το πρώτο μορφολογικά αναγνωρίσιμο κύτταρο είναι το βασεόφιλο μυελοκύτταρο. Παρομοίως, “μητρικά” κύτταρα των βασεόφιλων θεωρούνται τα μονοκύτταρα προγονικά κύτταρα της βασεόφιλης σειράς (CFU-Bas) τα οποία προκύπτουν από τον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση των CMP's. Από τον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση των CFU-Bas προκύπτουν μυελοβλάστες που δεν διαχωρίζονται μορφολογικά από αυτούς της ουδετερόφιλης ή της ηωσινόφιλης κοκκιώδους σειράς. Ο πολλαπλασιασμός και η διαφοροποίηση αυτών των μυελοβλαστών οδηγεί στην πλήρη ανάπτυξη της βασεόφιλης σειράς, σε πλήρη αντιστοιχία με την ουδετερόφιλη και την ηωσινόφιλη κοκκιώδη σειρά. Σε σύγκριση με την ουδετερόφιλη κοκκιώδη, τα κύτταρα της βασεόφιλης σειράς χαρακτηρίζονται από την επιπρόσθετη έκφραση του CD125 σε αντιστοιχία με την ηωσινόφιλη σειρά. Ένα χαρακτηριστικό ανοσοφαινοτυπικό στοιχείο της βασεόφιλης κοκκιώδους σειράς, είναι η διατήρηση της έκφρασης του CD117 σε όλα τα στάδια της διαφοροποίησής της.

4. ΔΙΑΦΟΡΟΠΟΙΗΣΗ ΤΗΣ ΜΟΝΟΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΣΕΙΡΑΣ

Σαν “απαρχή” της δημιουργίας των μονοκυττάρων, θεωρείται το μονοκύτταρο προγονικό κύτταρο της μονοκυτταρικής σειράς (CFU-M). Όπως έχει ήδη αναφερθεί, τα CFU-M προκύπτουν από τον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση των CFU-GM. Η ικανότητα αυτοανανέωσης των CFU-M είναι ελάχιστη έως μηδενική. Ανοσοφαινοτυπικά, τα CFU-M χαρακτηρίζονται από την έκφραση των παρακάτω δεικτών: CD34, CD33, CD13, CD11b, CD64, HLA-DR, CD123, CD117, CD135, CD115, CD116.

Από τον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση των CFU-M προκύπτουν τα πρώτα μορφολογικά αναγνωρίσιμα κύτταρα της μονοκυτταρικής σειράς, οι μονοβλάστες. Συνήθως χαρακτηρίζονται από την έκφραση των παρακάτω δεικτών: HLA-DR, CD33, CD13, CD15, CD11b, CD11c, CD64, CD4, CD115, CD116. Από τον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση των μονοβλαστών προκύπτουν τα προμο-

νοκύτταρα τα οποία συνήθως εκφράζουν τους εξής δείκτες: HLA-DR, CD33, CD13, CD11b, CD11c, CD64, CD4, CD115, CD116. Από τον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση των προμονοκυττάρων, προκύπτουν τα ώριμα μονοκύτταρα τα οποία συνήθως χαρακτηρίζονται από την έκφραση των εξής δεικτών: HLA-DR, CD33, CD13, CD11b, CD11c, CD14, CD64, CD4, CD115, CD116.

5. ΔΙΑΦΟΡΟΠΟΙΗΣΗ ΤΗΣ ΕΡΥΘΡΑΣ ΣΕΙΡΑΣ

Τα BFU-E και τα CFU-E είναι τα μονοκύτταρα προγονικά κύτταρα της ερυθράς σειράς. Τα BFU-E προκύπτουν από τον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση των MEP's, ενώ τα CFU-E είναι αποτέλεσμα του πολλαπλασιασμού και της διαφοροποίησης των BFU-E. Η ικανότητα αυτοανανέωσης των μονοκύτταρων προγονικών κυττάρων της ερυθράς σειράς είναι ελάχιστη έως μηδενική. Τα ανοσοφαινοτυπικά χαρακτηριστικά τους έχουν ως εξής: α) BFU-E: CD34, HLA-DR, CD117, CD123, EpoR και β) CFU-E: HLA-DR, CD117, CD123, EpoR, CD71, CD36. Από τον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση των CFU-E, προκύπτει το πρώτο μορφολογικά αναγνωρίσιμο κύτταρο της ερυθράς σειράς, ο προερυθροβλάστης. Ανοσοφαινοτυπικά, συνήθως χαρακτηρίζεται από την έκφραση των παρακάτω δεικτών: CD71, CD36, EpoR, GrA-C. Από τον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση των προερυθροβλαστών προκύπτουν οι βασεόφιλοι ερυθροβλάστες. Εν συνεχεία, από τον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση των βασεόφιλων ερυθροβλαστών προκύπτουν οι πολυχρωματόφιλοι ερυθροβλάστες. Περίπου τα 2/3 των πολυχρωματόφιλων ερυθροβλαστών δεν έχουν ικανότητα μιτωτικής διαίρεσης. Από τη διαφοροποίηση ή και τον πολλαπλασιασμό τους, προκύπτουν οι οξύφιλοι ερυθροβλάστες. Οι ερυθροβλάστες (βασεόφιλοι, πολυχρωματόφιλοι, οξύφιλοι) συνήθως χαρακτηρίζονται από την έκφραση των παρακάτω δεικτών: CD71, EpoR, GrA-C. Αποτέλεσμα της ωρίμανσης των πολυχρωματόφιλων ερυθροβλαστών σε συνδυασμό με την απώλεια του πυρήνα τους, είναι ο σχηματισμός των Δικτυοερυθροκυττάρων (ΔΕΚ), τα οποία στην επιφάνειά τους διατηρούν την έκφραση των CD71 και GrA-C. Τέλος, είναι γνωστό ότι τα ΔΕΚ διαφοροποιούνται προς ερυθροκύτταρα, τα οποία στην επιφάνειά τους διατηρούν την έκφραση των GrA-C.

6. ΔΙΑΦΟΡΟΠΟΙΗΣΗ ΤΗΣ ΜΕΓΑΚΑΡΥΟΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΣΕΙΡΑΣ

Τα BFU-Meg και τα CFU-Meg είναι τα μονοκύτταρα προγονικά κύτταρα της μεγακαρυοκυτταρικής

σειράς. Τα BFU-Meg προκύπτουν από τον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση των MEP's, ενώ τα CFU-Meg είναι αποτέλεσμα του πολλαπλασιασμού και της διαφοροποίησης των BFU-Meg. Η ικανότητα αυτοανανέωσης των μονοδύναμων προγονικών κυττάρων της μεγακαρυοκυτταρικής σειράς είναι ελάχιστη έως μηδενική. Τα ανοσοφαινοτυπικά χαρακτηριστικά τους είναι τα ακόλουθα: α) BFU-Meg: CD34, HLA-DR, CD117, CD135, CD123, CD110 και β) CFU-Meg: CD34 (+/-), HLA-DR, CD117, CD123, CD110. Από τον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση των CFU-Meg προκύπτουν τα πρώτα μορφολογικά αναγνωρίσιμα κύτταρα της μεγακαρυοκυτταρικής σειράς, οι μεγακαρυο-βλάστες. Ανοσοφαινοτυπικά, συνήθως χαρακτηρίζονται από την έκφραση των παρακάτω δεικτών: HLA-DR, CD110, CD61, CD41, CD42b. Οι μεγακαρυοβλάστες δεν πολλαπλασιάζονται με την κλασική μιτωτική διαίρεση. Εμφανίζουν το φαινόμενο της ενδομίτωσης (διαίρεση του πυρήνα χωρίς διαίρεση του πρωτοπλάσματος). Αποτέλεσμα της ενδομίτωσης και της διαφοροποίησης των μεγακαρυοβλαστών, είναι ο σχηματισμός των προμεγακαρυοκυττάρων. Αποτέλεσμα της περαιτέρω ενδομίτωσης και διαφοροποίησης των προμεγακαρυοκυττάρων, είναι η εμφάνιση των ώριμων μεγακαρυοκυττάρων. Τόσο το προμεγακαρυοκύτταρο, όσο και το ώριμο μεγακαρυοκύτταρο χαρακτηρίζονται από την παρουσία των παρακάτω δεικτών: CD41, CD42b, CD61, CD110. Από την κατάτμηση του πρωτοπλάσματος και της κυτταρικής μεμβράνης των μεγακαρυοκυττάρων, τελικά προκύπτουν τα αιμοπετάλια τα οποία πέραν των δεικτών που εμφανίζονται στα μεγακαρυοκύτταρα, επιπρόσθετα μπορεί να εκφράζουν το CD9 καθώς και τους δείκτες ενεργοποίησης CD62p και CD63.

7. ΔΙΑΦΟΡΟΠΟΙΗΣΗ ΤΗΣ Β-ΛΕΜΦΙΚΗΣ ΣΕΙΡΑΣ

Τα μονοδύναμα προγονικά κύτταρα της Β-λεμφικής σειράς (B-LSC ή pro-B lymphocytes) προκύπτουν από τον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση των CLP's. Παρουσιάζουν ελάχιστη έως μηδενική ικανότητα αυτοανανέωσης. Συνήθως χαρακτηρίζονται από την έκφραση των παρακάτω δεικτών: CD34, HLA-DR, Tdt, CD117, CD135, CD123, CD127, CD179a/b. Από τον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση των B-LSC's προκύπτουν τα πρώιμα προ-B λεμφοκύτταρα (early pre-B). Συνήθως χαρακτηρίζονται από την έκφραση των παρακάτω δεικτών: CD34, HLA-DR, Tdt, CD79a, CD19, CD10 (+/-), CyCD22. Από τη διαφοροποίηση των early pre-B λεμφοκυττάρων, προκύπτουν τα όψιμα προ-B λεμφοκύτταρα (late pre-B) τα

οποία χαρακτηρίζονται από την έκφραση των παρακάτω δεικτών: HLA-DR, CD19, CD10, CD79a, CD22, CD20 Συμ. Από τον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση των pre-B λεμφοκυττάρων προκύπτουν τα ενδιάμεσης ωριμότητας (intermediate) Β-λεμφοκύτταρα, τα οποία χαρακτηρίζονται από την έκφραση των παρακάτω δεικτών: HLA-DR, CD19, CD10, CD20, CD22, SlgM. Από τον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση των intermediate Β-λεμφοκυττάρων προκύπτουν τα πρώιμα ή ανώριμα (immature) Β-λεμφοκύτταρα, τα οποία χαρακτηρίζονται από την παρουσία των παρακάτω δεικτών HLA-DR, CD19, CD20, CD21, CD22, SlgM. Τελικά, τα immature Β-λεμφοκύτταρα διαφοροποιούνται προς τα ώριμα (mature) Β-λεμφοκύτταρα στα οποία επιπρόσθετα στην κυτταρική τους μεμβράνη εκφράζεται και η IgD. Τα λειτουργικά ώριμα, αλλά ανοσολογικά "ανώριμα" (naive) Β-λεμφοκύτταρα μέσω της κυκλοφορίας του αίματος, μεταναστεύουν από το μυελό των οστών στα δευτερογενή λεμφικά όργανα. Εκεί, μετά από αντιγονική διέγερση ενεργοποιούνται και πολλαπλασιάζονται εκφράζοντας συγκεκριμένους δείκτες στην κυτταρική τους μεμβράνη (CD10, CD23, CD38), για να διαφοροποιηθούν τελικά είτε προς μνημονικά Β-λεμφοκύτταρα είτε προς πλασματοκύτταρα.

8. ΔΙΑΦΟΡΟΠΟΙΗΣΗ ΤΗΣ Τ-ΛΕΜΦΙΚΗΣ ΣΕΙΡΑΣ

Τα μονοδύναμα προγονικά κύτταρα της Τ-λεμφικής σειράς (T-LSC) προκύπτουν από τον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση των T/NK progenitors. Παρουσιάζουν ελάχιστη έως μηδενική ικανότητα αυτοανανέωσης. Συνήθως χαρακτηρίζονται από την έκφραση των παρακάτω δεικτών: CD34, HLA-DR, Tdt, CD90, CD117, CD135, CD127. Τα T-LSC's αφού μεταναστεύσουν από τον μυελό των οστών στον θύμο αδέν, πολλαπλασιάζονται και διαφοροποιούνται προς προθυμοκύτταρα, τα οποία χαρακτηρίζονται από την έκφραση των παρακάτω δεικτών: Tdt, CD2, CD5, CD7, CyCD3. Τα προθυμοκύτταρα πολλαπλασιάζονται και διαφοροποιούνται προς κοινά θυμοκύτταρα, τα οποία εκφράζουν τους παρακάτω δείκτες: Tdt, CD1a, CD2, CD3, CD4, CD5, CD7, CD8. Από τον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση των κοινών θυμοκυττάρων, προκύπτουν τα ώριμα θυμοκύτταρα τα οποία χαρακτηρίζονται από την έκφραση των εξής δεικτών: Tdt, CD2, CD3, CD4 ή CD8, CD5, CD7. Τα κοινά θυμοκύτταρα διαφοροποιούνται προς ώριμα Τ-λεμφοκύτταρα, τα οποία ανοσοφαινοτυπικά χαρακτηρίζονται από την απώλεια έκφρασης της Tdt. Τα λειτουργικά ώριμα, αλλά ανοσολογικά ανώριμα (naive) Τ-λεμφοκύτταρα μεταναστεύουν

μέσω της κυκλοφορίας του αίματος από το θύμο αδένες, στα δευτερογενή λεμφικά όργανα. Εκεί μετά από αντιγονική διέγερση ενεργοποιούνται και πολλαπλασιάζονται εκφράζοντας συγκεκριμένους δείκτες ενεργοποίησης στην κυτταρική τους μεμβράνη (CD25, CD38, CD69, CD71, CD122), έχοντας τη δυνατότητα να διαφοροποιηθούν προς μνημονικά Τ-λεμφοκύτταρα.

9. ΟΝΤΟΓΕΝΕΣΗ ΤΩΝ ΝΚ-ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΩΝ

Τα μονοδύναμα προγονικά κύτταρα των ΝΚ-λεμφοκυττάρων (NK progenitors) προκύπτουν από τον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση των διδύναμων Τ/ΝΚ progenitors. Ανοσοφαινοτυπικά χαρακτηρίζονται από την έκφραση των παρακάτω δεικτών: CD34, CD90, CD117, CD127, CD132. Από τον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση των ΝΚ-progenitors προκύπτουν τα πρόδρομα ΝΚ-λεμφοκύτταρα (NK precursors) τα οποία συνήθως χαρακτηρίζονται από την έκφραση των εξής δεικτών: CD132, CD122, CD161. Από τον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση των ΝΚ-precursors προκύπτουν τα "ανώριμα" (immature) ΝΚ-λεμφοκύτταρα τα οποία συνήθως χαρακτηρίζονται από την έκφραση των παρακάτω δεικτών: CD122, CD161, CD56. Από τη διαφοροποίηση των ανώριμων ΝΚ-λεμφοκυττάρων τελικά προκύπτουν τα ώριμα (mature) ΝΚ-λεμφοκύτταρα τα οποία επιπρόσθετα εκφράζουν και τους εξής δείκτες: CD94 και CD16.

10. ΟΝΤΟΓΕΝΕΣΗ ΤΩΝ ΔΕΝΔΡΙΤΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

Έχουν ταυτοποιηθεί δύο τύποι μονοδύναμων προγονικών μορφών των δενδριτικών κυττάρων: α) Τα μυελικής προέλευσης (myeloid) DC progenitors και β) Τα λεμφικής προέλευσης (lymphoid) DC progenitors.

ΠΙΝΑΚΑΣ 1. Δείκτες επιφανείας/Υποδοχείς αυξητικών παραγόντων

CD117	Υποδοχέας του Stem Cell Factor
CD135	Υποδοχέας του Flt-3 Ligand
CD123	α αλυσίδα του υποδοχέα της IL-3
CD127	α αλυσίδα του υποδοχέα της IL-7
CD116	Υποδοχέας του GM-CSF
CD110	Υποδοχέας της θρομβοποιητίνης (c-mpl)
CD114	Υποδοχέας του G-CSF
CD125	α αλυσίδα του υποδοχέα της IL-5
CD115	Υποδοχέας του M-CSF
CD128	Υποδοχέας της IL-8
CD132	γ αλυσίδα του υποδοχέα της IL-15
CD122	β αλυσίδα του υποδοχέα της IL-2

Τα myeloid DC progenitors φαίνεται πως είναι άμεσοι απόγονοι των CMP's και συνήθως χαρακτηρίζονται από την έκφραση των παρακάτω δεικτών: CD34, CD117, CD135, CD64, CD33, CD13, CD11b. Από τον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση των myeloid DC progenitors προκύπτουν ώριμα μονοκύτταρα, τα οποία κάτω από την επίδραση του GM-CSF και της IL-4 πολλαπλασιάζονται και διαφοροποιούνται προς πρόδρομα (precursors) δενδριτικά κύτταρα. Αυτά, σε σύγκριση με τα μονοκύτταρα χαρακτηρίζονται από την απώλεια έκφρασης του CD14. Από τον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση των myeloid DC precursors προκύπτουν ανώριμα (immature) δενδριτικά κύτταρα, τα οποία επιπρόσθετα εκφράζουν και τους παρακάτω δείκτες: CD80, CD16, CD1b/c. Επίσης, εν μέρει ή ασθενώς μπορεί να εκφράζεται και το CD83. Από τη διαφοροποίηση των immature DC's προκύπτουν τα ώριμα δενδριτικά κύτταρα μυελικής προέλευσης, τα οποία χαρακτηρίζονται από τη σταθερή έκφραση του CD83 και την αυξημένη "ένταση" έκφρασης των CD40, CD80 και CD86.

Τα lymphoid DC progenitors φαίνεται πως είναι άμεσοι απόγονοι των ολιγοδυνάμων Τ/ΝΚ/DC progenitors και χαρακτηρίζονται συνήθως από την έκφραση των παρακάτω δεικτών: CD34, CD123, CD117, CD135. Από τον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση των lymphoid DC progenitors προκύπτουν τα αντίστοιχα πρόδρομα (precursors) δενδριτικά κύτταρα, τα οποία χαρακτηρίζονται από: α) Τη διατήρηση της έκφρασης του CD123 και β) την εμφάνιση του CD4. Από τον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση των lymphoid DC precursors προκύπτουν τα αντίστοιχα ανώριμα (immature) δενδριτικά κύτταρα, τα οποία χαρακτηρίζονται από την έκφραση των παρακάτω δεικτών: CD40, CD80 και CD86. Τέλος τα immature lymphoid DC's διαφοροποιούνται προς τα ώριμα λεμφικής προέλευσης δενδριτικά κύτταρα, στα οποία επιπρόσθετα εκφράζεται το CD83, ενώ ενισχύεται η "ένταση" της έκφρασης των CD40, CD80 και CD86.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Ηλιόπουλος Γ, Κυριάκου Δ, Αλεξανδράκης Μ. Εισαγωγή στην Αιμοποίηση, Εκδόσεις "Αιμοβιολογική", Ηράκλειο Κρήτης, 1996.
2. Hoffman R, Benz E, Shattil S, Furie B, Cohen H, Sieberstein L (Editors). Hematology: Basic principles and practice, 2nd Edition, Churchill-Livingstone, New York, 1995.
3. Roitt I, Brostoff J, Male D (Editors). Immunology, 5th Edition, Mosby, London, 1998.

4. Hoffbrand V, Lewis M, Tuddenham E (Editors). Post-graduate Haematology, 4th Edition, Butterworth-Heinemann, Oxford, 1999.
5. Rothe G, Schmitz G. Consensus Protocol for the flow cytometric immunophenotyping of hematopoietic malignancies. *Leukemia* 1996, 10:877-895.
6. Lyman S, Jacobsen S. C-kit ligand and Flt-3 ligand: Stem/Progenitor cell factors with overlapping yet distinct activities. *Blood* 1998, 91(4):1101-1134.
7. Banchereau J, Steinman R. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 1998, 392:245-252.
8. Spits H et al. Early stages in the development of human T natural killer and thymic dendritic cells. *Immunological Reviews* 1998, 165:75-86.
9. LeBien T. Fates of human B-cell precursors. *Blood* 2000, 96(1):9-23.
10. Mori K, Egashira M, Oshimi K. Differentiation stage of natural killer cell-lineage lymphoproliferative disorders based on phenotypic analysis. *British Journal of Haematology* 2001, 115:225-228.
11. Ardavin C, Martinez G, Martin P et al. Origin and differentiation of dendritic cells. *Trends in Immunology* 2001, 22(12):691-700.
12. Dorshkind K. Stem cells and lineage plasticity: the challenge to existing paradigms. *Immunological Reviews* 2002, 187:5-8.
13. MacDonald K, Munster D, Clark G, et al. Characterization of human blood dendritic cell subsets. *Blood* 2002, 100(13):4512-4520.
14. Terskith A, Miyamoto T, Chang C, et al. Gene expression analysis of purified hematopoietic stem cells and committed progenitors. *Blood* 2003, 102(1):94-101.

Οξεία Λεμφοβλαστική Λευχαιμία

Β Καψιμάλη-Βαϊτοπούλου

Η οξεία λεμφοβλαστική λευχαιμία (ΟΛΛ) αποτελεί τη συχνότερη κακοήθεια στα παιδιά, ενώ στους ενήλικες αφορά το 20% των περιπτώσεων οξείας λευχαιμίας. Στην πλειονότητα της (75-85%) είναι Β κυτταρικής σειράς. Η κυτταρομετρία ροής (ΚΡ) είναι η κυρίως χρησιμοποιούμενη τεχνική για την ανάλυση και τη μελέτη του ανοσοφαινότυπου των βλαστικών κυττάρων στο μυελό των οστών, στο περιφερικό αίμα αλλά και σε βιολογικά υγρά (π.χ. εγκεφαλονωτιαίο). Επιτρέπει την ανάλυση μεγάλου αριθμού κυττάρων, την ταυτόχρονη μελέτη πολλών παραμέτρων και είναι γρήγορη και αναπαραγώγιμη μέθοδος. Με την προσέγγιση αυτή επιτυγχάνεται η αναγνώριση του βλαστικού πληθυσμού και η ταυτοποίηση της κυτταρικής σειράς, ο προσδιορισμός του σταδίου διαφοροποίησης και της ετερογένειας του παθολογικών κυττάρων αλλά και η ανάλυση της κλωνικότητας. Επίσης μπορεί να εκτιμηθεί η ένταση έκφρασης και η παθολογική έκφραση αντιγόνων. Η κυτταρομετρική μελέτη αποσκοπεί στον ανοσοφαινοτυπικό χαρακτηρισμό των λευχαιμικών κυττάρων και όχι στη διάγνωση της νόσου. Βασίζεται δε στην ταυτοποίηση ενός ή περισσότερων δεικτών στην επιφάνεια ή στο κυτταρόπλασμα σε συνδυασμό με τα σκεδαστικά χαρακτηριστικά των κυττάρων. Οι δείκτες προσδιορίζονται με μονοκλωνικά αντισώματα που χρησιμοποιούνται συνήθως σε διπλούς ή τριπλούς συνδυασμούς και καθορίζονται από το εργαστήριο σύμφωνα με τα τρέχοντα επιστημονικά δεδομένα και τις συστάσεις ομάδων εμπειρογνομόνων.

Στην κυτταρομετρική ανάλυση της ΟΛΛ, ο εντοπισμός των βλαστικών κυττάρων με τα δύο βασικά σκεδαστικά χαρακτηριστικά (πρόσθιος/FS και ορθογώνιος/SS σκεδασμός στη διπαραμετρική κατανομή) ενδέχεται να μην είναι ευχερές, λόγω προσμίξεως με ώριμα λεμφοκύτταρα. Αυτό συμβαίνει συνήθως όταν το ποσοστό των βλαστών είναι <30%, οπότε μπορεί να συσχεραίνεται ο εντοπισμός και η ανοσοφαι-

νοτυπική ανάλυση. Όταν το ποσοστό των βλαστών στο δείγμα είναι υψηλό (>50%) ή ο πληθυσμός ευδιάκριτος, η ανάλυση δεν παρουσιάζει προβλήματα όταν η οριοθέτηση γίνεται στο κλασικό σκεδαστικό παράθυρο. Οι λεμφοβλαστικές λευχαιμίες προσφέρονται για μελέτη με το λεγόμενο βλαστικό παράθυρο, όπου συνδυάζοντας την ένταση του CD45 με τον ορθογώνιο σκεδασμό, οι βλάστες, ακόμη και σε μικρό ποσοστό, διακρίνονται ευχερώς από τα ώριμα κύτταρα.

Ο δείκτης CD45 είναι το κοινό λευκοκυτταρικό αντιγόνο, μια τυροσινική κινάση, η οποία εκφράζεται στα λευκοκύτταρα αλλά με διαφορετική ένταση ανάλογα με τον τύπο και το βαθμό ωρίμανσης. Στα λεμφοκύτταρα και στα μονοκύτταρα εκφράζεται εντονότερα στην επιφάνειά τους σε σύγκριση με τα κοκκιόκυτταρα, ενώ στα προγονικά κύτταρα εκφράζεται ασθενέστερα σε σχέση με τις ωριμότερες μορφές. Κατ' αυτόν τον τρόπο, στο βλαστικό παράθυρο, τα λευχαιμικά κύτταρα που συχνά εμφανίζουν μειωμένη έκφραση του CD45 (αλλά και διαφορετικό ορθογώνιο σκεδασμό) διακρίνονται από τα ώριμα κύτταρα. Να σημειωθεί ότι στις ΟΛΛ από πρόδρομα Β κύτταρα, η ένταση του CD45 έχει και προγνωστική σημασία.

Η ΟΛΛ διακρίνεται σε δύο κύριες κατηγορίες ανάλογα με την κυτταρική προέλευση: Στην ΟΛΛ Β κυτταρικής σειράς (Β-ΟΛΛ) και στην ΟΛΛ Τ κυτταρικής σειράς (Τ-ΟΛΛ). Η ταξινόμηση τους με βάση τα ανοσοφαινοτυπικά χαρακτηριστικά στηρίζεται στις προτάσεις της Ευρωπαϊκής ομάδας μελέτης γνωστής ως EGIL (European Group for the Immunological characterization of Leukemias, και παρουσιάζεται στον πίνακα που ακολουθεί.

Η ανοσοφαινοτυπική ταξινόμηση της ΟΛΛ βασίζεται στην έκφραση των δεικτών που χαρακτηρίζουν τα στάδια διαφοροποίησης των Β και των Τ λεμφοκυττάρων στο μυελό των οστών και στο θύμο αντιστοίχως.

Ο χαρακτηρισμός της Β-ΟΛΛ προϋποθέτει θετικότητα των βλαστών σε τουλάχιστον δύο από τους

ΠΙΝΑΚΑΣ

B I	cCD79a+, CD19+, CD10-, cμ-	Πρώιμη προ B (pro-B)
B II	cCD79a+, CD19+, CD10+, cμ-	Κοινή (common)
B III	cCD79a+, CD19+, CD10+/-, cμ+, σκ/λ(-)	Προ B (pre-B)
B IV	cCD79a+, CD19+, CD10+, Tdt-, σκ ή λ(+)	Ώριμη B (Burkitt)
T Ia	cCD3+, CD7++, CD5-, CD2-, sCD3-	Προθυμική (pro-T)
T Ib	cCD3+, CD7++, CD5+, CD2-, CD1a-, sCD3-	Προθυμική (pro-T)
T II	cCD3+, CD7++, CD5+, CD2+, CD1a-, sCD3-	pre-T
T III	cCD3+, CD7++, CD5+, CD2+, CD1a+, sCD3-/+ , TCRαβ+/- (T IIIa) ή TCRγδ+/- (T IIIb)	cortical T
T IV	cCD3+, CD7++, CD5+, CD2+, CD1a-, sCD3+ TCRαβ+(T IVa) ή TCRγδ+(T IVb)	mature T

c: κυτταροπλασματικό, s: επιφανειακό

δείκτες CD19, cCD79a, cCD22. Οι περισσότερες περιπτώσεις είναι HLADR+, Tdt+, εκτός από την ώριμη B-ΟΛΛ που είναι Tdt-. Η έκφραση του πυρηνικού δείκτη Tdt θεωρείται πολύ σημαντική διότι διακρίνει τις περιπτώσεις ΟΛΛ από τις ώριμες λεμφοϋπερπλασίες (π.χ. λέμφωμα από μεγάλα κύτταρα). Ο δείκτης CD20 είναι θετικός στην ώριμη B-ΟΛΛ και μπορεί να είναι θετικός στην κοινή και στην προ-B ΟΛΛ.

Η T-ΟΛΛ χαρακτηρίζεται από την κυτταροπλασματική ή την επιφανειακή έκφραση του CD3 ενώ η έκφραση του CD7 ή του CD2 δεν ταυτοποιούν μια περίπτωση ως T-ΟΛΛ. Η πλειονότητα των περιπτώσεων T-ΟΛΛ είναι HLADR-, CD34-, Tdt+. Η προγνωστική σημασία του ανοσοφαινότυπου στην T-ΟΛΛ δεν είναι σημαντική σε αντίθεση με τη B-ΟΛΛ. Αξίζει να σημειωθεί ότι διάφοροι υπότυποι της B-ΟΛΛ συσχετίζονται με συγκεκριμένες χρωμοσωμιακές ανωμαλίες.

Κατά την ανοσοφαινοτυπική ταυτοποίηση της ΟΛΛ προκύπτουν και περιπτώσεις που χαρακτηρίζονται από την έκφραση μυελικών δεικτών οπότε αναφέ-

ρονται ως My+ ΟΛΛ εφόσον δεν πληρούνται τα κριτήρια υβριδικής λευχαιμίας.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Orfao A, Schmitz G, Brando B, et al. Clinically useful information provided by the flow cytometric immunophenotyping of hematological malignancies: current status and future directions. *Clin Chem* 1999, 45:1708-1717.
2. Huh YO, Ibrahim S. Immunophenotypes in adult acute lymphoblastic leukemia. Role of flow cytometry in diagnosis and monitoring of disease. *Hematol Oncol Clin North Am* 2000, 14:1251-265.
3. Weir EG, Borowitz MJ. Flow cytometry in the diagnosis of acute leukemia. *Semin Hematol* 2001, 38:124-138.
4. Riley R, Massey D, Jackson-Cook C, et al. Immunophenotypic analysis of acute lymphocytic leukemia. *Hematol Oncol Clin N Am* 2002, 16:245-299.
5. Bain B J, Barnett D, Linch D, et al. Revised guideline on immunphenotyping in acute leukemias and chronic lymphoproliferative disorders. *Clin Lab Haem* 2002, 24:1-13.

Τυποποίηση Οξείας Μυελοβλαστικής Λευχαιμίας

Φ Κοντοπίδου

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η ακριβής διάγνωση είναι ο πρώτος στόχος που πρέπει να επιτευχθεί για να επιλεγεί η σωστή θεραπεία στους ασθενείς με οξεία λευχαιμία (ΟΛ).

Για μεγάλο χρονικό διάστημα τα κύρια διαγνωστικά εργαλεία για τη διάγνωση και την κατάταξη της ΟΛ ήταν η μορφολογία και η κυτταροχημεία. Σ' αυτές τις μεθόδους βασιζόταν η κατάταξη FAB, που ενώ ήταν γενικά αποδεκτή, είχε σχετικά φτωχή επαναληψιμότητα μεταξύ των εργαστηρίων.

Σήμερα η ανοσοφαινοτυπική ανάλυση των λευκαιμικών κύτταρων με τη μέθοδο της κυτταρομετρίας ροής (ΚΡ) θεωρείται απαραίτητη στη μελέτη της ΟΛ, για να συμπληρωθούν οι πληροφορίες του απλού μικροσκοπίου και της κυτταροχημείας, γιατί η ΚΡ επιτρέπει την ταχεία ανάλυση μεγάλου αριθμού κυττάρων, ακόμη και σε μικρά δείγματα δίνοντας υψηλή στατιστική ακρίβεια. Η ταυτόχρονη μελέτη διαφορετικών παραμέτρων (FS, SS, FL1, FL2 και FL3, FL4) αυξάνει την ειδικότητα και την ευαισθησία της μεθόδου.

Η ΚΡ αποτελεί μια αντικειμενική και αναπαραγώγιμη μέθοδο με την οποία επιτυγχάνεται:

- 1) Αναγνώριση του παθολογικού πληθυσμού και προσδιορισμός της κυτταρικής σειράς.
- 2) Ανάλυση της κλωνικότητας, συνήθως σε συνδυασμό με κυτταρογενετικές και μοριακές μελέτες.
- 3) Ανάλυση της κυτταρικής ωριμότητας και της ετερογένειας του παθολογικού κυτταρικού πληθυσμού.
- 4) Ποσοτική μέτρηση της έκφρασης των αντιγόνων στα αιμοποιητικά κύτταρα.
- 5) Τυποποίηση σύνθετων αντιγονικών συνδυασμών, που σχετίζονται με συγκεκριμένες μοριακές βλάβες και συγκεκριμένη κυτταρική βιολογία (βιολογία νόσου).
- 6) Εφαρμογή αυτών των ευρημάτων στην παρακολούθηση και στη θεραπεία καθώς και στην αναζήτηση της ελάχιστης υπολειπόμενης νόσου.

ΜΕΘΟΔΟΣ

Από τη λήψη του δείγματος μέχρι τη διατύπωση του τελικού αποτελέσματος η κυτταρομετρία ροής περιλαμβάνει διάφορα στάδια, εξ' ίσου σημαντικά, για την εξαγωγή σωστών αποτελεσμάτων. Αυτά είναι:

- α) συλλογή και φύλαξη του δείγματος,
- β) επιλογή του panel δεικτών και επεξεργασία
- γ) acquisition
- δ) ανάλυση και αξιολόγηση
- ε) διατύπωση αποτελεσμάτων.

Γενικά τα δείγματα που προορίζονται για ανοσοφαινοτυπική ανάλυση πρέπει να μεταφέρονται στο εργαστήριο κυτταρομετρίας ροής, όπου θα γίνει η επεξεργασία και η χρώση για ανάλυση, αμέσως μετά τη λήψη. Το δείγμα πρέπει να συνοδεύεται από κάθε διαθέσιμη κλινική ή εργαστηριακή πληροφορία.

Για τα λευκαιμικά δείγματα, η ταχεία μεταφορά - επεξεργασία - ανάλυση του δείγματος είναι πολύ σημαντική για την εξαγωγή σωστών αποτελεσμάτων, γιατί στην κυτταρομετρία ροής αναλύονται μόνο ζώντα κύτταρα και ο ρυθμός νέκρωσης ώριμων/αώρων κυττάρων είναι διαφορετικός. Έτσι σε ένα δείγμα που περιέχει βλαστικά κύτταρα, ακόμη και αν ο αριθμός των ζώντων κυττάρων μετά τη φύλαξη του δείγματος, παραμένει ικανοποιητικός, η αναλογία αωροτέρων/ώριμα κύτταρα μπορεί να έχει πλήρως διαταραχθεί.

Η πλέον ευρέως χρησιμοποιούμενη μέθοδος επεξεργασίας των δειγμάτων είναι σήμερα, η μέθοδος ολικού αίματος.

Τα πλεονεκτήματα έναντι της μεθόδου διαχωρισμού μονοπύρηνων κυττάρων με Ficoll είναι:

- 1) λιγότερα στάδια προετοιμασίας,
- 2) λιγότεροι χειρισμοί του δείγματος που εξασφαλίζουν οικονομία χρόνου και μικρότερη ταλαιπωρία των κυττάρων,
- 3) μικρότερη πιθανότητα για απώλεια κάποιων υποπληθυσμών,
- 4) δυνατότητα μέτρησης απόλυτου αριθμού, ορισμένων πληθυσμών κυττάρων, με χρήση beads.

Η μέθοδος αυτή επιτρέπει επίσης τη σύγχρονη ανάλυση των ουδετερόφιλων, που παραμένουν στο δείγμα μετά από μεθόδους λύσεως, δυνατότητα με ιδιαίτερο ενδιαφέρον για παθήσεις με διαταραχές της μυελικής διαφοροποίησης. Ασθενές σήμα των ουδετεροφίλων ως προς τον side scatter μπορεί να αντιστοιχεί στην ελαττωμένη κοκκίωση που βρίσκεται στα μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα. Σε ΟΜΛ σε πλήρη ύφεση με αιματολογικά κριτήρια, μπορεί να παραμένουν διαταραχές των ώριμων μυελικών κυττάρων και αποτελούν ένδειξη παραμονής του παθολογικού κλώνου.

Μειονέκτημα της μεθόδου όταν αναλύονται παλαιά δείγματα είναι η μη ειδική χρώση που οφείλεται στα νεκρά κύτταρα. Το δείγμα μετά τη λύση των ερυθρών περιλαμβάνει: όλα τα λευκά, εμπύρνα ερυθρά (εκτός ίσως κάποιους ώριμους νορμοβλάστες), αιμοπετάλια, νεκρά κύτταρα και σκουπίδια (debris). Αυτό οδηγεί σε μεγαλύτερη δυσκολία στο διαχωρισμό των κυτταρικών πληθυσμών (gating) γι' αυτό η μέθοδος ολικού αίματος χρησιμοποιείται σε συνδυασμό με πολυπαραγοντικές μεθόδους ανοσοφθορισμού.

Η μέθοδος ολικού αίματος περιλαμβάνει τα εξής στάδια:

- 1) Παρασκευή εναιωρήματος κυττάρων με συγκεκριμένη συγκέντρωση.
- 2) Προσθήκη συγκεκριμένης ποσότητας μονοκλωνικού αντισώματος (McAb) σε συγκεκριμένο όγκο αίματος ή μυελού και επώαση ώστε να γίνει η σύνδεση αντιγόνου-McAb.
- 3) Λύση των ερυθρών αιμοσφαιρίων με την προσθήκη+επώαση λυτικού διαλύματος.
- 4) Προσθήκη παραφορμαλδεύδης στο τελικό, προς ανάλυση, διάλυμα κυττάρων.

Παρά την ευρεία εφαρμογή της κυτταρομετρίας ροής στη διάγνωση των ΟΛ υπάρχει μεγάλη διαφοροποίηση μεταξύ των εργαστηρίων σε σχέση με τον ελάχιστο αριθμό και τον τύπο των αντισωμάτων που πρέπει να χρησιμοποιούνται, καθώς και για την ειδικότητα τους ή την επιλογή των συνδυασμών για διπλή, τριπλή ή τετραπλή χρώση.

Οι κλώνοι των McAbs πρέπει να επιλέγονται προσεκτικά καθώς διαφορετικοί κλώνοι που αναγνωρίζουν το ίδιο CD μπορεί να διαφέρουν στην ικανότητα σύνδεσης τους με το αντιγόνο, όπως έχει αποδειχθεί για τους δείκτες CD15 (γλυκοζυλιωμένη ή όχι γλυκοζυλιωμένη μορφή) και CD34 (class I, class II, class III).

Για να επιλεγούν οι πλέον κατάλληλοι συνδυασμοί, πρέπει να υπάρχει γνώση, τόσο για τα χαρακτηριστικά των αντιγόνων όσο και για τα χαρακτηριστικά των φθοριοχρωμάτων. Ένα δεδομένο φθοριόχρωμα

πρέπει να επιλέγεται για ένα συγκεκριμένο McAb, με βάση την πυκνότητα και την ετερογένεια της έκφρασης του αντιγόνου στη μεμβράνη των κυττάρων. Έτσι αντίγονα με ασθενή έκφραση, όπως CD13, CD19, CD33 θα πρέπει να ανιχνεύονται χρησιμοποιώντας McAbs συνδεδεμένα με έντονο (bright) φθοριόχρωμα, όπως R-phycocerythin-PE, ενώ αντίγονα με έντονη έκφραση όπως CD45 ή HLA-DR θα πρέπει να αναλύονται με McAbs συνδεδεμένα με πιο ασθενή (dim) φθοριοχρώματα όπως FITC ή PerCP.

Ο προσδιορισμός της κυτταρικής σειράς των βλαστικών κυττάρων αποτελεί, ακόμη και σήμερα, πρόβλημα σε μερικές περιπτώσεις ΟΛ. Αυτό οφείλεται κυρίως στην ύπαρξη cross lineage antigen expression. Αντιγόνα που σε φυσιολογικά δείγματα, σχετίζονται ή θεωρούνται ειδικά για τα λεμφοκύτταρα και τα NK κύτταρα (CD2, CD7, CD19, CD56) και τα κύτταρα της μυελικής σειράς (CD13, CD14, CD15, CD33, CD65) έχουν βρεθεί θετικά σε σημαντικό ποσοστό περιπτώσεων AML και ALL.

Αυτές οι παρατηρήσεις τονίζουν την αναγκαιότητα να χρησιμοποιούνται συνδυασμοί από δείκτες που σχετίζονται με διάφορες κυτταρικές σειρές, ώστε να τεκμηριωθεί η κυτταρική σειρά των βλαστικών κυττάρων. Πρέπει να περιλαμβάνονται δείκτες με μεγάλη ευαισθησία, που πάντα εκφράζονται από μια συγκεκριμένη σειρά (όπως CD7 στα T κύτταρα ή CD19 στα B κύτταρα) μαζί με δείκτες πιο ειδικούς (όπως CD3 για τα T κύτταρα ή MPO για AML). Επιπλέον πρέπει να χρησιμοποιούνται δείκτες των προγονικών κυττάρων, όπως CD34, για να τεκμηριωθεί η αωρότητα των παθολογικών κυττάρων. Όταν προσδιοριστεί η κυτταρική σειρά και το στάδιο διαφοροποίησης η ανοσοφαινοτυπική ανάλυση επικεντρώνεται στην κατάταξη σε μικρότερες, κλινικά ομοιογενείς, υποομάδες.

Η κύρια διαφορά μεταξύ διπλής και τριπλής/τετραπλής χρώσης, σχετίζεται με τη στρατηγική για την επιλογή και διαχωρισμό των προς μελέτη κυττάρων. Στο διπλό ανοσοφθορισμό η επιλογή των κυττάρων βασίζεται σε παραμέτρους που σχετίζονται με τη μορφολογία του κυττάρου (light scattering parameters, FCS-κυτταρικό μέγεθος, SSC-κοκκίωση). Στον τριπλό ή τετραπλό ανοσοφθορισμό χρησιμοποιείται ένας δείκτης, συνήθως σε συνδυασμό με SS, για ανοσολογικό gating των προς μελέτη κυττάρων (CD19 για B, CD7 για T, CD45 για ΟΜΛ). Με τη μέθοδο αυτή η ευαισθησία και ειδικότητα της μεθόδου για την ταυτοποίηση των βλαστικών κυττάρων είναι σαφώς υψηλότερες.

Ο αριθμός των κυττάρων που συλλέγονται για ανάλυση είναι 10.000 ή ιδανικότερα 15000 και όταν

η ανάλυση αφορά κάποιο συγκεκριμένο υποπληθυσμό (π.χ. στην MRD) τουλάχιστον 1.000.

Κατά την αξιολόγηση των αποτελεσμάτων τα ευρήματα πρέπει να αναφέρονται στα βλαστικά κύτταρα που λαμβάνονται από το αίμα ή το μυελό.

Υπάρχει γενική συμφωνία για ένα cut-off point θετικότητας δηλ. ένας δείκτης θεωρείται θετικός όταν εκφράζεται τουλάχιστον στο 20% των κυττάρων. Εξαιρέση αποτελούν το anti-MPO, CD3 και CD79α, λόγω του μεγάλου βαθμού ειδικότητας καθώς και το TdT, που θεωρούνται θετικά όταν εκφράζονται τουλάχιστον στο 10% των βλαστικών κυττάρων.

Η κυτταρομετρία ροής δίδει τη δυνατότητα ποιοτικής και ποσοτικής εκτίμησης της έκφρασης των αντιγόνων σε κάθε κυτταρικό πληθυσμό. Η ανάλυση μεγάλου αριθμού κυττάρων δίδει κατανομές (patterns) της έκφρασης των αντιγόνων στον πληθυσμό των λευκαιμικών κυττάρων. Έτσι εκτός από τη διαπίστωση για παρουσία/απουσία ενός αντιγόνου, λαμβάνονται πληροφορίες για το ποσό της έκφρασης του αντιγόνου/κύτταρο και την κατανομή - ομοιογενής/ετερογενής - της δραστηριότητας του αντιγόνου. Η ποσοτική ανάλυση της έκφρασης των αντιγόνων είναι σημαντική και πολύ χρήσιμη για τη διάκριση μεταξύ φυσιολογικών και λευκαιμικών κυττάρων καθώς και για την ταυτοποίηση διαφορετικών υποτύπων της ΟΛ με παρόμοιο γενετικό background. Η έκφραση των αντιγόνων, σε αντίθεση με τις συνήθως χρησιμοποιούμενες cut-off τιμές για τα θετικά κύτταρα, πρέπει να υπολογίζεται με τη μέση ένταση φθορισμού.

Θεωρείται ότι ο πληθυσμός των λευκαιμικών κυττάρων είναι θετικός για κάποιο αντιγόνο όταν η median fluorescence intensity (MFI) που βρίσκεται γι' αυτό το αντιγόνο είναι υψηλότερη απ' αυτήν των αρνητικών κυττάρων (χωρίς χρώση) + 2 standard deviations (SD). Η MFI μπορεί να εκφράζεται σε διαφορετικές μονάδες MFSF ή ABC (antibody binding capacity) αναλόγως του χρησιμοποιούμενου οργάνου. Η ποσοτική μέτρηση του φθορισμού σε προτυποποιημένες μονάδες όπως MESF, επιτυγχάνεται μέσω ρύθμισης (calibration) του μηχανήματος με set από beads που έχουν διαφορετική αλλά συγκεκριμένη ποσότητα φθοριοχρώματος. Η ποσοτικοποίηση των αντιγόνων είναι πολύ χρήσιμη στην ταυτοποίηση υποτύπων ΟΛ, με ιδιαίτερη προγνωστική σημασία τόσο στην ΟΛΛ [π.χ. t(12;21), t(9;22)] όσο και στην ΟΜΛ [π.χ. t(15;17)].

ΑΝΟΣΟΦΑΙΝΟΤΥΠΙΚΟ ΠΡΟΦΙΛ ΟΞΕΙΑΣ ΜΥΕΛΟΒΛΑΣΤΙΚΗΣ ΛΕΥΧΑΙΜΙΑΣ (ΟΜΛ)

Ανοσολογικά οι ΟΛ διακρίνονται σε 4 κατηγορίες:

Οξεία Λεμφοβλαστική Λευχαιμία (ΟΛΛ)
Οξεία Μυελοβλαστική Λευχαιμία (ΟΜΛ)
Διφαινοτυπική Οξεία Λευχαιμία (ΔΟΛ)

Άλλες: Αδιαφοροποίητη Οξεία Λευχαιμία (ΑΟΛ), Λευχαιμία από φυσικά κυτταροκτόνα κύτταρα, Λευχαιμία από δενδριτικά κύτταρα.

Η ΟΜΛ χαρακτηρίζεται ανοσολογικά από την έκφραση 2 ή περισσότερων από τους κάτωθι μυελομονοκυτταρικούς δείκτες: anti-MPO, CD117 (c-kit), CD13 και/ή CD33 και την απουσία ειδικών δεικτών για τη λεμφική σειρά.

Ο πιο ειδικός δείκτης για τη μυελική σειρά είναι το anti-MPO και ακολουθείται από το CD117.

Έχουν γίνει προσπάθειες να συσχετιστούν συγκεκριμένοι ανοσολογικοί δείκτες με τους διάφορους υποτύπους της ΟΜΛ σύμφωνα με την FAB κατάταξη. Μόνο 3 υπότυποι ΟΜΛ μπορεί να χαρακτηριστούν ανοσοφαινοτυπικά. Αυτοί είναι M0, M6, M7 (Πίνακας 1).

Η αξιολόγηση των αποτελεσμάτων του ανοσοφαινοτύπου κατά την ανάλυση της ΟΜΛ είναι διαφορετικός από αυτήν στην ΟΛΛ, στην οποία η κατάταξη γίνεται με ανοσολογικά κριτήρια. Η κατάταξη της ΟΜΛ, κατά FAB, βασίζεται στη μορφολογία των κυττάρων. Δεν υπάρχει μυελικός δείκτης που να διαχωρίζει κάποιον από τους υποτύπους M1 έως M5. Κά-

ΠΙΝΑΚΑΣ 1. Ανοσολογική Κατάταξη ΟΜΛ.

- 1. Αωρη Μυελική (M0)**
καθορίζεται με ανοσολογικούς δείκτες, έχει φαινότυπο όπως οι άλλες ΟΜΛ αλλά αρνητική κυτταροχημεία και αρνητικούς τους ειδικούς λεμφικούς δείκτες.
- 2. Μυελομονοκυτταρική σειρά**
anti-MPO+, CD13+, CD33+, CD117+
[Θετικότητα για τουλάχιστον 2 ή περισσότερους μυελικούς δείκτες]
- 3. Ερυθρά σειρά (M6)**
Αωρη: δεν υπάρχουν ειδικοί δείκτες
Ώριμη: anti-glycophorin A+
[CD36+, CD71+ μπορεί να είναι θετικά στα άωρα προγονικά κύτταρα της ερυθράς αλλά δεν είναι ειδικά για την ερυθρά σειρά]
- 4. Μεγακαρουκυτταρική σειρά (M7)**
CD41+, CD42+, CD61+
αναγνωρίζουν τις γλυκοπρωτεΐνες Ib, το σύμπλεγμα IIb/IIIa και IIIa στη μεμβράνη των αιμοπεταλίων και μεγακαρουκυττάρων. Το McAb CD61 είναι ο δείκτης εκλογής για τη διάγνωση της M7 γιατί εμφανίζεται στα πιο πρώιμα στάδια ωρίμανσης και ανιχνεύει το υψηλότερο ποσοστό βλαστικών κυττάρων χωρίς να έχει cross-reactivity με άλλα αιμοποιητικά κύτταρα
- 5. TdT+, ΟΜΛ**
- 6. Ly+AML, ΟΜΛ** με έκφραση 1 ή περισσότερων λεμφικών αντιγόνων, που όμως δεν πληρεί τα κριτήρια της ΔΟΛ.

ποιοι δείκτες εκφράζονται κατά προτίμηση σε κάποιον από αυτούς τους μορφολογικούς υποτύπους, όπως:

- CD14+ και anti-lysozyme+ στις περιπτώσεις με μονοκυτταρική διαφοροποίηση (M4-ΟΜΛ και M5-ΟΜΛ).
- HLA-DR- στις περιπτώσεις με έντονη μυελική διαφοροποίηση όπως M3-ΟΜΛ ή ώριμη M2-ΟΜΛ.
- CD19+ ένας δείκτης της Β-λεμφικής σειράς, στις πλείστες των περιπτώσεων M2-ΟΜΛ με t(8;21).
- CD2+ πολύ συχνά στην M3-ΟΜΛ με t(15;17) και στη M4Eo-ΟΜΛ.
- CD9+ χαρακτηριστικά εκφράζεται στα βλαστικά κύτταρα της M3-ΟΜΛ.
- CD36 αναγνωρίζει την πρώιμη M6-ΟΜΛ αλλά δεν είναι ειδικός δείκτης (μπορεί να είναι θετικό και στους μονοβλάστες). Όταν όμως εκφράζεται σε συνδυασμό με αρνητικό HLA-DR και CD13/CD33 ενισχύει την άποψη υπέρ της προέλευσης του κυττάρου από την ερυθρά σειρά.

Η τελική συσχέτιση των αποτελεσμάτων της ανοσοφαινοτυπικής ανάλυσης με τους διαφορετικούς κατά FAB υποτύπους βασίζεται στην κατανομή του παθολογικού πληθυσμού, στον συνδυασμό της έκφρασης των μυελικών δεικτών (πρώιμων δεικτών με πιο ώριμους μυελικούς δείκτες) και στην έκφραση των δεικτών που εκφράζονται σε συγκεκριμένους υποτύπους (Πίνακας 2).

ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΕΛΑΧΙΣΤΗΣ ΥΠΟΛΕΙΠΟΜΕΝΗΣ ΝΟΣΟΥ (ΕΥΝ)

Οι ασθενείς με ΟΛ σε κλινική ύφεση μπορεί να έχουν 10^{10} παθολογικά κύτταρα (το ανώτερο όριο για ανίχνευση νόσου με μορφολογικά κριτήρια).

Προοπτικές μελέτες σε μεγάλο αριθμό ασθενών έχουν αποδείξει ισχυρή συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων της ΕΥΝ κατά τη διάρκεια της κλινικής ύφεσης και του θεραπευτικού αποτελέσματος. Η ανάπτυξη επομένως ευαίσθητων τεχνικών για την ανίχνευση της ΕΥΝ είναι πολύ σημαντική για τη μέτρηση του φορτίου νόσου και την επιλογή της κατάλληλης θεραπευτικής στρατηγικής. Η ΚΡ και η PCR είναι σήμερα οι πλέον ευρέως χρησιμοποιούμενες μέθοδοι για την ανίχνευση πολύ μικρού αριθμού λευκαϊκών κυττάρων.

Η ανίχνευση της ΕΥΝ με ΚΡ βασίζεται:

- στην ταυτοποίηση παθολογικού φαινοτύπου που υπάρχει στα λευκαϊκά κύτταρα αλλά όχι στα φυσιολογικά αιμοποιητικά κύτταρα της ίδιας κυτταρικής σειράς, όπως έκφραση λεμφικών αντιγόνων στην ΟΜΛ
- στην ύπαρξη παθολογικού pattern της έκφρασης των αντιγόνων στα βλαστικά κύτταρα

Η ΚΡ μπορεί να ελέγξει περίπου το 90% των περιπτώσεων ΟΛΛ και το 70% των περιπτώσεων ΟΜΛ, λόγω της απουσίας ειδικού για τη λευκαϊμία φαινοτύπου. Γενικά η έκφραση των αντιγόνων είναι πιο ετερογενής στη ΟΜΛ σε σχέση με την ΟΛΛ, γεγονός που αντανακλά το γνωστό φαινόμενο που συμβαίνει σε πολλές περιπτώσεις ΟΜΛ, όπου τα λευκαϊκά κύτταρα βρίσκονται σε ποικίλα στάδια ωριμάνσεως. Η ευαισθησία της μεθόδου είναι 1 στα 10^4 κύτταρα με τις μεθόδους ρουτίνας και 1 στα 10^6 κύτταρα με ειδικές τεχνικές.

Κατά τη μελέτη της ΕΥΝ πρέπει να λαμβάνεται υπ' όψη και η κατανομή έκφρασης των φυσιολογικών κυττάρων στο δείγμα που αναλύεται. Αυτό έχει μεγάλη σημασία όταν οι φυσιολογικές κατανομές είναι "δυναμικές", όπως πχ σε μυελό που αναγεννάται

ΠΙΝΑΚΑΣ 2. ΟΜΛ - Συσχέτιση δεικτών με FAB κατάταξη

	M0	M2 t(8;21)	M3 t(15; 17)	M4Eo Inv16	M5 t(9; 11)	M5	M7
MPO	+/-	+	+	+	-/+	-	-
CD2	-			+/-			
CD13	+/-	+	+	+	+/-	-	+/-
CD14	-	-	-	+/-	+/-	-	-
CD15	-	+/-	-/+	+/-		+	-
CD19	-	+/-					
CD33	+/-	+/-	+	+	+	+	+/-
CD34	+/-	+/-	-	-/+			
CD56		+/-					
CD61	-	-	-	-	-	-	+
CD64	-	-	+/-	+	+	+	
CD117	+/-	+/-	-/+	+/-	- /+		
HLA-DR	+/-	+	-	+	+	+	+/-

μετά θεραπεία, όπου τα φυσιολογικά άωρα κύτταρα είναι παρόντα σε διάφορα στάδια διαφοροποίησης.

Αυξημένος αριθμός φυσιολογικών αιμοποιητικών προγονικών κυττάρων π.χ. σε μυελό που αναγεννάζεται μετά θεραπεία (regenerating), μπορεί να καλύψει την παρουσία μικρού πληθυσμού παθολογικών κυττάρων. Ο επακριβής καθορισμός του λευκαιμικού φαινοτύπου κατά τη διάγνωση της νόσου, που είναι συχνά χαρακτηριστική για το βλαστικό πληθυσμό του κάθε ασθενούς, είναι απαραίτητη προϋπόθεση για την επίλυση αυτού του προβλήματος. Η γνώση των αρχικών χαρακτηριστικών των κυττάρων, μαζί με τη δυνατότητα της αποθήκευσης των αρχείων σε list mode, κάνει δυνατή την προσεκτική επαναξιολόγηση του δείγματος που λαμβάνεται μετά τη θεραπεία. Η ανίχνευση παθολογικού φαινοτύπου στο περιφερικό αίμα μπορεί να είναι χρήσιμη για να αναγνωριστεί ένας μικρός πληθυσμός βλαστικών κυττάρων.

ΕΚΦΡΑΣΗ ΑΝΤΙΓΟΝΩΝ ΚΑΙ ΓΟΝΟΤΥΠΟΣ

Κλασικά πιστευόταν ότι τα λευκαιμικά κύτταρα αποτελούν το νεοπλασματικό ανάλογο ενός φυσιολογικού άωρου κυττάρου που "δεσμεύτηκε" σε ένα συγκεκριμένο στάδιο διαφοροποίησης. Τώρα η άποψη αυτή αναθεωρείται. Με τις σύγχρονες πολυπαραγοντικές, ποσοτικές μεθόδους έχει αποδειχθεί ότι η έκφραση των αντιγόνων στους λευκαιμικούς βλάστες είναι διαταραγμένη όσον αφορά: 1) την έκφραση αντιγόνων από άλλες κυτταρικές σειρές και 2) την παθολογική έκφραση των φυσιολογικών αντιγόνων. Η παθολογική έκφραση των φυσιολογικών αντιγόνων δεν συνδέεται άμεσα με τον ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό ενός πληθυσμού κυττάρων σε ένα συγκεκριμένο στάδιο διαφοροποίησης, αλλά φαίνεται ότι αντανακλά μια υποκείμενη γενετική ανωμαλία των λευκαιμικών κυττάρων.

Είναι γνωστή η προγνωστική σημασία των χρωμοσωμιακών ανωμαλιών τόσο στην ΟΜΛ όσο και στην ΟΛΛ. Συγκεκριμένοι γονότυποι σχετίζονται με συγκεκριμένες σειρές, με συγκεκριμένο στάδιο διαφοροποίησης και επάγουν την έκφραση παθολογικών αντιγόνων.

Τα τελευταία χρόνια είναι διαθέσιμοι κάποιοι δείκτες που ανιχνεύουν μόρια σε λευκαιμικά κύτταρα με συγκεκριμένες γονιδιακές αναδιατάξεις όπως:

- το παθολογικό μόριο της chondroitin sulfate (NG2), που σχετίζεται με τις αναδιατάξεις του MLL γονιδίου
- η fusion protein CBFβ (SMMHC), που προκύπτει από την inv(16)
- η υβριδική πρωτεΐνη PML/RARα σε περιπτώσεις

M3-ΟΜΛ με t(15;17).

Επίσης έχουν βρεθεί συνδυασμοί-κατανομές (pattern) δεικτών που σχετίζονται με συγκεκριμένες γονιδιακές βλάβες.

Η t(8;21) AML 1/ETO, βρίσκεται περίπου στο 7% των ασθενών με ΟΜΛ και στο 20% των ασθενών με M2-ΟΜΛ, συνδέεται με καλή πρόγνωση και χαρακτηριστικό φαινότυπο: CD34bright, CD117pos, CD13bright, CD33neg/dim, CD15bright, CD14neg, CD11bneg, CD4neg, MPObright, HLA-DRpos, CD19 dim, Tdtpos, CD56pos/neg, CD2neg, CD7neg.

Η t(15;17) PML/RARα χαρακτηρίζει τις περιπτώσεις των ασθενών με M3-ΟΜΛ, βρίσκεται περίπου στο 5-15% των ασθενών με ΟΜΛ, συνδέεται με καλή πρόγνωση και χαρακτηριστικό φαινότυπο: CD34neg, CD117pos/neg, CD13pos, CD33pos, CD15neg, CD14neg, CD11bneg, CD4neg, MPObright, HLA-DRneg, CD19neg, Tdtneg, CD56pos/neg, CD2neg/pos, CD7neg

Άλλες χρωμοσωμιακές βλάβες που συνδέονται με χαρακτηριστικό φαινότυπο είναι η inv16 CBFβ/SM-MHC, που βρίσκεται στην M4-ΟΜΛ, η 11q23, που βρίσκεται στην M4/M5-ΟΜΛ, η t(1;22) OTT/MAL, που βρίσκεται στην M7-ΟΜΛ.

Συμπερασματικά οι περισσότερες γονοτυπικές κατηγορίες μπορούν να προβλεφθούν από τον ανοσοφαινότυπο, με διαφορετική για την κάθε κατηγορία ακρίβεια, χωρίς απόλυτη ταύτιση μεταξύ φαινοτύπου και γονοτύπου. Η κυτταρομετρία δεν μπορεί να αντικαταστήσει την PCR ή την FISH, αλλά δίνει μια καλή ένδειξη προς πια κατεύθυνση πρέπει να στραφούν αυτές οι μελέτες. Ταχεία ένδειξη ότι ο ασθενής έχει πιθανόν γονότυπο με κακή πρόγνωση μπορεί να επισπεύσει χρήσιμες για τον ασθενή κλινικές ενέργειες, όπως την τοποθέτηση κεντρικού φλεβικού καθετήρα ή την εξαγωγή των αποτελεσμάτων της μοριακής μελέτης με PCR/FISH.

Σημαντικό επίσης είναι ότι έχουμε αυτές τις πληροφορίες χωρίς επιπλέον κόστος καθώς τα αντισώματα που χρειάζονται για την πρόβλεψη των μοριακών βλαβών περιλαμβάνονται στον βασικό φαινότυπο.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΙΚΑ

Η ανοσοφαινοτυπική ανάλυση των λευκαιμικών κυττάρων δίνει σημαντικές πληροφορίες για τη διάγνωση, την κατάταξη και την παρακολούθηση των ασθενών με ΟΜΛ. Αυτές οι πληροφορίες πρέπει να συσχετίζονται με τη μορφολογία, την κυτταροχημεία καθώς και τις κυτταρογενετικές και μοριακές μελέτες. Η εισαγωγή νέων δεικτών, με ειδικότητα για τις παθολογικές πρωτεΐνες που προκύπτουν από τις

αναδιατάξεις των γονιδίων, καθώς και η ποσοτική μέτρηση της έκφρασης των αντιγόνων είναι τα νέα εργαλεία της κυτταρομετρίας ροής, για τη μελέτη και αντιμετώπιση των ασθενών με ΟΜΛ.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Concensus protocol for the flow cytometric immunophenotyping of hematopoietic malignancies. *Leukemia* 1996, 10:877-895.
2. U.S.- Canadian consensus recommendations on the immunophenotypic analysis of hematologic neoplasia by flow cytometry. *Cytometry* 1997, 5:213-263.
3. New methologic approaches for immunophenotyping acute leukemias. *Haematologica*, 2001, 86:675-692.
4. Flow cytometry in the diagnosis of acute leukemia. *Sem in Hematology* 2001, 38:124-138.
5. The immunophenotype of 177 adults with acute myeloid leukemia: proposal of a prognostic score. *Blood* 2000, 96:870-877.
6. Optimal number of reagents required to evaluate hematology neoplasias: results of an international consensus meeting. *Cytometry* 2001, 46:23-27.
7. Flow cytometric analysis of cell- surface and intracellular antigens in the diagnosis of acute leukemia. *Am J Hematol* 2001, 68:69-74.
8. Early immunophenotypical evaluation of minimal residual disease in acute myeloid leukemia identifies different patient groups and may contribute to postinduction treatment stratification. *Blood* 2001, 98:1746-1751.
9. BIOMED-I concerted action report: flow cytometric immunophenotyping of precursor B-ALL with standardized 3-stainings. BIOMED-I concerted action investigation of minimal residual disease in acute leukemia: international standardization and clinical evaluation. *Leukemia* 2001, 15:1185-1192.
10. Regenerating normal B-cell precursors during and after treatment of ALL: implications for monitoring of minimal residual disease. *Br J Haematol* 2000, 110:139-146.
11. Definition of acute biphenotypic leukemia. *Haematologica* 1997, 82:64-66.
12. Immunophenotypig of leukemia. *J Immunol Methods* 2000, 243:59-75.
13. Antigen expression patterns reflecting genotype of acute leukemias. *Leukemia* 2002, 16:1233-1258.

Γονίδια και σακχαρώδης διαβήτης

ΑΔ Παναγή

SUMMARY

PANANI DA. Genes and Diabetes mellitus. *Diabetes mellitus (DM) is a heterogeneous disease with a common finding the hyperglucemia. Type 1 diabetes is an immunological disorder characterized by selective destruction of β -cells of the pancreatic islets. The HLA genes have been shown to be in relation with this type of diabetes. Thus several studies have shown that the presence of certain combinations of DQ and DR alleles of class II HLA could either lead to an increased risk for disease development or have a protective role. Type 2 DM is a multifactorial genetic disease and several genes have been shown to be implicated in the disease pathogenesis. One special type of non insulin – dependent DM is the maturity onset diabetes of the young (MODY). Molecular studies, have shown that mutations of certain genes can cause each of the five known types of MODY. Mutations of the mitochondrial DNA are considered also as a possible cause of a certain type of non-insulin-dependent DM inherited only from the mother. The molecular genetics techniques are promised enough for the investigation and treatment of DM patients in the future. Nosokomiaka Chronika, 66, 195-201, 2004.*

Key words: diabetes mellitus, HLA genes, maturity onset diabetes of the young (MODY), mitochondrial DNA.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο Σακχαρώδης διαβήτης (Σ.Δ.) αποτελεί μία ετερογενή ομάδα διαταραχών που έχουν ως κοινό σημείο την υπεργλυκαιμία. Ο τύπος 1 του Σ.Δ. είναι αυτοάνοση διαταραχή κατά την οποία τα β – κύτταρα του παγκρέατος καταστρέφονται πλήρως, στη γένεση δε της διαταραχής αυτής συμβάλλουν γενετικοί και περιβαλλοντικοί παράγοντες. Μεταξύ των γενετικών δεικτών που έχουν συσχετιστεί με τη νόσο προέχουσα θέση κατέχουν τα HLA γονίδια. Γενετικές μελέτες έχουν δείξει ότι ορισμένοι συνδυασμοί DQ και DR αλληλόμορφων γονιδίων της τάξης II HLA μπορεί να συνοδεύονται ή από πολύ αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης της νόσου ή να προφυλάσσουν από τη νόσο. Ο τύπος 2 διαβήτου είναι μία πολυπαραγοντική γενετική νόσος για τη γένεση της οποίας έχουν ενοχοποιηθεί μεταλλάξεις διαφόρων γονιδίων εμπλεκόμενων στο μεταβολισμό της γλυκόζης στα β – κύτταρα του παγκρέατος, στο ήπαρ, στους μύς και στο λίπος. Ένας ξεχωριστός ειδικός τύπος οικογενειακού νεανικού μη ινσουλινεξαρτώμενου διαβήτου είναι ο οψίμου ενάρξεως διαβήτης των νέων (Maturity onset diabetes of the young - MODY). Μετά τη μεγάλη εξέλιξη των τεχνικών της μοριακής βιολογίας υπήρξε σημαντική πρόοδος στον καθορισμό και μελέτη των γονιδίων που προκαλούν MODY. Τα γονίδια MODY εκφράζονται στα παγκρεατικά β – κύτταρα και καθένα εξ αυτών καθορίζει και ένα διαφορετικό τύπο από τους 5 γνωστούς τύπους MODY. Μεταλλάξεις επίσης του μιτοχον-

δριακού DNA έχουν θεωρηθεί ως πιθανή αιτία μιας κατηγορίας μη ινσουλινοεξαρτώμενου Σ.Δ. ο οποίος κληρονομείται στους απογόνους μόνο από τη μητέρα. Η ραγδαία εξέλιξη της μοριακής γενετικής υπόσχεται πολλά σχετικά με τη διερεύνηση της παθογένειας του Σ.Δ. και την περαιτέρω αντιμετώπιση αυτού με μοριακές μεθόδους. **Νοσοκ. Χρονικά, 66, 195-201, 2004.**

Όροι Ευρητηρίου: Σακχαρώδης διαβήτης, HLA γονίδια, μιτοχονδριακό DNA, οψίμου ενάρξεως διαβήτης νέων (MODY).

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Ο σακχαρώδης διαβήτης (Σ.Δ.) αποτελεί από πλευράς αιτιολογίας και κλινικών εκδηλώσεων μία ετερογενή ομάδα διαταραχών, που έχουν ως κοινό σημείο την υπεργλυκαιμία. Υπάρχουν δύο τύποι Σ.Δ., ο τύπος 1 και ο τύπος 2. Πλην των δύο αυτών τύπων υπάρχουν και άλλοι ειδικοί τύποι διαβήτου που οφείλονται σε γενετικά ελαττώματα των β-κυττάρων παγκρέατος (όπως σύνδρομο MODY-Maturity Onset Diabetes Mellitus of the Young-, σύνδρομο από διαταραχές μιτοχονδριακού DNA) ή σε γενετικά ελαττώματα στη δράση της ινσουλίνης (τύπος A ανοχής στην ινσουλίνη). Υπεργλυκαιμία όμως ή ηλαττωμένη ανοχή στη γλυκόζη ανευρίσκεται σε πλείστες άλλες καταστάσεις, οι οποίες αποτελούν τα λεγόμενα δευτεροπαθή σύνδρομα διαβήτου (όπως σύνδρομο Cushing, μεγαλακρία, σύνδρομο Kleinefelter, σύνδρομο Down κ.α.) (1-3).

ΔΙΑΒΗΤΗΣ ΤΥΠΟΥ 1

Ο τύπος 1 διαβήτου είναι μία αυτοάνοση διαταραχή κατά την οποία τα β-κύτταρα του παγκρέατος, τα οποία παράγουν την ινσουλίνη, καταστρέφονται πλήρως. Η αιτία της νόσου δεν είναι γνωστή, φαίνεται όμως ότι γενετικοί παράγοντες μαζί με περιβαλλοντικούς παίζουν ένα σημαντικό ρόλο στη γένεσή της. Η μελέτη του οικογενειακού ιστορικού, απ' την οποία προκύπτει ηυξημένη συχνότητα της νόσου μεταξύ πρώτου βαθμού συγγενών και μονοζυγωτικών διδύμων παρέχει ενδείξεις, για την ύπαρξη γενετικής βάσης στη νόσο. Ατομα με ένα γονέα ή αδελφό με τύπο 1 διαβήτου έχουν χονδρικά 5% κίνδυνο κατά τη διάρκεια της ζωής τους να αναπτύξουν διαβήτη, ενώ η συχνότητα εμφάνισης της νόσου μεταξύ μονοζυγωτικών διδύμων είναι περίπου 30-50%. Μεταξύ διζυγωτικών διδύμων ο κίνδυνος εκδήλωσης της νόσου ανέρχεται στο 5%. Η μη συμπτωτικότητα της νόσου στους μονοζυγωτικούς διδύμους σε ποσοστό 100%, όπως θα αναμενόταν, δείχνει προφανώς ότι τα υπεύθυνα γονίδια που συνδέονται

με ευαισθησία για ανάπτυξη τύπου 1 διαβήτου έχουν χαμηλή διεισδυτικότητα, ενώ παράλληλα συνηγορεί υπέρ του γεγονότος ότι ο τύπος 1 διαβήτου δεν οφείλεται μόνο σε γενετικούς παράγοντες, αλλά και σε περιβαλλοντικούς. Μεταξύ των παραγόντων περιβάλλοντος που έχουν ενοχοποιηθεί αναφέρονται διάφορα είδη ιών, τοξίνες, τροφές κ.ά. Επομένως από τις μέχρι τώρα γενετικές μας γνώσεις φαίνεται ότι ο τύπος 1 διαβήτου είναι μία πολύπλοκη πολυπαραγοντική γενετική νόσος, στην οποία διάφορα γονίδια αλληλεπιδρούν μεταξύ τους καθώς και με παράγοντες περιβάλλοντος, οδηγώντας έτσι σε ένα συνδυασμό παραγόντων κινδύνου, ενοχοποιημένων για την ανάπτυξη της νόσου. Το είδος των παραγόντων αυτών διαφέρει μεταξύ των διαφόρων φυλών και των διαφόρων ομάδων ηλικίας των ασθενών. Οσον αφορά τους γενετικούς παράγοντες, είναι γνωστό σήμερα ότι έχουν καθοριστεί και μελετηθεί τρεις βασικές θέσεις γονιδίων (gene loci), οι οποίες σχετίζονται με την ευαισθησία ανάπτυξης διαβήτου τύπου 1. Οι θέσεις αυτές περιλαμβάνουν: IDDM1 (αντιστοιχεί στα γονίδια HLA-DR και HLA-DQ), IDDM2 (αντιστοιχεί στο γονίδιο ινσουλίνης-INS) και IDDM12 (αντιστοιχεί στο γονίδιο CTLA4) (4).

Μεταξύ των γενετικών αυτών δεικτών που έχουν συσχετισθεί με τη νόσο προέχουσα θέση κατέχουν τα HLA γονίδια, τα οποία εντοπίζονται στα βραχεία σκέλη του χρωμοσώματος 6 (6p). Εκτενείς μελέτες έχουν δείξει ότι η ειδικότητα των HLA γονιδίων που συνδέεται με ηυξημένο κίνδυνο για τη νόσο διαφέρει μεταξύ λαών διαφόρων εθνικοτήτων. Τα HLA αντιγόνα είναι πολύπλοκες γλυκοπρωτεΐνες κυτταρικής μεμβράνης που παρουσιάζουν μεγάλη ποικιλία λόγω πολυμορφίας των HLA γονιδίων που τα κωδικοποιούν. Αρχικά βρέθηκε μία σύνδεση του Σ.Δ. τύπου 1 με τα αλληλόμορφα γονίδια HLA τάξης I, τα B8 και B15, ενώ αντίθετα παρατηρήθηκε μία αρνητική σύνδεση αυτού με το αλληλόμορφο B7. Μεταγενέστερες μελέτες απέδειξαν μία πλέον ισχυρή σύνδεση μεταξύ του τύπου 1 ΣΔ και των αντιγόνων HLA τάξης II, DR3 και DR4. Εννεήντα πέντε τοις εκατό των ασθενών με τύπο 1 διαβήτου φέρουν DR3 ή/και DR4 αντι-

γόνα, ενώ στο γενικό πληθυσμό η συχνότητα αυτών ανέρχεται στο 45%. Επειδή τα γονίδια που κωδικοποιούν DR3 και DR4 αντιγόνα απαντούν σε μεγάλη συχνότητα στο γενικό πληθυσμό, θεωρήθηκε πιθανό ότι αυτά από μόνα τους δεν αποτελούν πραγματικούς παράγοντες ευαισθησίας στη νόσο, αλλά άλλα γονίδια ευρισκόμενα πλησίον αυτών καθορίζουν την ύπαρξη ευαισθησίας στη νόσο. Μελέτες με τις νέες τεχνικές του DNA απέδειξαν την ύπαρξη μιας άλλης ομάδας γονιδίων τάξης II HLA, των αλληλομόρφων DQ, που συνδέονται πιο ισχυρά με τον τύπο 1 διαβήτη (1,4-9).

Κάθε αλληλόμορφο γονίδιο τάξης II HLA κωδικοποιεί για τη σύνθεση μιας α και μιας β πρωτεϊνικής αλυσού στην επιφάνεια των κυττάρων, που είναι υπεύθυνες για την παρουσίαση αντιγόνων στα ανοσολογικά δραστικά Τ-κύτταρα. Στα DQ μόρια και οι δύο αλυσείς α και β παρουσιάζουν πολυμορφίες και έτσι η περιγραφή ενός DQ μορίου απαιτεί δύο αριθμούς π.χ. DQA₁*0501, DQB₁*0201. Η περιγραφή αυτή δείχνει την α₁ αλυσού του γονιδίου DQ, αντιγόνο 5 παραλλαγή 1 και τη β₁ αλυσού του γονιδίου DQ, αντιγόνο 2 παραλλαγή 1. Στα DR μόρια η α-άλυσος είναι σταθερή, ενώ πολυμορφίες παρουσιάζει μόνο η β-άλυσος και ως εκ τούτου η περιγραφή του μορίου περιλαμβάνει ένα μόνο αριθμό για τη β-άλυσος, π.χ. DRB₁*0301. Η περιγραφή αυτή δείχνει τη β₁ αλυσού του γονιδίου DR, αντιγόνο 3 παραλλαγή 1. Μεταξύ των διαφόρων ατόμων παρατηρείται συνύπαρξη των αλληλόμορφων DR και DQ πιο συχνά απ' ό,τι θα αναμενόταν από την τύχη (linkage disequilibrium). π.χ. DQB₁*0301 και DQB₁*0302 συνδέονται με DR4 απλοτύπους και DQB₁*0201 με DR3, ενώ DQB₁*0502 και DQB₁*0602 συνδέονται με DR2. Μερικά αλληλόμορφα τύπου II HLA συνδέονται με ευαισθησία στο διαβήτη τύπου 1, ενώ άλλα με προφύλαξη από τη νόσο. Η σύνθεση τη β-άλυσου, η αλληλουχία δηλαδή των αμινοξέων, φαίνεται να παίζει σημαντικό ρόλο στον καθορισμό της ύπαρξης ή μη κινδύνου ανάπτυξης της νόσου. Έτσι η ύπαρξη ασπαρτικού οξέος στη θέση 57 στη β-άλυσος του DQ μορίου παίζει προστατευτικό ρόλο για την ανάπτυξη της νόσου, ενώ οι περισσότεροι ασθενείς που αναπτύσσουν τη νόσο έχουν άλλο αμινοξύ ως αλανίνη σ' αυτή τη θέση. Επίσης η ύπαρξη αργινίνης στη θέση 52 της α-άλυσου του DQ μορίου αυξάνει τον κίνδυνο για διαβήτη, ενώ η μη ύπαρξη αργινίνης σ' αυτή τη θέση ελαττώνει τον κίνδυνο. Ο συνδυασμός DQ*non Asp και DQ*Arg 52 φαίνεται να είναι ιδιαίτερα διαβητογόνος. Επίσης ορισμένοι συνδυασμοί DQ και DR αλληλομόρφων συνδέονται ή με μεγαλύτερο κίνδυνο ανάπτυξης τύπου 1 διαβήτη ή με προφύλαξη από τη

νόσο. Έτσι οι απλότυποι DRB₁*0301, DQA₁*0501, DQB₁*0201 και DRB₁*0401, DQA₁*0301, DQB₁*0302 συνοδεύονται με πολύ ηυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης της νόσου αντιπροσωπεύοντας το 40% περίπου των παιδιών που αναπτύσσουν διαβήτη. Αντίθετα ο απλότυπος DRB₁*1501, DQA₁*0102, DQB₁*0602 συνοδεύεται με τη μεγαλύτερη προφύλαξη απ' τη νόσο. Αδέλφια ασθενών με τύπο 1 διαβήτη είναι πιο πιθανό να αναπτύξουν διαβήτη, εάν έχουν γονότυπο HLA ακριβώς τον ίδιο, του κινδύνου αυτού ανερχομένου άνω του 20% μέχρι της ηλικίας των 30 ετών. Τα HLA γονίδια ευθύνονται περίπου για το 50% του γενετικού κινδύνου ανάπτυξης του τύπου 1 διαβήτη (1,4,7-10).

Η θέση IDDM₂ αντιστοιχεί στο γονίδιο ινσουλίνης στα βραχεία σκέλη του χρωμοσώματος 11. Ένας μεταβαλλόμενος αριθμός διαδοχικά επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών (Variable Number of Tandem Repeats-VNTR) έχουν περιγραφεί για τη γονιδιακή αυτή θέση. Υπάρχουν διάφορα αλληλόμορφα των VNTR. Είναι ενδιαφέρον, ότι διάφορες μελέτες έχουν δείξει ότι ορισμένα αλληλόμορφα VNTR επηρεάζουν την έκφραση του γονιδίου ινσουλίνης στο θύμο αδέν, επιδρώντας στην ανάπτυξη ανοχής στην ινσουλίνη (4).

Η γονιδιακή θέση IDDM₁₂ (στο χρωμόσωμα 2q33) μπορεί να ρυθμίζει γενετικά την ανοσολογική απάντηση. Το γονίδιο CTLA₄ είναι υποψήφιο για την ανάπτυξη αυτοάνοσων νοσημάτων δεδομένου ότι η παραγόμενη απ' αυτό πρωτεΐνη λειτουργεί ως αρνητικός ρυθμιστής της ενεργοποίησης των Τ-λεμφοκυττάρων (4). Πλην των ανωτέρω έχουν περιγραφεί και άλλοι γενετικοί δείκτες σχετιζόμενοι με τη νόσο που εντοπίζονται σε άλλα χρωμοσώματα ως το 3 και 8 (1).

ΔΙΑΒΗΤΗΣ ΤΥΠΟΥ 2

Ο διαβήτης τύπου 2 αποτελεί μία πολύπλοκη μεταβολική διαταραχή που χαρακτηρίζεται από σχετική ανεπάρκεια ινσουλίνης, ανοχή στην ινσουλίνη και ηυξημένη παραγωγή γλυκόζης από το ήπαρ. Η φύση όμως και η μοριακή βάση της πρωτοπαθούς βλάβης στο διαβήτη παραμένει ακόμα άγνωστη. Η νόσος είναι πολυπαραγοντική οφειλόμενη σε αλληλεπιδράσεις μεταξύ πολλών γονιδίων και περιβαλλοντικών παραγόντων, οι γενετικοί όμως παράγοντες φαίνεται να παίζουν τον κύριο λόγο. Η γενετική βάση της νόσου στηρίζεται κυρίως σε μελέτες διδύμων απ' τις οποίες προκύπτει ότι η επίπτωση της νόσου φθάνει στο 60% μεταξύ μονοζυγωτικών διδύμων και σε 15-20% περίπου μεταξύ διζυγωτικών. Υπέρ της γενετι-

κής βάσης συνηγορεί επίσης η ύπαρξη οικογενούς προδιάθεσης για τη νόσο, καθώς και η ύπαρξη σημαντικής διαφοράς στη συχνότητα εμφάνισης της νόσου μεταξύ των διαφόρων λαών. Τα τελευταία χρόνια έγινε σαφής η γενετική αιτιολογία για πολλά σπάνια σύνδρομα διαβήτη, γεγονός που δημιουργεί ελπίδες για καλύτερη γενετική ανάλυση στο μέλλον του διαβήτη τύπου 2. Όπως αναφέρθηκε, ο διαβήτης τύπου 2 είναι προφανώς μία πολυγονιδιακή νόσος. Για τη μοριακή ανάλυση της νόσου οι προσπάθειες των ερευνητών στράφηκαν στη μελέτη των γονιδίων που εμπλέκονται με το μεταβολισμό της γλυκόζης στα β-κύτταρα του παγκρέατος, στο ήπαρ, στους μύς και στο λίπος. Μεταλλάξεις των γονιδίων αυτών (όπως του γονιδίου της ινσουλίνης, του υποδοχέα της ινσουλίνης, της γλυκοκινάσης, της συνθετάσης του γλυκαγόνου κ.α.) θα μπορούσαν να παίζουν πρωτεύοντα ρόλο στην παθογένεια της νόσου. Παρ' όλα ταύτα τα μέχρι τούδε μοριακά δεδομένα δεν αποδεικνύουν σαφείς συσχετίσεις μεταξύ των γενετικών αυτών διαταραχών και της νόσου. Είναι γνωστό σήμερα ότι μεταλλάξεις του γονιδίου της γλυκοκινάσης συνδέονται με το σύνδρομο MODY 2. Ο ρόλος όμως των μεταλλάξεων αυτών στο κοινό ΣΔ τύπου 2 δεν έχει αποσαφηνισθεί. Από μελέτες οικογενειών μέσω σύνδεσης (linkage analysis) με μικροδορυφορικούς πολύμορφους δείκτες (microsatellite marker polymorphisms) που βρίσκονται στο 5' και 3' άκρο του γονιδίου της γλυκοκινάσης βρέθηκαν συσχετίσεις μεταξύ των γενετικών αυτών δεικτών και του διαβήτη τύπου 2. Μοριακή όμως ανάλυση του γονιδίου απέτυχε να εντοπίσει κάποια βασική μετάλλαξη σχετιζόμενη με τη νόσο. Μεταλλάξεις του γονιδίου της γλυκοκινάσης παρατηρούνται σε ποσοστό μικρότερο του 0,5% στο διαβήτη τύπου 2, ανευρίσκονται όμως σε πολύ μεγαλύτερο ποσοστό στο διαβήτη της κήσης (1,11-16).

Το ενδιαφέρον των ερευνητών στράφηκε επίσης στο γονίδιο της ινσουλίνης που εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 11, ως υποψήφιο γονίδιο ενοχοποιούμενο για την ανάπτυξη της νόσου. Μετά την απομόνωση του γονιδίου καθορίστηκαν γενετικοί δείκτες, ως πολυμορφίες μήκους θραύσματος του DNA από περιοριστικά ένζυμα (RFLP) ή μεταβαλλόμενος αριθμός διαδοχικά επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών (Variable Number Tandem Repeats-VNTR), ευρισκόμενοι κοντά στο γονίδιο. Παρ' όλα ταύτα εκτενείς μελέτες οικογενειών δεν απέδειξαν σαφή συσχέτιση των γενετικών αυτών δεικτών με ύπαρξη υψηλής ευαισθησίας για διαβήτη τύπου 2. Επιπρόσθετα σε διάφορες οικογένειες με διαβήτη τύπου 2 καθορίστηκαν σημεικές μεταλλάξεις του γονιδίου, ο ρόλος των οποίων

όμως δεν φαίνεται να σχετίζεται άμεσα με την ανάπτυξη της νόσου. Εξάλλου σε ορισμένους Αφρικανο-Αμερικανούς με διαβήτη τύπου 2 παρατηρήθηκε η έκθεση μιας αλληλουχίας 8bp στην περιοχή του προαγωγέα (promoter) του γονιδίου της ινσουλίνης από τη θέση -322 έως -315. Τούτο θεωρήθηκε ως πιθανό να συνδέεται με ευαισθησία για ανάπτυξη διαβήτη τύπου 2 (1,11).

Μιτοχονδριακός Διαβήτης

Η προσοχή των ερευνητών στράφηκε και στη μελέτη του DNA των μιτοχονδρίων. Είναι γνωστό ότι μερικοί τύποι μη ινσουλινο-εξαρτώμενου διαβήτη μεταδίδονται στους απογόνους μόνο από τη μητέρα. Η κληρονομικότητα του μιτοχονδριακού DNA είναι αποκλειστικά μητρικής προέλευσης, μεταλλάξεις δε αυτού έχουν συνδεθεί με ορισμένα νευρολογικά σύνδρομα, ορισμένα των οποίων συνοδεύονται με μη ινσουλινοεξαρτώμενο Σ.Δ. Το μιτοχονδριακό DNA κωδικοποιεί διάφορα γονίδια, όπως τα γονίδια για ένζυμα οξειδωτικής φωσφορυλίωσης και για ορισμένα μόρια tRNA, μεταλλάξεις δε αυτού έχουν θεωρηθεί ως πιθανά αίτια μη ινσουλινοεξαρτώμενου Σ.Δ. Η συχνότητα εμφάνισης των μεταλλάξεων αυτών είναι περίπου 1% σε μη επιλεγμένο πληθυσμό με διαβήτη τύπου 2 (1). Η πιο συχνή μετάλλαξη μιτοχονδριακού DNA είναι η A3243G, η οποία κωδικοποιεί για το t RNA (Leu, UUR) γονίδιο (17). Ο μιτοχονδριακός διαβήτης που σχετίζεται με την ανωτέρω μετάλλαξη γίνεται κλινικά έκδηλος στην ηλικία περίπου των 40 ετών. Ο διαβήτης μπορεί να είναι τύπου 1 ή τύπου 2, τούτου εξαρτώμενου από τη βαρύτητα της ινσουλινοπενίας. Ασθενείς με τύπο 2 διαβήτη μπορεί αρχικά να θεραπευθούν με δίαιτα και σουλφονουρία, ενώ η μετφορμίνη αντενδείκνυται λόγω του κινδύνου γαλακτικής οξέωσης (17).

ΟΨΙΜΟΥ ΕΝΑΡΞΕΩΣ ΔΙΑΒΗΤΗΣ ΤΩΝ ΝΕΩΝ

Ένας ξεχωριστός ειδικός τύπος μη ινσουλινοεξαρτώμενου διαβήτη που εκδηλώνεται σε άτομα ηλικίας μικρότερης των 40 ετών είναι ο οψίμου ενάρξεως διαβήτης των νέων (Maturity Onset Diabetes of the Young - MODY). Ο όρος αυτός χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά το 1964 από τους Faján και συν (18) για να περιγράψουν την κλινική οντότητα του οικογενειακού νεανικού μη ινσουλινοεξαρτώμενου διαβήτη χωρίς παχυσαρκία. Αργότερα, στη δεκαετία του 1970, περιγράφησαν περιπτώσεις MODY, που ενέφάνιζαν αυτόσωμο επικρατούντα χαρακτήρα κληρονομικότητας (19).

Αντίθετα με τον διαβήτη τύπου 2, όπου η γενετική ανάλυση στηριζόμενη στα οικογενειακά δένδρα πολλών γενεών είναι τρομερά δύσκολη (μεγάλη ηλικία εκδήλωσης νόσου, θνητότητα λόγω νόσου και προβλήματα στην ανάλυση μιάς πολυγονιδιακής και ετερογενούς νόσου), οι οικογένειες MODY είναι ιδανικές για γενετική ανάλυση. Η εκδήλωση της νόσου σε μικρή ηλικία καθιστά ευκολότερη τη συγκέντρωση στοιχείων των οικογενειακών δένδρων πολλών γενεών. Από τη μελέτη των οικογενειακών δένδρων φαίνεται ότι το MODY προκαλείται από ένα παθολογικό γονίδιο με μεγάλη διεισδυτικότητα που παρουσιάζει αυτόσωμο επικρατούντα χαρακτήρα κληρονομικότητας. Τα κατωτέρω κριτήρια καθορίζουν κλινικά το σύνδρομο MODY (1,2,20-21).

- α) Ένα ή δύο τουλάχιστον μέλη της οικογένειας με εκδήλωση διαβήτη πριν την ηλικία των 25.
- β) Μετά τη διάγνωση της νόσου επί πέντε τουλάχιστον χρόνια δεν απαιτείται θεραπεία με ινσουλίνη ή οι ασθενείς παρουσιάζουν ηυξημένα επίπεδα C πεπτιδίου.
- γ) Εκδήλωση σε τρεις τουλάχιστον κάθετα γενεές νεανικού μη ινσουλινοεξαρτώμενου διαβήτη.

Τα τελευταία χρόνια μετά τη μεγάλη εξέλιξη των τεχνικών της μοριακής βιολογίας υπήρξε σημαντική πρόοδος στον καθορισμό και μελέτη γονιδίων που προκαλούν MODY. Τα γονίδια αυτά που ονομάζονται γονίδια MODY εκφράζονται στα παγκρεατικά β-κύτταρα, καθώς η κύρια παθοφυσιολογία της νόσου είναι η ηλαττωμένη έκκριση της ινσουλίνης. Τα γονίδια που έχουν περιγραφεί μέχρι τώρα στο MODY είναι: η γλυκοκινάση (καθορίστηκε το 1992), τα γονίδια HNF1α (Hepatocyte Nuclear Factor 1α) και HNF4α (Hepatocyte Nuclear Factor 4α) που καθορίστηκαν το 1996, το γονίδιο IPF1 (Insulin Promoter Factor 1) που καθορίστηκε το 1997 και το γονίδιο HNF1β (Hepatocyte Nuclear Factor 1β) που καθορίστηκε το 1997. Καθένα απ' τα γονίδια αυτά χαρακτηρίζουν και ένα διαφορετικό τύπο MODY.

MODY 1

Αρχικά από μελέτες οικογενειών περιγράφηκε μία σύνδεση (linkage analysis) μεταξύ της κληρονομικότητας του MODY και μιας περιοχής του χρωμοσώματος 20 (20q₁₂₋₁₃) κοντά στο γονίδιο αδενοσινο-διαμινάσης (ADA). Επειδή για πρώτη φορά το MODY συνδέθηκε με μια περιοχή γονιδιώματος το MODY-20q ονομάστηκε MODY₁. Μεταγενέστερα δείχθηκε ότι το MODY₁ συνδέεται με μετάλλαξη του γονιδίου HNF4α, που κωδικοποιεί ένα παράγοντα μεταγραφής των β-κυττάρων παγκρέατος και των ηπατικών κυττάρων.

Έχουν περιγραφεί διάφορες μεταλλάξεις του γονιδίου, όπως μία ανερμηνεύσιμη (non-sense) στο εξώνιο 7 (2,20,22-24).

MODY 2

Το 1992 από μελέτες οικογενειών δείχθηκε μία σύνδεση μεταξύ του MODY και του γονιδίου γλυκοκινάσης (GCK), που βρίσκεται στα βραχεία σκέλη του χρωμοσώματος 7. Το γονίδιο περιλαμβάνει 12 εξώνια και η έκφρασή του ελέγχεται από δύο προαγωγείς (promoters). Οι μεταλλάξεις του γονιδίου GCK οδηγούν σε μία ηλαττωμένη ενζυμική δραστηριότητα και σε ελάττωση της ευαισθησίας των β-κυττάρων παγκρέατος στα επίπεδα γλυκόζης του πλάσματος, δηλαδή ινσουλίνη δεν εκκρίνεται μέχρι τα επίπεδα γλυκόζης του πλάσματος να είναι ήπια ανεβασμένα (2,20). Το γονίδιο απομονώθηκε το 1992 (25) και οι ερευνητές καθόρισαν δύο επαναλαμβανόμενες μικροδορυφορικές πολυμορφίες CA (microsatellite repeat polymorphisms) ως γενετικούς δείκτες συνδεόμενους με το γονίδιο για μελέτες οικογενειών (linkage analysis). Αργότερα καθορίστηκαν διάφορες μεταλλάξεις του γονιδίου. Σήμερα έχουν περιγραφεί πάνω από 45 μεταλλάξεις, οι περισσότερες των οποίων αφορούν τα εξώνια 5, 6, 7 και 8, τα οποία κωδικοποιούν για την περιοχή του ενζύμου που δεσμεύει τη γλυκόζη (26,27). Παρά την ύπαρξη μεγάλης ποικιλίας στις μεταλλάξεις του γονιδίου, ο φαινότυπος του MODY2 δεν διαφέρει ουσιαστικά. Τούτο χαρακτηρίζεται από ήπια υπεργλυκαιμία που εκδηλώνεται κατά την παιδική ή εφηβική ηλικία ή ενίοτε σε νεαρά ενήλικα άτομα. Οι ασθενείς είναι ασυμπτωματικοί και δεν χρήζουν θεραπείας πλην σπανιστών περιπτώσεων. Κατά τη διάρκεια της κύησης οι ασθενείς καθίστανται συμπτωματικοί και οι περισσότεροι χρειάζονται θεραπεία με ινσουλίνη. Λόγω ήπιας υπεργλυκαιμίας και απουσίας συμπτωμάτων οι ασθενείς με MODY2 πολλές φορές δεν διαγιγνώσκονται. Ως εκ τούτου η συχνότητα εμφάνισης των μεταλλάξεων του γονιδίου γλυκοκινάσης είναι δύσκολο να υπολογισθεί. Παρόλα ταύτα εκτενείς μελέτες δείχνουν, ότι υπάρχουν σαφείς διαφορές στη συχνότητα εμφάνισης της νόσου μεταξύ των διαφόρων λαών (56% στη Γαλλία και <1% στην Ιαπωνία) (2,20).

MODY 3

Είναι το συχνότερο μεταξύ των συνδρόμων MODY και το γονίδιο MODY3 (HNF1a) εντοπίστηκε στο χρωμόσωμα 12. Περίπου 25% των οικογενειών με μετάλλαξη του γονιδίου HNF1a φέρουν μία έκθεση C στη

σειρά κυτοσινών στο εξώνιο 4. Πάνω από 45 άλλες μεταλλάξεις έχουν περιγραφεί και περιλαμβάνουν μετατοπιστικές (Frameshift), παρερμηνεύσιμες (missense) και ανερμηνεύσιμες (nonsense) μεταλλάξεις. Ο HNF1a είναι παράγοντας μετεγγραφής που επιδρά στην έκφραση πολλών γονιδίων σε διάφορους ιστούς όπως ήπαρ, νεφρούς, πάγκρεας. Η δράση του ρυθμίζεται και από τον HNF4a. Ο μηχανισμός προκλήσεως του διαβήτη δεν είναι πλήρως διευκρινισμένος, αλλά πιθανόν να σχετίζεται με την αλλαγή στην έκφραση άλλων γονιδίων, όπως του γονιδίου της ινσουλίνης. Σε ασθενείς με μετάλλαξη HNF1a η κύρια ανωμαλία είναι η ανεπάρκεια της ανάπτυξης των β-κυττάρων παγκρέατος, η οποία στη συνέχεια καταλήγει σε μία προοδευτική απώλεια της λειτουργίας τους. Οι περισσότεροι ασθενείς με MODY3 κάτω της ηλικίας των 10 ετών έχουν φυσιολογική τιμή γλυκόζης νηστείας και φυσιολογική ανοχή στη γλυκόζη. Λόγω όμως προοδευτικής προφανώς επιδείνωσης της λειτουργίας των β-κυττάρων οι ασθενείς καταλήγουν σε κλινική διάγνωση διαβήτη σε ηλικία 20-25 ετών. Οι μεταλλάξεις του γονιδίου HNF1a έχουν υψηλή συνήθως διεισδυτικότητα, με τους περισσότερους ασθενείς να εκδηλώνουν διαβήτη μέχρι την ηλικία των 25 ετών (2,20,28-30).

MODY 4

Το γονίδιο IPF1 παίζει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση έκκρισης της ινσουλίνης και την ανάπτυξη του παγκρέατος. Όταν το μεταλλαγμένο γονίδιο ευρίσκεται σε ετερόζυγη κατάσταση προκαλείται το MODY 4, ενώ σε ομόζυγη κατάσταση τούτο προκαλεί αγενεσία του παγκρέατος. Έχει περιγραφεί μια εξάλειψη της κυτοσίνης (C) στο κωδικόνιο 63, που καταλήγει σε μια μετατοπιστική μετάλλαξη (Frameshift) (2,20,31).

MODY 5

Μεταλλάξεις του γονιδίου HNF1β συνδέθηκαν με το MODY 5. Ο παράγων HNF1β ρυθμίζει τη μετεγγραφή του HNF4a, ο οποίος στη συνέχεια ρυθμίζει την έκφραση του γονιδίου HNF1a (2,20,32).

Όπως φαίνεται από τα ανωτέρω η ανάπτυξη της μοριακής γενετικής βοήθησε σημαντικά στη μελέτη των MODY. Έτσι είναι δυνατόν να διαγνωσθούν οι διάφοροι τύποι MODY και να προβλεφθεί η πρόγνωση και η κλινική πορεία των ασθενών.

Ασθενείς με μεταλλάξεις του γονιδίου της γλυκοκινάσης (MODY2) δεν χρήζουν μακράς κλινικής παρακολούθησης, δίδεται όμως η γενετική συμβουλή για στενή ιατρική παρακολούθηση αυτών κατά τη διάρ-

κεια της κήσης. Αντίθετα ασθενείς με MODY3 πρέπει να τυγχάνουν στενής ιατρικής παρακολούθησης, λόγω προοδευτικής επιδείνωσης του διαβήτη με συνύπαρξη επιπλοκών μικροαγγειοπάθειας. Εξάλλου η μοριακή ανάλυση συμβάλλει στην ανάδειξη ατόμων υποψηφίων να αναπτύξουν διαβήτη μεταξύ των συγγενών ασθενών με MODY. Σε συγγενείς που δεν φέρουν τη μετάλλαξη γονιδίου ο κίνδυνος ανάπτυξης διαβήτη είναι ακριβώς ο ίδιος όπως στο γενικό πληθυσμό και ως εκ τούτου δεν χρειάζεται ετήσιος έλεγχος της τιμής γλυκόζης του αίματος.

Συμπερασματικά: Η ραγδαία εξέλιξη της μοριακής γενετικής υπόσχεται πολλά σχετικά με τη διερεύνηση της παθογένειας του Σ.Δ. και την περαιτέρω αντιμετώπιση αυτού με μοριακές μεθόδους όπως γονιδιακή θεραπεία.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Pickup JC, Williams G. Textbook of Diabetes. Second Edition, Blackwell Science. Vol. 1, 1997.
- Winter WE, NaKamura M, House D. Monogenic diabetes mellitus in youth. The MODY Syndromes. *Endocrinol Metabol Clin North Am* 1999, 28:765-785.
- Mirza SA, Leahy JL. Secondary forms and genetic syndromes of diabetes mellitus. *In: Medical Management of Diabetes Mellitus* Ed by JL Leahy, NG Clark, WT Cefalu Marcel Dekker, Inc. 2000, New York-Basel p. 217.
- Pugliese A. Genetics of type 1 diabetes. *Endocrinol Metab Clin N Am* 2004, 33:1-16.
- Dahlquist G. Potentials and pitfalls in neonatal screening for type 1 diabetes. *Acta Paediatr* 1999, 432(Suppl):80-82.
- Stephens E, Eisenbarth GS. Type 1A diabetes as immunological disorder. *In: Medical Management of Diabetes Mellitus*. Ed. By JL Leahy, NG Clark, WT Cefalu. Marcel Dekker, Inc. 2000, New York-Basel. p. 19.
- Beisswenger PJ. Type 1 diabetes. *In: Medical Management of Diabetes Mellitus*. Ed. by JL Leahy, NG Clark, WT Cefalu. Marcel Dekker, Inc 2000 New York-Basel. p. 95.
- Chowdhury TA, Mijovic CH, Barnett AH. The etiology of type1 diabetes. *Baillieres Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 1999, 13:181-95.
- Friday PR, Trucco M, Pietropaolo M. Genetic of type 1 diabetes mellitus. *Diabetes Nutr Metab* 1999, 12:3-26.
- Sanjeevi CB. HLA-DQ6-mediated protection in IDDM. *Hum Immunol* 2000, 61:148-53.
- Allan Vaag. On the pathophysiology of late onset non-insulin dependent diabetes mellitus. Current controversies and new insights. *Dan Medl Bull* 1999, 46:197-234.
- Leahy JL. Type 2 diabetes mellitus. *In: Medical Management of Diabetes Mellitus* Ed. by JL Leahy, NG Clark, WT

- Cefalu. Marcel Dekker, Inc. 2000, New York-Basel p. 115.
13. Sankaranarayanan K, Chakraborty R, Boerwinkle EA. Ionizing radiation and genetic risks VI. Chronic multifactorial diseases: a review of epidemiological and genetic aspects of coronary heart disease, essential hypertension and diabetes mellitus. *Mutat Res* 1999, 436:21-57.
 14. Natrass M, Bailey CJ. New agents for type 2 diabetes. *Baillieres Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 1999, 13:309-329.
 15. Pedersen O. Genetics of insulin resistance. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 1999, 107:113-138.
 16. Das UN. Glut-4, tumor necrosis factor, essential fatty acids and daf-genes and their role in insulin resistance and non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, 1999, 60:13-20.
 17. Maassen JA, Hart LM, Essen E, Heine R, Nispels G, Jahangir RS et al. Mitochondrial diabetes. *Diabetes* 2004, 53, S103-S109.
 18. Fajans SS, Conn JW. Prediabetes, subclinical diabetes and latent clinical diabetes: Interpretation diagnosis and treatment. In: Leibel DS, Wrenshall GS (eds). *On the Nature and Treatment of Diabetes*, Amsterdam, Excerpta Medical 1965, p. 641.
 19. Tattersall RB. Mild familial diabetes with dominant inheritance. *Q J Med* 1974,170:339-57.
 20. Hattersley AT. Maturity-onset diabetes of the Young; Clinical heterogeneity explained by genetic heterogeneity. *Diabetic Medecine*, 15: 15-24, 1998.
 21. Guazzarotti L, Bartolotta E, Chiarelli F. Maturity onset diabetes of the young (MODY): a new challenge for pediatric diabetologists. *J Pediatr Endocrinol Metab* 1999, 12:487-97.
 22. Bell GI, Xiang KS, Newman MV, et al. Gene for non insulin dependent diabetes mellitus (maturity-onset diabetes of the young subtype) is linked to DNA polymorphism on human chromosome 20q. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991, 88:1484-88.
 23. Vamagata K, Futura H, Oda N, et al. Mutations in the hepatocyte nuclear factor 4 alpha gene in maturity-onset diabetes of the young (MODY 1) *Nature*, 1996, 384:458-460.
 24. Lindner T, Gagnoli C, Futura H, et al. Hepatic function in a family with a nonsense mutation (R154x) in the hepatocyte nuclear factor-4a/MODY 1 gene. *J Clin Invest* 1997, 100:1400-1405.
 25. Tanizawa Y, Matsutani A, Chiu KC, Permutt MA. Human glucokinase gene: isolation, structural characterization and identification of a microsatellite repeat polymorphism. *Mol Endocrinol* 1992, 6:1070-1081.
 26. Froguel P, Vaxillaire M, Sun F, et al. Close linkage of glucokinase locus on chromosome 7p to early-onset non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Nature* 1992, 356:162.
 27. Froguel P, Zouali H, Vionnet N, et al. Familial hyperglycemia due to mutations in glucokinase. Definition of a subtype of diabetes mellitus. *N Engl J Med* 1993, 328:697-702.
 28. Vamagata K, Oda N, Kaisaki P, et al. Mutations in the hepatic nuclear factor 1 alpha gene in maturity-onset diabetes of the young (MODY 3). *Nature* 1996, 384:455-458.
 29. Vaxillaire M, Boccio V, Philippi A, et al. A gene for maturity onset diabetes of the young (MODY) maps to chromosome 12q. *Nature Genetics* 1995, 9:418-423.
 30. Dronsfield MJ, Tack CJJ, Bain SC, Hattersley AT. Linkage of the gene for maturity-onset diabetes of the young (MODY) with markers on the long arm of chromosome 12. *Diabetologia* 1995, 38:229.
 31. Stoffers DA, Ferrer J, Clarke WL, Habener JF. Early-onset type II diabetes mellitus (MODY 4) linked to IPF 1. *Nat Genet* 1997, 17:138-139.
 32. Horikawa Y, Iwasaki N, Hara M, et al. Mutation in hepatocyte nuclear factor-1b gene associated with MODY. *Nat Genet* 1997, 17:384.