

ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΤΩΝ ΕΠΙΠΕΔΩΝ IL-6 ΜΕ ΤΗΝ ΕΚΠΤΥΞΗ Τ ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΙΚΩΝ ΠΛΗΘΥΣΜΩΝ, ΤΗ ΒΑΡΥΤΗΤΑ ΤΟΥ ΣΥΝΔΡΟΜΟΥ ΑΠΕΛΕΥΘΕΡΩΣΗΣ ΚΥΤΤΑΡΟΚΙΝΩΝ ΚΑΙ ΝΕΥΡΟΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ ΜΕΤΑ ΑΠΟ CAR-T ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΘΕΡΑΠΕΙΑ

Μ. Δίγκα¹, Δ. Τσοκάνας¹, Μ. Λυσάνδρου¹, Ε. Σαγιαδινού¹, Ε. Τριανταφύλλου², Δ. Κεφάλια¹, Β. Ζαχαριουδάκη¹, ΓΙ. Χαμπαίος³, Α. Σπυριδωνίδης¹

¹Μονάδα Μεταμόσχευσης Μυελού των Οστών, Πανεπιστημιακό Γενικό Νοσοκομείο Πατρών, ²Κέντρο Αίματος, Πανεπιστημιακό Γενικό Νοσοκομείο Πατρών

³Α' Παθολογική Πτέρυγα, Γενικό Νοσοκομείο Αθηνών «Αλεξάνδρα»



Σκοπός

- ❖ Τα τα γενετικά τροποποιημένα Τ-λεμφοκύτταρα με χιμαιρικό αντιγονικό υποδοχέα (Chimeric antigen receptor T-cell therapy, CAR-T) είναι εγκεκριμένη θεραπεία για ασθενείς με ανθεκτικές Β-λεμφικές κακοήθειες.
- ❖ Οι κύριες επιπλοκές που επηρεάζουν την έκβαση των ασθενών είναι το σύνδρομο απελευθέρωσης κυτταροκινών (Cytokine Release Syndrome, CRS) και η νευροτοξικότητα (Immune Effector Cell Associated Neurotoxicity Syndrome, ICANS). Η ιντερλευκίνη-6 (IL-6) φαίνεται να παίζει έναν ρόλο κλειδί στην παθοφυσιολογία του CRS.
- ❖ Σκοπός της μελέτης είναι να εξετάσει εάν τα επίπεδα IL-6 σχετίζονται με τη βαρύτητα του CRS και του ICANS.

Αποτελέσματα

Πίνακας 1. Χαρακτηριστικά των ασθενών που έλαβαν CAR-T

Αριθμός ασθενών	10
Διάμεση Ηλικία (εύρος)	61 (20-68)
Νόσημα	6
DLBCL	1
PMBCL	1
Λέμφωμα Μανδύα B-ΟΛΛ	2
Κυτταρικό Προϊόν	7
Axicel	1
Tisacel	2
Brexucel	
CRS	10/10
Βαθμού 0	0
Βαθμού 1	4
Βαθμού 2	4
Βαθμού 3	2
Βαθμού 4	0
Θεραπεία CRS	7
Tocilizumab	4
Tocilizumab + Steroids	
ICANS	5/10
Βαθμού 0	5
Βαθμού 1	3
Βαθμού 2	0
Βαθμού 3	2
Βαθμού 4	0
Θεραπεία ICANS	1
Tocilizumab	5
Steroids	1
Anakirna	

❖ Συνολικά 10 ασθενείς έλαβαν κυτταρική θεραπεία από 30/3/2022 έως 31/7/2023.

❖ Τα χαρακτηριστικά των ασθενών αναγράφονται στον Πίνακα 1.

❖ Η κινητική των επιπέδων της IL-6 αξιολογήθηκε σε 4 χρονικά σημεία τις πρώτες 10 μέρες μετά την έγχυση των CAR-T (d 0, +3, +6, +10) και παρουσιάζεται στην Εικόνα 1 για το σύνολο των ασθενών (Εικόνα 1A) καθώς και για τους ασθενείς που ανέπτυξαν υψηλού και χαμηλού βαθμού CRS, ξεχωριστά (Εικόνα 1B). Παρατηρήθηκε αυξημένη συγκέντρωση IL-6 την d+3 (διάμεση τιμή 49.87 pg/ml, εύρος 5.69-2303) και d+6 (διάμεση τιμή 109.3 pg/ml, εύρος 1.5-1267).

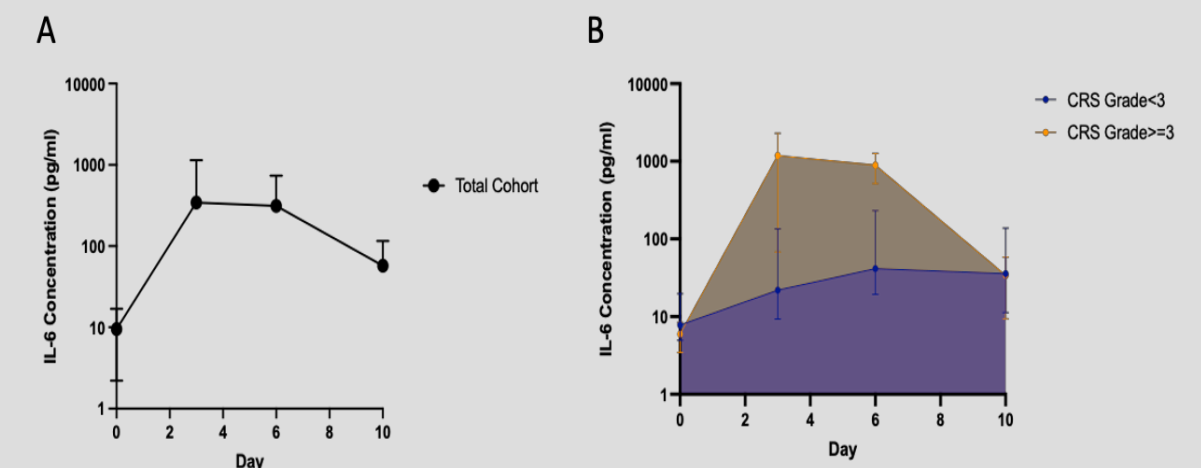
❖ Αντίστοιχα, αξιολογήθηκε η έκπτυξη των anti-CD19-CAR+ και ενεργοποιημένων HLA-DR+ Τ λεμφοκυττάρων (κύτταρα/μl) σε 8 χρονικά σημεία μετά την έγχυση των CAR-T (d 1, 10, 14, 30±5, 60±5, 100±5, 180±10 και 300±10) (Εικόνα 2A και 2B), αναδεικνύοντας την μέγιστη έκπτυξη των πληθυσμών αυτών την d+10.

❖ Τα επίπεδα IL-6 την d+6 εμφάνισαν στατιστικά σημαντική θετική συσχέτιση με την βαρύτητα του CRS (n=9, r=0.82, p=0.006) και την μέγιστη έκπτυξη (d+10) των anti-CD19-CAR+ (διάμεση τιμή 70.5 κύτταρα/μl, εύρος 18-1450, n=7, r=0.91, p=0.004) και ενεργοποιημένων HLA-DR+ Τ λεμφοκυττάρων (διάμεση τιμή 432 κύτταρα/μl, εύρος 234-1684, n=7, r=0.91, p=0.004).

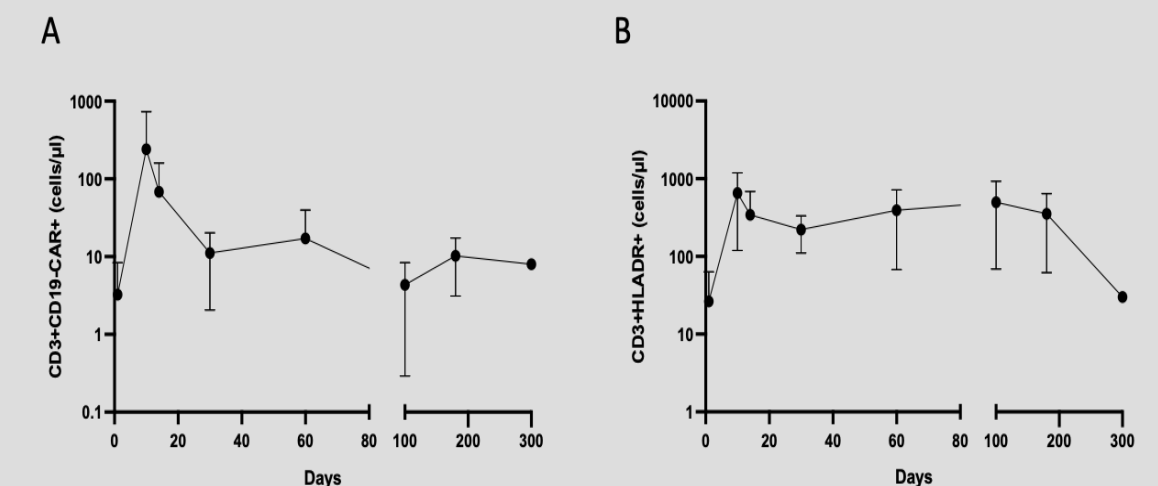
❖ Αντίθετα τα επίπεδα της IL-6 δεν εμφάνισαν καμία συσχέτιση με την βαρύτητα του ICANS σε κανένα από τα χρονικά σημεία που μελετήθηκαν.

Μεθοδολογία

- ❖ Η μέτρηση της IL-6 έγινε με την ανοσολογική μέθοδο ηλεκτροχημειοφωταύγειας "ECLIA".
- ❖ Η ποσοτικοποίηση των anti-CD19-CAR+ και ενεργοποιημένων HLA-DR+ Τ λεμφοκυττάρων πραγματοποιήθηκε με κυτταρομετρία ροής.



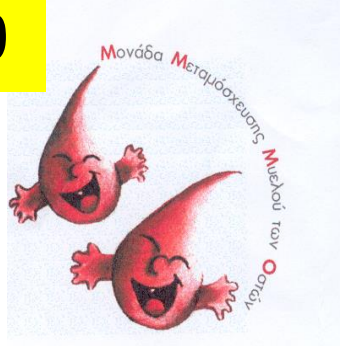
Εικόνα 1: Κινητική των επιπέδων IL-6 στον ορό σε 4 χρονικά σημεία (d 0, +3, +6, +10) για το σύνολο των ασθενών (A) που έλαβαν CAR-T καθώς και για τους ασθενείς που εμφάνισαν υψηλού ή χαμηλού βαθμού CRS ξεχωριστά (B)



Εικόνα 2: Έκπτυξη anti-CD19-CAR+ (A) και HLA-DR+ Τ λεμφοκυττάρων (B) σε ασθενείς που έλαβαν CAR-T κυτταρική θεραπεία, σε 8 χρονικά σημεία μετά την έγχυση του προϊόντος (d 1, 10, 14, 30±5, 60±5, 100±5, 180±10 και 300±10)

Συμπεράσματα

- ❖ Η μελέτη αυτή καταδεικνύει την πιθανή χρησιμοποίηση των επιπέδων IL-6, ως πιθανό βιοδείκτη CRS όχι όμως για το ICANS.
- ❖ Η εφαρμογή της μέτρησης IL-6 είναι μια μέθοδος εύκολη, γρήγορη, αποτελεσματική και μπορεί να συμβάλλει στην επιλογή ασθενών για πρώιμες παρεμβάσεις με σκοπό την πρόληψη των επιπλοκών της CAR-T θεραπείας.



ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗ ΤΗΣ ΠΤΩΧΗΣ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑΣ ΜΟΣΧΕΥΜΑΤΟΣ ΣΕ ΠΑΙΔΙΑΤΡΙΚΟΥΣ ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕΤΑ ΑΠΟ ΑΛΛΟΓΕΝΗ ΜΕΤΑΜΟΣΧΕΥΣΗ

Χ.Οικονομοπούλου, Α.Παϊσίου, Ε-Δ.Ιωαννίδου, Α.Κομιτοπούλου, Α.Καίσαρη, Γ.Σταυρουλάκη, Μ.Κασταμούλας, Μ.Θεοδοσάκη, Ε.Πετράκου, Ε.Σφουγκατάκη, Ε.Λαμπροπούλου, Ι.Γραφάκος, Γ. Βεσσαλάς, Ι.Περιστέρη, Ε.Γουσήτης

Μονάδα Μεταμόσχευσης Μυελού των Οστών, Ογκολογική Μονάδα Παιδών «Μαριάννα Β. Βαρδινογιάννη - Ελπίδα», Νοσοκομείο Παιδών «Η Αγία Σοφία»

ΕΙΣΑΓΩΓΗ - ΣΚΟΠΟΣ

- Πτωχή λειτουργία μοσχεύματος μετά από Αλλογενή ΜΑΚ ορίζεται η σοβαρή κυτταροπενία σε ≥ 2 σειρές και/ή η ανάγκη μεταγγίσεων, σε έδαφος υποπλαστικού/απλαστικού μυελού. Προϋπόθεση είναι η συνύπαρξη πλήρους χίμαιρας δότη και η απουσία άλλων αιτιών (λοίμωξη, φάρμακα, απόρριψη, σοβαρή GvHD ή υποτροπή του αρχικού νοσήματος).
- Η επίπτωση της πτωχής λειτουργίας μοσχεύματος αναφέρεται από 1 ως 27% και συσχετίζεται με υψηλή θνητότητα, λόγω επικείμενων λοιμώξεων και αιμορραγικών επεισοδίων.
- Οι τρόποι αντιμετώπισης περιλαμβάνουν τη χορήγηση αυξητικών παραγόντων, μεσεγγυματικών κυττάρων, άλλη ΜΑΚ και επίσης τη χορήγηση συμπληρωματικού μοσχεύματος CD34+ κυττάρων (boost) από τον ίδιο δότη.
- Τα δεδομένα στη βιβλιογραφία σχετικά με τη χορήγηση boost σε παιδιατρικούς ασθενείς είναι λίγα.
- Σκοπός της μελέτης μας ήταν να αξιολογήσουμε τα αποτελέσματα από τη χορήγηση boost σε παιδιατρικούς ασθενείς με πτωχή λειτουργία μοσχεύματος.

Υπεύθυνος επικοινωνίας: Χριστίνα Οικονομοπούλου chris_oiko@yahoo.com

ΑΣΘΕΝΕΙΣ και ΜΕΘΟΔΟΙ

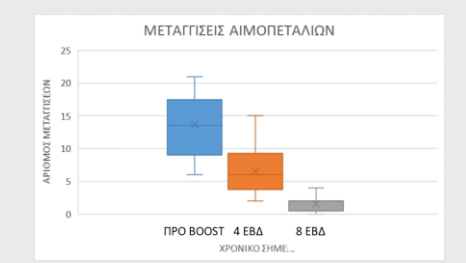
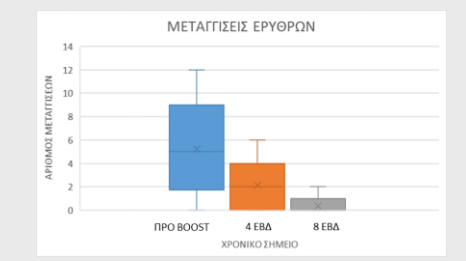
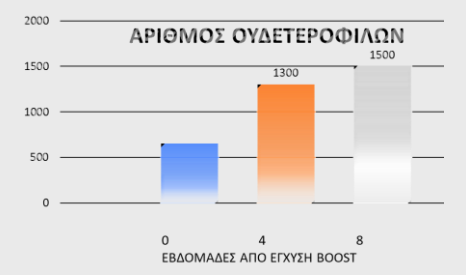
ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΑΣΘΕΝΩΝ ΚΑΙ ΜΕΤΑΜΟΣΧΕΥΣΕΩΝ	Αριθμός ασθενών
Συνολικός αριθμός ασθενών	19
Διάμεση ηλικία (έτη)	12.2
Φύλο	
Άρρεν/ Θήλυ	14/5
Διάγνωση	
ΟΛΛ	10
ΟΜΛ	3
ΜΔΣ	2
Απλαστική Αναιμία	1
Αιμοφαγοκυτταρικό σ.	1
JMML	1
SCID	1
Δότης	
MSD	3
MRD (HLA8/10)	2
VUD (HLA 10/10 ή 9/10)	8
Απλοταυτόσημος	6
Σχήμα προετοιμασίας	
Μυελοαφανιστικό	17
TBI	1
Καθόλου	1

ΠΤΩΧΗ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ ΜΟΣΧΕΥΜΑΤΟΣ	ΑΣΘΕΝΕΙΣ %
Είδος	
2παθής ανεπάρκεια - διάμεσος χρόνος 70 ημ (5-540) από ημ 0	10/19 (53%)
1παθής ανεπάρκεια	3/19 (16%)
Εμφύτεση ουδετεροφίλων	6/19 (31%)
Κυτταρικές σειρές #	
1	5/19 (26%)
2	11/19(58%)
3	3/19 (16%)

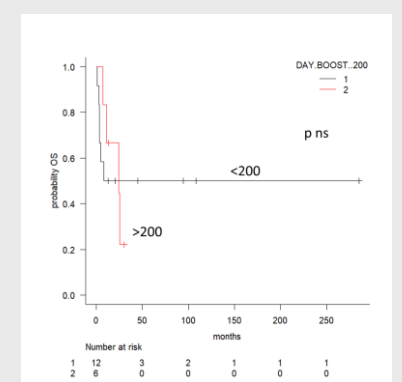
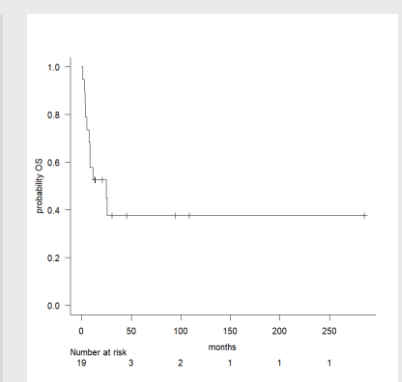
- ΣΥΜΠΛΗΡΩΜΑΤΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ**
- Boost χορηγήθηκε μετά από θετική επιλογή CD34+ αιμοποιητικών κυττάρων μέσω του συστήματος CliniMACS/Miltenyi.
 - 18/19 boosts χορηγήθηκαν άμεσα, χωρίς κατάψυξη.
 - Δε χορηγήθηκε σχήμα προετοιμασίας πριν την έγχυση του boost.
 - Δε χορηγήθηκε ανοσοκατασταλτική αγωγή μετά την έγχυση του boost.
 - Και οι 19 ασθενείς είχαν χίμαιρα δότη >95% προ της χορήγησης του boost.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

- ΑΙΜΑΤΟΛΟΓΙΚΗ ΑΠΟΚΑΤΑΣΤΑΣΗ:**
- Έγινε αξιολόγηση αυτής στις 4 εβδομάδες και στις 8 εβδομάδες.
 - 3/17 ασθενείς (όλοι με παγκυτταροπενία) δεν παρουσίασαν ανταπόκριση.
 - Στους υπόλοιπους 14, η διάμεση τιμή των ουδετεροφίλων από 650/mm³ την ημέρα της έγχυσης ανέβηκε σε 1300/mm³ στις 4 εβδομάδες και 1500/mm³ στις 8 εβδομάδες (p<0.05). Η ανάγκη μεταγγίσεων αίματος μειώθηκε στατιστικά σημαντικά σε 79% και 82% των ασθενών στις 4 και 8 εβδομάδες μετά το boost. Ομοίως και η ανάγκη μεταγγίσεων αιμοπεταλίων μειώθηκε στατιστικά σημαντικά σε 73% και 85%.
 - Η συνολική ανταπόκριση των ασθενών μας στη χορήγηση του boost ήταν 78.2% και δεν είχε στατιστικά σημαντική συσχέτιση με τον αριθμό των κυτταροπενιών ή την κυτταρικότητα του boost.

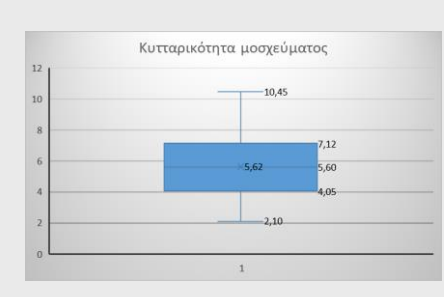


- Η πιθανότητα συνολικής επιβίωσης ήταν 37.6% (95%CI 15.4-59.9%). Χωρίς να είναι στατιστικά σημαντική, ήταν βελτιωμένη η OS στους ασθενείς που έλαβαν boost πριν την ημέρα +200, OS 50% (95% CI 21-74), σε σχέση με εκείνους που το έλαβαν μετά, OS 22.2% (95% CI 9.5-61.5).
- Δεν είχαμε de novo aGvHD μετά το boost. Δύο ασθενείς είχαν μετρίας βαρύτητας cGvHD προ της ενίσχυσης.
- 11 ασθενείς απεβίωσαν μετά την ενίσχυση μοσχεύματος, 2 λόγω υποτροπής, 8 λόγω λοίμωξης και ένας λόγω cGvHD, που προϋπήρχε της ενίσχυσης.



ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

- Η διάμεση ημέρα χορήγησης του συμπληρωματικού μοσχεύματος ήταν η +112 (+35 έως +616)
- Η διάμεση τιμή κυτταρικότητας CD34+ ήταν 5.62x10⁶/kg ΣΒ (2.15-10.45x10⁶).



ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η εμπειρία της μονάδας μας υποδεικνύει την αξία ενίσχυσης μοσχεύματος σε παιδιατρικούς ασθενείς με πτωχή λειτουργία μοσχεύματος, με υψηλό ποσοστό αιματολογικής αποκατάστασης. Ενδεχομένως η έγκαιρη χορήγηση να έχει επίπτωση στην συνολική επιβίωση, λόγω ταχύτερης αιματολογικής και ανοσολογικής αποκατάστασης.

Μ. Λύμπουρα,^{1,2} Α. Μπάτσαλη,^{1,2} Ν. Μπιζύμη,^{1,2} Α. Δαμιανάκη,^{1,2} Ε. Μαυρουδή,^{1,2} Ε. Παπαδάκη^{1,2}

¹Εργαστήριο Μελέτης Αιμοποίησης, Ιατρική Σχολή Πανεπιστημίου Κρήτης

²Εργαστήριο Δημόσιας Τράπεζας Ομφαλικών Βλαστοκυττάρων Κρήτης, Αιματολογική Κλινική Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ηρακλείου

Εισαγωγή

Τα μυελικά κατασταλτικά κύτταρα (myeloid-derived suppressor cells, MDSCs) είναι ένας ετερογενής πληθυσμός κυττάρων μυελικής προέλευσης που έχουν κατασταλτικό ρόλο στο Τ-κυτταρικό σύστημα. Διακρίνονται σε πολυμορφοπυρηνικούς (PMN-MDSCs: HLA-DR^{low}CD11b⁺/CD33⁺/CD15⁺) και μονοκυτταρικούς (M-MDSCs: HLA-DR^{low}CD11b⁺/CD33⁺/CD14⁺) υποπληθυσμούς.

Στόχος της παρούσας μελέτης είναι η εκτίμηση των ποσοτικών και ποιοτικών χαρακτηριστικών των MDSCs μετά τη συλλογή Ομφαλοπλακουντιακού Αίματος (ΟΠΑ) καθώς και μετά την κρυοσυντήρησή (-170°C) τους προκειμένου να προσδιοριστούν οι βέλτιστες συνθήκες για την απομόνωση και χρησιμοποίησή τους.

Υλικά και Μέθοδοι

Μελετήθηκαν 12 μονάδες ΟΠΑ από τελειόμηνες κυήσεις. Τα MDSCs εντοπίζονται και απομονώνονται από το κλάσμα των μονοπύρηνων κυττάρων (ΜΝΠ) του ΟΠΑ μέσω φυγοκέντρησης σε φικόλη.

Πραγματοποιήθηκε έλεγχος του αριθμού και της βιωσιμότητας των MDSCs με κυτταρομετρία ροής σε δείγματα ΟΠΑ που επεξεργάζονται εντός 12 ωρών από την ώρα συλλογής του ΟΠΑ (Time-0) και σε δείγματα που συντηρούνται και επεξεργάζονται μεταξύ 12-24 ωρών (Time-1).

Μελετήθηκε, επίσης, ο αριθμός και τα ανοσοφαινοτυπικά χαρακτηριστικά των MDSCs στο κλάσμα των ΟΠΑ-ΜΝΠ πριν και μετά την κρυοσυντήρησή τους (κρυοκαταψυκτικό μέσο: 10% Dimethyl sulfoxide, 90% Bovine Fetal Serum). Για την κυτταρομετρία ροής οι MDSCs υποπληθυσμοί μετρήθηκαν με το συνδυασμό αντισωμάτων CD45-V500/CD33-PC7/HLA-DR-APC/CD14-PE/CD11b-FITC/CD15-V450.

Η βιωσιμότητα ελέγχθηκε με 7-amino-actinomycin D (7AAD). Τα ανοσοφαινοτυπικά δεδομένα αναλύθηκαν με το πρόγραμμα Kaluza.

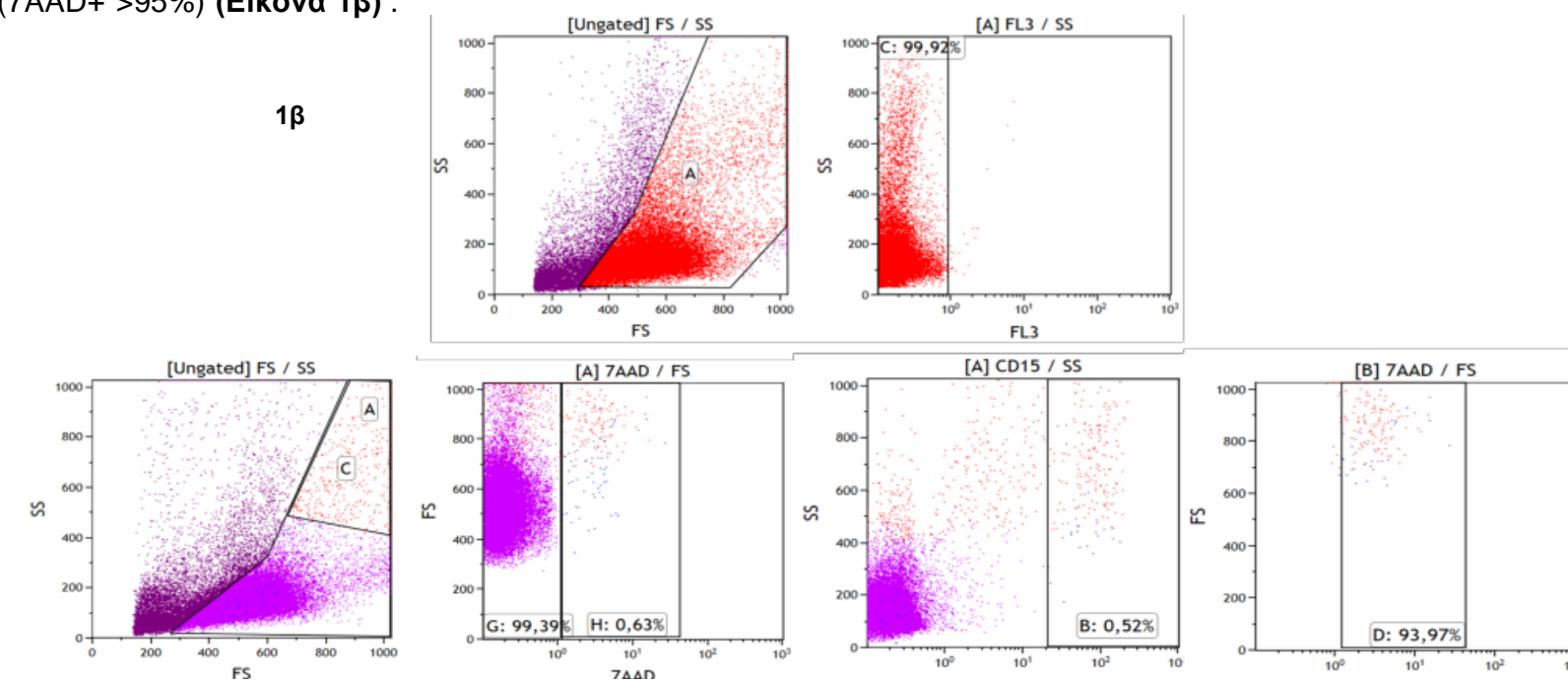
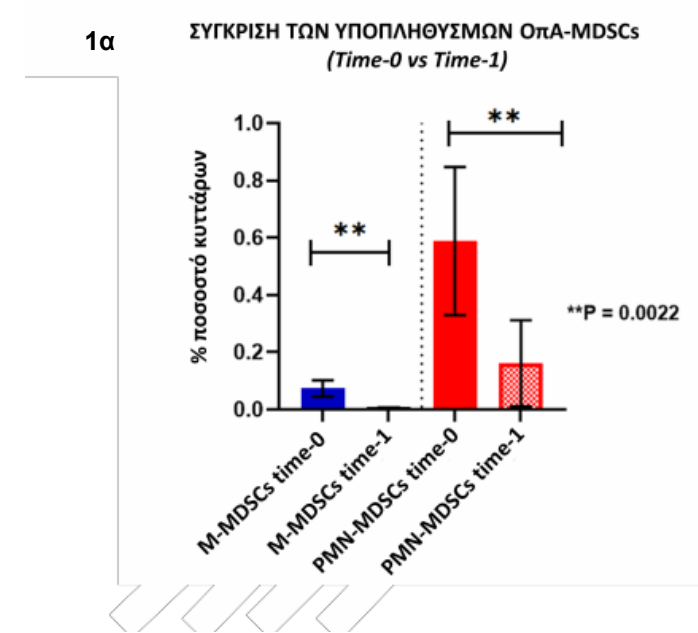
Βιβλιογραφία

- Bizymi, N., et al.; (2022). Myeloid-Derived Suppressor Cells (MDSC) in the Umbilical Cord Blood: Biological Significance and Possible Therapeutic Applications. Journal of Clinical Medicine, 11(3), 727.
- Bizymi, N., et al.; (2022). New Perspectives on Myeloid-Derived Suppressor Cells and Their Emerging Role in Haematology. Journal of Clinical Medicine, 11(18), 5326.

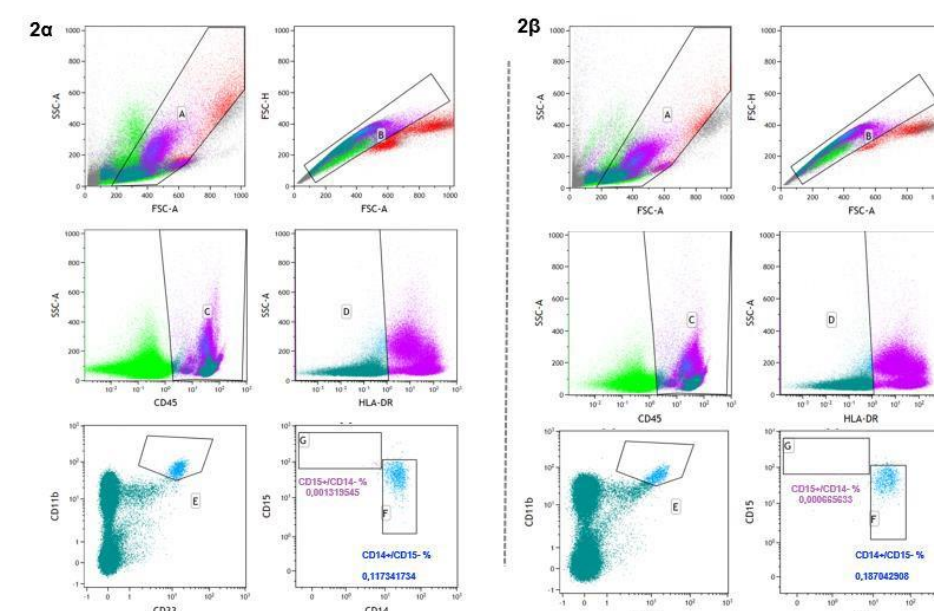
Αποτελέσματα

Ο αριθμός των M- και PMN-MDSCs συνολικά, μετά το πέρας των 12 ωρών από τη συλλογή των μονάδων ΟΠΑ (Time-1), μειώνεται σημαντικά σε σχέση με τους αντίστοιχους όταν η επεξεργασία των μονάδων πραγματοποιείται εντός 12 ωρών [M-MDSCs:0.074±0.02 (Time-0) και 0.007±0.003 (Time-1), PMN-MDSCs:0.588±0,26 (Time-0) και 0.162±0,15 (Time-1)] (Εικόνα 1α).

Το σύνολο των ΟΠΑ-MDSCs όταν επεξεργάζονται μετά το πέρας των 12 ωρών αποπίπτει (7AAD⁺ >95%) (Εικόνα 1β).



Κατά τον έλεγχο των ανοσοφαινοτυπικών χαρακτηριστικών των ΟΠΑ-MDSCs πριν και μετά την κρυοσυντήρηση φαίνεται πως τα κύτταρα διατηρούν τα ανοσοφαινοτυπικά και αριθμητικά χαρακτηριστικά τους (Εικόνα 2). 2α. Πριν την κρυοσυντήρηση των κυττάρων (ημέρα λήψης και επεξεργασίας των ΟΠΑ-MDSCs), 2β. Μετά την απόψυξη των ΟΠΑ-MDSCs (κρυοσυντήρηση ένα μήνα).



Συμπεράσματα

- Η απομόνωση, ο χαρακτηρισμός και η φύλαξη των MDSCs υποπληθυσμών πρέπει να πραγματοποιούνται εντός 12 ωρών από τη συλλογή των μονάδων ΟΠΑ, καθώς μετά τις 12 ώρες παρατηρείται έντονη απόπτωση.
- Η κρυοσυντήρηση φαίνεται να μην επηρεάζει τα ανοσοφαινοτυπικά και αριθμητικά χαρακτηριστικά των ΟΠΑ-MDSCs.
- Τα δεδομένα ενθαρρύνουν τη δημιουργία μιας βιοτράπεζας MDSCs για πιθανή χρήση τους σε ανοσοκατασταλτικές εφαρμογές αξιοποιώντας επιπλέον τις μονάδες ΟΠΑ που δεν είναι κατάλληλες για χρήση σε μεταμόσχευση.

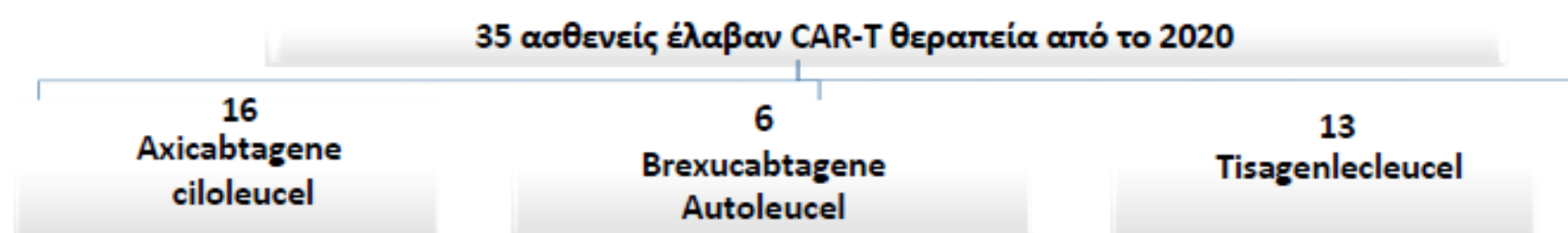


Β.Δούκα¹, Μ.Καλιού¹, Ε.Παπχιάνου¹, Σ.Μπουντουρά¹, Μ.Ισκάς¹, Α.Βαρδή¹, Α-Κ.Παντελιάδου¹, Ζ.Μπούσιου¹, Ι.Μπάτσης¹, Ρ.Αβραμίδου¹, Μ.Μουτσιάνα¹,
Α.Τσομπανάκου¹, Ε.Γαβριηλάκη^{1,2}, Δ.Σωτηρόπουλος¹, Ι.Σακελλάρη¹
1. Αιματολογικό Τμήμα, Νοσοκομείο “Γ.Παπανικολάου”, Θεσσαλονίκη
2. Β’ Προπαιδευτική Παθολογική Κλινική, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης

Εισαγωγή

Η ανοσοθεραπεία με χημειοαντιγονικό υποδοχέα Τ λεμφοκυττάρων (CAR-Ts) έχει οδηγήσει σε εντυπωσιακά ποσοστά ύφεσης σε ασθενείς με ανθεκτική αιματολογική κακοήθεια Β κυτταρικής προέλευσης. Για την εκτίμηση της απάντησης και την αξιολόγηση των σοβαρών επιπλοκών της CAR-T θεραπείας, είναι επιθυμητή και μερικές φορές κρίσιμη η παρακολούθηση των επιπέδων των CAR-T κυττάρων.

Μέθοδοι:



Ηλικία (διάμεσος): 47 έτη (εύρος: 20-74)

Φύλο	Άνδρες	23
	Γυναίκες	12

Διάγνωση	ALL	5
	DLBCL	16
	PMBCL	5
	MCL	5
	FL	4

Διάμεσο διάστημα παρακολούθησης: 8 (1-33) μήνες

Συμπεράσματα:

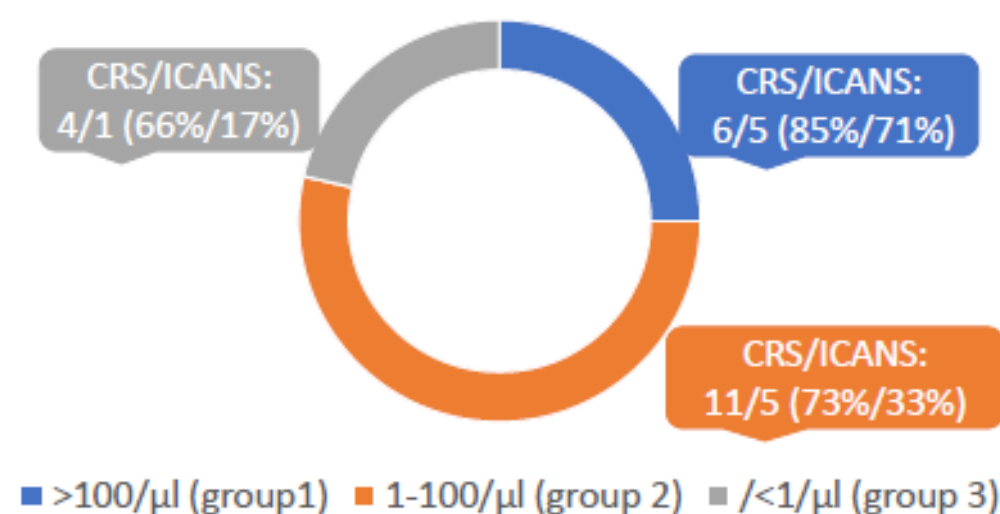
Η κυτταρομετρία ροής αποτελεί αξιόπιστη μέθοδο παρακολούθησης των CAR-T κυττάρων. Στη μελέτη μας, υψηλότερα επίπεδα έκπτυξης συσχετίστηκαν με μεγαλύτερη συχνότητα CRS ή ICANS.

Δε φάνηκε να υπάρχει συσχέτιση με το θεραπευτικό αποτέλεσμα, πιθανά λόγω του περιορισμένου αριθμού ασθενών.

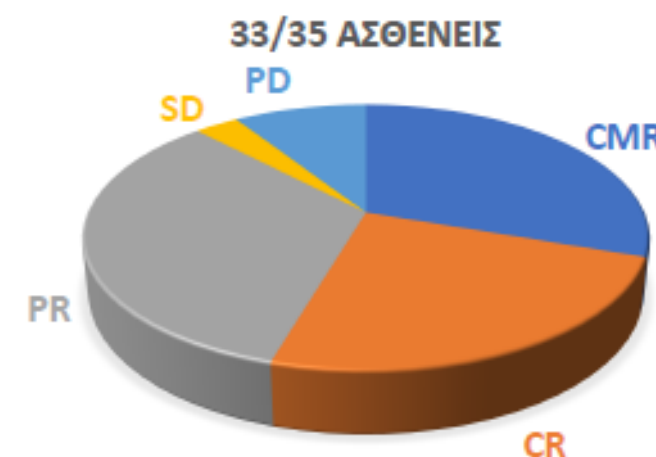
Ωστόσο, η μέτρηση των επιπέδων των CAR-T κυττάρων σε συγκεκριμένα χρονικά σημεία παρέχει καθοδήγηση για θεραπευτικές αποφάσεις, όπως η χορήγηση λεναλιδομίδης για την ενίσχυση της έκπτυξής τους,

Αποτελέσματα:

Μέγιστα επίπεδα έκπτυξης CAR-T κυττάρων

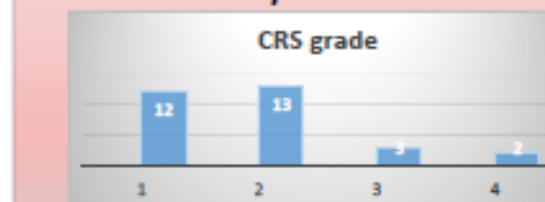


ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΝΟΣΟΥ:



CRS

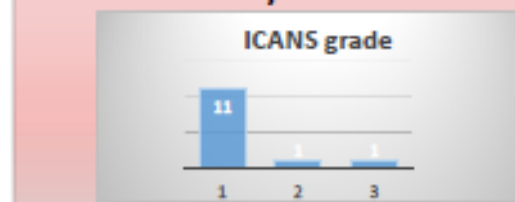
N= 30 ασθενείς



• Διάμεσο διάστημα εμφάνισης: 2 (0-12) ημέρες

ICANS

N= 13 ασθενείς



• Διάμεσο διάστημα εμφάνισης: 8 (3-12) ημέρες

- Δεκατέσσερις ασθενείς (40%) υποτροπίασαν – 5 από τους οποίους είχαν επιτύχει προηγουμένως CR/CMR.
- Πέντε/35 ασθενείς (14%) απεβίωσαν λόγω προόδου νόσου/TRM(CRS)/σήψης: 3/1/1.

- ✓ Τα μέγιστα επίπεδα έκπτυξης των CAR-T κυττάρων στο περιφερικό αίμα δε φάνηκε να είναι υψηλότερα στους ασθενείς που ανταποκρίθηκαν στη θεραπεία.
- ✓ Επιπλέον η διάρκεια ανίχνευσης CAR-T κυττάρων δε φάνηκε να σχετίζεται με την επιβίωση χωρίς πρόοδο νόσου.

ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΝΕΩΝ ΗΛΑ ΑΛΛΗΛΙΩΝ ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ ΤΗΣ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ NEXT GENERATION SEQUENCING ΚΑΙ Η ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΤΟΥΣ ΣΤΗΝ ΕΠΙΛΟΓΗ ΚΑΤΑΛΛΗΛΟΤΕΡΟΥ ΔΟΤΗ ΣΤΗ ΜΕΤΑΜΟΣΧΕΥΣΗ ΑΡΧΕΓΟΝΩΝ ΑΙΜΟΠΟΙΗΤΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ



Δ. Κουνιάκη, Β. Κίτσιου, Κ. Φωτόπουλος, Θ. Αθανασιάδης, Ι. Καρατάς, Β. Σταμάτη, Α. Ταράση, Α. Τσιρογιάννη
Τμήμα Ανοσολογίας-Ιστοσυμβατότητας, Γ.Ν.Α. «Ο Ευαγγελισμός», Αθήνα

Εισαγωγή

Είναι γνωστό ότι στις μεταμοσχεύσεις αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων (AAK) η HLA συμβατότητα σε επίπεδο αλληλίου μεταξύ δότη και λήπτη μειώνει την πιθανότητα απόρριψης ή εμφάνισης νόσου μοσχεύματος κατά ξενιστή και αυξάνει έτσι το ποσοστό επιβίωσης μετά τη μεταμόσχευση.

Σκοπός

Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν η παρουσίαση τριών νέων (novel) HLA αλληλίων που προσδιορίστηκαν με τη χρήση next generation sequencing (NGS) τεχνολογίας και η αξιολόγηση τους σχετικά με την αναζήτηση και επιλογή καταλληλότερου δότη στη μεταμόσχευση.

Υλικό και μέθοδος

Στο πλαίσιο συσχετίσεων με νοσήματα, προμεταμοσχευτικού ελέγχου και εθελοντών δοτών μυελού των οστών, 1920 δείγματα ατόμων τυποποιήθηκαν έως και σε 11 HLA γενετικούς τόπους (HLA-A,-B,-C,-DRB1/3/4/5,-DQB1,-DPB1,-DPA1,-DQA1) με τη χρήση NGS τεχνολογίας από τον Ιούλιο του 2021 έως και σήμερα. Για την παρασκευή και ενίσχυση της βιβλιοθήκης χρησιμοποιήθηκαν απολύτως ειδικοί (locus-specific) εκκινητές των οίκων CareDX (AlloSeq®Tx17 kit) και GenDx (NGSgo®-MX6-1 kit). Η αλληλούχιση έγινε σε πλατφόρμα Illumina (MiSeq) και τα πρωτογενή δεδομένα (raw data) αναλύθηκαν από τα AlloSeq Assign και NGSengine®NGS analysis λογισμικά, αντίστοιχα.

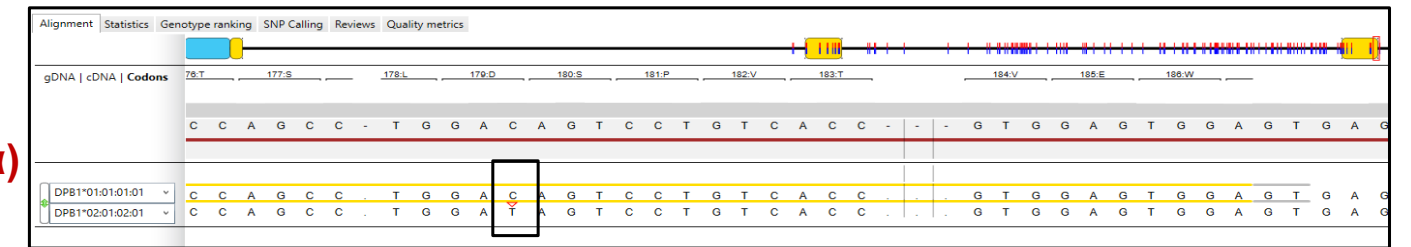
Αποτελέσματα

Η πλήρους μήκους DNA αλληλουχία τριών νέων HLA αλληλίων (HLA-DPB1*02:01:68, -A*01:426, -A*02:09:01:04) κατατέθηκε στις GenBank και IPD-IMGT/HLA βάσεις δεδομένων αλληλούχισης και τα ονόματά τους εκχωρήθηκαν επίσημα από την World Health Organization (WHO) Nomenclature Committee for Factors of the HLA System τον Σεπτέμβριο και Νοέμβριο του 2022.

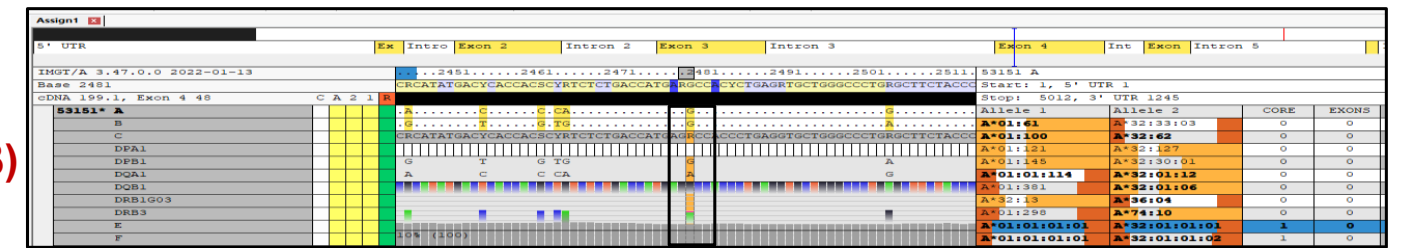
α) το HLA-DPB1*02:01:68 προσδιορίστηκε σε 27χρονο Έλληνα ασθενή, υποψήφιο για μεταμόσχευση αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων. Η DNA αλληλουχία του διέφερε από το -DPB1*02:01:02:01 σε μία νουκλεοτιδική αντικατάσταση (T>C), εξόνιο 3, gDNA 10216, κωδικόνιο 179 (GAT>GAC), διαφορά όμως που δεν εγείρει διαφορετική ανοσολογική απόκριση διότι η προκύπτουσα συνώνυμη μετάλλαξη κωδικοποιεί για το ίδιο αμινοξύ (Ασπαρτικό οξύ) (εικόνα α)

β) το HLA-A*01:426 προσδιορίστηκε σε 21χρονο Έλληνα δότη αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων. Η DNA αλληλουχία του διέφερε από το -A*01:01:01:01 σε μία νουκλεοτιδική αντικατάσταση (G>A), εξόνιο 4, gDNA 1617, κωδικόνιο 199 (GCC>ACC), με αποτέλεσμα την αλλαγή του αμινοξέος της Αλανίνης (A) σε Θρεονίνη (T). Δεδομένου ότι η A είναι αλειφατική, ενώ η T περιέχει μια ομάδα υδροξυλίου, πιθανόν να επηρεάζεται η στεροειδίαση του μορίου μεταβάλλοντας έτσι δυνητικά τις ανοσογενετικές του ιδιότητες και άρα την αλληλοαναγνώριση (εικόνα β).

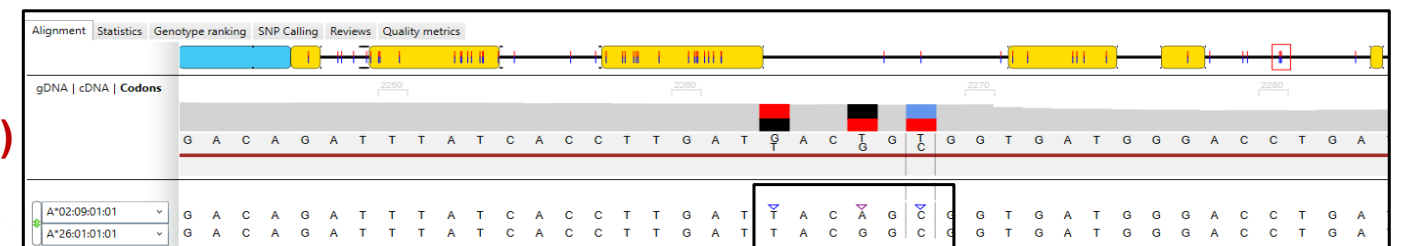
γ) στο πλαίσιο μελέτης ανοσογενετικής ασθενειών προσδιορίστηκε το HLA-A*02:09:01:04 σε 36χρονη Ελληνίδα. Η DNA αλληλουχία του διέφερε από το -A*02:09:01:01 σε τρεις νουκλεοτιδικές αντικαταστάσεις στο εσώνιο 5: gDNA 2263 (T>G), DNA 2266 (A>T) και gDNA 2268 (C>T), διαφορές που δεν εγείρουν διαφορετική ανοσολογική απόκριση (εικόνα γ).



α)



β)



γ)

α.
01

Συμπεράσματα

Η μελέτη μας επιβεβαιώνει ότι η χρήση της τεχνολογίας NGS στην HLA τυποποίηση στην καθημέρα πράξη του κλινικού Εργαστηρίου Ανοσολογίας-Ιστοσυμβατότητας έχει ρίξει φως στην αξιοσημείωτη γενετική ποικιλομορφία του HLA συστήματος, προσφέροντας τη δυνατότητα στην εις βάθος ανάλυση των αλληλουχιών του. Έτσι ο καθορισμός περιοχών της DNA αλληλουχίας που δεν έχουν μελετηθεί μέχρι τώρα, οδηγεί στην κατανόηση της σύνθετης γενετικής τους σύστασης, της πιθανής εμπλοκής τους στην αλληλοαναγνώριση και της συμβολή τους στην επιτυχή έκβαση των μεταμοσχεύσεων με την επιλογή του καταλληλότερου ζεύγους δότη-λήπτη.

ΑΙΜΟΠΟΙΗΤΙΚΑ ΣΤΕΛΕΧΙΑΙΑ ΚΥΤΤΑΡΑ ΩΣ ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΟ ΟΧΗΜΑ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΤΑΞΙΑ FRIEDREICH

Χ. Μπέτα^{1,2}, Χ. Πιπερίδου^{1,2}, Θ. Ίντζου^{1,2}, Κ. Πασχούδη^{1,2}, Α. Παπαδοπούλου², Ι. Σακελλάρη², Ν. Ψαθά^{1,2}, Ε. Γιαννάκη^{2,3}

¹ Εργαστήριο Βιολογίας Ανάπτυξης, Τομέας Γενετικής, Ανάπτυξης και Μοριακής Βιολογίας, Τμήμα Βιολογίας ΑΠΘ, Θεσσαλονίκη, Ελλάδα

² Μονάδα Γονιδιακής και Κυτταρικής Θεραπείας, Γενικό Νοσοκομείο Θεσσαλονίκης «Γεώργιος Παπανικολάου», Θεσσαλονίκη, Ελλάδα

³ Division of Hematology, University of Washington, Seattle



Υπόβαθρο

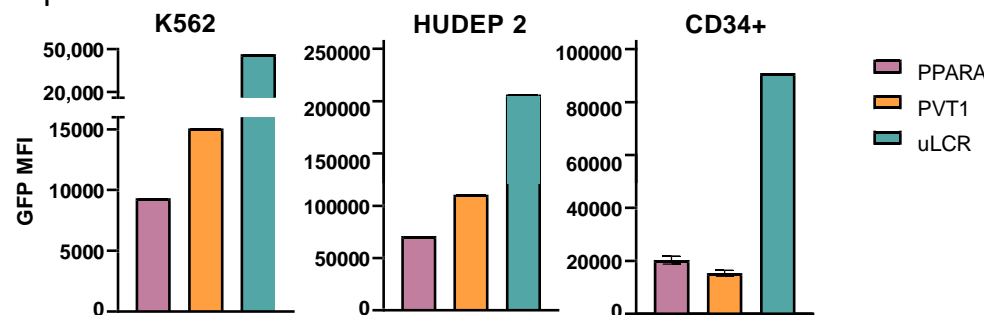
Η Αταξία Friedreich (FRDA) είναι μια αυτοσωμική, πολυσυστημική, υπολειπόμενη νόσος με προοδευτικά θανατηφόρα κατάληξη. Οφείλεται στην μειωμένη έκφραση της φραταξίνης (FXN), μιας μιτοχondριακής πρωτεΐνης απαραίτητης για τον ομαλό οξειδωτικό μεταβολισμό του κυττάρου. Προκλινικές μελέτες για την in vivo γονιδιακή θεραπεία της FRDA κατέδειξαν την εμφάνιση κυτταρο/ιστοτοξικότητας επαγόμενης από την υπερέκφραση του διαγονιδίου της FXN. Τα τελευταία χρόνια, διερευνάται ο ρόλος των αιμοποιητικών στελεχιαίων κυττάρων (HSCs) στη θεραπεία νευροεκφυλιστικών νόσων, καθώς έχουν την δυνατότητα να παραδίδουν λειτουργική πρωτεΐνη μέσω της διαφοροποίησής τους σε μακροφάγα, σύντηξης με τους προβληματικούς ιστούς και “διασταυρούμενης διόρθωσης” (cross correction), αλλά και της έκκρισης θεραπευτικών πρωτεϊνών στο αίμα μετά τη διαφοροποίησή τους σε ερυθροκύτταρα.

Σκοπός

Η διόρθωση του φαινοτύπου της FA μέσω γενετικής τροποποίησης των HSCs θα μπορούσε να οδηγήσει σε συστηματική απόδοση λειτουργικής φραταξίνης στους ιστούς. Στην παρούσα μελέτη διερευνούμε τη δυνατότητα έκφρασης και έκκρισης της FXN σε μη τοξικά επίπεδα από ερυθροκύτταρα μετά από διαφοροποίηση γενετικά τροποποιημένων HSCs.

Μέθοδοι

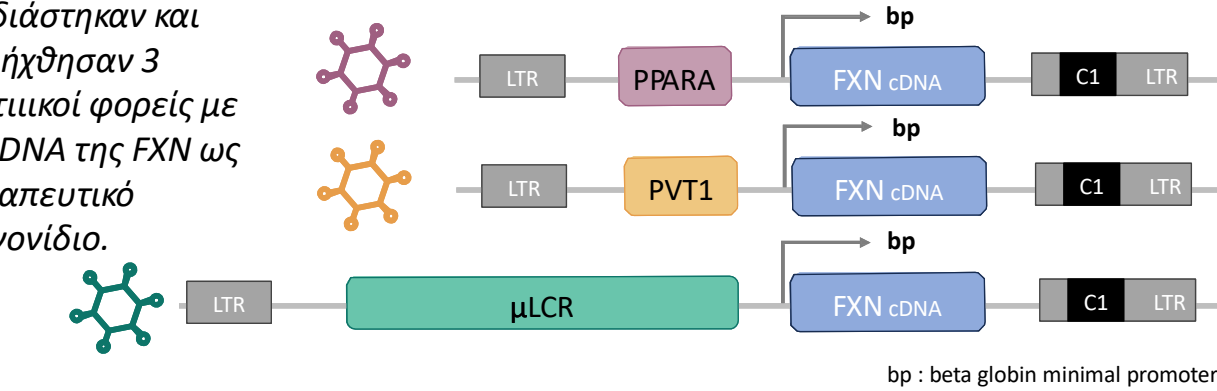
Προκειμένου να επιτευχθεί ακριβής ρύθμιση της έκφρασης της FXN σχεδιάστηκαν και παρήχθησαν 3 λεντιικοί φορείς που φέρουν ερυθροειδικούς ενισχυτές με διαφορετική ενεργότητα: τους πρόσφατα ταυτοποιημένους PVT1 και PPARA και τον μLCR.



Μέση ένταση φθορισμού (GFP) ανά κύτταρο (MFI), μετά από διαμόλυνση με λεντι-ικούς φορείς που φέρουν τους μLCR, PPARA και PVT1 σε K562, huder-2 και σε CD34+ κύτταρα

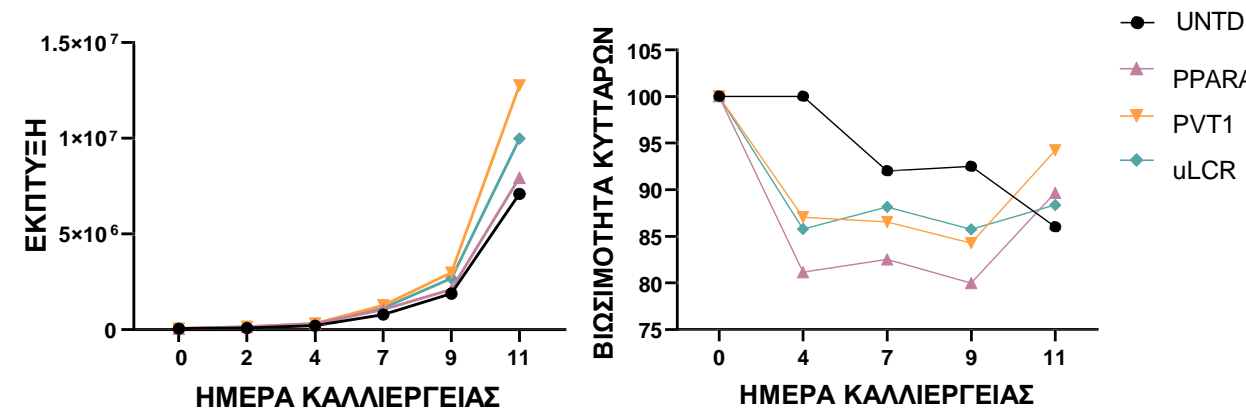
Αποτελέσματα

Σχεδιάστηκαν και παρήχθησαν 3 λεντιικοί φορείς με το cDNA της FXN ως θεραπευτικό διαγονίδιο.

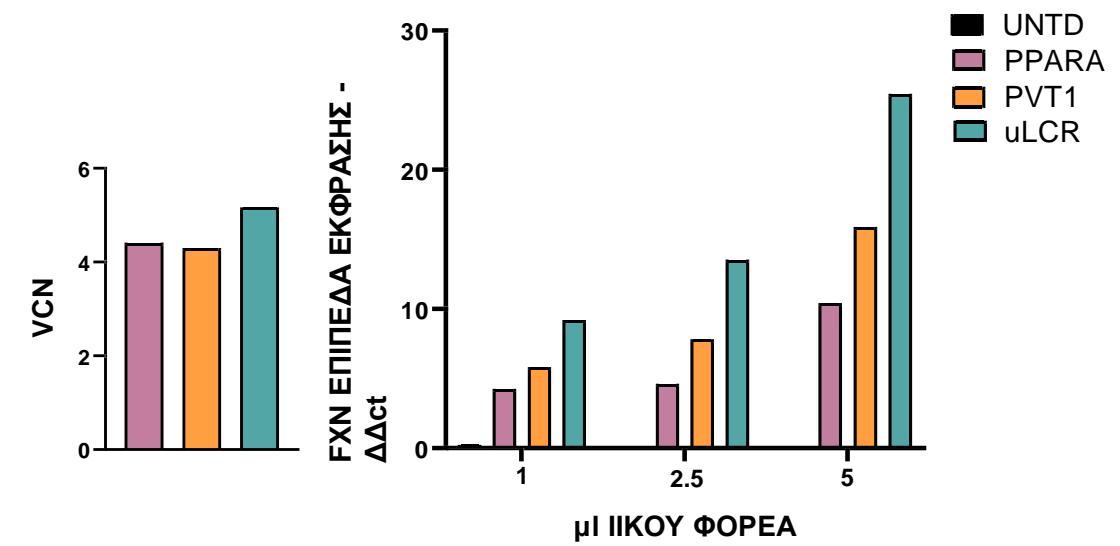


11 Ημέρες καλλιέργειας

- Βιωσιμότητα
- Μορφολογία
- Οξειδωτικό στρες
- Επίπεδα έκφρασης FXN
- Αριθμός ικών αντιγράφων/κύτταρο (VCN)

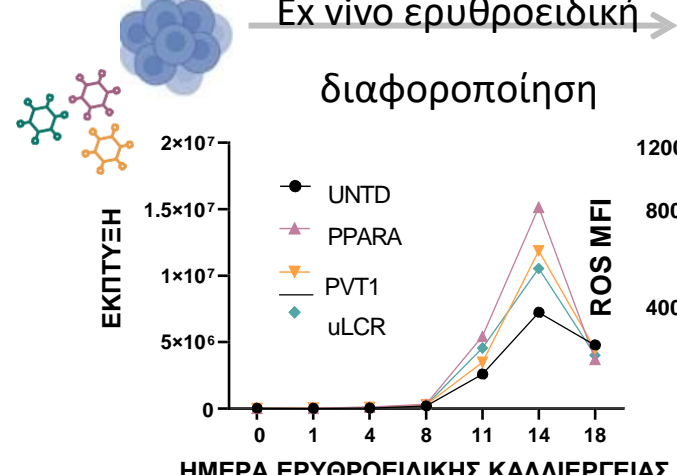


Οι φορείς δεν επηρέασαν την έκπτυξη και την βιωσιμότητα των κυττάρων

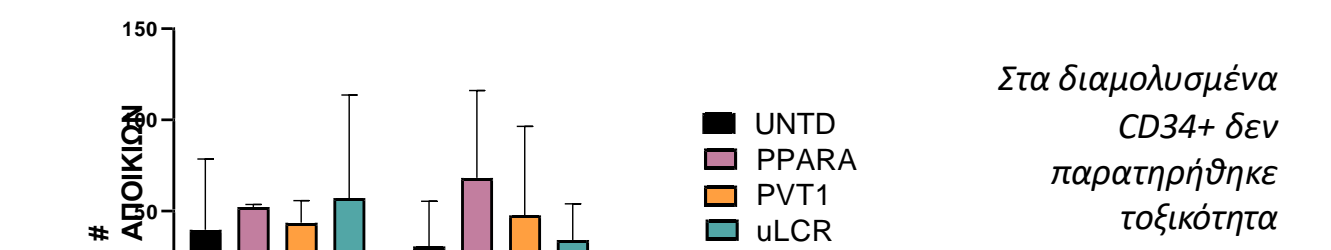


Όλοι οι φορείς οδήγησαν σε αύξηση των επιπέδων έκφρασης της FXN

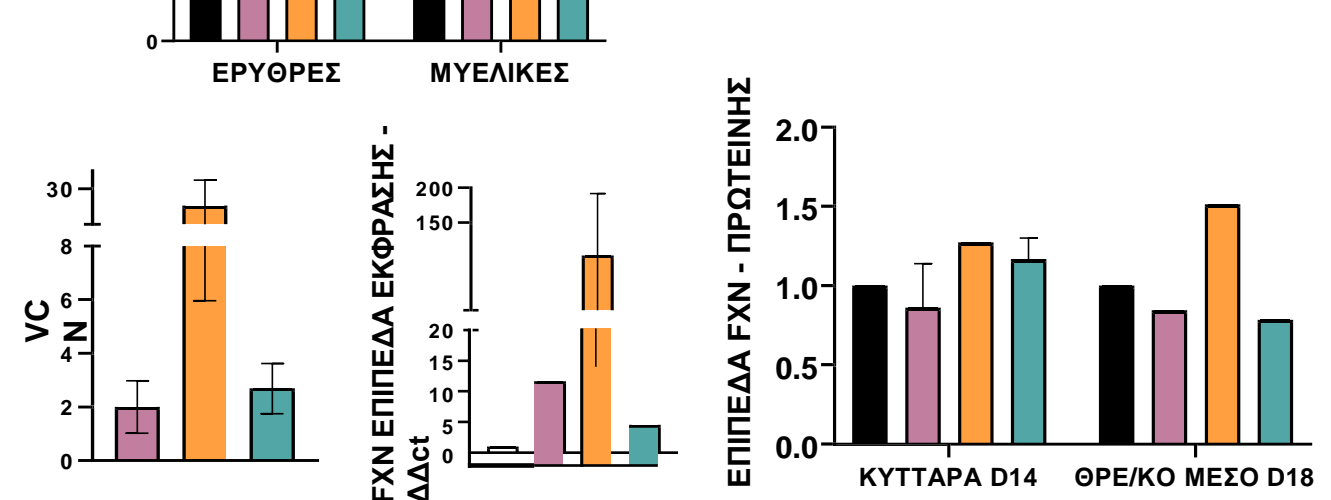
CD34+ κύτταρα



- Κλωνογικής ικανότητα
- Ερυθροποίηση
- Ποσοτικοποίηση της FXN με ELISA - στα κύτταρα
- στο θρεπτικό μέσο



Στα διαμολυσμένα CD34+ δεν παρατηρήθηκε τοξικότητα



Η έκφραση της FXN αυξήθηκε σημαντικά ειδικά με τον PVT1. Ο PVT1-FXN αύξησε επιπλέον: την ενδοκυττάρια FXN την ημέρα 14 την εκκρινόμενη FXN την ημέρα 18

Συμπεράσματα

Συνολικά, τα μέχρι τώρα αποτελέσματά μας υποδηλώνουν πως η έκφραση του γονιδίου της FXN σε CD34+ και K562 κύτταρα μέσω λεντιικών φορέων με ερυθροειδικούς ενισχυτές, είναι εφικτή και στερείται κυτταροτοξικότητας. Ο βέλτιστος φορέας φαίνεται πως είναι ο PVT1-FXN, ο οποίος πέτυχε τα υψηλότερα επίπεδα μεταγραφής, αύξησε τα επίπεδα της ενδοκυττάριας FXN κατά την διάρκεια της ερυθροειδικής διαφοροποίησης και της εκκρινόμενης πρωτεΐνης μετά το πέρας της διαφοροποίησης.

Σύγκριση του προπαρασκευαστικού σχήματος αλλογενούς μεταμόσχευσης φλουδαραβίνης/μελφαλάνης (FluMel) έναντι φλουδαραβίνης/τρεοσουλφάνης (FluTreo): μια μονοκεντρική ανάλυση

Μ. Λίγκα¹, Δ. Τσοκάνας¹, Μ. Λυσσάνδρου¹, Ε. Σαγιαδινού¹, Ε. Τριανταφύλλου², Δ. Κεφάλα, Β. Ζαχαριουδάκη¹, Δ. Κεφάλα¹, Χριστοπούλου Αναστασία¹, Α. Σπυριδωνίδης¹

¹Μονάδα Μεταμόσχευσης Μυελού των Οστών, Πανεπιστημιακό Γενικό Νοσοκομείο Πατρών, ²Κέντρο Αίματος, Πανεπιστημιακό Γενικό Νοσοκομείο Πατρών



Σκοπός

❖ Τα πρωτόκολλα προετοιμασίας για αλλογενή μεταμόσχευση αιμοποιητικών κυττάρων (άλλο-ΜΑΚ) βρίσκονται σε συνεχή εξέλιξη ώστε να επιτευχθεί υψηλότερη αποτελεσματικότητα με χαμηλότερη τοξικότητα.

❖ Σκοπός της μελέτης είναι η σύγκριση των αποτελεσμάτων δύο συχνά χρησιμοποιούμενων πρωτοκόλλων προετοιμασίας που βασίζονται στο συνδυασμό ενός αναλόγου πουρίνης και ενός αλκυλιούπα παράγοντα σε ένα αλκυλιωτή, φλουδαραβίνης/μελφαλάνης 140 mg/m² (Fludarabine-Treosulfan, FluMel) και φλουδαραβίνης/ τρεοσουλφάνης 42 g/m² (Fludarabine-Treosulfan, FluTreo).

Πίνακας 1. Επιδημιολογικά χαρακτηριστικά των ασθενών

Χαρακτηριστικά των ασθενών	FluMel	FluTreo	P value
Αριθμός ασθενών	34	20	n/a
Διάμεση Ηλικία (εύρος)	62 (20-71)	63 (30-72)	0.7
Φύλο – Α / Θ	20 / 14	15 / 5	0.2
Νόσημα	21	15	0.28
ΟΜΛ	7	3	
ΜΔΣ	4	0	
NHL	1	0	
B-ΟΛΛ	1	2	
Άλλα νοσήματα			
Στάδιο Νόσου προ άλλο-ΜΑΚ	3	1	0.49
Ανθεκτική Νόσος	3	0	
Μερική Ύφεση	24	17	
Πλήρη Ύφεση	4	2	
Untreated			
Δότης	9	1	0.045
Sibling	13	15	
WMUD	10	4	
MMUD	2	0	
haplo			
Εμφύτευση	+14 (10-22)	+14 (10-17)	0.54
WBC≥1000/mm ³ , ημέρα (εύρος)	+17 (9-57)	+17 (8-29)	0.56
PLT≥ 20.000/mm ³ , ημέρα (εύρος)	+17 (11-127)	+17 (13-33)	0.64
PLT≥ 50.000/mm ³ , ημέρα (εύρος)			
Graft Failure	1	1	0.73
Θνητότητα Σχετιζόμενη με Μεταμόσχευση (TRM)	12 (35%)	2 (10%)	0.04
Ναι	22 (65%)	18 (90%)	
Όχι			
Υποτροπή	9 (26.5%)	3 (15%)	0.33
Ναι	25 (73.5%)	17 (85%)	
Όχι			
Διάμεση επιβίωση, ημέρα (εύρος)	315.5 (18-1996)	121 (29-791)	0.004

Μεθοδολογία

❖ Ανασκοπήθηκαν αναδρομικά τα δεδομένα των ασθενών που υποβλήθηκαν σε άλλο-ΜΑΚ από τον Οκτώβριο 2005 έως τον Ιούλιο 2023, στη Μονάδα Μεταμόσχευσης Μυελού των Οστών του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Πατρών και επιλέχθηκαν οι ασθενείς που έλαβαν προπαρασκευαστικό σχήμα προετοιμασίας με FluMel και FluTreo.

❖ Τα κλινικά χαρακτηριστικά συγκρίθηκαν μεταξύ των δύο ομάδων χρησιμοποιώντας τις μεθόδους χ² (categorical parameters) και Mann-Whitney (continuous parameters) και το όριο στατιστικής σημαντικότητας τέθηκε ως p<0.05.

Αποτελέσματα

❖ Συνολικά 34 ασθενείς έλαβαν προπαρασκευαστικό σχήμα με FluMel και 20 ασθενείς με FluTreo.

❖ Η διάμεση ηλικία των ασθενών που έλαβαν FluMel ήταν τα 62 έτη (εύρος 20-71) και των ασθενών που έλαβαν FluTreo τα 63 έτη (εύρος 30-72).

❖ Τα λεπτομερή δημογραφικά χαρακτηριστικά των ασθενών αναγράφονται στον Πίνακα 1.

❖ Καμία διαφορά στην εμφύτευση των λευκών και των αιμοπεταλίων δεν παρουσιάστηκε ανάμεσα στις δυο ομάδες.

❖ Σε μονοπαραγοντική ανάλυση των κλινικών δεδομένων μεταξύ των δύο ομάδων ο τύπος δότη, η θνητότητα σχετιζόμενη με τη μεταμόσχευση (TRM) και η συνολική επιβίωση διέφεραν στατιστικά σημαντικά (p=0.045, p=0.04 και p=0.004 αντίστοιχα) με υπεροχή της ομάδας FluTreo.

❖ Το σύνολο των στατιστικών συγκρίσεων αναγράφεται στον Πίνακα 1.

Συμπεράσματα

❖ Το προπαρασκευαστικό σχήμα FluTreo προσφέρει όφελος επιβίωσης σε σχέση με το FluMel που οφείλεται στην χαμηλότερη θνητότητα σχετιζόμενη με την μεταμόσχευση, χωρίς να επηρεάζεται το ποσοστό υποτροπής.

❖ Τα δεδομένα αυτά χρήζουν προοπτικής επιβεβαίωσης αλλά είναι ικανά ώστε να καθιερώσουν το FluTreo στην στρατηγική μας σαν ενδεδειγμένο προπαρασκευαστικό σχήμα τουλάχιστον σε ασθενείς σε πλήρη ύφεση



ID 86

Π. Σαμαρά, Σ. Καρατασάκη, Σ. Γραφάκος

Κέντρο Εθελοντών Δοτών Μυελού των Οστών «ΟΡΑΜΑ ΕΛΠΙΔΑΣ», Ογκολογική Μονάδα Παίδων Μαριάννα Β. Βαρδινογιάννη-ΕΛΠΙΔΑ, Νοσοκομείο Παίδων «Η Αγία Σοφία», Αθήνα

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Αρχέγονα αιμοποιητικά κύτταρα για μεταμόσχευση συλλέγονται από έναν μη συγγενή εθελοντή δότη με δύο τρόπους: με παρακέντηση του μυελού των οστών (ΜΟ) (από τις λαγόνιες ακρολοφίες υπό γενική αναισθησία) και από το περιφερικό αίμα (με μηχανήμα κυτταραφαίρεσης μετά από τετραήμερη κινητοποίηση με G-CSF). Έχει διεξαχθεί εκτενής έρευνα για να καθοριστεί ποια μέθοδος δωρεάς προσφέρει τα καλύτερα αποτελέσματα για τον ασθενή. Ωστόσο, οι ίδιοι οι δότες επιλέγουν τελικά τον τρόπο με τον οποίο θα προσφέρουν τα κύτταρα, με τη μυελική συλλογή να επιτελείται όλο και πιο σπάνια πλέον.

ΣΚΟΠΟΣ

Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η ανάλυση των περιπτώσεων δωρεάς μοσχεύματος από τον ΜΟ μέσω παρακέντησης, εξετάζοντας τα χαρακτηριστικά δοτών-ληπτών και καταγράφοντας παράλληλα την εμπειρία των δοτών.

ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΣ

Από τις 300 συλλογές μοσχευμάτων από δότες του Κέντρου μας κατά το χρονικό διάστημα (02/2015-08/2023):

- οι 33 (11%) πραγματοποιήθηκαν από τον ΜΟ αφού είχε προηγηθεί κατάθεση αυτόλογης μονάδας αίματος
- οι δότες ήταν 22 άνδρες και 11 γυναίκες
- οι λήπτες ήταν:
 - 27 παιδιά (15 αγόρια & 12 κορίτσια, 19 στην Ελλάδα & 8 στο εξωτερικό)
 - 6 ενήλικες (3 άνδρες & 3 γυναίκες, 1 στην Ελλάδα & 5 στο εξωτερικό)

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η συλλογή αιμοποιητικών κυττάρων προς μεταμόσχευση από τον ΜΟ αφορά συγκεκριμένους λήπτες, κυρίως παιδιατρικούς ασθενείς ή ορισμένους ενήλικες με μη κακή νόσηση. Οι αναφερόμενες παρενέργειες χαρακτηρίστηκαν γενικά ήπιες και αποδεκτές από τους δότες, δεδομένου του δυνητικού οφέλους για το λήπτη, καθώς γνωρίζουν ότι η μεταμόσχευση αποτελεί τη μοναδική ελπίδα ζωής για τον ασθενή.

ΕΠΙΛΟΓΟΣ



Άρση της ανωνυμίας δότη-λήπτη & γνωριμία μετά από 2 έτη



Βασίλης & Αρχοντία

ΔΟΤΕΣ

- ✓ Όλοι οι δότες έλαβαν την αυτόλογη μονάδα αίματος αμέσως μετά τη λήψη του μυελού
- ✓ Μία δότρια 22 ετών έδωσε από το μυελό, αντί από το περιφερικό αίμα όπως είχε αρχικά προγραμματιστεί, λόγω μη κινητοποίησης με τον G-CSF (poor mobilizer, CD34+ ≤20 κύτταρα/μL στο περιφερικό της αίμα)
- ✓ Από τους υπόλοιπους 32 δότες, μετά τη συλλογή του μυελού:
 - 1 κλήθηκε να προσφέρει και περιφερικό αίμα
 - 3 προσέφεραν λεμφοκύτταρα (DLI)
 - 1 έδωσε αίμα για απομόνωση ειδικών T λεμφοκυττάρων λόγω ιικής λοίμωξης του λήπτη
- ✓ Οι δότες μας περιγράφουν:
 - μεγαλύτερο πόνο στην περιοχή της λήψης (3 εκ των οποίων, 2 άνδρες και 1 γυναίκα, για παρατεταμένο χρονικό διάστημα)
 - ήπια ναυτία λόγω της αναισθησίας
 - περισσότερες ημέρες περιορισμένης δραστηριότητας, καθώς και αναφορά στην παραμονή στο νοσοκομείο σε σχέση με τους δότες που προσέφεραν κύτταρα από το περιφερικό αίμα
 - κόπωση & ατονία για μερικές ημέρες μετά τη λήψη
 - αισθήματα χαράς για την πράξη τους, καθώς και αγωνία για την έκβαση της δωρεάς και την υγεία του λήπτη

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

ΛΗΠΤΕΣ

- ✓ Όσον αφορά τους παιδιατρικούς λήπτες:
 - έπασχαν κυρίως από αιματολογικές κακοήθειες (16/27) με επικρατούσα την οξεία λεμφοβλαστική λευχαιμία
 - 7 είχαν 9/10 συμβατότητα, ενώ 20 είχαν 10/10 συμβατότητα με τους δότες
 - 18 βρίσκονται εν ζωή, 5 απεβίωσαν, ενώ για 4 δεν υπάρχει follow-up
- ✓ Όσον αφορά τους ενήλικες λήπτες:
 - και οι 6 είχαν 10/10 συμβατότητα με τους δότες
 - 3 έπασχαν από λευχαιμία (1 από οξεία μυελογενή, 1 από χρόνια μυελογενή και 1 από οξεία λεμφοβλαστική)
 - 2 έπασχαν από απλαστική αναιμία
 - 1 έπασχε από μεσογειακή αναιμία
 - 4 από τους 6 βρίσκονται εν ζωή, ενώ για τους 2 δεν υπάρχει follow-up

ΕΠΑΓΩΓΗ ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟΥ ΣΤΡΕΣ ΣΕ ΚΥΤΤΑΡΑ ΤΟΥ ΑΙΜΑΤΟΣ ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ ΜΙΚΡΟΣΩΜΑΤΙΩΝ ΣΤΕΛΕΧΙΑΙΩΝ ΑΙΜΟΠΟΙΗΤΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ



Καϊόπουλος Γ.^{1,2}, Ξαγοράρη Α.¹, Παπαϊωάννου Δ.¹, Σακελλάρη Ι.¹, Τουράκη Μ.², Σωτηρόπουλος Δ.¹,

¹Δημόσια Τράπεζα Βλαστοκυττάρων, Τομέας Μεταμόσχευσης Μ.Ο., Αιματολογικό Τμήμα «Στοργή», Γ.Ν.Θ. «Γ. Παπανικολάου», Θεσσαλονίκη

²Τομέας Γενετικής, Ανάπτυξης και Μοριακής Βιολογίας, Τμήμα Βιολογίας, Σχολή Θετικών Επιστημών, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης, Θεσσαλονίκη

Εισαγωγή

Οι δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS) είναι μόρια που παράγονται πρωτίστως κατά τον κυτταρικό μεταβολισμό και οδηγούν στην πρόκληση οξειδωτικού στρες¹. Η αύξηση του οξειδωτικού στρες στα κύτταρα έχει ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση σηματοδοτικών μονοπατιών που οδηγούν με τη σειρά τους σε αύξηση της δραστικότητας αντιοξειδωτικών ενζύμων όπως είναι η δισμουτάση του υπεροξειδίου (SOD), η αναγωγή της γλουταθειόνης (GR) και η S-τρανσφεράση της γλουταθειόνης (GST) και στοχεύουν στην αδρανοποίηση των ROS. Τα αντιοξειδωτικά ένζυμα χρησιμεύουν ως δείκτες ανίχνευσης οξειδωτικού στρες στα κύτταρα². Η αύξηση των επιπέδων του οξειδωτικού στρες στα κύτταρα ενδέχεται να συνδέεται με την έκλυση μικροσωματίων. Τα μικροσωμάτια είναι μικρά μεμβρανικά κυστίδια, μεγέθους 0,1-1 μm, τα οποία εκβάλλουν από πλήθος κυττάρων έπειτα από ενεργοποίηση ή κατά την απόπτωση. Χαρακτηρίζονται από μεγάλη ετερογένεια στη σύστασή τους και αλληλεπιδρούν ποικιλοτρόπως με άλλα κύτταρα στόχους³.

Σκοπός της ερευνητικής μελέτης

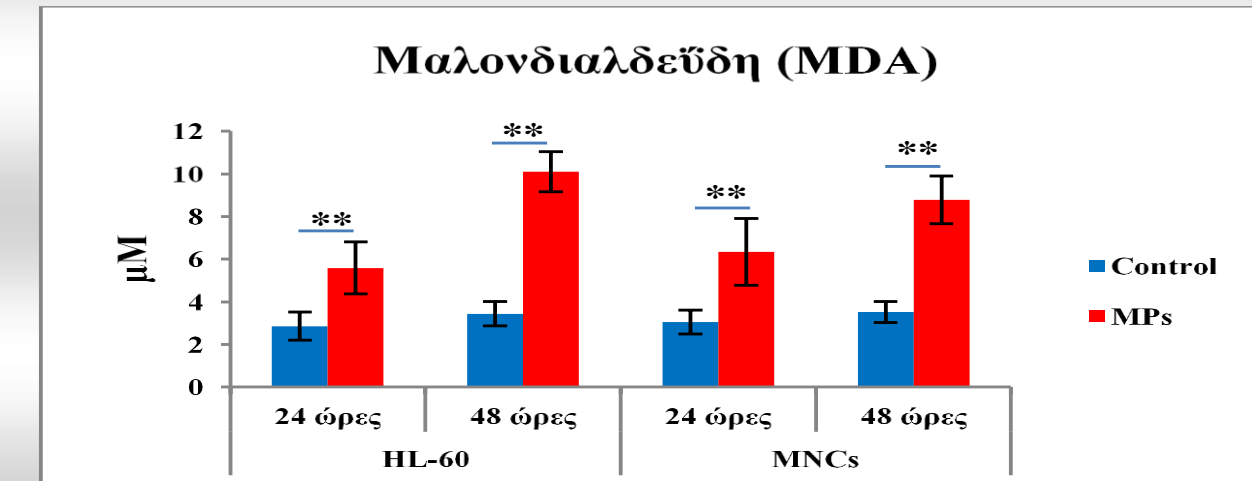
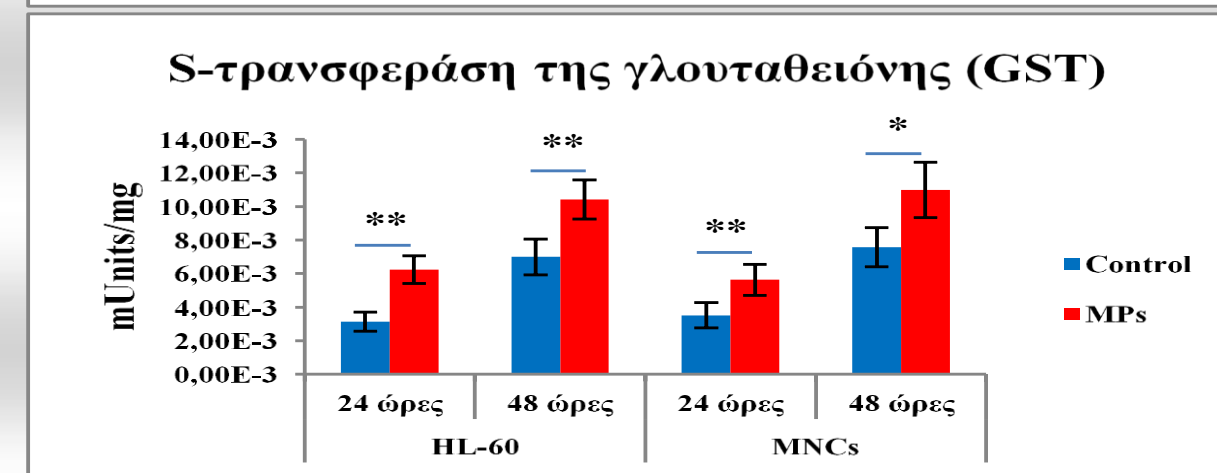
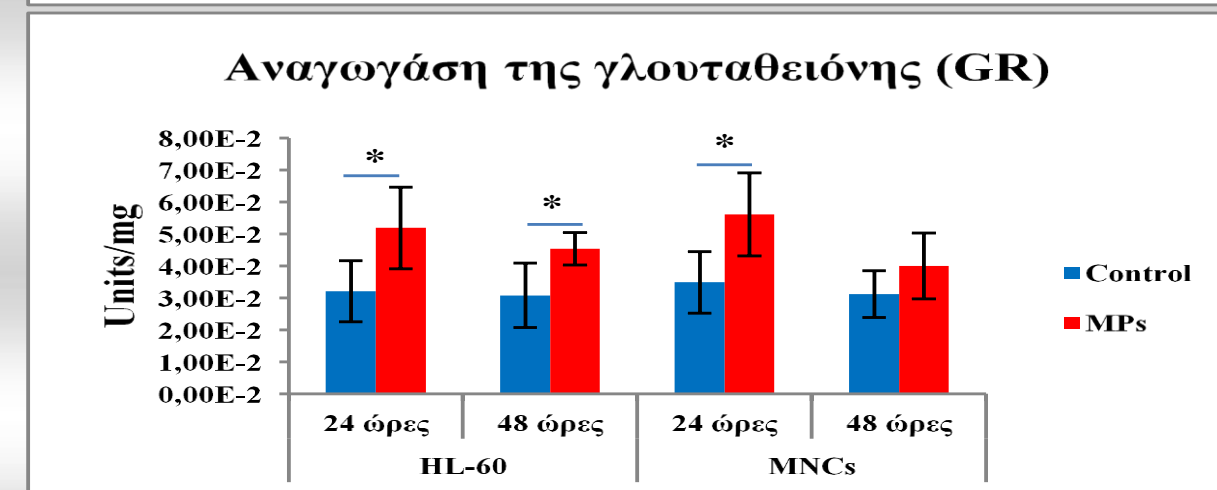
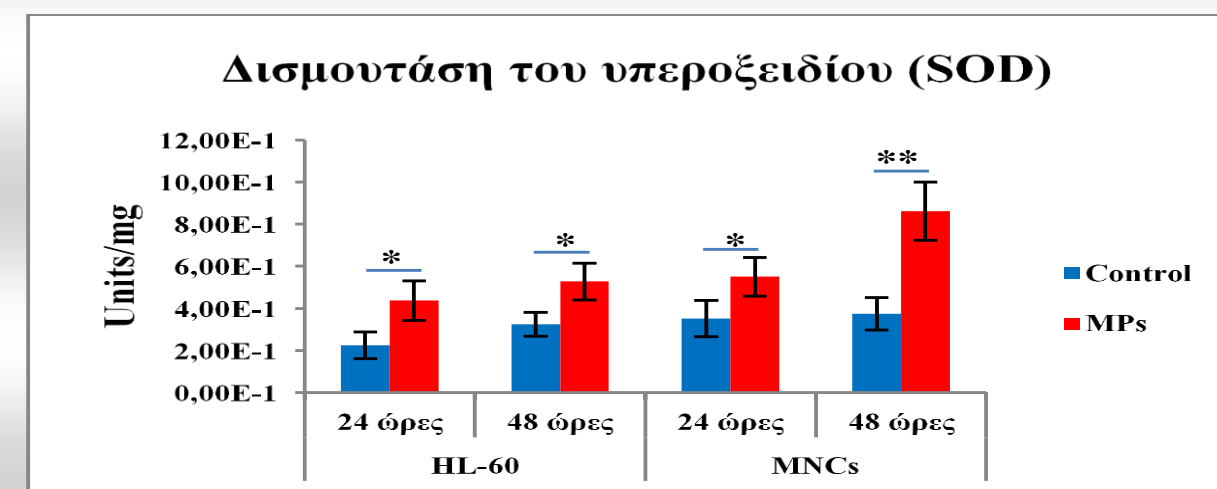
Ο σκοπός της παρούσας ερευνητικής μελέτης είναι η κατανόηση της επίδρασης των μικροσωματίων που προέρχονται από αρχέγονα στελεχιαία αιμοποιητικά κύτταρα (CD34⁺ MPs) στην πρόκληση οξειδωτικού στρες σε μονοπύρηννα κύτταρα ομφαλοπλακουντικού αίματος (MNCs) καθώς και σε κύτταρα της προμυελοκυτταρικής σειράς HL-60.

Μεθοδολογία

Πραγματοποιήθηκε απομόνωση μονοπύρηννων κυττάρων από ομφαλοπλακουντικό αίμα (ΟΠΑ) με φυγοκέντρηση διαβάθμισης πυκνότητας με τη χρήση φικόλης. Τα CD34⁺ μικροσωμάτια απομονώθηκαν από το πλάσμα ΟΠΑ με φυγοκέντρηση και ανοσομαγνητικό διαχωρισμό. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε συνεπάωση CD34⁺ μικροσωματίων και MNCs ή HL-60 κυττάρων. Ακολουθώς, μετρήθηκαν τα επίπεδα δραστικότητας των αντιοξειδωτικών ενζύμων SOD⁴, GR⁵ και GST⁶ καθώς και η ποσότητα της μαλονδιαλδεΐδης (MDA), παραπροϊόντος της λιπιδικής υπεροξειδωσίας. Στα αποτελέσματα εφαρμόστηκε στατιστική ανάλυση για την αξιολόγηση της σημαντικότητάς τους.

Αποτελέσματα

Προσδιορισμός της δραστικότητας των αντιοξειδωτικών ενζύμων SOD, GR, GST και των επιπέδων της MDA σε MNCs και HL-60 κύτταρα έπειτα από την επίδραση των CD34⁺ MPs σε αυτά για 24 και 48 ώρες.



Στα γραφήματα αποτυπώνεται ο μέσος όρος ενζυμικής δραστικότητας των αντιοξειδωτικών ενζύμων SOD, GR και GST, καθώς και η ποσότητα της MDA στα δείγματα ελέγχου και στα δείγματα που βρέθηκαν σε συνεπάωση με CD34⁺ MPs για 24 ή 48 ώρες. Παράλληλα, παρουσιάζεται η τυπική απόκλιση καθώς και η στατιστική σημαντικότητα των αποτελεσμάτων, *p-value < 0.05, **p-value < 0.001.

Συμπεράσματα

Τα CD34⁺ MPs οδηγούν σε άνοδο των επιπέδων του οξειδωτικού στρες σε MNCs και HL-60 κύτταρα, καθώς παρατηρείται αύξηση στη δράση των αντιοξειδωτικών ενζύμων SOD, GR και GST. Παράλληλα, παρουσία των MPs αυξάνεται η οξείδωση των λιπιδίων και συνεπώς η αποδιοργάνωση των κυτταρικών μεμβρανών και λιπιδικών ενώσεων. Εν τέλει, τα CD34⁺ MPs φαίνεται πως ενεργοποιούν τα MNCs και HL-60 και κινητοποιούν τον αντιοξειδωτικό μηχανισμό.

Βιβλιογραφία

- Betteridge, D. J. (2000). What is oxidative stress? *Metabolism*, 49(2), 3–8.
- Limón-Pacheco, J., & Gonsébat, M. E. (2009). The role of antioxidants and antioxidant-related enzymes in protective responses to environmentally induced oxidative stress. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 674(1-2), 137–147.
- Xagorari, A., Gerousi, M., Sioga, A., Bougiouklis, D., Argiriou, A., Anagnostopoulos, A., et al. Identification of miRNAs from stem cell derived microparticles in umbilical cord blood. *Exp Hematol*.2019 Dec;80:21-26. doi:10.1016/j.exphem.2019.11.001. Epub 2019 Nov 14.
- Beyer, W. F., & Fridovich, I. (1987). Assaying for superoxide dismutase activity: Some large consequences of minor changes in conditions. *Analytical Biochemistry*, 161(2), 559–566.
- Carlberg, I., & Mannervik, B. (1985). [59] Glutathione reductase. *Methods in Enzymology*, 484–490.
- Habig, W. H., Pabst, M. J., & Jakoby, W. B. (1974). Glutathione S-Transferases. *Journal of Biological Chemistry*, 249(22), 71.

ΒΡΑΧΥΠΡΟΘΕΣΜΗ ΕΚΒΑΣΗ ΑΙΜΑΤΟΛΟΓΙΚΩΝ ΑΣΘΕΝΩΝ ΠΟΥ ΧΡΕΙΑΣΤΗΚΑΝ ΝΟΣΗΛΕΙΑ ΣΕ ΜΕΘ

Ε. Γαβριελάτου¹, Α. Αργύρης², Σ. Ορφανόπουλος¹, Σ. Μαλαχιάς¹, Α. Μαντέλου¹, Σ. Κατσούλη Ε¹, Ε. Δούκα¹

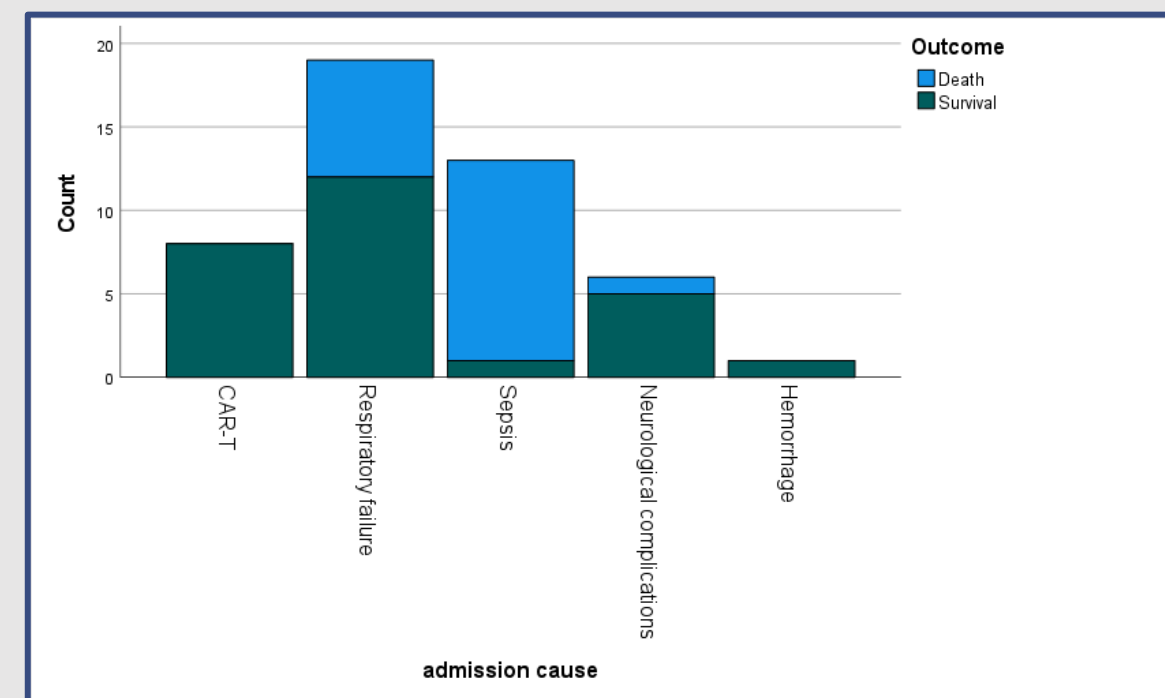
¹ Α' Κλινική Εντατικής Θεραπείας, Γ.Ν.Α. «Ευαγγελισμός», Ιατρική Σχολή, Ε.Κ.Π.Α., ² Α' Παθολογική Κλινική, Γ.Ν.Α «Αλεξάνδρα»

ΣΚΟΠΟΣ ΜΕΛΕΤΗΣ: Με τα νεότερα θεραπευτικά δεδομένα, η επιβίωση των αιματολογικών ασθενών συνεχώς βελτιώνεται. Παρόλα αυτά η εμφάνιση και η αντιμετώπιση απειλητικών για τη ζωή επιπλοκών σε αυτούς τους ασθενείς, αποτελεί πρόκληση τόσο για τους αιματολόγους όσο και για τους εντατικολόγους. Σκοπός της παρούσας μελέτης είναι η περιγραφή της αιτίας εισόδου, του τύπου της αιματολογικής νόσου καθώς και της έκβασης στους αιματολογικούς ασθενείς που εισήχθησαν στην ΜΕΘ του νοσοκομείου μας κατά τα έτη 2021-2022.

ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΣ: Πρόκειται για μία αναδρομική μελέτη παρατήρησης μετά από λεπτομερή ανασκόπηση των φακέλων των ασθενών που εισήχθησαν στην ΜΕΘ από 1/1/2021 έως 31/12/22. Αξιοποιήθηκαν δεδομένα μόνο από ασθενείς προερχόμενους από την Αιματολογική Κλινική και δεν ελήφθησαν υπόψη ασθενείς με οποιαδήποτε διάγνωση αιματολογικού νοσήματος προερχόμενοι από άλλες κλινικές του νοσοκομείου μας. Κάθε νοσηλεία στην ΜΕΘ θεωρήθηκε ξεχωριστή περίπτωση.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ: Στην ανωτέρω χρονική περίοδο εισήχθησαν 49 ασθενείς προερχόμενοι από την Αιματολογική Κλινική. Εξ' αυτών 8 (17%) ασθενείς εισήχθησαν λόγω CRS Grade 2 είτε λόγω ICANS στο πλαίσιο λήψης θεραπείας με CAR-T cells. Από τις υπόλοιπες αιτίες εισόδου,

η αναπνευστική ανεπάρκεια αποτέλεσε τη συχνότερη (19 ασθενείς, 40,4%), ακολουθούμενη από τη σήψη (13 ασθενείς, 27,7%), τις νευρολογικές επιπλοκές (6 ασθενείς, 12,8%), και την αιμορραγία (1 ασθενής, 2.1%). Σε 2 ασθενείς υπήρχαν ελλιπή δεδομένα ως προς την αιτία εισαγωγής. Η συχνότερη αιματολογική νόσος ήταν η οξεία μυελογενής λευχαιμία (14 ασθενείς, 28,6%). Ως προς τη βραχυπρόθεσμη έκβαση (έξοδος από ΜΕΘ), 20 ασθενείς κατέληξαν εντός νοσηλείας (θνητότητα 40,8%). Από τους ασθενείς που εισήχθησαν λόγω αναπνευστικής ανεπάρκειας, 7 ασθενείς απεβίωσαν (θνητότητα 36,8%) ενώ από τους ασθενείς που εισήχθησαν λόγω σήψης, 12 ασθενείς απεβίωσαν (θνητότητα 92,3%). Από τους ασθενείς που χρειάστηκαν μηχανικό αερισμό για οποιαδήποτε αιτία (36 ασθενείς σε σύνολο 47), 20 ασθενείς κατέληξαν εντός νοσηλείας (ποσοστό θνητότητας 55,6% επί των διασωληνωμένων).



ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ: Από την παρούσα μελέτη καταδεικνύεται ότι η αναπνευστική ανεπάρκεια είναι η συχνότερη αιτία εισαγωγής αιματολογικών ασθενών στην ΜΕΘ, ενώ η σήψη είναι η συχνότερη αιτία κακής έκβασης. Βάσει αυτών των δεδομένων υπογραμμίζεται η ανάγκη στενής συνεργασίας αιματολόγων και εντατικολόγων, ο σχεδιασμός κλινών ΜΕΘ λαμβάνοντας υπόψη το σύνολο των νοσηλευόμενων αιματολογικών ασθενών, και ενδεχομένως η αναγκαιότητα έγκαιρης εισαγωγής των ευάλωτων αυτών ασθενών σε περιβάλλον αυξημένης παρακολούθησης.