

Παθογένεια των μυελοδυσπλαστικών συνδρόμων II: Ο ρόλος του ανοσοποιητικού συστήματος

Μιχάλης Βουλγαρέλης, Ιωάννα Βλαχαδάμη, Κατερίνα Μπενέκου

ΠΕΡΙΛΗΨΗ: Τα μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα (ΜΔΣ) είναι μία ετερογενής ομάδα κλωνικών διαταραχών του αρχέγονου αιμοποιητικού κυττάρου που χαρακτηρίζονται από μη αποδοτική αιμοποίηση και αυξημένη πιθανότητα εξέλιξης σε οξεία μυελογενή λευχαιμία (ΟΜΛ). Η μυελική ανεπάρκεια που χαρακτηρίζει τη νόσο και οδηγεί σε ανάγκη μεταγγίσεων και ουδετεροπενικές λοιμώξεις, αρχικά θεωρήθηκε ως αποτέλεσμα ενδογενούς βλάβης του αρχέγονου αιμοποιητικού κυττάρου, σε ορισμένα όμως ΜΔΣ φαίνεται να σχετίζεται με αυτοανοσία, Τ-κυτταρική επαγόμενη μυελοκαταστολή και κυτταροπενίες επαγόμενες από κυτταροκίνες. Αυτοάνοσα νοσήματα όπως το σύνδρομο Raynaud, η ρευματοειδής αρθρίτιδα και η ρευματική πολυμυαλγία συχνά απαντώνται σε ασθενείς με ΜΔΣ. Μελέτες για τον ρόλο της αυτοανοσίας στη παθοφυσιολογία των ΜΔΣ οδήγησαν στη χρήση ανοσοκατασταλτικών θεραπειών. Σύμφωνα με το μοντέλο που συσχετίζει το ανοσολογικό σύστημα και τις κυτταροπενίες, ο δυσπλαστικός κλώνος εκφράζει ένα νεοαντιγόνο ή υπερεκφράζει ένα αυτοαντιγόνο, το οποίο προκαλεί έκπτυξη Τ-κυτταρικών κλώνων κυτταροτοξικών για τα ΜΔΣ. Τα ενεργοποιημένα Τ-λεμφοκύτταρα εκκρίνουν κυτταροκίνες, όπως Tumor Necrosis Factor- α (TNF- α) και ιντερφερόνη- γ (IFN- γ), οι οποίες καταστέλλουν την αιμοποίηση, προάγοντας την απόπτωση και των φυσιολογικών προγονικών κυττάρων. Οι παραπάνω παρατηρήσεις οδήγησαν σε περαιτέρω μελέτες για τον ρόλο του ανοσοποιητικού συστήματος στις κυτταροπενίες των ασθενών με ΜΔΣ. Τεχνικές FISH έδειξαν ότι τα κυτταροτοξικά Τ-κύτταρα στρέφονται ειδικά έναντι κυττάρων με τρισωμία 8. Δεδομένου ότι η πρωτεΐνη Wilm's tumor 1 (WT1) υπερεκφράζεται στα προγονικά κύτταρα αρκετών ασθενών με ΜΔΣ, αποτελεί πιθανό αντιγόνο που επάγει ειδική ανοσολογική απάντηση. Αυτή η ανασκόπηση έχει σαν σκοπό να περιγράψει τους ανοσολογικούς μηχανισμούς που εμπλέκονται στην παθογένεια των κυτταροπενιών των ΜΔΣ και την ανταπόκρισή τους στην ανοσοκαταστολή.

Haema 2011; 2(2): 162-168 Copyright EAE

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Τα ΜΔΣ είναι μία ετερογενής ομάδα κλωνικών διαταραχών του αρχέγονου αιμοποιητικού κυττάρου με γενικά χαρακτηριστικά μη αποδοτική αιμοποίηση και αυξημένη πιθανότητα εξέλιξης σε ΟΜΛ. Η μη αποδοτική αιμοποίηση εκδηλώνεται με μορφολογική δυσπλασία των αιμοποιητικών σειρών στον μυελό και το περιφερικό αίμα,

αιμοποιητική δυσλειτουργία και κυτταροπενίες, δηλαδή αναμία, ουδετεροπενία και θρομβοπενία. Μολονότι διαταραχές ποικίλων βιολογικών μονοπατιών έχουν ενοχοποιηθεί για την παθογένεια των ΜΔΣ, η βιολογική και κλινική τους θεώρηση επισκιάστηκε εξ αρχής από το γεγονός ότι αναγνωρίστηκαν ως “προλευχαιμικές” καταστάσεις. Αν και η λευχαιμική εκτροπή αποτελεί καταληκτικό γεγονός στο 30% των περιπτώσεων, τα ΜΔΣ φαίνεται ότι αποτελούν νοσολογικές εκδηλώσεις μιας πολυσταδιακής παθογενετικής εξεργασίας.

Η ευρέως αποδεκτή προσέγγιση της παθογένειας των ΜΔΣ περιλαμβάνει την επίδραση, αρχικά ενός γενετικά επιβλαβούς συμβάματος επί των αιμοποιητικών κυττάρων, με αποτέλεσμα μεταλλάξεις γονιδίων που ρυθμίζουν τον κυτταρικό κύκλο ή μεταγραφικών παραγόντων

Παθολογική Φυσιολογία, Ιατρική Σχολή, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών

Διεύθυνση Αλληλογραφίας: Μιχάλης Βουλγαρέλης, Αναπληρωτής Καθηγητής Αιματολογίας, Παθολογική Φυσιολογία, Ιατρική Σχολή Πανεπιστημίου Αθηνών, Μικράς Ασίας 75, 115 27, Αθήνα, e-mail: mvoulgar@med.uoa.gr

Ιωάννα Βλαχαδάμη, e-mail: ioannamd@yahoo.gr

Κατερίνα Μπενέκου, e-mail: katbenekou@yahoo.gr

που εμπλέκονται στη διαφοροποίηση, και τελικά την επικράτηση ενός κλώνου με πλεονέκτημα πολλαπλασιασμού, αλλά και ταυτόχρονα αυξημένη απόπτωση. Μεταγενέστερα, επιπρόσθετες γενετικές διαταραχές, όπως απώλεια ογκοκατασταλτικών γονιδίων, ενεργοποίηση ογκογονιδίων και επιγενετικές μεταβολές εγκαθιστούν στον κλώνο αυξημένο ρυθμό πολλαπλασιασμού και ελλειψιότητα απόπτωσης, με αποτέλεσμα τη μεταμόρφωση σε οξεία λευχαιμία.

Αδιαμφισβήτητα φαινόμενα που χαρακτηρίζουν τα ΜΔΣ είναι η γενετική αστάθεια, η αδυναμία του κλώνου για φυσιολογική διαφοροποίηση και η μη αποδοτική αιμοποίηση.¹ Η αναστολή παραγωγής ώριμων κυττάρων οδήγησε στην υπόθεση ότι η αυξημένη απόπτωση των κλωνικών προγονικών κυττάρων αποτελεί τη μοριακή βάση της μη αποδοτικής αιμοποίησης.² Οι περισσότεροι ερευνητές καταλήγουν ότι η απόπτωση είναι ιδιαίτερα αυξημένη στα πρώτα στάδια της νόσου στους αναφερόμενους 'καλής πρόγνωσης' ασθενείς, οι οποίοι σύμφωνα με τις παλαιότερες αναφορές παρουσιάζουν και τα υψηλότερα ποσοστά μη αποδοτικής ερυθροποίησης.³⁻⁷ Έχει διατυπωθεί η υπόθεση ότι οι πρωτοπαθείς γενετικές αλλοιώσεις του κλώνου επηρεάζουν ρυθμιστικά γονίδια του κυτταρικού κύκλου και πρωτεΐνες επιδιόρθωσης του DNA, οδηγώντας σε απώλεια των ρυθμιστικών μηχανισμών της απόπτωσης. Περισσότερες όμως μελέτες εστιάζονται στον πιθανό ρόλο εξωγενών παραγόντων, όπως του μικροπεριβάλλοντος του μυελού, το οποίο είναι δυνατόν να πυροδοτήσει την αποπτωτική διαδικασία μέσω υπερέκκρισης προαποπτωτικών μεσολαβητών.^{2,3,8,9} Η αύξηση των επιπέδων του TNF-α στο μικροπεριβάλλον του μυελού και η αυξημένη έκφραση του υποδοχέα Fas στα προγονικά αιμοποιητικά κύτταρα οδηγούν στην ενεργοποίηση των κασπασών και την πυροδότηση των κυτταρικών αποπτωτικών προγραμμάτων.²

ΚΥΤΤΑΡΟΚΙΝΕΣ ΚΑΙ Ο ΡΟΛΟΣ ΤΟΥΣ ΣΤΗΝ ΑΥΤΟΑΝΟΣΙΑ ΤΩΝ ΜΔΣ

Ο ρόλος του TNF-α ως επαγωγέα απόπτωσης έχει μελετηθεί επαρκώς.¹⁰⁻¹² Τα αυξημένα επίπεδα του TNF-α στα χαμηλού κινδύνου ΜΔΣ επάγουν απόπτωση με τη δέσμευση των υποδοχέων τύπου 1 (TNFR1) και την άμεση σύνδεσή του με την πρωτεΐνη *Tumor necrosis factor receptor type 1 associated death domain* (TRADD) ή την έμμεση σύνδεση με την πρωτεΐνη *Fas Associated Death Domain* (FADD) και την επακόλουθη ενεργοποίηση του καταρράκτη των κασπασών. Τα αυξημένα επίπεδα του TNF-α έχουν συσχετισθεί με τη βαρύτητα της αναιμίας, την αυξημένη κυτταροβρίθεια και αγγειογένεση στον μυελό και την κακή πρόγνωση των ασθενών.^{10,13,14} Η καταστολή του TNF-α με τη χορήγηση χημικών μονοκλωνικών αντισωμάτων συνοδεύτηκε από ελάττωση της

απόπτωσης στον μυελό των ασθενών με ΜΔΣ, αποκατάσταση της κλωνογόνου ικανότητας των CD34+ προγονικών κυττάρων και σε ορισμένες περιπτώσεις από κλινική ανταπόκριση. Αντίθετα, η απόπτωση στα προχωρημένα στάδια της νόσου είναι λιγότερο εμφανής διότι γενετικές κυτταρικές αλλαγές συντελούν στην επικράτηση αντιαποπτωτικών μορίων και μηχανισμών που οδηγούν στο φαινόμενο κυρίως του κυτταρικού πολλαπλασιασμού παρά της απόπτωσης.^{2,15}

Ιδιόμορφο χαρακτηριστικό της κλινικής εικόνας των ασθενών με ΜΔΣ είναι η εμφάνιση, σε σημαντικό ποσοστό, αυτοάνοσων – συστηματικών εκδηλώσεων (ΑΣΕ) (Πίνακας 1),¹⁶ εύρημα που συνηγορεί υπέρ της συμμετοχής ανοσολογικών μηχανισμών στην παθογένεια των ΜΔΣ. Οι εκδηλώσεις αυτές είναι μη ειδικές και ποικίλες, και πιθανόν να σχετίζονται με διαταραχές στην ισορροπία παραγωγής των προφλεγμονωδών κυτταροκινών που εμφανίζονται οι ασθενείς με ΜΔΣ. Καθώς τα όργανα που προσβάλλονται δεν ανήκουν συνήθως στο αιμοποιητικό σύστημα είναι δύσκολο να τεκμηριωθεί η παθογενετική συνάφεια των φαινομένων αυτών με τις ανοσολογικές αποκρίσεις έναντι του δυσπλαστικού κλώνου.¹⁶ Ο μεταγραφικός παράγοντας Interferon regulatory factor-1 (IRF-1) συμμετέχει στο μονοπάτι της ιντερφερόνης, στη λευχαιμογένεση και την ωρίμανση του ανοσοποιητικού συστήματος. Ο IRF-1 ενεργοποιείται υπό την επίδραση ποικίλων ερεθισμάτων, όπως οι ιοί, η IFN-γ και ο TNF-α.^{17,18} Μετά την ενεργοποίησή του ρυθμίζει την έκφραση πολλαπλών γονιδίων, τα προϊόντα των οποίων εμπλέκονται στην ενεργοποίηση της οδού των ιντερφερονών. Ελλείψεις και σωματικές μεταλλάξεις του γονιδίου του IRF-1 φαίνεται να εμπλέκονται στη παθογένεια των ΜΔΣ και την εξέλιξη σε λευχαιμία.¹⁹ Αν και η μεταγραφική αδρανοποίηση του γονιδίου του IRF-1 χαρακτηρίζει τους ασθενείς με ΜΔΣ, οι ασθενείς με ΜΔΣ και ΑΣΕ εμφανίζουν ακέραιο λειτουργικό μόριο IRF-1 και μάλιστα σε επίπεδα αντίστοιχα με αυτά των ασθενών με συστηματική αγγειίτιδα. Η αυ-

Πίνακας 1. ΜΔΣ και Αυτοάνοσες εκδηλώσεις

ΣΥΣΤΗΜΑΤΙΚΗ ΑΓΓΕΙΪΤΙΔΑ

ΧΡΟΝΙΕΣ ΑΥΤΟΑΝΟΣΕΣ ΕΚΔΗΛΩΣΕΙΣ

Δερματική αγγειίτιδα
Σπειραματονεφρίτιδα
Περιφερική Πολυνευροπάθεια

ΝΟΣΟΙ ΣΥΝΔΕΤΙΚΟΥ ΙΣΤΟΥ

Συστηματικός Ερυθηματώδης Λύκος
Υποτροπιάζουσα Πολυχονδρίτιδα
Σύνδρομο Sjogren
Φαινόμενο Raynaud

ΑΥΤΟΑΝΟΣΗ ΚΥΤΤΑΡΟΠΕΝΙΑ

ξημένη έκφραση του IRF-1 σε αυτούς τους ασθενείς πιθανότατα σχετίζεται με υπερδραστηριότητα του δικτύου των ιντερφερονών, T-helper-1 (Th1) ανοσολογική πόλωση και επαγωγή των γονιδίων της φλεγμονής, γεγονότα που εμπλέκονται στην παθογένεια της αγγειίτιδας στους ασθενείς αυτούς.^{16,20} Η απουσία και η λειτουργική αδρανοποίηση του IRF-1 φαίνεται ότι δρα προστατευτικά στην ανάπτυξη ΑΣΕ στους ασθενείς με ΜΔΣ. Τα αποτελέσματα αυτά συμφωνούν και με *in vivo* μελέτες σε γενετικά τροποποιημένα ποντίκια, που δεν εκφράζουν IRF-1 και εμφανίζουν ανοχή στην επαγωγή αυτοάνοσων νοσημάτων, όπως η επαγόμενη από κολλαγόνο αρθρίτιδα τύπου II και η αλλεργική εγκεφαλομυελίτιδα.^{20,21}

T-Helper 17 (Th17) CD4+ ΚΥΤΤΑΡΑ ΚΑΙ ΑΠΟΠΤΩΣΗ

Τα Th1 κύτταρα μέχρι πρόσφατα θεωρούνταν ως τα μόνα κύτταρα που ενέχονται στον παθογενετικό μηχανισμό της αυτοανοσίας. Το κεντρικό αυτό δόγμα άλλαξε μετά από πρόσφατες μελέτες που κατέδειξαν αυξημένο αριθμό CD4+ Th17 κυττάρων σε ποικίλα αυτοάνοσα νοσήματα.²² Τα Th17 κύτταρα και τα ρυθμιστικά CD4+CD25^{high} FoxP3+ (Tregs) κύτταρα αποτελούν χωριστούς υποπληθυσμούς από τα Th1 και τα Th2 λεμφοκύτταρα. Τα Tregs έχουν αντιφλεγμονώδη δράση και συντηρούν την ανοσολογική ανοχή ενώ τα Th17 λεμφοκύτταρα παίζουν σημαντικό ρόλο στην επαγωγή αυτοανοσίας. Έτσι, η ισορροπία αυτών των λεμφοκυτταρικών πληθυσμών παίζει σημαντικό ρόλο στην αναστολή αυτοάνοσων και φλεγμονωδών απαντήσεων. Σύμφωνα με τους Kordasti και συν²³, τα Th17 κύτταρα είναι αυξημένα στα χαμηλού κινδύνου ΜΔΣ στο περιφερικό αίμα σε σύγκριση με τα υψηλού κινδύνου. Επιπλέον, υπήρχε μία αντίστροφη σχέση μεταξύ του αριθμού των Th17 κυττάρων και των ρυθμιστικών κυττάρων. Ο λόγος Th17/Tregs είναι σημαντικά υψηλότερος στα χαμηλού κινδύνου ΜΔΣ έναντι εκείνων των υψηλού κινδύνου, σχετίζεται με αυξημένη απόπτωση στον μυελό και μπορεί να εξηγήσει τον υψηλότερο κίνδυνο για αυτοανοσία και την αυξημένη πιθανότητα ανταπόκρισης στην ανοσοκαταστολή.²³ Θα πρέπει όμως να αναφερθεί πως, αντίθετα με τους παραπάνω συγγραφείς, οι Bouchliou και συν κατέδειξαν πως τα Th17 κύτταρα είναι ελαττωμένα και υπολειτουργικά στον μυελό των ασθενών με χαμηλού κινδύνου ΜΔΣ,^{24,25} ενώ αυξάνονται στα όψιμα στάδια, προσδίδοντας έτσι έναν πιθανώς διαφορετικό ρόλο των Th17 κυττάρων στην παθοφυσιολογία των ΜΔΣ.

ΑΝΟΣΟΛΟΓΙΚΟΙ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΣΤΗΝ ΠΑΘΟΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ ΤΩΝ ΚΥΤΤΑΡΟΠΕΝΙΩΝ ΣΤΑ ΜΔΣ ΚΑΙ Η ΑΝΤΑΠΟΚΡΙΣΗ ΤΟΥΣ ΣΤΗΝ ΑΝΟΣΟΚΑΤΑΣΤΟΛΗ

Η πιθανότητα εμπλοκής αυτοάνοσων μηχανισμών στη μη αποδοτική αιμοποίηση αποτέλεσε τη θεωρητική βάση της χορήγησης ανοσοκατασταλτικής θεραπείας στους ασθενείς με ΜΔΣ, με άξονα την αποτελεσματικότητα τους σε άλλα νοσήματα μυελικής ανεπάρκειας, όπως η απλαστική αναιμία (ΑΑ). Ευνοϊκή ανταπόκριση εμφανίζουν το 30-50% των συμμετεχόντων ασθενών. Αν και η αποτελεσματικότητα της δεν έχει δοκιμασθεί σε τυχοποιημένες μελέτες, τα ενθαρρυντικά αποτελέσματα των πιλοτικών ερευνών αποτελούν έμμεση απόδειξη συμμετοχής των ανοσολογικών μηχανισμών στην παθογένεια των ΜΔΣ.^{26,27}

Σύμφωνα με τους Sloand και συν²⁷, οι μοναδικοί ανεξάρτητοι προγνωστικοί παράγοντες που επηρεάζουν την ανταπόκριση στην ανοσοκατασταλτική θεραπεία είναι η ηλικία και η έκφραση του αντιγόνου HLA-DR15/DR2. Έχει διατυπωθεί η υπόθεση ότι το συγκεκριμένο HLA μόριο πιθανόν ενέχεται σε μία αποτελεσματικότερη αντιγονοπαρουσίαση πεπτιδίων από φυσιολογικές αντιγονικές δομές των αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων. Επομένως, το αντιγόνο HLA-DR15/DR2 πιθανά είναι δείκτης εμπλοκής ανοσολογικών μηχανισμών στην παθογένεια της μυελικής ανεπάρκειας στα ΜΔΣ.²⁸

Οι Mollðrem και συν²⁹, χρησιμοποιώντας καλλιέργειες μυελού ασθενών με ΜΔΣ που είχαν λάβει αντιθυμοκυτταρική σφαιρίνη (ATG), έδειξαν ότι η απομάκρυνση των CD8+ T-κυττάρων από τις καλλιέργειες οδηγούσε σε αύξηση του αριθμού των CFU-GM αποικιών στους ασθενείς που είχαν κλινική ανταπόκριση στην ATG, ενώ δεν επηρέαζε τις καλλιέργειες ασθενών χωρίς ανταπόκριση. Έξι μήνες αργότερα τα ευρήματα αυτά στους ασθενείς που είχαν ανταπόκριση δεν ήταν επαναλήψιμα. Επιπλέον, προσθήκη των αυτόλογων CD8+ T-κυττάρων προκαλούσε αναστολή του αριθμού των αποικιών CFU-GMs στους ασθενείς που είχαν ανταπόκριση στην ATG. Η προσθήκη αντι-HLA αντισώματος προκαλούσε άρση της αναστολής, εύρημα δηλωτικό ότι η δράση των κυτταροτοξικών λεμφοκυττάρων κατά των αιμοποιητικών κυττάρων είναι HLA-I εξαρτώμενη.²⁹

Οι ασθενείς με ΜΔΣ και ΑΑ παρουσιάζουν αύξηση των CD8+CD28-CD57+ T-λεμφοκυττάρων, μιας υποκατηγορίας ώριμων λεμφοκυττάρων με ισχυρή κυτταροτοξική λειτουργία. Η απώλεια του CD28 και η έκφραση του CD57 αντανάκλα την τελική διαφοροποίηση σε κυτταροτοξικά επιτελικά T-λεμφοκύτταρα κάτι που συμβαίνει μόνο ύστερα από διέγερση του T-κυτταρικού υποδοχέα (TCR) από ειδικά αντιγόνα.³⁰ Επιπλέον, οι ασθενείς με ΜΔΣ πα-

ρουσιάζουν ολιγοκλωνικές εκπτώξεις T-λεμφοκυττάρων με υπερέκφραση περιορισμένου αριθμού Vβ υποοικογενειών του TCR.³¹ Η μελέτη της κατανομής του εύρους της CDR3 (complementarity-determining region) περιοχής στις υπερέκφρασμένες υποοικογένειες σε ασθενείς με ΜΔΣ αναδεικνύει σε ορισμένες περιπτώσεις ολιγοκλωνικές εκπτώξεις πιθανολογώντας μία αντιγονοεξαρτώμενη έκπτωση των T-λεμφοκυττάρων. Ιδιαίτερα ενδιαφέρον εύρημα αποτελεί η εξαφάνιση αυτών των κλωνικών λεμφοκυτταρικών πληθυσμών σε ασθενείς που ανταποκρίθηκαν στην ανοσοκατασταλτική θεραπεία.³¹

Αυτές οι παρατηρήσεις δημιουργούν πολλά ερωτήματα σχετικά με τους μηχανισμούς που εμπλέκονται στην ανοσολογική δυσλειτουργία των ΜΔΣ. Ποιά είναι τα αντιγόνα στα αιμοποιητικά κύτταρα του κλώνου που αναγνωρίζονται από τα αυτοαντιδρώντα T-λεμφοκύτταρα; Ποιός είναι ο ρόλος των κυτταροκινών, όπως ο TNF-α, όσον αφορά στην επίδραση στην υπόλοιπη φυσιολογική αιμοποίηση; Η άνοση μυελοκαταστολή χρησιμεύει ως μία μορφή ανοσοεπιτήρησης που καθυστερεί την εξέλιξη του δυσπλαστικού κλώνου; Πολλές απαντήσεις στις ερωτήσεις αυτές έχουν δοθεί από τις μελέτες ασθενών με τρισωμία 8. Η τεχνική FISH επιτρέπει τη μελέτη ξεχωριστά της επίδρασης των T-λεμφοκυττάρων με τα φυσιολογικά και δυσπλαστικά κλωνικά αιμοποιητικά κύτταρα, προσδιορίζοντας έτσι την ειδικότητα της ανοσολογικής απάντησης *in vitro*. Τα CD34+ κύτταρα ασθενών με τρισωμία 8³ υπερέκφραζουν Fas, TNFR1, και κασπάση-8 συγκριτικά με τα φυσιολογικά αιμοποιητικά κύτταρα, γεγονός που δηλώνει ότι τα κύτταρα αυτά υφίστανται T-άνοση επίθεση η οποία στοχεύει κάποιο νεοαντιγόνο που εκφράζεται στην επιφάνειά τους.

Έχει διαπιστωθεί ότι οι ασθενείς με τρισωμία 8, έχουν υψηλή πιθανότητα αιματολογικής ανταπόκρισης στην ανοσοκατασταλτική θεραπεία και επιπλέον, χαρακτηρίζονται από την παρουσία T-λεμφοκυτταροτοξικών κλώνων, που υπερέκφραζουν περιορισμένο αριθμό υποοικογενειών της Vβ περιοχής του TCR.³² Αυτοί οι T-λεμφοκυτταρικοί κλώνοι καταστέλλουν την ανάπτυξη των αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων με τρισωμία 8, αφού η απομάκρυνσή τους από τις καλλιέργειες οδηγεί σε αύξηση του αριθμού των αποικιών. Αυτή η κατασταλτική δράση είναι απόλυτα ειδική για τον δυσπλαστικό κλώνο, καθώς η αφαίρεση των αυτοαντιδρώντων CD8+ T-λεμφοκυττάρων δεν επηρεάζει τις καλλιέργειες των φυσιολογικών κυττάρων του ίδιου ασθενή.³²

Στους μη θεραπευθέντες ασθενείς, η διατήρηση του τρισωμικού κλώνου παρά την παρουσία της T-ανοσολογικής απάντησης σημαίνει ότι τα κλωνικά κύτταρα προσαρμόζονται και επιζούν της T-κυτταρικής επίθεσης. Τα αιμοποιητικά κύτταρα με τρισωμία 8 παρουσιάζουν σημεία ενεργοποιημένης αποπτωτικής διαδικασίας, με αυξημένα επίπεδα κασπάσης-8 και ανεξίνης, αλλά διαφεύγουν από

τον κυτταρικό θάνατο επειδή υπερέκφραζουν την πρωτεΐνη survivin.³ Αυτή η διαταραγμένη αποπτωτική διαδικασία οδηγεί στη παρουσία αιμοποιητικών κυττάρων με δυσπλαστική μορφολογία.³³

Η υπόθεση της εμπλοκής των αυτοαντιδρώντων T-λεμφοκυττάρων στην ανάπτυξη μυελικής ανεπάρκειας, φαίνεται απλή, αλλά στην κλινική πράξη τα στοιχεία περιπλέκονται. Οι ασθενείς με τρισωμία 8 που ανταποκρίνονται στην ανοσοκατασταλτική αγωγή παρουσιάζουν φυσιολογική μορφολογία στον μυελό, αλλά δεν χάνουν τον πληθυσμό με τρισωμία 8, ο οποίος μπορεί και να αυξηθεί. Φαίνεται δηλαδή ότι η εξαφάνιση των κλωνικών T-λεμφοκυτταρικών πληθυσμών με την ανοσοκατασταλτική θεραπεία βελτιώνει την αιματολογική εικόνα, αλλά αναπτύσσει τον δυσπλαστικό κλώνο, αίροντας την καταστολή του.³² Αυτό σημαίνει ότι η ανοσοκατασταλτική θεραπεία θα πρέπει να χρησιμοποιείται με μεγάλη προσοχή διότι η άρση της ανοσολογικής επιτήρησης πιθανόν να επάγει λευχαιμογένεση. Ευτυχώς, η μακροχρόνια παρακολούθηση των ασθενών που έλαβαν ανοσοκαταστολή δεν επιβεβαιώνει αυτές τις ανησυχίες. Αυτό επίσης σημαίνει ότι, αν και η ανοσολογική απάντηση εμπλέκεται στην πρόκληση μυελικής ανεπάρκειας στους ασθενείς με ΜΔΣ η μορφή αυτή ανοσολογικής επιτήρησης δεν επηρεάζει την ενδογενή τάση του δυσπλαστικού κλώνου προς λευχαιμική μεταμόρφωση.³

Ως πιθανά αντιγονικά ερεθίσματα πυροδότησης της αυτοάνοσης αντίδρασης ενοχοποιούνται πρωτεΐνες που εκφράζονται στα προγονικά αιμοποιητικά κύτταρα του ασταθούς γενετικού κλώνου.³⁴ Η υπόθεση που έχει διατυπωθεί είναι ότι ένα νεοαντιγόνο ή η υπερέκφραση ενός αυτοαντιγόνου στα αιμοποιητικά κύτταρα με τρισωμία 8 επάγει ειδική κυτταροτοξική CD8+ T-κυτταρική απάντηση. Ένα τέτοιο πιθανό αντιγόνο είναι η πρωτεΐνη WT1. Φυσιολογικά κύτταρα, σχεδόν σε όλους τους ιστούς, εκφράζουν WT1 αλλά κατά τη διαφοροποίηση καταστέλλεται η έκφραση αυτής της πρωτεΐνης. Όταν δεν υπάρχει η φυσιολογική καταστολή τα WT1+ προγονικά κύτταρα συνεχίζουν να πολλαπλασιάζονται με αποτέλεσμα τη μεταμόρφωση σε λευχαιμικά ή νεοπλασματικά κύτταρα λόγω συσσώρευσης επιπλέον γενετικών αλλαγών.³⁵ Το γονίδιο WT1, στην ανάλυση με μικροσυστοιχίες, υπερέκφράζεται σε ολικά μονοπύρηνια κύτταρα και σε CD34+ κύτταρα μυελού ασθενών με τρισωμία 8, συγκριτικά με CD34+ κύτταρα υγιών ατόμων και υπάρχει και σταδιακή υπερέκφραση με την πρόοδο της νόσου.³⁶ Επίσης, η έκφραση της WT1 πρωτεΐνης είναι σημαντικά αυξημένη στους ασθενείς με τρισωμία 8 που ανταποκρίθηκαν στην ανοσοκατασταλτική θεραπεία. Τέλος, οι ασθενείς με ΜΔΣ και τρισωμία 8 χαρακτηρίζονται από την παρουσία ειδικών για την πρωτεΐνη WT1 CD4+ και CD8+ T-λεμφοκυττάρων, τα οποία παράγουν κυρίως TNF-α και υπάρχει συσχέτιση του παραγόμενου TNF-α από τα

CD4+ λεμφοκύτταρα, με το ποσοστό των αιμοποιητικών κυττάρων που έχουν τρισωμία 8 στον μυελό ή με την παρουσία του αντιγόνου HLA-DR15, καθώς και με την ανταπόκριση στην ανοσοκαταστολή.³⁶

Η WT1 πρωτεΐνη είναι ανοσογόνος. Ο επίτοπος WT1-126-134 συνδέεται με το HLA-A*0201 και το σύμπλεγμα είναι ικανό να επάγει ειδικούς CD8+ T- λεμφοκυτταρικούς κλώνους που κατευθύνονται ενάντια στο συγκεκριμένο επίτοπο της WT1 πρωτεΐνης.³⁷ Αυτοί οι ειδικοί T-λεμφοκυτταρικοί κλώνοι είναι δυνατόν να ανιχνευθούν με κυτταρομετρία ροής, χρησιμοποιώντας τη μέθοδο της τετραμερούς ανάλυσης.³⁶ Τέλος, κυτταροτοξικά CD8+ T-λεμφοκύτταρα ειδικά έναντι του WT1-126-134 ανευρίσκονται στους λεμφοκυτταρικούς πληθυσμούς που χαρακτηρίζονται από υπερέκφραση συγκεκριμένων υποοικογενειών της Vβ περιοχής του TCR, όπως Vβ3 και Vβ5.3, και είναι ικανά να καταστέλλουν την αιμοποίηση όταν προστίθεται στα αυτόλογα κλωνικά κύτταρα του μυελού.³⁶ Τα αποτελέσματα αυτά υποδηλώνουν ότι η πρωτεΐνη WT1 είναι ένα από τα αντιγόνα που προκαλούν την T-ανοσολογική διέγερση με επακόλουθο τη μυελική ανεπάρκεια σε ασθενείς με τρισωμία 8.

Με βάση αυτές τις παρατηρήσεις, WT1 πεπτιδικά εμβόλια αξιολογήθηκαν σε κλινικές μελέτες επί ασθενών με ΜΔΣ και αυξημένο ποσοστό βλαστών. Τα χαρακτη-

ριστικά αυτών των μελετών ήταν η επαγωγή κυτταροτοξικών CD8+ T- λεμφοκυττάρων ειδικών έναντι του WT1 126-134, η ελάττωση του ποσοστού των βλαστών αλλά και η εκσεσημασμένη λευκοπενία επειδή στους συγκεκριμένους ασθενείς η συνολική αιμοποίηση επιτελείται από αιμοποιητικά κύτταρα που κατ'εξοχήν εξέφραζαν την πρωτεΐνη WT1, και επομένως αποτελούσαν στόχο για τα ειδικά κυτταροτοξικά T-λεμφοκύτταρα.³⁵

Συμπέρασμα

Μία άγνωστη ακόμα βλαπτική επίδραση προκαλεί τη δημιουργία κλώνου και ταυτόχρονα ανοσολογική απάντηση. Στην περίπτωση των ΜΔΣ η ανοσολογική απορρύθμιση δεν συμμετέχει στην πρωτογενή βλαπτική αλλοίωση αλλά παριστά μια συστηματική αντίδραση ενάντια στο δυπλαστικό κλώνο. Αυτή η ανοσολογική απάντηση περιλαμβάνει επιστράτευση T-κυτταροτοξικών λεμφοκυττάρων και έκκριση προφλεγμονωδών κυταροκινών, που πιθανότατα επιβραδύνουν τη λευχαιμική εξέλιξη, συντελούν ωστόσο στην παθογένεια της μυελικής ανεπάρκειας, προκαλώντας απόπτωση, αρχικά των κλωνικών αιμοποιητικών προβαθμίδων, και αργότερα και των μη κλωνικών προγονικών κυττάρων και των απογόνων τους.

Pathogenesis of myelodysplastic syndromes II: The role of the immune system

Michael Voulgarelis, Ioanna Vlahadami, Katerina Benekou

Department of Pathophysiology, University of Athens Medical School

ABSTRACT: Myelodysplastic syndromes (MDS), first clearly defined as an entity, have long been perceived as pre-leukemic hematopoietic stem cell disorders, which cause bone marrow failure, and ultimately may transform to acute leukemia. Bone marrow failure, resulting in transfusion dependence and neutropenic infections, that characterize the disease, was assumed to be an intrinsic stem cell defect causing defective maturation. However, accumulating evidence has shown that marrow failure in some MDS is associated with autoimmunity, T-cell mediated myelosuppression and cytokine-induced cytopenias. MDS is sometimes seen in association with Raynaud's syndrome, rheumatoid arthritis and polymyalgia rheumatica. Study of the autoimmune component in MDS pathophysiology has led to the development of immunosuppressive treatments. According to the working hypothesis regarding the relationship between the immune system and cytopenias in MDS, the MDS clones express a neoantigen or overexpress an autoantigen that triggers expansion of T-cell clones, cytotoxic for the MDS cell. These autoreactive T-cells secrete cytokines, TNF- α and IFN- γ , which promote apoptosis of the normal non-clonal progenitor cells, suppressing hematopoiesis. These observations raise many questions concerning the mechanism underlying the immune dysfunction of MDS. Much insight into these questions has been provided by studies of the cytopenia, associated with trisomy 8 MDS. FISH techniques showed that cytotoxic T-cells specifically targeted trisomy 8 bearing cells. Because the Wilm's tumor antigen (WT1) is overexpressed on CD34+ cells in many patients with MDS, it is an obvious candidate antigen for an MDS specific T-cell response. This review illustrates the immune mechanisms in the pathophysiology of cytopenia in myelodysplastic syndromes and the response to immunosuppression.

Βιβλιογραφία

1. Yoshida Y. Physician Education: Myelodysplastic Syndrome. *Oncologist*. 1996;1:284-287.
2. Kerbauy DB, Deeg HJ. Apoptosis and antiapoptotic mechanisms in the progression of myelodysplastic syndrome. *Exp Hematol*. 2007;35:1739-1746.
3. Sloand EM, Kim S, Fuhrer M et al. Fas-mediated apoptosis is important in regulating cell replication and death in trisomy 8 hematopoietic cells but not in cells with other cytogenetic abnormalities. *Blood*. 2002;100:4427-4432.
4. Kitagawa M, Yamaguchi S, Takahashi M, Tanizawa T, Hirokawa K, Kamiyama R. Localization of Fas and Fas ligand in bone marrow cells demonstrating myelodysplasia. *Leukemia*. 1998;12:486-492.
5. Kitagawa M, Saito I, Kuwata T et al. Overexpression of tumor necrosis factor (TNF)-alpha and interferon (IFN)-gamma by bone marrow cells from patients with myelodysplastic syndromes. *Leukemia*. 1997;11:2049-2054.
6. Gersuk GM, Beckham C, Loken MR et al. A role for tumour necrosis factor-alpha, Fas and Fas-Ligand in marrow failure associated with myelodysplastic syndrome. *Br J Haematol*. 1998;103:176-188.
7. Zang DY, Goodwin RG, Loken MR, Bryant E, Deeg HJ. Expression of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand, Apo2L, and its receptors in myelodysplastic syndrome: effects on in vitro hemopoiesis. *Blood*. 2001;98:3058-3065.
8. Deeg HJ, Beckham C, Loken MR et al. Negative regulators of hemopoiesis and stroma function in patients with myelodysplastic syndrome. *Leuk Lymphoma*. 2000;37:405-414.
9. Molldrem JJ, Caples M, Mavroudis D, Plante M, Young NS, Barrett AJ. Antithymocyte globulin for patients with myelodysplastic syndrome. *Br J Haematol*. 1997;99:699-705.
10. Raza A, Mundle S, Shetty V et al. Novel insights into the biology of myelodysplastic syndromes: excessive apoptosis and the role of cytokines. *Int J Hematol*. 1996;63:265-278.
11. Mundle SD, Ali A, Cartledge JD et al. Evidence for involvement of tumor necrosis factor-alpha in apoptotic death of bone marrow cells in myelodysplastic syndromes. *Am J Hematol*. 1999;60:36-47.
12. Sawanobori M, Yamaguchi S, Hasegawa M et al. Expression of TNF receptors and related signaling molecules in the bone marrow from patients with myelodysplastic syndromes. *Leuk Res* 2003;27:583-591.
13. Stifter G, Heiss S, Gastl G, Tzankov A, Stauder R. Overexpression of tumor necrosis factor-alpha in bone marrow biopsies from patients with myelodysplastic syndromes: relationship to anemia and prognosis. *Eur J Haematol*. 2005;75:485-491.
14. Hsu H, Xiong J, Goeddel DV. The TNF receptor 1-associated protein TRADD signals cell death and NF-kappa B activation. *Cell*. 1995;81:495-504.
15. Boula A, Voulgarelis M, Giannouli S et al. Effect of cA2 anti-tumor necrosis factor-alpha antibody therapy on hematoipoiesis of patients with myelodysplastic syndromes. *Clin Cancer Res*. 2006;12:3099-3108.
16. Voulgarelis M, Giannouli S, Ritis K, Tzioufas AG. Myelodysplasia-associated autoimmunity: clinical and pathophysiological concepts. *Eur J Clin Invest*. 2004;34:690-700.
17. Fujita T, Sakakibara J, Sudo Y, Miyamoto M, Kimura Y, Taniguchi T. Evidence for a nuclear factor(s), IRF-1, mediating induction and silencing properties to human IFN-beta gene regulatory elements. *EMBO J*. 1988;7:3397-3405.
18. Miyamoto M, Fujita T, Kimura Y et al. Regulated expression of a gene encoding a nuclear factor, IRF-1, that specifically binds to IFN-beta gene regulatory elements. *Cell*. 1988;54:903-913.
19. Willman CL, Sever CE, Pallavicini MG et al. Deletion of IRF-1, mapping to chromosome 5q31.1, in human leukemia and preleukemic myelodysplasia. *Science*. 1993;259:968-971.
20. Giannouli S, Tzoanopoulos D, Ritis K, Kartalis G, Moutsopoulos HM, Voulgarelis M. Autoimmune manifestations in human myelodysplasia: a positive correlation with interferon regulatory factor-1 (IRF-1) expression. *Ann Rheum Dis*. 2004;63:578-582.
21. Tada Y, Ho A, Matsuyama T, Mak TW. Reduced incidence and severity of antigen-induced autoimmune diseases in mice lacking interferon regulatory factor-1. *J Exp Med*. 1997;185:231-238.
22. Afzali B, Lombardi G, Lechler RI, Lord GM. The role of T helper 17 (Th17) and regulatory T cells (Treg) in human organ transplantation and autoimmune disease. *Clin Exp Immunol*. 2007;148:32-46.
23. Kordasti SY, Afzali B, Lim Z et al. IL-17-producing CD4(+) T cells, pro-inflammatory cytokines and apoptosis are increased in low risk myelodysplastic syndrome. *Br J Haematol*. 2009;145:64-72.
24. Bouchliou I, Miltiades P, Nakou E et al. Th17 and Foxp3(+) T regulatory cell dynamics and distribution in myelodysplastic syndromes. *Clin Immunol*. 2011;139:350-359.
25. Kotsianidis I, Bouchliou I, Nakou E et al. Kinetics, function and bone marrow trafficking of CD4+CD25+FOXP3+ regulatory T cells in myelodysplastic syndromes (MDS). *Leukemia*. 2009;23:510-518.
26. Sloand EM, Rezvani K. The role of the immune system in myelodysplasia: implications for therapy. *Semin Hematol*. 2008;45:39-48.
27. Sloand EM, Wu CO, Greenberg P, Young N, Barrett J. Factors affecting response and survival in patients with myelodysplasia treated with immunosuppressive therapy. *J Clin Oncol*. 2008;26:2505-2511.
28. Sauntharajah Y, Nakamura R, Nam JM et al. HLA-DR15 (DR2) is overrepresented in myelodysplastic syndrome and aplastic anemia and predicts a response to immunosuppression in myelodysplastic syndrome. *Blood*. 2002;100:1570-1574.
29. Molldrem JJ, Jiang YZ, Stetler-Stevenson M et al. Haematological response of patients with myelodysplastic syndrome to antithymocyte globulin is associated with a

- loss of lymphocyte-mediated inhibition of CFU-GM and alterations in T-cell receptor Vbeta profiles. *Br J Haematol.* 1998;102:1314-1322.
30. Kook H, Zeng W, Guibin C *et al.* Increased cytotoxic T cells with effector phenotype in aplastic anemia and myelodysplasia. *Exp Hematol.* 2001;29:1270-1277.
 31. Kochenderfer JN, Kobayashi S, Wieder ED, Su C, Mollidrem JJ. Loss of T-lymphocyte clonal dominance in patients with myelodysplastic syndrome responsive to immunosuppression. *Blood.* 2002;100:3639-3645.
 32. Sloand EM, Mainwaring L, Fuhrer M *et al.* Preferential suppression of trisomy 8 compared with normal hematopoietic cell growth by autologous lymphocytes in patients with trisomy 8 myelodysplastic syndrome. *Blood.* 2005;106:841-851.
 33. Barrett AJ, Sloand E. Autoimmune mechanisms in the pathophysiology of myelodysplastic syndromes and their clinical relevance. *Haematologica.* 2009;94:449-451.
 34. Heslop HE, Stevenson FK, Mollidrem JJ. Immunotherapy of hematologic malignancy. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.* 2003:331-349.
 35. Sugiyama H. WT1 (Wilms' tumor gene 1): biology and cancer immunotherapy. *Jpn J Clin Oncol* 2010;40:377-387.
 36. Sloand EM, Melenhorst JJ, Tucker ZC *et al.* T-cell immune responses to Wilms tumor 1 protein in myelodysplasia responsive to immunosuppressive therapy. *Blood.* 2011;117:2691-2699.
 37. Weber G, Karbach J, Kuci S *et al.* WT1 peptide-specific T cells generated from peripheral blood of healthy donors: possible implications for adoptive immunotherapy after allogeneic stem cell transplantation. *Leukemia.* 2009;23:1634-1642.