

**ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΟΥ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΥ ΤΗΣ ΟΥΔΕΤΕΡΟΠΕΝΙΑΣ
ΣΤΟΥΣ ΠΑΣΧΟΝΤΕΣ ΑΠΟ ΧΡΟΝΙΑ ΙΔΙΟΠΑΘΗ
ΟΥΔΕΤΕΡΟΠΕΝΙΑ ΤΟΥ ΕΝΗΛΙΚΟΥ
ΜΗ ΑΝΟΣΟΛΟΓΙΚΗΣ ΑΡΧΗΣ**

Διδακτορική Διατριβή
της
ΚΑΛΛΙΟΠΗΣ Π. ΓΚΙΟΥΡΕΜΟΥ
ΒΙΟΛΟΓΟΥ

Επιβλέπων Καθηγητής: Γεώργιος Ηλιόπουλος

ΗΡΑΚΛΕΙΟ 2001

Αφιερωμένο στο γιο μου
Θωμά

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Βιογραφικό Σημείωμα	Σελ.: 3-5
Πρόλογος	6
Περίληψη	7-8
Εισαγωγή	9-37
Υλικά-Μέθοδοι	38-47
Αποτελέσματα	48-59
Συζήτηση-Συμπεράσματα	60-65
Βιβλιογραφία	66-82
Συντμήσεις	83-86

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα διατριβή εκπονήθηκε στο ερευνητικό εργαστήριο Αιματολογίας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Κρήτης στο διάστημα 1997-2001.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω μια σειρά από ανθρώπους που βοήθησαν στην διαδικασία εκπόνησης της διατριβής. Καταρχήν ευχαριστώ τους γονείς μου που πάντα στήριζαν και στηρίζουν τις επιλογές μου και τον σύζυγο μου για την πραγματικά μεγάλη συμπαράσταση και κατανόησή του.

Επιστημονικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω πρώτα τον Καθηγητή κύριο Γιώργο Ηλιόπουλο, όχι μόνο γιατί μου έδωσε την ευκαιρία να ασχοληθώ με ένα πολύ ενδιαφέρον θέμα αλλά κυρίως γιατί σε κάθε μου δυσκολία ήταν πρόθυμος να με βοηθήσει προσωπικά, να ξεπεράσω τυχόν προβλήματα σε εργαστηριακό και γνωστικό επίπεδο.

Ευχαριστίες οφείλω και στον Επίκουρο Καθηγητή κύριο Μιχάλη Αλεξανδράκη για την προσεκτική του ανάγνωση και τις παρατηρήσεις του.

Ενα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω και στην Επίκουρη Καθηγήτρια κυρία Ελένη Παπαδάκη με την οποία συνεργάστηκα από την πρώτη μέρα στο εργαστήριο και η οποία με βοήθησε πολύ με συζητήσεις, συμβουλές αλλά και σε εργαστηριακό επίπεδο όσον αφορά στην κατανόηση τεχνικών.

Τέλος ένα ευχαριστώ και στους μεταπτυχιακούς με τους οποίους συνεργάστηκα τον κύριο Βασίλη Βαλάτα και τον κύριο Χάρη Ποντίκογλου, στην κυρία Κλαυδία Γεμεντζή που αποτελεί μόνιμο συνεργάτη του εργαστηρίου μας αλλά και σε όλους όσους βοήθησαν με οποιοδήποτε τρόπο στην περάτωση της διατριβής αυτής.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Προηγούμενες μελέτες στο εργαστήριο μας έχουν δείξει ότι, ασθενείς με Χρονία Ιδιοπαθή Ουδετεροπενία του Ενηλίκου Μη Ανοσολογικής Αρχής (Non Immune Chronic Idiopathic Neutropenia of Adult, NI-CINA) έχουν αυξημένα επίπεδα φλεγμονωδών κυτταροκινών στον ορό του αίματος, συμπεριλαμβανομένης και της IL-1b. Δεδομένου του γεγονότος ότι, η IL-1b πιθανόν να επηρεάζει την λειτουργία των στρωματικών κυττάρων του μυελού, σχεδιάστηκε μια μελέτη προκειμένου να διερευνηθεί η ικανότητα των στρωματικών κυττάρων απο ασθενείς με NI-CINA, να παράγουν επαρκείς ποσότητες αιμοποιητικών αυξητικών παραγόντων ή αυξημένες ποσότητες αναστολέων της μυελοποίησης σε καλλιέργειες μυελού μακράς διάρκειας (Long Term Bone Marrow Cultures, LTBMCS).

Η έρευνα έγινε σε 52 ασθενείς και 19 φυσιολογικούς μάρτυρες. Βρήκαμε ότι, οι ασθενείς με CINA είχαν μικρότερο αριθμό CD34⁺, CD34⁺/CD33⁺ και CFU-GM μυελικών κυττάρων. Τα στρωματικά κύτταρα ασθενών (LTBMCS) είχαν μειωμένη ικανότητα επαγωγής σχηματισμού αποικιών από φυσιολογικά κύτταρα του μυελού σε σχέση με τα στρωματικά κύτταρα των φυσιολογικών μαρτύρων. Τα υπερκείμενα από καλλιέργειες ασθενών είχαν φυσιολογικές ή αυξημένες συγκεντρώσεις G-CSF. Ανιχνεύσιμες ποσότητες GM-CSF στα υπερκείμενα βρέθηκαν στο 35% των ασθενών και στο 19% των φυσιολογικών μαρτύρων. Η IL-3 και ο MIP-1a δεν ήταν ανιχνεύσιμα σε κανένα υπερκείμενο καλλιέργειας. Επιπλέον, στα υπερκείμενα καλλιεργείων LTBMCS απο ασθενείς, βρέθηκαν αυξημένες ποσότητες IL-6 και TGF-b, οι οποίες συσχετίζονται ισχυρά με τις συγκεντρώσεις της IL-1b στον ορό. Περίπου το 82% των ασθενών είχαν

μεγαλύτερες ποσότητες TGF- β 1 από την μεγαλύτερη τιμή που βρέθηκε στους φυσιολογικούς μάρτυρες. Οι τιμές του TGF- β 1 συσχετίζονται αρνητικά με τον αριθμό των κυκλοφορούντων ουδετερόφιλων και των CD34⁺/CD33⁺ κυττάρων στον μυελό.

Προτείνουμε ότι, αυξημένα επίπεδα IL-1 β στον ορό, τα οποία είναι αποτέλεσμα μιας ήπιας υποκείμενης χρόνιας φλεγμονώδους διεργασίας, πιθανόν να επάγουν τα στρωματικά κύτταρα του μυελού να παράγουν τόσο επαγωγείς όσο και αναστολείς της μυελοποίησης. Δοθέντος ότι, η φυσιολογική μυελοποίηση είναι αποτέλεσμα ισόρροπης παραγωγής κυτταροκινών με θετική και αρνητική δράση, φαίνεται ότι η αυξημένη παραγωγή του TGF- β 1 από το αιμοποιητικό μικροπεριβάλλον, στους ασθενείς με NI-CINA, πιθανόν να καταστέλλει την μυελοποίηση και να συμβάλλει, σε κάποιο βαθμό, στην παθογένεια της ουδετεροπενίας στους ασθενείς με NI-CINA.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

ΑΙΜΟΠΟΙΗΣΗ

Κατά την εμβρυϊκή ζωή, τα έμμορφα συστατικά του αίματος παράγονται στον λεκιθικό σάκο, αργότερα στο ήπαρ και τον σπλήνα και τελευταία στον μυελό των οστών. Ωστόσο, πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι στα θηλαστικά, τα προγονικά αιμοποιητικά εμβρυϊκά κύτταρα μεσοδερματικής προέλευσης, πρωτοεμφανίζονται στην παραορτική περιοχή του εντέρου (1).

Κατά την μετεμβρυϊκή ζωή, όλα τα κύτταρα του αίματος παράγονται αποκλειστικά στον μυελό των οστών εκτός των λεμφοκυττάρων, που στην πλειονότητα τους παράγονται στα περιφερικά λεμφικά όργανα. Τονίζεται ιδιαίτερα, ότι η κατά την μετεμβρυϊκή ζωή ανάπτυξη εξωμυελικής αιμοποίησης είναι πάντοτε παθολογική, εκτός βέβαια από την λεμφοποίηση.

ΜΥΕΛΟΣ ΤΩΝ ΟΣΤΩΝ(BONE MARROW):ΤΟ ΜΥΕΛΙΚΟ ΟΡΓΑΝΟ

Το μυελικό όργανο θα μπορούσε κανείς να το φανταστεί σαν ένα τρισδιάστατο πλέγμα από ινίδια, αγγεία και κύτταρα, που συγκρατούνται μεταξύ τους με μια άμορφη πρωτεϊνούχα ουσία(extracellular matrix)και σχηματίζουν βροχίδες, τις αιμοποιητικές φωλιές (niches), στις οποίες πολλαπλασιάζονται, διαφοροποιούνται και ωριμάζουν, οι προβαθμίδες των αιμοποιητικών κυττάρων.

ΑΙΜΟΠΟΙΗΤΙΚΕΣ ΚΥΤΤΑΡΙΚΕΣ ΣΕΙΡΕΣ

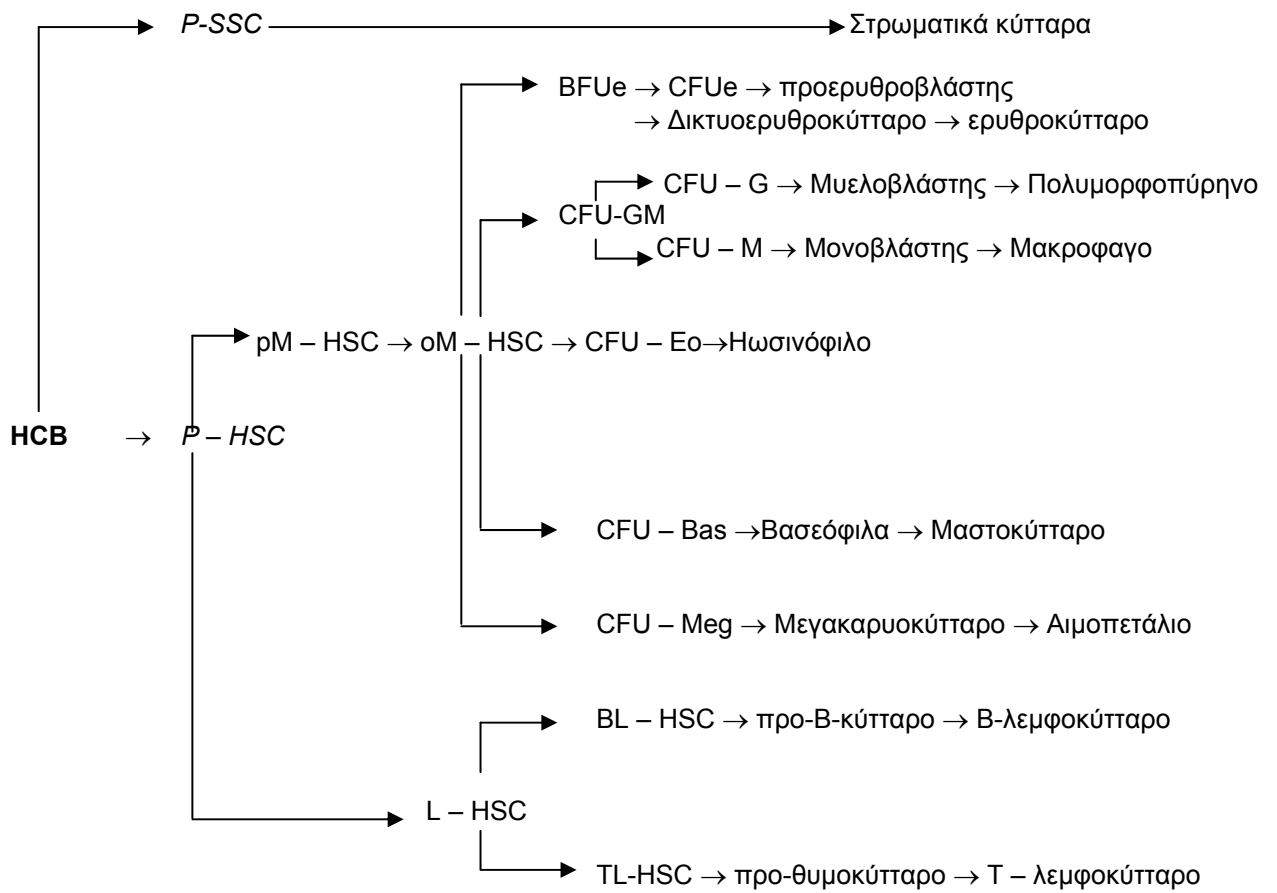
Όπως όλα τα κύτταρα στον οργανισμό, έτσι και τα κύτταρα του αίματος έχουν περιορισμένο χρόνο ζωής. Αυτό σημαίνει ότι η διατήρηση σταθερού του αριθμού των εμμόρφων συστατικών στο αίμα, εξασφαλίζεται μόνο με τον συνεχή εμπλουτισμό του με νέα κύτταρα και μάλιστα σε αριθμό ίσο, με τον αριθμό εκείνων που πεθαίνουν. Η είσοδος νέων εμμόρφων συστατικών στο αίμα γίνεται κυρίως από το μυελό των οστών αλλά και από τον θύμο αδένα και τα περιφερικά λεμφικά όργανα. Στον μυελό αναγνωρίζονται μορφολογικά οι προβαθμίδες των μυελικών αιματικών κυττάρων, τα μητρικά τους δηλαδή κύτταρα. Μάλιστα, για κάθε τύπο έμμορφων συστατικών αναγνωρίζονται πολλές προβαθμίδες ιεραρχικά ταξινομημένες, ώστε να αποτελούν μια σειρά στην οποία η μια προβαθμίδα δίνει γένεση στην άλλη. Έτσι αναγνωρίζονται συγκεκριμένες σειρές κυττάρων, οι αιμοποιητικές κυτταρικές σειρές ή προγονικές προβαθμίδες.

Οι αιμοποιητικές κυτταρικές σειρές διακρίνονται σε μυελικές και λεμφικές. Στις μυελικές εντάσσονται η ερυθροκυτταρική ή ερυθρά σειρά, η ουδετερόφιλη κοκκιώδης σειρά, η ηωσινόφιλη σειρά, η βασεόφιλη σειρά, η μονοκυτταρική/μακροφαγική σειρά και η μεγακαρυοτική σειρά. Στις λεμφικές κυτταρικές σειρές εντάσσονται η Β-λεμφοκυτταρική σειρά και η Τ-λεμφοκυτταρική σειρά. Για την σειρά των NK-κυττάρων ελάχιστα είναι επί του παρόντος γνωστά. Η ύπαρξη ανεξάρτητης NK- σειράς ακόμη πιθανολογείται.

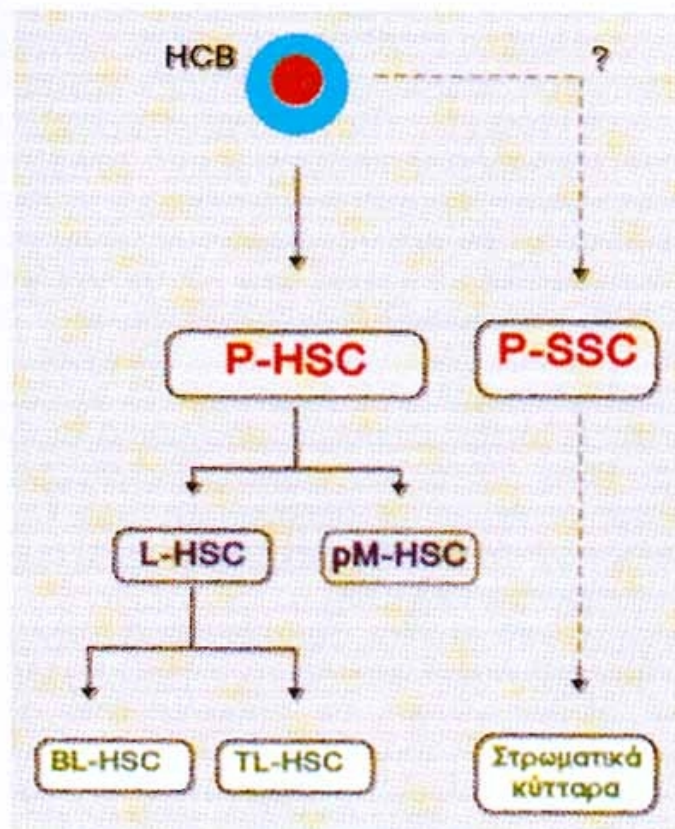
Η αναπλήρωση των συνεχώς θνησκόντων έμμορφων συστατικών του αίματος, επιτυγχάνεται με τον συνεχή πολλαπλασιασμό και διαφοροποίηση των μορφολογικά

αναγνωρίσιμων μητρικών τους κυττάρων, των γνωστών αιμοποιητικών κυτταρικών σειρών. Είναι όμως ευνόητο ότι οι μητρικές αυτές κυτταρικές σειρές θα εξαντλούνταν γρήγορα, εάν δεν υπήρχε μια πηγή που να τις τροφοδοτεί συνεχώς με νέα κύτταρα. Η συνεχής προσφορά νέων αρχικών κυττάρων στις επιμέρους μορφολογικά αναγνωρίσιμες αιμοποιητικές κυτταρικές σειρές, εξασφαλίζεται με τον πολλαπλασιασμό, τη διαφοροποίηση και την ωρίμανση μιας άλλης κατηγορίας κυττάρων, των αρχέγονων πολυδύναμων αιμοποιητικών προβαθμίδων (pluripotent hemopoietic stem cells, p-HSC) (εικόνα 1).

Τα αρχέγονα αυτά πολυδύναμα αιμοποιητικά κύτταρα θεωρούνται μάλιστα οι πλησιέστεροι απόγονοι του αιμοκυτοβλάστη (HCB) (εικόνα2). Αυτά, υπολογίζεται ότι αποτελούν το 0,01% έως το 0,05% του συνόλου των εμπύρηνων κυττάρων του μυελού. Πρόκειται για κύτταρα, που έχουν την ιδιότητα της διατήρησης σταθερού του συνολικού τους αριθμού ή όπως αλλιώς λέγεται έχουν “απεριόριστη ικανότητα αυτοσυντήρησης του κυτταρικού τους διαμερίσματος” (renewal capacity). Αυτό σημαίνει, ότι κάθε φορά που ο αριθμός τους τείνει να ελαττωθεί στον οργανισμό λόγω μετανάστευσης στην περιφέρεια, ή πολλαπλασιασμού ή διαφοροποίησης άλλων σε μορφολογικά αναγνωρίσιμες αιμοποιητικές κυτταρικές σειρές, παρακείμενα P-HSC πολλαπλασιάζονται χωρίς να διαφοροποιούνται και αναπληρώνουν το κενό που δημιουργήθηκε. Έτσι, ο συνολικός αριθμός τους στον οργανισμό, διατηρείται σε σταθερά επίπεδα.



Εικόνα : ΑΙΜΟΠΟΙΗΣΗ

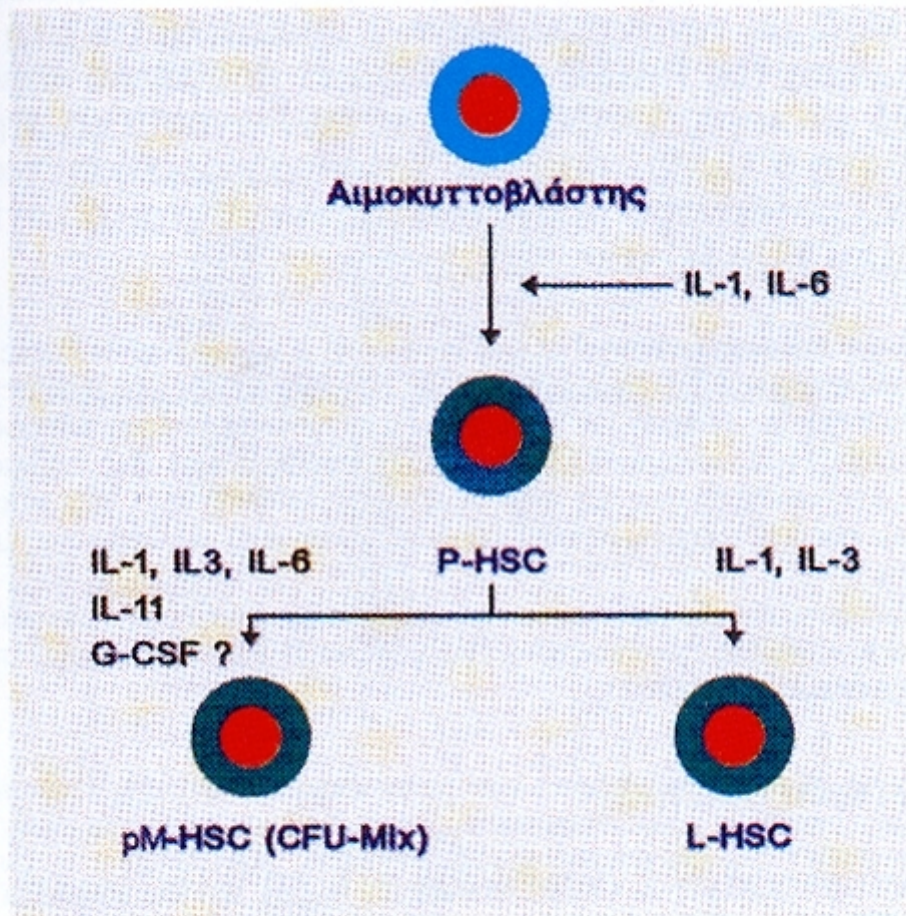


Εικ.9. Διαφοροποίηση του αιμοκυττοβλάστη (HCB) σε αρχέγονες πολυδύναμες προγονικές αιμοποιητικές προβαθμίδες (P-HSC) και, κατά μία άποψη, σε πολυδύναμες προγονικές προβαθμίδες των στρωματικών κυττάρων (pluripotent stromal stem cells, P-SSC). Με πολλαπλασιασμό, διαφοροποίηση και ωρίμανση, τα P-HSC δίνουν γένεση σε πολυδύναμα μυελικά HSC (pM-HSC) και διδύναμα λεμφικά HSC (L-HSC). Από τα τελευταία αυτά θα προέλθουν με περαιτέρω πολλαπλασιασμό και διαφοροποίηση οι προβαθμίδες BL-HSC και TL-HSC των Β- και Τ-λεμφοκυττάρων (προ-προ-Β-κύτταρα και προθυμοκύτταρα, αντίστοιχα).

Ένα μόνο μικρό ποσοστό από αυτά, μόλις 5%, πολλαπλασιάζονται υπό την επίδραση τοπικών επαγωγικών παραγόντων και δίνουν γένεση σε θυγατρικά κύτταρα, που είτε παραμένουν αδιαφοροποίητα ή διαφοροποιούνται προς δύο τουλάχιστον κατευθύνσεις, το πολυδύναμο μυελικό προγονικό αιμοποιητικό κύτταρο(pM-HSC) και το διδύναμο λεμφικό προγονικό αιμοποιητικό κύτταρο(L-HSC) (**εικόνα 3**).

ΜΥΕΛΙΚΑ HSC

Τα μυελικά, προγονικά αιμοποιητικά κύτταρα (myeloid hemopoietic stem cells) αποτελούν έναν αρκετά ετερόκλητο κυτταρικό πληθυσμό από πλευράς δέσμευσης για διαφοροποίηση προς συγκεκριμένη κατεύθυνση. Διακρίνονται σχηματικά σε πολυδύναμα που έχουν την ικανότητα διαφοροποίησης προς οποιαδήποτε μυελική σειρά, σε ολιγοδύναμα που δίνουν γένεση σε τρεις ή περισσότερες αλλά όχι όλες τις μυελικές κυτταρικές σειρές, σε διδύναμα που δίνουν γένεση σε δύο μόνο μυελικές κυτταρικές σειρές και σε μονοδύναμα που δίνουν γένεση σε μια και αυστηρά καθορισμένη μυελική κυτταρική σειρά. Έτσι, τα κύτταρα είναι ταξινομημένα ιεραρχικά, με την έννοια ότι ένα ολιγοδύναμο, για παράδειγμα, κύτταρο που έχει την ικανότητα διαφοροποίησης προς τρεις μυελικές κυτταρικές σειρές, τοποθετείται ψηλότερα στην ιεραρχία (είναι αωρότερο) από ένα διδύναμο μυελικό προγονικό κύτταρο που μπορεί να δώσει γένεση σε δύο μόνο μυελικές κυτταρικές σειρές, και



Εικ. 14. Αυξητικοί αιμοποιητικοί παράγοντες και ιντερλευκίνες που υπεισέρχονται στον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση του αιμοκυττοβλάστη και του πολυδύναμου προγονικού αιμοποιητικού κυττάρου P-HSC.

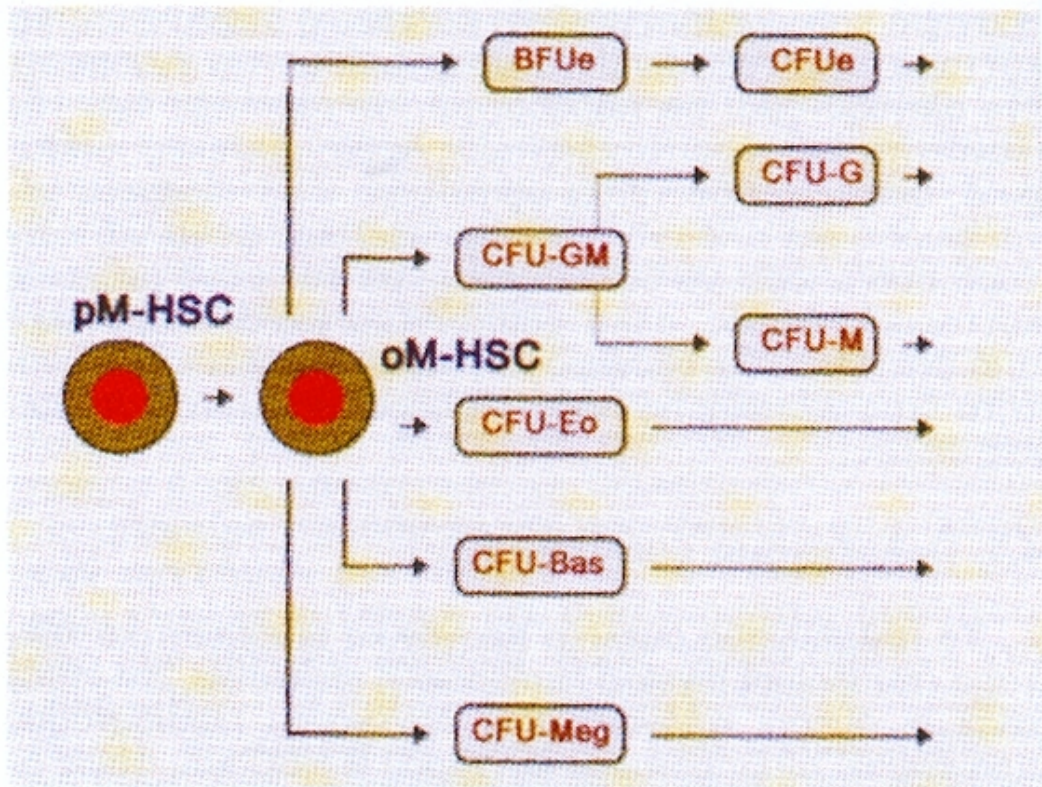
χαμηλότερα (είναι ωριμότερο) από ένα άλλο κύτταρο που έχει την ικανότητα διαφοροποίησης προς τέσσερις μυελικές κυτταρικές σειρές.

ΠΟΛΥΔΥΝΑΜΑ ΜΥΕΛΙΚΑ HSC

Τα πολυδύναμα μυελικά προγονικά αιμοποιητικά κύτταρα (pluripotent myeloid hemopoietic stem cells, pM-HSC) είναι οι άμεσοι απόγονοι του αρχέγονου πολυδύναμου προγονικού αιμοποιητικού κυττάρου P – HSC και αποτελούν τα μητρικά κύτταρα όλων των μυελικών αιμοποιητικών κυτταρικών σειρών, ερυθράς, ουδετερόφιλης κοκκιώδους, ηωσινοφίλης, βασεόφιλης, μονοκυτταρικής / μακροφαγικής και μεγακαρυοκυτταρικής (**εικόνα 4**). Τα κύτταρα αυτά έχουν χάσει την ικανότητα διαφοροποίησης προς μητρικά κύτταρα των λεμφοκυττάρων.

ΟΛΙΓΟΔΥΝΑΜΑ ΜΥΕΛΙΚΑ HSC

Τα ολιγοδύναμα μυελικά προγονικά αιμοποιητικά κύτταρα (oligopotent myeloid hemopoietic stem cells, oM-HSC) είναι απόγονοι του πολυδύναμου μυελικού προγονικού αιμοποιητικού κυττάρου pM-HSC. Πρόκειται για μυελικές προγονικές προβαθμίδες που έχασαν την ικανότητα διαφοροποίησης προς ορισμένες μυελικές κυτταρικές σειρές, ενώ διατηρούν την ικανότητα διαφοροποίησης σε άλλες από αυτές.



Εικ.10. Διαφοροποίηση του πολυδύναμου μυελικού προγονικού αιμοποιητικού κυττάρου (pM-HSC) σε ολιγοδύναμα προγονικά κύτταρα (oM-HSC), διδύναμα προγονικά κύτταρα CFU-GM και μονοδύναμα προγονικά κύτταρα της ερυθράς σειράς (BFUe και CFUe), της ουδετερόφιλης κοκκώδους σειράς (CFU-G), της μονοκυτταρικής/μακροφαγικής σειράς (CFU-M), της ηωσινόφιλης σειράς (CFU-Eo), της βασεόφιλης σειράς (CFU-Bas) και της μεγακαρυοκυτταρικής σειράς (CFU-Meg).

ΔΙΔΥΝΑΜΑ ΜΥΕΛΙΚΑ HSC

Τα διδύναμα μυελικά προγονικά αιμοποιητικά κύτταρα (bipotent myeloid hemopoietic stem cells) προέρχονται από τον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση ολιγοδύναμων μυελικών προγονικών αιμοποιητικών προβαθμίδων. Είναι κύτταρα που έχασαν την ικανότητα της εναλλακτικής διαφοροποίησης προς τρεις ή περισσότερες αιμοποιητικές κυτταρικές σειρές ενώ διατηρούν την ικανότητα διαφοροποίησης προς δύο από αυτές. Η μεταξύ τους διάκριση γίνεται με κυτταροκαλλιέργειες.

ΜΟΝΟΔΥΝΑΜΑ ΜΥΕΛΙΚΑ HSC

Τα μονοδύναμα μυελικά προγονικά αιμοποιητικά κύτταρα (unipotent myeloid hemopoietic stem cells) είναι τουλάχιστον επτά. Όλα τους είναι δεσμευμένα για διαφοροποίηση προς μια μόνο αυστηρά καθορισμένη κατεύθυνση. Τα κύτταρα αυτά είναι:

BFUe και **CFUe**: και οι δύο αυτές μονοδύναμες αιμοποιητικές προβαθμίδες είναι δεσμευμένες για να δώσουν γένεση αποκλειστικά στην ερυθρά σειρά. Τα BFUe προέρχονται από τον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση ολιγοδύναμων M-HSC. Πολλαπλασιαζόμενα και διαφοροποιούμενα τα BFUe δίνουν γένεση στα περισσότερο ώριμα CFUe (Colony forming units, erythroid). Από τον πολλαπλασιασμό και την περαιτέρω διαφοροποίηση των CFUe θα προέλθουν τα πρώτα μορφολογικά αναγνωρίσιμα κύτταρα της ερυθράς σειράς, οι προερυθροβλάστες.

CFU-G και **CFU-M** : Πρόκειται για μονοδύναμες προγονικές προβαθμίδες δεσμευμένες για την ουδετερόφιλη κοκκιώδη και την μονοκυτταρική / μακροφαγική σειρά, αντίστοιχα. Και οι δύο προέρχονται από τον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση του διδύναμου μυελικού προγονικού κυττάρου CFU-GM. Από τον πολλαπλασιασμό και την περαιτέρω διαφοροποίηση των CFU-G προέρχονται τα πρώτα μορφολογικά αναγνωρίσιμα κύτταρα της ουδετερόφιλης κοκκιώδους σειράς, οι μυελοβλάστες, ενώ από τον πολλαπλασιασμό και την περαιτέρω διαφοροποίηση των CFU-M, προέρχονται τα πρώτα κύτταρα της μονοκυτταρικής / μακροφαγικής σειράς, οι μονοβλάστες.

CFU-Eo και **CFU-Bas** : Και οι δύο μονοδύναμες αυτές προγονικές προβαθμίδες προέρχονται από τον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση ολιγοδύναμων μυελικών προγονικών κυττάρων. Πολλαπλασιαζόμενο και διαφοροποιούμενο το CFU-Eo (Colony Forming Unit, eosinophil) δίνει γένεση σε βλαστικά κύτταρα που δεν ξεχωρίζουν μορφολογικά από τους μυελοβλάστες της ουδετερόφιλης κοκκιώδους σειράς, και που με περαιτέρω πολλαπλασιασμό, διαφοροποίηση και ωρίμανση, οδηγούν στην ανάπτυξη της ηωσινόφιλης κυτταρικής σειράς. Πολλαπλασιαζόμενο και διαφοροποιούμενο το CFU-Bas (Colony Forming Unit, basophil) δίνει και αυτό γένεση σε δύο βλαστικά κύτταρα που μοιάζουν μορφολογικά με αυτά της ουδετερόφιλης και της ηωσινόφιλης σειράς, και τα οποία με περαιτέρω πολλαπλασιασμό, διαφοροποίηση και ωρίμανση οδηγούν στην ανάπτυξη της βασεόφιλης κυτταρικής σειράς.

CFU-meg : Τα CFU-meg (Colony Forming Unit, megacaryocyte), προέρχονται από τον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση ολιγοδύναμων προγονικών μυελικών προβαθμίδων. Πολλαπλασιαζόμενα και διαφοροποιούμενα τα κύτταρα αυτά, δίνουν γένεση στο πρώτο μορφολογικά αναγνωρίσιμο κύτταρο της μεγακαρυοκυτταρικής σειράς, το μεγακαρυοβλάστη.

ΛΕΜΦΙΚΑ HSC

Τα λεμφικά προγονικά αιμοποιητικά κύτταρα διακρίνονται σε διδύναμα που έχουν την ικανότητα διαφοροποίησης προς την B ή την T-λεμφοκυτταρική σειρά, και σε μονοδύναμα που είναι δεσμευμένα για να δώσουν γένεση σε μια και αυστηρά καθορισμένη λεμφοκυτταρική σειρά και τα οποία αποτελούν τις προγονικές προβαθμίδες των B-λεμφοκυττάρων και των T-λεμφοκυττάρων.

ΔΙΔΥΝΑΜΑ ΛΕΜΦΙΚΑ HSC

Το διδύναμο λεμφικό προγονικό αιμοποιητικό κύτταρο (Dipotent lymphoid hemopoietic stem cell, L-HSC) είναι το πρώτο κύτταρο στην ιεραρχία των λεμφικών προγονικών αιμοποιητικών προβαθμίδων. Προέρχεται από τον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση του P-HSC. Υπό την επίρεια άγνωστου ακόμη τοπικού επαγωγικού παράγοντα στο αιμοποιητικό μικροπεριβάλλον, ένα σημαντικό μέρος των L-HSC πολλαπλασιάζεται και διαφοροποιείται σε προγονικές προβαθμίδες των B-λεμφοκυττάρων, ενώ ένα άλλο επίσης σημαντικό μέρος, μεταναστεύει στην περιφέρεια. Όσα από τα μεταναστεύοντα L-HSC φθάσουν με την κυκλοφορία στο θύμο αδένα και βρεθούν εκεί υπό την επίρεια των θυμικών ορμονών που εκκρίνονται από τα επιθηλιακά κύτταρα του οργάνου, πολλαπλασιάζονται και διαφοροποιούνται σε προγονικές προβαθμίδες των T-λεμφοκυττάρων.

ΜΟΝΟΔΥΝΑΜΑ ΛΕΜΦΙΚΑ HSC

Τα μονοδύναμα προγονικά λεμφικά κύτταρα (unipotent lymphoid hemopoietic stem cells), είναι δύο, το BL-HSC και το TL-HSC. Και τα δύο, προέρχονται από τον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση του διδύναμου L-HSC.

BL-HSC (B-lymphoid hemopoietic stem cell): Αποτελεί τη δεσμευμένη προγονική προβαθμίδα των B-λεμφοκυττάρων που είναι γνωστό ως «προ-προ-B-

κύτταρα» (pro-pre-B-cell). Από το κύτταρο αυτό θα προέλθουν με πολλαπλασιασμό και περαιτέρω διαφοροποίηση τα «ανοσολογικά παρθένα» ώριμα Β-λεμφοκύτταρα (mature B-cells).

TL-HSC (T-lymphoid hemopoietic stem cell): Αποτελεί την δεσμευμένη προγονική προβαθμίδα των Τ-λεμφοκυττάρων και είναι περισσότερο γνωστό ως «προθυμοκύτταρο» (pre-thymocyte) Από το κύτταρο αυτό θα προέλθουν με πολλαπλασιασμό και περαιτέρω διαφοροποίηση τα «ανοσολογικά παρθένα» ώριμα Τ-λεμφοκύτταρα (mature T-cells).

ΡΥΘΜΙΣΗ ΑΙΜΟΠΟΙΗΣΗΣ

Η επαγωγή της διαφοροποίησης των προγονικών αιμοποιητικών προβαθμίδων σε μορφολογικά αναγνωρίσιμες αιμοποιητικές κυτταρικές σειρές, καθώς και ο πολλαπλασιασμός τους, βρίσκονται υπό την επίδραση επαγωγικών παραγόντων, ελέγχονται δε από την παρουσία αναστολέων της αιμοποίησης. Οι παράγοντες αυτοί, επαγωγείς και αναστολείς της αιμοποίησης (κυτταροκίνες), παράγονται τοπικά στο μικροπεριβάλλον του μυελού. Στους επαγωγείς εμπεριέχονται ο GM-CSF, ο G-CSF, η IL-3, η IL-4, η IL-6 και άλλοι. Αντίστοιχα, η αιμοποίηση μπορεί να ρυθμίζεται και αρνητικά από ιντερφερόνες, τον TNF (Tumor Necrosis Factor), τον MIP-1a, τον TGF- β και άλλους παράγοντες. Έτσι ο πολλαπλασιασμός των προγονικών αιμοποιητικών προβαθμίδων ρυθμίζεται από την ισορροπία μεταξύ αντίθετων, θετικών και αρνητικών σημάτων ανάπτυξης.

GM-CSF

Ο GM-CSF (Granulocyte macrophage colony stimulating factor) είναι γνωστός κυρίως για την επαγωγή του πολλαπλασιασμού και της διαφοροποίησης των κυττάρων της ηωσινόφιλης, βασεόφιλης μεγακαρυοκυτταρικής και της ερυθράς σειράς (2,3). Επιπλέον, ο GM-CSF σε συνδιασμό με την IL-3 επιταχύνουν τον σχηματισμό αποικιών GM, E, Eo και Meg (4,5,6) σε μυελό ποντικού και καλλιέργεια ανθρώπινων stem cells (7). Επίσης σε συνδιασμό με τον SCF (stem cell factor) επιταχύνει σημαντικά την παραγωγή ερυθροκυτταρικών και μυελικών αποικιών, από stem cells μυελού (8).

IL-3

Η IL-3(Ιντερλευκίνη-3) παρουσιάζει ένα μεγάλο εύρος δράσεων. Ετσι, επάγει τον σχηματισμό αποικιών από φυσιολογικά αιμοποιητικά stem cells, συμπεριλαμβανομένων των CFU-GEMM, CFU-GM, CFU-G, CFU-M, CFU-Mk, CFU-Eo, CFU-b και με την παρουσία EPO, πρώιμων (BFU-E) και όψιμων (CFU-E) ερυθρών αποικιών (9-14).

G-CSF

Ο G-CSF(Granulocyte colony stimulating factor) αποτελεί την κύρια κυτταροκίνη που επάγει τον πολλαπλασιασμό και την διαφοροποίηση της ουδετερόφιλης κοκκιώδους σειράς (15-19). Πρόσφατες μελέτες ωστόσο, έχουν δείξει ότι σε συνδιασμό με άλλες κυτταροκίνες, ο G-CSF έχει δράση και στα P-HSC (144).

IL-1

Η IL-1, άλλοτε γνωστή και ως OAF (Osteoclast Activating Factor) ή LAF (Lymphocyte Activating Factor), μαζί με την IL-3 υπεισέρχεται στην διαφοροποίηση του P-HSC σε L-HSC, και σε συνεργασία με την IL-6 προάγει την διαφοροποίηση του P-HSC σε πολυδύναμο προγονικό μυελικό μητρικό κύτταρο pM-HSC (CFU-Mix) (20-22).

IL-6

Η παραγωγή της IL-6 (Ιντερλευκίνη 6) επάγεται κυρίως από την IL-1 τον TNF-a και την IFN-b, καθώς και από βακτηριακές ενδοτοξίνες και διάφορους ιούς. Μαζί με την IL-1 και την IL-3 και πιθανόν την IL-11 προάγει τον πολλαπλασιασμό

και την διαφοροποίηση των P-HSC σε pM-HSC (20-22).

MIP-1a

Ο MIP-1a(Macrophage Inflammatory Protein 1a) αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό των περισσότερο ώριμων κυττάρων στο διαμέρισμα των stem cells (CFU-S, CFU-A, CFU-GEMM) αλλά δεν έχει δράση στα λιγότερο ώριμα stem cells (23-26). Όπως και πολλές άλλες κυτταροκίνες, ο MIP-1a (και ο MIP-1b) έχει πλειοτροπική δράση και υπάρχει ένδειξη ότι επάγει την δημιουργία CFU-GM αποικιών, υπό συγκεκριμένες συνθήκες (27,28).

TGF-b

Ο TGF-b είναι μια πρωτεΐνη που παράγεται από πολλούς κυτταρικούς τύπους και αποθηκεύεται στα κοκκία των αιμοπεταλίων (29,30). Επηρεάζει τον ρυθμό πολλαπλασιασμού πολλών κυτταρικών τύπων, δρώντας συνήθως ως αναστολέας (31-34) αλλά όχι πάντα (35,36). Έχει για παράδειγμα αποδειχθεί ότι η δράση του TGF-b, επαγωγική ή ανασταλτική σε συγκεκριμένο τύπο κυττάρων, εξαρτάται από την παρουσία άλλων κυτταροκινών στο περιβάλλον (37).

Στα αιμοποιητικά κύτταρα, ο TGF-b δρα ως ένας πολυδύναμος ρυθμιστής της ανάπτυξής τους, τόσο in vivo όσο και in vitro. Έτσι, επιλεκτικά αναστέλλει την παραγωγή πρώιμων stem cells , ως αποτέλεσμα της μειωμένης παραγωγής ερυθρών κυττάρων και αιμοπεταλίων (41-44), ενώ προάγει την κοκκιοποίηση παρουσία του GM-CSF (45).

ΚΟΚΚΙΟΠΟΙΗΣΗ

Συνοπτικά λοιπόν, η ρύθμιση της κοκκιοποίησης στο μυελικό όργανο και κατά συνέπεια ο αριθμός των ουδετερόφιλων στο περιφερικό αίμα, βρίσκεται υπό την επίδραση ενός αριθμού κυτταροκινών, που παράγονται από το μικροπεριβάλλον του μυελού και δρουν θετικά ή αρνητικά στον πολλαπλασιασμό και την διαφοροποίηση των προβαθμίδων των ουδετερόφιλων, μόνες ή σε συνδιασμό.

ΟΥΔΕΤΕΡΟΠΕΝΙΕΣ

ΟΡΙΣΜΟΣ

Ως ουδετεροπενία ορίζεται η ελάττωση του αριθμού των κυκλοφορούντων στο αίμα ουδετερόφιλων πολυμορφοπύρηνων σε επίπεδα χαμηλότερα από τα κατώτερα όρια της φυσιολογικής διακύμανσης που αντιστοιχεί στην ηλικία και τη φυλή του ατόμου. (92).

Στην πράξη ως ουδετεροπενία χαρακτηρίζεται στον ενήλικα η ελάττωση των ουδετερόφιλων πολυμορφοπύρηνων του αίματος κάτω των 2500/μl για χρονική περίοδο μεγαλύτερη των 3 μηνών (46,92,126).

ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ

Από **φυσιοπαθολογική άποψη** οι ουδετεροπενίες διακρίνονται σε τέσσερις μεγάλες ομάδες, που φέρονται και ως ουδετεροπενίες **τύπου I, II, III και IV** (Πίνακας 1).

α) Ουδετεροπενίες **απλαστικού τύπου**. Οι ουδετεροπενίες αυτές, φερόμενες και ως ουδετεροπενίες **κεντρικού τύπου** ή **τύπου I**, οφείλονται σε μείωση της παραγωγής ουδετερόφιλων πολυμορφοπύρηνων, λόγω μείωσης του αριθμού των κυτταρικών τους προβαθμίδων στο μυελό. Η βλάβη αφορά και στα δύο κυτταρικά διαμερίσματα, αυτό των **πολλαπλασιαζόμενων** και εκείνο των

ΠΙΝΑΚΑΣ 1: ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ ΟΥΔΕΤΕΡΟΠΕΝΙΩΝ

Φυσιοπαθολογική ταξινόμηση

1. Ουδετεροπενίες κεντρικού τύπου
 - α. Απλαστικού τύπου (τύπου I)
 - β. Ουδετεροπενίες από μη αποδοτική κοκκιοποίηση (τύπου II)
2. Ουδετεροπενίες περιφερικού τύπου (τύπου III)
3. Ψευδοουδετεροπενίες (τύπου IV)

Εμπειρική Ταξινόμηση

1. Συγγενείς Ουδετεροπενίες
2. Επίκτητες Ουδετεροπενίες
 - α. Ιδιοπαθείς
 - β. Δευτεροπαθείς
 - i. Ουδετεροπενίες από μυελοπάθεια
 - ii. Ουδετεροπενίες ανοσολογικής αρχής
 - iii. Ουδετεροπενίες λοιμώδους αιτιολογίας
 - iv. Ουδετεροπενίες φαρμακευτικής αιτιολογίας
 - v. Υπερσπληνισμός

ωριμαζόντων κυττάρων. Στο αίμα η ελάττωση αφορά εξίσου στο διαμέρισμα των κυκλοφορούντων και των προσκολλημένων στα αγγειακά τοιχώματα κυττάρων. Οι ουδετεροπενίες απλαστικού τύπου διακρίνονται σε συγγενείς και επίκτητες. Στις συγγενείς περιλαμβάνονται η νόσος του Kostmann (49-53), η καλοήθης οικογενής ουδετεροπενία (54-55), η συγγενής κυκλική ουδετεροπενία (56-59), καθώς και ουδετεροπενίες συνοδεύουσες από άλλες συγγενείς διαταραχές (60-71) . Στις επίκτητες απλαστικού τύπου ουδετεροπενίες εντάσσονται οι ουδετεροπενίες που οφείλονται σε φάρμακα (72-73) ή προϊόντα της βιομηχανικής χημείας, οι ουδετεροπενίες που προκαλούνται από ιονίζουσα ακτινοβολία (74-75), αυτές που προκαλούνται από διήθηση του μυελικού οργάνου από νεοπλασματικό ιστό και οι ουδετεροπενίες που συνοδεύουν την απλαστική αναιμία (76,77).

β) Ουδετεροπενίες από μη αποδοτική κοκκιοποίηση. Στις ουδετεροπενίες αυτές, τις λεγόμενες και ουδετεροπενίες τύπου II, η μείωση του αριθμού των ουδετερόφιλων πολυμορφοπύρηνων οφείλεται στον αυξημένο ενδομυελικό θάνατο των κοκκιοκυτταρικών προβαθμίδων. Σε αυτές, το διαμέρισμα των πολλαπλασιαζόμενων κυττάρων είναι έντονα υπερπλαστικό ενώ παρατηρείται σημαντική ελάττωση των ωριμαζόντων κυττάρων, ιδιαίτερα των αποθηκών των ουδετερόφιλων πολυμορφοπύρηνων. Παρατηρούνται σε έλλειψη βιταμίνης B12 ή φυλλικού (78) οξέος, σε έλλειψη χαλκού (79,80), σε σιδηροπενική αναιμία (σπάνια) (81) και σε μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα (82).

γ) Ουδετεροπενίες περιφερικού τύπου. Οι ουδετεροπενίες αυτές που φέρονται και ως ουδετεροπενίες τύπου III, προκαλούνται από αυξημένη καταστροφή ουδετερόφιλων πολυμορφοπύρηνων στην περιφέρεια, κυρίως στο σπλήνα και στο συκώτι. Η καταστροφή αυτή είναι συνέπεια υπερσπληνισμού (83-85), ή παρουσίας αντισώματος στην επιφάνειά τους (86,87), είτε σε αυξημένο πέρασμα πολυμορφοπύρηνων από την αιματική κυκλοφορία στους ιστούς (47). Στις ουδετεροπενίες που οφείλονται σε αντισώματα εντάσσονται : 1. Η νεογνική ή ισόανοση ουδετεροπενία (88-90) (isoimmune neonatal neutropenia), 2. Η ιδιοπαθής αυτοάνοση (91-93) ουδετεροπενία (autoimmune neutropenia), 3. Οι δευτεροπαθείς αυτοάνοσες ουδετεροπενίες που περιλαμβάνουν τις ουδετεροπενίες που συνοδεύουν αυτοάνοσα νοσήματα όπως είναι ο συστηματικός ερυθματώδης λύκος (94), το σύνδρομο Felty (96-97), το σύνδρομο Sjogren (97,98), η χρόνια ενεργή ηπατίτιδα (91) ή άλλα νοσήματα, όπως είναι τα λεμφοϋπερπλαστικά σύνδρομα (99) και η νόσος του Hodgkin (100,101). 4. Οι ανοσοαλλεργικές ουδετεροπενίες από φάρμακα (αντίσωμα που στρέφεται έναντι απτινικού συμπλέγματος) “απτίνη – πρωτεΐνη” πάνω στην επιφάνεια των κυττάρων (72,101-104).

δ) Ουδετεροπενίες από διαταραχή της κατανομής των κοκκιοκυττάρων, ή τύπου IV. Οι ουδετεροπενίες αυτές δεν είναι αληθείς, αφού δεν πρόκειται για πραγματική ελάττωση του αριθμού των ουδετερόφιλων πολυμορφοπύρηνων στον οργανισμό, αλλά για μετακίνηση πολυμορφοπύρηνων από το διαμέρισμα των κυκλοφορούντων, στο διαμέρισμα των προσκολλημένων στα αγγειακά τοιχώματα κοκκιοκυττάρων (ψευδοουδετεροπενίες) (105).

Η ταξινόμηση των ουδετεροπενιών με φυσιοπαθολογικά κριτήρια, η οποία είναι ανάλογη εκείνης των αναιμιών, φαίνεται ότι δεν προσφέρεται για την διερεύνηση μιας ουδετεροπενίας σε πρακτικό κλινικό επίπεδο. Στην κλινική μας εφαρμόζεται από χρόνια μια εντελώς εμπειρική ταξινόμηση των ουδετεροπενιών, που εύκολα απομνημονεύεται και η οποία νομίζουμε ότι δίνει τις βασικές κατευθύνσεις για την αιτιολογική διερεύνηση μιας ουδετεροπενίας. Αξίζει να σημειωθεί ότι οι ουδετεροπενίες αποτελούν γενικά μια πολύ ετερόκλητη ομάδα κοκκιοκυτταρικών διαταραχών.

Στην **εμπειρική ταξινόμηση** οι ουδετεροπενίες χωρίζονται σχετικά εύκολα σε **συγγενείς και επίκτητες**.

Ως συγγενείς χαρακτηρίζονται οι ουδετεροπενίες που μεταβιβάζονται κληρονομικά στους κατιόντες ή σχετίζονται με διαταραχές που αναπτύχθηκαν κατά την εμβρυϊκή ζωή. Διακρίνονται σε οικογενείς (54,55), φυλετικές (55), αμιγείς και συνδυαζόμενες με ανοσολογικές διαταραχές ή/και ποικίλες άλλες συγγενείς ανωμαλίες. Μερικές από αυτές είναι αρκετά συχνές, όπως η οικογενής ουδετεροπενία ενώ άλλες είναι πολύ σπάνιες, όπως η ακοκκιοκυτταραιμία του Kostmann (49,51).

Οι επίκτητες ουδετεροπενίες διακρίνονται σε ιδιοπαθείς άγνωστης αιτιολογίας (58,92) και παθογενετικού μηχανισμού και σε δευτεροπαθείς που συνοδεύουν διάφορα νοσήματα. Οι δευτεροπαθείς ουδετεροπενίες μπορεί να είναι από μυελοπάθεια (106,107), ανοσολογικής αρχής (90,91), λοιμώδους αιτιολογίας (108, 109, 110) ή φαρμακευτικής αιτιολογίας (73).

ΧΡΟΝΙΑ ΙΔΙΟΠΑΘΗΣ ΟΥΔΕΤΕΡΟΠΕΝΙΑ ΤΟΥ ΕΝΗΛΙΚΟΥ

ΜΗ ΑΝΟΣΟΛΟΓΙΚΗΣ ΑΡΧΗΣ, NI-CINA

(Non Immune Chronic Idiopathic Neutropenia of Adult).

Με τον όρο Χρόνια Ιδιοπαθής Ουδετεροπενία του Ενηλίκου (Chronic idiopathic neutropenia of adults, CINA), υποδηλώνεται η “δυσερμήνευτη” μείωση του αριθμού των κυκλοφορούντων ουδετερόφιλων κοκκιοκυττάρων σε επίπεδα κάτω από το κατώτατο όριο της φυσιολογικής διακύμανσης για μακρά περίοδο του χρόνου (92). Η διαταραχή περιγράφηκε για πρώτη φορά το 1968 από τους Kyle και Linman (112) και η φυσική της ιστορία ανασκοπήθηκε λίγα χρόνια αργότερα από τον Dale και τους συνεργάτες του, το 1979 και τον Kyle, το 1980. Στην παρούσα μελέτη θα αναφερθούμε στην Χρόνια Ιδιοπαθή Ουδετεροπενία του Ενηλίκου μη Ανοσολογικής Αρχής (Non Immune Chronic Idiopathic Neutropenia of Adult, NI-CINA). Από πλευράς συχνότητας η νόσος φαίνεται να απαντάται στο 8,2% του πληθυσμού στο Ηράκλειο Κρήτης.

ΚΡΙΤΗΡΙΑ ΔΙΑΓΝΩΣΗΣ ΤΗΣ NI-CINA

1. Αριθμός κυκλοφορούντων ουδετερόφιλων κοκκιοκυττάρων κάτω των 2500 ανά μl αίματος, που βρέθηκε σε τέσσερις τουλάχιστον διαδοχικές μετρήσεις, που έγιναν μέσα στους τελευταίους τρεις μήνες της παρακολούθησης του αρρώστου.

2. Αποκλεισμός κυκλικής, οικογενούς και φυλετικής ουδετεροπενίας με την

διενέργεια ανάλογων εξετάσεων αίματος.

3. Αποκλεισμός προηγούμενης έκθεσης σε ακτινοβολία ή λήψης κυτταροτοξικών αντικαρκινικών ή άλλων φαρμάκων, από αυτά που έχουν ενοχοποιηθεί ως δυνάμενα να προκαλέσουν ουδετεροπενία.

4. Αποκλεισμός οποιασδήποτε συστηματικής νόσου, από αυτές που χαρακτηρίζονται ή συνοδεύονται από ουδετεροπενία μετά από λεπτομερή αιματολογικό, κυτταρογενετικό, βιοχημικό, ανοσολογικό, βακτηριολογικό, βιολογικό, παρασιτικό έλεγχο, καθώς και υπερηχογραφικό έλεγχο κοιλίας.

5. Αρνητικές δοκιμασίες λευκοσυγκόλησης και ανοσοφθορισμού στην αναζήτηση αντιπολυμορφοπυρηνικών αντισωμάτων, προσκολλημένων στα κοκκιοκύτταρα ή και κυκλοφορούντα στον ορό (47,113).

ΑΙΤΙΟΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑ ΤΗΣ ΝΙ-CINA

Η αιτιολογία της νόσου είναι άγνωστη. Γενικά για την παθογένειά της CINA έχουν διατυπωθεί ποικίλες απόψεις και συγκεκριμένα:

1. Αυξημένη μετακίνηση ουδετερόφιλων κοκκιοκυττάρων από τη δεξιαμενή των κυκλοφορούντων στην δεξιαμενή των προσκολλημένων στα αγγειακά τοιχώματα (increased margination). Η άποψη αυτή υποστηρίχθηκε από τον Bishop, το 1971 (114), με βάση κυτταροκινητικά δεδομένα. Ωστόσο, η άποψη αυτή της «ψευδοουδετεροπενίας» δεν ερμηνεύει πολλά από άλλα στοιχεία, που συνοδεύουν ή χαρακτηρίζουν τη νόσο και ιδιαίτερα τον σταθερό χαρακτήρα της ουδετεροπενίας για μακρό χρονικό διάστημα.

2. Παρουσία διαλυτών ανοσοσυμπλεγμάτων στον ορό (circulating

immunocomplexes). Η άποψη αυτή υποστηρίχθηκε από τους Caligaris Carrio και συνεργάτες το 1979 (143) και βασίσθηκε σε περιπτώσεις βαριάς ουδετεροπενίας σε αρρώστους με ρευματικό νόσημα (σύνδρομο Felty). Μελέτες στο εργαστήριό μας έδειξαν ότι, με τη μοναδική εξαίρεση ενός αρρώστου, όλοι οι άλλοι, 156 άρρωστοι που μελετήθηκαν, δεν είχαν αυξημένες συγκεντρώσεις διαλυτών ανοσοσυμπλεγμάτων στον ορό τους.

3. Μη ειδική προσκόλληση ανοσοσφαιρίνης στα πολυμορφοπύρηνα. Η άποψη αυτή υποστηρίχθηκε από τον Lightsey το 1977 (115) και βασίσθηκε στη μελέτη μιας περίπτωσης νόσου του Graves με ουδετεροπενία. Οι συγγραφείς υποστήριξαν ότι αντισώματα έναντι των θυρεοειδικών ορμονών, προσκολλώνται κατά μη ειδικό τρόπο στην επιφάνεια των κοκκιοκυττάρων (non specific binding) τα οποία στη συνέχεια συγκρατούνται στον σπλήνα και φαγοκυττώνονται.

4. Διαταραχές των β2 ιντεργκρινών. Η άποψη αυτή υποστηρίχθηκε από τον Biasi, το 1944 (116) και βασίσθηκε σε δύο περιπτώσεις ουδετεροπενίας επί ρευματικών νοσημάτων. Υποστηρίζεται ότι οι β2 ιντεργκρίνες (CD11b/CD18), στην επιφάνεια των κοκκιοκυττάρων είναι ενεργοποιημένες και προκαλούν τη συγκόλληση των ουδετερόφιλων πολυμορφοπύρηνων πάνω στο αγγειακό ενδοθήλιο. Ωστόσο, ενεργοποιημένες β2 ιντεργκρίνες δεν αναφέρθηκαν στους άλλους συγγραφείς, μελέτες δε, στο δικό μας εργαστήριο δεν έδειξαν κάποια διαφορά στην έκφραση των μορίων αυτών στην επιφάνεια των ουδετερόφιλων κοκκιοκυττάρων, σε ένα μεγάλο αριθμό μελετηθέντων αρρώστων.

5. Αυξημένη έξοδος ουδετερόφιλων κοκκιοκυττάρων από την κυκλοφορία στους ιστούς. Η άποψη αυτή υποστηρίχθηκε από τους Παπαδάκη και Ηλιόπουλο το 1998 (47,113) και στηρίχθηκε στις ενδείξεις ενεργοποιημένου ενδοθηλίου στους

πάσχοντες. Υποστηρίζεται ότι στους πάσχοντες από NI-CINA υπάρχει μια ήπια φλεγμονώδης διεργασία κάπου στον οργανισμό, που οδηγεί σε αυξημένη παραγωγή ιντερλευκίνης 1-b(IL-1b) και TNF-a. Οι κυτταροκίνες αυτές αποτελούν τους κύριους ενεργοποιητές του ενδοθηλίου. Ενδείξεις της παρουσίας ενεργοποιημένου ενδοθηλίου στους πάσχοντες αποτελούν αφενός μεν, οι αυξημένες συγκεντρώσεις στον ορό διαλυτών μορίων προσκόλλησης ενδοθηλιακής προέλευσης (sE-σελεκτίνη, sICAM, sVCAM) και αφετέρου δε η ισχυρή αρνητική συσχέτιση μεταξύ των συγκεντρώσεων των μορίων αυτών στον ορό και του αριθμού των κυκλοφορούντων στο αίμα ουδετερόφιλων κοκκιοκυττάρων. Εξ' άλλου, η ιντερλευκίνη -8 (IL-8), τα επίπεδα της οποίας βρέθηκαν αυξημένα στους πάσχοντες, διευκολύνει την έξοδο των προσκολλημένων στο ενδοθήλιο ουδετερόφιλων κοκκιοκυττάρων προς τους ιστούς, λόγω της ισχυρής χημειοτακτικής προς τα ουδετερόφιλα δράσης της.

6. Μειωμένη παραγωγή κοκκιοκυττάρων στο μυελό των οστών. Η άποψη αυτή έχει υποστηριχθεί από πολλούς ερευνητές που μελέτησαν την κοκκιοποίηση με ποικίλους τρόπους : α) Παρουσία αντισωμάτων έναντι των προγονικών αιμοποιητικών κυττάρων. Η άποψη αυτή υποστηρίχθηκε από τους Hortman και συνεργάτες το 1994 (117) και δέχεται την ανάπτυξη αντισωμάτων στον οργανισμό, που στρέφονται έναντι των προγονικών αιμοποιητικών προβαθμίδων. Με τη δράση τους τα αντισώματα αυτά και πιθανά με την παρέμβαση του συμπληρώματος, θανατώνουν μέρος των κοκκιοκυτταρικών προβαθμίδων και οδηγούν σε μείωση της παραγωγής κοκκιοκυττάρων, β) Μείωση του αριθμού προγονικών προβαθμίδων με τη δράση άγνωστων παραγόντων και οπωσδήποτε όχι

αντισωμάτων, γ) Μειωμένη παραγωγή αυξητικού κοκκιοκυτταρικού παράγοντα (G-CSF) μέσα στο αιμοποιητικό μικροπεριβάλλον, από μειωμένη έκφραση του mRNA ή από διαταραχή της μεταγραφής (118).

Δικές μας μελέτες έχουν δείξει ότι ένας σημαντικός αριθμός ασθενών με NI-CINA παρουσιάζει μυελό μειωμένης κυτταροβρίθειας με διαταραχές στην ωρίμανση της κοκκιδούς σειράς. Ο σκοπός της παρούσας μελέτης είναι να διερευνηθεί ο ρόλος του αιμοποιητικού μικροπεριβάλλοντος στην εμφάνιση των διαταραχών αυτών και γενικότερα στην παθογένεια του συνδρόμου.

ΥΛΙΚΑ – ΜΕΘΟΔΟΙ

ΑΣΘΕΝΕΙΣ

Πενήντα δύο ασθενείς, 2 άνδρες και 50 γυναίκες ηλικίας 28-77 ετών (διάμεση ηλικία 55.5 χρόνια), συμμετείχαν στην μελέτη. Όλοι έπασχαν από NI-CINA σύμφωνα με τα κριτήρια που αναφέρθηκαν νωρίτερα (47,113) .

Οι ασθενείς ταξινομήθηκαν σε τρεις ομάδες με βάση την βαρύτητα της ουδετεροπενίας. Η ομάδα Α περιείχε 38 ασθενείς με ουδετερόφιλα πολυμορφοπύρρηνα να κυμαίνονται από 1700 μέχρι 2499 ανά μl αίματος (ελαφριά ουδετεροπενία), η ομάδα Β περιείχε 12 ασθενείς με ουδετερόφιλα ΠΜΝ να κυμαίνονται από 600–1699 ανά μl αίματος (ουδετεροπενία μέτριας βαρύτητας), και η ομάδα Γ περιείχε 2 ασθενείς με ουδετερόφιλα ΠΜΝ λιγότερα των 600 ανά μl αίματος (βαριά ουδετεροπενία). Εξαιτίας του μικρού τους αριθμού, οι ασθενείς της ομάδας Γ συμπεριελήφθησαν στην ομάδα Β και μελετήθηκαν μαζί σαν μια ομάδα ασθενών (ομάδα Β από 14 ασθενείς με «pronounced» ουδετεροπενία). Ασθενείς με πρόσφατο ιστορικό ιογενούς ή βακτηριακής λοίμωξης (μέσα στους τελευταίους δύο μήνες) αποκλείστηκαν από τη μελέτη.

Σαν μάρτυρες μελετήθηκαν, 19 αιματολογικά υγιή άτομα, 3 άντρες και 16 γυναίκες ηλικίας από 20-75 χρόνων (διάμεσο 54 χρόνια). Μεταξύ ασθενών και φυσιολογικών μαρτύρων δεν βρέθηκαν σημαντικές διαφορές όσον αφορά στην ηλικία και στο φύλο, χρησιμοποιώντας το τεστ χ^2 . Κάποιες κλινικές και εργαστηριακές πληροφορίες για τους ασθενείς δίνονται στον **πίνακα 2**.

ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΚΥΤΤΑΡΙΚΩΝ ΕΝΑΙΩΡΗΜΑΤΩΝ

Εναιωρήματα μυελικών μονοπύρηνων κυττάρων (Bone marrow mononuclear cells, BMMCs) των ασθενών προετοιμάστηκαν από μυελό που αναρροφήθηκε από την οπίσθια λαγόνια ακρολοφία για διαγνωστικούς σκοπούς. Δείγματα μυελού λαμβάνονταν και από άτομα χωρίς αιματολογικό πρόβλημα που χειρουργούνταν για αχονδροπλασία του ισχίου και χρησιμοποιούνταν ως μάρτυρες. Τα δείγματα μυελού αμέσως μετά την αναρρόφηση, διαλύονταν σε αναλογία 1:4 σε Iscove's modified Dulbecco's Medium (IMDM) (Gibco, Grand Island, NY) εμπλουτισμένο με 15% ορό εμβρύου αγελάδος (fetal calf serum, FCS, Gibco), 100 IU/ml πενικιλίνη, 50 µg/ml στρεπτομυκίνη και 10 IU/ml ηπαρίνη χωρίς συντηρητικά (Sigma Cretical CO, St. Louis, MO).

Ακολουθούσε επιστίβαση του αραιωμένου δείγματος μυελού σε Lymphoprep (1,077 g/ml 3, Nyegaard, Oslo, Norway) και ακολουθούσε φυγοκέντρηση στις 1800 στροφές για 30 λεπτά.. Τα κύτταρα λαμβάνονταν από τη μεσόφαση, πλένονταν, ελέγχονταν για την βιωσιμότητα τους με κυανό του τρυπανίου και επαναδιαλύονταν στο ανωτέρω θρεπτικό υλικό σε συγκέντρωση 10^7 /ml.

Προκειμένου να ληφθούν τα μη προσκολλώμενα μονοπύρηνια κύτταρα του μυελού (NA-BMMCs: Non adherent-bone marrow mononuclear cells), 10^7 BMMCs εναιωρούνταν σε 10 ml θρεπτικό υλικό σε μια πλαστική φλάσκα καλλιέργειας των 25 cm² και ακολουθούσε επώαση των κυττάρων για μια νύχτα στους 37° C και σε 5%CO₂ σε υγρό κλίβανο (fully humidified). Ακολουθούσαν δύο επιπλέον επώσεις σε νέες φλάσκες διάρκειας μιας ώρας η καθεμία και ακολούθως τα μη προσκολλημένα κύτταρα, λαμβάνονταν, ελέγχονταν ως προς την βιωσιμότητα, μετρούνταν, διαλύονταν σε θρεπτικό υλικό σε συγκέντρωση 5×10^6

κύτταρα/ml και χρησιμοποιούνταν ως κύτταρα στόχοι σε καλλιέργειες μεθυλοκυτταρίνης σε πειράματα συγκαλλιέργειας.

Προκειμένου να επιβεβαιωθεί η απομάκρυνση των προσκολλόμενων κυττάρων με την παραπάνω μέθοδο, τα μη προσκολλημένα κύτταρα ελέγχονταν, σε κάθε πείραμα, για την ιδιότητα τους να προσκολλώνται ή όχι.

ΠΙΝΑΚΑΣ 2 : Κλινικά και εργαστηριακά στοιχεία για τους ασθενείς που μελετήθηκαν

	Ασθενείς		Φυσιολογικοί Μάρτυρες	
	Ομάδα Α	Ομάδα Β	Συνολικοί ασθενείς	
Αριθμός ασθενών	38	14	52	19
Αντρες/Γυναίκες	2/36	0/14	2/50	3/16
Ηλικία(χρόνια)*	54 (28-77)	56 (43-76)	55.5 (28-77)	54 (20-75)
Διάρκεια(μήνες) ^{&}	40 (6-240)	48 (9-154)	42 (6-240)	-
Αιμοσφαιρίνη(g/dl) [#]	13.22 ± 1.14	12.09 ± 1.42	12.91 ± 1.31	14.65 ± 1.47
Λευκοκύτταρα(/μl) [#]	4052 ± 730	3053 ± 374	3783 ± 789	6678 ± 1034
Ουδετερόφιλα(/μl) [#]	2035 ± 230	1118 ± 442	1789 ± 507	3939 ± 851
Λεμφοκύτταρα (/μl) [#]	1646 ± 638	1570 ± 374	1626 ± 576	2082 ± 330
Μονοκύτταρα(/μl) [#]	293 ± 126	296 ± 172	294 ± 138	408 ± 143
Αιμοπετάλια x10 ³ (/μl) [#]	196 ± 54	189 ± 39	194 ± 50	228 ± 46

* Διάμεση τιμή και ακραίες τιμές

[&] Χρόνος από την διάγνωση της ασθένειας μέχρι την μελέτη(Διάμεση τιμή και ακραίες τιμές).

[#] Μέση τιμή ± Σταθερή απόκλιση

ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΙΑ ΡΟΗΣ ΔΥΟ ΧΡΩΜΑΤΩΝ

Συνδεδεμένα με φλουορεσκεΐνη (Fluorescein, FITC) ή φυκοερυθρίνη (phycoerythrin PE) μονοκλωνικά αντισώματα (MAbς) ποντικού έναντι των αντιγονικών επιτόπων CD34, CD33, CD38, CD71, CD45RA και HLA-DR, χρησιμοποιήθηκαν για την μελέτη των BMDCs με κυτταρομετρία ροής (Immunotech Laboratories Marseille, France). Ένα ισοτυπικό IgG ποντικού συνδεδεμένο με FITC ή PE χρησιμοποιήθηκε σαν αρνητικός μάρτυρας για κάθε χρήση MAb.

Τα κύτταρα πλένονταν δύο φορές σε PBS (phosphate buffer saline) εμπλουτισμένο με 1% BSA (Bovine serum albumin, Sigma) (PBS-1% BSA, pH:7.4). Ακολούθως, τα κύτταρα εναιωρούνταν PBS σε συγκέντρωση 10^7 /ml και χωρίζονταν σε δείγματα των 100μl για την διαδικασία του ανοσοφθορισμού. Τα κυτταρικά δείγματα επωάζονταν με 20μl από κάθε μονοκλωνικό (MAb) για 20 λεπτά, σε θερμοκρασία δωματίου, πλένονταν με PBS-1% BSA, μονιμοποιούνταν με 1% παραφορμαλδεΐδη (pH=7.4) και μετρούνταν αμέσως. Τα δείγματα μετρούνταν για το ποσοστό των θετικών ως προς το μονοκλωνικό αντίσωμα μεμβρανικό φθορισμό σε κυτταρομετρητή (Elite Coulter model, Coulter Electronics, UK). Σε κάθε δείγμα αναλύθηκαν 50.000 κύτταρα.

ΜΥΕΛΙΚΕΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ ΒΡΑΧΕΙΑΣ ΔΙΑΡΚΕΙΑΣ

10^5 NA-BMMCs καλλιεργούνται σε 1ml IMDM εμπλουτισμένο με 15% FCS, 1% BSA, 10^{-4} M μερκαπτοαιθανόλη (Gibco) και 1,2% μεθυλοκυτταρίνη σε τρυβλία Petri των 35-mm, παρουσία 50ng G-CSF (granulocyte colony stimulating factor, Granulokine, Amgen, Roche) και/ή 5ngr GM-CSF (granulocyte macrophage colony stimulating factor, Mielogen, Schering – Plough, Greece). Οι καλλιέργειες έγιναν εις διπλούν και επώαστηκαν στους 37°C και 5% CO₂ σε κλίβανο με 100% υγρασία.

Οι κοκκιοκυτταρικές (Granulocyte colony forming units, CFU-G) μονοκυτταρικές (Macrophage colony forming units, CFU-M) και μικτές κόκκιο- και μονοκυτταρικές αποικίες (Granulocyte Macrophage colony forming units, CFU-GM) μετρήθηκαν την 12η μέρα της καλλιέργειας χρησιμοποιώντας ένα ανάστροφο μικροσκόπιο Olympus. Για μεγαλύτερη ευκολία τελικά υπολογίζεται το σύνολο των CFU-G + CFU-M + CFU-GM ως CFU-GM αποικίες. Ως αποικίες θεωρήθηκαν αθροίσματα των πενήντα ή περισσότερων κυττάρων.

ΜΑΚΡΑΣ ΔΙΑΡΚΕΙΑΣ ΜΥΕΛΙΚΕΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ

Οι μακράς διάρκειας μυελικές καλλιέργειες (LTBMCs : Long term bone marrow cultures), πραγματοποιήθηκαν με βάση την τεχνική αναφορά του Dexter και συνεργ.(119,120) . 10^7 BMMCs εναιωρούνταν σε πλαστική φλάσκα των 25cm² σε τελικό όγκο 10ml IMDM εμπλουτισμένου με 15% FCS, 10% ιππείου ορού (horse serum, Gibco BRL, Gathersburg MD), 10^{-6} M ημίσουξινική υδροκορτιζόνη (hydrocorticone sodium succinate, Sigma) και 100 IU/ml πενικιλίνη –

στρεπτομυκίνη και επώαστηκαν στους 37°C και 5% CO₂ σε κλίβανο με 100% υγρασία.

Κάθε εβδομάδα γινόταν αφαίρεση της μισής ποσότητας του υπερκείμενου της καλλιέργειας και αντικατάστασή του με ίσο όγκο φρέσκου θρεπτικού υλικού. Κάθε εβδομάδα, οι φλάσκες εξετάζονταν με τη χρήση ενός ανάστροφου μικροσκοπίου, για τον σχηματισμό στρώματος. Μέσα σε 2-5 εβδομάδες, όταν οι καλλιέργειες είχαν σχηματίσει ένατάπητα, όταν καλύπτονταν δηλαδή τουλάχιστον το 75% της επιφάνειας της φλάσκας από στρωματικά κύτταρα (121), οι καλλιέργειες τερματίζονταν, τα μη προσκολλημένα κύτταρα απομακρύνονταν και τα κύτταρα του στρώματος ακτινοβολούνταν (1500 radς). Ακολουθούσε η αποκόλληση των προσκολλώμενων κυττάρων με επώαση τους με 0,25% τρυψίνη (Sigma) για 10 λεπτά στους 37° C. Τα αποκολλημένα κύτταρα πλένονταν δύο φορές με IMDM–15% FCS, μετρούνταν, ελέγχονταν για την βιωσιμότητα τους και χρησιμοποιούνταν σε πειράματα συγκαλλιέργειας.

ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ ΣΥΓΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ

10⁵ NA-BMMCs από φυσιολογικά άτομα (κύτταρα στόχοι) καλλιεργήθηκαν μαζί με ακτινοβολημένα στρωματικά κύτταρα από ασθενείς με NI-CINA ή από φυσιολογικούς μάρτυρες (κύτταρα διεγέρτες) σε αναλογία από 1:2 έως 1:8 απουσία εξωγενών παραγόντων ανάπτυξης (growth factors). Τα κύτταρα στόχοι επίσης ελέγχθηκαν και για τον σχηματισμό αποικιών απουσία στρωματικών κυττάρων. Όλα τα πειράματα συγκαλλιέργειας έγιναν σε ημιστερέο θρεπτικό υλικό

μεθυλοκυτταρίνης. Ο σχηματισμός αποικιών CFU – GM υπολογίσθηκε μετά 12 μέρες επώασης.

ΜΕΤΡΗΣΗ ΚΥΤΑΡΟΚΙΝΩΝ ΣΕ ΥΠΕΡΚΕΙΜΕΝΑ LTBMIC

Στο τέλος της τρίτης εβδομάδας των LTBMICs, λαμβάνονταν 5ml από το υπερκείμενο της καλλιέργειας και φυγοκεντρώνταν. Τα υπερκείμενα χωρίς κύτταρα χωρίζονταν σε μικρότερους όγκους και αποθηκεύονταν στους -70°C μέχρι τη στιγμή της μελέτης. Χρησιμοποιώντας τη μέθοδο ELISA και τα αντίστοιχα kits (Quantikine kits R&D Systems Inc., Minneapolis, Minn, USA) τα οποία είναι διαθέσιμα στο εμπόριο, μετρήθηκαν οι συγκεντρώσεις του G-CSF, του GM-CSF, της Ιντερλευκίνης -3 (IL-3), της Ιντερλευκίνης-6 (IL-6), του TGF- β 1 (Transforming growth factor beta 1) καθώς και του MIP -1 α (Macrophage Inflammatory protein 1 alpha). Πριν τις μετρήσεις του TGF- β 1, προηγείτο ενεργοποίηση του παράγοντα σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Επίσης, σύμφωνα με τους κατασκευαστές, οι ευαισθησίες των μεθόδων αυτών είναι μικρότερες από 7 pg/ml για τον G-CSF, 2.8 pg/ml για τον GM-CSF, 7.4 pg/ml για την IL-3, 0.7 pg/ml για την IL-6, 7pg/ml για τον TGF- β 1 και 6pg/ml για τον MIP-1 α .

ΜΕΤΡΗΣΕΙΣ ΤΩΝ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΕΩΝ ΤΩΝ IL-1 β και TNF- α

ΣΤΟΝ ΟΡΟ ΑΙΜΑΤΟΣ

Οροί από φλεβικό αίμα ασθενών και φυσιολογικών μαρτύρων συλλέγονταν σε

στείρες συνθήκες, χωρίζονταν σε μικρότερους όγκους και αποθηκεύονταν στους – 70° C μέχρι τη στιγμή του πειράματος. Χρησιμοποιώντας τη μέθοδο Elisa και τα αντίστοιχα kits (Quantikine™ kits, R&D Systems Inc., Minn., US) τα οποία είναι διαθέσιμα στο εμπόριο, μετρήθηκαν τα επίπεδα των IL-1β και TNF-α στους ορούς(12,18). Σύμφωνα με τους κατασκευαστές οι μικρότερες ανιχνεύσιμες ποσότητες των IL-1β και TNF-α με αυτή τη μέθοδο είναι 0.125pg/ml και 0.5pg/ml αντίστοιχα.

ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

Τα δεδομένα της μελέτης αναλύθηκαν στο GraphPad Prism πρόγραμμα του υπολογιστή. Οι συγκεντρώσεις των κυτταροκινών στα υπερκείμενα των LTBMCS αναλύθηκαν με μη παραμετρικά τεστ δεδομένου ότι οι τιμές που βρέθηκαν δεν ακολουθούσαν κανονική κατανομή. Η δοκιμασία Wilcoxon χρησιμοποιήθηκε για συγκρίσεις μεταξύ ομάδων και η δοκιμασία Spearman για τις συσχετίσεις μεταξύ κατανομών. Η διπλή ανάλυση μεταβλητότητας (standard two-way variance analysis test) χρησιμοποιήθηκε για να καθορίσει τις διαφορές στους αριθμούς των CFU-GM μεταξύ των ομάδων. Όλα τα άλλα αριθμητικά αποτελέσματα αναλύθηκαν με το Students' t-test.

Η ομογένεια των πληθυσμών εξετάστηκε με χ^2 τεστ. Μια πιθανότητα ίση ή μικρότερη του 5% θεωρήθηκε ως στατιστικά σημαντική.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Μυελικά προγονικά κύτταρα

Τα αποτελέσματα των αναλύσεων, με κυτταρομετρία ροής, των CD34⁺ κυττάρων στον μυελό φαίνονται στον **πίνακα 3**. Οι ασθενείς και των δύο ομάδων είχαν σημαντικά μικρότερες αναλογίες CD34⁺ κυττάρων συγκρινόμενα με τις τιμές στον μυελό και φυσιολογικών μαρτύρων ($p < 0.05$ και $p < 0.02$ αντίστοιχα). Ωστόσο μεταξύ των ασθενών των δύο ομάδων δεν βρέθηκε σημαντική διαφορά στην συχνότητα αυτών των κυττάρων. Οι αναλογίες των CD34⁺ κυττάρων που δεν εκφράζουν αντιγόνα συγκεκριμένης διαφοροποίησης (CD34⁺/lin⁻ κύτταρα), και ειδικότερα τα CD34⁺/CD33⁻, CD34⁺/CD45RA⁻, CD34⁺/CD38⁻, CD34⁺/CD71⁻, και CD34⁺/HLA-DR⁻ κύτταρα, ήταν όλα στα φυσιολογικά όρια. Μεταξύ των CD34⁺ κυττάρων που εκφράζουν συγκεκριμένα αντιγόνα επιφανείας (CD34⁺/lin⁺), οι αναλογίες των CD34⁺/CD33⁺, CD34⁺/CD38⁺, CD34⁺/CD71⁺, και CD34⁺/HLA-DR⁺ κυττάρων ήταν σημαντικά μειωμένες στις ομάδες των ασθενών συγκρινόμενα με τους φυσιολογικούς μάρτυρες ($p < 0.01$, $p < 0.001$, $p < 0.001$ και $p < 0.05$, αντίστοιχα). Δεν βρέθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ ασθενών και φυσιολογικών μαρτύρων στην αναλογία των CD34⁺/CD45RA⁺ κυττάρων.

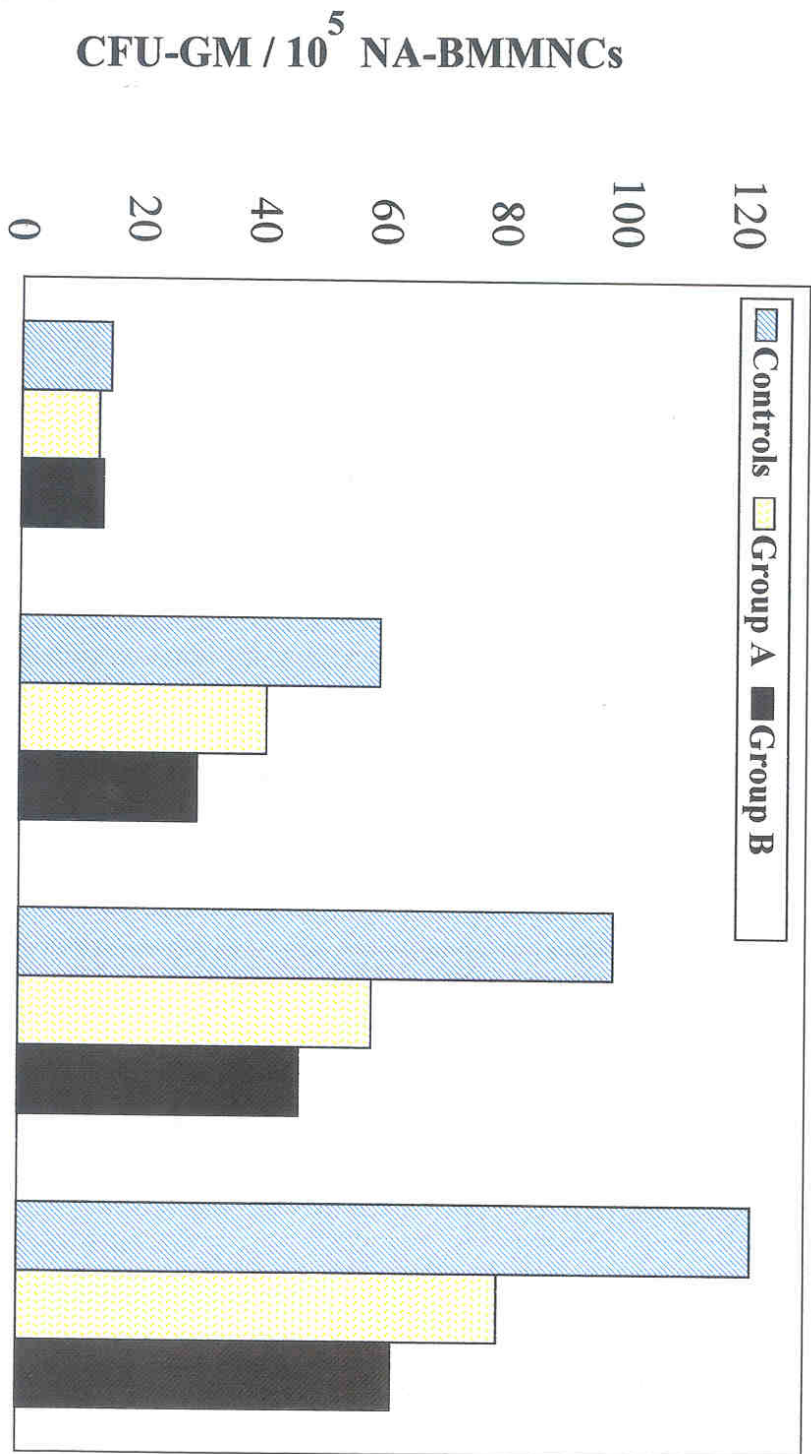
Ο σχηματισμός CFU-GM αποικιών από 10^5 NA-BMMCs

Πίνακας 3 :Ανάλυση με κυτταρομετρία ροής δύο χρωμάτων των CD34⁺ κυττάρων του μυελου σε ασθενείς με NI-CINA &

Κύτταρα (%)	Ασθενείς		Φυσιολογικοί Μάρτυρες	
	Ομάδα A (n=38)	Ομάδα B (n=14)	Συνολικοί ασθενείς (n=52)	(n=19)
CD34 ⁺	1.83 ± 0.80 *p<0.05 **N.S.	1.65 ± 1.35 *p<0.02	1.78 ± 0.97 *p<0.01	2.42 ± 0.63
CD34 ⁺ /CD33 ⁺	0.10 ± 0.07 *p<0.01 **N.S.	0.11 ± 0.13 *p<0.05	0.10 ± 0.09 *p<0.01	0.22 ± 0.23
CD34 ⁺ /CD33 ⁻	1.40 ± 0.95 *N.S. **N.S.	1.38 ± 1.44 *N.S.	1.39 ± 1.10 *N.S.	1.91 ± 0.69
CD34 ⁺ /CD38 ⁺	0.45 ± 0.33 *p<0.01 **N.S.	0.27 ± 0.19 *p<0.001	0.40 ± 0.31 *p<0.001	0.76 ± 0.55
CD34 ⁺ /CD38 ⁻	1.38 ± 0.70 *N.S. **N.S.	1.38 ± 1.25 *N.S.	1.38 ± 0.87 *N.S.	1.65 ± 0.82
CD34 ⁺ /CD71 ⁺	0.13 ± 0.12 *p<0.001 **N.S.	0.10 ± 0.06 *p<0.001	0.12 ± 0.11 *p<0.001	0.48 ± 0.27
CD34 ⁺ /CD71 ⁻	1.69 ± 0.72 *N.S. **N.S.	1.55 ± 1.35 *N.S.	1.66 ± 0.92 *N.S.	1.94 ± 0.64
CD34 ⁺ /DR ⁺	0.20 ± 0.23 *N.S. **N.S.	0.29 ± 0.31 *N.S.	0.22 ± 0.25 *p<0.05	0.43 ± 0.59
CD34 ⁺ /DR ⁻	1.63 ± 0.75 *N.S. **N.S.	1.36 ± 1.07 *N.S.	1.56 ± 0.84 *N.S.	1.99 ± 0.90
CD34 ⁺ /CD45RA ⁺	0.09 ± 0.06 *N.S. **N.S.	0.06 ± 0.05 *N.S.	0.08 ± 0.06 *N.S.	0.09 ± 0.16
CD34 ⁺ /CD45RA ⁻	1.74 ± 0.79 *N.S. **N.S.	1.59 ± 1.36 *N.S.	1.70 ± 0.96 *N.S.	2.03 ± 0.63

& Όλες οι τιμές είναι εκφρασμένες ως μέσες τιμές ποσοστών ± σταθερή απόκλιση

ΣΗΜΕΙΩΣΗ: Σύγκριση μεταξύ : (*) ομάδας ασθενών και φυσιολογικών μαρτύρων(**) ασθενών της ομάδας A και της ομάδας B. Στατιστικά σημαντική στο επίπεδο του p≤0,05. N.S.: όχι στατιστικά σημαντική.



Εικ.5 Αριθμός αποικιών που σχηματίστηκαν σε θρεπτικό υαλικό μεθυλοκυτταρίνης από μη προσκολλημένα μονοκύτταρα κύτταρα του μυελού ενεργοποιημένα ή μη με κυτταροκίνες. Οι ασθενείς με NI-CINA είχαν μικρότερος αριθμός αποικιών σε σύγκριση με τους φυσιολογικούς μαρτυρες όπως φαίνεται με διατήρηση

παρουσία G-CSF ή/και GM-CSF περιγράφεται στον **εικόνα 5**. Οι ασθενείς και των δύο ομάδων είχαν σημαντικά μικρότερους αριθμούς αποικιών CFU-GM σε σύγκριση με τους φυσιολογικούς μάρτυρες, όπως αυτό αποδείχθηκε με την δοκιμασία διπλής ανάλυσης μεταβλητότητας ($F=18.075 > F^2_{184}$ σε 1%). Δεν βρέθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά στον αριθμό των CFU-GM αποικιών μεταξύ των δύο ομάδων ασθενών (Α και Β).

ΙΚΑΝΟΤΗΤΕΣ ΤΩΝ ΣΤΡΩΜΑΤΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΝΑ ΕΠΑΓΟΥΝ ΤΟΝ ΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟ ΑΠΟΙΚΙΩΝ

Η ικανότητα των στρωματικών κυττάρων να επάγουν τον σχηματισμό αποικιών ελέγχθηκε με συγκαλλιέργεια 10^5 NA-BMMNCs από φυσιολογικούς μάρτυρες με διαφορετικές συγκεντρώσεις ακτινοβολημένων στρωματικών κυττάρων από μακρόχρονες καλλιέργειες ($12,5 \times 10^3$ μέχρι 50×10^3) από ασθενείς με CINA ή φυσιολογικούς μάρτυρες. Τα αποτελέσματα φαίνονται στον **πίνακα 4**. Απουσία στρωματικών κυττάρων, η μέση τιμή αποικιών που υπήρχε ανά τρυβλίο ήταν πολύ χαμηλή και για τους ασθενείς και για τους φυσιολογικούς μάρτυρες. Παρουσία στρωματικών κυττάρων ο αριθμός των CFU-GM αποικιών που αναπτύσσονταν ήταν σημαντικά μικρότεροι στις συγκαλλιέργειες που είχαν διεγερθεί με στρωματικά κύτταρα ασθενών σε σχέση με αυτές που είχαν διεγερθεί με στρωματικά κύτταρα φυσιολογικών μαρτύρων ($F=7,196 > F^2_{108}$ σε 1%). Δεν υπήρχαν σημαντικές

Πίνακας 4 :Σχηματισμός αποικιών CFU-GM από 10^5 φυσιολογικά μη προσκολλημένα

μονοπύρηννα κύτταρα του μυελού (NA-BMMNCs) ενεργοποιημένα με διάφορες συγκεντρώσεις στρωματικών κυττάρων από ασθενείς με NI-CINA ή φυσιολογικούς μάρτυρες.

Στρωματικά κύτταρα που προστέθηκαν ανά τρυβλίο καλλιέργειας	Ασθενείς			Φυσιολογικοί Μάρτυρες (n=10)
	Ομάδα A (n=14)	Ομάδα B (n=6)	Συνολικοί ασθενείς (n=20)	
Κανένα	17 ± 18 ^{&} *N.S. **N.S.	11 ± 7 *N.S.	15 ± 15 *N.S.	7 ± 6
12.5 x 10 ³	38 ± 16 *N.S. **N.S.	73 ± 55 *N.S.	49 ± 35 *N.S.	72 ± 32
25.0 x 10 ³	69 ± 28 *p<0.01 **N.S.	88 ± 70 *N.S.	75 ± 41 *p<0.05	112 ± 46
50.0 x 10 ³	100 ± 43 *p<0.01 **N.S.	117 ± 48 *N.S.	105 ± 45 *p<0.05	145 ± 43

[&] Μέσος αριθμός αποικιών ± 1SD.

ΣΗΜΕΙΩΣΗ: Η διπλή ανάλυση μεταβλητότητας χρησιμοποιήθηκε για να καθορίσει τον βαθμό διαφοράς μεταξύ των ομάδων των ασθενών και των φυσιολογικών μαρτύρων Σύγκριση μεταξύ : (*) ομάδας ασθενών και φυσιολογικών μαρτύρων(**) ασθενών της ομάδας A και της ομάδας B. Στατιστικά σημαντική στο επίπεδο του p≤0,05. N.S.: όχι στατιστικά σημαντική.

διαφορές μεταξύ των ασθενών των ομάδων A και B, στον σχηματισμό

CFU-GM αποικιών, σε οποιαδήποτε συγκέντρωση στρωματικών κυττάρων προστέθηκε.

ΚΥΤΟΚΙΝΕΣ ΣΕ ΥΠΕΡΚΕΙΜΕΝΑ LTBMCS

Σε ασθενείς με CINA, οι τιμές του G-CSF σε υπερκείμενα LTBMCS κυμαίνονταν από 39 μέχρι 2.500 pg/ml με διάμεση τιμή 75 και μέση τιμή 473 (110 pg/ml) (Πίνακας 5). Οι αντίστοιχες τιμές που βρέθηκαν στους φυσιολογικούς μάρτυρες κυμαίνονταν από 0 μέχρι 380 pg/ml με διάμεση τιμή 101 ± 25 pg/ml. Οι τιμές αυτές δεν διέφεραν μεταξύ τους στο επίπεδο του 5%. Ωστόσο 12 από τους 46 ασθενείς (δηλαδή το 26,1%), εμφάνιζε επιπεδα G-CSF στο υπερκείμενο, μεγαλύτερα από την μεγαλύτερη τιμή των 380 pg/ml που βρέθηκε στους φυσιολογικούς μάρτυρες. Αυτό δείχνει ότι τα στρωματικά κύτταρα από ασθενείς με CINA παράγουν φυσιολογικές ή αυξημένες ποσότητες G-CSF. Δεν βρέθηκε σημαντική διαφορά μεταξύ των ασθενών των ομάδων A και B, όσον αφορά στις αναλογίες των ασθενών που είχαν συγκεντρώσεις του G-CSF στα υπερκείμενα μεγαλύτερες από 380 pg/ml. Μια αρνητική συσχέτιση παρατηρήθηκε μεταξύ των τιμών του G-CSF στα υπερκείμενα και του αριθμού των κυκλοφορούντων ουδετερόφιλων σε όλα τα άτομα που μελετήθηκαν,

($r = -0.303$, $p < 0.05$).

Σε υπερκείμενα καλλιέργειών ο GM-CSF ανιχνεύτηκε σε 3 από τους 16

Πίνακας 5 :Συγκεντρώσεις κυτταροκινών σε υπερκείμενα καλλιέργειών που συλλέχθηκαν από καλλιέργειες μακράς διάρκειας (LTBMCS) στο τέλος της τρίτης εβδομάδας.

Κυτταροκίνη (pg/ml)	Ασθενείς			Φυσιολογικοί Μάρτυρες (n=18)
	Ομάδα A (n=34)	Ομάδα B (n=12)	Συνολικοί Ασθενείς (n=46)	
G-CSF	362 ± 95* (75, 39-1800)	786 ± 315 (67, 39-2500)	473 ± 110 (75, 39-2500)	101 ± 25 (73, 0-380)
GM-CSF	12 ± 4 (0, 0-65)	12 ± 7 (0, 0-60)	12 ± 3 (0, 0-65)	4 ± 3 (0, 0-38)
IL-3	n.d.&	n.d.	n.d.	n.d.
MIP-1α	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

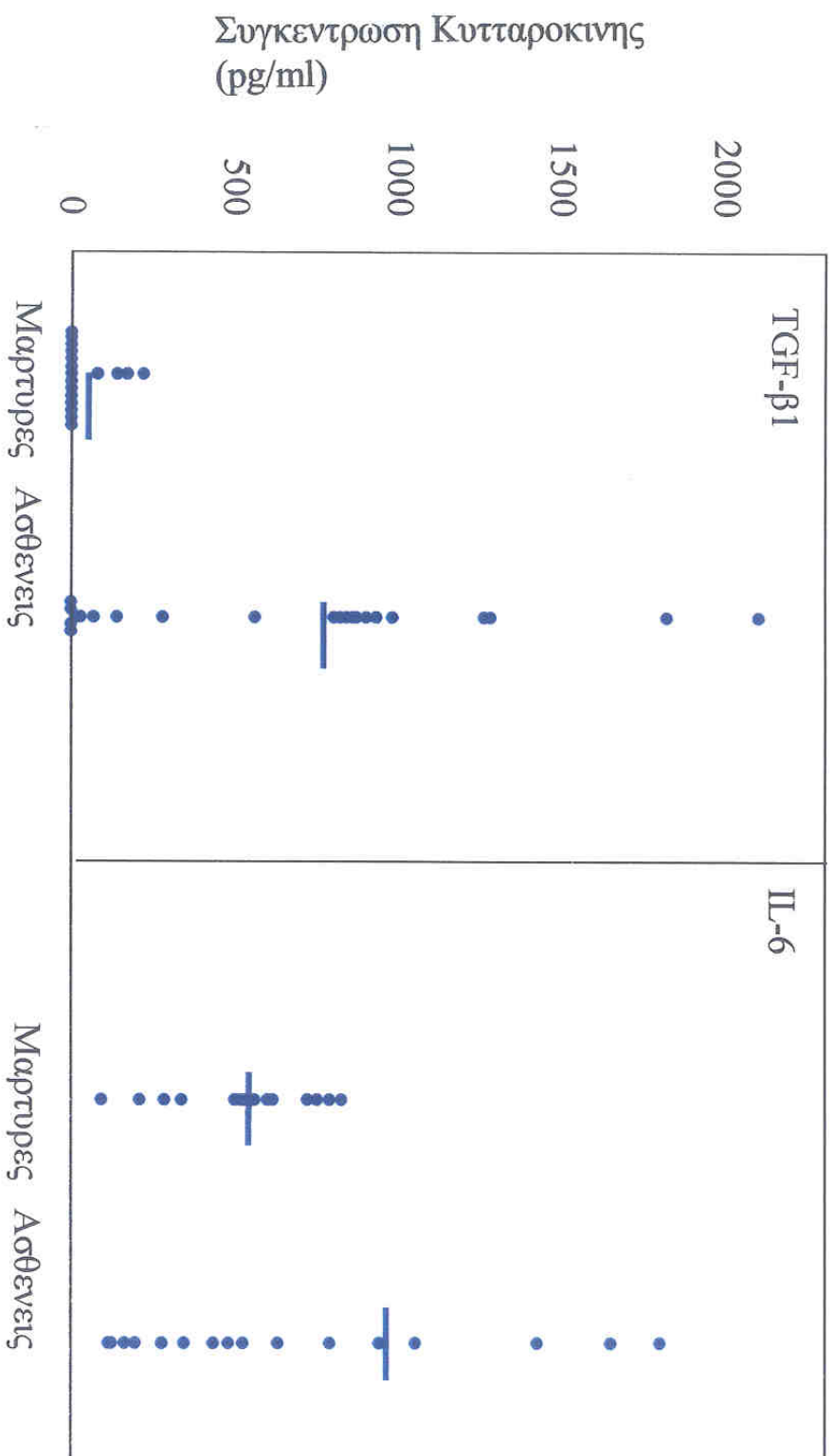
* Όλες οι τιμές είναι εκφρασμένες σαν μέση τιμή ± σταθερή απόκλιση. Οι διάμεσες τιμές και οι αποκλίσεις φαίνονται στις παρενθέσεις.

& n.d.(not detected), μη ανιχνεύσιμες τιμές.

φυσιολογικούς μάρτυρες (18.8%), σε 14 από τους 34 ασθενείς της ομάδας A (41,2%) και σε 4 από τους 12 ασθενείς της ομάδας B (33,3%). Οι αναλογίες

αυτές δεν διέφεραν μεταξύ τους στατιστικά στο επίπεδο του 5%. Οι συγκεντρώσεις του GM-CSF δεν συσχετίζονταν με τον αριθμό των κυκλοφορούντων ουδετερόφιλων. Μια πολύ σημαντική συσχέτιση παρατηρήθηκε μεταξύ των συγκεντρώσεων του GM-CSF και του G-CSF στο σύνολο των υπερκείμενων από τις καλλιέργειες που μελετήθηκαν ($r=0.545$, $p<0.001$). Η IL-3 και ο MIP-1α δεν ανιχνεύθηκαν στα υπερκείμενα των LTBMCS ούτε από ασθενείς, ούτε από φυσιολογικούς μάρτυρες.

Οι συγκεντρώσεις της IL-6 και του TGF- β 1 που βρέθηκαν σε υπερκείμενα LTBMCS, παριστάνονται στην **εικόνα 6**. Στους ασθενείς με CINA, η IL-6 κυμαινόταν από 116 μέχρι 1800 pg/ml με διάμεση τιμή 788 και μέση τιμή 941 ± 93 pg/ml. Οι τιμές αυτές ήταν σημαντικά μεγαλύτερες από αυτές των φυσιολογικών μαρτύρων οι οποίες κυμαίνονταν από 94 μέχρι 825 pg/ml με μέση τιμή 540 ± 47 pg/ml ($p<0.01$). Αυξημένες συγκεντρώσεις IL-6 πάνω από τη μεγαλύτερη τιμή των 825 pg/ml που παρατηρήθηκε στους φυσιολογικούς μας μάρτυρες, βρέθηκε σε 16 από τους 34 ασθενείς της ομάδας A (47.1%) και σε 6 από τους 12 ασθενείς της ομάδας B (50%). Αυτές οι αναλογίες δεν διαφέρουν στατιστικά μεταξύ τους. Οι συγκεντρώσεις της IL-6 στα υπερκείμενα συσχετίζονταν αρνητικά με τον αριθμό των κυκλοφορούντων ουδετερόφιλων ($r = -0.304$, $p<0.05$) και θετικά με τις συγκεντρώσεις στα υπερκείμενα του G-CSF ($r=0.594$, $p<0.001$) και του GM-CSF ($r=0.312$, $p<0.005$).



Εικ.6 Κατανομή των τιμών του TGF-β1 και της IL-6 σε υπερκείμενα από μακροχρονές μηδλικές καλσιεργίες τρίτης εβδομάδας (LTBMs). Οι μέσες τιμές δείχνονται από τις οριζόντιες γραμμές.

Στους ασθενείς με CINA, οι συγκεντρώσεις του TGF-β1 στα υπερκείμενα LTBM, κυμαινόταν από 0 έως 2100 pg/ml με διάμεση τιμή τα 840 pg/ml και μέση τιμή τα 748 ± 92 pg/ml. Οι αντίστοιχες τιμές στους φυσιολογικούς μάρτυρες κυμαίνονταν από 0 μέχρι 220 pg/ml με διάμεση τιμή 0 και μέση τιμή τα 40 ± 18 pg/ml. Οι κατανομές αυτές διέφεραν σε βαθμό στατιστικά σημαντικό στο επίπεδο του 1%. Ανιχνεύσιμες ποσότητες της κυτταροκίνης βρέθηκαν στα υπερκείμενα 4 από τους 16 φυσιολογικούς μάρτυρες (25%) και σε 36 από τους 44 ασθενείς με CINA (81.8%). Οι αναλογίες αυτές διέφεραν επίσης σε βαθμό στατιστικά σημαντικό. Καμία στατιστικά σημαντική διαφορά δεν βρέθηκε μεταξύ ασθενών της ομάδας A και της ομάδας B στα επίπεδα του TGF-β1 στα υπερκείμενα. Οι συγκεντρώσεις του TGF-β1 στα υπερκείμενα συσχετίζονταν αρνητικά με την αναλογία των CD34⁺/CD33⁺ κυττάρων στον μυελό ($r = -0,488$, $p < 0.001$) και με τον αριθμό των κυκλοφορούντων ουδετερόφιλων ($r = -0.440$, $p < 0.001$). Οι ίδιες αυτές συγκεντρώσεις συσχετίζονταν θετικά με τις τιμές στα υπερκείμενα τόσο της IL-6 ($r = 0.375$, $p < 0.001$) όσο και του G-CSF ($r = 0.315$, $p < 0.05$).

ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ ΤΗΣ IL-1β ΚΑΙ ΤΟΥ TNF-α ΣΤΟΝ ΟΡΟ

Στο σύνολο των ασθενών που μελετήθηκε, τα επίπεδα της IL-1β στον ορό, κυμαίνονταν από 0.5 μέχρι 5.6 pg/ml με διάμεση τιμή των 2.3 pg/ml και μέση τιμή 2.45 ± 1.42 pg/ml. Οι τιμές αυτές ήταν σημαντικά μεγαλύτερες από αυτές

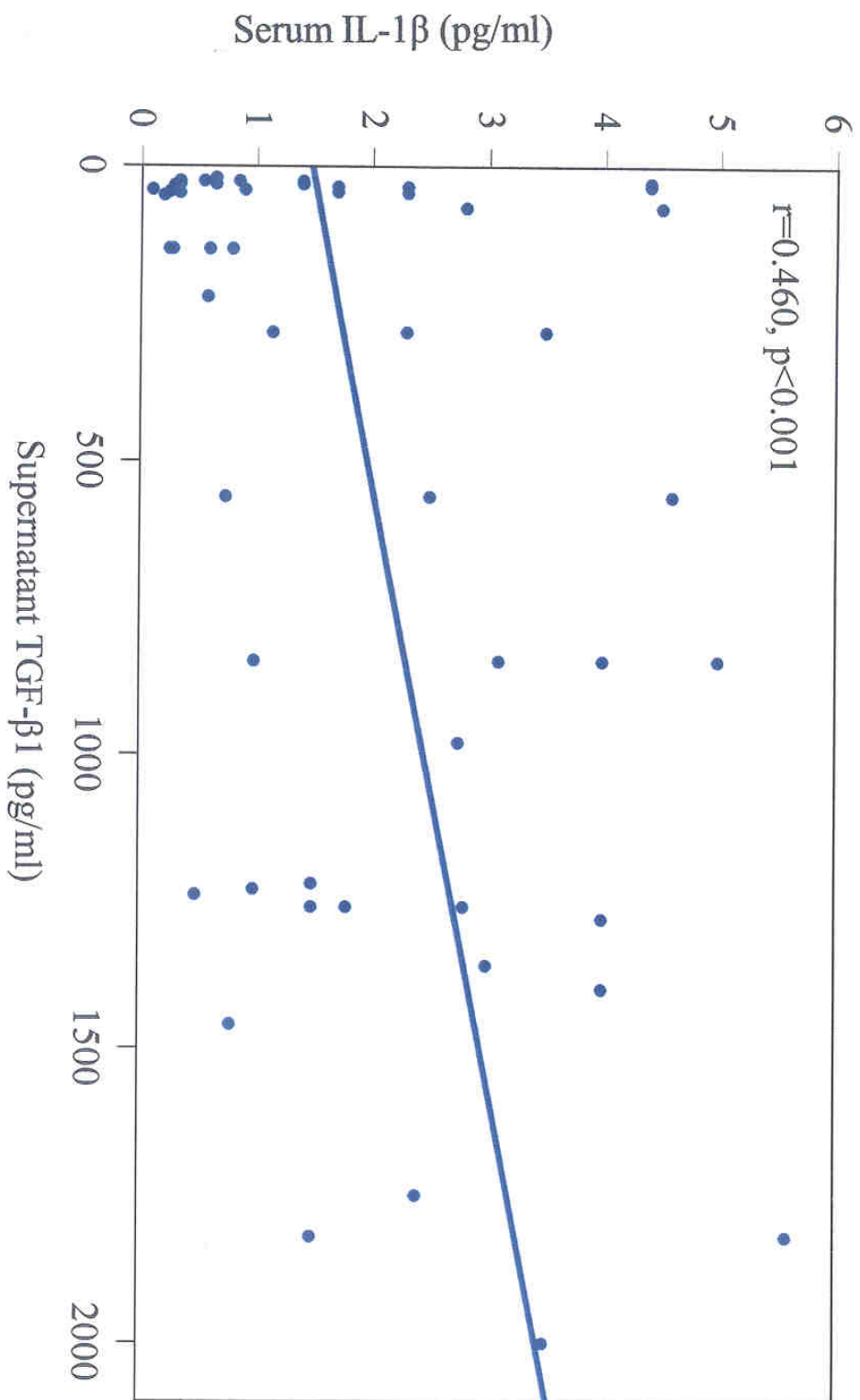


Fig.7 Συσχέτιση των επιπέδων της IL-1β στον ορό αίματος και του TGF-β1 στα υπερνημένα (TRMGs).

των 0.43 ± 0.29 pg/ml που βρέθηκαν στον ορό των φυσιολογικών μαρτύρων ($p < 0.001$). Αντίστοιχα, τα επίπεδα του TNF- α στον ορό ασθενών κυμαίνονταν από 0.8 μέχρι 12.3 pg/ml με διάμεση τιμή 3.8 pg/ml και μέση τιμή 4.2 ± 1.8 pg/ml. Οι τιμές αυτές ήταν επίσης σημαντικά μεγαλύτερες από αυτές των 1.9 ± 0.6 pg/ml που βρέθηκαν στον ορό των φυσιολογικών μαρτύρων ($p < 0.001$). Οι τιμές της IL-1 β στον ορό συσχετιζόταν ισχυρά με τις τιμές των IL-6 και TGF- β (εικόνα 7) στα υπερκείμενα καλλιιεργειών ($r=0.501$, $p < 0.001$ και $r=0.460$, $p < 0.001$ αντίστοιχα), ενώ δεν βρέθηκε σημαντική συσχέτιση μεταξύ του TNF- α στον ορό και των IL-6 ή TGF- β 1 στα υπερκείμενα καλλιιεργειών.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ - ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Τα αποτελέσματα που παρουσιάστηκαν εδώ δείχνουν ότι οι ασθενείς με NI-CINA, έχουν μικρό αριθμό δεσμευμένων για την μυελική σειρά προγονικών κυττάρων στο μυελό όπως αυτό αποδείχθηκε από τον μειωμένο αριθμό των $CD34^+/CD33^+$ κυττάρων στην ανάλυση με κυτταρομετρία ροής και από την συχνότητα των αποικιών CFU-GM που ελήφθησαν με κλωνογονική μέθοδο από μυελικά μονοπύρηνα κύτταρα.

Η χαμηλή συχνότητα των CFU-GM πιθανότατα αντανακλά την μείωση του διαμερίσματος των $CD34^+/CD33^+$ κυττάρων. Μειωμένος σχηματισμός CFU-GM αποικιών από μυελικά μονοπύρηνα κύτταρα σε ασθενείς με NI-CINA, έχει παλαιότερα αναφερθεί από πολλές έρευνες (122,123,124). Μελέτη ωστόσο με κυτταρομετρία ροής των stem cells σε ασθενείς με NI-CINA, δεν έχει γίνει μέχρι τώρα. Βρέθηκε επιπλέον ότι οι ασθενείς μας είχαν μικρό αριθμό $CD34^+/CD71^+$ κυττάρων, στα οποία περιλαμβάνονται τα δεσμευμένα για την ερυθρά σειρά προγονικά κύτταρα, και μικρό αριθμό $CD34^+/CD38^+$ κυττάρων, στα οποία περιλαμβάνονται και τα δεσμευμένα για την μυελική σειρά προγονικά κύτταρα. Αντίθετα, τα πιο άωρα προγονικά κύτταρα με φαινότυπο $CD34^+/lin^-$ ($CD38^-$, $CD71^-$, $CD39^-$, $CD45RA^-$, και $HLA-DR^-$), ήταν μέσα στα φυσιολογικά όρια στους ασθενείς μας. Το εύρημα αυτό είναι ενδεικτικό του ότι μια αριθμητική τουλάχιστον ανωμαλία στο επίπεδο των άωρων προγονικών κυττάρων δεν φαίνεται να αποτελεί την αιτία της ουδετεροπενίας στους ασθενείς μας.

Οι υποκείμενοι μηχανισμοί που οδηγούν σ' αυτή την ποσοτική ανωμαλία των δεσμευμένων για την μυελική σειρά προγονικών κυττάρων στους ασθενείς με NI-

CINA, είναι άγνωστοι. Δοθέντος ότι οι ασθενείς μας δεν έχουν χρωμοσωμικές ανωμαλίες (μη δημοσιευμένες παρατηρήσεις από την κλινική μας), και τα μυελικά προγονικά κύτταρα παρουσιάζουν φυσιολογική *in vitro* διαφοροποίηση (124, 125, 126) κάνει πιο λογική την αναζήτηση ως πιθανής αιτίας την διαταραχή στο μυελικό μικροπεριβάλλον. Όπως αναφέρθηκε στην εισαγωγή το αιμοποιητικό μικροπεριβάλλον υποστηρίζει την ανάπτυξη, τον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση των stem cells με παραγωγή κυτταροκινών και με έκφραση μορίων προσκόλλησης. Με τις LTBMIC, που χρησιμοποιήσαμε στην μελέτη μας και με τα πειράματα συγκαλλιέργειας στρωματικών κυττάρων με φυσιολογικά μονοπύρηννα μυελικά κύτταρα ελέγξαμε εν μέρει την ικανότητα του αιμοποιητικού μικροπεριβάλλοντος των ασθενών με NI-CINA να επάγει την μυελοποίηση. Βρήκαμε ότι τα στρωματικά κύτταρα από ασθενείς με NI-CINA απέτυχαν να επάγουν τη δημιουργία CFU-GM αποικιών, *in vitro*, σε σχέση με τα στρωματικά κύτταρα των φυσιολογικών μαρτύρων. Το εύρημα αυτό δείχνει ότι δείχνει ότι τα στρωματικά κύτταρα από ασθενείς με NI-CINA, πιθανόν να εκφράζουν ή να απελευθερώνουν μειωμένες ποσότητες αιμοποιητικών αυξητικών παραγόντων ή αυξημένες ποσότητες αναστολέων της μυελοποίησης. Προηγούμενες μελέτες στο δικό μας εργαστήριο (126) αλλά και σε άλλα (125) έχουν δείξει ότι τα υπερκείμενα από βραχείες καλλιέργειες μονοκυττάρων από μυελό ή περιφερικό αίμα, ασθενών με NI-CINA, είχαν ελαττωμένη ικανότητα να επάγουν σχηματισμό CFU-GM αποικιών σε άγαρ.

Η ρύθμιση της αιμοποίησης από στρωματικά κύτταρα του μυελού, γίνεται κυρίως με παραγωγή κυτταροκινών με επαγωγική ή ανασταλτική δράση που παρουσιάζονται στα stem cells είτε στην επιφάνεια των στρωματικών κυττάρων ή

σε διαλυτή μορφή (127-130) . Πρόσφατα οι Kogho και συνεργάτες (131) υποστήριξαν την ύπαρξη μειωμένης παραγωγής G-CSF, σε mRNA επίπεδο, από στρωματικά κύτταρα του μυελού, σε έναν περιορισμένο αριθμό ασθενών με CINA, ενώ οι Morikawa και συνεργάτες (132) ανέφεραν τη μειωμένη παραγωγή του G-CSF σε μεταμεταγραφικό επίπεδο σε έναν ασθενή με CINA. Στην δική μας μελέτη προσδιορίστηκαν οι συγκεντρώσεις κυτταροκινών σε υπερκείμενα μακρόχρονων μυελικών καλλιεργείων (LTBMCs), και βρέθηκε ότι τα στρωματικά κύτταρα των ασθενών μας παράγααν επαρκείς συγκεντρώσεις G-CSF. Μάλιστα, περισσότεροι από το 1/4 των ασθενών παράγααν G-CSF σε συγκέντρωση μεγαλύτερη από την πιο μεγάλη τιμή που μετρήθηκε στους φυσιολογικούς μάρτυρες. Ανιχνεύσιμες ποσότητες GM-CSF βρέθηκαν στα υπερκείμενα του 35% των ασθενών και του 19% των φυσιολογικών μαρτύρων. Η IL-3 δεν ανιχνεύτηκε στα υπερκείμενα ούτε των ασθενών ούτε των φυσιολογικών μαρτύρων. Η IL-3 είναι μια κυτταροκίνη που επάγει τον πολλαπλασιασμό των αρχέγονων αλλά και των δεσμευμένων για τη μυελική σειρά stem cells (120). Και άλλες μελέτες απέτυχαν να ανιχνεύσουν την κυτταροκίνη σε υπερκείμενα LTBMCs καλλιεργείων με την τεχνική της ELISA, πιθανόν επειδή βρίσκεται σε πολύ μικρές ποσότητες ή είναι δεσμευμένη στην επιφάνεια των στρωματικών κυττάρων ή σε συστατικά της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας (121). Τέλος η IL-6 βρέθηκε σημαντικά αυξημένη στα υπερκείμενα των LTBMCs των ασθενών σε σχέση με τα αντίστοιχα των φυσιολογικών ατόμων. Περίπου μάλιστα οι μισοί από τους ασθενείς είχαν IL-6 στα υπερκείμενα σε ποσότητα μεγαλύτερη από την πιο υψηλή τιμή που βρέθηκε στους φυσιολογικούς μάρτυρες. Η IL-6 είναι μια κυτταροκίνη με πλειοτροπική δράση, εμπλέκεται δε στον πολ/σμό των αρχέγονων προγονικών κυττάρων αλλά επίσης και στην

διαφοροποίηση των δεσμευμένων μυελικών κυττάρων (133, 134). Παράγεται από τους ινοβλάστες (135, 136) και η βασική της έκκριση μπορεί να αυξηθεί σημαντικά σε συνθήκες φλεγμονής (136).

Ο TGF- β 1 είναι ένας γνωστός αναστολέας της μυελοποίησης και γενικότερα της αιμοποίησης. Η κατασταλτική του δράση στο επίπεδο των δεσμευμένων για την μυελική σειρά προγονικών κυττάρων οφείλεται κατά κύριο λόγο στην καταστολή των υποδοχέων για τον GM-CSF, για τον G-CSF για την IL-3 και για την IL-1 (137-139). Στους ασθενείς μας οι συγκεντρώσεις του TGF- β 1 στα υπερκείμενα ήταν σημαντικά αυξημένες. Περίπου το 82% των ασθενών είχαν υψηλότερες τιμές της κυτταροκίνης από την μεγαλύτερη των φυσιολογικών μαρτύρων. Οι τιμές του TGF- β 1 συσχετιζόταν αρνητικά με την συχνότητα των CD34⁺/CD33⁺ κυττάρων του μυελού καθώς και με τον αριθμό των κυκλοφορούντων ουδετερόφιλων, ενισχύοντας έτσι την άποψη ότι η κυτταροκίνη αυτή εμπλέκεται ενεργά στην παθογένεια της ουδετεροπενίας στους ασθενείς μας. Ο MIP-1 α , ένας άλλος αναστολέας της μυελοποίησης, δεν ανιχνεύτηκε στα υπερκείμενα των LTBMK καλλιιεργειών, στους ασθενείς με NI-CINA, αλλά ούτε στους φυσιολογικούς μάρτυρες.

Με βάση όλα τα δεδομένα της μελέτης μας υποστηρίζουμε ότι τα στρωματικά κύτταρα από ασθενείς με NI-CINA είναι πιθανόν ενεργοποιημένα και παράγουν αυξημένες ποσότητες IL-6, TGF- β 1, G-CSF και πιθανόν GM-CSF. Από την άλλη, τα αυξημένα επίπεδα της IL-1 β και του TNF- α που βρέθηκαν στον ορό, στην παρούσα μελέτη, όπως και οι αυξημένες συγκεντρώσεις άλλων φλεγμονωδών μορίων όπως είναι η IL-8 και το RANTES που έχουν βρεθεί σε προηγούμενες μελέτες (140, 141), ενισχύουν την άποψη της ύπαρξης μιας υποκείμενης ήπιας

χρόνιας φλεγμονώδους διεργασίας. Είναι λοιπόν πιθανό ότι ο μικρός αριθμός των δεσμευμένων για την μυελική σειρά προγονικών κυττάρων στον μυελό των ασθενών μας, πιθανόν να σχετίζεται με την ανασταλτική δράση του TGF-β1 ο οποίος παράγεται τοπικά, από στρωματικά κύτταρα που έχουν ενεργοποιηθεί από την IL-1β. Η IL-1β είναι ένας από τους βασικούς επαγωγείς της παραγωγής της IL-6 (137) και του TGF-β1 (138, 139) από στρωματικά κύτταρα του μυελού. Οι ισχυρές συσχετίσεις που βρέθηκαν μεταξύ των ποσοτήτων του TGF-β1 στα υπερκείμενα και της συχνότητας των CD34⁺/CD33⁺ κυττάρων του μυελού καθώς και με τον αριθμό των κυκλοφορούντων ουδετερόφιλων, ενισχύουν αυτή την υπόθεση.

Συμπερασματικά τα δεσμευμένα για την μυελική σειρά προγονικά κύτταρα είναι μειωμένα στους ασθενείς με NI-CINA. Τα στρωματικά κύτταρα των ασθενών παράγουν ίδιες ή αυξημένες ποσότητες αιμοποιητικών αυξητικών παραγόντων αλλά έχουν μειωμένη ικανότητα επαγωγής της μυελοποίησης πιθανότατα λόγω αυξημένης παραγωγής του TGF-β1, και πιθανόν άλλων αναστολέων της μυελοποίησης. Προτείνουμε ότι η αυξημένη παραγωγή της IL-1β από μια ήπια χρόνια φλεγμονώδη διεργασία στους ασθενείς με NI-CINA (140-142), επάγει τα στρωματικά κύτταρα να εκκρίνουν επαγωγείς και αναστολείς της μυελοποίησης. Δεδομένου ότι η μυελοποίηση προκύπτει σαν αποτέλεσμα από την ισορροπία μεταξύ κυτταροκινών με θετική και αρνητική δράση, φαίνεται λογικό να δεχθούμε ότι μια αυξημένη παραγωγή του TGF-β1 από το μυελικό μικροπεριβάλλον, πιθανόν να καταστέλλει την μυελοποίηση και εν μέρει τουλάχιστον να συμβάλλει στην παθογένεια της ουδετεροπενίας στους ασθενείς με NI-CINA. Μελέτες για τον ρόλο του TGF-β1 στην μυελική καταστολή με χρήση εξουδετερωτικών

αντισωμάτων, καθώς και για την παραγωγή άλλων ανασταλτικών μορίων από τα στρωματικά κύτταρα των ασθενών, είναι ήδη σε εξέλιξη, στο εργαστήριο μας προκειμένου να εμβαθύνουμε ακόμη περισσότερο στην αιτιολογία και την παθογένεια της ουδετεροπενίας στα άτομα που πάσχουν από NI-CINA.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Marshall CJ, Kinnon C., Thrasher A.J., Polarized expression of bone morphogenetic protein – 4 in the human aorta – gonad – mesonephros region. *Blood* 2000 ; 96 (4): 1591-3.
2. Metcalf D. *The Colony Stimulating Factors*. Amsterdam : Elsevier, 1984.
3. Hogge DE, Sutherland HJ, Cashman JD, Lansdorp PM, Humphries RK, Eaves CJ. Cytokines acting early in human haematopoiesis. In: Brenner MK, ed. *Cytokines and Growth Factors*. London : Bailliere Tindall, 1994: 49-63.
4. Mazur EM, Cohen JL, Wong GG, Clark SC. Modest stimulatory effect of recombinant human GM-CSF on colony growth from peripheral blood human megakaryocyte progenitor cells. *Exp Hematol* 1987;15:1128-1133.
5. McNiece IK, Steward FM, Deacon DM, Quesenberry PJ. Synergistic interactions between hematopoietic growth factors as detected by in vitro mouse bone marrow colony formation. *Exp. Hematol* 1988; 16:383-388.
6. Metcalf D, Nicola NA, Gough NM, Elliott M, McArthur G, Li M. Synergistic suppression: Anomalous inhibition of factor –dependent hemopoietic cell proliferation by combination of two colony stimulating factors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89:2819 – 2823.
7. Bot FJ, van Eijk L, Schipper P, Backx B., Lowenberg B. Synergistic effects between GM-CSF and G-CSF or M-CSF on highly enriched human marrow progenitor cells. *Leukemia* 1990; 4:325-328.
8. McNiece IK, Langley KE, Zsebo KM. Recombinant human stem cell factor synergises with GM-CSF, G-CSF, IL-3 and EPO to stimulate human

progenitor cells of the myeloid and erythroid lineages. *Exp Hematol* 1991; 19:226-231.

9. Messner HA, Yamasaki K., Jamal N, Minden MM, Yang YC, Wong GG, Clark SC, Growth of human hemopoietic colonies in response to recombinant gibbon interleukin 3: comparison with human recombinant granulocyte and granulocyte – macrophage colony – stimulating factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; 84:6765-6769.

10. Sieff CA, Niemeyer CM, Nathan DG, Ekern SC, Bieber FR, Yang YC, Wong G, Clark SC. Stimulation of human hematopoietic colony formation by recombinant gibbon multi – colony- stimulating factor or interleukin 3. *J. Clin Invest* 1987; 80:818-823.

11. Lopez AF, To LB, Yang YC, Gamble JR, Shannon MF, Burns GF, Dyson PG, Juttner CA, Clark S., and Vadas MA. Stimulation of proliferation, differentiation, and function of human cells by primate interleukin 3. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; 84:2761-2765.

12. Lopez AF, Dyson PG, To LB, Elliott MJ, Milton SE, Russell JA, Juttner CA, Yang YC, Clark SC, Vadas MA. Recombinant human interleukin –3 stimulation of hematopoiesis in humans: loss of responsiveness with differentiation in the neutrophilic myeloid series. *Blood* 1988; 72:1979 – 1804.

13. Emerson SG, Yang YC, Clark SC, Long MW. Human recombinant granulocyte – macrophage colony stimulating factor and interleukin 3 have overlapping but distinct hematopoietic activities. *J. Clin Invest* 1988; 82:1282-1287.

14. Sonoda Y, Yang YC, Wong GG, Clark SC, Ogawa M. Erythroid burst –

promoting activity of purified recombinant human GM-CSF and interleukin -3: studies with anti-GM-CSF and anti-IL-3 sera and studies in serum – free cultures. Blood 1988; 72: 1381-1386.

15. Nicola NA, Metcalf D, Johnson GR, Burgess AW. Separation of functionally distinct human granulocyte – macrophage colony – stimulating factors. Blood 1979; 54: 614 – 627.

16. Burgess AW, Metcalf D. Characterization of a serum factor stimulating the differentiation of myelomonocytic leukemic cells. Int J Cancer 1980; 39: 647-654.

17. Nicola NA, Metcalf D, Matsumoto M, Johnson GR. Purification of a factor inducing differentiation in murine myelomonocytic leukemia cells: identification as granulocyte colony – stimulating factor (G-CSF): J Biol Chem 1983; 258: 9017-9023.

18. Metcalf D, Nicola NA. Proliferative effects of purified granulocyte colony – stimulating factor (G-CSF) on normal mouse hemopoietic cells. J Cell Physiol 1983 ; 116: 198-206.

19. Strife NA, Lambek C, Wisniewski D, Gulati S, Gasson JC, Golde DW, Welte K, Gabilove JL, Clarkson B. Activities of four purified growth factors on highly enriched human hematopoietic progenitor cells. Blood 1987; 1508 – 1523.

20. Aggarwal B, Gutterman J. Human Cytokines. Blackwell Scientific Publications, London, 1992.

21. Kishimoto T. Interleukins. Karger, Basel, 1992.

22. Symann M, Quesenberry PJ, Morstyn G. Haemopoietic Growth Factors.

23. Graham GJ, Wright EG, Hewich R, Wolpe SD, Wilkie NM, Donaldson D, Lorimore S, Pragnell IB. Identification and characterisation of an inhibitor of

haemopoietic stem cell proliferation. *Nature* 1990 ; 344:442-444.

24. Quesniaux VFJ, Graham GJ, Pragnell I, Donaldson D, Wolpe SD, Iscove NN, Fagg B. Use of 5-fluoruracil to analyse the effects of macrophage inflammatory protein 1a on long term reconstituting stem, cells in vivo. *Blood* 1993; 81: 1497-1504.

25. Dunlop DJ, Wright EG, Lorimore S, Graham GJ, Holyoake T, Kerr DJ, Wolpe SD, Pragnell IB. Demonstration of stem cell inhibition and myeloprotective effects of SCI/rhMIP1a in vivo. *Blood* 1993; 79:2221-2225.

26. Lord BI, Dexter TM, Clements JM, Hunter MA, Gearing AJH. Macrophage inflammatory protein protects multipotent hematopoietic cells from the cytotoxic effects of hydroxyurea in vivo. *Blood* 1992; 79:2605-2609.

27. Broxmeyer HE, Sherry B, Lu L, Cooper S, Oh K-O, Tekamp – Olson P, Kwon BS, Cerami A. Enhancing and suppressing effects of recombinant murine macrophage inflammatory proteins on colony formation in vitro by bone marrow myeloid progenitor cells. *Blood* 1990; 76: 1110-1116.

28. Broxmeyer HE, Sherry B, Lu L, Cooper S, Carow C, Wolpe SD, Cerami A. Myelopoietic enhancing effects of murine macrophage inflammatory proteins 1 and 2 on colony formation in vitro by murine and human bone marrow granulocyte/macrophage progenitor cells. *J. Exp Med* 1989; 170: 1583-1594.

29. Massague, L. The transforming growth factors. *Trends Biochem. Sci.*1985a; 10: 237-240.

30. Sporn M. B., Roberts A.B., Wakenfield L. M., and Assoian, R.K. Transforming growth factor- β : biological function and chemical structure. *Science* 1986; 233: 532-534.

31. Holley R. W., Bohlen P., Fava R., Baldwin J. H., Kleeman G., and Armour R. Purification of kidney epithelial cell growth inhibitors. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1980; 77: 5989-5992.

32. Tucker R. F., Shipley G. D., Moses H. L., and Holley R. W. Growth inhibitor from BSC-1 cells closely related to type β transforming growth factor. Science 1984a; 226:705 – 707.

33. Shipley G. D., Tucker R. F., and Moses H. L. Type β transforming growth factor / growth inhibitor stimulates entry of monolayer cultures of AKR-2B cells into S phase after a prolonged prereplicative interval. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1985; 82:4147-4151.

34. Roberts A. B., Anzano M. A., Wakefield L. M., Roche N. S., Stern D. F., and Sporn M. B. Type B transforming growth factor : a bifunctional regulator of cell growth. Proc Natl Acad Sci USA 1985; 82:119-123.

35. Massague J. Type β transforming growth factor from feline sarcoma virus – transformed rat cells. Isolation and biological properties. J. Biol. Chem. 1984; 259:9756-9761.

36. Leof E. B., Proper J. A., Goustin A.S., Shipley G.D., DiCorleto P.E. and Moses H.L. Induction of c-sis mRNA and activity similar to platelet – derived growth factor by transofming growth factor β : a proposed model for indirect mitogenesis involving autocrine activity. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1986; 83: 2453-2457.

37. Rik Derynck, Julie A. Jarrett, Ellson Y. Chen, Dennis H. Eaton, John R. Bell, Richard K. Assoian, Anita B. Roberts, Michael B. Sporn & David V. Goeddel. Human transofming growth factor $-\beta$ complementary DNA sequence and

expression in normal and transformed cells. *Nature* 1985; 316:701

38. Hodgson GS, Bradley TR. Properties of haematopoietic stem cells surviving 5 – fluorouracil treatment. Evidence for a pre – CFU – S cell? *Nature* 1979; 281:381.

39. Hestdal K, Jacobsen SE, Ruscetti F, Longo DL, Oppenheim J, Keller J. Increased granulopoiesis after sequential administration of transforming growth factor β 1 and granulocyte – macrophage CSF. *Exp Hematol* 1993; 21:799-805.

40. Bursucker I, Neddermann KM, Petty BA, Schacter B, Spitalny GL, Tepper MA, Pasternak RD. In vivo regulation of hemopoiesis by transforming growth factor beta 1: stimulations of GM-CSF and M-CSF-dependent murine bone marrow precursors. *Exp Hematol* 1992; 20:431-435.

41. Goey H, Keller J, Back T. Inhibition of early murine hematopoietic progenitor cell proliferation after in vivo locoregional administration of transforming growth factor $-\beta$ 1. *J Immunol* 1989; 143: 877-883.

42. Migdalska A, Molineux G, Demuyneck H, Evans GS, Ruscetti F, Dexter TM. Growth inhibitory effects of transforming growth factor $-\beta$ 1 in vivo. *Growth Factors* 1991; 4:239-245.

43. Carlino JA, Higley HR, Creson JR, Avis PD, Ogawa Y, Ellingsworth LR. Transforming growth factor β 1 systemically modulates granuloid, erythroid, lymphoid, and thrombocytic cells in mice. *Exp Hematol* 1992; 20:943.

44. Miller KM, Carlino JA, Ogawa Y, Avis PD, Carroll KG. Alterations in erythropoiesis in TGF- β 1-treated mice. *Exp Hematol* 1992; 20:951-956.

45. Keller JR, Jacobsen SEW, Sill KT, Ellingsworth LR, Ruscetti FW. Stimulation of granulopoiesis by transforming growth factor β : synergy with

granulocyte/macrophage – colony – stimulating factor. Proc Natl Acad Sci USA 1991; 88:7190.

46. Hoffbrand AV & Pettit JE, Essential Haematology. Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1993.

47. Papadaki HA, Eliopoulos GD. Selective loss of peripheral blood CD45RO+ T-lymphocytes correlates with increased levels of serum cytokines and endothelial cell – derived cell adhesion molecules in patients with chronic idiopathic neutropenia of adults. Ann Hematol 1998; 77:153-159.

48. Schultz W. Uber eigenartige Halserknankungen. Dtsch Med Wochenschr 1922; 48: 1495.

49. Kostmann R. Infantile Genetic Agranulocytosis : A review with presentation of ten new cases. Acta Paediatr Scand 1975; 64:362-368.

50. Hestdal K, Welte K, Lie SO, et al. Severe congenital neutropenia: Abnormal growth and differentiation of myeloid progenitors to granulocyte stimulating factor(G-CSF) but normal responses to G-CSF plus stem cell factor. Blood 1993; 82:2991-2997.

51. Parmley RT, Ogawa M, Darby CP Jr, Spicer SS. Congenital neutropenia : Neutrophil proliferation with abnormal maturation. Blood 1975; 56: 723-734.

52. Welte K, Zeidler C, Reiter A, et al. Differential effects of GM-CSF and G-CSF in children with congenital neutropenia. Blood 1990; 75:1056-1063.

53. Dong F, Brynes RK, Tidow N, et al. Mutations in the gene for the granulocyte colony stimulating factor receptor in patients with acute myeloid leukemia preceded by severe congenital neutropenia. N Engl J Med 1995; 333: 487-493.

54. Cutting HO, Lang JE. Familial benign chronic neutropenia. *Ann Intern Med* 1964; 61:876-887.
55. Shoenfeld Y, Alkan ML, Asaly A, et al. Benign familial leukopenia and neutropenia in different ethnic groups. *Eur J Haematol* 1988; 41:273-277.
56. Dale DC, Hammond WP. Cyclic neutropenia: A clinical review. *Blood Rev* 1988; 2: 178-185.
57. Wright DG, Fauci AS, Dale DC, Wolff SM. Correction of human cyclic neutropenia with prednisolone. *N Engl J Med* 1978; 298:295-300.
58. Dale DC, Bonilla MD, Davis MD, et al. A randomised controlled phase III trial of recombinant human granulocyte colony stimulating factor (Filgrastim) for treatment of severe chronic neutropenia. *Blood* 1993; 81: 2496-2502.
59. Lange RD. Cyclic hematopoiesis: human cyclic neutropenia. *Exp Hematol* 1983; 11: 435-451.
60. Putterman C, Safadi R, Zlotogora J, et al. Treatment of the hematological manifestations of dyskeratosis congenita. *Ann Hematol* 1993; 66:209-212.
61. Ventura A, Dragovich D, Luxardo P, Zanazzo G. Human granulocyte colony stimulating dactor (r Hu G-CSf) for treatment of neutropenia in Shwachman syndrome. *Haematologica* 1995; 80: 227-229.
62. Woods WG, Roloff JS, Lukens JN, Krivit W. The occurrence of leukemia in patients with the Shwachman syndrome. *J Pediatr* 1981 ; 99: 425-428.
63. Lux SE, Johnston RB Jr, August CS, et al. Chronic neutropenia and abnormal cellular immunity in cartilage – hair hypoplasia. *N Engl J Med* 1970; 282:231-236.
64. Kozlowski C, Evans DI. Neutropenia associated with X-linked

agammaglobulinemia. *J Pathol* 1991; 44:388-390.

65. Levinsky RJ, Tidedman K. Successful bone marrow transplantation for reticular dysgenesis. *Lancet* 1983; 1: 671-672.

66. Norio R, Raitta C, Lindahl E. Further delineation of the Cohen syndrome. *Clin Genet* 1984; 25:1.

67. Bassan R, Viero P, Minetti B, et al. Myelokathexis : a rare form of chronic benign granulocytopenia. *Br J Hematol* 1984; 58:115-117.

68. Pinkerton PH, Robinson JB, Senn JS. Lazy leukocyte syndrome – disorder of the granulocyte membrane? *J. Clin Pathol* 1978; 31:300-308.

69. Blume RS, Wolff SM. The Chediak – Higashi Syndrome: Studies in four patients and review of the literature. *Medicine* 1972; 51:247-280.

70. Parmley RT, Crist WM, Ragab AH, et al. Congenital dysgranulopoietic neutropenia: Clinical, serologic, ultrastructural and in vitro proliferative characteristics. *Blood* 1980; 56:465.

71. Rosen FS, Cooper MD, Wedgwood RJP. Medical progress. The primary immunodeficiencies. *N. Engl J Med* 1984; 235:300.

72. Vincent PC. Drug – induced aplastic anaemia and agranulocytosis. Incidence and mechanisms. *Drugs* 1986; 31: 52-63.

73. Julia A, Olona M, Bueno J, et al. Drug – induced agranulocytosis: Prognostic factors in a series of 168 episodes. *Br J Haematol* 1991; 79:336-371.

74. Murdoch JM, Smith CC. Hematological aspects of systemic disease: Infection. *Clin Haematol* 1972; 1:619-644.

75. Hammond WP, Price TH, Souza LM, Dale DC. Treatment of cyclic neutropenia with granulocyte colony – stimulating factor. *N Engl J Med* 1989;

320:1306.

76. Lynch RE, et al. The prognosis in aplastic anemia. *Blood* 1975; 45:517.

77. Marsh JC, Socie G, Schrezenmeier H, et al. Haematopoietic growth factors in aplastic anemia. *Blood* 1975; 45:517.

78. Finch SC. Granulocytopenia. In *Williams Hematology*, New York, 1972, McGraw-Hill Inc.

79. Dunlap WM, James GW, Hume DM. Anemia and neutropenia caused by copper deficiency. *Ann Intern Med* 1974; 80: 470-476.

80. Percival SS. Neutropenia caused by copper deficiency: Possible mechanisms of action. *Nutr Rev* 1995; 53:59-66.

81. Voight D, et al. Uber die Blutkonzentrationen der Leukozyten und Trombocyten bei Eisenmangel. *Blut* 1967; 14:267.

82. Groupe Francais de morphologie Hematologique: French registry of acute leukemia and myelodysplastic syndromes. Age distribution and hemogram analysis of the 449 cases recorded during 1982 – 1983 and classified according to FAB criteria. *Cancer* 1987; 60:1385-1394.

83. Amorosi EL. Hypersplenism. *Semin Hematol* 1965; 2: 249-285.

84. Wiseman BK, Doan CA. A newly recognised granulopenic syndrome caused by excessive splenic leukotysis and successfully treated by splenectomy. *Ann Intern Med* 1942; 16:1097.

85. Chapman AZ, Reeder PS, Baker LA. Neutropenia secondary to tuberculous splenomegaly: Report of a case. *Ann Intern Med* 1954; 41:1225.

86. Minchinton RM, Waters AH. The occurrence and significance of neutrophil antibodies. *Br J Haematol* 1984; 56:521-528.

87. Harmon DC, Weitzman SA, Strossel TP. The severity of immune neutropenia correlates with the maturational specificity of antineutrophil antibodies. *Br J Haematol* 1984; 58:209-215.

88. Lalezari P, Nussbaum M, Gelman S, Spaet T. Neonatal neutropenia due to maternal isoimmunization. *Blood* 1960; 15:236-243.

89. Carton J, Tchernia G, Celton JL, et al. Alloimmune Neonatal neutropenia. *Am J Pediatr Hematol Oncol* 1991; 13:21-25.

90. Minchinton RM, Mc Grath KM. Alloimmune neonatal neutropenia – a neglected diagnosis? *Med J Aust* 1987; 3:139.

91. Boxer LA, Yokoyama M, Wiebe RA. Autoimmune neutropenia associated with chronic active hepatitis. *Am J Med* 1972; 52: 279-282.

92. Dale D, Guerry D, Wewerka J, Bull J, Chusid M. Chronic neutropenia. *Medicine (Baltimore)* 1979; 58: 128-144.

93. Buy J, Kissel K, Nowak K, et al. Autoimmune neutropenia: Clinical and laboratory studies in 143 patients. *Ann Hematol* 1991; 63:249.

94. Starkebaum G, Price TH, Lee My, Arend WP. Autoimmune neutropenia in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1978; 21:504.

95. Vincent PC, Levi JA, Mac Queen A. The mechanism of neutropenia in Felty's syndrome. *Br J Haematol* 1974; 27:463-475.

96. Choi MFV, Munt MJ, Turner AR, et al. Successful reversal of neutropenia in Felty's syndrome with recombinant granulocyte colony stimulating factor. *Br J Haematol* 1994; 86: 663-664.

97. Starkebaum G, Singer JW, Arend WP. Humoral and cellular immune mechanisms of neutropenia in patients with Felty's syndrome. *Clin Exp Immunol*

1980; 39:307.

98. Bloch KJ, Buchanan WW, Wohl MJ, Bunim JJ. Sjogren's Syndrome. *Medicine* 1965; 44:187.

99. Rustagi P, et al. Antigranulocyte antibodies in CLL and other chronic lymphoproliferative disorders. *Blood* 1983; 62 (suppl 1): 106.

100. Heyman MR, Walsh TJ. Autoimmune neutropenia in Hodgkin's disease. *Cancer* 1987; 59: 1903.

101. Gordon BG, Kiwanuka J, Kadushin J. Autoimmune neutropenia and Hodgkin's disease: Successful treatment with intravenous gammaglobulin. *Am J Pediatr Hematol Oncol* 1991; 13:164.

102. Salarma A, Schutz B, Kiefel V, et al. Immune mediated agranulocytosis related to drugs and their metabolites: mode of sensitization and heterogeneity of antibodies. *Br J Haematol* 1989; 72:127-132.

103. Murphy MF, Chapman JF, Metcalf P, Water AH. Antibiotic induced neutropenia (letter). *Lancet* 1985; 2:1306-1307.

104. Eisner EV, Carr RM, Mackinney AA. Quinidine – induced agranulocytosis. *JAMA* 1977; 238: 884-886.

105. Joyce RA, Boggs DR, Hasiba U, Srodes CH. Marginal neutrophil pool size in normal subjects and neutropenic patients as measured by epinephrine infusion. *J Lab Clin Med* 1976; 88:614-620.

106. Barbui T, Bassan R, Viero P, et al. Pure white cell aplasia treated by high dose intravenous immunoglobulin. *Br. J Haematol* 1984; 58:554.

107. Levitt LJ, Ries CA, Greenberg RL. Pure white cell aplasia. Antibody-mediated autoimmune inhibition of granulopoiesis. *N Engl J Med* 1983; 308:1141.

- 108.Ivarsson SA, Ljung R. Neutropenia and congenital cytomegalovirus infection (letter). *Pediatr Infect Dis J* 1988; 7:436-437.
- 109.Dale DC, Wolff SM. Studies of the neutropenia of acute malaria. *Blood* 1973; 41:197-206.
- 110.Rose HM. The clinical manifestations and laboratory diagnosis of rickettsialpox. *Ann Intern Med* 1949; 31: 871-883.
- 111.Arneborn P, Palmblad J. Drug induced neutropenia in the Stockholm region 1973-75: Frequency and causes. *Acta Med Scand* 1978; 204:283-286.
- 112.Kyle RA, Linman JW. Chronic idiopathic neutropenia: a newly recognised syndrome? *N Engl J Med* 1968; 279:1015-1019.
- 113.Papadaki HA, Eliopoulos GD. Enhanced neutrophil extravasation may be a contributing factor in the determination of neutropenia in patients with chronic idiopathic neutropenia of adults. *Eur J Haematol* 1998b; 61:272-277.
- 114.Bishop CR, Rothstein G, Ashenbrucher HE, Athens JW. Leukokinetic studies. XIV Blood neutrophil Kinetics in chronic steady – state neutropenia. *J. Clin Invest* 1971; 50: 1678-1689.
- 115.Lightsey AL, Chapman RM, Mc Millan R, Mushonic J, Yelenosky R, Longmire RL. Immune Neutropenia. *Ann Inter Med* 1977; 86:60-62.
- 116.Biasi D, Bambara L-M, Carletto A, Caramashi P, Ortolani R, Perona G, Bellavite P. Increased in vitro neutrophil adherence in a case of chronic idiopathic neutropenia. *Br J Haematol* 1994; 86: 421-424.
- 117.Hartman KR, LaRussa VF, Roghell SW, Atolagbe TO, Ward FT, Klipple G. Antibodies to myeloid precursor cells in autoimmune neutropenia. *Blood* 1994; 84: 625-631.

- 118.Kohgo Y, Hirayama Y, Matsunaga T, Kato J, Sakamaki S, Niitsu Y. Chronic idiopathic neutropenia associated with abnormal expression of granulocyte colony – stimulating factor mRNA of bone marrow stroma cells. *Int J Hematol* 1994; 59:177-180.
- 119.Dexter TM, Allen TD, Lajtha LG. Conditions controlling the proliferation of hemopoietic stem cells in vitro. *J Cell Physiol* 1977; 91:335-344.
- 120.Gartner S, Kaplan HS. Long term culture of human bone marrow cells. *Proc Natl Acad Sci (USA)* 1980; 77: 4756-4759.
- 121.Gibson FM, Scopes J, Daly S, Ball S. Gordon – Smith EC. Haemopoietic growth factor production by normal and aplastic anaemia stroma in long – term bone marrow culture. *Br J Haematol* 1995; 91: 551-561.
- 122.Dancey JT, Brubaker LH. Neutrophil marrow in chronic benign idiopathic neutropenia. *Am J Med* 1980; 68:251-254.
- 123.Morikawa K, Oiwa K, Oseko F, Kubota T, Morikawa S, Nakamura T. Distinct effect of G-CSF on the growth and differentiation of myeloid progenitor cells from, chronic idiopathic neutropenia. *Intern Med* 1995; 34: 384-387.
- 124.Rickard KA, Brown RD, Yuen E, Kronenberg H. Chronic idiopathic neutropenia. Granulopoietic assessment by bone marrow culture and granulocyte kinetics. *Am J Hematol* 1980; 9: 193-198.
- 125.Maciejewski JP, Anderson S, Katevas P, Young NS. Phenotypic and functional analysis of bone marrow progenitor cell compartment in bone marrow failure. *Br J Haematol* 1994; 87: 227-234.
- 126.Greenberg PL, Mara B, Steed S, Boxer L. The chronic idiopathic neutropenia syndrome: Correlation of clinical features with in vitro parameters of

granulocytopoiesis. *Blood* 1980; 915-921.

127. Eliopoulos GD, Meletis J, Fessas P, Anagnou NP. Defective CSA-dependent granulopoiesis in patients with chronic drug – induced neutropenia. *Haematologia* 1990; 23: 101-109.

128. Marsh JCW, Chang J, Testa NG, Hows JM, Dexter TM. The hematopoietic defect in aplastic anemia assessed by long – term marrow culture. *Blood* 1990; 76: 1748-1757.

129. Gordon MY. Physiology and function of the haemopoietic microenvironment. *Br J Haematol* 1994; 86: 241-243.

130. Toksoz D, Szebo KM, Smith KA et al. Support of human hematopoiesis in long – term bone marrow cultures by murine stromal cells selectively expressing the membrane – bound and secreted forms of the human homolog of the Steel gene product, stem cell factor. *Proc Natl Acad Sci (USA)* 1992; 89: 7350-7354.

131. Javad Amman M, Keller U, Derigs G, Mohamadzadeh M, Huber C, Peschel C. Regulation of cytokine expression by interferon- α in human bone marrow stromal cells: inhibition of hematopoietic growth factors and induction of interleukin –1 receptor antagonist. *Blood* 1994; 84: 4142-4150.

132. Gibson FM, Scopes J, Daly S, Rizzo S, Ball SE, Gordon – Smith EC. IL-3 is produced by normal stroma in long-term bone marrow cultures. *Br J Haematol* 1995; 90: 518-525.

133. Kogho Y, Hirayama Y, Matsunaga T, Kato J, Sakamaki S, Niitsu Y. Chronic idiopathic neutropenia associated with abnormal expression of granulocyte colony – stimulating factor mRNA of bone marrow stromal cells. *Int J Hamatol* 1994; 59: 177-180.

134.Morikawa K, Yamamori S, Oiwa K, et al. Impaired G-CSF production at post – transcriptional level in a patient with chronic idiopathic neutropenia. *Br J. Haematol* 1993; 85: 200-202.

135.Eaves CJ, Cashman JD, Kay RJ, et al. Mechanisms that regulate the cell cycle status of very primitive hematopoietic cells in long-term human marrow cultures II. analysis of positive and negative regulators produced by stromal cells within the adherent layer. *Blood* 1991; 78:110-117.

136.Caracciolo D, Clarc SC, Rovera G. Human interleukin-6 supports granulocytic differentiation of hematopoietic progenitor cells and acts synergistically with GM-CSF. *Blood* 1989; 73: 666-670.

137.Hirano T. The biology of Interleukin-6. In, Kishimoto T (ed), *Interleukins: Molecular Biology and Immunology*. Basel: Karger, 1992. pp 153-180.

138.Guba SC, Sartor CI, Gottschalk LR, YE-Hu J, Mullingan T, Emerson SG. Bone marrow stromal fibroblast secrete Interleukin –6 and Granulocyte – Macrophage Colony stimulating factor in the absence of inflammatory stimulation: Demonstration by serum – free bioassay, enzyme – linked immunosorbent assay, and reverse transcriptase polymerase chain reaction. *Blood* 1992; 80: 1190-1198.

139.Keller JR, Jacobsen SEW, Dubois CM, Hestdal K, Ruscetti FW. Transforming growth factor – β : a bidirectional regulator of haematopoietic cell growth. *Int J Cell Cloning* 1992; 10: 2-11.

140.Cashman JD, Eaves AC, Raines EW, Ross R, Eaves CJ. Mechanisms that regulate the cell cycle status of very primitive hematopoietic cells in long-term human marrow cultures. I. Stimulatory role of a variety of mesenchymal cell activators and inhibitory role of TGF β . *Blood* 1990; 75:96-101.

141. Wright EG, Pragnell IB, Stem cell proliferation inhibitors. *Baillieres Clin Haematol* 1992; 5: 723-739.

142. Papadaki HA, Eliopoulos GD. Enhanced neutrophil extravasation may be a contributing factor in the determination of neutropenia in patients with chronic idiopathic neutropenia of adults. *Eur J Haematol* 1998; 61: 272-277.

143. Papadaki HA, Eliopoulos GD. Selective loss of peripheral blood CD45RO+ T-lymphocytes correlates with increased levels of serum cytokines and endothelial cell-derived cell adhesion molecules in patients with chronic idiopathic neutropenia of adults. *Ann Hematol* 1998; 77: 153-159.

144. Ogawa M. Differentiation and proliferation of hematopoietic stem cells. *Blood* 1993; 81:2844-2853.

ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ

1. **BFU-E** = Burst Forming Unit – Erythroid. Πρώιμο προγονικό κύτταρο της ερυθράς σειράς που σχηματίζει ερυθροπορτοκαλόχρες αποικίες χαρακτηριστικής μορφής (αποτελούνται από μικρές συναθροίσεις ερυθροβλαστών που θυμίζουν δευτερογενείς εκρήξεις πυροτεχνήματος). Είναι κύτταρο πιο άωρο του CFU-E προγονικού κυττάρου.
2. **BSA** = Bovine Serum Albumin.
3. **CD34** = Αντιγονική μεμβρανική πρωτεΐνη που εκφράζεται στα αρχέγονα αιμοποιητικά, στα προγονικά αιμοποιητικά κύτταρα και στα ενδοθηλιακά κύτταρα των τριχοειδών αγγείων.
4. **CUF** ή **CFC** = Colony Forming Unit ή Colony Forming Cell. «Μονάδα ή κύτταρο που σχηματίζει αποικίες». Προγονικό αιμοποιητικό κύτταρο, που σε ημιστερεά υλικά (π.χ. μεθυλοκυτταρίνη) σχηματίζει αποικίες προδρόμων κυττάρων του αίματος.
5. **CFU-BL** (ή **CFU-Blast**) = Colony Forming Unit – Blast. «Βλάστη που σχηματίζει αποικίες». Πρόκειται για υποκατηγορία αρχεγόνου αιμοποιητικού κυττάρου που σε ημιστερεά υλικά σχηματίζει αποικία (κλώνο) αδιαφοροποίητων βλαστικών κυττάρων.
6. **CFU-E** = Colony forming Unit – Erythroid. Μονοδύναμο προγονικό κύτταρο της ερυθράς σειράς πλέον ώριμο του BFU-E, απ' την διαφοροποίηση του οποίου προέρχεται. Σχηματίζει ερυθροπορτοκαλόχρες αποικίες ερυθροβλαστών.
7. **CFU-Eo** και **CFU-Bas** = Colony Forming Unit – Eosinophil και – Basophil. «Μονάδα που σχηματίζει αποικίες με ηωσινόφιλα και βασεόφιλα κύτταρα». Μονοδύναμο προγονικά κύτταρα προερχόμενα απ' την διαφοροποίηση του CFU-GEMM κυττάρου. Σχηματίζουν αντίστοιχα αποικίες ηωσινόφιλων και βασεόφιλων κυττάρων.
8. **CFU-G** = Colony Forming Unit – Granulocyte. «Μονάδα που σχηματίζει αποικίες κοκκιοκυττάρων». Μονοδύναμο προγονικό αιμοποιητικό κύτταρο προερχόμενο απ' την διαφοροποίηση του CFU-GM. Δίνει αποικίες κυττάρων της ουδετερόφιλης κοκκιώδους σειράς. Απ' την διαφοροποίησή του προέρχεται ο μυελοβλάστης.
9. **CFU-GEMM** ή **CFU-Mix** = Colony Forming Unit – Granulocyte, Erythrocyte, Megakaryocyte, Macrophage. «Μονάδα που σχηματίζει αποικίες κοκκιοκυττάρων, ερυθροκυττάρων, μεγακαρυοκυττάρων, μακροφάγων». Είναι πολυδύναμο προγονικό κύτταρο που σε καλλιέργεια σχηματίζει αποικίες από διαφοροποιημένα κύτταρα τριών τουλάχιστον κυτταρικών σειρών. Προέρχεται απ' την διαφοροποίηση του στελεχιαίου κυττάρου της μυελικής σειράς (pM-HSC).

- 10. CFU-GM** = Colony Forming Unit – Granulocyte / Macrophage. «Μονάδα που σχηματίζει αποικίες κοκκιοκυττάρων / μακροφάγων». Διδύναμο προγονικό κύτταρο της μυελικής σειράς. Σε βραχείας διάρκειας καλλιέργειες σχηματίζει μικτές αποικίες κυττάρων της ουδετερόφιλης κοκκιοκυτταρικής και μονοκυτταρικής σειράς.
- 11. CFU-M** = Colony Forming Unit – Macrophage. «Μονάδα που σχηματίζει αποικίες μακροφάγων». Προγονικό κύτταρο «δεσμευμένο» για την μονοκυτταρική / μακροφαγική σειρά. Προέρχεται απ' την διαφοροποίηση του CFU-GM.
- 12. CFU-Meg** = Colony Forming Unit – Megakaryocyte. «Μονάδα που σχηματίζει αποικίες Μεγακαρυοκυττάρων». Προέρχεται απ' την διαφοροποίηση του CFU-GEMM. Σχηματίζει αποικίες κυττάρων της μεγακαρυοκυτταρικής σειράς.
- 13. CFU-Mix** = άωρα CFU-GEMM.
- 14. CINA** = Chronic Idiopathic Neutropenia of Adult. «Χρόνια Ιδιοπαθής Ουδετεροπενία του Ενηλίκου».
- 15. Confluent stroma** = Τάπητας στρωματικών κυττάρων που καλύπτει την επιφάνεια φλάσκας σε ποσοστό > 75%.
- 16. CSF** = Colony Stimulating Factor. Διεγερτικός ή αυξητικός παράγων (σχηματισμού) αποικιών. Πρόκειται για βιομόρια που συμμετέχουν στην διέγερση του πολλαπλασιασμού και της διαφοροποίησης των προγονικών και προδρόμων αιμοποιητικών κυττάρων.
- 17. Cytokines** = Κυτταροκίνες. Μεγάλη οικογένεια χημικών παραγόντων (βιομόρια) που δρουν στον πολλαπλασιασμό, διαφοροποίηση και ωρίμανση των αιμοποιητικών κυττάρων. Διακρίνονται σε καθ' αυτό αυξητικούς παράγοντες, σε ιντερλευκίνες και σε αναστολείς αιμοποίησης.
- 18. FCS** = Fetal Calf Serum. Ο όρος εμβρύου αγελάδας χρησιμοποιείται σαν συστατικό του θρεπτικού υλικού στις καλλιέργειες των αιμοποιητικών κυττάρων.
- 19. HS** = Horse Serum. Ο όρος αλόγου είναι συστατικό του θρεπτικού υλικού των μακράς διάρκειας μυελικών καλλιεργειών. Διεγείρει τον πολλαπλασιασμό των αρχηγόνων κυττάρων από την G₀ στην G₁ φάση του κυτταρικού κύκλου.
- 20. IMDM** = Iscove's Modified Dulbecco's Medium = Θρεπτικό υγρό ισότονο με τα φυσιολογικά κύτταρα. Είναι εμπλουτισμένο με πολλά θρεπτικά συστατικά και έχει πολλές εφαρμογές σε καλλιέργειες.
- 21. LTBCM ή LTC** = Long-Term Bone Marrow Culture. Μακράς διάρκειας καλλιέργεια μυελού των οστών ή σύστημα Dexter. Τεχνική μελέτης της αλληλεπίδρασης των προγονικών αιμοποιητικών κυττάρων με τα

στρωματικά κύτταρα.

22. MIP-1a = Macrophage Inflammatory Protein-1a.

23. P-HSC = Pluripotent-Haemopoietic Stem Cell. «Αρχέγονο πολυδύναμο προγονικό αιμοποιητικό κύτταρο». Πρόκειται για το αρχέγονο αιμοποιητικό κύτταρο με δυνατότητα διαφοροποίησης προς την μυελική και την λεμφική σειρά.

24. PBS = Phosphate Buffered Saline. Είναι διάλυμα ισότονο με τα φυσιολογικά κύτταρα, πλούσιο σε φωσφορικά ιόντα. Χρησιμοποιείται για πλύσεις κυττάρων, αραιώσεις κυτταρικών εναιωρημάτων κ.λ.π.

25. Pluripotent cells = Σ' αυτά ανήκουν το P-HSC και το ρM-HSC.

26. ρM-HSC = Pluripont Myeloid-Hematopoietic Stem Cell. «Πολυδύναμο αιμοποιητικό κύτταρο της μυελικής σειράς» που προέρχεται απ' την διαφοροποίηση του P-HSC.

27. Stem cells = Προγονικά κύτταρα. Πρόκειται για τα P-HSC και ρM-HSC αρχέγονα κύτταρα της αιμοποιητικής ιεραρχίας.

28. TGF-β= Transforming Growth Factor-β. «Αυξητικός παράγοντας μεταμόρφωσης». Κυτταροκίνη που αποτελεί σημαντικό ανασταλτικό παράγοντα πολλαπλασιασμού προγονικών κυττάρων (ιδιαίτερα του CFU-Mix).

29. TNF-α = Tumor Necrosis Factor-α. Ο «παράγοντας νέκρωσης όγκων» Αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό των αιμοποιητικών προγονικών κυττάρων,