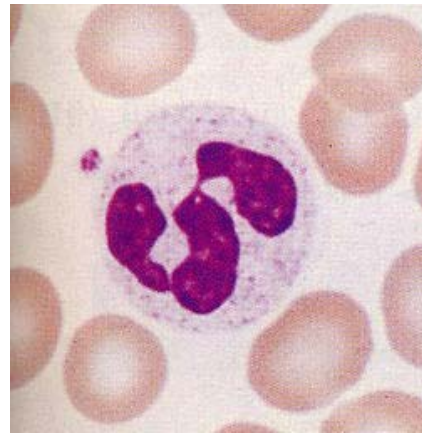
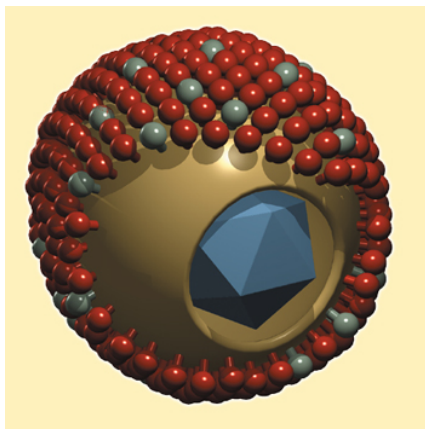


Πανεπιστήμιο Κρήτης
Σχολή Επιστημών Υγείας
Τμήμα Ιατρικής

Μεταπτυχιακό πρόγραμμα
"ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΚΑΙ ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΑΙΤΙΟΛΟΓΙΑ, ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΗ
ΚΑΙ ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΗ ΤΩΝ ΑΣΘΕΝΕΙΩΝ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ"

Μεταπτυχιακή εργασία με τίτλο:
**«ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΟΥ ΡΟΛΟΥ ΤΟΥ
ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΓΑΛΟΪΟΥ (CMV) ΣΤΗΝ
ΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑ ΤΗΣ ΧΡΟΝΙΑΣ
ΙΔΙΟΠΑΘΟΥΣ ΟΥΔΕΤΕΡΟΠΕΝΙΑΣ»**



ΔΑΔΠΑ ΕΥΤΕΡΠΗ

ΥΠΕΥΘΥΝΟΙ ΚΑΘΗΓΗΤΕΣ:
Επικ. Καθηγητής Ιολογίας ΓΕΩΡΓΙΟΣ ΣΟΥΡΒΙΝΟΣ
Επικ. Καθηγήτρια Αιματολογίας ΕΛΕΝΗ ΠΑΠΑΔΑΚΗ

ΗΡΑΚΛΕΙΟ ΝΟΕΜΒΡΙΟΣ 2006

Πρώτον από όλους θα ήθελα να ευχαριστήσω τον καθηγητή Ιολογίας της Ιατρικής του Πανεπιστημίου Κρήτης κ. Δημήτριο Σπαντίδο, που με εμπιστεύτηκε και με δέχτηκε στο εργαστήριό του από το 5^ο ακόμα έτος των βασικών σπουδών μου, δίνοντας μου τη δυνατότητα να έρθω σε επαφή με την εργαστηριακή ιατρική και μου ενέπνευσε την επιθυμία να ασχοληθώ με την έρευνα.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω την Επίκ. Καθηγήτρια Αιματολογίας της Ιατρικής του Πανεπιστημίου Κρήτης κα Ελένη Παπαδάκη, γιατί ήταν από τους καθηγητές «δασκάλους» των φοιτητικών μου χρόνων και με εισήγαγε στο μαγικό κόσμο της αιματολογίας. Επιπρόσθετα, ήταν εκείνη που με παρότρυνε και εν συνεχεία με στήριξε στην απόφαση να παρακολουθήσω το μεταπτυχιακό αυτό πρόγραμμα.

Φυσικά η παρούσα μεταπτυχιακή εργασία θα ήταν αδύνατο να πραγματοποιηθεί χωρίς τη βοήθεια του Επίκ. Καθηγητή Ιολογίας της Ιατρικής του Πανεπιστημίου Κρήτης κ. Γεωργίου Σουρβίνου. Θα ήθελα να τον ευχαριστήσω αρχικά, γιατί ήταν, μαζί με την κα Παπαδάκη, εμπνευστής της ιδέας αυτής της εργασίας. Περισσότερο ακόμα όμως τον ευχαριστώ, γιατί με καθοδήγησε, με βοήθησε και γενικά στάθηκε δίπλα μου σε όλη την προσπάθεια αυτής της δουλειάς.

Ένα πολύ μεγάλο ευχαριστώ θα ήθελα να πω στους συναδέλφους και φίλους μου, προτιμώ να τους αποκαλώ φίλους γιατί έχουμε δημιουργήσει μια υπέροχη παρέα, του εργαστηρίου Ιολογίας της Ιατρικής του Πανεπιστημίου Κρήτης. Ευχαριστώ τους Γιάννα Σούφλα, Βούλα Μπαριτάκη και Δημήτρη Πανουτσόπουλο που ήταν και οι πρώτοι που με μύησαν στα πράγματα του εργαστηρίου. Επίσης τους Ευαγγελία Κουρεπίνη, Γιώτα Δημητροπούλου, Ειρήνη Νεοφύτου, Μαρία Κιμούλη, Πέγκυ Κανέλου, Ξένια Κατζόλη, Ανθούλα Βάκη, Ρένα Λυμπαρίδου, Βίρνα Αμανατίδου, Δανάη Παπαδογιάννη, Νίκο Σουλιτζή, Απόστολο Ζαραβίνο, Βασίλη Μπαλή, Σταύρο Δέρδα, Χάρη Φιλιππάκη, Φίλιππο Πορίχη, Γιάννη Λυρώνη, Σταύρο Αποστολάκη και Μανώλη Συμβουλάκη, για το υπέροχο κλίμα που δημιουργούν στο εργαστήριο, μετατρέποντας τις ατέλειωτες ώρες πειραμάτων σε ευχάριστη εμπειρία.

Θα ήταν αμέλεια να μην ευχαριστήσω τους Κατερίνα Πυροβολάκη, Αθηνά Δαμιανάκη, Χριστίνα Καστρινάκη, Μιχάλη Σπανουδάκη και Κλαυδία Γεμετζή, φίλους από το εργαστήριο Αιματολογίας της Ιατρικής του Πανεπιστημίου Κρήτης, για τη βοήθειά τους καθώς και τις ευχάριστες στιγμές που μου χάρισαν στη μικρή παραμονή μου στο εργαστήριο.

Τελευταίους, αλλά πιο σημαντικούς, θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένεια μου για την αγάπη και τη στήριξη που μου προσφέρει σε όλους τους τομείς της ζωής μου και το Βίκτωρα, γιατί είναι πάντα δίπλα μου σε καλές και κακές στιγμές προσφέροντάς μου αγάπη και αισιοδοξία. Τον ευχαριστώ ιδιαίτερα για τη βοήθεια και υπομονή που έδειξε τόσο κατά τη διάρκεια της μεταπτυχιακής εργασίας, όσο και κατά τη συγγραφή της.

Θα ήταν παράληψη να μην αναφερθώ και στο μικρό μου Ραλφ, ο οποίος σεβάστηκε το πλήθος χαρτιών σκορπισμένα σε διάφορα σημεία του σπιτιού, κατά τη διάρκεια της συγγραφής και περιορίστηκε μόνο στη διατροφή με κόκαλα.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1	ΕΙΣΑΓΩΓΗ	5
1.1	Ουδετεροπενία	5
1.2	Ταξινόμηση	6
1.3	Παθοφυσιολογία	6
1.4	Αιτιολογία	8
1.5	Κλινικές εκδηλώσεις – Επιδημιολογία	10
1.6	Θεραπευτική αντιμετώπιση	10
1.7	Χρόνια ιδιοπαθής ουδετεροπενία (Chronic Idiopathic Neutropenia)	11
1.8	Ποιος είναι λοιπόν ο πιθανός παθοφυσιολογικός μηχανισμός της CIN;	14
1.9	CMV – Κυτταρομεγαλοϊός	18
1.10	Στόχος της παρούσας μελέτης	20
2	ΜΕΘΟΔΟΙ – ΥΛΙΚΑ	21
2.1	Μέθοδοι	21
2.2	Υλικά	28
3	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	31
3.1	PCR	31
3.2	Μολύνσεις	33
4	ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ – ΣΥΖΗΤΗΣΗ	39
5	ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ	44
6	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	46

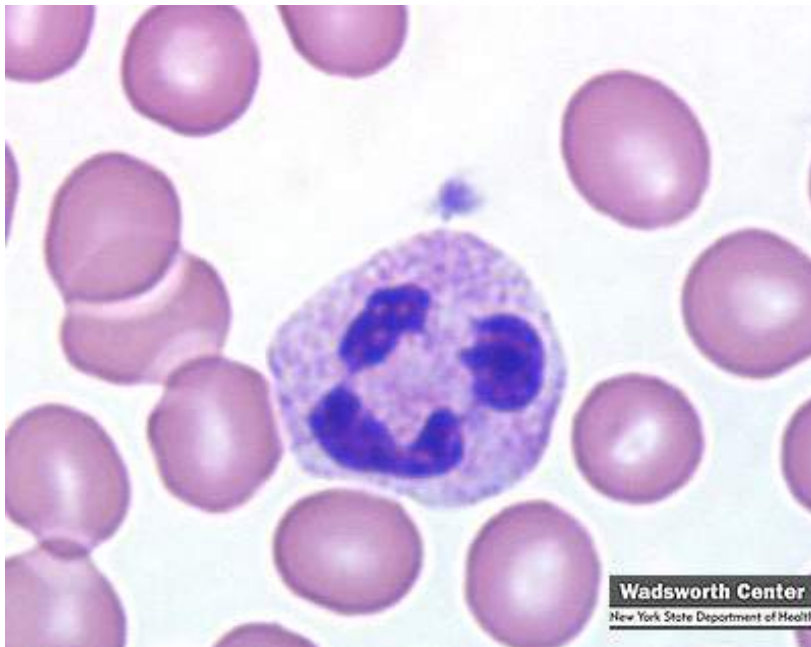
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Ουδετεροπενία

Ουδετεροπενία γενικά ονομάζεται η ελάττωση του αριθμού των κυκλοφορούντων ουδετερόφιλων πολυμορφοπύρηνων κυττάρων σε επίπεδα χαμηλότερα από τα κατώτερα όρια της φυσιολογικής διακύμανσης που αντιστοιχεί στην ηλικία και φυλή του ατόμου [1,2].

Για τους Ευρωπαίους η ουδετεροπενία ορίζεται ως η μείωση του απόλυτου αριθμού των ουδετερόφιλων $<2500/\mu\text{L}$ για χρονική περίοδο μεγαλύτερη των 3 μηνών.

Η σοβαρότητα της ουδετεροπενίας εξαρτάται από τον απόλυτο αριθμό των ουδετερόφιλων (ANC). Εάν ο ANC είναι μεταξύ $2500-1700/\mu\text{L}$, τότε η ουδετεροπενία χαρακτηρίζεται ως Ήπια, εάν είναι από $1700-600/\mu\text{L}$ είναι Μέτρια και κάτω των $600/\mu\text{L}$ τότε χαρακτηρίζεται ως Βαριά. Όταν πια είναι κάτω των $100/\mu\text{L}$, τότε επιφυλάσσεται ο όρος ακοκκιοκυτταραιμία.



Εικόνα 1.1 Ουδετερόφιλο

1.2 Ταξινόμηση

Για την ταξινόμηση των ουδετεροπενιών μπορούν να χρησιμοποιηθούν είτε η φυσιοπαθολογική ταξινόμηση είτε η εμπειρική ταξινόμηση [3].

Φυσιοπαθολογική ταξινόμηση	Εμπειρική Ταξινόμηση
1. Ουδετεροπενίες κεντρικού τύπου α. Απλαστικού τύπου (τύπου I) β. Ουδετεροπενίες από μη αποδοτική κοκκιοποίηση (τύπου II)	1. Συγγενείς Ουδετεροπενίες
2. Ουδετεροπενίες περιφερικού τύπου (τύπου III)	2. Επίκτητες Ουδετεροπενίες α. Ιδιοπαθείς β. Δευτεροπαθείς ι. Ουδετεροπενίες από μυελοπάθεια ιι. Ουδετεροπενίες ανοσολογικής αρχής ιιι. Ουδετεροπενίες λοιμώδους αιτιολογίας ιiv. Ουδετεροπενίες φαρμακευτικής αιτιολογίας v. Υπερσπληνισμός
3. Ψευδοουδετεροπενίες (τύπου IV)	

1.3 Παθοφυσιολογία

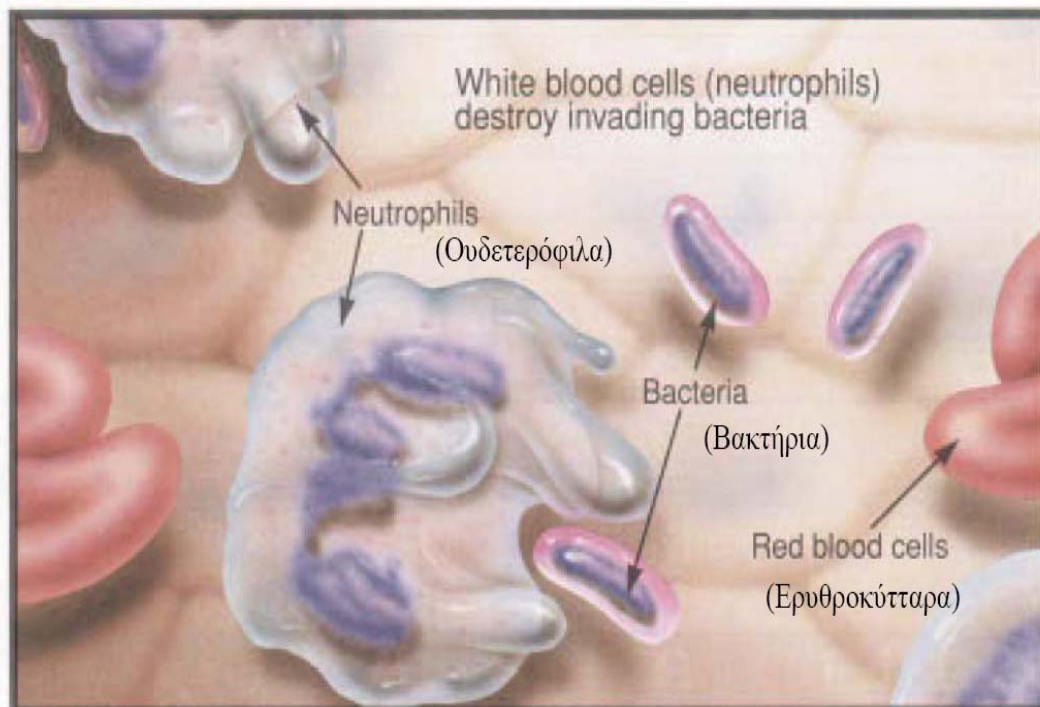
Τα ουδετερόφιλα κοκκιοκύτταρα παράγονται στο μυελό των οστών από μία σειρά μορφολογικά αναγνωρίσιμων κυτταρικών προβαθμίδων που αποτελούν την ουδετερόφιλη κοκκιώδη σειρά. Το πρώτο, μητρικό κύτταρο της σειράς είναι ο μυελοβλάστης. Με τον πολλαπλασιασμό του μυελοβλάστη προκύπτουν δύο όμοια κύτταρα, τα προμυελοκύτταρα, τα οποία πολλαπλασιάζονται θα δώσουν τα μυελοκύτταρα. Περίπου το $\frac{1}{3}$ των μυελοκυττάρων δεν πολλαπλασιάζεται περαιτέρω, το $\frac{1}{3}$ πεθαίνει μέσα στο μυελό και το υπόλοιπο $\frac{1}{3}$ διαιρείται μιτωτικά για να δώσει γένεση σε δύο μυελοκύτταρα.

Τα μυελοκύτταρα που προέκυψαν από τον πολλαπλασιασμό άλλων

μυελοκυττάρων, όπως και αυτά που έχασαν την ικανότητα του πολλαπλασιασμού, ωριμάζουν σε μεταμυελοκύτταρα. Τα μεταμυελοκύτταρα δε διαιρούνται μιτωτικά, αλλά ωριμάζουν σε ραβδοπύρηνα, τα οποία με τη σειρά τους θα ωριμάσουν σε ουδετερόφιλα πολυμορφοπύρηνα.

Τα ουδετερόφιλα θα εξελιχθούν στην αιματική κυκλοφορία αφού παραμείνουν στο μυαλό για 1-2 ημέρες προκειμένου να αποκτήσουν την κατάλληλη πλαστικότητα που θα τα επιτρέψει να περάσουν μέσα από το τοίχωμα των φλεβόκολπων για να εισέλθουν στην αιματική κυκλοφορία, ψάχνοντας να εγκολπώσουν και να σκοτώσουν ξένα στοιχεία. Αυτά που παραμένουν στο μυελό θα αποτελέσουν τις μυελικές αποθήκες. Τα μισά από τα κυκλοφορούντα θα προσκολληθούν στα ενδοθηλιακά κύτταρα και θα συνθέσουν την «περιθωριοποιημένη δεξαμενή» (ΠΔ). τα μη περιθωριοποιημένα κύτταρα αποτελούν την «κυκλοφορούσα δεξαμενή» (ΚΔ).

Μετά από 6-8 ώρες στην κυκλοφορία, τα ουδετερόφιλα είτε τυχαία είτε χημειοτακτικά κινούμενα, θα εισέλθουν στους ιστούς, όπου προορίζονται για την κυτταρική δράση ή το θάνατο.



Εικόνα 1.2 Ουδετερόφιλα στην κυκλοφορία του αίματος που σκοτώνουν βακτήρια

Λαμβάνοντας υπόψη αυτές τις κινητικές παραμέτρους, μια απλή παθοφυσιολογική κατάταξη της ουδετεροπενίας μπορεί να προκύψει από το μοντέλο των τριών διαμερισμάτων:

1. διαμέρισμα μυελού
2. διαμέρισμα περιφερικού αίματος
3. εξωαγγειακό διαμέρισμα

1.4 Αιτιολογία

Η ουδετεροπενία μπορεί να προκληθεί από ποίκιλια αίτια, όπως:

1. Φάρμακα: το πιο συχνό αίτιο είναι οι αντικαρκινικοί χημειοθεραπευτικοί παράγοντες, καθώς επίσης και η φαινοτοΐνη, η καρβαμαζεπίνη, η ινδομεθανίνη, η χλωραμφενικόλη, διάφορες πενικιλίνες κ.α.
2. Ιογενείς λοιμώξεις: γρίπη, ηπατίτιδα, λοιμώδης μονοπυρήνωση, HIV
3. Θρεπτικά αίτια: έλλειψη B₁₂, έλλειψη φυλλικού οξέος
4. Αιματολογικά αίτια: κυκλική ουδετεροπενία, λευχαιμία, μυελοδυσπλασία
5. Υπερσπληνισμός: σύνδρομο Felti, συμφορητική σπληνομεγαλία
6. Αυτοάνοση: ιδιοπαθής, ΣΕΛ, λέμφωμα

Οι αιτίες της ουδετεροπενίας μπορούν επίσης να ταξινομηθούν με βάση το διαμέρισμα με το οποίο συνδέεται ο παθοφυσιολογικός σχετικός μηχανισμός [4]:

I. Διαταραχές στο διαμέρισμα του μυελού των οστών

- 1) Βλάβη μυελού οστών
 - i. Φάρμακα: κυτταροτοξικοί και μη κυτταροτοξικοί παράγοντες
 - ii. Ακτινοβολία
 - iii. Χημικές ουσίες: βενζένιο, DDT, δινιτροφενόλη, αρσενικό, βισμούθιο, νιτρικό οξείδιο

- iv. Ορισμένες συγγενείς και κληρονομικές ουδετεροπενίες
 - v. Ανοσολογικής αιτιολογίας (παρατηρούνται ευθέως σε ασθενείς με ρευματικά νοσήματα): κυτταροτοξικά μέσω T κυττάρων, μέσω αντισωμάτων (Ab) και μηχανισμοί που απαιτούν T και Ab
 - vi. Λοίμωξη: ιογενής (ηπατίτιδα, παρβοϊός, AIDS), βακτηριδιακή (TBC, M.kansasii)
 - vii. Αντικατάσταση μυελού οστών (δηθητικά νοσήματα): κακοήθειες (πνεύμονας, μαστός, προστάτης, στόμαχος, λέμφωμα και λεμφοειδείς λευχαιμίες), ίνωση, ιδιοπαθής μυελοειδής μεταπλασία, χρόνια μυελογενής λευχαιμία, οξεία μεγακαρυοκυτταρική λευχαιμία
- 2) Διαταραχές ωρίμανσης
- i. Επίκτητες: έλλειψη φυλλικού οξέος, έλλειψη B₁₂
 - ii. Νεοπλασματικά και άλλα νοσήματα κλωνοποίησης: συγγενείς ουδετεροπενίες, οξεία μη λεμφοκυτταρική λευχαιμία, μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα, παροξυσμική νυχτερινή αιμοσφαιρινουρία

II. Διαταραχές στο περιφερικό διαμέρισμα του αίματος

- 1) Μετακίνηση ουδετερόφιλων από την κυκλοφορούσα στην περιθωριοποιημένη δεξαμενή (γνωστή ως ψευδοουδετεροπενία)
- i. Κληρονομούμενη ή ιδιοσυστασιακή καλοήθης ψευδοουδετεροπενία
 - ii. Επίκτητη: οξεία (σοβαρή βακτηριδιακή λοίμωξη, συχνά συνδεόμενη με ενδοτοξιναιμία), χρόνια (διατροφή φτωχή σε θερμίδες, ελονοσία)
- 2) Ενδοαγγειακή κατάτμηση
- i. Στον πνεύμονα (λευκοσυγκόληση μέσω συμπληρώματος)
 - ii. Στο σπλήνα (υπερσπληνισμός)

III. Διαταραχές στο εξωαγγειακό διαμέρισμα

- 1) Αυξημένη χρήση
- i. Σοβαρή βακτηριδιακή, μυκητιασική, ιογενής ή ρικετσιακή λοίμωξη
 - ii. Αναφυλαξία

1.5 Κλινικές εκδηλώσεις [3] – Επιδημιολογία [1,2]

Οι ήπιες και μέσης βαρύτητας ουδετεροπενίες είναι κατά κανόνα ασυμπτωματικές και ανακαλύπτονται τυχαία στις εξετάσεις αίματος. Ακόμα και οι βαριές ουδετεροπενίες δε συνοδεύονται πάντοτε από λοιμώξεις. Η εμφάνιση λοίμωξης προϋποθέτει είτε πολύ βαριά ουδετεροπενία είτε παράταση της ουδετεροπενίας για ημέρες. Οι πιο συνηθισμένες λοιμώξεις είναι αυτές του δέρματος, της στοματικής κοιλότητας, των παραρινικών κόλπων, του αναπνευστικού, της περιπρωκτικής και περιγεννητικής χώρας.

Στις παρατεταμένες βαριές ουδετεροπενίες, π.χ. των καρκινοπαθών που έχουν υποβληθεί σε χημειοθεραπεία, μπορεί να εμφανιστούν πνευμονικές πυκνώσεις και σηψαιμίες που οδηγούν στο θάνατο. Περίπου 21% καρκινοπαθών με ουδετεροπενικό πυρετό εμφανίζουν σοβαρές επιπλοκές.

Παρατηρείται ότι όσο μακρότερη είναι η διάρκεια μιας βαριάς ουδετεροπενίας από κυτταροτοξικά φάρμακα ή ακτινοβολία, τόσο μεγαλύτερος είναι και ο κίνδυνος εμφάνισης σοβαρής λοίμωξης.

Γενικά η θνησιμότητα σχετίζεται με τη διάρκεια, τη σοβαρότητα της ουδετεροπενίας και το χρόνο που μεσολαβεί μέχρι την έναρξη χορήγησης χημειοπροφύλαξης (αντιβιοτικών) στον ουδετεροπενικό πυρετό.

Η συχνότητα της ουδετεροπενίας παγκοσμίως είναι 3,4 περιπτώσεις / 1.000.000 πληθυσμού όσον αφορά την ακοκκιοκυτταραιμία και 1 περίπτωση / 1.000.000 πληθυσμού για την προκληθείσα από φάρμακα ουδετεροπενία.

Το μεγαλύτερο ποσοστό των ουδετεροπενικών ατόμων είναι γυναίκες. Η ηλικιακή εμφάνιση ποικίλλει, όμως στα ηλικιωμένα άτομα η επίπτωση είναι υψηλότερη.

1.6 Θεραπευτική αντιμετώπιση

Οι ήπιες και μέσης βαρύτητας ουδετεροπενίες συνήθως δε χρήζουν καμίας θεραπευτικής παρέμβασης. Γενικά η θεραπεία του ουδετεροπενικού ασθενή ακολουθεί την ακριβή διάγνωση και συμπεριλαμβάνει τη θεραπεία της υποκείμενης

νόσου ή τη διακοπή των ύποπτων φαρμάκων ή τοξινών.

Η θεραπεία αποσκοπεί στην προσπάθεια αύξησης των ουδετερόφιλων και στην αντιμετώπιση πιθανών λοιμώξεων. Οπότε χορηγούνται αυξητικοί παράγοντες GM-CSF ή G-CSF καθώς και εμπειρική αντιβιοτική αγωγή πριν τα αποτελέσματα των καλλιιεργειών [5]. Συνήθως χορηγούνται κινολόνες. Εάν εμφανιστεί πυρετός, συνιστάται συνδυασμός αμινογλυκοσίδης και κεφταζιδίμης, ενώ σε παρατεταμένη εμφάνιση χορηγείται και βανκομυκίνη. Εάν ο πυρετός επιμένει, τότε συνιστάται κάλυψη για αναερόβια και μύκητες [3].

Στη βαριά απλαστική αναιμία συνιστάται η μεταμόσχευση μυελού των οστών, εφόσον εκτιμηθεί η διάρκεια και η σοβαρότητα της ουδετεροπενίας, επιβεβαιωθεί η ανεπάρκεια του μυελού ως πρωτοπαθής αιτία και έχει αποκλειστεί κάποια ανοσολογικής φύσης μυελική ανεπάρκεια.

1.7 Χρόνια ιδιοπαθής ουδετεροπενία (Chronic Idiopathic Neutropenia)

A. Γενικά

Ο όρος *χρόνια ιδιοπαθής ουδετεροπενία* (CIN) χρησιμοποιείται ευρέως για να περιγράψει την άγνωστης αιτιολογίας (αδικαιολόγητη) μείωση του αριθμού των κυκλοφορούντων ουδετερόφιλων κάτω του ελάχιστου φυσιολογικού ορίου, που αντιστοιχεί στην ηλικία και φυλή του ατόμου, για χρονικό διάστημα μεγαλύτερο των τριών μηνών [6,7,8].

Οι ασθενείς με CIN είναι συνήθως ασυμπτωματική και η διάγνωση γίνεται τυχαία στα πλαίσια τακτικού ελέγχου από την γενική αίματος.

Για να χαρακτηριστεί η ουδετεροπενία ως ιδιοπαθής θα πρέπει:

- I. Ο αριθμός των κυκλοφορούντων ουδετερόφιλων να είναι μικρότερος των 2500cell/μL αίματος σε τουλάχιστον 4 διαδοχικούς μηνιαίους αιματολογικούς ελέγχους
- II. Να έχει αποκλειστεί η πιθανότητα κυκλικής ή οικογενούς ουδετεροπενίας

με τις απαραίτητες εξετάσεις

- III. Να αποκλειστεί η πιθανότητα υποκείμενης νόσου σχετιζόμενης με ουδετεροπενία διενεργώντας έναν πλήρη αιματολογικό, βιοχημικό, ιολογικό, κυτταρολογικό, ανοσολογικό, παρασιτολογικό και υπερηχογραφικό έλεγχο, παράλληλα με μια καλή φυσική εξέταση και λήψη αναλυτικού ιστορικού
- IV. Να μην υπάρχει ιστορικό έκθεσης σε ακτινοβολία, οργανικά διαλύματα ή χρήση κυτταροτοξικών και άλλων φαρμάκων ικανών να προκαλέσουν ουδετεροπενία
- V. Απουσία anti-neutrophil αντισωμάτων

Ανάλογα με τον αριθμό των κυκλοφορούντων ουδετερόφιλων, η CIN κατατάσσεται σε:

- i. Ήπια, όταν τα ουδετερόφιλα είναι από 2499-1800/ μL αίματος
- ii. Μέτρια, όταν τα ουδετερόφιλα είναι από 1799-500/ μL αίματος
- iii. Σοβαρή, όταν τα ουδετερόφιλα είναι $<500/\mu\text{L}$ αίματος

B. Κλινική – Εργαστηριακή εικόνα

Το μεγαλύτερο ποσοστό των ασθενών με χρόνια ιδιοπαθή ουδετεροπενία (CIN) είναι ασυμπτωματικοί. Ένα μικρό ποσοστό θα εμφανίσει συμπτωματολογία και θα είναι συνήθως ασθενείς με σοβαρής μορφής CIN.

Η συμπτωματολογία περιλαμβάνει επανειλημμένες λοιμώξεις συνήθως του αναπνευστικού, του ουροποιητικού ή του δέρματος με εμφάνιση πυρετού $>38^{\circ}\text{C}$ επί τουλάχιστον 3 ημέρες (ουδετεροπενικός πυρετός). Σε αυτές τις λοιμώξεις απαιτείται χορήγηση αντιβιοτικών [9,10]. Έχει περιγραφεί, επίσης, παρουσία επίμονης ουλίτιδας και σε πολύ μικρό ποσοστό σπληνομεγαλία [11,12].

Σύμφωνα με μια έρευνα του Αιματολογικού Ερευνητικού Εργαστηρίου της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Κρήτης, περίπου το 38% των ασθενών με CIN εμφανίζουν μυοσκελετικούς πόνους εξαιτίας οστεοαρθρίτιδας και οστεοπόρωσης,

συγκριτικά με το 6% φυσιολογικών ατόμων, αντίστοιχης ηλικίας και φύλου [9]. Επίσης σε παρόμοια έρευνα βρέθηκε ότι περίπου το 44,4% εμφάνισε οστεοπενία και 15,6% οστεοπόρωση [13]. Οι ασθενείς αυτοί εμφάνισαν επιπρόσθετα αυξημένη συγκέντρωση στα ούρα του αμινοτελικού πεπτιδίου του Κολλαγόνου I (NTx), συμβατό με αυξημένη οστική επαναρρόφηση και αυξημένη οστεοκαλσίνη (OC) στον ορό, που φανερώνει αύξηση στην οστεοβλαστική λειτουργία. Αυτά τα ευρήματα είναι αντίθετα με τη μείωση στην οστική πυκνότητα (BMD), που εμφάνιζαν οι ασθενείς, αλλά συμβατά με την αυξημένη συγκέντρωση του TNF- α , που μάλλον αποτελεί και την αιτία της οστικής επαναρρόφησης, αν και το τελικό αποτέλεσμα των αλλαγών στον οστικό μεταβολισμό είναι οστεολυτικό.

Τα εργαστηριακά ευρήματα στους ασθενείς με CIN είναι συνήθως απλή ουδετεροπενία ή συνδυασμένη με αναιμία ή θρομβοπενία. Επίσης μπορεί να συνυπάρχει λεμφοπενία και μονοκυτταροπενία.

Η εξέταση του μυελού εμφανίζει μείωση της κοκκιδώδους σειράς και της αναλογίας μυελικών/ερυθρών κυττάρων, ανάλογη με αυτή του βαθμού της ουδετεροπενίας, καθώς επίσης και στροφή προς τα αριστερά της κοκκιδώδους σειράς (αύξηση άωρων και μείωση ώριμων μορφών) [14]. Ο μυελός, λοιπόν, εμφανίζει μια μικρή υποπλασία, χωρίς όμως σημεία κυτταρικής καταστροφής.

Γ. Αίτια

Ο όρος «ιδιοπαθής» που χαρακτηρίζει αυτόν τον τύπο της ουδετεροπενίας, αποκαλύπτει το πρόβλημα που υπάρχει στην ανεύρεση των αιτιών και του παθοφυσιολογικού μηχανισμού αυτής της νόσου.

Οι μηχανισμοί, οι οποίοι ενοχοποιούνται είναι:

A. Οξεία απαίτηση των ουδετερόφιλων ή κατανάλωσή τους στους ιστούς ή καταστροφή των ιδίων και των πρόδρομων μορφών τους από αντισώματα.

Τα ουδετερόφιλα μεταναστεύουν στους ιστούς από την κυκλοφορία, χημειοτακτικά κινούμενα, όταν ο ιστός φλεγμαίνει. Όπως αναφέρθηκε

προηγουμένως, για να χαρακτηριστεί μια ουδετεροπενία ως ιδιοπαθής, πρέπει να αποκλειστεί οποιαδήποτε υποκείμενη νόσος ή φλεγμονή, όπως επίσης και η παρουσία αντισωμάτων έναντι των ουδετερόφιλων και των πρόδρομων μορφών.

B. Μειωμένη παραγωγή από το μυελό.

Η μειωμένη παραγωγή μπορεί να προκληθεί μετά από έκθεση σε ακτινοβολία, τοξικές χημικές ουσίες, φάρμακα, μολυσματικούς παράγοντες και ανοσοεξαρτώμενη καταστροφή του μυελού, στοιχεία τα οποία αποκλείουν τον χαρακτηρισμό της προκλειθήσας ουδετεροπενίας ως ιδιοπαθής. Το μόνο που παρατηρείται στην CIN είναι μικρή υποπλασία του μυελού αγνώστου αιτιολογίας που δε δικαιολογεί τον βαθμό της ουδετεροπενίας [14].

1.8 Ποιος είναι λοιπόν ο πιθανός παθοφυσιολογικός μηχανισμός της CIN;

Στην προσπάθεια καθορισμού των αιτιών της CIN, έγιναν εκτεταμένες μελέτες τόσο στο αίμα, τον ορό και το μυελό των ασθενών, όσο και σε γονιδιακό επίπεδο.

Στο αίμα ελέγχθηκε τόσο ο αριθμός, όσο και η δραστηριότητα των κυττάρων. Διαπιστώθηκε ότι υπάρχει επιλεκτική μείωση των CD45RO⁺ T λεμφοκυττάρων μνήμης και μείωση στη δραστηριότητα των NK κυττάρων, ανάλογη του βαθμού της ουδετεροπενίας [15].

Στον ορό των ασθενών βρέθηκαν υψηλές συγκεντρώσεις φλεγμονωδών κυττοκινών και χημειοκινών, TNF- α , IL-1 β , sTNF-RI, TGF- β ₁, IL-6, IL-8, οι οποίες σχετίζονται με τη μείωση των CD45RO⁺ [16,17,18]. Η αυξημένη συγκέντρωση του TGF- β ₁ στον ορό σχετίζεται και με την αύξηση των IgA και IgG₁ ανοσοσφαιρινών και τη μείωση των IgG₃ στον ορό των ασθενών [19].

Στο μυελό παρατηρείται επίσης, αυξημένη συγκέντρωση TGF- β που δικαιολογεί την αναστολή δημιουργίας μεγακαρυοκυττάρων [20]. Η αυξημένη συγκέντρωση φλεγμονωδών κυττοκινών στο μυελό των οστών καταστέλλει την ερυθροποίηση μειώνοντας την έκφραση της EPOR στα πρόδρομα ερυθροκύτταρα.

Σε γονιδιακό επίπεδο οι μελέτες που έχουν γίνει σε ασθενείς με CIN εμφανίζουν αυξημένη συχνότητα του HLA τάξης II DRB1*1302 απλότυπου [21], ενώ στα γονίδια της ελαστάσης ELA2 [22], της GGT [23] και του G-CSFR δεν βρέθηκαν μεταλλάξεις που να επηρεάζουν τη λειτουργία τους. Αντίθετα τα χαμηλά επίπεδα έκφρασης της GGT και της ELA2 οφείλονται στον χαμηλό αριθμό των ουδετερόφιλων.

Όλα αυτά είναι διαπιστώσεις για την CIN, οι οποίες δε φανερώνουν τα αρχικά αίτια της νόσου, δείχνουν όμως ότι ο μυελός πιθανόν ευθύνεται για τη μειωμένη παραγωγή των ουδετερόφιλων, με αποτέλεσμα όλες οι έρευνες να στραφούν προς τη διεξοδική μελέτη του αιμοποιητικού μικροπεριβάλλοντος του μυελού.

Με τον όρο αιμοποιητικό μικροπεριβάλλον (ΑΜΠ) υποδηλώνεται το ιστολογικά ιδιόμορφο υπόστρωμα του μυελού που συγκρατεί τις αιμοποιητικές προβαθμίδες, επάγει και προάγει τον πολλαπλασιασμό, τη διαφοροποίηση και την ωρίμανση αυτών. Εξασφαλίζει την έξοδο των παραγόμενων ώριμων αιματικών κυττάρων από το μυελό στην κυκλοφορία και προάγει τη λειτουργική δραστηριότητα ορισμένων από τα εκεί παραγόμενα ώριμα αιματικά κύτταρα.

Τα στοιχεία που απαρτίζουν το ΑΜΠ είναι τα [3]:

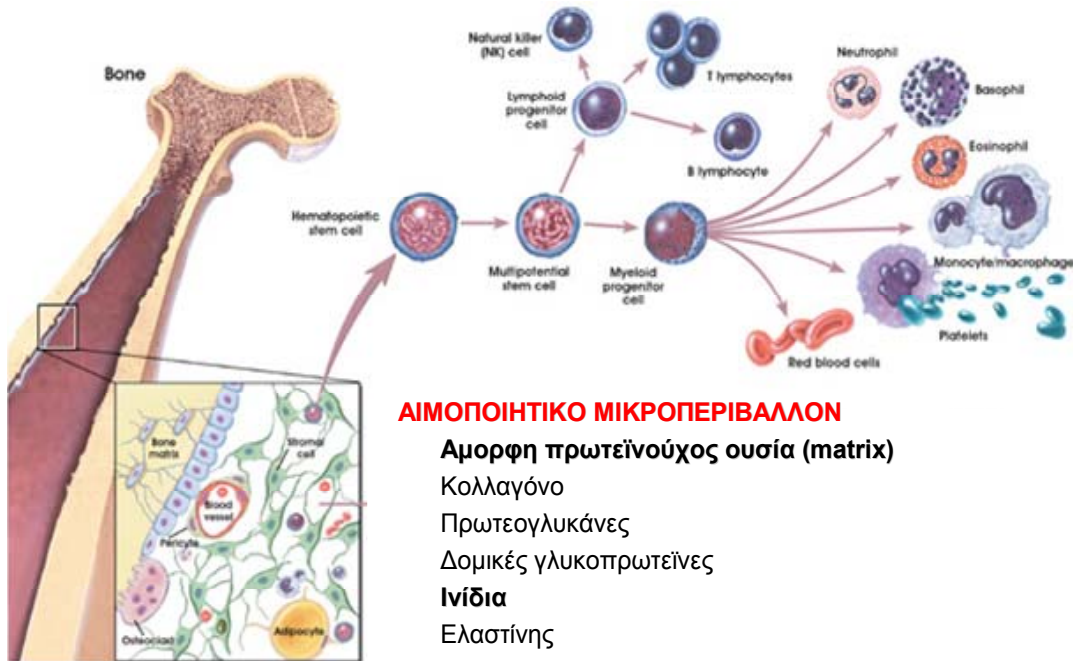
i. **Ινίδια**: συνδετικές ίνες, δικτυωτές ίνες, ελαστικές ίνες και ίνες κολλαγόνου. Οι συνδετικές, ελαστικές και δικτυωτές ίνες αποτελούν το σκελετό μέσα στον οποίο σχηματίζονται ιδιόμορφοι χώροι, οι αιμοποιητικές φωλιές, στις οποίες πολλαπλασιάζονται, διαφοροποιούνται και ωριμάζουν οι αιμοποιητικές προβαθμίδες συγκρατούμενες από τα ινίδια κολλαγόνου.

ii. **Αγγεία**: αρτηρίες, αρτηρίδια, τριχοειδή, φλέβες (φλεβόκολποι) και λεμφαγγεία.

iii. **Κύτταρα**: ινοβλάστες, λιποκύτταρα, μακροφάγα, ενδοθηλιακά. Όλα αυτά αποτελούν τα στρωματικά κύτταρα του μυελού. Υπάρχουν και λίγα λεμφοκύτταρα και μονοκύτταρα τα οποία δεν ανήκουν στα στρωματικά, αλλά φτάνουν στο μυελό από την περιφέρεια μέσω της κυκλοφορίας.

iv. **Άμορφη πρωτεϊνούχα ουσία**: κολλαγόνο, πρωτεΐνες προσκόλλησης (γλυκοζαμινογλυκάνες, θειική χονδροϊτίνη, θειική ηπαρίνη, λαμίνη, αιμονεκτίνη,

φιμπρονεκτίνη). Η άμορφη πρωτεϊνούχος ουσία μέσω του κολλαγόνου και των πρωτεϊνών προσκόλλησης συμμετέχει στη συγκράτηση των αιμοποιητικών προβαθμίδων μέσα στις αιμοποιητικές φωλιές.



ΑΙΜΟΠΟΙΗΤΙΚΟ ΜΙΚΡΟΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝ

Άμορφη πρωτεϊνούχος ουσία (matrix)

- Κολλαγόνο
- Πρωτεογλυκάνες
- Δομικές γλυκοπρωτεΐνες

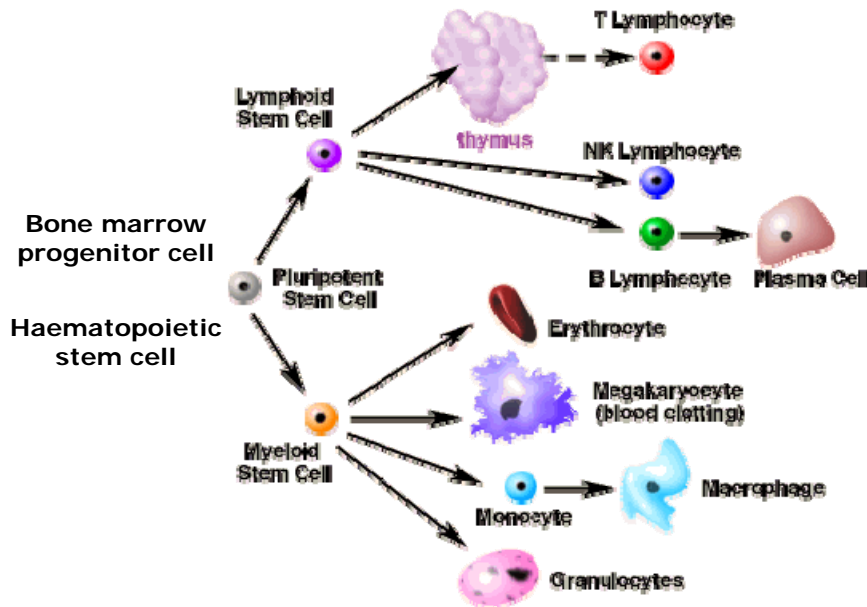
Ινίδια

- Ελαστίνης
- Κολλαγόνου
- Δικτυωτές ίνες

Αγγεία

Κύτταρα

Εικόνα 1.3 Αιμοποιητικό μικροπεριβάλλον μυελού



Εικόνα 1.4 Διαφοροποίηση προγονικών μυελικών κυττάρων

Σε μελέτες λοιπόν που έγιναν *in vitro* χρησιμοποιώντας μακροχρόνιες καλλιέργειες μυελικών μονοπύρηνων κυττάρων (LTBMMCs) ασθενών με CIN, βρέθηκε στα στρωματικά κύτταρα χαμηλός αριθμός CD34⁺ κυττάρων (CFU-GM/CD34⁺/CD33⁺), αυξημένη παραγωγή προφλεγμονοδών κυττοκινών και χημειοκινών από τα μακροφάγα. Στα υπερκείμενα βρέθηκε υψηλό ποσοστό TGF-β₁, IL-1β, TNF-α, IL-6 και G-CSF προερχόμενο από τα στρωματικά κύτταρα, που σημαίνει ότι τα μακροφάγα ή τα μεσεγχυματικά στρωματικά είναι ενεργοποιημένα. Παρατηρείται επίσης, αυξημένη συγκέντρωση INF-γ και FasL, οι οποίες οδηγούν σε Fas μεσολαβούμενη απόπτωση, εκκρινόμενες από τα T λεμφοκύτταρα [24]. Τα ενεργοποιημένα αυτά λεμφοκύτταρα διαπιστώθηκε πως προέρχονται από τα στρωματικά κύτταρα του μυελού. Στον ορό των ασθενών αυτών δεν υπάρχει αυξημένη συγκέντρωση INF-γ που σημαίνει ότι τα λεμφοκύτταρα του μυελού είναι περισσότερα από αυτά του περιφερικού αίματος.

Συμπερασματικά, λοιπόν, φαίνεται πως οι αυξημένες συγκεντρώσεις κυττοκινών και χημειοκινών στο μυελό των ασθενών με CIN και η τοπική πολυκλωνική ενεργοποίηση T λεμφοκυττάρων οφείλεται στην παρουσία χρόνιας φλεγμονής στα στρωματικά κύτταρα του μυελού [6]. Η αιτιολογία, όμως, αυτής της φλεγμονής είναι άγνωστη.

Μια γενική υπόθεση είναι ότι η φλεγμονή οφείλεται σε χρόνιες κρυμμένες μολύνσεις και πιθανοί αιτιολογικοί παράγοντες για αυτό είναι ιοί. Έχει βρεθεί, μάλιστα, πως ασθενής με CIN είναι συχνά οροθετικοί για πολλούς ερπητοϊούς, χωρίς όμως να μπορούμε να διευκρινίσουμε εάν η μόλυνση οφείλεται στην ουδετεροπενία λόγω εξασθενημένου ανοσοποιητικού ή αν η μόλυνση οδήγησε στη CIN.

Την παραπάνω υπόθεση, που προκύπτει από τα αναφερθέντα στοιχεία, μελέτησαν τα εργαστήρια Αιματολογίας και Ιολογίας του Πανεπιστημίου Κρήτης, διερευνώντας την επίδραση των ερπητοϊών στην παθογένεια της CIN.

Ενοχοποιήθηκαν οι ερπητοϊοί γιατί:

- i. Είναι μία από τις κυριότερες και συχνότερες αιτίες ιώσεων.
- ii. Το χαρακτηριστικό τους γνώρισμα είναι ότι μπορούν να βρίσκονται στον οργανισμό σε λανθάνουσα κατάσταση και να επανενεργοποιούνται κάθε

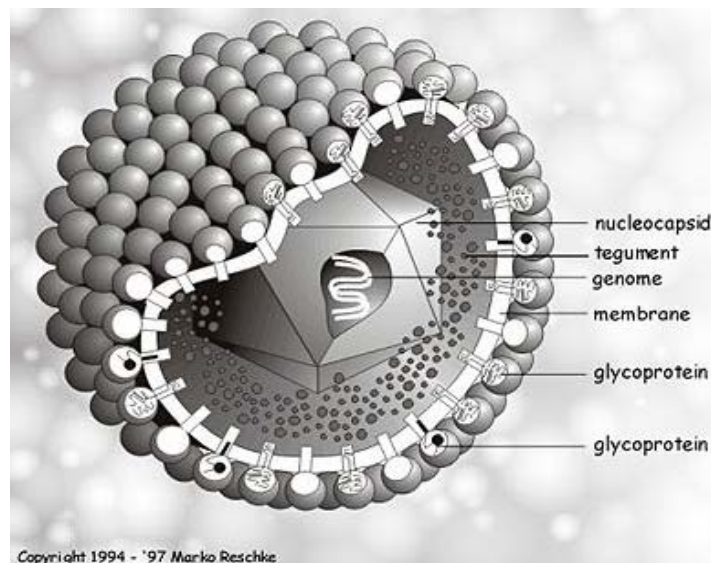
φορά που ο οργανισμός εξασθενεί. Η δυνατότητα αυτή της λανθάνουσας κατάστασης θα μπορούσε να δικαιολογεί την κρυμμένη αιτιολογία της CIN.

Στη μελέτη αυτή βρέθηκε ότι το 55,5% των ασθενών με CIN φέρουν στα κύτταρα του μυελού DNA του CMV. Το υψηλό αυτό ποσοστό συγκριτικά με τους μάρτυρες (0%), ενοχοποιεί ακόμα περισσότερο τον CMV.

1.9 CMV – Κυτταρομεγαλοϊός



Ο CMV ή HSV-5 ανήκει στην υποοικογένεια Β ερπητοϊών. Έχει δίκλωνο DNA μέσα σε ένα εικοσαεδρικό καψίδιο, το οποίο περιβάλλεται από φάκελο αποτελούμενο από λιπιδική διπλοστιβάδα με γλυκοπρωτεϊνικές δομές, που μοιάζουν με καρφιά. Ανάμεσα στο φάκελο και το καψίδιο είναι αποθηκευμένα τα ένζυμα και οι πρωτεΐνες αντιγραφής [25].

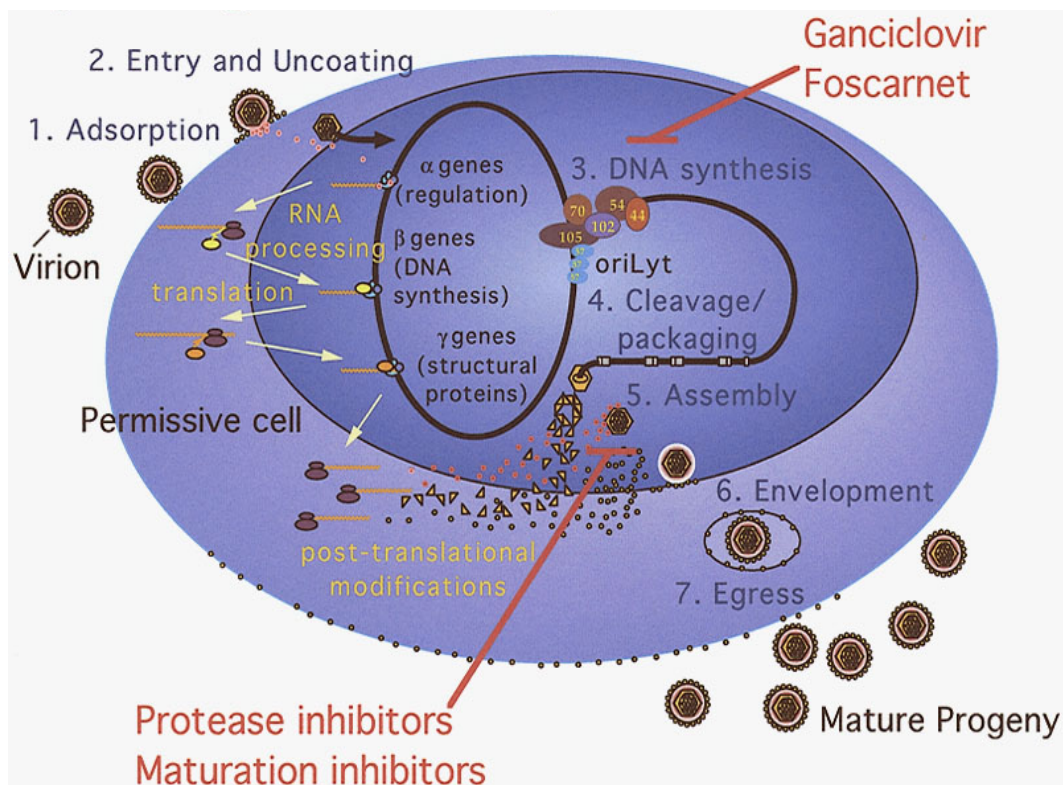


Εικόνα 1.5 CMV

Συνήθως προκαλεί βαριάς μορφής μόλυνση εκ γενετής, που μπορεί να προκαλέσει νευρολογικά και νοητικά προβλήματα, μολύνσεις σε δέκτες αλλομοσχευμάτων και ένα είδος λοιμώδους μονοκυρήνωσης.

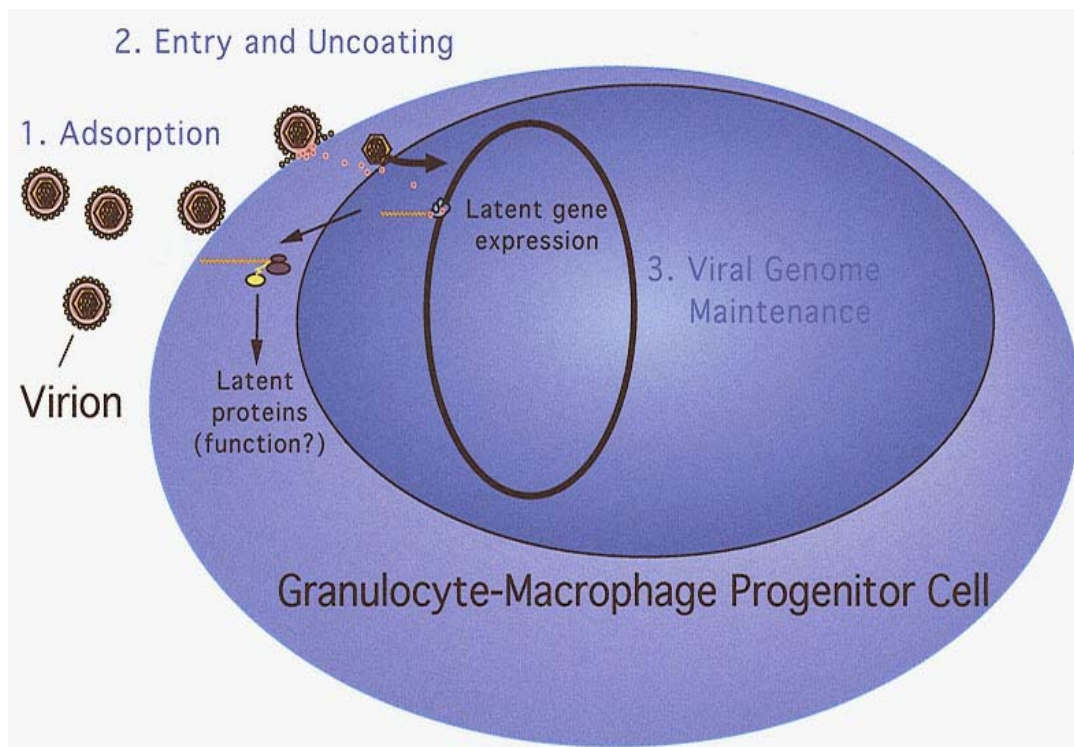
Ο τρόπος που ο CMV προσβάλλει τα κύτταρα περιλαμβάνει τρία βήματα:

- i. Πρόσδεση στην κυτταρική μεμβράνη μέσω της πρωτεογλυκάνης HSPG και των γλυκοπρωτεϊνών του φακέλου gM, gB.
- ii. Πρόσδεση στις πρωτεΐνες υποδοχείς του κυττάρου (EGFR), ιντεγκρίνες κτλ, οι οποίες στέλνουν το σήμα για την ιική αντιγραφή στο εσωτερικό του κυττάρου.
- iii. Σύντηξη μέσω των γλυκοπρωτεϊνών του φακέλου gB, gH, gL και gO και απελευθέρωση του καψιδίου στο εσωτερικό του κυττάρου.



Εικόνα 1.6 Κύκλος αναπαραγωγής του ιού

Με την έκφραση των immediate early (IE) πρωτεϊνών γίνεται μεταγραφή και μετάφραση των γονιδίων του ιού και αναπαραγωγή αυτού μέσω λυτικού κύκλου. Εάν οι πρωτεΐνες μπλοκαριστούν εξαιτίας των μεταγραφικών παραγόντων του κυττάρου, τότε ο ιός οδηγείται σε λυσιγονική κατάσταση [26].



Εικόνα 1.7 Ιός σε λανθάνουσα κατάσταση

1.10 Στόχος της παρούσας μελέτης

Οι μέχρι τώρα μελέτες έχουν δείξει ότι η μόλυνση με CMV σε T λεμφοκύτταρα και στα στρωματικά κύτταρα του μυελού είναι λανθάνουσα, ενώ σε μακροφάγα και ινοβλάστες οδηγεί σε αναπαραγωγή του ιού και λυτικό κύκλο [27,28]. Επίσης φαίνεται ότι ως αποθήκες του ιού δρουν τα πρόδρομα μυελοκύτταρα $CD34^+/CD33^+$ που διατηρούν τον ιό σε λανθάνουσα κατάσταση [29,30].

Αρχικά, στη δική μας μελέτη, προσπαθήσαμε να επιβεβαιώσουμε το ποσοστό εμφάνισης CMV στο μυελό των ασθενών με CIN και παράλληλα μελετήσαμε την πιθανή εμπλοκή του στην παθογένειά της. Για το σκοπό αυτό μελετήσαμε σε *in vitro* αναπαραστάση του AMΠ του μυελού με τις LTBMCC καλλιέργειες, ποια κύτταρα τελικά μολύνονται από τον CMV, εάν η μόλυνσή τους οδηγεί σε λύση ή λυσιγονία και τι συμβαίνει με τα υπερκείμενα αιμοποιητικά κύτταρα (non-adherence cells-NACs).

2. ΜΕΘΟΔΟΙ – ΥΛΙΚΑ

2.1 Μέθοδοι

A. ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΟΛΙΚΟΥ ΓΕΝΩΜΙΚΟΥ ΥΛΙΚΟΥ ΑΠΟ ΚΥΤΤΑΡΑ ΤΟΥ ΑΙΜΑΤΟΣ

Σε falcon των 15ml τοποθετήθηκαν 3ml περιφερικού αίματος και προστέθηκαν μέχρι πληρώσεως Reagent A. Το μείγμα φυγοκεντρήθηκε στις 3000 rpm, για 10 λεπτά σε R/T, έτσι ώστε τα λευκά αιμοσφαίρια να διαχωριστούν από τα ερυθρά και να σχηματίσουν πελέτα. Το υπερκείμενο αφαιρέθηκε, η πελέτα επαναδιαλύθηκε σε erpendorf των 1,5ml με 500μl Reagent B και επώαστηκε στους 37°C για 30 λεπτά, ώστε να λυθούν οι πρωτεΐνες. Στη συνέχεια προστέθηκε 200μl NaOCl₄·H₂O και ακολούθησε επώαση στους 65°C για 25 λεπτά.

Για την κατακρήμνιση των πρωτεϊνικών στοιχείων προστέθηκε ίσος όγκος φαινόλης και χλωροφορμίου (200μl+200μl) και το μείγμα φυγοκεντρήθηκε στις 13000 rpm για 6 λεπτά. Στο erpendorf διακρίνονταν δύο φάσεις, μία υπερκείμενη υδαρής και μία υποκείμενη ημιστέρη που περιείχε τα πρωτεϊνικά θραύσματα. Αναρροφήθηκε η υπερκείμενη φάση, τοποθετήθηκε σε νέο erpendorf και προστέθηκε μέχρι πληρώσεως απόλυτη αιθανόλη. Το μείγμα αφέθηκε overnight στους -20°C για την κατακρήμνιση του DNA.

Στη συνέχεια, φυγοκεντρήθηκε στις 13000 rpm, για 10 λεπτά στους 4°C, έτσι ώστε το DNA να σχηματίσει πελέτα. Αναρροφήθηκε η υπερκείμενη απόλυτη αιθανόλη και η πελέτα φυγοκεντρήθηκε για δεύτερη φορά στις 13000 rpm, για 10 λεπτά, στους 4°C, με 70% αιθανόλη για περαιτέρω κατακρήμνιση του DNA. Αφαιρέθηκε το υπερκείμενο, αφέθηκε η πελέτα να στεγνώσει και το DNA επαναδιαλύθηκε σε 50μl αποστειρωμένο νερό.

Αρχικά, το δείγμα παρέμεινε overnight στους 4°C για να ομογενοποιηθεί το DNA και αποθηκεύτηκε στους -20°C.

B. ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΟΛΙΚΟΥ ΓΕΝΩΜΙΚΟΥ ΥΛΙΚΟΥ ΑΠΟ ΜΥΕΛΟ ΤΩΝ ΟΣΤΩΝ ΚΑΙ ΚΥΤΤΑΡΙΚΕΣ ΣΕΙΡΕΣ

200μl δείγματος (κύτταρα ολικού μυελού, υπερκείμενο μυελού, κυτταρικές σειρές) τοποθετήθηκαν σε erpendorf το οποίο περιείχε 400μl Reagent B και 4μl πρωτεΐνάσης K (20μg/μl) και επώαστηκαν σε υδατόλουτρο στους 60°C για 24-36 ώρες, ώστε να λυθούν οι κυτταρικές μεμβράνες και οι πρωτεΐνες.

Στη συνέχεια για την κατακρήμιση των πρωτεϊνικών δομών, προστέθηκε ίσος όγκος φαινόλης και χλωροφορμίου (200μl+200μl) και το μείγμα φυγοκεντρήθηκε στις 13000 rpm για 6 λεπτά. Στο erpendorf διακρίνονταν δύο φάσεις, μία υπερκείμενη υδαρής και μία υποκείμενη ημιστέρη που περιείχε τα πρωτεϊνικά θραύσματα. Αναρροφήθηκε η υπερκείμενη φάση, τοποθετήθηκε σε νέο erpendorf και προστέθηκε μέχρι πληρώσεως απόλυτη αιθανόλη και 1/20 του όγκου NaCl. Το μείγμα αφέθηκε overnight στους -20°C για την κατακρήμιση του DNA.

Στη συνέχεια, φυγοκεντρήθηκε στις 13000 rpm, για 10 λεπτά στους 4°C, έτσι ώστε το DNA να σχηματίσει πελέτα. Αναρροφήθηκε η υπερκείμενη απόλυτη αιθανόλη και η πελέτα φυγοκεντρήθηκε για δεύτερη φορά στις 13000 rpm, για 10 λεπτά, στους 4°C, με 70% αιθανόλη για περαιτέρω κατακρήμιση του DNA. Αφαιρέθηκε το υπερκείμενο, αφέθηκε η πελέτα να στεγνώσει και το DNA επαναδιαλύθηκε σε 50μl αποστειρωμένο νερό.

Αρχικά το δείγμα παρέμεινε overnight στους 4°C για να ομογενοποιηθεί το DNA και αποθηκεύτηκε στους -20°C.

Γ. ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΣ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΟΛΙΚΟΥ ΜΥΕΛΟΥ

Εναιωρήματα μυελικών μονοπύρηνων κυττάρων (BMMCs) των ασθενών προετοιμάστηκαν από μυελό που αναρροφήθηκε από την οπίσθια λαγόνια ακρολοφία. Τα δείγματα μυελού αμέσως μετά την αναρρόφηση, διαλύθηκαν σε αναλογία 1:1 σε IMDM340 σε στείρες συνθήκες και επώαστηκαν overnight. Ακολούθησε επιστίβαση του αραιωμένου δείγματος μυελού σε φικόλη (8ml φικόλη και 7 ml δείγματος) και φυγοκέντρηση στις 1800 rpm για 30 λεπτά.

Τα κύτταρα ελήφθησαν από τη μεσόφαση με πιπέτα Pasteur, επαναδιαλύθηκαν σε IMDM340 και φυγοκεντρήθηκαν στις 1800 rpm, για 7 λεπτά. Αφαιρέθηκε το υπερκείμενο και επαναδιαλύθηκε η πελέτα σε 20 έως 50ml IMDM340. Τα κύτταρα ελέγχθηκαν για τη βιωσιμότητά τους με κυανό του τρυπανίου, μετρήθηκαν και χωρίστηκαν για την περαιτέρω επεξεργασία (καλλιέργειες, ανοσομαγνητικός διαχωρισμός κτλ).

Δ. ΜΑΚΡΑΣ ΔΙΑΡΚΕΙΑΣ ΜΥΕΛΙΚΕΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ (LTBMMCs)

10^7 BMMCs εναιωρήθηκαν σε πλαστική φλάσκα των 25cm^2 σε τελικό όγκο 10ml IMDM 340 και επώστηκαν στους 37°C και σε 5% CO_2 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 βδομάδα, οι φλάσκες εξετάζονταν με τη χρήση ενός ανάστροφου μικροσκοπίου, για τον σχηματισμό στρώματος. Μέσα σε 2-5 εβδομάδες, όταν οι καλλιέργειες σχημάτισαν τάπητα, καλύφθηκε δηλαδή τουλάχιστον το 75% της επιφάνειας της φλάσκας από στρωματικά κύτταρα, οι καλλιέργειες τερματίστηκαν και τα μη προσκολλημένα κύτταρα (non adherence-NACs) μεταφέρθηκαν σε ημιστέρες βραχυχρόνιες καλλιέργειες (STC). Ακολούθησε η αποκόλληση των προσκολλόμενων κυττάρων με επώαση τους με 0,25% τρυψίνη (Sigma) για 10 λεπτά. Τα αποκολλημένα κύτταρα ξεπλύθηκαν δύο φορές με IMDM, μετρήθηκαν, ελέγχθηκαν για την βιωσιμότητά τους και χρησιμοποιήθηκαν για εκχύλιση DNA.

Ε. ΜΥΕΛΙΚΕΣ ΗΜΙΣΤΕΡΕΕΣ ΒΡΑΧΥΧΡΟΝΙΕΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ

3×10^5 NA-BMMCs, διαλυμένα σε 600μl IMDM, καλλιεργήθηκαν σε τρυβλία Petri των 35mm, που περιείχαν 15μl G-CSF και 2,4ml εναιωρήματος 1,2% μεθυλοκυτταρίνης (τελικός όγκος = 3ml). Οι καλλιέργειες επώστηκαν στους 37°C και σε 5% CO_2 σε κλίβανο με 100% υγρασία. Τη 12^η ημέρα, χρησιμοποιώντας ανάστροφο μικροσκόπιο, μετρήθηκαν οι κοκκιοκυτταρικές, μονοκυτταρικές και μικτές αποικίες CFU-G, CFU-M και CFU-GM.

ΣΤ. ΑΝΟΣΟΜΑΓΝΗΤΙΚΟΣ ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΣ ΒΜΜCs

10^7 ΒΜΜCs τοποθετήθηκαν σε falcon των 15ml, προστέθηκε mini Macs buffer (4°C) μέχρι πληρώσεως και φυγοκεντρήθηκαν στις 1800 rpm, για 7-10 λεπτά στους 4°C. Αφαιρέθηκε το υπερκείμενο και η κυτταρική πελέτα επαναδιαλύθηκε στο εναπομένων buffer.

Τα κύτταρα επώαστηκαν με mab microbeads (20μl mab/ 10^7 κύτταρα) για 15-30 λεπτά στους 4°C. Στη συνέχεια προστέθηκε buffer (mini Macs) μέχρι πληρώσεως του falcon. Τα κύτταρα φυγοκεντρήθηκαν στις 1800 rpm, για 7 λεπτά, αφαιρέθηκε το υπερκείμενο και η πελέτα επαναδιαλύθηκε στο εναπομένων buffer (~500μl).

Η στήλη τοποθετήθηκε στο μαγνήτη και ξεπλύθηκε με 500μl mini Macs. Αρχικά η στήλη μεταφέρθηκε στο σωληνάριο, όπου θα γινόταν η συλλογή των αρνητικών για το επωασμένο αντίσωμα κυττάρων. Το δείγμα εισήχθη στη στήλη. Αφού πέρασε όλο, ακολούθησαν τρία πλυσίματα της στήλης με 500μl mini Macs για να αποβληθούν κύτταρα που δεν έφεραν το αντίσωμα και απλά είχαν εγκλωβιστεί ανάμεσα στα άλλα. Τα θετικά κύτταρα, ελήφθησαν, αφού εφαρμόστηκε το έμβολο στη στήλη, σε άλλο καθαρό σωληνάριο.

Z. ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (POLYMERASE CHAIN REACTION – PCR) ΓΙΑ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΓΟΝΙΔΙΩΜΑΤΟΣ ΤΟΥ CMV

Συστατικά	Όγκος αντιδραστηρίων / αντίδραση
dH ₂ O	4,65 μl
buffer (10x)	2,0
MgCl ₂ (50mM)	0,6
dNTPs (10μM)	0,4
CMV1-2 (10μM)	0,6
Taq	0,15
Sample	10 μl από κάθε δείγμα
Total Volume	20,0 μl

- Πρόγραμμα PCR:

PCR CMV SIM

Θερμοκρασία	Χρόνος
94 ° C	2,30 min

94 ° C	40 sec	
57 ° C	30 sec	x 8 κύκλους
72 ° C	30 sec	

94 ° C	40 sec	
55 ° C	30 sec	x 27 κύκλους
72 ° C	30 sec	
72 ° C	10 min	

- Εμφάνιση σε πηκτική αгарόζης 2%.
- Αναμενόμενο προϊόν: 167 bp, μπορεί να χρησιμοποιηθεί DNA Ladder 100 bp.
- Αλληλουχίες primers:
 - CMV3: 5'gtgaccaaggccacgacgtt 3'
 - CMV4: 3'tctgccaggacatctttctc 5'
- Stock solutions 100μM
- Working solutions 10μM
- Θετικό Control: Πλασμίδιο με κλωνοποιημένο το προϊόν της αντίδρασης (167 bp).

Η. ΜΟΛΥΝΣΗ ΤΩΝ LTBMMSs ΜΕ ΤΟ ΣΤΕΛΕΧΟΣ HCMV-AD169

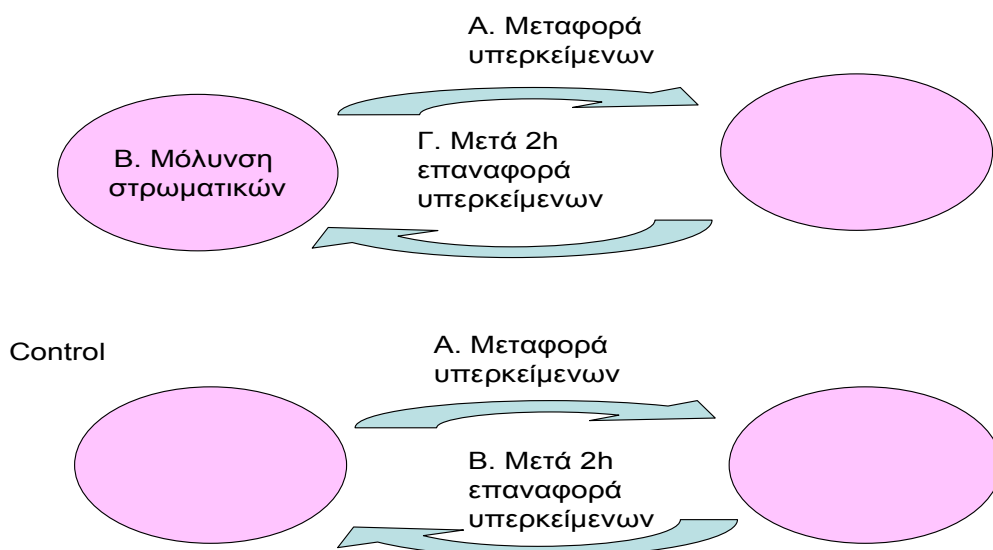
Σε 9 τριών εβδομάδων LTBMMSs (10^5 κύτταρα/καλλιέργεια) φυσιολογικού μυελού, ελαιωρούμενες σε πηγάδια μιας πλάκας 24 πηγαδιών, όπου τα στρώματα είχαν αναπτυχθεί καλά, έγινε μόλυνση με HCMV-AD169 με multiplicity of infection (moi) 1.

Τα κύτταρα συλλέχθηκαν από κάθε πηγάδι σταδιακά, την 1^η, 2^η, 3^η, 5^η, 8^η, 11^η, 14^η και 20^η ημέρα μετά τη μόλυνση (dpi) από το 1^ο, 2^ο, 3^ο, 4^ο, 5^ο, 6^ο, 7^ο και 8^ο πηγάδι αντίστοιχα. Το 9^ο πηγάδι χρησιμοποιήθηκε ως μάρτυρας. Τα κύτταρα φυγοκεντρήθηκαν στις 1800 rpm, για 7 λεπτά. Αφαιρέθηκε το υπερκείμενο και η πελέτα επαναδιαλύθηκε σε 200μl IMDM. Στα κύτταρα έγινε εκχύλιση DNA και PCR για HCMV, ώστε να ελεγχθεί η αντιγραφή, ο πολλαπλασιασμός ή η παραμονή του ιού σε λανθάνουσα κατάσταση.

Θ. ΜΟΛΥΝΣΗ ΤΩΝ LTBMCMCs ΜΕ ΤΟ ΣΤΕΛΕΧΟΣ HCMVEGFP-IE2

Σε 22 τρυβλία Petri των 35mm, εναιωρήθηκαν καλλιέργειες LTBMCMCs φυσιολογικού μυελού. Σε κάθε τρυβλίο τοποθετήθηκαν 2×10^6 BMMCs. Μετά την ολοκλήρωση της τρίτης εβδομάδας, όταν το στρώμα είχε αναπτυχθεί και υπήρχε ικανοποιητικός αριθμός NACs, έγινε μόλυνση με HCMVEGFP-IE2 όπως περιγράφεται παρακάτω.

Αρχικά, μεταφέρθηκαν τα NACs από τα τρυβλία 5, 6, 7, 8, 9 και 10 στα στρώματα των τρυβλίων 1, 2, 11, 12, 13 και 14 αντίστοιχα. Έγινε μόλυνση των τρυβλίων που περιείχαν μόνο στρωματικά κύτταρα (5, 7, 9) με HCMVEGFP-IE2 μοί 1 ανά τρυβλίο, ενώ τα υπόλοιπα (6, 8, 10) χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρες (mock infected-mi).



Τα τρυβλία διατηρήθηκαν στον κλίβανο για 2 ώρες, αναδεδυόμενα ελαφρά κάθε 15 λεπτά. Στη συνέχεια ξεπλύθηκαν με IMDM τρεις φορές και τα μεταφερθέντα υπερκείμενα μεταφέρθηκαν πίσω στα αντίστοιχά τους στρώματα. Τα στρώματα που χρησίμευσαν ως «ξενώνες» καταστράφηκαν, εκτός από αυτά των τρυβλίων 1 και 2. Το τρυβλίο 1 μολύνθηκε με HCMVEGFP-IE2 μοί 1 και επώαστηκε όπως και προηγουμένως, ενώ το 2 διατηρήθηκε ως μάρτυρας (mi). Ξεπλύθηκε με IMDM τρεις φορές και προστέθηκαν 2ml IMDM340 για να διατηρηθούν οι καλλιέργειες.

Στα τρυβλία 15, 16, 19 και 20 αφαιρέθηκε το υπερκείμενο και διατηρήθηκε το στρώμα. Τα στρώματα στα 15 και 19, μολύνθηκαν όπως και προηγουμένως. Τα τρυβλία 16 και 20 χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρες (mi).

Στα ζευγάρια τρυβλίων 3-4, 17-18 και 21-22 μολύνθηκαν τα τρυβλία 3, 17, 21 με HCMVEGFP-IE2 μοί 1, παρουσία και των NACs κυττάρων, ενώ τα 4, 18 και 22 διατηρήθηκαν ως μάρτυρες (mi).

Την 1^η ημέρα μετά τη μόλυνση (day post-infection - dpi), τα τρυβλία 1-2, 3-4 και 5-6 ελέγχθηκαν στο μικροσκόπιο φθορισμού. Αναζητήθηκε η μόλυνση, με βάση το φθορισμό και φωτογραφήθηκαν. Τα στρωματικά κύτταρα συλλέχθηκαν σε διάλυμα μερκαπτοαιθανόλης για μετέπειτα ποσοτικό έλεγχο με Western Blotting της IE2 πρωτεΐνης του ιού. Τα υπόλοιπα τρυβλία παρακολουθούνταν καθημερινά και την 4^η dpi φωτογραφήθηκαν και συλλέχθηκαν, όπως και προηγουμένως τα στρωματικά κύτταρα για τα τρυβλία 7-8, 15-16 και 17-18. Τα NACs αυτών των καλλιεργειών μεταφέρθηκαν σε STCs για διαφοροποίηση προς CFU-GM σειρές. Οι υπόλοιπες καλλιέργειες, παρακολουθήθηκαν με σκοπό την ανίχνευση διαφορών στην κατάσταση των κυττάρων και το φθορισμό από την έκφραση της IE2 πρωτεΐνης.

2.2 Υλικά

A. ΕΚΧΥΛΙΣΗ DNA

- Reagent A: 10mM Tris base,
Sucrose 320mM,
MgCl₂- 6H₂O 5mM,
Triton-X-100 1% ,
Ρυθμίζουμε το pH =8 χρησιμοποιώντας NaOH ή HCl.
- Reagent B: 400mM Tris base,
60mM EDTA,
150mM NaCl,
Ρυθμίζουμε το pH =8 χρησιμοποιώντας NaOH ή HCl.
Αποστειρώνουμε και προσθέτουμε 1% w/w SDS.
- Πρωτεΐνάση K (20mg/ml),
- Φαινόλη,
- Χλωροφόρμιο CHCl₃,
- Αιθανόλη απόλυτη και 70%.

B. PCR

- 10X buffer solution-MgCl₂ (Fermentas).
- MgCl₂ 50mM (Fermentas).
- Εκκινητές 10mM.
- dNTPs 2.5mM (Fermentas).
- Sterile water.
- Πλασμίδια ως θετικοί μάρτυρες.
- DNA template.

Γ. ΚΥΤΤΑΡΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ

- IMDM340:
 - (GIBCO) => IMDM (Iscove's modified Dulbecco's medium 500ml)
 - Αφαιρούμε 100ml από το IMDM
 - Προσθέτουμε αφού αναμειχθούν, με τη χρήση φίλτρου 0,22μm
 - 50ml 10% FBS
 - 50ml 10% Horse serum
 - 5ml 1% L-glutamine
 - 5ml 1% υδροκορτιζόνη (HSS 10^{-4} M)
 - 5ml 1% πενικιλίνη
- Μεθυλοκυτταρίνη (MC):
 - 40ml MC
 - 30ml FCS
 - 10ml 10%BSA
 - Προσθέτουμε αφού αναμειχθούν, με τη χρήση φίλτρου 0,22μm
 - 1ml 7,5% διττανθρακικά
 - 100μl μερκαπτοαιθανόλη 10^{-4} M
 - 1ml L-glutamine

Δ. ΑΝΟΣΟΜΑΓΝΗΤΙΚΟΣ ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΣ

- Αντισώματα MACs Miltenyi Biotec:
 - Direct CD34 Progenitor Cell Isolation kit human (Microbeads)
 - CD14 Microbeads, human
 - CD3 Microbeads, human
- Στήλες: MACs Separation Columns, 25 LS, Miltenyi Biotec

- Mini Macs Buffer
 - 50ml ACD
 - 25ml BSA
 - 20ml NaHCO₃
 - PBS έως 500ml τελικό όγκο
 - Πέρασμα ανά 250ml σε 0,22μm φίλτρο και διατήρηση στους 4°C.

E. ΠΚΑ ΣΤΕΛΕΧΗ

- HCMV-AD169
- HCMVEGFP-IE2

ΣΤ. ΔΕΙΓΜΑΤΑ

Μελετήθηκαν 21 ασθενείς με διαγνωσμένη CIN, 17 γυναίκες και 4 άντρες. Από κάθε ασθενή έγινε προσπάθεια συλλογής δειγμάτων DNA από περιφερικό αίμα (PB), μυελό των οστών (BM), κύτταρα CD34⁺, CD14⁺, CD3⁺ και στρωματικά κύτταρα, αλλά λόγω της κυτταροπενίας που συνήθως εμφάνιζε ο μυελός, αυτό δεν ήταν πάντοτε εφικτό.

Τα δείγματα ελήφθησαν μετά από:

- i. Εκχύλιση DNA από ολικό περιφερικό αίμα
- ii. Εκχύλιση DNA από μυελό που αναρροφήθηκε από την οπίσθια λαγόνια ακρολοφία
- iii. Εκχύλιση DNA από τις κυτταρικές σειρές CD34⁺, CD14⁺ και CD3⁺, μετά από ανοσομαγνητικό διαχωρισμό αυτών από τα BMMCs
- iv. Εκχύλιση DNA από τα στρωματικά κύτταρα LTBMCMCs (συμπληρωμένης 3^{ης} εβδομάδας)

Επίσης χρησιμοποιήθηκαν και μυελοί 8 μη ουδετεροπενικών ασθενών, ως μάρτυρες, από τους οποίους έγινε εκχύλιση DNA από ολικό μυελό και στρώθηκαν LTBMCMCs που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα μόλυνσης.

Όλα τα δείγματα φωτομετρήθηκαν ώστε να ποσοτικοποιηθεί το γενετικό υλικό και να δημιουργηθούν οι κατάλληλες συγκεντρώσεις για την PCR. Η ποιότητα και η παρουσία του DNA στα δείγματα επιβεβαιώθηκε με PCR για το γονίδιο της β₂ μικροσφαιρίνης και ηλεκτροφόρηση των προϊόντων σε πηκτή αγαρόζης 2%.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 PCR

Πίνακας 3.1.: Συγκεντρωτικά αποτελέσματα ανίχνευσης του ιού CMV σε διάφορους τύπους κυττάρων με PCR.

	PB	BM	CD34 ⁺	CD14 ⁺	CD3 ⁺	Stromal
O ₁	-	+	\	\	\	\
O ₂	-	+	-	-	-	\
O ₃	-	+	\	\	\	\
O ₄	-	+	-	-	-	\
O ₅	-	+	-	-	-	+
O ₆	-	+	-	-	-	+
O ₇	-	+	-	-	-	+
O ₈	-	-	\	\	\	\
O ₉	+	+	\	\	\	+
O ₁₀	\	-	-	-	-	\
O ₁₁	-	+	\	\	\	+
O ₁₂	\	\	\	\	\	-
O ₁₃	\	-	\	\	\	\
O ₁₄	\	\	\	\	\	-
O ₁₅	\	-	\	\	\	\
O ₁₆	\	+	\	\	\	\
O ₁₇	\	\	\	\	\	-
O ₁₈	\	\	\	\	\	-
O ₁₉	\	+	\	\	\	\
O ₂₀	\	+	\	\	\	\
O ₂₁	-	-	\	\	\	\

O = Ασθενής με CIN

+ = Θετική PCR για CMV

- = Αρνητική PCR για CMV

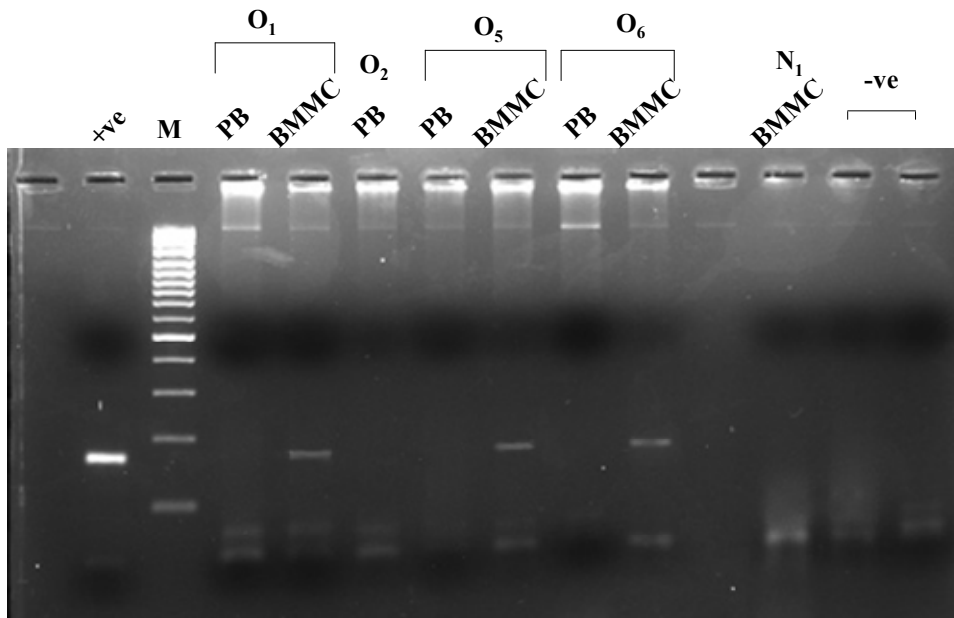
\ = Έλλειψη δείγματος

Στο DNA από PB, BM, CD34⁺, CD14⁺, CD3⁺ και στρωματικά κύτταρα, η ανίχνευση του γονιδιώματος του CMV με PCR και εκκινιτές τους CMV₃ και CMV₄ έδωσε τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται συγκεντρωμένα στον Πίνακα 3.1.

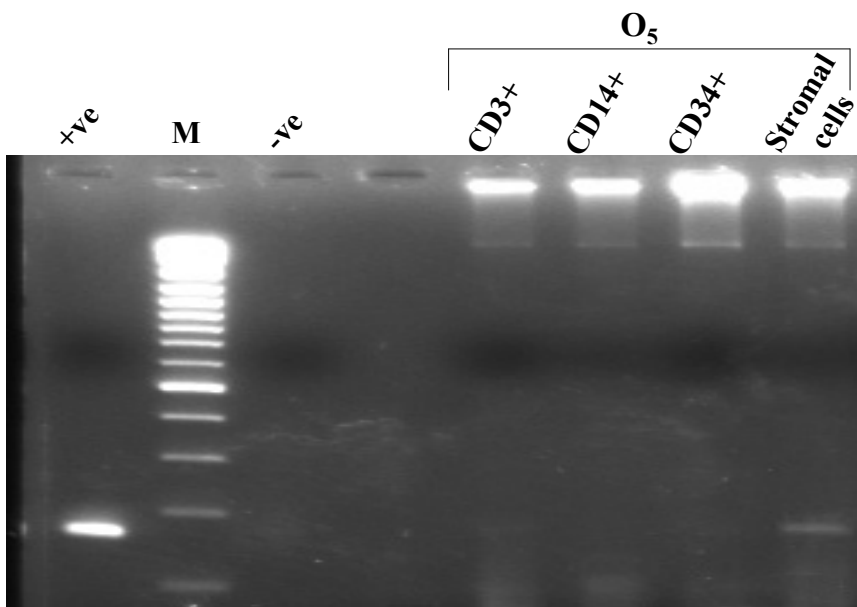
Όπως φαίνεται από τον Πίνακα 3.1, 12 από τους 21 ασθενείς εμφάνισαν τον CMV, δηλαδή ποσοστό 57%, που επιβεβαιώνει το προηγούμενο ποσοστό των ερευνών μας (55,5%).

Επίσης από τα αποτελέσματα της PCR, προκύπτει ότι οι περισσότεροι ασθενείς που ήταν θετικοί για τον CMV, ήταν θετικοί στο μυελό και στα στρωματικά κύτταρα, αλλά όχι στο αίμα και στα διαχωρισμένα κύτταρα (CD34⁺, CD14⁺, CD3⁺), γεγονός που επιβεβαιώνει τις υποψίες μας για παρουσία του ιού σε λανθάνουσα κατάσταση στα κύτταρα του μυελού και συγκεκριμένα στα στρωματικά. Παραδείγματα θετικών για CMV δειγμάτων φαίνονται στις Εικόνες 3.1 και 3.2.

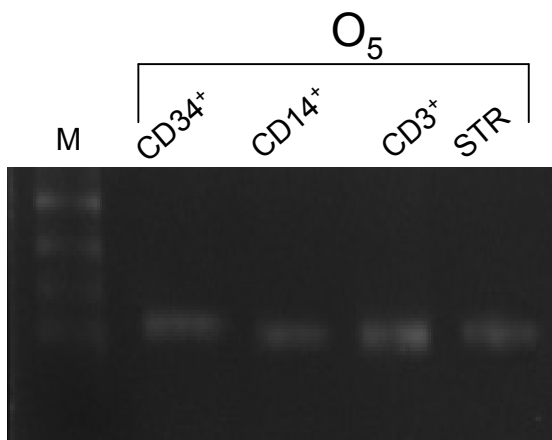
Από τους μάρτυρες, κανένας δεν εμφάνισε CMV στο μυελό (0%) ενισχύοντας την υπόθεση για την εμπλοκή του CMV στην CIN. Επίσης, εφόσον οι μυελοί ήταν αρνητικοί για CMV, χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα μόλυνσης.



Εικόνα 3.1 Ανίχνευση HCMV στα BMMC των CIN ασθενών, αλλά όχι στο μάρτυρα



Εικόνα 3.2 Ανίχνευση HCMV μόνο στα στρωματικά κύτταρα



Εικόνα 3.3 B₂ Μικροσφαιρίνη

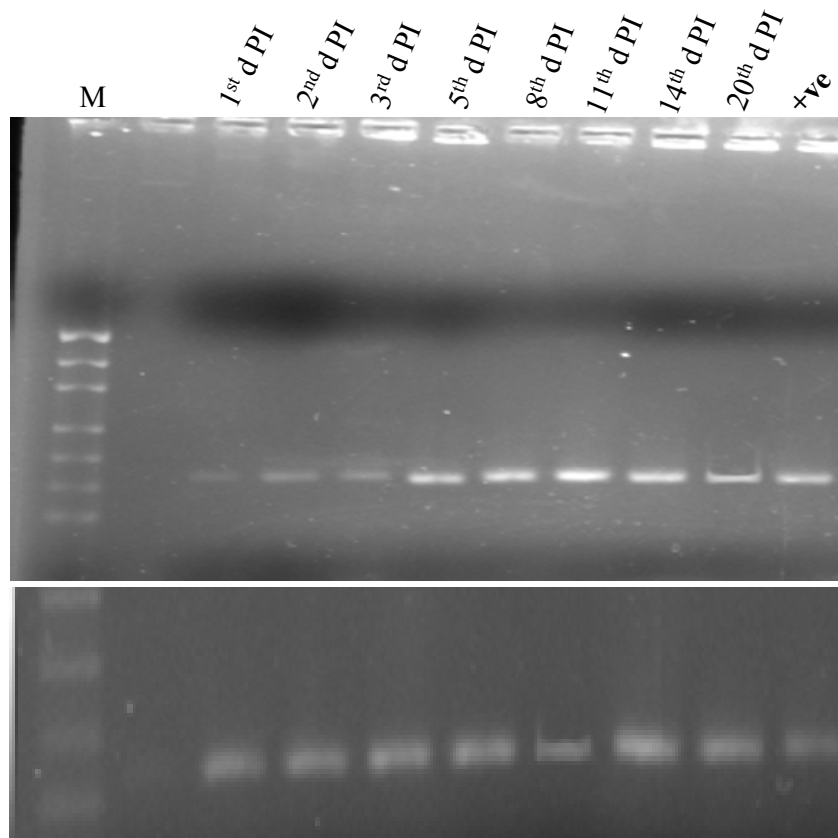
3.2 Μολύνσεις

Στο πρώτο πείραμα έγινε μόλυνση με HCMV-AD169 των LTBMCMCs 3^{ης} εβδομάδας και συλλογή των κυττάρων σταδιακά την 1^η, 2^η, 3^η, 5^η, 8^η, 11^η, 14^η, 20^η dpi. Τα κύτταρα παρακολουθούνταν καθημερινά σε ανάστροφο μικροσκόπιο.

Η μόνη διαφορά που εμφάνισαν τα στρωματικά κύτταρα με τα στρωματικά του μάρτυρα, ήταν μια ελαφριά πεπλάτυνση των μολυσμένων κυττάρων, τα οποία

όμως δεν οδηγήθηκαν σε λύση, αλλά ακολούθησαν παρόμοια πορεία, όπως τα στρωματικά του μάρτυρα. Η διαφορά στα NACs ήταν ότι στα μολυσμένα τρυβλία, τα κύτταρα μειωνόταν πιο αισθητά με την πάροδο των ημερών, συγκριτικά με αυτά του μάρτυρα και την 20^η dpi η διαφορά ήταν αντιληπτή και στο μικροσκόπιο. Μετά από μέτρηση σε πλάκα newbauer, βρέθηκε ότι τα NACs από τα μολυσμένα τρυβλία ήταν 9×10^3 , ενώ των μαρτύρων ήταν 15×10^3 .

Μετά από συλλογή τους τα κύτταρα των τρυβλίων αυτών φυγοκεντρήθηκαν στις 1800 rpm, για 7 λεπτά. Η πελέτα επαναδιαλύθηκε σε θρεπτικό IMDM και έγινε εκχύλιση του DNA που χρησιμοποιήθηκε σε PCR για ανίχνευση του γονιδιώματος του CMV. Τα αποτελέσματα της PCR φαίνονται στην Εικόνα 3.4.



Εικόνα 3.4

Εικόνα 3.5 Ανίχνευση B₂ μικροσφαιρίνης στα δείγματα της Εικόνας 3.4

Σύμφωνα με την Εικόνα 3.4, η παρουσία του ιού επιβεβαιώνεται, όμως παρατηρείται επίσης ότι μετά από την 5^η ημέρα, η ποσότητα του ιικού DNA είναι σταθερή, ο ιός δηλαδή οδηγείται σε λανθάνουσα κατάσταση και δεν πολλαπλασιάζεται.

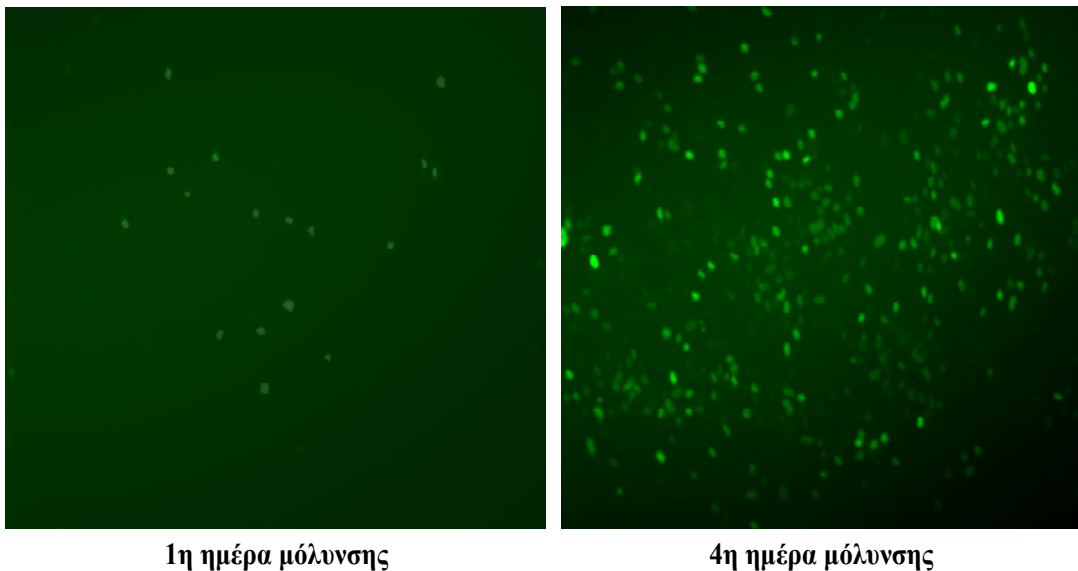
Αυτό είναι πολύ ενθαρρυντικό για την υπόθεσή μας, γιατί φαίνεται πως ο CMV μέσα στο αιμοποιητικό μικροπεριβάλλον του μυελού, όπως έχει αποδειχτεί και παλιότερα [26], μπορεί να οδηγηθεί σε λανθάνουσα κατάσταση.

Μετά από αυτήν τη διαπίστωση, αποφασίσαμε να προχωρήσουμε στη μόλυνση αντίστοιχων καλλιιεργειών με το ιικό στέλεχος HCMVEGFP-IE2, οπύ η IE-2 πρωτεΐνη του ιού που εκφράζεται κατά τη μεταγραφή είναι σημασμένη με GFP, ώστε να μπορούμε χρησιμοποιώντας ανάστροφο μικροσκόπιο ανοσοφθορισμού, να παρακολουθήσουμε την πορεία του CMV κατά τη μόλυνση των LTBMBCs.

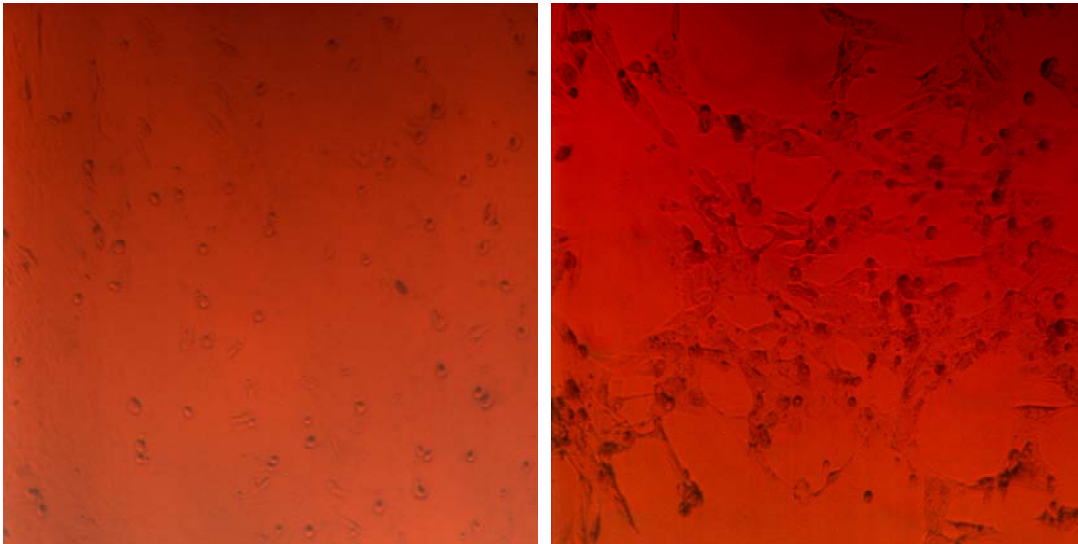
Το πείραμα αυτό, όπως έχει ήδη περιγραφεί στις μεθόδους, έγινε με τρεις διαφορετικούς τρόπους μόλυνσης:

1. μόνο των στρωματικών κυττάρων, απουσία των NACs, ώστε να επιβεβαιωθεί η μόλυνση των στρωματικών κυττάρων
2. σε πλήρης καλλιέργειες (στρωματικά κύτταρα + NACs)
3. μόνο των στρωματικών κυττάρων, απουσία των NACs, αλλά επαναφορά των NACs μετά από 2h από τη μόλυνση

Τα αποτελέσματα φαίνονται στις Εικόνες 3.6, 3.7, 3.8 και 3.9.



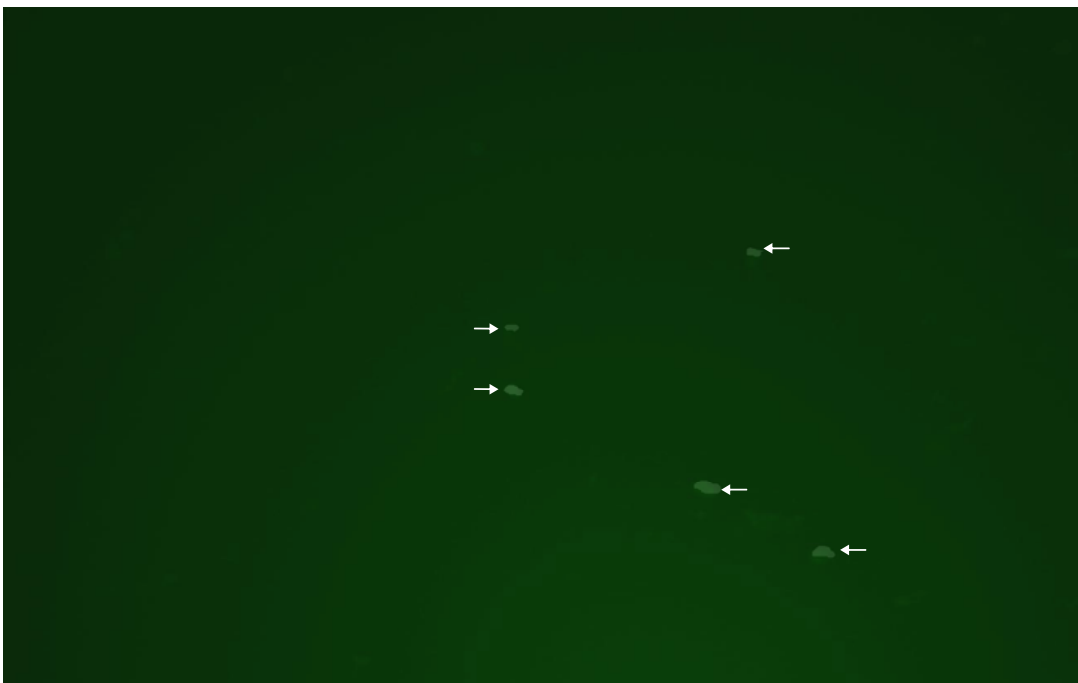
Εικόνα 3.6 Ενεργή μόλυνση των στρωματικών κυττάρων με τον ιό HCMVEGFP-IE2 σε φθορισμό



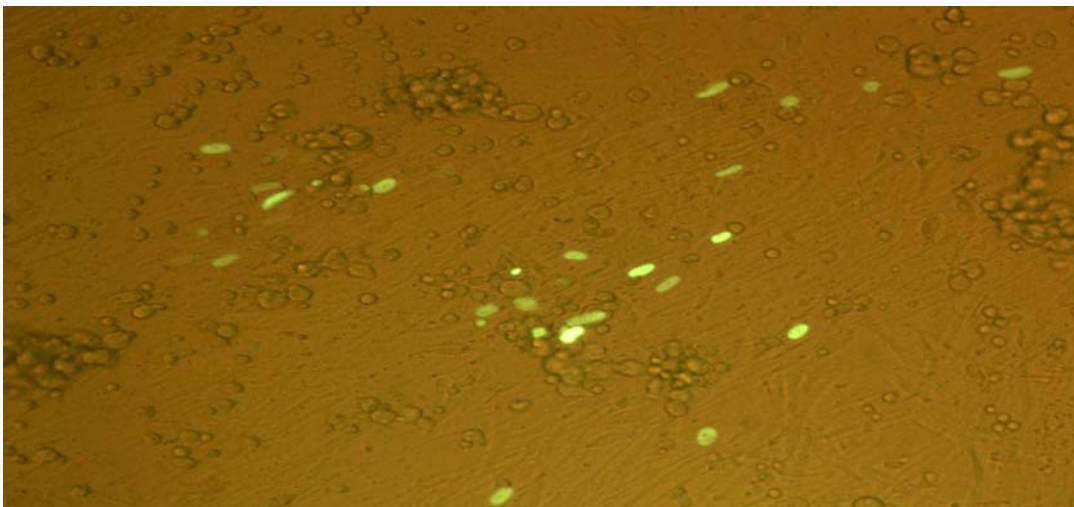
Μη μολυσμένα στρωματικά κύτταρα

Μολυσμένα κύτταρα 4 rid

Εικόνα 3.7 Ενεργή μόλυνση των στρωματικών κυττάρων με τον ιό HCMVEGFP-IE2 στο ορατό φως



Εικόνα 3.8 Αναστολή μόλυνσης των στρωματικών κυττάρων με τον ιό HCMVEGFP-IE2. Στρωματικά κύτταρα έχουν μολυνθεί με τον ιό HCMVEGFP-IE2 για 2h και ακολούθως τα NACs επανήλθαν στα αρχικά στρωματικά κύτταρα. Εικόνες ελήφθησαν 4 μέρες μετά τη μόλυνση.



Εικόνα 3.9 Στρωματικά κύτταρα έχουν μολυνθεί με τον ιό HCMV-IE2 για 2h και ακολούθως τα NACs επανήλθαν στα αρχικά στρωματικά κύτταρα. Εικόνες ελήφθησαν 4 μέρες μετά τη μόλυνση. Η μόλυνση περιορίζεται μόνο στα στρωματικά κύτταρα.

Όπως είναι φανερό, αυτό που παρατηρήσαμε είναι ότι:

i. Οι καλλιέργειες που περιείχαν μόνο στρωματικά κύτταρα εμφανίζουν ταχεία και εξαπλούμενη μόλυνση, η οποία τελικά οδηγεί σε λύση των κυττάρων. Δηλαδή, τα στρωματικά κύτταρα μολύνονται από τον ιό και δεν μπορούν να καταστείλουν τη μόλυνση ή να οδηγήσουν τον ιό σε λανθάνουσα κατάσταση, αλλά οδηγούνται σε λύση. Η παρατήρηση αυτή είναι συμβατή με έρευνες που δείχνουν ότι ο CMV μολύνει συνήθως κύτταρα, όπως ινοβλάστες, που αποτελούν βασικό δομικό στοιχείο του στρώματος του αιμοποιητικού μικροπεριβάλλοντος.

ii. Σε αντίθεση με τα παραπάνω, όταν μετά τη μόλυνση των στρωματικών κυττάρων γινόταν επαναφορά των NACs, τότε η μόλυνση περιοριζόταν αρκετά. Ελάχιστα κύτταρα φέρανε στον πυρήνα τους τη φθορίζουσα IE-2, σήμα αντιγραφής του ιού, η έκφραση αυτής μετά την 4^η dpi παρέμενε σταθερή και τα κύτταρα δεν οδηγούνταν σε λύση. Αυτή η παρατήρηση ήταν κοινή και για τους δύο τρόπους. Σημαντικό επίσης είναι ότι στις εικόνες του μικροσκοπίου φαίνεται πως η μόλυνση περιορίζεται στα στρωματικά κύτταρα και δεν περνάει στα NACs.

iii. Προηγούμενες μελέτες έχουν υποστηρίξει ότι τα CD34⁺ κύτταρα μολύνονται από τον ιό και τον διατηρούν σε λανθάνουσα κατάσταση [31,32], προφανώς όμως πρόκειται για πρόδρομες μορφές πριν αυτές δώσουν τα στρωματικά και τα μη προσκολλημένα αιμοποιητικά κύτταρα [33]. Όταν έχει γίνει

η φάση της διαφοροποίησης σε στρώμα και NACs, φαίνεται ότι η μόλυνση δεν περνάει από τα στρώματα στα υπερκείμενα. Φαίνεται, όμως, ότι η παρουσία των NACs και πιθανόν παράγοντες που εκκρίνονται από αυτά, εμποδίζουν τη μεταγραφή του ιού, οδηγώντας τον σε λανθάνουσα κατάσταση. Επίσης όμως, φαίνεται ότι η παρουσία του CMV, ακόμα και σε μικρή ποσότητα και σε λανθάνουσα κατάσταση στα στρωματικά κύτταρα, επηρεάζει τον αριθμό και την περαιτέρω διαφοροποίηση των NACs. Αυτό αποδείχτηκε όταν ελήφθησαν τα NACs την 4^η dpi από τις μολυσμένες και μη LTBMCMCs, μετρήθηκαν και μπήκαν σε STCs. Ο αριθμός των NACs των μολυσμένων καλλιιεργειών ήταν αισθητά πιο μικρός (18×10^4), από των μη μολυσμένων (26×10^4) και οι STCs των μολυσμένων NACs δεν έδωσαν καμία αποικία CFU-GM, ενώ αυτές των μη μολυσμένων, έδωσαν έστω και μία.

4. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ – ΣΥΖΗΤΗΣΗ

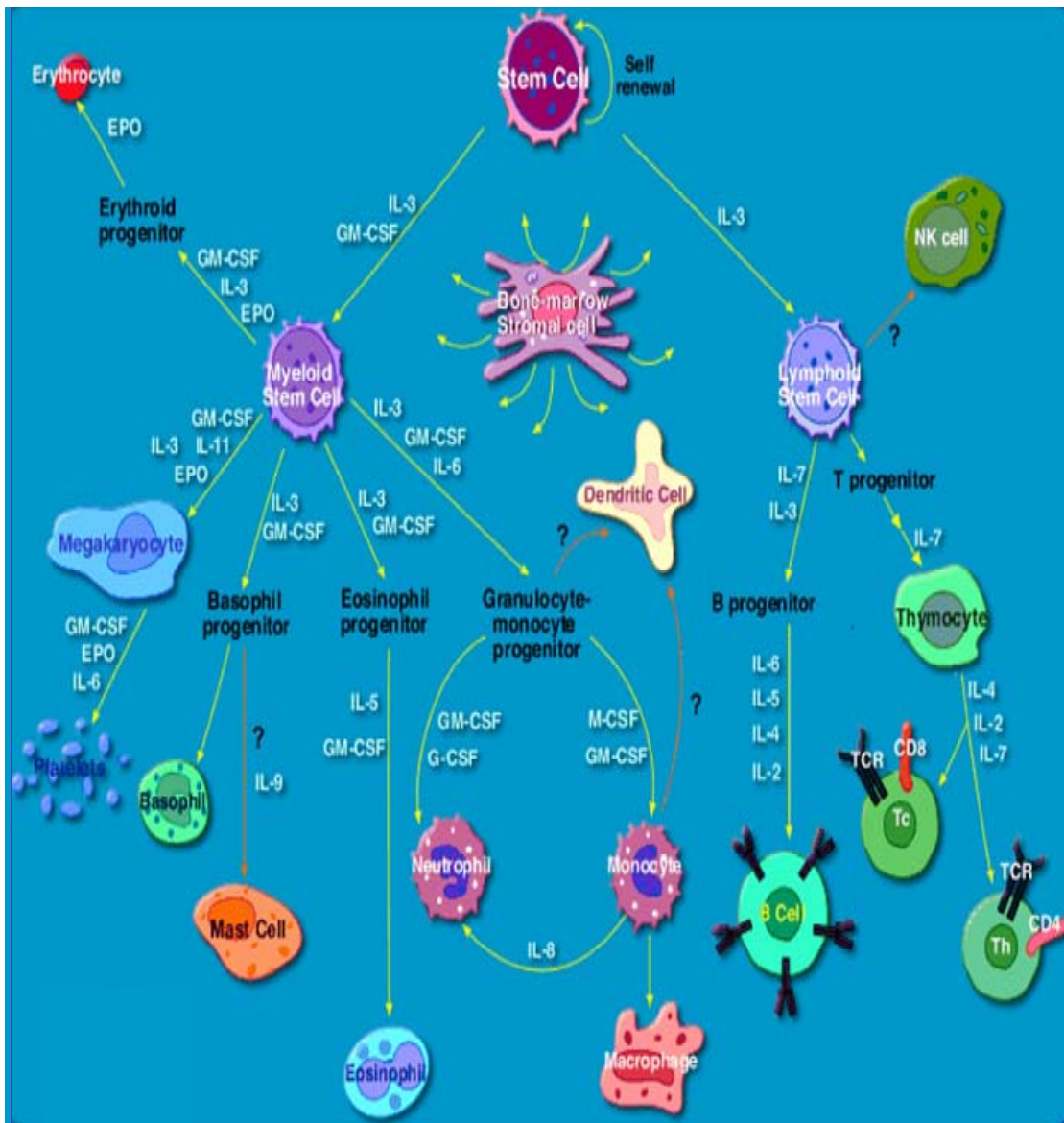
Προηγούμενες μελέτες πάνω στη Χρόνια Ιδιοπαθή Ουδετεροπενία (CIN) έχουν αποδείξει ότι στο μυελό των ασθενών με CIN υπάρχει μειωμένος αριθμός $CD34^+/CD33^+$ κυττάρων [34]. Επίσης ο αριθμός των CFU-GM αποικιών που προκύπτουν από τα κύτταρα αυτά σε καλλιέργειες STC είναι αισθητά μειωμένος συγκριτικά με αυτές που προκύπτουν από αυτά φυσιολογικών ατόμων. Αντίθετα ο αριθμός των πιο άωρων προγονικών κυττάρων $CD34^+/lin^-$ ($CD38^-$, $CD71^-$, $CD39^-$, $CD45RA^-$, $HLA-DR^-$) είναι φυσιολογικός επιβεβαιώνοντας τις προβλέψεις ότι μία αριθμητική ανωμαλία στο επίπεδο των άωρων προγονικών κυττάρων δεν αποτελεί την αιτία της ουδετεροπενίας.

Δοθέντος ότι οι ασθενείς με CIN δεν έχουν χρωμοσωμικές ανωμαλίες κάνει πιο λογική την αναζήτηση ως παθογενετικής αιτίας, τη διαταραχή στο μυελικό περιβάλλον. Το αιμοποιητικό μικροπεριβάλλον του μυελού (ΑΜΠ) υποστηρίζει την ανάπτυξη, τον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση των προγονικών κυττάρων με την παραγωγή κυτταροκινών (με επαγωγική ή ανασταλτική δράση) και με έκφραση μορίων προσκόλλησης, οπότε οι έρευνες στράφηκαν προς τη μελέτη του ΑΜΠ και των παραγόντων αυτών.

Βρέθηκε ότι τα στρωματικά κύτταρα ασθενών με CIN παράγουν επαρκείς συγκεντρώσεις G-CSF και GM-CSF [34], παράγοντες υπεύθυνοι για τη διαφοροποίηση των προγονικών αιμοποιητικών προς ουδετερόφιλα, αποκλείοντάς τους ως πιθανούς αιτιολογικούς παράγοντες.

Στα υπερκείμενα των LTBMBCs CIN ασθενών βρέθηκαν αυξημένα επίπεδα IL-6, TGF- β_1 , IL-1 β , TNF- α [17,18,19,34], όπως και αυξημένες συγκεντρώσεις άλλων φλεγμονωδών μορίων (IL-8, RANTES) [35,36]. Η IL-6 είναι μια κυτταροκίνη με πλειοτροπική δράση, εμπλέκεται στον πολλαπλασιασμό των αρχέγονων προγονικών κυττάρων, αλλά επίσης και στη διαφοροποίηση των δεσμευμένων μυελικών κυττάρων [37,38]. Παράγεται από τους ινοβλάστες και η βασική της έκκριση αυξάνεται σε συνθήκες φλεγμονής [39,40]. Ο TGF- β_1 , γνωστός αναστολέας της μυελοποίησης και γενικότερα της αιμοποίησης, καταστέλλει, στο επίπεδο των δεσμευμένων για τη μυελική σειρά προγονικών κυττάρων, τους

υποδοχείς για τους GM-CSF, G-CSF, IL-3 και IL-1 [41,42]. Η σχέση της συγκέντρωσης του TGF-β₁ και του αριθμού των CD34⁺/CD33⁺ είναι αντιστρόφως ανάλογη (επιβεβαιώνοντας το χαμηλό αριθμό αυτών των κυττάρων στους CIN ασθενείς), εμπλέκοντας έτσι τον TGF-β₁ στην παθογένεια της CIN. Παράλληλα, οι αυξημένες συγκεντρώσεις της IL-1β και του TNF-α, τόσο στα υπερκείμενα των LTBMMSs, όσο και στον ορό των ασθενών, συμβαδίζουν με την αύξηση του TGF-β₁, γιατί η IL-1β είναι από τους βασικούς επαγωγείς της IL-6 και του TGF-β₁.



Εικόνα 4.1 Διαφοροποίηση μυελικών προγονικών κυττάρων

Οι αυξημένες συγκεντρώσεις όλων αυτών των κυττοκινών οδήγησαν στην υπόθεση της παρουσίας μιας χρόνιας φλεγμονώδους διεργασίας στο μυελό των ασθενών. Η IL-1β, παραγόμενη από μία ήπια, χρόνια φλεγμονώδη διεργασία, επάγει τα στρωματικά κύτταρα να εκκρίνουν επαγωγείς και αναστολείς της μυελοποίησης. Μια τέτοια φλεγμονή θα μπορούσε να οφείλεται σε ιούς, μια και αυτοί μπορούν να εισέλθουν και να παραμείνουν στον οργανισμό σε λανθάνουσα κατάσταση.

Με βάση τα παραπάνω ευρήματα, διερευνήθηκε η παρουσία και πιθανή επίπτωση των ερπητοϊών στους ασθενείς με CIN. Βρέθηκε ότι οι ερπητοϊοί εντοπίζονται σε αυξημένη συχνότητα στους ασθενείς, συγκριτικά με τους μη ουδετεροπενικούς μάρτυρες και συγκεκριμένα ο CMV (55,5% έναντι 0% στους μάρτυρες). Στην παρούσα μελέτη το ποσοστό αυτό επιβεβαιώθηκε (57% έναντι 0% στους μάρτυρες). Επίσης, είναι γνωστό ότι η απάντηση των μονοκύτταρων σε CMV μόλυνση, είναι η αυξημένη έκκριση IFN-α/β, TNF-α και IL-1β [43,44,45].

Έρευνες που αφορούν στον CMV, έχουν δείξει ότι η μόλυνση μυελοκυττάρων είναι εφικτή και μάλιστα ο ιός βρίσκεται σε λανθάνουσα κατάσταση [46]. Ο CMV μολύνει τα T λεμφοκύτταρα, τα στρωματικά του μυελού και τα CD34⁺/CD33⁺ και οδηγείται σε λανθάνουσα κατάσταση, ενώ στους ινοβλάστες και τα μακροφάγα οδηγείται σε λυτικό κύκλο [27,31].

Όλα αυτά σε συνδυασμό με την αυξημένη εντόπιση του CMV στους CIN ασθενείς, μας οδήγησαν στην περαιτέρω διερεύνηση της πιθανής εμπλοκής του CMV στην παθογένεια της CIN.

Αρχικά προσπαθήσαμε να διερευνήσουμε την παρουσία του CMV σε διαφορετικές κυτταρικές σειρές. Με τη μέθοδο της PCR, ανιχνεύσαμε τον CMV στο DNA των κυττάρων του ολικού μυελού και σε αυτό των στρωματικών κυττάρων, σε 12 από τους 21 ασθενείς. Δεν ανιχνεύθηκε καθόλου στους υποπληθισμούς των CD34⁺, CD14⁺ και CD3⁺ κυττάρων, ενώ στις περισσότερες περιπτώσεις δεν ανιχνεύτηκε ούτε στο περιφερικό αίμα των ασθενών, κάτι το οποίο έχει παρατηρηθεί και σε άλλες μελέτες: δηλαδή ασθενείς που δεν εμφανίζουν τον ιό στο αίμα και δεν εμφανίζουν αντισώματα για αυτόν στον ορό, να εμφανίζουν τον ιό στο μυελό [33]. Από τα ιστορικά των ασθενών μας, φαίνεται ότι κανένας δεν εμφάνιζε IgM για τον CMV, ενώ κάποιοι είχαν IgG. Αυτό δείχνει ότι η μόλυνση

ήταν χρόνια και υποστηρίζει την υπόθεση μας. Συμπερασματικά, το γεγονός ότι κάποιοι ασθενείς είχαν θετική PCR για CMV στο μυελό, όχι όμως στο αίμα και δεν είχαν και αντισώματα έναντι του ιού, συμβαδίζει με την υπόθεση ότι η μόλυνση είναι ήπια, χρόνια και λανθάνουσα, με άλλα λόγια θα μπορούσαμε να την χαρακτηρίσουμε εγκλωβισμένη στο μυελό [33].

Το γεγονός ότι τα CD34⁺ δεν εμφάνισαν CMV έρχεται σε αντίθεση με τα μέχρι τώρα δεδομένα, της παρουσίας του ιού σε λανθάνουσα κατάσταση σε αυτά [27,31]. Όμως, με βάση νεότερες μελέτες [33], φαίνεται ότι ο CMV μολύνει και παραμένει σε λανθάνουσα κατάσταση στις πιο άωρες προγονικές μορφές των CD34⁺ όταν αυτά είναι ακόμα προσκολλημένα στο στρώμα, πριν διαφοροποιηθούν σε NACs.

Τα δικά μας πειράματα μολύνσεων έδειξαν ότι ο CMV έχει την ικανότητα να μολύνει τα στρωματικά κύτταρα και να τα οδηγεί σε λύση, όταν απουσιάζουν τα NACs. Αντίθετα, όταν είναι παρόν τα NACs, η μόλυνση περιορίζεται και ο CMV οδηγείται σε λανθάνουσα κατάσταση. Οι εικόνες στο μικροσκόπιο φθορισμού έδειξαν επίσης ότι η μόλυνση περιορίζεται καθαρά στα στρωματικά κύτταρα και δεν περνά στα NACs. Αυτό ίσως δικαιολογεί και την απουσία του DNA του CMV στα CD34⁺ των BMMCs των θετικών για CMV στο μυελό ασθενών.

Είναι γνωστό ότι ο τρόπος μετάδοσης του ιού είναι η κυτταρική επαφή. Αυτός, επομένως μπορεί να είναι και ο λόγος που η μόλυνση δε φτάνει στα NACs. Έτσι, βάσει των ευρημάτων μας, θα μπορούσαμε να υποθέσουμε το εξής μοντέλο: όταν μολύνονται τα στρωματικά κύτταρα, η μόλυνση μεταδίδεται και στους ινοβλάστες, οι οποίοι αποτελούν μεγάλο μέρος των στρωματικών κυττάρων, οπότε ο ιός οδηγείται σε λυτικό κύκλο. Όταν, όμως, είναι παρόν τα NACs, η μόλυνση αυτή περιορίζεται πολύ πριν φτάσει στους ινοβλάστες, μόνο σε κύτταρα, όπως τα ενδοθηλιακά, τα οποία δρουν ως «αποθήκες» του ιού με αποτέλεσμα να παγιδεύεται εκεί σε λανθάνουσα κατάσταση [26]. Πράγματι οι αναλύσεις που έγιναν με τη χρήση μικροσκοπίου έδειξαν ότι, στις καλλιέργειες των LTBMMCs με NACs, τα ελάχιστα κύτταρα που ήταν μολυσμένα, δεν ήταν ινοβλάστες.

Σύμφωνα με τα παραπάνω, φαίνεται πως τα NACs με κάποιον άγνωστο μηχανισμό, ίσως μέσω κάποιων παραγόντων που εκκρίνουν, περιορίζουν και παγιδεύουν τον ιό σε λανθάνουσα κατάσταση μέσα στα στρωματικά κύτταρα.

Παράλληλα όμως, η παρουσία του ιού στα στρωματικά κύτταρα, οδηγεί στην ενεργοποίηση τους και την απελευθέρωση από αυτά κυττοκινών, ανασταλτικών για την αιμοποίηση, εμποδίζοντας την περαιτέρω διαφοροποίηση των NACs προς CFU-GM αποικίες (όπως φάνηκε από τις βραχυχρόνιες καλλιέργειες-STC).

Είδαμε λοιπόν, ότι στην *in vitro* αναπαράσταση του AMΠ και της μόλυνσής του από τον CMV, η υπόθεση για τη χρόνια φλεγμονή και την εμπλοκή της στη διαφοροποίηση των NACs επαληθεύεται.

Συμπερασματικά, θα μπορούσαμε να πούμε ότι δεν είναι απίθανο ο CMV να εμπλέκεται στην παθογένεια της CIN. Οι ασθενείς με CIN μπορεί να έχουν μολυνθεί στο παρελθόν χωρίς να νοσήσουν και η χρόνια παρουσία του ιού στο μυελό να οδηγεί στην CIN. Πρέπει, όμως, να ξεκαθαρίσει τελείως ο τρόπος με τον οποίο εμποδίζεται η αναπαραγωγή του CMV στα στρωματικά κύτταρα και οδηγείται ο ιός σε λανθάνουσα κατάσταση. Για το λόγο αυτό τα υπερκείμενα από τις μολυσμένες καλλιέργειες, που περιέχουν τόσο τους εκκρινόμενους παράγοντες από το στρώμα, όσο και από τα NACs, έχουν συλλεχθεί και θα αποτελέσουν το υλικό για περαιτέρω μελέτες σε μια προσπάθεια πλήρους διερεύνησης της εμπλοκής του CMV στην παθογένεια της CIN.

5. ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

1. **ΑΜΠ** = Αιμοποιητικό μικροπεριβάλλον του μυελού των οστών.
2. **BSA** = Bovine Serum Albumin.
3. **CD3** = Αντιγονική μεμβρανική πρωτεΐνη που εκφράζεται στα Τ λεμφοκύτταρα.
4. **CD14** = Αντιγονική μεμβρανική πρωτεΐνη που εκφράζεται στα μονοκύτταρα, κοκκιοκύτταρα και δενδριτικά κύτταρα.
5. **CD34** = Αντιγονική μεμβρανική πρωτεΐνη που εκφράζεται στα αρχέγονα αιμοποιητικά, στα προγονικά αιμοποιητικά κύτταρα και στα ενδοθηλιακά κύτταρα των τριχοειδών αγγείων.
6. **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. μεθλοκυτταρίνη) σχηματίζει αποικίες προδρόμων κυττάρων του αίματος.
7. **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 κοκκιδώδους σειράς. Απ' την διαφοροποίησή του προέρχεται ο μυελοβλάστης.
8. **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.
9. **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.
10. **CIN** = Chronic Idiopathic Neutropenia. «Χρόνια Ιδιοπαθής Ουδετεροπενία».
11. **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.

12. **FCS** = Fetal Calf Serum. Ο όρος εμβρύου αγελάδας χρησιμοποιείται σαν συστατικό του θρεπτικού υλικού στις καλλιέργειες των αιμοποιητικών κυττάρων.
13. **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.
14. **IMDM** = Iscove's Modified Dulbeco's Medium. Θρεπτικό υγρό ισότονο με τα φυσιολογικά κύτταρα. Είναι εμπλουτισμένο με πολλά θρεπτικά συστατικά και έχει πολλές εφαρμογές σε καλλιέργειες.
15. **LTBMMC 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.
16. **NAC** = Non Adherence cell. Μη προσκολλημένα κύτταρα.
17. **Pluripotent stem cells** = Αρχέγονο πολυδύναμο προγονικό κύτταρο.
18. **Stem cells** = Προγονικά κύτταρα. Πρόκειται για τα P-HSC και pM-HSC αρχέγονα κύτταρα της αιμοποιητικής ιεραρχίας.
19. **TGF-β**= Transforming Growth Factor-β. «Αυξητικός παράγοντας μεταμόρφωσης». Κυτταροκίνη που αποτελεί σημαντικό ανασταλτικό παράγοντα πολλαπλασιασμού προγονικών κυττάρων (ιδιαίτερα του CFU-Mix).
20. **TNF-α** = Tumor Necrosis Factor-α. Ο «παράγοντας νέκρωσης όγκων» Αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό των αιμοποιητικών προγονικών κυττάρων,

6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. <http://www.emedicine.com/med/topic1640.htm>
2. http://www.neutropenia.ca/about/types_of_neutropenia.html
3. Φυσιολογία και Φυσιοπαθολογία του Αίματος και των Αιμοποιητικών Οργάνων, Γεώργιος Ηλιόπουλος, 3^η έκδοση, Ιατρικές εκδόσεις Π.Χ. Πασχαλίδης.
4. Νοσολογία CECIL, Φυσιοπαθολογία-Διάγνωση-Θεραπεία, Goldman-Bennett, Γεν. Επιμέλεια Ρούσσοσ Χ., Ιατρικές εκδόσεις Π.Χ. Πασχαλίδης.
5. Heuser M, Ganser A. Colony- stimulating factors in the management of neutropenia and its complications. *Annals of Hematology*. 2005 July; 10.1007/s0027-005-1087-4. Review Article.
6. Papadaki HA, Palmblad J, Eliopoulos GD. Non-immune chronic idiopathic neutropenia of adult: an overview. *Eur J Haematol* 2001; 67: 35–44.
7. Kyle RA, Linman JW. Chronic idiopathic neutropenia: a newly recognized syndrome? *N Engl J Med* 1968;279:1015–1019.
8. Haddy TB, Rana SR, Castro O. Benign ethnic neutropenia: What is a normal absolute neutrophil count? *J Lab Clin Med* 1999;133:15–22.
9. Dale DC, Guerry D, Wewerka J, Bull J, Chusid M. Chronic neutropenia. *Medicine (Baltimore)* 1979;58:128–144.
10. Sievers EL, Dale DC. Non-malignant neutropenia. *Blood Rev* 1996;10:95–100.
11. Kyle RA, Linman JW. Gingivitis and chronic idiopathic neutropenia: report of two cases. *Mayo Clin Proc* 1970; 45:494–504.
12. Kamma JJ, Lygidakis NA, Nakou M. Subgingival microflora and treatment in prepubertal periodontitis associated with chronic idiopathic neutropenia. *J Clin Periodontol* 1998;25: 759–765.
13. Papadaki HA, Margioris AN, Miliaki M, Steriopoulos C, Valatas V, Eliopoulos GD. Chronic idiopathic neutropenia of adults is associated with decreased bone mineral density and alterations in bone turnover biochemical markers. *Eur J Haematol* 1999;62:311–316.
14. Papadaki HA, Chatzivassili A, Stefanaki K, Kouamaki V, Kanavaros P, Eliopoulos GD. Morphologically defined myeloid cell compartments,

lymphocyte subpopulations and histological findings of bone marrow in patients with nonimmune chronic idiopathic neutropenia of adults. *Ann Hematol* 2000;79:563–570.

15. Papadaki HA, Coulocheri S, Xylouri I, Chatzivassili A, Konsolas J, Katrinakis G, Karkavitsas N, Eliopoulos GD. Defective natural killer cell activity of peripheral blood lymphocytes correlates with the degree of neutropenia in patients with chronic idiopathic neutropenia of adults. *Ann Hematol*. 1998 Mar-Apr;76(3-4):127-34.
16. Papadaki HA, Coulocheri S, Eliopoulos GD. Patients with chronic idiopathic neutropenia of adults have increased serum concentrations of inflammatory cytokines and chemokines. *Am J Hematol*. 2000 Dec;65(4):271-7.
17. Papadaki HA, Eliopoulos GD. Enhanced neutrophil extravasation may be a contributing factor in the determination of Papadaki et al. neutropenia in patients with chronic idiopathic neutropenia of adults. *Eur J Haematol* 1998;61:272–277.
18. Papadaki HA, Katrinakis G, Eliopoulos AG, Coulocheri S, Alexandrakis M, Eliopoulos GD. Low numbers of peripheral blood natural killer cells in patients with chronic idiopathic neutropenia of adults are probably due to enhanced extravasation into the tissues. *Haema* 1998;1:33–40.
19. Papadaki HA, Palmblad J, Kapsimali V, Anagnou NP, Eliopoulos GD. Increased serum IgA and decreased IgG3 strongly correlate with increased serum levels of TGF- β 1 in patients with non-immune chronic idiopathic neutropenia of adults. *Eur J Haematol* 2000;65:237–244.
20. Sakamaki S, Hirayama Y, Matsunaga T, Kuroda H, Kusakabe T, Akiyama T, Konuma Y, Sasaki K, Tsuji N, Okamoto T, Kobune M, Kogawa K, Kato J, Takimoto R, Koyama R, Niitsu Y. Transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1) induces thrombopoietin from bone marrow stromal cells, which stimulates the expression of TGF- β receptor on megakaryocytes and, in turn, renders them susceptible to suppression by TGF- β itself with high specificity. *Blood* 1999 Sep 15; 94(6):1961-70.
21. Papadaki HA, Eliopoulos GD, Coulocheri SA, Spyropoulou M, Stavropoulos-Giokas C. Increased frequency of HLA-DRB1*1302 haplotype in patients with nonimmune chronic idiopathic neutropenia of adults. *Blood*. 2001 Jan 15;97(2):580-1.
22. Papadaki HA, Horwitz M, Coulocheri SA, Person RA, Benson KF, Eliopoulos GD. Low levels of serum elastase are not associated with mutations in ELA-2 elastase encoding gene in chronic idiopathic neutropenia. *Blood*. 2003 Apr 1;101(7):2898-9.

23. Papadaki HA, Kosteas T, Gemetzi C, Christoforidou A, Anagnou NP, Eliopoulos GD. Low serum gamma-glutamyltranspeptidase (GGT) in patients with chronic idiopathic neutropenia is not implicated in the pathophysiology of the disease. *Haematologica*. 2003 Nov;88(11):ELT32.
24. Papadaki HA, Stamatopoulos K, Damianaki A, Gemetzi C, Anagnostopoulos A, Papadaki A, G. Eliopoulos and G. D. Eliopoulos. Activated T-lymphocytes with myelosuppressive properties in patients with chronic idiopathic neutropenia. *British Journal of Haematology*. Volume 128 Issue 6 Page 863 - March 2005.
25. <http://www-micro.msb.le.ac.uk/3035/Herpesviruses.html>
26. Streblow DN, Nelson JA. Models of HCMV latency and reactivation. *Trends in Microbiol*. 11:293-295, 2003
27. Taylor-Weideman, J. et al. (1991) Monocytes are a major site of persistence of human cytomegalovirus in peripheral blood mononuclear cells. *J. Gen. Virol*. 72, 2059–2064.
28. Kondo K. et al. (1994) Human cytomegalovirus latent infection of granulocyte-macrophage progenitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91, 11879–11883.
29. Michelsona S, Rohrlich P, Beissera P, Laurenta L, Perretc E, Prévostc M, Monchatred E, Duvale M, Marolleauf J, Charbordg P. Human cytomegalovirus infection of bone marrow myofibroblasts enhances myeloid progenitor adhesion and elicits viral transmission. *Microbes and Infection*, 3, 2001, 1005–1013.
30. Goodrum F, Jordan CT, Terhune SS, High K, Shenk T. Differential outcomes of human cytomegalovirus infection in primitive hematopoietic cell subpopulations. *Blood*, 1 August 2004, Volume 104, Number 3, 687-695.
31. Von Laer D. et al. (1995) Detection of cytomegalovirus DNA in CD34⁺ cells from blood and bone marrow. *Blood* 86, 4086–4090.
32. Zhuravskaya T, Maciejewski JP, Netski DM, Bruening E, Mackintosh FR, Jeor St S. Spread of Human Cytomegalovirus (HCMV) After Infection of Human Hematopoietic Progenitor Cells: Model of HCMV Latency. *Blood*, Vol 90, No 6 (September 15), 1997: pp 2482-2491.
33. Khaiboullina SF, Maciejewski JP, Crapnell K, Spallone PA, Stock AD, Pari GS, Zanjani ED, Jeor St S. Human cytomegalovirus persists in myeloid

progenitors and is passed to the myeloid progeny in a latent form. 2004 Blackwell Publishing Ltd, *British Journal of Haematology*, 126, 410–417.

34. Papadaki HA, Giouremou K, Eliopoulos GD. Low frequency of myeloid progenitor cells in chronic idiopathic neutropenia of adults may be related to increased release of TGF- β 1 by bone marrow stromal cells. *Eur J Haematol* 1999;63:154–162.
35. 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.
36. Wright EG, Pragnell IB. Stem cell proliferation inhibitors. *Baillieres Clin Haematol* 1992; 5: 723-739.
37. 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.
38. 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.
39. 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.
40. 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.
41. Hirano T. The biology of Interleukin-6. In, Kishimoto T (ed), *Interleukins: Molecular Biology and Immunology*. Basel: Karger, 1992. pp 153-180.
42. 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.
43. Evers DL, Wang X, Huang E-S. Cellular stress and signal transduction responses to human cytomegalovirus infection. *Microbes and Infection* 6 (2004) 1084–1093.

44. Yurochko AD, Huang E-S. Human cytomegalovirus binding to human monocytes induces immunoregulatory gene expression, *J. Immunol.* 162 (1999) 4806–4816.
45. Baillie J, Sahlender DA, Sinclair JH. Human cytomegalovirus infection inhibits tumor necrosis factor alpha (TNF- α) signaling by targeting the 55-kilodalton TNF-alpha receptor, *J. Virol.* 77 (2003) 7007–7016.
46. Cheung AKL, Abendroth A, Cunningham AL, Slobedman B. Viral gene expression during the establishment of human cytomegalovirus latent infection in myeloid progenitor cells. *Blood*, 1 December 2006, Vol. 108, No. 12, pp. 3691-3699.