



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ**

*Εργαστήριο Μελέτης της Αιμοποίησης
Διευθύντρια Παπαδάκη Α Ελένη*

Εκπόνηση Διδακτορικής Διατριβής
Της **ΓΕΜΕΝΤΖΗ ΚΛΑΥΔΙΑΣ**

**«Διερεύνηση του μηχανισμού της
Λεμφοπενίας σε πάσχοντες από Χρόνια
Ιδιοπαθή Ουδετεροπενία»**

**Επιβλέπουσα
Παπαδάκη Ελένη
Καθηγήτρια Αιματολογίας**

Ηράκλειο 2013

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Με συγκίνηση θα ήθελα να απευθύνω ένα μεγάλο ευχαριστώ σε όλους τους ανθρώπους που στάθηκαν δίπλα μου και με στήριξαν όλα αυτά τα χρόνια, τους φίλους και συνεργάτες μου στο Εργαστήριο, στην Κλινική και στην Ιατρική Σχολή του Πανεπιστημίου Κρήτης.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ στά «δικά μου παιδιά» Αθηνά Δαμιανάκη και Ειρήνη Μαυρουδή για την αμέριστη συμπαράστασή τους, που μέσα από τη ζωντάνια, την αγάπη και τις γνώσεις τους, με βοήθησαν να ανταπεξέρθω σε κάθε δυσκολία.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα την κα Χουλιάκη Χριστιάννα για την βοήθεια της, καθώς και την κα Κουταλά Ελένη για τη ζωντανή συναδελφική μας σχέση και τη συνδρομή της στην εκπόνηση της παρούσας εργασίας.

Μα πάνω από όλα, με απέραντη ευγνωμοσύνη θα ήθελα να ευχαριστήσω ολόθερμα την κα Παπαδάκη Ελένη, καθηγήτρια Αιματολογίας για την τιμή που μου έκανε να μου εμπιστευθεί την παρούσα Διδακτορική Διατριβή. Η συμπαράστασή της όλα αυτά τα χρόνια, η σημαντική βοήθειά της και τα κίνητρα που μου παρείχε με βοήθησαν να ολοκληρώσω την Διδακτορική μου Διατριβή, παρά τις όποιες δυσκολίες.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1. ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ (σελ 2)
2. ABSTRACT (σελ 4)
3. ΠΕΡΙΛΗΨΗ (σελ 5-8)
4. ΕΙΣΑΓΩΓΗ (σελ 9-23)
5. ΧΡΟΝΙΑ ΙΔΙΟΠΑΘΗΣ ΟΥΔΕΤΕΡΟΠΕΝΙΑ (σελ 24-25)
6. ΛΕΜΦΟΠΕΝΙΑ ΣΤΗ ΧΡΟΝΙΑ ΙΔΙΟΠΑΘΗ
ΟΥΔΕΤΕΡΟΠΕΝΙΑ (σελ 26)
7. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ (σελ 27)
8. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....(σελ 28-45)
9. ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ(σελ 45)
10. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ(σελ 46-63)
11. ΣΥΝΟΨΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ(σελ 64-65)
12. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....(σελ 66-72)
13. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΑΝΑΦΟΡΕΣ(σελ 73-78)
14. ΠΡΩΤΟΤΥΠΗ ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΗ (σελ 79)

ABSTRACT

Objectives: Chronic idiopathic neutropenia (CIN) is a disorder of granulopoiesis characterised by presence of activated T-lymphocytes that induce/sustain apoptosis of bone marrow (BM) granulocytic progenitors. T-cell lymphopenia is commonly found in CIN. The aim of the study is to probe the mechanisms underlying T-cell lymphopenia in CIN.

Methods: We investigated parameters of T-cell homeostasis namely the proliferation/apoptotic rate of naive and memory T-cells, the T-cell senescence by telomere measurement, the recent thymic T-cell production through quantification of T-cell receptor rearrangement excision circles (TRECs), and the production of interleukin (IL-7).

Results: CIN patients (n=44) displayed lower proportion of naïve CD45RA⁺ cells within the CD4⁺ and CD8⁺ cells compared to controls (n=15). The proportion of apoptotic cells within the CD8⁺ fraction was higher in patients compared to controls and was correlated with the percentage of Ki-67⁺ cells indicating an activation-induced accelerated CD8⁺ cell death. The TREC content of CD4⁺ and CD8⁺ cells was lower in patients compared to controls and was correlated with the proportion of CD45RA⁺ CD4⁺ and CD8⁺ cells and with the levels of serum and BM IL-7 which were significantly decreased in the patients. The mean relative telomere length of CD4⁺ and CD8⁺ cells was significantly lower in CIN patients compared to age-matched controls.

Conclusions: The aberrant T-cell expansions associated with the pathogenesis of CIN result in increased proliferation/apoptosis and possibly exhaustion of PB T-cells which, in association with the inadequate compensatory thymic export of new TREC expressing T-cells partially due to IL-7 deficiency, may contribute to lymphopenia in CIN.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η Χρόνια ιδιοπαθής Ουδετεροπενία (Chronic Idiopathic Neutropenia; CIN) είναι μια επίκτητη διαταραχή της κοκκιοποίησης και χαρακτηρίζεται από παρατεταμένη και ανεξήγητη μείωση των ουδετεροφίλων [Dale DC, *Medicine*, 1979]. Η παθοφυσιολογία της νόσου έγκειται στη διαταραχή της κοκκιοποίησης λόγω του αυξημένου ποσοστού ενεργοποιημένων Τ-κυττάρων στο μυελό των οστών και την ακόλουθη παραγωγή ανασταλτικών κυτταροκινών και προαποπτωτικών μορίων [Papadaki HA, *Blood*, 2003] [Papadaki HA, *Br J Haematol*, 2005]. Ωστόσο, το αυξημένο ποσοστό των διεγερμένων Τ λεμφοκυττάρων μπορεί να σημαίνει ότι υπάρχει πιθανότητα αυξημένης απόπτωσης των κυττάρων αυτών, το οποίο θα μπορούσε να οδηγήσει σε αντιρροπιστική αύξηση του πολλαπλασιασμού των περιφερικών Τ-λεμφοκυττάρων και αυξημένη, κατά το δυνατό, παραγωγή Τ-λεμφοκυττάρων από τον θύμο αδένα προκειμένου να διατηρηθεί η ομοιόσταση του Τ-κυτταρικού διαμερίσματος .

Κατά τη φάση παραγωγής των Τ-λεμφοκυττάρων στον θύμο, τα προερχόμενα από τον μυελό των οστών προγονικά Τ-κύτταρα μεταναστεύουν στον θύμο όπου εκπτύσσονται και ωριμάζουν. Μία εναλλακτική οδός, και με δεδομένο ότι η παραγωγή στον θύμο μειώνεται λόγω ηλικίας, είναι η ταχεία κυτταρική διαίρεση των ώριμων Τ-κυτταρικών κλώνων διαδικασία που ονομάζεται «ομοιοστατική περιφερική έκπτυξη» (homeostatic peripheral expansion, HPE) και η οποία χρησιμεύει όχι μόνο για την αύξηση του αριθμού των Τ-κυττάρων αλλά και για τη διατήρηση του ρεπερτορίου των Τ-λεμφοκυττάρων στον μεγαλύτερο δυνατό βαθμό [Guimond M, *J.of Immunotherapy*, 2005] [Williams KM, *Best Pract res Clin.Haematol*.2008]. Πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι η κύρια κυτταροκίνη που επάγει την παραγωγή των Τ-λεμφοκυττάρων στον θύμο, αλλά και τον πολλαπλασιασμό τους και την επιβίωσή τους στην περιφέρεια, συμβάλλοντας ουσιαστικά στη ρύθμιση της ομοιόστασης του διαμερίσματος των Τ-κυττάρων, είναι η IL-7 (interleukin-7) [Poncel F, *J.Leukoc. Biol.*2005][Fry Tj., *Trends Immunol* 2001] [Fry Tj., *Blood*, 2002][Ponchel. *Clin. Chim. Acta* 2011].

Η κυτταροκίνη αυτή παράγεται κυρίως από τὰ στρωματικά κύτταρα του μυελού των οστών και από τα επιθηλιακά κύτταρα του θύμου αδένου και η παραγωγή της καταστέλλεται από τον TGF-β1 (Transforming Growth Factor –β1) [Fry Tj, Blood, 2001]. Ας σημειωθεί ότι ο TGF-β1 βρίσκεται σε αυξημένα επίπεδα στο μικροπεριβάλλον του μυελού των οστών ασθενών με χρόνια ιδιοπαθή ουδετεροπενία (chronic idiopathic neutropenia, CIN) [Papadaki HA, Eur J Haematol. 1999]

Το 37% των ασθενών με CIN έχουν μικρότερο αριθμό κυκλοφορούντων λεμφοκυττάρων στο αίμα συγκριτικά με υγιή άτομα ίδιου φύλου και αναλόγου ηλικίας. Η παρατηρούμενη λεμφοπενία αφορά κυρίως τη μείωση του αριθμού των T-λεμφοκυττάρων και σε μικρότερο βαθμό των NK-κυττάρων αλλά όχι και των B-κυττάρων. Επιπλέον, υπάρχει θετική συσχέτιση μεταξύ του αριθμού των κυκλοφορούντων λεμφοκυττάρων και του αριθμού των κυκλοφορούντων ουδετερόφιλων στο αίμα των ασθενών. [Kyriakou D, Ann Hematol, 1997] [Papadaki

ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Ο σκοπός της μελέτης αυτής ήταν η διερεύνηση των μηχανισμών της παρατηρούμενης **λεμφοπενίας** σε ασθενείς με CIN και συγκεκριμένα, ο έλεγχος της παραγωγής ανοσολογικά παρθένων T-κυττάρων στο θύμο και η απόπτωση αυτών στην περιφέρεια, καθώς και τα χαρακτηριστικά γήρανσης των περιφερικών T-κυττάρων σε συνδυασμό με την T-κυτταρική παραγωγή στο θύμο αδένου σε ασθενείς με αυστηρά καθορισμένα διαγνωστικά κριτήρια της νόσου.

ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Μελετήθηκαν 44 ασθενείς με CIN, 8 άνδρες και 36 γυναίκες ηλικίας 34-73 ετών (διάμεση ηλικία 43 έτη), που πληρούσαν τα διαγνωστικά κριτήρια της νόσου [Papadaki HA, Blood, 2003]. Συγκεκριμένα οι ασθενείς είχαν αριθμό κυκλοφορούντων ουδετερόφιλων μικρότερο των $1800 \times 10^6/L$ (μέση τιμή $1325 \pm 321 \times 10^6/L$, εύρος $600-1700 \times 10^6/L$) για χρονικό διάστημα 37-208 μηνών (διάμεσο διάστημα 60 μηνών). Επίσης, οι ασθενείς δεν είχαν ιστορικό υποκείμενης νόσου που θα μπορούσε να σχετίζεται με ουδετεροπενία όπως

αποδείχτηκε με ενδεδειγμένο κλινικοεργαστηριακό έλεγχο, δεν είχαν ιστορικό πρόσφατης λήψης φαρμάκων που προκαλούν ουδετεροπενία, δεν είχαν λάβει κατά το παρελθόν χημειοθεραπεία και δεν είχαν εκτεθεί σε ακτινοβολία, είχαν δε αρνητικές δοκιμασίες για αντιπολυμορφωποιητικά αντισώματα για αποκλεισμό αυτοάνοσης ουδετεροπενίας.

Αρχικά μελετήθηκε με κυτταρομετρία ροής ο βαθμός διέγερσης αλλά και απόπτωσης των T-λεμφοκυτταρικών υποπληθυσμών του αίματος των ασθενών σε σύγκριση με υγιείς μάρτυρες. Επιπλέον ο ρυθμός πολλαπλασιασμού των T-λεμφοκυττάρων διερευνήθηκε με τον προσδιορισμό του μεγέθους των τελομερών με την τεχνική της Real Time PCR [Koetz K, *Proc Natl Acad Sci* 2000] αλλά και με προσδιορισμό του πυρηνικού δείκτη Kι67 με κυτταρομετρία ροής, που αντιστοιχεί στον αριθμό των κυττάρων που βρίσκονται σε φάση πολλαπλασιασμού σε δεδομένη στιγμή [Gerdes J, *J Immunol* 1984]. Μελετήθηκε, επίσης, η παραγωγή νέων T-λεμφοκυττάρων από τον θύμο αδένος με τον προσδιορισμό στα περιφερικά T-λεμφοκύτταρα των κυκλικών τμημάτων εξω-χρωμοσωμικού DNA (T-cell rearrangement excision circles, TRECs) που προκύπτουν κατά την διαδικασία του γονιδιακού ανασυνδιασμού της α-αλυσίδας του υποδοχέα του T-λεμφοκυττάρου (T-cell receptor TCR) με την τεχνική της Q Real Time PCR [Hazenberg MD *Nat.Med*, 2000,] [Ping YE, *Critical Rev. Immunol.* 2002][Hazenberg MD, *J Mol.Med*, 2001]. Τέλος, προσδιορίστηκαν τα επίπεδα της IL-7 στον ορό των ασθενών με CIN αλλά και σε υπερκείμενα μακρόχρονων μυελικών καλλιέργειών με ανοσοενζυμική μέθοδο (ELISA).

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Στην παρούσα μελέτη δείχθηκε ότι η λεμφοπενία στους ασθενείς με CIN σχετίζεται με το μειωμένο αριθμό των CD4⁺ και CD8⁺ λεμφοκυττάρων στο περιφερικό αίμα και το χαμηλό ποσοστό των παρθένων (naive) T κυττάρων (CD45RA⁺) καθώς και των μνημονικών (CD45RO⁺) κυττάρων.

Επίσης δείχθηκε από κυτταρομετρική ανάλυση του δείκτη πολλαπλασιασμού Kι67 ότι τα CD4⁺ και CD8⁺ λεμφοκύτταρα έχουν αυξημένη πολλαπλασιαστική ικανότητα όπως επιβεβαιώνεται και από το μειωμένο μήκος των τελομερών των κυττάρων αυτών.

Την παραγωγή νέων λεμφοκυττάρων από τον θύμο αδένα την προσδιορίσαμε με την μέτρηση των TREC_s στα περιφερικά T-λεμφοκύτταρα, τα οποία βρέθηκαν σημαντικά χαμηλότερα και στα CD4⁺ και στα CD8⁺ των ασθενών σε σύγκριση με τους υγιείς μάρτυρες.

Υπήρξε θετική συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων των TREC και των ποσοστών των CD45RA⁺ παρθένων CD4⁺ και CD8⁺ κυττάρων που υποδεικνύει μια ελαττωμένη παραγωγή από το θύμο στους ασθενείς με CIN. Επιπλέον βρέθηκε μια αρνητική συσχέτιση μεταξύ του αριθμού των TREC και του ποσοστού των πολλαπλασιαζόμενων Κί67 κυττάρων μέσα στο κλάσμα των CD4⁺ και CD8⁺ κυττάρων. Ο αποπτωτικός ρυθμός των ανωτέρων κυτταρικών πληθυσμών ήταν σημαντικά αυξημένος στους ασθενείς με CIN.

Τέλος οι ασθενείς με CIN έχουν σημαντικά χαμηλότερα επίπεδα IL-7 συγκριτικά με τους μάρτυρες στον ορό και σε υπερκείμενα μακρόχρονων καλλιιεργειών και υπάρχει σημαντική συσχέτιση στα επίπεδα κυτταροκίνης στον ορό και στο περιεχόμενο σε TREC στα CD4⁺ και CD8⁺ κύτταρα.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑ

Η T-λεμφοπενία στη CIN είναι πολυπαραγοντική. Συγκεκριμένα, υπάρχει πρόωρη μείωση του μήκους των τελομερών των T-λεμφοκυττάρων του περιφερικού αίματος που θα μπορούσε να αποδοθεί στην εξάντληση των T κυττάρων πιθανότατα λόγω του αυξημένου πολλαπλασιασμού ως απάντηση σε αντιγονική διέγερση. Φλεγμονώδεις κυτταροκίνες που σχετίζονται με την παθοφυσιολογία της CIN επηρεάζουν πιθανώς την παραγωγή της IL-7 με αποτέλεσμα την ανεπαρκή αντισταθμιστική θυμική παραγωγή νέων T-κυττάρων που εκφράζουν TREC. Ο αυξημένος αποπτωτικός θάνατος των διεγερμένων T-λεμφοκυττάρων είναι επιπρόσθετος παράγοντας μείωσης τού διαμερίσματος των κυκλοφορούντων T-λεμφοκυττάρων αφού η ελαττωμένη παραγωγή IL-7 ενδέχεται να μην επιτρέπει την αντιροπιστική αύξηση της παραγωγής τους στον θύμο, τουλάχιστο σε βαθμό ανάλογο της περιφερικής καταστροφής.

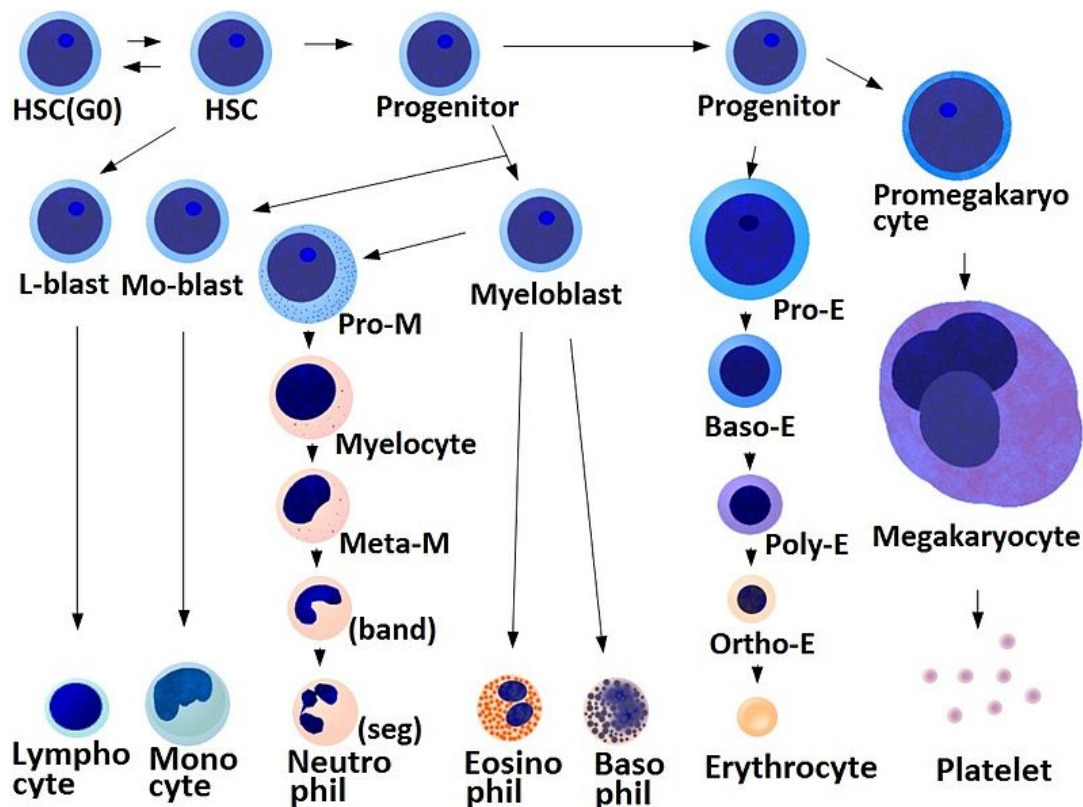
ΕΙΣΑΓΩΓΗ

ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ

Τα λεμφοκύτταρα προέρχονται από το πολυδύναμο αρχέγονο αιμοποιητικό κύτταρο (pluripotent hematopoietic stem cell) στο μυελό των οστών (**Εικόνα 1**) και αποτελούν το 20%-30% των εμπύρηνων κυττάρων του περιφερικού αίματος στους ενήλικες. Με βάση το μέγεθος τους διακρίνονται σε δύο κατηγορίες στα μικρά και στα μεγάλα λεμφοκύτταρα.

Οι δυο κύριοι λεμφοκυτταρικοί υποπληθυσμοί είναι τα **B** και **T** κύτταρα που αντιστοιχούν στους δυο τύπους της ανοσιακής απάντησης (χυμικού και κυτταρικού τύπου). Μια άλλη κατηγορία είναι τα μεγάλα κοκκιώδη λεμφοκύτταρα ή φυσικά κύτταρα φονείς (NK cells) που δεν εκφράζουν ούτε **B** ούτε **T** κυτταρικούς δείκτες και που έχουν σχέση με την φυσική ανοσία του ατόμου.

Το είδος και το στάδιο διαφοροποίησης των λεμφοκυττάρων ξεχωρίζει με τη βοήθεια ορισμένων πρωτεϊνικών μορίων, που εκφράζονται στην επιφάνεια ή στο κυτταρόπλασμα τους (κυτταρικοί δείκτες) και οι οποίοι χάνονται ή εμφανίζονται ανάλογα με το στάδιο ωρίμανσης του κυττάρου. Η ταυτοποίηση δε των συγκεκριμένων και καλά καθορισμένων κυτταρικών δεικτών (clusters of differentiation, CD) είναι δυνατόν να γίνει μέσω χρήσης μονοκλωνικών αντισωμάτων.

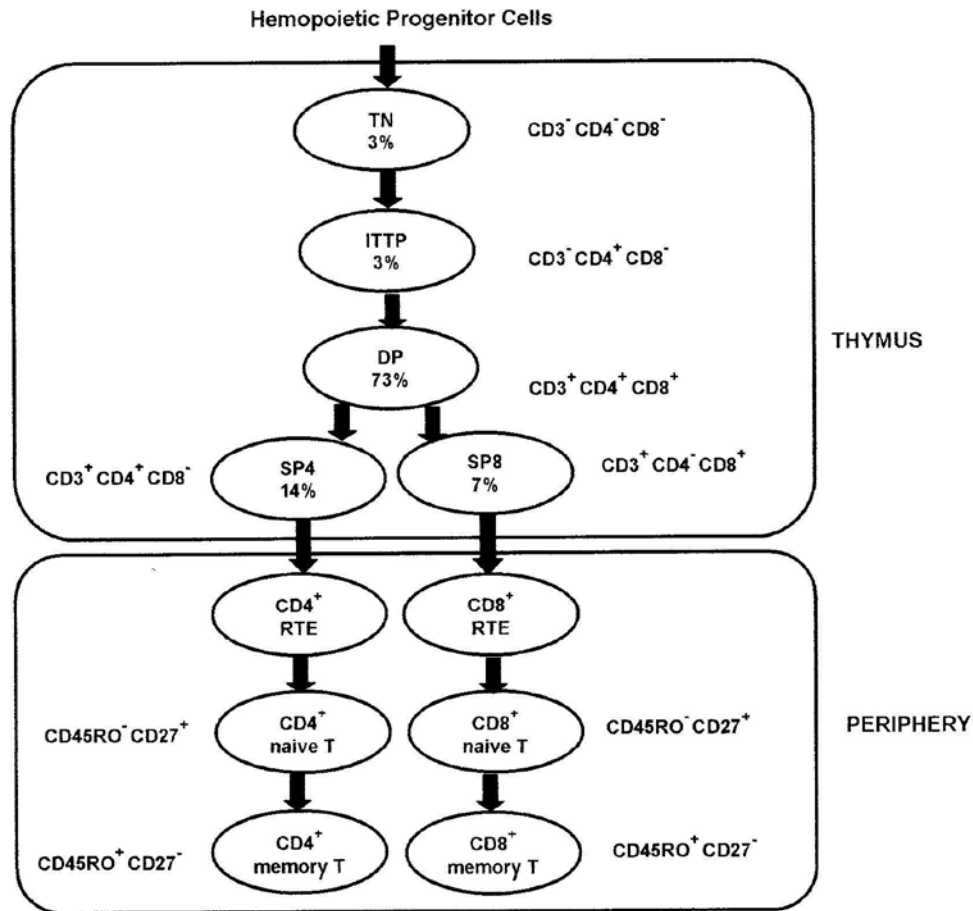


Εικόνα 1. Η διαδικασία της αιμοποίησης. Κατά την διάρκεια της αιμοποίησης το πολυδύναμο αρχέγονο αιμοποιητικό κύτταρο (hematopoietic stem cell; HSC) διαφοροποιείται σε δύο τύπους προγονικών κυττάρων, το προγονικό κύτταρο της μυελικής σειράς, και το προγονικό κύτταρο της λεμφικής σειράς, όπου το τελευταίο θα δώσει γένεση και στους δύο τύπους λεμφοκυττάρων (**B** και **T**)

Παραγωγή T λεμφοκυττάρων

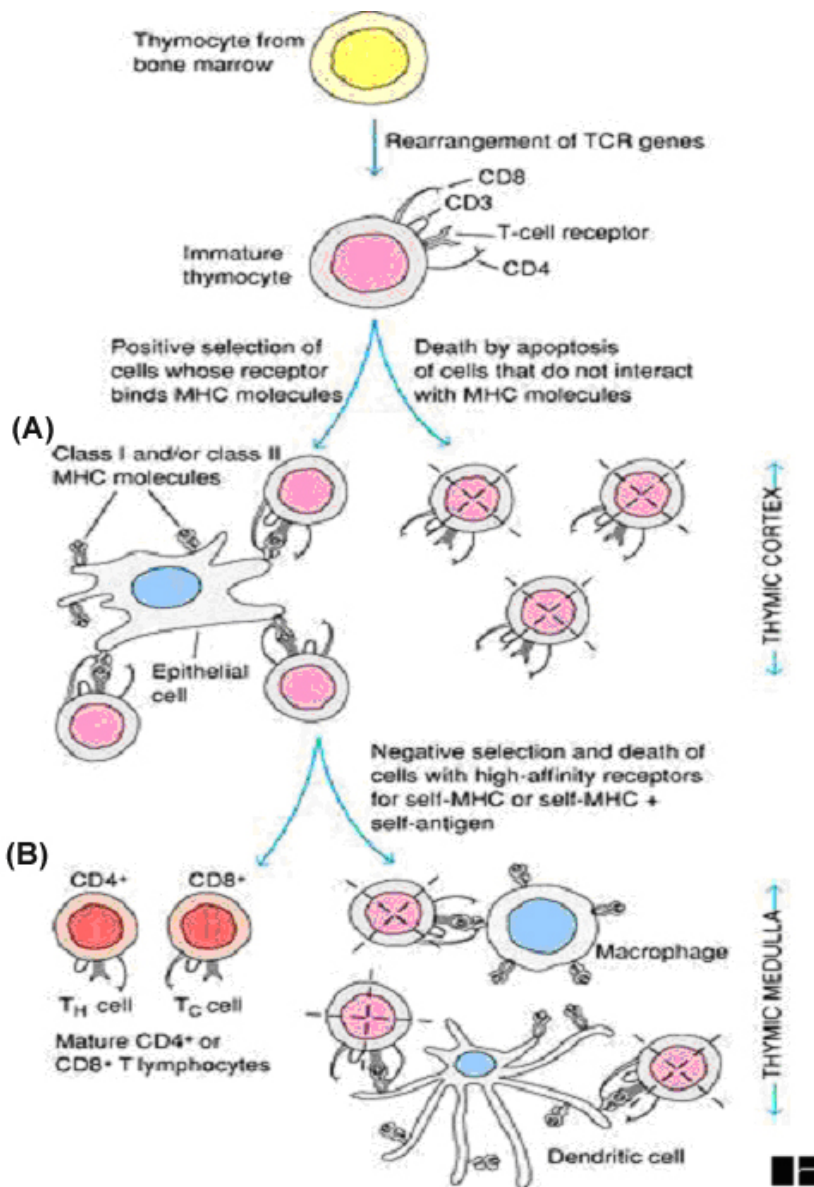
Ο ανθρώπινος θύμος αδένας είναι το κεντρικό λεμφικό όργανο και είναι πλήρως ανεπτυγμένος πριν την γέννηση. Αποτελείται από φλοιώδη και μυελώδη μοίρα με τα αντίστοιχα επιθηλιακά κύτταρα, τα θυμοκύτταρα και τα στρωματικά κύτταρα. Ο θύμος αδένας παρέχει ένα εξειδικευμένο μικροπεριβάλλον για την ωρίμανση και την επιλογή της πλειοψηφίας των T-λεμφοκυττάρων, γνωστή σαν θυμοποίηση [Ping YE, *J Immunol.* 2002]. Ο ρυθμός παραγωγής των T κυττάρων είναι μεγαλύτερος πριν την ήβη ενώ μετά από αυτήν, ο θύμος αδένας αρχίζει να συρρικνώνεται και η παραγωγή νέων T κυττάρων στους ενήλικες μειώνεται [Jamieson B D *Immunity* 1999].

Κατά την διάρκεια της παραγωγής T-λεμφοκυττάρων στον θύμο (στο εξής στο κείμενο θυμοποίηση) τα προερχόμενα από τον μυελό των οστών προγονικά T-κύτταρα, τα οποία δεν εκφράζουν επιφανειακούς δείκτες T-λεμφοκυττάρων, μεταναστεύουν στον θύμο όπου εκπτύσσονται και ωριμάζουν. Κατά τη διάρκεια αυτής της διαδικασίας, η επαφή τους με τα κύτταρα του στρώματος του θύμου, διεγείρει τον πολλαπλασιασμό τους, τη διαφοροποίηση τους και την έκφραση των πρώτων μορίων επιφανείας που είναι χαρακτηριστικά για τα T-λεμφοκύτταρα. Στο τέλος της φάσης αυτής, περίπου μετά από μια εβδομάδα, τα ανώριμα θυμοκύτταρα δεν εκφράζουν κανένα από τα τρία χαρακτηριστικά μόρια των ώριμων T-λεμφοκυττάρων, όπως το σύμπλεγμα CD3 και τα μόρια CD4 ή CD8, οπότε διαφοροποιούνται σε CD3⁻/CD4⁻/CD8⁻, δηλαδή τριπλά αρνητικά (triple negative, TN) θυμοκύτταρα. Στην συνέχεια αυτά τα τριπλά αρνητικά (TN) διαφοροποιούνται σε ενδοθυμικά προγονικά T-κύτταρα CD3⁻/CD4⁺/CD8⁻ (ITTP intrathymic T progenitor) τα οποία με τη σειρά τους μετατρέπονται σε διπλά θετικά CD3⁺/CD4⁺/CD8⁺ κύτταρα (Double positive, DP) (**Εικόνα 2**).



Εικόνα 2. Η διαδικασία της θυμοποίησης. Το αρχέγονο αιμοποιητικό κύτταρο εισερχόμενο στο θύμο αδένα, υπόκειται σε διαδοχικές διαφοροποιήσεις από το τριπλά αρνητικό κύτταρο (Triple Negative, TN), στο ενδοθυμικό προγονικό T κύτταρο (intrathymic T-progenitor; ITTP), σε διπλά θετικό κύτταρο (double positive; DP) και σε μονά θετικό κύτταρο (single positive; SP). Στη συνέχεια τα CD4⁺ ή CD8⁺ T κύτταρα εξέρχονται από τον θύμο στην περιφέρεια ως πρόσφατοι θυμικοί μετανάστες (recent thymic emigrants; RTE), όπου στη συνέχεια θα ωριμάσουν και θα εξελιχθούν σε παρθένα (naive) CD45RA⁺ και μνημονικά (memory) CD45RO⁺ κύτταρα (Από: Ping Ye *Critical Rev in Immunol* 2002)

Καθώς τα κύτταρα ωριμάζουν μετακινούνται στο φλοιό του θύμου αδένα, εκεί αναγνωρίζουν το σύμπλεγμα πεπτιδίου-μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας (Major Histocompatibility Complex; MHC) και υπόκεινται σε θετική ή αρνητική επιλογή (**Εικόνα 3A, 3B**) Τα θυμοκύτταρα στα οποία η γονιδιακή αναδιάταξη αποτυγχάνει στο να κωδικοποιήσει και να εκφράσει τον T κυτταρικό υποδοχέα υπόκεινται σε αποπτωτικό θάνατο.



Εικόνα 3. Θετική και Αρνητική επιλογή στο θύμο. (Α) Κατά τη διαδικασία της θυμοποίησης τα τριπλά αρνητικά προγονικά T-κύτταρα ($CD3^-/CD4^-/CD8^-$), μετατρέπονται σε διπλά θετικά κύτταρα ($CD3^+/CD4^+/CD8^+$) μετά από την αναδιάταξη του γονιδίου του υποδοχέα του T κυττάρου (T-cell receptor; TCR). Στη συνέχεια μετακινούνται στον φλοιό του θύμου αδένος όπου θα συναντήσουν σύμπλεγμα πεπτιδίου-MHC. Όσα το αναγνωρίσουν και προσδεθούν σε αυτό θα επιλεγθούν θετικά, ενώ όσα δεν αλληλεπιδράσουν με αυτό το σύμπλεγμα υπόκεινται σε προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο (απόπτωση). (Β) Στη συνέχεια, όσα από τα κύτταρα που επιλέχθηκαν θετικά έχουν μεγάλη συγγένεια για τα MHC του εαυτού ή για το σύμπλεγμα αντιγόνου-MHC, υπόκεινται σε κυτταρικό θάνατο (αρνητική επιλογή), ενώ παραμένουν ζωντανά τα ώριμα $CD4^+$ ή $CD8^+$ T-κύτταρα που αλληλεπιδρούν με κατάλληλη δύναμη σύνδεσης.

(από: <http://www.cartage.org.lb/en/themes/sciences/LifeScience/GeneralBiology/Immunology/ImmunityInfection/CellActivation/TCCellMaturation/TCCellMaturation.htm>)

Περίπου το 95% των διπλά θετικών (DP) κυττάρων πεθαίνουν λόγω θετικής ή αρνητικής επιλογής, ενώ τα υπόλοιπα διαφοροποιούνται περαιτέρω σε μονά θετικά $CD3^+/CD4^+/CD8^-$ (single positive $CD4^+$; SP4) κύτταρα και μονά θετικά $CD3^+/CD4^-/CD8^+$ (single positive $CD8^+$; SP8) κύτταρα και έτσι μεταναστεύουν από τον θύμο στην περιφέρεια σαν πρόσφατοι θυμικοί μετανάστες (Recent Thymic Emigrants; RTE) [Ping YE, *J Immunol.* 2002] **(Εικόνα 2)**. Μετά την έξοδό τους, τα RTE ωριμάζουν περαιτέρω σε παρθένα (naive) T-κύτταρα και κυκλοφορούν με το αίμα στην περιφέρεια [Jamiesson B D *Immunity* 1999] **(Εικόνα 2)**.

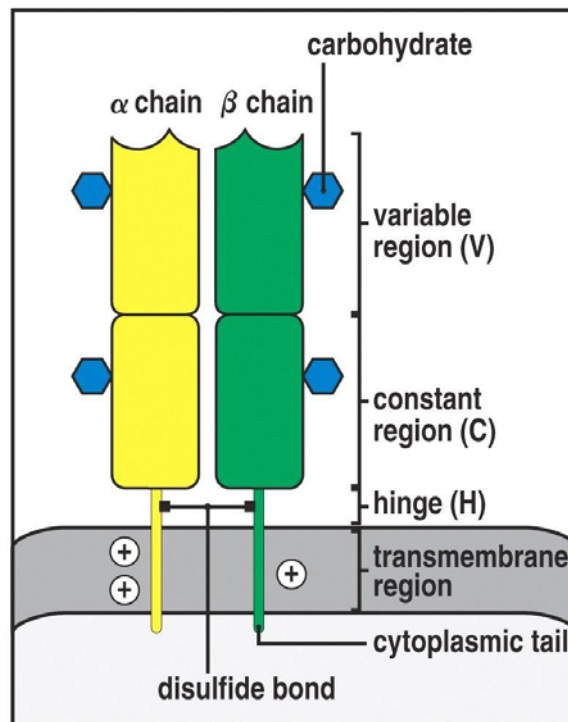
Ο όρος RTE αναφέρεται σε T κύτταρα που έχουν υποστεί λίγες μόνο κυτταρικές διαιρέσεις μετά την αποχώρησή τους από τον θύμο αδέν. Λόγω του ότι δεν υπάρχει φαινοτυπικός δείκτης ώστε να εκτιμηθούν ποσοτικά τα T- κύτταρα που μόλις έχουν παραχθεί και έχουν εξέλθει στην αιματική κυκλοφορία, ο προσδιορισμός αυτός γίνεται με τα κυκλικά τμήματα εξω-χρωμοσωμικού DNA των T λεμφοκυττάρων γνωστά ως TREC (T-cell rearrangement excision circles) [Koetz K, *Proc Natl Sci* 2000] [Kong FK *Proc Natl Acad Sci*, 1999] [Ponchel F, *Blood*, 2002].

Μία εναλλακτική οδός παραγωγής T- κυττάρων είναι διαμέσου της ταχείας κυτταρικής διαίρεσης των ώριμων T-κυτταρικών κλώνων, διαδικασία γνωστή ως ομοιοστατική περιφερική έκπτυξη (homeostatic peripheral expansion; HPE) [Williams KM, *Best Pract Res Clin Haem* 2008]. Η αναπαραγωγή των T κυττάρων μέσω αυτής της οδού είναι ιδιαίτερα χρήσιμη διότι συντελεί στη διατήρηση της περιφερικής δεξαμενής των T-κυττάρων, ιδιαίτερα σε κατάσταση λεμφοπενίας [Stutman O *Immunol.Rev* 1986]. Σε κάποιες μελέτες έχει περιγραφεί αυτός ο μηχανισμός ως η αργή μετατροπή των ανώριμων (naive) κυττάρων σε κύτταρα μνήμης (memory) με ενεργό φαινότυπο, σε κατάσταση λεμφοπενίας [Terry J Fry *J of Immuol* 2005] [Williams M K *Seminars in Immunol.* 2007].

Ο υποδοχέας του T- λεμφοκυττάρου (TCR)

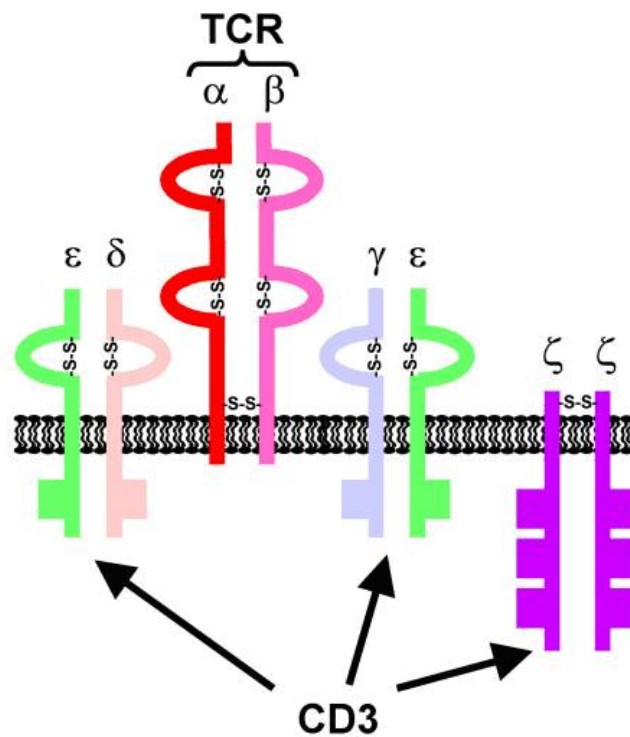
Τα T-λεμφοκύτταρα αναγνωρίζουν ξένα αντιγόνα μέσω του υποδοχέα τους (T-cell receptor; TCR). Ο TCR είναι μία ετεροδιμερής γλυκοπρωτεΐνη που αποτελείται από δύο πολυπεπτιδικές αλυσίδες (αβ ή γδ) (**Εικόνα 4**). Ο TCR (α,β) εκφράζεται στην συντριπτική πλειοψηφία των T-περιφερικών λεμφοκυττάρων ενώ ο TCR (γ,δ) που αποτελείται από γ και δ αλυσίδες εκφράζεται στο 2-14% των T-περιφερικών λεμφοκυττάρων [Mette D Hazenberg, *Jmol. Med.*,2001].

Οι αλυσίδες α αποτελούνται από γονιδιακά τμήματα «μεταβλητής περιοχής» (variable region; V), «συνδετικής περιοχής» (Joining region; J) και «σταθερής περιοχής» (Constant region; C). Οι αλυσίδες β αποτελούνται από γονιδιακά τμήματα «μεταβλητής περιοχής» (variable region; V), «ετερογενούς πειοχής» (Diversity; D), «συνδετικής περιοχής» (Joining region; J) και «σταθερής περιοχής» (Constant region; C).



Εικόνα 4. Δομή του υποδοχέα T κυττάρου (TCR) με τις αλυσίδες α,β (Από *Garland Science, 2005*)

Ο TCR συνδέεται σταθερά με ένα σύμπλεγμα τριών (3) διαμεμβρανικών πολυπεπτιδίων που αποτελούν το επιφανειακό μόριο CD3 (**Εικόνα 5**) και είναι απαραίτητα για την έκφραση του TCR επί της κυτταρικής μεμβράνης. Οι πρωτεϊνικές αλυσίδες CD3 (CD3γ, δ, ε και ζ) έχουν κυτταροπλασματικές προεκτάσεις που τους επιτρέπουν να αλληλεπιδρούν με πρωτεΐνες μεταγωγής σημάτων.



Εικόνα 5. Το σύμπλοκο TCR-CD3. Ο T-κυτταρικός υποδοχέας (TCR) σχηματίζεται από δύο υπομονάδες (συνήθως α και β) και άλλες τέσσερις πρωτεϊνικές αλυσίδες (γ, δ, ε, ζ) που συνθέτουν τρία διμερή για να σχηματίσουν το σύμπλεγμα CD3. (Από *Pablo de Felipe, Genetic Vaccines and Therapy, 2004*)

Το αντιγόνο αναγνωρίζεται από πρωτεϊνικές δομές που προέρχονται από κωδικοποιημένους τομείς των μορίων του TCR που αποτελούνται από συνδυασμούς των γονιδιακών περιοχών V, D και J (variable, diversity και joining) **(Πίνακας1)**

Γονίδια που κωδικοποιούν τις αλυσίδες του TCR					
Γονίδια TCR	Χρωμόσωμα	Τμήματα V	Τμήματα D	Τμήματα J	Τμήματα C
α (A)	14q11-12	70	0	61	1
β (B)	7q32-35	67	2	13	2
γ (G)	7p15	14	0	5	2
δ (D)	14q11-12	8	3	4	1
C=constant, D=diversity, J=joining, V=variable					

Πίνακας 1. Οι υπεύθυνες γονιδιακές περιοχές για την κωδικοποίηση των α, β, γ και δ αλυσίδων του υποδοχέα του T-κυττάρου (TCR). (Από *Hodges E, Krishna MT, Pickard C, Smith JL. J Clin Pathol. 2003*)

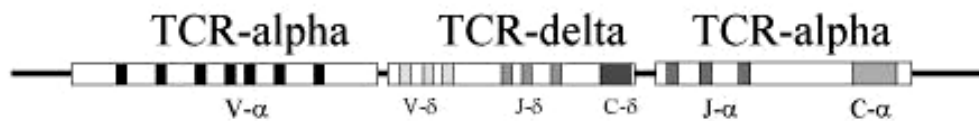
Για τη διαδικασία του ανασυνδυασμού απαιτείται η δράση γονιδίων που τον ενεργοποιούν (recombination activating genes, RAG), όπως το RAG1 και το RAG2 καθώς και η δράση του ενζύμου τελικής δεοξυνουκλεοτιδικής τρανσφεράσης (terminal deoxynucleotidyl transferase, TdT) [*Geenen V, J.Endocr. 2003*] [*Kirsten M Seminarsin Immunology 2007*].

Τα γονίδια του TCR περιβάλλονται εκατέρωθεν από σηματοδοτικές αλληλουχίες ανασυνδυασμού (recombination signal sequences; RSS), που δρουν σαν αναγνωριστικές θέσεις για το υπεύθυνο ένζυμο για τον VDJ ανασυνδυασμό και καθορίζουν την ακριβή θέση που θα γίνει ο ανασυνδυασμός [*Mette D Hazenberg, Jmol. Med.,2001*].

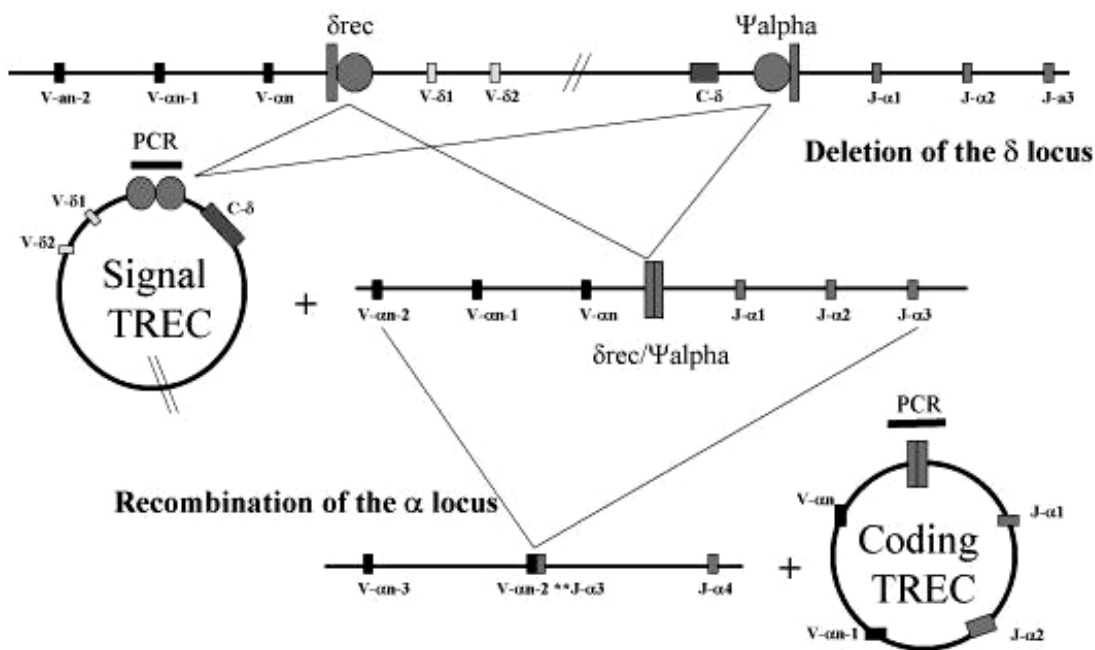
TRECs (T-cell rearrangement excision circles)

Κατά την διάρκεια της αναδιάταξης των γονιδίων του TCR, κλάσματα DNA που αποκόπτονται διατηρούνται σαν επισωμάτια, γνωστά ως κυκλικά τμήματα εξω- χρωμοσωμικού DNA των T λεμφοκυττάρων (T-cell rearrangement excision circles, TRECs) [Mette D Hazenberg, *Jmol. Med.*,2001] [Douek DC, *Nature* 1998].

Δύο είδη TRECs, το signal-joint TREC (sjTREC) και το coding-joint TREC (cjTREC), ως προϊόντα της διαγραφής της περιοχής του TCR δ γονιδίου που παρεμβάλλεται στην περιοχή του TCR α γονιδίου στο χρωμόσωμα 14(14q11) (**Εικόνα 6**), αποκόπτονται για να γίνει η πρώτη αναδιάταξη του TCR α στα T(α , β) κύτταρα [Ping YE, *J Immunol.* 2002]. (**Εικόνα 7**). Συγκεκριμένα το sjTREC προκύπτει από την πρώτη αναδιάταξη του γονιδίου α όπου αποκόπτονται οι περιοχές D, J, C του γονιδίου TCR δ μέσω σύνδεσης των σημάτων ανασυνδυασμού που βρίσκονται εκατέρωθεν των γονιδιακών περιοχών δ rec ΨJ α pha. Στη συνέχεια, σε ένα ακόλουθο βήμα ανασυνδυασμού, δημιουργείται το ανασυνδιασμένο γονίδιο V α -J α -C α και το cjTREC που περιλαμβάνει τις περιοχές δ rec ΨJ α pha και το οποίο βρίσκεται στα περισσότερα T-κύτταρα [Ponchel et al. *BMC Biotechnology* 2003] [Douek et al. 1998].



Εικόνα 6. Τα γονίδια TCR α και TCR δ στο χρωμόσωμα 14q11. Τα ορθογώνια αναπαριστούν το κάθε γονιδιακό τμήμα, V (variable), J (joining) και C (constant). [Από Ponchel et al. *BMC Biotechnology* 2003]

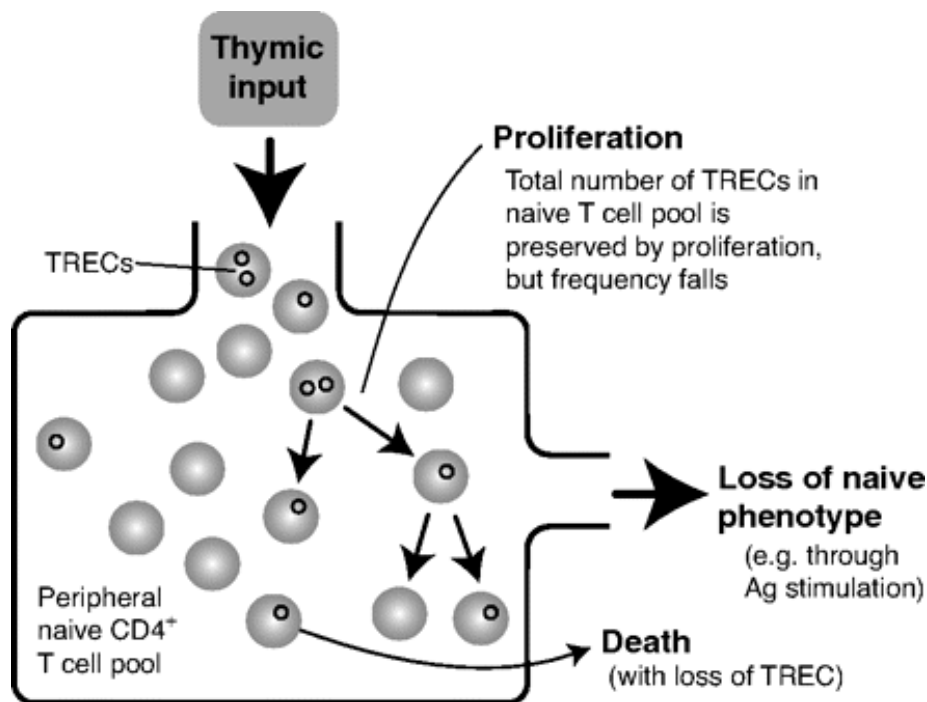


Εικόνα 7. Δημιουργία των signal TRECs και coding TRECs κατά τη διάρκεια της αναδιάταξης του γονιδίου TCRα. Το signal TREC προκύπτει από την πρώτη αναδιάταξη του γονιδίου α όπου αποκόπτονται οι περιοχές D,J,C του γονιδίου TCR δ μέσω σύνδεσης των σημάτων ανασυνδυασμού που βρίσκονται εκατέρωθεν των γονιδιακών περιοχών δrec ΨJαlpha. Στη συνέχεια, σε ένα ακόλουθο βήμα ανασυνδυασμού, δημιουργείται το ανασυνδιασμένο γονίδιο Vα-Jα-Cα και το coding TREC που περιλαμβάνει τις περιοχές δrec ΨJαlpha [Ponchel et al. BMC Biotechnology 2003]

Τα TRECs είναι σταθερά, δεν διπλασιάζονται κατά την διάρκεια της μίτωσης και ως εκ τούτου η συγκέντρωση των TRECs αραιώνεται με κάθε κυτταρική διαίρεση. Για το λόγο αυτό, τα T-λεμφοκύτταρα εντός του θύμου έχουν υψηλότερες TREC συγκεντρώσεις σε σύγκριση με τα T-κύτταρα στο περιφερικό αίμα. Επίσης, στα naïve T-κύτταρα υπάρχουν υψηλότερες συγκεντρώσεις TREC από ότι στα T-κύτταρα μνήμης [Ping YE, J Immunol. 2002]. Υψηλότερες συγκεντρώσεις από sjTREC βρίσκονται στα διπλά

θετικά $CD3^+/CD4^+/CD8^+$ κύτταρα με 1,5 αντίγραφα ανά κύτταρο, ενώ στα $CD3^+/CD4^+/CD8^-$ (SP4) και $CD3^+/CD4^-/CD8^+$ (SP8) κύτταρα η συγκέντρωση είναι 0,7 και 0,6 αντίστοιχα. Ωστόσο, στα τριπλά αρνητικά (TN) και στα ITTP κύτταρα δεν έχουν ανιχνευθεί sjTREC.

Με την αύξηση της ηλικίας υπάρχει μια βαθμιαία μείωση της συγκέντρωσης των TRECs στα υγιή άτομα. [Ping YE Critical rev in Imm 2002] Αυτή η μείωση της συγκέντρωσης των TRECs αντανάκλα μια μείωση των πρόσφατων θυμικών μεταναστών (RTE) από τον θύμο αδένά. [Ping YE Critical Rev in Imm, 2002]. Ωστόσο, το περιεχόμενο σε TRECs των λεμφο/μονοπύρηνων κυττάρων του περιφερικού αίματος (peripheral Blood Mononuclear cells; PBMCs) ακόμα και σε παρθένα (naive) $CD45RA^+/CD4^+$ και $CD45RA^+/CD8^+$ κύτταρα δεν καθορίζεται μόνο από την έξοδο των $TREC^+/CD45RA^+$ κυττάρων από τον θύμο αδένά αλλά και την διαίρεση, τον κυτταρικό θάνατο και επιπλέον από την μακροζωία των ανοσολογικά παρθένων (naive) T κυττάρων [Mette D Hazenberg J Mol Med 2001] **(Εικόνα 8)**. Όλοι αυτοί οι παράγοντες θα πρέπει να λαμβάνονται υπόψη κατά την εκτίμηση και ερμηνεία των TREC [Mette D Hazenberg, Jmol. Med.,2001]



Εικόνα 8. Η συγκέντρωση των TRECs στην αποθήκη των παρθένων $CD4^+$ κυττάρων στην περιφέρεια εξαρτάται από την εισροή των πρόσφατων θυμικών μεταναστών (RTE) από τον θύμο αδένά, τον βαθμό διαίρεσης αυτών των κυττάρων, και τον βαθμό κυτταρικού θανάτου.

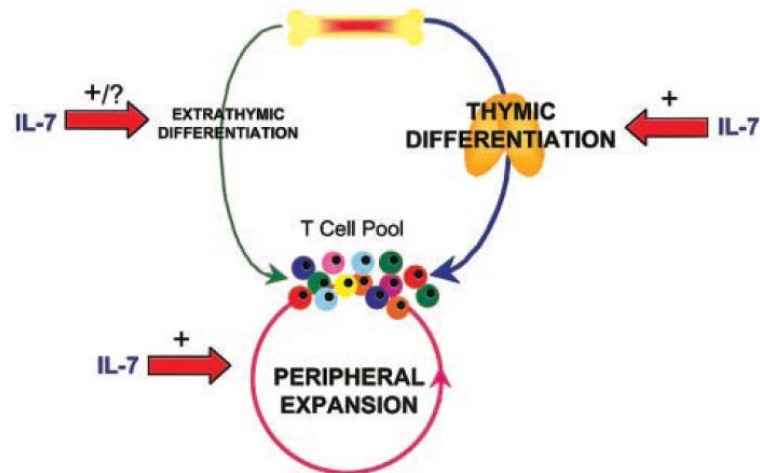
Για την μέτρηση των TRECs ανιχνεύεται το δRec-ψJa signal joint σαν τον πιο άριστο δείκτη TREC, με τη μέθοδο της Real Time PCR (ποσοτικής PCR πραγματικού χρόνου) Η ανίχνευση και ποσοτικοποίηση των TRECs έχει αποδειχθεί ένα νέο και ενδιαφέρον εργαλείο για βασική και κλινική έρευνα, όπως μετά από μεταμόσχευση αιμοποιητικών κυττάρων, καθώς αποτελεί ένδειξη λειτουργικής ωρίμανσης των T-κυττάρων η οποία μάλιστα σχετίζεται με την αποκατάσταση των T-naive κυττάρων, την διεύρυνση του ρεπερτορίου του TCR και την αποκατάσταση της λειτουργίας των T-κυττάρων [Hazenberg MD Nat med 2000][Markert ML J med. 1999]. Ομοίως, η ανάκτηση των TRECs σε ασθενείς με HIV μόλυνση μετά από υψηλής δραστηριότητας αντιρετροϊκή θεραπεία (Highly Active Antiretroviral Therapy, HAART) αποτελεί απόδειξη της συνεχούς θυμικής εξόδου TREC⁺ naive T-κυττάρων σε συνδυασμό με ανακατανομή των T-κυττάρων από λεμφοειδείς ιστούς [Hazenberg MD Nat med 2000]. Δεδομένα από χορήγηση εξωγενούς IL-7 για την παραγωγή των TREC στο ανθρώπινο θύμο αδένά έδειξαν ότι η IL-7 είχε άμεση επίδραση στην αύξηση του ανασυνδυασμού του TCR γονιδίου [Ping Ye Critical Rev in Immun 2002].

Interleukin-7

Η IL-7 είναι μια κυτταροκίνη τύπου I, με ανοσορυθμιστική δράση και ανήκει στην οικογένεια της αιμοποιητίνης. Παράγεται κυρίως από τα στρωματικά κύτταρα του μυελού των οστών και από τα επιθηλιακά κύτταρα του θύμου αδένά, ενώ άλλες πιθανές θέσεις παραγωγής της είναι τα επιθηλιακά κύτταρα του δέρματος και του εντέρου καθώς και τα δενδριτικά κύτταρα των λεμφαδένων. Μέσα στον θύμο αδένά ο κύριος πληθυσμός που συμμετέχει στην παραγωγή της IL-7 φαίνεται να είναι ένας πληθυσμός επιθηλιακών κυττάρων με έκφραση τάξης II μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας (MHC) που πιθανόν να αντιπροσωπεύει τα επιθηλιακά κύτταρα του φλοιού [Fry T Blood 2002]. Το γονίδιο της ανθρώπινης IL-7 βρίσκεται στο χρωμόσωμα 8q12-13.

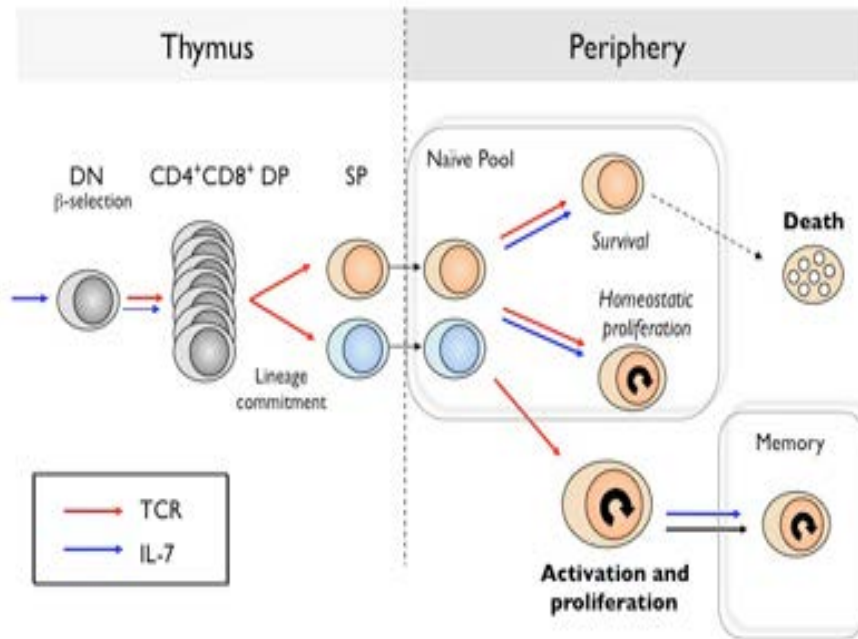
Η IL-7 επάγει την παραγωγή των T λεμφοκυττάρων στον θύμο αλλά και τον πολλαπλασιασμό και την επιβίωση τους στην περιφέρεια, συμβάλλοντας έτσι ουσιαστικά στη ρύθμιση της ομοιόστασης του διαμερίσματος των T-

λεμφοκυττάρων [Fry T Blood 2002] [Sun Kyeong Lee Immunologica Review 2005]
(Εικόνα 9).



Εικόνα 9. Η IL-7 συμβάλλει στη διαφοροποίηση των T-λεμφοκυττάρων στον θύμο που αποτελεί το κυρίαρχο μονοπάτι μέσω του οποίου δημιουργούνται νέα T-κύτταρα. Ομοίως συμβάλλει στην περιφερική αναγέννηση αυτών.

Κατά την διάρκεια της θυμοποίησης η IL-7 εμπλέκεται στην ανάπτυξη των T- λεμφοκυττάρων μέσα από την οδό της ταχείας κυτταρικής διαίρεσης των ώριμων T-κυτταρικών κλώνων (homeostatic peripheral expansion). Διεγείροντας τα άωρα T προγονικά κύτταρα συμβάλλει στην επιβίωση και έκπτυξη τόσο των ώριμων παρθένων (naive) T- κυττάρων όσο και των μνημονικών (ιδιαίτερα των CD4⁺) κυττάρων (**Εικόνα 10**).



Εικόνα 10. Ρύθμιση της παραγωγής και ομοιόστασης των T-λεμφοκυττάρων στο θύμο και στην περιφέρεια μέσω επίδρασης της IL-7. [Από www.nimr.mcrc.ac.uk/research/benedict-seddom]

Ο TGF-β και η IL-7 έχουν μια αλληλένδετη σχέση μεταξύ τους, όπου η κάθε μια κυτταροκίνη είναι ικανή να μειώσει την έκφραση της άλλης [Fry *T Blood* 2002]. Ο TGF-β έχει δειχθεί να μειώνει τα επίπεδα έκφρασης του mRNA της IL-7 καθώς και την έκκρισή της από τα στρωματικά κύτταρα του μυελού των οστών [Tang *J J Immunol* 1997]. Ομοίως, η IL-7 μειώνει την παραγωγή του TGF-β [Dubinett *Sm J Nation cancer Instit* 1995]. Οι μηχανισμοί που εμπλέκονται σε αυτή την αλληλεπίδραση δεν έχουν διασαφηνιστεί ακόμα, παρά το ότι η δυναμική των δύο παραγόντων έχει σημαντικό ρόλο σε ένα πλήθος κυτταρικών πληθυσμών του ανοσοποιητικού συστήματος.

ΧΡΟΝΙΑ ΙΔΙΟΠΑΘΗΣ ΟΥΔΕΤΕΡΟΠΕΝΙΑ

Με τον ευρύ όρο «Χρονία ιδιοπαθής ουδετεροπενία» (Chronic Idiopathic Neutropenia, CIN) χαρακτηρίζεται κάθε ανεξήγητη ελάττωση του αριθμού των κυκλοφορούντων ουδετερόφιλων κοκκιοκυττάρων σε επίπεδα χαμηλότερα από το κατώτερο όριο της φυσιολογικής διακύμανσης, για ένα δεδομένο εθνικό πληθυσμό, για χρονικό διάστημα τουλάχιστον τριών μηνών [Kyle RA *N Engl J Med.* 1968] [Papadaki:HA an overview. *Eur J Haematol* 2001] [Dale DC, *Chronic neutropenia Med.*, 1979]. Τα διαγνωστικά κριτήρια της νόσου είναι (α) επίκτητη ουδετεροπενία με αριθμό ουδετεροφίλων κάτω από 1800/μl για περισσότερο από 3 μήνες, (β) αρνητικές δοκιμασίες για αντιπολυμορφοπυρινικά αντισώματα, (γ) έλλειψη στοιχείων ενδεικτικών δευτεροπαθούς ουδετεροπενίας, (δ) αποκλεισμός περιπτώσεων κυκλικής ή οικογενούς ουδετεροπενίας, (ε) έλλειψη ιστορικού έκθεσης σε ακτινοβολία, επαφής με οργανικούς διαλύτες ή λήψης φαρμάκων ενοχοποιούμενων για ουδετεροπενία, (στ) έλλειψη καρυοτυπικών ανωμαλιών στον μυελό [Papadaki:HA *Cell Cycle* 2003].

Η συχνότητα της CIN στον πληθυσμό της Κρήτης εκτιμάται σε 1.67%. Η νόσος είναι συχνότερη στις γυναίκες (Σχέση γυναικών:άνδρες = 5:1), και συνήθως εμφανίζεται σε άτομα μέσης ηλικίας με HLA τάξης I γενετική προδιάθεση, όπως φαίνεται από την αυξημένη συχνότητα του απλότυπου HLA-DRB1*1302 [Dale DC, *Medicine (Baltimore)*, 1979] [Papadaki HA, *Eur J Haematol*, 2001] [Papadaki HA *Ann Hematol.*, 1999].

Οι ασθενείς μπορεί να εμφανίζουν σε ένα ποσοστό \approx 40% οστικά άλγη και οστεοπενία και σε μικρότερο ποσοστό οστεοπόρωση, που φαίνεται να σχετίζεται με τη βαρύτητα της ουδετεροπενίας [Papadaki HA *Eur.J.Haematol.*2001]. Επίσης με υπερηχογραφικό έλεγχο τεκμηριώνεται σε ποσοστό περίπου 48% αύξηση του όγκου σπληνός ενώ η κλινικά ανιχνεύσιμη σπληνομεγαλία είναι εναντίον της διάγνωσης της CIN [Papadaki HA *Eur.J.Haematol.*2001]. Λοιμώξεις είναι εξαιρετικά σπάνιες στην πορεία της νόσου και η επίπτωση είναι 1.9% ανά έτος. Πρόκειται για βακτηριακές λοιμώξεις αναπνευστικού, δέρματος ή χρόνιες λοιμώξεις της στοματικής κοιλότητας. Εξαιρετικά σπάνια φαίνεται να είναι και η εξέλιξη της νόσου σε

μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα ή οξεία λευχαιμία. Έχουν περιγραφεί μόνο μεμονωμένες περιπτώσεις CIN ασθενών που ανέπτυξαν Οξεία Μυελογενή Λευχαιμία ή Μυελοδυσπλαστικό Σύνδρομο [Auner HW, Br. J. Haematol., 1999] [Papadaki HA, Ann Haematol., 2002] [Papadaki HA, Ann Haematol., 1999].

Η διαταραχή της κοκκιοποίησης στη CIN οφείλεται κυρίως στην παρουσία ενεργοποιημένων T-λεμφοκυττάρων στον μυελό με μυελοκατασταλτικές ιδιότητες [Papadaki HA, Br J Haematol, 2005]. Τα λεμφοκύτταρα αυτά είναι κυρίως ολιγοκλωνικά/μονοκλωνικά CD8⁺ ενεργοποιημένα κύτταρα [Spanoudakis M, Clin Immunol, 2010]. Τα κύτταρα αυτά σε συνδυασμό με τα ενεργοποιημένα μακροφάγα στο μικροπεριβάλλον του μυελού των οστών [Papadaki HA, Am J Hematol, 2000] [Velegraki et al J Clin Immunol 2011] παράγουν αυξημένα ποσά ανασταλτικών κυτταροκινών και προαποπτωτικών μορίων όπως η IL-1β, ο TGF-β1, η IL-6, ο TNF-α, το Fas-Ligand, και το CD40-Ligand με επακόλουθη την μέσω-Fas ή και μέσω- CD40 επαγωγή απόπτωσης στις κοκκιοκυταρικές προβαθμίδες, και ιδιαίτερα του πληθυσμού των CD34⁺/CD33⁺ κυττάρων [Papadaki HA, Am J Hematol, 2000] [Papadaki HA, Eur J Haematol, 1999] [Papadaki HA, Blood, 2003] [Mavroudi et al J Leukoc Biol 2011]

Η CIN είναι δυνατό να εμφανισθεί είτε ως μεμονωμένη ουδετεροπενία, είτε ως ουδετεροπενία συνδυαζόμενη με αναιμία, στο 14.2% των ασθενών [Papadaki HA, Ann Haem, 2001], με θρομβοπενία στο 10% των ασθενών [Psyllaki M, Br J Hematol, 2006], με ήπια μονοκυτταροπενία που σχετίζεται με τον ελαττωμένο αριθμό των μονοκυτταρικών προβαθμίδων [Papadaki HA, Ann Hematol 2001] και επιπλέον με λεμφοπενία στο 37% των ασθενών [Kyriakou D Ann Heematol. 1997] [Papadaki HA Ann Hematol 1998].

ΛΕΜΦΟΠΕΝΙΑ ΣΤΗ ΧΡΟΝΙΑ ΙΔΙΟΠΑΘΗ ΟΥΔΕΤΕΡΟΠΕΝΙΑ

Σε ασθενείς με CIN έχει δειχθεί ότι υπάρχει μικρότερος αριθμός κυκλοφορούντων λεμφοκυττάρων στο αίμα συγκριτικά με υγιή άτομα ίδιου φύλου και αναλόγου ηλικίας [Kyriakou D, *Ann Hematol*,1997] [Papadaki HA *Ann Hematol* 1998]. Η παρατηρούμενη λεμφοπενία αφορά κυρίως στη μείωση του αριθμού των Τ-λεμφοκυττάρων και σε μικρότερο βαθμό των ΝΚ-κυττάρων αλλά όχι και των Β-κυττάρων. Επιπλέον υπάρχει θετική συσχέτιση μεταξύ του αριθμού των κυκλοφορούντων λεμφοκυττάρων και του αριθμού των κυκλοφορούντων ουδετερόφιλων στο αίμα των ασθενών [Kyriakou D, *Ann Hematol*, 1997] [Papadaki HA *Ann Hematol* 1998].

Ασθενείς με CIN έχουν αυξημένο ποσοστό διεγερμένων κυττάρων μέσα στο διαμέρισμα των κυκλοφορούντων Τ-λεμφοκυττάρων σε σχέση με αναλόγου ηλικίας και φύλου υγιείς μάρτυρες. Αυτό μπορεί να σημαίνει ότι υπάρχει πιθανότητα αυξημένου ρυθμού απόπτωσης των κυττάρων αυτών. Αν αυτό πράγματι συμβαίνει, τότε αναμένει κανείς αντιρροπιστική αύξηση του πολλαπλασιασμού των περιφερικών Τ-λεμφοκυττάρων και αυξημένη παραγωγή Τ-λεμφοκυττάρων από τον θύμο αδένα προκειμένου να διατηρηθεί η ομοιόσταση του Τ-κυτταρικού διαμερίσματος [Papadaki HA, *Br.J.Haematol.*,2005]. Επιπλέον, τα αυξημένα επίπεδα του TGF-β1 στο μικροπεριβάλλον του μυελού των οστών ασθενών με CIN [Papadaki HA, *Eur J Haematol*.1999], θα μπορούσαν να καταστείλουν την παραγωγή της IL-7 από τα στρωματικά κύτταρα του μυελού των οστών και από τα επιθηλιακά κύτταρα του θύμου αδένα [Fry T], *Blood*, 2001].

ΣΚΟΠΟΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Ο σκοπός της μελέτης αυτής ήταν η διερεύνηση των μηχανισμών της παρατηρούμενης λεμφοπενίας στη CIN, με έμφαση στην παραγωγή ανοσολογικά παρθένων T-κυττάρων στο θύμο και στην απόπτωση αυτών στην περιφέρεια, καθώς και στη διερεύνηση των χαρακτηριστικών γήρανσης των περιφερικών T-κυττάρων σε συνδυασμό με την T-κυτταρική παραγωγή από τον θύμο αδέννα.

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

ΑΣΘΕΝΕΙΣ

Μελετήθηκαν 44 ασθενείς με CIN, 8 άνδρες και 36 γυναίκες ηλικίας 34-73 ετών (διάμεση ηλικία 43 έτη). Όλοι οι ασθενείς πληρούσαν τα διαγνωστικά κριτήρια της νόσου [Papadaki HA Eur. J Haem ,2001]. Συγκεκριμένα οι ασθενείς είχαν αριθμό κυκλοφορούντων ουδετερόφιλων μικρότερο των $1800 \times 10^6/L$ (μέση τιμή $1325 \pm 321 \times 10^6/L$, εύρος $600-1700 \times 10^6/L$) για χρονικό διάστημα 37-208 μήνες (διάμεσο διάστημα 60 μηνών). Οι ασθενείς είχαν φυσιολογικό καρύοτυπο στο μυελό των οστών. Περιπτώσεις ασθενών με κυκλική ή οικογενή ουδετεροπενία αποκλείστηκαν από την μελέτη, όπως επίσης και περιπτώσεις αυτοάνοσης ουδετεροπενίας μετά από διενέργεια δοκιμασιών λευκοσυγκόλησης και ανοσοφθορισμού για έλεγχο αντιπολυμορφοπυρηνικών αντισωμάτων. Επίσης οι ασθενείς δεν είχαν εκτεθεί σε ιονίζουσα ακτινοβολία, δεν είχαν έρθει σε επαφή με οργανικούς διαλύτες και δεν είχαν λάβει φάρμακα ικανά να προκαλέσουν ουδετεροπενία. Ασθενείς με πρόσφατο ιστορικό ιογενούς ή βακτηριακής λοίμωξης (κατά τη διάρκεια των τελευταίων δύο μηνών) αποκλείστηκαν από τη μελέτη. Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν επίσης και 15 αιματολογικά υγιείς μάρτυρες. Δημογραφικά και εργαστηριακά δεδομένα των ασθενών παρουσιάζονται αναλυτικά στον **Πίνακα 2**.

Πίνακας 2. Κλινικά και εργαστηριακά δεδομένα των ασθενών που μελετήθηκαν

A/A	Ηλικία (έτη)	Φύλο	Διάρκεια (μήνες)	Αιμοσφαιρίνη(g/dl)	Λευκά(x10 ⁶ /L)	Ουδετερόφιλα(x10 ⁶ /L)	Λεμφοκύτταρα(x10 ⁶ /L)	Μονοκύτταρα(x10 ⁶ /L)	Αιμοπετάλια(x10 ⁹ /L)
1	37	Γ	51	12,7	3400	1600	1300	400	263
2	52	Γ	55	12,4	3300	1530	1390	270	263
3	69	A	37	13,9	2100	900	800	300	222
4	37	Γ	72	13,2	2500	600	1500	300	255
5	52	Γ	112	11,3	3500	1610	1540	280	169
6	69	Γ	71	11,9	3000	1000	1400	500	273
7	43	A	43	14,0	3300	1600	1400	200	225
8	37	Γ	166	12,6	2800	800	1800	200	238
9	52	Γ	208	13,2	3200	1600	1200	300	182
10	69	Γ	79	12,8	3200	1400	1300	400	218
11	43	Γ	51	13,3	3700	1600	1600	300	190
12	35	A	66	14,5	3500	1600	1400	400	243
13	73	Γ	166	11,6	2050	650	1080	230	196
14	42	A	114	13,7	3200	1100	1600	400	188
15	58	Γ	39	11,9	2300	800	1200	300	157
16	55	Γ	80	13,7	2800	1600	1000	200	201
17	71	Γ	38	12,4	3300	1320	1518	330	184
18	69	Γ	39	10,9	2500	1000	1100	300	171
19	34	Γ	112	12,9	3400	1600	1400	300	130
20	38	Γ	200	13	3300	1200	1700	300	264
21	37	Γ	42	13,4	3700	1000	1900	400	319
22	52	Γ	65	12,4	3049	1100	1520	367	189
23	69	Γ	117	12,7	3400	1600	1300	400	263
24	43	Γ	54	12,4	3300	1530	1390	270	263
25	35	Γ	44	13,9	2200	1000	800	300	222
26	73	Γ	39	13,2	3400	1500	1500	300	255
27	42	Γ	82	11,3	3500	1610	1540	280	169
28	58	Γ	163	11,9	2950	950	1400	500	273
29	55	A	54	14,0	3300	1600	1400	200	225
30	71	Γ	85	12,6	3100	1100	1800	200	238
31	69	Γ	49	13,2	3200	1600	1200	300	182
32	34	Γ	50	12,8	3500	1700	1300	400	218
33	38	Γ	49	13,3	3700	1600	1600	300	190
34	34	A	50	14,5	3500	1600	1400	400	243
35	38	Γ	45	11,6	3000	1630	1080	230	196
36	37	A	156	13,7	3200	1100	1600	400	188
37	52	Γ	82	11,9	3200	1600	1200	300	157
38	69	A	49	13,7	2800	1600	1000	200	201
39	43	Γ	73	12,4	3300	1320	1518	330	184
40	35	Γ	108	10,9	2500	1000	1100	300	171
41	35	Γ	55	12,9	3400	1600	1400	300	130
42	35	Γ	79	13	3700	1600	1700	300	264
43	38	Γ	38	13,4	3700	1000	1900	400	319
44	37	Γ	51	12,4	3235	1250	1520	367	189

Επεξηγήσεις συντηρήσεων. A/A, Αύξων Αριθμός.

Απομόνωση και μέτρηση μυελικών μονοπυρήνων κυττάρων (Bone marrow mononuclear cells, BMMCs)

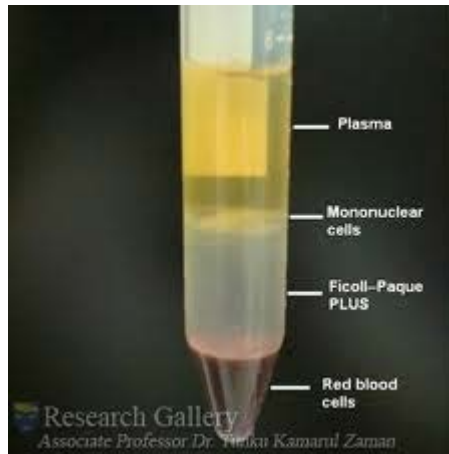
Τα δείγματα του μυελού ελήφθησαν με αναρρόφηση από την οπίσθια λαγόνια ακρολοφία των ασθενών (**Εικόνα 11**) μετά από τοπική αναισθησία και σε στείρες συνθήκες.



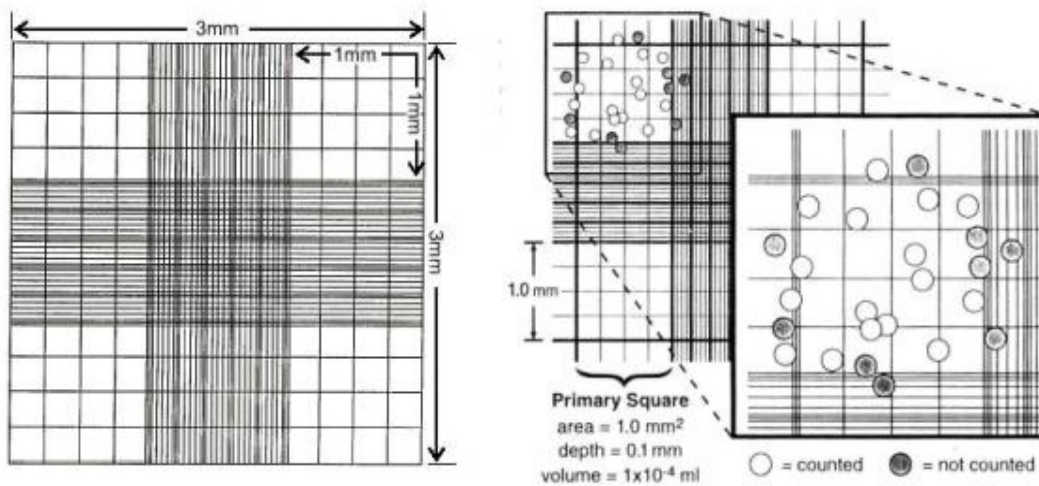
Εικόνα 11. Αναρρόφηση μυελικού πολφού

Η απομόνωση των μυελικών μονοπύρηνων κυττάρων των ασθενών πραγματοποιήθηκε μετά από επιστίβαση του μυελού, κατόπιν αραίωσής του 1:1 σε ειδικό καλλιεργητικό υλικό (Iscove's Modified Dulbecco's Medium, IMDM. Gibco Invitrogen Corporation, Paisley UK), σε φικόλη (Histopaque-1077, Sigma-Aldrich) σε αναλογία 4:3 και φυγοκέντρηση στα 400g χωρίς φρένο για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου

Τα BMMCs παρέμειναν στη μεσόφαση μεταξύ πλάσματος και Histopaque-1077 (**Εικόνα 12**) και αφού λήφθηκαν και πλύθηκαν με θρεπτικό υλικό IMDM μετρήθηκαν σε πλάκα Neubauer (**Εικόνα 13**). Για τη μέτρηση των κυττάρων έγινε αραίωση 1:1 με χρωστική Trypan blue (κυανό του τρυπανίου). Η συγκέντρωση ανά ml των κυττάρων στο μετρούμενο δείγμα προσδιορίστηκε με τον τύπο $N \times 2 \times 10^4$ όπου N ο αριθμός των μετρούμενων κυττάρων. Τα κύτταρα αυτά χρησιμοποιήθηκαν σε μακρόχρονες καλλιέργειες.



Εικόνα 12. Διαχωρισμός κυττάρων με Histopaque-1077. Η μεσόφαση των μονοπύρηνων μυελικών κυττάρων βρίσκεται μεταξύ πλάσματος και Histopaque 1077 (φικόλης)

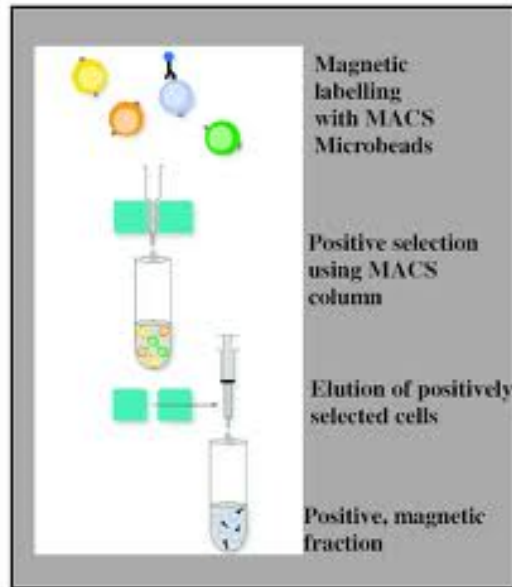


Εικόνα 13. Πλάκα Neubauer. Τετράγωνα μετρήματος κυττάρων στην πλάκα Neubauer. Η καταμέτρηση των ζώντων κυττάρων γίνεται στην κεντρική περιοχή. Τα νεκρά κύτταρα (βαμμένα μπλε) δεν προσμετρούνται.

Διαχωρισμός των CD4+ και CD8+ υποπληθυσμών

Αρχικά απομονώθηκαν μονοπύρηννα κύτταρα του περιφερικού αίματος (Peripheral Blood Mononuclear Cells, PBMCs) μετά από επιστίβαση 10 ml αίματος, αραιωμένο 1:1 με θρεπτικό υλικό IMDM, σε Histopaque-1077 και φυγοκέντρηση στα 400g για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Στη

συνέχεια, 10^7 PBMCs προστέθηκαν σε 100 μl διαλύματος ειδικών μικροσφαιριδίων με μαγνητικές ιδιότητες (MACS isolation Kit, Miltenyi Biotec, GmbH, Bergisch Gladbach, Germany) κατάλληλα συνδεδεμένων με αντι-CD4⁺ μονοκλωνικό αντίσωμα (mAb). Ακολούθησε επώαση για 30 λεπτά στο ψυγείο, πλύσιμο των κυττάρων με ρυθμιστικό διάλυμα (MACS buffer) φωσφορικού άλατος (PBS; Phosphate Buffer Saline, Gibco), εμπλουτισμένου με 0,5% αλβουμίνη από ορό αγελάδας (Bovine Serum Albumin, BSA; Gibco), 0,6% οξύ κιτρικής δεξτρόζης (Acid-citrate-Dextrose, ACD) και 4% διττανθρακικό νάτριο (Sodium bicarbonate; Gibco) με φυγοκέντρηση για 10min στις 1400 rpm και απόρριψη του υπερκείμενου. Κατόπιν έγινε επαναδιάλυση του ιζήματος των κυττάρων με 500-1000 ml με MACS buffer. Στη συνέχεια το εναιώρημα των κυττάρων/MACS μικροσφαιριδίων αφέθηκε να περάσει σε κατάλληλη στήλη διαχωρισμού (MACS column), που ήταν προσαρμοσμένη στο μόνιμο μαγνητικό πεδίο του συστήματος διαχωρισμού (MACS separator) που είχε προηγουμένως εκπλυθεί με 500 ml MACS buffer. Λόγω της παρουσίας του μαγνητικού πεδίου τα σημασμένα με MACS Microbeads CD4⁺ κύτταρα συγκρατούνταν στη στήλη, ενώ τα CD4⁻ περνούσαν διαμέσου αυτής και απορρίπτονταν. Ακολουθώς, η στήλη εκπλύθηκε 3 φορές με 500 ml MACS buffer, απομακρύνθηκε από το σύστημα διαχωρισμού και μεταφέρθηκε σε σωληνάριο. Στη στήλη προστέθηκε 1 ml διαλύματος MACS buffer και με τη βοήθεια κατάλληλου εμβόλου έγινε έκλυση των CD4⁺ στο σωληνάριο (**Εικόνα 14**). Στη συνέχεια τα CD4⁻ κύτταρα επώασθηκαν με μαγνητικά μικροσφαιρίδια συνδεδεμένα κατάλληλα με αντί CD8⁺ μονοκλωνικό αντίσωμα. Ακολουθήθηκε η ίδια διαδικασία έως ότου λήφθηκε ένας καθαρός πληθυσμός CD8⁺ κυττάρων. Ο αριθμός και η βιωσιμότητα των CD4⁺ και CD8⁺ κυττάρων ελέγχθηκαν με τη χρώση Trypan blue. Η καθαρότητα του πληθυσμού των κυττάρων ήταν μεγαλύτερη από 96% όπως εκτιμήθηκε με την κυτταρομετρία ροής.



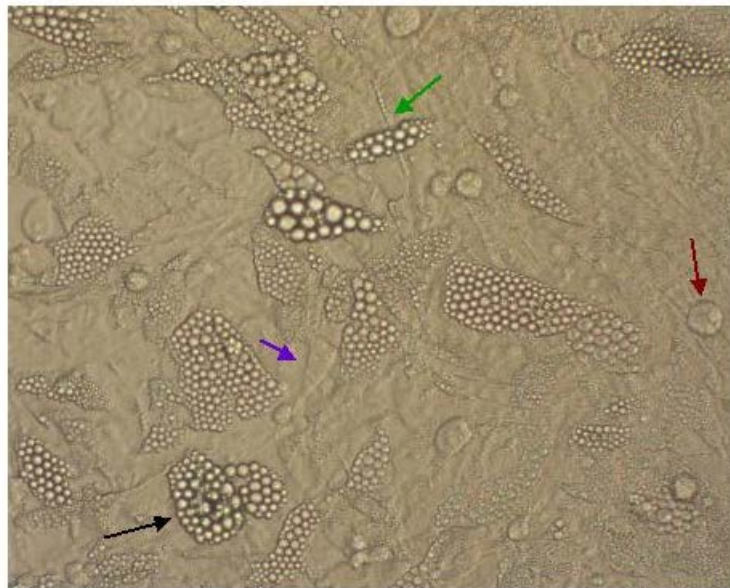
Εικόνα 14. Τεχνική του έμμεσου ανοσομαγνητικού διαχωρισμού (magnetic activated cell sorting MACS) Μαγνητικά σημασμένα κύτταρα με MACS μικροσφαιρίδια περνούν από στήλη θετικής επιλογής. Έκλουση των θετικών κυττάρων μετά από απομάκρυνση της στήλης από το μαγνητικό πεδίο (Από *Petra Hajkova: Epigenetic reprogramming in mouse germ cells*).

Μακρόχρονες μυελικές καλλιέργειες (LTBMCs)

Οι μακράς διάρκειας μυελικές καλλιέργειες (Long term bone marrow cultures, LTBMCs) θεωρούνται το καλύτερο *in vitro* μοντέλο για τη μελέτη της αιμοποίησης, καθώς προσομοιάζει στις συνθήκες που αναπτύσσονται στο μυελό των οστών. Συγκεκριμένα, η επιβίωση και ανάπτυξη των υπερκείμενων αιμοποιητικών κυττάρων γίνεται με την παραγωγή κυτταροκινών και επιφανειακών βιομορίων από τη στιβάδα των προσκολλημένων κυττάρων (κύτταρα στρώματος), χωρίς να υπάρχει ανάγκη για προσθήκη εξωγενών παραγόντων [Charbord P. New York, NY: Marcel Dekker; 1995] [Dexter TM, *Methods Cell Biol*, 1976] [Dexter TM, *J Cell Physiol* 1977].

Για την καλλιέργεια, 10^7 BMMCs τοποθετήθηκαν σε καλλιεργητική φλάσκα των 25cm^2 όπου επώασθησαν παρουσία 10ml θρεπτικού υλικού IMDM εμπλουτισμένου με 10% ορό εμβρύου αγελάδος (fetal calf serum, FCS,

Gibco), 10% ορού αλόγου (horse serum, HS, Gibco) και 100IU/ml πενικιλίνη/στρεπτομυκίνη (Gibco) σε κλίβανο στους 33°C και 5% CO₂ με 100% υγρασία. Κάθε εβδομάδα γινόταν αφαίρεση της μισής ποσότητας του υπερκειμένου της καλλιέργειας και αντικατάστασή του με ίσο όγκο φρέσκου θρεπτικού υλικού. Μετά από 2-3 εβδομάδες σχηματίζονταν ένας τάπητας από κύτταρα του αιμοποιητικού μικροπεριβάλλοντος όπως λιποκύτταρα, ινοβλάστες, μακροφάγα, και ενδοθηλιακά κύτταρα (**Εικόνα 15**) ενώ στο υπερκείμενο αναπτύσσονταν, πολλαπλασιάζονταν και διαφοροποιούνταν οι προγονικές αιμοποιητικές προβαθμίδες. Στο τέλος της τρίτης εβδομάδας των μακροχρόνιων μυελικών καλλιιεργιών (με κάλυψη τάπητα φλάσκας πάνω από 70%) λήφθηκαν 5 ml υπερκειμένου από τις καλλιέργειες, φυγοκεντρήθηκαν στά 3500 rpm και το υπερκείμενο χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό της IL-7 με τη μέθοδο της ELISA.



Εικόνα 15: Τάπητας από μακρόχρονη υγρή καλλιέργεια μυελικών μονοπύρηνων κυττάρων. Διακρίνονται λιποκύτταρα (μαύρο βέλος), ενδοθηλιακά κύτταρα (μπλε βέλος), μακροφάγα (κόκκινο βέλος) και ινοβλάστες (πράσινο βέλος). Από το αρχείο του Ερευνητικού Εργαστηρίου Μελέτης της Αιμοποίησης (Ε. Παπαδάκη)

Μέτρηση της IL-7

Η ανίχνευση της κυτταροκίνης IL-7 έγινε στο υπερκείμενο του μικροπεριβάλλοντος του μυελού των οστών χρησιμοποιώντας το σύστημα των μακρόχρονων μυελικών καλλιέργειών. Μετά το τέλος της 3^{ης}-4^{ης} εβδομάδας, ελήφθησαν υπερκείμενα, φυγοκεντρήθηκαν και αποθηκεύθηκαν στους -72°C, μέχρι την ημέρα όπου μετρήθηκε σε αυτά η IL-7. Η μέτρηση της IL-7 στα υπερκείμενα και στον ορό έγινε με μια ποσοτική ανοσοενζυμική μεθοδο με βάση την τεχνική sandwich (ELISA, Quantikine; HS R & D Systems).

Συγκεκριμένα, σε πηγαδάκια πλάκας ELISA 96 θέσεων στον πυθμένα των οποίων βρισκόταν ακινητοποιημένο ποντικίσιο αντί-ανθρώπινο μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι της IL-7, προστέθηκαν οι οροί ή τα υπερκείμενα καλλιέργειών των ασθενών και πρότυπα διαλύματα γνωστής συγκέντρωσης της κυτταροκίνης. Ακολούθησε επώαση, οπότε η IL-7 προσκολλήθηκε στο αντίσωμα του πυθμένα της πλάκας. Μετά από την απομάκρυνση της περίσσειας του δείγματος ή του προτύπου διαλύματος, στα πηγαδάκια προστέθηκε ένα δεύτερο -πολυκλωνικό- αντίσωμα έναντι της IL-7 το οποίο ήταν συνδεδεμένο με κατάλληλο ένζυμο (αλκαλική φωσφατάση). Ακολούθησε επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 25 min και διακοπή της αντίδρασης με την προσθήκη 100 μl κατάλληλου οξέος (stop solution, Quantikine; R & D Systems) σε κάθε πηγαδάκι. Στη συνέχεια μετρήθηκε η οπτική πυκνότητα των πηγαδιών εντός 10 min, σε φωτόμετρο με κατάλληλη υποδοχή για πλάκες ELISA. Η μέτρηση έγινε σε μήκος κύματος 450nm με διόρθωση στα 600nm. Σύμφωνα με τον κατασκευαστή η ευαισθησία της δοκιμασίας είναι 0,6 mIU/mL.

Προσδιορισμός του δείκτη κυτταρικού πολλαπλασιασμού Ki67

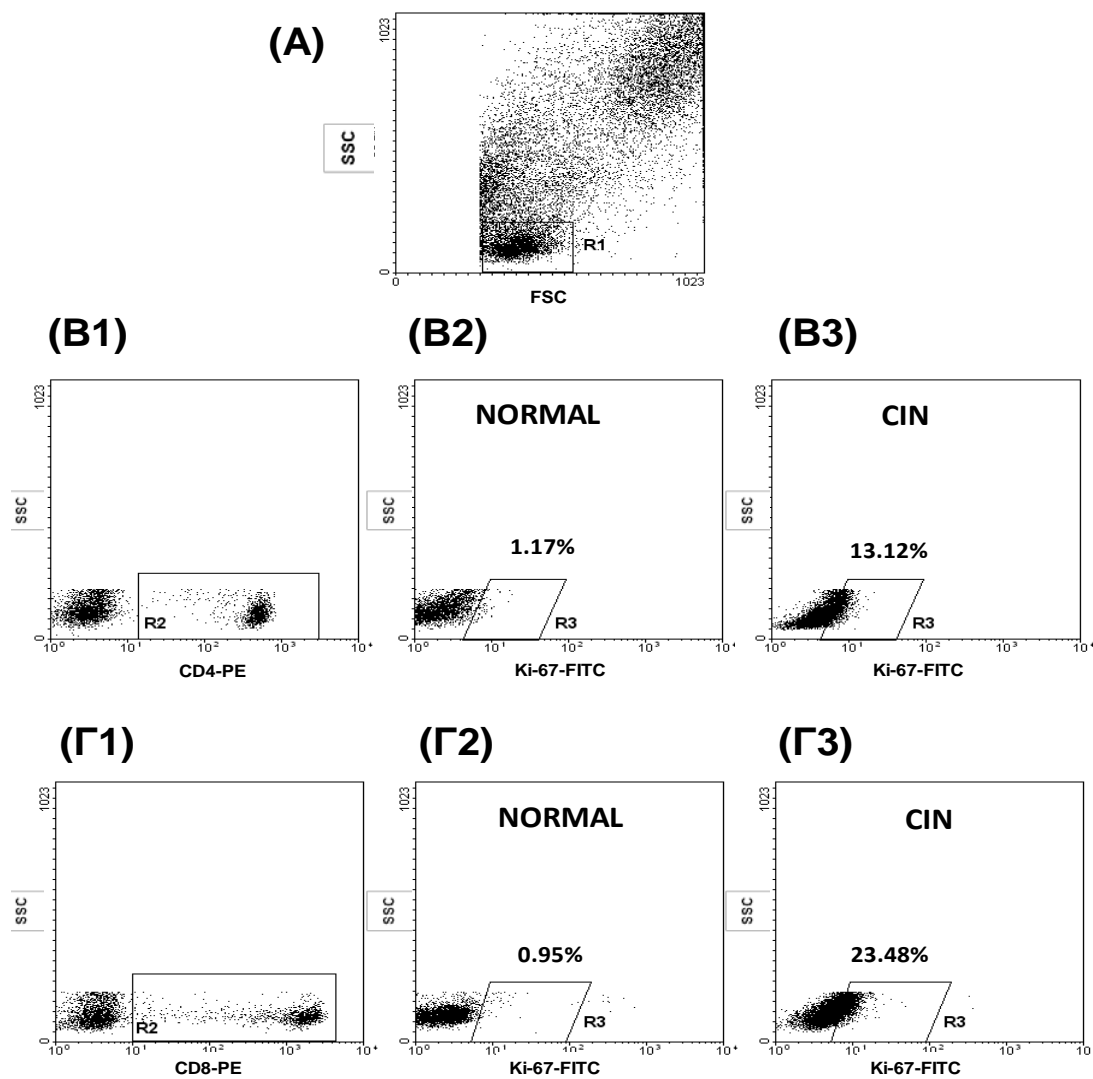
Το Ki67 είναι ένας πυρηνικός δείκτης που σχετίζεται άμεσα με τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Κατά τη μεσόφαση, το αντιγόνο Ki-67 είναι δυνατόν να ανιχνευθεί αποκλειστικά εντός του πυρήνα του κυττάρου, ενώ στη μίτωση μεγαλύτερο μέρος της πρωτεΐνης μεταφέρεται στην επιφάνεια των χρωμοσωμάτων. Η Ki-67 πρωτεΐνη είναι παρούσα κατά τη διάρκεια όλων των ενεργών φάσεων του κυτταρικού κύκλου (G1, S, G2 και μίτωση), αλλά απουσιάζει από τα κύτταρα σε ηρεμία (G0).

Μελετήθηκε το ποσοστό έκφρασης του Ki67 στα CD4⁺ και CD8⁺ λεμφοκύτταρα ολικού περιφερικού αίματος ασθενών με CIN και υγιών μαρτύρων, με κυτταρομετρία ροής.

Αναλυτικότερα, 100 μl ολικού αίματος αφού πλύθηκαν με PBS επωάσθηκαν για 20 min με μονοκλωνικά αντισώματα αντι-CD4 (13B8.2 , Beckman-Coulter) ή αντι-CD8 (B9.11, Beckman-Coulter) συζευγμένα με φθοριόχρωμα PE. Τα κατάλληλα ιστοτυπικά control χρησιμοποιήθηκαν σε κάθε περίπτωση. Ακολούθησε πλύση με PBS και φυγοκέντρηση στα 1500 rpm για 5 λεπτά. Στη συνέχεια, προστέθηκε 100 μl διαλύματος μονιμοποίησης (IntraPrep Permeabilization reagent, Beckman-Coulter) και το αίμα επωάστηκε για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου, πλύθηκε με PBS και φυγοκεντρήθηκε στα 1500 rpm για 5 λεπτά. Ακολούθησε προσθήκη 100 μl διαλύματος που προκαλεί διαπερατότητα (permeabilization medium, IntraPrep Permeabilization reagent, Beckman-Coulter) και του μονοκλωνικού αντισώματος αντι-Ki67 (clone ki-67, Dako Denmark A/S) συζευγμένου με το φθοριόχρωμα FITC. Ακολούθησε επώαση 15 λεπτών σε θερμοκρασία δωματίου, πλύσιμο με PBS, φυγοκέντρηση στα 1500 rpm για 5 λεπτά και ανάλυση με κυτταρομετρητή ροής (Epics Elite Coulter model Miami, FL).

Η ανάλυση έγινε στα λεμφοκύτταρα δηλαδή στο παράθυρο (gate) των κυττάρων με χαμηλό πλάγιο σκεδασμό (side scatter; SSC) και χαμηλό πρόσθιο σκεδασμό (Forward scatter; FSC), στο διάγραμμα FSC-SSC (**Εικόνα 16A**). Η έκφραση του Ki67 προσδιορίστηκε τόσο στο παράθυρο

των CD4⁺ κυττάρων (**Εικόνα 16B**) όσο και των CD8⁺ κυττάρων (**Εικόνα 16Γ**)



Εικόνα 16. Κυτταρομετρική ανάλυση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού με εκτίμηση του δείκτη Κί67 στα CD4⁺ και CD8⁺ κύτταρα του αίματος. **(A)** Διάγραμμα (scattergram) οριζόντιου σκεδασμού (FS) προς κάθετο σκεδασμό (SSC) για την περιχαρακώση των

λεμφοκυττάρων R1 **B1)** Διάγραμμα SSC έναντι CD4 και περιχαράκωση των CD4+ κυττάρων (R2) στο gate των λεμφοκυττάρων **B2, B3)** Διάγραμμα SSC έναντι δείκτη Ki67-FITC στο gate των CD4+ κυττάρων και περιχαράκωση των Ki67⁺/CD4⁺ κυττάρων σε ασθενή με CIN και σε φυσιολογικό άτομο. **Γ1)** Διάγραμμα SSC έναντι CD8 και περιχαράκωση των CD8+ κυττάρων (R2) στο gate των λεμφοκυττάρων. **Γ2, Γ3)** Διάγραμμα SSC έναντι δείκτη Ki67-FITC στο gate των CD8⁺ κυττάρων και περιχαράκωση των Ki67⁺/CD4⁺ κυττάρων σε ασθενή με CIN και σε φυσιολογικό άτομο.

Προσδιορισμός λεμφοκυτταρικών υποπληθυσμών περιφερικού αίματος με κυτταρομετρία ροής

Το ποσοστό και ο απόλυτος αριθμός του συνόλου των CD3⁺ T-λεμφοκυττάρων και των υποπληθυσμών τους CD4⁺ και CD8⁺, προσδιορίστηκε με κυτταρομετρία ροής. Ομοίως, προσδιορίστηκε το ποσοστό και ο απόλυτος αριθμός των ανοσολογικά παρθένων (naive) CD45RA⁺/CD27⁺ και μνημονικών (memory) CD45RA⁻/CD45RO⁺ κυττάρων.

Για τους προσδιορισμούς αυτούς χρησιμοποιήθηκαν σε 100 μl περιφερικού αίματος οι παρακάτω συνδυασμοί μονοκλωνικών αντισωμάτων και αντιστοίχων ισοτυπικών controls συνδεδεμένων με φλουρεσκεΐνη (fluorescein) και φικοερυθρίνη (phycoerythrin) CD4(13B8.2)/CD45RA(2H4LDH11LDB9)/CD45RO(UCHL1) και CD8(B9.11)/CD45RA(2H4LDH11LDB9)/CD45RO(UCHL1). Τα δείγματα επώασθηκαν για 20 min στους 4°C και κατόπιν ακολούθησε πλύσιμο με προσθήκη 3ml PBS / 0.5% FCS / 0.04% sodium azide και φυγοκέντρηση στα 1600 rpm για 5 min. Ακολούθησε λύση των ερυθρών με Q-Prep. Τα δείγματα αναλύθηκαν σε κυτταρομετρητή ροής (Epics Elite Coulter model Miami, FL) μέσα σε 24 ώρες από τη μονιμοποίησή τους και μετρήθηκαν για το ποσοστό των θετικών ως προς το μονοκλωνικό αντίσωμα μεμβρανικό φθορισμό. Σε κάθε δείγμα αναλύθηκαν 500.000 κύτταρα.

Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε στο gate των λεμφοκυττάρων και καθορίστηκε σε διάγραμμα πρόσθιας πλάγιας σκέδασης FSC/SSC.

Προσδιορισμός της απόπτωσης στα T-λεμφοκύτταρα του περιφερικού αίματος.

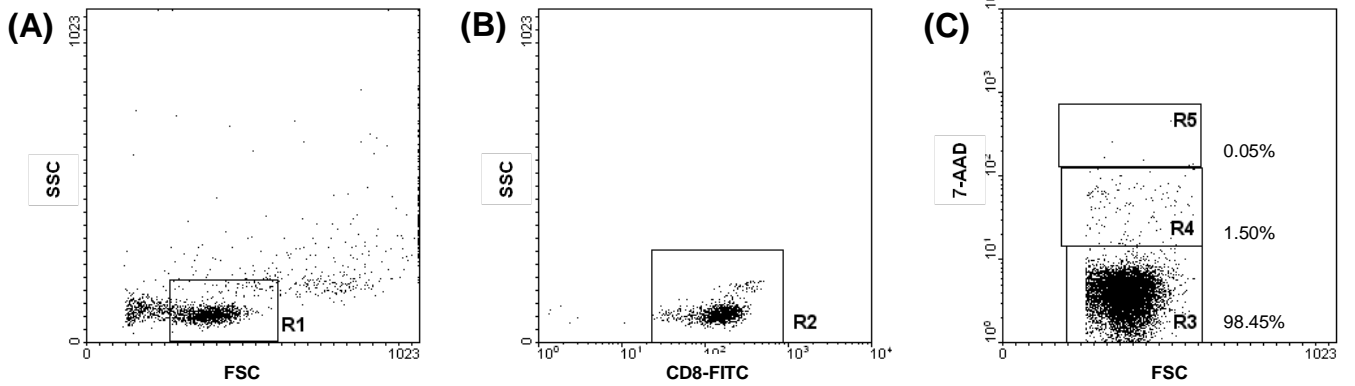
Η απόπτωση των κυττάρων μελετήθηκε με κυτταρομετρία ροής, σε ανοσομαγνητικά διαχωρισμένους πληθυσμούς CD4⁺ ή CD8⁺ κυττάρων σε ασθενείς με CIN και αντίστοιχους υγιείς μάρτυρες χρησιμοποιώντας τη χρώση 7-actinoaminomycin-D (7-AAD; Calbiochem-Novabiochem).

Η 7-αμινο-ακτινομυκίνη-D είναι μια φθορίζουσα ουσία που εκπέμπει στα 660 nm μετά από διέγερση, και έχει την ιδιότητα να προσδένεται στο DNA, παρεμβαλλόμενη μεταξύ των βάσεων κυτοσίνης-γουανίνης. Η πρόσδεση της εξαρτάται από το βαθμό ακεραιότητας της κυτταρικής μεμβράνης. Επομένως, τα ζώντα κύτταρα, των οποίων η κυτταρική μεμβράνη είναι ακέραια, δεν επιτρέπουν την είσοδο της χρωστικής, ενώ αντίθετα τα αποπτωτικά και τα νεκρά κύτταρα σημαίνονται μέτρια και εντονότερα, αντίστοιχα. Με τον τρόπο αυτό μπορούν να διακριθούν 3 κυτταρικοί πληθυσμοί: των ζώντων (7AAD^{neg}), των αποπτωτικών (7AAD^{dim}) και των νεκρών (7AAD^{bright}) κυττάρων [Philpott NJ., *Blood*. 1996; 87:2244-2251] [Schmid et al (*Cytometry* 1994;15:12)].

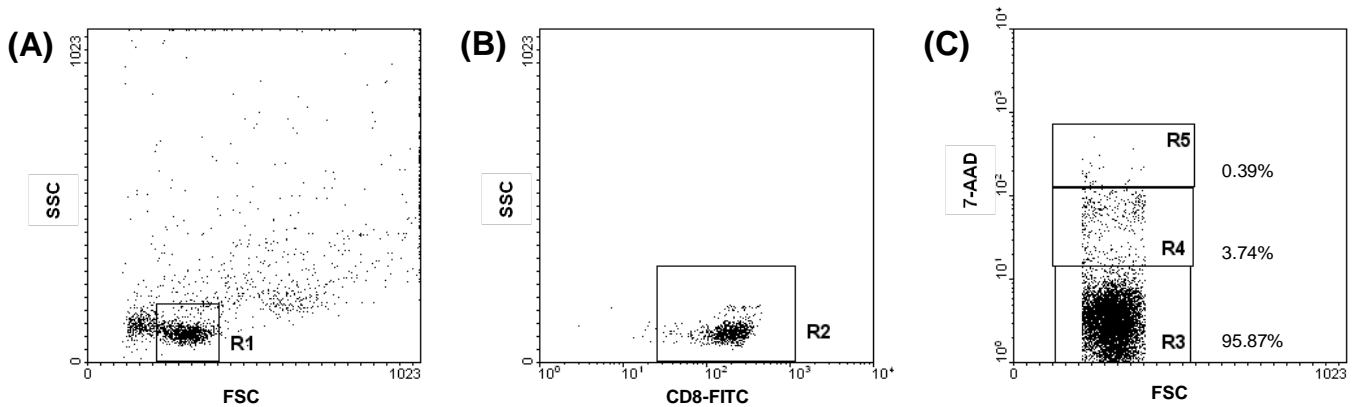
Αρχικά επωάσθησαν τα κύτταρα με το αντίστοιχο μονοκλωνικό αντίσωμα και κατόπιν, μετά το πλύσιμο, τα κύτταρα, επωάσθησαν για 15 λεπτά με ανάλογης των κυττάρων συγκέντρωση διαλύματος 7-AAD. Μετά την φυγοκέντρηση και την αφαίρεση του υπερκείμενου έγινε άμεση μέτρηση των κυττάρων στο κυτταρόμετρο ροής. Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε στο διαμέρισμα των λεμφοκυττάρων (CD4⁺ και CD8⁺ κυττάρων) σε ασθενείς και αντιστοίχους υγιείς μάρτυρες.

Προσδιορίστηκε το ποσοστό των ζωντανών, αποπτωτικών, και νεκρών κυττάρων στους δύο υποπληθυσμούς (**Εικόνα 17**)

Healthy control



CIN patient

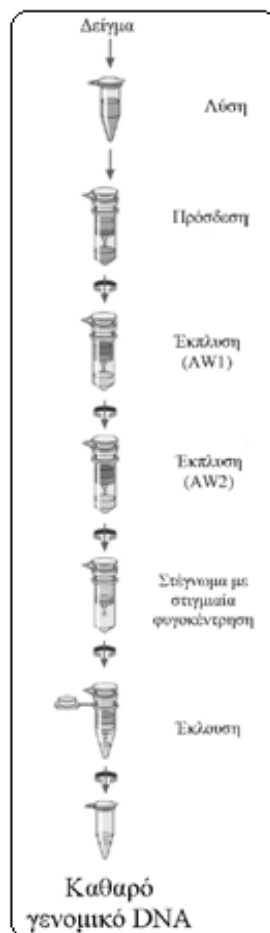


Εικόνα 17. Ανάλυση του ποσοστού των αποπτωτικών $CD8^+$ (A) Διάγραμμα FSC έναντι SSC και περιχαράκωση των λεμφοκυττάρων (R1) (B) Διάγραμμα SSC έναντι CD-8 και περιχαράκωση των $CD8^+$ κυττάρων (R2) στο gate των λεμφοκυττάρων (C) Διάγραμμα FSC έναντι 7-AAD και περιχαράκωση των ζώντων (R3) αποπτωτικών (R4) και νεκρών (R5) κυττάρων στο gate των $CD8^+$ κυττάρων.

Προσδιορισμός του μεγέθους των τελομερών με την τεχνική της real time PCR

Ο προσδιορισμός του μήκους των τελομερών αντανακλά τον ρυθμό πολλαπλασιασμού των Τ-λεμφοκυττάρων.

Σε ανοσομαγνητικά διαχωρισθέντα CD4⁺, CD8⁺ Τ-λεμφοκύτταρα απομονώθηκε το DNA με τη χρήση του QIAmp DNA Blood Mini Kit (Qiagen GmbH, Hilden, German)] σύμφωνα με το πρωτόκολλο της εταιρίας (**Εικόνα 18**)



Εικόνα 18 .Απομόνωση DNA με τη χρήση το QIAmp DNA Blood Mini Kit.

Στη συνέχεια, για την Real-time PCR χρησιμοποιήθηκε έτοιμο δείγμα iTaq SYBR Green Supermix με ROX (Biorad, Hercules, CA). Αρχικά, για κάθε αντίδραση, 20 μl τελικού όγκου αναμιγνύονταν με 100ng DNA 1x Taq Syber Green Supermix (Biorad, Hercules, CA) και 900 nM ειδικών εκκινητών

(primers). Σαν γονίδιο αναφοράς (reference gene) χρησιμοποιήθηκε η β-σφαιρίνη (single-copy –gene). Οι συνθήκες της αντίδρασης ήταν 50⁰ C για 2 min, αρχική αποδιάταξη και ενεργοποίηση της πολυμεράσης στους 95⁰ για 10 λεπτά ακολουθούμενη από 35 κύκλους αποδιάταξης (95⁰ για 15 sec) και υβριδοποίησης των εκκινητών (56⁰ για 1 λεπτό).

Οι αλληλουχίες των εκκινητών ήταν:

Για τα τελομερή: πρόσθιος 5'-CGGTTTGTGGGTTTGGGTTTGGGTTTGGGTTTGGGTT-3 και οπίσθιος 5'-GGCTTGCCTTACCCTTACCCTTACCCTTACCCTTACCCT-3.

Για την β-σφαιρίνη: πρόσθιος 5'-GCTTCTGACACAACCTGTGTTCACTAGC-3 και οπίσθιος 5'-CACCAACTTCATCCACGTTCCACC-3 .

Το μήκος του τελομερούς αντικατοπτρίστηκε από το σχετικό πηλίκο:

Τελομερές/μονό αντίγραφο γονιδίου (Telomere/single-copy-gene, T/S)
 $T/S=2^{-\Delta Ct} (\Delta Ct=Ct_{\text{τελομερούς}}-Ct_{\text{β-σφαιρίνης}})$.

Οι μετρήσεις έγιναν με το ABI Prism 7000 Sequence Detection System software (Applied Biosystems).

Προσδιορισμός των TREC στα περιφερικά T-λεμφοκύτταρα

Για την εκτίμηση του αριθμού των T-κυττάρων που μόλις είχαν παραχθεί και είχαν εξέλθει από τον θύμο αδένα στην κυκλοφορία προσδιορίστηκαν τα SjTrecs. Η ποσοτικοποίηση πραγματοποιήθηκε σε ολικό DNA από ανοσομαγνητικά διαχωρισθέντα CD4⁺ και CD8⁺ T-λεμφοκύτταρα με τη μεθοδολογία απόλυτης ποσοτικοποίησης με χρήση ποσοτικής αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (quantitative Real Time PCR), με εκκινητές και ιχνηλάτη TaqMan. Ως γονίδιο αναφοράς (reference gene) χρησιμοποιήθηκε το γονίδιο της σταθερής περιοχής Ca το οποίο παραμένει στα γονίδια TCR μετά την αναδιάταξή τους.

Για τη δημιουργία πρότυπης καμπύλης (standard curve) χρησιμοποιήθηκαν σε κάθε πείραμα διαδοχικές αραιώσεις γνωστής συγκέντρωσης του πλασμιδιακού φορέα TA vector PCR 2,1 (Invitrogen) με κλωνοποιημένα στην Pvu II θέση είτε το προϊόν sjTREC, είτε το προϊόν Ca μετά από PCR

σε DNA CD3⁺ κυττάρων ομφάλιου λώρου. Οι τεχνικές κλωνοποίησης αναφέρονται παρακάτω.

Αναλυτικά, ολικό DNA από CD4⁺ και CD8⁺ T-λεμφοκύτταρα ασθενών με CIN και υγιών μαρτύρων απομονώθηκε χρησιμοποιώντας το QIAmp Blood Kit (Qiagen, Hiden, Germany) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

Μια τυπική αντίδραση όγκου 20μl περιείχε ρυθμιστικό διάλυμα TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems Inc., Foster City, CA, USA), 900 nm από κάθε εκκινητή, 200 nm ιχθυλάτη TaqMan και 100 ng DNA.

Οι ακολουθίες των ειδικών εκκινητών και ανιχνευτών για τα sjTREC και Ca ήταν οι ακόλουθες:

Για το sjTREC:

5'-CCATGCTGACACCTCTGGTT-3' πρόσθιος

5'-TCGTGAGAACGGTGAATGAAG-3'-οπίσθιος

Probe CACGGTGATGCATAGGCACCT-

Για το Ca:

5'-CCTGATCCTCTTGTCCCACAG-3' πρόσθιος

5'-GGATTTAGAGTCTCTCAGCTGGTACA-3' οπίσθιος

Probe 5'ATCCAGAACCCTGACCCTGCCG-3'

Οι συνθήκες της αντίδρασης ήταν: 50° C για 2 min, αρχική αποδιάταξη και ενεργοποίηση της πολυμεράσης στους 95° C για 10 λεπτά, ακολουθούμενη από 40 κύκλους αποδιάταξης (95° C για 15 δευτερόλεπτα) και υβριδοποίησης των εκκινητών (60° C για 1 λεπτό) με ανάκτηση των δεδομένων φθορισμού στο τέλος κάθε σταδίου υβριδοποίησης

Οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν στο σύστημα ανίχνευσης αλληλουχίας ABI PRISM 7000 (Applied Biosystems) και τα αποτελέσματα αναλύθηκαν με το πρόγραμμα ABI PRISM SDS. Το αποτέλεσμα εκτιμήθηκε ως εξής:

Μέση ποσότητα (CA) /2=αριθμός των T κυττάρων

Μέση ποσότητα TRECs /αριθμό των T- κυττάρων =αντίτυπα sj TREC ανά T κύτταρο .

Τεχνικές κλωνοποίησης

Αντίδραση συγκόλλησης τμημάτων DNA (Ligation) του PCR προϊόντος σε πλασμιδιακό φορέα (TA cloning Vector)

Μέσα σε σωληνάριο Eppendorf προστέθηκαν:

T4 DNA Ligase 10x buffer	1 μl
Pcr 2,1 Ta vector	2 μl
T4 DNA Ligase (3 units /μl)	1 μl
PCR προϊόν	X μl *
Νερό για τελικό όγκο	10 μl

Αφού αναμείχθηκαν τα υλικά αφέθηκε η αντίδραση όλη νύχτα στους 4⁰ C.

**Για τον υπολογισμό της κατάλληλης ποσότητας του προϊόντος PCR που θα περιέχεται στην αντίδραση για την συγκόλληση (ligation) με τον φορέα χρησιμοποιήθηκε ο εξής τύπος:*

$X \text{ ng PCR product} = (Y \text{ bp PCR product}) (50 \text{ ng pCR@2.1 vector} / \text{size in bp of the pCR@2.1 vector} : \sim 3900)$

Μετασχηματισμός επιδεκτικών (competent) κυττάρων Ecoli με θερμικό σοκ (Transformation)

Μεταφέρθηκαν σε πάγο 50 μl κατεψυγμένα επιδεκτικά (competent) κύτταρα, όσα χρειάζονται για κάθε αντίδραση. Προστέθηκαν 2μl από την αντίδραση συγκόλλησης (ligation) κατευθείαν στα κύτταρα, ακολούθησε ήπια ανάδευση και επώαση στον πάγο για 30 λεπτά. Έπειτα προκλήθηκε θερμικό σοκ στους 42⁰ για 30 δευτερόλεπτα ακριβώς και στη συνέχεια στον πάγο.

Προστέθηκαν 250μl SOC*θρεπτικό και ακολούθησε επώαση στους 37⁰ για 1 ώρα .

Απλώθηκαν 50μl μέχρι 200 μl από κάθε αντίδραση μετασχηματισμού σε πιάτα με LB με άγαρ που περιλαμβάνουν επίσης XGALL και αντιβιοτικό. Επώαστηκαν στους 37⁰ για 18 ώρες όπου σχηματίστηκαν άσπρες αποικίες εκ των οποίων λήφθηκαν τουλάχιστον 10 για απομόνωση του πλασμιδίου και για περιοριστική ανάλυση. Οι αποικίες καλλιεργήθηκαν σε 2-5 ml σε θρεπτικό LB όλη νύχτα.

Απομονώθηκε το πλασμίδιο και στη συνέχεια προσδιορίστηκε η αλληλουχία του προϊόντος της PCR(insert)

***SOC θρεπτικό**

2% Tryptone

0,5 Yeast Extract

10 mM NaCl

2,5 mM KCl

10 mM MgCl₂

10 mM MgSO₄

20Mm Glucose

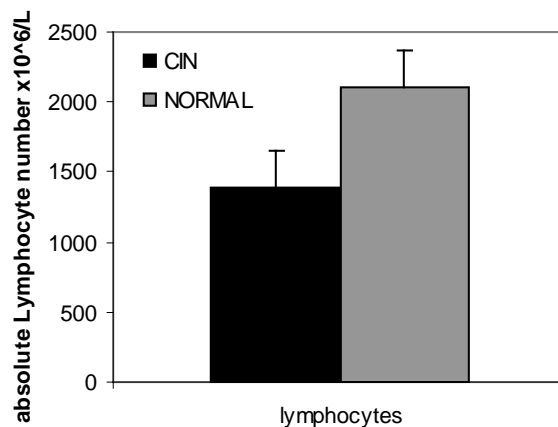
ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

Τα δεδομένα αναλύθηκαν με το πρόγραμμα στατιστικής GraphPad Prism (GraphPad Software, San Diego CA) και εκφράστηκαν σαν ο μέσος όρος \pm 1 τυπικής απόκλισης (SD). Το Mann-Whitney U test χρησιμοποιήθηκε για να καθορίσει διαφορές στις διάφορες τιμές μεταξύ ασθενών και μαρτύρων. Το χ^2 -τεστ χρησιμοποιήθηκε για να καθοριστεί η ομοιογένεια των πληθυσμών αναφορικά με την ηλικία και το φύλο. Το τεστ συσχέτισης Spearman χρησιμοποιήθηκε για να ελέγξει πιθανές συσχετίσεις μεταξύ διαφόρων παραμέτρων. Η δοκιμασία διπλής ανάλυσης μεταβλητότητας (two-way Analysis of Variance, ANOVA) χρησιμοποιήθηκε για να συγκριθεί η μέση σχετική τιμή των τελομερών σε διαφορετικές ηλικιακές ομάδες μεταξύ των ασθενών και των μαρτύρων.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

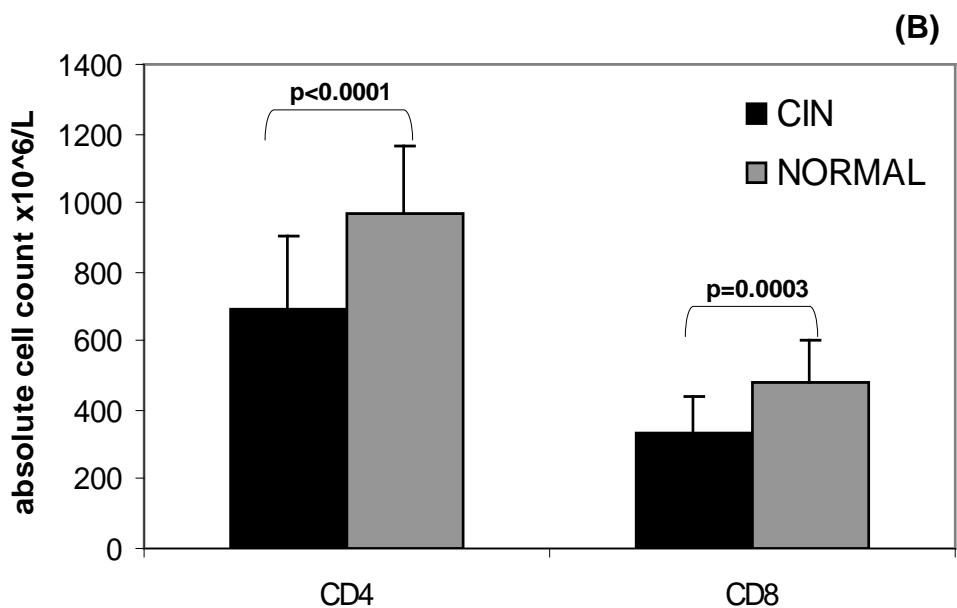
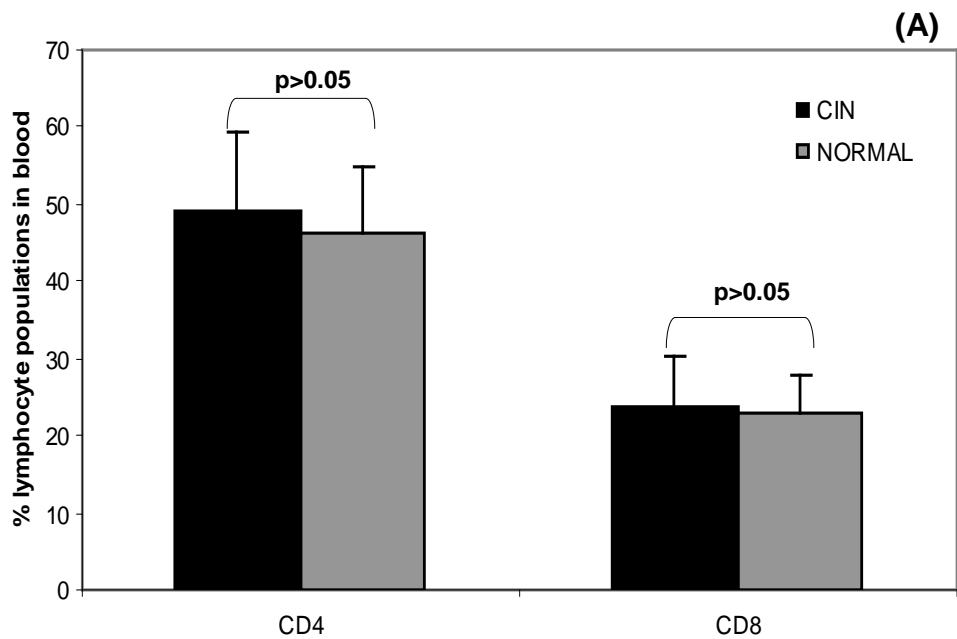
Λεμφοκυτταρικοί Υποπληθυσμοί

Ο απόλυτος αριθμός των λεμφοκυττάρων στο αίμα ήταν αρκετά ελαττωμένος στους ασθενείς με CIN ($1393 \pm 260 \times 10^6/L$) συγκριτικά με τους μάρτυρες ($2107 \pm 255 \times 10^6/L$; $p < 0.0001$) (**Εικόνα 19**).



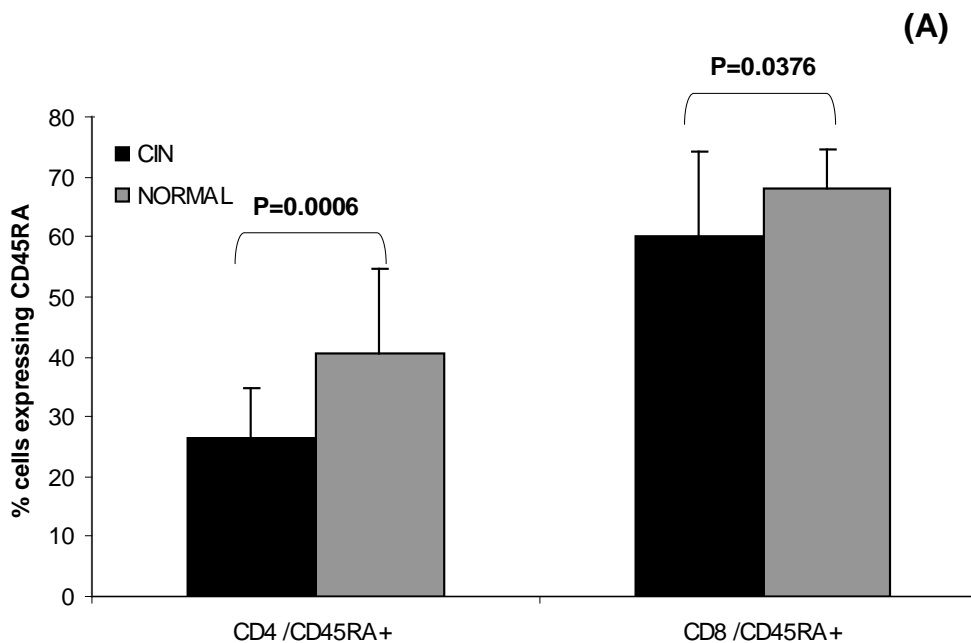
Εικόνα 19. Απόλυτος αριθμός λεμφοκυττάρων στο περιφερικό αίμα ασθενών (n=45) και μαρτύρων (n=15). Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσος όρος (± 1 σταθερή απόκλιση)

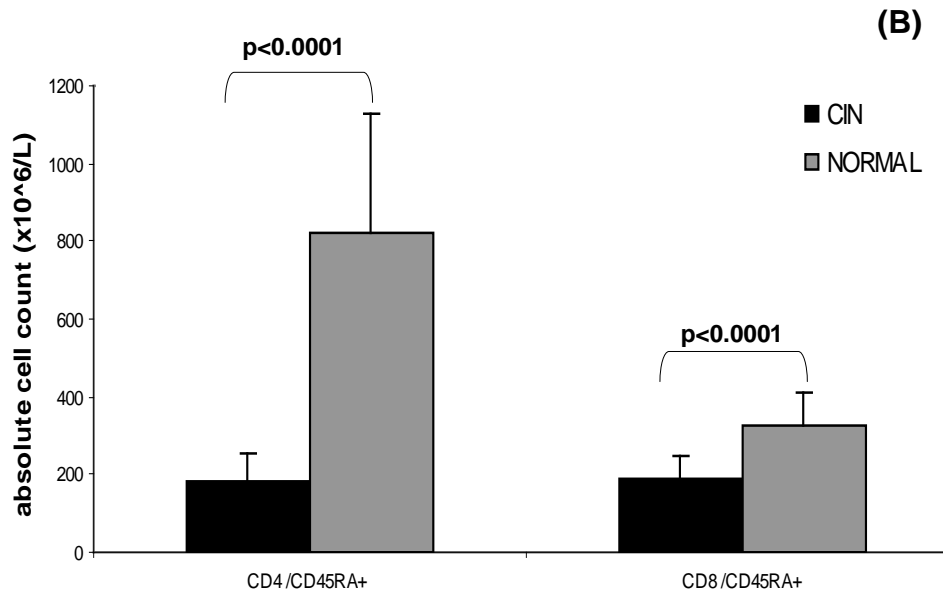
Η αναλογία των CD4⁺ και CD8⁺ στα λεμφοκύτταρα δεν βρέθηκε στατιστικά σημαντική μεταξύ ασθενών ($49.32\% \pm 10.21\%$ και $23.83\% \pm 6.30\%$ αντίστοιχα) και μαρτύρων ($46.29\% \pm 8.43\%$ και $22.97\% \pm 4.67\%$ αντίστοιχα), ωστόσο ο απόλυτος αριθμός των CD4⁺ και CD8⁺ κυττάρων ήταν στατιστικά αρκετά χαμηλότερος σε ασθενείς με CIN (692 ± 210 και $332 \pm 111 \times 10^6/L$ αντίστοιχα) συγκριτικά με υγιείς μάρτυρες (972 ± 188 και $484 \pm 117 \times 10^6/L$ αντίστοιχα) ($p < 0.0001$ and $p = 0.0003$, αντίστοιχα) (**Εικόνα 20A, 20B**).



Εικόνα 20. Έκφραση του CD4 και CD8 στα λεμφοκύτταρα ασθενών με CIN (n= 44) και μαρτύρων (n=15) στο περιφερικό αίμα. **(A)** Η εκατοστιαία αναλογία των CD4 και CD8 T-κυττάρων στον πληθυσμό των λεμφοκυττάρων **(B)** Ο απόλυτος αριθμός (10^6 κύτταρα/L) των υποπληθυσμών CD4 και CD8 T-κυττάρων στο περιφερικό αίμα ασθενών με CIN και μαρτύρων. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέση τιμή (± 1 σταθερή απόκλιση)

Η αναλογία των παρθένων (naive) CD45RA⁺ κυττάρων μέσα στο κλάσμα των CD4⁺ και CD8⁺ κυττάρων ήταν αρκετά μειωμένη στους ασθενείς (26.50% ± 8.21% και 59.92% ± 14.23%, αντίστοιχα) συγκριτικά με τους μάρτυρες (40.68% ± 14.03% και 67.93% ± 6.56%, αντίστοιχα, $p = 0.0006$ και $p = 0.0376$, αντίστοιχα). Η ελάττωση αυτή συνοδευόταν από μείωση των απόλυτων αριθμών των CD4⁺/CD45RA⁺ και CD8⁺/CD45RA⁺ κυττάρων στους ασθενείς (182 ± 73 και $190 \pm 58 \times 10^6/L$, αντίστοιχα) συγκριτικά με τους μάρτυρες (820 ± 310 και $328 \pm 84 \times 10^6/L$, αντίστοιχα; $p < 0.0001$ και $p < 0.0001$ αντίστοιχα). **(Εικόνα 21A, 21B)** Τα παραπάνω ευρήματα υποδηλώνουν μειωμένη παραγωγή από τον θύμο αδένα T-λεμφοκυττάρων.



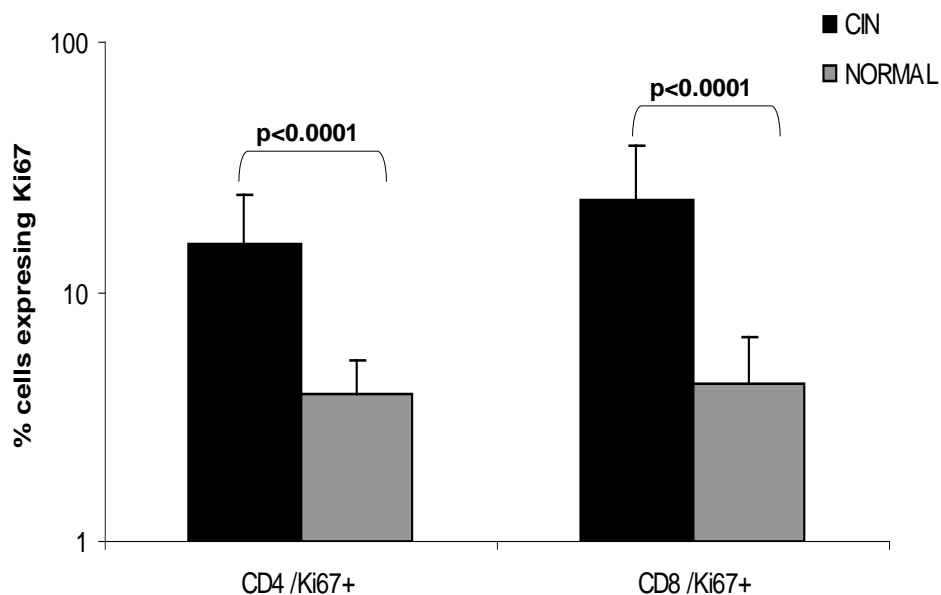


Εικόνα 21. Έκφραση του CD45RA στο κλάσμα των CD4 και CD8 T-λεμφοκυττάρων ασθενών με CIN (n=45) και μαρτύρων (n= 15) στο περιφερικό αίμα. **(A)** Η εκατοστιαία αναλογία των CD45RA⁺ κυττάρων στο κλάσμα των CD4⁺ και CD8⁺ T-κυττάρων. **(B)** Ο απόλυτος αριθμός (10⁶ κύτταρα/L) των υποπληθυσμών των CD4⁺/CD45RA⁺ και CD8⁺/CD45RA⁺ παρθένων T-κυττάρων στο περιφερικό αίμα ασθενών με CIN και μαρτύρων. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέση τιμή(± 1 σταθερή απόκλιση)

Ωστόσο, παρατηρήθηκε επιπλέον μια μείωση στον απόλυτο αριθμό των T-κυττάρων μνήμης CD4⁺/CD45RO⁺ και CD8⁺/CD45RO⁺ στους ασθενείς (443 ± 130 και 139 ± 57 x 10⁶/L αντίστοιχα) συγκριτικά με τους μάρτυρες (626 ± 167 and 193 ± 52 x 10⁶/L, αντίστοιχα, $p=0.0003$ and $p=0.002$, αντίστοιχα) που προφανώς οφείλεται στον συνολικά χαμηλό αριθμό των CD4⁺ και CD8⁺ κυττάρων στους ασθενείς.

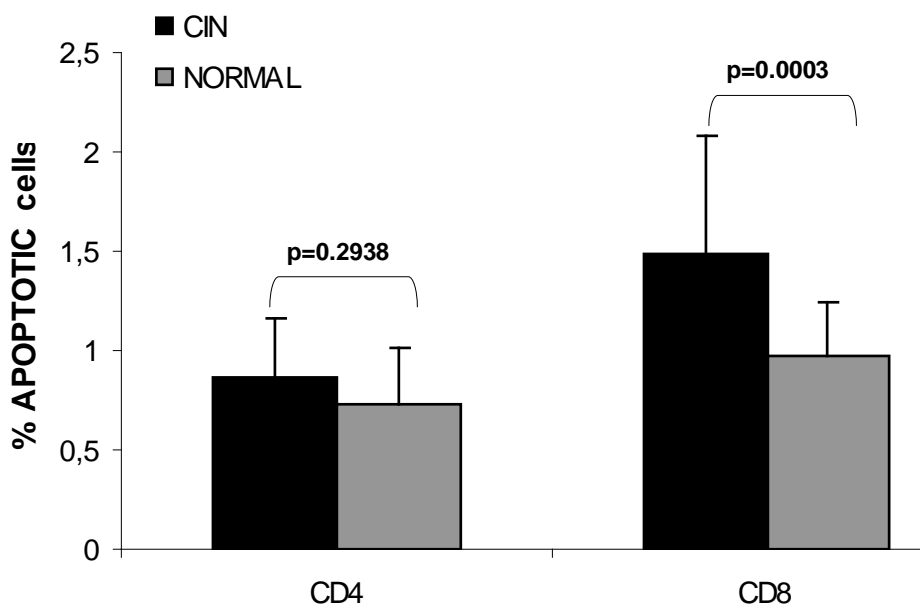
Χαρακτηριστικά πολλαπλασιασμού και απόπτωσης των λεμφοκυτταρικών υποπληθυσμών

Το ποσοστό των κυττάρων που εξέφραζαν τον πυρηνικό δείκτη Ki67 μέσα στο διαμέρισμα των CD4⁺ και CD8⁺ κυττάρων, ήταν αρκετά υψηλότερο στους ασθενείς (15.55% ± 9.15% και 23.29% ± 14.79%, αντίστοιχα) συγκριτικά με τους μάρτυρες (3.87% ± 1.41% και 4.31% ± 2.21%, αντίστοιχα; $p < 0.0001$ and $p < 0.0001$, αντίστοιχα) υποδηλώνοντας αύξηση του αριθμού των CD4⁺ και CD8⁺ κυττάρων που ευρίσκονται σε φάση πολλαπλασιασμού, στους ασθενείς (**Εικόνα 22**)



Εικόνα 22. Έκφραση του δείκτη Ki67 στα CD4 και CD8 T-λεμφοκύτταρα ως δείκτη πολλαπλασιασμού. Τα ραβδογράμματα αντιπροσωπεύουν το ποσοστό των CD4 και CD8 κυττάρων που είναι θετικά ως προς την έκφραση του Ki67, όπως μετρήθηκε με κυτταρομετρία ροής κατόπιν ενδοκυττάριας σήμανσης με αντίστοιχα μονοκλωνικά αντισώματα σε ασθενείς μεCIN (n=44) και υγιείς μάρτυρες (n =15). Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέση τιμή (± 1 σταθερή απόκλιση).

Η αυξημένη ενεργοποίηση των Τ-λεμφοκυττάρων στους ασθενείς με CIN έχει επιβεβαιωθεί και από παλαιότερες μελέτες [Papadaki HA. Br.J.Haematol 2005]. Ωστόσο, επειδή η αυξημένη ενεργοποίηση συσχετίζεται και με αυξημένη απόπτωση των Τ-λεμφοκυττάρων [Russel JH Curr Opin Immunol. 1995] που ενδεχομένως να έχει κάποιο ρόλο στην λεμφοπενία των ασθενών με CIN, μελετήθηκαν τα αποπτωτικά χαρακτηριστικά των Τ-κυττάρων των ασθενών. Βρέθηκε ότι το ποσοστό των αποπτωτικών κυττάρων μέσα στο κλάσμα των CD4⁺ κυττάρων δεν διέφερε σημαντικά μεταξύ των ασθενών (0.86% ± 0.30%) και υγιών μαρτύρων (0.73% ± 0.28%) ($p = 0.2998$). Ωστόσο, ένας αυξημένος αριθμός από αποπτωτικά κύτταρα υπήρχε μέσα στο κλάσμα των CD8⁺ κυττάρων των ασθενών (1.48% ± 0.60%) συγκριτικά με αυτό των μαρτύρων (0.97% ± 0.28%; $p = 0.0003$) (**Εικόνα 23**)

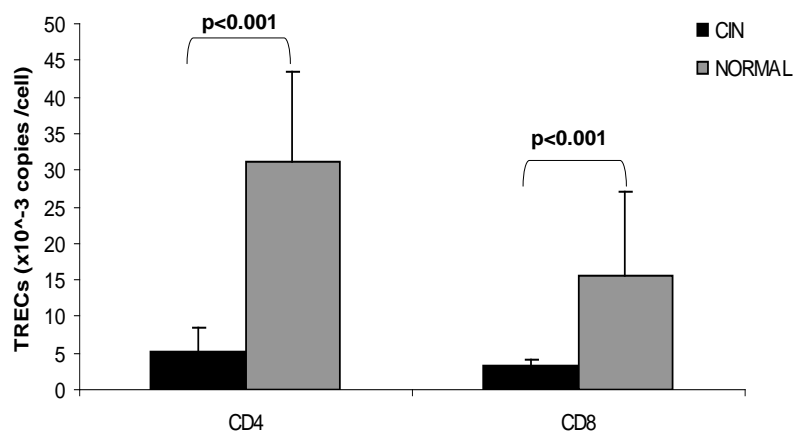


Εικόνα 23. Ποσοστό αποπτωτικών ανοσομαγνητικά διαχωρισθέντων CD4⁺ και CD8⁺ κυττάρων στο κλάσμα των Τ-κυττάρων του περιφερικού αίματος όπως μετρήθηκε με κυτταρομετρία ροής κατόπιν χρώσης με 7-AAD. (n=22) Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέση τιμή (± 1 σταθερή απόκλιση). Η σύγκριση μεταξύ ασθενών και μαρτύρων έχει πραγματοποιηθεί με Mann-Whitney U test και επισημαίνονται οι τιμές p.

Ενδιαφέρον είχε το γεγονός ότι το ποσοστό των αποπτωτικών κυττάρων ήταν αρκετά πιο υψηλό στο κλάσμα των CD8⁺ κυττάρων συγκριτικά με αυτό των CD4⁺ κυττάρων στους ασθενείς ($p < 0.0001$) αλλά όχι όμως και στους μάρτυρες. ($p = 0.0584$). Τέλος, η συσχέτιση μεταξύ του ποσοστού των Ki-67⁺ κυττάρων και του ποσοστού των αποπτωτικών κυττάρων μέσα στο κλάσμα των CD8⁺ κυττάρων ($r = 0.3184$, $p = 0.014$) ενισχύει την υπόθεση ενός επαγόμενου από ενεργοποίηση επιταχυνόμενου κυτταρικού θανάτου στα CD8⁺ κύτταρα των ασθενών.

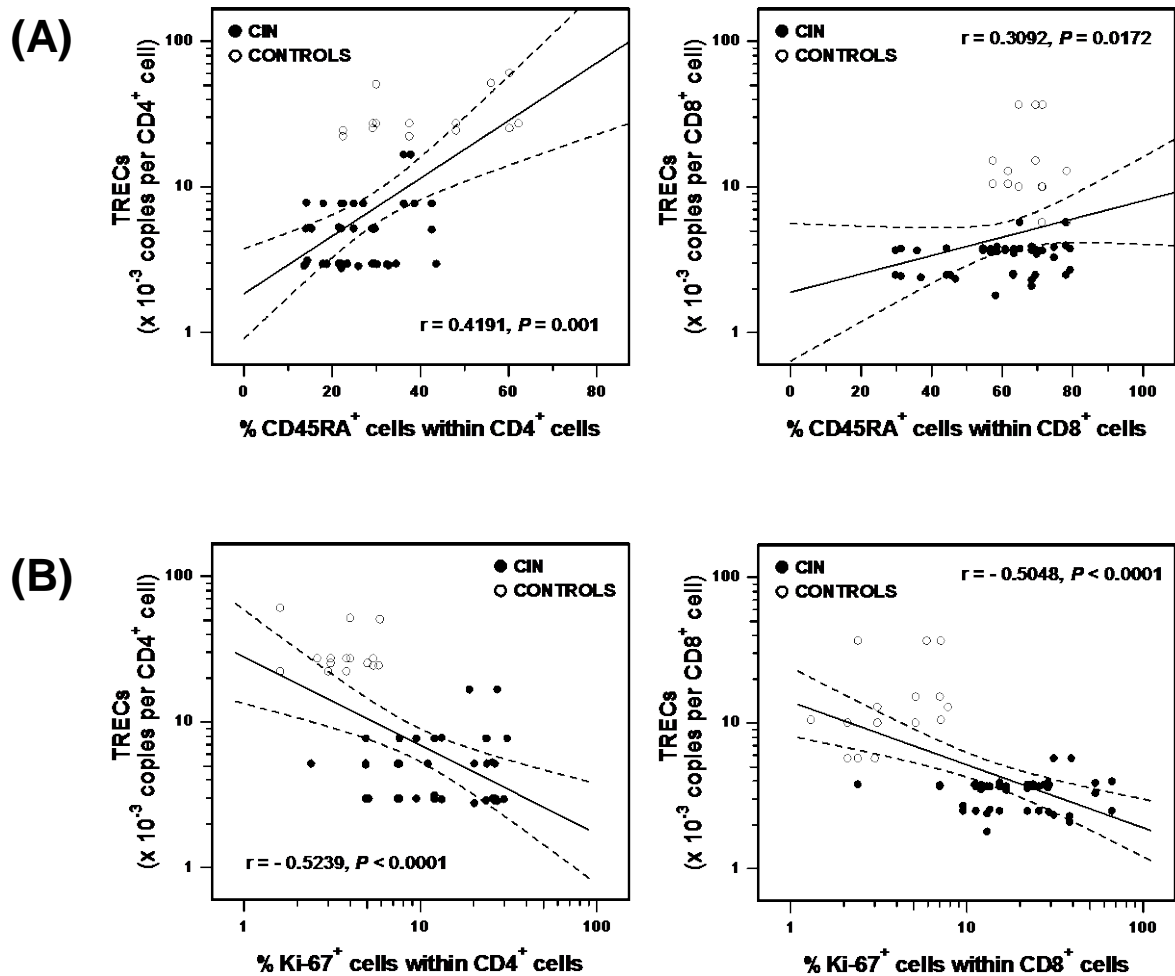
Αναλογία των TREC στα CD4⁺ και CD8⁺ κύτταρα

Για την εκτίμηση του αριθμού των T-κυττάρων που μόλις παρήχθησαν και εξήλθαν από τον θύμο αδένα στην κυκλοφορία μετρήθηκε ο αριθμός των sjTREC με ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (quantitative Real Time PCR). Βρέθηκε ότι τα sjTREC στους ασθενείς ήταν πολύ χαμηλότερα και στους δύο κυτταρικούς πληθυσμούς ($5.18 \pm 3.21 \times 10^{-3}$ αντίγραφα/CD4⁺ κύτταρα και $3.39 \pm 0.81 \times 10^{-3}$ αντίγραφα/CD8⁺ κύτταρα) συγκριτικά με τους υγιείς μάρτυρες ($31.14 \pm 12.40 \times 10^{-3}$ αντίγραφα/CD4⁺ κύτταρα και $15.67 \pm 11.34 \times 10^{-3}$ αντίγραφα/CD8⁺ κύτταρα; $p < 0.0001$ and $p < 0.0001$) (**Εικόνα 24**)



Εικόνα 24. Αριθμός των T-cell receptor excision circles (TRECs) στους CD4⁺ και CD8⁺ κυτταρικούς υποπληθυσμούς των ασθενών με CIN (n=45) και υγιών μαρτύρων (n=15). Τα ραβδογράμματα αντιπροσωπεύουν τη μέση τιμή (± 1 σταθερή απόκλιση) του αριθμού των TRECs στα CD4⁺ και CD8⁺ κύτταρα του αίματος όπως εκτιμήθηκε με ποσοτική real-time PCR. Η σύγκριση μεταξύ ασθενών και μαρτύρων έγινε με Mann-Whitney U test και επισημαίνονται οι p τιμές.

Ο χαμηλός αριθμός των TRECs στους ασθενείς παράλληλα με τη θετική συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων των TRECs και των ποσοστών των CD45RA⁺ παρθένων CD4⁺ ($r = 0.4191, p = 0.001$) και CD8⁺ ($r=0.4191, p = 0.001$) κυττάρων υποδεικνύει μια μειωμένη παραγωγή T-κυττάρων από το θύμο στους ασθενείς με CIN (**Εικόνα 25A**) ενώ η αρνητική συσχέτιση μεταξύ του αριθμού των TRECs και του ποσοστού των πολλαπλασιαζόμενων Ki-67⁺ κυττάρων μέσα στο κλάσμα των CD4⁺ ($r = -0.5239, p < 0.0001$) και CD8⁺ ($r = -0.5048, p < 0.0001$) κυττάρων υποδηλώνει ότι δεν μπορεί να αποκλειστεί η ως ένα βαθμό περιφερική αραίωση των TRECs που προκλήθηκε από τον επιταχυνόμενο ρυθμό διαίρεσης των κυττάρων (**Εικόνα 25B**)

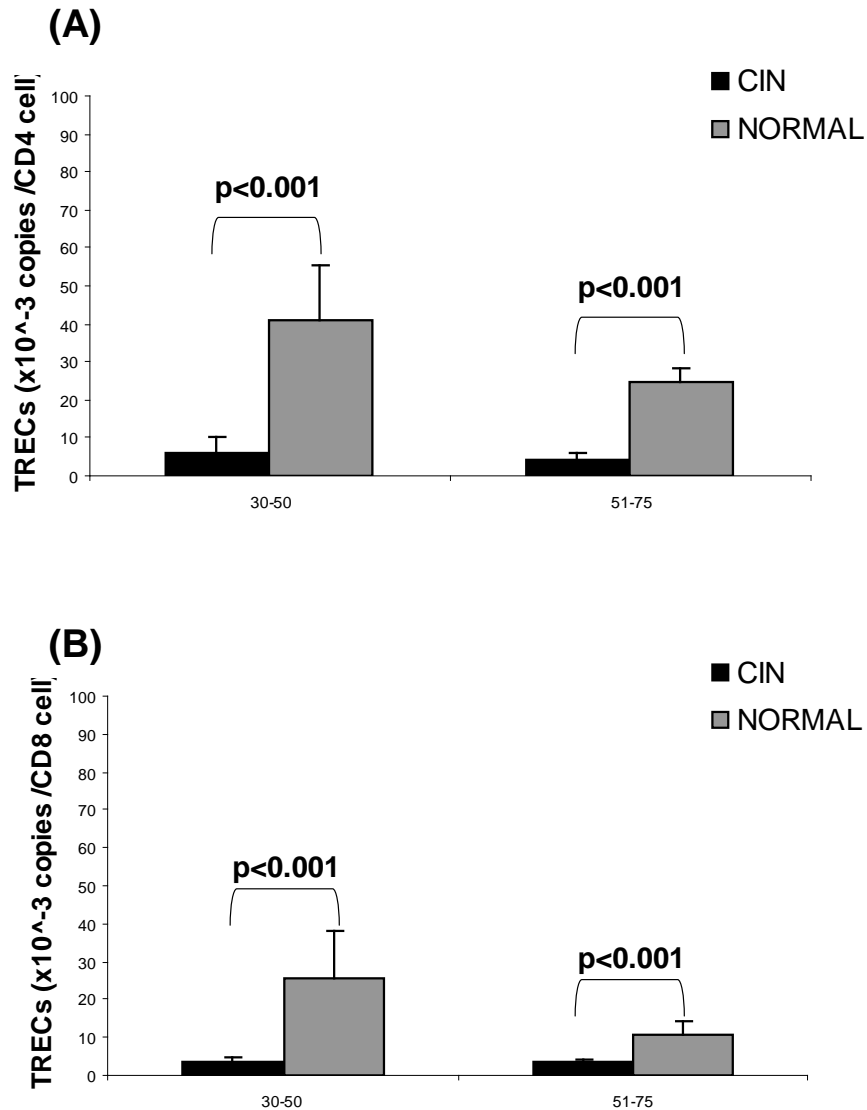


Εικόνα 25. Γραμμική συσχέτιση των T-cell receptor excision circles (TRECs) στους CD4⁺ και CD8⁺ κυτταρικούς υποπληθυσμούς των ασθενών με CIN και υγιών μαρτύρων με **(A)** το ποσοστό των παρθένων (naïve) CD45⁺ κυττάρων και **(B)** το ποσοστό των πολλαπλασιαζόμενων Ki-67⁺ κυττάρων. Στα διαγράμματα φαίνεται ο συντελεστής συσχέτισης (r) και ο βαθμός σημαντικότητας (p) σύμφωνα με τη δοκιμασία συσχέτισης κατά Spearman. Οι γραμμές συσχέτισης υποδεικνύονται ως συνεχόμενες γραμμές, ενώ τα κατά 95% όρια αξιοπιστίας ως διακεκομμένες γραμμές.

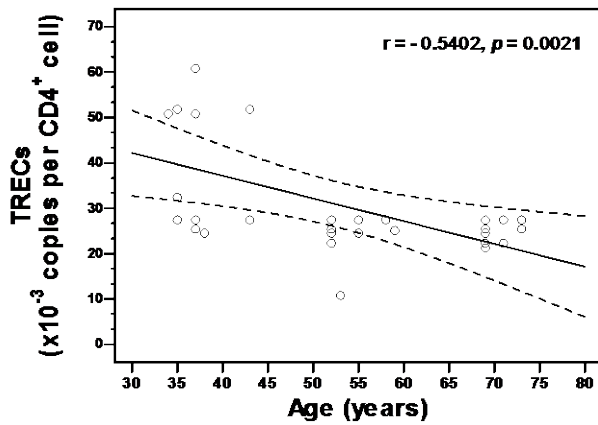
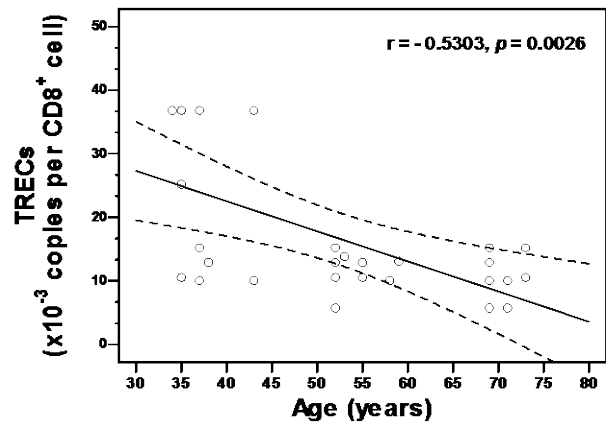
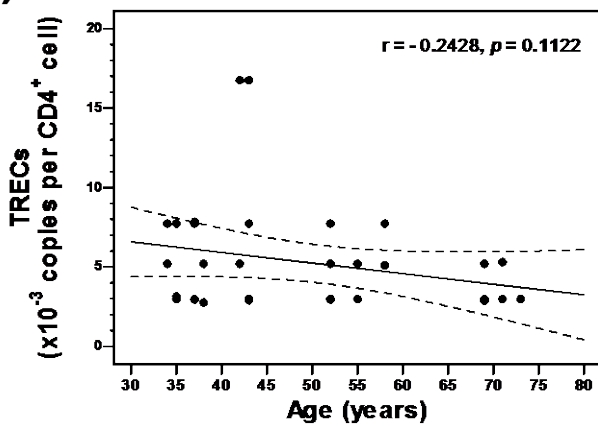
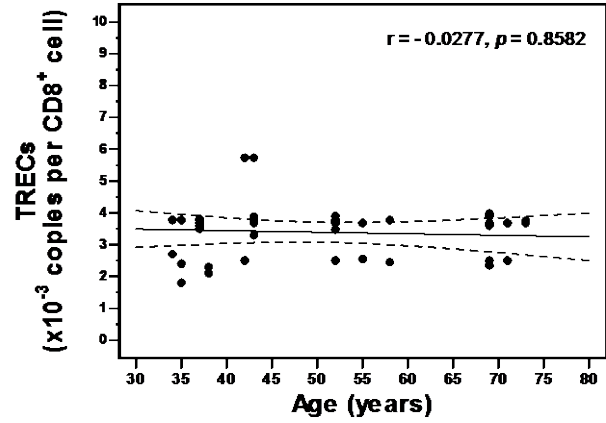
Για να διερευνηθεί η πιθανή επίδραση της ηλικίας στον αριθμό των TRECs στους CD4⁺ και CD8⁺ πληθυσμούς, διαχωρίστηκε ο υπό μελέτη πληθυσμός σε άτομα μικρότερης (30-50 χρονών) και μεγαλύτερης (51-75 χρονών) ηλικίας. Βρέθηκε ότι ο αριθμός των TRECs ήταν σημαντικά χαμηλότερος

στους ασθενείς συγκρινόμενος με τους μάρτυρες και στις δύο ηλικιακές ομάδες και στους δύο λεμφοκυτταρικούς υποπληθυσμούς. Στην πρώτη ομάδα, με τα νεότερα ηλικιακά άτομα, βρέθηκαν $6.19 \pm 4.10 \times 10^{-3}$ αντίγραφα/ $CD4^+$ κύτταρα και $3.49 \pm 0.99 \times 10^{-3}$ αντίγραφα/ $CD8^+$ κύτταρα στους ασθενείς έναντι $40.94 \pm 14.63 \times 10^{-3}$ αντιγράφων/ $CD4^+$ κύτταρα και $25.39 \pm 12.55 \times 10^{-3}$ αντιγράφων/ $CD8^+$ κύτταρα στους μάρτυρες ($p < 0.0001$ και $p < 0.0001$, αντίστοιχα). Στη μεγαλύτερη ηλικιακή ομάδα βρέθηκαν $(4.26 \pm 1.71 \times 10^{-3})$ αντίγραφα / $CD4^+$ κύτταρα και $3.29 \pm 0.61 \times 10^{-3}$ αντίγραφα/ $CD8^+$ κύτταρα στους ασθενείς έναντι $24.40 \pm 3.92 \times 10^{-3}$ αντιγράφων/ $CD4^+$ κύτταρα και $10.88 \pm 3.34 \times 10^{-3}$ αντιγράφων / $CD8^+$ κύτταρα στους μάρτυρες ($p < 0.0001$ and $p < 0.0001$, αντίστοιχα) **(Εικόνα 26A, 26B)**.

Ενδιαφέρον ήταν ότι βρέθηκε μια στατιστικά σημαντική αρνητική συσχέτιση μεταξύ του περιεχομένου των $CD4^+$ και $CD8^+$ κυττάρων σε TREC και την ηλικία στα υγιή άτομα ($n = 30$) ($r = - 0,5717$, $p = 0,001$ και $r = - 0,5316$, $p = 0,0025$, αντίστοιχα), αλλά όχι στους ασθενείς με CIN ($n = 44$). Αυτό υποδηλώνει ότι και άλλοι παράγοντες εκτός από την ηλικία έχουν ένα σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση του αριθμού των TREC στη CIN. **(Εικόνα 27A,B,Γ,Δ)**



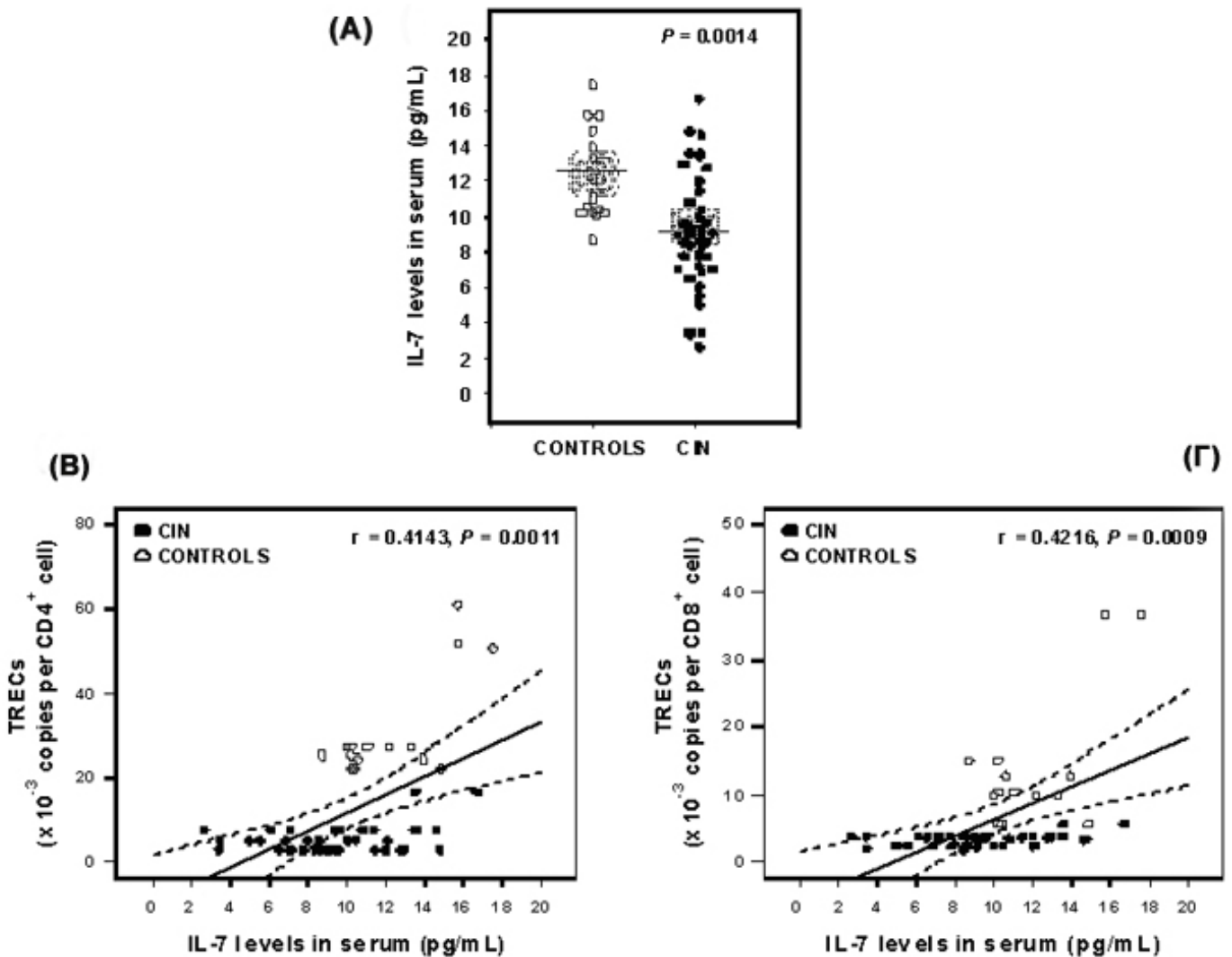
Εικόνα 26. Περιεχόμενο σε T-cell receptor excision circles (TRECs) στους **(A)** CD4⁺ και **(B)** CD8⁺ κυτταρικούς υποπληθυσμούς μικρότερων και μεγαλύτερων ηλικιακά ασθενών με CIN και υγιών μαρτύρων. Οι μπάρες αντιπροσωπεύουν τη μέση τιμή (± 1 σταθερή απόκλιση) του αριθμού των TRECs στα CD4⁺ και CD8⁺ κύτταρα του αίματος στην μικρότερη ηλικιακά ομάδα (30-50 χρόνων) και στην μεγαλύτερη ηλικιακά ομάδα (51-75 χρόνων), σε ασθενείς με CIN και υγιείς μάρτυρες. Η σύγκριση μεταξύ ασθενών και μαρτύρων έγινε με τη δοκιμασία Mann-Whitney U και επισημαίνονται οι p τιμές.

(Α)**(Β)****(Γ)****(Δ)**

Εικόνα 27. Γραμμική συσχέτιση των T-cell receptor excision circles (TRECs) στους CD4⁺ και CD8⁺ κυτταρικούς υποπληθυσμούς των υγιών μαρτύρων (**Α** και **Β**) και των ασθενών με CIN (**Γ** και **Δ**) με την ηλικία. Στα διαγράμματα φαίνεται ο συντελεστής συσχέτισης (r) και ο βαθμός σημαντικότητας (p) σύμφωνα με τη δοκιμασία συσχέτισης κατά Spearman. Οι γραμμές συσχέτισης υποδεικνύονται ως συνεχόμενες γραμμές, ενώ τα 95% όρια αξιοπιστίας ως διακεκομμένες γραμμές.

Επίπεδα IL-7

Οι ασθενείς με CIN βρέθηκε να έχουν σημαντικά χαμηλότερα επίπεδα IL-7 στον ορό συγκριτικά με τους μάρτυρες (**Εικόνα 28A**). Επιπλέον, υπήρξε μια στατιστικά σημαντική θετική συσχέτιση της συγκέντρωσης της IL-7 στον ορό με το περιεχόμενο σε TREC στα CD4⁺ ($r=0.4143, p=0.0011$) και CD8⁺ κύτταρα ($r=0.4216, p=0.0009$) (**Εικόνα 28B, 28 Γ**).



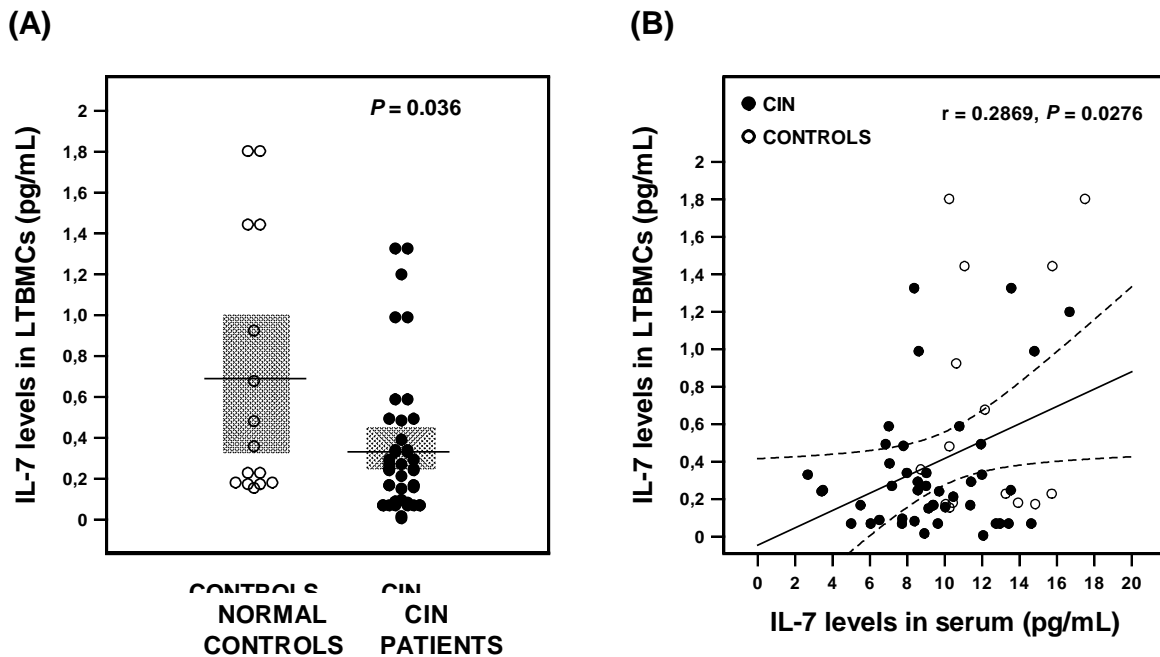
Εικόνα 28. Επίπεδα IL-7 στον ορό και η συσχέτισή τους με το περιεχόμενο σε T-cell receptor excision circles (TRECs) των υποπληθυσμών των T-λεμφοκυττάρων σε ασθενείς με CIN και υγιείς μάρτυρες. **(A)** Ατομικές μετρήσεις της IL-7 στον ορό ασθενών και υγιών μαρτύρων. Η μέση τιμή της συγκέντρωσης της κυτταροκίνης και τα 95% όρια αξιοπιστίας

απεικονίζονται με την οριζόντια γραμμή και τα διάστικτα τετράγωνα, αντίστοιχα. Η σύγκριση μεταξύ ασθενών και μαρτύρων έγινε με τη δοκιμασία Mann-Whitney U και επισημαίνεται η τιμή p . **(B, Γ)** Γραμμική συσχέτιση των T-cell receptor excision circles (TRECs) στους $CD4^+$ **(B)** και $CD8^+$ **(Γ)** κυτταρικούς υποπληθυσμούς των υγιών μαρτύρων και των ασθενών με CIN, με την ηλικία. Στα διαγράμματα φαίνεται ο συντελεστής συσχέτισης (r) και ο βαθμός σημαντικότητας (p) σύμφωνα με τη δοκιμασία συσχέτισης κατά Spearman. Οι γραμμές συσχέτισης παλινδρόμησης υποδεικνύονται ως συνεχόμενες γραμμές, ενώ τα 95% όρια εμπιστοσύνης ως διακεκομμένες γραμμές.

Ομοίως, μετρήθηκαν τα επίπεδα της κυταροκίνης σε υπερκείμενα μακρόχρονων μυελικών καλλιεργείων, καθώς τα στρωματικά κύτταρα του μυελού των οστών συνεισφέρουν στην συστηματική παραγωγή της IL-7. Βρέθηκε ότι, όπως και στον ορό, η συγκέντρωση της IL-7 στα υπερκείμενα ήταν επίσης μειωμένη στους ασθενείς (0.33 ± 0.34 pg/mL) συγκριτικά με τους μάρτυρες (0.68 ± 0.63 , $p=0,036$). Επιπλέον, υπήρχε μια θετική συσχέτιση των επιπέδων της κυταροκίνης στον ορό και τα υπερκείμενα των καλλιεργείων ($r=0.2869$, $p=0.0276$) **(Εικόνα 29)**. Ενδιαφέρον ήταν το γεγονός ότι υπήρξε θετική συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων της IL-7 στα υπερκείμενα των μακρόχρονων καλλιεργείων και στο περιεχόμενο των TRECs τόσο στα $CD4^+$ ($r = 0.342$, $P = 0.008$) όσο και στα $CD8^+$ κύτταρα ($r = 0.2879$, $p = 0.027$).

Καθώς είναι γνωστό ότι η IL-7 επάγει την παραγωγή των T-λεμφοκυττάρων στον θύμο, τα παραπάνω ευρήματα ενισχύουν την υπόθεση ότι ο μειωμένος αριθμός των TREC στα T-λεμφοκύτταρα του περιφερικού αίματος μπορεί να οφείλεται, τουλάχιστον εν μέρει, στη χαμηλή παραγωγή νέων T-κυττάρων λόγω μειωμένης παραγωγή της IL-7.

Τα χαμηλά επίπεδα της κυταροκίνης δεν φαίνεται να έχουν ρόλο στην αποπτωτική διαδικασία των T-κυττάρων στην περιφέρεια καθώς δεν υπήρχε σημαντική συσχέτιση μεταξύ της IL-7 και του ποσοστού των $CD4^+$ ($r = -0.2442$) και $CD8^+$ κυττάρων ($r = -0.2166$).



Εικόνα 29. Συγκέντρωση της IL-7 σε υπερκείμενα μακρόχρονων μυελικών καλλιέργειών (Long-term Bone Marrow Cultures, LTBMCs) και συσχέτιση των επιπέδων της κυτταροκίνης μεταξύ ορού και υπερκειμένων. **(Α)** Ατομικές μετρήσεις της IL-7 σε υπερκείμενα LTBMIC ασθενών με CIN και υγιών μαρτύρων. Η μέση τιμή των συγκεντρώσεων της κυτταροκίνης και τα 95% όρια αξιοπιστίας απεικονίζονται με την οριζόντια γραμμή και τα διάστικτα τετράγωνα, αντίστοιχα. Η σύγκριση μεταξύ ασθενών και μαρτύρων έγινε με τη δοκιμασία Mann-Whitney U και επισημαίνεται η τιμή p . **(Β)** Γραμμική συσχέτιση των επιπέδων της κυτταροκίνης μεταξύ ορού και υπερκειμένων LTBMCs υγιών μαρτύρων και ασθενών με CIN. Στο διάγραμμα φαίνεται ο συντελεστής συσχέτισης (r) και ο βαθμός σημαντικότητας (p) σύμφωνα με τη δοκιμασία συσχέτισης κατά Spearman. Η γραμμή συσχέτισης υποδεικνύεται ως συνεχόμενη γραμμή, ενώ τα 95% όρια εμπιστοσύνης ως διακεκομμένες γραμμές.

Προσδιορισμός του μήκους των τελομερών

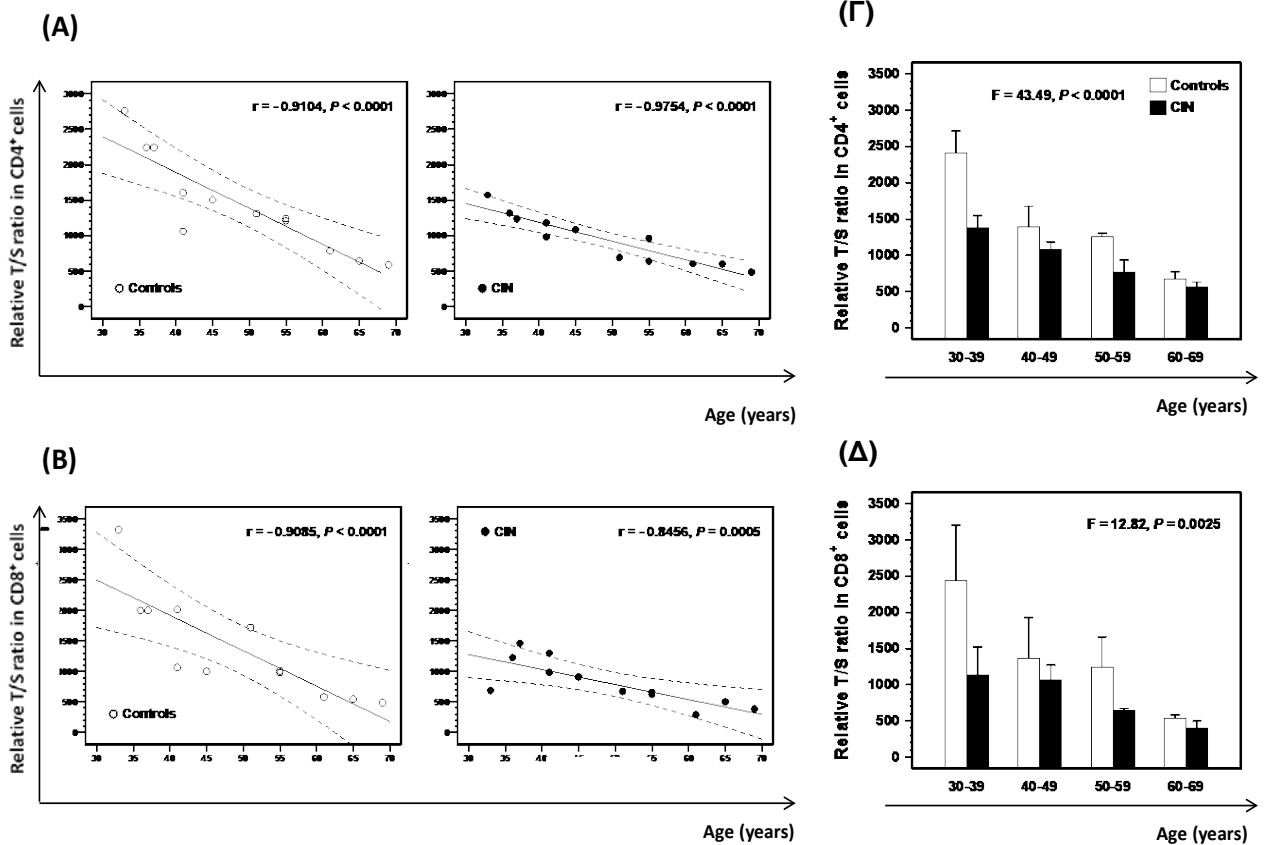
Το σχετικό μήκος των τελομερών στα $CD4^+$ και $CD8^+$ T-κύτταρα εξετάστηκε σε 12 ασθενείς με CIN και 12 υγιείς μάρτυρες αντίστοιχης ηλικίας. Όπως αναμένονταν, βρέθηκε μια – σχετιζόμενη με την ηλικία μείωση – στους υποπληθυσμούς των $CD4^+$ και $CD8^+$ T-κυττάρων τόσο στους ασθενείς ($r = -$

0.9754, $p < 0.0001$ και $r = -0.8456$, $p = 0.0005$ αντίστοιχα) όσο και στους μάρτυρες ($r = -0.9104$, $p < 0.0001$ and $r = -0.9085$, $p = 0.0005$, αντίστοιχα).

Για να χαρακτηριστεί το σχετικό μήκος των τελομερών (relative telomere length, RTL) των κυττάρων των ασθενών σαν κανονικό (appropriate) ή μη-κανονικό (inappropriate) για μία δεδομένη ηλικία, καθορίστηκε ο λόγος παρατηρούμενο/προβλεπόμενο σχετικό μήκος των τελομερών (observed/predicted; O/P) για κάθε δείγμα, σύμφωνα με την εξίσωση που απορρέει από τη γραμμική συσχέτιση ανάμεσα στο RTL και την ηλικία (έτη)των μαρτύρων [Kastrinaki MC, *Ann Rheum Dis* 2008].

Βρέθηκε ότι ο μέσος λόγος O/P των ασθενών στα CD4⁺ (0.71 ± 0.18) και CD8⁺ (0.68 ± 0.34) κύτταρα ήταν εκτός των 95% ορίων αξιοπιστίας των μαρτύρων (μέσος λόγος O/P 1.02 ± 0.1 και 1.07 ± 0.39 αντίστοιχα ($p = 0.0036$ και $p = 0.0073$, αντίστοιχα) υποδηλώνοντας μη-κανονική απώλεια των τελομερών στους ασθενείς, με την ηλικία.

Τα παραπάνω αποτελέσματα επιβεβαιώθηκαν με την ανάλυση του RTL στα CD4⁺ και CD8⁺ κύτταρα των ασθενών και μαρτύρων ανά δεκαετία (**Εικόνα 30**). Βρέθηκε συγκεκριμένα, στατιστικά σημαντική διαφορά στην απώλεια του μήκους των τελομερών των ασθενών στα CD4⁺ και CD8⁺ κύτταρα σε σχέση με τα αντίστοιχα των υγιών μαρτύρων.



Εικόνα 30. Σχετικό μήκος τελομερών στα CD4⁺ και CD8⁺ κύτταρα του περιφερικού αίματος σε ασθενείς με CIN και, αντίστοιχης ηλικίας, υγιείς μάρτυρες. **(Α)** Γραμμική συσχέτιση μεταξύ του σχετικού μήκους των τελομερών στα CD4⁺ κύτταρα (που αντανακλάται με το λόγο σχετικού τελομερούς προς μονό αντίγραφο γονιδίου - (relative telomere/single-copy-gene, T/S) και της ηλικίας (έτη), σε ασθενείς με CIN και αντίστοιχης ηλικίας υγιείς μάρτυρες. **(Β)** Γραμμική συσχέτιση μεταξύ του σχετικού μήκους των τελομερών (λόγος T/S) στα CD8⁺ κύτταρα και της ηλικίας (έτη) σε ασθενείς με CIN και αντίστοιχης ηλικίας υγιείς μάρτυρες. Στα διαγράμματα φαίνεται ο συντελεστής συσχέτισης (*r*) και ο βαθμός σημαντικότητας (*p*) σύμφωνα με τη δοκιμασία συσχέτισης κατά Spearman. Η γραμμή συσχέτισης υποδεικνύεται ως συνεχής γραμμή, ενώ τα 95% όρια αξιοπιστίας ως διακεκομμένες γραμμές. **(Γ)** Τα ραβδογράμματα απεικονίζουν τη μέση τιμή (± 1 σταθερή απόκλιση) των επιμέρους τιμών του λόγου T/S ανά δεκαετία στα CD4⁺ κύτταρα σε ασθενείς με CIN και αντίστοιχης ηλικίας υγιείς μάρτυρες **(Δ)** Μέση τιμή (± 1 σταθερή απόκλιση) των επιμέρους τιμών του λόγου T/S ανά δεκαετία στα CD8⁺ κύτταρα σε ασθενείς με CIN και αντίστοιχης ηλικίας υγιείς μάρτυρες. Η σύγκριση των κατανομών μεταξύ ασθενών και μαρτύρων έγινε με τη δοκιμασία διπλής ανάλυσης μεταβλητότητας (two-way ANOVA) και απεικονίζονται οι τιμές F και *p*.

ΣΥΝΟΨΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

1) Μικρότερος απόλυτος αριθμός των **CD4⁺** και **CD8⁺** κυττάρων σε ασθενείς με CIN έναντι υγιών μαρτύρων.

(692 ± 210 και $332 \pm 111 \times 10^6/L$, έναντι 972 ± 188 και $484 \pm 117 \times 10^6/L$ αντίστοιχα ; $p < 0.0001$ και $p = 0.0003$, αντίστοιχα).

2) Μειωμένη αναλογία των **παρθένων (naive) CD45RA⁺** κυττάρων μέσα στο κλάσμα των CD4⁺ και CD8⁺ κυττάρων στους ασθενείς έναντι υγιών μαρτύρων.

($26.50\% \pm 8.21\%$ και $59.92\% \pm 14.23\%$, έναντι $40.68\% \pm 14.03\%$ και $67.93\% \pm 6.56\%$, αντίστοιχα; $p = 0.0006$ και $p = 0.0376$, αντίστοιχα).

3) Μειωμένος ο απόλυτος αριθμός των **T-κυττάρων μνήμης CD4⁺/CD45RO⁺** και **CD8⁺/CD45RO⁺** στους ασθενείς έναντι υγιών μαρτύρων.

(443 ± 130 και $139 \pm 57 \times 10^6/L$ έναντι 626 ± 167 και $193 \pm 52 \times 10^6/L$, αντίστοιχα; $p=0.0003$ and $p=0.002$, αντίστοιχα).

4α) Αυξημένος αριθμός **αποπτωτικών κυττάρων** μέσα στο κλάσμα των CD8⁺ κυττάρων των ασθενών έναντι υγιών μαρτύρων.

($1.48\% \pm 0.60\%$ έναντι $0.97\% \pm 0.28\%$; $p = 0.0003$)

4β) Αυξημένο ποσοστό **αποπτωτικών κυττάρων** στο κλάσμα των CD8⁺ κυττάρων συγκριτικά με αυτό των CD4⁺ κυττάρων στους ασθενείς ($p < 0.0001$) αλλά όχι όμως και στους μάρτυρες. ($p = 0.0584$).

5) Θετική συσχέτιση μεταξύ του ποσοστού των **Ki-67⁺ κυττάρων** και του ποσοστού των **αποπτωτικών κυττάρων** μέσα στο κλάσμα των CD8⁺ κυττάρων ($r=0.3184$, $p=0.014$)

6) Χαμηλότερος αριθμός των **sjTRECs** στους ασθενείς και στους δύο κυτταρικούς πληθυσμούς (CD4 και CD8 κυττάρων) έναντι υγιών μαρτύρων. ($5.18 \pm 3.21 \times 10^{-3}$ αντίγραφα/CD4⁺ κύτταρα και $3.39 \pm 0.81 \times 10^{-3}$ αντίγραφα/CD8⁺ κύτταρα έναντι $31.14 \pm 12.40 \times 10^{-3}$ αντίγραφα/CD4⁺ κύτταρα και $15.67 \pm 11.34 \times 10^{-3}$ αντίγραφα/CD8⁺ κύτταρα αντίστοιχα; $p < 0.0001$ και $p < 0.0001$).

7) Θετική συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων των **TRECs** και των ποσοστών των **CD45RA⁺ παρθένων CD4⁺** ($r = 0.4191$, $p = 0.001$) και **CD8⁺** ($r=0.4191$, $p = 0.001$)

8) Αρνητική συσχέτιση μεταξύ του αριθμού των **TRECs** και του ποσοστού των πολλαπλασιαζόμενων **Ki-67⁺ κυττάρων** μέσα στο κλάσμα των **CD4⁺** ($r = - 0.5239$, $p < 0.0001$) και **CD8⁺** ($r = - 0.5048$, $p < 0.0001$) κυττάρων .

9^α) Χαμηλότερα επίπεδα **IL-7 στον ορό** των ασθενών συγκριτικά με τους μάρτυρες.

9^β) Θετική συσχέτιση της συγκέντρωσης της **IL-7 στον ορό** με το περιεχόμενο σε **TREC** στα **CD4⁺** ($r=0.4143$, $p=0.0011$) και **CD8⁺** κύτταρα ($r=0.4216$, $p=0.0009$).

10) Μείωση σχετιζόμενη με την ηλικία του σχετικού **μήκους των τελομερών** στα **CD4⁺** και **CD8⁺** T-κύτταρα και αρνητική συσχέτιση με την αυξημένη πολλαπλασιαστική ικανότητα αυτών (με τον δείκτη ki67).

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η Χρόνια Ιδιοπαθής Ουδετεροπενία (CIN), σαν όρος χρησιμοποιείται για να υποδηλώσει την ανεξήγητη μείωση του αριθμού των κυκλοφορούντων ουδετερόφιλων κοκκιοκυττάρων, σε επίπεδα χαμηλότερα από το κατώτερο όριο της φυσιολογικής διακύμανσης (όριο $2000 \times 10^6/\mu\text{l}$) για ένα δεδομένο εθνικό πληθυσμό, και για χρονικό διάστημα τουλάχιστον τριών μηνών [Papadaki HA *Europ Journal of Haematology* 2001]. Οι ασθενείς με CIN μπορεί να παρουσιάσουν μόνο ουδετεροπενία ή ουδετεροπενία σε συνδυασμό με ήπια αναιμία και/ή θρομβοπενία όπως, επίσης και λεμφοπενία.

Αναφορικά με την λεμφοπενία, έχει βρεθεί ότι ο αριθμός των λεμφοκυττάρων του περιφερικού αίματος των ασθενών με CIN στον πληθυσμό της Κρήτης είναι σημαντικά μειωμένος σε σχέση με υγιείς μάρτυρες. Μάλιστα, ο αριθμός των λεμφοκυττάρων σχετίζεται με τη βαρύτητα της ουδετεροπενίας [Kyriakou D *Ann. Haematol* 1997], [Papadaki HA *Ann Haemat* 1998]. Το 37% περίπου των ασθενών έχει αριθμό λεμφοκυττάρων κάτω από 1500 ανά μL αίματος. Η μείωση αυτή των λεμφοκυττάρων οφείλεται κυρίως στην ελάττωση των Τ-κυττάρων και σε μικρότερο βαθμό στη μείωση των κυττάρων φυσικών φονέων (NK κυττάρων) [Papadaki HA *Ann Haemat* 1998].

Στην παρούσα μελέτη διερευνήσαμε τους πιθανούς μηχανισμούς της λεμφοπενίας στους ασθενείς με CIN, ιδιαίτερα σε συνάρτηση με την υποκείμενη αντιγονική διέγερση αλλά και την φλεγμονώδη διαδικασία στον μυελό των οστών των ασθενών. Επικεντρωθήκαμε δηλαδή στη διερεύνηση πιθανής κοινής παθοφυσιολογικής σχέσης μεταξύ της ουδετεροπενίας και λεμφοπενίας που παρατηρείται στη νόσο [Papadaki HA *Blood* 2003] [Spanoudakis *Clin. Immun.* 2010].

Αρχικά, επιβεβαιώθηκε ότι ο απόλυτος αριθμός των CD4^+ και CD8^+ κυττάρων είναι μειωμένος στους ασθενείς, συγκριτικά με υγιείς μάρτυρες. Το εύρημα βέβαια αυτό οφείλεται πρωτίστως στην λεμφοπενία των ασθενών.

Παλιότερες μελέτες στο εργαστήριό μας έχουν δείξει ότι το ποσοστό των διεγερμένων κυττάρων μέσα στο διαμέρισμα των κυκλοφορούντων Τ-λεμφοκυττάρων είναι αυξημένο σε ασθενείς με CIN σε σχέση με αναλόγου ηλικίας και φύλου μάρτυρες. Ο αριθμός των Τ-κυττάρων που εξέφραζαν

τους δείκτες ενεργοποίησης CD25 και HLA-DR, έχει βρεθεί σημαντικά υψηλότερος στους ασθενείς σε σχέση με τους μάρτυρες. Έχει δειχθεί μάλιστα ότι υπάρχει παρουσία ολιγοκλωνικών /μονοκλωνικών T-κυττάρων με πιθανή παθοφυσιολογική σημασία στο διαμέρισμα των CD8⁺ κυττάρων του περιφερικού αίματος ή/και του μυελού των οστών των ασθενών. Αντίθετα, τα CD4⁺ κύτταρα έχουν ένα πολυκλωνικό προφίλ ανάπτυξης [Spanoudakis M, Clin.Immunol, 2010].

Στην παρούσα μελέτη, υπολογίσθηκε ο αριθμός των κυττάρων που βρίσκονταν σε φάση πολλαπλασιασμού με τον πυρηνικό δείκτη Ki67. Βρήκαμε, ότι ο δείκτης αυτός ήταν ιδιαίτερα αυξημένος στους ασθενείς, σε σύγκριση με τους υγιείς μάρτυρες, τόσο μέσα στο διαμέρισμα των CD4⁺ όσο και στο διαμέρισμα των CD8⁺ κυτταρικών υποπληθυσμών. Αυτό πιθανόν να υποδήλωνε είτε μία πρώτη απάντηση στη αντιγονική διέγερση που επίσης επάγει την έκπτυξη ολιγοκλωνικών/μονοκλωνικών T-κυτταρικών κλώνων, είτε μια αντισταθμιστική ομοιοστατική T-κυτταρική έκπτυξη λόγω της ίδιας της λεμφοπενίας.

Το γεγονός ότι στους ασθενείς με CIN υπήρχε μεγάλη ενεργοποίηση των T-κυτταρικών υποπληθυσμών και το γεγονός, επίσης, ότι αυξημένη ενεργοποίηση συσχετίζεται και με αυξημένη απόπτωση ώστε να διατηρείται η T-κυτταρική ομοιόσταση [Russell JH, Curr. Opin. Immunol. , 1995] οδήγησε στο να διερευνήσουμε την πιθανότητα αυξημένης απόπτωσης των κυττάρων αυτών. Πράγματι, το ποσοστό των αποπτωτικών T-κυτταρικών υποπληθυσμών του περιφερικού αίματος βρέθηκε σημαντικά υψηλότερο στο διαμέρισμα των CD8⁺ από ότι στο διαμέρισμα των CD4⁺ κυττάρων σε ασθενείς με CIN αλλά όχι σε υγιείς μάρτυρες. Η παρατηρούμενη σημαντική συσχέτιση του ποσοστού του Ki67 θετικών και των αποπτωτικών CD8⁺ κυττάρων ενισχύει την υπόθεση της λεμφοπενίας που επάγεται από ενεργοποίηση αλλά και επιταχυνόμενο κυτταρικό θάνατο των CD8⁺ κυττάρων των ασθενών. Υποθέτουμε δηλαδή, ότι τα CD8⁺ κύτταρα βρίσκονται σε μεγαλύτερο «κίνδυνο» για απόπτωση λόγω του μεγαλύτερου βαθμού ενεργοποίησης. Ο αυξημένος ρυθμός απόπτωσης θα μπορούσε να οδηγήσει σε αντιρροπιστική αύξηση του πολλαπλασιασμού των περιφερικών T-λεμφοκυττάρων και αυξημένη παραγωγή T-λεμφοκυττάρων από τον θύμο

αδένα προκειμένου να διατηρηθεί η ομοιόσταση του T-κυτταρικού διαμερίσματος.

Ο ρυθμός πολλαπλασιασμού των T-λεμφοκυττάρων αντανακλάται από τον προσδιορισμό του μήκους των τελομερών των κυττάρων αυτών. Όπως αναμένονταν, με την πάροδο του χρόνου το σχετικό μήκος των τελομερών των CD4⁺ και CD8⁺ T κυτταρικών υποπληθυσμών, ήταν μειωμένο τόσο στους ασθενείς όσο και στους μάρτυρες. Ωστόσο, το σχετικό μήκος των τελομερών των ασθενών με CIN σε σχέση με τους μάρτυρες ήταν περισσότερο μειωμένο από το αναμενόμενο για την κάθε ηλικιακή ομάδα. Ο αυξημένος T-κυτταρικός πολλαπλασιασμός λόγω φλεγμονής, σε συνεργασία με την πρόωρη απώλεια του μήκους των τελομερών και η δυσανάλογη για την ηλικία γήρανση των T-κυττάρων, έχουν περιγραφεί σε ασθενείς με αυτοάνοσες και συστηματικές νόσους διαμεσολαβούμενες μέσω του ανοσοποιητικού συστήματος [Georgin-Lavialle S, *Autoimmun.Rev.* 2010]

Πρέπει να τονιστεί ότι σε αντίθεση με τους περισσότερους άλλους τύπους σωματικών κυττάρων, τα T κύτταρα εκφράζουν ενδογενή δραστικότητα τελομεράσης, η οποία είναι πολύ καλά ρυθμισμένη κατά τη διάρκεια τόσο της ανάπτυξης του T κυττάρου όσο και ενεργοποίησής του. Πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι υπάρχει χαμηλή δραστικότητα τελομεράσης σε PBMCs ασθενών με CIN, που μπορεί, επίσης, να συσχετίζεται με την εξάντληση των λεμφοκυττάρων των ασθενών αυτών [Pavlaki et al, *Haematologica*, 2012].

Η διατήρηση της ισορροπίας στο T κυτταρικό διαμέρισμα είναι πολύπλοκη και το ανοσοποιητικό σύστημα βρίσκεται σε συνεχή κύκλο εργασιών για να ανταποκριθεί στις απαιτήσεις σε T λεμφοκύτταρα. Γίνεται προσπάθεια να υπάρξει ισορροπία μεταξύ της εισροής νέων T-κυττάρων από τον θύμο και διατήρησης του υπάρχοντος αποθέματος των λεμφοκυττάρων, αλλά συγχρόνως και της απώλειας αυτών εξαιτίας αντιγονικών προκλήσεων και αποπτωτικού θανάτου. Είναι γνωστό ότι η διατήρηση του διαμερίσματος των T-κυττάρων επιτυγχάνεται κυρίως μέσα από δυναμικές διεργασίες, που εμπλέκουν την κυτταρική επιβίωση, τον πολλαπλασιασμό και το ρυθμό απόπτωσης των κυττάρων αυτών. Η ομοιόσταση ωστόσο στο διαμέρισμα

των παρθένων (naive) T-κυττάρων, εξαρτάται κυρίως από την θυμική έξοδο ακόμη και κατά την ενήλικη ζωή [Mette DHazenberg *J Mol MED* 2001]. Ο ανθρώπινος θύμος αδένας είναι το κεντρικό λεμφικό όργανο που παρέχει ένα εξειδικευμένο μικροπεριβάλλον για την παραγωγή νέων T-κυττάρων και την εισροή αυτών στην αιματική κυκλοφορία. Ο καλύτερος τρόπος εκτίμησης του αριθμού των T-λεμφοκυττάρων που παρήχθησαν πρόσφατα και εξήλθαν από τον θύμο αδένα στην αιματική κυκλοφορία είναι η εκτίμηση των TRECs στα T-κύτταρα του περιφερικού αίματος [Mette D Hazenberg *J Mol MED* 2001] διότι δεν υπάρχουν ειδικοί φαινοτυπικοί δείκτες.

Μελέτες σε υγιή άτομα και σε ασθενείς με λοίμωξη HIV έχουν εκτιμήσει ότι ο χρόνος ημιζωής ενός περιφερικού T λεμφοκυττάρου είναι ≈ 100 ημέρες. Σε ασθενείς όπου υπάρχει καταστροφή των T-κυττάρων όπως HIV λοίμωξη, η θεραπεία με (HAART) (αντιρετροϊκή θεραπεία) προκαλεί ταχεία αύξηση του αριθμού των ανιχνεύσιμων TRECs στα περιφερικά κύτταρα [Douek *et al.* 1998, Poulin & Sékaly 1999] Επομένως, ο θύμος των ενηλίκων διατηρεί μια σημαντική θυμοποιητική λειτουργία και εξακολουθεί να παράγει πρόσφατα διαφοροποιημένα T παρθένα (naive) κύτταρα τα οποία εξάγονται προς την περιφέρεια [Jamieson *et al.*, 1993].

Βάση του παραπάνω σκεπτικού υπολογίστηκε και ποσοτικοποιήθηκε το ποσοστό των TRECs στα $CD4^+$ και $CD8^+$ κύτταρα ασθενών με CIN και βρέθηκε ότι ήταν σημαντικά μειωμένο στους ασθενείς συγκριτικά με τους υγιείς μάρτυρες, γεγονός που υποδηλώνει, πιθανότατα, τη μειωμένη απόδοση του θύμου αδένα. Σε συμφωνία με αυτό ήταν η θετική συσχέτιση μεταξύ του ποσοστού των TREC στους T-κυτταρικούς υποπληθυσμούς των $CD4^+$ και $CD8^+$ κυττάρων και το ποσοστό των παρθένων (naive) $CD45RA^+$ κυττάρων μέσα στο αντίστοιχο κλάσμα των κυττάρων αυτών. Ωστόσο, αξιωματικά σημειωθεί ότι το περιεχόμενο σε TREC στα PBMC ακόμα και σε παρθένα (naive) $CD45RA^+/CD4^+$ και $CD45RA^+/CD8^+$ κύτταρα δεν καθορίζεται μόνο από την έξοδο από τον θύμο αδένα των $TREC^+/CD45RA^+$ κυττάρων αλλά και από την διαίρεση και τον κυτταρικό θάνατο και ενδεχομένως τις ενδοκυτταρικές μειώσεις των επισωματικών κύκλων. Όλοι αυτοί οι παράγοντες θα πρέπει να λαμβάνονται υπόψη κατά την εκτίμηση και ερμηνεία των TREC [Mette D Hazenberg, *Jmol. Med.*,2001].

Για να διερευνηθεί περαιτέρω η πιθανή επίδραση της ηλικίας στον αριθμό των TRECs στους CD4⁺ και CD8⁺ πληθυσμούς, διαχωρίστηκε ο υπό μελέτη πληθυσμός σε άτομα μικρότερης (30-50 χρονών) και μεγαλύτερης (51-75 χρονών). Αν και ο αριθμός των TRECs ήταν μικρότερος στους ασθενείς και στις δύο ηλικιακές ομάδες σε σχέση με τους υγιείς μάρτυρες, το γεγονός ότι δεν υπήρχε αρνητική συσχέτιση του αριθμού των TRECs ανάλογα με την ηλικία, σε αντίθεση με τους υγιείς μάρτυρες, υποδηλώνει ότι και άλλοι παράγοντες εκτός από την ηλικία έχουν ένα σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση του αριθμού των TREC στη CIN.

Πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι η κύρια κυτταροκίνη που επάγει την παραγωγή των T-λεμφοκυττάρων στον θύμο αλλά και τον πολλαπλασιασμό και την επιβίωση τους στην περιφέρεια συμβάλλοντας ουσιαστικά στη ρύθμιση της ομοιόστασης του T -διαμερίσματος είναι η IL-7 (interleukin-7 [FRY], *Blood*, 2002], [Sasson SC, *Curr. Drug. Targets* 2006] [Guimond M, *J of Immunother.*, 2005]. Η μειωμένη τιμή της κυτταροκίνης στον ορό καθώς και η θετική συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων της και του ποσοστού των TREC στα CD4⁺ και CD8⁺ κύτταρα σε ασθενείς με CIN σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου, επιβεβαίωσε περαιτέρω την υπόθεση ότι το χαμηλό ποσοστό των TREC στα περιφερικά T-κύτταρα των ασθενών, οφείλεται κυρίως στην μειωμένη παραγωγή από τον θύμο λόγω ανεπαρκούς παραγωγής IL-7 [FRY Tj, *Blood*, 2002] [Sasson SC, *Curr. Drug. Targets* 2006] [Guimond M, *J of Immunother.*, 2005].

Η IL-7 που βρίσκεται στην κυκλοφορία του αίματος, έχει δειχθεί ότι παράγεται από διάφορους ιστούς συμπεριλαμβανομένων και των στρωματικών κυττάρων του μυελού των οστών [Ponchel F *Clin Chim Acta* 2011 , Για τον λόγο αυτό προσδιορίστηκε η παραγωγή IL-7 από τα στρωματικά κύτταρα μακρόχρονων καλλιιεργειών μυελού των οστών παράλληλα με τον ορό, σε ασθενείς με CIN. Σε συμφωνία με τα αποτελέσματα από τον ορό, τα επίπεδα της IL-7 στα υπερκείμενα μακρόχρονων καλλιιεργειών βρέθηκαν σημαντικά χαμηλότερα στους ασθενείς σε σχέση με τους υγιείς μάρτυρες. Με βάση τα παραπάνω δεδομένα ενισχύθηκε η άποψη ότι ο μυελός των οστών πιθανόν να έχει ουσιαστικό ρόλο στη συστηματική έλλειψη της IL-7 στη CIN . Επομένως, είναι πιθανόν να συμβάλει στην ελλιπή ικανότητα του θύμου αδένος να παράγει νέα T-κύτταρα στους ασθενείς.

Έχει δειχθεί από παλαιότερες μελέτες ότι ο TGF-β και η IL-7 έχουν μια αλληλένδετη σχέση μεταξύ τους, όπου η κάθε μια κυτταροκίνη είναι ικανή να ρυθμίσει την έκφραση της άλλης [Fry T Blood 2002]. Επιπλέον, έχει δειχθεί ότι φλεγμονώδεις κυτταροκίνες συμπεριλαμβανομένου του παράγοντα νέκρωσης των όγκων-α (TNF-α) και της IL-1β, επιδρούν κατασταλτικά στην παραγωγή της IL-7 από το μυελό των οστών και το θύμο αδέν, καθώς επίσης και στα επίπεδα της κυτταροκίνης στην κυκλοφορία [Fry T Jerry Blood 2001] [Lee Sun-Kyeong Immunological Reviews 2005] [Fry J Terry Blood 2002]. Ενδιαφέρον είναι ότι τα παραπάνω έχουν περιγραφεί σε ασθενείς με Ρευματοειδή Αρθρίτιδα οι οποίοι, επίσης, παρουσιάζουν μειωμένους αριθμούς TREC στα περιφερικά T-κύτταρα [Ponchel F. Arthritis. Res. Ther. 2005] Έχει δειχθεί από παλαιότερα δεδομένα του εργαστηρίου μας ότι ασθενείς με CIN έχουν αυξημένα ποσά TGF-β1 στο μυελικό μικροπεριβάλλον [Papadaki HA Eur J Haemat. 1997] καθώς και αυξημένη παραγωγή άλλων φλεγμονωδών κυτταροκινών όπως παράγοντα νέκρωσης των όγκων-α (TNF-α) και IL-1β. Επομένως, το φλεγμονώδες μυελικό περιβάλλον των ασθενών με CIN, συμβάλλει πιθανότατα στην αναποτελεσματική παραγωγή της IL-7.

Συνοψίζοντας, είναι πιθανό ότι φλεγμονώδεις κυτταροκίνες που σχετίζονται με την παθοφυσιολογία της CIN επηρεάζουν την παραγωγή της IL-7 με αποτέλεσμα την ανεπαρκή αντισταθμιστική θυμική παραγωγή νέων T-λεμφοκυττάρων που εκφράζουν TREC. Πράγματι, δεδομένα από χορήγηση εξωγενούς IL-7 για την παραγωγή των TREC στο ανθρώπινο θύμο αδέν, έδειξαν ότι η IL-7 είχε άμεση επίδραση στην αύξηση του ανασυνδυασμού του TCR γονιδίου [Hazenber MD Nat med 2000]. Υποστηρίζουμε, επίσης, ότι εκτεταμένες ανοσολογικές απαντήσεις προερχόμενες πιθανόν από αντιγονικό ερέθισμα ή φλεγμονή, συμβάλλουν στον αυξημένο πολλαπλασιασμό των T-λεμφοκυττάρων και πιθανόν να οδηγούν σε τελική εξάντληση αυτών, όπως αποδείχτηκε από την πρόωρη ελάττωση του μήκους των τελομερών τους.

Επιπλέον οι ομοιότητες μεταξύ της CIN και αυτοάνοσων νόσων, στη μη-φυσιολογική δυναμική διαδικασία των T-κυττάρων, ενισχύουν περαιτέρω την άποψη της ανοσολογικής φύσης της CIN. Τέλος, η διερεύνηση του

μηχανισμού της λεμφοπενίας όπως και κάθε ενός ξεχωριστά προβλήματος που σχετίζεται με αυτή τη νόσο παρουσιάζει ιδιαίτερη σπουδαιότητα και βιολογική σημασία καθώς βοηθάει στην περαιτέρω κατανόηση της παθολογίας της νόσου.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΑΝΑΦΟΡΕΣ

Awong G, LaMotte-Mohs R, Zuniga-Pflucker JC. *Key players for T-cell regeneration*. Curr Opin Hematol 2010

Dale DC, Guerry D, Wewerka JR, Bull JM, Chusid MJ. *Chronic neutropenia*. Medicine (Baltimore) 1979

Dubinett SM, Huang M, Dhanani S, et al. *Downregulation of murine fibrosarcoma transforming growth factor-beta 1 expression by interleukin 7* J Natl Cancer Inst 1995

Eliopoulos DG, Mavroudi I, Pontikoglou C, Ximeri M, Stavroulaki E, Pyrovolaki K, Velegraki M, Spanoudakis M, Goulielmos G, Papadaki HA. *The -509C/T polymorphism of transforming growth factor-beta1 is associated with increased risk for development of chronic idiopathic neutropenia*. Eur J Haematol 2009

Fry TJ, Mackal CL *Interleukin 7; from bench to clinic* Blood 2002

Fry TJ et al *A potential role for IL-7 in T cell Homeostasis in patients with RA* Blood 2001

Fry TJ, Mackall CL, *Interleukin-7 master regulator of peripheral Tcell homeostasis* . Trends Immunol 2001

Georgin-Lavialle S, Aouba A, Mouthon L, Londono-Vallejo JA, Lepelletier Y, Gabet AS, Hermine O. *The telomere/telomerase system in autoimmune and systemic immune-mediated diseases*. Autoimmun Rev 2010.

Gerdes J, Lemke H, Baisch H, Wacker HH, Schwab U, Stein H. *Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67*. J Immunol 1984

Guimond M., Fry T.J., Mackall C.L.: *Cytokine signals in T cell homeostasis.* J Immunother. 2005.

Hazenberg MD Verschuren MC, Hamann D, Miedema F, van Dongen J.

T- cell receptor excision circles as markers for recent thymic emigrants J Mol Medic. 2001.

Hazenberg MD Dörte Hamann, Hanneke Schuitemaker , Frank Miedema, *T-cell depletion in HiV* Nat med 2000.

Jamieson BD, Douek DC, Killian S, et al. Generation of functional thymocytes in the human adult. Immunity 1999.

Kastrinaki MC, Sidiropoulos P, Roche S, Ringe J, Lehmann S, Kritikos H, Vlahava VM, Delorme B, Eliopoulos GD, Jorgensen C, Charbord P, Haupl T, Boumpas DT, Papadaki HA. *Functional, molecular and proteomic characterisation of bone marrow mesenchymal stem cells in rheumatoid arthritis.* Ann Rheum Dis 2008.

Koetz, K., E. Bryl, K. Spickschen, W. M. O'Fallon, J. J. Goronzy, and. C. M. Weyand. *T cell homeostasis in patients with rheumatoid arthritis.* Proc. Natl. Acad. Sci 2000

Kong, F-K., Chen, C. H., and Cooper, M. D.: *Reversible disruption of thymic function by steroid treatment. . Natl. Acad. Sci. 2002*

Koumaki V, Damianaki A, Ximeri M, Pontikoglou C, Axioti F, Spanoudakis M, Eliopoulos GD, Papadaki HA. Pro-inflammatory bone marrow milieu in patients with chronic idiopathic neutropenia is associated with impaired local production of interleukin-10. Br J Haematol 2006

Kyle ra , L inman JW. *Chronic idiopathic neutropenia .A newly recognized entity* Engl. J Med. 1968

Kyriakou D, Papadaki HA, Sakellariou D, Eliopoulos AG, Kapsimali V, Eliopoulos GD. *Flow-cytometric analysis of peripheral blood lymphocytes in patients with chronic idiopathic neutropenia of adults*. Ann Hematol 1997

Markert ML, Hummell DS, Rosenblatt HM, Schiff SE, Harville TO, Williams LW, Schiff RI, N Engl J Med. 1999

Mavroudi I, Papadaki V, Pyrovolaki K, Katonis P, Eliopoulos AG, Papadaki HA. *The CD40/CD40 ligand interactions exert pleiotropic effects on bone marrow granulopoiesis*. J Leukoc Biol. 2011

Papadaki HA, Palmblad J, Eliopoulos GD. *Non-immune CIN of adult; an overview* Eur J Haematol 2001

Papadaki HA, Eliopoulos AG, Kosteas T, Gemetzi C, Damianaki A, Koutala H, Bux J, Eliopoulos GD. *Impaired granulocytopoiesis in patients with chronic idiopathic neutropenia is associated with increased apoptosis of bone marrow myeloid progenitor cells*. Blood. 2003

Papadaki HA, Eliopoulos DG, Valatas V, Eliopoulos GD. *Anemia of chronic disease is the more frequent type of anemia seen in patients with chronic idiopathic neutropenia of adults*. Ann Hematol 2001

Papadaki HA, Giouremou K, Eliopoulos GD. *Low frequency of myeloid progenitor cells in chronic idiopathic neutropenia of adults may be related to increased production of TGF-beta1 by bone marrow stromal cells*. Eur J Haematol 1999;

Papadaki HA, Kosteas T, Gemetzi C, Alexandrakis M, Psyllaki M, Eliopoulos GD. *Two patients with nonimmune chronic idiopathic neutropenia of adults developing acute myeloid leukemia with aberrant phenotype and*

complex karyotype but no mutations in granulocyte colony-stimulating factor receptor. Ann Hematol 2002

Papadaki HA, Stamatopoulos K, Damianaki A, Gemetzi C, Anagnostopoulos A, Papadaki T, Eliopoulos AG, Eliopoulos GD. *Activated T-lymphocytes with myelosuppressive properties in patients with chronic idiopathic neutropenia. Br J Haematol 2005*

Papadaki HA, Xylouri I, Couloxeri S, Kalmanti M, Kafatos A, Eliopoulos GD. *Prevalence of chronic idiopathic neutropenia of adults among an apparently healthy population living of the island of Crete. Ann Hematol 1999*

Pavlaki K Christina Kastrinaki, Michail Klontzas, Maria Velegraki, Irene Mavroudi, Helen A. Papadaki *Abnormal telomere shortening of peripheral blood mononuclear cells and granulocytes in patients with chronic idiopathic neutropenia Haematologica 2012*

Philpott NJ, Turner AJ, Scopes J, Westby M, Marsh JC, Gordon-Smith EC, Dalglish AG, Gibson FM. The use of 7-amino actinomycin D in identifying apoptosis: simplicity of use and broad spectrum of application compared with other techniques. *Blood 1996*

Ping ye, Denise e. Kirschner *Reevaluation of t cell receptor excision circles as a measure of human recent thymic emigrants J.Immunol 2002*

Ping ye, Denise e. Kirschner *Measure Emigration of Human thymocytes by Tcell Receptor Excision Circles Critical Rev.in Immunol.2002*

Ponchel F, Cuthbert RJ, Goeb V. IL-7 and lymphopenia. *Clin Chim Acta 2011;412:7-16.*

Ponchel F, Morgan AW, Bingham SJ, Quinn M, Buch MH, Verburg RJ, Henwood J, Douglas SH, Masurel A, Conaghan PG, Gesinde M, Taylor J, Markham AF, Emery P, van Laar JM, Isaacs JD: *Dysregulated Lymphocyte*

proliferation and differentiation in patients with rheumatoid arthritis. Blood. 2002

Ponchel F, Verburg RJ, Bingham SJ, Brown AK, Moore J, Protheroe A, Short K, Lawson CA, Morgan AW, Quinn M, Buch M, Field SL, Maltby SL, Masurel A, Douglas SH, Straszynski L, Fearon U, Veale DJ, Patel P, McGonagle D, Snowden J, Markham AF, Ma D, van Laar JM, Papadaki HA, Emery P, Isaacs JD. *Interleukin-7 deficiency in rheumatoid arthritis: consequences for therapy-induced lymphopenia. Arthritis Res Ther* 2005;7:R80-R92.

Russell JH. *Activation-induced death of mature T cells in the regulation of immune responses. Curr Opin Immunol* 1995

Sasson SC, Zaunders JJ, Kelleher AD. *The IL-7/IL-7 receptor axis: understanding its central role in T-cell homeostasis and the challenges facing its utilization as a novel therapy. Curr Drug Targets.*

Schluns KS, Cook JE, Le PT. *TGF-beta differentially modulates epidermal growth factor-mediated increases in leukemia-inhibitory factor, IL-6, IL-1 alpha, and IL-1 beta in human thymic epithelial cells. J Immunol* 1997.

Schmid I, Uittenbogaart CH, Giorgi JV. *Sensitive method for measuring apoptosis and cell surface phenotype in human thymocytes by flow cytometry. Cytometry* 1994

Sempowski GD, Hale LP, Sundy JS, Massey JM, Koup RA, Douek DC, Patel DD, Haynes BF. *Leukemia inhibitory factor, oncostatin M, IL-6, and stem cell factor mRNA expression in human thymus increases with age and is associated with thymic atrophy. J Immunol* 2000

Spanoudakis M, Koutala H, Ximeri M, Pyrovolaki K, Stamatopoulos K, Papadaki HA. *T-cell receptor Vbeta repertoire analysis in patients with*

chronic idiopathic neutropenia demonstrates the presence of aberrant T-cell expansions. Clin Immunol 2010

Sun-Kyeong Lee Lee S.-K., Surh C.D., *Role of interleukin-7 in bone and T-cell homeostasis*, Immunological Reviews, 2005

Tang J, Nuccie BL, Ritterman I *TGF-beta down-regulates stromal IL-7 secretion and inhibits proliferation of human B cell precursors.* J Immunol 1997.

V Geenen and J-F Poulin *TREC resulting from Rec-J rearrangement (TCRD deletion).* Society for Endocrinology 2003

Velegraki M, Koutala H, Tsatsanis C, Papadaki HA. *Increased Levels of the High Mobility Group Box 1 Protein Sustain the Inflammatory Bone Marrow Microenvironment in Patients with Chronic Idiopathic Neutropenia via Activation of Toll-Like Receptor 4.* J Clin Immunol. 2011

Williams KM ,Gress RE, *Immune reconstitution and implications for immunotherapy following hematopoietic stem cell transplantation* Best Pract Res Clin Haematol.2008

Williams KM Hakim F,Gress R *T cell immune reconstitution following lymphodepletion* Seminars in Immunol 2007

Wlodarski MW, Nearman Z, Jiang Y, Lichtin A, Maciejewski JP. *Clonal predominance of CD8(+) T cells in patients with unexplained neutropenia.* Exp Hematol 2008.

ΠΡΩΤΟΤΥΠΗ ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΗ

<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1600-0609.2011.01722.x/pdf>

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22092365#>