

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ**

**ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**

**ΑΥΞΗΜΕΝΗ ΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑ ΤΩΝ Β-ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΩΝ  
ΤΟΥ ΠΕΡΙΦΕΡΙΚΟΥ ΑΙΜΑΤΟΣ ΣΕ ΜΗ ΕΙΔΙΚΟΥΣ  
ΠΟΛΥΚΛΩΝΙΚΟΥΣ ΔΙΕΓΕΡΤΕΣ ΣΕ  
ΠΑΣΧΟΝΤΕΣ ΑΠΟ ΧΡΟΝΙΑ ΙΔΙΟΠΑΘΗ ΟΥΔΕΤΕΡΟΠΕΝΙΑ**

**Χρυσή Ανδριώτη**  
**Βιοπαθολόγος**

**Διδακτορική Διατριβή**

**Επιβλέπων Καθηγητής: Γεώργιος Ηλιόπουλος**

**Ηράκλειο 2003**

*« Εκεί όπου ο κόσμος παύει να είναι η σκηνή για τις προσωπικές ελπίδες και επιθυμίες, εκεί όπου εμείς, σαν ελεύθερα όντα, τον παρατηρούμε με απορία, αναρωτιόμαστε γι' αυτόν και τον μελετάμε, εκεί είναι η είσοδος στο βασίλειο της Τέχνης και της Επιστήμης. Εάν μεταφράσουμε αυτό που παρατηρήσαμε και νιώσαμε με τη γλώσσα της λογικής, τότε κάνουμε επιστήμη. Εάν το δείξουμε με μορφές των οποίων οι σχέσεις δεν είναι προσιτές στην ενσυνείδητη σκέψη, αλλά αναγνωρίζονται με τη διαίσθηση και ως μεστές νοήματος, τότε κάνουμε τέχνη. Το κοινό στοιχείο και στην επιστήμη και στην τέχνη είναι η αφοσίωση σε κάτι που υπερβαίνει το προσωπικό »*

*A. Einstein*

## *Ευχαριστίες*

Είναι αρκετά τα πρόσωπα που το καθένα τους, από κάποια σκοπιά, συνέβαλε στην ολοκλήρωση αυτής της εργασίας. Περιορίζω την καταγραφή τους μόνο στο ένα φύλο, το κατά πολύ πλουσιότερο στη διαχείριση συναισθήματος.

Ιδιαίτερα θα ήθελα να εκφράσω αμέτρητα ευχαριστώ στον καθηγητή κ. Γεώργιο Ηλιόπουλο που με τον πιο καθοριστικό τρόπο με βοήθησε στην ολοκλήρωση αυτής της διδακτορικής διατριβής.

Πολλές ευχαριστίες οφείλω σε όλο το προσωπικό του Αιματολογικού εργαστηρίου του Πανεπιστημίου Κρήτης και κυρίως στην επίκουρη καθηγήτρια κ. Ελένη Παπαδάκη της οποίας η συμβολή σε εργαστηριακό επίπεδο ήταν αμέριστη.

Τελειώνοντας, αισθάνομαι την ανάγκη να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στην οικογένειά μου για την προσφορά και την κατανόησή της καθ' όλη τη διάρκεια της εκπόνησης αυτής της διατριβής.

# Περιεχόμενα

	<i>Περίληψη-Σκοπός της μελέτης</i>	1
	<i>Γενικό Μέρος</i>	
<i>Κεφάλαιο Α</i>	<i>Χρόνια ιδιοπαθής ουδετεροπενία του ενηλίκου</i>	5
	* Ορισμός	5
	* Διαγνωστικά κριτήρια	6
	* Σταδιοποίηση	8
	* Επιδημιολογία	8
	* Κλινικές εκδηλώσεις	9
	<i>Λοιμώξεις</i>	9
	<i>Σπληνομεγαλία</i>	10
	<i>Οστεοπενία και οστεοπόρωση</i>	10
	* Πρόγνωση και θεραπεία	11
	* Εργαστηριακά ευρήματα	12
	<i>Από το αίμα</i>	12
	<i>Από τον μυελό των οστών</i>	16
	<i>Πρωτείνες του ορού</i>	19
	* Πιθανός παθογενετικός μηχανισμός	22
<i>Κεφάλαιο Β.</i>	<i>Β Λεμφοκύτταρα</i>	26
	* Εισαγωγή	26
	* Προέλευση και κυκλοφορία	26
	* Διαφοροποίηση	28
	<i>Πρώτο κύμα διαφοροποίησης</i>	28
	<i>Δεύτερο κύμα διαφοροποίησης</i>	30
	<i>Τρίτο κύμα διαφοροποίησης</i>	33
	* Δείκτες Β κυτταρικής διαφοροποίησης	34
	<i>Μεμβρανικές ανοσοσφαιρίνες</i>	34
	<i>Κυτταρικά ένζυμα</i>	35
	<i>Μεμβρανικά αντιγονικά μόρια</i>	35
	* Υποδοχέας Β λεμφοκυττάρου	42
	* Ενεργοποίηση των Β λεμφοκυττάρων	44
	* Πολυκλωνική ενεργοποίηση των Β-λεμφοκυττάρων- Μιτογόνα	46
	* Μεταβίβαση διέγερσης του Β-κυττάρου μέσω του BcR	49
	<i>Ειδικό Μέρος</i>	
	<i>Ασθενείς, Υλικά και Μέθοδοι</i>	
	* Ασθενείς	56
	* Αρίθμηση των κυττάρων του αίματος	57
	* Ανοσοφαινότυπος Β λεμφοκυττάρων	57
	* Απομόνωση Β λεμφοκυττάρων	58

<i>* Καλλιέργεια B λεμφοκυττάρων</i>	62
<i>* Μέτρηση του sCD23 σε υπερκείμενα καλλιέργειας B λεμφοκυττάρων</i>	63
<i>* Μέτρηση του sCD23 στον ορό</i>	64
<i>* Στατιστική ανάλυση</i>	65
<i>Αποτελέσματα</i>	66
<i>Συζήτηση</i>	76
<i>Συμπεράσματα</i>	79
<i>Βιβλιογραφία</i>	81



*Περίληψη*  
*Σκοπός της μελέτης*

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ – ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Η Χρονία Ιδιοπαθής Ουδετεροπενία του ενηλίκου (Chronic Idiopathic Neutropenia of Adult-CINA) περιγράφηκε για πρώτη φορά το 1968 από τους Kyle και Linman [1] και θεωρείται ως μία καλοήθους δυσλειτουργία που χαρακτηρίζεται από την ανεξήγητη μείωση του αριθμού των κυκλοφορούντων ουδετερόφιλων κοκκιοκυττάρων για παρατεταμένο χρονικό διάστημα, συνήθως μεγαλύτερο των τριών μηνών [2,30,95-97].

Το σύνδρομο εμφανίζεται συνήθως σε γυναίκες μέσης ηλικίας [29,96] και παρουσιάζεται είτε σαν μεμονωμένη ουδετεροπενία είτε σαν ουδετεροπενία συνδυασμένη με θρομβοκυττοπενία ή και αναιμία [2,96].

Λοιμώξεις σπάνια παρατηρούνται παρά τον χαμηλό αριθμό των κυκλοφορούντων στο αίμα ουδετερόφιλων κοκκιοκυττάρων [2,32,96,99].

Δεν έχει παρατηρηθεί εξέλιξη της ουδετεροπενίας σε συστηματικό ερυθματώδη λύκο, ρευματοειδή αρθρίτιδα, λευχαιμία ή άλλο συστηματικό νόσημα, μετά από μακρά περίοδο παρακολούθησης των ασθενών αυτών [30,98]. Παρ' όλα αυτά, τελευταία αναφέρθησαν πέντε περιπτώσεις CINA που εξελίχθησαν σε Οξεία Μυελογενή Λευχαιμία και έχει προταθεί ότι η δυσλειτουργία μπορεί ν' αποτελέσει προλευχαιμική κατάσταση σε μερικούς ασθενείς [40,82,94].

Προηγούμενες μελέτες στο εργαστήριό μας έχουν δείξει ότι οι ασθενείς με CINA παρουσιάζουν χαμηλό αριθμό κυκλοφορούντων

στο αίμα λεμφοκυττάρων εξ' αιτίας της επιλεκτικής ελάττωσης των μνημονικών  $CD4^+/CD45RO^+$  και  $CD8^+/CD45RO^+$  λεμφοκυττάρων και σε λιγότερο βαθμό των NK-κυττάρων [15,22,23]. Ωστόσο, τα Β-λεμφοκύτταρα των πασχόντων δεν έχουν ακόμη καλά μελετηθεί. Το ερώτημα έχει ενδιαφέρον να απαντηθεί όχι μόνο για λόγους πληρότητας μιας γενικότερης μελέτης των λεμφοκυττάρων στη CINA, αλλά και για τον πρόσθετο λόγο ότι η παθογένεια του συνδρόμου παραμένει ακόμη άγνωστη. Έχει αναφερθεί ότι ένα σημαντικό ποσοστό ασθενών με CINA έχουν στον ορό τους αυξημένα επίπεδα ανοσοσφαιρινών IgG ή και IgA [16], κυκλοφορούντων ανοσοσυμπλεγμάτων [61], αυξημένη αναλογία πλασματοκυττάρων στο μυελό των οστών [56] και αυξημένη συχνότητα εμφάνισης μονοκλωνικής γαμμαπάθειας [61]. Όλα αυτά τα δεδομένα υποδεικνύουν την εμπλοκή του Β-κυτταρικού συστήματος στην φυσιοπαθολογία της CINA.

Βασισμένοι σ' αυτές τις παρατηρήσεις και με σκοπό να ερμηνεύσουμε τις παραμέτρους εκείνες των Β-λεμφοκυττάρων που παρέχουν πληροφορίες σε ότι αφορά τη δυσλειτουργία του ανοσοποιητικού μηχανισμού στους πάσχοντες από CINA, σχεδιάσαμε την παρούσα μελέτη που περιελάμβανε:

- (α) Την αρίθμηση των λευκοκυττάρων του αίματος σε αιματολογικό αναλυτή, τη μέτρηση της αναλογίας των λεμφοκυττάρων με απλή μικροσκοπία, και την έκφραση των αποτελεσμάτων σε απόλυτες τιμές (κύτταρα/  $\mu\text{L}$  αίματος)
- (β) Την αρίθμηση των Β-λεμφοκυττάρων με βάση την έκφραση σε αυτά των επιφανειακών δεικτών CD19, CD20 και CD23



χρησιμοποιώντας τα αντίστοιχα μονοκλωνικά αντισώματα σημασμένα με φυκοερυθρίνη (PE) ή φλουορεσκεΐνη (FITC) (άμεσος διπλός ανοσοφθορισμός) με κυτταρομετρία ροής (flow cytometry).

(γ) Τον προσδιορισμό της αναλογίας των CD19<sup>+</sup>/CD23<sup>+</sup> κυττάρων τα οποία εκφράζουν τον ενεργοποιημένο B-λεμφοκυτταρικό υποπληθυσμό. (δ) Την εκτίμηση των συγκεντρώσεων του διαλυτού μορίου CD23 (sCD23) στον ορό των πασχόντων με τη μέθοδο της μικρο-ELISA.

(ε) Την εκτίμηση της ικανότητας παραγωγής sCD23 μορίων σε υγρές καλλιέργειες ανοσομαγνητικά διαχωρισθέντων CD19<sup>+</sup> B-λεμφοκυττάρων παρουσία μη-ειδικών μιτογόνων (E.coli LPS και PWM).

Με όλα τα παραπάνω πιστεύεται ότι είναι δυνατή η εκτίμηση του βαθμού ενεργοποίησης του B-συστήματος στους πάσχοντες από CINA. Ας σημειωθεί ότι υπάρχουν σήμερα ισχυρές ενδείξεις ενεργοποίησης του T-συστήματος στους πάσχοντες [Papadaki et al, personal communication], όπως και ενεργοποίηση των μακροφάγων [13], δύο κυτταρικών πληθυσμών που εμπλέκονται άμεσα στην ανοσολογική απάντηση.

Η έρευνα έγινε σε 107 ασθενείς και 46 φυσιολογικούς μάρτυρες. Βρήκαμε ότι οι ασθενείς είχαν αυξημένη αναλογία B-λεμφοκυττάρων στο περιφερικό αίμα, αλλά φυσιολογικό απόλυτο αριθμό B-λεμφοκυττάρων, γεγονός το οποίο αποδίδεται στην λεμφοπενία που προκαλείται από την ελάττωση των NK και T-λεμφοκυττάρων, όπως έχει ήδη αναφερθεί.

Οι ασθενείς είχαν αυξημένη αναλογία των CD19<sup>+</sup> κυττάρων στο μυελό των οστών. Τα CD19<sup>+</sup>/CD23<sup>+</sup> κύτταρα του περιφερικού αίματος, τα οποία αντιπροσωπεύουν τον ενεργοποιημένο Β-λεμφοκυτταρικό υποπληθυσμό, δεν ήταν αυξημένα στους ασθενείς που μελετήθηκαν, ενώ η συγκέντρωση του sCD23 στον ορό των πασχόντων δεν διέφερε από αυτή των φυσιολογικών μαρτύρων. Τα ανοσομαγνητικά διαχωρισθέντα CD19<sup>+</sup> Β-λεμφοκύτταρα περιφερικού αίματος των ασθενών παρουσίασαν αυξημένη ευαισθησία σε μη ειδικούς πολυκλωνικούς διεγέρτες, όπως αποδεικνύεται από τα υψηλά επίπεδα sCD23 που μετρήθηκαν στα υπερκείμενα κυτταροκαλλιιεργειών.

Υποθέτουμε ότι όλα αυτά τα ευρήματα μπορεί να σχετίζονται με μια ήπιου βαθμού χρόνια φλεγμονώδη διεργασία η οποία ενέχεται στην παθογένεια του συνδρόμου.

B

## *Γενικό Μέρος*

B

*Κεφάλαιο Α*

*Χρόνια Ιδιοπαθής Ουδετεροπενία*

---

## *ΧΡΟΝΙΑ ΙΔΙΟΠΑΘΗΣ ΟΥΔΕΤΕΡΟΠΕΝΙΑ ΤΟΥ ΕΝΗΛΙΚΟΥ*

### *1.1 ΟΡΙΣΜΟΣ*

Η Χρονία Ιδιοπαθής Ουδετεροπενία του ενηλίκου (Chronic Idiopathic Neutropenia of Adults-CINA) είναι ένας ευρέως χρησιμοποιούμενος περιγραφικός όρος που υποδηλώνει την ανεξήγητη και παρατεταμένη (πάνω από τρεις μήνες) μείωση του αριθμού των κυκλοφορούντων στο αίμα ουδετερόφιλων κοκκιοκυττάρων κάτω από το κατώτερο όριο της φυσιολογικής διακύμανσης σ' ένα δεδομένο εθνικό πληθυσμό [1,2,17,81,82,83,84].

Η διαταραχή παρουσιάζεται με δύο τύπους, την ανοσολογικού τύπου και την μη ανοσολογικού τύπου CINA.

Η ανοσολογικού τύπου οφείλεται σε αντιπολυμορφοπυρηνικά αντισώματα [3-7,69-70], μη ειδική προσκόλληση ανοσοσφαιρίνης [8], κυκλοφορούντα ανοσοσυμπλέγματα [68], αντισώματα έναντι μυελικών προβαθμίδων [9] ή ακόμη σε κυτταροεπαγόμενη καταστολή της μυελοποίησης [10].

Η μη ανοσολογικού τύπου αποδίδεται σε πολλές και ακόμη άγνωστες αιτίες και παθογενετικούς μηχανισμούς, αν και, κατά τα τελευταία χρόνια παρουσιάστηκαν πολλές ενδείξεις ότι η μη ανοσολογικού τύπου ουδετεροπενία των ενηλίκων (NI-CINA) σχετίζεται με προ-φλεγμονώδεις κυτταροκίνες και χυμοκίνες [11-13], που σχετίζονται με την παρουσία μιας ήπιας χρόνιας φλεγμονώδους διεργασίας [11-16].

Η μη ανοσολογικού τύπου CINA χαρακτηρίζεται από:

- ουδετεροπενία ποικίλου βαθμού συνοδευόμενη από μικρό αριθμό δεσμευμένων για τη μυελική σειρά προγονικών κυττάρων

στον μυελό, όπως αυτό αποδεικνύεται από τον μειωμένο αριθμό των CD34<sup>+</sup>/CD33<sup>+</sup> κυττάρων και την αυξημένη παραγωγή αναστολέων της αιμοποίησης όπως του TGF-β1 και του TNF-α [12].

- Λεμφοπενία οφειλόμενη σε εκλεκτική μείωση των ανοσολογικά μνημονικών T-κυττάρων και των κυττάρων «φυσικών φονέων»(NK) [15,21-23].
- Αυξημένος σπληνικός όγκος υπερηχοτομογραφικά [19]
- Οστεοπενία ή/και οστεοπόρωση [20]
- Αναιμία, κυρίως του τύπου της αναιμίας της χρόνιας νόσου [24]
- Στοιχεία χρόνιου αντιγονικού ερεθισμού και συγκεκριμένα αυξημένη αναλογία πλασματοκυττάρων του μυελού των οστών, αυξημένα επίπεδα IgG<sub>1</sub> ή/και IgA στον ορό [16], αυξημένη συχνότητα μονοκλωνικής γαμμαπάθειας στον ορό [61], αυξημένη συχνότητα αντιπυρηνικών αντισωμάτων και αυξημένα επίπεδα κυκλοφορούντων ανοσοσυμπλεγμάτων [11,12,14,15,86].
- Αυξημένη συγκέντρωση προφλεγμονωδών κυτταροκινών και χυμοκινών που παράγονται από ενεργοποιημένα μακροφάγα [13] και επηρεάζουν τον οστικό μεταβολισμό, τη λειτουργία του μυελού των οστών και την κυκλοφορία των λευκοκυττάρων [96,97].

### ***1.2 ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΑ ΚΡΙΤΗΡΙΑ***

Τα κριτήρια για την διάγνωση της μη άνοσης ουδετεροπενίας συνοψίζονται στον πίνακα 1. Συγκεκριμένα:

1. Αριθμός κυκλοφορούντων στο αίμα ουδετερόφιλων κοκκιοκυττάρων κάτω από 2500/μl αίματος, που βρέθηκε σε τέσσερις διαδοχικές μετρήσεις, που έγιναν μέσα στους τελευταίους τρεις μήνες της παρακολούθησης του αρρώστου [2,17,95-97].

2. Αποκλεισμός της κυκλικής [27,85], οικογενούς [26,78,79] και φυλετικής ουδετεροπενίας [77,78,80]

3. Αποκλεισμός έκθεσης σε ιονίζουσα ακτινοβολία, επαφής με οργανικούς διαλύτες, ή λήψης κυτταροτοξικών ή άλλων φαρμάκων ικανών να προκαλέσουν ουδετεροπενία [25,48,49].

4. Αρνητικές δοκιμάσιες λευκοσυγκόλλησης και ανοσοφθορισμού στην αναζήτηση αντιπολυμορφοπυρηνικών αντισωμάτων, προσκολλημένων στα κοκκιοκύτταρα ή και κυκλοφορούντα στον ορό.

5. Αποκλεισμός κάποιας άλλης συστηματικής νόσου που συνοδεύεται με ουδετεροπενία [71-75] (όπως λεμφοϋπερπλαστική νόσος, νοσήματα του συνδετικού ιστού), μετά από λεπτομερή αιματολογικό, βιοχημικό, ανοσολογικό [86], βακτηριολογικό [90,91], ιολογικό [28,46,47], παρασιτολογικό έλεγχο [88,89], όπως επίσης και υπερηχογραφικό έλεγχο κοιλίας [11,14,16].

### Πίνακας 1. Κριτήρια διάγνωσης της NI-CINA

<p>1.Αριθμός κοκκιοκυττάρων μικρότερος από 2500/μλ σε 4 διαδοχικές μετρήσεις , σε χρονικό διάστημα 3 μηνών</p> <p>2.Αποκλεισμός κυκλικής, οικογενούς, φυλετικής ουδετεροπενίας</p> <p>3.Αποκλεισμός λήψης φαρμάκων ή έκθεσης σε ιονίζουσα ακτινοβολία</p> <p>4.Αποκλεισμός συστηματικής νόσου</p> <p>5.Μη ανεύρεση αντιπολυμορφοπυρηνικών αντισωμάτων</p>
---

Γενικά, η μη ανοσολογικού τύπου CINA μπορεί να διακριθεί από τους άλλους τύπους της χρόνιας ουδετεροπενίας από τον επίκτητο χαρακτήρα της, την έλλειψη χρωμοσωμιακών ανωμαλιών, τις αρνητικές δοκιμασίες για αντισώματα κατά των ουδετερόφιλων, την

έλλειψη ιστορικού έκθεσης σε ιονίζουσα ακτινοβολία, επαφής με χημικά προϊόντα ή λήψης φαρμάκων ικανών να προκαλέσουν ουδετεροπενία [48,49,76] και έλλειψη κλινικών ή και εργαστηριακών αποδείξεων υποκείμενου νοσήματος στο οποίο θα μπορούσε να αποδοθεί η ουδετεροπενία [11,14,16].

### ***1.3 ΣΤΑΔΙΟΠΟΙΗΣΗ***

Το κατώτερο όριο της φυσιολογικής διακύμανσης των ουδετερόφιλων πολυμορφοπύρηνων για τους ενήλικες είναι 2500 ουδετερόφιλα/μl αίματος [17].

Με βάση τον αριθμό των κυκλοφορούντων ουδετερόφιλων κοκκιοκυττάρων στο αίμα, η ουδετεροπενία μπορεί να χαρακτηριστεί ως «ήπια»(mild) εάν ο αριθμός των ουδετερόφιλων κυμαίνεται από 2499 έως 1800/μl αίματος [14,17], «μέτριας βαρύτητας» (moderate) εάν κυμαίνεται από 1799 έως 500/μl αίματος και η «βαριά»(severe) για αριθμό ουδετερόφιλων κάτω των 500/μl αίματος. Ο όρος «ακοκκιοκυτταραιμία» (agranulocytosis) αναφέρεται στις περιπτώσεις βαριάς ουδετεροπενίας με αριθμό ουδετερόφιλων κάτω των 100/μl αίματος [17], ενώ ο όρος «εξεσημασμένη ουδετεροπενία» (pronounced neutropenia) καλύπτει όλες τις περιπτώσεις ενδιάμεσης και βαριάς ουδετεροπενίας [14].

### ***1.4 ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ***

Η επίπτωση της NI-CINA στο γενικό πληθυσμό είναι άγνωστη αλλά ο επιπολασμός της εξεσημασμένης ουδετεροπενίας στο Κρητικό πληθυσμό εκτιμάται στο 1.67% [29]. Εμφανίζεται κυρίως στις γυναίκες [2,30]. Ο λόγος γυναίκες/άνδρες είναι 5/1 [14]. Η κατανομή στην εμφάνιση της νόσου με βάση την ηλικία δείχνει ότι το 65,3% των ουδετεροπενικών ατόμων, αφορούν σε άτομα ηλικίας 30-59 ετών, κάτω των 30 ετών (15 έως 29 ετών) το ποσοστό



καλύπτει το 19,4% και άνω των 60 ετών (60 έως 79 ετών) το ποσοστό ανέρχεται σε 15,3%. Πρόσφατα αναφέρθηκε προδιάθεση για την εμφάνιση της νόσου στους έχοντες τον απλότυπο HLA-DRB1\* 1302 με σχετικό κίνδυνο ν'αναπτύξουν ουδετεροπενία 8,36 [31].

### **1.5 ΚΛΙΝΙΚΕΣ ΕΚΔΗΛΩΣΕΙΣ**

Οι ασθενείς συνήθως είναι ασυμπτωματικοί και η ύπαρξη της CINA αποκαλύπτεται τυχαία, επ'ευκαιρία κάποιας εξέτασης αίματος που έγινε για άσχετο λόγο. Εν τούτοις ορισμένοι ασθενείς μπορεί να εμφανίζουν κλινικά συμπτώματα και εργαστηριακά ευρήματα που χρήζουν περαιτέρω έρευνα. Ως τέτοια μπορεί να θεωρηθούν:

- Λοιμώξεις. Εμφανίζονται κυρίως στις «βαριές» ουδετεροπενίες και αφορούν συνήθως το δέρμα, το αναπνευστικό σύστημα, το ουροποιητικό σύστημα, τη στοματική κοιλότητα, τα παραρρίνια, την περιγεννητική και την περιπρωκτική χώρα [2,32]. Εμμένουσα ουλίτιδα έχει επίσης αναφερθεί [33-35]. Στο δέρμα οι λοιμώξεις παίρνουν την μορφή του μολυσματικού κηρίου, της δοθιήνωσης, της θυλακίτιδας και της σταφυλοκοκκικής δερματίτιδας. Στη στοματική κοιλότητα παίρνουν τον τύπο της ελκώδους στοματίτιδας, ενώ στα παραρρίνια την μορφή της οξείας παραρρινοκολπίτιδας ή και μαστοειδίτιδας. Στην περιγεννητική και την περιπρωκτική χώρα, οι λοιμώξεις παίρνουν την μορφή διάχυτων φλεγμώνων και αποστημάτων. Οι λοιμώξεις του αναπνευστικού είναι κατά βάση τραχειοβρογχίτιδες και βρογχίτιδες. Η πιθανότητα να εμφανιστεί βακτηριακή λοίμωξη σε ασθενείς με NI-CINA εξαρτάται από την σοβαρότητα της ουδετεροπενίας και από τα χαμηλά επίπεδα στον ορό του διαλυτού υποδοχέα Fcγ-RIII (soluble CD16) [37].

Προληπτική θεραπευτική αντιμετώπιση σε ασθενείς με βαριά ουδετεροπενία, περιλαμβάνει αυξητικούς παράγοντες όπως ο G-CSF και ο GM-CSF [18,36,38,39].

- Σπληνομεγαλία. Κλινικά ελεγχόμενη σπληνομεγαλία είναι πολύ σπάνια στους ασθενείς με NI-CINA [2]. Εν τούτοις αυξημένος σπληνικός όγκος, όπως υπολογίστηκε από το διορθωμένο σπληνικό δείκτη (corrected splenic index- CSI) με την υπερηχοτομογραφία, βρέθηκε στο 48.1% των ασθενών [19]. Στην ίδια ομάδα ασθενών οι τιμές CSI συσχετιζόταν αντιστρόφως ανάλογα με τον αριθμό των κυκλοφορούντων ουδετερόφιλων και λεμφοκυττάρων αλλά όχι και με το επίπεδο της αιμοσφαίρινης ή τον αριθμό των κυκλοφορούντων μονοπύρηνων ή αιμοπεταλίων [19]. Έχει προταθεί ότι ο αυξημένος σπληνικός όγκος σε αυτούς τους ασθενείς μπορεί να αντικατοπτρίζει μία υπερπλασία ενεργοποιημένων σπληνικών μακροφάγων και ενεργοποιημένων ενδοθηλιακών κυττάρων, οδηγώντας έτσι σε αύξηση στον ορό των προ-φλεγμονωδών κυτταροκινών και των διαλυτών μορίων προσκόλλησης [19].

Στη βάση αυτής της παρατήρησης έχει ειπωθεί ότι ο αυξημένος σπληνικός όγκος στους ασθενείς με NI-CINA επηρεάζει την κυκλοφορία των λευκοκυττάρων αυξάνοντας την καταστροφή και ή την εξαγγείωση των ουδετερόφιλων και των λεμφοκυττάρων στο σπλήνα [19,68].

- Οστεοπενία και οστεοπόρωση. Γύρω στο 38% των ασθενών με NI-CINA παρουσίαζαν μυοσκελετικούς πόνους οφειλόμενους σε οστεοαρθρίτιδα και οστεοπόρωση, ενώ μόνο το 6% των φυσιολογικών μαρτύρων παρουσίαζαν ανάλογη συμπτωματολογία [14]. Η οστική πυκνότητα αυτών των ασθενών ήταν σημαντικά ελαττωμένη και αντιστρόφως ανάλογη με τις τιμές της

ουδετεροπενίας [20]. Οι ασθενείς είχαν επίσης αυξημένες στα ούρα τις συγκεντρώσεις της αμινοτελοπεπτιδάσης του προ-κολλαγόνου 1(NTx), θέτοντας έτσι την υπόνοια αυξημένης οστικής απορρόφησης και αυξημένες στον ορό τις συγκεντρώσεις της οστεοκαλσίνης (OC), η οποία με την σειρά της έθεται την υπόνοια αυξημένου οστικού σχηματισμού. Οι τιμές και των δύο, δηλαδή της NTx και της OC συσχετίστηκαν αρνητικά με την οστική πυκνότητα και θετικά με τα επίπεδα στον ορό του TNF-α και της IL-1β [20]. Αυτές οι αλλαγές των βιοχημικών δεικτών του οστικού μεταβολισμού σημαίνουν αυξημένο οστικό μεταβολισμό που οδηγεί μακροχρόνια σε μείωση της οστικής μάζας. Με τη δράση των κυτταροκινών αυτών στους οστεοκλάστες, τους οποίους και ενεργοποιούν, αναπτύσσεται οστεοπενία και οστεοπόρωση. Ένα μέρος των οστικών αλγών των αρρώστων μπορεί να οφείλεται στις οστεοπενικές δράσεις του TNF-α και της IL-1β [20].

## 1.6 ΠΡΟΓΝΩΣΗ ΚΑΙ ΘΕΡΑΠΕΙΑ

Η πρόγνωση της νόσου είναι γενικά άριστη. Όπως αναφέρθηκε, οι λοιμώξεις στους πάσχοντες είναι σπάνιες. Εξ άλλου, δεν παρατηρήθηκε εξέλιξη της ουδετεροπενίας σε συστηματικό ερυθματώδη λύκο, ρευματοειδή αρθρίτιδα, λευχαιμία ή άλλο συστηματικό νόσημα [30,98], μετά από μακρά περίοδο παρακολούθησης των αρρώστων αυτών.

Τελευταία αναφέρθηκαν πέντε περιπτώσεις ουδετεροπενίας που εξελίχθηκαν σε οξεία μυελογενή λευχαιμία [40,82,94]. Η αιτιοπαθογενετική σχέση μεταξύ προηγηθείσης ουδετεροπενίας και ανάπτυξης λευχαιμίας στους αρρώστους αυτούς δεν μπορεί να

τεκμηριωθεί λόγω του σχετικά υψηλού επιπολασμού της ουδετεροπενίας. [41].

Σε ότι αφορά την θεραπευτική αντιμετώπιση αυτής καθ' εαυτής της νόσου, τίποτα ακόμη δεν είναι γνωστό. Οι άρρωστοι απαντούν εύκολα και με μεγάλη ταχύτητα σε μικρές δόσεις αυξητικού παράγοντα G-CSF, όταν κρίνεται απαραίτητη η χορήγησή του [18,36,42,43]. Επίσης σε περιπτώσεις λοιμώξεων ενδεδειγμένη είναι η χορήγηση αντιβιοτικών.

### **1.7 ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΑ ΕΥΡΗΜΑΤΑ**

- Από το αίμα. Η NI-CINA μπορεί να παρουσιάζεται είτε σαν μεμονομένη ουδετεροπενία, είτε σαν ουδετεροπενία συνδιασμένη με αναιμία ή/και θρομβοπενία [2]. Επίσης μπορεί να παρατηρηθεί λεμφοπενία και μονοκυττοπενία [14-15,21-23].

Ουδετεροπενία. Η ουδετεροπενία έχει αποδοθεί εν προκειμένω:

α) σε αυξημένη απώλεια των ουδετερόφιλων στους ιστούς [11,44]

β) σε αυξημένη κατακράτηση των ουδετερόφιλων στο σπλήνα [3,6,8,45]

γ) σε μη αντισταθμιζόμενη μειωμένη παραγωγή ουδετερόφιλων στο μυελό των οστών [12,45].

Η αυξημένη έξοδος των ουδετερόφιλων κοκκιοκυττάρων από το αίμα στους ιστούς, ως αίτιο της ουδετεροπενίας, στηρίζεται στις ενδείξεις ενεργοποιημένου ενδοθηλίου. Ενδείξεις της παρουσίας ενεργοποιημένου ενδοθηλίου στους πάσχοντες αποτελούν αφ' ενός μεν οι αυξημένες συγκεντρώσεις στον ορό διαλυτών μορίων προσκόλλησης ενδοθηλιακής προέλευσης (sE-selectine, sICAM,

sVCAM) και αφ' ετέρου η αυξημένη παραγωγή IL-1 $\beta$  και TNF- $\alpha$ , που αποτελούν τους κύριους ενεργοποιητές του ενδοθηλίου.

Η αυξημένη κατακράτηση των ουδετερόφιλων στο σπλήνα ως αίτιο της ουδετεροπενίας, ανακοινώθηκε το 1977 από τον Lightsey και τους συνεργάτες του οι οποίοι μελέτησαν μία περίπτωση νόσου του Graves με ουδετεροπενία. Υποστήριξαν ότι τ' αντισώματα έναντι των θυρεοειδικών κυττάρων προσκολλώνται κατά μη ειδικό τρόπο στην επιφάνεια των κοκκιοκυττάρων τα οποία στη συνέχεια κατακρατούνται από τον σπλήνα και φαγοκυτταρώνονται [8].

Η μειωμένη παραγωγή ουδετερόφιλων στο μυελό των οστών μπορεί να οφείλεται σε παρουσία αντισωμάτων έναντι των προγονικών αιμοποιητικών προβαθμίδων, σε μειωμένη παραγωγή του αυξητικού κοκκιοκυτταρικού παράγοντα, G-CSF, λόγω μειωμένης έκφρασης του G-CSF mRNA ή από διαταραχή της μεταγραφής και τέλος σε αυξημένη παραγωγή του TGF- $\beta$ 1 από τα στρωματικά κύτταρα του αιμοποιητικού μικροπεριβάλλοντος.

Οι ασθενείς απαντούν εύκολα στην ενδοφλέβια χορήγηση υδροκορτιζόνης αυξάνοντας τον αριθμό των κυκλοφορούντων ουδετερόφιλων, κινητοποιώντας τα ουδετερόφιλα από το διαμέρισμα των προσκολλημένων στα αγγειακά τοιχώματα (marginal pool ) ή από τα αποθηκευμένα στο μυελό ώριμα πολυμορφοπύρρηνα, τα οποία αποτελούν τις εφεδρείες άμεσης ανάγκης (ουδετεροφιλικές αποθήκες) (marrow reserve), για να περάσουν στην δεξαμενή των κυκλοφορούντων ουδετερόφιλων [50].

Η μυελούπεροξειδάση και η αλκαλική φωσφατάση που παράγονται από τα ουδετερόφιλα των αρρώστων βρέθηκαν μέσα σε φυσιολογικά πλαίσια, ενώ παρατηρήθηκαν διαταραχές στις  $\beta$ <sub>2</sub>-ιντεγκρίνες (CD11b/CD18) [51] και την L-σελεκτίνη [52]. Οι  $\beta$ <sub>2</sub>-

ιντεγκρίνες στην επιφάνεια των κοκκιοκυττάρων είναι ενεργοποιημένες στους ασθενείς με CINA και προκαλούν την συγκόλληση των ουδετερόφιλων πολυμορφοπύρηνων πάνω στο αγγειακό ενδοθήλιο. Δεν βρέθηκαν μεταλλάξεις στο γονίδιο της ελαστάσης (Horwitz P, personal communication).

Λεμφοπενία. Λεμφοκύτταρα περιφερικού αίματος είναι συνήθως ελαττωμένα στους ασθενείς με NI-CINA, και οι μετρήσεις των λεμφοκυττάρων συσχετίζονται αρνητικά με το βαθμό της ουδετεροπενίας [15,23]. Το 37% των ασθενών έχουν τιμές λεμφοκυττάρων κάτω από 1500/μl περιφερικού αίματος. Αυτή η μείωση των λεμφοκυττάρων οφείλεται σε μείωση των T-κυττάρων και σε λιγότερο βαθμό των NK-κυττάρων [2]. Και τα δύο, βοηθητικά/επαγωγικά  $CD4^+$  και κατασταλτικά/κυτταρολυτικά  $CD8^+$  T-κύτταρα, μειώνονται παράλληλα, έτσι ώστε η αναλογία  $CD4^+/CD8^+$  T-κύτταρα να παραμένει μέσα σε φυσιολογικά όρια. Η ελάττωση των T-κυττάρων απεικονίζει κυρίως την ελάττωση του αριθμού των μνημονικών  $CD45RO^+/CD4^+$  και  $CD45RO^+/CD8^+$ , και όχι των ανοσολογικά παρθένων  $CD45RA^+/CD4^+$  ή  $CD45RA^+/CD8^+$  T-κυττάρων [23]. Οι πάσχοντες από CINA έχουν στην κυκλοφορία τους φυσιολογικό αριθμό ενεργοποιημένων T-λεμφοκυττάρων, όπως αυτό φαίνεται από την έκφραση των αντιγόνων CD25, CD38, CD71, και HLA-DR [23]. Όλα αυτά δείχνουν ότι οι πάσχοντες από CINA δεν έχουν στη κυκλοφορία τους αυξημένο αριθμό ενεργοποιημένων T-λεμφοκυττάρων και κατ' ακολουθίαν, δεν μπορεί να θεωρηθεί ότι η ουδετεροπενία των ασθενών με CINA οφείλεται στην παρουσία και δράση ενεργοποιημένων T-λεμφοκυττάρων. Τα NK-κύτταρα, τα οποία ορίζονται από την έκφραση στην επιφάνειά τους των αντιγόνων CD16 και CD56, είναι ελαττώμενα στους ασθενείς με CINA [23]. Η κυτταρολυτική δραστηριότητα (NKα) στο περιφερικό

αίμα βρέθηκε ελαττωμένη στον πληθυσμό των λεμφομονοπύρηνων κυττάρων και συσχετίστηκε αντιστρόφως ανάλογα με το βαθμό της ουδετεροπενίας [21]. Η ΝΚα αυξήθηκε με τη παρουσία ανασυνδιασμένης ανθρώπινης IL-2 ή ανασυνδιασμένης ανθρώπινης ιντερφερόνης-α [21], αλλά οι τιμές δεν έφτασαν τις τιμές των φυσιολογικών μαρτύρων.

Συμπερασματικά, η χαμηλή ΝΚα των ΝΚ-κυττάρων στους ασθενείς με NI-CINA οφείλεται προφανώς στο χαμηλό αριθμό ΝΚ-κυττάρων στο περιφερικό αίμα [21,22].

Θρομβοκυττοπενία- Μονοκυττοπενία. Γύρω στο 36% των ασθενών με NI-CINA έχουν μονοπύρηννα περιφερικού αίματος κάτω από 200/μl. Ο αριθμός των μονοπύρηνων συσχετίστηκε αντιστρόφως ανάλογα με τον βαθμό της ουδετεροπενίας [14].

Θρομβοκυττοπενία, η οποία ορίζεται σαν ελάττωση του αριθμού των αιμοπεταλίων κάτω από 150.000/μl αίματος, παρατηρήθηκε γύρω στο 10% των ασθενών [14]. Η αιτία του υποκείμενου μηχανισμού που οδηγεί σ' αυτές τις διαταραχές παραμένει ακόμη άγνωστη.

Αναιμία. Η αναιμία στους πάσχοντες από CINA δεν είναι συνήθης. Έχει αναφερθεί στο 10-15% και αποδίδεται σε:

- ◆ Έλλειψη σιδήρου [30]
- ◆ Διαταραχές της διακίνησης του σιδήρου [2]
- ◆ Έλλειψη φυλλικού ή και Α- κοβαλαμίνης (B12) [53]
- ◆ Ελάττωση του χρόνου επιβίωσης των ερυθροκυττάρων [2,53].

Ωστόσο βρέθηκε ότι οι τιμές της αιμοσφαιρίνης συσχετίζονται θετικά με τον αριθμό των κυκλοφορούντων ουδετερόφιλων και αρνητικά με τα επίπεδα στον ορό της ερυθροποιητίνης (EPO) και του TNF-α [24,54,55].

Υποστηρίζεται ότι η αναιμία της χρόνιας νόσου είναι ο συχνότερος τύπος αναιμίας που παρατηρείται στους ασθενείς με NICKINA [24].

- Από τον μυελό των οστών

Στους ασθενείς με CINA η κοκκιώδης σειρά τα στο μυελό των οστών βρέθηκε ελαττωμένη στο 79% των ασθενών [56]. Μεγαλοβλαστικές αλλοιώσεις της ερυθράς σειράς παρατηρήθηκαν στο 25% των περιπτώσεων. Μικρά μεγακαρυοκύτταρα σπάνια παρατηρήθηκαν, οι δε αναλογίες ηωσινόφιλων και λεμφοκυττάρων ήταν φυσιολογικές ή ήπια αυξημένες.

Η αναλογία κοκκιώδους προς ερυθρά σειρά είναι ελαττωμένη και συσχετίζεται με το βαθμό της ουδετεροπενίας.

Η αναλογία των κυττάρων που αποτελούν τον πολλαπλασιαζόμενο κοκκιοκυτταρικό πληθυσμό, PGP-proliferating granulocyte pool, είναι αυξημένη, ενώ αυτή των κυττάρων που αποτελούν τον ωριμάζοντα πληθυσμό MGP-maturing granulocyte pool, είναι ελαττωμένη [56]. Είναι δηλαδή εμφανής η στροφή προς τ'αριστερά της κοκκιώδους σειράς.

Συμπερασματικά, υπάρχει αρνητική συσχέτιση μεταξύ κυκλοφορούντων ουδετερόφιλων πολυμορφοπύρηνων κυττάρων και αναλογίας του αθροίσματος των άωρων μυελικών κοκκιοκυττάρων (προμυελοκύτταρα και βλαστικά κύτταρα) και θετική συσχέτιση μεταξύ κυκλοφορούντων ουδετερόφιλων και αναλογίας του αθροίσματος των ώριμων μυελικών κοκκιοκυττάρων (ραβδοπύρηνια και πολυμορφοπύρηνια). Δηλαδή όσο βαρύτερη είναι η ουδετεροπενία, τόσο περισσότερο αυξημένη είναι η αναλογία των προμυελοκυττάρων και των βλαστικών κυττάρων στο μυελό και τόσο



μικρότερη είναι η αναλογία των ώριμων ραβδοπύρηνων και πολυμορφοπύρηνων του μυελού.

Η ελάττωση της δεξαμενής των ωριμαζόντων κοκκιοκυττάρων οφείλεται προφανώς στην αυξημένη έξοδο των ώριμων κυττάρων στην περιφέρεια σαν απάντηση στην ουδετεροπενία [11,22]. Η αδυναμία του μυελού των οστών να γεμίσει τις αποθήκες με ώριμα κοκκιοκύτταρα οφείλεται προφανώς στην ανεπαρκή προσφορά νέων μυελοβλαστών από το ελαττωμένο διαμέρισμα των μυελικών προβαθμίδων [12].

Ιδιαίτερου ενδιαφέροντος από αιτιοπαθογενετική άποψη τυγχάνει η αρνητική συσχέτιση μεταξύ του αριθμού των κυκλοφορούντων στο αίμα ουδετερόφιλων και της αναλογίας των πλασματοκυττάρων του μυελού [56] γεγονός που ενισχύει την άποψη, ότι η CINA σχετίζεται με κάποια ήπια χρόνια φλεγμονώδη διεργασία στον οργανισμό [11,56,64].

Υποπληθυσμοί λεμφοκυττάρων. Η αναλογία των T-κυττάρων και των NK-κυττάρων δεν έχει αλλαγές στους ασθενείς με CINA, ενώ τα B-κύτταρα και τα CD57<sup>+</sup> κύτταρα είναι αυξημένα [56]. Το αντιγόνο CD57 εκφράζεται σε ένα μεγάλο ποσοστό των CD8 T-κυττάρων, αλλά και στο 55-60% των NK-κυττάρων [57]. Τα μνημονικά CD45RO<sup>+</sup> T-κύτταρα του μυελού των οστών είναι ελαττώμενα ενώ δεν παρατηρείται αλλαγή στην αναλογία των ανοσολογικά παρθένων CD45RA<sup>+</sup> T-κυττάρων [57].

Ιστολογικά ευρήματα. Σε ιστολογικά παρασκευάσματα οι πάσχοντες από CINA έχουν στην πλειοψηφία τους φυσιολογικό μυελικό όργανο, με αύξηση του διαμερίσματος των πολλαπλασιαζόμενων κοκκιοκυττάρων και μείωση του

διαμερίσματος των ωριμαζόντων κοκκιοκυττάρων [56]. Τα ευρήματα αυτά είναι συμβατά με ένα βαθμό αναστολής της ωρίμανσης, που άνετα θα μπορούσε να αποδοθεί στην παρουσία αναστολέων της κοκκιοποίησης. Το γεγονός εξάλλου ότι στο μυελικό όργανο δεν υπάρχουν διαταραχές των λεμφοκυττάρων εκτός από μία μικρή αύξηση των Β-κυττάρων, δείχνει ότι η αναστολή της κοκκιοποίησης δεν οφείλεται σε ενεργοποίηση του Τ-λεμφοκυτταρικού πληθυσμού [56].

#### **Κοκκιοκυτταρικές προβαθμίδες και αιμοποιητικό μικροπεριβάλλον.**

Οι αναλογίες των  $CD34^+$  κυττάρων που εκφράζουν συγκεκριμένα αντιγόνα επιφανείας ( $CD34^+/lin^+$  κύτταρα) και συγκεκριμένα τα  $CD34^+/CD33^+$ ,  $CD34^+/CD71^+$ ,  $CD34^+/CD45RA^+$ ,  $CD34^+/CD38^+$ ,  $CD34^+/DR^+$  είναι σημαντικά ελαττωμένες, ενώ οι αναλογίες των  $CD34^+$  κυττάρων που δεν εκφράζουν αντιγόνα συγκεκριμένης διαφοροποίησης ( $CD34^+/lin^-$ ) είναι φυσιολογικές.

Οι ασθενείς με NI-CINA έχουν φυσιολογικό [58,59], ελαττωμένο [45] ή αυξημένο αριθμό των CFU-GM (granulocyte-macrophage colony-forming units) [58]. Έχει επίσης επιβεβαιωθεί ότι η δυσλειτουργία του αιμοποιητικού μικροπεριβάλλοντος [58,59] οδηγεί σε ακατάλληλη απελευθέρωση του G-CSF, εξ' αιτίας, μειωμένης έκφρασης του G-CSF m-RNA [60] ή από διαταραχή της μεταγραφής [92] ή αυξημένης απελευθέρωσης αναστολέων της αιμοποίησης όπως ο TGF- $\beta_1$  και ο TNF- $\alpha$  [12]. Ο αριθμός του G-CSF του μυελού των οστών συσχετίζεται με το βαθμό της ουδετεροπενίας [12]. Επίσης, καλλιέργειες μακράς διάρκειας στρωματικών κυττάρων ασθενών με ουδετεροπενία, δεν μπόρεσαν να αναπτύξουν CFU-GM αποικίες [12]. Το εύρημα αυτό δείχνει ότι τα στρωματικά κύτταρα ασθενών με NI-CINA πιθανόν εκφράζουν ή απελευθερώνουν μειωμένες ποσότητες

αυξητικών αιμοποιητικών παραγόντων ή αυξημένες ποσότητες αναστολέων της μυελοποίησης. Η ρύθμιση της αιμοποίησης από στρωματικά κύτταρα του μυελού γίνεται με την παραγωγή κυτταροκινών με επαγωγική ή ανασταλτική δράση στα stem cells. Υπερκείμενα καλλιιεργειών μυελού των οστών, από ασθενείς, έχουν αυξημένες συγκεντρώσεις G-CSF, IL-6, TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta_1$  [12]. Αυτά τα ευρήματα δείχνουν ότι τα στρωματικά κύτταρα, όπως μακροφάγα και μεσεγχυματικά κύτταρα, είναι ενεργοποιημένα σε ασθενείς με NI-CINA και παράγουν αυξημένα ποσά επαγωγέων (GM-CSF, IL-6, G-CSF) και αναστολέων της αιμοποίησης, όπως ο TGF- $\beta_1$  και ο TNF- $\alpha$  [12]. Είναι προφανές ότι τα ενεργοποιημένα στρωματικά κύτταρα του μυελού των οστών καταστέλλουν την μυελοποίηση, όχι μόνο απελευθερώνοντας αυξημένα ποσά αναστολέων της αιμοποίησης επηρεάζοντας έτσι την αύξηση των αιμοποιητικών προβαθμίδων (υπάρχει ισχυρή αρνητική συσχέτιση μεταξύ των ποσοτήτων του TGF- $\beta_1$  και της αναλογίας των CD34<sup>+</sup>/CD33<sup>+</sup> κυττάρων), αλλά και επηρεάζοντας την επαγωγή των παραγόντων ανάπτυξης απελευθερώνοντας μεγάλα ποσά TNF- $\alpha$ , ο οποίος ενεργοποιεί την οδό κυτταρικού θανάτου στο διαμέρισμα των κοκκιοκυτταρικών προβαθμίδων [12]. Συμπερασματικά τα στρωματικά κύτταρα του μυελού των οστών παράγουν αυξημένες ποσότητες αιμοποιητικών αυξητικών παραγόντων οι οποίοι όμως έχουν μειωμένη ικανότητα επαγωγής της μυελοποίησης λόγω αυξημένης παραγωγής του TGF- $\beta_1$  και πιθανόν άλλων αναστολέων της μυελοποίησης.

- Πρωτεΐνες του ορού

Ανοσοσφαιρίνες. Ένα σημαντικό ποσοστό ασθενών με NI-CINA έχουν στον ορό τους αυξημένα επίπεδα ανοσοσφαιρινών IgG και IgA αλλά όχι IgM [16,61]. Τα αυξημένα επίπεδα της IgG αντανακλούν

αύξηση της IgG<sub>1</sub>, ενώ η IgG<sub>2</sub> και η IgG<sub>4</sub> δεν παρουσιάζουν σημαντική αλλαγή. Η IgG<sub>3</sub> είναι ελαττωμένη [16]. Τα επίπεδα της IgG<sub>3</sub> συσχετίζονται αρνητικά [16] και της IgA θετικά με τα επίπεδα στον ορό του TGF-β<sub>1</sub>[16] ο οποίος είναι μία κυτταροκίνη που παίζει σημαντικό ρόλο στην ρύθμιση της αλλαγής ισοτύπων των ανοσοσφαιρινών. Συγκεκριμένα επάγει αλλαγή σε IgG<sub>2</sub> και IgA ενώ αναστέλλει την αλλαγή σε IgG<sub>3</sub> και IgM [62].

Πρωτεΐνες οξείας φάσης. Με εξαίρεση την α<sub>1</sub>-αντιθρυψίνη όλες οι άλλες πρωτεΐνες οξείας φάσης δεν παρουσιάζουν σημαντικές αλλαγές στους ασθενείς με NI-CINA [61]. Ο λόγος για τον οποίο παρουσιάζεται αυτή η αύξηση στην α<sub>1</sub>-αντιθρυψίνη χρήζει περισσότερη εργαστηριακή διερεύνηση, μπορεί όμως κάποιος να υποθέσει ότι μπορεί να συσχετίζεται με τα χαμηλά επίπεδα στον ορό της ουδετερόφιλης ελαστάσης για την οποία η α<sub>1</sub>-αντιθρυψίνη είναι φυσιολογικός αναστολέας.

Κυκλοφορούντα ανοσοσυμπλέγματα, ρευματοειδής παράγοντας, παράγοντες συμπληρώματος C3-C4 και διαλυτός Fcγ-RIII. Κυκλοφορούντα ανοσοσυμπλέγματα μπορεί να είναι αυξημένα σε ασθενείς με NI-CINA [63,64] ενώ δεν παρατηρούνται αλλαγές στα επίπεδα του ρευματοειδή παράγοντα ή των παραγόντων του συμπληρώματος C3 και C4 [64].

Τα επίπεδα του Fcγ-RIII είναι φυσιολογικά [37]. Όμως ασθενείς με χαμηλές τιμές του εν λόγω υποδοχέα έχουν αυξημένο ρίσκο σε λοιμώξεις [37], εξ' αιτίας του ότι ο υποδοχέας μεσολαβεί στη φαγοκυττάρωση και στην εξαρτημένη από αντίσωμα κυτταρικά επαγόμενη κυτταροτοξικότητα (ADCC - antibody dependent cell mediated cytotoxicity)[37].

Αυτοαντισώματα. Αντιπυρηνικά αντισώματα (ANA) σε τίτλο ίσο ή μεγαλύτερο του 1/80 μπορεί να βρεθούν σε ασθενείς με NI-CINA [64]. Και οι δύο τύποι κοκκίωσης, στικτή και διάχυτη μπορούν να παρατηρηθούν με την ίδια συχνότητα [64].

Αντισώματα κατά οργανοειδικών και μη οργανοειδικών αντιγόνων συμπεριλαμβανομένων των αντι-ουδετερόφιλων κυτταροπλασματικών αντιγόνων (ANCA), είναι είτε αρνητικά είτε θετικά σε χαμηλό τίτλο [64].

Κυτταροκίνες και χυμοκίνες. IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , διαλυτός TNF-R p55 (sTNF-RI), TGF- $\beta_1$ , IL-6, IL-8 και RANTES είναι αυξημένα σε ασθενείς με NI-CINA και σχετίζονται αρνητικά με το βαθμό της ουδετεροπενίας [11,13,16,22]. Όλα αυτά τα μόρια παράγονται από ενεργοποιημένα μακροφάγα. Όπως έχει αναφερθεί, αυξημένες συγκεντρώσεις του TGF- $\beta_1$ , IL-6 και του G-CSF βρέθηκαν σε υπερκείμενα καλλιεργειών μυελού των οστών, γεγονός το οποίο υποδηλώνει ότι τα στρωματικά κύτταρα του μυελού των οστών είναι ενεργοποιημένα σ' αυτούς τους ασθενείς [12]. Όλα αυτά τα δεδομένα ενισχύουν την άποψη της ύπαρξης μιας υποκείμενης ήπιας χρόνιας φλεγμονώδους διεργασίας [11,13,16,22].

Διαλυτά μόρια προσκόλλησης. Τα μόρια προσκόλλησης (cell adhesion molecules, CAM) είναι πρωτεΐνες κυτταρικής επιφάνειας που εμπλέκονται στη σύνδεση των κυττάρων σε ιστούς αλλά και σε αλληλεπιδράσεις κυττάρου-κυττάρου.

Οι κύριες κατηγορίες μορίων προσκόλλησης που παίζουν ρόλο στις λευκοκυτταρικές αλληλεπιδράσεις είναι οι seleκτίνες (επιλεκτίνες), οι ιντεγκρίνες (integrins), μέλη της οικογένειας των ανοσοσφαιρινών και μερικά μόρια ανάλογα της βλεννίνης.

Από τις σελεκτίνες, η Ε-σελεκτίνη εκφράζεται στο αγγειακό ενδοθήλιο και πυροδοτεί την ταχεία-χαμηλής συγγένειας προσκόλληση των λευκοκυττάρων, μέσω ενός ολιγοσακχαρίτη που βρίσκεται στις επιφανειακές γλυκοπρωτεΐνες των κυκλοφορούντων λευκοκυττάρων, στο ενδοθήλιο .

Στην οικογένεια των ανοσοσφαιρινών ανήκουν τα διακυτταρικά προσκολλητικά μόρια (ICAM) και τα αγγειοκυτταρικά μόρια προσκόλλησης (VCAM) τα οποία εκφράζονται από το ενδοθήλιο και από τα αντιγονοπαρουσιαστικά λεμφοκύτταρα, και η δέσμευση σε αυτά τα μόρια καθιστά ικανά τα λευκοκύτταρα να μεταναστεύουν μέσω των αγγειακών τοιχωμάτων.

Τα επίπεδα στον ορό των διαλυτών αυτών μορίων προσκόλλησης, των προερχόμενων από ενδοθηλιακά κύτταρα, όπως είναι η sE-selectin, sICAM και το sVCAM είναι αυξημένα στους ασθενείς με CINA , και οι τιμές τους σχετίζονται αρνητικά με τον αριθμό των κυκλοφορούντων ουδετερόφιλων και θετικά με τις τιμές των περισσότερων κυτταροκινών και χυμοκινών που παράγονται από τα μακροφάγα [16,22]. Αυτά τα ευρήματα δείχνουν ότι οι ασθενείς με CINA έχουν ενεργοποιημένο ενδοθήλιο. Η ενεργοποίηση των ενδοθηλιακών κυττάρων προέρχεται προφανώς από τα αυξημένα επίπεδα IL-1β και TNF-α που είναι οι δύο κύριοι ενδοθηλιακοί ενεργοποιητές [57].

Με βάση τα παραπάνω, είναι εμφανής η αυξημένη λευκοκυτταρική εξαγγείωση που επιτυγχάνεται με την διαμεσολάβηση των β<sub>2</sub>-ιντεγκρινών των λευκοκυττάρων με τα ICAM-1 και VCAM-1, μόρια που εκφράζονται στο ενεργοποιημένο ενδοθήλιο [11].

Υποστηρίζεται επίσης ότι τα μνημονικά CD45RO<sup>+</sup> T-λεμφοκύτταρα που εκφράζουν β<sub>1</sub>-ιντεγκρίνες στη μεμβράνη τους (VLA-4), προσκολλώνται στο ενεργοποιημένο ενδοθήλιο μέσω του VCAM-1 και περνούν στους ιστούς [65] κάτι που δεν γίνεται με τα ανοσολογικά παρθένα CD45RA<sup>+</sup> T-λεμφοκύτταρα, που από τη φύση τους στερούνται

του αντιγόνου. Αν αυτά τα δραστικά Τ-κύτταρα αναγνωρίσουν στη συνέχεια ειδικό αντιγόνο στον ιστό όπου εισέρχονται, τότε παράγουν κυτταροκίνες, όπως TNF-α που ενεργοποιεί ενδοθηλιακά κύτταρα για να εκφράσουν Ε-σελεκτίνη, VCAM-1 και ICAM-1 και χυμοκίνες όπως η RANTES [15], οι οποίες ακολούθως επιδρούν στα δραστικά Τ-κύτταρα ενεργοποιώντας τα μόρια προσκόλλησής τους.

### 1.8 ΠΙΘΑΝΟΣ ΠΑΘΟΓΕΝΝΕΤΙΚΟΣ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ

Ένα μοντέλο πιθανού παθογεννητικού μηχανισμού της NI-CINA προτάθηκε τελευταία από την κ. Παπαδάκη και τους συνεργάτες της. Σύμφωνα με το μοντέλο αυτό οι ασθενείς με NI-CINA έχουν πιθανότατα μια χρόνια φλεγμονή που οδηγεί σε χρόνια αντιγονικό ερεθισμό και ενεργοποίηση των μακροφάγων [31] (Εικόνα 1).

Ο χρόνιος αντιγονικός ερεθισμός τεκμαίρεται από :

1. Τα αυξημένα επίπεδα στον ορό των IgG<sub>1</sub> και IgA [16]
2. Την αυξημένη αναλογία πλασματοκυττάρων στο μυελό [56]
3. Την αυξημένη συχνότητα εμφάνισης ANA στον ορό [64] και τις αυξημένες συγκεντρώσεις κυκλοφορούντων ανοσοσυμπλεγμάτων στον ορό [61,64] .

Η ενεργοποίηση των μακροφάγων τεκμαίρεται από :

1. Τα αυξημένα επίπεδα κυτταροκινών και χυμοκινών στον ορό (IL-1β, IL-8, RANTES, TNF-α, TGF-β<sub>1</sub>) [13,16]
2. Την αυξημένη συγκέντρωση των κυτταροκινών στα υπερκείμενα μυελικών καλλιέργειών [12] μακράς διάρκειας, στρωματικών κυττάρων (TGF-β<sub>1</sub>, IL-6, G-CSF, GM-CSF).

Με τη σειρά τους, ο χρόνιος αντιγονικός ερεθισμός και η ενεργοποίηση των μακροφάγων μπορούν να εξηγήσουν το αυξημένο μέγεθος του σπληνός, που παρατηρείται υπερηχοτομογραφικώς.



Οι κυτταροκίνες που παράγονται από τα μακροφάγα δρουν στο αγγειακό ενδοθήλιο, στους οστεοκλάστες και στα στρωματικά κύτταρα του μυελού των οστών. Έτσι :

α) Η IL-1 $\beta$  και ο TNF- $\alpha$  ενεργοποιούν τα ενδοθηλιακά κύτταρα οδηγώντας σε ευξημένη κυτταρική εξαγγείωση [11]. Ενδείξεις ενεργοποιημένου ενδοθηλίου στους πάσχοντες αποτελούν οι αυξημένες συγκεντρώσεις στον ορό διαλυτών μορίων προσκόλλησης ενδοθηλιακής προέλευσης (sE-selectin, sICAM, sVCAM). Εξ' άλλου η IL-8, τα επίπεδα της οποίας βρέθηκαν αυξημένα στους πάσχοντες, διευκολύνει την έξοδο των προσκολλημένων στο ενδοθήλιο ουδετερόφιλων κοκκιοκυττάρων προς τους ιστούς λόγω της ισχυρής χημειοτακτικής προς τα ουδετερόφιλα δράσης της.

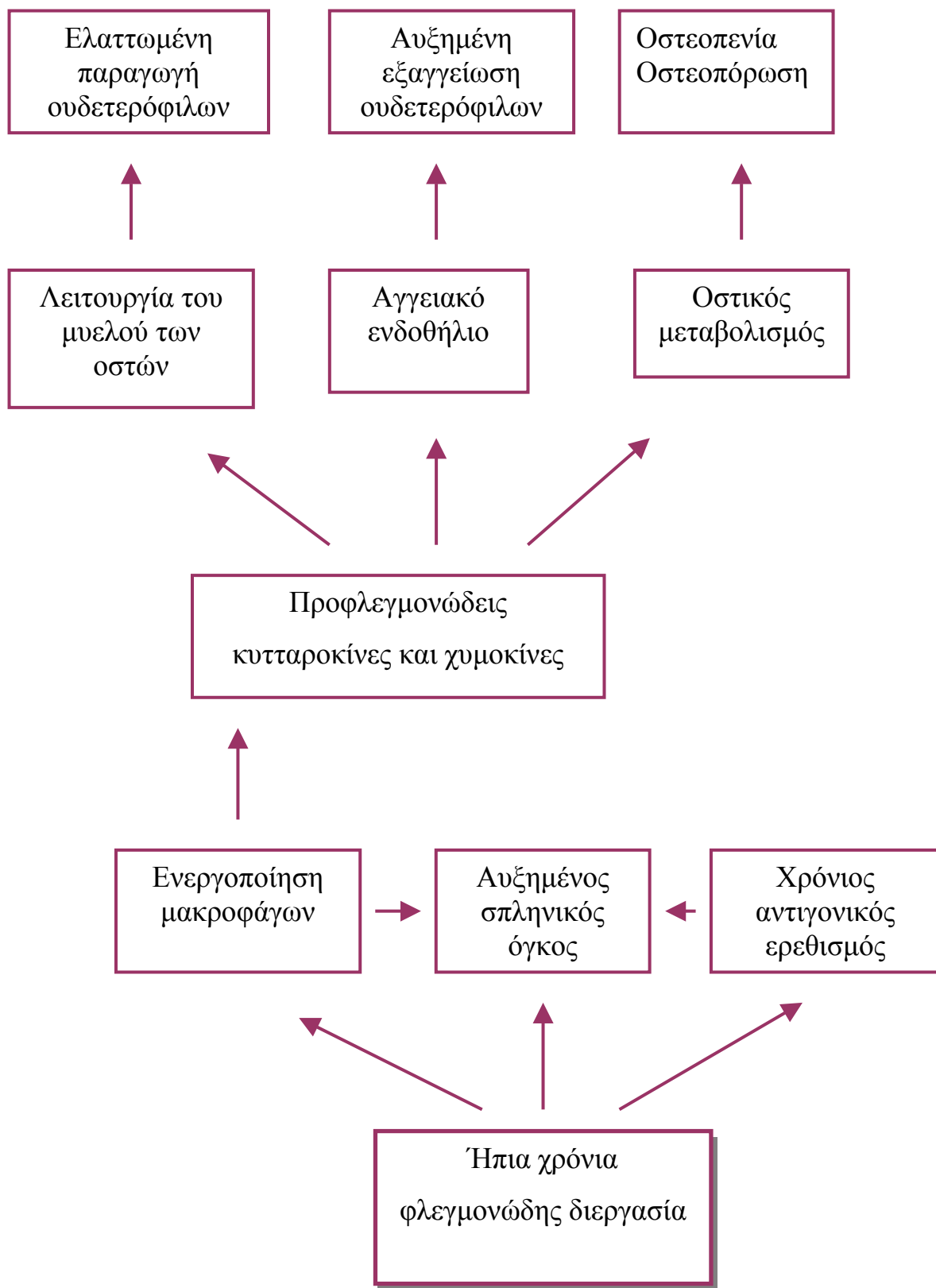
β) Ο TGF- $\beta_1$  αναστέλει τη μυελοποίηση [12] ενώ ο TNF- $\alpha$  επιτείνει την απόπτωση των μυελικών προγονικών κυττάρων. Η IL-1 $\beta$  ενεργοποιεί τα στρωματικά κύτταρα του μυελού των οστών τα οποία στη συνέχεια επάγουν την παραγωγή του TGF- $\beta_1$ , ο οποίος στη συνέχεια μαζί με την μεταφερόμενη από την περιφέρεια στο μυελικό όργανο ποσότητα του TGF- $\beta_1$ , αναστέλλουν την μυελοποίηση. Επίσης, η αναιμία, του τύπου της χρόνιας νόσου, που παρατηρείται μπορεί να εξηγηθεί από τη δράση του TNF- $\alpha$  στο μικροπεριβάλλον του μυελού των οστών [24].

γ) Η IL-1 $\beta$  και ο TNF- $\alpha$  οδηγούν σε οστεοπενία και οστεοπόρωση [20,67] μέσω ενεργοποίησης των οστεοκλαστών [20,66]. Ένα μέρος των οστικών αλγών των αρρώστων μπορεί να είναι αποτέλεσμα των οστεοπενικών δράσεων της IL-1 $\beta$  και του TNF- $\alpha$ .

Με βάση τα παραπάνω η ουδετεροπενία στους πάσχοντες από NI-CINA μπορεί να είναι το αποτέλεσμα του συνδιασμού τριών παραγόντων, της ελαττωμένης παραγωγής ουδετερόφιλων στο μυελό των οστών [12], της αυξημένης εξαγγείωσης ουδετερόφιλων στους ιστούς [11,22] και της αυξημένης κατακράτησης και/ή εξαγγείωσης ουδετερόφιλων μέσα στο σπλήνα [19].



Εικόνα 1. Σχηματική αναπαράσταση πιθανού παθογενετικού μηχανισμού της NI-CINA





*Κεφάλαιο Β*

*Β - λεμφοκύτταρα*

# ***B-ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΑ***

## **2.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ**

Τα Β-λεμφοκύτταρα αποτελούν το 5%-15% του συνόλου των λεμφοκυττάρων του αίματος [107]. Βασική βιολογική αποστολή τους στον οργανισμό είναι η προαγωγή της ειδικής ανοσολογικής άμυνας έναντι ποικίλων ξένων βλαπτικών βιολογικών παραγόντων του περιβάλλοντος που με κάποιο τρόπο εισήλθαν στον οργανισμό και αναγνωρίζονται ως «αντιγόνα» [200,201] .

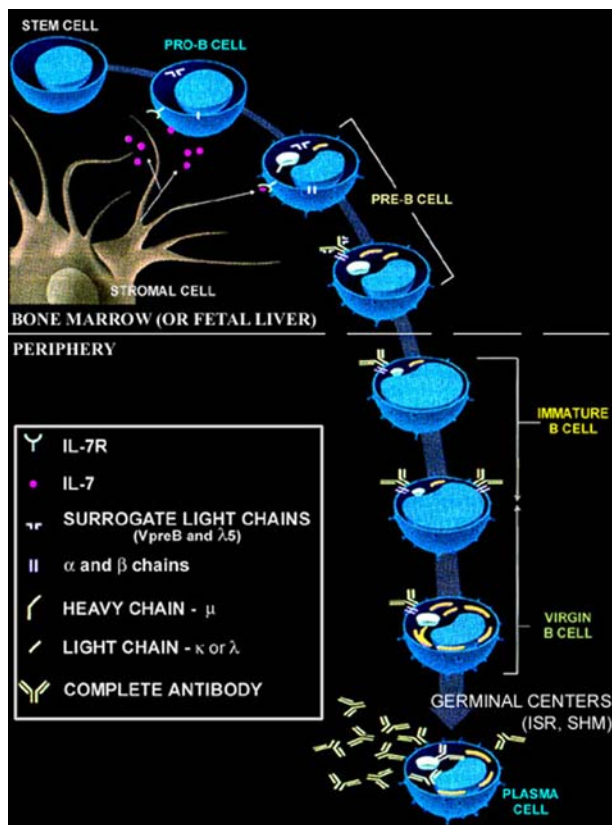
Τα αντισώματα είναι τα ειδικά για τα αντιγόνα προϊόντα των Β-λεμφοκυττάρων. Η παραγωγή αντισωμάτων ως απάντηση στη λοίμωξη αποτελεί την κύρια συμβολή των Β-λεμφοκυττάρων στην ειδική ανοσία [100,200,201] .

## **2.2 ΠΡΟΕΛΕΥΣΗ ΚΑΙ ΚΥΚΛΟΦΟΡΙΑ**

Τα Β-λεμφοκύτταρα παράγονται στον μυελό των οστών [102] και, κυρίως, στα περιφερικά λεμφικά όργανα [101-103,105,263].

Α. Στο μυελό των οστών. Η παραγωγή Β-λεμφοκυττάρων στο μυελό των οστών είναι αυτόνομη και επαγωγίμη. Η αυτόνομη είναι συνεχής και επιτελείται χωρίς αντιγονικό ερεθισμό. Ο μυελός δηλαδή λειτουργεί εν προκειμένω ως πρωτογενές ανοσολογικό όργανο [262]. Πρόκειται για τη λεμφοποίηση που αρχίζει από το πολυδύναμο προγονικό αιμοποιητικό κύτταρο P-HSC (pluripotent hemopoietic stem cell- αρχέγονο πολυδύναμο προγονικό μητρικό αιμοποιητικό κύτταρο) [207,219,253], περνά στο L-HSC (lymphoid HSC-διδύναμο λεμφικό προγονικό αιμοποιητικό κύτταρο) από το οποίο θα προέλθει με πολλαπλασιασμό και διαφοροποίηση το BL-HSC (προ-προ-B-κύτταρο), για να προχωρήσει στη συνέχεια, υπό την επήρεια

άγνωστων τοπικών επαγωγικών παραγόντων [219,246] ( πιθανώς με τη δράση της IL-7 ) [110,111,217,218,252], στην παραγωγή βραχείας ζωής ανοσολογικά παρθένων ώριμων B-κυττάρων (virgin mature B-cells) που θα περάσουν στην αιματική κυκλοφορία [104,108,130] (Εικόνα 2.1).



Εικ. 2.1 Επίδραση της IL-7 στην ανάπτυξη των B-λεμφοκυττάρων.

Η επαγωγική παραγωγή επιτελείται μόνο μετά από αντιγονικό ερεθισμό και πραγματοποιείται στα βλαστικά κέντρα των διάσπαρτων μέσα στο μυελικό όργανο λεμφοζυδιακών σχηματισμών. Ο μυελός δηλαδή λειτουργεί εδώ ως δευτερογενές ανοσολογικό όργανο. Από την παραγωγή αυτή θα προκύψουν μακράς ζωής ώριμα ανοσολογικά μνημονικά B-κύτταρα [121,130,262].

Β. Στο σπλήνα και στους λεμφαδένες [101,255]. Η παραγωγή B-λεμφοκυττάρων στο σπλήνα και τους λεμφαδένες είναι πάντοτε

επαγωγήμη. Ο σπλήνας και οι λεμφαδένες είναι δευτερογενή ανοσολογικά όργανα. Τα λεμφικά κύτταρα που συνεχώς παράγονται στα όργανα αυτά χωρίς αντιγονικό ερεθισμό, πεθαίνουν επι τόπου, για να επιζήσουν και να εξέλθουν στην κυκλοφορία μόνο εκείνα που παρήχθησαν μετά από αντιγονικό ερεθισμό [103]. Τα εξερχόμενα λεμφοκύτταρα αποδίδονται στην αιματική κυκλοφορία ως μακράς ζωής ανοσολογικά μνημονικά Β-κύτταρα [130,262].

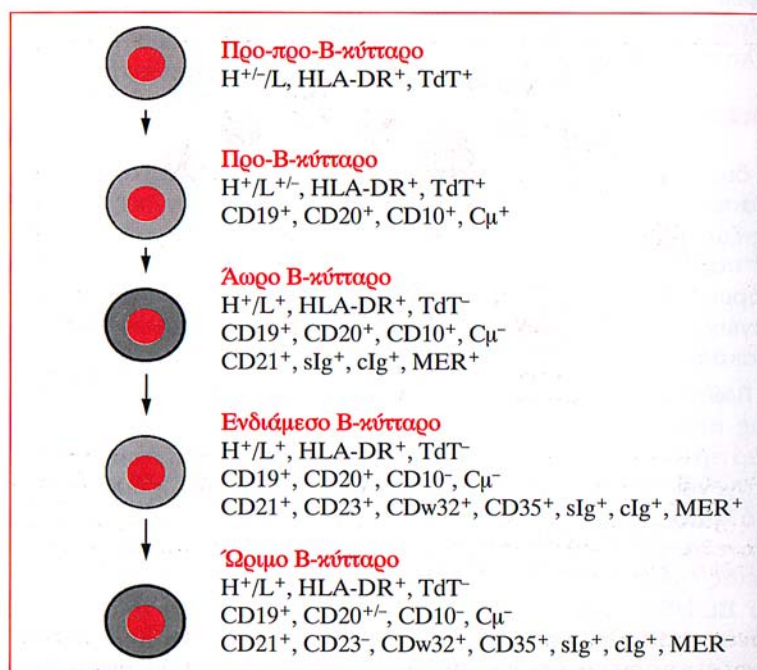
Γ. Στα λεμφοεπιθηλιακά όργανα που βρίσκονται κατά μήκος του εντέρου και στα διάσπαρτα λεμφοζίδια των ιστών και των οργάνων. Στα όργανα αυτά παράγονται μακράς ζωής μνημονικά Β-κύτταρα πάντοτε μετά από αντιγονικό ερεθισμό [205,262].

### 2.3 ΔΙΑΦΟΡΟΠΟΙΗΣΗ

Η διαφοροποίηση των κυττάρων της Β-λεμφοκυτταρικής σειράς εξελίσσεται σε τρία κύματα [129]. Το πρώτο οδηγεί στην παραγωγή βραχείας ζωής ώριμων ανοσολογικά παρθένων Β-κυττάρων, το δεύτερο στην παραγωγή μακράς ζωής ώριμων ανοσολογικά μνημονικών Β-κυττάρων και βραχείας ζωής πλασματοκυττάρων, και το τρίτο στην παραγωγή μακράς ζωής ώριμων ανοσολογικά μνημονικών Β-κυττάρων και μακράς ζωής πλασματοκυττάρων.

α. Πρώτο κύμα διαφοροποίησης. Το πρώτο κύμα διαφοροποίησης πραγματοποιείται αποκλειστικά στο μυελό των οστών μέσα στις μυελικές βροχίδες, έξω από τα διάσπαρτα λεμφοζίδια, και όπως ελέγχει είναι ανεξάρτητο από αντιγονικά ερεθίσματα. Το πιο σημαντικό γεγονός που συμβαίνει κατά τη διάρκεια αυτής της φάσης είναι ο γονιδιακός ανασυνδιασμός [118] που οδηγεί στην έκφραση μεμβρανικής ανοσοσφαιρίνης στα κύτταρα τα οποία στην συνέχεια αποικίζουν την περιφέρεια [133,216]. Το

κύμα αρχίζει από το δεσμευμένο προγονικό αιμοποιητικό κύτταρο BL-HSC, και ολοκληρώνεται με την παραγωγή και απόδοση στην κυκλοφορία ώριμων βραχείας ζωής ανοσολογικά παρθένων Β-κυττάρων [218]. (Εικόνα 2.2)



**Εικ. 2.2** Πρώτο κύμα διαφοροποίησης της Β-λεμφοκυτταρικής σειράς. Η διαφοροποίηση γίνεται στο μυελό των οστών και είναι ανεξάρτητη από αντιγονικά ερεθίσματα. Δύο άλλα αντιγόνα της Β-κυτταρικής σειράς, τα CD72 και CD79, απεδείχθησαν πολύ ενδιαφέροντα. MER, mouse erythrocyte rosettes. (Από Γ. Ηλιοπούλου, "Βασική Ανοσολογία", Ηράκλειο 1999).

Το BL-HSC, γνωστό και ως προ-προ-B-κύτταρο (pro-pre-B-cell) [112], δεν αναγνωρίζεται μορφολογικά ανάμεσα στα άλλα λεμφοκύτταρα, η ύπαρξη του όμως έχει καταδειχθεί από την έναρξη των γονιδιακών αναδιατάξεων των βαρειών μ- ανοσοσφαιρινικών αλύσεων [129].

Το δεύτερο κύτταρο της σειράς είναι το προ-B-κύτταρο (pre-B-cell) [112,215,218]. Το κύτταρο αυτό δεν αναγνωρίζεται μορφολογικά. Η ταυτότητά του αποκαλύπτεται με την αναζήτηση συγκεκριμένων αναδιατάξεων των γονιδίων των ανοσοσφαιρινών στον πυρήνα [113,118,254] και τη διαπίστωση της παρουσίας

---

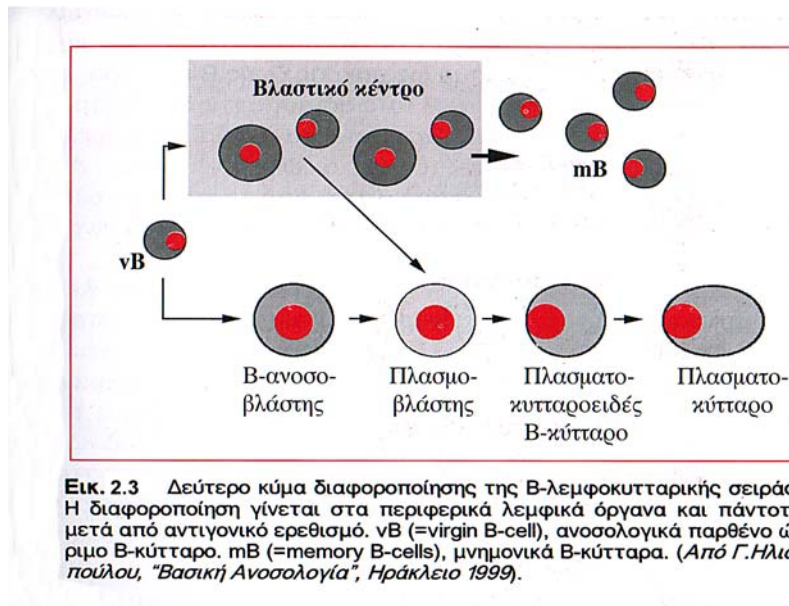
συγκεκριμένων αντιγόνων στο πρωτόπλασμα και την επιφάνεια της κυτταρικής του μεμβράνης [104,129,218,250].

Το τρίτο κύτταρο της σειράς είναι το άωρο Β-κύτταρο (immature B-cell) [258-260] που προέρχεται από τον πολλαπλασιασμό, διαφοροποίηση και ωρίμανση του προ-Β-κυττάρου. Η ταυτότητα του κυττάρου αυτού αποκαλύπτεται από την παρουσία στην μεμβράνη του συγκεκριμένων δεικτών διαφοροποίησης και ιδιαίτερα από την έκφραση μεμβρανικών ανοσοσφαιρινών-υποδοχέων για το αντιγόνο [258].

Το τέταρτο κύτταρο είναι το ενδιάμεσο Β-κύτταρο (intermediate B-cell) που προέρχεται από τον πολλαπλασιασμό, τη διαφοροποίηση και την ωρίμανση του άωρου Β-κυττάρου. Από το ενδιάμεσο αυτό κύτταρο θα προέλθει με πολλαπλασιασμό και περαιτέρω διαφοροποίηση και ωρίμανση το ώριμο Β-κύτταρο (mature B-cell) [264] που αποτελεί και το τελευταίο κύτταρο της σειράς [218]. Πρόκειται για ένα βραχείας ζωής κύτταρο που θα εξέλθει από το μυελό στην κυκλοφορία για να οδηγηθεί στους ιστούς και τα λεμφικά όργανα και να πεθάνει εκεί μέσα σε 3-4 ημέρες εάν δεν δεχθεί στο διάστημα αυτό αντιγονικό ερέθισμα [103]. Εάν δεχθεί αντιγονικό ερέθισμα δεν πεθαίνει αλλά συγκρατείται στους περιφερικούς λεμφικούς ιστούς όπου πολλαπλασιάζεται και διαφοροποιείται.

β. Δεύτερο κύμα διαφοροποίησης. Το δεύτερο κύμα διαφοροποίησης πραγματοποιείται στα λεμφικά όργανα και τους λεμφικούς ιστούς [263]. Το κύμα αρχίζει από το ώριμο βραχείας ζωής ανοσολογικά παρθένο Β-κύτταρο που δέχθηκε τον αντιγονικό ερεθισμό, και ολοκληρώνεται με την παραγωγή μακράς ζωής μνημονικών Β-κυττάρων και βραχείας ζωής πλασματοκυττάρων [115,130]. (Εικόνα 2.3)





Το πρώτο κύτταρο στο δεύτερο αυτό κύμα διαφοροποίησης είναι το διεγερμένο Β-κύτταρο. Ο πολλαπλασιασμός και η περαιτέρω διαφοροποίησή του μπορεί να γίνει είτε μέσα στο λεμφοζίδιο είτε έξω από αυτό [114,255]. Η διαφοροποίηση μέσα στο λεμφοζίδιο οδηγεί στην παραγωγή μικρών και μεγάλων λεμφικών κυττάρων με ή χωρίς εντομή του πυρήνα τους. Τα κύτταρα αυτά αποτελούν μέρος των κυττάρων του βλαστικού κέντρου και ονομάστηκαν κεντροκύτταρα και κεντροβλάστες [119,256]. Από τον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση των θυγατρικών αυτών κυττάρων θα προέλθει ένας σημαντικός αριθμός μνημονικών Β-κυττάρων και πλασμοβλαστών. Και οι δύο αυτοί τύποι κυττάρων εξέρχονται από το λεμφοζίδιο στον εξωλεμφοζιδιακό χώρο. Από εκεί τα μνημονικά Β-κύτταρα διασπείρονται με την κυκλοφορία σε ολοκληρο τον οργανισμό ως μακράς ζωής Β-κύτταρα, ενώ οι πλασμοβλάστες δίνουν γένεση με περαιτέρω πολλαπλασιασμό και διαφοροποίηση σε πλασματοκυτταροειδή Β-κύτταρα από τα οποία θα προέλθουν τα βραχείας ζωής πλασματοκύτταρα (διαρκεία ζωής 3-4 ημέρες) [138]. Ας σημειωθεί ότι τα αντισώματα που παράγονται από τα πλασματοκυτταροειδή Β-κύτταρα και τα βραχείας ζωής



---

πλασματοκύτταρα είναι του τύπου των IgM μορίων (πρωτογενής ανοσολογική απάντηση) [134,212].

Το μνημονικό B-κύτταρο (memory B-cell) [121] είναι ένα μικρό λεμφοκύτταρο εκτός κυτταρικού κύκλου σε φάση G0 για μήνες ή και έτη. Κυκλοφορεί στο αίμα και τους ιστούς. Η μορφολογική του διάκριση από άλλους τύπους λεμφοκυττάρων δεν είναι δυνατή παρά μόνο με την αναζήτηση ορισμένων μεμβρανικών δεικτών διαφοροποίησης. Το κύτταρο φέρει στην επιφάνειά του ανοσοσφαιρίνες-υποδοχείς που είναι περισσότεροι σε αριθμό και περισσότερο ειδικοί για το συγκεκριμένο αντιγόνο απ' ότι ήταν στο μητρικό ανοσολογικά παρθένο B-κύτταρο [206,256]. Οι διαφορές οφείλονται στις υπερμεταλλάξεις στα γονίδια που κωδικοποιούν για την ειδικότητα του αντισώματος [136,148].

Η εξωλεμφοζιδιακή διαφοροποίηση οδηγεί στην παραγωγή βραχείας ζωής πλασματοκυττάρων. Το διεγερμένο με το αντιγόνο ώριμο B-κύτταρο εγκαθίσταται έξω από το λεμφοζίδιο και δίνει γένεση με πολλαπλασιασμό και διαφοροποίηση σε B-ανοσοβλάστες. Πρόκειται για μεγάλα κύτταρα με ευμεγέθη στρογγυλό αραιοχρωματικό πυρήνα και ένα μεγάλο κεντρικό πυρήνιο, και πλούσιο και έντονα βασεόφιλο πρωτόπλασμα που φέρει ενίοτε λίγα μικρά κενοτόπια. Από τον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση του κυττάρου αυτού θα προκύψει ένας αριθμός πλασμοβλαστών και πλασματοκυτταροειδών B-κυττάρων που θα δώσουν γένεση σε ένα σημαντικό αριθμό πλασματοκυττάρων. Το εάν και κατά πόσο η εξωλεμφοζιδιακή αυτή διαφοροποίηση μπορεί να δώσει γένεση και σε μνημονικά B-κύτταρα δεν είναι γνωστό. Τα πλασματοκύτταρα αυτά είναι βραχείας ζωής κύτταρα και παράγουν αντισώματα του τύπου των IgM μορίων [262].

---

Το πλασματοκύτταρο είναι ένα εύκολα αναγνωρίσιμο κύτταρο που φέρει συνήθως ένα στρογγυλό και με τροχοειδή διάταξη της χρωματίνης πυρήνα. Το πρωτόπλασμά του είναι πλούσιο, βασεόφιλο και συχνά με μικρά κενοτόπια. Ζει περίπου 6 ημέρες και μετά πεθαίνει.

γ. Τρίτο κύμα διαφοροποίησης. Το τρίτο κύμα διαφοροποίησης αρχίζει με την αντιγονική διέγερση ενός μνημονικού Β-κυττάρου και ολοκληρώνεται με την παραγωγή ενός μεγάλου αριθμού μνημονικών Β-κυττάρων και μακράς ζωής πλασματοκυττάρων. Το νέο αυτό κύμα ακολουθεί την ίδια οδό διαφοροποίησης που ακολουθεί και το δεύτερο, αλλά με ορισμένες σημαντικές διαφορές. Η πρώτη διαφορά αφορά στην κατά κύριο λόγο λεμφοζιδιακή εν προκειμένω διαφοροποίηση. Έχει από μακρού παρατηρηθεί ότι μετά από ένα έντονο αντιγονικό ερέθισμα, όχι μόνο αυξάνονται σε μέγεθος τα λεμφοζίδια, αλλά εμφανίζονται και τριτογενή τοιαύτα. Η δεύτερη διαφορά αφορά τα μνημονικά Β-κύτταρα που γίνονται τώρα ακόμη περισσότερο ειδικά για το αντιγόνο απ' ότι ήταν τα μητρικά τους. Η τρίτη διαφορά, που ίσως είναι και η πλέον σημαντική, αφορά στα πλασματοκύτταρα που στην πλειοψηφία τους είναι εδώ λεμφοζιδιακής προέλευσης. Λόγω των υπερμεταλλάξεων που γίνονται στα γονίδια των βαρειών και ελαφρών ανοσοσφαιρινικών αλύσεων στα κύτταρα του βλαστικού κέντρου [135,136,148], οι παραγόμενοι πλασμοβλάστες που εξέρχονται στον εξωλεμφοζιδιακό χώρο, δίνουν γένεση με πολλαπλασιασμό και περαιτέρω διαφοροποίηση σε πλασματοκυτταροειδή Β-κύτταρα και μακράς ζωής πλασματοκύτταρα (διάρκεια ζωής 30 ημέρες) που παράγουν ώριμες ανοσοσφαιρίνες IgG ή IgA ή IgE [138,170] με μεγάλη ειδικότητα για το αντιγόνο(δευτερογενής ανοσολογική απάντηση)

[122,202,212]. Τα πλασματοκύτταρα αυτά μεταναστεύουν στο μυελό των οστών για να εξασφαλίσουν εκεί τη μακρά τους επιβίωση στο πλέον κατάλληλο γι' αυτά αιμοποιητικό μικροπεριβάλλον [120,138].

#### 2.4 ΔΕΙΚΤΕΣ Β-ΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΔΙΑΦΟΡΟΠΟΙΗΣΗΣ

Δείκτες διαφοροποίησης ονομάζονται οι γονιδιακοί ανασυνδιασμοί, οι ανοσοσφαιρίνες επιφάνειας, τα ένζυμα, τα μεμβρανικά αντιγονικά μόρια και οι υποδοχείς που εμφανίζονται σε κάποια φάση της διαφοροποίησης των κυττάρων μιας κυτταρικής σειράς και εξαφανίζονται αργότερα ή συνεχίζουν εκφραζόμενα μέχρι το τελευταίο κύτταρο της σειράς, και τα οποία μπορεί να χρησιμοποιηθούν για την αναγνώριση και διάκριση των κυττάρων μεταξύ τους [265] (Εικόνα 2.4).



Εικ. 2.4 Διαδοχική εμφάνιση και απώλεια διαφόρων δεικτών διαφοροποίησης κατά το πρώτο κύμα διαφοροποίησης του Β-κυττάρου. (Από A.V.Hofbrand & J.E.Pettit, "Essential Haematology", Oxford, 1993).

- **Μεμβρανικές ανοσοσφαιρίνες.**

Ανοσοσφαιρίνες-υποδοχείς του αντιγόνου εκφράζονται στο στάδιο του άωρου Β-κυττάρου και εξαφανίζονται στο στάδιο του πλασματοκυττάρου. Ανήκουν σε διάφορες ανοσοσφαιρινικές τάξεις

(IgG, IgA, IgM, IgE, IgD) [116]. Τα μακράς ζωής μνημονικά B-κύτταρα φέρουν στην μεμβράνη τους είτε μόνο IgG, είτε μόνο IgA είτε μόνο IgE ανοσοσφαιρίνες. Τα λεμφοκύτταρα που φέρουν στην μεμβράνη τους μόνο IgM μόρια μπορεί να είναι ανοσολογικά μνήμονα αλλά και ανοσολογικά παρθένα B-κύτταρα [218], αυτά δε που φέρνουν και τους δύο τύπους ανοσοσφαιρινών IgM και IgD είναι σχεδόν ενδιάμεσα B-κύτταρα. Ωστόσο, είναι δυνατόν να συνεκφράζονται στη μεμβράνη του ίδιου κυττάρου δύο ή και περισσότεροι τύποι ανοσοσφαιρινικών μορίων. Ανεξάρτητα πάντως από την τάξη τους, όλα τα ανοσοσφαιρινικά μόρια σε ένα και το αυτό κύτταρο έχουν τον ίδιο πάντοτε τύπο ελαφρών αλύσεων κ ή λ. Κάθε B κύτταρο έχει περίπου 20.000-200.000 μόρια ανοσοσφαιρίνης στην επιφάνειά του [100].

#### • Κυτταρικά ένζυμα

Το πιο σημαντικό βιομόριο που χρησιμοποιείται σήμερα σαν δείκτης της αναγνώρισης των προγονικών αιμοποιητικών προβαθμίδων είναι το ένζυμο τελική δεσοξυριβοζονουκλεοτιδυλο-τρανσφεράση (terminal deoxyribonucleotidyl-transferase, TdT). Το ένζυμο αυτό βρίσκεται στον πυρήνα των αρχέγονων πολυδύναμων προγονικών αιμοποιητικών κυττάρων P-HSC, στον πυρήνα των BL-HSC (προ-προ-B-κύτταρα) και στον πυρήνα των προ-B-κυττάρων [189].

#### • Μεμβρανικά αντιγονικά μόρια

1. Φέρουν αντιγόνα τάξη II του MHC, που είναι σημαντικά για τις αλληλεπιδράσεις με τα T-κύτταρα [127,164].
2. Τα μόρια CD19, CD20 και CD22 είναι οι κύριοι δείκτες που χρησιμοποιούνται για την ταυτοποίηση των B-κυττάρων [188,200]

---

Το CD19 σχηματίζει σύμπλεγμα με τα CR2 (CD21) [147,171,222] και CD81 (TAPA-1) που αποτελεί τον συν-υποδοχέα του Β-κυττάρου [145,147,222] (Εικόνα 2.7). Ανήκει στην υπεροικογένεια των ανοσοσφαιρινών. Είναι μία μεμβρανική γλυκοπρωτεΐνη μοριακού βάρους 95 Kd που εμφανίζεται νωρίς στην διαφοροποίηση, και συγκεκριμένα στο στάδιο του προ-Β-κυττάρου, και διατηρείται μέχρι το στάδιο του λεμφο-πλασματοκυτταροειδούς Β-κυττάρου.

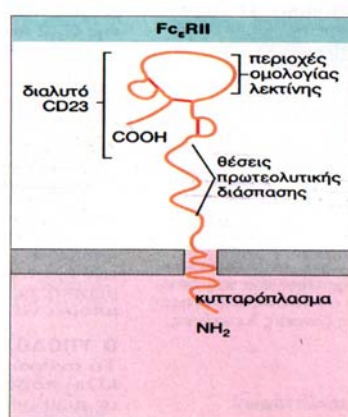
Ο τρόπος που ο συν-υποδοχέας του Β-κυττάρου ενισχύει την σηματοδότηση του αντιγονικού υποδοχέα είναι να φέρει περισσότερες κινάσες τυροσίνης της οικογένειας Src στον υποδοχέα [140,145,154,180,181,222].

Η πρόσδεση του C3d στο CR2 [244] έχει ως αποτέλεσμα την φωσφορυλίωση των τυροσινών στην κυτταροπλασματική περιοχή του CD19 [147,223,236,237,245]. Δεν είναι γνωστό ποιες κινάσες τυροσίνης εμπλέκονται. Αφού φωσφορυλιωθεί το CD19 μπορεί να συνδεθεί με την κινάση τυροσίνης Lyn της οικογένειας Src και με το ένζυμο φωσφατιδυλινοσιτόλη 3-κινάση (PI-3 κινάση) [179,240]. Η ταυτόχρονη σύνδεση του υποδοχέα Β-κυττάρου με τον συν-υποδοχέα επιτρέπει στις συνδεδεμένες με το CD19 τυροσινικές κινάσες να φωσφορυλιώσουν τον Β-κυτταρικό υποδοχέα, αυξάνοντας περαιτέρω την ενεργοποίησή του [180,240]. Επιπλέον, η PI-3 κινάση που είναι προσκολλημένη στον συν-υποδοχέα αυξάνει τη σηματοδότηση [249], ενεργοποιώντας την πρωτεϊνική κινάση C και την οδό της MAP κινάσης. Η οδός της MAP κινάσης οδηγεί στην ενεργοποίηση του παράγοντα μεταγραφής Jun ο οποίος μαζί με τον Fos σχηματίζουν τον AP-1 μεταγραφικό παράγοντα, ο οποίος τελικά επάγει την μεταγραφή ειδικών γονιδίων που οδηγούν στον πολλαπλασιασμό του Β-κυττάρου. Έτσι, όταν ο συν-υποδοχέας τίθεται σε λειτουργία

συγχρόνως με τον αντιγονικό υποδοχέα του Β-κυττάρου, χρειάζεται πολύ μικρότερο ποσό αντιγόνου για να παραχθεί σήμα ενεργοποίησης [154,179,224,237] (Εικόνα 2.7).

Το CD20 αποτελεί κανάλι ιόντων  $Ca^{++}$  [266] και έχει, πιθανόν, ρυθμιστικό ρόλο στην ενεργοποίηση των Β-κυττάρων [267]. Είναι ένα μεμβρανικό πρωτεϊνικό ετεροδιμερές. Αποτελείται από δύο πολυπεπτιδικές αλυσίδες με μοριακό βάρος 37 Kd και 32 Kd αντίστοιχα [268]. Εμφανίζεται στο στάδιο του προ-Β-κυττάρου λίγο μετά την εμφάνιση του CD19 και διατηρείται μέχρι το στάδιο του λεμφο-πλασματοκυτταροειδούς Β-κυττάρου εξαφανιζόμενο στο στάδιο του πλασματοκυττάρου [270].

Το αντιγόνο CD23 αναγνωρίζει τέσσερις διαφορετικούς συνδέτες, την ανοσοσφαιρίνη E, το CD21 και τις  $\beta_2$ -ιντεγκρίνες CD11b και CD11c [199]. Είναι υποδοχέας χαμηλής συγγένειας για το Fc κλάσμα της ανοσοσφαιρίνης IgE ( Fc $\epsilon$ RII ) [155,193,198]. Αρχικά βρέθηκε στην επιφάνεια των Β-κυττάρων και των λεμφοζυδιακών δενδριτικών κυττάρων. Παρουσιάζει τα χαρακτηριστικά ενός μορίου προσκολλημένου σε μεμβράνη, αλλά είναι ασύνηθες στο ότι τοποθετείται ανάποδα με το C-τελικό άκρο να είναι εξωκυττάριο [155,195]. (Εικόνα 2.5)



Εικ. 2.5. Fc υποδοχέας για IgE  
(Από I.Roitt, J.Brostoff, D.Male, Άνοσολογία, 1995)

Αντίθετα από άλλους Fc υποδοχείς, το CD23 δεν είναι μέλος της οικογένειας ανοσοσφαιρινών, αλλά ανήκει σε αρχέγονη υπεροικογένεια ζωϊκών λεκτινών [192,193,196]. Δύο τύποι του ανθρώπινου FcεRII έχουν αναγνωριστεί που διαφέρουν μόνο στην N-τελική κυτταροπλασματική περιοχή, ενώ οι εξωκυττάρια περιοχές είναι ταυτόσημες [193]. Ο FcεRIIa εκφράζεται σε B-κύτταρα (IgD<sup>+</sup>/IgM<sup>+</sup>), ενώ ο FcεRIIb σε T-κύτταρα, B-κύτταρα (IgD<sup>+</sup>/IgM<sup>+</sup>), ενεργοποιημένα μακροφάγα, μονοκύτταρα, ηωσινόφιλα, αιμοπετάλια και λεμφοζιδιακά δενδριτικά κύτταρα και η έκφρασή του χρειάζεται επαγωγή από IL-4 [149,213,214]. Αυτό μπορεί να εξηγήσει τη διαφορά που παρατηρείται στην λειτουργία του υποτύπου FcεRII πάνω στα B-κύτταρα κατά τη διάρκεια της φυσιολογικής δραστηριότητας B-κυττάρων αφ' ενός και την εκτελεστική φάση της ανοσίας, που μεσολαβείται από την IgE αφ' ετέρου. Η έκφραση του CD23 είναι αυξημένη κατά την διάρκεια της ενεργοποίησης των B λεμφοκυττάρων [156,272]. Τα διαλυτά μόρια CD23 που φέρονται και ως “παράγοντες δέσμευσης IgE”, προέρχονται από την αυτοπρωτεόλυση του μεμβρανικού υποδοχέα [271] και μπορούν να θεωρηθούν ως ένας άλλος τύπος κυτταροκίνης η οποία είναι αυτοκρινής αυξητικός παράγοντας για τα B-κύτταρα και απαραίτητος για την ισότυπη μεταστροφή σε IgE [149,273,274].

Αυξημένες συγκεντρώσεις διαλυτών μορίων CD23 βρέθηκαν στον ορό ασθενών με B-ΧΛΛ [157], σύνδρομο Sjogren [158], ατοπία [161], Ρευματοειδή αρθρίτιδα [159,160,162,194] και Συστηματικό Ερυθηματώδη Λύκο [158,162].

Ο ρόλος της IgE και του CD23 στην ανοσοαπάντηση έγινε γνωστός μετά από ένεση σε ποντίκια συμπλέγματος IgE-αντιγόνο. Το αποτέλεσμα ήταν να παραχθεί 100 πλάσια ποσότητα



---

αντιγονοειδικών αντισωμάτων σε σχέση με αυτά που θα είχαν παραχθεί εάν χορηγείτο μόνο του το αντιγόνο. Αντισώματα ειδικά για το CD23 αναστέλλουν το προαναφερθέν αποτέλεσμα, επιβεβαιώνοντας έτσι ότι αυτό έχει σχέση απευθείας με τον υποδοχέα CD23 [197].

Η δέσμευση του ανοσοσυμπλέγματος IgE-αντιγόνο στο CD23 των B-κυττάρων προάγει την ενδοκύττωση του συμπλέγματος και στην συνέχεια την παρουσία των αντιγονικών πεπτιδίων στα κατάλληλα TH<sub>2</sub>-κύτταρα [214].

Επομένως, ένας από τους τρόπους δράσης του IgE/CD23 είναι ότι αυξάνουν την ικανότητα των ανοσολογικά παρθένων B-κυττάρων να παρουσιάζουν το αντιγόνο στα ανοσολογικά παρθένα T-κύτταρα [149,232]. Άλλος προτεινόμενος μηχανισμός δράσης είναι ότι τα λεμφοζιδιακά δενδριτικά κύτταρα δεσμεύουν το σύμπλεγμα IgE-αντιγόνο και παρουσιάζουν αυτό απευθείας στα B-κύτταρα [241].

Επίσης τα λεμφοζιδιακά δενδριτικά κύτταρα μπορούν να ενεργοποιήσουν τα B-κύτταρα μέσω του CD21. Αυτό το κάνουν μέσω του CD23, που εκφράζεται στην επιφάνειά τους, και είναι ικανό να συνδεθεί στο CD21 και να μεταδώσει έτσι ένα συνδιεγερτικό σήμα [166,191].

Το CD72 είναι ένα ετεροδιμερές αποτελούμενο από δύο γλυκοπρωτεϊνικά μόρια με μοριακό βάρος 43KD και 39KD. Βρίσκεται στην επιφάνεια όλων των B-κυττάρων, όχι όμως και στην επιφάνεια του πλασματοκυττάρου [176,177].

Το CD10, γνωστό και ως cCALLA ( common acute lymphoblastic leukemia antigen ) είναι μία μεταλλοπρωτεΐνωση



ψευδαργύρου με μοριακό βάρος 100 Kd [184]. Εμφανίζεται στα προ-B-κύτταρα μετά από την έκφραση του CD19 και εξαφανίζεται στα ώριμα B-κύτταρα. Βρίσκεται επίσης στα κύτταρα των βλαστικών κέντρων, ινοβλάστες και επιθηλιακά κύτταρα [186] στα λευχαιμικά κύτταρα οξείας λεμφικής λευχαιμίας (80%), στα πολυμορφοπύρρηνα και ακόμη στα πλασματοκύτταρα περιπτώσεων πολλαπλού μυελώματος [185].

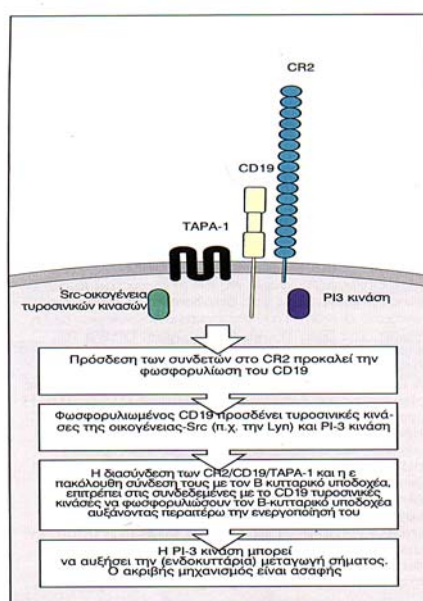
Ένας δείκτης που είχε αρχικά βρεθεί μόνο στα T-κύτταρα, το CD5 (T1 ή Leu-1) [125,126], έχειδειχτεί ότι υπάρχει και σε μερικά B-κύτταρα [172,175], στα οποία ταυτοποιεί μια υποομάδα που έχει προδιάθεση για την παραγωγή αυτοαντισωμάτων. Εκφράζεται στα κύτταρα σχεδόν όλων των περιπτώσεων χρόνιας B-λεμφοκυτταρικής λευχαιμίας [173], στα B-κύτταρα του εμβρύου, σ' ένα ποσοστό 2% των φυσιολογικών B-κυττάρων του ενήλικα [174] και σε περιπτώσεις ρευματοειδούς αρθρίτιδας [173].

- Υποδοχείς στην επιφάνεια των B-κυττάρων είναι μεμβρανικές γλυκοπρωτεΐνες που έχουν την ιδιότητα ν' αντιδρούν και να ενώνονται στερεοχημικά με συγκεκριμένες μοριακές δομές. Τα B-κύτταρα φέρουν :

1. Υποδοχείς συμπληρώματος. Τέτοιοι είναι: Ο CR1 ο οποίος αντιδρά δεσμεύοντας τα κλάσματα C3b και C4b του συμπληρώματος [178,247]. Η παρουσία του ελέγχεται με αντι-CD35 μονοκλωνικό αντίσωμα [183] και επιτελεί τέσσερις λειτουργίες, οψωνοποίηση [233] ανοσοπροσκόλληση, αναστολή του συμπληρώματος και επαγωγή της διέγερσης του B-κυττάρου [182,239]. Η σύνδεση του C3b ή του C4b στους CR1 που βρίσκονται στην επιφάνεια των B-κυττάρων είναι μιτογόνο με την έννοια ότι προκαλεί τη διέγερση του υποκείμενου κυττάρου [230]. Ο εν λόγω

υποδοχέας έχει μοριακό βάρος 250 kD και εκφράζεται στην επιφάνεια των Β κυττάρων, ερυθροκυττάρων [234], μονοκυττάρων [183], ουδετερόφιλων, ηωσινόφιλων και λεμφοζιδιακών δενδριτικών κυττάρων. Το CD35 εμφανίζεται για πρώτη φορά στο στάδιο του άωρου Β-κυττάρου για να εξαφανιστεί στο πλασματοκύτταρο.

Ο υποδοχέας CR2 δεσμεύει το C3d και iC3b κλάσματα του συμπληρώματος, αποτελεί συστατικό του συν-υποδοχέα του Β-κυττάρου (εικόνα 2.7) και συγχρόνως αποτελεί τον υποδοχέα για τον ιό Epstein Barr [226-229,231]. Ελέγχεται με το μονοκλωνικό αντίσωμα αντι-CD21 [220]. Ο CR2 επιτελεί δύο κυρίως λειτουργίες, επαγωγή διέγερσης στα Β-κύτταρα [225] (συνδέτης του CD23) [166] και συμπεριφορά ως κυττάρου αντιγονο-παρουσιαστή [239]. Ο υποδοχέας συγκρατεί στην επιφάνεια του κυττάρου βακτηρίδια, και γενικότερα αντιγόνα, πάνω στα οποία έχει λάβει χώρα η αντίδραση αντιγόνου-αντισώματος και έχουν καθηλωθεί μόρια C3d [235,244]. Με τη δέσμευση C3d-CR2 και τη συγκράτηση έτσι του αντιγόνου το κύτταρο παρουσιάζει το αντιγόνο στα Τ-κύτταρα [182,239]. (Εικόνα 2.7)



**Εικόνα 2.7.** Σύμπλεγμα Β-κυτταρικού συνυποδοχέα (Από Janeway-Travers, Κλινική Ανοσοβιολογία, δεύτερη έκδοση)

Το CD21 εμφανίζεται στο στάδιο του προ-B-κυττάρου μετά την εμφάνιση του CD20, και διατηρείται σ' όλα τα μετέπειτα στάδια διαφοροποίησης εξαφανιζόμενο στο στάδιο του πλασματοκυττάρου. Το CD21 αποτελεί τον συνδέτη του CD23 που εκφράζεται στην επιφάνεια των λεμφοζιδιακών δενδριτικών κυττάρων των λεμφαδένων [191].

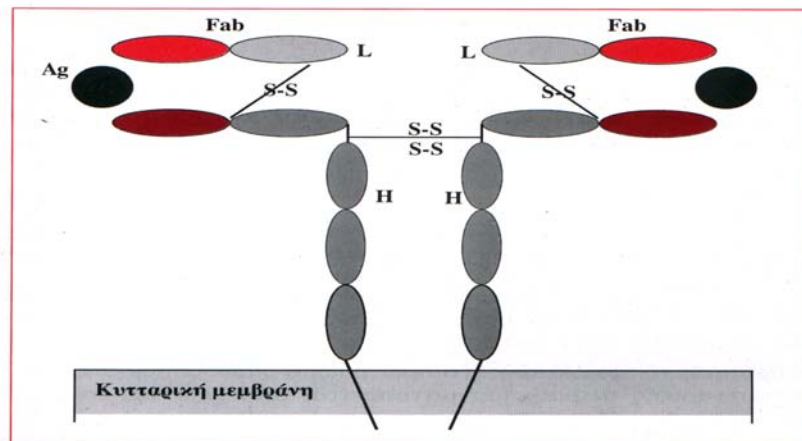
Οι υποδοχείς CR1 και CR2 εκφράζονται επίσης στα λεμφοζιδιακά δενδριτικά κύτταρα [221,248] γεγονός που είναι απαραίτητο για την παραγωγή της αντιγονοειδικής IgG ανοσοσφαιρίνης από τα Β κύτταρα. [242,243].

2. Υποδοχέας Fc για την εξωγενή IgG1 (Fc $\gamma$ RII) [124,167,203]. Είναι μέσης συγγένειας υποδοχέας για το Fc τμήμα αλλοδομημένης ανοσοσφαιρίνης και ανοσοσυμπλεγμάτων. Ανήκει στην υπεροικογένεια των ανοσοσφαιρινών. Ελέγχεται με το μονοκλωνικό αντίσωμα CDw32. Εμφανίζεται στο στάδιο του ενδιάμεσου Β-κυττάρου, διατηρείται σ' όλα τα μετέπειτα στάδια για να εξαφανιστεί στο πλασματοκύτταρο [203,204].

## 2.5 ΥΠΟΔΟΧΕΑΣ Β-ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΟΥ

Ο υποδοχέας του Β-κυττάρου για το αντιγόνο είναι μία μεμβρανική ανοσοσφαιρίνη, ένα συμμετρικό μόριο που μπορεί να ανήκει σε οποιαδήποτε ανοσοσφαιρινική τάξη [132,168]. Πρόκειται για σχετικά μεγάλα μόρια που αποτελούνται από δύο όμοιες μεταξύ τους βαρείες H (heavy) και δύο όμοιες μεταξύ τους ελαφρές L(Light) πολυπεπτιδικές αλυσούσ συγκρατούμενες με δυσουλφιδικούς δεσμούς. Το μόριο κρατείται στην επιφάνεια του κυττάρου χάρη στην παρουσία μιάς μικρής σειράς υδρόφοβων αμινοξέων στο COOH-τελικό άκρο των βαρειών αλυσέων. Έτσι ολόκληρες οι ελαφρές

άλυστοι προέχουν πάνω στην κυτταρική επιφάνεια. Ο πρώτος τομέας κάθε βαρείας αλύσου που βρίσκεται προς το NH<sub>2</sub>-τελικό άκρο, και ο πρώτος τομέας μιάς ελαφράς αλύσου που και αυτός βρίσκεται προς το NH<sub>2</sub>-τελικό άκρο, έχουν μεταβλητή αμινοξική σύνθεση και, με τη συμβολή τους, σχηματίζουν ένα είδος θύλακα που υποδέχεται το αντιγόνο [163]. Αυτό σημαίνει ότι κάθε μεμβρανική ανοσοσφαιρίνη – υποδοχέας έχει δύο θέσεις υποδοχείς του αντιγόνου. Όλοι οι άλλοι τομείς των βαρειών και των ελαφρών αλύσεων έχουν κατά βάση σταθερή αμινοξική σύνθεση. Μεγάλες διαφορές υπάρχουν εδώ μεταξύ μορίων που ανήκουν σε διαφορετική τάξη (IgG, IgA, IgM, IgD, IgE) και διαφορετικό τύπο (κ,λ) ανοσοσφαιρίνης [168,169] (Εικόνα 2.8).



**Εικ. 2.8.** Ανοσοσφαιρίνη-υποδοχέας του Β-κυττάρου τύπου IgM. Ο υποδοχέας έχει δύο θέσεις σύνδεσης με το αντιγόνο (Ag), ανά μία σε κάθε Fab-κλάσμα του μορίου του. H (heavy), βαρεία αλυσός, L (light), ελαφρά αλυσός. S-S, δισουλφιδικός δεσμός. (Από Γ.Ηλιοπούλου, "Βασική Ανοσολογία", Ηράκλειο, 1999).

Η ανοσοσφαιρίνη-υποδοχέας εκφράζεται πάνω στην κυτταρική επιφάνεια συνδεδεμένη με μη ομοιοπολικούς δεσμούς με δύο άλλες πρωτεΐνες τις Igα και Igβ [139,150]. Αυτές οι δύο πρωτεΐνες είναι απαραίτητες για την μεμβρανική έκφραση της ανοσοσφαιρίνης – υποδοχέα [150]. Οι κυτταροπλασματικές ουρές των Igα και Igβ περιέχουν αμινοξικές ακολουθίες οι οποίες μπορούν να

φωσφορυλιωθούν από ενδοκυττάριας κινάσες τυροσίνης. Οι αμινοξικές αυτές ακολουθίες, ..... YXX(L/V)X6-9YXX(L/V)... (όπου Y=Tyrosine, L=Leucine, V=Valine, X=κάθε αμινοξύ) ονομάζονται ITAM (Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif). Κάθε αλυσίδα I $\alpha$  και I $\beta$  έχει 1 ITAM και επομένως ο BcR έχει δύο ITAMs. Εξάλλου, μέσω των ITAMs οι I $\alpha$  και I $\beta$  συνδέουν τα μεμβρανικά τμήματα του υποδοχέα με κινάσες τυροσίνης, οι οποίες υπεισέρχονται στη μεταβίβαση μηνυμάτων (signal transduction), από την επιφάνεια της μεμβράνης προς τον πυρήνα με σκοπό την ενεργοποίηση του Β-λεμφοκυττάρου [139,142].

Η ποικιλομορφία της ανοσοσφαιρίνης-υποδοχέα καθορίζεται από αναδιατάξεις των γονιδίων που κωδικοποιούν για τη σύνθεση των μεταβλητών τομέων των βαρειών και των ελαφρών πολυπεπτιδικών αλύσεων των ανοσοσφαιρινών. Πρόκειται για μια πολύπλοκη διαδικασία που οδηγεί στην παραγωγή μεγάλης ποικιλίας υποδοχέων ικανών να αντιδρούν με όλες τις ξένες για τον οργανισμό στερεοχημικές διαμορφώσεις (αντιγονικοί επίτοποι) που μπορεί να απαντηθούν στη φύση.

## 2.6 ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ Β-ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΩΝ

Τα περισσότερα λεμφοκύτταρα του περιφερικού αίματος βρίσκονται στη φάση G<sub>0</sub> του κυτταρικού κύκλου, δηλαδή σε φάση ηρεμίας. Υπό την επίδραση αντιγόνου, τα Β-λεμφοκύτταρα των οποίων οι ανοσοσφαιρίνες-υποδοχείς είναι ειδικοί για το συγκεκριμένο αντιγόνο, ενεργοποιούνται [128,142,246], πολλαπλασιάζονται και τελικά διαφοροποιούνται σε πλασματοκύτταρα και σε μνημονικά κύτταρα [142,153].

---

Υπάρχουν δύο τρόποι ενεργοποίησης των Β-κυττάρων ανάλογα με τη φύση του αντιγόνου. Η ενεργοποίηση των Β-κυττάρων από θυμοεξαρτώμενα αντιγόνα (TD antigens) απαιτεί συνεργασία των Β-κυττάρων με τα βοηθητικά Τ-κύτταρα (T<sub>H</sub>). Αντίθετα η ενεργοποίηση των Β-κυττάρων από τα θυμο-ανεξάρτητα αντιγόνα (TI antigens) δεν απαιτεί την παρέμβαση των T<sub>H</sub>-κυττάρων.

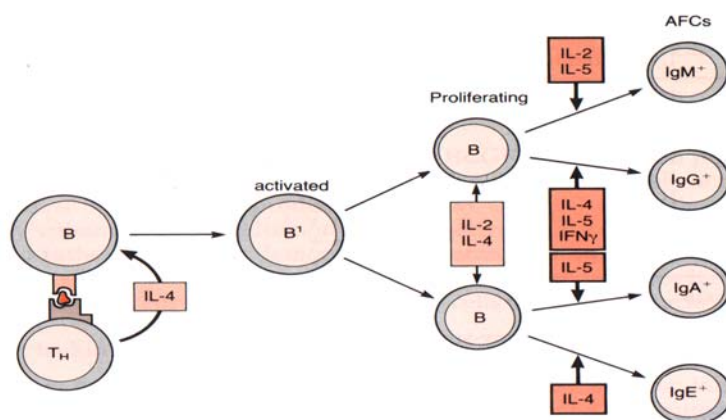
Τα θυμο-ανεξάρτητα αντιγόνα είναι μεγάλα πολυμερή μόρια με επαναλαμβανόμενους αντιγονικούς καθοριστές. Υπάρχουν δύο τύποι θυμο-ανεξάρτητων αντιγόνων:

A) TI-1 Πρόκειται για συστατικά του βακτηριακού κυτταρικού τοιχώματος, όπως είναι ο λιποπολυσακχαρίτης (LPS) στα GRAM(-) βακτήρια. Τα περισσότερα TI-1 αντιγόνα σε υψηλές συγκεντρώσεις είναι πολυκλωνικοί διεγέρτες (ή μιτογόνα) για τα Β-κύτταρα.

B) TI-2 Σε αυτή την κατηγορία αντιγόνων ανήκουν οι δεξτράνες, η πολυμερισμένη φλαγγελίνη των βλεφαρίδων, το πολυσακχαριδικό καψίδιο του πνευμονιοκόκκου και άλλες. Δεν είναι πολυκλωνικοί ενεργοποιητές των Β-κυττάρων και για να ενεργοποιήσουν τα Β-κύτταρα απαιτούν την συμμετοχή των κυτταροκινών IL-1, IL-6, TNF.

Η επιφανειακή ανοσοσφαιρίνη-υποδοχέας (BcR) όταν αλληλεπιδράσει με το αντιγόνο, οδηγεί στην ενεργοποίηση των Β-κυττάρων: α) Με την πυροδότηση της εκκίνησης ενδοκυττάρων αντιδράσεων μεταγωγής σήματος [142] και β) Με την πινοκύττωση του αντιγόνου και την μεταφορά αυτού σε ενδοκυττάριας θέσεις όπου αποδομείται και επιστρέφει στην επιφάνεια του Β-κυττάρου με τη μορφή πεπτιδίων συνδεδεμένα με MHC τάξης II μόρια [164,210]. Το σύμπλεγμα πεπτίδιο-MHC αναγνωρίζεται, στη συνέχεια από τον υποδοχέα TCR των T<sub>H</sub> λεμφοκυττάρων [127,151,153,165,211] προκαλώντας τα να συνθέσουν μόρια [181,214], που με τη σειρά τους

διεγείρουν τα Β-κύτταρα να πολλαπλασιαστούν και οι απόγονοι τους να διαφοροποιηθούν σε πλασματοκύτταρα [153]. (Εικόνα 2.9).



Εικόνα 2.9. Ο ρόλος των κυτοκινών στον έλεγχο της πρωτογενούς απάντησης των Β-λεμφοκυττάρων στο αντιγόνο. (Από G.G.B.Klaus, *B Lymphocytes*, 1990)

### ΠΟΛΥΚΛΩΝΙΚΗ ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ Β-ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΩΝ ΜΙΤΟΓΟΝΑ

Τα μιτογόνα είναι ουσίες που προκαλούν κυτταρική διαίρεση (μίτωση). Τα περισσότερα ανήκουν στις λεκτίνες, που προέρχονται από φυτικούς σπόρους και οι οποίες έχουν ειδικότητα για ορισμένους πολυσακχαρίτες στην κυτταρική επιφάνεια Β ή Τ-κυττάρων, επί των οποίων προσκολλώνται προκαλώντας τα να ενεργοποιηθούν, να εισέλθουν δηλαδή σε φάση κυτταρικής διαίρεσης.

Μερικές από αυτές τις ουσίες είναι :

A) ΡΗΑ (φυτοαιμοσυγκολλητίνη) που προέρχεται από *Phaseolus vulgaris* και ενώνεται με N-acetyl-D-galactosamine των Τ-λεμφοκυττάρων.

B) Κονκαναβαλίνη (Con A) που προέρχεται από *Canavalia ensiformis* και ενώνεται με α-D-mannose, α-D-glucose επί των Τ-λεμφοκυττάρων.

Γ) Μιτογόνο φυτολάκας (PWM) που προέρχεται από τη *Phytolaca americana* και το οποίο διεγείρει Β και Τ-κύτταρα ενώ δεν υπάρχει



ειδικός υδατάνθρακας στην επιφάνεια αυτών των κυττάρων προς σύνδεση.

Τα μιτογόνα των Β-λεμφοκυττάρων ενεργοποιούν κλώνους κυττάρων ανεξαρτήτως αντιγονικής ειδικότητας, αποτελούν δηλαδή πολυκλωνικούς ενεργοποιητές των Β-κυττάρων.

Στους πολυκλωνικούς ενεργοποιητές των Β-κυττάρων ανήκουν, εκτός από τις λεκτίνες, και ουσίες που ενώνονται με τους υποδοχείς των επιφανειακών ανοσοσφαιρινών, όπως τα αντι-Ig αντισώματα, Staph. Aureus Cowan, LPS (λιποπολυσακχαρίτης τοιχώματος GRAM (-) βακτηριδίων), ο ιός Epstein Barr.

Τα γεγονότα που ακολουθούν την διέγερση των ήρεμων Β-κυττάρων, από ειδικό αντιγόνο ή πολυκλωνικούς διεγέρτες, διακρίνονται σε τρία στάδια: ενεργοποίηση, πολλαπλασιασμός και διαφοροποίηση σε πλασματοκύτταρα.

1) Η ενεργοποίηση αναφέρεται στα γεγονότα που συμβαίνουν τις πρώτες 24 ώρες που ακολουθούν την διέγερση των μικρών ήρεμων Β-κυττάρων πριν αυτά εισέλθουν στη φάση  $G_1$  του κυτταρικού κύκλου. Οι πρώιμες αλλαγές που παρατηρούνται σ' αυτή τη φάση είναι η αναπαραγωγή ενδοκυττάρων δευτερογενών αγγελιοφόρων μεταγωγής σήματος και η εμφάνιση του mRNA. Τα κύτταρα βαθμιαία μεγαλώνουν, ενώ παρατηρούν και αλλαγές στους επιφανειακούς δείκτες, όπως αύξηση των επιπέδων του CD23 και DR αντιγόνων. Η αύξηση των επιπέδων των MHC τάξης II μορίων είναι ιδιαίτερης σημασίας για την αλληλεπίδραση των Β-κυττάρων με τα  $T_H$  κύτταρα. Μια ποικιλία παραγόντων, χαμηλές συγκεντρώσεις των anti-Ig, IL-4,  $Ca^{++}$  και PWM, επάγουν τα κύτταρα να εισέλθουν σ' αυτή τη φάση ενεργοποίησης. Από αυτά η IL-4 και οι χαμηλές συγκεντρώσεις των anti-Ig επάγουν την ενεργοποίηση αλλά όχι τον πολλαπλασιασμό των



---

Β-κυττάρων. Αντίθετα το LPS [293] επάγει τα Β-κύτταρα να πολλαπλασιαστούν και να διαφοροποιηθούν σε πλασματοκύτταρα.

2) Ο πολλαπλασιασμός αναφέρεται στην είσοδο των ενεργοποιημένων Β-κυττάρων (βλάστες) στη φάση G<sub>1</sub> του κυτταρικού κύκλου με σκοπό την παραγωγή κυττάρων που παράγουν αντισώματα κατά του πρωτογενούς αντιγόνου.

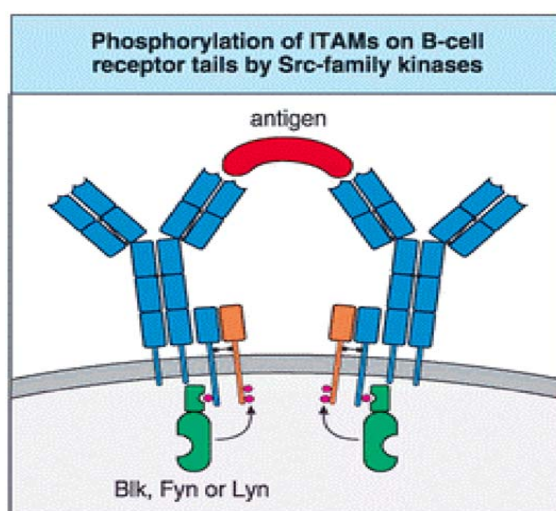
3) Διαφοροποίηση σε αντισωματοπαραγωγά κύτταρα (AFC). Οι περισσότερες πληροφορίες γι' αυτή τη φάση προέρχονται από μελέτες ενεργοποίησης των Β-κυττάρων με LPS. Όταν τα Β-κύτταρα καλλιεργηθούν παρουσία LPS εκκρίνουν IgM μετά από 30 ώρες. Πάνω από 80% των κλώνων των Β-κυττάρων που διεγέρθησαν από LPS μεταστρέφουν το IgM σε IgG. Τα AFC είναι μεγάλοι ανοσοβλάστες που βαθμιαία μετατρέπονται σε τυπικά πλασματοκύτταρα. Τα πλασματοκύτταρα είναι υψηλής διαφοροποίησης τελικά κύτταρα. Το 5-40% της πρωτεϊνοσύνθεσής τους αναφέρεται στην παραγωγή αντισωμάτων. Στα πλασματοκύτταρα υπάρχει τραχύ ενδοπλασματικό δίκτυο, ελεύθερα πολυριβοσώματα και συσκευή Golgi που είναι υπεύθυνη με την γλυκοζυλίωση των ανοσοσφαιρινών. Στο κοινό μικροσκόπιο, το κυτταρόπλασμα των πλασματοκυττάρων είναι βασεόφιλο λόγω της μεγάλης ποσότητας RNA που χρησιμοποιείται για την σύνθεση αντισωμάτων στο τραχύ ενδοπλασματικό δίκτυο. Σε επίπεδο ηλεκτρονικού μικροσκοπίου το τραχύ ενδοπλασματικό δίκτυο συχνά εμφανίζεται υπό τη μορφή παράλληλων σειρών, οι οποίες στα ώριμα πλασματοκύτταρα γεμίζουν με ανοσοσφαιρίνες. Τα πλασματοκύτταρα σπάνια εμφανίζονται στη κυκλοφορία (<0,1% των λεμφοκυττάρων) ενώ φυσιολογικά περιορίζονται στα δευτερογενή λεμφικά όργανα και τους ιστούς. Τα αντισώματα που παράγονται από

ένα πλασματοκύτταρο εμφανίζουν μία μόνο ειδικότητα και ανήκουν στην ίδια τάξη ανοσοσφαιρινών.

### Μεταβίβαση μηνύματος διέγερσης του Β-ΚΥΤΤΑΡΟΥ ΜΕΣΩ ΤΟΥ BcR

Με την αντίδραση BcR-αντιγόνου, το Β-κύτταρο διεγείρεται σε πολλαπλασιασμό. Η μεταβίβαση του μηνύματος για πολλαπλασιασμό από την επιφάνεια της μεμβράνης προς τον πυρήνα [299] γίνεται με την παρέμβαση μιας σειράς παραγόντων που όλοι τους μαζί αποτελούν το σύστημα μεταφοράς του μηνύματος (signal transduction) [142,288,291].

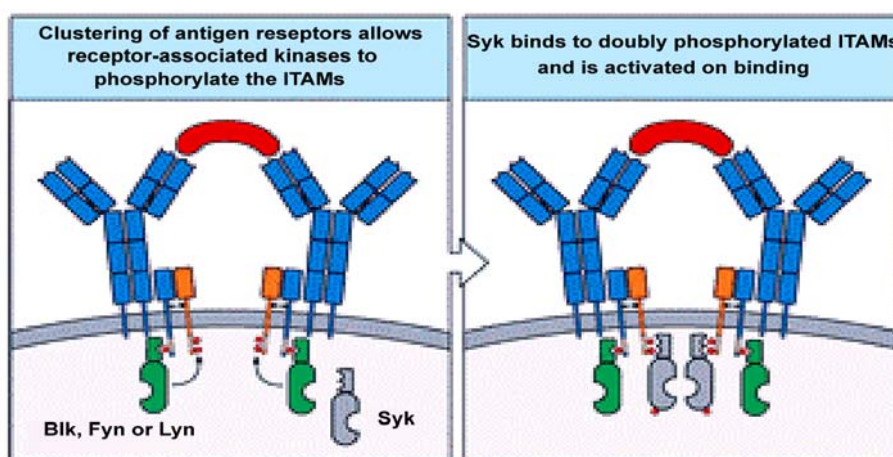
Το πρώτο ενδοκυττάριο γεγονός μετά την ένωση του αντιγόνου με τον BcR στην επιφάνεια του Β-κυττάρου, είναι η ενεργοποίηση των τυροσινικών κινάσων της οικογένειας των Src πρωτεϊνών [142]. Στα Β-κύτταρα τρεις πρωτεϊνικές κινάσες τυροσίνης της οικογένειας των Src πρωτεϊνών, οι Fyn, Blk και Lyn φωσφορυλιώνουν δύο αμινοξέα τυροσίνης στις ITAMs των Iga και Igb. (Εικ. 2.10)



Εικόνα 2.10 (Από Charles A. Janeway, Immunology, 5<sup>th</sup> Edition, 2001).

Η δραστηριότητα των κινάσων που συνδέονται με τον υποδοχέα ρυθμίζεται θετικά από μία άλλη πρωτεΐνη κυτταρικής επιφάνειας, τη CD45

[145,181,209], η οποία είναι φωσφατάση ειδική για τυροσίνη που απομακρύνει ένα ειδικό κατασταλτικό φωσφορικό άλας από αυτές τις κινάσες [145]. Η CD45 ονομάζεται επίσης κοινό λευκοκυτταρικό αντιγόνο. Η φωσφορυλίωση των ITAMs επιτρέπει τη σύνδεση μιας άλλης κινάσης τυροσίνης που ονομάζεται Syk, με τη φωσφοτυροσίνη. Η φωσφοτυροσίνη διαθέτει μια θέση σύνδεσης για πρωτεΐνες που περιέχουν SH<sub>2</sub> δομές (Src ομολογία-2). Η Syk διαθέτει δύο τέτοιες SH<sub>2</sub> δομές κάθε μία από τις οποίες ενώνεται με μία φωσφοτυροσίνη. Η ένωση αυτή οδηγεί στην ενεργοποίηση της Syk (Εικόνα 2.11).

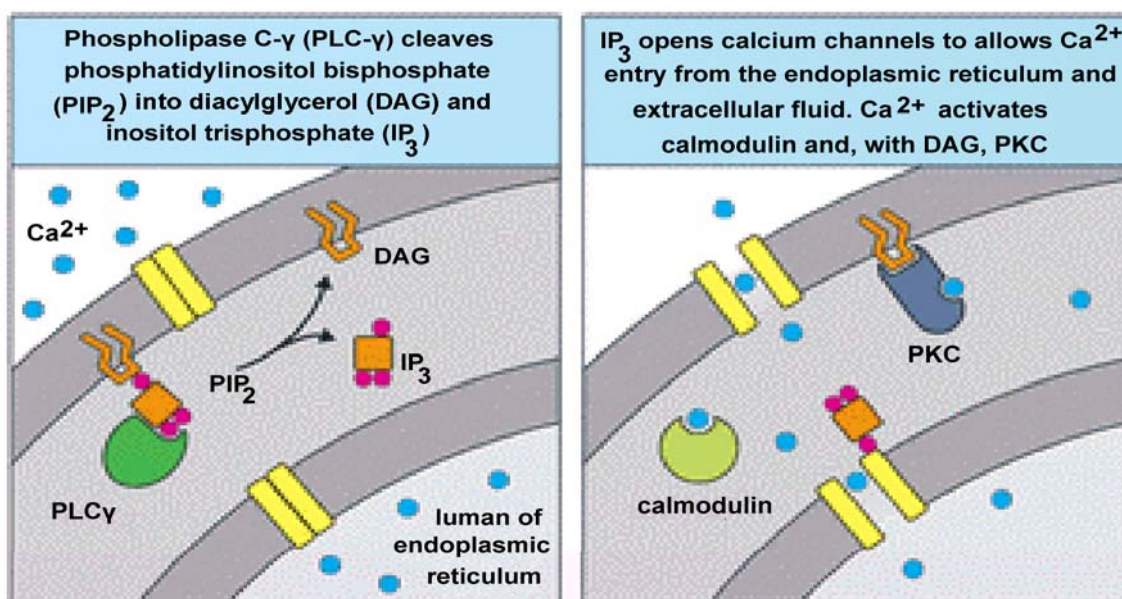


Εικόνα 2.11(Από Charles A.Janeway, Immunology, 5<sup>th</sup> Edition, 2001).

Οι ενεργοποιημένες κινάσες τυροσίνης Syk [197] ξεκινούν στη συνέχεια την ενεργοποίηση δύο οδών μεταφοράς του μηνύματος για διέγερση και πολλαπλασιασμό του Β-κυττάρου, την οδό της φωσφολιπάσης C-γ και την οδό της MAP-κινάσης [277,278,288,290].

Η ενεργοποιημένη φωσφολιπάση C-γ (PLC-γ) διασπά το μεμβρανικό φωσφολιπίδιο 4,5-διφωσφορική φωσφατιδυλινοσιτόλη

(PIP<sub>2</sub>) σε τριφωσφορική ινοσιτόλη (IP<sub>3</sub>) [146] και διακυλογλυκερόλη (DAG). Ο PI<sub>3</sub> αυξάνει στο πρωτόπλασμα τη συγκέντρωση Ca<sup>++</sup> [146]. Η αύξηση αυτή επιτυγχάνεται αφ' ενός μεν με απ'ευθείας δράση του IP<sub>3</sub> στις αποθήκες ασβεστίου του κυττάρου από τις οποίες απελευθερώνονται Ca<sup>++</sup> στο κυτταρόπλασμα, και αφ'ετέρου με τη μεταροπή του IP<sub>3</sub> σε τετραφωσφορικό ινοσίτη (IP<sub>4</sub>) και τη δράση του τελευταίου στην αντλία ασβεστίου της κυτταρικής μεμβράνης [146]. Η DAG ενεργοποιεί παρουσία Ca<sup>++</sup> την πρωτεϊνική κινάση-C (PKC) σερίνη/θρεονίνη (Εικόνα 2.12), η οποία φωσφορυλιώνει ενδοκυττάρια πρωτεΐνες [139,152] που ενεργοποιούν παράγοντες μεταγραφής όπως είναι ο NFκΒ [287,289].



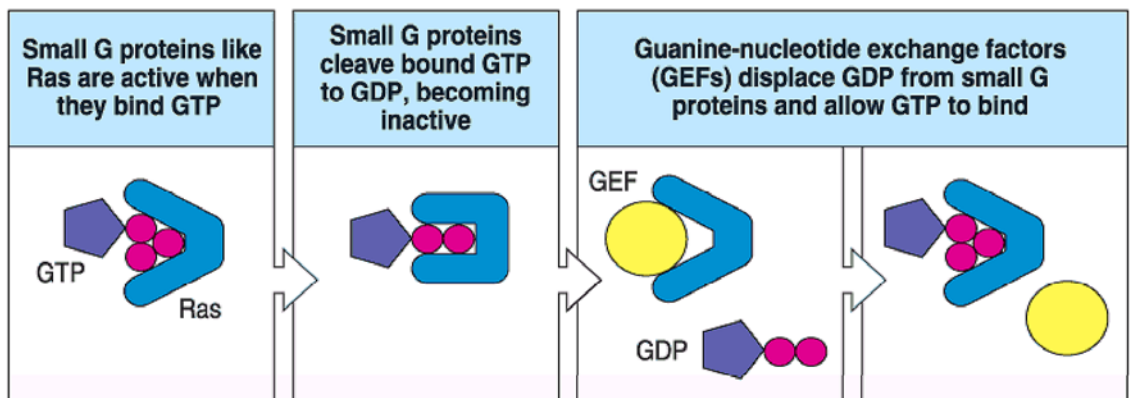
Εικόνα 2.12(Από Charles A.Janeway, Immunology, 5<sup>th</sup> Edition,

Ο τελευταίος επάγει την μεταγραφή ειδικών γονιδίων που οδηγούν στον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση του Β-κυττάρου. Παράλληλα η ενδοκυττάρια αύξηση της συγκέντρωσης Ca<sup>++</sup> ενεργοποιεί την καλσινευρίνη, μια φωσφατάση που φωσφορυλιώνει

τον παράγοντα μεταγραφής NF-AT (Nuclear Factor of Activated T cells). Ο NF-AT βρίσκεται σε όλα τα αιμοποιητικά κύτταρα.

Η οδός της MAP-κινάσης (Mitogen Activated Protein- kinase) [277, 278] ξεκινά με την ενεργοποίηση της Ras πρωτεΐνης [291]. Πρόκειται για μία G-πρωτεΐνη, η οποία υπάρχει σε δύο μορφές, την ανενεργό μορφή όταν είναι ενωμένη με GDP και την ενεργό μορφή όταν είναι ενωμένη με GTP. Η ενεργοποίηση της Ras προϋποθέτει τη δράση ενός GEF (Guanine nucleotide Exchange Factor) ο οποίος μετατρέπει το GDP σε GTP [296]. Ο GEF που ενεργοποιεί τη Ras ονομάζεται SOS (Εικόνα 2.13).

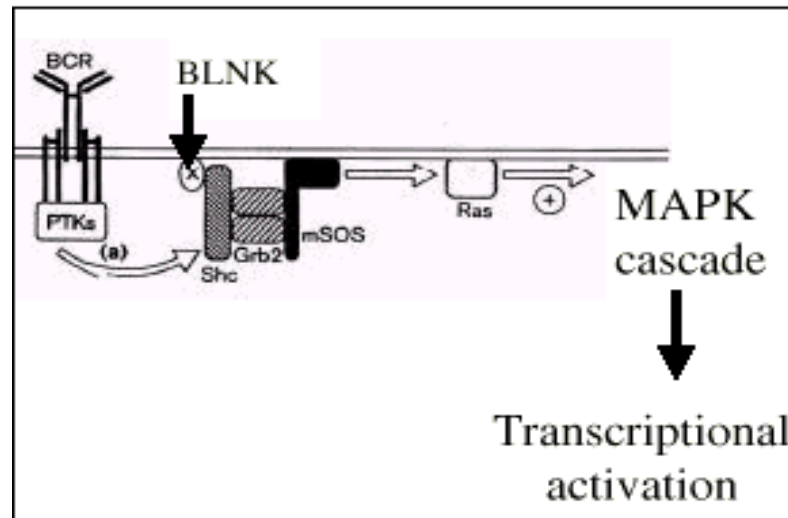
**Εικόνα 2.13 (Από Charles A. Janeway, Immunology, 5<sup>th</sup> Edition, 2001).**



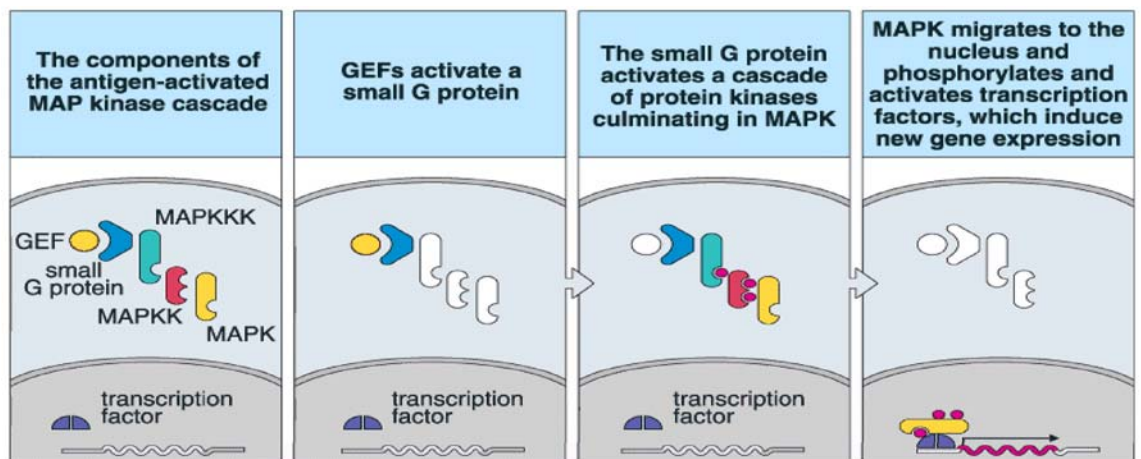
Η συμπλησίαση του SOS στον BcR γίνεται μέσω μιάς άλλης πρωτεΐνης της Shc, η οποία φωσφορυλιώνεται από τις πρωτεϊνικές κινάσες που έχουν φωσφορυλιώσει τις I $\alpha$  και I $\beta$ . Η φωσφορυλιωμένη Shc ενώνεται με την Grb-2 και με τον SOS οπότε σχηματίζεται ένα σύμπλοκο που προωθεί την απελευθέρωση του GDP από την Ras και την ένωση της τελευταίας με το GTP. Κατ' αυτό τον τρόπο η Ras ενεργοποιείται. (Εικόνα 2.14)



Εικόνα 2.14 (Από Charles A. Janeway, Immunology, 5<sup>th</sup> Edition, 2001).

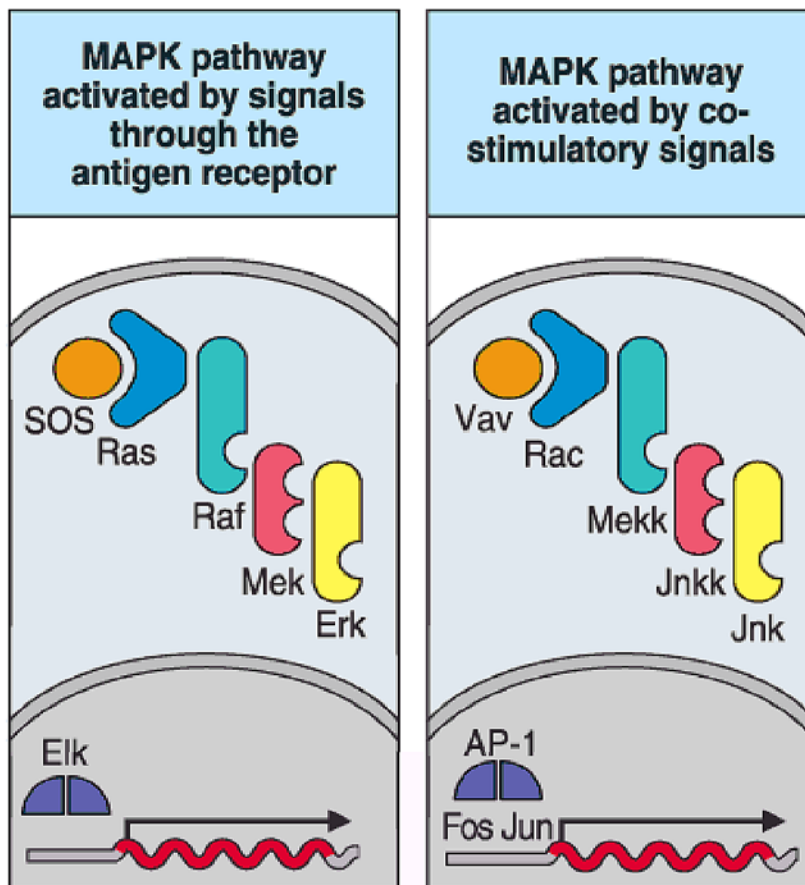


Η ενεργοποιημένη Ras ενώνεται με τον Raf (MAPKKK) τον οποίο και φωσφορυλιώνει [281-283,297]. Ο ενεργοποιημένος Raf (serine/threonine kinase) φωσφορυλιώνει και ενεργοποιεί την MAPKK. Η τελευταία κινάση της οδού είναι η MAP κινάση (MAPK) [284,286] η οποία απαιτεί φωσφορυλίωση σε δύο αμινοξέα, τη σερίνη και τη θρεονίνη (Εικόνα 2.15) [285,300].

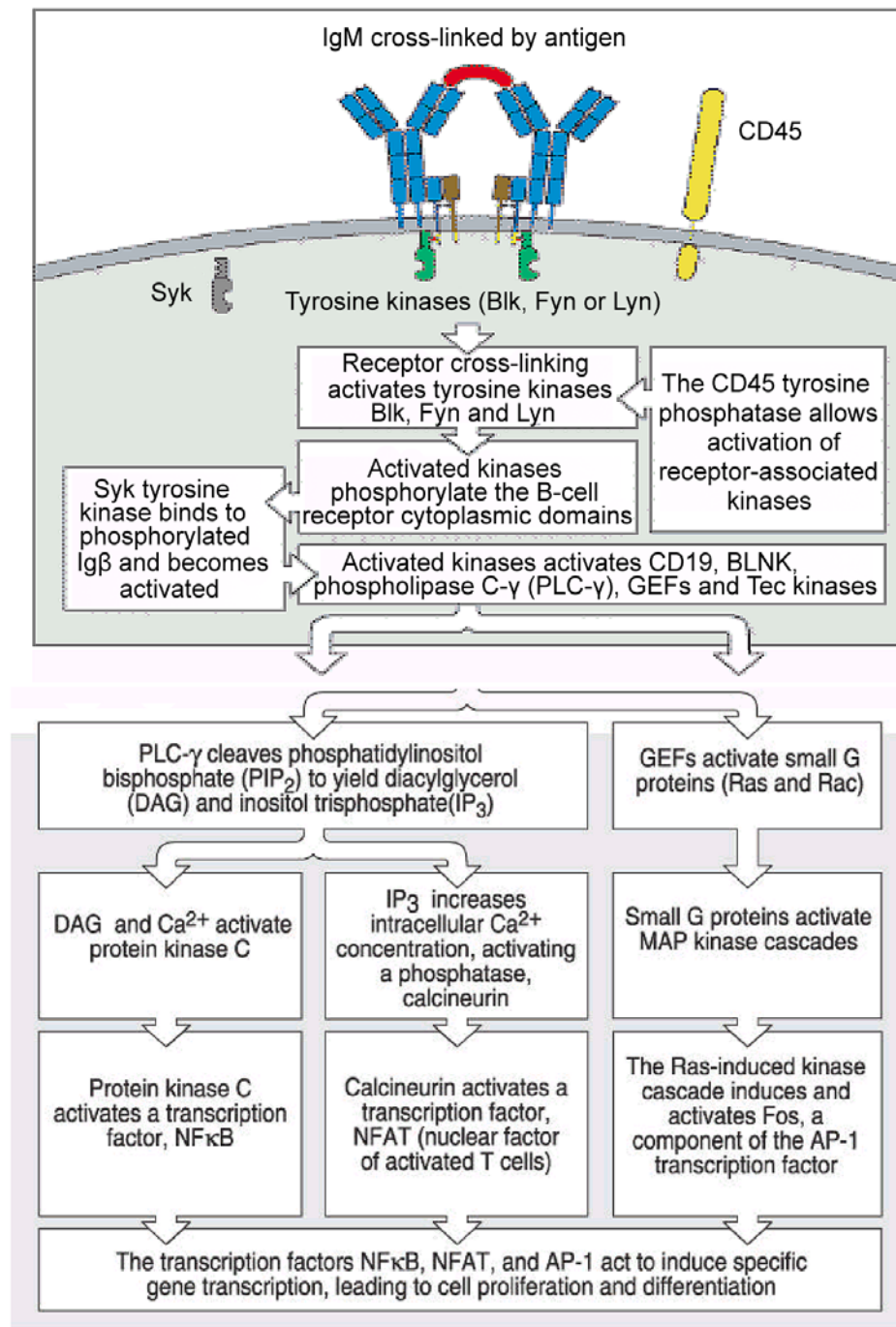


Στα λεμφοκύτταρα ενεργοποιούνται δύο MAPK, η Erk1 και η Erk2 [278,280]. Όταν ενεργοποιηθούν οι Erks φωσφορυλιώνουν και

ενεργοποιούν τον παράγοντα μεταγραφής Elk ο οποίος επιδρά στο γονίδιο μεταγραφής δύο άλλων παραγόντων μεταγραφής, του Fos και του Jun [279]. Ο Jun είναι ένας παράγοντας μεταγραφής η σύνθεση του οποίου ελέγχεται από την οδό της MAP κινάσης όταν αυτή ενεργοποιείται από τη φωσφορυλίωση του CD19 που αποτελεί μέρος του συνυποδοχέα του Β λεμφοκυττάρου. Ο Jun σχηματίζει με τον Fos ετεροδιμερές [283]. Τα ετεροδιμερή Jun και Fos σχηματίζουν τον AP-1 παράγοντα μεταγραφής [280]. Οι παράγοντες μεταγραφής AP-1, NFAT και NFκB [289] τελικά επάγουν την μεταγραφή ειδικών γονιδίων που οδηγούν στον πολλαπλασιασμό [257,298] και τη διαφοροποίηση του Β κυττάρου [117,187,246,292,299]. (Εικόνα 2.16)



Εικόνα 2.16 (Από Charles A. Janeway, Immunology, 5<sup>th</sup> Edition, 2001).

**Summary of the intracellular signaling pathways initiated by the BCR and its coreceptor**


Εικόνα 2.17 (Από Charles A. Janeway, Immunology, 5<sup>th</sup> Edition, 2001).



## *Ειδικό Μέρος*

---



*Ασθενείς, Υλικά  
και  
Μέθοδοι*

## ***1. ΑΣΘΕΝΕΙΣ***

Στην παρούσα μελέτη περιελήφθησαν 107 ασθενείς που έπασχαν από NI-CINA, 13 άνδρες, ηλικίας από 15 έως 73 ετών ( διάμεση ηλικία 53 ) και 94 γυναίκες, ηλικίας από 15 έως 74 ετών ( διάμεση ηλικία 53 ).

Όλοι οι ασθενείς πληρούσαν τα κριτήρια διάγνωσης της NI-CINA που εφαρμόζονται στην κλινική μας και έχουν προηγουμένως αναφερθεί.

Οι ασθενείς ταξινομήθηκαν σε δύο ομάδες με βάση τον αριθμό των κυκλοφορούντων ουδετερόφιλων. Στην ομάδα Α ανήκαν 60 ασθενείς με αριθμό ουδετερόφιλων πολυμορφοπύρηνων από 1800 έως 2499/μl αίματος (ήπια ουδετεροπενία). Στην ομάδα Β ανήκαν 36 ασθενείς με αριθμό ουδετερόφιλων πολυμορφοπύρηνων κάτω από 1800/μl αίματος (pronounced neutropenia).

Ασθενείς με πρόσφατη βακτηριακή ή ιογενή λοίμωξη (εντός του τελευταίου διμήνου) δεν περιελήφθησαν στην παρούσα μελέτη. Εξ' άλλου, σε όλους τους ασθενείς που μελετήθηκαν, τα επίπεδα στον ορό της C-αντιδρώσας πρωτεΐνης (CRP) ήταν εντός των φυσιολογικών ορίων.

Ως μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν 46 υγιείς εθελοντές, 10 άνδρες και 36 γυναίκες, ηλικίας από 20 έως 65 ετών (διάμεση ηλικία 43), από το προσωπικό του Νοσοκομείου και από τους συγγενείς των ασθενών. Δεν υπήρξαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ ασθενών και φυσιολογικών μαρτύρων στην κατανομή ηλικίας και φύλου, όπως αποδείχθηκε με την εφαρμογή του στατιστικού κριτηρίου  $X^2$ .

## **2. ΑΡΙΘΜΗΣΗ ΤΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΤΟΥ ΑΙΜΑΤΟΣ**

Η αρίθμηση των λευκών αιμοσφαιρίων του αίματος έγινε σε αιματολογικό αναλυτή τύπου STKS (Coulter Electronics U.K.). Φλεβικό αίμα λαμβάνονταν σε σωληνάρια με αντιπηκτικό EDTA-K<sub>3</sub>. Όλα τα δείγματα αναλύθηκαν μέσα σε μία ή δύο ώρες από την συλλογή του αίματος. Εξήχθηκε ο λευκοκυτταρικός τύπος και τα πολυμορφοπύρρηνα και λεμφοκύτταρα εκφράστηκαν τελικά σε απόλυτες τιμές (κύτταρα / μl αίματος).

## **3. ΑΝΟΣΟΦΑΙΝΟΤΥΠΟΣ Β-ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΩΝ**

Ο έλεγχος της παρουσίας των αντιγόνων CD19, CD20 και CD23 των Β-λεμφοκυττάρων των πασχόντων έγινε με ανοσοφθορισμό, σε κυτταρόμετρο ροής (Flow cytometer) τύπου Epics-Profile II (Coulter Electronics U.K.) από τα λεμφομονοπύρρηνα του αίματος (peripheral blood mononuclear cells, PBMCs)

Φλεβικό αίμα λαμβάνονταν σε σωληνάριο με αντιπηκτικό EDTA-K<sub>3</sub>, όπως αναφέρθηκε παραπάνω. Μετά την αρίθμηση των εμμόρφων συστατικών του αίματος, 100 μl από το αίμα φέρονταν σε σωληνάρια των 5ml και αναμιγνύονταν με 10-20μl ειδικού μονοκλωνικού αντισώματος (Mab) σημασμένου με φλουορεσκεΐνη (Fluorescein, FITC) ή φυκοερυθρίνη (Fycoerythrin, PE), έναντι των αντιγόνων CD19, CD20 και CD23 (Coulter). Μία ισοτυπική IgG ποντικού σημασμένη με FITC ή PE χρησιμοποιήθηκε σαν αρνητικός μάρτυρας για κάθε χρήση μονοκλωνικού αντισώματος. Τα δείγματα με το μονοκλωνικό αντίσωμα αφήνονταν για επώαση στους 4<sup>0</sup>C για 20 min και στη συνέχεια πλένονταν με PBS (Phosphate-buffered Saline) (Kallestad <sup>TM</sup>) εμπλουτισμένο με 10% FCS (Fetal Calf Serum) (GibcoBRL) για τη

απομάκρυνση του μη συνδεδεμένου μονοκλωνικού αντισώματος. Ακολουθούσε λύση των ερυθρών αιμοσφαιρίων και μονιμοποίηση των εναπομεινάντων λευκών αιμοσφαιρίων με Immunoprep Reagent System (Coulter Electronics U.K.). Στη συνέχεια τα κύτταρα ελέγχονταν για το ποσοστό των θετικών ως προς το μονοκλωνικό αντίσωμα φθορισμό σε κυτταρομετρητή ροής στο πρόγραμμα εξόδου λεμφοκυττάρων (gate of lymphocytes). Από τις εκατοστιαίες αναλογίες των θετικών κυττάρων που δίνονταν από το κυτταρόμετρο ροής και τον απόλυτο αριθμό των λεμφοκυττάρων που βρίσκονταν στη γενική αίματος, υπολογίστηκε ο απόλυτος αριθμός θετικών κυττάρων ανά μl αίματος.

#### **4. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ Β-ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΩΝ**

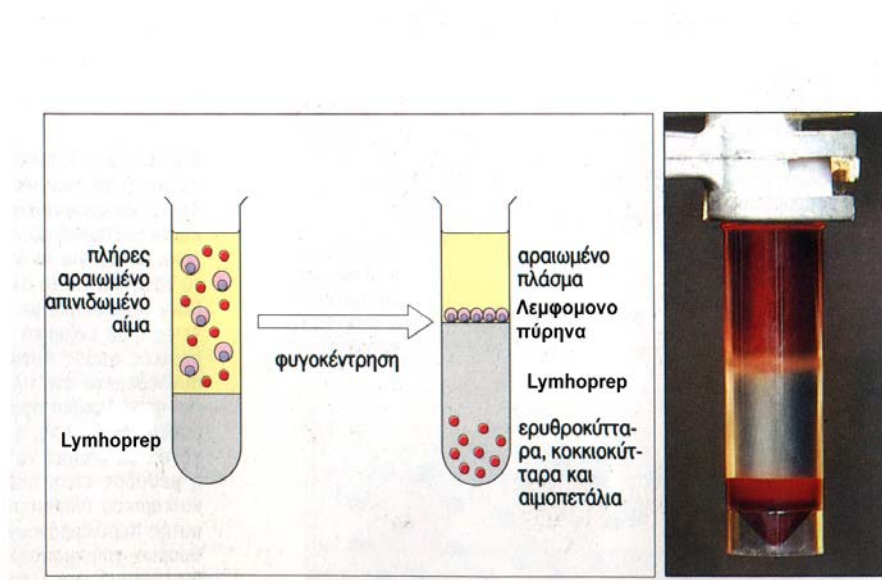
20 ml περιφερικού αίματος ασθενών και μαρτύρων φέρονταν σε σωληνάριο των 50 ml που περιέχει 1ml ηπαρίνης.

Το αίμα αραιώνονταν σε ίσο όγκο Mini Macs buffer που είναι ένα διάλυμα αποτελούμενο από 40ml NaHCO<sub>3</sub>, 50ml BSA, 100ml ACD και 810ml PBS. Η προσθήκη του ACD στο διάλυμα αποτελεί σημαντική παράμετρο για την απομάκρυνση των ιόντων Ca<sup>++</sup> τα οποία ενεργοποιούν την διαδικασία συγκόλλησης των αιμοπεταλίων. Τέτοιες συγκολλήσεις μειώνουν την ποιότητα διαχωρισμού των κυττάρων. Το NaHCO<sub>3</sub> (GibcoBRL) χρησιμεύει για να σταθεροποιεί το pH του διαλύματος στα 7,2 - 7,4. Το PBS με Ph 7,2 κρατιόταν σε θερμοκρασία 15°C–30°C, και ήταν ελεύθερο ιόντων μαγνησίου και ασβεστίου καθόσον τα ιόντα αυτά συμμετέχουν σε μηχανισμούς συσσωμάτωσης και προσκόλλησης των κυττάρων μεταξύ τους, διαδικασία που μειώνει την ποιότητα διαχωρισμού των κυττάρων. Η BSA είναι συστατικό που πρέπει να

διαλυθεί τελευταίο και αν είναι δυνατόν χωρίς ανακίνηση για να αποφύγουμε τη δημιουργία αφρού. Η θερμοκρασία του διαλύματος είναι 4° C, κατά την διάρκεια της χρησιμοποίησής του.

Ακολούθως γινόταν επιστίβαση του αραιωμένου δείγματος σε Lymphoprep (Nycomed 1,077+/-0.001 gr/ml), έτσι ώστε να μην αναμειχθούν τα δύο υγρά και να σχηματιστούν δύο στοιβάδες Lymphoprep-αίμα. Ακολουθούσε φυγοκέντρηση στις 1800 στροφές για 30 λεπτά.

Το Lymphoprep έχει υψηλότερη πυκνότητα από αυτή των λεμφοκυττάρων αλλά χαμηλότερη από αυτή των ερυθροκυττάρων και των κοκκιοκυττάρων. Έτσι, μετά τη φυγοκέντρηση τα ερυθροκύτταρα και τα κοκκιοκύτταρα περνούν προς τα κάτω διαμέσου του Lymphoprep για να σχηματίσουν ίζημα στον πυθμένα του σωληναρίου, ενώ τα λεμφομονοπύρηνα τοποθετούνται μεταξύ της στοιβάδας του Lymphoprep και της στοιβάδας του αραιωμένου πλάσματος (Εικόνα 3.1).



Εικόνα 3.1. Διαχωρισμός λεμφομονοπύρηνων με Lymphoprep  
(Ανοσολογία Ivan Roite-Jonathan Brostoff-David Male, 1995)

Τα λεμφομονοπύρρηνα λαμβάνονταν με αποστειρωμένη πιπέτα, και πλένονταν 3 φορές με Mini Macs buffer ως εξής:

1<sup>ο</sup> πλύσιμο στις 1600 στροφές για 10 λεπτά

2<sup>ο</sup> πλύσιμο στις 1400 στροφές για 15 λεπτά

3<sup>ο</sup> πλύσιμο στις 1400 στροφές για 15 λεπτά

Το πλύσιμο στις χαμηλές στροφές στοχεύει στην απομάκρυνση των αιμοπεταλίων από το εναιώρημα των κυττάρων, τα οποία μειώνουν την ποιότητα του διαχωρισμού.

Μετά το 3<sup>ο</sup> πλύσιμο γίνεται μέτρηση του ολικού αριθμού των κυττάρων που απομονώσαμε, ενώ ταυτόχρονα ελέγχεται η βιωσιμότητά τους με κυανού του τρυπανίου.

Προκειμένου να ληφθούν τα B-λεμφοκύτταρα από το σύνολο των λεμφομονοπύρρηνων κυττάρων, ακολουθήσαμε τη διαδικασία της θετικής επιλογής.  $10^7$  κύτταρα εναιωρούνταν σε 80 μl Mini Macs buffer και 20 μl διαλύματος CD19 MACS Microbeads (Myltenyi Biotec). Ακολουθούσε επώαση στους 4<sup>ο</sup> C για 15 min, και στη συνέχεια προσθέτονταν δεκαπλάσιος όγκος διαλύματος Mini Macs Buffer, φυγοκεντρούνταν για 10 min στις 1400 στροφές και απορρίπταμε τόσο υπερκείμενο ώστε ο τελικός όγκος του εναιωρήματος των κυττάρων να είναι περίπου 500 μl.

Μετά την μαγνητική σήμανση, το εναιώρημα των κυττάρων περνούσε διαμέσου μιας στήλης διαχωρισμού MS (MACS-Myltenyi Biotec) η οποία ήταν τοποθετημένη σε ένα ισχυρό μαγνητικό πεδίο (Mini Macs Magnet). Αυτό είχε αποτέλεσμα τα σημασμένα με τα CD19 ανοσομαγνητικά σφαιρίδια B-λεμφοκύτταρα να

συγκρατούνται από τη στήλη ενώ τα υπόλοιπα κύτταρα να περνούν διαμέσου αυτής και να απορρίπτονται.

Η στήλη MS έχει την ικανότητα να διαχωρίζει  $10^7$  θετικά σημασμένα κύτταρα από το σύνολο των  $2 \cdot 10^8$  ολικών λεμφομονοπύρηνων κυττάρων. Προηγείται πλύσιμο της στήλης με Mini Macs Buffer προκειμένου να δημιουργηθεί ισοτονικό περιβάλλον στη στήλη.

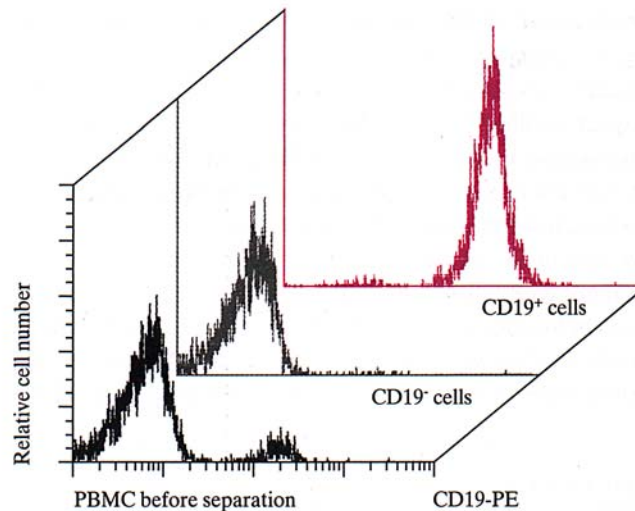
Στην συνέχεια η στήλη απομακρύνονταν από το μαγνητικό πεδίο και αφού περάσουν 1000  $\mu$ l Mini MACS Buffer διαμέσου αυτής συλλέγονταν το εναιώρημα των Β-λεμφοκυττάρων (έκλουση) (Εικόνα 3.2).



Εικόνα 3.2. Μαγνητικός διαχωρισμός κυττάρων χρησιμοποιώντας την MACS τεχνολογία. (Miltenyi Biotec, 2000)



Η ανοσοφαινοτυπική ανάλυση των κυττάρων που απομονώσαμε γινόταν με κυτταρομετρία ροής χρησιμοποιώντας μονοκλωνικά αντισώματα CD19-PE ή CD19-FITC (Εικόνα 3.3).



Εικόνα 3.3. Διαχωρισμός των PBMC χρησιμοποιώντας CD19 MicroBeads και στήλη διαχωρισμού τύπου MS.

### 5. ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ Β-ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΩΝ

Τα Β-λεμφοκύτταρα που βρίσκονται στα PBMCs καλλιεργούνται παρουσία PWM (Pokeweed mitogen) (GibcoBRL) και LPS (λιποπολυσακχαρίτης) (SIGMA) τα οποία αποτελούν μη ειδικά μιτογόνα των Β-λεμφοκυττάρων.

Σε τρία διαφορετικά βοθρία μιας καλλιεργητικής πλάκας τοποθετούνταν  $10^6$  / CD19<sup>+</sup> κύτταρα σε 800μl θρεπτικού υλικού (RPMI 1640 + 10% FCS) και τα οποία επωάζονταν παρουσία PWM στο 1<sup>ο</sup>βοθρίο, LPS στο 2<sup>ο</sup>βοθρίο, και θρεπτικό υλικό χωρίς μιτογόνο στο 3<sup>ο</sup>βοθρίο. Σε όλα τα βοθρία ο τελικός όγκος συμπληρώνονταν 1000μl με θρεπτικό υλικό.

Η καλλιεργητική πλάκα τοποθετείτο σε κλίβανο (5% CO<sub>2</sub>, 100% υγρασία, 37° C) για 72 ώρες. Ακολούθως συλλέγονταν τα

υπερκείμενα τα οποία και αποθηκεύονταν στους  $-70^{\circ}\text{C}$  μέχρι την στιγμή της μέτρησης του sCD23

Πίνακας 2. Καλλιέργεια B-λεμφοκυττάρων

1 <sup>ο</sup> βοθρίο	10 <sup>6</sup> κύτταρα σε 100 μl PWM 50 μgr σε 100 μl RPMI 1640 – 10% FCS ad 1000 μl
2 <sup>ο</sup> βοθρίο	10 <sup>6</sup> κύτταρα σε 100 μl LPS 50 μgr σε 100 μl RPMI 1640 – 10% FCS ad 1000 μl
3ο βοθρίο	10 <sup>6</sup> κύτταρα σε 100 μl RPMI 1640 – 10% FCS ad 1000 μl

#### **6. ΜΕΤΡΗΣΗ ΤΟΥ sCD23 ΣΕ ΥΠΕΡΚΕΙΜΕΝΑ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ B-ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΩΝ.**

Με τη μέθοδο sandwich ELISA και τη χρήση του αντίστοιχου Kit (Bio Source, Europe, S.A.) του εμπορίου, μετρήθηκαν οι συγκεντρώσεις του soluble CD23 στα υπερκείμενα καλλιέργειας B-λεμφοκυττάρων που απομονώθηκαν από 10 ασθενείς με CINA και 5 φυσιολογικούς μάρτυρες. Σύμφωνα με τον κατασκευαστή η ευαισθησία της μεθόδου είναι 0,15U/ml.

Συνοπτικά, 100 μl από κάθε δείγμα, standard και control προστίθεντο στις θέσεις μιας μικροπλάκας στις οποίες έχει προσκολληθεί μονοκλωνικό αντίσωμα που αναγνωρίζει το sCD23.

Στη συνέχεια προστίθεντο 50μl μονοκλωνικού αντισώματος αντι-sCD23, σημασμένου με υπεροξειδάση (συνδέτης). Μετά από δύο ώρες επώαση σε θερμοκρασία δωματίου, το sCD23 που περιέχεται στα δείγματα, controls και standards ενώνεται με το μονοκλωνικό αντίσωμα που έχει προσκολληθεί στη πλάκα και με αυτό του συνδέτη. Στην συνέχεια πλένονταν η μικροπλάκα 3 φορές

ώστε να απομακρυνθεί ο ελεύθερος συνδέτης, ενώ η ένωση του συνδέτη με το sCD23 των δειγμάτων καθίσταται ορατή με την προσθήκη 200 μl υποστρώματος που περιέχει τετραμεθυλ-βενζιδίνη (TMB). Πρόκειται για ένα άγχρωμο υπόστρωμα στο οποίο δρα το ενζυμικό τμήμα του συνδέτη ώστε να παραχθεί ένα τελικό προϊόν κυανού χρώματος μετά από επώαση 30 min σε θερμοκρασία δωματίου. Η αντίδραση σταματά αφού προστεθούν 100 μl stopping solution σε κάθε θέση της μικροπλάκας.

Η συγκέντρωση του sCD23 των δειγμάτων είναι ευθέως ανάλογη της παραγωγής χρώματος ή οπτική απορρόφηση του οποίου ελέγχεται στα 450 nm. Η συγκέντρωση του sCD23 υπολογίστηκε από την καμπύλη αναφοράς η οποία χαράχθηκε από γνωστές συγκεντρώσεις και απορροφήσεις των standards.

### **7. ΜΕΤΡΗΣΗ ΤΟΥ sCD23 ΣΤΟΝ ΟΡΟ**

Οροί από φλεβικό αίμα ασθενών και φυσιολογικών μαρτύρων συλλέχθηκαν με στείρες συνθήκες και αποθηκεύθηκαν στους  $-70^{\circ}\text{C}$  μέχρι τη στιγμή του πειράματος. Για την μέτρηση του sCD23 στον ορό χρησιμοποιήθηκε η ανοσοενζυμική μέθοδος (enzyme immunoassay-EIA) διπλού αντισώματος (sandwich) και το αντίστοιχο kit του εμπορίου (Bendazyme TM-soluble CD23).

Συνοπτικά, 100μl από κάθε δείγμα, control και calibrator τοποθετήθηκαν στις θέσεις μιας μικροπλάκας στις οποίες έχει προσκολληθεί μονοκλωνικό αντίσωμα που αναγνωρίζει το ανθρώπινο sCD23. Ακολουθεί επώαση δύο ωρών στους  $37^{\circ}\text{C}$  και στη συνέχεια αφού πλυθεί η μικρο-πλάκα προστίθεντο σε κάθε θέση 100μl αντισώματος προβάτου που αναγνωρίζει το ανθρώπινο sCD23.

Ακολουθεί δεύτερη επώαση για δύο ώρες στους 37° C, πλένεται η πλάκα και στη συνέχεια σε κάθε θέση προστίθεντο 100μl αντι-προβάτειου αντισώματος, αντι-sCD23, σημασμένου με υπεροξειδάση (συνδέτης). Μετά από μία επώαση δύο ωρών στους 37° C και αφού πλυθεί η πλάκα ώστε να απομακρυνθεί ο ελεύθερος συνδέτης, προστίθεντο σε κάθε θέση της μικροπλάκας 100μl υποστρώματος τετρα-μεθυλ-βενζιδίνη (TMP). Η πλάκα επωάζονταν για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου ώστε να αντιδράσει το υπόστρωμα με το ενζυμικό τμήμα του συνδέτη και να σχηματιστεί ένα έγχρωμο τελικό προϊόν, η ένταση του χρώματος του οποίου είναι ευθέως ανάλογη της συγκέντρωσης του sCD23 στα δείγματα και μπορεί να μετρηθεί φωτομετρικά στα 450 nm. Η ποσότητα του sCD23 στα δείγματα υπολογίστηκε με βάση μία καμπύλη αναφοράς που χαράχθηκε με βάση τις γνωστές συγκεντρώσεις του sCD23.

#### **8. ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ**

Τα αριθμητικά δεδομένα της μελέτης αναλύθηκαν στο στατιστικό πρόγραμμα του υπολογιστή (Microsoft Excel 2000 statistical PC program. Ο έλεγχος της ομοιογένειας των πληθυσμών που μελετήθηκαν εξετάστηκε με την δοκιμασία  $X^2$ . Η μη παραμετρική δοκιμασία Spearman χρησιμοποιήθηκε για την συσχέτιση των δεδομένων των κυτταροκαλλιιεργειών ενώ η δοκιμασία t ανά ζεύγη για την ανάλυση των δεδομένων των κυτταροκαλλιιεργειών.

Μια πιθανότητα ίση ή μικρότερη του 5% θεωρήθηκε ως στατιστικά σημαντική διαφορά για πιθανότητα λάθους.



*Αποτελέσματα*

### ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Οι βασικές αιματολογικές παράμετροι των μελετηθέντων αρρώστων αναγράφονται στον πίνακα 3. Στο σύνολο των ασθενών, ο αριθμός των κυκλοφορούντων λεμφοκυττάρων κυμαίνονταν από 700 έως 3212 ανά μl αίματος και αντιπροσωπεύονταν με τη διάμεση τιμή των 1759 και τη μέση τιμή των  $1764 \pm 558$  (SD) κυττάρων /μl αίματος. Αυτές οι τιμές ήταν σημαντικά χαμηλότερες από τις αντίστοιχες των φυσιολογικών μαρτύρων, που κυμαίνονταν από 1000 έως 3645 ανά μl αίματος και αντιπροσωπεύονταν με τη διάμεση τιμή των 2145 και τη μέση τοιαύτη των  $2211 \pm 549$  / μl αίματος ( $P < 0.0001$ ). Οι τιμές των λεμφοκυττάρων των ασθενών συσχετίστηκαν θετικά με τη σοβαρότητα της ουδετεροπενίας ( $r = 0.4026$ ,  $P < 0.0001$ ).

**Πίνακας 3. Κλινικά και εργαστηριακά δεδομένα στους πάσχοντες**

	Ομάδα Α	Ομάδα Β	Σύνολο ασθενών	Φυσιολογικοί μάρτυρες
Αριθμός ασθενών	61	46	107	46
Ανδρες / Γυναίκες	8/53	5/41	13/94	10/36
Ηλικία (διάμεση, εύρος) (έτη)	15-74 (53)	15-75 (53)	15-75 (53)	20-65 (43)
Αιμοσφαιρίνη.(gr/dl) <sup>&amp;</sup>	$13.03 \pm 1.14$	$13.01 \pm 1.10$	$13.02 \pm 1.12$	$14.09 \pm 1.45$
WBCs (/μl)	$4370 \pm 705$	$3520 \pm 563$	$4004 \pm 771$	$6919 \pm 1374$
Ουδετερόφιλα (/μl)	$2091 \pm 200$	$1491 \pm 303$	$1833 \pm 389$	$4224 \pm 1122$
Λεμφοκύτταρα (/μl)	$1870 \pm 604$	$1623 \pm 460$	$1764 \pm 558$	$2211 \pm 549$
Μονοκύτταρα (/μl)	$291 \pm 110$	$291 \pm 95$	$291 \pm 103$	$466 \pm 182$
Αιμοπετάλια ( $\times 10^3$ /μl)	$213 \pm 48$	$212 \pm 57$	$213 \pm 52$	$278 \pm 104$
Σπληνομεγαλία	None	None	None	None
Anti-PMN αντισώματα <sup>#</sup>	Αρνητικά	Αρνητικά	Αρνητικά	Αρνητικά

<sup>&</sup> Τιμές εκφρασμένες ως μέσες τιμές  $\pm$  1SD.

<sup>#</sup> Αναζητήθησαν με τη μέθοδο της λευκοσυγκόλλησης και του ανοσοφθορισμού.  
**ΠΑΡΑΤΗΡΗΣΗ** : Ο αριθμός των ουδετερόφιλων κοκκιοκυττάρων των ασθενών της ομάδας Α κυμαίνονταν από 1800 έως 2500 / μl αίματος, ενώ της ομάδας Β ήταν χαμηλότερος από 1800 / μl αίματος.

Οι εκατοστιαίες αναλογίες των Β-λεμφοκυττάρων του περιφερικού αίματος, όπως αυτές καθορίζονται από την έκφραση των δεικτών επιφανείας CD19, CD20 και CD23 φαίνονται στον πίνακα 4.

Πίνακας 4. Αναλογία Β-κυτταρικών υποπληθυσμών στο αίμα στους πάσχοντες από CINA &

	Ομάδα Α	Ομάδα Β	Σύνολο ασθενών	Φυσιολογικοί μάρτυρες
CD19 <sup>+</sup>	11.2 ± 3.6 (n=61) *P=0.0080 **P=0.5508	11.7 ± 5.4 (n=46) *P=0.0133	11.4 ± 4.4 (n=107) *P=0.0061	9.5 ± 2.9 (n=46)
CD20 <sup>+</sup>	11.0 ± 3.4 (n=26) *P=0.0105 **P=0.9304	10.9 ± 5.2 (n=24) *P=0.0487	10.9 ± 4.3 (n=50) *P=0.0195	8.5 ± 3.0 (n=21)
CD23 <sup>+</sup>	3.5 ± 1.7 (n=17) *P=0.0391 **P=0.8752	3.6 ± 2.0 (n=16) *P=0.0404	3.6 ± 1.8 (n=33) *P=0.0187	2.4 ± 1.5 (n=20)

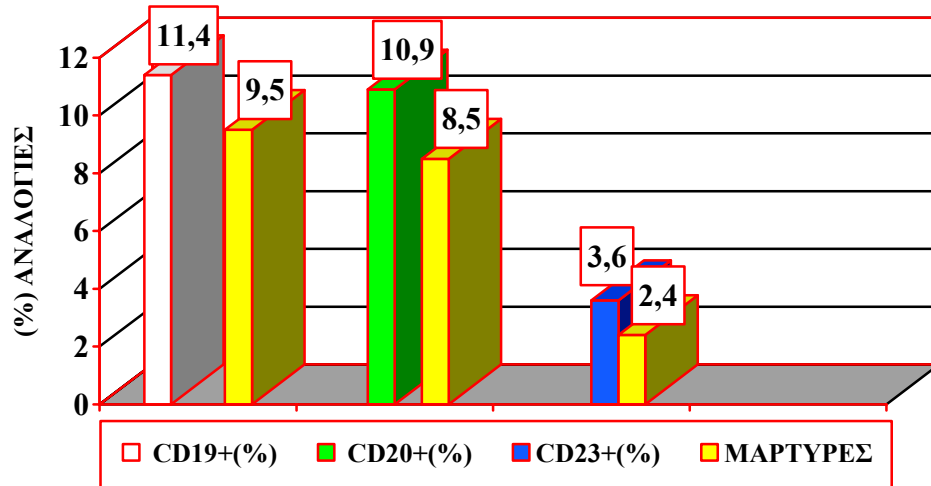
& Τιμές εκφρασμένες ως μέσες τιμές εκατοστιαίας αναλογίας κυττάρων ± 1SD.  
(\* ) Σύγκριση μεταξύ ασθενών της ομάδας με τους φυσιολογικούς, (\*\* ) σύγκριση μεταξύ ασθενών της ομάδας Α και ασθενών της ομάδας Β. Στατιστικά σημαντική διαφορά για  $P \leq 0.05$   
*ΠΑΡΑΤΗΡΗΣΗ:* Ο αριθμός των ουδετερόφιλων κοκκιοκυττάρων των ασθενών της ομάδας Α κυμαίνονταν από 1800 έως 2500 / μl αίματος, ενώ της ομάδας Β ήταν χαμηλότερος από 1800 / μl αίματος.

Στο σύνολο των ασθενών, η αναλογία των CD19<sup>+</sup> κυττάρων ανέρχονταν σε 11.4% ± 4.4%, και ήταν σημαντικά υψηλότερη από αυτή των 9.5% ± 2.9% των φυσιολογικών μαρτύρων ( $P < 0.0061$ ). Η αναλογία των CD19<sup>+</sup> κυττάρων συσχετίστηκε αντιστρόφως με τη σοβαρότητα της ουδετεροπενίας ( $r=-0.1865$ ,  $P=0.0210$ ) (εικόνα 4.1). Παρόμοιες αλλαγές παρατηρήθηκαν στις εκατοστιαίες αναλογίες

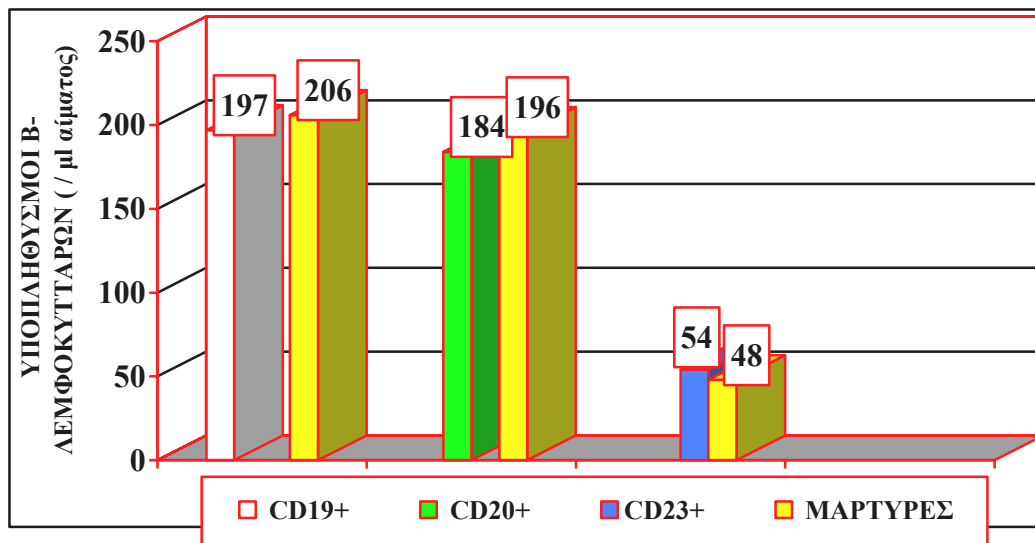


των CD20 και CD23 μορίων, οι οποίες ανέρχονταν σε  $10.9\% \pm 4.3\%$  και  $3.6\% \pm 1.8\%$ ,

**Εικόνα 4.2** ΑΝΑΛΟΓΙΕΣ ΥΠΟΠΛΗΘΥΣΜΩΝ Β-ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΩΝ ΣΤΟ ΠΕΡΙΦΕΡΙΚΟ ΑΙΜΑ ΑΣΘΕΝΩΝ ΜΕ ΣΙΝΑ ΚΑΙ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΜΑΡΤΥΡΩΝ



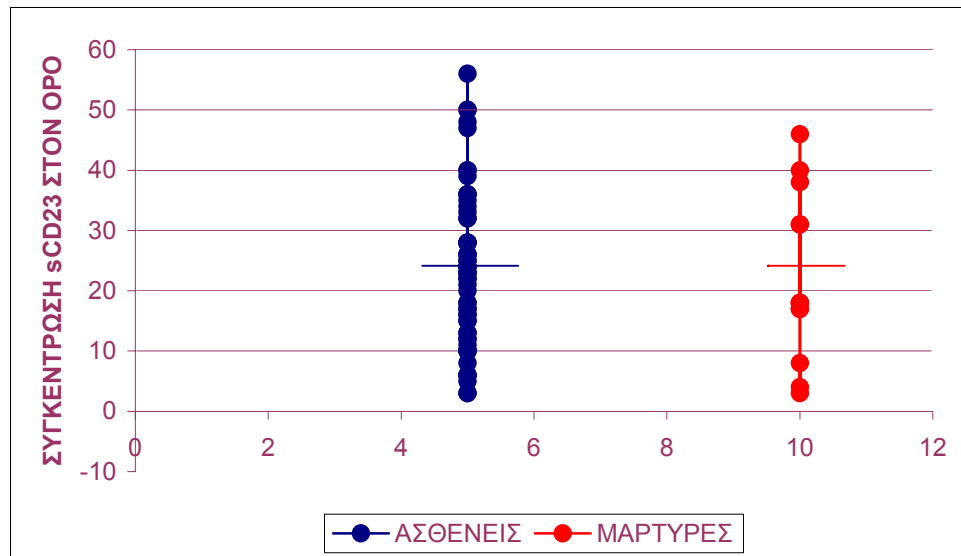
αντίστοιχα. Αυτά τα ποσοστά ήταν σημαντικά υψηλότερα από αυτά των  $8.5\% \pm 3.0\%$  ( $P = 0.0195$ ) και  $2.4\% \pm 1.5\%$  ( $P = 0.0187$ ) που βρέθηκαν στους φυσιολογικούς μάρτυρες (εικόνα 4.2). Οι τιμές των αναλογιών αυτών συσχετίστηκαν αντιστρόφως ανάλογα με το βαθμό της ουδετεροπενίας ( $r = -0.2426$ ,  $P = 0.0358$  και  $r = -0.3434$ ,  $P = 0.0121$ , αντίστοιχα) (εικόνα 4.3 και 4.4) Εντούτοις, σημαντικές διαφορές δεν βρέθηκαν μεταξύ ασθενών και φυσιολογικών μαρτύρων στον απόλυτο αριθμό των  $CD19^+$ ,  $CD20^+$  και  $CD23^+$  κυττάρων, υποθέτοντας ότι η προαναφερόμενες αυξημένες αναλογίες των Β-λεμφοκυττάρων μπορεί να μην είναι αληθινές αλλά ένα δευτεροπαθές φαινόμενο οφειλόμενο στην εκλεκτική ελάττωση των άλλων τύπων των λεμφοκυττάρων από την κυκλοφορία (εικόνα 4.5). Η αναλογία των  $CD19^+$  και  $CD20^+$  κυττάρων συσχετίστηκε αντιστρόφως ανάλογα με τον απόλυτο αριθμό των ολικών λεμφοκυττάρων του περιφερικού αίματος ( $r = -0.1654$ ,  $P = 0.0217$  και  $r = -0.3675$ ,  $P = 0.0016$ , αντίστοιχα).



Εικόνα 4.5 ΥΠΟΠΛΗΘΥΣΜΟΙ Β-ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΩΝ ΣΤΟ ΠΕΡΙΦΕΡΙΚΟ ΑΙΜΑ ΑΣΘΕΝΩΝ ΜΕ CINA ΚΑΙ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΜΑΡΤΥΡΩΝ

Καθώς το CD23 είναι ένας δείκτης ενεργοποίησης των Β-λεμφοκυττάρων, εκτιμήσαμε την αναλογία των CD19<sup>+</sup>/CD23<sup>+</sup> κυττάρων. Βρήκαμε ότι η αναλογία των CD19<sup>+</sup>/CD23<sup>+</sup> κυττάρων ανέρχονταν σε 27.9% ± 11.7% στους ασθενείς και στους φυσιολογικούς μάρτυρες σε 23.5% ± 13.4%. Οι αναλογίες αυτές δεν διέφεραν σημαντικά μεταξύ τους, στο επίπεδο του 5%. Η αναλογία των CD19<sup>+</sup>/CD23<sup>+</sup> κυττάρων δεν συσχετίστηκε με τη σοβαρότητα της ουδετεροπενίας ( $r = -0.2207$ ,  $P = 0.1123$ ) ή με το βαθμό της λεμφοπενίας ( $r = 0.0059$ ,  $P = 0.9667$ ). Από την άλλη μεριά, η πυκνότητα των CD23 μορίων στην επιφάνεια των Β-λεμφοκυττάρων, όπως εκτιμήθηκε από την μέση ένταση φθορισμού (mean fluorescence channel value-MFCV), δεν διέφερε σημαντικά μεταξύ ασθενών και φυσιολογικών μαρτύρων.

Για περισσότερη μελέτη της ενεργοποίησης των Β-λεμφοκυττάρων μετρήσαμε τα επίπεδα του sCD23 στον ορό των



ασθενών. Καμία σημαντική διαφορά δεν βρέθηκε μεταξύ ασθενών και φυσιολογικών μαρτύρων όσο αφορά την τιμή μέτρησης του sCD23 ( $23.4 \pm 12.9$  units/ml στους ασθενείς έναντι των  $22.2 \pm 13.8$  units/ml στους φυσιολογικούς μάρτυρες,  $P = 0.7724$ ) (εικόνα 4.6).

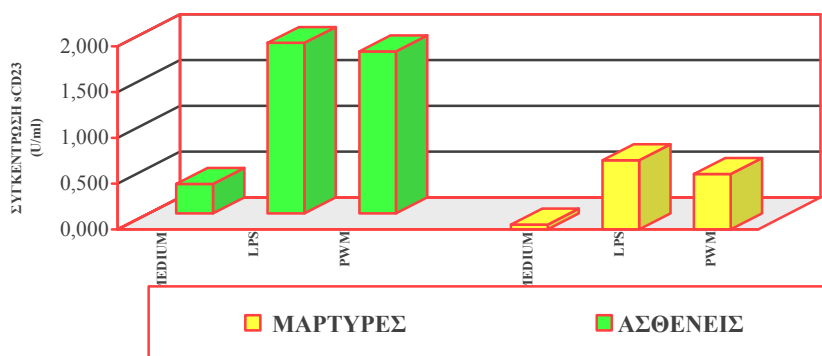
**ΕΙΚΟΝΑ 4.6 ΚΑΤΑΝΟΜΗ ΤΩΝ ΤΙΜΩΝ ΤΟΥ sCD23 ΣΤΟΝ ΟΡΟ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΜΑΡΤΥΡΩΝ ΚΑΙ ΑΣΘΕΝΩΝ ΜΕ CINA. ΟΙ ΜΕΣΕΣ ΤΙΜΕΣ ΔΕΙΧΝΟΝΤΑΙ ΜΕ ΤΙΣ ΟΡΙΖΟΝΤΙΕΣ ΓΡΑΜΜΕΣ.**

Η ευαισθησία των Β-λεμφοκυττάρων των ασθενών σε μη ειδικούς πολυκλωνικούς ενεργοποιητές, PWM και LPS, εκτιμήθηκε μετρώντας τη συγκέντρωση του sCD23 σε υπερκείμενα υγρών καλλιιεργειών, διάρκειας 72 h, ανοσομαγνητικά διαχωριζόμενων CD19<sup>+</sup> κυττάρων. Τα δεδομένα φαίνονται στο πίνακα 5. Τα Β-λεμφοκύτταρα ασθενών με CINA απαντούν στις συνθήκες καλλιιεργειας παράγοντας υψηλότερα ποσά sCD23 σε σχέση με αυτά που παράγονται από τα Β-λεμφοκύτταρα φυσιολογικών μαρτύρων (

$0.323 \pm 0.292$  έναντι των  $0.052 \pm 0.049$  units, αντίστοιχα,  $P = 0.0430$ ). Τα Β-λεμφοκύτταρα ασθενών και φυσιολογικών μαρτύρων αυξάνουν δραματικά την παραγωγή του sCD23 παρουσία LPS ή PWM. Η συγκέντρωση του sCD23 στα υπερκείμενα καλλιέργειας ήταν σημαντικά υψηλότερη στην ομάδα των ασθενών σε σχέση με αυτή των φυσιολογικών μαρτύρων ( $P = 0.0332$  και  $P = 0.0159$ , αντίστοιχα). Αυτά τα ευρήματα δείχνουν ότι τα Β-λεμφοκύτταρα των ασθενών έχουν αυξημένη ευαισθησία σε μη ειδικά μιτογόνα συγκρινόμενα με αυτά των φυσιολογικών μαρτύρων (εικόνα 4.7).

Στον πίνακα 6 φαίνονται οι εκατοστιαίες αναλογίες των  $CD19^+$  και  $CD20^+$  Β-λεμφοκυττάρων του μυελού των οστών. Τα  $CD19^+$  κύτταρα του μυελού των οστών ήταν σημαντικά υψηλότερα στην ομάδα των ασθενών ( $11.8\% \pm 5.4\%$ ) από ότι στους φυσιολογικούς μάρτυρες ( $7.5\% \pm 4.2\%$ ,  $P = 0.0190$ ). Εντούτοις, η αναλογία των  $CD20^+$  κυττάρων δεν διέφερε σημαντικά μεταξύ ασθενών και φυσιολογικών μαρτύρων στο επίπεδο του 5%. Ομοίως, μη στατιστικά σημαντικές διαφορές παρατηρήθηκαν μεταξύ ασθενών και φυσιολογικών μαρτύρων στην αναλογία των  $CD5^+/CD19^+$  κυττάρων.

**ΕΙΚΟΝΑ 4.7 ΓΡΑΦΗΜΑ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ ΤΟΥ sCD23 ΣΕ ΥΠΕΡΚΕΙΜΕΝΑ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ Β-ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΩΝ ΑΣΘΕΝΩΝ ΚΑΙ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΜΑΡΤΥΡΩΝ ΜΕΤΑ ΑΠΟ ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗ ΤΟΥΣ ΑΠΟ ΜΗ ΕΙΔΙΚΟΥΣ ΠΟΛΥΚΛΩΝΙΚΟΥΣ ΔΙΕΓΕΡΤΕΣ**



Πίνακας 5. Συγκέντρωση του Soluble CD23 σε υπερκείμενα καλλιεργείων Β-λεμφοκυττάρων μετά από ενεργοποίησή τους από μη ειδικούς πολυκλωνικούς διεγέρτες. <sup>&</sup>

Additive	<b>Patients (n=10)</b>	Controls (n=6)	Differences (P-value) <sup>#</sup>
LPS (50μg/mL)	1.862 ± 1.068 *P=0.0012	0.756 ± 0.500 *P=0.0197	P=0.0332
PWM (50μg/mL)	1.770 ± 0.938 *P=0.0006	0.604 ± 0.515 *P=0.0439	P=0.0159
Mediume alone	0.323 ± 0.292	0.052 ± 0.049	P=0.0430

<sup>&</sup> Τιμές (units/mL) εκφρασμένες ως μέσες τιμές ± 1SD.

*ΠΑΡΑΤΗΡΗΣΗ:* Τα ανοσομαγνητικά διαχωριζόμενα CD19+ κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε 1ml RPMI παρουσία PWM και LPS.

Το παραπάνω test χρησιμοποιήθηκε για να συσχετίσει τιμές μεταξύ ασθενών και φυσιολογικών μαρτύρων (\*) σύγκριση μεταξύ ενεργοποιημένων και μη ενεργοποιημένων από μιτογόνα καλλιεργείων .

Πίνακας 6. Αναλογία Β-λεμφοκυτταρικών υποπληθυσμών του μυελού των οστών στους πάσχοντες από CINA.

	Ομάδα Α	Ομάδα Β	Σύνολο ασθενών	Φυσιολογικοί μάρτυρες
CD19+	10.0 ± 4.5 (n=17) *P=0.1551 **P=0.0477	13.6 ± 5.7 (n=18) *P=0.0050	11.8 ± 5.4 (n=35) *p=0.0191	7.5 ± 4.2 (n=11)
CD20+	7.2 ± 2.1 (n=11) *P=0.0560 **P=0.7049	7.8 ± 5.0 (n=14) *P=0.1701	7.5 ± 3.9 (n=25) *P=0.1053	4.7 ± 2.9 (n=6)
CD5+ / CD19+	0.16 ± 0.09 (n=5) *P=0.9998 **P=0.1824	0.33 ± 0.25 (n=7) *P=0.1824	0.26 ± 0.21 (n=12) *P=0.3365	0.16 ± 0.09 (n=5)

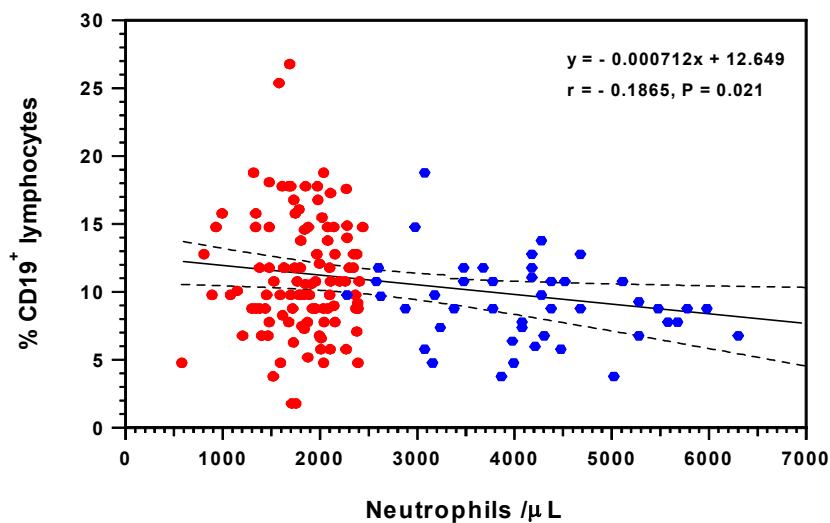
& Τιμές εκφρασμένες σε μέσες τιμές εκατοστιαίας αναλογίας κυττάρων ± 1SD.

(\*) Σύγκριση μεταξύ ασθενών της ομάδας με τους φυσιολογικούς μάρτυρες

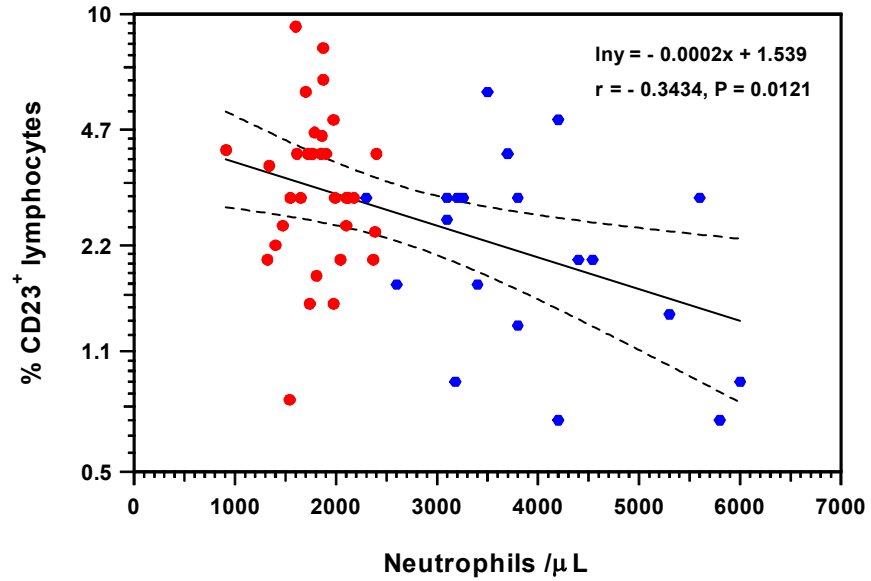
(\*\*) Σύγκριση μεταξύ της ομάδας Α και της ομάδας Β. Στατιστικά σημαντική διαφορά για  $P \leq 0.05$ .

**ΠΑΡΑΤΗΡΗΣΗ:** Ο αριθμός των ουδετερόφιλων κοκκιοκυττάρων των ασθενών της ομάδας Α κυμαινόταν από 1800 έως 2500 / μl αίματος, ενώ της ομάδας Β ήταν χαμηλότερος από 1800 / μl αίματος.

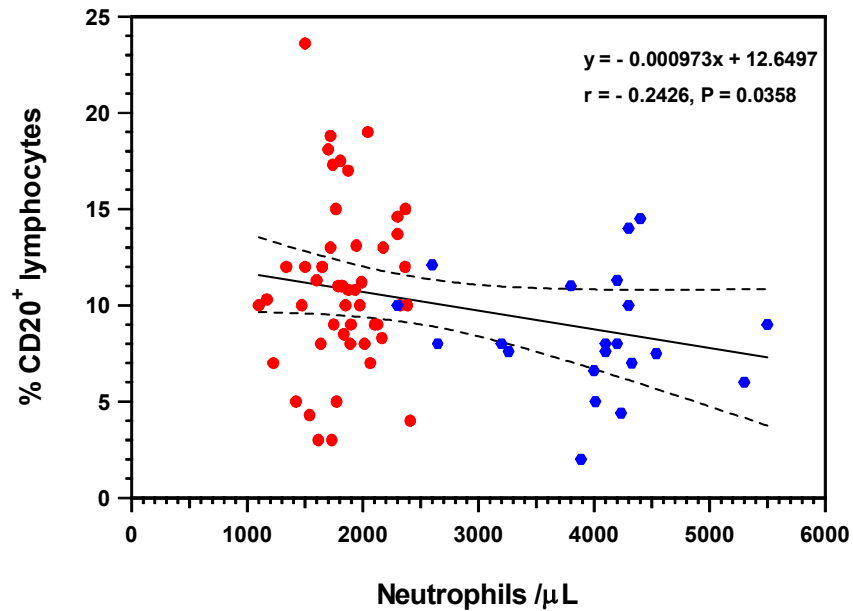
Εικόνα 4.1 ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΤΗΣ % ΑΝΑΛΟΓΙΑΣ ΤΩΝ CD19<sup>+</sup> Β-ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΜΕ ΤΟ ΒΑΘΜΟ ΤΗΣ ΟΥΔΕΤΕΡΟΠΕΝΙΑΣ



**Εικόνα 4.3. ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΤΗΣ % ΑΝΑΛΟΓΙΑΣ ΤΩΝ CD23<sup>+</sup> Β-ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΜΕ ΤΟ ΒΑΘΜΟ ΤΗΣ ΟΥΔΕΤΕΡΟΠΕΝΙΑΣ.**

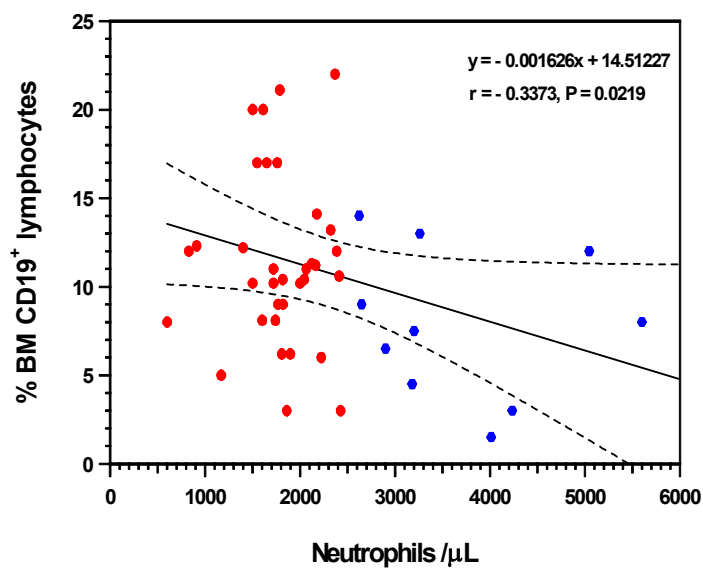


**Εικόνα 4.4. ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΤΗΣ % ΑΝΑΛΟΓΙΑΣ ΤΩΝ CD20<sup>+</sup> Β-ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΜΕ ΤΟ ΒΑΘΜΟ ΤΗΣ ΟΥΔΕΤΕΡΟΠΕΝΙΑΣ.**





**Εικόνα 4.8** ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΤΗΣ ΑΝΑΛΟΓΙΑΣ ΤΩΝ CD19<sup>+</sup> Β-ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΤΟΥ ΜΥΕΛΟΥ ΤΩΝ ΟΣΤΙΩΝ ΜΕ ΤΟ ΒΑΘΜΟ ΤΗΣ ΟΥΔΕΤΕΡΟΠΕΝΙΑΣ.





## Συζήτηση

---

## ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Τα αποτελέσματα που παρουσιάστηκαν εδώ, δείχνουν ότι οι ασθενείς με CINA έχουν τιμές κυκλοφορούντων λεμφοκυττάρων στατιστικά χαμηλότερες από αυτές των φυσιολογικών μαρτύρων. Η λεμφοπενία αυτή σχετίζεται θετικά με τη σοβαρότητα της ουδετεροπενίας.

Ο έλεγχος των δεικτών επιφανείας, CD19 και CD20, με κυτταρομετρία ροής, έδειξε ότι οι ασθενείς με CINA έχουν φυσιολογικές τιμές B-λεμφοκυττάρων στο περιφερικό αίμα, όπως προκύπτει από τον απόλυτο αριθμό των κυττάρων αυτών ανά μl αίματος και αυξημένη αναλογία B-λεμφοκυττάρων, ως προς το σύνολο των λεμφοκυττάρων του περιφερικού αίματος.

Παλαιότερες μελέτες στην κλινική μας έχουν δείξει ότι οι ασθενείς με CINA παρουσιάζουν μία επιλεκτική ελάττωση των  $CD4^+/CD45RO^+$ ,  $CD8^+/CD45RO^+$  και των NK-κυττάρων [15,22,23]. Με βάση τα παραπάνω, η λεμφοπενία αποδίδεται σε ελάττωση των προαναφερομένων T-λεμφοκυτταρικών υποπληθυσμών και των NK-κυττάρων. Επομένως οι αυξημένες αναλογίες των B-λεμφοκυττάρων είναι ένα σχετικό φαινόμενο οφειλόμενο στην προαναφερόμενη εκλεκτική ελάττωση των T και NK-κυττάρων.

Για να εκτιμήσουμε το βαθμό ενεργοποίησης του B-λεμφοκυτταρικού συστήματος στους πάσχοντες από CINA προσδιορίσαμε την αναλογία των  $CD23^+$  κυττάρων στο σύνολο των λεμφοκυττάρων του περιφερικού αίματος, την αναλογία των  $CD19^+/CD23^+$  κυττάρων που εκφράζουν τον ενεργοποιημένο B-κυτταρικό υποπληθυσμό, την πυκνότητα του CD23 στην κυτταρική επιφάνεια όπως προκύπτει από την μέση ένταση φθορισμού, η οποία δίδεται απευθείας από το κυτταρόμετρο και τη συγκέντρωση του

sCD23 στον ορό και στα υπερκείμενα υγρών καλλιιεργειών ανοσομαγνητικά διαχωρισθέντων CD19<sup>+</sup> B-λεμφοκυττάρων παρουσία των μη ειδικών μιτογόνων LPS και PWM.

Βρήκαμε ότι η αναλογία των CD19<sup>+</sup>/CD23<sup>+</sup> κυττάρων στους ασθενείς και τους φυσιολογικούς μάρτυρες δεν διέφερε σημαντικά μεταξύ τους, ούτε συσχετίστηκε με τη σοβαρότητα της ουδετεροπενίας ή τον βαθμό της λεμφοπενίας. Η αναλογία των CD23<sup>+</sup> κυττάρων ήταν σημαντικά υψηλότερη στους ασθενείς με CINA σε σχέση με τους φυσιολογικούς μάρτυρες και συσχετίστηκε αντιστρόφως ανάλογα με τη σοβαρότητα της ουδετεροπενίας. Αντίθετα ο απόλυτος αριθμός των CD23<sup>+</sup> κυττάρων ήταν φυσιολογικός στους πάσχοντες. Επίσης η πυκνότητα των CD23 μορίων στην επιφάνεια των B-κυττάρων και η συγκέντρωση του sCD23 στον ορό δεν διέφερε σημαντικά μεταξύ ασθενών και φυσιολογικών μαρτύρων. Επομένως κανένας από τους ασθενείς δεν είχε αυξημένο αριθμό ενεργοποιημένων B-λεμφοκυττάρων στο περιφερικό αίμα.

Αντίθετα τα B-λεμφοκύτταρα των ασθενών έχουν αυξημένη ευαισθησία σε μη ειδικούς πολυκλωνικούς διεγέρτες σε σχέση με αυτά των μαρτύρων. Αυτό προκύπτει από το γεγονός ότι η συγκέντρωση του sCD23 στα υπερκείμενα καλλιέργειας B-κυττάρων των ασθενών, παρουσία LPS και PWM, είναι σημαντικά υψηλότερη σε σχέση με αυτή που μετρήθηκε στα υπερκείμενα καλλιέργειας B-κυττάρων φυσιολογικών μαρτύρων.

Η αυξημένη ευαισθησία των ανοσομαγνητικά διαχωριζομένων CD19<sup>+</sup> κυττάρων των ασθενών σε μη ειδικούς πολυκλωνικούς διεγέρτες, είναι δύσκολο να εξηγηθεί. Προηγούμενες μελέτες στο εργαστήριό μας δείχνουν ότι οι ασθενείς με CINA έχουν αυξημένες συγκεντρώσεις στον ορό προ-φλεγμονωδών κυττοκινών, οι οποίες

προφανώς παράγονται από ενεργοποιημένα μακροφάγα [13,96,97]. Υποθέσαμε έτσι, ότι κάποια υποκείμενη λάνθανουσα επεξεργασία μπορεί να ενέχεται στην παθογένεια του συνδρόμου [15,16,22,96,97]. Κάτω από την επήρεια των προ-φλεγμονωδών κυττοκινών, τα Β-λεμφοκύτταρα των ασθενών γίνονται περισσότερο ευαίσθητα σε μη ειδικούς ενεργοποιητές έτσι ώστε να αυξάνουν σημαντικά την παραγωγή και έκκριση του sCD23 σε υπερκείμενα κυτταροκαλλιεργειών. Μία άλλη εξήγηση αυτής της αυξημένης ευαισθησίας των Β-λεμφοκυττάρων, ειδικά στο LPS, είναι η έκθεση των Β-λεμφοκυττάρων σ' ένα χρόνιο αντιγονικό ερέθισμα, εξ' αιτίας της ήπιας χρόνιας φλεγμονώδους διεργασίας, με αποτέλεσμα αυξημένη έκφραση υποδοχέων στην επιφάνεια των Β-λεμφοκυττάρων και έτσι αυξημένη κυτταρική απάντηση σε μιτογόνα η οποία καθορίζεται απευθείας από την αυξημένη παραγωγή sCD23. Μία τρίτη δυνατότητα είναι η ευαισθητοποίηση των Β-λεμφοκυττάρων από μεσολαβητές, όπως η IL-4, η οποία απελευθερώνεται από ενεργοποιημένα Τ-λεμφοκύτταρα [276]. Τα Τ-κύτταρα μπορεί να είναι ενεργοποιημένα στους ασθενείς με CINA εξ' αιτίας του υποκείμενου χρόνιου αντιγονικού ερεθισμού [15,61,96]. Ένα ισχυρό στοιχείο υπέρ της ύπαρξης μιας λανθάνουσας χρόνιας φλεγμονώδους διεργασίας είναι η ανεύρεση αυξημένου αριθμού πλασματοκυττάρων και CD19<sup>+</sup> κυττάρων στον μυελό των οστών, όπως έχει προηγουμένως αναφερθεί [56].

Συμπερασματικά υποθέσαμε ότι η αυξημένη ευαισθησία των ανοσομαγνητικά διαχωριζόμενων Β-κυττάρων των ασθενών σε μη ειδικούς διεγέρτες σχετίζεται με την υποκείμενη χρόνια φλεγμονώδη διεργασία η οποία ενέχεται στην παθογένεια του συνδρόμου, όπως έχουμε αναφέρει σε προηγούμενες μελέτες.



*Συμπεράσματα*

## ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Τα συμπεράσματα που εξάγονται από την παρούσα μελέτη είναι τα ακόλουθα:

1. Οι πάσχοντες από CINA έχουν σημαντικά χαμηλότερες απόλυτες τιμές λεμφοκυττάρων στο αίμα σε σχέση με τους φυσιολογικούς μάρτυρες. Οι τιμές των λεμφοκυττάρων σχετίζονται θετικά τη σοβαρότητα της ουδετεροπενίας.

2. Οι πάσχοντες από CINA έχουν αυξημένη αναλογία Β-λεμφοκυττάρων περιφερικού αίματος αλλά φυσιολογικό απόλυτο αριθμό αυτών, προφανώς λόγω της επιλεκτικής ελάττωσης των Τ και των ΝΚ-κυττάρων.

Οι εκαοστιαίες αναλογίες των CD19<sup>+</sup>, CD20<sup>+</sup> και CD23<sup>+</sup> Β-κυττάρων συσχετίστηκαν αντιστρόφως ανάλογα με τον αριθμό των κυκλοφορούντων στο αίμα ουδετερόφιλων πολυμορφοπύρηνων κυττάρων. Η αναλογία των CD19<sup>+</sup> και CD20<sup>+</sup> κυττάρων συσχετίστηκε αντιστρόφως ανάλογα με τον απόλυτο αριθμό των ολικών λεμφοκυττάρων του περιφερικού αίματος.

3. Στο περιφερικό αίμα τα CD19<sup>+</sup>/CD23<sup>+</sup> κύτταρα, τα οποία εκφράζουν ενεργοποιημένο υποπληθυσμό Β-λεμφοκυττάρων, δεν ήταν αυξημένα στους ασθενείς που μελετήθηκαν. Επίσης η αναλογία των CD19<sup>+</sup>/CD23<sup>+</sup> κυττάρων δεν σχετίστηκε με τη σοβαρότητα της ουδετεροπενίας.

4. Η πυκνότητα των CD23 μορίων στην επιφάνεια των Β-κυττάρων, όπως εκτιμήθηκε από την μέση ένταση φθορισμού, δεν διέφερε σημαντικά μεταξύ ασθενων και φυσιολογικών μαρτύρων.

5. Οι συγκεντρώσεις στον ορό του sCD23 δεν διέφεραν σημαντικά μεταξύ ασθενών και φυσιολογικών μαρτύρων.



6. Οι ασθενείς έχουν αυξημένη αναλογία CD19<sup>+</sup> B-λεμφοκυττάρων στο μυελό των οστών.

7. Τα ανοσομαγνητικά διαχωριζόμενα CD19<sup>+</sup> κύτταρα των ασθενών με CINA απαντούν στις συνθήκες καλλιέργειας αυξάνοντας δραματικά την παραγωγή του sCD23 παρουσία LPS και PWM. Η συγκέντρωση του sCD23 στα υπερκείμενα καλλιέργειας είναι σημαντικά υψηλότερη στην ομάδα των ασθενών σε σχέση με αυτή των φυσιολογικών μαρτύρων. Τα ευρήματα αυτά δείχνουν ότι τα B-λεμφοκύτταρα των ασθενών έχουν αυξημένη ευαισθησία σε μη ειδικά μιτογόνα.

Όλα αυτά τα ευρήματα συνηγορούν υπέρ του ότι οι ασθενείς με CINA έχουν πιθανότατα μία ήπιου βαθμού χρόνια φλεγμονώδη επεξεργασία που ενέχεται στην παθογένεια του συνδρόμου.

## SUMMARY

The current study was designed to investigate some quantitative and functional parameters of B-lymphocytes in patients with chronic idiopathic neutropenia (CIN) of adult. The study was carried out on 107 patients and 46 normal controls. We found that patients had increased proportions of peripheral blood B- lymphocytes but normal absolute B-lymphocyte counts, a discrepancy probably due to lymphopenia caused by the reduction of T- and NK-cells previously reported. Patients had also increased proportions of CD19<sup>+</sup> bone marrow B-lymphocytes. Peripheral blood CD19<sup>+</sup>/CD23<sup>+</sup> cells, representing the activated B-lymphocyte population, were not increased in the patients studied, and serum soluble CD23 molecules normally seeded from activated B-lymphocytes, did not differ from the controls. Patient immunomagnetically isolated peripheral blood CD19<sup>+</sup> B-lymphocytes displayed a significantly raised sensitivity to nonspecific polyclonal mitogens, as evidenced by the high amounts of soluble CD23 molecules seeded in the supernatant culture medium. We suggest that all these findings are probably related to a low-grade chronic inflammatory process in CIN patients leading to chronic antigenic stimulation, as we previously have reported.

**BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

1. Kyle RA, Linman JW. Chronic idiopathic neutropenia: a newly recognized syndrome? *N Engl J Med* 1968; 279: 1015-1019.
2. Dale DC, Guerry D, Wewerka J, Bull J, Chusid M. Chronic neutropenia. *Medicine (Baltimore)* 1979; 58: 128-144.
3. Boxer LA, Greenberg MS, Boxer GJ, Stossel TP. Autoimmune neutropenia. *N Engl J Med* 1975; 293: 748-753.
4. Larezani P, Jiang A-F, Yegen L, Santorineou M. Chronic autoimmune neutropenia due to anti-NA<sub>2</sub> antibody. *N Engl J Med* 1975; 293 : 744-747.
5. Shastri KA, Logue GL. Autoimmune neutropenia. *Blood* 1993; 81: 1984-1995.
6. Logue GL, Shastri KA, Laughlin M, Shimm DS, Ziolkowski LM, Iglehart JL. Idiopathic neutropenia: antineutrophil antibodies and clinical correlations. *Am J Med* 1991; 90: 211-216.
7. Papadaki HA, Gibson FM, Rizzo S, Gordon-Smith EC, Marsh JCW. Assessment of bone marrow stem cell reserve and function and stromal cell function in patients with autoimmune cytopenias. *Blood* 2000; 96: 3272-3275.
8. Lightsey AL, Chapman R, McMillan R, Mushovic J, Yelenosky R, Longmire RL. Immune neutropenia. *Ann Intern Med* 1977;86:60-62.
9. Hartman KR, LaRussa VF, Rothwell SW, Atolagbe TO, Ward FT, Klipple G. Antibodies to myeloid precursor cell in autoimmune neutropenia. *Blood* 1994; 94:625-631.
10. Bagby GC, Lawrence HJ, Neerhout RC. T-lymphocyte-mediated granulopoietic failure: in vitro identification of prednisone-responsive patients. *N Engl J Med* 1983; 309 : 1073-1078.

11. Papadaki HA, Eliopoulos GD. Enhanced neutrophil extravasation may be a contributing factor in the determination of neutropenia in patients with chronic idiopathic neutropenia of adults. *Eur J Haematol* 1998; 61:272-277.
12. Papadaki HA, Giouremou K, Eliopoulos GD. Low frequency of myeloid progenitor cells in chronic idiopathic neutropenia of adults may be related to increased release of TGF- $\beta_1$  by bone marrow stromal cells. *Eur J Haematol* 1999;63:154-162.
13. Papadaki HA, Coulocheri SA, Eliopoulos GD. Patients with chronic idiopathic neutropenia of adults have increased serum concentrations of inflammatory cytokines and chemokines. *Am J Hematol* 2000;65:271-277.
14. Papadaki HA, Psyllaki M, Eliopoulos GD. Clinical and laboratory findings on 183 patients with non-immune chronic idiopathic neutropenia of adult. *Br J Haematol* 2001; (submitted).
15. Papadaki HA, Eliopoulos GD. Selective loss of peripheral blood CD45RO<sup>+</sup> T-lymphocytes correlates with increased levels of serum cytokines and endothelial cell-derived soluble cell adhesion molecules in patients with chronic idiopathic neutropenia of adults. *Ann Hematol* 1998;77:153-159.
16. Papadaki HA, Palmblad J, Kapsimali V, Anagnou NP, Eliopoulos GD. Increased serum IgA and decreased IgG<sub>3</sub> strongly correlate with increased serum levels of TGF- $\beta_1$  in patients with non-immune chronic idiopathic neutropenia of adults. *Eur J Hematol* 2000;65:237-244.
17. Hoffbrad AV, Pettit JE. *Essential Haematology*. 3<sup>rd</sup> edition. Blackwell Scientific Publication, Oxford, 1993. P.156.
18. Dale DC, Bonilla MD, Davis MD, et al. A randomised controlled phase III trial of recombinant human granulocyte colony

stimulating factor (Filgrastim) for treatment of severe chronic neutropenia. *Blood* 1993; 81:2496-2502.

19. Papadaki HA, Charoulakis N, Eliopoulos DG, Psyllaki M, Eliopoulos GD. Patients with non-immune chronic idiopathic neutropenia of adults have increased splenic volume on ultrasonography. *Clin and Lab Haematol* (in press).

20. Papadaki HA, Margioris AN, Miliaki M, Steriopoulos C, Valatas V, Eliopoulos GD. Chronic idiopathic neutropenia of adults is associated with decreased bone mineral density and alterations in bone turnover biochemical markers. *Eur J Haematol* 1999;62:311-316.

21. Papadaki HA, Coulocheri SA, Xylouri I, Chatzivassili A, Karkavitsas N, Eliopoulos GD. Defective natural killer cell activity of peripheral blood lymphocytes correlates with the degree of neutropenia in patients with chronic idiopathic neutropenia of adults. *Ann Hematol* 1998; 76 : 127-134.

22. Papadaki HA, Katrinakis G, Eliopoulos AG, Coulocheri S, Alexandrakis M, Eliopoulos GD. Low numbers of peripheral blood natural killer cells in patients with chronic idiopathic neutropenia of adults are probably due to enhanced extravasation into the tissues. *Haema*, 1998;1:33-40.

23. 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;75:103-110.

24. 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;80:195-200.

25. Vincent PC. Drug-induced aplastic anaemia and agranulocytosis. Incidence and mechanisms. *Drugs* 1986;31:52-63.
26. Cutting HO, Lang JE. Familial benign chronic neutropenia. *Ann Intern Med* 1964;61:876-887.
27. Dale DC, Hammond WP. Cyclic neutropenia: A clinical review. *Blood Rev* 1988; 2:178-185.
28. Hammond WP, Harlan JM. Severe neutropenia in infectious mononucleosis. *West J Med* 1979; 131:92-97.
29. Papadaki HA, Xylouri I, Coulocheri SA, Kalmanti M, Kafatos A, Eliopoulos GD. Prevalence of chronic idiopathic neutropenia of adults among an apparently healthy population living on the island of Crete. *Ann Hematol* 1999; 78: 293-297.
30. Kyle RA. Natural history of chronic idiopathic neutropenia. *N Engl J Med* 1980;302:908-909.
31. Papadaki HA, Eliopoulos GD, Coulocheri SA, Spyropoulou M, Stavropoulos-Giokas C. Increased frequency of DRB1\*1302 HLA-haplotype in patients with non-immune chronic idiopathic neutropenia of adults. *Blood* 2001;97:850-851.
32. Sievers EL, Dale DC. Non-malignant neutropenia. *Blood Rev* 1996; 10:95-100.
33. Kyre RA, Linman JW. Gingivitis and chronic idiopathic neutropenia : report of two cases. *Mayo Clin Proc* 1970;45:494-504.
34. Kamma JJ, Lygidakis NA, Nakou M. Subgingival microflora and treatment in prepubertal periodontitis associated with chronic idiopathic neutropenia. *J Clin Periodontol* 1998;25:759-765.
35. Kalkwarf KL, Gutz DP. Periodontal changes associated with chronic idiopathic neutropenia. *Pediatr Dent* 1981;3:189-195.

36. Frampton JE, Lee CR, Faulds D. Filgrastim : A review of its pharmacological properties and therapeutic efficacy in neutropenia. *Drugs* 1994; 48: 731-760.
37. Koene HR, de Haas M, Kleijer M, Huizinga TW, Roos D, von dem Borne AE. Clinical value of soluble IgG Fc receptor type III in plasma from patients with chronic idiopathic neutropenia. *Blood* 1998; 91: 3962-3966.
38. Furukava T, Takahashi M, Moriyama Y, Koike T, Kurokawa I, Shibata A. Successful treatment of chronic idiopathic neutropenia using recombinant granulocyte colony-stimulating factor. *Ann Hematol* 1991; 62:22-24.
39. Heussner P, Haase D, Kanz L, Fonatsch C, Welte K, Freund M. G-CSF in the long-term treatment of cyclic neutropenia and chronic idiopathic neutropenia in adult patients. *Int J Hematol* 1995; 62:225-234.
40. Auner HW, Klintschar M, Crevenna R, Beham-Schmid C, Hoefler G, Mitterbauer G, Linkesch W, Sill H. Two case studies of chronic idiopathic neutropenia preceding acute myeloid leukemia . *Br J Haematol* 1999;105:431-433.
41. Papadaki HA, Kosteas M, Gemetzi C, Alexandrakis M, Eliopoulos GD. Development of acute leukemia with multiple karyotypic abnormalities but no mutations in G-CSF receptor in two patients with non-immune chronic idiopathic neutropenia of adults. *Ann Hematol* 2001; (submitted).
42. Hammond WP, Price TH, Souza LM, Dale DC. Treatment of cyclic neutropenia with granulocyte colony-stimulating factor. *N Engl J Med* 1989;320:1306.



43. Muroi K, Ito M, Sasaki R, et al. Treatment of drug induced agranulocytosis with granulocyte colony stimulating factor (letter). *Lancet* 1989;2:55.
44. Bishop CR, Rothstein G, Ashenbrucker HE, Athens JW. Leukokinetic studies. XIV. Blood neutrophil kinetics in chronic steady-state neutropenia. *Journal of Clinical Investigation*, 1971;50:1678-1689.
45. Rickard KA, Brown RD, Yuen E, Kronenberg H. Chronic idiopathic neutropenia. Granulopoietic assessment by bone marrow culture and granulocyte kinetics. *Am J Hematol* 1980;9:193-198.
46. Murphy MF, Metcalfe P, Waters AH, et al. Incidence and mechanism of neutropenia and thrombocytopenia in patients with human immunodeficiency virus infection. *Br J Haematol* 1987;66:337-340.
47. Nagaraju M, Weitzman S, Baumann G. Viral hepatitis and agranulocytosis. *Am J Dig Dis* 1973;18:247-252.
48. Julia A, Olona M, Bueno J, et al. Drug-induced agranulocytosis : Prognostic factors in a series of 168 episodes. *Br J Haematol* 1991;79:336-371.
49. Irvine AE, French A, Daly A, et al. Drug induced neutropenia due to direct effects on CFU-C. Ten years of culture experience. *Eur J Haematol* 1994;52:21-27.
50. Vogel JM, Kimball HR, Wolff SM, Perry S.(1967) Etiocholanolone in the evaluation of marrow reserves in patients receiving cytotoxic agents. *Ann Int Med* 1967;67:1226-1238.
51. Biasi D, Barmbara L-M, Carletto A, Caramaschi P, Ortolani R, Perona G, Bellavite P. Increased in vitro neutrophil adherence in a case of chronic idiopathic neutropenia. *Br J Haematol* 1994;86:421-424.

52. Papadaki HA, Giouremou K, Eliopoulos GD. Overexpression of L-selectin may account for enhanced neutrophil extravasation in patients with chronic idiopathic neutropenia of adults. *Haema* 2000;3:29-35.

53. Finch, S.C. (1983) Neutropenia. In, Williams WJ et al (eds), "Hematology", 3<sup>rd</sup> edition, McGraw-Hill Book Comp., London. pp 773-793.

54. Miller CB, Jones RJ, Piantadosi S, Adloff MD, Spivac JL. Decreased erythropoietin response in patients with anemia of cancer. *N Engl J Med* 1990;322:1698-1692.

55. Blake DR, Waterworth RF, Bacon PA. Assessment of iron stores in inflammation by assays of serum ferritin concentrations. *Br Med J* 1981;283:1147-1148.

56. Papadaki HA, Chatzivassili A, Stefanaki K, Koumaki V, Kanavaros P, Eliopoulos GD. Morphologically defined myeloid cell compartments, lymphocyte subpopulations and histological findings of bone marrow in patients with non-immune chronic idiopathic neutropenia of adults. *Ann Hematol* 2000;79:563-570.

57. Picker LJ, Furst A, Robinson SH, Kadin ME. Immunarchitecture of bone marrow in neutropenia: increased HNK-1<sup>+</sup> cells define a subset of neutropenic patients. *Am J Hematol* 1987;25:29-41.

58. Greenberg P, Mara B, Steed S, Boxer L. The chronic idiopathic neutropenia syndrome: Correlation of clinical features with in vitro parameters of granulopoiesis. *Blood* 1980;55:915-921.

59. Eliopoulos GD, Meletis J, Fessas P, Anagnou N. Defective CSA-dependent granulopoiesis in patients with chronic neutropenia. *Haematologia* 1990;23:101-109.

- 
60. Kohgo Y, Hirayama Y, Matsunaga T, Kato J, Sakamaki S, Niitsu Y. Chronic idiopathic neutropenia associated with abnormal expression of granulocyte colony-stimulating factor mRNA of bone marrow stromal cells. *Int J Hematol* 1994;59:177-180.
61. Papadaki HA, Eliopoulos DG, Ponticoglou C, Eliopoulos GD. Increased frequency of monoclonal gammopathy of undetermined significance in patients with non-immune chronic idiopathic neutropenia syndrome. *Int J Hematol* 2001;73:339-345.
62. Islam KB, Baskin B, Nilsson L, Hammarstrom L, Sideras P, Smith CL. Molecular analysis of IgA deficiency. Evidence for impaired switching to IgA. *J Immunol* 1994;152:1442-1452.
63. Caligaris-Cappio F, Gamussi G, Gavosto A. Idiopathic neutropenia with normocellular bone marrow. An immune complex disease. *Br J Haematol* 1979;43:595-605.
64. Papadaki HA, Psyllaki M, Eliopoulos DG, Tsiroyanni A, Eliopoulos GD. Increased frequency and specific reactivity of serum antinuclear antibodies in patients with non-immune chronic idiopathic neutropenia of adults. *Acta Haematol* 2001;105:13-20.
65. Carlos TM, Harlan JM. Leukocyte-endothelial adhesion molecules. *Blood* 1994;84:2068-2101.
66. Azuma Y, Kaji K, Katogi R, Tageshita S, Kudo A. Tumor necrosis factor-alpha induces differentiation of and bone resorption by osteoclasts. *J Biol Chem* 2000;275:4858-4854.
67. Roodman GD. Cell biology of the osteoclast. *Exp Hematol* 1999;27:1229-1241.
68. Wiseman BK, Doan CA. A newly recognised granulopenic syndrome caused by excessive splenic leukotysis and successfully treated by splenectomy. *Ann Intern Med* 1942;16:1097.

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

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

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

72. Starkebaune G, Dancey JT, Arend WP. Chronic neutropenia: Possible association with Sjogren's Syndrome. *J Rheumatol* 1981;8:679.

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

74. Starkebaum G, Singer JW, Arent WP. Humoral and cellular immune mechanisms of neutropenia in patients with Felty's syndrome. *Clin Exp Immunol* 1980;39:307.

75. Stevens C, Peppercorn MA, Grand RJ. Chron's disease associated with autoimmune neutropenia. *J Clin Gastroenterol* 1991;13:328.

76. Steinberg CL, et al. Agranulocytosis following phenylbutazone (Butazolidin) therapy. *JAMA* 1953;152:33.

77. Shaper AG, Lewis P. Genetic neutropenia in people of African origin. *Lancet* 1971;2:1021.

78. Shoenfeld Y, Alkan ML, Asaly A, et al. Benign familial leukopenia and neutropenia in different ethnic groups. *Eur J Haematol* 1988;41:273-277.

79. Djalbetti M, et al. Familial leukopenia-neutropenia in Yemenite Jews. *Bull Res Council Israel* 1961;9E :24.

80. Mintz U, Sachs L. Normal granulocyte colony forming cells in the bone marrow of Yemenite Jews with genetic neutropenia. *Blood* 1973;41:747-751.
81. Browne EA, Marcus AJ. Chronic idiopathic neutropenia. *N Engl J Med* 1960;262-795.
82. Papadaki HA, Kosteas T, Gemetzi C, Alexandrakis M, Eliopoulos GD. Two patients with nonimmune idiopathic neutropenia of adult developing acute myeloid leukemia with aberrant phenotype and complex karyotype but no mutations in granulocyte colony-stimulating factor receptor. *Ann Haematol* 2002; 81: 50-54.
83. Rickard KA, Brown RD, Yuen E, Kroneberg H. Chronic idiopathic neutropenia: Granulopoietic assessment by both marrow culture and granulocyte kinetics. *Am J Hematol* 1980; 9:193.
84. Price TH, Lee MY, Dale DC, Finch CA. Neutrophil kinetics in chronic neutropenia. *Blood* 1979;54:581.
85. Lange RD. Cyclic hematopoiesis: human cyclic neutropenia. *Exp Hematol* 1983;11:435-451.
86. Breedveld FC, Lafeber GJM, De Vries E, et al. Immune complexes and pathogenesis of neutropenia in Felty's syndrome. *Ann Rheum Dis* 1986;45:696-702.
87. Knight J, Laing P, Knight A, et al. Thyroid stimulating auto-antibodies usually contain only lambda ligh chains: Evidence for the "forbidden" clone theory. *J Clin Endocrinol Metab* 1986;62:342-347.
88. Cartwright GE, Chung HL, Chang A. Studies of the pancytopenia of Kala-azar. *Blood* 1948;3:249-275.
89. Dale DC, Wolff SM. Studies of the neutropenia of acute malaria. *Blood* 1973;41:197-206.

90. Castaneda MR, Guerrero G. Studies on the leukocytic picture in brucellosis. *J Infect Dis* 1946;78:43-48.

91. Lien-Keng K et al. Diagnostic value of bone marrow and blood picture in salmonellosis. *Ann Paediatr* 1960;194:141.

92. Morikawa K, Yamamori S, Oiwa K, Morikawa S, Oseko F, Kubota T, Nakamura T. Impaired G-CSF production at post-transcriptional level in a patient with chronic idiopathic neutropenia. *Br J Haematol* 1993;85:200-202.

93. Papadaki HA, Kritikos HD, Valatas V, Boumpas DT, Eliopoulos GD. Anemia of chronic disease in rheumatoid arthritis is associated with increased apoptosis of bone marrow erythroid cells: improvement following anti-tumor necrosis factor- $\alpha$  antibody therapy. *Blood* 2002; 100: 474-482.

94. Papadaki HA, Katrinakis G, Psyllaki M, Kosteas T, Eliopoulos GD. Acute CD7<sup>+</sup>/CD56<sup>+</sup> myeloid/NK precursor cell leukaemia in a patient with chronic idiopathic neutropenia receiving with granulocyte colony-stimulating factor. *Brit J Haematol* 2002; (submitted).

95. Haddy TB, Rana SR, Castro O. Bening ethnic neutropenia: What is a normal absolute neutrophil count? *J Lab Clin Med* 1999; 133: 15-22.

96. Papadaki HA, Palmblad J, Eliopoulos GD. Nonimmune chronic idiopathic neutropenia of adult: an overview. *Eur J Haematol* 2001; 67: 35-44.

97. Papadaki HA, Eliopoulos GD. An overview of the diagnosis, classification and differential diagnosis of chronic neutropenia. *Haema* 2002; 5: 39-49.

- 
98. Welte K, Boxer LA. Severe chronic neutropenia: pathophysiology and therapy. *Semin Hematol* 1997; 34: 267-278.
99. Palmblad J, Papadaki HA, Eliopoulos GD. Acute and chronic neutropenia-What is new? *J Intern Med* 2001; 250: 476-491.
100. Cooper D.M. : B-lymphocyte. Normal development and function. *N.Engl. J.Med.* 1452, 1987.
101. Hardy,R.R., Mallisen. B-lymphocyte development. The (Knock-) ins and outs of lymphoid development. *Curr. Opin. Immunol* 1998; 10:155-157.
102. Osmond D. Population dynamics of bone marrow B-lymphocytes. *Immunological Review.* 93: 103, 1986.
103. Bofil M., Janossy G., Janossy M., Burfold G., Seymour G., Wernet P., Kelemen E.: Human B-cell development. *Journ. Immunol.* 134, 1531, 1986.
104. Mc Kearn, J.P., C.Baum, and J.M.Davie. Cell surface antigens expressed by subsets of pre-B cells and B cells. *J. Immunol* 1984; 132: 332-339.
105. Harakawa, K. Li, Y.S., Wasserman, R. Sauder, S., Shinton, S. Hardy, R.R. B-lymphocyte developmental lineage. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*1997; 815:15-29.
106. Immunology, Western Kentucky University. March 27, 1998  
B-cell receptor complex.
107. Immunology Western Kentucky University. Cell of the Immune system. February 6, 1998.
108. Osmond, D. G. The turn over of B-cell population . *Immunol Today* 1993; 14:34-37.

109. Moller, G. (ed). The B-cell antigen receptor complex. *Immunol . Rev.* 1993; 132:5-206.

110. Hayashi, S. I., Kunishada , T., Ogawa, M., Sudo, T., Kodama, H., Suda, T., Nishikawa, S., and Nishikawa, S. I. Stepwise progression of B- lineage differentiation supported by interleukin -7 and other stromal cell molecules. *J. Exper. Med* 1990; 171:1683-1695.

111. Kikncade, P. W., Lee, G., Pietrangeli, C. E., Hayashi, S.I. and Gimble, J.M. Cell and molecules that regulate B-lymphopoiesis in bone marrow. *Ann. Rev. Immunol* 1993; 7:111-143.

112. Hardy, R.R., Carmack, C.E., Shinton, S.A., Kemp, J.D., and Hayakawa, K. Resolution and characterization of pro-B and pre-pro-B-cell stages in normal mouse bone marrow. *J. Exp. Med* 1991;173:1213-1225.

113. Nishimoto, N., Kubagawa, H., Ohno, T., Gartland, G.L., Stankovic, A.K., and Cooper, M.D. Normal pre-B-cells express a receptor complex of  $\mu$ -heavy chains and surrogate light-chain proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1991;88:6283-6288.

114. Rouse, R.V., Riechert, R.A., Gallatin, W.M., Weissman, I.L., and Butcher, E.C. Localization of lymphocyte subpopulations in peripheral lymphoid organs: directed lymphocyte migration are segregation into specific microenvironments. *Am. J. Anat.* 1984; 170:391.

115. Kelsoe, G. and Zheng, B.: Sites of B-cell activation in vivo. *Curr. Opin. Immunol* 1993, 5: 418-422.



116. Venkitaraman, A.R., Williams, G.T., Dariavich P., and Neuberger M.S. The B-cell antigen receptor of the five immunoglobulin classes. *Nature* 1991; 352:777-781.

117. De Franco, A.L. Molecular aspects of B-lymphocytes activation. *Ann. Rev. Cell Biol.* 1987; 3: 143-178.

118. Chen, J., and Alt, F.W.: Gene rearrangement and B-cell development. *Curr. Opin. Immunol.* 1993, 5: 194-200.

119. MacLennan, I.C.M.: Germinal centres. *Ann. Rev. Immunol.* 1994;12: 117-139.

120. Benner, R., Hijmans, W., and Haajiman, J.J. The bone marrow: the major source of serum immunoglobulins, but still a neglected site of antibody formation. *Clin. Exper. Immunol.* 1981; 46: 1-18.

121. Vitetta, E.S., Berton, M.S., Burger, C., Kapron, M., Lee W.T., and Vin, X-M. Memory B and T-cells. *Ann. Rev. Immunol.* 1991; 9: 193-217.

122. Kraal, G., Weissman, I.L., and Butcher, E.C. Memory B-cells express a phenotype consistent with migratory competence after secondary but not short-term primary immunization. *Cell. Immunol.* 1988; 115: 78.

123. Novak, T.J., Farber, D., Leitenberg, D., Hang, S., Johnson, P., and Bottomly, K. Isoforms of the transmembrane tyrosine phosphatase CD45 differentially affect T-cell recognition. *Immunity* 1994; 1: 81-92.

124. Amigorena, S., Bonnerot, C., Drake, J., Choquet, D., Hunziker, W., Guillet, J.G., Webster, P., Sautes, C., Mellman, I., and

---

Fridman, W.H. Cytoplasmic domain heterogeneity and function of IgG Fc receptors in B lymphocytes. *Science* 1992; 256: 1808-1812.

125. Cadol N., Ault K.A. Phenotypic and functional characterization of human Leu-1 (CD5) B-cells. *Science* 236: 81, 1987.

126. Hayakawa, K., and Hardy, R.R.: Normal, autoimmune, and malignant CD5<sup>+</sup> B-cells: The LY-1 B lineage. *Ann. Rev. Immunol.* 1993, 6: 197-218.

127. Chenssult R.W., Grey H.M. Antigen presentation by B-cells and its significance in T-B interactions. *Adv. Immun.* 1986; 39:51.

128. Cambier J.C., Ramson J.T. Molecular mechanisms of transmembrane signaling in B-lymphocytes. *Ann. Rev. Immunol.* 1987; 5: 175.

129. Rolink A., Melchers F. Molecular and cellular origin of B-lymphocyte diversity. *Cell* 1991; 66:1081.

130. MacLennan, I.C.M. and Gray D.: Antigen-driven selection of virgin and memory B-cells. *Immunol. Rev.* 1986, 91:61.

131. Gold M.R., Law O.A., De Franco A.L. Stimulation of protein tyrosine phosphorylation by the B-lymphocyte antigen receptor. *Nature* 1990; 245:810.

132. Koning F. Lymphocyte antigen receptors: a common design? *Immunol Today* 1991; 12:100.

133. Alt W.F., Blackwell K., De Pinho R., Reth M., Vancopoulos G. Regulation of genome rearrangement events during lymphocyte differentiation. *Immunological Review* 1986; 89:5.

- 
134. Alt W.F., Blackwell T.K., and Vancopoulos G.D. Development of the primary antibody repertoire. *Science* 1987; 238: 1079.
135. Kim, S., Davis M., Sinn E., Patten P., and Hood L. Antibody diversity: Somatic hypermutation of rearranged Vh genes. *Cell* 1981; 27 : 573-581.
136. Jacob, J., Kelsoe, G., Rajewsky, K., and Weiss, U.: Intraclonal generation of antibody mutants in germinal centres. *Nature* 1991, 354 : 389-392.
137. Gray, D., and Skarvail, H.: B-cell memory is shortlived in the absence of antigen. *Nature* 1988, 336:70-72.
138. Gray D.: The dynamics of immunological memory. *Semin. Immunol.* 1992, 4: 29-34.
139. Compbell, K.S., and Cambier, J.C. B-lymphocyte antigen receptors are non-covalently associated with a disulfide-linked, inducibly phosphorylated glucoprotein complex. *EMBO J.* 1990; 9: 441-448.
140. Pleiman, C.M., Dambrassio, D., and Cambier, J.C. The B-cell antigen receptor complex : structure and signal transduction. *Immunol Today* 1994; 15: 393-399.
141. Sefton, B.M., and Taddie, T.A. Role of tyrosine kinases in lymphocyte activation. *Curr. Opin. Immunol* 1994; 6: 372-379.
142. Peaker, C. Transmembrane signalling by the B-cell antigen receptor. *Curr. Opin. Immunol* 1994; 6: 359-363.

143. Yamanishi, Y., Kakinchi, T., Mizuguchi, J., Yamamoto T., and Toyoshima, K. Association of B-cell antigen receptor with protein tyrosine kinase Lyn. *Science* 1991; 251: 192-194.

144. Burkhardt, A.L., Brunswick, M., Bolen, J.B., and Mond, J.J. Anti-immunoglobulin stimulation of B lymphocytes activates Src-related protein-tyrosine kinases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1991; 88:7410-7414.

145. Fearon, D.T. The CD19-CR<sub>2</sub>-TAPA-1 complex, CD45 and signaling by the antigen receptor of B lymphocytes. *Curr. Opin. Immunol* 1993; 5:341-348.

146. Yamanishi, Y., Fukui, Y., Wangasant, B., Kinishita, Y., Ishimori, Y., Toyoshima, K., and Yamamoto, T. Activation of Src-like protein-tyrosine kinase Lyn and its association with phosphatidylinositol 3-kinase upon B-cell antigen receptor-mediated signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1992; 89:1118-1122.

147. Tedder, T.F., Zhou, L.J., and Engel, P. The CD19/CD21 signal transduction complex of B-lymphocytes. *Immunol. Today* 1994; 15: 437-442.

148. Hozumi N., Togenava S. Evidence for somatic rearrangement of immunoglobulin genes coding for variable and constant regions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 73: 3628, 1976.

149. Jabara H.H., Fu S.M., Geha R.S., Vercelli D. CD40 and IgE: Synergism between anti-CD40 monoclonal antibody and interleukin 4 in the induction of IgE synthesis by highly purified human B-cells. *J. Exp. Med.* 172:1861, 1990.

150. Hombach J., Tsudata T., Leclercq L., Stappert H., Reth M. Molecular components of B-cells antigen receptor complex of the IgM class. *Nature* 343: 760,1990

151. Clark E.A., Ledbetter J.A. How B and T cells talk to each other. *Nature* 367, 425, 1994.

152. Bijsterbosch M.K., Meade C.J., Turner G.A., Klaus G.G.: B-lymphocyte receptors and polyphosphoinositide degradation. *Cell* 41:999,1985

153. Abbas A.K.: A reassessment of the mechanisms of antigen-specific T-cell dependent B-cell activation. *Immunol. Today* 1988, 9: 89-94.

154. Lankester A.C., Van S.G., Rood P., Verhoeven A.J., and Van L.R.: B-cell antigen receptor crosslinking induces tyrosine phosphorylation and membrane translocation of a multimeric Shc complex that is augmented by CD19 coligation. *Eur. J. Immunol.* 1994, 24: 2818-2825.

155. Delespesse G., Suter U., Mossalayi D., et al : Expression, structure and function of the CD23 antigen. *Adv Immunol* 1991; 49: 149-191.

156. Gordon J.: CD23 and B-cell activation. *Clin Exp Allergy* 1992; 22: 199-204.

157. Safrani M., Bron D., Lagneaux L., Fonteyn C., Prost H., Delespesse G.: Elevation of IgE-binding factors in serum patients with B-cell-derived chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 1988; 71: 94-98.

158. Bansal AS, Roberts T, Hay EM, Kay R, Pumphrey RSH, Wilson PB.: Soluble CD23 levels are elevated in the serum of

---

patients with primary Sjogren's syndrome and systemic lupus erythematosus. *Clin Exp Immunol* 1992; 89: 452-455.

159. Chomarat P., Briolay J., Banchereau J., Miossec P.: Increased production of soluble CD23 in rheumatoid arthritis and its regulation by interleukin-4. *Arthritis Rheum* 1993; 36: 234-242.

160. Bansal AS., MacGregor AJ., Pumphrey RSH, Silman AJ., Ollier WER., Wilson PB.: Increased levels of sCD23 in rheumatoid arthritis are related to disease status. *Clin Exp Rheumatol* 1994; 12: 281-285.

161. Matsumoto T., Miike T., Yamaguchi K., Murakami M., Kawabe T., Yo-Doi J.: Serume levels of soluble IL-2 receptor, IL-4 and IgE-binding factors in childhood allergic diseases. *Clin Exp Immunol* 1991; 85: 288-292.

162. Kumagai S., Ishida H., Iwai K., et al: Possible different mechanisms of B-cell activation in systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis: opposite expression of low-affinity receptors for IgE (CD23) on their peripheral B-cells. *Clin Exp Immunol* 1989; 78: 348-353.

163. Davies D.R., Padian E.A., and Sheriff S.: Antigen: antibody complexes. *Ann Rev Biochem.* 1990; 59: 439-473.

164. Gresswell P.: Assembly, transport and function of MHC class II molecules. *Ann Rev Immunol* 1995; 12: 259-293.

165. Lanzavecchia A.: Receptor-mediated antigen uptake and its effect on antigen presentation to class II-restricted T lymphocytes. *Annu. Rev. Immunol.* 1993; 8: 773-793.

- 
166. Aubry J.P., Pochon S., Graber P., Jansen K.U. Bonnefoy J.Y.: CD21 is a ligand for CD23 and regulates IgE production. *Nature* 1992; 358-505.
167. Ravetch J.V., and Kinet J.: Fc receptors. *Ann. Rev. Immunol.* 1993; 9: 457-492.
168. Reth M.: Antigen receptors on B lymphocytes. *Ann. Rev. Immunol.* 1992; 10: 97.
169. Reth M.: B-cell antigen receptors. *Curr. Opin. Immunol.* 1994; 6: 3.
170. Tonegawa S.: Somatic generation of antibody diversity. *Nature* 1983; 302: 575.
171. Tedder T.F., Inaoki M., and Sato S.(1997): The CD19/21 complex regulates signal transduction thresholds governing humoral immunity and autoimmunity. *Immunity* 6, 107.
172. Freedman A.S., Freeman G., Whitman J., Segil J., Daley J., Levine H. and Nadler L.M.: Expression and regulation of CD5 on in vivo activated human B cells. *Eur J Immunol* 1989; 19: 849-855.
173. Youinou P., Mackenzie L.E., Lamour A., Mageed R.A. and Lydyard P.M.: Human CD5-positive B cells in lymphoid malignancy and connective tissue diseases. *Eur J Clin Invest* 1993; 2: 139-150.
174. Kawamura M., Wheeler C.J., Notkins A.L., Le thi Bich-Thuy.: Modulation of the expression of CD5 antigen on the surface of human peripheral B lymphocytes. *Cell Immunol* 1994; 159: 61-76.
175. Vemino L.A., Pisetsky D.S., Lipsky P.E.: Analysis of the expression of the CD5 by human B cells and correlation with functional activity. *Cell Immunol* 1992; 19: 185-197.

176. Cerutti A., Trentin L., Zambello R., Sancetta R., Milani A., Tassinari C., Adami F., Agostini C. and Semetzato G.: The CD5/CD72 receptor complex is co-expressed with several functionally relevant counter-structures on human B cells and delivers critical signalling activity. *J Immunol* 157: 5 1854-1862.

177. H Van de Vedle, I von Hoegen, B. Luo, Pames J.R., Thielemans K.: The B cell surface protein CD72/Lyb-2 is the ligand for CD5. *Nature* 1990; 351: 662.

178. Kinoshita T., Lavoise S., Nussenzweig V.: Regulatory proteins for the activated third and fourth components of complement (C3b and C4b) in mice. Identification and properties of complement receptor I (CR1). *J Immunol* 1985; 134: 2564-2470.

179. Fujimoto, M., Poe, J.C., Jansen, P.J., Sato, S., Tedder, T.F.: CD19 amplifies B lymphocyte signal transduction by regulating Src-family protein tyrosine kinase activation. *J. Immunol.* 1999; 162: 7088-7094.

180. Carter RH, Tuveson DA, Park DJ, Rhee SG, Fearon DT.: The CD19 complex of B lymphocytes. Activation of phospholipase C by a protein tyrosine-kinase-dependent pathway that can be enhanced by the membrane IgM complex. *J Immunol* 1991; 147: 3663-3671.

181. Kansas GS, Tedder TF : Transmembrane signals generated through MHC class II, CD19, CD20, CD39, and DC40 antigens induce LFA-1 dependent adhesion in human B-cells through a tyrosine kinase-dependent pathway. *J Immunol* 1991; 147: 4094-4102.

182. Croix D, Aheam J, Rosengard A, Han S, Kelsoe G, Ma M, Carroll M: Antibody response to a T-dependent antigen requires B



cell expression of complement receptors. *J Exp Med* 1996; 183: 1857-1864.

183. Fearon DT: Identification of the membrane glycoprotein that is the C3b receptor of the human erythrocyte, polymorphonuclear leukocyte, B lymphocyte, and monocyte. *J Exp Med* 1980; 152: 20-30.

184. LeBien TW, McKormack RT: The common acute lymphoblastic leukemia antigen (CD10). Emancipation from a functional enigma. *Blood* 1989; 73: 625.

185. Ritz J, Nadler LM, Ghan AK, et al: Expression of common acute lymphoblastic leukemia (cALLa) by lymphomas of B-cell and T-cell lineage. *Blood* 1981; 58: 648.

186. Metzgar RS, Borowitz MJ, Jones NJ, et al: Distribution of common acute lymphoblastic leukemia antigen in nonhematopoietic tissues. *J Exp Med* 1981; 154: 1249.

187. Clark EA and Lane PJL: Regulation of human B-cell activation and adhesion. *Annu Rev Immunol* 1991; 9: 97.

188. Fujimoto, M., Bradney, A.P., Poe, J.C., Steeber, D.A., Tedder, T.F.: Modulation of B lymphocyte antigen receptor signal transduction by a CD19/CD22 regulatory loop. *Immunity* (In Press).

189. Benedict, C.L., Gilfillan, S., Thai, T-H., and Kearney, J.F.: Terminal deoxynucleotidyl transferase and lymphocyte repertoire development. *Immunol. Rev.* 2000; 175: 150-157.

190. Cheng, C-J., Rowley, B., et al. Syk Tyrosine Kinase required for Mouse Viability and B-cell Development. *Nature*. 1995; 378: 303 - 306.

- 
191. Aubry JP, Pochon S, Gauchat JF, Nueba-Marin A, Holers VM, Graber P, Siegfried C, Bonnefoy JY.: CD23 interacts with a new functional extracytoplasmatic domain involving N-linked oligosaccharides on CD21. *J. Immunol* 1994; 152: 5806-5813.
192. Bonnefoy JY, Aubry JP, Gauchat JF, Graber P, Life P, Flore-Romo L, Mazzei G.: Receptors for IgE. *Curr Opin Immunol* 1993; 5: 944-947.
193. Delespesse G, Sarfati M, Wu CY, Fournier S, Letellier M.: The low affinity receptor for IgE. *Immunol Rev.* 1992; 125: 77-97.
194. Hellen EA, Rowlands DC, Hansel TT, Kitas GD, Crocker J.: Immunohistochemical demonstration of CD23 expression on lymphocytes in rheumatoid synovitis. *J Clin Pathol* 1991; 44: 293-296.
195. Tsunasawa S, Sakiyama F, Suemura M, Kishimoto T.: Molecular structure of human lymphocyte receptor for immunoglobulin E. *Cell* 1986; 47: 867-885.
196. Padlan EA, Helm BA.: Modeling of the lectin-homology domains of the human and murine low-affinity Fcepsilon receptor (Fcepsilon RII/CD23). *Receptor* 1993; 3: 325-341.
197. Richards ML, Katz DH.: Biology and chemistry of the low-affinity IgE receptor (Fcepsilon RII/CD23). *Crit Rev Immunol* 1991; 11: 65-86.
198. Kishimoto T.: A B cell specific differentiation antigen, CD23, is a receptor for IgE (Fcepsilon R) on lymphocytes. *J Immunol* 1987; 38: 2576-2580.

- 
199. Zyberk C, Bonnefoy JY.: CD23 regulates monocyte activation through a novel interaction with the adhesion molecules CD11b-CD18 and CD11c-CD18. *Immunity* 1995; 3: 119-125.
200. Roitt I., J.Brostoff and D. Male.: “Immunology”, Mosby., London, England, 1996, fourth edition.
201. Stitis, D.P., J.D.Stobo, J.V. Wells: “Basic and Clinical Immunology” 7<sup>th</sup> edition, Appleton and Lange (1991).
202. Mayumi M.et al.: “IgG subclass expression by human B-lymphocytes and plasma cells: B lymphocytes precommitted to IgG subclass can be preferentially induced by polyclonal mitogens with T cell help.” *J.Immuno* 1983; 130: 671.
203. Van de Winkel, J.G.J. and C.L. Anderson: “Biology of human immunoglobulin G Fc receptors.” *J. Leucocyte Biol.* 1991; 49: 511.
204. Van de Winkel, J.G.J. and P.J.A.Capel (eds): “Human IgG Fc receptors”. R.G. Landes Company, Austin, USA (1996)
205. Alley,C.D. and Mestecky,J.(1988) In B lymphocytes in human disease. Bird, G. and Calvert,J.E. (ed), Oxford Medical Publications, Oxford, p.223.
206. Burnet,F.M. (1975) The clonal selection theory of acquired immunity. Cambridge University Press, Cambridge.
207. Spangrude,G.J., Muller-Sieberg,C.E., Heimfeld,S.and Weissman, I.L.: Two rare populations of mouse Thy-1<sup>lo</sup> bone marrow cells populate the thymus. *J. Exp. Med* 1988; 167: 1671-1683.

208. Calvert, J.E. and Cooper, M.D. (1988) In B Lymphocytes in human disease. Bird, G. and Calvert, J.E. (ed), Blackwell Scientific Publications, Oxford, p.77.
209. M.M. Harnett and G.G. Klaus. G protein coupling of antigen receptor-stimulated polyphosphoinositide hydrolysis in B cells. *J Immunol* 1988; 140: 3135-3139.
210. R.W. Chesnut and H.M. Grey. Studies on the capacity of B cells to serve as antigen-presenting cells. *J Immunol* 1981; 126: 1075-1079.
211. V.M. Sanders, J.M. Snyder, J.W. Uhr, and E.S. Vitetta. Characterization of the physical interaction between antigen-specific B and T cells. *J Immunol* 1986; 137: 2395-2404.
212. N.R. Klinman. The mechanism of antigenic stimulation of primary and secondary clonal precursor cells. *J. Exp. Med.* 1972; 136: 241-260.
213. E.S. Vitetta, J. Ohara, C.D. Myers, J.E. Layton, P.H. Krammer, and W.E. Paul. Serological, biochemical, and functional identity of B cell-stimulatory factor 1 and B cell differentiation factor for IgG1. *J. Exp. Med.* 1985; 162: 1726-1731.
214. W.E. Pant and J. Chara. B-cell stimulatory factor-1/ Interleukin-4. *Ann.Rev.Immunol.* 1987; 5: 429-452.
215. Mojica, M. P., Perry, S. S., Searles, A. E., Elenitoba-Johnson, K. S. J., Pierce, L. J., Wiesmann, A., Slayton, W. B., Spangrude, G. J. Phenotypic Distinction and Functional Characterization of Pro-B Cells in Adult Mouse Bone Marrow. *J.Immunol.* 2001; 166: 3042-3051.

216. Li, Y. S., K. Hayakawa, R. R. Hardy. 1993. The regulated expression of B lineage associated genes during B cell differentiation in bone marrow and fetal liver. *J. Exp. Med.* 1993; 178: 951.

217. Marshall, A.J., H.E. Fleming, G.E. Wu, C. J. Paige. Modulation of the IL-7 dose-response threshold during pro-B cell differentiation is dependent on pre-B cell receptor expression. *J. Immunol.* 1998; 161: 6038.

218. Carsetti, R.. The development of B cells in the bone marrow is controlled by the balance between cell-autonomous mechanisms and signals from the microenvironment. *J. Exp. Med.* 2000; 191: 5.

219. Veiby, O.P., A.A. Mikhail, H.R. Snodgrass. Growth factors and hematopoietic stem cells. *Hematol. Oncol. Clin. North Am.* 1997; 11: 1173.

220. Tedder, T.F., L.T. Clement, M.D. Cooper. Expression of C3d receptors during human B cell differentiation: immunofluorescence analysis with the HB-5 monoclonal antibody. *J. Immunol.* 1984; 133: 678.

221. Reynes, M., J.P. Aubert, J.H. Cohen, J. Audouin, V. Tricottet, J. Diebold, M.D. Kazatchkine. Human follicular dendritic cells express CR1, CR2, and CR3 complement receptor antigens. *J. Immunol.* 1985; 135: 2687.

222. Fearon, D.T., R.H. Carter. The CD19/CR2/TAPA-1 complex of B lymphocytes: linking natural to acquired immunity. *Annu. Rev. Immunol.* 1995; 13: 127.

223. Matsumoto, A.K., J. Kopicky Burd, R.H. Carter, D.A. Tuveson, T.F. Tedder, D.T. Fearon. Intersection of the complement and immune systems: a signal transduction complex of the B

lymphocyte-containing complement receptor type 2 and CD19. *J. Exp. Med.* 1991; 173: 55.

224. Carter, R.H., D.T. Fearon. CD19: lowering the threshold for antigen receptor stimulation of B lymphocytes. *Science* 1992; 256: 105.

225. Dempsey, P.W., M.E.D. Allison, S. Akkaraju, C.C. Goodnow, D.T. Fearon. C3d of complement as a molecular adjuvant: bridging innate and acquired immunity. *Science* 1996; 271: 348.

226. Nemerow, G.R., R.A. Houghten, M.D. Moore, N.R. Cooper. Identification of an epitope in the major envelope protein of Epstein-Barr virus that mediates viral binding to the B lymphocyte EBV receptor (CR2). *Cell* 1989; 56: 369.

227. Lowell, C.A., L.B. Klickstein, R.H. Carter, J.A. Mitchell, D.T. Fearon, J.M. Ahearn. Mapping of the Epstein-Barr virus and C3dg binding sites to a common domain on complement receptor type 2. *J. Exp. Med.* 1989; 170: 1931.

228. Nemerow, G.R., R. Wolfert, M.E. McNaughton, N.R. Cooper. Identification and characterization of the Epstein-Barr virus receptor on human B lymphocytes and its relationship to the C3d complement receptor (CR2). *J. Virol.* 1985; 55: 347.

229. Nemerow, G.R., M.E. McNaughton, N.R. Cooper. Binding of monoclonal antibody to the Epstein Barr virus (EBV)/CR2 receptor induces activation and differentiation of human B lymphocytes. *J. Immunol.* 1985; 135: 3068.

230. Bohnsack, J.F., N.R. Cooper. CR2 ligands modulate human B cell activation. *J. Immunol.* 1988; 141: 2569.

231. Luxembourg, A.T., N.R. Cooper. Modulation of signaling

via the B cell antigen receptor by CD21, the receptor for C3dg and EBV. *J. Immunol.* 1994; 153: 4448.

232. Reljic, R., G. Cosentino, H.J. Gould. 1997. Function of CD23 in the response of human B cells to antigen. *Eur. J. Immunol.* 1997; 27: 572.

233. Vik, D.P., D.T. Fearon. Neutrophils express a receptor for iC3b, C3dg, and C3d that is distinct from CR1, CR2, and CR3. *J. Immunol.* 1985; 134: 2571.

234. Paccaud, J.P., J.L. Carpentier, J.A. Schifferli. Direct evidence for the clustered nature of complement receptors type 1 on the erythrocyte membrane. *J. Immunol.* 1988; 141: 3889.

235. Prechl, J., Baiu, D.C., Horvath, A., Erdei, A. (2002). Modeling the presentation of C3d-coated antigen by B lymphocytes: enhancement by CR1/2-BCR co-ligation is selective for the co-ligating antigen. *Int Immunol* 2002; 14: 241-247.

236. Hasegawa, M., Fujimoto, M., Poe, J.C., Steeber, D.A., Tedder, T.F. CD19 Can Regulate B Lymphocyte Signal Transduction Independent of Complement Activation. *The J Immunol* 2001; 167: 3190-3200.

237. Cherukuri, A., Cheng, P.C., Pierce, S.K. The Role of the CD19/CD21 Complex in B Cell Processing and Presentation of Complement-Tagged Antigens. *The J Immunol* 2001; 167: 163-172 .

238. Levy, S., Todd, S. C., Maecker, H. T. CD81 (TAPA-1): A molecule involved in signal transduction and cell adhesion in the immune system. *Annu. Rev. Immunol.* 1998; 16: 89-109.

239. Carroll, M.C. The role of complement and complement receptors in induction and regulation of immunity. *Annu. Rev.*

Immunol. 1998; 16: 545-568.

240. Fujimoto, M., Poe, J.C., Jansen, P.J., Sato, S., Tedder, T.F. CD19 Amplifies B Lymphocyte Signal Transduction by Regulating Src-Family Protein Tyrosine Kinase Activation. *The J Immunol* 1999; 162: 7088-7094.

241. Qin, D., Wu, J., Vora, K.A., Ravetch, J.V., Szakal, A.K., Manser, T., Tew, J.G. Fc $\gamma$  Receptor IIB on Follicular Dendritic Cells Regulates the B Cell Recall Response. *The J Immunol* 2000; 164: 6268-6275.

242. Fang, Y., Xu, C., Fu, Y.-X., Holers, V.M., Molina, H. Expression of Complement Receptors 1 and 2 on Follicular Dendritic Cells Is Necessary for the Generation of a Strong Antigen-Specific IgG Response. *The J Immunol* 1998; 160: 5273-5279.

243. Qin, D., Wu, J., Carroll, M.C., Burton, G.F., Szakal, A.K., Tew, J.G. Evidence for an Important Interaction Between a Complement-Derived CD21 Ligand on Follicular Dendritic Cells and CD21 on B Cells in the Initiation of IgG Responses. *The J Immunol* 1998; 161: 4549-4554.

244. Hess, M.W., Schwendinger, M.G., Eskelinen, E.-L., Pfaller, K., Pavelka, M., Dierich, M.P., Prodinger, W.M. Tracing uptake of C3dg-conjugated antigen into B cells via complement receptor type 2 (CR2, CD21). *Blood* 2000; 95: 2617-2623.

245. Su, L., Rickert, R.C., David, M. Rapid stat Phosphorylation via the B Cell Receptor. Modulatory role of CD19. *J. Biol. Chem.* 1999; 274: 31770-31774.

246. Reth, M., Wienands, J. Initiation and processing of signals from the B cell antigen receptor. *Annu. Rev. Immunol.* 1997; 15: 453-



479.

247. Nagar, B., Jones, R.G., Diefenbach, R.J., Isenman, D.E., Rini, J.M. X-ray Crystal Structure of C3d: A C3 Fragment and Ligand for Complement Receptor 2. *Science* 1998; 280: 1277-1281.

248. Liu, Y.-J., Xu, J., de Bouteiller, O., Parham, C. L., Grouard, G., Djossou, O., de Saint-Vis, B., Lebecque, S., Banchereau, J., Moore, K. W. Follicular Dendritic Cells Specifically Express the Long CR2/CD21 Isoform. *J. Exp. Med.* 1997; 185: 165-170.

249. Buhl, A.M., Pleiman, C.M., Rickert, R.C., Cambier, J.C. Qualitative Regulation of B Cell Antigen Receptor Signaling by CD19: Selective Requirement for PI3-Kinase Activation, Inositol-1,4,5-Trisphosphate Production and Ca<sup>2+</sup> Mobilization. *J. Exp. Med.* 1997; 186: 1897-1910.

250. Lu, L.-S., Tung, J., Baumgarth, N., Herman, O., Gleimer, M., Herzenberg, L.A., Herzenberg, L.A. Identification of a germ-line pro-B cell subset that distinguishes the fetal/neonatal from the adult B cell development pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2002; 99: 3007-3012.

251. Cornall, R.J., Cheng, A.M., Pawson, T., Goodnow, C.C. Role of Syk in B-cell development and antigen-receptor signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2000; 97: 1713-1718.

252. Miyaura, C., Onoe, Y., Inada, M., Maki, K., Ikuta, K., Ito, M., Suda, T. Increased B-lymphopoiesis by interleukin 7 induces bone loss in mice with intact ovarian function: Similarity to estrogen deficiency. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1997; 94: 9360-9365.

253. Morrison, S. J., N. Uchida, I. L. Weissman. The biology of hematopoietic stem cells. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* 1995; 11: 35.

254. Hozumi N., Tonegava S. Evidence for somatic rearrangement of immunoglobulin genes coding for variable and constant regions. *Prot. Natl. Acad. Sci. USA* 1976; 73: 3628.

255. Timmens W., Rozeboom T., Popema S. Fetal and neonatal development of human spleen: an immunohistological study. *Immunology* 1987; 60: 603.

256. Rolink A., Melchers F. Molecular and cellular origin of B lymphocyte diversity. *Cell* 1991; 66: 1081.

257. Monroe, J. G., M. J. Kass. Molecular events in B cell activation. I. Signals required to stimulate G<sub>0</sub> to G<sub>1</sub> transition of resting B lymphocytes. *J. Immunol.* 1985; 135:1674.

258. Allman, D. M., S. E. Ferguson, M. P. Cancro. Peripheral B cell maturation. I. Immature peripheral B cells in adults are heat-stable antigen<sup>hi</sup> and exhibit unique signaling characteristics. *J. Immunol.* 1992; 149:2533.

259. Chung, J. B., Sater, R. A., Fields, Allman, D. M., S. E. Ferguson, V. M. Lentz, M. P. Cancro. Peripheral B cell maturation. II. Heat-stable antigen<sup>hi</sup> splenic B cells are an immature developmental intermediate in the production of long-lived marrow-derived B cells. *J. Immunol.* 1993; 151:4431.

260. M. L., Erikson, J., Monroe, J. G. CD23 defines two distinct subsets of immature B cells which differ in their responses to T cell help signals. *Int Immunol* 2002; 14: 157-166.

261. Levine, M.H. et al. A B-cell receptor-specific selection step governs immature to mature B cell differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2000; 97: 2743-2748.

262. Φυσιολογία και Φυσιοπαθολογία του αίματος και των αιμοποιητικών οργάνων. Γεωργίος Ηλιόπουλος. Ιατρικές εκδόσεις «Πασχαλίδη». 3<sup>η</sup> έκδοση.

263. Loder, F., Mutschler, B., Ray, R.J., Paige, C.J., Sideras, P., Torres, R., Lamers, M.C., Carsetti, R. B cell development in the spleen takes place in discrete steps and is determined by the quality of B cell receptor–derived signals. *J. Exp. Med.* 1999; 190: 75-89.

264. Dorshkind, K. 1990. Regulation of hemopoiesis by bone marrow stromal cells and their products. *Annu. Rev. Immunol.* 1990; 8: 111-137.

265. Fournier S, Delespesse G, Rubio M, Biron G, Sarfati M. CD23 antigen regulation and signaling in chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Invest* 1992; 89: 1312-1321.

266. Kanzaki, M., M.A. Lindorfer, J.C. Garrison, and I. Kojima. (1997b). Activation of the calcium-permeable cation channel CD20 by alpha subunits of the Gi protein. *J. Biol. Chem.* 272: 14733-14739

267. Dorken B, Moller P, Pezzutto A, Schwartz-Albiez R, Molderhauer G. B-cell antigens: CD20. In: Knapp W, Dorken B, Gilks WR, et al, eds. *Leucocyte Typing IV: White Cell Differentiation Antigens.* Oxford: Oxford University Press; 1989:46-48.

268. Tedder, T.F., G. Klejman, S.F. Schlossman, and H. Saito. Structure of the gene encoding the human B lymphocyte differentiation antigen CD20 (B1). *J. Immunol.* 1989; 142: 2560-2568.

269. Bubien, J.K., L.J. Zhou, P.D. Bell, R.A. Frizzell, and T.F. Tedder. Transfection of the CD20 cell surface molecule into ectopic

cell types generates a  $Ca^{2+}$  conductance found constitutively in B lymphocytes. *J. Cell Biol.* 1993; 121: 1121-1132

270. Tedder, T.F., and Engel, P. CD20: a regulator of cell-cycle progression of B lymphocytes. *Immunol. Today* 1994; 15: 450-454.

271. Delespesse, G., H. Hofstetter and M. Safrati. Low affinity receptor for IgE (FC $\epsilon$ RII, CD23) and its soluble fragments. *Int. Arch. Allergy Appl Immunol* 1989; 90: 1-41.

272. Gordon, L., M.J. Millsum, M.J. Flores-Romo, et al. Regulation of resting and cycling human B-cell via surface IgM and the accessory molecules IL-4, CD23 and CD40. *Immunol* 1989; 68: 526.

273. Bengtsson M., et al. B cell reconstitution after autologous bone marrow transplantation : increase in serum CD23 ( IgE-binding factor) precedes IgE and B cell regeneration.

274. Safrati D., et al. Possible role of human lymphocyte receptor for IgE (CD23) or its soluble fragments in the in vitro synthesis of human IgE. *J. Immunol* 1988; 141: 2195-2199.

275. Bonnefoy JY, Lecoanet-Henchoz S, Aurby JP, Gauchat IF, Graber P. CD23 and B cell activation. *Curr Opin Immunol* 1995; 7:355-359.

276. Fournier S, Delespesse G, Rubio M, Biron G, Safrati M. CD23 antigen regulation and signaling in chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Invest* 1992; 89: 1312-1321.

277. Treisman, R. Regulation of transcription by MAP kinase cascades. *Curr. Opin. Cell Biol.* 1996; 8: 205-215.

278. Robinson, M.J. and Cobb, M.H. Mitogen-activated protein kinase pathways. *Curr. Opin. Cell Biol.* 1997; 9: 180-186.

279. Wisdom, R., Johnson, R. S. and Moor, C. c-Jun regulates cell cycle progression and apoptosis by distinct mechanisms. *EMBO J.* 1999; 18: 188-197.

280. Kamakura, S., Moriguchi, T., and Nishida, E. Activation of the protein kinase ERK5/BMK1 by receptor tyrosine kinases. Identification and characterization of a signaling path-way to the nucleus. *J. Biol. Chem.* 1999; 274: 26563-26571.

281. English, J.M., Pearson, G., Hockenberry, T., Shivakumar, L., White, M.A., and Cobb, M.H. Contribution of the ERK5/MEK5 pathway to Ras/Raf signalling and growth control. *J. Biol. Chem.* 1999; 274: 31588-31592.

282. Ellinger-Ziegelbauer, H., Kelly, K., and Siebenlist, U. Cell cycle arrest and reversion of Ras-induced transformation by a conditionally activated form of mitogen-activated protein kinase kinase kinase 3. *Mol. Cell. Biol.* 1999; 19: 3857-3868.

283. Adler, V., Pincus, M.R., Brandt-Rauf, P.W., and Ronai, Z. Complexes of p21Ras with JUN N-terminal kinase and JUN proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1995; 92: 10585-10589.

284. Russell, M., Lange-Carter, C.A., and Johnson, G.L. Direct interaction between Ras and the kinase domain of mitogen-activated protein kinase kinase kinase (MEKK1). *J. Biol. Chem.* 1995; 270: 11757-11760.

285. Waskiewicz, A.J., Flynn, A., Proud, C.G., and Cooper, J.A. Mitogen-activated protein kinases activate the serine/threonine kinases Mnk1 and Mnk2. *EMBO J.* 1997; 16: 1909-1920.

286. Chang L, Karin M. Mammalian MAP kinase signalling cascades. *Nature* 2001 Mar 1; 410(6824):37-40.

287. Pearson G, English JM, White MA, Cobb MH. ERK5 and ERK2 cooperate to regulate NF-kappaB and cell transformation. *J Biol Chem*. 2001; 276(11):7927-31.

288. Weston CR, Lambright DG, Davis RJ. Signal transduction. MAP kinase signaling specificity. *Science*. 2002 Jun 28; 296(5577):2345-7.

289. Baeuerle PA & Baltimore D: NF-κB: Ten years after. *Cell* 1996; 87: 13-20.

290. Robinson MJ & Cobb MH: Mitogen-activated protein kinase pathways. *Curr Opin Cell Biol* 1997; 9: 180-186.

291. Davis RJ: The mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway. *J Biol Chem* 1993; 268: 14553-6.

292. Su B & Karin M: Mitogen-activated protein kinase cascades and regulation of gene expression. *Curr Opin Immunol* 1996; 8: 402-11.

293. Geppert TD, Whitehurst CE, Thompson P, Beutler B: Lipopolysaccharide signals activation of tumor necrosis factor biosynthesis through the Ras/Raf-1/MEK/MAPK pathway. *Mol Med* 1994; 1: 93-103.

294. Reimann T, Buscher D, Hipskind RA, Krautwald S, Lohmann-Matthes M, Baccarini M: Lipopolysaccharide induces activation of the Raf-1/MAP kinase pathway. A putative role for Raf-1 in the induction of the IL-1β and the TNF-α genes. *J Immunol* 1994; 153: 5740-9.

- 
295. Hambleton J, Weinstein SL, Lem L, DeFranco AL: Activation of c-Jun N-terminal kinase in bacterial lipopolysaccharide-stimulated macrophages. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 2774-8.
296. Bos JL. Ras-like GTPases. *Biochim Biophys Acta* 1997; 1333: M19-31.
297. Yan J, Roy S, Apolloni A, Lane A, Hancock JF. Ras isoforms vary in their ability to activate Raf-1 and phosphoinositide 3-kinase. *J Biol Chem* 1998; 273: 24052-24056.
298. Taylor S, Shalloway D. Cell cycle-dependent activation of Ras. *Curr Biol* 1996; 6: 1621-1627.
299. Karin M; & Hunter T; Transcriptional control by protein phosphorylation: signal transmission from the cell surface to the nucleus. *Curr Biol* 1995; 5: 747.
300. Iritani BM, Forbush KA, Farrar MA, Perimutter RM. Control of B-cell development by Ras-mediated activation of Raf. *EMBO J* 1997; 16: 7019-7031.