



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
UNIVERSITY OF CRETE

ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ
FACULTY OF MEDICINE



Τ.Θ. 1393, Ηράκλειο Κρήτης

P.O.Box 1393, Heraklion Crete, Greece

**ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΟΥ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΥ ΤΗΣ ΘΡΟΜΒΟΠΕΝΙΑΣ
ΣΤΟΥΣ ΠΑΣΧΟΝΤΕΣ ΑΠΟ ΧΡΟΝΙΑ ΙΔΙΟΠΑΘΗ
ΟΥΔΕΤΕΡΟΠΕΝΙΑ ΤΟΥ ΕΝΗΛΙΚΟΥ ΜΗ ΑΝΟΣΟΛΟΓΙΚΗΣ
ΑΡΧΗΣ (NONIMMUNE CHRONIC IDIOPATHIC
NEUTROPENIA OF ADULTS, NI-CINA)**

**Διδακτορική Διατριβή
της
ΨΥΛΛΑΚΗ ΜΑΡΙΑ
ΙΑΤΡΟΣ**

Επιβλέπουσα: Ελένη Παπαδάκη, Επίκουρη Καθηγήτρια.

ΗΡΑΚΛΕΙΟ 2006

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ	ΣΕΛΙΔΕΣ
Βιογραφικό Σημείωμα	3-10
Πρόλογος	11
Ουδετεροπενίες	12-16
Χρόνια ιδιοπαθής ουδετεροπενία	17-39
Μεγακαρυοποίηση	40-72
Υλικά και μέθοδοι	73-96
Αποτελέσματα	97-107
Συζήτηση-Συμπεράσματα	108-111
Περίληψη	112-116
Βιβλιογραφία	116-146

ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ

ΠΡΟΣΩΠΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ

ΟΝΟΜΑ: ΜΑΡΙΑ
ΕΠΙΘΕΤΟ: ΨΥΛΛΑΚΗ
ΠΑΤΡΩΝΥΜΟ : ΣΤΥΛΙΑΝΟΣ
ΗΜΕΡ. ΓΕΝΝΗΣΕΩΣ: 10/07/1967
ΔΙΕΥΘΥΝΣΗ: Γρηγορίου Λαμπράκη 3 Νέα Αλικαρνασσό
71601 Ηράκλειο Κρήτης
ΤΗΛΕΦΩΝΟ: 2102843372, 6944474500
E-MAIL : Psyllaki@yahoo.gr
ΕΙΔΙΚΟΤΗΤΑ: ΑΙΜΑΤΟΛΟΓΟΣ

ΕΜΠΕΙΡΙΑ

Τελείωσα το Γενικό Λύκειο Καστελλίου το 1985. Τον Οκτώβριο του 1988 εισήχθη στην Ιατρική Σχολή Ηρακλείου Κρήτης μετά από Πανελλήνιες Εξετάσεις από την οποία και αποφοίτησα τον Ιούλιο του 1994 με βαθμό επιδόσεως “Λίαν καλώς” 7.15 (επτά και δέκα πέντε). Τον Αύγουστο του 1994 πήρα την άδεια ασκήσεως του ιατρικού επαγγέλματος.

Από 4/11/1994 έως 31/5/1996 υπηρέτησα ως γιατρός υπηρεσίας υπαίθρου στο Περιφερειακό Ιατρείο Ζάκρου του Κέντρου Υγείας Σητείας για την εκπλήρωση της προβλεπόμενης υπηρεσίας από το νόμο υπηρεσίας υπαίθρου.

Από 4/7/1996 έως και 3/2/1997 υπηρέτησα σε θέση ειδικευομένου Παθολογίας στο Παθολογικό τμήμα του Νομαρχιακού Γενικού Νοσοκομείου-Κέντρου Υγείας Σητείας.

Από 5/2/1997 έως και 6/10/1998 υπηρέτησα σε θέση ειδικευομένου Παθολογίας στο Β' Παθολογικό Τμήμα του Νομαρχιακού Γενικού Νοσοκομείου Χανίων “Ο Άγιος Γεώργιος”.

Από 4/12/1998 έως και 6/12/2002 υπηρέτησα σε θέση ειδικευόμενου Αιματολογίας στην Αιματολογική Κλινική του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Ηρακλείου.

Απόκτηση τίτλου ειδικότητας Αιματολογίας στις 6/2/2003

Από 17/6/2003 έως και 16/6/2004, εργάσθηκα ως επικουρικός αιματολόγος στην Αιματολογική Κλινική του Γενικού Νοσοκομείου Ηρακλείου Βενιζέλειο- Πανάνειο. Από 23/8/2004 έως και 22/8/2005 εργάσθηκα ως επικουρικός αιματολόγος στην Αιματολογική Κλινική του Γενικού Νοσοκομείου Ηρακλείου Βενιζέλειο-Πανάνειο. Από 29/5/2006 εργάζομαι ως επικουρικός αιματολόγος στο Γενικό Νοσοκομείο Ελευσίνας Θριάσιο.

ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΟ ΕΡΓΟ

Εκπόνηση διδακτορικής διατριβής το χρονικό διάστημα 2000-2006 στο εργαστήριο Αιματολογίας του Ιατρικού Τμήματος της Σχολής Επιστημών Υγείας του Πανεπιστημίου Κρήτης.

ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ ΣΕ ΙΑΤΡΙΚΑ ΠΕΡΙΟΔΙΚΑ

1) Increased frequency and specific reactivity of serum antinuclear antibodies in patients with nonimmune chronic idiopathic neutropenia of adults

Helen A. Papadaki **Maria Psyllaki** Dimitris G. Eliopoulos Aleka Tsiroyianni
George D. Eliopoulos

Acta Haematol 2001;105:13-20

2) Patients with non-immune chronic idiopathic neutropenia syndrome have increased splenic volume on ultrasography

H.A. Papadaki, N.Z. Charoulakis, D.G. Eliopoulos, **M. Psyllaki**, G.D. Eliopoulos

Clin. Lab. Haem. 2001,23,111-117

3) Assessment of bone marrow stem cell reserve and function and stromal cell function in patients with severe congenital neutropenia

Helen A. Papadaki, Frances M. Gibson, **Maria Psyllaki**, Edward C. Gordon-Smith, Judith C.W. Marsh, George D. Eliopoulos

Eur J Haematol 2001:67:245-251

4) Two patients with nonimmune chronic idiopathic neutropenia of adults developing acute myeloid leukemia with aberrant phenotype and complex karyotype but no mutations in granulocyte colony-stimulating factor receptor

H.A. Papadaki, T. Kosteas, C. Gemetzi, M. Alexandrakis, **M. Psyllaki**, G.D. Eliopoulos

Ann Hematol (2002) 81:50-54

5) Complete regression of primary gastric plasmacytoma following Helicobacter pylori eradication

H. A. Papadaki, P Skordilis , G. Minadakis, M. Roussomoustakaki , G. Katrinakis , **M. Psyllaki** , M. Tsardi E. Kouroumalis, G . D . Eliopoulos

Ann Hematol 2003 82:589-592

6) Alendronate reduces serum TNFalpha and IL-1beta, increases neutrophil counts, and improves bone mineral density and bone metabolism indices in patients with chronic idiopathic neutropenia (CIN)-associated osteopenia/osteoporosis.

Papadaki HA, Tsatsanis C, Christoforidou A, Malliaraki N, **Psyllaki M**, Pontikoglou C, Miliaki M, Margioris AN, Eliopoulos GD.

J Bone Miner Metab. 2004;22:577-87.

7) Neurofibromatosis type I and smoldering multiple myeloma: A case report.

Danilatou V, Liapi D, **Psyllaki M**, Chatzivasili A, Chronaki I, Heliakis P.

Hematology. 2006 ;11:45-8.

8) Effect of cA2 anti-tumor necrosis factor-alpha antibody therapy on hematopoiesis of patients with myelodysplastic syndromes.

Boula A, Voulgarelis M, Giannouli S, Katrinakis G, **Psyllaki M**, Pontikoglou C, Markidou F, Eliopoulos GD, Papadaki HA.

Clin Cancer Res. 2006;12:3099-108.

9) Impaired megakaryopoiesis in patients with chronic idiopathic neutropenia is associated with increased transforming growth factor β 1 production in bone marrow.

Psyllaki M, Damianaki A, Gemetzi K, Pyrovolaki K, Eliopoulos GD, Papadaki HA

.B J Heama .2006;134, 624-631.

ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΙΣ ΣΕ ΕΛΛΗΝΙΚΑ ΙΑΤΡΙΚΑ ΣΥΝΕΔΡΙΑ

1) Increased frequency and specific reactivity of serum antinuclear antibodies in nonimmune chronic idiopathic neutropenia syndrome

H.A Papadaki, **M. Psyllaki**, C.Ponticoglou, M. Niniraki, A. Tsiroyianni, G.D. Eliopoulos

11⁰ ΠΑΝΕΛΛΗΝΙΟ ΑΙΜΑΤΟΛΟΓΙΚΟ ΣΥΝΕΔΡΙΟ

ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗ 16-19 ΝΟΕΜΒΡΙΟΥ 2000

2) Patients with nonimmune chronic idiopathic neutropenia of adults have increased splenic volume on ultrasonography

H.A. Papadaki, C. Ponticoglou, **M. Psyllaki**, N.Z. Charoulakis, G.D. Eliopoulos

11⁰ ΠΑΝΕΛΛΗΝΙΟ ΑΙΜΑΤΟΛΟΓΙΚΟ ΣΥΝΕΔΡΙΟ

ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗ 16-19 ΝΟΕΜΒΡΙΟΥ 2000

3) Η αυξημένη απόπτωση των CD34⁺/CD33⁺ κοκκιοκυτταρικών προβαθμίδων ως πιθανός παθογενετικός μηχανισμός της υποπλαστικού τύπου χρ'ονιας ιδιοπαθούς ουδετεροπενίας του ενηλίκου.

Ε.Παπαδάκη, **M. Ψυλλάκη**, Κ. Γεμετζή, Ε. Κουταλά, Β. Βαλάτας, Μ. Νινιράκη, Α. Δαμιανάκη, Γ. Ηλιόπουλος

12⁰ ΠΑΝΕΛΛΗΝΙΟ ΑΙΜΑΤΟΛΟΓΙΚΟ ΣΥΝΕΔΡΙΟ

ΑΘΗΝΑ 22-25 ΝΟΕΜΒΡΙΟΥ 2001

4) Η θεραπεία με αντι-TNFα μονοκλωνικό αντίσωμα διορθώνει τις ποιοτικές και ποσοτικές διαταραχές των προγονικών αιμοποιητικών προβαθμίδων και του μυελικού αιμοποιητικού μικροπεριβάλλοντος σε ασθενείς με ρευματοειδή αρθρίτιδα

Ε. Παπαδάκη, Β. Βαλάτας **M. Ψυλλάκη**, Η. Κρητικός , Δ.Μπούμπας , Γ. Ηλιόπουλος

12⁰ ΠΑΝΕΛΛΗΝΙΟ ΑΙΜΑΤΟΛΟΓΙΚΟ ΣΥΝΕΔΡΙΟ

ΑΘΗΝΑ 22-25 ΝΟΕΜΒΡΙΟΥ 2001

5) Οξεία λευχαιμία με τρισωμία 4 και CD7⁺/CD56⁺ φαινοτυπική έκφραση αλλά χωρίς μεταλλάξεις στον υποδοχέα του G-CSF σε άρρωστη με χρόνια ιδιοπαθή ουδετεροπενία που θεραπεύονταν με G-CSF.

Ε. Ποτολίδης, Γ. Κατρινάκης, Θ. Κωστέας, **M. Ψυλλάκη**, Α. Μπουλά, Α. Φουντουλάκης, Γ.Δ. Ηλιόπουλος, Ε.Α. Παπαδάκη

13⁰ ΠΑΝΕΛΛΗΝΙΟ ΑΙΜΑΤΟΛΟΓΙΚΟ ΣΥΝΕΔΡΙΟ

ΠΑΤΡΑ 24-27 ΟΚΤΩΒΡΙΟΥ 2002

6) Μελέτη της μεγακαρυοποίησης στους πάσχοντες απο χρόνια ιδιοπαθή ουδετεροπενία του ενηλίκου

M.Ψυλλάκη, Α. Δαμιανάκη, Κ. Γεμετζή, Ε. Κουταλά, Γ.Δ. Ηλιόπουλος, Ε.Α. Παπαδάκη

13⁰ ΠΑΝΕΛΛΗΝΙΟ ΑΙΜΑΤΟΛΟΓΙΚΟ ΣΥΝΕΔΡΙΟ

ΠΑΤΡΑ 24-27 ΟΚΤΩΒΡΙΟΥ 2002

7) Όσιμη οστεοπέτρωση σε άνδρα 41 ετών

Α.Χριστοφορίδου, Α. Μπουλά, **M.Ψυλλάκη**, Ε. Ξυλούρη, Α. Φουντουλάκης, Γ. Ηλιόπουλος

11⁰ ΠΑΓΚΡΗΤΙΟ ΙΑΤΡΙΚΟ ΣΥΝΕΔΡΙΟ

ΧΑΝΙΑ ΚΡΗΤΗΣ 1-3 ΝΟΕΜΒΡΙΟΥ 2002

8) Πρωτοπαθη μη-malt εξωλεμφαδενικά λεμφώματα απο μεγάλα κύτταρα

Α. Μπουλά, Ε. Ξυλουρη, Α. Χριστογορίδου, **Μ. Ψυλλάκη**, Α. Φουντουλακης , Γ. Ηλιόπουλος

11⁰ ΠΑΓΚΡΗΤΙΟ ΙΑΤΡΙΚΟ ΣΥΝΕΔΡΙΟ

ΧΑΝΙΑ ΚΡΗΤΗΣ 1-3 ΝΟΕΜΒΡΙΟΥ 2003

9) Μελέτη της επίδρασης της θεραπείας με anti-TNFα μονοκλωνικό ανίσωμα στον αριθμό και τη λειτουργία των μυελικών αιμοποιητικών προβαθμίδων και τη λειτουργία των στρωματικών κυττάρων ασθενών με μυελοδυσπλαστικό σύνδρομο.

Α. Μπουλά, Χ. Ποντίκογλου, Α. Δαμιανάκη, Κ. Γεμετζή, Ε. Κουταλά, **Μ. Ψυλλάκη**, Γ. Κατρινάκης, Α. Φουντουλάκης, Φ. Μαρκίδου, Α. Κολοβού, Γ. Ηλιόπουλος, Ε. Παπαδάκη.

14⁰ ΠΑΝΕΛΛΗΝΙΟ ΑΙΜΑΤΟΛΟΓΙΚΟ ΣΥΝΕΔΡΙΟ

ΑΛΕΞΑΝΔΡΟΥΠΟΛΗ 13-16 ΝΟΕΜΒΡΙΟΥ 2003

10) Η χορήγηση alendronate (fosamax) στους πάσχοντες από χρόνια ιδιοπαθή ουδετεροπενία αυξάνει τον αριθμό των πολυμορφοκυττάρων στο αίμα μειώνοντας την παραγωγή TNFα

Ε. Παπαδάκη Α. Χριστοφορίδου, **Μ. Ψυλλάκη**, Α. Δαμιανάκη, Χ. Ποντίκογλου, Χ. Τσατσάνης, Γ. Ηλιόπουλος.

14⁰ ΠΑΝΕΛΛΗΝΙΟ ΑΙΜΑΤΟΛΟΓΙΚΟ ΣΥΝΕΔΡΙΟ

ΑΛΕΞΑΝΔΡΟΥΠΟΛΗ 13-16 ΝΟΕΜΒΡΙΟΥ 2003-12-13

11) Αποτελέσματα της κλινικής δοκιμής χορήγησης του αντι-TNFα μονοκλωνικού αντισώματος infliximab σε πάσχοντες απο μυελοδυσπλαστικό σύνδρομο.

Α. Μπουλά, Μ. Βουλγαρέλης, Σ. Γιαννούλη, Γ. Κατρινάκης, Φ. Μαρκίδου, **Μ. Ψυλλάκη**, Χ. Ποντίκογλου, Α. Δαμιανάκη Γ.Δ. Ηλιόπουλος, Ε.Α. Παπαδάκη.

16⁰ ΠΑΝΕΛΛΗΝΙΟ ΑΙΜΑΤΟΛΟΓΙΚΟ ΣΥΝΕΔΡΙΟ

ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗ 16-19 ΝΟΕΜΒΡΙΟΥ 2005

12) Η αναστολή του πολλαπλασιασμού των λευχαιμικών κυττάρων HMC-1 παρουσία ρετινοϊκού οξέος συνοδεύεται απο ελαττωμένη παραγωγή θρυπτάσης

Μ.Αλεξανδράκης , **Μ. Ψυλλάκη**, Α. Χριστοφορίδου, Ζ. Σαριδάκη

11⁰ ΠΑΝΕΛΛΗΝΙΟ ΑΙΜΑΤΟΛΟΓΙΚΟ ΣΥΝΕΔΡΙΟ

ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗ 16-19 ΝΟΕΜΒΡΙΟΥ 2000

13) Ιδιοπαθής αυτάνοση ουδετεροπενία ως αιτία γαλαζοκύανης ιστιοκυττάρωσης στο μυελό των οστών

Ε. Παπαδάκη , **Μ. Ψυλλάκη** , Ε. Μιχελακάκη , Θ. Ευαγγελίου , Γ. Ηλιόπουλος

12^ο ΠΑΝΕΛΛΗΝΙΟ ΑΙΜΑΤΟΛΟΓΙΚΟ ΣΥΝΕΔΡΙΟ

ΑΘΗΝΑ 22-25 ΝΟΕΜΒΡΙΟΥ 2001

14) Οι πάσχοντες απο συγγενή ακοκκιοκυτταραιμία του Kostmann έχουν μειωμένο αριθμό δεσμευμένων προγονικών προβαθμίδων στο μυελό αλλά φυσιολογικά αρχέγονα προγονικά αιμοποιητικά κύτταρα και φυσιολογική ικανότητα των στρωματικών κυττάρων στη στήριξη της in vitro κοκκιοποίησης

Ε. Παπαδάκη , **Μ. Ψυλλάκη** , F. Gibson, J.C. Marsh, Γ. Δ. Ηλιόπουλος

12^ο ΠΑΝΕΛΛΗΝΙΟ ΑΙΜΑΤΟΛΟΓΙΚΟ ΣΥΝΕΔΡΙΟ

ΑΘΗΝΑ 22-25 ΝΟΕΜΒΡΙΟΥ 2001

15) Χορηγήση αντι-TNF-α μονοκλωνικού αντισώματος βελτιώνει την αναιμία της χρονίας νόσου στους πάσχοντες απο ρευματοειδή αρθρίτιδα μειώνοντας την απόπτωση στο διαμέρισμα των μυελικών ερυθροκυτταρικών προβαθμίδων

Ε. Παπαδάκη , Β. Βαλάτας , Η. Κρητικός , **Μ. Ψυλλάκη** , Α. Δαμιανάκη , Κ. Γεμετζή , Ε. Κουταλά , Δ. Μπούμπας , Γ. Ηλιόπουλος

12^ο ΠΑΝΕΛΛΗΝΙΟ ΑΙΜΑΤΟΛΟΓΙΚΟ ΣΥΝΕΔΡΙΟ

ΑΘΗΝΑ 22-25 ΝΟΕΜΒΡΙΟΥ 2001

16) Εκτίμηση της οστικής νόσου στο πολλαπλού μυέλωμα. συσχέτιση μεταξύ των δεικτών μεταβολισμού και άλλων κλινικών παραμέτρων

Α. Χριστοφορίδου , Φ. Πάσσαμ , **Μ. Ψυλλάκη** , Α. Μπουλά , Δ. κυριάκου , Ν. Μαλλιαράκη , Ε. Καντιδάκη , Μ. Αλεξανδράκης , Γ. Ηλιόπουλος

12^ο ΠΑΝΕΛΛΗΝΙΟ ΑΙΜΑΤΟΛΟΓΙΚΟ ΣΥΝΕΔΡΙΟ

ΑΘΗΝΑ 22-25 ΝΟΕΜΒΡΙΟΥ 2001

17) Ιογενείς λοιμώξεις στον αιμοδοτικό πληθυσμό του νομού Ηρακλείου. σύγκριση με προηγούμενες μελέτες

Μ. Ψυλλάκη , Ε. Λυδάκη , Ε. Μπολωνάκη , Ε. Νικολούδη

11^ο ΠΑΓΚΡΗΤΙΟ ΙΑΤΡΙΚΟ ΣΥΝΕΔΡΙΟ

ΧΑΝΙΑ ΚΡΗΤΗΣ 1-3 ΝΟΕΜΒΡΙΟΥ 2002

ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΙΣ ΣΕ ΔΙΕΘΝΗ ΣΥΝΕΔΡΙΑ

1) Increased apoptosis of bone marrow erythroid cells . improvent following anti-tnfα antiboby treament

A. Papadaki H.A. Papadaki V. Valatas C. Gemetzi A. Damianaki H. Coutala **M. Psyllaki** P. Katonis H. Kouroumali; D. Boumpas G.D.Eliopoulos

7th CONGRESS OF THE EUROPEAN HEAMATOLOGY ASSOCIATION

FLORENCE , ITALY 6-9 JUNE 20002

2) Patients with non-immune chronic idiopathic neutropenia of adults (NI-CINA) display quantitative and functional abnormalities of haemopoietic progenitor cells in the bone marrow

Papadaki HA, Gemetzi C, Koutala H, **Psillaki M**, Cafetza M, Niniraki M, Katonis P, Eliopoulos GD

THE 1st NEUTROPENIA NETWORK CONFERENCE

HERAKLION, GREECE, 27-28 APRIL 2001

3) Increased frequency of HLA-DRB1*1302 haplotype in patients with non-immune chronic idiopathic neutropenia of adults (ni-cina)

Papadaki HA, **Psillaki M**, Coulohecheri SA, Spyropoulou M, Stavropoulos-Giokas C, Eliopoulos GD

THE 1st NEUTROPENIA NETWORK CONFERENCE

HERAKLION, GREECE, 27-28 APRIL 2001

4) Bone marrow stem cell disturbances in patients with nonimmune chronic idiopathic neutropenia of adult(ni-cina) are probably due to adnormal stromal cell function

H.A.Papadaki , **M. Psyllaki** , H. Coutala , C. Gemetzi , P. Katonis , G.D. Eliopoulos

6th CONGRESS OF THE EUROPEAN HEAMATOLOGY ASSOCIATION

FRANKFURT, GERMANY, 21-24 JUNE 2001

5) Increased apoptosis of the committed cells accounts for impaired granulopoiesis in non-immune chronic idiopathic neutropenia of adult (NI-CINA)

A. Papadaki H.A. Papadaki T. Kosteas C. Gemetzi A. Damianaki H. Coutala **M. Psyllaki** P. Katonis N. Anagnou J Bux G.D.Eliopoulos

7th CONGRESS OF THE EUROPEAN HEMATOLOGY ASSOCIATION

FLORENCE , ITALY 6-9 JUNE 20002

6) Point mutation in the extracellular domain of G-CSF receptor in a patient with chronic idiopathic neutropenia who developed CD7+/CD56+ myeloid/nk leukemia following treatment with G-CSF

P. Costeas, H.A Papadaki , C. Gemetzi (2), **M. Psyllaki** , G. Katrinakis , E. Potolidis N.P.Anagnou , G.D. Eliopoulos

8th CONGRESS OF THE EUROPEAN HEMATOLOGY ASSOCIATION

LYON, FRANCE, 12-15 JUNE 2003

7) Effect of CA2 ANTI-TNFA monoclonar antibody therapy on the bone marrow stem/progenitor cell reserve and function and stromal cell function in patients with myelodysplastic syndromes

A.Papadaki, A. Boula , A. Damianaki, C. Gemetzi , Z. Zidianakis, G. Katrinakis, A. Foundoulakis, **M. Psyllaki**, C. Ponticoglou, G.D. Eliopoulos

8th CONGRESS OF THE EUROPEAN HEMATOLOGY ASSOCIATION

LYON, FRANCE, 12-15 JUNE 2003

ΠΑΡΑΚΟΛΟΥΘΗΣΗ ΣΥΝΕΔΡΙΩΝ

Έχω παρακολουθήσει 15 ελληνικά συνέδρια και 9 διεθνή.

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα διατριβή εκπονήθηκε στο ερευνητικό εργαστήριο Αιματολογίας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Κρήτης στο διάστημα 2000-20006.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω μια σειρά από ανθρώπους που βοήθησαν στην διαδικασία εκπόνησης της διατριβής.

Επιστημονικά θα ήθελα να ευχαριστήσω πρώτα την επίκουρη καθηγήτρια κυρία Ελένη Παπαδάκη, όχι μόνο γιατί μου έδωσε την ευκαιρία να ασχοληθώ με ένα πολύ ενδιαφέρον θέμα αλλά κυρίως γιατί σε κάθε δυσκολία ήταν πρόθυμη να με βοηθήσει προσωπικά, να ξεπεράσω τυχόν προβλήματα σε εργαστηριακό και γνωστικό επίπεδο.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω επίσης στον επίτιμο καθηγητή κύριο Γεώργιο Ηλιόπουλο, ο οποίος με βοήθησε πολύ με συζητήσεις, συμβουλές καθώς και στην κατανόηση πολλών τεχνικών.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω όλο το προσωπικό του εργαστηρίου με το οποίο συνεργάστηκα αλλά και όλους όσους βοήθησαν με οποιοδήποτε τρόπο για την περάτωση της διατριβής αυτής.

ΟΥΔΕΤΕΡΟΠΕΝΙΕΣ

ΟΡΙΣΜΟΣ

Ως ουδετεροπενία ορίζεται η ελάττωση του αριθμού των κυκλοφορούντων στο αίμα ουδετερόφιλων πολυμορφοπύρηνων σε επίπεδα χαμηλότερα από τα κατώτερα όρια της φυσιολογικής διακύμανσης που αντιστοιχεί στην ηλικία και τη φυλή του ατόμου (1). Στην πράξη ως ουδετεροπενία χαρακτηρίζεται στον ενήλικα η ελάττωση των ουδετερόφιλων πολυμορφοπύρηνων του αίματος κάτω των 2500/μl για χρονική περίοδο μεγαλύτερη των 3 μηνών (1,2,3)

ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ

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

a) Ουδετεροπενίες απλαστικού τύπου. Οι ουδετεροπενίες αυτές, φερόμενες και ως ουδετεροπενίες κεντρικού τύπου ή τύπου I, οφείλονται στην μείωση της παραγωγής ουδετερόφιλων πολυμορφοπύρηνων, λόγω μείωσης του αριθμού των κυτταρικών τους προβαθμίδων στο μυελό. Η βλάβη αφορά και στα δύο κυτταρικά διαμερίσματα, αυτό των πολλαπλασιαζόμενων και εκείνο των ωριμαζόντων κυττάρων. Στο αίμα η ελάττωση αφορά εξίσου στο διαμέρισμα των κυκλοφορούντων και των προσκολλημένων στα αγγειακά τοιχώματα κυττάρων. Οι ουδετεροπενίες απλαστικού τύπου διακρίνονται σε συγγενείς και επίκτητες. Στις συγγενείς περιλαμβάνονται η νόσος του Kostmann (4-8), η καλοήθης οικογενής ουδετεροπενία (9-10), η συγγενής κυκλική ουδετεροπενία (11-14), καθώς και ουδετεροπενίες

συνοδεύουσες άλλες συγγενείς διαταραχές (15-26). Στις επίκτητες απλαστικού τύπου ουδετεροπενίες εντάσσονται οι ουδετεροπενίες που οφείλονται σε φάρμακα (27-28) ή προϊόντα της βιομηχανικής χημείας, οι ουδετεροπενίες που προκαλούνται από ιονίζουσα ακτινοβολία (29-30), αυτές που προκαλούνται από διήθηση του μυελικού οργάνου από νεοπλασματικό ιστό και οι ουδετεροπενίες που συνοδεύουν την απλαστική αναιμία (31-32).

β) Ουδετεροπενίες από μη αποδοτική κοκκιοποίηση. Στις ουδετεροπενίες αυτές, τις λεγόμενες και ουδετεροπενίες τύπου II, η μείωση του αριθμού των ουδετερόφιλων πολυμορφοπύρηνων οφείλεται στον αυξημένο ενδομυελικό θάνατο των κοκκιοκυτταρικών προβαθμίδων. Σε αυτές, το διαμέρισμα των πολλαπλασιαζόμενων κυττάρων είναι έντονα υπερπλαστικό ενώ παρατηρείται σημαντική ελάττωση των ωριμαζόντων κυττάρων, ιδιαίτερα των αποθηκών των ουδετερόφιλων πολυμορφοπύρηνων. Παρατηρούνται σε έλλειψη βιταμίνης B₁₂ ή φυλλικού οξέος (33), σε έλλειψη χαλκού (34-35), σε σιδηροπενική αναιμία (σπάνια) (36) και σε μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα (37).

γ) Ουδετεροπενίες περιφερικού τύπου. Οι ουδετεροπενίες αυτές που φέρονται και ως ουδετεροπενίες τύπου III, προκαλούνται από αυξημένη καταστροφή ουδετερόφιλων πολυμορφοπύρηνων στην περιφέρεια, κυρίως στο σπλήνα και στο συκώτι. Η καταστροφή αυτή είναι συνέπεια υπερσπληνισμού (38-40), ή παρουσίας αντισώματος στην επιφάνεια τους (41-42), είτε σε αυξημένο πέρασμα πολυμορφοπύρηνων από την αιματική κυκλοφορία στους ιστούς(43). Στις ουδετεροπενίες που οφείλονται σε αντισώματα εντάσσονται : 1. Η νεογνική ή ισοάνοση ουδετεροπενία (44-48) (issoimmune neonatal neutropenia) 2. Η ιδιοπαθής αυτοάνοση ουδετεροπενία (autoimmune neutropenia) (1, 49-52) 3. Οι δευτεροπαθείς αυτοάνοσες ουδετεροπενίες που συνοδεύουν αυτοάνοσα νοσήματα (53) όπως ο

συστηματικός ερυθρηματώδης λύκος (53-58) το σύνδρομο Felty (53,58-61) το σύνδρομο Sjogren (62), η χρόνια ενεργή ηπατίτιδα (63), ή άλλα νοσήματα όπως είναι τα λεμφοϋπερπλαστικά σύνδρομα (64) και η νόσος του Hodgkin (65-66). 4. Οι ανοσοαλλεργικές ουδετεροπενίες από φάρμακα (αντίσωμα που στρέφεται έναντι απτινικού συμπλέγματος) “απτίνη-πρωτεΐνη” πάνω στην επιφάνεια των κυττάρων (27,67-69).

δ) Ουδετεροπενίες από διαταραχή της κατανομής των κοκκιοκυττάρων, ή τύπου IV. Οι ουδετεροπενίες αυτές δεν είναι αληθείς, αφού δεν πρόκειται για πραγματική ελάττωση του αριθμού των ουδετερόφιλων πολυμορφοπύρηνων στον οργανισμό, αλλά για μετακίνηση πολυμορφοπύρηνων από το διαμέρισμα των κυκλοφορούντων, στο διαμέρισμα των προσκολλημένων στα αγγειακά τοιχώματα κοκκιοκυττάρων (ψευδοουδετεροπενίες) (70).

Η ταξινόμηση των ουδετεροπενιών με φυσιοπαθολογικά κριτήρια, η οποία είναι ανάλογη εκείνης των αναιμιών, φαίνεται ότι δεν προσφέρεται για τη διερεύνηση μιας ουδετεροπενίας σε πρακτικό κλινικό επίπεδο.

Στην εμπειρική ταξινόμηση οι ουδετεροπενίες χωρίζονται σχετικά εύκολα σε συγγενείς και επίκτητες. Ως συγγενείς χαρακτηρίζονται οι ουδετεροπενίες που μεταβιβάζονται κληρονομικά στους κατιόντες ή σχετίζονται με διαταραχές που αναπτύχθηκαν κατά την εμβρυϊκή ζωή. Διακρίνονται σε οικογενής (9-10), φυλετικές (10), αμιγείς και συνδυαζόμενες με ανοσολογικές διαταραχές ή/και ποικίλες άλλες συγγενείς ανωμαλίες. Μερικές από αυτές είναι αρκετά συχνές, όπως η οικογενής ουδετεροπενία, ενώ άλλες είναι πολύ σπάνιες, όπως η ακοκκιοκυτταραιμία του Kostmann (4,6).

Οι επίκτητες ουδετεροπενίες διακρίνονται σε ιδιοπαθείς άγνωστης αιτιολογίας (1, 13) και παθογενετικού μηχανισμού και σε δευτεροπαθείς που συνοδεύουν διάφορα νοσήματα. Οι δευτεροπαθείς ουδετεροπενίες μπορεί να είναι από μυελοπάθεια (71-72), ανοσολογικής αρχής (46,63), λοιμώδους αιτιολογίας (73-74) ή φαρμακευτικής αιτιολογίας(26).

ΠΙΝΑΚΑΣ 1:ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ ΟΥΔΕΤΕΡΟΠΕΝΙΩΝ

Φυσιοπαθολογική ταξινόμηση

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

Εμπειρική Ταξινόμηση

1. Συγγενείς Ουδετεροπενίες
2. Επίκτητες Ουδετεροπενίες
 - α. Ιδιοπαθείς
 - β. Δευτεροπαθείς
 - I. Ουδετεροπενίες από μυελοπάθεια
 - II. Ουδετεροπενίες ανοσολογικής αρχής
 - III. Ουδετεροπενίες λοιμώδους αιτιολογίας
 - IV Ουδετεροπενίες φαρμακευτικής αιτιολογίας
 - V Υπερσπληνισμός

ΧΡΟΝΙΑ ΙΔΙΟΠΑΘΗΣ ΟΥΔΕΤΕΡΟΠΕΝΙΑ

Η χρόνια ιδιοπαθής ουδετεροπενία (Chronic idiopathic neutropenia, CIN) είναι ένας ευρέως χρησιμοποιούμενος περιγραφικός όρος, ο οποίος χρησιμοποιείται για να υποδηλώσει την ανεξήγητη μείωση του αριθμού των κυκλοφορούντων ουδετεροφίλων, κάτω από τα κατώτερα όρια της φυσιολογικής διακύμανσης, σε ένα δεδομένο εθνικό πληθυσμό, για μεγάλη περίοδο του χρόνου, περισσότερο από τρεις μήνες (1, 75-76). Τουλάχιστον δύο τύποι αυτής της διαταραχής μπορούν να αναγνωρισθούν, η *ανοσολογικής αρχής CIN* που οφείλεται στην ύπαρξη αντιπολυμορφοπυρηνικών αντισωμάτων (1, 75-83), κυκλοφορούντων ανοσοσυμπλέγμάτων (84), μη ειδικής προσκόλληση ανοσοσφαιρίνης στα πολυμορφοπύρρηνα (85), αντισωμάτων εναντίων των μυελικών προβαθμίδων (86), καταστολή της μυελοποίησης από κυτταρολυτικά T- λεμφοκύτταρα (87) και η *μη ανοσολογικής αρχής CIN* της οποίας η αιτιολογία και ο παθογενετικός μηχανισμός είναι άγνωστα. Ωστόσο κατά τη διάρκεια των τελευταίων χρόνων υπάρχουν ενδείξεις ότι η μη ανοσολογικής αρχής CIN πιθανόν να προκαλείται από προ-φλεγμονώδης κυτταροκίνες και χυμοκίνες και πιθανόν να αποτελεί ένα χωριστό σύνδρομο το οποίο χαρακτηρίζεται από ομοιογενή κλινικά χαρακτηριστικά και μάλλον όμοια φυσική πορεία. (3, 94, 112, 129)

ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΑ ΚΡΙΤΗΡΙΑ

Τα διαγνωστικά κριτήρια της CIN φαίνονται στον πίνακα 2 (2, 88, 94).

Αυτή η κατάσταση μπορεί να αναγνωρισθεί από τους άλλους τύπους χρόνιας ουδετεροπενίας από τον επίκτητο χαρακτήρα της, τη συνήθως καλοήθη έκβαση της, την έλλειψη κυτταρογεννετικών ανωμαλιών, το αρνητικό ιστορικό έκθεσης σε

ιονίζουσα ακτινοβολία, χημικές ουσίες ή άλλα φάρμακα τα οποία μπορούν να προκαλέσουν ουδετεροπενία , την απουσία κλινικών και εργαστηριακών ευρημάτων για οποιαδήποτε υποκείμενη νόσο στην οποία θα μπορούσε να αποδοθεί η ουδετεροπενία και τις αρνητικές δοκιμασίες για αντισώματα εναντίων των ουδετερόφιλων. Παρά το γεγονός ότι πολλά από τα παραπάνω κριτήρια είναι κριτήρια αποκλεισμού, αυτός ο ορισμός φαίνεται να περιγράφει μάλλον μια ομογενής υποομάδα ασθενών με δυσερμηνευτή χρόνια ουδετεροπενία.

Με βάση τη σοβαρότητα της ουδετεροπενίας η διαταραχή αυτή μπορεί να χαρακτηριστεί ως “ήπια” εάν ο αριθμός των ουδετεροφίλων κυμαίνεται από 1800 ως 2499 ανά μλ αίματος , “μέτριας βαρύτητας” εάν ο αριθμός κυμαίνεται από 500 έως 1799 ανά μλ και “βαριά” εάν ο αριθμός των ουδετερόφιλων είναι κάτω από 500 ανά μλ αίματος .(94) Ο όρος “ακκοκιοκυτταραιμία” χρησιμοποιείται για τους ασθενείς εκείνους με αριθμό ουδετερόφιλων κάτω από 100 ανά μλ αίματος ενώ ο όρος “ έκδηλη ουδετεροπενία”(pronounced neutropenia) χρησιμοποιείται για να υποδηλώσει όλες τις περιπτώσεις ήπιας και σοβαρής ουδετεροπενίας μαζί (88,89) . Κατά κοινή ομολογία τα όρια μεταξύ ήπιας και μέτριας βαρύτητας ουδετεροπενία είναι αυθαίρετα. Άλλοι έχουν αυθαίρετα υποστηρίξει τα όρια των 500-1000 ουδετεροφίλων ανά μλ για τη μέτριας βαρύτητας ουδετεροπενία και τα όρια των 1000-1500 ουδετεροφίλων ανά μλ για την ήπια ουδετεροπενία (90,91).

ΠΙΝΑΚΑΣ 2 ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΑ ΚΡΙΤΗΡΙΑ C1N (2, 88, 94)

<p>1. Αριθμός κυκλοφορούντων ουδετερόφιλων κάτω από 2500 ανά μl αίματος του σε τέσσερις τουλάχιστον συνεχείς μετρήσεις αίματος που έγιναν ανά μήνα , μέσα στους τρεις τελευταίους μήνες της παρακολούθησης.</p>
<p>2. Αποκλεισμό κυκλικής ή οικογενούς ουδετεροπενίας με την διενέργεια κατάλληλων εξετάσεων αίματος .</p>
<p>3. Αποκλεισμός προηγούμενης έκθεσης σε ακτινοβολία ή λήψης κυτταροτοξικών αντικαρκινικών ή άλλων φαρμάκων, από αυτά που έχουν ενοχοποιηθεί ως δυνάμενα να προκαλέσουν ουδετεροπενία.</p>
<p>4. Αποκλεισμός οποιασδήποτε συστηματικής νόσου από αυτές που χαρακτηρίζονται ή συνοδεύονται από ουδετεροπενία μετά από λεπτομερή αιματολογικό, κυτταρογενετικό, βιοχημικό, ανοσολογικό, βακτηριολογικό, βιολογικό, παρασιτολογικό έλεγχο, καθώς και υπερηχογραφικό έλεγχο κοιλίας</p>
<p>5. Αρνητικές δοκιμασίες λευκοσυγκόλλησης και ανοσοφθορισμού στην αναζήτηση αντιπολυμορφοπυρηνικών αντισωμάτων, προσκολλημένων στα κοκκιοκύτταρα ή και κυκλοφορούντα στον ορό.</p>
<p>6. Φυσιολογικός καρυότυπος μυελού των οστών</p>

ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ

Η συχνότητα της CIN στο γενικό πληθυσμό είναι άγνωστη. Εντούτοις έχει υπολογισθεί ότι η συχνότητα της έκδηλης ουδετεροπενίας στο πληθυσμό της Κρήτης είναι 1.67%.(92). Η νόσος αφορά κυρίως γυναίκες (93). Σε μια σειρά από 183 ασθενείς εγγεγραμμένους στην Μονάδα Ουδετεροπενιών στην Κρήτη η σχέση ανδρών προς γυναικών ήταν 5:1. Στην ίδια σειρά των ασθενών περίπου 65% ήταν ηλικίας 30-59 ετών, 20% ήταν ηλικίας 15-30 και 15% ήταν ηλικίας 60-79 ετών κατά τη διάγνωση (94). Αυξημένη συχνότητα του απλοτύπου HLA-DRB1*1302 ορίζει ένα σχετικό κίνδυνο 8.36 για την ανάπτυξη της διαταραχής (95).

ΚΛΙΝΙΚΕΣ ΕΚΔΗΛΩΣΕΙΣ

Οι ασθενείς με CIN είναι συνήθως ασυμπτωματικοί και η διάγνωση γίνεται τυχαία από γενική αίματος που γίνεται για άλλους λόγους. Η ουδετεροπενία μπορεί να υπάρχει για χρόνια ή ακόμα και καθόλη τη διάρκεια της ζωής, αλλά οι ασθενείς να ανταποκρίνονται στις βακτηριακές λοιμώξεις με σημαντική αύξηση του αριθμού των κυκλοφορούντων ουδετεροφίλων (94,130). Αυτόματη διόρθωση της ουδετεροπενίας μπορεί να παρατηρηθεί σπάνια (94). Ωστόσο μερικοί από αυτούς τους ασθενείς μπορεί να παρουσιάζουν μια ποικιλία από κλινικά συμπτώματα και εργαστηριακά ευρήματα που απαιτούν περαιτέρω διερεύνηση και αντιμετώπιση.

ΛΟΙΜΩΞΕΙΣ

Λοιμώξεις που να σχετίζονται με την ουδετεροπενία είναι ασυνήθεις στους ασθενείς με CIN παρά το χαμηλό αριθμό των κυκλοφορούντων ουδετεροφίλων (1, 94, 96). Επαναλαμβανόμενες λοιμώξεις από το αναπνευστικό, ουροποιητικό σύστημα ή το δέρμα, οι οποίες να απαιτούν θεραπεία με αντιβιοτικά έχουν

παρατηρηθεί σε περιορισμένο αριθμό ασθενών με χρόνια ιδιοπαθής ουδετεροπενία (1,96). Επίμονη ρινίτιδα έχει παρατηρηθεί σποραδικά στους ασθενείς με CIN (97-99, 131). Στη σειρά των 183 ασθενών της Κρήτης με αριθμό ουδετεροφίλων από 393 έως 2499 ανά μl αίματος η συχνότητα των λοιμώξεων έχει εκτιμηθεί σε 2,09% ανά έτος (94) ενώ σοβαρές λοιμώξεις που να απαιτούν την χορήγηση ανασυνδυασμένου αυξητικού παράγοντα των πολυμορφοκυττάρων (recombinant human granulocyte colony stimulating factor, rhG-CSF) παρατηρήθηκαν μόνο σ' ένα ασθενή. Ο κίνδυνος για βακτηριακές λοιμώξεις στους ασθενείς με CIN εξαρτάται από τη σοβαρότητα της ουδετεροπενίας και από τα επίπεδα στο πλάσμα του διαλυτού υποδοχέα Fcγ-RIII (soluble CD16) (100). Γενικά οι ασθενείς με CIN ανταποκρίνονται στην χορήγηση ανασυνδυασμένου αυξητικού παράγοντα των πολυμορφοκυττάρων ((recombinant human granulocyte colony-stimulating factor, rhG-CSF) αυξάνοντας γρήγορα τον αριθμό των κυκλοφορούντων ουδετερόφιλων ακόμα και σε χαμηλές δόσεις της κυτταροκίνης (101-102).

ΣΠΛΗΝΟΜΕΓΑΛΙΑ

Κλινικά ανιχνεύσιμη σπληνομεγαλία είναι πολύ σπάνια στους ασθενείς με CIN (1, 94). Εντούτοις αύξηση του όγκου του σπληνός, όπως εκτιμήθηκε από τον προσδιορισμό του διορθωμένου σπληνικού δείκτη (corrected splenic index) (CSI) στο υπερηχογράφημα, ήταν αυξημένος στο 48.1% των ασθενών με CIN της Κρήτης (103). Σε όλους τους ασθενείς, ο διορθωμένος σπληνικός δείκτης, σχετιζόταν αντιστρόφως με τον αριθμό των κυκλοφορούντων ουδετερόφιλων και λεμφοκυττάρων αλλά όχι με τα επίπεδα της αιμοσφαιρίνης ή τον αριθμό των κυκλοφορούντων μονοκυττάρων και αιμοπεταλίων (103). Πιθανόν ο αυξημένος σπληνικός δείκτης σε αυτούς τους ασθενείς να αντανάκλα την υπερπλασία των ενεργοποιημένων σπληνικών μακροφάγων και των ενεργοποιημένων ενδοθηλιακών

κυττάρων μιας και τα επίπεδα των προ-φλεγμονωδών κυτταροκινών που προέρχονται από τα μακροφάγα και τα επίπεδα των διαλυτών μορίων προσκόλλησης που προέρχονται από τα ενδοθηλιακά κύτταρα είναι και τα δύο αυξημένα στον ορό των ασθενών. Στη βάση αυτών των παρατηρήσεων έχει προταθεί ότι ο αυξημένος σπληνικός δείκτης στους ασθενείς με CIN πιθανόν επηρεάζει την κυκλοφορία των λευκοκυττάρων μέσω της αυξημένης απομόνωσης και/ή εξαγγείωσης των ουδετερόφιλων και λεμφοκυττάρων στον σπλήνα(103) .

ΟΣΤΕΟΠΕΝΙΑ ΚΑΙ ΟΣΤΕΟΠΟΡΩΣΗ

Περίπου 38% των ασθενών με CIN στην Κρήτη παρουσιάζουν μυοσκελετικά άλγη οφειλόμενα σε οστεοαρθρίτιδα ή οστεοπόρωση σε σύγκριση με μόνο 6% των υγιών μαρτύρων ανάλογης ηλικίας και φύλου (94). Σε μια μελέτη από 45 μη επιλεγμένους ασθενείς που ποτέ δεν είχαν λάβει θεραπεία με G-CSF η οστική πυκνότητα (bone mineral density) ήταν σημαντικά μειωμένη και η τιμή της οστικής πυκνότητας συσχετιζόταν ισχυρά με το βαθμό της ουδετεροπενίας (104). Με βάση τα προηγούμενα δημοσιευμένα κριτήρια οστεοπενία διαγνώσθηκε στο 44.4% και οστεοπόρωση στο 15,6% των ασθενών. Αυτοί οι ασθενείς επίσης είχαν αυξημένες συγκεντρώσεις στα ούρα του αμινοτελοπεπτιδίου του κολλαγόνου I (NTx), υποδηλωτικό της αυξημένης οστικής απορρόφησης καθώς επίσης και αυξημένα επίπεδα οστεοκαλσίνης (OC) στον ορό, υποδηλωτικά του αυξημένου οστικού σχηματισμού. Οι τιμές τόσο του αμινοτελοπεπτιδίου όσο και της οστεοκαλσίνης σχετιζόνταν αντίστροφα με τις τιμές της οστικής πυκνότητας και θετικά με τα επίπεδα του παράγοντα νέκρωσης του όγκου (tumor necrosis factor- α ,TNF- α) (104). Οι μεταβολές αυτές των βιοχημικών δεικτών του οστικού μεταβολισμού είναι υποδηλωτικές του αυξημένου οστικού turnover οδηγώντας με το χρόνο σε απώλεια οστικής μάζας. Έχει προταθεί ότι η αυξημένη απορρόφηση οστού πιθανά σχετίζεται

με την αυξημένη παραγωγή προ-φλεγμονωδών κυτταροκινών κυρίως του TNF-α στους ασθενείς αυτούς (104). Η χορήγηση alendronate στους ασθενείς αυτούς βελτιώνει την οστική πυκνότητα και τους δείκτες οστικού μεταβολισμού και αυξάνει τον αριθμό των ουδετεροφίλων μέσω μείωσης των επιπέδων στον ορό του TNF-α και της IL-1β (132).

ΦΥΣΙΚΗ ΠΟΡΕΙΑ

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω η ουδετεροπενία μπορεί να υπάρχει για χρόνια ή σε όλη τη διάρκεια της ζωής των ασθενών με CIN. Διακυμάνσεις στις τιμές των ουδετεροφίλων δεν είναι ασυνήθης αλλά αυτόματη διόρθωση του αριθμού των ουδετεροφίλων σπάνια μπορεί να συμβεί (1,90-91). Καμιά θεραπεία για την ουδετεροπενία αυτή καθ' αυτή δε συνιστάται. Ασθενείς με σοβαρή ουδετεροπενία και λοιμώξεις μπορεί να θεραπευτούν με αντιβιοτικά και G-CSF.

Έχει δημοσιευθεί ότι καμιά περίπτωση συστηματικού ερυθρηματώδους λύκου, ρευματοειδούς αρθρίτιδος, λευχαιμίας, ή άλλης συστηματικής νόσου δεν έχει αναπτυχθεί στους ασθενείς αυτούς κατά τη διάρκεια μακροχρόνιας παρακολούθησης (91). Ωστόσο ο Auner και οι συνεργάτες του δημοσίευσαν πρόσφατα δύο περιπτώσεις στις οποίες χρόνια ιδιοπαθής ουδετεροπενία προηγήθηκε οξείας μυελογενούς λευχαιμίας και διατύπωσαν την άποψη ότι η διαταραχή αυτή μπορεί να αποτελεί μια προλευχαιμική κατάσταση (105). Ένας από τους ασθενείς της Κρήτης ανέπτυξε οξεία μυελογενής λευχαιμία και ένας δεύτερος οξεία multilineage λευχαιμία μετά από 34 και 64 μήνες αντίστοιχα από τη διάγνωση(106). Τέλος πρόσφατα περιγράφηκε η περίπτωση ασθενούς που ανέπτυξε οξεία μυελογενής /NK λευχαιμία από προγονικά κύτταρα μετά από 11 χρόνια από τη διάγνωση και τέσσερις μήνες μετά από θεραπεία με G-CSF και η οποία παρουσίασε σημειακή μετάλλαξη

στην ενδοκυττάρια περιοχή του υποδοχέα του G-CSF και τρισωμία 4 (107). Πάνω στη βάση αυτών των παρατηρήσεων έχει προταθεί ότι η χρόνια ιδιοπαθής ουδετεροπενία πιθανόν να είναι μια προλευχαιμική κατάσταση τουλάχιστον σε μια υποκατηγορία των ασθενών αυτών (105, 106) .

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΑ ΕΥΡΗΜΑΤΑ

ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ ΣΤΟΝ ΟΡΟ

Ανοσοσφαιρίνες ορού: Περίπου 20% των ασθενών έχουν αυξημένα επίπεδα στον ορό των IgG ή IgA αλλά όχι και των IgM ανοσοσφαιρινών (116). Επιπρόσθετα 7.14% των ασθενών με αριθμό ουδετεροφίλων κάτω από 1500/μL αίματος και 2.61% των ασθενών με αριθμό ουδετερόφιλων που κυμαίνεται από 1500 έως 2499 ανά μL αίματος έχουν καλοήθους μονοκλωνική γαμμαπάθεια (monoclonal gammopathy of undetermined significance, MGUS) (116). Κανένας από τους 66 φυσιολογικούς μάρτυρες ή τους 157 αντίστοιχης ηλικίας και φύλου ασθενείς που νοσηλεύθηκαν στο νοσοκομείο, για διάφορες μη κακοήθεις ασθένειες, δεν είχαν στον ορό τους MGUS.

Τα αυξημένα επίπεδα της IgG στον ορό πιθανό αντανακλούν την αύξηση της IgG₁ μιας και η IgG₂ και IgG₄ δε παρουσίασαν καμιά σημαντική αλλαγή των επιπέδων τους ενώ τα επίπεδα της IgG₃ ήταν σημαντικά ελαττωμένα(89). Χαμηλά επίπεδα της IgG₃ έχουν παρατηρηθεί επίσης σε ασθενείς με μη σοβαρή ουδετεροπενία σε μια μελέτη στη Σουηδία (90). Τα αυξημένα επίπεδα των IgG₃ σχετίζονταν αντίστροφα και τα επίπεδα των IgA θετικά με τα επίπεδα στον ορό του TGF-β₁ (89). Προτάθηκε ότι οι αλλαγές αυτές των ανοσοσφαιρινών στους ασθενείς με CIN μπορεί να σχετίζεται με την αύξηση των επιπέδων του TGF-β₁ η οποία

φυσιολογικά είναι μια κυτταροκίνη που επιδρά σε μεταγραφικούς παράγοντες που εμπλέκονται στην μεταστροφή (switch) των ανοσοσφαιρικών τάξεων (117).

Κυκλοφορούντα ανοσοσυμπλέγματα, ρευματοειδής παράγοντας. Παράγοντες του συμπληρώματος C 3 και C 4 και διαλυτού υποδοχέα Fcγ-RIII: Έχει δημοσιευθεί ότι κυκλοφορούντα ανοσοσυμπλέγματα μπορεί να είναι αυξημένα σε μερικούς ασθενείς με χρόνια ιδιοπαθής ουδετεροπενία (84). Αυξημένα επίπεδα κυκλοφορούντων ανοσοσυμπλεγμάτων έχουν βρεθεί σε 32,5% των ασθενών με CIN στην Κρήτη (133). Καμιά σημαντική αλλαγή δεν παρατηρήθηκε στα επίπεδα στον ορό του ρευματοειδή παράγοντα ή των παραγόντων του συμπληρώματος C 3 και C 4 (133). Σε μια ομάδα από 66 Ολλανδών ασθενών με CIN και αριθμό ουδετεροφίλων κάτω από 1500 ανά μl αίματος, τα επίπεδα στο πλάσμα του διαλυτού Fcγ-RII βρέθηκαν μέσα στα φυσιολογικά όρια, αλλά ασθενείς με χαμηλές τιμές Fcγ-RII είχαν ένα αυξημένο ρίσκο για μολυσματικές λοιμώξεις (100).

Αυτααντισώματα στον ορό: Αντιπυρηνικά αντισώματα (Antineuclear antibodies, ANA) σε τίτλο ίσο ή μεγαλύτερο του 1:80 παρατηρήθηκαν σε 33,1% των ασθενών στην Κρήτη με CIN συγκρινόμενα με το 9,5% που βρέθηκε σε υγιείς μάρτυρες της ίδιας ηλικίας και φύλου(133).Ο τύπος της αντίδρασης ήταν στικτός στο 84,6% και διάχυτος στο 15,4% (133). Άλλα αντισώματα εναντίων ειδικών και μη ειδικών οργανιδίων βρέθηκαν σε χαμηλή αναλογία και σε τίτλους όμοιους με εκείνους που παρατηρήθηκαν στους φυσιολογικούς μάρτυρες (133).

Ιοί και άλλα παθογόνα: Αντισώματα έναντι των ιών της ηπατίτιδος B και C, CMV, Epstein-Barr Virus, Herpes Viruses, Human immunodeficiency viruses, Coxiella burnetti, Brucella melitensis, Salmonella typhi, Toxoplasma gondii και Leishmania Donovanii μελετήθηκαν σε ένα μεγάλο αριθμό ασθενών με CIN στην Κρήτη. Τα αντισώματα για οξεία λοίμωξη (IgM αντισώματα) ήταν αρνητικά ενώ για παλιά

λοίμωξη (IgG αντισώματα) μπορεί να ήταν θετικά και σε τίτλους όμοιους με εκείνους που παρατηρήθηκαν σε υγιείς μάρτυρες (94). Σε αντίθεση τα αντισώματα έναντι του *Helicobacter Pylori* ήταν αυξημένα σε ποσοστό 69,2% στους ασθενείς με CIN έναντι 32,4% των φυσιολογικών μαρτύρων (134).

Πρωτεΐνες οξείας φάσεως: Με εξαίρεση την α₁ αντιθρυψίνη, οι άλλες πρωτεΐνες οξείας φάσεως στο ορό δεν παρουσίασαν καμιά σημαντική αλλαγή στην ομάδα των ασθενών με CIN που μελετήθηκαν. Η αιτία και η βιολογική σημασία των αυξημένων επιπέδων της α₁ αντιθρυψίνης στους ασθενείς αυτούς , χρειάζεται περαιτέρω έρευνα . Μπορεί όμως κανείς να υποθέσει ότι η αύξηση αυτή πιθανά να σχετίζεται με τα ανεξήγητα χαμηλά επίπεδα στον ορό της ελαστάσης των ουδετεροφίλων της οποίας η α₁ αντιθρυψίνη είναι ένας φυσιολογικός ανασταλτής.

ΚΥΤΤΑΡΑ ΠΕΡΙΦΕΡΙΚΟΥ ΑΙΜΑΤΟΣ

Οι ασθενείς με CIN μπορεί να παρουσιάζουν μόνο ουδετεροπενία ή ουδετεροπενία σε συνδυασμό με αναιμία και/ή θρομβοπενία (1).Επίσης μπορεί να παρατηρηθεί ουδετεροπενία με λεμφοπενία ή/και μονοκυτταροπενία (43, 108-110).

Λεμφοπενία. Ο αριθμός των λεμφοκυττάρων του περιφερικού αίματος των ασθενών με CIN, στον πληθυσμό της Κρήτης, ήταν σημαντικά ελαττωμένος και ο αριθμός των λεμφοκυττάρων σχετιζόταν με το βαθμό της ουδετεροπενίας (43,110) . Περίπου 37% των ασθενών είχαν αριθμό λεμφοκυττάρων κάτω από 1500 ανά μL αίματος. Η μείωση των λεμφοκυττάρων οφειλόταν κυρίως στην ελάττωση των Τ-κυττάρων και σε μικρότερο βαθμό στη μείωση των κυττάρων φυσικών φονέων (NK κυττάρων) (110) Τόσο τα βοηθητικά/ επαγωγικά CD4⁺ όσο και τα κατασταλτικά/κυτταρολυτικά CD8⁺ ήταν παράλληλα μειωμένα έτσι ώστε η σχέση CD4⁺ / CD8⁺ να παραμένει μέσα στα φυσιολογικά όρια . Η μείωση των Τ-κυττάρων

οφείλεται κυρίως στη ελάττωση των μνημονικών CD45RO⁺/CD4⁺ και CD45RO⁺/CD8⁺ αλλά όχι και στην ελάττωση των ανοσολογικά παρθένων CD45RA⁺/CD4⁺ και CD45RA⁺/CD8⁺ T-κυττάρων. Ο απόλυτος αριθμός των T-κυττάρων που εκφράζουν τα αντιγόνα επιφανείας CD25, CD38, CD71 και HLA-DR, τα οποία αποτελούν δείκτες ενεργοποίησης των κυττάρων, βρέθηκαν μέσα στα φυσιολογικά όρια, υποδεικνύοντας ότι τα ενεργοποιημένα T-λεμφοκύτταρα δεν είναι αυξημένα στην κυκλοφορία των ασθενών με CIN (110). Τα B κύτταρα του περιφερικού αίματος που ορίζονται ως IgD- θετικά κύτταρα και από την έκφραση των δεικτών επιφανείας CD19 και CD20 δεν παρουσιάζουν καμιά σημαντική διαφορά στους ασθενείς με CIN (110)

Μονοκυτταροπενία και θρομβοπενία Περίπου 36% των ασθενών με CIN στην Κρήτη είχαν αριθμό μονοκυττάρων στο περιφερικό αίμα κάτω από 250/μL αίματος και ο απόλυτος αριθμός των μονοκυττάρων σχετιζόταν με το βαθμό της ουδετεροπενίας (94). Θρομβοπενία, όπως ορίζεται από τη μείωση του αριθμού των αιμοπεταλίων κάτω από 150000/μL, παρατηρήθηκε περίπου σε 10% των ασθενών (94). Η αιτία και ο υποκείμενος μηχανισμός που οδηγεί σε αυτές τις διαταραχές παραμένει ακόμα αδιευκρίνιστος.

Αναιμία. Αναιμία, στους ασθενείς με χρόνια ιδιοπαθής ουδετεροπενία, έχει δημοσιευθεί από πολλούς ερευνητές και έχει αποδοθεί στην έλλειψη σιδήρου(93), σε διαταραχές στο κύκλο διακίνησης (turnover) του σιδήρου (1), σε έλλειψη φυλικού οξέος και κοβολαμίνης (118), ή σε ελάττωση του χρόνου επιβίωσης των ερυθροκυττάρων(1,118). Αναιμία όπως ορίζεται από τη μείωση της αιμοσφαιρίνης σε επίπεδα κάτω από 12g/dl στις γυναίκες και κάτω από 13.3g/dl στους άνδρες, βρέθηκε σε 15.6% στους ασθενείς με NI-CINA της Κρήτης (119). Τα επίπεδα της αιμοσφαιρίνης σχετιζόνταν θετικά με τον αριθμό των κυκλοφορούντων

ουδετεροφίλων και αντιστρόφως με τα επίπεδα στον ορό της ερυθροποιητίνης , και τις συγκεντρώσεις του TNF-α (119). Με βάση προηγούμενα δημοσιευμένα κριτήρια προτάθηκε ότι η αναιμία της χρόνιας νόσου είναι ο πιο συχνός τύπος αναιμίας στους ασθενείς με CIN(119).

Ουδετεροπενία. Διαφορετικοί μηχανισμοί έχουν εμπλακεί στην παθογένεια της χρόνιας ιδιοπαθούς ουδετεροπενίας. Έχει υποστηριχθεί σε προηγούμενες μελέτες, οι οποίες πιθανόν να συμπεριλάμβαναν τόσο περιπτώσεις ανοσολογικής αιτιολογίας CIN, όσο και μη ανοσολογικής αιτιολογίας CIN, ότι η ουδετεροπενία οφείλεται σε αυξημένη απώλεια ουδετεροφίλων στην περιφέρεια, λόγω της υπερβολικής προσκόλλησης των ουδετεροφίλων στα τοιχώματα των αγγείων(111), της αυξημένης εξαγγείωσης των ουδετεροφίλων στους ιστούς (88,120) ή της αυξημένης καταστροφής των ουδετεροφίλων (77-80, 82) ή σε διαταραχή της παραγωγής των ουδετεροφίλων από το μυελό των οστών που οφείλεται σε μειωμένο αριθμό προγονικών μυελικών αιμοποιητικών κυττάρων (113,121-122) ή σε δυσλειτουργία του αιμοποιητικού μικροπεριβάλλοντος στην επαρκή υποστήριξη της μυελοποίησης οφειλόμενη είτε στην ανεπαρκή παραγωγή αιμοποιητικών αυξητικών παραγόντων, συγκεκριμένα G-CSF, από τα στρωματικά κύτταρα (123-124) είτε στην αυξημένη παραγωγή αναστολέων που επιδρούν στην μυελοποίηση αναστέλλοντας τον πολλαπλασιασμό ή αυξάνοντας την απόπτωση των μυελικών προβαθμίδων (113,122).

Μελέτες της λειτουργίας των ουδετεροφίλων είναι πολύ περιορισμένες. Ανωμαλίες των β_2 - ιντεγκρινών (120) και αύξηση της έκφρασης στην επιφάνεια των ουδετεροφίλων της L-σελεκτίνης (125) έχουν δημοσιευθεί. Παρόλο που οι ασθενείς με CIN της Κρήτης έχουν χαμηλά επίπεδα ελαστάσης στον ορό τους καμιά μετάλλαξη στην ελαστάση που κωδικοποιείται από τα γονίδια ELA2 δε μπόρεσε να αποδειχθεί στον αριθμό των ασθενών με CIN της Κρήτης που μελετήθηκαν (126).

ΜΥΕΛΟΣ ΤΩΝ ΟΣΤΩΝ

Μορφολογικά οριζόμενα κυτταρικά διαμερίσματα

Η κοκκιώδη σειρά στο μυελό των οστών των ασθενών με χρόνια ιδιοπαθής ουδετεροπενία έχει χαρακτηριστεί σε προηγούμενες μελέτες ως υπερπλαστική, φυσιολογική ή υποπλαστική (127) . Αυτά τα αντιφατικά συμπεράσματα πιθανό να οφείλονται στην μεγάλη ετερογένεια των ουδετεροπενικών ασθενών που μελετήθηκαν και στους οποίους συμπεριλήφθηκαν και ασθενείς με ανοσολογικού τύπου ουδετεροπενία και πιθανών και περιπτώσεις ασθενών με μυελοδυσπλασία. Στην ομάδα των ασθενών με C1N της Κρήτης που μελετήθηκαν (128), η κοκκιώδη σειρά στο μυελό των οστών ήταν σημαντικά ελαττωμένη στο 79% των ασθενών με βαριά ουδετεροπενία. Η σχέση κυττάρων της κοκκιώδους σειράς προς κυττάρων της ερυθράς σειράς ήταν ελαττωμένη και συσχετιζόταν με το βαθμό της ουδετεροπενίας. Η αναλογία των κυττάρων που αποτελούσαν το διαμέρισμα των πολλαπλασιαζόμενων κυττάρων ήταν αυξημένη ενώ τα κύτταρα που αποτελούσαν το διαμέρισμα των ωριμαζόντων ήταν σημαντικά ελαττωμένα (128). Έτσι μια εντυπωσιακή στροφή της κοκκιώδους σειράς προς τα αριστερά ήταν εμφανής (128, . Ο χαμηλός αριθμός των κυττάρων στο διαμέρισμα των ωριμαζόντων έχει αποδοθεί στην αυξημένη μετακίνηση των κυττάρων αυτών προς το περιφερικό αίμα σαν απάντηση στην ουδετεροπενία ενώ ο αυξημένος αριθμός κυττάρων στο διαμέρισμα των πολλαπλασιαζόμενων κυττάρων έχει θεωρηθεί σαν μια προσπάθεια του μυελού των οστών να αντισταθμίσει τις απώλειες από το διαμέρισμα των ωριμαζόντων κυττάρων (128). Η αδυναμία του μυελού των οστών να αντισταθμίσει πλήρως τις απώλειες στο διαμέρισμα των ωριμαζόντων κυττάρων πιθανό να οφείλεται σε ανεπαρκή παροχή νέων μυελοβλαστών από το ελαττωμένο διαμέρισμα των μυελικών προγονικών κυττάρων (113, 122).

Μεγαλοβλαστοειδή χαρακτηριστικά της ερυθράς σειράς παρατηρήθηκαν σε περίπου 25% των ασθενών (128). Τα μεγακαρυοκύτταρα ήταν μέσα στα φυσιολογικά όρια πολλά δε από αυτά είχαν μορφολογία μικρομεγακαρυοκυττάρου (υπολοβιώδη μεγακαρυοκύτταρα).

Η αναλογία των λεμφοκυττάρων και ηωσινοφίλων ήταν μέσα στα φυσιολογικά όρια ή ελαφρώς αυξημένα (128). Σε αντίθεση η αναλογία των πλασματοκυττάρων ήταν σημαντικά αυξημένη και το ποσοστό των πλασματοκυττάρων συσχετιζόταν αντιστρόφως με τον αριθμό των κυκλοφορούντων ουδετεροφίλων (128).

Υποπληθυσμοί λεμφοκυττάρων

Η αναλογία στο μυελό των οστών των NK κυττάρων ήταν φυσιολογική στους ασθενείς με CIN ενώ τα B κύτταρα και CD57⁺ ήταν ελαφρώς αυξημένα Τα μνημονικά CD45RO⁺ T κύτταρα στο μυελό των οστών ήταν μειωμένα στους ασθενείς με βαριά ουδετεροπενία. Καμιά σημαντική μεταβολή δε βρέθηκε στην αναλογία των ανοσολογικά παρθένων CD45RA⁺T κυττάρων (128) .Σε αντίθεση ήταν αυξημένη η αναλογία των T κυττάρων που φέρουν στην επιφάνεια τους δείκτες ενεργοποίησης(151). Μια σημαντική αύξηση των CD57⁺ κυττάρων στο μυελό των οστών παρατηρήθηκε σε μη επιλεγμένους ουδετεροπενικούς ασθενείς από τον Picker et al (114)

Ιστολογικά ευρήματα

Ιστολογικά η κυτταροβρίθεια του μυελού των οστών των ασθενών με βαριά ουδετεροπενία χαρακτηρίστηκε μειωμένη. Στροφή της κοκκιώδους σειράς προς τα αριστερά παρατηρήθηκε σε περίπου 67% των ασθενών (128). Αυξημένη αναλογία των διάσπαρτων λεμφοκυττάρων βρέθηκε σε 10.5% των ασθενών , αλλά λεμφοζίδια στις παραδοκιδώδεις περιοχές, χωρίς βλαστικά κέντρα βρέθηκαν στο 50% των

ασθενών (128). Τα ηωσινόφιλα ήταν αυξημένα σε περίπου 10% των ασθενών και τα ιστιοκύτταρα σε ποσοστό 12% (128). Ανοσοϊστολογικές μελέτες δεν έδειξαν καμιά σοβαρή ανωμαλία. Σε καμιά κυτταρική σειρά δε μπόρεσε να δειχτεί η παρουσία της p53 πρωτεΐνης ενώ η bcl-2 πρωτεΐνη αναδείχθηκε σε όλες τις λεμφοκυτταρικές συναθροίσεις(128).

Πρόδρομα κύτταρα της κοκκιώδους σειράς

Καλλιέργειες μυελικών κυττάρων. Μελέτες από πολλά εργαστήρια έχουν δείξει ότι σε ασθενείς με χρόνια ιδιοπαθής ουδετεροπενία τα μυελικά κύτταρα παρουσιάζουν φυσιολογική (3, 129) , μειωμένη (121) ή αυξημένη (129) ικανότητα σχηματισμού αποικιών από πολυμορφοπύρρηνα-μακρογάγα σε ημιστερεές καλλιέργειες (granulocyte-macrophage-colony-forming units). Έχει επίσης προταθεί, ότι δυνατόν να υπάρχει μια δυσλειτουργία του αιμοποιητικού μικροπεριβάλλοντος , η οποία μπορεί να οδηγεί είτε σε ανεπαρκή απελευθέρωση του G-CSF, λόγω ανώμαλης έκφρασης του mRNA G-CSF (123) ή λάθους σε μεταγραφικό επίπεδο (124), είτε σε αύξηση της απελευθέρωσης αναστολέων της αιμοποίησης από τα στρωματικά κύτταρα όπως του TGF-β1 και TNF- α (113,122) η οποία δυνατόν να ενέχεται στην παθογένεια της νόσου τουλάχιστον σε ένα αριθμό των ασθενών αυτών

Πρόσφατα έχει δειχθεί στο εργαστήριο μας ότι όλοι σχεδόν οι ασθενείς με ήπια ή σοβαρή ουδετεροπενία παρουσιάζουν χαμηλό αριθμό CFU-GM (colony-forming units granulocyte-macrophage) κλωνογονικών προγονικών κυττάρων μέσα στο κλάσμα των μυελικών μονοπύρηνων κυτταρων (Bone marrow mononuclear cells, BBMCs) (122). Έχει επίσης βρεθεί ότι αυτή η μείωση αντανακλά κυρίως το χαμηλό αριθμό των CFU-G (colony-forming units granulocyte) μιας και ο αριθμός των CFU-M (colony-forming units macrophage) δεν παρουσιάζει καμιά σημαντική

αλλαγή. Για να εξετάσουμε κατά πόσο η μείωση στον σχηματισμό των CFU-GM οφείλεται στο χαμηλό αριθμό των προγονικών κυττάρων που περιέχονται στο κλάσμα των μυελικών μονοπύρηνων ή είναι αποτέλεσμα βλάβης των προγονικών κυττάρων εμείς δοκιμάσαμε την κλωνογονική δυνατότητα ανοσομαγνητικά απομονωμένων καθαρών CD34⁺ μυελικών κυττάρων και βρήκαμε ότι ο συνολικός αριθμός των CFU-GM ήταν πράγματι σημαντικά μειωμένος στην ομάδα των ασθενών και ότι αυτή η μείωση αφορούσε τον αριθμό των CFU-G αλλά όχι και τον αριθμό των CFU-M. Με άλλα λόγια τα αρχέγονα αιμοποιητικά κύτταρα, όπως υπολογίσθηκαν από τις long-term culture initiating cell (LTC-IC), δεν παρουσίασαν σημαντική διαφορά μεταξύ ασθενών και φυσιολογικών μαρτύρων. Αυτά τα ευρήματα δείχνουν καθαρά ότι υπάρχει μια επιλεκτική μείωση στο διαμέρισμα του πληθυσμού των προγονικών κυττάρων των κοκκιοκυττάρων στους ασθενείς με CIN (122)

Επιπρόσθετα στρώματα των ασθενών αυτών, από μακροχρόνιες μυελικές καλλιέργειες (LTBMC), σε σχέση με τα στρώματα υγιών μαρτύρων, αδυνατούν να υποστηρίξουν την αυτόλογη αιμοποίηση όπως αποδεικνύεται από το χαμηλό αριθμό των μη προσκολλούμενων κυττάρων, τη χαμηλή συχνότητα των κλωνογόνων πρόδρομων κυττάρων μέσα στο κλάσμα των μη προσκολλούμενων κυττάρων και τη μικρή διάρκεια παραγωγής αποικιών από μη προσκολλούμενα κύτταρα. Επίσης στρώματα ασθενών από μακροχρόνιες μυελικές καλλιέργειες ασκούν αρνητική επίδραση στην ανάπτυξη αλλογενών φυσιολογικών CD34⁺ κυττάρων. Όλα αυτά τα ευρήματα συνηγορούν υπέρ της ανασταλτικής δράσης του μυελικού μικροπεριβάλλοντος στη αιμοποίηση στους ασθενείς με CIN (122).

Ανάλυση με κυτταρομετρία ροής και in situ end-labeling. Σε μια πρόσφατη μελέτη, έχουμε δείξει ότι μυελικά CD34⁺, CD34⁺/CD33⁺ και CD34⁺/CD33⁻ ήταν όλα σημαντικά μειωμένα στο κλάσμα των μυελικών μονοπύρηνων κυττάρων των

ασθενών (122). Χρησιμοποιώντας 7-αμινοακτινομυκίνη D (7-amino-actinomycin D) ως δείκτη φθορισμού της κυτταρικής απόπτωσης (135) και την τεχνική της *in situ* end-labeling (136) εμείς επίσης βρήκαμε ότι η απόπτωση ήταν σημαντικά αυξημένη μέσα στο κλάσμα των μυελικών $CD34^+$ και $CD34^+/CD33^+$ αλλά όχι και στο κλάσμα των μυελικών $CD34^+/CD33^-$, $CD34^-/CD33^+$ ή $CD33^-/CD15^+$ (122, 137). Μιας και η έκφραση του αντιγόνου Fas μπορεί να σχετίζεται με αυξημένη απόπτωση των μυελικών προγονικών αιμοποιητικών κυττάρων (138) εμείς εκτιμήσαμε την έκφραση αυτού του μορίου στα προγονικά κύτταρα των ασθενών και βρήκαμε έκφραση του μορίου μέσα στο κλάσμα των μυελικών $CD34^+$ και $CD34^+/CD33^+$ αλλά όχι και στο κλάσμα των $CD34^+/CD33^-$, $CD34^-/CD33^+$ ή $CD33^-/CD15^+$. Η έκφραση αυτή ήταν σημαντικά αυξημένη στους ασθενείς σε σχέση με τους φυσιολογικούς μάρτυρες. Η αναλογία των Fas^+ μυελικών $CD34^+$ και $CD34^+/CD33^+$ σχετιζόταν με την αναλογία των αποπτωτικών κυττάρων προτείνοντας ότι η έκφραση του Fas πιθανά ενέχεται στην αποπτωτική μείωση των κυττάρων των πληθυσμών αυτών (122). Σε αντίθεση καμία διαφορά δεν αποδείχθηκε στη αναλογία των Fas^+ ή στο ποσοστό των αποπτωτικών κυττάρων μεταξύ ασθενών και μαρτύρων στα περισσότερα ώριμα διαμερίσματα των κοκκιοκυττάρων περιλαμβανομένου και των κυκλοφορούντων στο περιφερικό αίμα πολυμορφοπυρήνων. Αυτά τα ευρήματα είναι σύμφωνα με τα αποτελέσματα από τη *in vitro* μελέτη της μυελοποίησης και δηλώνουν ότι η διαταραχή στη κοκκιοποίηση στους ασθενείς με CIN πιθανά οφείλεται στην απόπτωση μέσω Fas μέσα στο διαμέρισμα των και $CD34^+/CD33^+/Fas^+$ προγονικών κυττάρων των κοκκιοκυττάρων(122).

ΚΥΤΤΑΡΟΚΙΝΕΣ ΚΑΙ ΧΥΜΟΚΙΝΕΣ

Κυτταροκίνες και χυμοκίνες ορού. Έχει δημοσιευθεί ότι στον ορό των ασθενών με CIN τα επίπεδα ποικίλων προ-φλεγμονωδών κυτταρικών και χυμοκινών που,

παράγονται κύρια από ενεργοποιημένα μακροφάγα, είναι αυξημένα (112). Τα επίπεδα στον ορό της ιντερλευκίνης 1β (IL-1β), του παράγοντα νέκρωσης των όγκων α (TNF-α), του διαλυτού υποδοχέα του παράγοντα νέκρωσης των όγκων p55 (sTNF-R1), TGF-β1, της ιντερλευκίνης 6 (IL-6), καθώς επίσης και της ιντερλευκίνης 8 (IL-8) και RANTES, βρέθηκαν σημαντικά αυξημένα στους ασθενείς με CIN στην Κρήτη. Τα επίπεδα των κυτταροκινών και χυμοκινών στον ορό σχετίζονταν ισχυρά με το βαθμό της ουδετεροπενίας (112). Σε αντίθεση τα επίπεδα στον ορό της ιντερλευκίνης-4 (IL-4), της ιντερφερόνης-γ (INF-γ), του διαλυτού υποδοχέα της ιντερλευκίνης-2 (IL-2) και του διαλυτού CD23 (sCD23) που κύρια παράγονται από ενεργοποιημένα λεμφοκύτταρα δεν παρουσίασαν καμία σημαντική μεταβολή στην ομάδα των ασθενών σε σχέση με την ομάδα των μαρτύρων (112). Αξίζει να σημειωθεί ότι τα αυξημένα επίπεδα του TNF-α στον ορό των ασθενών αυτών σχετίζεται με την τιμή του CSI, ο οποίος αποτελεί μια εκτίμηση του όγκου του σπληνός.

Κυτταροκίνες στα υπερκείμενα μακροχρόνιων μυελικών καλλιεργείων (LTBMs supernatants). Σημαντικά αυξημένες συγκεντρώσεις κυτταροκινών βρέθηκαν στα υπερκείμενα των μακροχρόνιων μυελικών καλλιεργείων των ασθενών. Η IL-1β, ο TGF-β1, η IL-6, ο TNF-α και ο G-CSF βρέθηκαν σε αυξημένα ποσά στα υπερκείμενα μακροχρόνιων καλλιεργείων από μυελικά κύτταρα ασθενών (113, 122), σε αντίθεση με τα επίπεδα της INF-γ, stromal cell-derived factor (SDF) macrophage inflammatory protein-1α (MPI-1α) που ήταν φυσιολογικά. (113, 122). Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι οι τιμές του TNF-α σχετίζονται ισχυρά τόσο με την αναλογία των και CD34⁺/Fas⁺ προγονικών κυττάρων όσο και με την αναλογία των CD34⁺/7AAD⁺ αποπτοτικών κυττάρων ενώ σχετίζονται αντιστρόφως με τον αριθμό των in-vitro σχηματιζόμενων GFU-GM αποικιών (122). Ο TNF-α είναι μια κυτταροκίνη με προ-αποπτοτικές ιδιότητες και παράγεται κυρίως από τα

ενεργοποιημένα μακροφάγα (139). IL-1β επίσης παράγεται από τα ενεργοποιημένα μακροφάγα και είναι ο κύριος διεγέρτης της παραγωγής της IL-6 και του TGF-β1 (140-142). Η IL-6 είναι μια πολυδύναμη κυτταροκίνη που ενέχεται στον πολλαπλασιασμό των αρχέγονων κυττάρων και στην διαφοροποίηση των CFU-GM κυττάρων (143, 145). Παράγεται συνεχώς από τους ινοβλάστες και η βασική της έκκριση μπορεί να αυξηθεί αρκετά κάτω από την επίδραση φλεγμονωδών καταστάσεων (144). Ο TGF-β1 είναι ένας αναστολέας του πολλαπλασιασμού των stem cell (142) και έχει επίσης βρεθεί σε αυξημένες συγκεντρώσεις στο 82% των ασθενών με CIN. Οι τιμές του TGF-β1 σχετίζονται αντίστροφα με τον αριθμό των CD34⁺/CD33⁺ κυττάρων και τον αριθμό των κυκλοφορούντων πολυμορφοκυττάρων (113). Έχει δημοσιευθεί ότι ο TGF-β1 αναστέλλει την μυελοποίηση κυρίως με τη μείωση της έκφρασης των υποδοχέων GM-CSF, G-CSF, IL-3, IL-1 στα προγονικά κύτταρα της μυελικήςσειράς(140-142).

Ο G-CSF σε ποικίλες συγκεντρώσεις έχει βρεθεί στα υπερκείμενα μακροχρόνιων καλλιεργείων όλων των ασθενών που μελετήθηκαν (113). Τιμές της κυτταροκίνη στα υπερκείμενα πάνω από τα ανώτερα όρια που βρέθηκαν στους μάρτυρες παρατηρήθηκαν σε 26% των ασθενών που μελετήθηκαν. Ανιχνεύσιμα ποσά του GM-CSF στα υπερκείμενα παρατηρήθηκαν στο 19% των ασθενών ποσοστό το οποίο δεν διαφέρει σημαντικά από αυτό που παρατηρήθηκε στους φυσιολογικούς μάρτυρες (113). Η IL-3 ήταν μη ανιχνεύσιμη στα υπερκείμενα μακροχρόνιων καλλιεργείων τόσο των ασθενών όσο και των μαρτύρων (113).

Έκφραση της IFN-γ και του Fas ligand Έκφραση του mRNA της IFN-γ και του Fas ligand από στρωματικά κύτταρα μακροχρόνιων μυελικών καλλιεργείων έχει δειχθεί σε ποσοστό 43% και 27% αντίστοιχα στους ασθενείς με CIN που μελετήθηκαν (122) Η IFN-γ είναι ένας ισχυρός αναστολέας της αιμοποίησης κυρίως

μέσω της αύξησης της έκφρασης του αντιγόνου Fas στα CD34⁺ κύτταρα (146) ενώ το FasL πιθανόν πυροδοτεί το μονοπάτι της απόπτωσης μέσω του Fas (136,147)

Η IFN- γ και το FasL παράγονται κύρια από ενεργοποιημένα T-λεμφοκύτταρα (148) αλλά και από ενεργοποιημένα μονοκύτταρα/μακροφάγα(149-150). Μια πρόσφατη μελέτη έδειξε ότι η παραγωγή των πιο πάνω μορίων στους ασθενείς με CIN γίνεται από ενεργοποιημένα T-κύτταρα και όχι από μακροφάγα (151)

Πιθανός ρόλος των κυτταροκινών στην κοκκιοποίηση. Όλα τα πιο πάνω αναφερθέντα δεδομένα δείχνουν τα στρωματικά κύτταρα των ασθενών με CIN παράγουν επαρκής ή και ακόμη αυξημένα ποσά αιμοποιητικών αυξητικών παραγόντων, αλλά επίσης και αυξημένα ποσά αναστολέων της μυελοποίησης. Μιας και η σταθερή παραγωγή των κοκκιοκυττάρων είναι το αποτέλεσμα της ισοροπίας αρνητικών και θετικών δρώντων κυτταροκινών φαίνεται λογική η παραδοχή ότι η αυξημένη παραγωγή αναστολέων από το μυελικό μικροπεριβάλλον των ασθενών πιθανόν υπερνικάει την επαγωγική δράση των αιμοποιητικών αυξητικών παραγόντων και μπορεί να οδηγήσει σε καταστολή της μυελοποίησης. Τουλάχιστον δύο κατασταλτικές διαδικασίες πιθανόν να λαμβάνουν χώρα, επιτάχυνση της απόπτωσης και αναστολή του πολλαπλασιασμού στο επίπεδο των προγονικών κυττάρων της μυελικής σειράς. Η επιτάχυνση της απόπτωσης είναι κυρίως το αποτέλεσμα των αυξημένων ποσών του TNF- α στο μυελικό μικροπεριβάλλον και πιθανόν το αποτέλεσμα της έκφρασης του FasL από τα μυελικά στρωματικά κύτταρα. Η αναστολή του πολλαπλασιασμού πιθανόν να προκαλείται από τα αυξημένα ποσά του TGF- β 1 στο μυελικό μικροπεριβάλλον και την έκφραση της IFN- γ από λεμφοκύτταρα που βρίσκονται στα στρωματικά μυελικά κύτταρα.

ΔΙΑΛΥΤΑ ΜΟΡΙΑ ΠΡΟΣΚΟΛΛΗΣΗΣ ΣΤΟΝ ΟΡΟ ΚΑΙ ΕΞΑΓΓΕΙΩΣΗ ΤΩΝ ΛΕΥΚΟΚΥΤΤΑΡΩΝ.

Τα επίπεδα στον ορό των προερχόμενων από τα ενδοθηλιακά κύτταρα, διαλυτών μορίων προσκόλλησης όπως η Ε-σελεκτίνη (sE-selectin), το sICAM (soluble intracellular cell adhesion molecule), το sVCAM (soluble vascular cell adhesion molecule,) ήταν όλα σημαντικά αυξημένα στους ασθενείς με CIN και η παρατηρούμενη τιμή σχετιζόταν αντίστροφα με τον αριθμό των κυκλοφορούντων ουδετεροφίλων και θετικά με τα επίπεδα των περισσότερων από τις προαναφερόμενες κυτταροκίνες και χυμοκίνες που προέρχονταν από τα μακροφάγα (109). Αυτές οι παρατηρήσεις δείχνουν ότι οι ασθενείς με CIN έχουν ενεργοποιημένο ενδοθήλιο και ότι η ενεργοποίηση των ενδοθηλιακών κυττάρων γίνεται πιθανά με τη μεσολάβηση των αυξημένων επιπέδων των IL-1α, και TNF-α , δύο ισχυρών ενεργοποιητών των ενδοθηλιακών κυττάρων (114). Πάνω στη βάση μελετών που έχουν δημοσιευθεί για το ρόλο του ενεργοποιημένου ενδοθηλίου στην ‘κυκλοφορία’ των λευκοκυττάρων (115), προτάθηκε ότι αυξημένη εξαγγείωση, που πιθανά επιτυγχάνεται από τη αλληλεπίδραση των β2-ιντεγκρινών που εκφράζονται πάνω στα ουδετερόφιλα με τα μόρια ICAM-1 και VCAM-1 που εκφράζονται από τα ενεργοποιημένα ενδοθήλια και κάτω από την επίδραση της χυμοκίνης IL-8 , μπορεί να συμβαίνει στους ασθενείς με CIN, και είναι δυνατόν να είναι ένας παράγοντας που συμβάλλει στον καθορισμό του βαθμού της ουδετεροπενίας (88). Αυξημένη εξαγγείωση έχει επίσης προταθεί και για τα μνημονικά CD45RO⁺ T κύτταρα και τα NK κύτταρα τα οποία σταθερά εκφράζουν α₄β₁ ιντεγκρίνες (very late integen-4, VLA-4)(115). Χρησιμοποιώντας αυτά τα μόρια, τα λεμφοκύτταρα αντιδρούν με τα ενδοθηλιακά μόρια ICAM-1 και VCAM-1, προσκολλούνται στενά στο τοίχωμα των αγγείων και περνούν στους ιστούς κάτω από την επίδραση των χυμοκινών RANTES(43).

ΕΝΔΕΙΞΕΙΣ ΓΙΑ ΜΙΑ ΧΡΟΝΙΑ ΦΛΕΓΜΟΝΩΔΗΣ

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

Όλα τα πιο πάνω δεδομένα τα οποία συζητήθηκαν προτείνουν την ύπαρξη μιας υποκείμενης, ήπιας (low grade), χρόνιας φλεγμονώδης διαδικασίας στους ασθενείς με CIN. Αυτή η φλεγμονώδης διαδικασία σχετίζεται τουλάχιστον με τρία κύρια γεγονότα, ενεργοποίηση των μακροφάγων, χρόνιο αντιγονικό ερεθισμό και αυξημένο όγκο σπληνός στο υπερηχογράφημα. Η ενεργοποίηση των μακροφάγων υποδηλώνεται από την αυξημένη συγκέντρωση των προ-φλεγμονωδών κυτταροκινών και χυμοκινών στον ορό και στα υπερκείμενα των μακροχρόνιων μυελικών καλλιεργειών. Ο χρόνιος αντιγονικός ερεθισμός υποδηλώνεται από τα αυξημένα επίπεδα στον ορό των IgG και/ή των IgA, την αυξημένη συχνότητα παραπροτεΐνης στην ηλεκτροφόρηση των πρωτεϊνών του ορού, τα αυξημένα επίπεδα των κυκλοφορούντων ανοσοσυμπλεγμάτων την αυξημένη αναλογία των πλασματοκυττάρων στο μυελό των οστών και την αυξημένη συχνότητα των θετικών αντιπυρηνικών αντισωμάτων με σκτική αντιδραστικότητα.

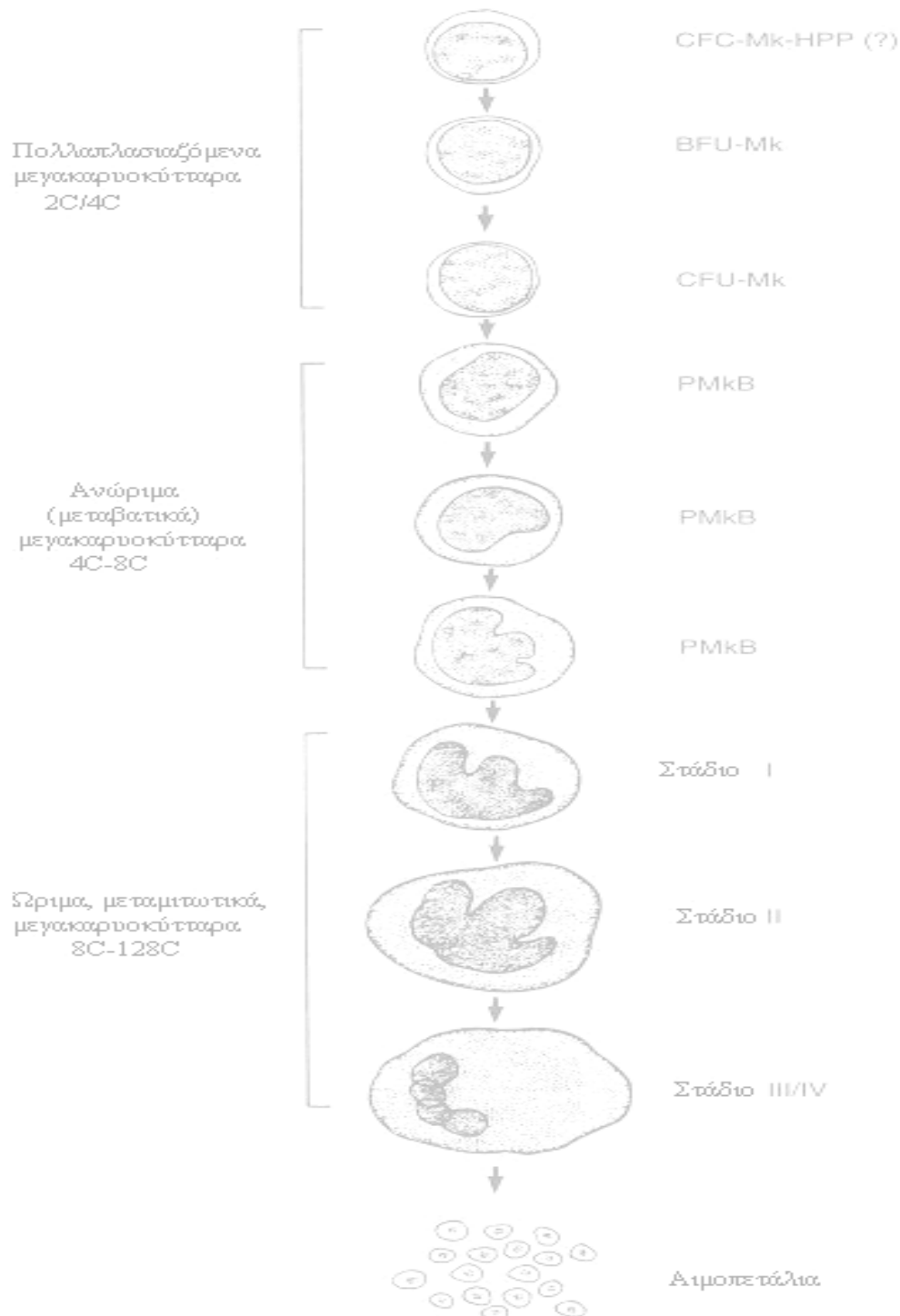
Η αιτία μιας τέτοιας μη αναγνωρίσιμης ήπιας χρόνιας φλεγμονής στους ασθενείς με CIN είναι άγνωστη αλλά είναι πιθανά η πηγή των βιολογικών προϊόντων τα οποία ενεργοποιούν τα μακροφάγα και των αντιγονικών υλικών που ενεργοποιούν τα ανοσοϊκανά κύτταρα. Ο αυξημένος σπληνικός όγκος πιθανά να είναι μέρος της φλεγμονώδους διαδικασίας ή ο τύπος όπου η χρόνια φλεγμονώδης διαδικασία λαμβάνει χώρα.

Συμπερασματικά η χρόνια ιδιοπαθής ουδετεροπενία είναι μια πολύ λίγο κατανοητή οντότητα. Εκδηλώνεται με χρόνια ουδετεροπενία και μια ποικιλία άλλων κλινικών και εργαστηριακών ευρημάτων. Υπάρχουν ωστόσο αυξημένες ενδείξεις ότι η διαταραχή αυτή αποτελεί ένα σύνδρομο μυελικής ανεπάρκειας το οποίο χαρακτηρίζεται από σημαντική μείωση των $CD34^+$ και $CD34^+/CD33^+$ προγονικών κυττάρων των κοκκιοκυττάρων. Αυτή η μείωση είναι κύρια το αποτέλεσμα της αυξημένης απόπτωσης που οφείλεται στα αυξημένα ποσά του TNF-α στο μυελικό μικροπεριβάλλον των ασθενών. Επιπρόσθετα μόρια που εκφράζονται από τα μυελικά στρωματικά κύτταρα πιθανόν να επιδρούν στην απόπτωση ή στον πολλαπλασιασμό των προγονικών κυττάρων των κοκκιοκυττάρων με τελικό αποτέλεσμα τη μείωση αυτών των προγονικών κυττάρων. Μιάς και δεν υπάρχει απόδειξη για βλάβη του αρχεχονου αιμοποιητικού κυττάρου μπορούμε να υποθέσουμε ότι η ουδετεροπενία των ασθενών με CIN προκαλείται από την ανασταλτική δράση του μυελικού μικροπεριβάλλοντος

Επίσης η αυξημένη εξαγγείωση των ουδετεροφίλων, που οφείλεται στην παρουσία του ενεργοποιημένου ενδοθηλίου, στους ασθενείς μπορεί να είναι ένας παράγοντας που συνεισφέρει στο βαθμό της ουδετεροπενίας σε αυτή τη διαταραχή

ΜΕΓΑΚΑΡΥΟΠΟΙΗΣΗ

Η ανάπτυξη των μεγακαρυοκυττάρων είναι μία σύνθετη βιολογική διαδικασία, η οποία περιλαμβάνει μια σειρά κυτταρικών γεγονότων τα οποία αρχίζουν από το πολυδύναμο αιμοποιητικό κύτταρο και καταλήγουν στη βιογένεση των αιμοπεταλίων (152). Τα κυτταρικά στάδια μέσα από το οποίο το πολυδύναμο αιμοποιητικό κύτταρο γίνεται ένα μεγακαρυοκύτταρο έχουν αναγνωριστεί σε *in vitro* μελέτες αποικιών. Έχει επίσης αναγνωρισθεί η ύπαρξη μιας ιεραρχία στην ανάπτυξη των μεγακαρυοκυττάρων (152-154). Η ιεραρχία αυτή γίνεται καλύτερα κατανοητή εάν η ανάπτυξη των μεγακαρυοκυττάρων διαιρεθεί τεχνητά σε τρία στάδια : τις προγονικές αιμοποιητικές προβαθμίδες (*early progenitors* που έχουν την ικανότητα να παράγουν αποικίες οι οποίες αποτελούνται από κύτταρα πολλών σειρών και *late progenitors* που είναι δεσμευμένες μόνο για την διαφοροποίηση των μεγακαρυοκυττάρων), τα ανώριμα μεγακαρυοκύτταρα ((προμεγακαρυοβλάστες) και τα ώριμα μεγακαρυοκύτταρα. (Εικόνα 1) Οι προγονικές προβαθμίδες των μεγακαρυοκυττάρων είναι υπεύθυνες για την αύξηση του αριθμού των μεγακαρυοκυττάρων και τον πολλαπλασιασμό τους σε απάντηση σε μιτωτικούς αυξητικούς παράγοντες. Οι προμεγακαρυοβλάστες είναι μεταβατικά κύτταρα μεταξύ των προβαθμίδων και των περισσότερων ώριμων μεταμιτωτικών κυττάρων. Τα ώριμα μεγακαρυοκύτταρα δε πολλαπλασιάζονται περαιτέρω αλλά έχουν τη μοναδική ικανότητα κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης να αυξάνουν τη σύνθεση του DNA χωρίς να υφίσταται μίτωση, μια διαδικασία γνωστή ως ενδομίτωση. Τα ώριμα μεγακαρυοκύτταρα είναι αισθητά μεγαλύτερα από τα άλλα κύτταρα του μυελού των οστών. Κάθε ώριμο μεγακαρυοκύτταρο παράγει περισσότερα από 2.000-3.000 αιμοπετάλια. (152-155)



Εικόνα 1: Κυτταρική ιεραρχία της ανάπτυξης των μεγακαρυοκυττάρων. Σχηματικά μπορεί να διαιρεθεί σε τρία στάδια: τα πολλαπλασιαζόμενα προγονικά κύτταρα τα οποία έχουν το τυπικό περιεχόμενο 2C/4C DNA, τα ανώριμα μεγακαρυοκύτταρα τα οποία έχουν ενδιάμεσο περιεχόμενο DNA μεταξύ των προγονικών κυττάρων και των περισσότερο ώριμων μεγακαρυοκυττάρων και είναι μεταβατικά κύτταρα μεταξύ των προγονικών και των ώριμων κυττάρων και τα ώριμα μεταμιτωτικά μεγακαρυοκύτταρα τα οποία έχουν περιεχόμενο DNA μεταξύ 8C και 128C. CFC-Mk-HPP, (colony-forming cell-megakaryocyte-high-proliferative potential;) BFU-Mk, (burst-forming unit-megakaryocyte;) CFU-Mk, (colony-forming unit-megakaryocyte;) PMkB, promegakaryoblast). (Hoffman: Hematology: Basic Principles and Practice, 3rd ed., 2000)

ΠΡΟΓΟΝΙΚΕΣ ΑΙΜΟΠΟΙΗΤΙΚΕΣ ΠΡΟΒΑΘΜΙΔΕΣ

Οι περισσότερες από τις γνώσεις μας όσο αφορά τις αιμοποιητικές προγονικές προβαθμίδες προέρχονται από *in vitro* μελέτες αυτών των κυττάρων. Διακρίνονται σε *early* προγονικές προβαθμίδες, μη δεσμευμένες για την μεγακαρυοκυτταρική σειρά προβαθμίδες, που δίνουν γένεση σε αποικίες από κύτταρα πολλών σειρών οι οποίες περιέχουν και ένα μικρό πληθυσμό μεγακαρυοκυττάρων, και σε *late* προβαθμίδες δεσμευμένες μόνο για την μεγακαρυοκυτταρική σειρά.

Early μεγακαρυοκυτταρικές προβαθμίδες

Τα μεγακαρυοκύτταρα προέρχονται από το πολυδύναμα αιμοποιητικά stem cell (haematopoietic stem cells, HSCs) τα οποία με τη σειρά τους προέρχονται από τον αιμαγγειοβλάστη ο οποίος δίνει γένεση σε προγονικά κύτταρα του αίματος και των αγγείων. Τα πολυδύναμα αιμοποιητικά κύτταρα δίνουν γένεση στα CFU-GEMM (colony-forming unit granulocytes, erythrocytes, macrophage, megakaryocyte) και αυτά με τη σειρά τους στα CFU-EM (colony-forming unit erythrocyte, megakaryocyte), που θεωρούνται κοινοί πρόγονοι της μεγακαρυοκυτταρικής και ερυθράς σειράς. Η διαφοροποίηση του CFU-GEMM ρυθμίζεται από μεταγραφικούς παράγοντες. Δύο είναι οι κύριοι μεταγραφικοί παράγοντες που εμπλέκονται στην διαφοροποίηση του. Ο GATA-1 ο οποίος οδηγεί το CFU-GEMM προς την διαφοροποίηση του CFU-EM και ο PU.1 που ρυθμίζει τη διαφοροποίηση προς τα προγονικά κύτταρα της κοκκιώδους και μονοκυτταρικής σειράς (1577). Σε απάντηση σε παράγοντες του περιβάλλοντος, χυμοκίνες και κυτταροκίνες, το διδύναμο CFU-EM μπορεί να διαφοροποιηθεί είτε προς τη μεγακαρυοκυτταρική είτε προς την ερυθρά σειρά (158)

Late μεγακαρυοκυτταρικές προβαθμίδες

Τα κύτταρα αυτής της σειράς είναι μια ετερογενής ομάδα και αποτελείται από τρεις διακριτούς πληθυσμούς που ο καθένας χαρακτηρίζεται από διαφορετικό βαθμό ικανότητας πολλαπλασιασμού.

Οι περισσότερο αρχέγονες αιμοποιητικές προβαθμίδες δεσμευμένες μόνο για τη μεγακαρυοκυτταρική σειρά είναι οι *Mk-HPP-CFC* (*megakaryocyte high proliferative-potential colony-forming-cell*). Περιγράφηκαν για πρώτη φορά σε καλλιέργειες μυελού των οστών από ποντίκια το 1993 (155). Έχουν περιγραφεί επίσης σε καλλιέργειες από εμβρυϊκά μυελικά κύτταρα αλλά όχι σε κύτταρα από μυελό των οστών του ενηλίκου. Αυτές οι προγονικές προβαθμίδες παρουσιάζουν μεγάλη ικανότητα πολλαπλασιασμού και δίνουν γένεση σε αποικίες από μερικές εκατοντάδες κύτταρα (300-1000) (160).

Οι *BFU-Mk* (*burst-forming unit-megakaryocyte*) είναι οι περισσότερο αρχέγονες προβαθμίδες δεσμευμένες για την μεγακαρυοκυτταρική σειρά, που μπορούν να απομονωθούν από κύτταρα του μυελού των οστών του ενηλίκου και διατηρούν μια μεγάλη ικανότητα πολλαπλασιασμού. Δίνουν γένεση σε αποικίες από 100-500 κύτταρα (161-162). Πιστεύεται ότι είναι οι απόγονοι των *Mk-HPP-CFC* και οι άμεσοι πρόγονοι των *CFU-Mk* (*colony forming cells megakaryocyte*). *BFU-Mk* μακροσκοπικά μοιάζουν με τις erythroid-burst-forming colonies. Τα κύτταρα των *BFU-Mk* είναι ανθεκτικά στην 5-φλουορεσίνη (5-FU) και εκφράζουν το αντιγόνο CD34 ενώ είναι HLA-DR αρνητικά.

Τέλος τα *CFU-Mk* (*colony-forming-cell-megakaryocyte*) είναι τα περισσότερο ώριμα κύτταρα των προγονικών προβαθμίδων. Διατηρούν μια πολύ περιορισμένη ικανότητα πολλαπλασιασμού δίνοντας γένεση μόνο σε 3-50 μεγακαρυοκύτταρα

(163). Τα CFU-Mk δεν είναι τα πρώτα κύτταρα της σειράς που ανταποκρίνονται στη θρομβοπενία . Στην πραγματικότητα η αύξηση του αριθμού των CFU-Mk συμβαίνει σαν μεταγενέστερη απάντηση στην μείωση του αριθμού των αιμοπεταλίων. Αυτό είναι αποτέλεσμα του γεγονότος ότι τα προγονικά κύτταρα είναι ευαίσθητα στην μάζα των μεγακαρυοκυττάρων και όχι των αιμοπεταλίων(164). Τα κύτταρα των CFU-MK είναι ευαίσθητα στη δράση της 5-φλουορεσίνη (5-FU) και εκφράζουν το αντιγόνο CD34 ενώ είναι HLA-DR θετικά.

ΑΝΩΡΙΜΑ ΜΕΓΑΚΑΡΥΟΚΥΤΤΑΡΑ (ΠΡΟΜΕΓΑΚΑΡΥΟΒΛΑΣΤΕΣ)

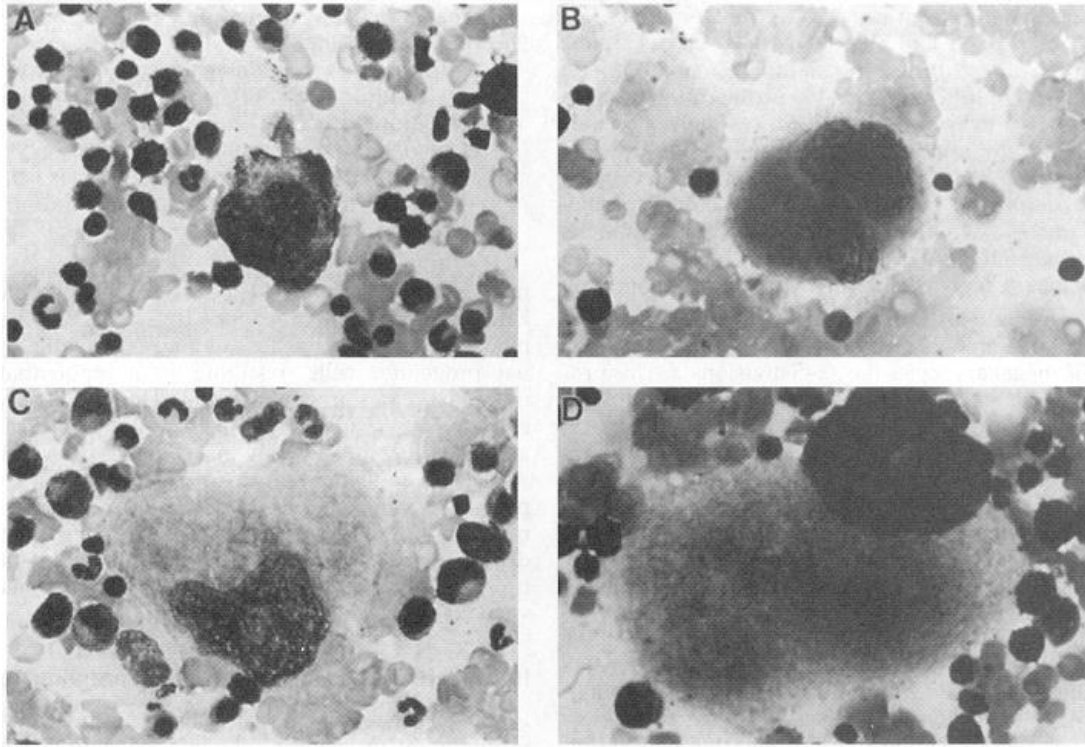
Προμεγακαρυοβλάστες είναι μεταβατικά κύτταρα, ενδιάμεσα μεταξύ των πολλαπλασιαζόμενων προγονικών κυττάρων και των μεταμιτωτικών ώριμων μεγακαρυοκυττάρων και αποτελούν περίπου το 5% των συνολικών μεγακαρυοκυτταάρων (165). Έχουν το μέγεθος και τη μορφολογία του λεμφοκυττάρου και δεν είναι εύκολο να διακριθούν *in vitro* ή στα δείγματα του μυελού των οστών, αλλά μπορούν να αναγνωρισθούν από την έκφραση ειδικών για τα αιμοπετάλια δεικτών όπως υπεροξειδάση των αιμοπεταλίων, η οποία ανευρίσκεται αποκλειστικά στο ενδοπλασματικό δίκτυο, γλυκοπρωτεΐνη IIb/IIIa, von Willebrand factor κ.τ.λ(166). Μερικά από αυτά μπορούν να διατηρούν μια περιορισμένη ικανότητα πολλαπλασιασμού αλλά η πλειοψηφία τους δε σχηματίζει αποικίες σε καλλιέργειες (167). Αποτελούν το στάδιο ανάπτυξης των μεγακαρυοκυττάρων στο οποίο έχει σταματήσει ο πολλαπλασιασμός, συνεχίζεται όμως η σύνθεση του DNA (ενδομίτωση). Οι προμεγακαρυοβλάστες είναι πολύ ευαίσθητοι στα επίπεδα των αιμοπεταλίων και είναι τα πρώτα κύτταρα που αυξάνονται σε κατάσταση θρομβοπενίας και αντίστροφα είναι τα πρώτα κύτταρα που μειώνονται σε καταστάσεις που συνοδεύονται από θρομβοκυττάρωση(168). Τρεις υποπληθυσμοί

αυτών των κυττάρων υπάρχουν οι οποίοι διαφέρουν μεταξύ τους στα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά τους, στην μορφολογία, στην έκφραση αντιγόνων και στα ένζυμα που περιέχουν(172,159) .

ΩΡΙΜΑ ΜΕΓΑΚΑΡΥΟΚΥΤΤΑΡΑ

Με βάση την ποιότητα και την ποσότητα του κυτταροπλάσματος του ώριμου μεγακαρυοκυττάρου, το μέγεθος, το βαθμό λόβωσης του πυρήνα και τη μορφή της χρωματίνης του πυρήνα μπορούν να αναγνωρισθούν τρία στάδια της ανάπτυξης των μεγακαρυοκυττάρων(169) (Εικόνα 2).

Μεγακαρυοβλάστη (στάδιο I) που χαρακτηρίζεται που χαρακτηρίζεται από τη μεγάλη σχέση πυρήνα/πρωτοπλάσματος, με αδρό βασεόφιλο πρωτόπλασμα, το οποίο αντανakλά το μεγάλο ρυθμό της πρωτεϊνοσύνθεσης που συμβαίνει σε αυτό το κύτταρο. Στο προμεγακαρυοκύτταρο (στάδιο II) που τόσο ο όγκος του πρωτοπλάσματος, όσο και ο αριθμός των ειδικών για τα αιμοπετάλια σωματιδίων έχουν αρχίσει να αυξάνονται. Τα κοκκιώδη μεγακαρυοκύτταρα (στάδιο III και IV) είναι τα περισσότερο ώριμα από τα μεγακαρυοκύτταρα έχουν άφθονο ώριμο πρωτόπλασμα, και ένα μεγάλο πολυλοβωτά πυρήνα και είναι υπεύθυνα για το σχηματισμό των αιμοπεταλίων.



Εικόνα 2: Ωριμα ανθρώπινα μεγακαρυοκύτταρα A) μεγακαρυοβλάστης B) Προμεγακαρυοκύτταρα (Στάδιο II) C) Κοκκιώδη μεγακαρυοκύτταρα (Στάδιο III) D) Κοκκιώδη μεγακαρυοκύτταρα (Στάδιο IV) (Hoffman: Hematology: Basic Principles and Practice, 3rd ed., 2000)

ΑΙΜΟΠΕΤΑΛΙΑ

Το τελικό γεγονός στην ανάπτυξη των μεγακαρυοκυττάρων είναι η απελευθέρωση των αιμοπεταλίων στην κυκλοφορία. Κατά την διάρκεια της ωρίμανσης των μεγακαρυοκυττάρων συμβαίνει αύξηση και εγκολεασμός της πλασματικής μεμβράνης τους, σχηματίζοντας έτσι ένα σωληνώδες σύστημα γνωστό ως σύστημα των μεμβρανών περιχαράκωσης (demarcation membrane system). Το σύστημα αυτό θεωρείται ότι χωρίζει το πρωτόπλασμα των μεγακαρυοκυττάρων σε πεδία αιμοπεταλίων αν και ο ακριβής ρόλος του δε είναι απόλυτα ξεκάθαρος. Τέλος τα μεγακαρυοκύτταρα εκτείνουν ψευδοπόδια στον αυλό

των αιμόκολλων και τα αιμοπετάλια αποσχίζονται από αυτά με κατακερματισμό της μεμβράνης τους μέσα στην κυκλοφορία (170).

ΔΕΙΚΤΕΣ ΤΗΣ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΤΩΝ ΜΕΓΑΚΑΡΥΟΚΥΤΤΑΡΩΝ

Τα μεγακαρυοκύτταρα και οι πρόδρομες μορφές τους εκφράζουν στην επιφάνεια τους αντιγονικούς επιτόπους οι οποίοι καθορίζονται ανάλογα με το στάδιο ανάπτυξης. Η έκφραση αυτών των αντιγόνων επιτρέπει την απομόνωση και τον καθορισμό των υποπληθυσμών των μεγακαρυοκυττάρων από τα μυελικά κύτταρα τα οποία περιέχουν ποικίλα προγονικά κύτταρα των μεγακαρυοκυττάρων. Ένα από τα αντιγόνα των μεγακαρυοκυττάρων και των πρόδρομων μορφών τους είναι το CD34, ένα αντιγόνο που βρίσκεται σε όλα τα αιμοποιητικά προγονικά κύτταρα και επιτρέπει το διαχωρισμό τους από τα άλλα κύτταρα του μυελού (171). Η έκφραση του CD34 μειώνεται σταδιακά με την αύξηση της ωρίμανσης των προγονικών κυττάρων και χάνεται στα πολυπλοειδικά μεγακαρυοκύτταρα (172). Επακόλουθα η εξέταση των κλασμάτων των CD34⁺ για άλλους αντιγονικούς δείκτες βοηθάει στην ανοσοφαινοτυπική ανάλυση της μεγακαρυοκυτταρικής σειράς. Η συνέκφραση του CD34 και του HLA-DR επιτρέπει τον περαιτέρω διαχωρισμό των προγονικών κυττάρων. Γενικά η έκφραση του HLA-DR (σύμπλεγμα HLA-DR του μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας τάξεως II) χαρακτηρίζει περισσότερο τα ώριμα προγονικά αιμοποιητικά κύτταρα (π.χ. τα CD34⁺ HLA-DR⁻ είναι περισσότερο αρχέγονα από τα CD34⁺ HLA-DR⁺ κύτταρα). Ανάμεσα στις προβαθμίδες των μεγακαρυοκυττάρων αυτή η διαφορά ξεχωρίζει τα BFU-Mk (τα οποία είναι CD34⁺ HLA-DR⁻) από τα CFU-Mk (τα οποία είναι CD34⁺ HLA-DR⁺) (173).

Η γλυκοπρωτεΐνη των αιμοπεταλίων GPIIb/IIIa (CD41) ένας άλλος σημαντικός δείκτης της μεγακαρυοκυτταρικής σειράς , εκφράζεται σε όλα τα κύτταρα της σειράς από τα CFU-MK έως τα αιμοπετάλια. Τα CD41⁺ αντιπροσωπεύουν το 2% των CD34⁺ κυττάρων (172).

Η γλυκοπρωτεΐνη GPIIIa (CD61) έπεται της έκφρασης της GPIIb/IIIa (CD41) και εμφανίζεται στο στάδιο του προμεγακαρυοβλάστη. Η έκφραση της αυξάνει κατά τη διάρκεια της διαφοροποίησης των μεγακαρυοκυττάρων παράλληλα με τη μείωση της έκφρασης του CD34 (172,174).

Μελέτες σε προμεγακαρυοβλάστες στους ανθρώπους , έχουν δείξει ότι και αυτά τα κύτταρα εκφράζουν το CD34 αλλά σε μικρό ποσοστό . Τρεις αντιγονικά διακριτοί υποπληθυσμοί των προμεγακαρυοβλαστών έχουν αναγνωρισθεί πάνω στη βάση της συνέκφρασης του CD34 και της γλυκοπρωτεΐνης των αιμοπεταλίων GPIIIa (CD34+IIIa⁻ , CD34+ IIIa⁺ και CD34-IIIa⁺). Αυτά τα κύτταρα είναι μεταβατικά στην έκφραση των αντιγόνων και αποτελούν το σημείο στο οποίο στα μεγακαρυοκύτταρα αρχίζει να μειώνεται η έκφραση του CD34 και αρχίζει να αυξάνει τη γλυκοπρωτεΐνη των αιμοπεταλίων GPIIIa . Πάνω στη βάση της ικανότητας πολλαπλασιασμού και των περιεχομένων κοκκίων τα CD34-IIIa⁺ είναι τα περισσότερο ώριμα, περιέχουν μεγάλο αριθμό κοκκίων και έχουν μικρή δυνατότητα πολλαπλασιασμού, τα CD34+ IIIa⁺ είναι ενδιάμεσα κύτταρα ενώ τα CD34+IIIa⁻ κύτταρα είναι τα περισσότερο αρχέγονα έχουν μεγαλύτερη ικανότητα πολλαπλασιασμού και δίνουν γένεση σε περισσότερο πολυπλοειδικούς απογόνους. Εντούτοις η συνολική ικανότητα πολλαπλασιασμού των προμεγακαρυοβλαστών παραμένει περιορισμένη και μόνο ένα 10% των CD34+IIIa⁻ είναι ικανά να σχηματίζουν αποικίες (172) .

Τέλος ανοσοφαινοτυπικές αναλύσεις έχουν δείξει ότι αν και τα ώριμα μεγακαρυοκύτταρα εκφράζουν ασθενώς το CD34 ή και καθόλου εντούτοις εκφράζουν αντιγόνα που χαρακτηρίζουν τα αιμοπετάλια, όπως τέταρτο αιμοπεταλιακό παράγοντα (PF4) , γλυκοπρωτεΐνη GPIIb/IIIa, vWF(Von Willibrand factor),θρομβοσπονδίνη και θρομβομοντουλίνη.

ΕΝΔΟΜΙΤΩΣΗ

Ένα από τα πιο χαρακτηριστικά γνωρίσματα της ανάπτυξης των μεγακαρυοκυττάρων είναι η ενδομίτωση, όπου γίνεται διπλασιασμός του DNA χωρίς διαίρεση του πυρήνα ή του κυτταροπλάσματος, η οποία έχει σαν αποτέλεσμα τον πολυπλοειδισμό των μεγακαρυοκυττάρων. Η ενδομίτωση αρχίζει στους προμεγακαρυοβλάστες και ολοκληρώνεται στο στάδιο II των μεγακαρυοβλαστών (291-292). Είναι μια καλά ελεγχόμενη διαδικασία όπου σε κάθε κύκλο της σύνδεσης του DNA έχουμε ακριβή διπλασιασμό όλων των χρωμοσωμάτων με αποτέλεσμα τα κύτταρα να περιέχουν DNA που έχει 8 έως 128 φορές το φυσιολογικό χρωμοσωμιακό υλικό σε ένα μόνο πολυλωβωτό πυρήνα . Η ενδομίτωση δεν είναι το αποτέλεσμα της απουσίας μίτωσης στα μεγακαρυοκύτταρα αλλά πιθανά το αποτέλεσμα μιας αποτυχημένης μίτωσης(293) Η κινητική του κυτταρικού κύκλου των κυττάρων που υφίσταται ενδομίτωση είναι ασυνήθης και χαρακτηρίζεται από μια βραχείας διάρκειας G1 φάση , μια φυσιολογική ή ελαφρά παρατεταμένη φάση σύνδεσης του DNA, μια βραχείας διάρκειας G2 φάση και μια πολύ βραχεία φάση ενδομίτωσης. Κατά τη διάρκεια της τελευταίας τα χρωμοσώματα συμπυκνώνονται, διαλύεται η πυρηνική μεμβράνη σχηματίζεται η μιτωτική άτρακτος στην οποία μετακινούνται τα χρωμοσώματα. Εντούτοις μετά από τον αρχικό διαχωρισμό των χρωμοσωμάτων οι χρωματίδες τους αποτυγχάνουν να ολοκληρώσουν τη φυσιολογική

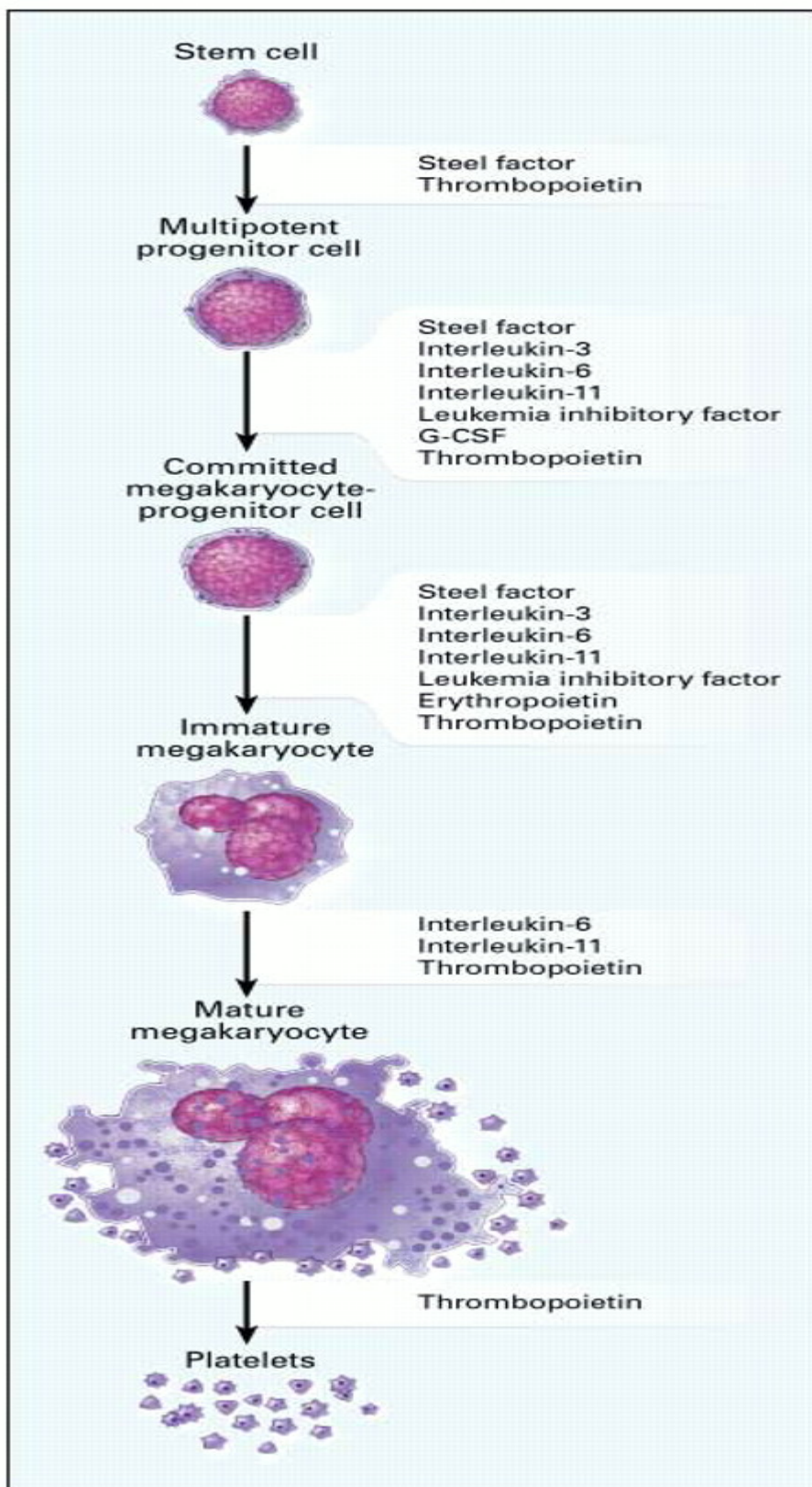
τους μετακίνηση στους αντίθετους πόλους του κυττάρου , η άτρακτος διαλύεται και το κύτταρο εισέρχεται ξανά στην G1 φάση(293).

ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΗΣ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΤΩΝ ΜΕΓΑΚΑΡΥΟΚΥΤΤΑΡΩΝ

Υπάρχουν τρεις περιοχές στην ανάπτυξη των μεγακαρυοκυττάρων στις οποίες ο φυσιολογικός έλεγχος είναι εμφανής, στην αύξηση του αριθμού των μεγακαρυοκυττάρων (πολλαπλασιασμός), στη ρύθμιση της ωρίμανσης των μεγακαρυοκυττάρων και τέλος στον έλεγχο της αποβολής των αιμοπεταλίων. Ένας μεγάλος αριθμός μελετών έχει δείξει το ρόλο των κυτταροκινών στις δύο πρώτες από αυτές τις περιοχές

ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΠΟΥ ΠΡΟΑΓΟΥΝ ΤΗΝ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΤΩΝ ΜΕΓΑΚΑΡΥΟΚΥΤΤΑΡΩΝ

Η ανάπτυξη των μεγακαρυοκυττάρων ελέγχεται από αυξητικούς παράγοντες που η λειτουργία τους είναι να ρυθμίζουν τον πολλαπλασιασμό και την τελική διαφοροποίηση (ωρίμανση) τους. Πολυάριθμες κυτταροκίνες, με πολλαπλές λειτουργικές δράσεις, επερεάζουν την μεγακαρυοποίηση εάν και συχνά η δράση τους πάνω στον πολλαπλασιασμό και την ωρίμανση αλληλεπικαλύπτονται. Ο συνδυασμός κυτταροκινών διεγείρει καλύτερα τον πολλαπλασιασμό των μεγακαρυοκυττάρων στις *in vitro* μελέτες από ένα μόνο αυξητικό παράγοντα. Συνήθως απαιτείται ο συνδυασμός 2-7 κυτταροκινών για τη ανάπτυξη των μεγακαρυοκυττάρων και την ωρίμανση τους (175-178) (Εικόνα 3) .



Εικόνα 3: Ο ρόλος των κυτταροκινών στη μεγακαρυοποίηση. Πολλά στάδια της ανάπτυξης των μεγακαρυοκυττάρων μπορεί να επηρεάζονται από πολλές κυτταροκίνες *in vitro* όπως interleukin -3 , interleukin-6, interleukin- 11, thrombopoietin, stem factor, granulocyte colony stimulating factor, erythropoietin, leukemia inhibitor factor. Εάν και όλες αυτές οι κυτταροκίνες μπορεί να επιδρούν στην ανάπτυξη των μεγακαρυοκυττάρων *in vitro* γενετική έλλειψη μόνο του stem factor και της thrombopoietin επιδρά στην ανάπτυξη των μεγακαρυοκυττάρων και στην παραγωγή των αιμοπεταλίων *in vivo*.(Kaushansky K. Thrombopoietin. N Engl Med 1988;339:746-54)

Ιντερλευκίνη-3 (IL-3): παράγεται κυρίως από τα T-λεμφοκύτταρα και τα μαστοκύτταρα είναι μιτωγόνος κυτταροκίνη και κατά κύριο λόγο διεγείρει τον πολλαπλασιασμό των προβαθμίδων των μεγακαρυοκυττάρων. αλλά από μόνη της έχει μικρή επίδραση στην ωρίμανση των μεγακαρυοκυττάρων(179,181-183).

GM-CSF: παράγεται από τα T λεμφοκύτταρα, μονοκύτταρα, ινοβλάστες και ενδοθηλιακά κύτταρα, είναι επίσης μιτωγόνος κυτταροκίνη και προάγει τον πολλαπλασιασμό των προβαθμίδων των μεγακαρυοκυττάρων μόνη της ή σε συνδυασμό με την IL-3(180-183).

Τόσο η IL-3 όσο και ο GM-CSF μόνοι τους δεν μπορούν να υποστηρίξουν τη πλήρη ανάπτυξη των μεγακαρυοκυττάρων και απαιτείται ο συνδυασμός τους με άλλες κυτταροκίνες όπως IL-6 και IL-11. Και οι δύο τελευταίες κυτταροκίνες επιδρούν κυρίως στο στάδιο ωρίμανσης των μεγακαρυοκυττάρων και δρουν συνεργικά με την IL-3 ή GM-CSF για να αυξήσουν τον αριθμό, το μέγεθος και το περιεχόμενο σε DNA των αναπτυσσόμενων μεγακαρυοκυττάρων.

Ο φυσιολογικός ρόλος της IL-3 και του GM-CSF στη μεγακαρυοποίηση αμφισβητείται μια και η χορήγηση τους στα ποντίκια ή τους ανθρώπους έχει μόνο ελάχιστη επίδραση στην παραγωγή των αιμοπεταλίων και η γενετική εξάλειψη είτε της IL-3 είτε του GM-CSF δεν έχει καμιά επίδραση στην μεγακαρυοποίηση, ακόμα και σε συνδυασμό με την εξάλειψη και άλλων κυτταροκινών που επιδρούν στη μεγακαρυοποίηση(184-185).

Stem cell factor ή c-kit ligand ή mast cell growth factor ή steel factor: Είναι πολυδύναμη κυτταροκίνη. Δρά κυρίως στα αρχέγονα αιμοποιητικά κύτταρα. Παράγεται από τα ενδοθηλιακά κύτταρα και τους ινοβλάστες στο μυελό των οστών (185-186). Από μόνη της δεν είναι ισχυρός επαγωγέας του σχηματισμού των

μεγακαρυοκυτταρικών αποικιών και της ενδομίτωσης (187-190). Ωστόσο μπορεί να δράσει συνεργικά με άλλες κυτταροκίνες όπως , IL-3, IL-6, IL-11, LIF και ιδιαίτερα της TPO στο σχηματισμό των μεγακαρυοκυτταρικών αποικιών και στην ωρίμανση των μεγακαρυοκυττάρων (191-193). Επιδρά ιδιαίτερα με την TPO σε δύο επίπεδα α) στο επίπεδο των δεσμευμένων προγονικών κυττάρων των μεγακαρυοκυττάρων και αυξάνει τον πολλαπλασιασμό τους και β) στο επίπεδο των αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων και προάγει τη διαφοροποίησή τους προς την μεγακαρυοκυτταρική σειρά. Γενετική εξάλειψη του οδηγεί σε μείωση της παραγωγής μεγακαρυοκυττάρων(194).

Flt-3 ligand (FL): Παράγεται από τα T κύτταρα και τα στρωματικά κύτταρα. Επιδρά κυρίως στα αρχέγονα αιμοποιητικά κύτταρα (195-196). Εάν και πολλές μελέτες έχουν δείξει ότι από μόνο του το FL δεν ασκεί καμία δράση στο σχηματισμό των μεγακαρυοκυτταρικών αποικιών, εντούτοις υπάρχουν μερικές μελέτες οι οποίες υποστηρίζουν ότι μπορεί να αυξήσει την επίδραση των κυτταροκινών GM-CSF, IL-3 και SCF στον πολλαπλασιασμό των μεγακαρυοκυττάρων(197).

Ιντερλευκίνη-6 (IL-6): Παράγεται σαν απάντηση σε φλεγμονώδη ερεθίσματα από T λεμφοκύτταρα, μακροφάγα , ινοβλάστες και στρωματικά κύτταρα (198). Εάν και η IL-6 από μόνη της in vitro, σε καλλιέργειες χωρίς ορό, δεν ασκεί καμία επίδραση στον πολλαπλασιασμό των μεγακαρυοκυττάρων , μπορεί να αυξάνει τον αριθμό των μεγακαρυοκυτταρικών αποικιών παρουσία IL-3, stem factor και LIF (177,191 199). Δρά κυρίως στο στάδιο της ωρίμανσης των μεγακαρυοκυττάρων αυξάνοντας τη διάμετρο τον πολυπλοειδισμό την ενεργότητα της ακετυλοχολινεστεράσης και την σύνθεση των πρωτεϊνών στα μεγακαρυοκύτταρα(200-202). Σε μακροχρόνιες μυελικές καλλιέργειες δρά σαν παράγοντας διαφοροποίησης καθώς τα επίπεδα της σχετίζονται με το μέγεθος των μεγακαρυοκυττάρων και τον πολυπλοειδισμό τους και η εξουδετέρωση της προκαλεί μείωση αυτών των παραμέτρων(203).

Η χορήγηση της στα ποντίκια ή σε ανθρώπους έχει σαν αποτέλεσμα αύξηση του αριθμού των κυκλοφορούντων αιμοπεταλίων (202, 204-207). Αυτά τα ευρήματα προτείνουν ότι η IL-6 μπορεί να συμβάλλει στη μεγακαρυοποίηση in vivo ένα συμπέρασμα το οποίο υποστηρίζεται από την παραγωγή της IL-6 από ορισμένα καρκινικά κύτταρα με αποτέλεσμα θρομβοκυττάρωση σαν παρανεοπλαστικό φαινόμενο (208). Πρόσφατες μελέτες προτείνουν ότι η IL-6 επιδρά έμμεσα στην παραγωγή των αιμοπεταλίων αυξάνοντας την παραγωγή mRNA TPO από τα ηπατοκύτταρα (209-210).

Ιντερλευκίνη-11(IL-11): Παράγεται από ένα μεγάλο αριθμό ιστών και στο αιμοποιητικό σύστημα από τους ινοβλάστες (211). Μόνη της δεν έχει καμία επίδραση στο πολλαπλασιασμό των μεγακαρυοκυττάρων (212). Προάγει την ωρίμανση των μεγακαρυοκυττάρων αυξάνοντας το ποσοστό των 32N μεγακαρυοκυττάρων (214) Δρά συνεργικά με την θρομβοποιητίνη την ιντερλευκίνη-3, LIF και ερυθροποιητίνη, και προάγει τον πολλαπλασιασμό και την ωρίμανση των μεγακαρυοκυττάρων (192, 213-215).

Leukemia inhibitory factor, LIF (Λευχαιμικός ανασταλτικός παράγοντας): Είναι μια κυτταροκίνη που σχετίζεται δομικά με την IL-6 και ασκεί πολυαριθμες βιολογικές δράσεις σε αιμοποιητικά και μη αιμοποιητικά κύτταρα. Αυξάνει τον αριθμό των μεγακαρυοκυττάρων και αιμοπεταλίων όταν ενεθεί in vivo στα ποντίκια (216). In vitro σε καλλιέργειες από φυσιολογικό μυελό των οστών, μόνο του δεν ασκεί καμία επίδραση στην επιβίωση και τον πολλαπλασιασμό των μεγακαρυοκυττάρων αλλά προάγει την ωρίμανση των μεγακαρυοκυττάρων αυξάνοντας την δραστηριότητα της ακετυλοχολινεστεράσης και το ποσοστό των 32N μεγακαρυοκυττάρων (214).

Ερυθροποιητίνη (EPO): Παράγεται κυρίως από τα περιωληνιαρικά νεφρικά κύτταρα και σε μικρό ποσοστό από τα ηπατοκύτταρα τα κύτταρα Kupffer του ήπατος και από τα μακρογάγα του μυελού των οστών (217-219). Είναι ικανή να αυξάνει το DNA και τη σύνθεση των πρωτεϊνών σε απομονωμένα μεγακαρυοκύτταρα καθώς επίσης και το σχηματισμό των μεγακαρυοκυτταρικών αποικιών *in vitro* (220-222). Ειδικές υψηλής συγγένειας θέσεις σύνδεσης της ερυθροποιητίνης εκφράζονται στα μεγακαρυοκύτταρα (223). Ωστόσο ο ρόλος της EPO στη μεγακαρυοποίηση είναι περιορισμένος και χρειάζεται και την συνεργασία και άλλων κυτταροκινών (224).

ΘΡΟΜΒΟΠΟΙΗΤΙΝΗ (TPO):

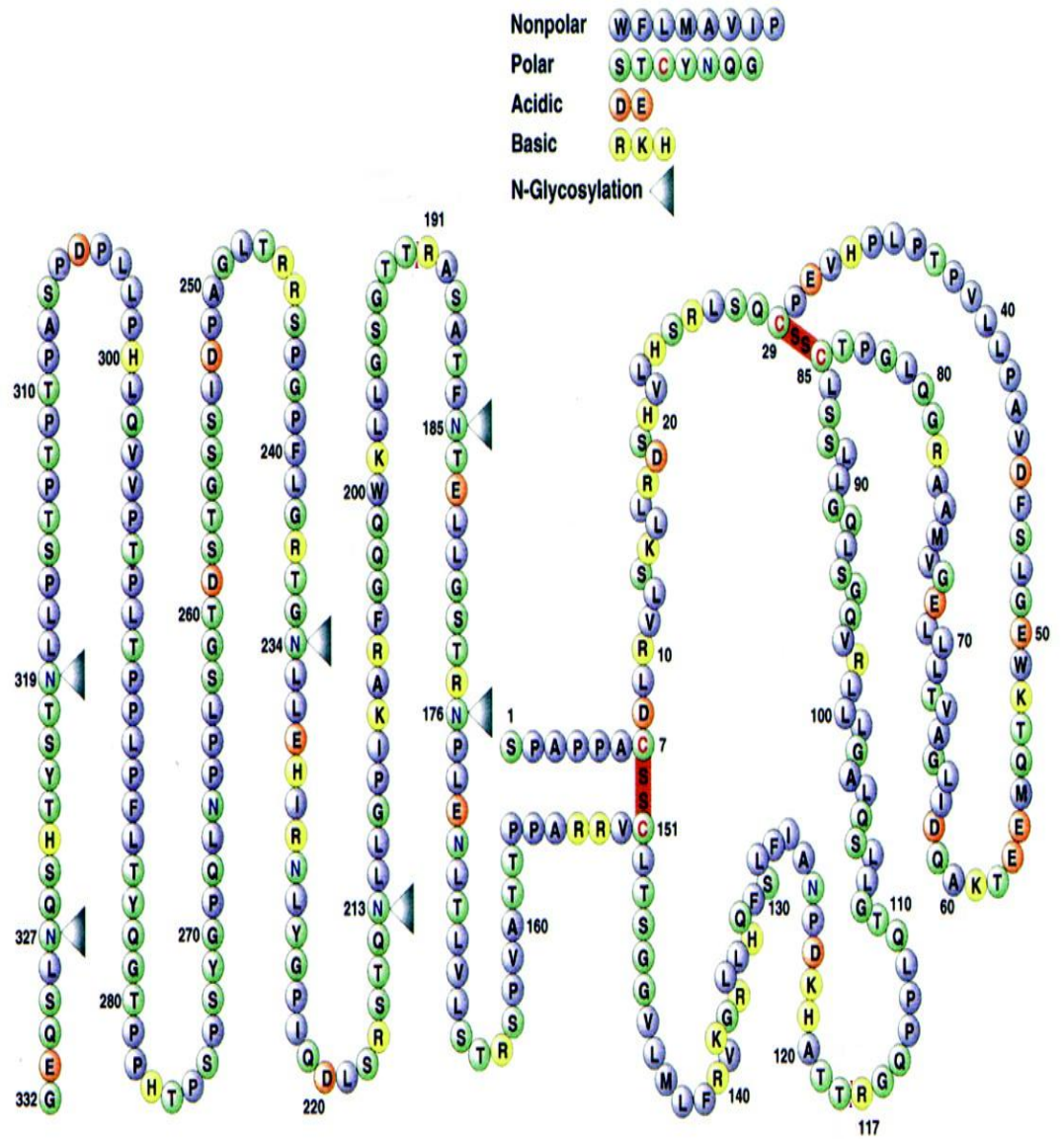
ΔΟΜΗ ΤΗΣ ΘΡΟΜΒΟΠΟΙΗΤΙΝΗΣ

Η θρομβοποιητίνη γνωστή και ως c-Mpl ligand είναι ο κύριος ρυθμιστής του πολλαπλασιασμού και της ωρίμανσης των μεγακαρυοκυττάρων καθώς επίσης και της παραγωγής αιμοπεταλίων. Το γονίδιο της θρομβοποιητίνης εδράζεται στο χρωμόσωμα 3q21(225). Συντίθεται σαν πρόδρομη πρωτεΐνη 353 αμινοξέων συμπεριλαμβανομένου και των εικοσιένα αμινοξέων που αποτελούν την οδηγό αλληλουχία έκκρισης. Ακολουθεί μετά την έκκριση απομάκρυνση των 21 αμινοξέων και τα εναπομείναντα 332 αμινοξέα υφίσταται γλυκοζυλίωση έτσι ώστε τελικά να προκύψει μια γλυκοπρωτεΐνη 80-90 KDa .Η TPO παίρνοντας τη δευτερογενή δομή της τυλίγεται σε τέσσερις άλφα έλικες (Εικόνα 4). Σχηματικά το πολυπεπτίδιο μπορεί να διαιρεθεί σε δύο περιοχές. Την αμινοτελική περιοχή που αποτελείται από 154 αμινοξέα, φέρει αλληλουχίες με μεγάλη ομολογία με την ερυθροποιητίνη και συνδέεται με τον Mpl υποδοχέα και την καρβοξυ-τελική περιοχή, η οποία περιέχει 6 θέσεις N-και πολλαπλές O-συνδεδεμένες υδατανθρακικές αλύσους. Η λειτουργία των υδατανθρακικών αυτών αλύσων είναι να

αυξάνουν το χρόνο παραμονής της πρωτεΐνης στην κυκλοφορία, τη βιοδιαθεσιμότητα της και να βελτιώνουν την απεκκριτική της ικανότητα .

Η θρομβοποιητίνη ασκεί τις βιολογικές της δράσεις μέσω του υποδοχέα της, ο οποίος εκφράζεται από τις δεσμευμένες προβαθμίδες των μεγακαρυοκυττάρων ως τα αιμοπετάλια καθώς επίσης και στο κλάσμα των CD34⁺ κύτταρων στο μυελό των οστών (227-228).

Ο υποδοχέας της θρομβοποιητίνης (c-Mpl) είναι μια διαμεμβρανική πρωτεΐνη η οποία, εκτός από την εσωτερική καταλυτική περιοχή της, δομικά και λειτουργικά σχετίζεται με τα μέλη της μεγάλης οικογένειας των αιμοποιητικών υποδοχέων (226). Μετά τη σύνδεση της θρομβοποιητίνης ο υποδοχέας υφίσταται διμερισμό ο οποίος οδηγεί στη φωσφορυλίωση και ενεργοποίηση πολλών μορίων μεταφοράς του σήματος στον πυρήνα όπως το μονοπάτι των JAK/STAT κινασών (294) , το μονοπάτι των MAPK κινασών (295) και το μονοπάτι των PI3K κινασών (296), με τελικό αποτέλεσμα την επιβίωση ανάπτυξη και την διαφοροποίηση των κυττάρων στόχων.



Εικόνα 4: Σχηματική παράσταση της δομής ολόκληρου του μορίου της θρομβοποιητίνης. Τα αμινοξέα συμβολίζονται με ένα γράμμα. (Kato T, et al. Native thrombopoietin: structure and function. Stem Cell 1988;16:322-

ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΤΗΣ ΘΡΟΜΒΟΠΟΙΗΤΙΝΗΣ

Η θρομβοποιητίνη κυρίως παράγεται από το ήπαρ (ηπατοκύτταρα) και το νεφρό (εσπειραμένα σωληνάκια) και σε μικρότερο βαθμό από τα σπλήνα και το μυελό των οστών (στρωματικά κύτταρα) (229-231).

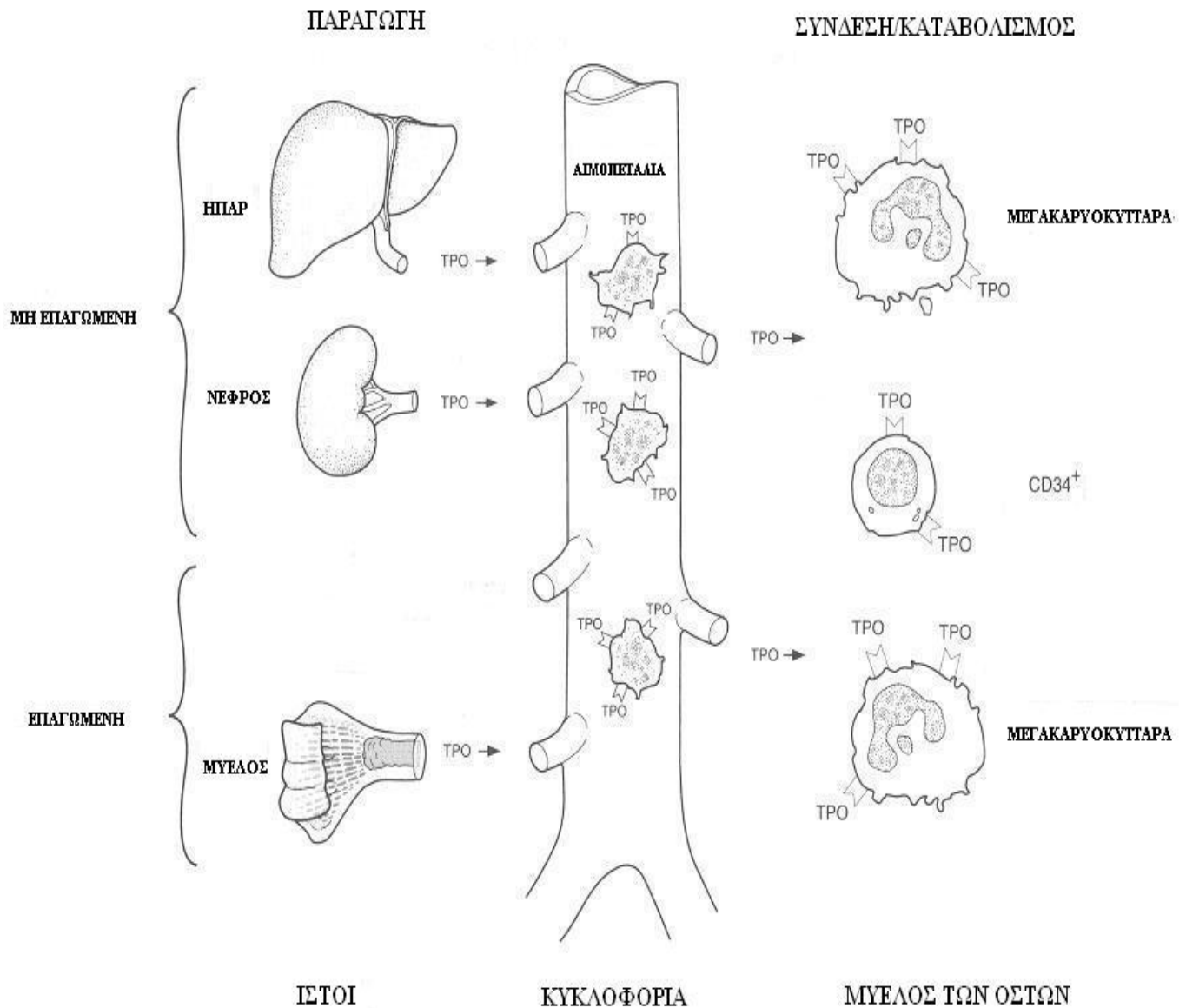
Η συγκέντρωση της θρομβοποιητίνης στο πλάσμα μεταβάλλεται αντίστροφα από τον αριθμό των αιμοπεταλίων (233). Δύο πιθανοί μηχανισμοί έχουν προταθεί για τον έλεγχο των επιπέδων της TPO στο πλάσμα (Εικόνα 5). Σύμφωνα με το πρώτο μηχανισμό η έκφραση του γονιδίου της TPO είναι σταθερή και η συγκέντρωση της εξαρτάται από τη μάζα των c-Mpl υποδοχέων (π.χ. αιμοπεταλίων και μεγακαρυοκυττάρων) οι οποίοι συνδέουν την TPO και την καταβολίζουν (232-234). Ο σημαντικός ρόλος του μηχανισμού αυτού στη ρύθμιση των επιπέδων της TPO ενισχύεται από τα αποτελέσματα πολλών μελετών οι οποίες δείχνουν ότι τα επίπεδα του mRNA TPO στο ήπαρ και στο νεφρό, των δύο σημαντικότερων ιστών παραγωγής της TPO, σε καταστάσεις εκσεσημασμένης θρομβοπενίας ή θρομβοκυττάρωσης δεν μεταβάλλονται (229,230,235).

Η αύξηση της έκφρασης του TPO mRNA στο μυελό των οστών, σε καταστάσεις θρομβοπενίας, δηλώνουν ότι πρέπει να υπάρχει ένας επιπρόσθετος ή εναλλακτικός μηχανισμός στη ρύθμιση των επιπέδων της TPO (229-230,236).

Σύμφωνα με το μηχανισμό αυτό η συγκέντρωση της TPO στο πλάσμα καθορίζεται με μηχανισμό παλίνδρομης ρύθμισης στο επίπεδο της έκφρασης του γονιδίου της, στο μυελό των οστών. Υψηλός αριθμός αιμοπεταλίων μπορεί να αναστέλλει τη μεταγραφή του γονιδίου της TPO ή να ελαττώνει την σταθερότητα των αντιγράφων του γονιδίου της TPO. Αντίθετα η θρομβοπενία θα πρέπει να έχει ακριβώς τα αντίθετα αποτελέσματα..

Η άποψη αυτή ενισχύεται από το γεγονός ότι ένας αριθμός πρωτεϊνών των αιμοπεταλίων μπορούν να ρυθμίζουν την παραγωγή της TPO από τα στρωματικά κύτταρα του μυελού των οστών. {CD40 Ligand, platelet-derived growth factor (PDGF), Fibroblast growth factor (FGF), TGF-β1, Platelet Factor 4 (PF4) και thrombospondin} (237-239).

Εντούτοις υπάρχουν γεγονότα που ενισχύουν την άποψη ότι πρέπει να υπάρχουν επιπρόσθετοι μηχανισμοί εκτός της μάζας των αιμοπεταλίων-μεγακαρυοκυττάρων στη ρύθμιση των επιπέδων της θρομβοποιητίνης. Για παράδειγμα στις περιπτώσεις με αντιδραστική θρομβοκυττάρωση, παρατηρούνται αυξημένα επίπεδα θρομβοποιητίνης στον ορό παρά την αυξημένη μάζα των αιμοπεταλίων και μεγακαρυοκυττάρων (231). Έχει βρεθεί ότι στις περιπτώσεις αυτές τα αυξημένα επίπεδα της IL-6 οδηγούν σε αύξηση της έκφρασης του mRNA της TPO από το ήπαρ (209-210).



Εικόνα 5: Ρύθμιση της παραγωγής της θρομβοποιητίνης. Η θρομβοποιητίνη (TPO) παράγεται σταθερά από το ήπαρ και τα νεφρά. Στις περιπτώσεις αυξημένης καταστροφής των αιμοπεταλίων ή μεγακαρυοκυττάρων αυξάνεται η παραγωγή της από τον μυελό των οστών, συνεισφέροντας έτσι στην αύξηση της παραγωγής των αιμοπεταλίων. Η TPO στη συνέχεια συνδέεται με τους υποδοχείς της στα αιμοπετάλια καθώς επίσης στα μεγακαρυοκύτταρα και στα CD34 κύτταρα με αποτέλεσμα τον καταβολισμό της (Hoffman: Hematology: Basic Principles and Practice, 3rd ed., 2000)

ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΟΣ ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ ΘΡΟΜΒΟΠΟΙΗΤΙΝΗΣ

Η ΤΡΟ μόνη της ή σε συνδυασμό με άλλες κυτταροκίνες ασκεί πολλές δράσεις κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης των μεγακαρυοκυττάρων (Εικόνα 3).

Ένας μεγάλος αριθμός μελετών *in vitro* και *in vivo* έχουν βοηθήσει να διευκρινηθούν οι κυτταρικοί στόχοι της θρομβοποιητίνης και έχει βοηθήσει να αποκαλυφθούν πολλές από τις ιδιότητες του μορίου. Είναι ο κύριος ρυθμιστής της ωρίμανσης των μεγακαρυοκυττάρων οδηγώντας άμεσα στο σχηματισμό των αιμοπεταλίων. Αν και η ΤΡΟ είναι απαραίτητη για την παραγωγή μεγάλων μεγακαρυοκυττάρων καθένα από τα οποία έχει την ικανότητα να δίνει γένεση σε χιλιάδες αιμοπετάλια, ο σχηματισμός των προ-αιμοπεταλίων(*proplatelet*) από τα μεγακαρυοκύτταρα δεν απαιτεί την παρουσία της απεναντίας μερικοί μελετητές υποστηρίζουν ότι μπορεί να καταστέλλει την παραγωγή τους (232-234).

Η ΤΡΟ υποστηρίζει: α) το σχηματισμό των ειδικών κοκκίων των αιμοπεταλίων β) την έκφραση των ειδικών πρωτεϊνών των αιμοπεταλίων όπως της γλυκοπρωτεΐνης GPIIb/IIIa GPIb/V/IX γ) το σχηματισμό του συστήματος των μεμβρανών περιχάρακωσης (*demarcation membrane*) και των πεδίων αιμοπεταλιοπαραγωγής δ) την προσκόλληση των μεγακαρυοκυττάρων (*megakaryocytes adhesion*) μέσω της ενεργοποίησης των GPIIb/IIIa, VLA-4, VLA-5 ε) την ενδομίτωση και σαν επακόλουθο τον πολυπλοειδισμό των μεγακαρυοκυττάρων στ) το σχηματισμό των αιμοπεταλίων από ένα μόνο μεγακαρυοκύτταρο σε καλλιέργειες χωρίς ορό (213, 235-237). Άλλες κυτταροκίνες αποτυγχάνουν να οδηγήσουν τα μεγακαρυοκύτταρα στην πλήρη ωρίμανση τους , εάν η ενδογενή επίδραση της ΤΡΟ μπλοκαριστεί (213).

Η ΤΡΟ επίσης είναι ένας ισχυρός επαγωγέας του πολλαπλασιασμού όλων των προγονικών προβαθμίδων των μεγακαρυοκυττάρω. Προάγει την διαφοροποίηση των

αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων προς μεγακαρυοκύτταρα και προάγει τη δημιουργία των μεγακαρυοκυτταρικών αποικιών (CFU-MKs, colony-forming unit-megakaryocytes) (238). Δρα συνεργικά μ' άλλες κυτταροκίνες κυρίως ιντερλευκίνη 3 (IL- 3), ιντερλευκίνη 11 (IL- 11), stem factor, (SF) και ερυθροποιητίνη (EPO) και προάγει την ανάπτυξη των προγονικών κυττάρων των μεγακαρυοκυττάρων και την ωρίμανση τους (192,239). Γενετική έλλειψη της TPO ή του υποδοχέα της οδηγεί σε σοβαρή θρομβοπενία στα ποντίκια οφειλόμενη σε μεγάλο βαθμό στη ελάττωση του αριθμού των προγονικών κυττάρων των μεγακαρυοκυττάρων και των ώριμων μεγακαρυοκυττάρων καθώς επίσης και σε μείωση του πολυπλοειδισμού των εναπομείνοντα μεγακαρυοκυττάρων (240-241). Αντίθετα όταν η TPO χορηγείται σε ζώα ή ανθρώπους διεγείρει την παραγωγή των αιμοπεταλίων με λογαριθμικό τρόπο (242-243).

Εκτός από την άμεση δράση της στον πολλαπλασιασμό και την ωρίμανση των μεγακαρυοκυττάρων η TPO δρά στα αρχέγονα αιμοποιητικά κύτταρα και προάγει την επιβίωσή τους (244-245). Δρα συνεργικά με την ερυθροποιητίνη και διεγείρει την ανάπτυξη των προγονικών κυττάρων των ερυθροκυττάρων και σε συνεργασία με την ιντερλευκίνη-3 και τον stem cell παράγοντα προάγει την επιβίωση και τον πολλαπλασιασμό των αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων και των προγονικών κυττάρων όλων των αιμοποιητικών σειρών (246,192). Χορήγηση της σε φυσιολογικά ή μυελοκατασταλμένα ζώα αυξάνει τον αριθμό όλων των προγονικών κυττάρων, ενώ γενετική έλλειψη της TPO ή του υποδοχέα της οδηγεί σε 65%ώς 95% ελάττωση των πρόδρομων κυττάρων πολλών σειρών (246-248). Στη συγγενή αμεγακαρυοκυτταρική θρομβοπενία, που οφείλεται σε μετάλλαξη του υποδοχέα της θρομβοποιητίνης, αρχικά παρατηρείται μόνο ελάττωση ή έλλειψη της μεγακαρυοκυτταρικής σειράς στο μυελό των οστών των ασθενών αυτών. Αργότερα με την πρόοδο της νόσου παρατηρείται ελάττωση του αριθμού και της κλωνογονικότητας των μυελικών

κυττάρων που συνοδεύεται από μείωση των προγονικών κυττάρων της ερυθράς και μυελικής σειράς, υποπλασία του μυελού των οστών και πανκυτταροπενία στο περιφερικό αίμα (249).

ΑΝΑΣΤΟΛΕΙΣ ΤΗΣ ΜΕΓΑΚΑΡΥΟΠΟΗΣΗΣ

Transforming growth factor beta 1 (TGF-β1)

Ο TGF παράγεται από πολλούς τύπους κυττάρων. Παράγεται από τα μεγακαρυοκύτταρα και αποθηκεύεται στα α-κοκκία τους καθώς επίσης και στα α-κοκκία των αιμοπεταλίων από τα οποία ελευθερώνεται χωρίς την ύπαρξη ερεθίσματος ή σε απάντηση μετά από διέγερση σε αυξητικούς παράγοντες κυρίως μετά από επίδραση IL-3 και σε μικρότερο βαθμό μετά από επίδραση IL-1 και IL-11 (250-251). Επίσης παράγεται από τα μυελικά στρωματικά κύτταρα (252,253,256), τα ενεργοποιημένα μακροφάγα (254) , ενεργοποιημένα T λεμφοκύτταρα (255) και τα CD34 αιμοποιητικά προγονικά κύτταρα (257).

Δομή του TGF-β1

Τρεις αρκετά όμοιες ισομορφές του TGF-β έχουν απομονωθεί και κλωνοποιηθεί από τα θηλαστικά ο TGF-β1, TGF-β2 και ο TGF-β3 (276-277). Εάν και ο ρυθμιστικός ρόλος των 3 αυτών ισόμορφων μπορεί να διαφέρει είναι καλά τεκμηριωμένο ότι και οι τρεις εμπλέκονται στην ρύθμιση της αιμοποίησης. Πρόσφατα έχει κωδικοποιηθεί στα θηλαστικά ένας τέταρτο μέλος της οικογένειας των TGF-β ο οποίος ονομάζεται παράγοντα ο οποίος σχετίζεται με την αιμορραγία του ενδομητρίου (endometrial bleeding associated factor, ebaF)(278)

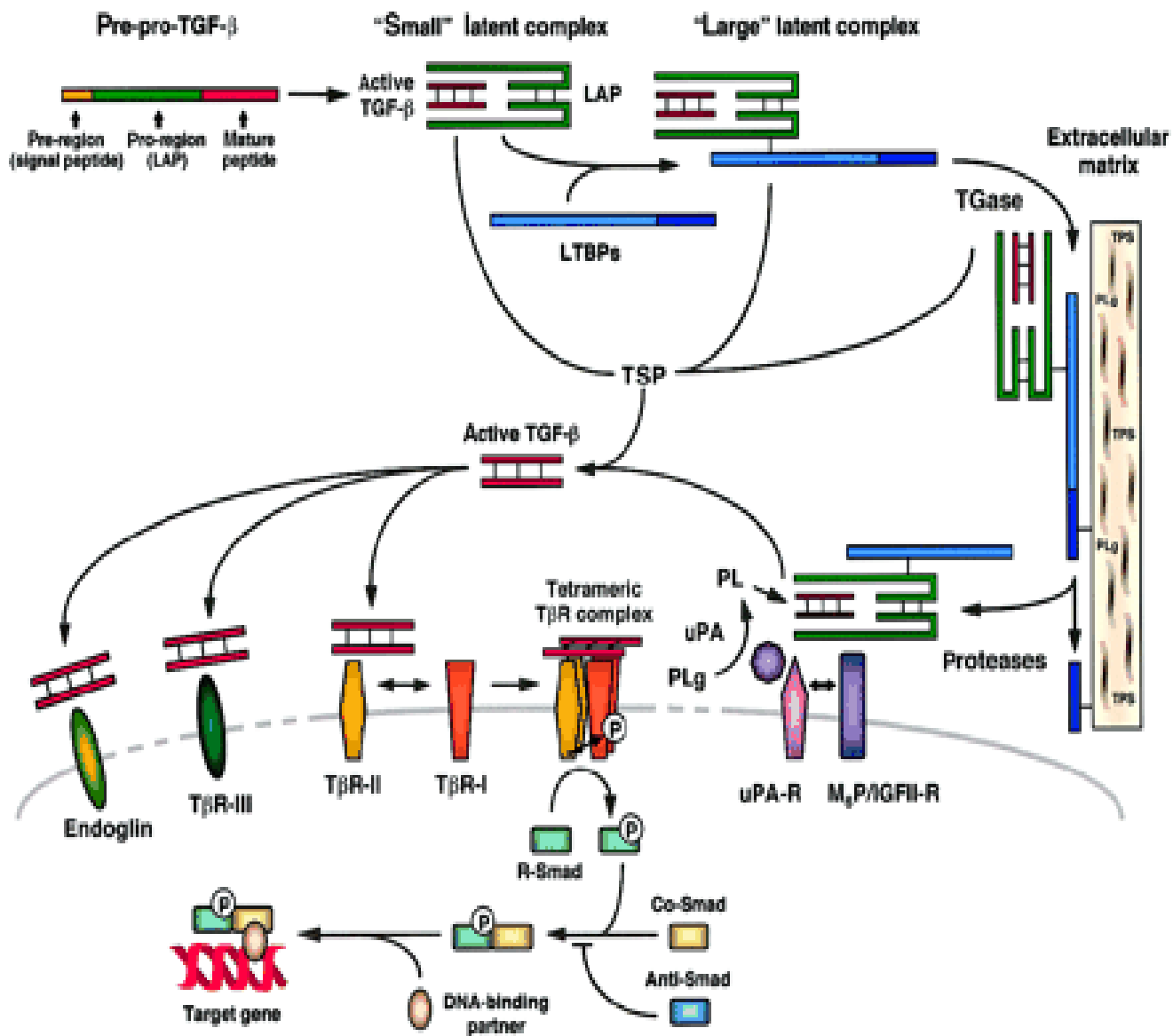
Ο TGF-β1 συντίθεται σαν πρόδρομη πρωτεΐνη η οποία είναι βιολογικά ανενεργή(279). Πρόκειται για ένα προ-προ-πεπτίδιο(pre-pro-peptide) το οποίο

χρειάζεται διαδικασία δυο σταδίων για να δώσει γένεση στη ενεργή μορφή του TGF-β1. Μια πρώτη πρωτεολυτική διάσπαση οδηγεί στην αφαίρεση του υδρόφιλου πεπτιδίου οδηγού (signal peptide) στην αμινοτελική περιοχή της πρόδρομης πρωτεΐνης οδηγώντας στη δημιουργία του προ-TGF. Μια δεύτερη πρωτεολυτική διάσπαση οδηγεί στην αποκοπή της προ-περιοχής (pro-regio) από το ώριμο πεπτίδιο. Ολόκληρη η πρόδρομη πρωτεΐνη είναι μια αλυσίδα 390 αμινοξέων. Το πεπτίδιο – οδηγός αντιστοιχεί στα αμινοξέα 1-29 η προ-περιοχή στα αμινοξέα 30-278 και το ώριμο πεπτίδιο στα αμινοξέα 279-390. Η βιοενεργή μορφή του TGF-β1 αποτελείται από δύο αλυσίδες ώριμων πεπτιδίων ενωμένες μεταξύ τους με δισουλφιδικούς δεσμούς. Μόλις συντεθεί ο TGF-β1 απελευθερώνεται από τα κύτταρα ως λανθάνων (latent) σύμπλεγμα το οποίο είναι βιολογικά ανενεργό (Εικόνα 6)(280) Δύο μορφές του latent συμπλέγματος έχουν αναγνωρισθεί, small and large latent TGF-β1. Στο small latent σύμπλεγμα, ένα μόριο του ώριμου ενεργού TGF-β1 είναι συνδεδεμένο μη ομοιοπολικά με ένα διμερές προ-πεπτίδιο το οποίο είναι ομοιοπολικά συνδεδεμένο και το οποίο ονομάζεται latency associated protein ή LAP. Στο Large latent σύμπλεγμα το μόριο LAP είναι συνδεδεμένο με δισουλφιδικό δεσμό με ένα από τα μέλη της οικογένειας των υψηλού μοριακού βάρους πρωτεϊνών και ονομάζεται latent TGF-β1 - binding proteins or LTBPs. Το LTBPs προσφέρει στο σύμπλεγμα την ικανότητα να συνδέεται με την εξωκυττάρια ουσία επιτρέποντας έτσι την αποθήκευση του TGF-β1. Η απελευθέρωση του TGF-β1 από την εξωκυττάρια ουσία γίνεται με τη δράση πρωτεολυτικών ενζύμων όπως χυμάση ελαστάση και πλασμίνη τα οποία είναι ικανά να διασπούν το LTBPs(281).

Ενεργοποίηση του latent TGF- β1

Εξωκυττάρια ενεργοποίηση του TGF-β1 latent συμπλέγματος είναι μια κρίσιμη διαδικασία για τη ρύθμιση της λειτουργίας του TGF-β1 in vivo. Η αλληλεπίδραση

του TGF-β1 και LAP είναι μη ομοιοπολική και μπορεί να διαταραχθεί εύκολα *in vitro* μετά από κατεργασία του μορίου σε υψηλή θερμοκρασία ή με την οξינוποίηση (282). Διαφορετικοί μηχανισμοί της ενεργοποίησης του TGF-β1 παρουσιάζονται στην εικόνα 6. Η πλασμίνη έχει αποδειχθεί ότι προάγει την ενεργοποίηση του latent TGF-β με πρωτεολυτική διάσπαση μέσα στη N- τελική περιοχή του LAP. Αυτή η διάσπαση διαταράζει τους ομοιοπολικούς δεσμούς με αποτέλεσμα την απελευθέρωση της βιολογικά ενεργής μορφής του TGF-β1 (283). Στα μονοκύτταρα, μακροφάγα και ενδοθηλιακά κύτταρα στη κυτταρική ενεργοποίηση του latent TGF-β1 έχει δημοσιευθεί ότι εμπλέκεται ο υποδοχέα της mannose-6 phosphate/type II insulinelike growth factor (M6P/IGII-R) και ο υποδοχέας της ουροκινάσης ενεργοποιητή του πλασμινογόνου (urokinase plasminogen activator receptor, uPA-R) (284). Ένα άλλο ένζυμο η τρανσγλουταμινάση έχει αποδειχθεί ότι εμπλέκεται τόσο στο ρυθμό εναπόθεσης του TGF-β στην εξωκυττάρια ουσία (285) όσο και στην ενεργοποίηση του TGF-β1 στην επιφάνεια των κυττάρων (284). Τέλος η θρομβοσπονδίνη μια πρωτεΐνη των α-κοκκίων των αιμοπεταλίων έχει βρεθεί ότι προάγει την ενεργοποίηση του TGF-β1 προκαλώντας μεταβολές της διαμόρφωσης του LAP (286).



Εικόνα 6: TGF-β1: Δομή, ενεργοποίηση και υποδοχείς. LAP: latency associated peptide LTBP: latent TGF-β binding protein M6P/GFII-R: mannose-6-phosphate/type II insulin-like growth factor receptor PLg: πλασμινογόνο, PL: πλασμίνη Smad: ενδοκυττάρια πρωτεΐνες μεταφοράς του σήματος Anti-Smad: ανταγωνιστικές Smad TGase: τρανσγλουταμινάση TβRI ,TβRII: υποδοχείς του TGF-β, TSP: θρομβοσπονδίνη uPA: ουροκινάση, uPA-R: υποδοχέας της ουροκινάσης. (Fortunel NO, Hatzfeld A, Hatzfeld JA. Transforming growth factor-β: pleiotropic role in the regulation of hematopoiesis. Blood 2000;96:2022-2036.)

TGF-β signal transduction pathway(μονοπάτι μεταφοράς σήματος)

Ανάμεσα σε πολλές διαμεμβρανικές και μεμβρανικές πρωτεΐνες , που είναι γνωστό ότι αλληλεπιδρούν με τον TGF , οι τύπου I και II υποδοχείς του TGF-β (TβR-I or ALK and TβR-II) άμεσα εμπλέκονται στη μεταφορά του σήματος (Εικόνα 6). TβR-I και TβR-II αποτελούν 2 οικογένειες διαμεμβρανικών σερίνη/θρεονίνη υποδοχέων των 53-65kd (287)και 80-95kd (288) αντίστοιχα , οι οποίοι αλληλεπιδρούν και σχηματίζουν ετεροτετραμερή συμπλέγματα. Ο μηχανισμός με τον οποίο οι 2 αυτοί υποδοχείς συμμετέχουν στην μεταφορά του σήματος είναι σήμερα καλά τεκμηριωμένος (289). TGF-β πρώτα συνδέεται με τον TβR-II που είναι μια εκ φύσεως ενεργή κινάση. TβR-I αναγνωρίζεται και προσελκύεται από το σύμπλεγμα TGF-β/TβR-II και στη συνέχεια φωσφορυλιώνεται από τον TβR-II Η φωσφορυλίωση επιτρέπει στον TβR-I να διαδώσει το σήμα κατά τη φορά των ενδοκυττάρων υποστρωμάτων.

Οι Smad ενδοκυττάρια πρωτεΐνες

Το ενδοκυττάριο μονοπάτι μεταβίβασης του σήματος από τον TGF-β εμπλέκει την οικογένεια των Smad πρωτεϊνών (290) (Εικόνα 6). Σε αυτό το δίκτυο μεταφοράς υπάρχει η συνεργασία ανάμεσα σε τρεις υποτάξεις των Smad πρωτεϊνών οι οποίες μπορούν να διακριθούν από τις διαφορετικές τους λειτουργίες στη μεταφορά του σήματος από τον TGF-β. Η πρώτη ομάδα των Smad υποδοχέων που ονομάζεται receptor activated or receptor-regulated Smads (R-Smad) άμεσα φωσφορυλιώνεται από τον ενεργοποιημένο TβR-I. Μετά την φωσφορυλίωση R-Smads αντιδρούν με μέλη της δεύτερης υποομάδας υποδοχέων των Smads η οποία ονομάζεται common partner Smads (Co-Smads) και σχηματίζουν ένα ετεροδιμερή σύμπλεγμα R-Smad/Co-Smads το οποίο μεταφέρεται στον πυρήνα όπου συνδέεται με DNA-binding partners και έπειτα ρυθμίζει τη μεταφραστική απάντηση των γονιδίων

στόχων. Μια Τρίτη υποομάδα των υποδοχέων που ονομάζεται antagonistic or inhibitory Smads (Anti-Smads) εμποδίζει την αλληλεπίδραση μεταξύ R-Smads και Co-Smads συμμετέχει σε αρνητική ρύθμιση (negative feedback), καταστολή της απάντησης του TGF-β. Στην περίπτωση της μεταφοράς του σήματος στα θηλαστικά οι R-Smads περιλαμβάνουν τις Smad2 και Smad3, οι Co-Smads τις Smad4 και οι Anti-Smads τις Smad6 και Smad7 .

Β ΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΔΡΑΣΕΙΣ ΤΟΥ TGF-β1

Ο TGF-β είναι μια πολυδύναμη κυτταροκίνη. Μπορεί να ασκήσει είτε αρνητική είτε θετική δράση στο πολλαπλασιασμό , διαφοροποίηση ή κυτταρικό θάνατο ανάλογα με το στάδιο ανάπτυξης του κυττάρου στόχου και το in vivo μικροπεριβάλλον ή τις κυτταροκίνες που χρησιμοποιούνται στις in vitro μελέτες. Στο αιμοποιητικό σύστημα ο ρυθμιστικός ρόλος του TGF-β1 δε φαίνεται να περιορίζεται σ' ένα μόνο κυτταρικό διαμέρισμα ή υποπληθυσμό. Συμμετέχει στη ρύθμιση των περισσότερων σταδίων της ανάπτυξης και της λειτουργίας ποικίλων αιμοποιητικών σειρών. Γενικά ο TGF-β1 επιλεκτικά ασκεί αρνητική δράση στα περισσότερα αρχέγονα αιμοποιητικά κύτταρα (primitive) ενώ στα μεταγενέστερα στάδια της ανάπτυξης των αιμοποιητικών κυττάρων εμπλέκεται στον έλεγχο (αρνητικό ή θετικό) της διαφοροποίησης και της ωρίμανσης των κυττάρων. (Εικόνα 7) (258)

Όσο αφορά τη μεγακαρυοποίηση ο TGF-β1 φαίνεται να επιδρά σε όλα τα στάδια της ανάπτυξης και της διαφοροποίησης των μεγακαρυοκυττάρων. Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω η μεγακαρυοποίηση περιλαμβάνει δύο στάδια μέσα από τα οποία επιτελείται η παραγωγή των αιμοπεταλίων. Στο πρώτο στάδιο οι προγονικές προβαθμίδες των μεγακαρυοκυττάρων πολλαπλασιάζονται και στη συνέχεια στο επόμενο στάδιο διαφοροποιούνται προς μεγακαρυοκύτταρα τα οποία ωριμάζουν και δίνουν γένεση στα αιμοπετάλια.

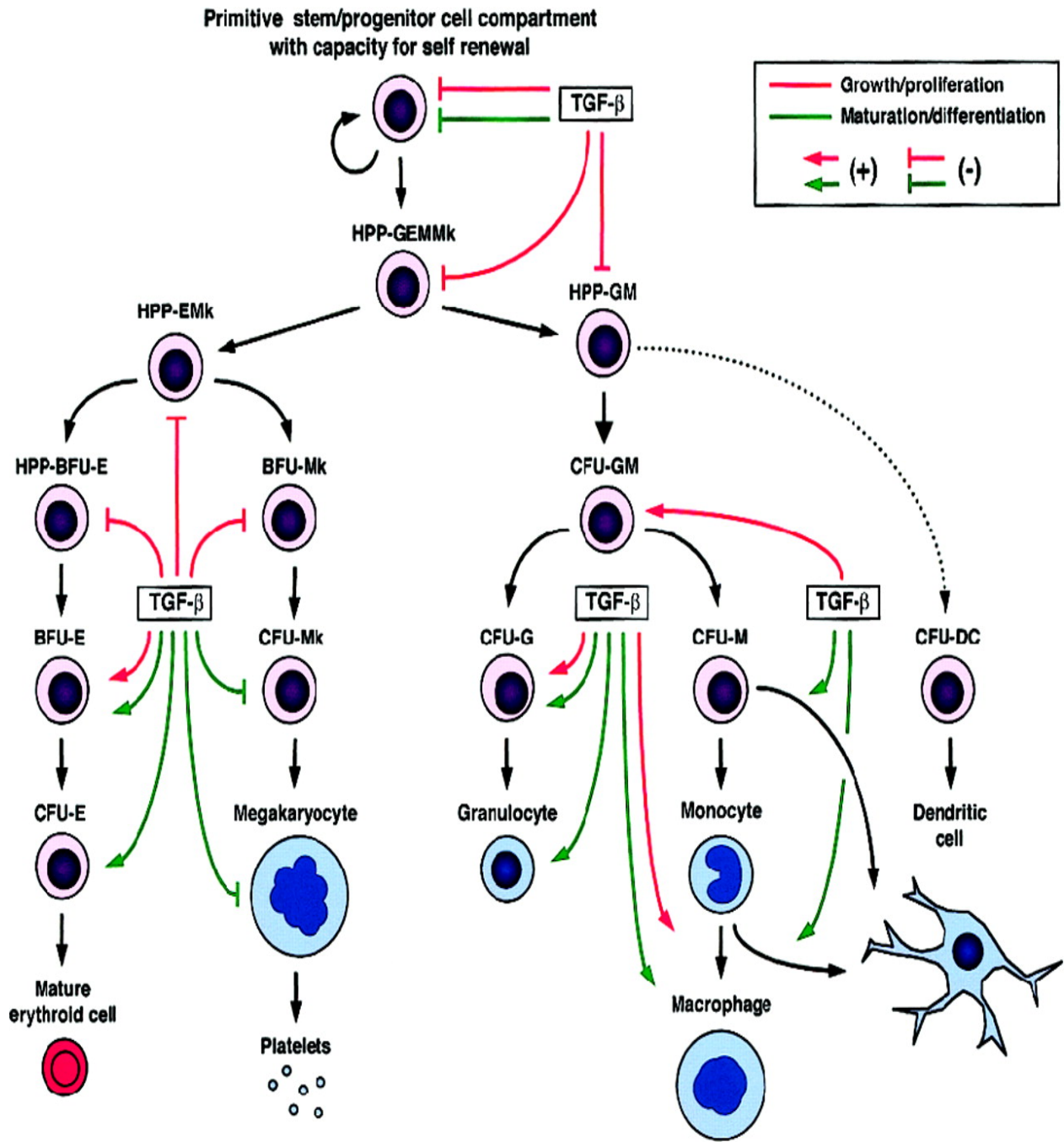
Στο στάδιο του πολλαπλασιασμού των προγονικών προβαθμίδων των μεγακαρυοκυττάρων πολλές μελέτες έχουν δείξει ότι ο TGF-β αναστέλλει την ευοδωτική δράση των κυτταροκινών (early-acting MK-stimulating factor) , όπως IL-6, IL-11, IL-3, SCF, TPO, που εμπλέκονται στο στάδιο αυτό (259-262). Αντίθετα η προσθήκη αντισώματος έναντι του TGF-β1 στις καλλιέργειες έχει σαν αποτέλεσμα την αύξηση του πολλαπλασιασμού των μεγακαρυοκυττάρων (262) .

Έχει δημοσιευθεί ότι ο TGF-β1 προάγει την ωρίμανση και την τελική διαφοροποίηση πολλών αιμοποιητικών σειρών (Εικόνα 9). Ωστόσο αυτό δεν ισχύει στην περίπτωση των μεγακαρυοκυττάρων. Το δεύτερο στάδιο της ανάπτυξης των μεγακαρυοκυττάρων , συνίσταται από την ενδομίτωση μια διαδικασία που οδηγεί στην γέννηση πολυπλοειδικών μεγακαρυοκυττάρων από τα οποία απελευθερώνονται τα αιμοπετάλια. Αυτή η διαδικασία προάγεται από κυτταροκίνες (late activating MK-stimulating factor) όπως IL-6, IL-11, TPO. Μελέτες έχουν δείξει ότι ο TGF-β1 ασκεί μια ανασταλτική επίδραση και στο στάδιο αυτό. Η καταστολή που ασκεί ο TGF-β1 στην ενδομίτωση παρατηρήθηκε για πρώτη φορά χρησιμοποιώντας μεγακαρυοκύτταρα της ανθρώπινης σειράς Dam1 ως μοντέλο (263-264) και αυτό το αποτέλεσμα έχει αναπαραχθεί χρησιμοποιώντας μεγακαρυοκύτταρα αρουραίου (262).

Επειδή ο TGF-β1 είναι ισχυρός αναστολέας τόσο του σταδίου του πολλαπλασιασμού των μεγακαρυοκυττάρων όσο και του σταδίου της ωρίμανσης τους, μπορεί να θεωρηθεί ως ένας πιθανός παράγοντας παλίνδρομης ρύθμισης (feedback) της μεγακαρυοποίησης. Η φυσιολογική σχέση αυτού του ρυθμιστικού μηχανισμού έχει καθαρά αποδειχθεί σε μελέτες ανθρώπων με θρομβοκυτταραιμία. Εάν και στις περιπτώσεις αυτές ο TGF-β1 δεν είναι ο μοναδικός παράγοντας που είναι υπεύθυνος για αυτή τη διαταραχή έχει δημοσιευθεί ότι η αυξημένη παραγωγή

των αιμοπεταλίων οφείλεται σε ελάτωση της ευαισθησίας των προγονικών κυττάρων των μεγακαρυοκυττάρων στη δράση του (265-266).

Έχει περιγραφεί ότι ο TGF-β1 έχει την ικανότητα να μειώνει την έκφραση των υποδοχέων στα προγονικά αιμοποιητικά κύτταρα του ανθρώπου και του ποντικού, Στα ανθρώπινα αιμοποιητικά προγονικά κύτταρα έχει δειχθεί ότι μειώνει την έκφραση του υποδοχέα της IL-6 (267), FLT3(267), c-kit (268) και TPO (269). Η μείωση του υποδοχέα της TPO μπορεί να εξηγήσει τουλάχιστον εν μέρει την ανασταλτική δράση του TGF-β1 στην μεγακαρυοποίηση μιας και η TPO είναι πιθανόν ένας από τους κυριότερους παράγοντες που προάγει τόσο τον πολλαπλασιασμό όσο και την διαφοροποίηση των μεγακαρυοκυττάρων.



Εικόνα 7: Ρυθμιστικό ρόλο του TGF-β στην ανάπτυξη/πολλαπλασιασμό και ωρίμανση/διαφοροποίηση στην ανάπτυξη των αιμοποιητικών κυττάρων. BFU, burst-forming unit; CFU, colony-forming unit; HPP, high proliferative potential; DC, dendritic cell; E, erythroid cell; G, granulocyte; M, monocyte/macrophage; and Mk, megakaryocyte. (Fortunel NO, Hatzfeld A, Hatzfeld JA. Transforming growth factor-β: pleiotropic role in the regulation of hematopoiesis. Blood 2000;96:2022-2036.)

Τέταρτος αιμοπεταλικός παράγοντας(PF4) και άλλες χυμοκίνες της οικογένειας

CXC: Ο PF4 είναι μέλος της οικογένειας των CXC χυμοκινών και ελευθερώνεται από τα α-κοκκία των αιμοπεταλίων όταν αυτά ενεργοποιούνται. Η δράση του είναι ειδική για την μεγακαρυοκυτταρική σειρά. Η θρομβογλομπουλίνη-β είναι επίσης μέρος της οικογένειας των CXC χυμοκινών και περιέχεται μέσα στα α-κοκκία των αιμοπεταλίων. Έχει βρεθεί ότι ο PF4 και η θρομβογλομπουλίνη αναστέλλουν το πολλαπλασιασμό των προγονικών κυττάρων των μεγακαρυοκυττάρων (270-272).

Εκτός από τις παραπάνω χυμοκίνες και άλλες χυμοκίνες της οικογένειας CXC όπως IL-8, NAP-2 (neutrophil activating peptide 2), MIP-1α (macrophage inhibitory protein-1α), MIP-1β (macrophage inhibitory protein -1β και C10 αναστέλλουν τον πολλαπλασιασμό των προγονικών προβαθμίδων (273).

Όλα αυτά τα ευρήματα δείχνουν το σημαντικό ρόλο των χυμοκινών στη ρύθμιση της μεγακαρυοποίησης.

Ιντερφερόνη-α : Η επίδραση της ιντερφερόνης στην μεγακαρυοποίηση έχει μελετηθεί *in vitro* και *in vivo*. Ανασυνδυασμένη α-ιντερφερόνη αναστέλλει το σχηματισμό των μεγακαρυοκυτταρικών αποικιών *in vitro*. Η χορήγηση της σε ασθενείς με χρόνια ηπατίτιδα μπορεί να οδηγήσει σε σοβαρή θρομβοπενία (274-275).

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

ΑΣΘΕΝΕΙΣ

Τριάντα εννέα ασθενείς, 37 γυναίκες και 2 άνδρες ηλικίας 20 έως 77 ετών (διάμεση ηλικία 54 ετών) συμμετείχαν στην μελέτη. Όλοι έπασχαν από χρόνια ιδιοπαθή ουδετεροπενία (CIN) σύμφωνα με τα κριτήρια που αναφέρθηκαν προηγουμένως.

Οι ασθενείς είχαν αριθμό ουδετερόφιλων κάτω από 1800/ μ L στο περιφερικό αίμα για περίοδο η οποία κυμαινόταν από 24 έως 180 μήνες (διάμεση τιμή 75 μήνες) , παρουσίαζαν υποπλαστική και με στροφή προς τα αριστερά μυελική σειρά, στα χρωσμένα με May-Grunwald-Giemsa μυελικά επιχρίσματα και στα δείγματα της οστεομυελικής βιοψίας, και αρνητικά στον ορό τεστ λευκοσυγκόλλησης και ανοσοφθορισμού για αντιπολυμορφοποιητικά αντισώματα. Ασθενείς με πρόσφατο ιστορικό ιογενούς ή βακτηριακής λοίμωξης (μέσα στους τελευταίους δύο μήνες) αποκλείστηκαν από τη μελέτη.

Σαν μάρτυρες μελετήθηκαν 20 υγιή άτομα , 18 γυναίκες και 2 άνδρες ηλικίας 30 έως 64 ετών (διάμεση ηλικία 50.5 χρόνια). Μεταξύ ασθενών και φυσιολογικών μαρτύρων δε βρέθηκαν σημαντικά στατιστικά διαφορές όσον αφορά την ηλικία και το φύλο, χρησιμοποιώντας το τεστ X^2 . Μερικές αιματολογικές παράμετροι των ασθενών που μελετήθηκαν δίνονται στον πίνακα 3

**ΠΙΝΑΚΑΣ 3 ΑΙΜΑΤΟΛΟΓΙΚΟΙ ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΙ ΤΩΝ ΑΣΘΕΝΩΝ ΠΟΥ
ΜΕΛΕΤΗΘΗΚΑΝ**

	CIN ασθενείς (n = 39)	Υγιείς μάρτυρες (n = 20)
Αιμοσφαιρίνη (g/dL)	13.09 ± 0.81**	13.94 ± 1.24
Διάμεση τιμή και ακραίες τιμές	13.20 (11.10 -14.80)	13.65 (12.00 -15.90)
Λευκά αιμοσφαίρια (/μL)	3579 ± 615	6654 ± 1453
Διάμεση τιμή και ακραίες τιμές	3654 (2200-5376)	6650 (4300-9000)
Ουδετερόφιλα (/μL)	1541 ± 315	3966 ± 985
Διάμεση τιμή και ακραίες τιμές	1700 (500-1789)	4019 (2623-6000)
Λεμφοκύτταρα (/μL)	1654 ± 500	2069 ± 582
Διάμεση τιμή και ακραίες τιμές	1560 (900-3666)	2017 (1000-3200)
Μονοκύτταρα (/μL)	285 ± 98	429 ± 180
Διάμεση τιμή και ακραίες τιμές	287 (100-600)	419 (177-952)
Αιμοπετάλια (x10³/μl)	203 ± 43	238 ± 49
Διάμεση τιμή και ακραίες τιμές	200 (100-297)	232 (157-323)

(*) Τη στιγμή της μυελικής παρακέντησης. (**) Όλες οι τιμές είναι εκφρασμένες ως μέσες τιμές ±σταθερή απόκλιση (means ± 1SD).

ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΜΥΕΛΙΚΩΝ ΠΑΡΑΣΚΕΥΑΣΜΑΤΩΝ

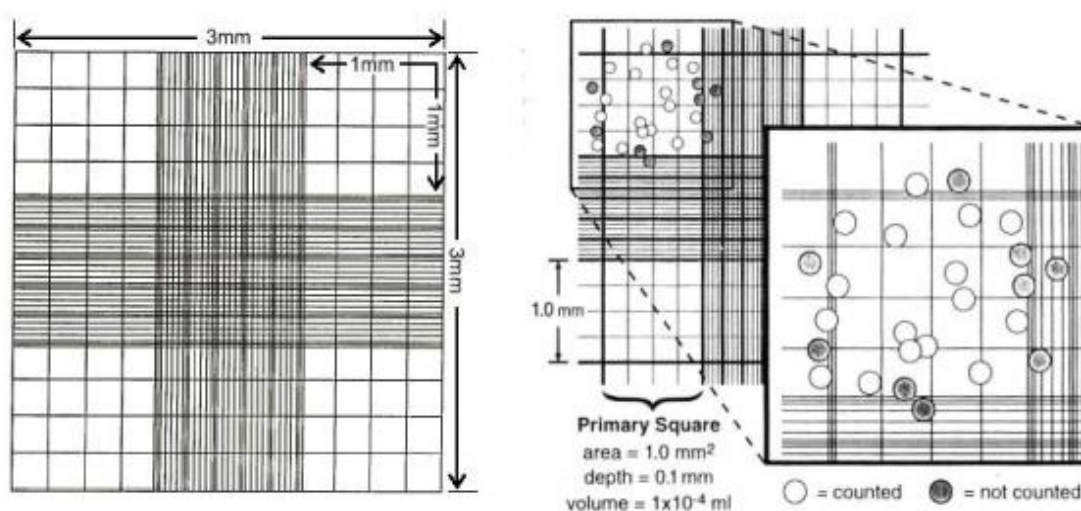
Εναιωρήματα μυελικών μονοπύρηνων κυττάρων (Bone marrow mononuclear cells BMMCs) των ασθενών προετοιμάστηκαν από μυελό που αναρροφήθηκε από την οπίσθια λαγόνια ακρολοφία για διαγνωστικούς σκοπούς. Δείγματα μυελού λαμβάνονταν και από άτομα χωρίς αιματολογικό πρόβλημα που χειρουργούνταν για αχονδροπλασία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

Ακολουθούσε επιστίβαση του αραιωμένου δείγματος μυελού σε Lymphoprep (Nycomed Pharma , Oslo, Norway) και φυγοκέντρηση στις 1800 στροφές για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Τα κύτταρα λαμβάνονταν από τη μεσόφαση και πλένονταν δυο φορές με IMDM. Ο αριθμός και η βιωσιμότητά των κυττάρων ελέγχονταν με τη χρώση κυανό του τρυπανίου και στη συνέχεια επαναδιαλύονταν στο ανωτέρω θρεπτικό υλικό σε συγκέντρωση 10^7 /mL.

ΜΕΤΡΗΣΗ ΤΟΥ ΑΡΙΘΜΟΥ ΚΑΙ ΤΗΣ ΒΙΩΣΙΜΟΤΗΤΑΣ

ΤΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

Για την μέτρηση του αριθμού και της βιωσιμότητας των κυττάρων χρησιμοποιήσαμε διάφορες πλάκες μέτρησης (hemocytometer). Στην Εικόνα 8 παριστάνεται μια βελτιωμένη πλάκα Neubauer (improved Neubauer). Κάθε μεγάλο τετράγωνο της πλάκας έχει όγκο 0.1 mm^3 (επιφάνεια 1 mm^2 και βάθος 0.1 mm). Επομένως μετρώντας τα κύτταρα σε ένα μεγάλο τετράγωνο (n) μπορούμε να υπολογίσουμε τα κύτταρα του εναιωρήματός μας (N) ανά 1 mL ως εξής: $N = n \times 10^4 \times$ συντελεστής αραιώσης (π.χ. αν το δείγμα αραιώθηκε 50:50, ο συντελεστής είναι 2).



Εικόνα 8: Πλάκα Neubauer (improved Neubauer)

ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΚΑΘΑΡΩΝ CD34⁺ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

Καθαρὰ CD34⁺ απομονώθηκαν από BMMCs με την τεχνική του έμμεσου ανοσομαγνητικού διαχωρισμού (magnetic activated cell sorting; MACS isolated Kit, Miltenyi Biotec, GmbH, Bergisch Gladbach, Germany) σύμφωνα με το πρωτόκολλο του κατασκευαστή. Συγκεκριμένα BMMCs πλένονταν δυο φορές με ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικού άλατος (Phosphate buffer saline PBS; Sigma) εμπλουτισμένο με 0, 5% αλβουμίνη ορού αγελάδος (BSA; Sigma), 0,6% οξύ κιτρικής γλυκόζης και 4% διττανθρακικό νάτριο. (MACS buffer). Στην συνέχεια τα κύτταρα επωάζονταν με ανθρώπινη γ-σφαιρίνη (100μl/10⁸ BMMCs) και μονοκλωνικό αντι-CD34 αντίσωμα, συνδεδεμένο με απτίνη (clone QBEND/10) (10μL/10⁸ BMMCs) για 15 λεπτά στους 6-12⁰ C. Μετά την επώαση ακολούθησε μία πλύση με ρυθμιστικό διάλυμα MACS και τα κύτταρα επωάστηκαν με κολλοειδή υπερ-παραμαγνητικά μικροκομβολόγια συνδεδεμένα με ένα αντι-απτίνη αντίσωμα (100μL/10⁸ BMMCs) για 15 λεπτά στους 6-12⁰C. Τα κύτταρα μετά πλύθηκαν και επαναδιαλύθηκαν σε 500μL ρυθμιστικό διάλυμα MACS ανά 10⁸ συνολικά BMMCs. Τα μαγνητικά σημασμένα κύτταρα εμπλουτίστηκαν σε μια στήλη θετικής επιλογής σε μαγνητικό πεδίο από MiniMACS. Ο αριθμός και η βιωσιμότητα των CD34⁺ ελέγχθηκαν με τη χρώση κυανό του τρυπανίου. Η καθαρότητα του πληθυσμού των CD34⁺ κυττάρων ήταν μεγαλύτερη από 96% όπως εκτιμήθηκε με την κυτταρομετρία ροής.

ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΙΑ ΡΟΗΣ ΔΥΟ ΧΡΩΜΑΤΩΝ

Συνδεδεμένα με φλουορεσκεΐνη (Fluorescein, FITC) ή φυκοερυθρίνη (Phycoerythrin PE) μονοκλωνικά αντισώματα ποντικού (MAbs) έναντι των αντιγονικών επιτόπων CD34 και CD61 χρησιμοποιήθηκαν για τη μελέτη των BMMCs με κυτταρομετρία ροής. Ένα ισοτυπικό αντίσωμα ποντικού συνδεδεμένο με FITC ή PE χρησιμοποιήθηκε σαν αρνητικός μάρτυρας για κάθε χρήση MAbs.

Συγκεκριμένα 1×10^6 BMMCs επώαστηκαν με 40μL ανθρώπινης γ-σφαιρίνης για 10 λεπτά στον πάγο. Στη συνέχεια προστέθηκαν δέκα μικρόλιτρα από ισοθειοκυανικό άλας φλουορεσκεΐνη (Fluorescein, FITC) συνδεδεμένο με μονοκλωνικό αντίσωμα ποντικού (QBEND-10; Beckman-Coulter, Marseille France) έναντι του αντιγονικού επιτόπου CD34 των κυττάρων και δέκα μικρόλιτρα φυκοερυθρίνη (phycoerythrin PE) συνδεδεμένη με μονοκλωνικό αντίσωμα ποντικού έναντι του αντιγονικού επιτόπου CD61 (SZ21; Beckman-Coulter) και τα κύτταρα επώαστηκαν για 30 λεπτά στον πάγο. Συνδεδεμένα με FITC ή PE ισοτυπικά IgG ποντικού χρησιμοποιήθηκαν σαν αρνητικοί μάρτυρες.

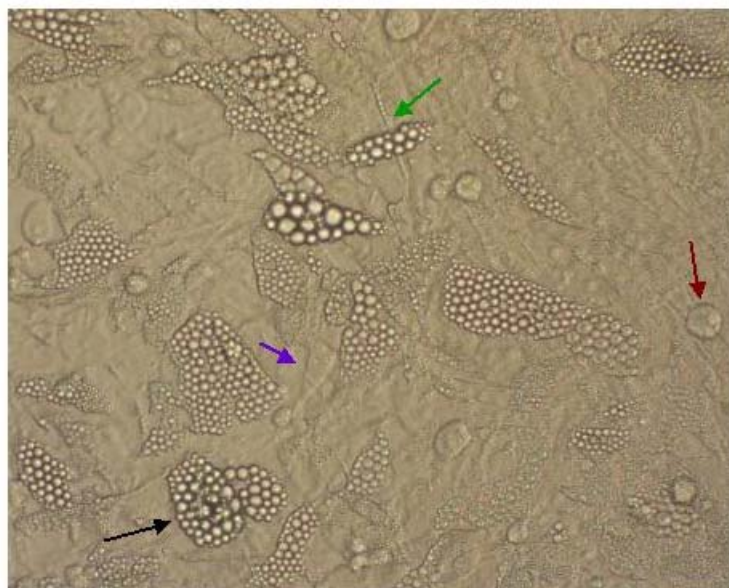
Τα κύτταρα πλένονταν δύο φορές με PBS (phosphate buffer saline) εμπλουτισμένο με 1% ορό εμβρύου αγελάδος FBS (Fetal bovine serum, Gibco), 0,005% άλατος αζωτιδίου και μονιμοποιούνταν με 500μL 2% διαλύματος παραφορμαλδεΐνης. Τα δείγματα αναλύονταν σε κυτταρομετρή (Epics Elite Coulter model Miami, FL) μέσα σε 24 ώρες από τη μονιμοποίησή τους και μετρούνταν για το ποσοστό των θετικών ως προς το μονοκλωνικό αντίσωμα μεμβρανικό φθορισμό. Σε κάθε δείγμα αναλύθηκαν 500.000 κύτταρα. Το ποσοστό των CD34⁺/CD61⁺ προγονικών κυττάρων των μεγακαρυοκυττάρων εκτιμήθηκε

στην έξοδο των κυττάρων με χαμηλή οριζόντια διάχυση (Forward scatter; FSC) και χαμηλή κάθετη διάχυση (Side scatter; SSC).

ΜΑΚΡΑΣ ΔΙΑΡΚΕΙΑΣ ΜΥΕΛΙΚΕΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ

Οι μακράς διάρκειας μυελικές καλλιέργειες (LTBMCs: Long term bone marrow cultures), πραγματοποιήθηκαν με βάση την τεχνική αναφοράς του Dexter και συνεργατών του (298). Οι μακρόχρονες υγρές κυτταροκαλλιέργειες προσφέρονται ιδιαίτερα για την μελέτη του αιμοποιητικού μικροπεριβάλλοντος.

Συγκεκριμένα 10^7 BMMCs εναιωρούνταν σε πλαστική φλάσκα των 25cm^2 σε τελικό όγκο 10 ml IMDM (Iscove's modified Dulbecco's medium) εμπλουτισμένο με 10% ορό εμβρύου αγελάδος (Gibco) με 10% ορό ιππείου (Gibco), 100IU/mL πενικιλίνη-στρεπτομυσίνη 10mmol L-γλουταμίνη και 10^{-6} M ημισουξινική υδροκορτιζόνη (hydrocorticone sodium succinate, Sigma) και επώαστηκαν στους 37° και 5% CO_2 σε κλίβανο με 100% υγρασία. (122, 126) Κάθε εβδομάδα γινόταν αφαίρεση της μισής ποσότητας του υπερκείμενου της καλλιέργειας και αντικατάστασή του με ίσο όγκο φρέσκου θρεπτικού υλικού. Κάτω από τις συνθήκες αυτές αναπτύσσεται στον πυθμένα της φλάσκας μετά από 3-4 εβδομάδες ένας τάπητας από κύτταρα του αιμοποιητικού μικροπεριβάλλοντος, κυρίως λιποκύτταρα, ινοβλάστες και ενδοθήλια ενώ στο υπερκείμενο αναπτύσσονται, πολλαπλασιάζονται και διαφοροποιούνται οι προγονικές αιμοποιητικές προβαθμίδες (Εικόνα 9)



Εικόνα 9: Τάπητας από μακρόχρονη υγρή καλλιέργεια μυελικών μονοκυρήνων κυττάρων. Διακρίνονται λιποκύτταρα (μαύρο βέλος), ενδοθηλιακά κύτταρα (μπλε βέλος), μακροφάγα (κόκκινο βέλος) και ινοβλάστες (πράσινο βέλος). Από το αρχείο του Ερευνητικού Εργαστηρίου Μελέτης της Αιμοποίησης (Ε. Παπαδάκη).

Το σύστημα αυτό θεωρείται το καλύτερο *in vitro* μοντέλο για την μελέτη της αιμοποίησης δοθέντος ότι οι συνθήκες μοιάζουν αρκετά με τις πραγματικές αφού η ανάπτυξη των αιμοποιητικών κυττάρων στο υπερκείμενο γίνεται με την παραγωγή κυτταροκινών και έκφραση επιφανειακών βιομορίων από τα κύτταρα του στρώματος χωρίς προσθήκη εξωγενών παραγόντων. Ο τύπος αυτός των κυτταροκαλλιιεργειών προσφέρεται ιδιαίτερα για την μελέτη του ρόλου των αυξητικών αιμοποιητικών παραγόντων και των αναστολέων της αιμοποίησης στην ανάπτυξη των μυελικών προβαθμίδων και ακόμα για την διερεύνηση του ρόλου του αιμοποιητικού μικροπεριβάλλοντος στην ανάπτυξη των αιμοποιητικών κυττάρων.

Στο τέλος της τρίτης με τέταρτης εβδομάδας των μακροχρόνιων μυελικών καλλιιεργιών λαμβανόταν 5ml από το υπερκείμενο της καλλιιεργειας και φυγοκεντρούονταν. Τα υπερκείμενα χωρίς κύτταρα χωρίζονταν σε μικρότερους όγκους και αποθηκεύονταν στους -72°C για προσδιορισμό κυτταροκινών με

ανοσοενζυμική μέθοδο Elisa και τη βοήθεια των κατάλληλων Kits.

ΚΛΩΝΟΓΟΝΙΚΗ ΜΕΘΟΔΟΣ ΜΕΛΕΤΗΣ ΤΩΝ ΠΡΟΒΑΘΜΙΔΩΝ ΤΩΝ ΜΕΓΑΚΑΡΥΟΚΥΤΤΑΡΩΝ

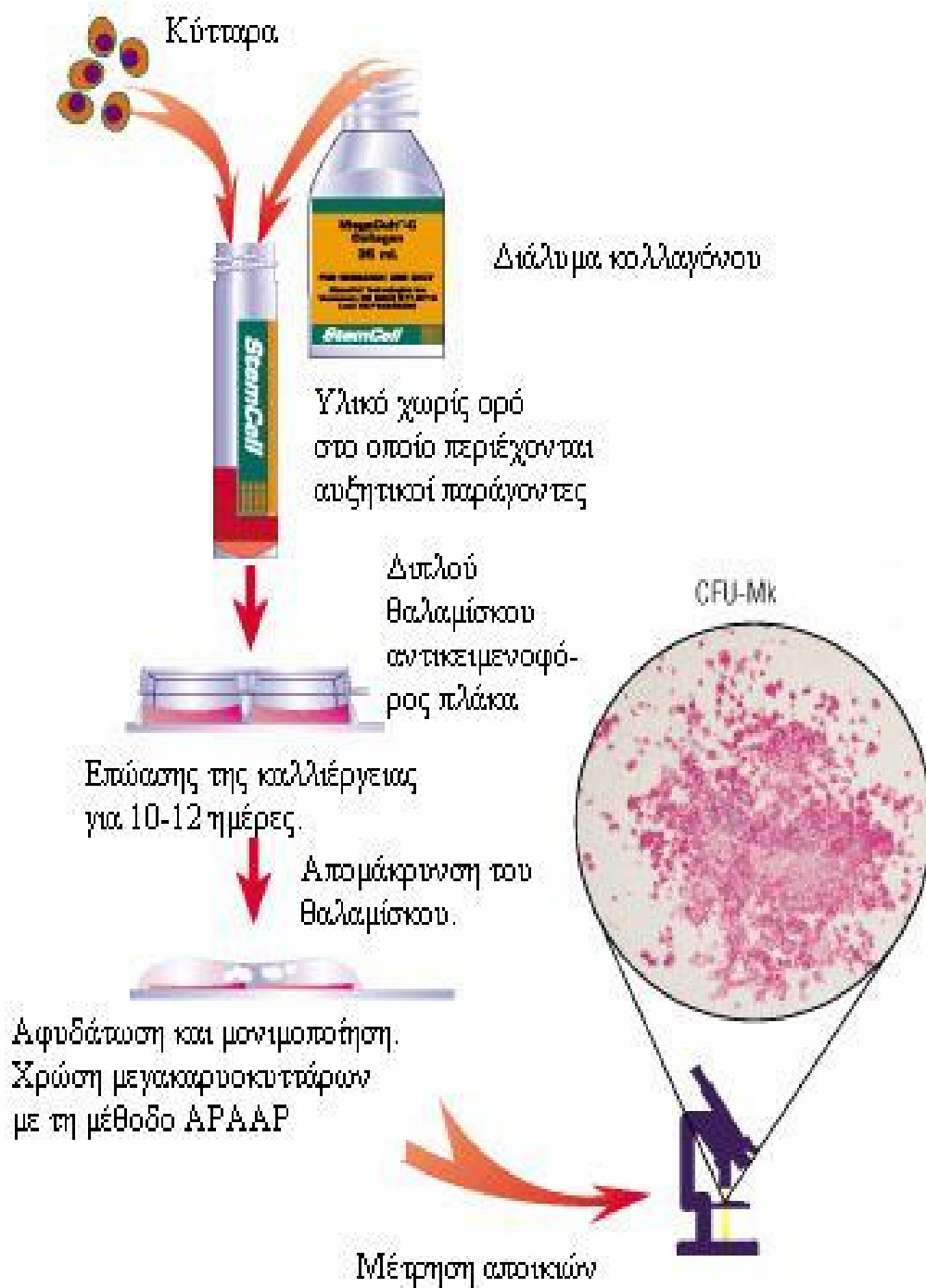
Ο σχηματισμός των μεγακαρυοκυτταρικών αποικιών (CFU-Meg) εκτιμήθηκε με τη βοήθεια διαθέσιμου θρεπτικού υλικού κατάλληλου για την ανάπτυξη των μεγακαρυοκυτταρικών αποικιών (Megacult-c Stem Cell Technologies Inc, Vancouver, Canada).

Το Megacult-C είναι ένα σύστημα βασισμένο στο κολλαγόνο το οποίο είναι κατάλληλο για την άριστη ανάδειξη των προγονικών κυττάρων των μεγακαρυοκυττάρων από εναιωρήματα κυττάρων από CD34⁺ μυελικά κύτταρα ή μονοπύρηνια μυελικά κύτταρα. Το κολλαγόνο μπορεί εύκολα να αφυδατωθεί και στην συνέχεια να χρησιμοποιηθεί για ανοσοϊστοχημική χρώση με διατήρηση της μορφολογίας των κυττάρων. Δεν απαιτεί ειδικό εργαστηριακό εξοπλισμό και εμποδίζει την έκθεση των κυττάρων σε υψηλές θερμοκρασίες. Περιέχει επίσης ένα καθορισμένο υποκατάστατο ορού το οποίο ελαχιστοποιεί τις ανασταλτικές δράσεις παραγόντων όπως ο TGF-β1 που μπορούν να βρεθούν στον ορό και επιπρόσθετα περιέχει ανασυνδυασμένες ανθρώπινες κυτταροκίνες IL-3, IL-6 και TPO .

Εκτέλεση της μεθόδου.

5×10^5 BMDCs ή 2.5×10^4 CD34⁺ επαναδιαλύονται σε τελικό όγκο 1.6 mL IMDM εμπλουτισμένου με 1.1mg/mL κολλαγόνο 1% BSA (Bovine serum albumin) 0,01mg/mL ινσουλίνη παγκρέατος βοός (bovine pancreatic insulin)

0,2mg/mL ανθρώπινης τρανσφερρίνης, 50ng/mL ανασυνδυασμένης θρομβοποιητίνης, 10ng/mL ανασυνδυασμένης IL-3, 10ng/mL IL-6 και στην συνέχεια μοιράζονταν ακριβώς σε διπλά ειδικά τρυβλία (double chamber slide). Τα τρυβλία επωάζονταν στους 37⁰C σε 5% CO₂ /95% αέρα για 10 έως 12 ημέρες. Μετά την επώαση γινόταν μονιμοποίηση για 20 λεπτά με διάλυμα 1:3 μεθανόλης:ακετόνης. Οι αποικίες είτε χρώνονταν αμέσως είτε αποθηκεύονταν στους 4⁰ C στο σκοτάδι για ένα μήνα μέχρι να εκτελεσθεί η ανοσοϊστοχημική χρώση. Η ανάδειξη των CFU-Meg αποικιών έγινε με τη χρήση του αντί- CD41 (GPIIb-GPIIIa) μονοκλωνικού αντισώματος (5B12; Dako, Glostrup, Denmark) με τη χρήση της αλκαλικής αντί- αλκαλικής φωσφατάσης τεχνικής (APAAP) όπως έχει περιγραφεί σε προηγούμενες μελέτες (297). (Εικόνα 10).

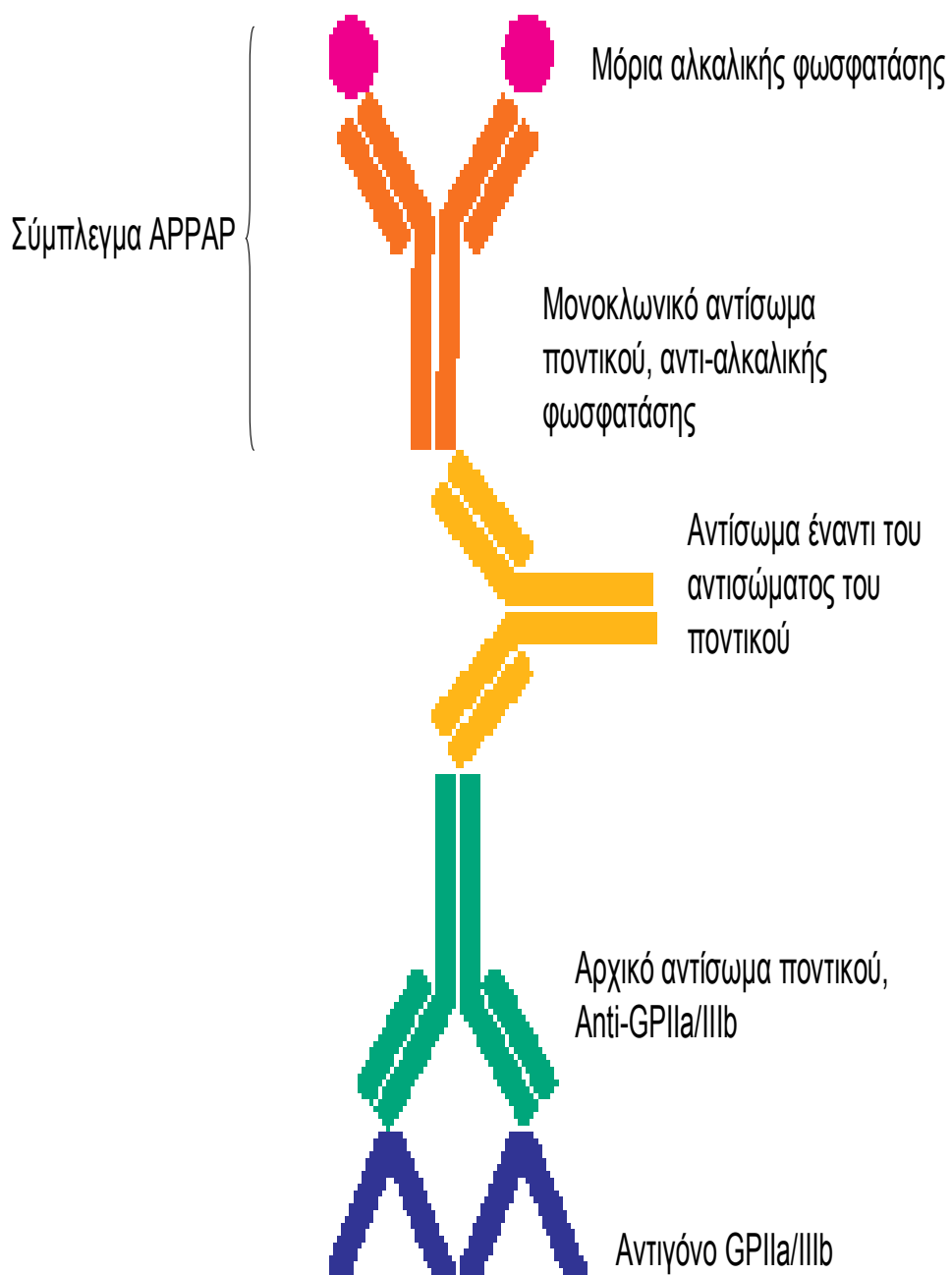


Εικόνα 10: Σχηματική παράσταση της μεθόδου της ανάπτυξης των μεγακαρυοκυττάρων megaCult -C

ΑΝΟΣΟΪΣΤΟΧΗΜΙΚΗ ΜΕΘΟΔΟΣ ΑΡΑΑΡ

Περιγραφή της μεθόδου.

Η τεχνική της APPAP αποτελεί διαδικασία τριών σταδίων (Εικόνα 11) . Στο πρώτο στάδιο το αρχικό αντίσωμα, το οποίο είναι ένα μονοκλωνικό anti-human GPIIb/IIIa αντίσωμα ποντικού, αναγνωρίζει το κυτταρικό αντιγόνο GPIIb/IIIa και συνδέεται μαζί του. Στην συνέχεια το αρχικό αντίσωμα αναγνωρίζεται από ένα μονοκλωνικό αντίσωμα κουνελιού,(anti-mouse), σε ένα δεύτερο στάδιο επώασης. Το τελευταίο αντίσωμα χρησιμοποιείται σε περίσσεια έτσι ώστε να εξασφαλισθεί ότι μόνο η μία από τις δύο Fab θέσεις του θα συνδεθεί με το αρχικό αντίσωμα αφήνοντας την άλλη θέση διαθέσιμη για τη σύνδεση του αντισώματος με το ανοσοενζυμικό σύμπλεγμα της αλκαλικής φωσφατάσης, αντι-αλκαλικής φωσφατάσης(APAAP complexes). Το σύμπλεγμα APAAP αποτελείται από δύο μόρια αλκαλικής φωσφατάσης και ένα αντίσωμα. Το στάδιο αυτό αποτελεί το τρίτο στάδιο της διαδικασίας. Η επανάληψη της διαδικασίας σύνδεσης του αντισώματος έναντι του αντισώματος του ποντικιού και του συμπλέγματος APAAP προκαλεί μια αξιοσημείωτη αύξηση του ποσού της αλκαλικής φωσφατάσης που ενώνεται με αποτέλεσμα την αύξηση της έντασης της τελικής αντίδρασης. Η αντίδραση του ενζύμου της αλκαλικής φωσφατάσης αναπτύσσεται σε αζωτούχο -αναγωγικό κυτταροχημικό υπόστρωμα στο οποίο το Fast red είναι με τη μορφή διαζωτούχου άλατος. Το αποτέλεσμα της αντίδρασης αυτής είναι ένα ζωηρό κόκκινο χρώμα με το οποίο χρωματίζονται τα GPIIb/IIIa θετικά κύτταρα ,και το οποίο δημιουργεί αντίθεση με τη χρώση της αιματοξυλίνης με την οποία χρωματίζονται τα GPIIb/IIIa αρνητικά κύτταρα, με αποτέλεσμα τα GPIIb/IIIa θετικά να γίνονται εύκολα ορατά κάτω από το οπτικό μικροσκόπιο .



Εικόνα 11: Σχηματική παράσταση των σταδίων της APAAP.

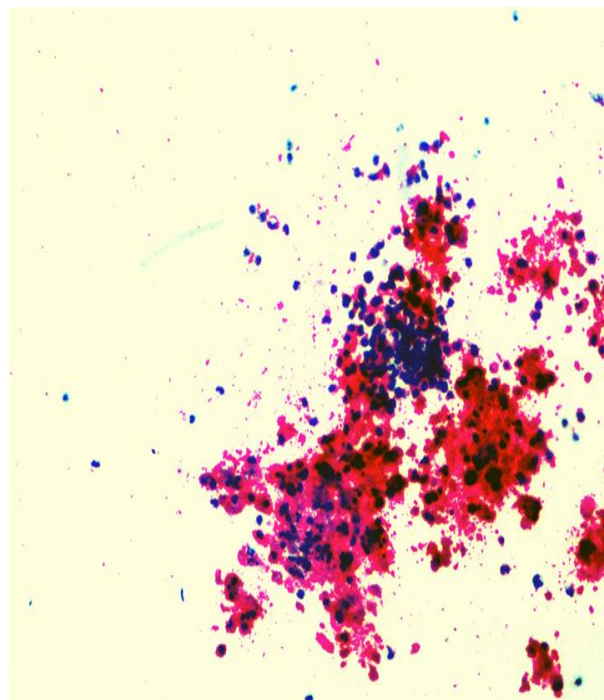
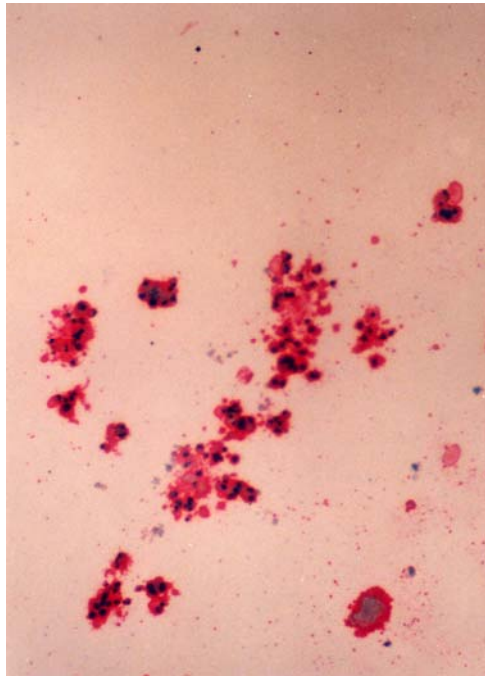
Εκτέλεση της μεθόδου

Σε συντομία, οι αντικειμενοφόρες πλάκες μονιμοποιούνταν για 80 δευτερόλεπτα με διάλυμα μεθανόλης- ακετόνης 1:3 πριν την χρώση και ανθρώπινη γ σφαιρίνη προστέθηκε για 5 λεπτά, σε ένα κύκλο που αναπαραστούσε το ένα τέταρτο από την κάθε τετράγωνη περιοχή της αντικειμενοφόρου πλάκας. Οι αντικειμενοφόρες πλάκες πλένονταν πριν από κάθε βήμα με διάλυμα TBS (0,05M Tris/NaCl pH 7,6). Μετά την επώαση των αντικειμενοφόρων πλακών με το μονοκλωνικό αντίσωμα αντι -CD41 ποντικού (5B12; Dako, Glostrup, Denmark) για 30 λεπτά ακολούθησε διαδοχικά επώαση με αντίσωμα κουνελιού έναντι του αντισώματος του ποντικού (Dako Denmark) και με APAAP (Dako, Denmark) για 30 λεπτά το καθένα και στη συνέχεια επώαση με το καθένα επίσης για 10 λεπτά. Το υπόστρωμα για τη δράση της APAAP αποτελούνταν από 100mg ASNaphthol-Mix phosphate (Sigma) , 200 μ L NN-Dimethylmorphamide (Sigma) 9,8 mL Tris buffer pH 8,2 ,60 μ L levamisole (1,024g/5mL, Sigma) 200mg άλας fast red (Sigma). Με το υπόστρωμα αυτό έγινε επικάλυψη των πλακών για 30 λεπτά. Τέλος οι πλάκες επικαλύπτηκαν για 10 λεπτά με αιματοξυλίνη και στην συνέχεια κάτω από το οπτικό μικροσκόπιο έγινε η αναγνώριση και η μέτρηση των μεγακαρυοκυτταρικών αποικιών.

Χαρακτηρισμός των μεγακαρυοκυτταρικών αποικιών.

Τρεις κατηγορίες μεγακαρυοκυτταρικών αποικιών αναγνωρίστηκαν: οι αμιγείς μεγακαρυοκυτταρικές αποικίες, οι μικτές αποικίες οι οποίες περιείχαν εκτός των μεγακαρυοκυττάρων και κύτταρα των άλλων μυελικών σειρών και οι μη μεγακαρυοκυτταρικές αποικίες από κύτταρα άλλων μυελικών σειρών πλὴν των μεγακαρυοκυττάρων. Οι αμιγείς μεγακαρυοκυτταρικές αποικίες ανάλογα με το μέγεθος και την ωριμότητα των κυτάρων της αποικίας χαρακτηρίστηκαν επιπλέον ως

μικρές αποικίες με κύτταρα μικρότερα από πενήντα και μεγάλες αποικίες οι οποίες αποτελούνταν από περισσότερα από πενήντα κύτταρα απλωμένα γύρω από μια κεντρική περιοχή (Burst –forming units; BFU-MK) (Εικόνα 12) Οι μικρές σε μέγεθος αποικίες αντιπροσώπευαν αποικίες από περισσότερες ώριμες προβαθμίδες των μεγακαρυοκυττάρων (Colony-forming units; CFU-MK) ενώ οι Burst αποικίες αντιπροσώπευαν αποικίες από περισσότερες άωρες προβαθμίδες των μεγακαρυοκυττάρων(BFU-MK).



Εικόνα 12: Μεγακαροκυτταρικές αποικίες (MK): Α. CFU-Mk : <50 κύτταρα Β. BFU-MK:> 50 κύτταρα. Γ . Μεικτή αποικία.

ΜΕΤΡΗΣΗ ΚΥΤΤΑΡΟΚΙΝΩΝ ΣΤΑ ΥΠΕΡΚΕΙΜΕΝΑ

LTBMCs

Ο προσδιορισμός των επιπέδων του Transforming growth factor $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$) και της θρομβοποιητίνης (TPO) στα υπερκείμενα των μακροχρόνιων μυελικών καλλιιεργειών έγινε με ανοσοενζυμική μέθοδο Elisa και τα κατάλληλα kits (Quantikine kits R&D Systems Inc., Minneapolis, Minn, USA) τα οποία είναι διαθέσιμα στο εμπόριο. Πριν την μέτρηση των επιπέδων του TGF- $\beta 1$ έγινε ενεργοποίηση του σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Επίσης σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή οι ευαισθησίες των μεθόδων ήταν 15pg/mL και 7 pg/mL για την TPO και τον TGF- $\beta 1$ αντίστοιχα.

A) ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΘΡΟΜΒΟΠΟΙΗΤΙΝΗΣ ΜΕ ΑΝΟΣΟΕΝΖΥΜΑΤΙΚΗ ΜΕΘΟΔΟ ELISA

Βασικές αρχές της μεθόδου.

Ο προσδιορισμός της TPO στα υπερκείμενα των μακροχρόνιων καλλιιεργειών έγινε με ποσοτική ανοσοενζυμική μέθοδος τύπου σαντουίτς. Συγκεκριμένα ένα μονοκλωνικό αντίσωμα ειδικό για την TPO είχε προ-επιστρωθεί και καθηλωθεί μέσα στις κυψελίδες του σετ. Πρότυπα διαλύματα και δείγματα πιπεταρίστηκαν μέσα στις κυψελίδες και εάν υπήρχε καθόλου TPO σε αυτά αυτή συνδεόταν με το ακινητοποιημένο αντίσωμα. Ακολουθούσε πλύσιμο με το οποίο απομακρυνόταν τα μη συνδεδεμένα υποστρώματα και προσθήκη ενός πολυκλωνικού συνδεδεμένου με ένζυμο αντισώματος ειδικό για την TPO. Ακολουθούσε ένα πλύσιμο για να απομακρυνθεί οποιοδήποτε μη συνδεδεμένο αντίσωμα-ένζυμο αντιδραστήριο και προσθήκη ενός διαλύματος χρωμογόνου

υποστρώματος στις κυψελίδες. Χρώμα αναπτύχθηκε σε αναλογία με τη συνολική ποσότητα της TPO που είχε συνδεθεί στα αρχικά στάδια. Η ανάπτυξη του χρώματος σταμάτησε με την προσθήκη του ανάλογου αντιδραστηρίου και η ένταση του χρώματος εκτιμήθηκε.

Προετοιμασία αντιδραστηρίων

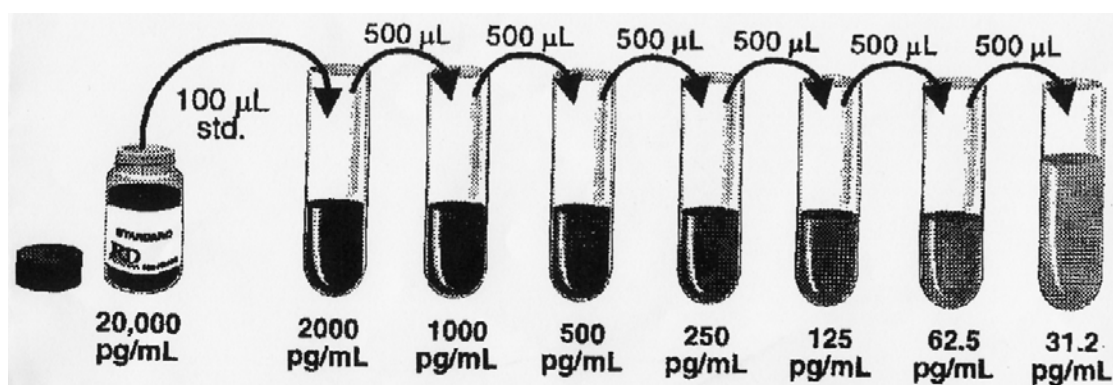
Wash buffer (Αντιδραστήριο για πλύσιμο): 20mL του συμπυκνωμένου Wash buffer διαλύεται σε αποιονισμένο ή αποστειρωμένο νερό για το σχηματισμό 500mL wash buffer.

Calibrator Diluent RD-11(1X) (Διάλυμα καλιμπραρίσματος)-5mL του συμπυκνωμένου διαλύματος καλιμπραρίσματος διαλύεται σε 20mL αποιονισμένου ή αποστειρωμένου νερού έτσι ώστε ο τελικός όγκος του διαλύματος να είναι 25mL

Substrate Solution (Διάλυμα χρωμογόνου υποστρώματος)-Αντιδραστήρια χρωμογόνα A και B αναμιγνύονται μαζί σε ίσους όγκους, 15 λεπτά πριν από τη χρήση. Προστατεύονται από το φως. 50μL από το παραγόμενο αντιδραστήριο μίξης χρησιμοποιήθηκε σε κάθε κυψέλη.

TPO standard (Πρότυπο διάλυμα TPO)-Έγινε ανασύσταση του πρότυπου διαλύματος TPO με 1.0mL αποιονισμένου ή αποστειρωμένου νερού. Αυτή η ανασύσταση είχε σαν αποτέλεσμα την παραγωγή ενός διαλύματος στοκ 20,000pg/mL. Έγινε ανάδειξη του πρότυπου διαλύματος για να εξασφαλισθεί η πλήρης ανασύσταση τουλάχιστον για 15 λεπτά πριν πραγματοποιηθούν οι αραιώσεις. Αρχικά 100μL του διαλύματος τοποθετούνται σε ένα σωληνάριο με αποτέλεσμα η συγκέντρωση του TPO πρότυπου (standard) σε αυτό το σωληνάριο να είναι 2000pg/mL.

Στη συνέχεια πιπεταρίστηκαν 900μL του Calibrator Diluent RD-11(1X) μέσα στο σωληνάριο που περιέχει τα 2000pg/mL του TPO standard διαλύματος. 500μL του Calibrator Diluent RD-11(1X) τοποθετήθηκαν στα εναπομείνοντα σωληνάρια. Μετά 500μL μεταφέρθηκαν διαδοχικά από το πρώτο στο τελευταίο σωληνάριο (Βλέπε εικόνα 13). Πριν από κάθε μεταφορά το περιεχόμενο του κάθε σωληναρίου αναδεύεται ελαφρά. Τα 2000pg/mL του TPO standard χρησιμοποιήθηκαν σαν υψηλό πρότυπο ενώ το διάλυμα Calibrator Diluent RD-11(1X) σαν πρότυπο μηδέν.



Εικόνα 13: Σχηματική παράσταση των αραιώσεων του διαλύματος TPO standard

Εκτέλεση της μεθόδου.

Έγινε προσθήκη 50μL του Diluent RD11 σε κάθε κυψελίδα. Ακολούθησε προσθήκη 50μL των πρότυπων διαλυμάτων, controls ή δειγμάτων σε κάθε κυψελίδα και επώαση για τρεις ώρες σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά την επώαση έγινε αναρρόφηση και πλύσιμο σε κάθε κυψελίδα, συνολικά τέσσερις φορές. Το πλύσιμο

έγινε με προσθήκη 400μL wash buffer σε κάθε κυψελίδα. Μετά το τελευταίο πλύσιμο έγινε αναρρόφηση του εναπομείνοντος wash buffer από κάθε κυψελίδα και ακολούθησε προσθήκη 200μL TPO συζευγμένου με ένζυμο και επώαση για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολούθησε αναρρόφηση και πλύσιμο όπως αναφέρθηκε παραπάνω και έπειτα προσθήκη 200μL Substrate solution σε κάθε κυψελίδα και επώαση για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου προστατεύοντας τις κυψελίδες από το φως. Μετά το τέλος της επώασης έγινε προσθήκη 50μL διαλύματος τερματισμού (Stop Solution) και προσδιορισμός της οπτικής πυκνότητας κάθε κυψελίδας μέσα σε 30 λεπτά στα 450 nm.

B.ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΟΥ TGF-β1 ΜΕ ΑΝΟΣΟΕΝΖΥΜΙΚΗ ΜΕΘΟΔΟ ELISA

Η μέτρηση του TGF-β1 στα υπερκείμενα των μακροχρόνιων καλλιιεργειών έγινε με ποσοτική ανοσοσενζυματική μέθοδος τύπου σαντουίτς. Ο διαλυτός υποδοχέας του TGF-β τύπου II , ο οποίος συνδέει τον TGF-β1 έχει προεπιστρωθεί στις μικροκυψελίδες πλάκας μικροτιτλοποίησης πολυστερίνης. Πρότυπα διαλύματα γνωστής περιεκτικότητας σε TGF-β1(standards) και δείγματα πιπετάρονται μέσα στις μικροκυψελίδες και εάν υπάρχει καθόλου TGF-β1 μέσα σε αυτά συνδέεται με τον ακινητοποιημένο υποδοχέα. Ακολουθεί πλύσιμο για την απομάκρυνση των ασύνδετων υποστρωμάτων και προσθήκη ενός συνδεδεμένου με ένζυμο πολυκλωνικού αντισώματος ειδικού για τον TGF-β1 που συνδέεται με τον ακινητοποιημένο TGF-β1 από την πρώτη επώαση. Ακολουθεί δεύτερο πλύσιμο για την απομάκρυνση κάθε ασύνδετου αντιδραστηρίου αντισώματος-ενζύμου και προσθήκη ενός διαλύματος χρωμογόνου υποστρώματος και ανάπτυξη χρώματος σε αναλογία προς το ποσό του TGF-β1 που συνδέθηκε στο αρχικό

στάδιο. Η ανάπτυξη του χρώματος στάματησε με την προσθήκη του κατάλληλου αντιδραστηρίου και η ένταση του χρώματος εκτιμήθηκε.

Ενεργοποίηση του TGF-β1 των δειγμάτων.

Ενεργοποίηση του TGF-β1 έγινε μόνο στα δείγματα αφού τα πρότυπα διαλύματα περιείχαν ενεργή μορφή του TGF-β1. Η ενεργοποίηση της λανθάνουσας μορφής του TGF-β1 (latent TGF-β1) των δειγμάτων στην ανοσοενεργό μορφή του η οποία μπορεί να ανιχνευθεί με την ανοσοενζυμική μέθοδος έγινε ως εξής: Σε 0,5 ml από υπερκείμενα μακροχρόνιων καλλιιεργειών προστέθηκαν 0,1 mL 1 N HCL, έγινε επώαση για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και στην συνέχεια έγινε αδρανοποίηση του οξινοποιημένου δείγματος με την προσθήκη 0,1 mL 1,2 N NaOH/0,5M HEPES.

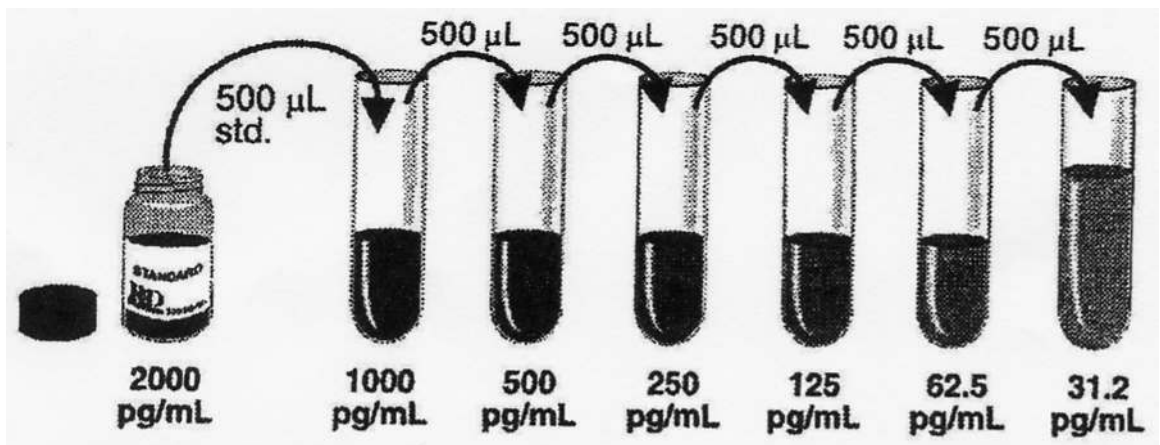
Προετοιμασία των αντιδραστηρίων.

Wash buffer (Διάλυμα πλυσίματος). 20mL του συμπυκνωμένου διαλύματος προστέθηκαν σε απιονισμένο νερό για τη δημιουργία 500mL Wash buffer.

Substrate Solution (Διάλυμα χρωμογόνου υποστρώματος). Χρωμογόνα διαλύματα A και B αναμιγνύονταν μαζί σε ίσους όγκους 15 λεπτά πριν τη χρήση. Προστατεύονταν από το φως. 50μL από το παραγόμενο μίγμα χρησιμοποιήθηκαν σε κάθε κυψέλη.

TGF-β1 Standard (Πρότυπο διάλυμα TGF-β1). Έγινε ανασύσταση το πρότυπου διαλύματος TGF-β1 με διάλυμα καλιμπραρίσματος RD51 (calibrator diluent RD51). Αυτή η ανασύσταση είχε σαν αποτέλεσμα την παραγωγή ενός αποθεματικού διαλύματος 2000 pg/mL.

Στη συνέχεια πιπεταρίσθηκαν 500μL Calibrator Diluent σε μια σειρά σωλημαρίων από πολυστερίνη. 500μL του πρότυπου διαλύματος πιπεταρίσθηκαν στο πρώτο σωληνάριο και ακολούθησαν διαδοχικές αραιώσεις όπως φαίνεται από το παρακάτω σχήμα (Εικόνα 14). Το αδιάλυτο πρότυπο διάλυμα χρησιμοποιήθηκε ως high standard (2000 pg/ml) Το διάλυμα του καλιμπραρίσματος χρησιμοποιήθηκε ως πρότυπο 0(0 pg/ml).



Εικόνα 14: Σχηματική παράσταση των αραιώσεων του διαλύματος TGF-β1 standard .

Εκτέλεση της μεθόδου.

Έγινε προσθήκη 200μL των πρότυπων διαλυμάτων, controls, και ενεργοποιημένων διαλυμάτων σε κάθε κυψελίδα. Ακολούθησε επώαση για 3 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά την επώαση έγινε αναρρόφηση και πλύσιμο σε κάθε κυψελίδα , συνολικά τρεις φορές. Το πλύσιμο έγινε με προσθήκη 400μL wash buffer σε κάθε κυψελίδα. Μετά το τελευταίο πλύσιμο έγινε αναρρόφηση του εναπομείνοντος wash buffer από κάθε κυψελίδα και ακολούθησε προσθήκη 200L

TGF-β1 συζευγμένου με ένζυμο και επώαση για 1,5 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολούθησε αναρρόφηση και πλύσιμο, όπως αναφέρθηκε παραπάνω, και έπειτα προσθήκη 200μL Substrate solution σε κάθε κυψελίδα και επώαση για 20 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου προστατεύοντας τις κυψελίδες από το φώς. Μετά το τέλος της επώασης έγινε προσθήκη 50μL διαλύματος τερματισμού (Stop Solution και προσδιορισμός της οπτικής πυκνότητας κάθε κυψελίδας μέσα σε 30 λεπτά στα 450 nm.

ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ ΕΞΟΥΔΕΤΕΡΩΣΗΣ ΤΟΥ TGF- β1.

Σε μια σειρά τεσσάρων πειραμάτων εκτιμήθηκε ο σχηματισμός των CFU-Meg από BMMCs μετά την προσθήκη μοκλωνικού εξουδετερωτικού αντισώματος ποντικού έναντι του ανθρώπινου TGF-β1 (R&D systems, MN, USA). Το εξουδετερωτικό αντίσωμα προστέθηκε σε συγκέντρωση 50μg/ml . Σύμφωνα με τον κατασκευαστή η εξουδετερωτική δόση₅₀ (Neutralization dose₅₀ , ND₅₀) για αυτό το αντίσωμα ορίζεται ως η συγκέντρωση του αντισώματος που απαιτείται για να αποδώσει το μισό της μέγιστης αναστολής της δραστηριότητας της κυτταροκίνης στη σειρά των κυττάρων που εξετάζεται, όταν η κυτταροκίνη είναι παρούσα σε συγκέντρωση μόλις ικανή για την μέγιστη δράση της. Η συγκέντρωση αυτή ορίζεται σε 0,3-1 μg/ml παρουσία 0,25ng/mL rhTGF-β1.

ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

Τα δεδομένα της μελέτης αναλύθηκαν χρησιμοποιώντας το GraphPad Prism πρόγραμμα του υπολογιστή (GraphPad Software, San Diego, CA). Η ομογένεια των πληθυσμών εξετάστηκε με το Χ τετράγωνο τέστ. Συγκρίσεις μεταξύ δυο σειρών μετρήσεων έγιναν με μη παραμετρικά τέστ , Mann-Whitney . Συσχετίσεις μεταξύ δύο αριθμητικών παραμέτρων εξετάστηκαν με Spearman's μη παραμετρικό τέστ συσχέτισης. Μια πιθανότητα ίση ή μικρότερη του 5% θεωρήθηκε ως στατιστικά σημαντική. Τα δεδομένα των ομάδων εκφράστηκαν ως μέση τιμή ± σταθερή απόκλιση.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Μεγακαρυοκύτταρα στο μυελό των οστών και αιμοπετάλια περιφερικού αίματος

Σε συμφωνία με προηγούμενα δημοσιευμένα μας αποτελέσματα (128), οι ασθενείς με CIN παρουσιάζουν φυσιολογικό αριθμό μεγακαρυοκυττάρων στα χρωσμένα με May-Grunwald-Giemsa μυελικά επιχρίσματα με παρουσία όμως υπολοβιδών μορφών (Εικόνα 15). Ο αριθμός όμως των αιμοπεταλίων στο περιφερικό αίμα ήταν σημαντικά ελαττωμένος στους ασθενείς με CIN σε σχέση με τους μάρτυρες ($P = 0.0146$) (Πίνακας 3). Λαμβάνοντας υπόψη το όριο των 150,000/μL σαν μια διακριτή τιμή για τον ορισμό της θρομβοπενίας, εμείς βρήκαμε ότι 12.8% των ασθενών με CIN παρουσιάζουν χαμηλό αριθμό αιμοπεταλίων. Ενδιαφέρων ήταν το γεγονός ότι ο αριθμός των αιμοπεταλίων στο περιφερικό αίμα σχετιζόταν ισχυρά με τον αριθμό των ουδετερόφιλων στην ομάδα των ασθενών με CIN ($r = 0.4529$, $P = 0.0038$) αλλά όχι και στους μάρτυρες ($r = 0.3892$, $P = 0.0899$) προτείνοντας ότι ένας κοινός παθογενετικός μηχανισμός πιθανά επιδρά τόσο στη κοκκιοποίηση όσο και στη μεγακαρυοποίηση στους ασθενείς με CIN.

Προγονικά κύτταρα των μεγακαρυοκυττάρων στο μυελό των οστών

Η συχνότητα των CD34⁺/CD61⁺ προγονικών κυττάρων των μεγακαρυοκυττάρων ήταν σημαντικά μειωμένη στους ασθενείς ($0.19 \pm 0.11\%$; διάμεση τιμή 0.20%, ακραίες τιμές 0.01%-0.40%) συγκρινόμενη με τους μάρτυρες ($0.46\% \pm 0.49\%$; διάμεση τιμή 0.32%, ακραίες τιμές 0.10%-2.30%) ($P = 0.0022$). Η μείωση αυτή πιθανά να οφείλεται στη χαμηλότερη αναλογία των

συνολικών CD34⁺ στους ασθενείς (0.99%±0.47%; διάμεση τιμή 0.90%, ακραίες τιμές 0.30%-2.00%) σε σχέση με τους μάρτυρες (2.11%± 1.24%; διάμεση τιμή 1.80%, ακραίες τιμές 1.00%-6.00%) ($P < 0.0001$) αφού καμιά σημαντική στατιστικά διαφορά δεν τεκμηριώθηκε μεταξύ ασθενών και μαρτύρων στην αναλογία των CD61⁺ κυττάρων που ανιχνεύθηκαν στο διαμέρισμα των CD34⁺ κυττάρων (21.83%±12.77% και 21.98%±19.22% αντίστοιχα). Αυτά τα δεδομένα είναι σε συμφωνία με προηγούμενες μελέτες οι οποίες δείχνουν χαμηλό αριθμό CD34⁺ προγονικών κυττάρων στους ασθενείς με CIN (113, 122) και υποδεικνύουν ότι ο χαμηλός αριθμός των CD34⁺/CD61⁺ προγονικών κυττάρων των μεγακαρυοκυττάρων αντανακλά τις χαμηλές εφεδρίες των μυελικών CD34⁺ στους ασθενείς με CIN.

ΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ ΜΕΓΑΚΑΡΥΟΚΥΤΤΑΡΙΚΩΝ ΑΠΟΙΚΙΩΝ

Ο αριθμός των CFU-Meg που αναπτύχθηκαν από τα BMMCs στους ασθενείς με CIN και στους μάρτυρες απεικονίζεται στην εικόνα 16. Η μέση συχνότητα των συνολικών CFU-Meg που ελήφθησαν από 5×10^5 BMMCs ήταν σημαντικά χαμηλότερη στους ασθενείς (79.79 ± 41.70 ; διάμεση τιμή 64.00, ακραίες τιμές 22.00-146.00) συγκρινόμενη με τους μάρτυρες (153.60 ± 75.61 ; διάμεση τιμή 132.00, ακραίες τιμές 48.00-328.00) ($P < 0.0001$). Αναλύοντας περαιτέρω τα δεδομένα των αποικιών σε σχέση με τον αριθμό των κυττάρων ανά αποικία και της μορφολογίας της αποικίας, βρήκαμε ότι αυτή η μείωση οφειλόταν στο μικρότερο αριθμό των μεγάλων σε μέγεθος (19.59 ± 14.08 ; διάμεση τιμή 18.00, ακραίες τιμές 0-40.00 αποικίες ανά 5×10^5 BMMCs) και μεικτών αποικιών (2.15 ± 3.74 ; διάμεση τιμή 0, ακραίες τιμές 0-10 αποικίες ανά 5×10^5 BMMCs) στους ασθενείς σε σχέση με τους μάρτυρες (75.80 ± 57.88 ; διάμεση τιμή 70.00, ακραίες τιμές 4.00-216.00 αποικίες ανά 5×10^5 BMMCs και

12.40 ± 13.97 ; διάμεση τιμή 8.00 , ακραίες τιμές 0-48.00 αποικίες ανά 5×10^5 BMMCs αντίστοιχα) ($P < 0.0001$ και $P = 0.0005$ αντίστοιχα) επειδή καμία σημαντική στατιστικά διαφορά δε βρέθηκε μεταξύ ασθενών και μαρτύρων στην συχνότητα των μικρών σε μέγεθος αποικιών (55.74 ± 27.14 και 66.20 ± 48.57 αποικίες ανά 5×10^5 BMMCs αντίστοιχα) ($P = 0.9325$). Αυτά τα δεδομένα δείχνουν παθολογική κλωνογονική ικανότητα των περισσότερων άωρων προβαθμίδων των προγονικών κυττάρων των μεγακαρυοκυττάρων αλλά όχι και των ώριμων προγονικών κυττάρων στους ασθενείς με CIN.

Για να μελετήσουμε κατά πόσο ο μειωμένος σχηματισμός των CFU-Meg στους ασθενείς με CIN οφείλεται σε εγγενής βλάβη των προγονικών κυττάρων των μεγακαρυοκυττάρων ή είναι αποτέλεσμα της ανασταλτικής δράσης του μυελικού μικροπεριβάλλοντος στην ανάπτυξη των προγονικών κυττάρων των μεγακαρυοκυττάρων εμείς προσδιορίσαμε την κλωνογονική ικανότητα των CFU-Meg από ανοσομαγνητικά διαχωρισμένα $CD34^+$ κύτταρα των ασθενών (Εικόνα 16). Καμία στατιστικά σημαντική διαφορά δε βρέθηκε μεταξύ ασθενών και μαρτύρων στο συνολικό αριθμό των CFU-Meg ($P = 0.082$) των μικρών και μεγάλου μεγέθους CFU-Meg ($P = 0.879$ και $P = 0.2798$, αντίστοιχα) ή των μεικτών αποικιών ($P=0.102$). Με βάση τα δεδομένα αυτά μπορούμε να υποθέσουμε την ύπαρξη μιας πιθανής εξωγενούς ανασταλτικής δράσης στα πρώιμα (early) στάδια της ανάπτυξης των μεγακαρυοκυττάρων παρά μιας εγγενής βλάβης των προγονικών κυττάρων των μεγακαρυοκυττάρων. Εναλλακτικά, ο ελαττωμένος σχηματισμός των CFU-Meg από BMMCs των ασθενών μπορεί απλά να είναι το αποτέλεσμα του μειωμένου αριθμού των $CD34^+/CD61^+$ προγονικών κυττάρων μέσα στο κλάσμα των BMMCs.

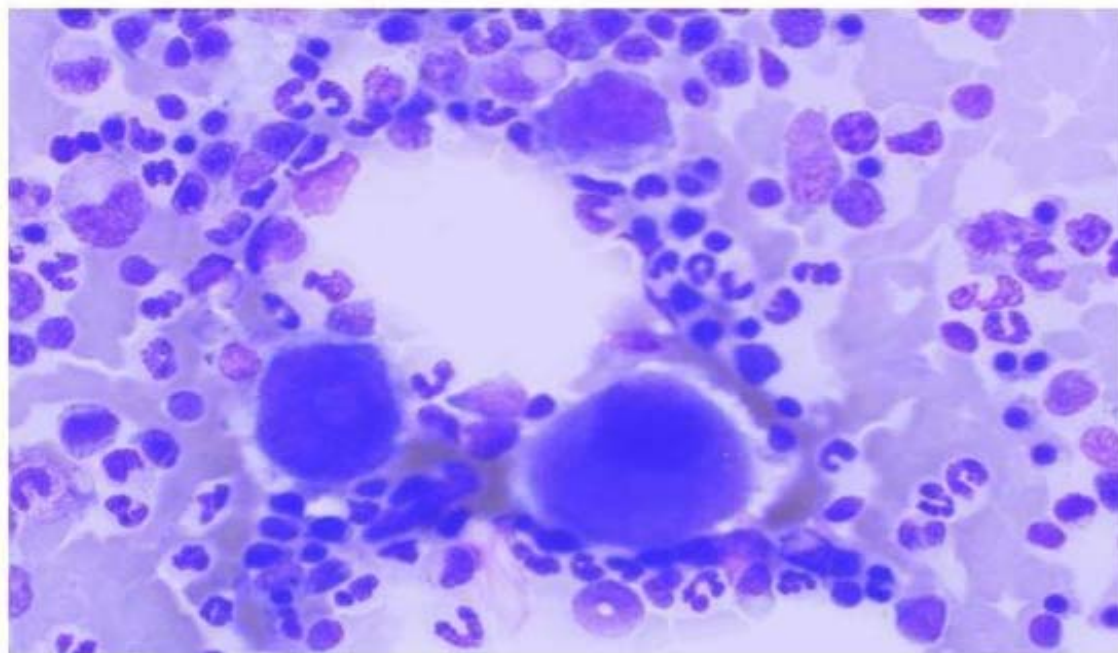
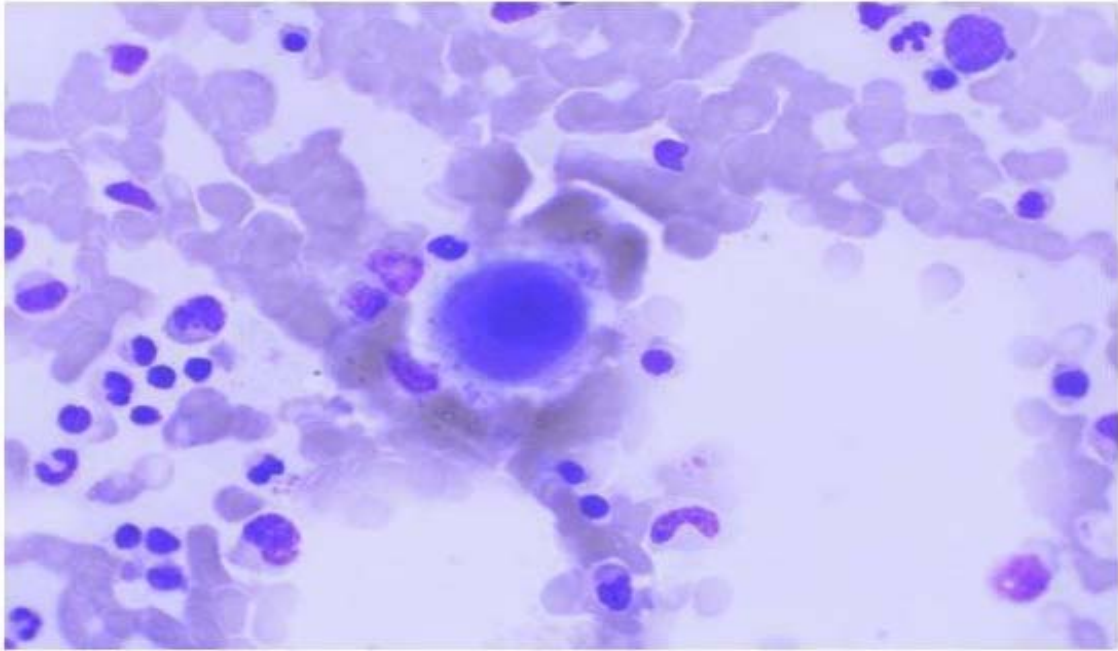
Παραγωγή κυτταροκινών από τα στρωματικά κύτταρα μακροχρόνιων μυελικών καλλιέργειών.

Επειδή η τοπική παραγωγή της TPO και του TGF-β₁ στο μυελό των οστών έχει δημοσιευθεί ότι επηρεάζεται στη ρύθμιση της μεγακαρυοποίησης (231, 238), εμείς εξετάσαμε την παραγωγή αυτών των κυτταροκινών από τα στρωματικά κύτταρα μακροχρόνιων μυελικών καλλιέργειών των ασθενών (Εικόνα 17). Τα επίπεδα της TPO και του TGF-β₁ ήταν στατιστικά σημαντικά αυξημένα στους ασθενείς (125.49 ± 21.75 ; διάμεση τιμή 120.14 , ακραίες τιμές 70.18-175.57 pg/mL και 1035.03 ± 331.55 ; διάμεση τιμή 983.23, , ακραίες τιμές 533.22-1596.34 pg/mL αντίστοιχα) συγκρινόμενα με τους μάρτυρες (107.61 ± 19.73 ; διάμεση τιμή 110.25, ακραίες τιμές 78.26-133.88 pg/mL και 683.95 ± 144.45 ; διάμεση τιμή 720.22 , ακραίες τιμές 440.36-891.30 pg/mL αντίστοιχα) ($P = 0.0022$ και $P < 0.0001$ αντίστοιχα) και οι τιμές κάθε κυτταροκίνης σχετίζονταν θετικά η μία με την άλλη ($r = 0.3749$, $P = 0.0034$) (Εικόνα 17). Ενδιαφέρον παρουσίασε το γεγονός ότι οι τιμές της TPO στα υπερκείμενα των μακροχρόνιων μυελικών καλλιέργειών, αλλά όχι και οι τιμές του TGF-β₁, σχετίζονταν αρνητικά με τον αριθμό των αιμοπεταλίων στο περιφερικό αίμα ($r = -0.4056$, $P = 0.0014$ και $r = -0.1652$, $P = 0.2115$ αντίστοιχα) ενώ οι τιμές του TGF-β₁ σχετίζονταν αντίστροφα με το ποσοστό των CD34⁺ ($r = -0.2664$, $P = 0.0414$) και CD34⁺/CD61⁺ ($r = -0.3190$, $P = 0.0138$) προγονικών κυττάρων στους ασθενείς που μελετήθηκαν. Τέλος οι τιμές του TGF-β₁ σχετίζονταν αρνητικά με τον συνολικό αριθμό των CFU-Meg που ελήφθησαν από τα BMMCs ($r = -0.3676$, $P = 0.0042$) υποδηλώνοντας μια πιθανή περαιτέρω ανασταλτική δράση της κυτταροκίνης στην ανάπτυξη των προγονικών κυττάρων των μεγακαρυοκυττάρων (Εικόνα 18).

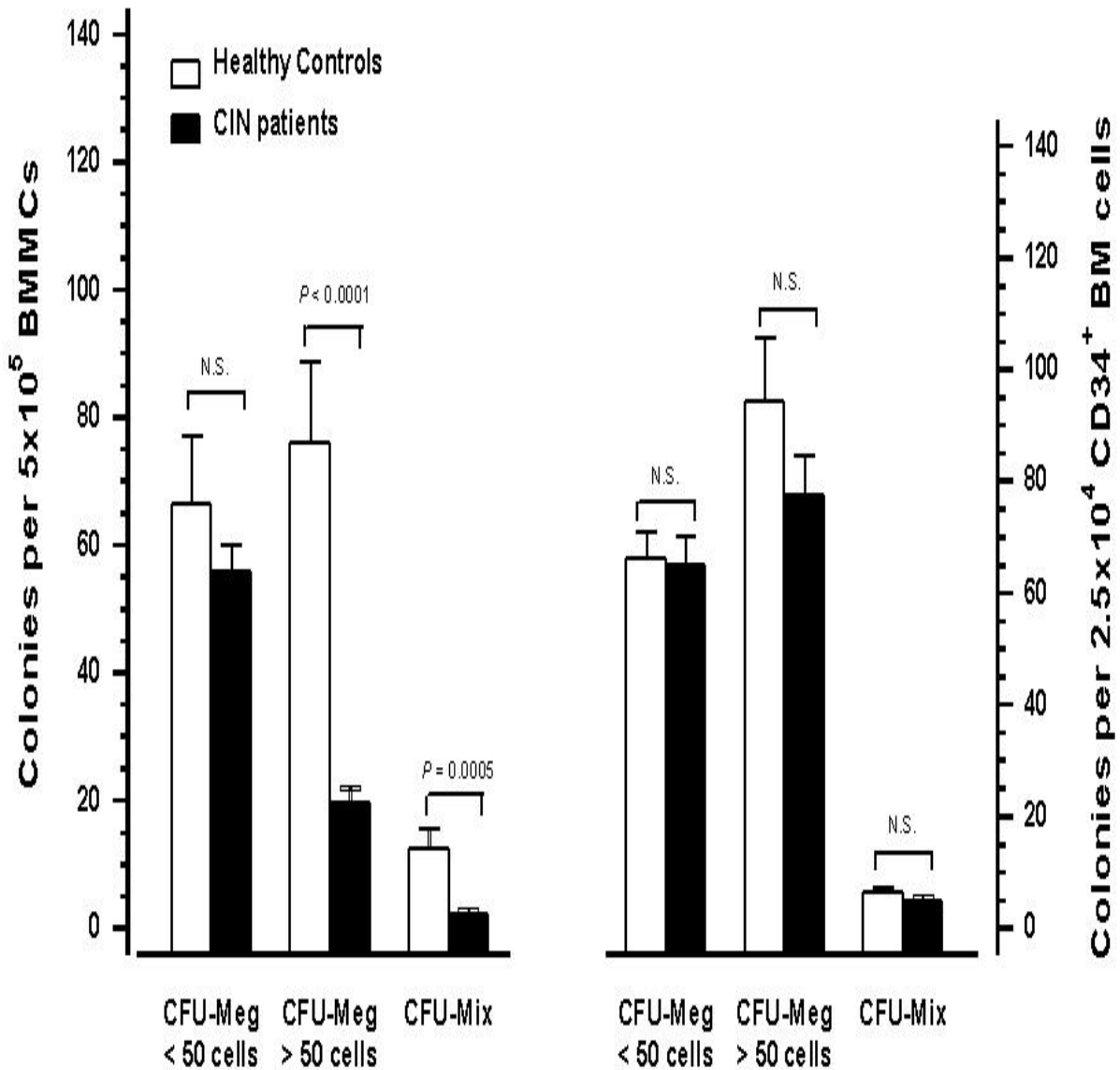
Δράση του αντι-TGF-β₁ εξουδετερωτικού αντισώματος στο σχηματισμό των CFU-Meg.

Για να εξετάσουμε κατά πόσο η αυξημένη συγκέντρωση του TGF-β₁ στο μυελικό μικροπεριβάλλον των ασθενών με CIN μπορεί να εξηγήσει την παθολογική κλωνογονική ικανότητα των προγονικών κυττάρων των μεγακαρυοκυττάρων εμείς επώασαμε BMMCs παρουσία TGF-β₁ εξουδετερωτικού αντισώματος και στη συνέχεια εφαρμόσαμε την κλωνογονική μέθοδος ανάπτυξης των προγονικών κυττάρων των μεγακαρυοκυττάρων. Χρησιμοποιήσαμε το εξουδετερωτικό αντίσωμα σε συγκέντρωση 10 φορές μεγαλύτερη από τη δόση εξουδετέρωσης της υψηλότερης τιμής του TGF-β₁ που βρήκαμε στα υπερκείμενα των ασθενών με CIN (1.6 mg/mL). Εάν ο TGF-β₁ ήταν υπεύθυνος για τη διαταραχή της μεγακαρυοποίησης στους ασθενείς με CIN, τότε η προσθήκη του εξουδετερωτικού αντισώματος αναμενόταν να αυξήσει σημαντικά το σχηματισμό των CFU-Meg. Η μέση τιμή των αποικιών που σχηματίστηκαν από την εκτέλεση τεσσάρων πειραμάτων φαίνεται στην εικόνα 19. Παρουσία αντί-TGF-β₁ αντισώματος, μια στατιστικά σημαντική αύξηση παρατηρήθηκε στο συνολικό αριθμό των CFU-Meg αποικιών στους ασθενείς με CIN (270.5 ± 69.9) σε σχέση με τον αρχικό αριθμό των αποικιών πριν τη χορήγηση του εξουδετερωτικού αντισώματος (78.3 ± 22.2 , $P < 0.01$) η οποία οφειλόταν σε μια σημαντική αύξηση των μικρών, μεγάλων και μεικτών αποικιών ($P < 0.05$, $P < 0.001$ και $P < 0.01$, αντίστοιχα). Τα ποσοστά επί της εκατό της αύξησης εκτιμήθηκαν σε $242.0\% \pm 15.4\%$, $131.7\% \pm 20.1\%$ και $303.1\% \pm 120.9\%$ αντίστοιχα. Στους μάρτυρες, η παρουσία του αντί-TGF-β₁ αντισώματος αύξησε επίσης τον αριθμό των CFU-Meg αποικιών (303.0 ± 68.4), σε σχέση με τον αριθμό των αποικιών πριν τη χορήγηση του αντισώματος (217.0 ± 80.1),

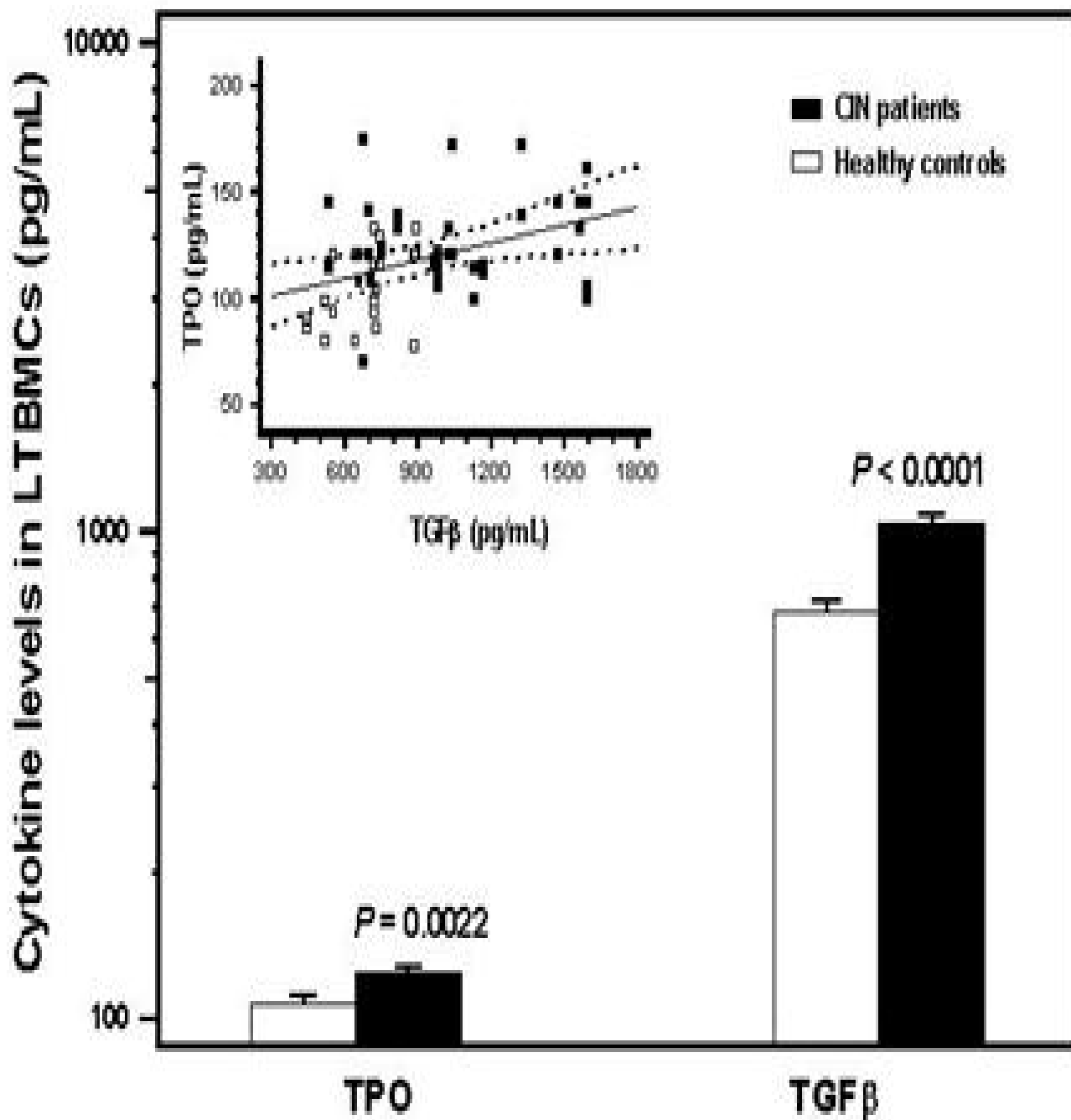
ωστόσο η αύξηση αυτή δεν ήταν στατιστικά σημαντική ($P = 0.0571$). Αυτά τα δεδομένα επιβεβαιώνουν περαιτέρω μια σημαντική ανασταλτική δράση του TGF- β_1 πάνω στην μεγακαρυοποίηση στους ασθενείς με CIN.



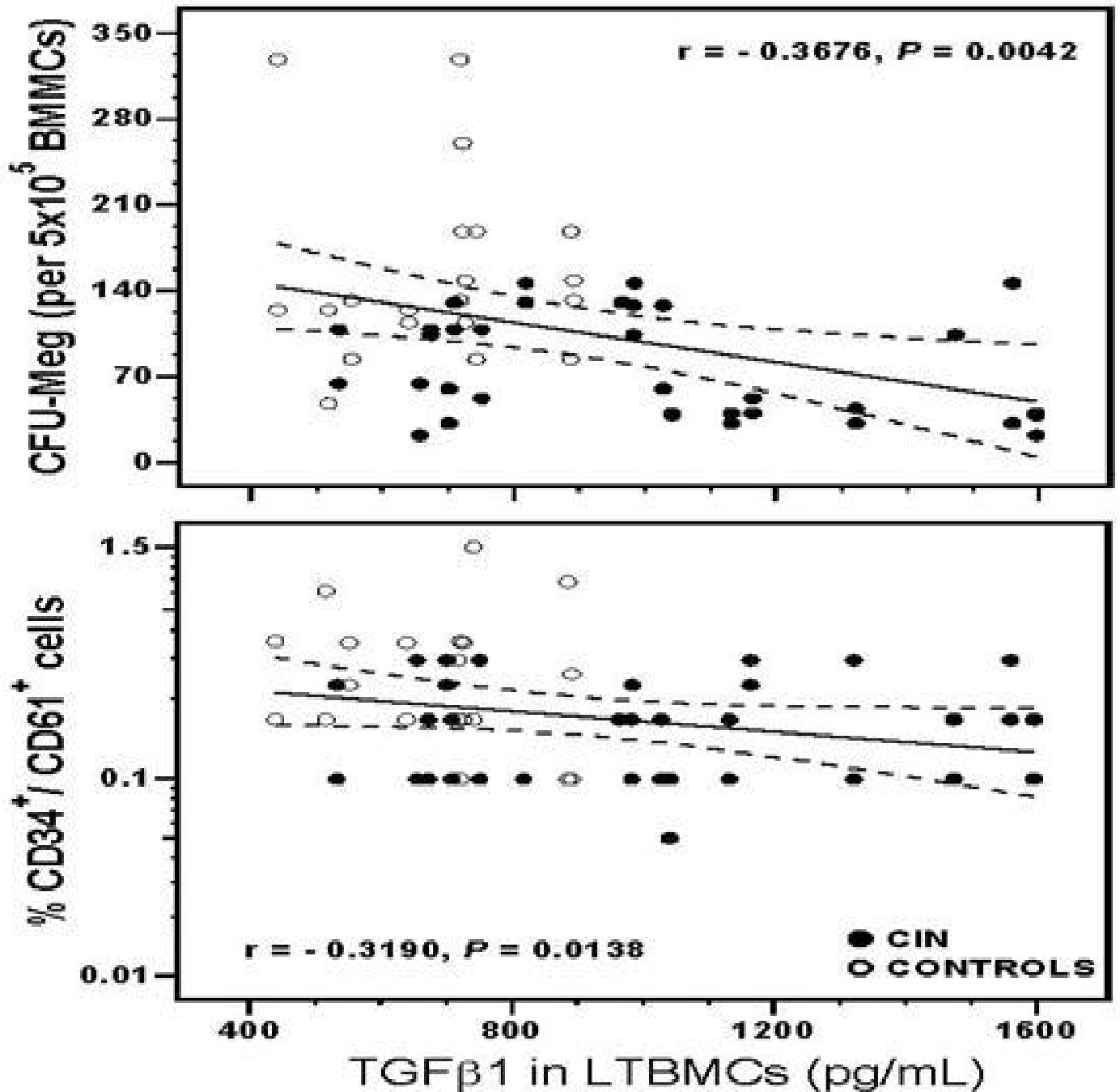
Εικόνα 15: Υπολοβιώδη μεγακαρυοκύτταρα στους ασθενείς με CIN. Χρωσμένα μυελικά επιχρίσματα με May Grunwald Giemsa από δύο ασθενείς με CIN δείχνουν υπολοβιώδη μεγακαρυοκύτταρα (αρχική μεγέθυνση X40, Olympus οπτικό μικροσκόπιο)



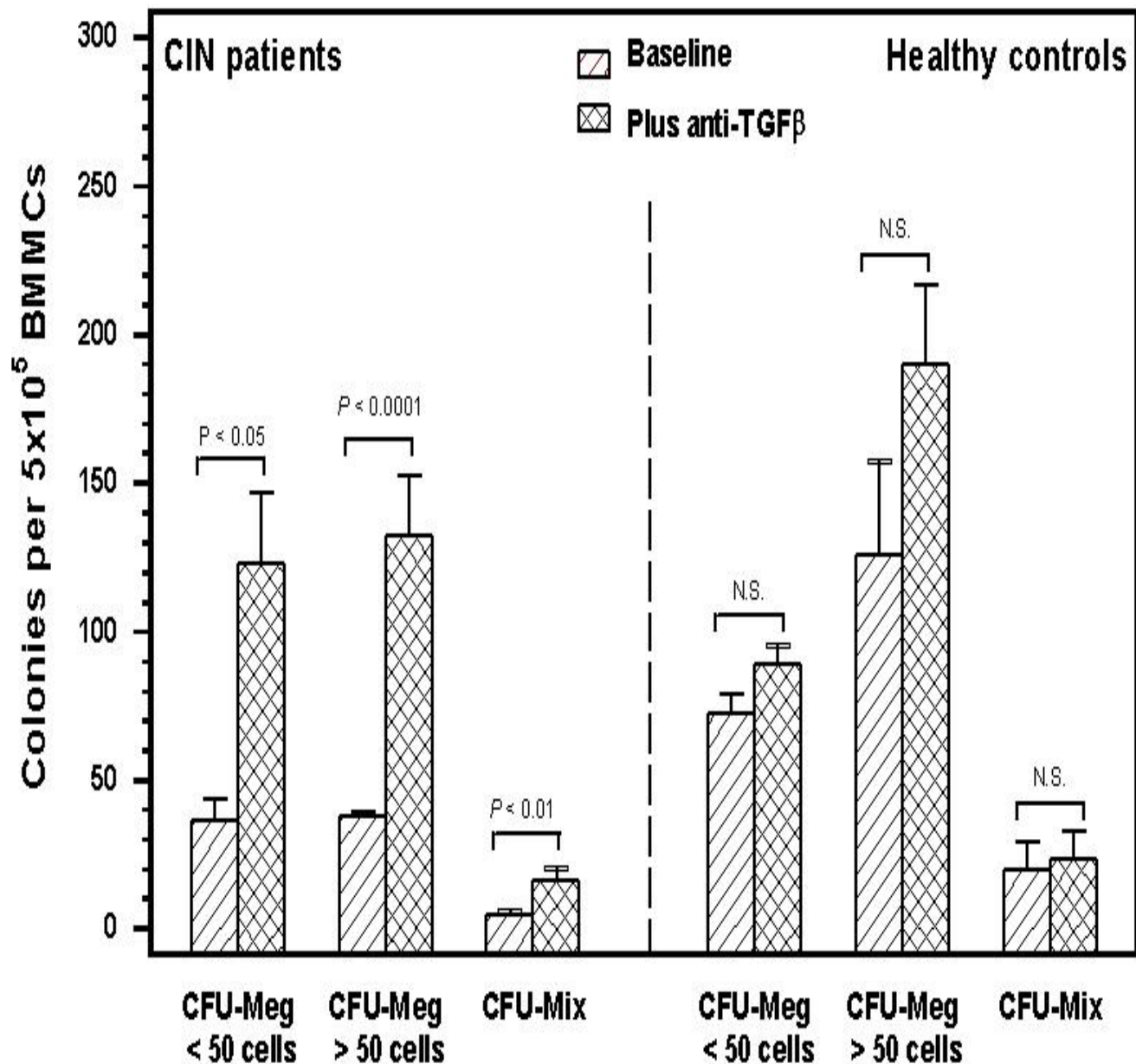
Εικόνα 16: Megakaryocyte colony forming κύτταρα. Οι αριστερές μπάρες παριστούν το μέσο αριθμό των CFU-Meg αποικιών (\pm SEM) που ελήφθησαν από 5×10^5 BMMCs των ασθενών με CIN (n=39) και υγείων μαρτύρων (n=20) χρησιμοποιώντας κλωνογονική μέθοδο. Οι αριστερές μπάρες παριστούν το μέσο αριθμό των αποικιών (\pm SEM) που ελήφθησαν από 2.5×10^4 ανοσομαγνητικά διαχωρισμένα CD34⁺ κύτταρα από τους ασθενείς και τους μάρτυρες. Η αναγνώριση των αποικιών και η αρίθμηση τους έγινε με την μέθοδο APAAP. Η σύγκριση μεταξύ ασθενών και μαρτύρων έγινε με τη χρήση μη παραμετρικού Mann-Whitney τέστ και οι τιμές του P υποδεικνύονται. N.S., όχι σημαντική διαφορά



Εικόνα 17: Επίπεδα της TPO και του TGF-β₁ στα υπερκείμενα των LT BMC. Οι μάρκες παριστούν τη μέση τιμή των επιπέδων (\pm SEM) των κυτταροκινών στα υπερκείμενα των LT BMC των ασθενών με CIN (n=39) και των μαρτύρων (n=20) που συλλέχθηκαν την εβδομάδα 3-4. Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν με Elisa. Συγκρίσεις μεταξύ ασθενών και μαρτύρων έγιναν με τη χρήση μη-παραμετρικού Mann-Whitney test και οι τιμές του P υποδεικνύονται. Ανάλυση γραμμικής συσχέτισης με τη χρήση του Spearman's test που έγινε για το συσχετισμό των τιμών μεταξύ TPO και TGF-β₁, επίσης δείχνεται Η γραμμή συσχέτισης δείχνεται σαν συνεχής γραμμή και το 95% των ορίων διακύμανσης ως διακεκομμένη γραμμή. Η εξίσωση συσχέτισης, ο συντελεστής συσχέτισης (r) και ο βαθμός της σημαντικότητας (P) δείχνονται.



Εικόνα 18: Συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων του TGF-β₁ στα υπερκείμενα των LTBMCS και των προγονικών κυττάρων των μεγακαρυοκυττάρων. Ανάλυση γραμμικής συσχέτισης για τη συσχέτιση των επιπέδων του TGF-β₁ στα υπερκείμενα των LTBMCS και της συχνότητας των CFU-Meg κλωνογονικών προγονικών κυττάρων (άνω διάγραμμα) και της αναλογίας των CD34⁺/CD61⁺ προγονικών κυττάρων των μεγακαρυοκυττάρων (κάτω διάγραμμα) μέσα στο κλάσμα των BMMC των ασθενών με CIN (n=39) και των υγιών μαρτύρων (n=20). Η ανάλυση έγινε με τη χρήση του Spearman's test Η γραμμή συσχέτισης δείχνεται σαν συνεχής γραμμή και 95% των ορίων διακύμανσης σαν διακεκομμένες γραμμές. Ο συντελεστής συσχέτισης (r) και ο βαθμός σημαντικότητας (P) δείχνονται.



Εικόνα 19: Θετική δράση του αντι-TGF-β₁ εξουδετερωτικού αντισώματος στο σχηματισμό των CFU-Meg. Οι μπάρες αναπαριστούν το μέσο αριθμό των CFU-Meg αποικιών (\pm SEM) που ελήφθησαν από τα BMMCs των ασθενών με CIN (n=4) και των μαρτύρων (n=4) παρουσία ή όχι TGF-β₁ εξουδετερωτικού αντισώματος σε συγκέντρωση 50μg/mL. Παρουσία αντι-TGF-β₁ αντισώματος, μια στατιστικά σημαντικά αύξηση παρατηρήθηκε στον αριθμό των CFU-Meg που ελήφθησαν από τους ασθενείς με CIN (αριστερές μπάρες) όχι όμως και από τους μάρτυρες (δεξιές μπάρες), σε σχέση με τον αριθμό των αποικιών πριν τη χορήγηση του αντισώματος. Συγκρίσεις έγιναν με τη χρήση του μη-παραμετρικού Mann-Whitney tέστ και οι τιμές του P επισημαίνονται. N.S. όχι στατιστικά σημαντικό.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ-ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Τα δεδομένα που παρουσιάζονται εδώ δείχνουν ότι οι ασθενείς με CIN έχουν παθολογική μεγακαρυοποίηση στο μυελό των οστών η οποία υποδηλώνεται από το χαμηλό αριθμό των $CD34^+/CD61^+$ προγονικών κυττάρων των μεγακαρυοκυττάρων, το χαμηλό αριθμό των CFU-Meg αποικιών από BMMCs και το σχετικά χαμηλό αριθμό αιμοπεταλίων στο περιφερικό αίμα σε σχέση με τους μάρτυρες. Η ισχυρή συσχέτιση μεταξύ του αριθμού των κυκλοφορούντων ουδετερόφιλων και των αιμοπεταλίων στην ομάδα των ασθενών αλλά όχι και στους μάρτυρες, δείχνει ότι ένας κοινός παθογενετικός μηχανισμός πιθανό να επιδρά στην κοκκιοποίηση και στη μεγακαρυοποίηση στη χρόνια ιδιοπαθή ουδετεροπενία. Ο φυσιολογικός σχηματισμός των CFU-Meg αποικιών από καθαρά $CD34^+$ κύτταρα τα οποία είναι χωρίς κυτταροκίνες που παράγονται από στρωματικά κύτταρα, υποδηλώνει ότι το μυελικό μικροπεριβάλλον πιθανά ασκεί μια αρνητική δράση στη μεγακαρυοποίηση στους ασθενείς αυτούς.

Για να αποσαφηνίσουμε περαιτέρω τους παθογενετικούς μηχανισμούς οι οποίοι πιθανά επιδρούν στην ανάπτυξη των προγονικών κυττάρων στους ασθενείς με CIN, εκτιμήσαμε τα επίπεδα στα υπερκείμενα μακροχρόνιων μυελικών καλλιέργειών δυο τοπικά παραγόμενων κυτταροκινών οι οποίες έχει αποδειχθεί ότι παίζουν σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της μεγακαρυοποίησης, δηλαδή της TPO και του $TGF-\beta_1$. Έχει προταθεί ότι η παραγωγή της TPO από τα στρωματικά κύτταρα του μυελού είναι επαγόμενη, σε απάντηση του αριθμού των αιμοπεταλίων στο περιφερικό αίμα, και ότι ασκεί θετική δράση στην ανάπτυξη των μεγακαρυοκυττάρων (236, 229), ενώ η τοπική παραγωγή του $TGF-\beta_1$ πιθανά αναστέλλει την ανάπτυξη των προγονικών κυττάρων των μεγακαρυοκυττάρων και την ενδομίτωση (262, 264, 263). Οι ασθενείς

μας παρουσιάζουν πολύ αυξημένα επίπεδα και των δύο κυτταροκινών στα υπερκείμενα των LTBMCS σε σχέση με τους υγιείς μάρτυρες. Οι τιμές της TPO σχετίζονταν αντίστροφα με τον αριθμό των αιμοπεταλίων στο περιφερικό αίμα, υποδεικνύοντας μια πιθανή παλίνδρομη αλληλορύθμιση (feedback) της μάζας των αιμοπεταλίων στην παραγωγή κυτταροκινών από το μυελό των οστών, και θετικά με τα επίπεδα του TGF-β₁ προτείνοντας επίσης ένα μηχανισμό παλίνδρομης αλληλορύθμισης μεταξύ αυτών των κυτταροκινών. Έχει δημοσιευθεί ότι ο TGF-β₁ προάγει την παραγωγή της TPO από τα στρωματικά κύτταρα τόσο σε φυσιολογικές όσο και σε παθολογικές καταστάσεις (238). Ο παραπάνω μηχανισμός, σε συνδυασμό με την επαγόμενη από την TPO αύξηση της έκφρασης των υποδοχέων του TGF-β₁ στην επιφάνεια των προβαθμίδων των μεγακαρυοκυττάρων, έχει προταθεί σαν πιθανός μηχανισμός της διαφοροποίησης του Stem cell προς την μεγακαρυοκυτταρική σειρά καθώς επίσης και για την αναστολή της ωρίμανσης με παρουσία υπολοβιώδη μεγακαρυοκυττάρων στους ασθενείς με θρομβοπενική πορφύρα (238). Η κατασταλτική δράση του TGF-β₁ στην ενδιάμεση περίοδο της διαφοροποίησης (mid-differentiation period) των μεγακαρυοκυττάρων πιθανά δίνει μια εξήγηση για τα υπολοβιώδη μεγακαρυοκυττάρων που συχνά απαντούν στο μυελό των ασθενών με CIN (128).

Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι τα επίπεδα του TGF-β₁ στα υπερκείμενα των LTBMCS των ασθενών μας δεν σχετίζονται με τον αριθμό των αιμοπεταλίων στο περιφερικό αίμα υποδηλώνοντας μια ενδογενή βλάβη στο μυελικό μικροπεριβάλλον στους ασθενείς με CIN που δε σχετίζεται με τη μάζα των αιμοπεταλίων. Υπέρ αυτής της υπόθεσης είναι προηγούμενα δημοσιευμένα δεδομένα ότι ένα φλεγμονώδες μυελικό περιβάλλον το οποίο αποτελείται από προ-φλεγμονώδης κυτταροκίνες και προ-αποπτωτικούς διαμεσολαβητές όπως ιντερλευκίνη-1β (IL-1β), IL-6, TNF-α, INFγ και FasL συνεισφέρει σημαντικά στην

παθοφυσιολογία της ασθένειας (113, 122). Επιπρόσθετα αυξημένα επίπεδα του TGF-β₁ έχουν δημοσιευθεί τόσο στο μυελό των οστών όσο και στο περιφερικό αίμα στους ασθενείς με CIN. Τα επίπεδα του TGF-β₁ στο μυελό των οστών έχουν συσχετισθεί αντίστροφα με τη συχνότητα των CD34⁺/CD33⁺ κυττάρων και θετικά με το βαθμό της ουδετεροπενίας ενώ τα επίπεδα της κυτταροκίνης στο περιφερικό αίμα έχουν συσχετισθεί με παθολογικές υποτάξεις ανοσοσφαιρινών και με χαμηλό αριθμό ουδετεροφίλων στους ασθενείς με CIN (113, 89). Τα κύτταρα στο μυελό των οστών που είναι κυρίως υπεύθυνα για την παραγωγή του TGF-β₁ στους ασθενείς με CIN παραμένουν άγνωστα και προσφέρουν ένα ενδιαφέρον πεδίο για περαιτέρω έρευνα. Ωστόσο όλα αυτά τα δεδομένα υποστηρίζουν την άποψη ότι ο TGF-β₁ εμπλέκεται σημαντικά στην παθογένεια της αρρώστειας. Σε συμφωνία με αυτή την υπόθεση είναι τα δεδομένα από αυτή τη μελέτη τα οποία δείχνουν ότι ο TGF-β₁ πιθανά έχει ένα παθογενετικό ρόλο στη ελαττωματική μεγακρυοποίηση στους ασθενείς με CIN. Συγκεκριμένα, αυξημένα επίπεδα του TGF-β₁ στο μυελό των οστών σχετίζονται αντίστροφα με την αναλογία των CD34⁺/CD61⁺ κυττάρων και τον αριθμό των CFU-Meg στους ασθενείς προτείνοντας μια αρνητική δράση της κυτταροκίνης πάνω στην ανάπτυξη των προγονικών κυττάρων των μεγακαρυοκυττάρων. Η σημαντική αύξηση του αριθμού των CFU-Meg, που ακολουθεί την εξουδετέρωση του TGF-β₁, στις κλωνογονικές μεθόδους συνεισφέρει επιπλέον σε αυτή την υπόθεση. Η θετική επίδραση της εξουδετέρωσης του TGF-β₁ στην ανάπτυξη των μεγακαρυοκυτταρικών αποικιών ήταν εμφανής σε όλα τα στάδια της ανάπτυξης των μεγακαρυοκυττάρων, περισσότερο ωστόσο έκδηλη στις μεγάλες και μεικτές αποικίες οι οποίες προέρχονται από περισσότερο αρχέγονα προγονικά κύτταρα των μεγακαρυοκυττάρων. Αυτό το εύρημα είναι σε συμφωνία με τη σημαντική μείωση του αριθμού των μεγάλων και μεικτών αποικιών, αλλά όχι και του μικρού μεγέθους αποικιών, στους ασθενείς σε σχέση με τους μάρτυρες και υποδεικνύει ακόμα περισσότερο την πιθανή εμπλοκή του

TGF-β₁ ο οποίος είναι γνωστό ότι ασκεί μια περισσότερο έκδηλη αρνητική δράση στην ανάπτυξη των πρώιμων (early) σταδίων της μεγακρυοποίησης(259, 258, 269).

Είναι ενδιαφέρον ότι παρά τα πολύ αυξημένα επίπεδα του TGF-β₁ στο μυελό των οστών, οι ασθενείς μας παρουσιάζουν φυσιολογικό, ελαφρώς χαμηλότερο από των μαρτύρων, αριθμό αιμοπεταλίων στο περιφερικό αίμα γεγονός που προτείνει την ύπαρξη ενός αντισταθμιστικού μηχανισμού. Εμείς υποθέσαμε ότι τα αυξημένα επίπεδα της TPO σε συνδυασμό με τα αυξημένα επίπεδα της IL-6 στα υπερκείμενα των μακροχρόνιων μυελικών καλλιιεργειών των ασθενών, όπως έχει προηγουμένως δημοσιευθεί (113), πιθανά αντισταθμίζει την ανασταλτική δράση του TGF-β₁ μιας και οι δύο κυτταροκίνες έχουν αναγνωρισθεί ως κυτταροκίνες με ευοδωτική δράση τόσο στα πρώιμα (early) όσο και στα περισσότερο ώριμα (late) στάδια της ανάπτυξης των μεγακαρυοκυττάρων (175).

Συμπερασματικά τα δεδομένα μας παρέχουν ενδείξεις ότι οι ασθενείς με CIN έχουν παθολογική μεγακαρυοποίηση η οποία χαρακτηρίζεται από μειωμένη ανάπτυξη των προγονικών κυττάρων των μεγακαρυοκυττάρων με παρουσία υπολοβιώδη μεγακαρυοκυττάρων στο μυελό των οστών και σχετικά χαμηλό αριθμό αιμοπεταλίων στο περιφερικό αίμα. Η αυξημένη τοπική παραγωγή του TGF-β₁ λόγω μιας φλεγμονώδους διαδικασίας στο μυελό των οστών των ασθενών κύρια εμπλέκεται στη διαταραχή της μεγακαρυοποίησης ενώ η αντίθετη δράση της TPO σε απάντηση της υπερπαραγωγής του TGF-β₁ και/ή της σχετικά χαμηλής μάζας των αιμοπεταλίων στο περιφερικό αίμα, μπορεί τελικά ν' αντισταθμίζει την ανασταλτική δράση του TGF-β₁ στη μεγακαρυοποίηση. Τα δεδομένα από αυτή τη μελέτη, υποστηρίζουν περαιτέρω την άποψη ότι η χρόνια ιδιοπαθής ουδετεροπενία είναι ένα σύνδρομο μυελικής ανεπάρκειας που οφείλεται σε κυτταροκίνες και πιθανά συνεισφέρουν περαιτέρω στη αποσαφήνιση της παθοφυσιολογίας της ασθένειας.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η χρόνια ιδιοπαθής ουδετεροπενία (chronic idiopathic neutropenia, CIN) ορίζεται σαν μια εμμένουσα, ανεξήγητη μείωση του αριθμού των κυκλοφορούντων ουδετερόφιλων κάτω από τα κατώτερα όρια της φυσιολογικής διακύμανσης σ' ένα δεδομένο εθνικό πληθυσμό για μακρά περίοδο του χρόνου συνήθως για περισσότερο από τρεις μήνες. Η διαταραχή μπορεί να αναγνωρισθεί ανάμεσα στους άλλους τύπους της χρόνιας ουδετεροπενίας από τον επίκτητο χαρακτήρα της, την έλλειψη χρωμοσωμιακών ανωμαλιών, τις αρνητικές δοκιμασίες για αντιπολυμορφοποιητικά αντισώματα, την έλλειψη κλινικών και εργαστηριακών ευρημάτων για οποιαδήποτε υποκείμενη ασθένεια στην οποία η ουδετεροπενία θα μπορούσε να αποδοθεί, την προδιάθεση στις γυναίκες και την συνήθως ήπια και χωρίς επιπλοκές πορεία της. Μία HLA τάξεως II (DRB1*1302) γενετική προδιάθεση ορίζει ένα σχετικό κίνδυνο 8.36 για την ανάπτυξη της ασθένειας έχει επίσης δημοσιευθεί. Επιπρόσθετα, σε αντίθεση με τους ασθενείς με σοβαρές συγγενείς μορφές ουδετεροπενίας, καμία μετάλλαξη του γονιδίου που κωδικοποιεί την ELA-2 δεν έχει αναγνωρισθεί στους ασθενείς με χρόνια ιδιοπαθής ουδετεροπενία μέχρι σήμερα.

Η ουδετεροπενία στους ασθενείς με CIN έχει κυρίως αποδοθεί σε ένα φλεγμονώδες μυελικό μικροπεριβάλλον το οποίο παράγει αυξημένα ποσά αναστολέων της αιμοποίησης με αποτέλεσμα την υποπλασία και την αριστερή στροφή της κοκκιώδους σειράς. Ειδικά έχει δειχθεί ότι οι ασθενείς με CIN παρουσιάζουν αυξημένα ποσά ενεργοποιημένων T-λεμφοκυττάρων με μυελοκατασταλτικές ιδιότητες στο μυελό των οστών τα οποία προάγουν με τη διαμεσολάβηση του Fas τον αποπτωτικό θάνατο των προγονικών κυττάρων της μυελικής σειράς στο μυελό των οστών μέσω της παραγωγής της ιντερφερόνης-γ (INF γ) και του Fas ligand (FasL). Έχει επίσης δειχθεί ότι τα υπερκείμενα των

μακροχρόνιων μυελικών καλλιεργείων των ασθενών με CIN έχουν πολύ αυξημένα επίπεδα του παράγοντα νέκρωσης των όγκων- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) και του transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1) τα οποία ασκούν μια αρνητική επίδραση στη μυελοποίηση. Έχει επίσης δημοσιευθεί ότι η χρόνια ιδιοπαθής ουδετεροπενία μπορεί να παρουσιάζεται είτε ως μεμονωμένη ουδετεροπενία είτε ως ουδετεροπενία σε συνδυασμό με αναιμία/ή και θρομβοπενία. Σύμφωνα με τα δικά μας δεδομένα τα οποία στηρίζονται σε περισσότερους από 200 ασθενείς, 10% των ασθενών παρουσιάζει θρομβοπενία ενώ η πλειοψηφία των ασθενών παρουσιάζει αυξημένη συχνότητα υπολοβιόδη μεγακαρυοκυττάρων στο μυελό των οστών στα μυελικά επιχρίσματα και στα δείγματα της οστεομυελικής βιοψίας. Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι κανένας από τους ασθενείς μας δεν έχει αναπτύξει μυελοδυσπλαστικό σύνδρομο έπειτα από μακροχρόνια παρακολούθηση. Η αιτία αυτών των ανωμαλιών που σχετίζονται με τη μεγακαρυοποίηση παραμένει άγνωστη. Ωστόσο, μπορεί κανείς να υποθέσει ότι το φλεγμονώδες μυελικό μικροπεριβάλλον των ασθενών με CIN είναι δυνατό να ασκεί μια ανασταλτική δράση στη ανάπτυξη των μεγακαρυοκυττάρων επιπρόσθετα με την καταστολή της μυελοποίησης. Αυτή η υπόθεση δεν έχει μελετηθεί μέχρι σήμερα.

Αυτή η μελέτη σχεδιάστηκε με σκοπό να μελετήσει την μεγακαρυοποίηση στους ασθενείς με CIN σε μια προσπάθεια να διερευνήσει το παθοφυσιολογικό μηχανισμό που σχετίζεται με τη χαμηλή μάζα των αιμοπεταλίων και την ανώμαλη μορφολογική εμφάνιση των μεγακαρυοκυττάρων. Δεδομένου ότι η θρομβοποιητίνη (TPO) και ο TGF- β 1 έχει δειχθεί ότι ασκούν πρωταρχικό ρόλο στην μεγακαρυοποίηση μελετήσαμε ειδικά την εμπλοκή αυτών των κυτταροκινών στην ανάπτυξη των προγονικών κυττάρων των μεγακαρυοκυττάρων.

Μελετήσαμε 39 ασθενείς με χρόνια ιδιοπαθής ουδετεροπενία, 37 γυναίκες και 2 άνδρες ηλικίας 20 έως 77 ετών (διάμεση ηλικία 54 χρόνια). Όλοι οι ασθενείς πληρούσαν τα διαγνωστικά κριτήρια για τη χρόνια ιδιοπαθής ουδετεροπενία. Οι ασθενείς είχαν αριθμό ουδετερόφιλων κάτω από 1800/ μ L στο περιφερικό αίμα για περίοδο η οποία κυμαινόταν από 24 έως 180 μήνες (διάμεση τιμή 75 μήνες) , παρουσίαζαν υποπλαστική και με στροφή προς τα αριστερά μυελική σειρά στα χρωσμένα με May-Grunwald-Giemsa μυελικά επιχρίσματα και στα δείγματα της οστεομυελικής βιοψίας και αρνητικά στον ορό τεστ λευκοσυγκόλλησης και ανοσοφθορισμού για αντιπολυμορφοπυρηνικά αντισώματα. Σαν μάρτυρες μελετήθηκαν 20 αιματολογικά υγιή άτομα , 18 γυναίκες και 2 άνδρες ηλικίας 30-64 (διάμεση ηλικία 50.5 χρόνια). Μεταξύ ασθενών και φυσιολογικών μαρτύρων δε βρέθηκαν σημαντικά στατιστικά διαφορές όσον αφορά την ηλικία και το φύλο, χρησιμοποιώντας το τεστ χ^2 .

Για να διερευνήσουμε τον υποκείμενο παθοφυσιολογικό μηχανισμό, μελετήσαμε τις εφεδρείες και την κλωνογονική ικανότητα των προγονικών κυττάρων των μεγακαρυοκυττάρων.

Εναιωρήματα μυελικών μονοπύρηνων κυττάρων (bone marrow mononuclear cells, BMMCs) των ασθενών και των μαρτύρων προετοιμάστηκαν από μυελό που αναρροφήθηκε από την οπίσθια λαγόνια ακρολοφία. Καθαρά $CD34^+$ απομονώθηκαν από BMMCs με την τεχνική του ανοσομαγνητικού διαχωρισμού. Εκτιμήθηκε το ποσοστό των $CD34^+/CD61^+$ προγονικών κυττάρων των μεγακαρυοκυττάρων στο κλάσμα των BMMCs χρησιμοποιώντας κυτταρομετρία ροής. Η αναγνώριση των μεγακαρυοκυτταρικών αποικιών (colony-forming units, CFU-Meg) από καθαρά $CD34^+$ και από BMMCs έγινε με τη χρήση μιας κλωνογονικής μεθόδου στηριζόμενη στο κολλαγόνο. Επίσης εκτιμήσαμε τα επίπεδα της TPO και του TGF- β 1 στα

υπερκείμενα μακροχρόνιων μυελικών καλλιέργειών χρησιμοποιώντας ανοσοενζυμική μέθοδο. Πειράματα εξουδετέρωσης του TGF-β1 πραγματοποιήθηκαν στις μεγακαρυοκυτταρικές καλλιέργειες από BMMCs.

Τα δεδομένα της μελέτης αναλύθηκαν χρησιμοποιώντας το GraphPad Prism πρόγραμμα του υπολογιστή (GraphPad Software, San Diego, CA).

Βρήκαμε ότι οι ασθενείς με CIN έχουν στο μυελό των οστών χαμηλό αριθμό CD34⁺/CD61⁺ προγονικών κυττάρων των μεγακαρυοκυττάρων, χαμηλό αριθμό CFU-Meg αποικιών από BMMCs, αλλά όχι και από καθαρά CD34⁺ κύτταρα και σχετικά χαμηλό αριθμό αιμοπεταλίων στο περιφερικό αίμα σε σχέση με τους μάρτυρες. Μια στατιστικά σημαντική συσχέτιση παρατηρήθηκε μεταξύ του αριθμού των κυκλοφορούντων ουδετερόφιλων και των αιμοπεταλίων στην ομάδα των ασθενών αλλά όχι και των μαρτύρων. Τα επίπεδα της TPO και του TGF-β1 στα υπερκείμενα μακροχρόνιων μυελικών καλλιέργειών ήταν σημαντικά αυξημένα στους ασθενείς σε σχέση με τους μάρτυρες. Τα επίπεδα της TPO σχετίζονταν αντίστροφα με τον αριθμό των αιμοπεταλίων στο περιφερικό αίμα και θετικά με τα επίπεδα του TGF-β1. Τα επίπεδα του TGF-β1 σχετίζονταν αντίστροφα με το ποσοστό των CD34⁺/CD61⁺ προγονικών κυττάρων των μεγακαρυοκυττάρων ενώ δεν παρατηρήθηκε συσχέτιση του TGF-β1 με τον αριθμό των αιμοπεταλίων στο περιφερικό αίμα. Η προσθήκη ενός αντί-TGF-β1 εξουδετερωτικού αντισώματος στις μεγακαρυοκυτταρικές αποικίες από BMMCs προκάλεσε μια σημαντική αύξηση του αριθμού των CFU-Meg στους ασθενείς με CIN αλλά όχι και στους μάρτυρες, σε σχέση με τον αριθμό τους πριν από την προσθήκη του αντισώματος.

Συμπερασματικά τα δεδομένα μας παρέχουν ενδείξεις ότι οι ασθενείς με CIN έχουν παθολογική μεγακαρυοποίηση η οποία χαρακτηρίζεται από μειωμένη ανάπτυξη των προγονικών κυττάρων των μεγακαρυοκυττάρων με παρουσία υπολοβιόδη

μεγακαρυοκυττάρων στο μυελό των οστών και σχετικά χαμηλό αριθμό αιμοπεταλίων στο περιφερικό αίμα. Προτείνουμε ότι η αυξημένη τοπική παραγωγή του TGF-β₁ λόγω μιας φλεγμονώδους διαδικασίας στο μυελό των οστών των ασθενών κύρια εμπλέκεται στη διαταραχή της μεγακαρυοποίησης, ενώ η αντίθετη δράση της TPO σε απάντηση της υπερπαραγωγής του TGF-β₁ και/ή της σχετικά χαμηλής μάζας των αιμοπεταλίων στο περιφερικό αίμα, μπορεί τελικά ν' αντισταθμίζει την ανασταλτική δράση του TGF-β₁ στη μεγακαρυοποίηση. Τα δεδομένα από αυτή τη μελέτη υποστηρίζουν περαιτέρω την άποψη ότι η χρόνια ιδιοπαθής ουδετεροπενία είναι ένα σύνδρομο μυελικής ανεπάρκειας που οφείλεται σε κυτταροκίνες και πιθανά συνεισφέρουν περαιτέρω στη αποσαφήνιση της παθοφυσιολογίας της ασθένειας.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Dale D, Guerry D, Wewerka J, Bull J, Chusid M. Chronic neutropenia. *Medicine (Baltimore)* 1979;58:128-144
2. Hoffbrand AV & Pettit JE, *Essential Haematology*. Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1993
3. Eliopoulos GD, Meletis J, Fessas P, Anagnou NP. Defective CSA-dependent granulopoiesis in patients with chronic drug- induced neutropenia. *Haematologica* 1990;23:101-109.
4. Kostmann R. Infantile Genetic Agranulocytosis: A review with presentation of ten new cases. *Acta Paediatr Scand* 1975;64:362-368.
5. Hestdal K, Welte K, Lie SO, et al. Severe congenital neutropenia: Abnormal growth and differentiation of myeloid progenitors to granulocyte stimulating factor (G-CSF) but normal responses to G-CSF plus stem cell factor. *Blood* 1993;82:2991-2997.
6. Parmley RT, Ogawa M, Darby CP Jr, Spicer SS. Congenital neutropenia: Neutrophil proliferation with abnormal maturation. *Blood* 1975;56:723-734.
7. Welte K, Zeidler C, Reiter A, et al. Differential effects of GM-CSF and G-CSF in children with congenital neutropenia . *Blood* 1990; 75:1056-1063.
8. Dong F, Brynes RK, Tidow N, et al. Mutation in the gene for the granulocyte colony stimulating factor receptor in patients with acute myeloid leukemia preceded by severe congenital neutropenia. *N Engl J Med* 1995; 333:487-493.
9. Cutting Ho, Lang JE. Familiar benign chronic neutropenia. *Ann Intern Med* 1964;61:876-887.
10. Shoenfeld Y, Alkan ML, Asaly A, et al. Benign familial leukopenia and neutropenia in different ethnic groups. *Eur J Haematol* 1988;41:273-277.
11. Dale DC, Hammond WP. Cyclic neutropenia: A clinical review. *Blood Rev* 1988;2:178-185.

12. Wright DG, Fauci AS, Dale DC, Wolf SM. Correction of human cyclic neutropenia with prednisolone. *N Engl J Med* 1978; 298:295-300.
13. Dale DC, Bonilla MD, Davis MD, et al. A randomized controlled phase III trial of recombinant human granulocyte colony stimulating factor (Filgrastim) for treatment of severe chronic neutropenia. *Blood* 1993;81:2496-2502.
14. Lange RD. Cyclic hematopoiesis: human cyclic neutropenia. *Exp Hematol* 1983;11:435-451.
15. Putterman C, Safadi R, Zlotogora J, et al Treatment of the hematological manifestations of dyskeratosis congenital. *Ann Hematol* 1993;66:209-212.
16. Ventura A, Dragovich D, Luxardo P, Zanazzo G. Human granulocyte colony stimulating factor (rHu G-CSF) for treatment of neutropenia in Shwachman syndrome. *Haematologica* 1995;80:227-229.
17. Woods WG, Roloff JS, Lukens JN, Krivit W. The occurrence of leukemia in patients with the Shwachman syndrome. *J Pediatr* 1981; 99:425-428.
18. Lux SE, Johnston RB Jr, August CS, et al. Chronic neutropenia and abnormal cellular immunity in cartilage- hair hypoplasia. *N Engl J Med* 1970;282:231-236.
19. Kozlowski C, Evans DI. Neutropenia associated with X-linked agammaglobulinemia. *J Pathol* 1991;44:388-390.
20. Levinsky RJ, Tidedman K. Successful bone marrow transplantation for reticular dysgenesis. *Lancet* 1983;671-672
21. Norio R, Raitta C, Lindahl E. Further delineation of the Cohen syndrome. *Clin Genet* 1984; 25:1.
22. Bassan R, Viero P, Minetti B, et al. Myelokathexis: a rare form of Chronic Benign granulocytopenia. *Br J Heamatol* 1984;58:115-117
23. Pinkerton PH, Robinson JB, Senn JS. Lazy leukocyte syndrome- disorder of the granulocyte membrane? *J. Clin Pathol* 1978;31:300-308.

24. Blume RS, Wolff SM. The Chediak-Higashi Syndrome: Studies in four patients and review of the literature. *Medicine* 1972;51:247-280.
25. Palmley RT, Crist WM, Ragab AH, et al. Congenital dysgranulopoietic neutropenia: Clinical, serologic, ultrastructural and in vitro proliferative characteristics. *Blood* 1980;56:465.
26. Rosen FS, Cooper MD, Wedgwood RJP. Medical progress. The primary immunodeficiencies. *N.Engl J Med* 1984;235:300.
27. Vincent PC. Drug- induced aplastic anaemia and agranulocytosis. Incidence and mechanisms. *Drugs* 1986;31:52-63.
28. 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.
29. Murdoch JM, Smith CC. Hematological aspects of systemic disease:Infection. *Clin Haematol* 1972; 1:619-644.
30. Hammond WP, Price TH, Souza LM, Dale DC. Treatment of cyclic neutropenia with granulocyte colony-stimulating factor. *N Engl J Med* 1989;320:1306.
31. Lynch RE, et al. The prognosis in aplastic anemia *Blood* 1975;45:517.
32. Marsh JC, Socie G, Schrezenmeier H, et al. Haemaropoietic growth factors in aplastic anemia. *Blood* 1975; 45:517.
33. Finch SC. Granulocytopenia. In *Williams Hematology*, New York,1972, McGraw-Hill Inc.
34. Dunlap WM, James GW, Hume DM. Anemia and neutropenia caused by copper deficiency. *Ann Inter Med* 1974;80:470-476.
35. Percival SS. Neutropenia caused by copper deficiency: Possible mechanisms of action. *Nutr Rev* 1995;53:59-66.
36. Voight D, et al. Uber die Blutkonzentrationen der Leukozyten und Trombocyten bei Eisenmangel Blut 1967;14:267.

37. Groupe Francais de morphologie Hematologique: French registry of acute leukemia and myelodysplastic syndromes. Age distribution and hemogram analysis of the 449 cases recorded during 1982-1983 and classified according to FAB criteria. *Cancer* 1987;60:1385-1394.
38. Amorosi EL. Hypersplenism. *Semin Hematol* 1965; 2:249-285.
39. Wiseman BK, Doan CA. A newly recognised granulopenic syndrome caused by excessive splenic leukolysis and successfully treated by splenectomy. *Ann Intern Med* 1942;16:1097.
40. Chapman AZ, Reeder PS, Baker LA. Neutropenia secondary to tuberculous splenomegaly: Report of a case. *Ann Inter Med* 1954;41:1225.
41. Minchinton RM, Waters AH. The occurrence and significance of neutrophil antibodies. *Br J Haematol* 1984;56:521-528.
42. 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.
43. Papadaki HA, Eliopoulos GD. Selective loss of peripheral blood CD45RO+ T-lymphocytes correlates with increased levels of serum cytokines and endothelial cell-derived cell adhesion molecules in patients with chronic idiopathic neutropenia of adults. *Ann Hematol* 1998;77:153-159.
44. Lalezari P, Nussbaum M, Gelman S, Spaet T. Neonatal neutropenia due to maternal isoimmunization. *Blood* 1960;15:236-243.
45. Carton J, Tchernia G, Celton JL, et al. Alloimmune neonatal neutropenia . *Am J Pediatr Hematol Oncol* 1991 ;13 :21-25.
46. Minchinton RM, Mc Grath KM. Alloimmune neonatal neutropenia –a neglected diagnosis? *Med J Aust* 1987;3:139.
- 47 Bux J, Jung KD, Kauth T, Mueller-Eckhardt C. Serological and clinical aspects of granulocyte antibodies leading to alloimmune neonatal neutropenia. *Transfus Med.* 1992;2:143-149.

48. Gilmore MM, Stroncek DF, Korones DN. Treatment of alloimmune neonatal neutropenia with granulocyte colony-stimulating factor. *J Pediatr.* 1994;125:948-951.
49. Buy J, Kissel K, Nowak K, et al. Autoimmune neutropenia: Clinical and laboratory studies in 143 patients. *Ann Hematol.* 1991;63:249.
50. Kobayashi M, Nakamura K, Kawaguchi H, et al. Significance of the detection of antineutrophil antibodies in children with chronic neutropenia. *Blood* 2002;99:3468-3471.
51. Palmblad JE, Von Dem Borne AE. Idiopathic, immune, infectious, and idiosyncratic neutropenias. *Semin Hematol.* 2002;39:113-120.
52. Kyle RA. Natural history of chronic idiopathic neutropenia. *N Engl J Med.* 1980;302:908-909
53. Starkebaum G. Chronic neutropenia associated with autoimmune disease. *Semin Hematol.* 2002;39:121-127.
54. Starkebaum G, Price TH, Lee My, Arend WP. Autoimmune neutropenia in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1978;21:504.
55. Starkebaum G, Arend WP. Neutrophil-binding immunoglobulin G in systemic lupus erythematosus. *J Clin Invest.* 1979;64:902-912.
56. Kurien BT, Newland J, Paczkoski C, Moore KL, Scofield RH. Association of neutropenia in systemic lupus erythematosus. (Sle) with anti-Ro and binding of an immunologically cross-reactive neutrophil membrane antigen. *Clin Exp Immunol.*2000;120:209-217
57. Hsieh SC, Yu HS, Lin WW, et al. Anti-Ssb/La Is one of the antineutrophil autoantibodies responsible for neutropenia and functional impairment of polymorphonuclear neutrophils in patients with systemic lupus erythematosus. *Clin Exp Immunol.* 2003; 131:506-516.
58. Vincent PC, Levi JA, Mac Queen A. The mechanism of neutropenia in Felty's syndrome. *Br J Haematol* 1974;27:463-475.

59. Choi MfV, Munt MJ, Turner AR, et al. Successful reversal of neutropenia in Felty's syndrome with recombinant granulocyte colony stimulating factor.. Br J Haematol 1994;86:663-664.
60. Starkebaum G, Singer JW, Arend WP. Humoral and cellular immune mechanisms of neutropenia in patients with Felty's syndrome. Clin Exp Immunol 1980;39:307.
61. Starkebaum G, Loughran TP, Jr, Gaur LK, Davis P, Nepom BS. Immunogenetic similarities between patients with Felty's syndrome and those with clonal expansion of large granular lymphocytes in rheumatoid arthritis. Arthritis Rheum. 1997;40:624-626.
62. Bloch KJ, Buchanan WW, Wohl MJ, Bunim JJ. Sjogren's Syndrome. Medicine 1965;44:187.
63. Boxer LA, Yokoyama M, Wiebe RA. Autoimmune neutropenia associated with chronic active hepatitis. Am J Med 1972;52:279-282.
64. Rustagi P, et al. Antigranulocyte antibodies in CLL and other chronic lymphoproliferative disorders. Blood 1983;62(supp1):106.
65. Heyman MR, Walsh TJ. Autoimmune neutropenia in Hodgkin's disease. Cancer 1987;59:1903.
66. Gordon BG, Kiwanuka J, Kadushin J. Autoimmune neutropenia and Hodgkin's disease: Successful treatment with intravenous gammaglobulin. Am. J Pediatr Hematol Oncol 1991;13:164.
67. Salaria A, Schutz B, Kiefel V, et al. Immune mediated agranulocytosis related to drugs and their metabolites: mode of sensitization and heterogeneity of antibodies. Br. J Haematol 1989; 72:127-132.
68. Eisner EV, Carr RM, Mackinney AA. Quinidine- induced agranulocytosis. JAMA 1977;238:884-886.
69. Murphy MF, Chapman JF, Metcalf P, Water AH. Antibiotic induced neutropenia (Letter). Lancet 1985;2:1306-1307.

70. Joyce RA, Boggs DR, Hasiba U, Srodes CH. Marginal neutrophil pool size in normal subjects and neutropenic patients as measured by epinephrine infusion. *J Lab Clin Med* 1976;88:614-620.
71. Barbui T, Bassan R, Viero P, et al. Pure white cell aplasia treated by high dose intravenous immunoglobulin. *Br. J Haematol* 1984;58:554.
72. Levirt LJ, Ries CA, Greenberg RL. Pure white cell aplasia. Antibody-mediated autoimmune inhibition of granulopoiesis. *N Engl J Med* 1983;308:1141.
73. Ivarson SA, Ljung R. Neutropenia and congenital cytomegalovirus infection(letter). *Pediatr Infect Dis J* 1988;7:436-437.
74. Dale DC, Wolf SM. Studies of the neutropenia of acute malaria. *Blood* 1973;41:197-206.
75. Kyle RA, Linman JW. Chronic idiopathic neutropenia: a newly recognized syndrome? *N Engl J Med* 1968;279:1015-1019.
76. Haddy TB, Rana SR, Castro O. Benign ethnic neutropenia: What is a normal absolute neutrophil count? *J Lab Clin Med* 1999;133:15-22.
77. Boxer LA, Greenberg MS, Boxer GJ, Stossel TP. Autoimmune neutropenia. *N. Engl J Med* 1975;293:744-747.
78. Lalezari P, Jlang A, Yegen L, Santorineou M. Chronic autoimmune neutropenia due to anti-NA2 antibody. *N. Engl J Med* 1975;293:744-747.
79. Shastri KA, Logue GL. Autoimmune neutropenia. *Blood* 1993;81:1984-1995.
80. 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.
81. Hartman KR, Wright DG. Identification of antibodies specific for the neutrophil adhesion glycoproteins CD11b/CD18 in patients with autoimmune neutropenia. *Blood* 1991;78:1096-1104.

82. Bux J, Behrens G, Jaeger G, Welte K. Diagnosis and clinical course of autoimmune neutropenia in infancy: analysis of 240 cases. *Blood* 1998;91:181-186.
83. 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.
84. Caligaris-Cappio F, Gammusi G, Cavosto A. Idiopathic neutropenia with normocellular bone marrow: An immune complex disease. *Br J Haematol* 1979;43:595-605.
85. Lightsey AL, Charman R, McMillan R, Mushovic J, Yelenosky R, Longmire RL. Immune neutropenia. *Ann Intern Med* 1977;86:60-62.
86. Hartman KR, Larussa VF, Rothwell SW, Atolagbe TO, Ward FT, Klipple G. Antibodies to myeloid precursor cells in autoimmune neutropenia. *Blood* 1994;94:625-631.
87. 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.
88. 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.
89. Papadaki HA, Palmblad J, Kapsimali V, Anagnou NP, Eliopoulos GD. Increased serum IgA and decreased IgG₃ strongly correlate with increased serum level of TGF- β ₁ in patients with non-immune chronic idiopathic neutropenia of adults. *Eur J Haematol* 2000;65:237-244.
90. Palmblad J, Karistrom R, Gustafson R. Chronic mild neutropenia in adults- relation to IgG₃ deficiency and infections susceptibility. *Blood* 2000;96:31b (Abstract).
91. Dale DC. Immune and idiopathic neutropenia. *Curr Opin Hematol* 1998;5: 33-36.

92. Papadaki HA, Xylouri I, Coulocheri SA, Kalmanti M, Kafatow 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.
93. Kyle RA. Natural history of chronic idiopathic neutropenia. *N. Engl. J Med* 1980;302: 908-909.
94. Papadaki HA, Palmblad J, Eliopoulos GD. Non-immune chronic idiopathic neutropenia of adult: an overview. *Eur J Haematol* 2001;67: 35-44
95. Papadaki HA, Eliopoulos GD, Coulocheri SA, Spyropoulou M, Ssavropoulos-Giokas C. Increased frequency of DRB1*1302 HLA-haplotype in patients with nonimmune chronic idiopathic neutropenia of adults. *Blood* 2001;97:850-851.
96. Sievers EL, Dale DC. Non-malignant neutropenia. *Blood Rev* 1996;10:95-100.
97. Kyle RA, Linman JW. Gingivitis and chronic idiopathic neutropenia: report of two cases. *Mayo Clin Proc* 1970;45:494-504.
98. Kalkwarf KL, Gutz DP. Periodontal changes associated with chronic idiopathic neutropenia. *Pediatr Dent* 1981;3:189-195.
99. Kamna JJ, Lygidakis NA, Nakou M. Subgingival microflora and treatment in prepubertal periodontitis associated with chronic idiopathic neutropenia. *J Clin Periodontol* 1998;25:759-765.
100. Koene HR, De Haas M, Kleuer M, Huizinga TW, Roos D, Vondem Borne AE. Clinical value of soluble IgG Fc receptor type III in plasma from patients with chronic idiopathic neutropenia. *Blood* 1998;91:3962-3966
101. Furukawa 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.
102. 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.

103. Papadaki HA, Charoulakis N, Eliopoulos GD, Psyllaki M, Eliopoulos GD. Patients with nonimmune chronic idiopathic neutropenia of adults have increased splenic volume on ultrasonography. *Clin Lab Haematol* 2001;23:111-117
104. Papadaki HA, Marcioris 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.
105. Auner HW, Klintschar M, Crevenna R, et al. Two case studies of chronic idiopathic neutropenia preceding acute myeloid leukemia. *Br J Haematol* 1999;105:431-433.
106. Papadaki HA, Kosteas T, Gemetzi C, Alexandrakis M, Psyllaki M, Eliopoulos GD. Two patients with nonimmune chronic idiopathic neutropenia of adult developing acute myeloid leukemia with aberrant phenotype and complex Karyotype but no mutation in granulocyte colony stimulating factor receptor. *Ann Hematol* 2002;81:50-54.
107. Papadaki HA, Kosteas T, Gemetzi C, Damianaki A, Anagnostou NP, Eliopoulos GD. Acute myeloid/NK precursor cell leukemia with trisomy 4 and a novel point mutation in the extracellular domain of the G-CSF receptor in a patient with chronic idiopathic neutropenia. *Ann Hematol*. 2004 ;83:345-8
108. 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.
109. 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.
110. Kyriakou V, 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.

111. Bishop CR, Rothstein G, Ashenbrucker HE, Athens JW. Leukokinetic studies. XIV. Blood neutrophil kinetics in chronic-steady-state neutropenia. *J Clin Invest* 1971;50:1678-1689.
112. Papadaki HA, Coulocheri S, Eliopoulos GD. Patients with chronic idiopathic neutropenia of adults have increased serum concentrations of inflammatory cytokines and chemokines. *Am J Hematol* 2000;65:271-277,
113. 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 by bone marrow stromal cells. *Eur J Haematol* 1999;63:154-162.
114. Picker LJ, Furst A, Robinson SH, Kadin ME. Immuno-architecture of bone marrow in neutropenia: increased HNK-1⁺ cells define a subset of neutropenic patients. *Am J Hematol* 1987;25:29-41.
115. Carlos TM, Harlan JM. Leukocyte-endothelial adhesion molecules. *Blood* 1994;84:2068-2101.
116. Papadaki HA, Eliopoulos DG, Ponticoglou C, Eliopoulos GD. Increased frequency of monoclonal gammopathy of undetermined significance in patients with non-immune chronic neutropenia syndrome. *Int J Hematol* 2001;73:339-345.
117. Isham KB, Baskin B, Nilsson L, Hammarstrom L, Sideras P, Smith CI. Molecular analysis of IgA deficiency. Evidence for impaired switching to IgA. *J Immunol* 1994;152:1442-1452.
118. Finch SC. Neutropenia In: Williams WJ et al.(eds), *Hematology*, 3rd edn, London: McGraw-Hill, 773-793.
119. 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
120. Biasi D, Bambara L-M, Carletto A, et al. Increased in vitro neutrophil adherence in a case of chronic idiopathic neutropenia. *Br J Haematol* 1994;86:421-424.

121. Rickard KA, Browh RD, Yuen E, Kronenberg H. Chronic idiopathic neutropenia. Granulopoietic assessment by bone marrow culture and granulocyte kinetics. *Am J Hematol* 1980;9:193-198.
122. Papadaki HA, Eliopoulos AG, Kosteas T, Gemetzi C, Damianaki A, Koutala H, Bux J, Eliopoulos GD. Impaired granulopoiesis in patients with chronic idiopathic neutropenia is associated with increased apoptosis of bone marrow myeloid progenitor cells. *Blood* 2003;101:2591-2600.
123. 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.
124. Morikawa K, Yamamori S, Oiwa K, et al. Impaired G-CSF production at post-transcriptional level in a patient with chronic idiopathic neutropenia. *Br J Haematol* 1993;85:200-202.
125. 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.
126. Papadaki HA, Hotwitz M, Coulocheri SA, Person RA, Benson KF, Eliopoulos GD. Low levels of serum elastase are not associated with mutations in ELA-2 elastase encoding gene in chronic idiopathic neutropenia *Blood* 2003 ;101 :2898-9.
127. Dancy JT, Brubaker LH. Neutrophil marrow in chronic benign idiopathic neutropenia. *Am J Med* 1980;68:251-254.
128. Papadaki HA, Chatzivassili A, Stefanaki K, Koumaki V, Kanavaros P, Eliopoulos GD. Morphologically defined myeloid cells compartments, lymphocyte subpopulations and histological findings of bone marrow in patients with nonimmune chronic idiopathic neutropenia of adults. *Ann Hematol* 2000;79:563-570.
129. Greenberg P, Mara B, Steed S, Boxer L. Chronic idiopathic neutropenia syndrome: correlation of clinical features with in vitro parameters of granulopoiesis. *Blood* 1990;55:915-921.

130. Papadaki H.A.& Eliopoulos G.D. An overview on the diagnosis, classification and differential diagnosis of chronic neutropenias. *Haema* 2002;5:39-49.
131. Olcay L, Celenligil-Nazliel H, & Yetgin S. Chronic idiopathic neutropenia associated with gingival enlargement. *Turk Journal of Pediatrics* 2001;43:162-165.
132. Papadaki HA, Tsatsanis C, Christoforidou A, et al. Alendronate reduces serum TNF alpha and IL-1beta, increases neutrophil counts and improves bone mineral density and bone metabolism indices in patients with chronic osteopenia/osteoporosis. *Bone Miner Metab.* 2004;22:577-87.
133. Papadaki HA, Psyllaki M, Eliopoulos DG, et al. Increased frequency and specific reactivity of serum antibodies in patients with non-immune chronic idiopathic neutropenias of adults. *Acta Haematol* 2001;105:13-20.
134. Papadaki HA, Pontikoglou C, Stavroulaki E, et al. High prevalence of *Helicobacter pylori* and monoclonal gammopathy of undetermined significance in patients with chronic idiopathic neutropenia. *Ann Hematol.* 2005;84:317-20.
135. Philpott NJ, Turner AJ, Scopes J, et al. The use of 7-amino-actinomycin D in identifying apoptosis : simplicity of use and broad spectrum of application compared with other techniques. *Blood* 1996;87:883-889.
136. Ansari B, Greenstein BD, Hall PA. In situ end-labeling detects DNA strand breaks in apoptosis and other physiological and pathological states. *J Pathol* 1993;170:1-3.
137. Koumaki V, Papadaki HA, Stefanaki K, et al. Increased cell apoptosis in bone marrow trephine biopsies and immunomagnetically isolated myeloid progenitor cells in patients with chronic idiopathic neutropenia. *Ann Hematol* 2003;82:641-5.
138. Nagafuji K, Shibuya T, Harada M, et al. Functional expression of Fas antigen (CD95) on hematopoietic progenitors cells. *Blood* 1995;86:883-889.
139. Gersuk GM, Backham C, Loken MR, et al. A role for tumor necrosis factor-alpha, Fas, and Fas-Ligand in marrow failure associated with myelodysplastic syndrome. *Br. J Haematol* 1998;103:176-188.

140. Keller J.R., Jacobsen SE W, Dubois CM, et al. Transforming growth factor- β : a bidirectional regulator of haematopoietic cell growth. *Int J cell Cloning* 1992;10:2-11.
141. Wright EG, Pragnell IB. Stem cell proliferation inhibitors. *Baillieres Clin Haematol* 1992;5:723-739.
142. Cashman JD, Eaves AC, Raines EW, et al. Mechanicms that regulate the cell cycle status of very primitive hematopoietic cells in long-term human marrow cultures. I. Stimulatory role of a variety of mesenchymal cell activators and inhibitory role of TGF- β 1. *Blood* 1990;75:96-101.
143. Caracciolo D, Clarc SC & rovera G. Human interleukin-6 supports granulocytic differentiation of hematopoietic progenitors cells and acts synergistically with GM-CSF. *Blood* 1989;73:666-670.
144. Guba SC, Sattor CI, Gottschalk LR et al. Bone marrow stroma fibroblasts secrete interleukin-6 and granulocyte-macrophage colony stimulating factor in the absence of inflammatory stimulation: demonstration by serum-free bioassay, enzyme-linked immunosorbent assay, and reverse trancriptase polymerase chain reaction. *Blood* 1992;80:1190-1198.
145. Eaves CL, Cashman JD, Kay RJ, et al. Mechanicms that regulate the cell cycle status of very primitive hematopoietic cells in long-term human marrow cultures. II. Analysis of positive and negative regulators produced by stromal cells within the adherent layer. *Blood* 1992;78:110-117.
146. Young NS, Maciejewski J. The pathophysiology of acquired aplastic anemia. *N Engl J Med* 1997;336:1365-1372.
147. Maciejewski J, Selleri C, Anderson S, Young NS. Fas antigen expression on CD34+ human bone marrow cells is induced by interferon gamma and tumor necrosis factor alpha and potentiates cytokines-mediated hematopoiesis suppression in vitro. *Blood* 1995;85:3183-3190.
148. Selleri C, Maciejewski J, Sato T, Young NS. Interferon-gamma constitutively expressed in the stromal microenvironment of human marrow cultures mediates potent hametopoietic inhibition. *Blood* 1996;87:4149-4157.

149. Rothfuchs AG, Gigliotti D, Palmblad K, et al. INF-alpha beta-dependent, INF-gamma secretion by bone marrow-derived macrophages controls an intracellular bacterial infection. *J Immunol.* 2001;167:6453-6461.
150. Kitagawa M, Yamaguchi S, Takahashi M, et al. Localization of Fas and Fas ligand in bone marrow cells demonstrating myelodysplasia. *Leukemia* 1998;12:486-492.
151. Papadaki HA, Stamatopoulos K, Damianaki A, et al. Actinated T- lymphocytes with myelosuppressive properties in patients with chronic idiopathic neutropenia. *Br. J Haematol* 2005;128:863-876.
- 152 Hoffman R. Regulation of megakaryocytopoiesis. *Blood* 1989;74:1196-1212.
153. Avraham H. Regulation of megakaryocytopoiesis. *Stem Cells* 1993;11:449-510
155. Long MW. Population heterogeneity among cells of the megakaryocyte lineage. *Stem Cells* 1993;11:33-40
156. Harker LA, Finck CA: thrombokinetic in man. *J Clin Invest* 1969;48:963-974.
157. Debil N, Coulombel L, Croisille L, et al. Characterization of a bipotent erythro-megakaryocytic progenitor in human bone marrow. *Blood* 1996;88:1284-1296.
158. Hunt P. A bipontential megakaryocyte/erythrocyte progenitor cell: The link between erythropoiesis and megakaryocytopoiesis become stronger. *Jlab Clin Med* 1995;125:303-304.
159. Long MW, Williams N, Ebbe S. Immature megakaryocytes in the mouse: physical characteristics, cell cycle status, and in vitro responsiveness to thrombopoietin stimulatory factor *Blood* 1982;59:569-573
160. Bruno E, Murray LJ, DiGiusto R, et al. Detection of a primitive megakaryocyte progenitor cell in human fetal bone marrow. *Exp Hematol* 1996;24:552-558.
161. Long MW, Gragowski LL, Heffner CH, et al. Phorbol diesters stimulate the development of an early murine progenitor cell: the burst-forming unit-megakaryocyte *J Clin Invest* 1985;76:431-436.

162. Briddell RA, Brandt JE, Straneva JE, et al. Characterization of the burst forming unit-megakaryocyte. *Blood* 1989;74:145-151.
163. Williams N, Jackson H. Kinetic analysis of megakaryocyte numbers and ploidy levels in developing colonies from mouse bone marrow cells. *Cell Tissue Kinet* 1982;15:483-494.
164. Levis J, Levin PC, Metcalf D. The effect of acute thrombocytopenia in megakaryocyte-CFC in mice: Studies on bone marrow and spleen. *Blood* 1980;56:274-283.
165. Long MW, Williams N, McDonald TP. Immature megakaryocytes in the mouse. In vitro relationship to megakaryocytes progenitors cells and mature megakaryocytes. *J Cell Physiol* 1982;112:339-344.
166. Rabellino EM, Levene RB, Leung LLK, et al. Human megakaryocytes. II. Expression of platelet protein in early marrow megakaryocytes. *J Exp Med* 1981;154:88-100.
167. Young KM, Weiss L. Megakaryocytopoiesis : Incorporation of tritiated thymidine by small acetylcholinesterase –positive cells in murine bone marrow during antibody-induced thrombocytopenia. *Blood* 1987;69:290.
168. Long MW, Henry RL. Thrombocytosis-induced suppression of small acetylcholinesterase positive cells in bone marrow of rats. *Blood* 1979;1339-1346.
169. Williams N, Levine RF. The origin, development and regulation of megakaryocytes. *Br J Haematol* 1982;52:173.
170. Tavassoli M. Megakaryocyte-platelet axis and the process of platelet formation and release. *Blood* 1980;55:537.
171. Strauss LC, Rowley SD, La Russa VF, et al. Antigen analysis of hematopoiesis. V. Characterization of My-10 antigen expression by normal lymphohematopoietic progenitor cells. *Exp Hematology* 1986;14:878-886.
172. Debili N, Issaad C, Masse JM, et al. Expression of CD34 and platelet glycoproteins during human megakaryocytic differentiation. *Blood* 1992;80:3022-3035.

173. Briddell RA, Brandt JE, Leemhuis TB, et al. Role of cytokines in sustaining long-term human megakaryocytopoiesis in vitro. *Blood* 1992;79:332-337.
174. Ayala IA, Tomer A, Kellar KL. Flow cytometric analysis of megakaryocytic-associated antigens on CD34 cells and their progeny in liquid culture. *Stem Cells* 1996;14:320-329.
175. Bruno E, Miller ME, Hoffman R. Interacting cytokines regulate in vitro human megakaryocyte development. *Blood* 1989;73:671-677.
176. Long MW, Hutchinson RJ, Gragowski LL, et al. Synergistic regulation of human megakaryocyte development. *J Clin Invest* 1988;82:1779-1786.
177. Quesenberry PJ, McGrath HE, Williams ME, et al. Multifactor stimulation of megakaryocytopoiesis: effects of interleukin 6. *Exp Hematol* 1991;19:35-41.
178. Williams JL, Pipian GG, Datta NS, et al. Thrombopoietin requires additional megakaryocyte-active cytokines for optimal ex vivo expansion of megakaryocyte precursor cells. *Blood* 1998;91:4118-4126.
179. Yang YC, Ciarletta AB, Temple PA, et al : Human IL-3 (multi-CSF) : identification by expression cloning of a novel hematopoietic growth factor related to murine IL-3. *Cell* 1986;47:3-10.
180. Wong CG, Witek JS, Temple PA, et al: Human GM-CSF: molecular cloning of the complementary DNA and purification of the natural and recombinant proteins. *Science* 1985;228:810-815.
181. Emerson SG, Yang YC, Clark SC, et al: Human recombinant granulocyte-macrophage colony stimulating factor and interleukin 3 have overlapping but distinct activities. *J Clin Invest* 82:1988;82:1282.
182. Donahue RE, Seebra J Metzger M, et al: Human IL-3 and GM-CSF act synergistically in stimulating hematopoiesis in primates. *Science* 1988;241:1820-1823.
183. Briddelli RA, Hoffman R: Cytokine regulation of the human burst-forming unit-megakaryocyte. *Blood* 1990;76:516-522.

184. Chen Q, Solar G, Eaton DL, de Sauvage FJ. IL-3 does not contribute to platelet production in c-Mpl deficient mice. *Stem cells* 1998;2 [16 Suppl]: 31-36.
185. Scott CL, Robb L, Mansfield R, et al. Granulocyte –macrophage colony-stimulating factor is not responsible for residual thrombopoiesis in mpl null mice. *Exp Hematol* 2000;28:1001-1007.
186. Heinrich MC, Dooley DC, Freed AC, et al: Constitutive expression of steel factor gene by human stromal cells. *Blood* 1993;82:771
187. Linenberger ML, Jacobsen FW, Bennett LG, et al: Stem cell factor production by human marrow stromal fibroblasts. *Exp Hematol* 1995;23:1104.
188. Avraham H, Vannier E, Cowley S, et al. Effects of the stem cell factor, c-kit ligand, on human megakaryocytic cells. *Blood* 1992;79:365-371
189. Tanaka R, Koike K, Imai T, et al: Stem cell factor enhances proliferation, but not maturation, of murine megakaryocytic progenitors in serum-free culture. *Blood* 1992 80:1743.
190. Imai T, Nakahata T: Stem cell factor promotes proliferation of human primitive megakaryocytic progenitors, but not megakaryocytic maturation. *Int J Hematol* 1994; 59:91.
191. Debili N, Masse JM, Katz A, et al: Effects of the recombinant hematopoietic growth factors interleukin-3, interleukin-6, stem cell factor, and leukemia inhibitory factor on the megakaryocytic differentiation of CD34+ cells. *Blood* 1993;82:84-95
192. Broudy VC, Lin NL, Kaushansky K: Thrombopoietin (c-mpl ligand) acts synergistically with erythropoietin, stem cell factor, and interleukin-11 to enhance murine megakaryocyte colony growth and increases megakaryocyte ploidy in vitro. *Blood* 1995; 85:1719-1726
193. Briddell RA, Bruno E, Cooper RJ, et al: Effect of c-kit ligand on in vitro human megakaryocytopoiesis. *Blood* 1991;78:2854-2859.
194. Ebbe S, Phalen E, Stohlman F Jr. Abnormalities of megakaryocytes in S1/S1d mice. *Blood* 1973;42:865-871.

195. Lyman SD, James L, Bos TV, et al. Molecular cloning of a ligand for the flt/fik2 tyrosine kinase receptor: a proliferative factor for primitive hematopoietic cells. *Cell* 1993;75:1157-1167.
196. Lyman SD, James L, Johnson L, et al. Cloning of the human homologue of the murine flt3: a growth factor for early hematopoietic progenitor cells. *Blood* 1994;83:2795-2801.
197. Placibello W, Garetto L, Sanavio F, et al. The effects of human flt3 ligand on in vitro human megakaryocytopoiesis. *Exp Hematol.* 1996;24:340-346.
198. Kishimoto T. The biology of interleukin-6. *Blood* 1989;74:1-10.
199. Ishibashi T, Kimura H, Shikama Y ,et al. Interleukin-6 is a potent thrombopoietic factor in vivo in mice. *Blood* 1987;74:1241-1244.
200. Kimura H, Ishibashi T, Uchida T,et al. Interleukin-6 is a differentiation factor for human megakaryocytes in vitro. *Eur J Immunol*1990;20:1927-1931.
201. Williams N, De Giorgio T, Banu N,et al. Recombinant interleukin-6 stimulates immature megakaryocytes *Exp Hematol* 1990;18:69-72.
202. Asano S, Okamoto A, Ozawa K, et al. In vivo effects of recombinant human interleukin-6 in primates: stimulated production of platelets. *Blood* 1990;75:1602-1605.
203. Mei RL, Burstein SA. Megakaryocytic maturation in murine long-term bone marrow culture: role of interleukin-6. *Blood* 1991;78:1438-1447.
204. Carrington PA, Hill RJ, Stenberg PE, et al. Multiple in vivo effects of interleukin-3 and interleukin-6 on mouse megakaryocytopoiesis. *Blood* 1991;77:34-41.
205. Lazansky HM, Winton EF, Williams SF, et al. Phase I multicenter trial of interleukin 6 therapy after autologous bone marrow transplantation in advanced breast cancer. *Bone marrow Transplant.* 1995;15:935-942.

206. Gordon MS, Nemunaltis J, Hoffman R, et al. A phase I trial of recombinant human interleukin -6 in patients with myelodysplastic syndromes and thrombocytopenia. *Blood* 1995;85:3066-3076.
207. Schrezenmeler H Marsh JC, Stromeyer P ,et al. A phase I/II trial of recombinant human interleukin-6 in patients with aplastic anaemia. *Br J Haematol.* 1995;90:283-292.
208. Blay JY, Favrot M, Rossi JF, Wijidenes J. Role of interleukin-6 in paraneoplastic thrombocytosis. *Blood* 1993;82:2261-2262.
209. Kaser A, Brandacher G, Steurer W, et al. Interleukin-6 stimulates thrombopoiesis through thrombopoietin: role in inflammatory thrombocytosis. *Blood* 2001;98:2720-2725.
210. Wolder EM, Jelkmann W. Interleukin-6 increases thrombopoietin production in human hepatoma cells HepG2 and Hep38. *J Interferon Cytokine Res* 2000;20:499-506.
211. Yang L, Yang Y-C: Regulation of interleukin (IL)-11 gene expression in IL-11 induced primate bone marrow stromal cells. *J Biol Chem* 1994 269:32732-32739.
212. Teramura M, Kobayashi S, Hoshino S, et al. Interleukin-11 enhances human megakaryocytopoiesis in vitro. *Blood* 1992;15:327-331.
213. Kaushansky K, Broudy VC, Lin N, et al . Thrombopoietin, the Mpl ligand, is essential for full megakaryocyte development. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92:3234-3238.
214. Burstein SA, Mei RL, Henthorn J, et al. Leukemia inhibitory factor and interleukin-11 promote maturation of murine and human megakaryocytes in vitro. *J Cell Physiol* 1992;153:305-12.
215. Du X, Williams DA. Interleukin-11: a review of molecular, cell biology and clinical use. *Blood* 1997;89:3897-3908.
216. Metcalf D, Nicola NA, Gearing DP. Effects of injected leukemia inhibitory factor on hematopoietic and other tissues in mice. *Blood* 1990;76:50-56

217. Koury ST, Bondurant MC, Koury MK. Localization of erythropoietin synthesizing cell in murine Kidneys by in situ hybridization. *Blood* 1988;71:524-527
218. Fried W, Baronc-Varelas J, Morley C. Factors that regulate extrarenal erythropoietin production. *Blood Cells* 1984;10:287.
219. Rich IN, Hart W, Kubanek B. Extrarenal erythropoietin production by macrophages. *Blood* 1982;60:1007-1018.
220. Burstein SA, Ishibashi T. Erythropoietin and megakaryocytopoiesis. *Blood Cells*. 1989;15:193-201
221. Ishida Y, Yano S, Yoshida T, et al. Biological effects of recombinant erythropoietin, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, interleukin 3, and interleukin 6 on purified rat megakaryocytes. *Exp Hematol*. 1991;19:608-12
222. Tsukada J, Misago M, Kikuchi M, et al. The effect of high doses of recombinant human erythropoietin on megakaryocytopoiesis and platelet production in splenectomized mice. *Br J Haematol*. 1990 ;76:260-8
223. Shikama Y, Ishibashi T, Kimura H, et al. Transient effect of erythropoietin on thrombocytopoiesis in vivo in mice. *Exp Hematol* 1992;20:216-222.
224. Cardier JE, Erickson-Miller CL, et al. Differential effect of erythropoietin and GM-CSF on megakaryocytopoiesis from primitive bone marrow cells in serum-free conditions. *Stem Cells*. 1997;15:286-90.
225. Foster DC, Sprecher CA, Grant FJ, et al. :Human thrombopoietin gene structure, cDNA sequence, expression and chromosomal localization. *Proc Natl Acad Sci Usa*1994; 91:13023.
226. Vigon I, Mormon J, Coxault L, et al. : Molecular cloning and characterization of MPL, the human homolog of the v-mpl oncogene :Identification of a member of the hematopoietic growth factor receptor superfamily.*Proc Natl Acad Sci USA* 1992;89:5640-5644.
227. Methia N, Louache F, Vainchenker W ,et al: Oligodeoxynucleotides antisense to the pro-oncogene c-mpl specifically inhibit in vitro megakaryocytopoiesis.*Blood* 1993;82:1395-1401.

228. Debil N, Wendling F, Cosman D, et al. The Mpl receptor is expressed in the megakaryocytic lineage from late progenitors to platelets. *Blood* 1995;85:391-401.
229. Sungaran R, Markovic B, Chong B: Localization and regulation of Thrombopoietin mRNA expression in Human Kindey, Liver, Bone marrow and Spleen using In Situ Hybridization. *Blood* 1997;89:101-107.
230. McCarty JM, Sprugel KH, Fox NE, Sabath DE, Kaushansky K: Murine thrombopoietin mRNA levels are modulated by platelet count. *Blood* 1995;86:3668-3675
231. Guerriero A, Worford L, Holland HK et al : Thrombopoietin is synthesised by bone marrow stromal cells. *Blood* 1997;90: 3444-3455.
232. Kuter DJ, RD Rosenberg; The reciprocal relationship of thrombopoietin (c-Mpl ligand) to changes in the platelet mass during busulfan-induced thrombocytopenia in the rabbit. *Blood* 1995;85:2720-2730)
233. Emmons RV, Reid DM, Colen RL, et al Human thrombopoietin levels are high when thrombocytopenia is due to megakaryocyte deficiency and low when due to increased platelet destruction. *Blood* 1996;87:4068-4071
234. Shivdasani R, Fielder Paul Keller GA et al Regulation of the serum concentration of Thrombopoietin in thrombopoietin in Thrombocytopenic NF-E2 knockout mice. *Blood*:1997;88:1821-1827
235. Nagata Y, Shozaki Y, Nagahisa H, et al. Serum thrombopoietin level is not regulated by transcription but by the the total counts of both megakaryocytes and platelets during thrombocytopenia and thrombocytosis. *Thromb Haemost.* 1997;77:808-14.
236. Hirayama Y, Sakamaki S, Matsunaga T, et al: Concentrations of thrombopoietin in bone marrow in normal subjects and in patients with idiopathic thrombocytopenic purpura, aplastic anemia and essential thrombocythemia correlate with its mRNA expression of bone marrow stromal cells. *Blood* 1988;72:46-52.

237. Sungara R, Chisholm OT, Markovic B, et al: The role of platelet α -granular proteins in the regulation of thrombopoietin messenger RNA expression in bone marrow stromal cells. *Blood* 2000;95:3094-3101
238. Sakamaki S, Hirayama Y, Matsunaga T, et al: Transforming growth factor $-\beta$ 1 (TGF- β 1) induces thrombopoietin from bone marrow stromal cells, which stimulates the expression of TGF- β receptor on megakaryocytes and in turn, renders them susceptible to suppression by TGF- β itself with high specificity. *Blood* 1999;94:1961-1970
239. Solanilla A, Dechanet J, El Andaloussi A, et al. CD40-ligand stimulates myelopoiesis by regulating flt3-ligand and thrombopoietin production in bone marrow stromal cells. *Blood* 2000;95:3758-3764.
231. Cerutti A, Custodi P, Duranti M, et al. Thrombopoietin levels in patients with primary and reactive thrombocytosis. *Br J Haematol* 1997;99:281-2824.
232. Rojnuckarin P, Drachman JG, Kaushansky K. Thrombopoietin-induced activation of the mitogen-activated protein kinase:role in endomitosis. *Blood* 1999;94:1273-1282.
233. Nagahisa H, Nagata Y, Ohnuki T, et al. Bone marrow stromal cells produce thrombopoietin and stimulate megakaryocyte growth and maturation but suppress proplatelet formation. *Blood* 1996;87:1309-1316.
234. Choi ES, Hokom M, Bartley T, et al .Recombinant human megakaryocyte growth and development factor (rHuMGDF), a ligand for c-Mpl, produces functional human platelets in vitro.*Stem Cells* 1995;13:317-22.
235. Gramer EM, Norol F, Guichard J, et al : Ultrastructure of platelet formation by human megakaryocytes cultured with the Mpl ligand. *Blood* 1997;89:2336-2346.
236. Zauli G, Bassini A, Vitale M, et al: Thrombopoietin enhances the α IIb β 3-dependent adhesion of megakaryocytic cell to fibrinogen or fibronectin through PI 3 Kinase. *Blood* 1997; 89:883-895.

237. Kaushansky K, Lok S, Holly RD, et al : Promotion of megakaryocyte progenitor expansion and differentiation by the c-Mpl ligand thrombopoietin. *Nature* 1994;369:568-571.
238. Deibel N, Wendling F, Katz A, et al. The mpl-ligand or thrombopoietin or megakaryocyte growth and differentiative factor has both direct proliferative and differentiative activities on human megakaryocyte progenitors. *Blood* 1995;87:2516-2525.
- 239 Lazzari L, Henschler Reinhard R, Lecchi L, et al . Interleukin-6 and interleukin-11 act synergically with thrombopoietin and stem cell factor to modulate ex vivo expansion of human CD41+ and CD61+ megakaryocytic cells. *Hematologica* 2000;85:25-30.
240. Gurney AL, Carver-Moore K, de Sauvage FJ, et al Thrombocytopenia in c-Mpl-deficient mice. *Science* 1994;265:1445-1447.
241. de Sauvage FJ, Carver-Moore K, Luoh SM et al Physiological regulation of early and late stages of megakaryocytopoiesis by thrombopoietin. *Exp. Med* 1996;183:651-656.
242. Harker LA, Matzec UM, Hunt P, et al. Dose response effects of pegylated human megakaryocyte growth and development factor on platelet production and function in nonhuman primates. *Blood* 1996;88:511-521
243. Angchaisuksiri P, Carlson PL, Dessypris EN: Effects of recombinant human thrombopoietin on megakaryocytes colony formation and megakaryocytes ploidy by human CD34+ cells in a serum-free system. *Br J Haematol* 1996;93:13 .
244. Solar GP, Kerr WG, Zeigler FC, et al. Role of c-mpl in early hematopoiesis. *Blood* 1998;92:4-10.
245. Kaushansky K. Thrombopoietin. Accumulating evidence for an important biological effect on the hematopoietic stem cell. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 2003;996:39-43.

246. Kaushansky K, Brondy VC, Grossmann A, et al. Thrombopoietin expands erythroid progenitors, increases red cell production, and enhances erythroid recovery after myelosuppressive therapy. *J Clin Invest* 1995;96:1683-1687.
247. Alexander WS, Roberts AW, Nicola NA, et al. Deficiencies in progenitors cells of multiple hematopoietic lineages and defective megakaryocytopoiesis in mice lacking the thrombopoietin receptor c-Mpl. *Blood* 1996;87:2162-2170.
248. Carvey-Moore R, Broxmeyer HE, Luoh SM, et al. Low levels of erythroid and myeloid progenitors in thrombopoietin and mpl-deficient mice. *Blood* 1996 88;803-808.
249. Ballmaier M, Germeshausen M, Kruremeier S, et al .Thrombopoietin is essential for the maintenance of normal hematopoiesis in humans. Development of aplastic anemia in patients with congenital amegakaryocytic thrombocytopenia. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 2003;996:17-25.
250. Fava RA, Casey TT, Wilcox J, et al: Synthesis of transforming growth factor-beta 1 by megakaryocytes and its localization to megakaryocyte and platelet alpha-granules.*Blood* 1990;76:1946-1955.
251. Wickenhauser C, Hillienhof A, Jungheim K, et al: Detection and quantification of transforming growth factor (TGF-beta) and platelet-derived growth factor (PDGF) release by normal human megakaryocytes. *Leukemia* 1995;9:310-5.
252. Eaves CJ, Cashman JD Kay RJ ,et al : Mechanisms that regulate the cell cycle status of very primitive hematopoietic cells in long-term human marrow cultures.II. Analysis of positive and negative regulators produced by stromal cells within the adherent layer.*Blood* 1991;78:110-117.
253. Li WH, Huang WQ, Huang YH, et al: Positive and negative hematopoietic cytokines produced by bone marrow endothelial cells.*Cytokines* 2000;12:1017-1023.
254. Assoian RK, Fleurdelys BE, Stevenson HC, et al : Expression and secretion of type beta transforming growth factor by activated human macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1987;84:6020-6024.

255. Kehrl JH, Wakelfield LM, Roberts AB, et al: Production of transforming growth factor β by human T lymphocytes and its potential role in the regulation of T cell growth. *Journal of Experimental Medicine* 1986;163:1037-1050.
256. Ploemacher RE, Van Soest, PL & Boudewijn A : Autocrine transforming growth factor beta 1 blocks colony formation and progenitor cell generation by hematopoietic growth factor. *Stem Cells*; 11: 336-347.
257. Majka M, Janowska-Wieczorek A, Ratajczak J, et al : Numerous growth factors, cytokines and chemokines are secreted by human CD34⁺ cells, myeloblasts, erythroblasts, and megakaryoblasts and regulate normal hematopoiesis in an autocrine/paracrine manner. *Blood* 2001;97:3075-3085.
258. Fortunel NO, Hatzfeld A, Hatzfeld JA. Transforming growth factor- β : pleiotropic role in the regulation of hematopoiesis. *Blood* 2000;96:2022-2036.
- 259 Jackson H, Williams N, Westcott KR, Green R. Differential effects of transforming growth factor- β 1 on distinct developmental stages of murine megakaryocytopoiesis. *J Cell Physiol*. 1994;161:312-318.
260. Berthier R, Valiron O, Schweitzer A. Serum -free medium allows the optimal growth of human megakaryocyte progenitors compared with human plasma supplemented cultures: role of TGF beta. *Stem Cells* 1993;11:120-129.
261. Lu L, Wang LS, Cooper RJ, et al. Suppressive effects of TNF- α , TGF- β 1, and chemokines on megakaryocytic colony formation in CD34⁺ cells derived from umbilical cord blood compared with mobilized peripheral blood and bone marrow. *J Hematother Stem Cell Res* 2000;9:195-204.
262. Kuter DJ, Gminski DM, Rosenberg RD. Transforming growth factor β inhibits megakaryocyte growth and endomitosis. *Blood* 1992;72:619-626.
263. Greenberg P, Chandrasekhar C, Golan DE, et al. Transforming growth factor β inhibits endomitosis in the Dami human megakaryocytic cell line. *Blood* 1990;76:533-537.

264. Cowley SA, Groopman JE, Avraham H. Effects of transforming growth factor β on megakaryocytic cell fusion and endomitosis. *Int J Cell Cloning* 1992;10:223-231.
265. Zauli G, Catani L, Gugiottan L, et al. Essential thrombocythemia : impaired regulation of megakaryocyte progenitors. *Int J Cell Cloning* 1991;43-56.
266. Zauli G, Visani G, Catani L, et al. Reduced responsiveness of bone marrow megakaryocyte progenitors to platelet-derived transforming growth factor β 1 , produced in normal amounts in patients with essential thrombocythaemia. *Br J Haematol* 1993;83:14-20.
267. Fortunel N, Batard P, Hatzfeld A, et al. High proliferative potential-quiescent cells : A working model to study primitive quiescent cells. *J Cell Sci* 1988;111:1867-1875.
268. Sansilvestri P, Cardoso AA, Batard P, et al. Early CD34^{high} cells can be separated into KIT^{high} cells in which transforming growth factor-beta (TGF- β) downmodulates c-Kit and KIT^{low} cells in which anti-TGF- β upmodulates c-kit. *Blood* 1995;86:1729-1735.
269. Fortunel NO, Hatzfeld JA, Monier MN , et al . Control of hematopoietic Stem/Progenitor cell fate by transforming growth factor- β . *Oncology Research* 2003;13:445-453.
270. Gewirtz AM, Calabretta B, Rucinski B, Niewiarowski S, Xu WY: Inhibition of human megakaryocytopoiesis in vitro by platelet factor 4 (PF4) and a synthetic COOH-terminal PF4 peptide. *J Clin Invest* 1989 83:1477-1482.
271. Han ZC, Sensebe L, Abgrall JF, Briere J: Platelet factor 4 inhibits human megakaryocytopoiesis in vitro. *Blood* 1990 75:1234-1239.
- Argrall JF, Han ZC, Sensebe L, et al. Inhibitory effect of highly purified human platelet beta-thromboglobulin on in vitro human megakaryocyte colony formation. *Exp Hematol* 1991;19:202-205.
272. Han ZC, Bellucci S, Tenza D, Caen JP: Negative regulation of human megakaryocytopoiesis by human platelet factor 4 and -thromboglobulin: Comparative

analysis in bone marrow cultures from normal individuals and patients with essential thrombocythaemia and immune thrombocytopenic purpura. *Br J Haematol* 1990; 74:395-401.

273. Gewirtz AM, Zhang J, Ratajczak J, et al. Chemokine regulation of human megakaryocytopoiesis. *Blood* 1995;86:2559-2567.

274. Griffin CG, Grant BW. Effects of recombinant interferons on human megakaryocyte growth. *Exp Hematol*. 1990 Oct;18:1013-8

275. Dusheiko G, Giustina G. Side effects of alpha interferon in chronic hepatitis C. *Hepatology* 1997;26(Suppl 1):112S-121S.

276. Derynck R, Jarrett JA, Chen EY, et al. Human transforming growth factor β complementary DNA sequence and expression in normal and transforming cell. *Nature* 1985;316:701-705.

277. ten Dijke P, Hansen P, Iwata KK, et al. Identification of another member of the transforming growth factor type b gene family. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988;85:4715-4719.

278. Kothapalli R, Buyuksal I, Wu SQ, et al . Detection of ebaf, a novel human gene of the transforming growth factor β superfamily: association of gene expression with endometrial bleeding. *J Clin Invest* 1997;99:2342-2350.

279. Gentry LE, Lioubin MN, Purchio AF, et al. Molecular events in the processing of recombinant type 1 pre-pro-transforming growth factor- β to the mature polypeptide. *Mol Cell Biol*. 1988;8:4162-4168.

280. Lawrence DA. Identification and activation of latent transforming $-\beta$. *Methods Enzymol*. 1991;198:327-336.

281. Taipale J, Lohi J, Saarinen J, et al. Human mast cell chymase and leukocyte elastase release latent transforming growth factor type β 1 from the extracellular matrix of cultured human epithelial and endothelial cells. *J Biol Chem*. 1995;270:4689-4696.

282. Brown PD, Wakefield LM, Levinson AD, et al. Physicochemical activation of recombinant latent transforming growth factor- β 's 1,2 and 3. *Growth Factors* 1990;3:35-43.
283. Lyons RM, Gently LE, Purchio AF, et al. Mechanism of activation of latent transforming growth factor β 1 by plasmin. *J Cell Biol* 1990;110:1361-1367.
284. Nunes I, Shapiro RL, Rifkin DB, et al. Characterization of latent TGF- β activation by murine peritoneal macrophages. *J Immunol.* 1995;155:1450-1459.
285. Verderio E, Gaudry C, Gross S, et al. Regulation of cell surface tissue transglutaminase. Effects on matrix storage of latent transforming growth factor- β binding protein-1. *Histochem Cytochem* 1999;47:1417-1432.
286. Schultz-Cherry S, Ribeiro S, Gentry L, et al. Thrombospondin binds and activates the small and large form of latent transforming growth factor- β 1 in a chemically defined system. *J Biol Chem* 1994;269:26775-26782.
287. Franzen P, ten Dijke P, Ichijo H, et al. Cloning of a TGF β type I receptor that forms a heteromeric complex with the TGF β type II receptor. *Cell* 1993;75:681-692.
288. Lin HY, Wang XF, Nig-Eaton E, et al. Expression cloning of the TGF- β type II receptor, a transmembrane serine/threonine kinase. *Cell* 1992;68:775-785.
299. Wrana JL, Attisano L, Wieser R, et al. Mechanism of activation of the TGF- β receptor. *Nature* 1994;370:341-347.
290. Piek E, Heldin CH, ten Dijke P. Specificity, diversity, and regulation in TGF- β superfamily signaling. *FASEB J.* 1999;13:2105-2124.
291. Feinendegen LE, Odartchenko N, Cottier H, et al. Kinetics of megakaryocyte proliferation. *Proc Soc Exp Biol Med* 1962;111:177-182.
292. Ebbe S, Stohlman F Jr. Megakaryocytopoiesis in the rat. *Blood* 1965;26:2.
293. Vitrat N, Cohen-Solar K, Pique C, et al. Endomitosis of human megakaryocyte are due to abortive mitosis. *Blood* 1998;91:3711-3723.

294. Drachman, J. G., Griffin, J. D. and Kaushansky, K. The c-Mpl ligand (thrombopoietin) stimulates tyrosine phosphorylation of Jak2, Shc and c-Mpl. *J. Biol. Chem* 1995; 270:4979 -4982.
295. Matsumura, I., Nakajima, K., Wakao, H., et al. Involvement of prolonged ras activation in thrombopoietin-induced megakaryocytic differentiation of a human factor-dependent hematopoietic cell line. *Mol. Cell. Biol.* 1998; 18:4282 -4290.
296. Sattler, M., Salgia, R., Durstin, M. A., et al. Thrombopoietin induces activation of the phosphatidylinositol-3' kinase pathway and formation of a complex containing p85PI3K and the protooncogene p120CBL. *J. Cell Physiol.* 1997; 171:28 -33.
297. Cox C., Killick S.B., Patel S, et al. In vitro proliferation and differentiation of megakaryocytic progenitors in patients with aplastic anemia, paroxysmal nocturnal hemoglobinuria, and the myelodysplastic syndromes. *Stem Cells* 2000;18:428-434.
298. Dexter TM, Allen TD, Lajtha LG. Conditions controlling the proliferation of hemopoietic stem cells in vitro. *J Cell Physiol* 1977;91:335-344.

