

**Μελέτη της απόπτωσης στους πάσχοντες από χρόνια ιδιοπαθή ουδετεροπενία του ενηλίκου (SINA) και σχέση αυτής με παραμέτρους επαγωγής και αναστολής της μυελοποίησης.**

**Βασιλική ΚΟΥΜΑΚΗ**

**ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**



**ΗΡΑΚΛΕΙΟ, 2003**

**Μελέτη της απόπτωσης στους πάσχοντες από χρόνια ιδιοπαθή ουδετεροπενία του ενηλίκου (SINA) και σχέση αυτής με παραμέτρους επαγωγής και αναστολής της μυελοποίησης.**

**(Μελέτη της απόπτωσης των κοκκιοκυτταρικών προβαθμίδων σε ιστολογικές τομές και ανοσομαγνητικά διαχωρισθέντα αιμοποιητικά κύτταρα στο μυελό ασθενών με χρόνια ιδιοπαθή ουδετεροπενία)**

Στους γονείς μου  
Ευσταθία και Γεώργιο  
**Για την αστείρευτη αγάπη τους και την  
πολύπλευρη βοήθειά τους προς εμένα**

## Περιεχόμενα

<b>Βιογραφικό Σημείωμα</b>	Σελίδα	5
<b>Πρόλογος</b> .....	Σελίδα	8
<b>Κεφ.1.</b> Χρόνια ιδιοπαθής ουδετεροπενία	“	9
1.1 Εισαγωγή	“	9
1.2. Διαγνωστικά κριτήρια	“	10
1.3. Επιδημιολογικά στοιχεία	“	10
1.4. Κλινική έκφραση	“	11
1.5. Εργαστηριακά ευρήματα	“	12
1.6. Κοκκιοκυτταρικές προβαθμίδες του μυελού των οστών	“	14
1.7. Κυτταροκίνες και χημειοκίνες	“	16
1.8. Εξαγγείωση/Εξοδος λευκοκυττάρων	“	18
1.9. Ενδείξεις χρόνιας φλεγμονώδους αντίδρασης	“	19
1.10. Σκιαγράφηση του πιθανού παθογενετικού μηχανισμού	“	20
1.11. Θεραπεία	“	23
1.12. Πρόγνωση	“	24
<i>Βιβλιογραφία</i> .....		24
<b>Κεφ.2.</b> Η απόπτωση ως βιολογικό φαινόμενο	“	31
2.1. Εισαγωγή	“	31
2.2. Ρύθμιση της απόπτωσης	“	33
2.3. Απόπτωση στο αιμοποιητικό σύστημα	“	37
2.4. Απόπτωση και νεοπλασίες	“	38
<i>Βιβλιογραφία</i> .....	“	38
<b>Κεφ.3.</b> Το ερώτημα στην παρούσα μελέτη	“	40
<b>Κεφ.4.</b> Ασθενείς, Υλικά και Μέθοδοι	“	43
4.1. Ασθενείς	“	43
4.2. Δείγματα μυελού των οστών	“	44
4.3. Απομόνωση CD34 <sup>+</sup> και CD33 <sup>+</sup> κυττάρων	“	45
4.4. Ανίχνευση της απόπτωσης	“	45
4.5. Διπλή χρώση για τη μελέτη της απόπτωσης	“	46
4.6. Χρώση της απόπτωσης σε επιχρίσματα	“	47
4.7. Μελέτη των p53, bcl-2 κι άλλων πρωτεινών	“	47
4.8. Στατιστική ανάλυση	“	48

<i>Βιβλιογραφία</i> .....	“	48
<b>Κεφ.5.</b> Αποτελέσματα της μελέτης	“	50
<i>Βιβλιογραφία</i> .....	“	54
<b>Κεφ.6.</b> Συζήτηση και Συμπεράσματα	“	55
<i>Βιβλιογραφία</i> .....	“	58
Περίληψη	“	60
Summary	“	62

---

## ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

<b>Όνοματεπώνυμο:</b>	<b>Βασιλική Κουμάκη</b>
<b>Διεύθυνση:</b>	Κεραμεικού 6, 151 25 Μαρούσι
<b>Τηλέφωνο:</b>	210- 6891435, 6974147380
<b>E-mail:</b>	vkoumaki@yahoo.com
<b>Ημερ. Γεννήσεως:</b>	08-01-76

## ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ

---

<b>1993</b>	Αποφοίτηση από το 1ο Λύκειο Κηφισιάς. Βαθμός απολυτηρίου « <b>Λίαν καλώς</b> » (17 <sup>9/11</sup> )
<b>1993-1996</b>	Εγγραφή και φοίτηση στο τμήμα Βιολογίας, <b>Queens College</b> του <b>City University of New York, Η.Π.Α.</b> Αποφοίτηση με « <b>Αριστα</b> » (9.38)
<b>1998-2003</b>	Μεταπτυχιακή Φοιτήτρια στο <b>Τμήμα Ιατρικής Πανεπιστημίου Κρήτης</b>

## ΥΠΟΤΡΟΦΙΕΣ

---

<b>2000-2001</b>	Χορήγηση υποτροφίας από το <b>Ίδρυμα Λεβέντη</b>
------------------	--

## ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΔΡΑΣΤΗΡΙΟΤΗΤΑ

---

- 1995-1996** Έρευνα στο Εργαστήριο Αναπτυξιακής Βιολογίας με θέμα “The role of ceramide in Apoptosis Signaling” **Queens College, CUNY, USA.**
- 1997-2003** Έρευνα στο Εργαστήριο Αιματολογικής Κλινικής με θέμα «Μελέτη της απόπτωσης σε πάσχοντες από χρόνια ιδιοπαθή ουδετεροπενία (CIN) σε οστεομυελικές βιοψίες και ανοσομαγνητικά διαχωρισμένα κύτταρα» **Ιατρικό Τμήμα, Πανεπιστήμιο Κρήτης.**

### **ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ**

---

- 1.** Papadaki HA, Chatzivassili A, Stefanaki K, **Koumaki V**, Kanavaros P, Eliopoulos GD. Morphologically defined myeloid cell compartments, lymphocyte subpopulations and histological findings of bone marrow in patients with non-immune chronic idiopathic neutropenia of adults. **Ann Haematol 2000; 79:563-570.**
- 2.** **Koumaki V**, Papadaki HA, Stefanaki K, Damianaki A, Gemetzi C, Katonis P, Vrentzos G, Eliopoulos GD. Increased cell apoptosis in bone marrow trephine biopsies and immunomagnetically isolated myeloid progenitor cells in patients with chronic idiopathic neutropenia. **Ann Hematol (in press).**
- 3.** Andrioti C, Katrinakis G, Niniraki M, Coulocheri SA, Ponticoglou C, **Koumaki V**, Eliopoulos GD, Papadaki HA. Increased sensitivity of peripheral blood B-lymphocytes to nonspecific polyclonal activators in patients with chronic idiopathic neutropenia. **Haema 2003; 6:54-60.**

### **ΑΝΑΚΟΝΩΣΕΙΣ ΣΕ ΣΥΝΕΔΡΙΑ**

---

- 1.** **Koumaki V**, Stefanaki K, Tzardi M, Papadaki H, Rontogianni D, Darivianaki A, Karidi H, Foudoulakis A, Katrinakis G, Delides G, Eliopoulos G, Kanavaros P. Immunohistochemical expression of Rb, p53, Waf-1/p21, Ki67 (MIB-1) in multiple myeloma (MM). **17<sup>th</sup> European Congress of Pathology, Barcelona, Spain, 1999**

2. Χατζηβασίλη Α, Παπαδάκη Ε, Στεφανάκη Κ, **Κουμάκη Β**, Κουλοχέρη Σ, Ηλιόπουλος Γ. Μορφολογικά οριζόμενα διαμερίσματα της κοκκιώδους σειράς, λεμφοκυτταρικοί υποπληθυσμοί και ιστολογικά ευρήματα στο μυελό των οστών ασθενών με χρόνια ιδιοπαθή ουδετεροπενία του ενηλίκου μη ανοσολογικής αρχής. **10<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Συνέδριο Ελληνικής Αιματολογικής Εταιρίας, Ρόδος, 1999**
3. Papadaki HA, Couloheri S, Giouremou K, **Koumaki V**, Eliopoulos GD. Increased levels of TGF- $\beta_1$  and IL-6 in the sera and supernatant fluids from long term bone marrow cell cultures in patients with chronic idiopathic neutropenia of adults. **4<sup>th</sup> European Congress of the Hellenic Society of Haematology, Heraklion, 1999**
4. **Koumaki V**, Papadaki HA, Stefanaki K, Katonis P, Eliopoulos GD. Αυξημένη απόπτωση των μυελικών κυττάρων στη χρόνια ιδιοπαθή ουδετεροπενία του ενηλίκου. Μελέτη σε ιστολογικές τομές και ανοσομαγνητικά απομονωθέντα προγονικά αιμοποιητικά κύτταρα με την *in situ* τεχνική ISEL σε πάσχοντες από CIN, **13<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Αιματολογικό Συνέδριο Ελληνικής Εταιρίας, Πάτρα, 2002.**

#### ΣΕΜΙΝΑΡΙΑ

---

<b>12/11-15/11/1998</b>	9 <sup>ο</sup> Πανελλήνιο Αιματολογικό Συνέδριο Ελληνικής Αιματολογίας Εταιρίας, Ηράκλειο.
<b>28/10-31/10/1999</b>	10 <sup>ο</sup> Πανελλήνιο Αιματολογικό Συνέδριο Ελληνικής Αιματολογίας Εταιρίας, Ρόδος.
<b>27/4-28/4/2001</b>	1 <sup>st</sup> Neutropenia Network Conference, Ηράκλειο
<b>24/10-27/10 2002</b>	13 <sup>ο</sup> Πανελλήνιο Αιματολογικό Συνέδριο Ελληνικής Αιματολογικής Εταιρίας, Πάτρα.

#### ΞΕΝΕΣ ΓΛΩΣΣΕΣ

---

<b>Αγγλικά</b>	1) Cambridge Certificate of Proficiency in English 2) Oxford Certificate of Proficiency in English (επάρκεια διδασκαλίας της γλώσσας) (1992)
<b>Γαλλικά</b>	D.A.L.F. (Diplôme Approfondie da la langue Francaise) (επάρκεια διδασκαλίας της γλώσσας) (1998)

## Πρόλογος

Η χρόνια ιδιοπαθής ουδετεροπενία είναι μιά σχετικά συχνή κοκκιοκυτταρική διαταραχή που χαρακτηρίζεται από μειωμένο αριθμό ουδετερόφιλων κοκκιοκυττάρων στην κυκλοφορία του αίματος. Η αιτιολογία της είναι άγνωστη, όπως άγνωστος είναι και ο υποκείμενος παθογενετικός μηχανισμός. Πρόσφατες ωστόσο έρευνες στο εργαστήριο μας έδειξαν ότι η ουδετεροπενία στους αρρώστους αυτούς οφείλεται, τουλάχιστον κατά ένα σημαντικό ποσοστό, στη μειωμένη παραγωγή κοκκιοκυττάρων στο μυελό των οστών, και υπάρχουν πολλές ενδείξεις ότι η μείωση αυτή προκαλείται, κατά κύριο λόγο, από την αυξημένη απόπτωση των κοκκιοκυτταρικών προβαθμίδων και ενδεχομένως από την ελάττωση ή αναστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού.

Η παρούσα μελέτη αποτελεί μέρος μιάς ευρύτερης έρευνας στην παθολογία της χρόνιας ιδιοπαθούς ουδετεροπενίας που μου ανετέθη από τον Καθηγητή Κύριο Γεώργιο Ηλιόπουλο. Σκοπός της μελέτης αυτής ήταν να διερευνηθεί το βαθμό της απόπτωσης στις προβαθμίδες των κοκκιοκυττάρων στο μυελό των οστών χρησιμοποιώντας την τεχνική της *in situ* τελικής χρώσης του αποπτωτικού DNA (τεχνική ISEL). Έτσι, μελετήθηκε το φαινόμενο σε ιστολογικές τομές και σε επιστρώσεις ανοσομαγνητικά απομονωθέντων προγονικών κυττάρων και συγκρίθηκαν τα αποτελέσματα με άλλες παραμέτρους της κοκκιοποίησης.

Στη μελέτη αυτή, μεγάλη υπήρξε η βοήθεια του Καθηγητού Κυρίου Γεωργίου Ηλιόπουλου, τον οποίο ευχαριστώ πάρα πολύ. Ευχαριστίες οφείλω και στην Επίκουρη Καθηγήτρια Κυρία Ελένη Παπαδάκη για την πολύπλευρη βοήθειά της, όπως και στην Επιμελήτρια του ΕΣΥ Κυρία Καλλιόπη Στεφανάκη για τη μεγάλη της προσφορά σε τεχνικά θέματα και τον σχολιασμό των αποτελεσμάτων. Ευχαριστώ επίσης όλο το προσωπικό του Παθολογοανατομικού Εργαστηρίου του Πανεπιστημίου Κρήτης για τη



συμπαράσταση και διευκόλυνση που μου παρείχε στο τεχνικό μέρος της μελέτης. Τέλος, ευχαριστώ το Ίδρυμα Λεβέντη, το οποίο μου χορήγησε ετήσια υποτροφία κατά το ακαδημαϊκό έτος 2000-2001 για την εκπόνηση της παρούσας διατριβής.

Βασιλική Κουμάκη  
Βιολόγος

# Χρόνια ιδιοπαθής ουδετεροπενία

## 1.1. Εισαγωγή

Με τον όρο “χρόνια ιδιοπαθής ουδετεροπενία” (chronic idiopathic neutropenia, CIN) υποδηλώνεται η δυσερμήνευτη χρονίζουσα ελάττωση του αριθμού των κυκλοφορούντων στο αίμα ουδετερόφιλων κοκκιοκυττάρων (ΠΜΠ) σε επίπεδα κάτω από τα κατώτερα όρια της φυσιολογικής διακύμανσης που αντιστοιχεί στην ηλικία και τη φυλή του ατόμου [1-3]. Η διαταραχή περιγράφηκε για πρώτη φορά το 1968 από τους Kyle και Linman [4] και η φυσική της ιστορία ανασκοπήθηκε λίγα χρόνια αργότερα από τον Dale και τους συνεργάτες του [1] και τον Kyle [5].

Στους ενήλικες λευκούς, ο αριθμός των ΠΜΠ στο αίμα κάτω από τον οποίο η κατάσταση χαρακτηρίζεται ως ουδετεροπενία (cutoff value) δεν έχει καθοριστεί. Τιμές ΠΜΠ 2000, 1800, 1700 ή 1500 ανά  $\mu\text{L}$  αίματος έχουν κατά καιρούς θεωρηθεί ως κατώτερες τιμές της φυσιολογικής διακύμανσης των ΠΜΠ στον καθορισμό της ουδετεροπενίας [6]. Ωστόσο, όπως έδειξαν μελέτες στο Εργαστήριό μας, άτομα με αριθμό ΠΜΠ από 1800 έως 2500 ανά  $\mu\text{L}$  δεν ήταν φυσιολογικά με την έννοια ότι είχαν στον ορό τους αυξημένα επίπεδα φλεγμονωδών κυτταροκινών που δεν είχαν τα φυσιολογικά άτομα [7]. Εξάλλου, οι Hoffbrand και Pettit δίνουν ως κατώτερη τιμή φυσιολογικής διακύμανσης των ΠΜΠ τα 2500 ανά  $\mu\text{L}$  αίματος [8].

Η ουδετεροπενία χαρακτηρίζεται περαιτέρω ως “ήπια” (mild) εάν ο αριθμός των ΠΜΠ κυμαίνεται από 1800 έως 2499 ανά  $\mu\text{L}$  αίματος, “μέτριας βαρύτητας” (moderate) εάν ο αριθμός των ΠΜΠ κυμαίνεται από 500 έως 1799 ανά  $\mu\text{L}$  και “βαρεία” (severe) εάν ο αριθμός των ΠΜΠ είναι κάτω των 500 ανά  $\mu\text{L}$  αίματος. Για τις πολύ βαριές ουδετεροπενίες με αριθμό ΠΜΠ κάτω των 100 ανά  $\mu\text{L}$  επιφυλάσσεται ο όρος ακοκκιοκυτταραιμία (agranulocytosis). Στο Εργαστήριό μας, χρησιμοποιείται επίσης

ο όρος “έκδηλη ουδετεροπενία” (pronounced neutropenia) για να υποδηλωθεί έτσι κάθε ελάττωση του αριθμού των ΠΜΠ κάτω των 1800 ανά  $\mu\text{L}$  αίματος.

## 1.2. Διαγνωστικά κριτήρια

Τα διαγνωστικά κριτήρια της CIN έχουν λεπτομερώς περιγραφεί και δημοσιευθεί σε διεθνή βιοϊατρικά περιοδικά [3,7] και θα μπορούσαν να συνοψισθούν στα κάτωθι:

1. Αριθμός κυκλοφορούντων ΠΜΠ στο αίμα κάτω των 2500 ανά  $\mu\text{L}$  αίματος που βρίσκεται τουλάχιστον σε τέσσερις μηνιαία γενόμενες εξετάσεις αίματος.
2. Αποκλεισμός οικογενούς, φυλετικής ή κυκλικής ουδετεροπενίας.
3. Αρνητικές δοκιμασίες λευκοσυγκόλλησης και ανοσοφθορισμού στον έλεγχο για αντι-ΠΜΠ αντισώματα στον ορό των πασχόντων.
4. Φυσιολογικός καρύοτυπος των μυελικών κυττάρων.
5. Αρνητικό ιστορικό έκθεσης σε ιονίζουσα ακτινοβολία, επαφής με οργανικούς διαλύτες ή λήψης κυτταροτοξικών ή άλλων φαρμάκων ικανών να προκαλέσουν ουδετεροπενία.
6. Αποκλεισμός οιασδήποτε υποκείμενης νόσου που θα μπορούσε να συνοδεύεται ή χαρακτηρίζεται από ουδετεροπενία.

Με βάση τα κριτήρια αυτά, η διάγνωση της CIN δεν παρουσιάζει ιδιαίτερες δυσκολίες. Δυσκολίες μπορεί να ανακύψουν σε περιπτώσεις ύπαρξης υποκείμενης νόσου η οποία δεν έχει ακόμα δώσει επαρκή σημεία της κλινικο-εργαστηριακής της έκφρασης. Ιδιαίτερη προσοχή χρειάζεται στον έλεγχο ενός αρχόμενου μυελοδυσπλαστικού συνδρόμου ή συστηματικού ερυθηματώδους λύκου. Ωστόσο, μια τέτοια πιθανότητα περιορίζεται σημαντικά μετά την πάροδο τουλάχιστον τριμήνου από την ημερομηνία της αρχικής διάγνωσης της ουδετεροπενίας εάν δεν εμφανισθούν πρόσθετα κλινικά και εργαστηριακά στοιχεία ενδεικτικά των νόσων αυτών [1].

## 1.3. Επιδημιολογικά στοιχεία

Η συχνότητα της CIN στο γενικό πληθυσμό είναι άγνωστη. Ο επιπολασμός της (prevalence) στον πληθυσμό του Ηρακλείου έχει υπολογισθεί σε 8.22% [9]. Στη μελέτη αυτή, τα 6.81% είχαν ήπια ουδετεροπενία, ενώ τα 1.41% είχαν μέτριας βαρύτητας ουδετεροπενία. Βαρεία ουδετεροπενία, κάτω των 500 ΠΜΠ ανά  $\mu\text{L}$  αίματος, δεν βρέθηκε σε κανένα από τους 886 φαινομενικά υγιείς κατοίκους της περιοχής που μελετήθηκαν.

Στην παραπάνω επιδημιολογική μελέτη, η σχέση γυναικών προς άνδρες υπολογίστηκε σε 3 προς 2. Ωστόσο, στους 183 αρρώστους που είναι καταγεγραμμένοι και παρακολουθούνται στη Μονάδα Ουδετεροπενιών (Neutropenia Unit) της Κλινικής μας, η σχέση αυτή ανέρχεται σε 5 προς 1. Η διαφορά φαίνεται να σχετίζεται, τουλάχιστον εν μέρει, με το γεγονός ότι οι γυναίκες είναι περισσότερο αγχώδεις και αναζητούν ευκολότερα ιατρική βοήθεια απ' ότι οι άνδρες.

Η CIN παρατηρείται σε οιαδήποτε ηλικία. Ωστόσο τα 2/3 των περιπτώσεων παρατηρούνται στις ηλικίες 30-59 ετών. Κάτω των 30 ετών το ποσοστό καλύπτει τα 22% και άνω των 60 ετών το 14% [9]. Διαφορές μεταξύ ανδρών και γυναικών στην καθ' ηλικία κατανομή της νόσου δεν παρατηρήθηκαν [9].

Πρόσφατα βρέθηκε μια αυξημένη προδιάθεση στην εμφάνιση της νόσου με σχετικό κίνδυνο 8.36 στους έχοντες το φαινότυπο HLA-DRB1\*1302 [10].

#### **1.4. Κλινική έκφραση**

Κατά κανόνα, οι πάσχοντες από CIN προσέρχονται αναζητώντας ιατρική βοήθεια λόγω ουδετεροπενίας που διαπιστώθηκε σε τυχαία γενόμενο εργαστηριακό έλεγχο. Πολλοί άρρωστοι αναφέρουν στο πρόσφατο ιστορικό τους κάποια λοίμωξη, συχνά από το ουρογεννητικό σύστημα, ενώ άλλοι βρίσκονται να έχουν περάσει κάποια ιογενή λοίμωξη. Ωστόσο, μια σχέση της εμφάνισης της ουδετεροπενίας με συγκεκριμένη λοίμωξη δεν έχει τεκμηριωθεί, όπως δεν έχει τεκμηριωθεί και η σχέση της ουδετεροπενίας με τη χρήση γεωργικών φαρμάκων ή μη-στεροειδών αντιφλεγμονωδών φαρμάκων [9].

**Λοιμώξεις.** Οι πάσχοντες από CIN δεν έχουν συνήθως ιδιαίτερη ευαισθησία στις λοιμώξεις, ακόμη και όταν ο αριθμός των ΠΜΠ στο αίμα είναι πολύ χαμηλός. Υποστηρίζεται ότι στους πάσχοντες επισυμβαίνει μια αυξημένη έξοδος ΠΜΠ στους ιστούς που καλύπτει τις ανάγκες [7]. Οι λοιμώξεις, εάν και όποτε αυτές εμφανισθούν, αφορούν στο αναπνευστικό και σπανιότερα στο ουροποιητικό ή δερμο-υποδόριο ιστό. Είναι ενδιαφέρον ότι σε περίπτωση λοίμωξης αυξάνεται ο αριθμός των ΠΜΠ στο αίμα, και ακόμη ότι οι πάσχοντες απαντούν στη χορήγηση G-CSF ακόμη και σε μικρές δόσεις [11,12].

**Σπληνομεγαλία.** Κλινικά διαπιστώσιμη σπληνομεγαλία παρατηρείται εξαιρετικά σπάνια στους πάσχοντες από CIN. Ωστόσο, η εκτίμηση του όγκου του σπληνός με υπερήχους και η έκφραση αυτού σε διορθωμένο σπληνικό δείκτη σε σχέση με την επιφάνεια του σώματος (corrected splenic index, CSI) έδειξε ότι τα 48.1% των πασχόντων έχουν αυξημένο όγκο σπληνός σε σχέση με τα φυσιολογικά άτομα [13].

**Οστεοπενία-Οστεοπόρωση.** Μελέτες στο Εργαστήριό μας έχουν δείξει ότι οι πάσχοντες από CIN έχουν μυοσκελετικές διαταραχές. Τα 38% περίπου των ασθενών παραπονούνται για άτυπα μυοσκελετικά άλγη. Οστεοπενία και οστεοπόρωση απαντώνται στα 44.4% και 15.6%, αντίστοιχα, των πασχόντων όπως αυτές εκτιμώνται με τον προσδιορισμό της οστικής πυκνότητας (bone mineral density, BMD) και τα κριτήρια του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας [14,15]. Οι πάσχοντες έχουν επίσης αυξημένες συγκεντρώσεις αμινοτελοπεπτιδίου του προκολλαγόνου στα ούρα (NTx) και αυξημένα επίπεδα οστεοκαλτσίνης (OC) στον ορό, στοιχεία που δείχνουν έναν αυξημένο ρυθμό παραγωγής και καταστροφής οστού που οδηγεί σε οστεοπενία στην πάροδο του χρόνου [15].

**Εξέλιξη.** Στην πλειονότητα των ασθενών, η ουδετεροπενία διατηρείται για μακρό χρονικό διάστημα ή και καθ' όλη τη ζωή του ατόμου με μικρές διακυμάνσεις σε περίπτωση εμφανούς ή αφανούς λοίμωξης. Υποστηρίχθηκε εξ άλλου ότι η νόσος δεν εξελίσσεται σε συστηματικό νόσημα τύπου συστηματικού ερυθρεματοειδούς λύκου, ρευματοειδούς αρθρίτιδας, λευχαιμίας ή άλλης νόσου [5]. Ωστόσο περιγράφηκαν τελευταία 4 περιπτώσεις CIN που εμφάνισαν οξεία μυελική λευχαιμία αρκετά χρόνια μετά τη διάγνωση της ουδετεροπενίας [16,17]. Πιθανολογείται ότι

υπάρχουν και άλλες ανάλογες περιπτώσεις που διαφεύγουν της διάγνωσης, και ότι μερικές περιπτώσεις της CIN μπορούν να θεωρηθούν ως προ-λευχαιμικές καταστάσεις [16].

## 1.5. Εργαστηριακά ευρήματα

**Κύτταρα Περιφερικού Αίματος.** Η ουδετεροπενία στους ασθενείς με CIN μπορεί να συνοδεύεται από αναιμία σε ποσοστό 15.6% [18], θρομβοπενία σε 10% [3], μονο-κυτταροπενία σε 32.3% (αδημοσίευτες παρατηρήσεις) και λεμφοπενία σε 37% των περιπτώσεων [19-21]. Η αναιμία είναι συχνά του τύπου της αναιμίας της χρόνιας νόσου [18]. Η λεμφοπενία έχει αποδοθεί, τουλάχιστον εν μέρει, σε εκλεκτική ελάττωση των μνημονικών CD45RO<sup>+</sup> κυττάρων τόσο των βοηθητικών/επαγωγικών όσο και των κατασταλτικών/κυτταρολυτικών T-κυττάρων και σε μικρότερο βαθμό στην ελάττωση των NK-κυττάρων.

**Πρωτεΐνες ορού.** Τα 20% των πασχόντων από CIN έχουν αυξημένη IgG ορού και/ ή IgA αλλά όχι των IgM ανοσοσφαιρινών [22]. Τα αυξημένα επίπεδα των IgG αντικατοπτρίζουν κυρίως την αύξηση των IgG<sub>1</sub> μορίων. Τα 32.5% των ασθενών έχουν αυξημένα ποσά διαλυτών ανοσοσυμπλεγμάτων στον ορό, ενώ τα επίπεδα των παραγόντων του συμπληρώματος C3 και C4, του ρευματοειδή παράγοντα, και των πρωτεϊνών οξείας φάσης είναι μέσα σε φυσιολογικά πλαίσια με εξαίρεση της α<sub>1</sub>-αντιθρυψίνης, τα επίπεδα της οποίας είναι σημαντικά αυξημένα. Μια στατιστικά σημαντική αρνητική συσχέτιση βρέθηκε μεταξύ της τιμής της α<sub>1</sub>-αντιθρυψίνης και του αριθμού των κυκλοφορούντων ουδετερόφιλων κοκκιοκυττάρων αφ' ενός, και των επιπέδων της ελαστάσης του ορού αφ' ετέρου [23,24]. Τα αυξημένα επίπεδα της ελαστάσης του ορού δεν σχετίζονται με μεταλλάξεις στο γονίδιο ELA-2 που κωδικοποιεί για το ένζυμο [25].

Έχει επίσης υποστηριχθεί ότι τα επίπεδα του διαλυτού υποδοχέα Fcγ-RIII (διαλυτό CD16) στο πλάσμα δεν αυξάνεται στους ασθενείς με CIN, αλλά ασθενείς με πολύ χαμηλές τιμές του μορίου, έχουν αυξημένο κίνδυνο να εμφανίσουν βακτηριακές λοιμώξεις [26].

**Αντισώματα έναντι παθογόνων και αυτοαντισώματα.** Στους πάσχοντες από

CIN δεν έχουν ανευρεθεί αντισώματα έναντι συγκεκριμένων ιογενών ή βακτηριακών παθογόνων [3] με εξαίρεση τα αντισώματα έναντι του *Helicobacter pylori* που βρίσκονται αυξημένα σε ποσοστό 68.5% των ασθενών έναντι 36.4% των φυσιολογικών μαρτύρων (αδημοσίευτες παρατηρήσεις). Περίπου το 1/3 των ασθενών έχουν θετική τη δοκιμασία για αντιπυρηνικά αντισώματα [23]. Άλλα αυτοαντισώματα οργανοειδικά ή όχι δεν βρέθηκαν σε αυξημένο ποσοστό ασθενών με CIN σε σχέση με τους μάρτυρες [23].

**Μυελός των οστών.** Ο μυελός των οστών είναι υποκυτταρικός σε ποσοστό μεγαλύτερο του 90% των ασθενών με CIN. Το πιο ενδιαφέρον εύρημα τόσο στις οστεομυελικές βιοψίες όσο και στις αναρροφήσεις κυττάρων του μυελού των οστών είναι η «στροφή προς τ' αριστερά» των κοκκιοκυτταρικών προβαθμίδων που οδηγούν σε μειωμένη M/E σχέση (Μυελική/Ερυθρά σειρά) [27]. Μεγαλοβλαστοειδή χαρα-κτηριστικά στην ερυθρά σειρά βρίσκονται σε ποσοστό άνω του 25% των ασθενών. Τα μεγακαρυοκύτταρα είναι φυσιολογικά σε αριθμό αλλά με ήπιες ή εντονότερες δυσπλαστικές αλλοιώσεις και με συχνή την παρουσία μερικών μικρομεγακαρυο-κυττάρων. Τα μυελικά λεμφοκύτταρα είναι αυξημένα στο 10% των ασθενών. Σε λίγους ασθενείς βρέθηκαν λεμφοκυτταρικές αθροίσεις χωρίς βλαστικά κέντρα σε μη παραδοκιδώδεις περιοχές. Στους περισσότερους ασθενείς τα ηωσινόφιλα είναι ελαφρώς αυξημένα. Αυξημένη αναλογία πλασματοκυττάρων (2-8%) βρίσκεται στην πλειονότητα των ασθενών. Το ποσοστό των πλασματοκυττάρων στο μυελό σχε-τίζεται αρνητικά με το βαθμό της ουδετεροπενίας. Μικρή αύξηση των ιστοκυτ-τάρων έχει ακόμη περιγραφεί σε ένα ποσοστό των ασθενών [27].

## 1.6. Κοκκιοκυτταρικές προβαθμίδες του μυελού των οστών

**Κυτταροκαλλιέργειες.** Μελέτες σε διάφορα εργαστήρια έχουν δείξει ότι τα κύτταρα από το μυελό των οστών πάσχοντων από CIN έχουν υψηλή, φυσιολογική ή ελαττωμένη δυνατότητα σχηματισμού κοκκιοκυτταρικών-μακροφαγικών αποικιών σε ημιστερεά καλλιεργητικά μέσα [28-30]. Έχει επίσης αναφερθεί ότι ως πιθανή αιτία της ουδετεροπενίας στους πάσχοντες μπορεί να είναι η δυσλειτουργία του αιμοποιητικού μικροπεριβάλλοντος [28,30]. Η δυσλειτουργία αυτή έχει αποδοθεί σε

μειωμένη τοπική παραγωγή G-CSF [31,32] ή σε αυξημένη απελευθέρωση αναστολέων της κοκκιοποίησης, συμπεριλαμβανομένου και του TGF- $\beta_1$  [33].

Πρόσφατα, βρέθηκε ότι σχεδόν όλοι οι πάσχοντες από CIN με μέτρια ή βαριά ουδετεροπενία έχουν ελαττωμένο αριθμό διδύναμων προγονικών μυελικών κυττάρων (CFU-GM) στο κλάσμα των μυελικών λεμφο-μονοκυττάρων (BMMCs) [34]. Προκειμένου να ελεγχθεί εάν ο ελαττωμένος αριθμός των CFU-GM οφείλεται σε μειωμένη περιεκτικότητα προγονικών προβαθμίδων στο κλάσμα BMMC ή είναι το αποτέλεσμα κάποιου μειονεκτήματος των προγονικών αιμοποιητικών προβαθμίδων, μελετήθηκε στο Εργαστήριό μας η πολλαπλασιαστική ικανότητα των ανοσομαγνητικά διαχωρισθέντων CD34<sup>+</sup> κυττάρων του μυελού των οστών και βρέθηκε ότι ο συνολικός αριθμός των CFU-GM ήταν πράγματι σημαντικά ελαττωμένος στους ασθενείς και ότι η ελάττωση αυτή αφορούσε στα CFU-G και όχι στα CFU-M. Από την άλλη πλευρά, οι αρχέγονες προγονικές αιμοποιητικές προβαθμίδες που ελέγχονται με πειράματα μακρόχρονων καλλιέργειών και είναι γνωστές ως LTC-ICs (long-term culture initiating cells), δεν βρέθηκε να διαφέρουν σημαντικά μεταξύ ασθενών και μαρτύρων. Αυτά τα ευρήματα δείχνουν ότι υπάρχει μια εκλεκτική μείωση των κοκκιοκυτταρικών προγονικών προβαθμίδων στο μυελό των πασχόντων από CIN [34].

**Ανάλυση κυτταρομετρίας ροής.** Με την κυτταρομετρία ροής και τη χρήση 7-AAD (7-amino-actinomycin D) ως φθορίζουσα σήμανση της απόπτωσης των κυττάρων [35] βρέθηκε ότι υπάρχει σημαντικά αυξημένη απόπτωση στα CD34<sup>+</sup> και CD34<sup>+</sup>/CD33<sup>+</sup>, αλλά όχι και στα CD34<sup>+</sup>/CD33<sup>-</sup>, CD34<sup>-</sup>/CD33<sup>+</sup> και CD33<sup>-</sup>/CD15<sup>+</sup> κυτταρικά διαμερίσματα του μυελού των οστών [34]. Επίσης, ελέγχθηκε η έκφραση του Fas αντιγόνου στις αιμοποιητικές προγονικές προβαθμίδες του μυελού, αφού η έκφραση του μορίου αυτού σχετίζεται με την απόπτωση των κυττάρων αυτών [36], και βρέθηκε ότι η αναλογία των Fas<sup>+</sup> κυττάρων στα CD34<sup>+</sup> και CD34<sup>+</sup>/CD33<sup>+</sup>, αλλά όχι και στα CD34<sup>+</sup>/CD33<sup>-</sup>, CD34<sup>-</sup>/CD33<sup>+</sup> και CD33<sup>-</sup>/CD15<sup>+</sup> κυτταρικά διαμερίσματα του μυελού των οστών ήταν σημαντικά αυξημένη στους ασθενείς σε σχέση με τους μάρτυρες. Επιπλέον, βρέθηκε μία θετική συσχέτιση μεταξύ των ποσοστών των Fas<sup>+</sup> CD34<sup>+</sup> και CD34<sup>+</sup>/CD33<sup>+</sup> κυττάρων και των ποσοστών των αποπτωτικών κυττάρων, πράγμα που υποδηλώνει ότι η έκφραση του Fas πιθανότατα εμπλέκεται στην ελάττωση με απόπτωση των κυτταρικών αυτών πληθυσμών [34]. Αντίθετα, δεν



παρατηρήθηκαν διαφορές ούτε στα ποσοστά των Fas<sup>+</sup> κυττάρων ούτε στα ποσοστά των αποπτωτικών κυττάρων μεταξύ των ασθενών και των φυσιολογικών ατόμων στα περισσότερα ώριμα κοκκιοκυτταρικά κυτταρικά διαμερίσματα, συμπεριλαμβανομένων των κυκλοφορούντων στο αίμα ουδετεροφίλων κοκκιοκυττάρων. Τα ευρήματα αυτά είναι συμβατά με αυτά της *in vitro* μυελοποίησης και δείχνουν ότι η πλημμελής κοκκιοποίηση στους ασθενείς με CIN πιθανότατα οφείλεται στην αυξημένη απόπτωση που επάγεται μέσω του αντιγόνου Fas στο CD34<sup>+</sup>/CD33<sup>+</sup>/Fas<sup>+</sup> κοκκιοκυτταρικό προγονικό κυτταρικό διαμέρισμα [34].

### 1.7. Κυτταροκίνες και χημειοκίνες

**Κυτταροκίνες και χημειοκίνες ορού.** Οι ασθενείς με CIN έχουν αυξημένα επίπεδα πολλών προ-φλεγμονωδών κυτταροκινών και χημειοκινών στον ορό κατά βάση μακροφαγικής προέλευσης [37]. Τα επίπεδα της ιντερλευκίνης-1β (IL-1β), του παράγοντα νέκρωσης όγκων-α (TNF-α), του διαλυτού TNF υποδοχέα p55 (sTNF-RI), της ιντερλευκίνης-6 (IL-6), του αυξητικού παράγοντα μετατροπής των όγκων-β<sub>1</sub> (TGF-β<sub>1</sub>), καθώς και των ιντερλευκίνης-8 (IL-8) και RANTES, που είναι δύο ισχυρές χημειοκίνες για τα ουδετερόφιλα και λεμφοκύτταρα, αντίστοιχα, είναι σημαντικά αυξημένες στους πάσχοντες από CIN και σχετίζονται ισχυρά μεταξύ τους και με τον βαθμό της ουδετεροπενίας. Αντίθετα, τα επίπεδα της ιντερλευκίνης-4 (IL-4) και της ιντερφερόνης-γ (INF-γ), του διαλυτού CD23 (sCD23) μορίου και του διαλυτού υποδοχέα της ιντερλευκίνης-2 (sIL-2R) στον ορό των ασθενών, που είναι κατά βάση λεμφοκυτταρικής προέλευσης, δεν παρουσιάζουν στατιστικά σημαντική διαφορά από αυτά των φυσιολογικών μαρτύρων [37].

**Κυτταροκίνες στα υπερκείμενα των μακροχρόνιων καλλιέργειών.** Αυξημένα ποσά κυτταροκινών παράγονται στις μακροχρονες μυελικές καλλιέργειες LTBMCs. Η IL-1β, η IL-6, ο TNF-α και ο TGF-β<sub>1</sub> αλλά όχι και η INF-γ, ο SDF (stromal cell-derived factor) ή η ανασταλτική μακροφαγική πρωτεΐνη-1α (macrophage inhibitory protein 1α (MIP-1α) έχουν βρεθεί σημαντικά αυξημένες στα υπερκείμενα των

LTBMCs [33,34]. Οι τιμές του TNF- $\alpha$  έχουν ισχυρή θετική συσχέτιση με τα ποσοστά των CD34<sup>+</sup>/Fas<sup>+</sup> προγονικών κυττάρων και των CD34<sup>+</sup>/7AAD<sup>+</sup> αποπτωτικών κυττάρων, ενώ αυτά παρουσιάζουν αρνητική συσχέτιση με τον αριθμό των *in vitro* CFU-GM αποικιών [34]. Ο TNF- $\alpha$  είναι μια κυτταροκίνη με προ-αποπτωτικές ιδιότητες που παράγεται κυρίως από τα ενεργοποιημένα μακροφάγα [38]. Η IL-1 $\beta$  παράγεται επίσης από τα ενεργοποιημένα μακροφάγα και είναι ένας από τους κυριότερους επαγωγείς της παραγωγής IL-6 και TGF- $\beta$ <sub>1</sub> [39-41]. Η IL-6 είναι μία πλειοτρόπος κυτταροκίνη που εμπλέκεται στον πολλαπλασιασμό των αρχέγονων προγονικών κυττάρων και τη διαφοροποίηση των CFU-GM κυττάρων [42,43]. Παράγεται κυρίως από τους ινοβλάστες και η βασική της έκφραση μπορεί να επαυξηθεί κάτω από φλεγμονώδεις καταστάσεις [44,45]. Ο TGF- $\beta$ <sub>1</sub> είναι ένας αναστολέας του πολλαπλασιασμού των προγονικών κυττάρων [41] και έχει βρεθεί αυξημένος στα 82% των ασθενών με CIN. Έχει επίσης βρεθεί μια αρνητική συσχέτιση μεταξύ της κυτταροκίνης και του αριθμού των CD34<sup>+</sup>/CD33<sup>+</sup> κυττάρων καθώς και του αριθμού των κυκλοφορούντων ουδετεροφίλων [33,34]. Υποστηρίζεται ότι η κυτταροκίνη αυτή εμποδίζει την μυελοποίηση με την αρνητική ρύθμιση της έκφρασης των υποδοχέων των G-CSF, GM-CSF, IL-3 και IL-1 στα μυελικά προγονικά κύτταρα [39,40].

Ο G-CSF ανιχνεύθηκε στα υπερκείμενα των LTBMBC όλων των ασθενών με CIN σε διαφορές συγκεντρώσεις [33]. Οι 26% των ασθενών είχαν τιμές κυτταροκίνης πάνω από το ανώτερο όριο που βρέθηκε στους φυσιολογικούς μάρτυρες. Ανιχνεύσιμες τιμές GM-CSF στα υπερκείμενα των καλλιεργείων βρέθηκαν σε ποσοστό 19%, όπως και στους μάρτυρες [33]. Η IL-3 δεν ανιχνεύθηκε στα υπερκείμενα των καλλιεργείων ούτε των ασθενών, ούτε των μαρτύρων [33].

**Έκφραση IFN- $\gamma$  και Fas ligand.** Πρόσφατα βρέθηκε ότι τα mRNAs που κωδικοποιούν για την INF- $\gamma$  και τον FasL, αντίστοιχα, εκφράζονται σε καλλιέργειες στρωματικών κυττάρων του μυελού σε ποσοστό 43% και 27% αντίστοιχα στους ασθενείς με CIN ενώ δεν εκφράζονται παρά σπάνια στα φυσιολογικά άτομα [34]. Η IFN- $\gamma$  είναι ένας ισχυρός αναστολέας της αιμοποίησης που φαίνεται να δρα μέσω της επαγωγής της έκφρασης του Fas αντιγόνου στα CD34<sup>+</sup> κύτταρα [46]. αφού αυτό μπορεί να προκαλέσει Fas-επαγόμενη απόπτωση των κυττάρων [36,47]. Παραταύτα, ο ρόλος όλων των μορίων αυτών στην παθογένεια της CIN χρήζει συμπληρωματικής

διερεύνησης.

**Πιθανός ρόλος των κυτταροκινών στην κοκκιοποίηση.** Τα παραπάνω ευρήματα υποδηλώνουν ότι τα στρωματικά κύτταρα του μυελού των οστών των πασχόντων από CIN παράγουν επαρκή ή αυξημένη ποσότητα αιμοποιητικών αυξητικών παραγόντων, άλλα ταυτόχρονα και αυξημένες ποσότητες αναστολέων της μυελοποίησης. Εφόσον η φυσιολογική μυελοποίηση είναι το αποτέλεσμα της ισορροπίας μεταξύ των θετικά και αρνητικά δρώντων κυτταροκινών, είναι πιθανό η αυξημένη έκφραση των αναστολέων της μυελοποίησης από το αιμοποιητικό μικροπεριβάλλον των πασχόντων από CIN να ξεπερνά την επαγωγική δράση των αιμοποιητικών αυξητικών παραγόντων και να οδηγείται έτσι η μυελοποίηση σε καταστολή. Δύο τουλάχιστον κατασταλτικές λειτουργίες πρέπει να συμβαίνουν, η αυξημένη απόπτωση και η αναστολή του πολλαπλασιασμού στο στάδιο των μυελικών προγονικών κυττάρων. Η αυξημένη απόπτωση είναι κυρίως το αποτέλεσμα των αυξημένων τιμών του TNF- $\alpha$  στο αιμοποιητικό μικροπεριβάλλον και επίσης το αποτέλεσμα της έκφρασης του FasL στα στρωματικά κύτταρα του μυελού των οστών. Η αναστολή του πολλαπλασιασμού μπορεί να οφείλεται στις αυξημένες συγκεντρώσεις του TGF- $\beta_1$  στο αιμοποιητικό μικροπεριβάλλον καθώς και στην έκφραση της IFN- $\gamma$  από τα λεμφοκύτταρα που βρίσκονται στο στρώμα του μυελού των οστών.

### 1.8. Εξαγγείωση/Εξοδος λευκοκυττάρων

**Ενεργοποίηση ενδοθηλίου.** Μελέτες στο Εργαστήριο μας έχουν δείξει ότι οι πάσχοντες από CIN έχουν αυξημένα επίπεδα διαλυτής E-σελεκτίνης (sE-selectin), διαλυτού διακυτταρικού μορίου προσκόλλησης (soluble intercellular cell adhesion molecule, sICAM) και διαλυτού αγγειακού μορίου προσκόλλησης (soluble vascular cell adhesion molecule, sVCAM) [7,20]. Τα αυξημένα επίπεδα των μορίων αυτών στον ορό, που φέρονται γενικά ως «διαλυτά μόρια προσκόλλησης» (sCAMs), θεωρούνται ως δείκτες ενεργοποίησης των ενδοθηλίων [48]. Στους πάσχοντες, οι τιμές των sCAMs παρουσιάζουν αρνητική συσχέτιση με τον αριθμό των κυκλοφορούντων στο αίμα ουδετεροφίλων [7,20,21] και θετική συσχέτιση με τα επίπεδα της IL-1 $\beta$  και του TNF- $\alpha$  [7,20]. Ας σημειωθεί ότι τα τελευταία αυτά μόρια

είναι δυο από τους πλέον ισχυρούς ενεργοποιητές του ενδοθηλίου [48]. Βρέθηκε επίσης ότι τα επίπεδα των sCAMs στον ορό παρουσιάζουν ισχυρή συσχέτιση με τις χημειοκίνες IL-8 και RANTES [7,20]. Εξ άλλου, έχει βρεθεί ότι τα κυκλοφορούντα ουδετερόφιλα πολυμορφοπύρηννα υπερεκφράζουν L-selectin στην κυτταρική τους επιφάνεια, πράγμα που σημαίνει ότι είναι ενεργοποιημένα στους πάσχοντες από CIN [49].

**Ουδετεροπενία.** Από τα παραπάνω συμπεραίνεται ότι οι πάσχοντες από CIN, έχουν ενεργοποιημένο ενδοθήλιο, πάνω στο οποίο προσκολλώνται τα κυκλοφορούντα ουδετερόφιλα με την αλληλεπίδραση μορίων της επιφάνειας τους. [7,49]. Ένα τέτοιο μόριο είναι η L-selectin, που εμπλέκεται στο κύλισμα των ουδετεροφίλων πάνω στο ενεργοποιημένο ενδοθήλιο [48]. Οι πιο σημαντικές αλληλεπιδράσεις, όμως, που οδηγούν στη σταθερή προσκόλληση είναι η σύνδεση των ICAM-1 και VCAM-1 μορίων του ενεργοποιημένου ενδοθηλίου με τις β<sub>2</sub>-ιντεγκρίνες και κυρίως με την CD11b/CD18 της επιφάνειας των ουδετεροφίλων [7]. Με τη δράση της IL-8, και πιθανώς και άλλων χημειοτακτικών μορίων, η σταθερή προσκόλληση των ουδετερο-φίλων ακολουθείται από διαπίδυση και υποενδοθηλιακή μετανάστευση αυτών, που οδηγεί στην μείωση του αριθμού τους στην κυκλοφορία. Ο μηχανισμός αυτός θα μπορούσε να εξηγήσει την προαναφερθείσα σπανιότητα των λοιμώξεων στους πάσχοντες από CIN, εφόσον ο αριθμός των ουδετεροφίλων που είναι διαθέσιμος στις περιοχές της οξείας φλεγμονής είναι μεγαλύτερος από τον αναμενόμενο με βάση τον αριθμό των κυκλοφορούντων ουδετεροφίλων στο αίμα [3,7].

**Λεμφοπενία και μονοκυτταροπενία.** Τα μνημονικά CD45RO<sup>+</sup> αλλά όχι και τα παρθένα CD45RA<sup>+</sup> T-κύτταρα καθώς και τα NK-κύτταρα που εκφράζουν στην επιφάνεια τους το αντιγόνο VLA-4 (very late antigen-4) [48] μπορούν να προσκολληθούν στο τοίχωμα των αγγείων αλληλεπιδρώντας με τα μόρια του ενεργοποιημένου ενδοθηλίου ICAM-1 και VCAM-1. Η υποενδοθηλιακή στη συνέχεια μετανάστευση προωθείται με τη δράση της χημειοκίνης RANTES, η οποία έχει βρεθεί ότι είναι σημαντικά αυξημένη στον ορό των πασχόντων από CIN και ότι οι τιμές της συσχετίζονται αρνητικά με τον αριθμό των κυκλοφορούντων CD45RO<sup>+</sup> κυττάρων [20,21]. Ωστόσο, άλλοι μηχανισμοί μπορεί να εμπλέκονται στην

παθοφυσιολογία της λεμφοπενίας των πασχόντων από CIN, όπως για παράδειγμα, τα χαμηλά επίπεδα της IL-7 που πρόσφατα βρέθηκαν στα υπερκείμενα των μακρόχρονων μυελικών καλλιεργείων των ασθενών μας (αδημοσίευτες παρατηρήσεις).

Τα μονοκύτταρα εκφράζουν  $\beta_2$ -ιντεγκρίνες και κυρίως την CD11c/CD18 τοιαύτη. Προσκολλώνται και αυτά στο ενεργοποιημένο ενδοθήλιο αλληλεπιδρώντας με τα μόρια ICAM-1 και VCAM-1 του ενδοθηλίου, με αποτέλεσμα να περνούν στους ιστούς υπό την επίρεια των χημειοκινών IL-8 και MCP-1. Οι κυτταροκίνες αυτές βρέθηκαν αυξημένες στον ορό των ασθενών και συσχετίζονται αρνητικά με τον αριθμό των μονοκυττάρων του αίματος. [34]. Αυτό θα μπορούσε να ερμηνεύσει, τουλάχιστον εν μέρει, την μονοκυτταροπενία στους πάσχοντες από CIN.

### 1.9. Ενδείξεις χρόνιας φλεγμονώδους αντίδρασης

Τα στοιχεία που αναφέρθηκαν παραπάνω υποδηλώνουν την ύπαρξη κάποιας υποκείμενης λανθάνουσας χρόνιας φλεγμονώδους επεξεργασίας στον οργανισμό των πασχόντων από CIN. Η ύπαρξη μιάς τέτοιας φλεγμονώδους αντίδρασης τεκμαίρεται από τρία βασικά γεγονότα, την παρουσία στον οργανισμό ενεργοποιημένων μακροφάγων, την ανάπτυξη ενός χρόνιου αντιγονικού ερεθισμού και τον αυξημένο όγκο του σπληνός στον υπερηχοτομογραφικό έλεγχο. Η ενεργοποίηση των μακροφάγων υποδηλώνεται από τις αυξημένες συγκεντρώσεις των προφλεγμονωδών κυτταροκινών και χημειοκινών στον ορό και στα υπερκείμενα των μακροχρόνιων μυελικών καλλιεργείων των πασχόντων από CIN. Ο χρόνιος αντιγονικός ερεθισμός υποδηλώνεται από τα αυξημένα επίπεδα των IgG ή/και IgA του ορού, την αυξημένη συχνότητα των μονοκλωνικών κλασμάτων στην ηλεκτροφόρηση των πρωτεϊνών του ορού, τα αυξημένα επίπεδα των κυκλοφορούντων ανοσοσυμπλεγμάτων, το αυξημένο ποσοστό των πλασματοκυττάρων στο μυελό των οστών και την αυξημένη συχνότητα θετικών δοκιμασιών για αντιπυρηνικά αντισώματα με στικτή αντιδραστικότητα.

Η αιτία αυτής της πιθανής ήπιας χρόνιας φλεγμονής στους πάσχοντες από CIN είναι άγνωστη, αλλά αποτελεί πιθανόν την πηγή όλων αυτών των βιολογικών

στοιχείων που ενεργοποιούν τα μακροφάγα και συμπεριφέρονται ως αντιγόνα ικανά να ενεργοποιήσουν τα ανοσολογικά κύτταρα. Ο αυξημένος όγκος σπληνός μπορεί να αποτελεί μέρος της φλεγμονώδους εξεργασίας ή να είναι ο τόπος όπου η χρόνια φλεγμονώδης αντίδραση λαμβάνει χώρα.

### **1.10. Σκιαγράφιση του πιθανού παθογενετικού μηχανισμού**

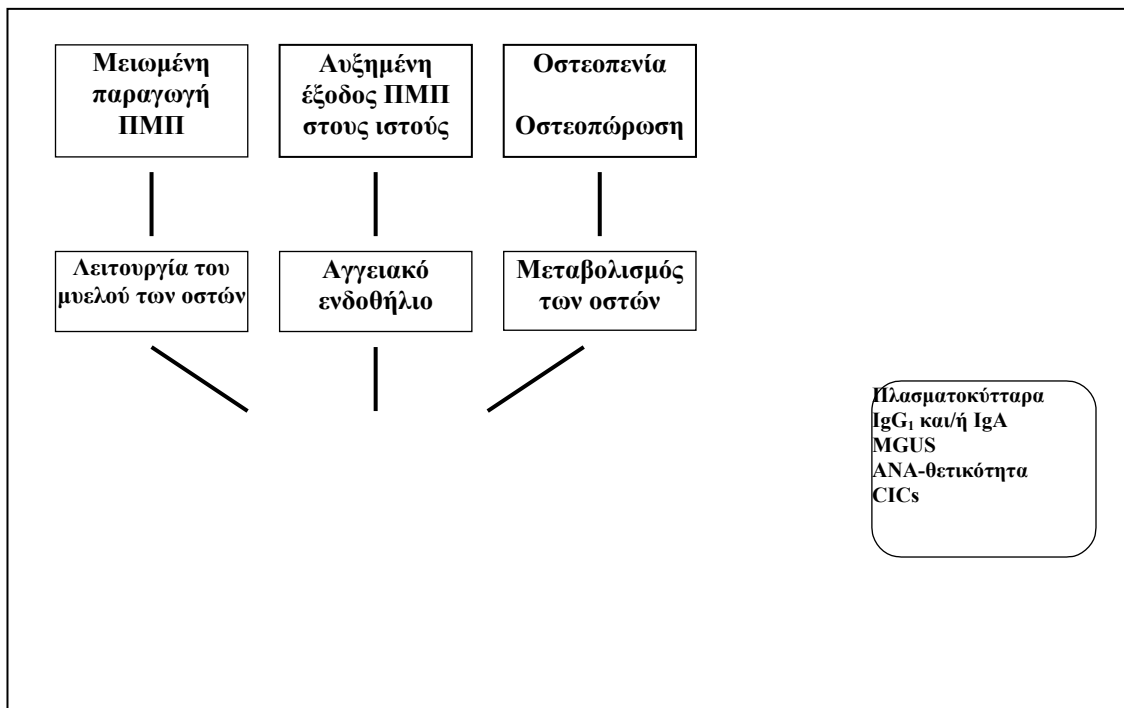
Σαν συμπέρασμα όλων των παραπάνω αναφερθέντων κλινικών, εργαστηριακών και ερευνητικών δεδομένων θα μπορούσε να λεχθεί ότι η χρόνια ιδιοπαθής ουδετεροπενία είναι μια κοκκιοκυτταρική διαταραχή που πιθανότατα σχετίζεται με κάποια υποκλινική λανθάνουσα χρόνια λοίμωξη στον οργανισμό σε συνδυασμό με μια γενετική προδιάθεση στην οποία εμπλέκεται ο HLA-DRB1\*1302 απλότυπος. Η ύπαρξη μιας τέτοιας φλεγμονής μπορεί να οδηγήσει τόσο στο χρόνια αντιγονικό ερεθισμό όσο και στην ενεργοποίηση των μακροφάγων. Ο αντιγονικός ερεθισμός τεκμαίρεται από την ύπαρξη αυξημένων τιμών IgG<sub>1</sub> και IgA στον ορό, την αυξημένη συχνότητα μονοκλωνικής γαμμαπάθειας άγνωστης εξέλιξης (MGUS) [50], το αυξημένο ποσοστό πλασματοκυττάρων στο μυελό των οστών, την αυξημένη συχνότητα των ANA στον ορό και τα αυξημένα επίπεδα διαλυτών ανοσοσυμπλεγμάτων (CICs) στον ορό των ασθενών. Η ενεργοποίηση των μακροφάγων είναι εμφανής από τα αυξημένα επίπεδα των προ-φλεγμονωδών κυτταροκινών και χημειοκινών μακροφαγικής προέλευσης στον ορό των ασθενών καθώς και από τις αυξημένες συγκεντρώσεις κυτταροκινών στρωματικής προέλευσης στα υπερκείμενα των μακρόχρονων μυελικών καλλιιεργειών των πασχόντων από CIN. Ο αυξημένος όγκος σπληνός, όπως αυτός ελέγχεται με υπερηχοτομογραφία, μπορεί να αποδοθεί στον χρόνια αντιγονικό ερεθισμό αλλά και στα ενεργοποιημένα μακροφάγα. Η απουσία αυξημένου ποσοστού ενεργοποιημένων λεμφοκυττάρων στο περιφερικό αίμα και το μυελό των οστών, καθώς και η απουσία αυξημένων συγκεντρώσεων κυτταροκινών λεμφοκυτταρικής προέλευσης στον ορό των ασθενών δεν αποκλείουν την πιθανότητα ύπαρξης μιας τέτοιας φλεγμονής.

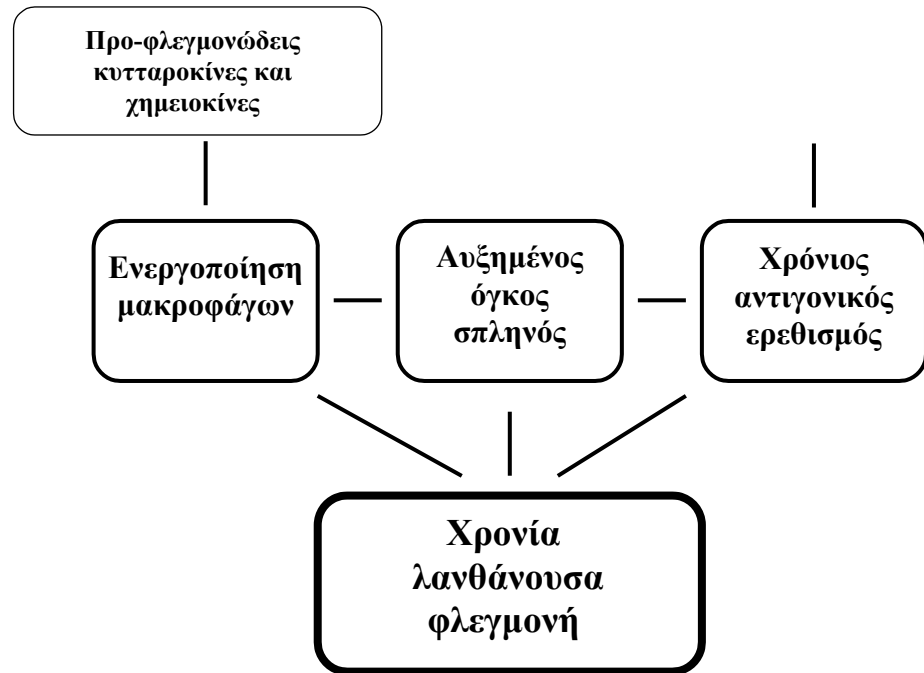
Οι προ-φλεγμονώδεις κυτταροκίνες μακροφαγικής προέλευσης ασκούν προφανώς τη δράση τους στο αγγειακό ενδοθήλιο, στον οστικό μεταβολισμό και στη λει-

τουργία του μυελού (Εικόνα 1.1). Η δράση στο αγγειακό ενδοθήλιο των αυξημένων συγκεντρώσεων κυτταροκινών IL-1 $\beta$  και TNF- $\alpha$  υποδηλώνεται από την ενεργοποίηση των ενδοθηλιακών κυττάρων που οδηγούν στην αυξημένη έξοδο κυττάρων στους ιστούς. Η επίδραση αυτή εξηγεί σε κάποιο βαθμό την ανάπτυξη της ουδετεροπενίας και λεμφοπενίας στους πάσχοντες από CIN, καθώς και τη σπανιότητα των βακτηριακών λοιμώξεων στους ασθενείς αυτούς, δεδομένου ότι ο αριθμός των λευκο-κυττάρων στους ιστούς είναι προφανώς μεγαλύτερος από αυτόν που θα αναμένετο από τον χαμηλό αριθμό των λευκοκυττάρων που βρίσκονται και κυκλοφορούν στο αίμα.

Οι προ-φλεγμονώδεις κυτταροκίνες επηρεάζουν προφανώς τον οστικό μεταβολισμό με την ενεργοποίηση των οστεοκλαστών, αφού η IL-1 $\beta$  και ο TNF- $\alpha$  είναι δύο ισχυροί ενεργοποιητές των οστεοκλαστών. Είναι πιθανόν, η οστεοπενία και η οστεοπόρωση που παρατηρούνται στους πάσχοντες να οφείλονται στα αυξημένα επίπεδα των κυτταροκινών αυτών.

Οι προ-φλεγμονώδεις κυτταροκίνες που παράγονται στην περιφέρεια και οι τοπικά παραγόμενες στο μυελό των οστών από τα στρωματικά κύτταρα, είναι πιθανό να δρουν και να επηρεάζουν την μυελοποίηση αναστέλλοντας τον πολλαπλασιασμό και αυξάνοντας την απόπτωση των μυελικών προγονικών κυττάρων. Η αναστολή του πολλαπλασιασμού οφείλεται προφανώς στα αυξημένα επίπεδα του TGF- $\beta_1$  και στην έκφραση της IFN- $\gamma$  από τα στρωματικά λεμφοκύτταρα, ενώ η αυξημένη απόπτωση προκαλείται προφανώς από τις αυξημένες συγκεντρώσεις του TNF- $\alpha$  που επάγει την έκφραση του Fas στα CD34<sup>+</sup> κύτταρα, αλλά και από την έκφραση του FasL στα στρω-





**Εικόνα 1.1.** Σκιαγράφιση του πιθανού παθογενετικού μηχανισμού της χρονίας ιδιοπαθούς ουδετεροπενίας. Υπάρχουν σαφείς ενδείξεις για την ύπαρξη κάποιας ήπιας λανθάνουσας φλεγμονώδους αντίδρασης στον οργανισμό που οδηγεί σε ενεργοποίηση των μακροφάγων, χρόνια αντιγονικό ερεθισμό και αύξηση του όγκου του σπληνός. Ο χρόνιος αντιγονικός ερεθισμός τεκμαίρεται από τον αυξημένο αριθμό πλασματοκυττάρων στο μυελό, τα αυξημένα επίπεδα IgG ή και IgA ανοσοσφαιρινών στον ορό, την αυξημένη συχνότητα MGUS, την αυξημένη συχνότητα θετικών ANA στον ορό και τα αυξημένα επίπεδα διαλυτών ανοσοσυμπλεγμάτων. Η ενεργοποίηση των μακροφάγων τεκμαίρεται από τις αυξημένες συγκεντρώσεις προ-φλεγμονωδών κυτταροκινών και χημειοκινών στον ορό και στα υπερκείμενα μακρόχρονων μυελικών καλλιιεργειών. Οι αυξημένες συγκεντρώσεις προ-φλεγμονωδών κυτταροκινών πιθανότατα εμπλέκονται στη μείωση της παραγωγής ουδετερόφιλων κοκκιοκυττάρων στο μυελό, στην αυξημένη έξο-δο ουδετερόφιλων στους ιστούς και την οστεοπενία και οστεοπόρωση από την ενεργοποίηση των οστεοκλαστών [3].

ματικά κύτταρα του μυελού των οστών. Η αυξημένη παραγωγή αναστολέων της μυελοποίησης είναι πιθανό να ξεπερνά την επίσης αυξημένη τοπική παραγωγή αιμοποιητικών αυξητικών παραγόντων και μπορεί να οδηγεί στην μειωμένη παραγωγή ουδετεροφίλων. Η αναιμία της χρονίας νόσου που παρατηρείται στους πασχοντές από CIN, μπορεί επίσης να εξηγηθεί από τις αυξημένες συγκεντρώσεις του TNF-α στο αιμοποιητικό μικροπεριβάλλον.

Ο μειωμένος αριθμός κυκλοφορούντων ουδετεροφίλων και λεμφοκυττάρων στο αίμα στους πάχοντες από CIN μπορεί επίσης να αποδοθεί τουλάχιστον εν μέρει, και



στον αυξημένο όγκο του σπληνός που σχετίζεται με το βαθμό της ουδετεροπενίας και της λεμφοπενίας. Ωστόσο, ο σπλήνας είναι πιθανόν να αποτελεί και τον τόπο στον οποίο πραγματοποιείται η κατακράτηση και εξαγγείωση τόσο των ουδετεροφίλων όσο και των λεμφοκυττάρων.

Συμπερασματικά, η ουδετεροπενία στους πάσχοντες από CIN είναι προφανώς το αποτέλεσμα του συνδυασμού τουλάχιστον τριών παραγόντων, μιας μειωμένης παραγωγής ουδετεροφίλων κυττάρων στο μυελό, μιας αυξημένης εξόδου ουδετεροφίλων κυττάρων στους ιστούς, και μιάς αυξημένης κατακράτησης ουδετεροφίλων στο σπλήνα.

### **1.11. Θεραπεία**

Όπως ήδη ελέχθει, οι πάσχοντες από CIN δεν είναι επιρρεπείς στην εμφάνιση λοιμώξεων και, κατ' ακολουθίαν, δεν χρειάζονται καμιάς θεραπείας. Σε βαρεία ουδετεροπενία έχουν χορηγηθεί κορτικοστεροειδή στο παρελθόν με ικανοποιητικά αποτελέσματα με την έννοια ότι τα κορτικοειδή αυξάνουν τον αριθμό των κυκλοφορούντων ουδετεροφίλων. Ωστόσο, η θεραπεία αυτή δεν εφαρμόζεται πλέον αφού δίνει παροδικά αποτελέσματα και συνοδεύεται από σημαντικές παρενέργειες στη μακροχρόνια χορήγησή τους. Σήμερα, η θεραπεία εκλογής, για όσες περιπτώσεις χρειάζεται, είναι η χορήγηση μικρών δόσεων G-CSF στις οποίες οι πάσχοντες απαντούν γρήγορα με αύξηση των κυκλοφορούντων πολυμορφοκυττάρων. Ιδιαίτερα χρήσιμη είναι η χορήγηση G-CSF σε συνδυασμό με αντιβιοτικά σε περιπτώσεις μικροβιακών λοιμώξεων.

### **1.12. Πρόγνωση**

Η πρόγνωση της CIN είναι γενικά άριστη. Όπως ήδη αναφέρθηκε, οι λοιμώξεις στους πάσχοντες είναι σχετικά σπάνιες. Ελέχθει, εξ άλλου, ότι στους πάσχοντες δεν παρατηρήθηκε εξέλιξη σε συστηματικό ερυθματώδη λύκο, ρευματοειδή αρθρίτιδα ή άλλο αιματολογικό ή συστηματικό νόσημα μετά από μακρά παρακολούθηση των αρρώστων αυτών πέραν των 15 ετών [5]. Τελευταία όμως αναφέρθηκαν δυο

περιπτώσεις CIN που εξελίχθηκαν σε οξεία λευχαιμία [16]. Η αιτιοπαθογενετική σχέση μεταξύ προηγούμενης ουδετεροπενίας και ανάπτυξης λευχαιμίας στους αρρώστους αυτούς δεν μπορεί να τεκμηριωθεί λόγω του σχετικά υψηλού επιπολασμού της ουδετεροπενίας, που φθάνει τα 8,2% στον Κρητικό πληθυσμό [9]. Αναφέρθηκαν επίσης 2 άρρωστοι με οξεία λευχαιμία από την Κλινική μας που παρακολουθούντο για χρόνια από το Εξωτερικό Αιματολογικό Ιατρείο [17], ενώ σε μία 5<sup>η</sup> περίπτωση με βαριά ουδετεροπενία και συχνές λοιμώξεις που αντιμετωπίζονταν με αντιβιοτικά και G-CSF, αναπτύχθηκε μία σχετικά σπάνια οξεία CD7/CD56 μυελική/NK λευχαιμία (υπό δημοσίευση) [51].

### ***Βιβλιογραφία***

1. Dale DC, Guerry D, Wewerka J, Bull J, Chusid M. Chronic neutropenia. *Medicine* (Baltimore) 1979; 58: 128-144.
2. Haddy TB, Rana SR, Castro O. Benign ethnic neutropenia: What is a normal absolute neutrophil count? *J Lab Clin Med* 1999; 133:15-22.
3. Papadaki HA, Palmblad J, Eliopoulos GD. Nonimmune chronic idiopathic neutropenia of adult: an overview. *Eur J Haematol* 2001; 67: 35-44.
4. Kyle RA, Linman JW. Chronic idiopathic neutropenia: a newly recognised syndrome? *N Engl J Med* 1968; 279:1015-1019.
5. Kyle RA. Natural history of chronic idiopathic neutropenia. *N Engl J Med* 1980; 302: 908-909.
6. Finch, S.C. (1983) Neutropenia. In, Williams WJ et al (eds), "Hematology", 3<sup>rd</sup> edition, McGraw-Hill Book Comp, London. pp 773-793.
7. 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* 1998a; 61: 272-277.
8. Hoffbrand AV, Pettit JE. *Essential Haematology*. 3<sup>rd</sup> edition. Blackwell Scientific

- Publications, Oxford 1993. p.156.
9. Papadaki HA, Xylouri I, Coulocheri SA, Kalmanti M, Kafatos A, Eliopoulos GD. Prevalence of chronic idiopathic neutropenia of adults among an apparently healthy population living in the island of Crete. *Ann Hematol* 1999; 78: 293-297.
  10. Papadaki HA, Eliopoulos GD, Coulocheri SA, Spyropoulou M, Stavropoulos-Giokas C. Increased frequency of HLA-DRB1\*1302 haplotype in patients with nonimmune chronic idiopathic neutropenia of adult. *Blood* 2001; 77: 850-851.
  11. 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.
  12. 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.
  13. Papadaki HA, Charoulakis NZ, Eliopoulos DG, Psyllaki M, Eliopoulos GD. Patients with nonimmune chronic idiopathic neutropenia syndrome have increased splenic volume on ultrasonography. *Clin Lab Haematol* 2001-2; 23, 111-118.
  14. WHO Study Group. Assessment of fracture risk and its application to screening for postmenopausal osteoporosis. *World Health Organiz Techn Rep Ser* 1994; 843:1-129.
  15. Papadaki et al, 1999b]. Papadaki HA, Margioris A, 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* 1999b; 62, 311-316.
  16. Auner HW, Klintschar M, Crevenna R, Beham-Schmid C, Hoefler G, Mitterbauer G, Linkesch W, Sill H. (1999) Two case studies of chronic idiopathic neutropenia preceding acute myeloid leukaemia. *Br J Haematol* 1999; 105, 431-433.
  17. Papadaki HA, Kosteas T, Gemetzi C, Alexandrakis M, Eliopoulos GD. Two patients with non-immune chronic idiopathic neutropenia of adult developing acute myeloid leukemia with aberrant phenotype and complex karyotype but no

- mutations in G-CSF receptor. *Ann Hematol* 2002; 81: 50-54.
18. Papadaki HA, Eliopoulos DG, Valatas V, Eliopoulos GD. Anemia of chronic disease is the more frequent type of anemia seen in patients with nonimmune chronic idiopathic neutropenia of adult. *Ann Hematol* 2001; 80: 195-200.
  19. Kyriakou D, Papadaki HA, Sakellariou D, Eliopoulos AG, Kapsimali V, Eliopoulos GD. Flow-cytometric analysis of peripheral blood lymphocytes in patients with chronic idiopathic neutropenia of adults. *Ann Hematol* 1997; 75: 103-110.
  20. Papadaki HA, Eliopoulos GD. Selective loss of peripheral blood CD45RO<sup>+</sup> T-lymphocytes correlates with increased levels of serum cytokines and endothelial cell-derived soluble cell adhesion molecules in patients with chronic idiopathic neutropenia of adults. *Ann Hematol* 1998; 77: 153-159.
  21. Papadaki HA, Katrinakis G, Eliopoulos AG, Coulocheri SA, 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.
  22. Papadaki HA, Palmblad J, Kapsimali V, Anagnostou NP, Eliopoulos GD. Increased serum IgA and decreased IgG<sub>3</sub> strongly correlate with increased levels of TGF- $\alpha_1$  in patients with nonimmune chronic idiopathic neutropenia of adults. *Eur J Haematol* 2000; 65: 237-244.
  23. Papadaki HA, Psyllaki M, Eliopoulos DG, Tsiroyanni A, Eliopoulos GD. Increased frequency and specific reactivity of serum antinuclear antibodies in patients with nonimmune chronic idiopathic neutropenia of adults. *Acta Haematol* 2001; 105: 13-20.
  24. Prassouli A, Coulocheri SA, Ponticoglou C, Boula A, Papadaki HA, Eliopoulos GD. Low levels of serum neutrophil elastase inversely correlate with serum  $\alpha_1$ -antitrypsin levels in patients with chronic idiopathic neutropenia. *Haema* 2003; (in press).

25. Papadaki HA, Horwitz M, Coulocheri SA, Person RA, Benson KF, Eliopoulos GD. Low levels of serum elastase are not associated with mutations in ELA-2 elastase encoding gene in chronic idiopathic neutropenia. *Blood* 2003; 101: 2898-2899.
26. Koene HR, de Haas M, Kleijer M, Huizinga TW, Roos D, von dem Borne AE. Clinical value of soluble IgG Fc receptor type III in plasma from patients with chronic idiopathic neutropenia. *Blood* 1998; 91: 3962-3966.
27. Papadaki HA, Chatzivassili A, Stefanaki K, Koumaki V, Kanavaros P, Eliopoulos GD. Morphologically defined myeloid cell compartments, lymphocyte subpopulations and histological findings of bone marrow in patients with nonimmune chronic idiopathic neutropenia of adults. *Ann Hematol* 2000; 79: 563-570.
28. Greenberg PL, Mara B, Steed S, Boxer L. The chronic idiopathic neutropenia syndrome: Correlation of clinical features with in vitro parameters of granulopoiesis. *Blood* 1980; 55: 915-921.
29. Rickard K, Brown R, Yuen E, Kronenberg H. Chronic idiopathic neutropenia. Granulopoietic assessment by bone marrow culture and granulocyte kinetics. *Am J Hematol* 1980; 9: 193-198.
30. Eliopoulos GD, Meletis J, Fessas P, Anagnou N. Defective CSA-dependent granulopoiesis in patients with chronic neutropenia. *Haematologia* 1990; 23:101-109.
31. Kogho Y, Hirayama Y, Matsunaga T, Kato J, Sakamaki S, Niitsu Y. Chronic idiopathic neutropenia associated with abnormal expression of granulocyte colony-stimulating factor mRNA of bone marrow stromal cells. *Int J Hematol* 1994; 59: 177-180.
32. Morikawa K, Yamamori S, Oiwa K, Morikawa S, Oseko F, Kubota T, Nakamura T. Impaired G-CSF production at post-transcriptional level in a patient with chronic idiopathic neutropenia. *Br J Haematol* 1993; 85: 200-202.
33. Papadaki HA, Giouremou K, Eliopoulos GD. Low frequency of myeloid progenitor cells in chronic idiopathic neutropenia of adults may be related to

- increased production of TGF- $\beta_1$  by bone marrow stromal cells. *Eur J Haematol* 1999; 63: 154-162.
34. Papadaki HA, Eliopoulos AG, Kostas T, Gemetzi C, Damianaki A, Koutala H, Bux J, Eliopoulos GD. Impaired granulocytopoiesis in patients with chronic idiopathic neutropenia is associated with increased apoptosis of bone marrow myeloid progenitor cells. *Blood* 2003; 101: 2591-2600.
  35. Ansari B, Coates PJ, Greenstein BD, Hall PA. In situ end-labelling detects DNA strand breaks in apoptosis and other physiological and pathological states. *J Pathol* 1993; 170: 1-8.
  36. Nagafuji K, Shibuya T, Harada M, et al. Functional expression of Fas antigen (CD95) on hematopoietic progenitor cells. *Blood* 1995; 86: 883-889.
  37. Papadaki HA, Coulocheri SA, Eliopoulos GD. Patients with chronic idiopathic neutropenia of adults have increased serum concentrations of inflammatory cytokines and chemokines. *Am J Hematol* 2000; 65: 271-277.
  38. Gersuk GM, Backham C, Loken MR, et al. A role for tumour necrosis factor- $\alpha$ , Fas and Fas-Ligand in marrow failure associated with myelodysplastic syndrome. *Br J Haematol* 1998; 103:176-188.
  39. Keller, J.R., Jacobsen, S.E.W., Dubois, C.M., Hestdal, K. & Ruscetti, F.M. Transforming growth factor- $\beta$ : a bi-directional regulator of haematopoietic cell growth. *International Journal of Cell Cloning* 1992; 10: 2-11.
  40. Wright, E.G. & Pragnell, I.B. Stem cell proliferation inhibitors. *Bailliere's Clinical Haematology* 1992; 5: 723-739.
  41. Cashman, J.D., Eaves, A.C., Raines, EW, Ross, R. & Eaves, C.J. Mechanisms that regulate the cell cycle status of very primitive hematopoietic cells in long-term human marrow cultures. I. Stimulatory role of a variety of mesenchymal cell activators and inhibitory role of TGF $\beta$ . *Blood* 1990; 75: 96-101.
  42. Eaves, C.L., Cashman, J.D., Kay, R.J., Dougherty, G.C., Otsuda, T., Gaboury, L.A., Hogge, D.E., Lansdorp, P.M., Eaves, A.C. & Humphries, R.K. (1991) 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.
43. Caracciolo, D., Clarc, S.C. & Rovera, G. (1989) Human interleukin-6 supports granulocytic differentiation of hematopoietic progenitor cells and acts synergistically with GM-CSF. *Blood* 1989; 73: 666-670.
44. Guba, S.C., Sartor, C.I., Gottschalk, L.R., Ye-Hu, J., Mulligan, T. & Emerson, S.G. 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 transcriptase polymerase chain reaction. *Blood* 1992; 80:1190-1198.
45. Hirano, T. The biology of interleukin-6. In, Kishimoto T. (ed). *Inter-leukins: Molecular Biology and Immunology*. Basel, Karger, pp 1992, 153-180.
46. Young NS, Maciejewski J. The pathophysiology of acquired aplastic anemia. *N Engl J Med* 1997; 336: 1365-1372.
47. Maciejewski JP, Selleri C, Anderson S, Young NS. Fas antigen expression on CD34<sup>+</sup> human marrow cells is induced by interferon gamma and tumor necrosis factor alpha and potentiates cytokine-mediated hematopoietic suppression in vitro. *Blood* 1995; 85: 3183-3190.
48. Carlos TM, Harlan JM. Leukocyte-endothelial adhesion molecules. *Blood* 1994; 84: 2068-2101.
49. Papadaki HA, Giouremou K, Eliopoulos GD. Overexpression of neutrophil L-selectin may account for the enhanced neutrophil extravasation in patients with chronic idiopathic neutropenia of adults. *Haema* 2000; 3: 29-35.
50. Papadaki HA, Eliopoulos DG, Ponticoglou C, Eliopoulos GD. Increased frequency of monoclonal gammopathy of undetermined significance in patients with nonimmune chronic idiopathic neutropenia of adults. *Int J Hematol* 2001; 73: 339-345.
51. Papadaki HA, Eliopoulos GD. An overview on the diagnosis, classification and

differential diagnosis of chronic neutropenias. *Haema* 2002; 5: 39-49.

---



# Απόπτωση (apoptosis)

---

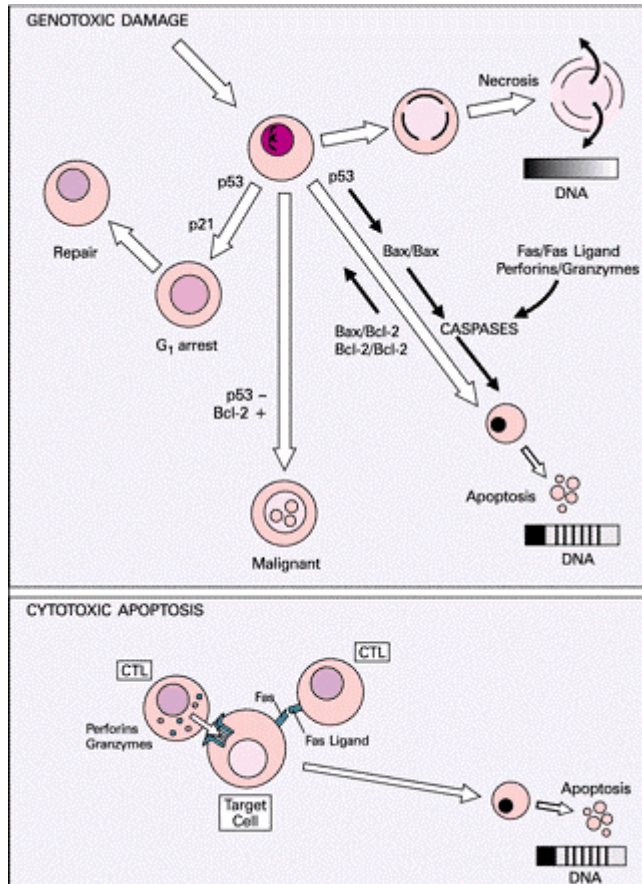
## 2.1. Εισαγωγή

Τα κύτταρα πεθαίνουν με δύο βασικούς μηχανισμούς, τη νέκρωση και την απόπτωση. Η νέκρωση (necrosis) χαρακτηρίζεται από ελευθέρωση ενδοκυττάρων προτεασών και άλλων λυσοσωμιακών ενζύμων που οδηγούν σε τοπική φλεγμονώδη αντίδραση. Η απόπτωση (apoptosis) χαρακτηρίζεται από την ενεργοποίηση ενδοκυττάρων συστημάτων θανάτωσης του κυττάρου χωρίς ελευθέρωση προτεασών και άλλων λυσοσωμιακών ενζύμων και στην οποία η απομάκρυνση των θανόντων κυττάρων γίνεται σιωπηλά με φαγοκύτωση [1-3].

Ο αποπτωτικός μηχανισμός ενεργοποιείται κατά βάση για τη θανάτωση των κυττάρων που φτάνουν στο τέλος της ζωής τους, των κυττάρων που θεωρούνται περιττά στον οργανισμό, και των κυττάρων που υπέστησαν κάποια μη επιδιορθώσιμη ενδοκυττάρια βλάβη. Πρόκειται δηλαδή για ένα γενικό φαινόμενο που επισυμβαίνει σε όλους τους ιστούς και που είναι απαραίτητο για την ανάπτυξη και την ομοιόσταση. Με απόπτωση, για παράδειγμα, γίνεται η αφαίρεση πλεοναζόντων κυττάρων κατά την εμβρυογένεση, ο περιορισμός της υπέρμετρης ανάπτυξης των κυττάρων με τη στέρηση ενδοκρινικών ή αυξητικών παραγόντων ή και κυτταροκινών, η επιδιόρθωση των ιστικών βλαβών, και ακόμη η απομάκρυνση κυττάρων που έχουν υποστεί σοβαρές γονιδιακές βλάβες. Απόπτωση από εξωγενείς παράγοντες παρατηρείται τυπικά στα θυμοκύτταρα που εκτέθηκαν σε κορτικοστεροειδή και σε καρκινικά κύτταρα που εκτέθηκαν σε ανοσολογικούς μηχανισμούς ή κυτταροτοξικά φάρμακα.

Μορφολογικά, τα κύτταρα που υπόκεινται σε απόπτωση παρουσιάζουν ρυτίδωση της κυτταρικής και πυρηνικής μεμβράνης και εν συνεχεία συμπύκνωση της

χρωμα-τίνης. Τα μιτοχόνδρια και τα ριβοσώματα διατηρούν τη βασική τους δομή και λειτουργία.



**Εικόνα 2.1.** Σχηματική παράσταση του μηχανισμού της απόπτωσης μετά από ενδογενή (genotoxic) και εξωγενή (cytotoxic) επαγωγή [1]

για, ενώ ρήγνυται ο κυτταροσκελετός. Έτσι, το κύτταρο συρρικνώνεται και το πυρηνικό υλικό κατακρημνίζεται με τη μορφή αδρών βολίων, τα αποπτωτικά σωμάτια [1]. Καθώς τα αποπτωτικά αυτά σωμάτια δεν προκαλούν ελευθέρωση κυτταροκινών, η διαδικασία απομάκρυνσης των αποπτωτικών κυττάρων προχωρεί, όπως ελέγχει, με φαγοκύτωση χωρίς ταυτόχρονη ανάπτυξη φλεγμονώδους αντίδρασης. Το τελευταίο στάδιο της απόπτωσης χαρακτηρίζεται από διάσπαση του DNA με την ενεργοποίηση ενδονουκλεασών. Με τη διάσπαση αυτή, το DNA χωρίζεται σε ποικίλου μεγέθους τμήματα έτσι ώστε στην ηλεκτροφόρηση σε αгарόζη να δίνεται η εικόνα πολλαπλών ταινιών (DNA ladders), σε αντίθεση με την συνεχώς φθίνουσα σε ένταση ταινία που

παίρνεται με την ηλεκτροφόρηση του DNA των κυττάρων που πέθαναν με το μηχανισμό της νέκρωσης [1-3].

## 2.2. Ρύθμιση της απόπτωσης

Στη ρύθμιση της απόπτωσης εμπλέκονται κατά βάση τα μόρια p53, Bcl-2, οι κασπάσες, οι γκρανζύμες (granzymes) και το σύστημα Fas-Fas ligand (FasL).

### *Ο ρόλος της p53*

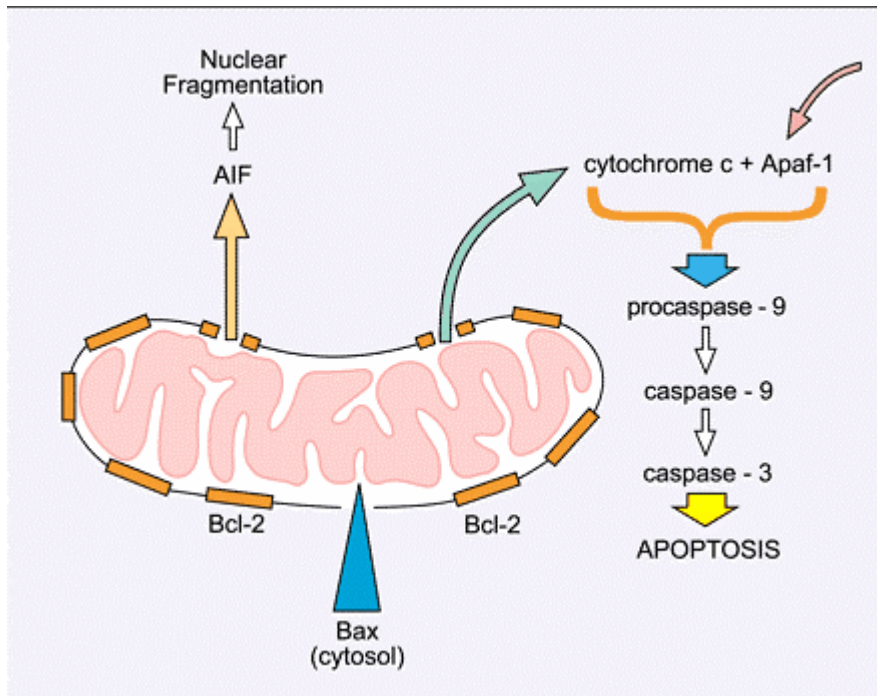
Η p53 είναι μια πρωτεΐνη που λειτουργεί ως ρυθμιστικός παράγοντας μεταγραφής. Προσδένεται στο DNA αναγνωρίζοντας μικρές ή μεγαλύτερες βλάβες αυτού (ρήξη μονής ή διπλής έλικας, κλπ) και προκαλεί είτε αναστολή του πολλαπλασιασμού στη G<sub>1</sub> φάση για να δοθεί ο χρόνος επιδιόρθωσης είτε αποπτωτικό θάνατο του κυττάρου εάν η βλάβη του DNA είναι σημαντική και μη επιδιορθώσιμη.

Η p53 βρίσκεται φυσιολογικά στο κυτταρόπλασμα του κυττάρου σε μικρές συγκεντρώσεις. Οι συγκεντρώσεις της ρυθμίζονται από έναν άλλον μεταγραφικό παράγοντα, την πρωτεΐνη MDM2 (murine double minute 2), η οποία προσδένεται στην p53 και περιορίζει τη βιολογική της δράση ενώ προάγει την αποδόμησή της. Σε περίπτωση βλάβης του DNA, η επαγωγή της ενεργοποίησης του γονιδίου p53 συνοδεύεται από αυξημένη σύνθεση του μορίου και φωσφορυλίωσή του. Η φωσφορυλίωση έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της δραστηριότητάς της και τη μείωση της απενεργοποίησής της από την MDM2, πράγμα που οδηγεί στον διπλασιασμό της ημιζωής της (T/2) με επαύξηση της δράσης μέχρι στο εκατονταπλάσιο [4]. Η ενεργοποιημένη p53 αναστέλλει μέσω της p21 τη δράση της κυκλίνης D/CDK4 που φυσιολογικά εμπλέκεται στη φωσφορυλίωση της Rb που προάγει τον κυτταρικό κύκλο [5]. Γενικά θα μπορούσε να λεχθεί ότι το γονίδιο p53, το οποίο κατατάσσεται στα ογκοκατασταλτικά γονίδια, για σημαντικές βλάβες του DNA συμπεριφέρεται ως αποπτωτικός παράγοντας δρώντας μέσω του συστήματος Bcl-2/Bax (Εικόνα 2.1).

### *Bcl-2/bax*

Στην οικογένεια των Bcl-2/Bax μορίων ανήκουν οι Bcl-2 και Bcl-X<sub>L</sub> πρωτεΐνες που αναστέλλουν την απόπτωση, και οι πρωτεΐνες Bax, Bad και Bid που επάγουν την

απόπτωση [6]. Έτσι, η απόπτωση καθορίζεται από τη σχέση τούτων μεταξύ τους, σχέση που ρυθμίζεται ή καθορίζεται από τη δράση της παραπάνω αναφερθείσας p53.



**Εικόνα 2.2.** Σχηματική παράσταση της θέσης του Bcl-2, Bax και των κασπασιών 9 και 3 στην απόπτωση [1].

Η Bcl-2 εδράζεται στη μιτοχονδριακή μεμβράνη ενώ οι Bax βρίσκονται στο κυτταρόπλασμα του κυττάρου (Εικόνα 2.2). Ο ρόλος της Bcl-2 είναι να προφυλάσσει τη μιτοχονδριακή μεμβράνη από ρήγματα και να ελέγχει τη διαβατότητά της [7]. Η Bax, όταν υπερισχύσει η δράση της, έναντι της Bcl-2, μεταναστεύει από το κυτταρόπλασμα στη μιτοχονδριακή μεμβράνη και διαταράσσει τη διαβατότητά της. Αυτό οδηγεί στην ελευθέρωση δύο παραγόντων, του κυττοχρώματος c και του παράγοντα AIF (apoptosis-inducing factor). Το κυττόχρωμα c οδηγεί στην ενεργοποίηση της κασπάσης-9 που καταλήγει στην απόπτωση, ενώ ο AIF μεταναστεύει στον πυρήνα και προκαλεί κατάτμηση του DNA [8].

### ***Οι κασπάσες***

Καθώς το κυτόχρωμα *c* απελευθερώνεται στο κυταρόπλασμα ενεργοποιεί το ενζυμικό σύστημα, το οποίο είναι υπεύθυνο για τα τελικά βήματα της απόπτωσης, δηλαδή τις κασπάσες. Οι κασπάσες είναι κυστεϊνικές πρωτεάσες (με κυστεΐνη στο ενεργό τους κέντρο) των οποίων τα ανενεργά πρόδρομα μόρια βρίσκονται στο κυταρόπλασμα. Έχουν αναγνωρισθεί 13 κασπάσες. Το ICE, μια πρωτεάση που αρχικά περιγράφηκε ως επαγωγέας φλεγμονής, έχει αναγνωρισθεί ως μέλος αυτής της οικογένειας και μετονομάστηκε προκασπάση-1. Οι κασπάσες ενεργοποιούν άλλες προκασπάσες σε μια ακολουθία γεγονότων που θυμίζει το συμπλήρωμα ή τη διαδικασία συγκόλλησης. Επίσης μπορούν να ενεργοποιηθούν και με αυτότμηση. Οι κασπάσες κατηγοριοποιούνται ως εκκινητές (κασπάσες -2, -8, -9, -10) ή επαγωγείς (κασπάσες -3, -6, -7) της πρωτεόλυσης, οι οποίες ενεργοποιούνται από τις αντίστοιχες κασπάσες-εκκινητές. Η πρωτεόλυση από τις κασπάσες είναι εξειδικευμένη και περιορισμένη. Η κατάτμηση του πεπτιδίου συμβαίνει μόνο μετά από συγκεκριμένη αλληλουχία αμινοξέων ασπαρτικού οξέος αποδομώντας την πρωτεΐνη και όχι επιφέροντας γενική πρωτεόλυση. Η δράση της κασπάσης έχει ως αποτέλεσμα την κατάτμηση των πρωτεϊνών του κυτταροσκελετού, ρήξη της πυρηνικής μεμβράνης, διακοπή της διακυτταρικής επαφής, απελευθέρωση της DNA νουκλεάσης (CAD, caspase activated deoxyribonuclease) από τον παρεμποδιστή με τον οποίο βρίσκεται συνδεδεμένη, ώστε να ξεκινήσει η κατάτμηση του DNA. Η περιορισμένη έκτασης πρωτεόλυση δεν καταλήγει σε λύση του κυττάρου αλλά σε αποπτωτικά σωματία εγκλεισμένα σε μεμβράνη. Αυτά τα μη αντιστρέψιμα πρωτεολυτικά γεγονότα είναι υπεύθυνα για τις μορφολογικές αλλαγές χαρακτηριστικές των αποπτωτικών κυττάρων και της εμφάνισης της χαρακτηριστικής εικόνας της ηλεκτροφόρησης DNA σε γέλη αγαρόζης. Οι κασπάσες μπορούν επιπρόσθετα να δράσουν στις μιτοχονδριακές μεμβράνες με περαιτέρω απελευθέρωση του κυτοχρώματος *c* και μερικών ενδο-μιτοχονδριακών προκασπασών. Η οικογένεια των αναστολέων των κασπασών (IAPs) [9-11] εκλεκτικά παρεμποδίζουν τις κασπάσες επαγωγείς μπλοκάροντας την αποπτωτική διαδικασία. Αυτές υπερεκφράζονται σε πολλά κακοήθη κύτταρα. [9-11].

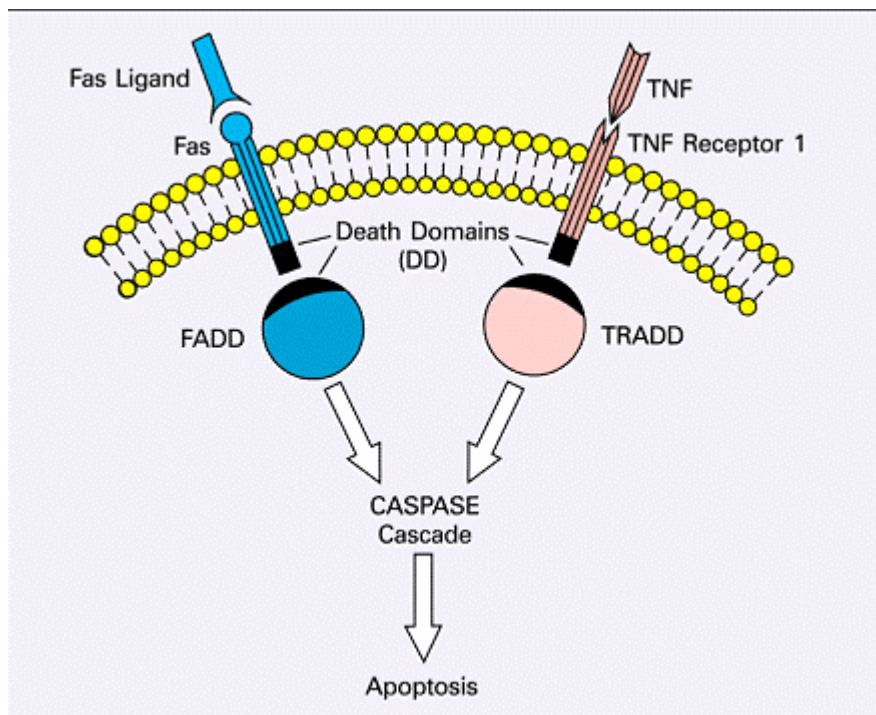
### ***Το σύστημα περφορίνης-γκρανζύμης***

Αυτό το εκκριτικό αποπτωτικό μονοπάτι είναι λειτουργικό στο να απομακρύνει κύτταρα μολυσμένα από παθογόνα και καρκινικά κύτταρα. Οι περφορίνες και οι γκρανζύμες είναι πρωτεΐνες που περιέχονται στα κυταροπλασματικά εκκριτικά κοκκία των κυτταροτοξικών λεμφοκυττάρων και των NK (natural killer) κυττάρων. Όταν τα κυτταροτοξικά λεμφοκύτταρα συνδέονται μέσω υποδοχέα με το κύτταρο στόχο, εκκρίνονται περφορίνες οι οποίες εισέρχονται στη μεμβράνη του κυττάρου στόχου, όπου συγκεντρώνονται σε ένα στρογγυλό διαμεμβρανικό πόρο παρόμοιο με το MAC (membrane attack complex) του συμπληρώματος (υπάρχει ανοσολογική αλληλεπίδραση μεταξύ περφορινών και MAC). Ο πόρος των περφορινών επάγει μια γρήγορη αύξηση του κυταροπλασματικού ασβεστίου. Η πρωτεάση σερίνης (γκρανζύμη B) που εκκρίνεται ταυτόχρονα εισέρχεται στο κύτταρο στόχο μέσω εκκριτικών σωματιδίων με ενδοκύτωση μέσω υποδοχέα. Η περφορίνη αφού έχει σχηματίσει τους πόρους στην υποκείμενη κυτταρική μεμβράνη του κυττάρου-στόχου, επιτρέπει την είσοδο της γκρανζύμης στο εσωτερικό του κυττάρου. Η γκρανζύμη-B επάγει την απόπτωση μέσω του συστήματος των κασπασών [12,13].

### ***Fas – Fas Ligand***

Εκτός του παραπάνω εκκριτικού μηχανισμού, έχει περιγραφεί και ο εναλλακτικός μη εκκριτικός μηχανισμός της απόπτωσης που επάγεται μέσω της ενεργοποίησης των υποδοχέων θανάτου που εκφράζονται στην κυτταρική μεμβράνη. Ο μεμβρανικός υποδοχέας Fas (CD95) είναι μέλος της οικογένειας TNFR (Tumor Necrosis Factor Receptor) και είναι επαγωγέας της απόπτωσης. Εκφράζεται σε πολλούς κυτταρικούς τύπους (λεμφοκύτταρα, ηπατοκύτταρα, καρκινικά κύτταρα, κ.ά.). Η πρωτεΐνη συνδέτης του Fas, ο Fas-Ligand (FasL), είναι μέλος της οικογένειας του TNF και η έκφρασή του είναι πολύ περιορισμένη. Βρίσκεται στα κυτταροτοξικά T κύτταρα και στα NK κύτταρα. Ο FasL προσδέεται στον υποδοχέα του και ενεργοποιεί το αποπτωτικό μονοπάτι. Αυτός ο μηχανισμός παίζει σημαντικό ρόλο στην απομάκρυνση των ενεργοποιημένων T κυττάρων στο τέλος της ανοσοαπάντησης, στην εξάλειψη των κυττάρων στόχων τα οποία είναι προσβεβλημένα από ιούς, προκαλεί θάνατο των καρκινικών κυττάρων και καταστροφή των κυττάρων σε

διάφορες παθολογικές καταστάσεις. Ο FasL και ο TNF επιφέρουν την απόπτωση με ανάλογο τρόπο, ο FasL δια μέσου του Fas υποδοχέα και ο TNF με πρόσδεσή του στον υποδοχέα TNFR1 (Εικόνα 2.3). Όταν οι συνδέτες ενωθούν στους αντίστοιχους υποδοχείς, οι υποδοχείς δημιουργούν τριμερή σύμπλοκα. Η κυτταροπλασματική ουρά του κάθε υποδοχέα περιέχει έναν τομέα γνωστό ως "τομέα θανάτου" (Death Domain, DD), η ενεργοποίηση του οποίου οδηγεί στην απόπτωση του κυττάρου μέσω κυτταροπλασματικών πρωτεϊνικών μορίων που όλα τους μαζί φέρονται ως "μόρια του signal transduction" [14,15].



**Εικόνα 2.3.** Σχηματική παράσταση του μηχανισμού της απόπτωσης μέσω Του αντιγόνου Fas και του υποδοχέα p55 του TNF [1].

### 2.3. Η απόπτωση στο αιμοποιητικό σύστημα

Η παραγωγή καθώς και η απομάκρυνση αιμοποιητικών κυττάρων ρυθμίζεται από την απόπτωση. Η διατήρηση των ερυθροποιητικών προγονικών κυττάρων (BFU-Es και CFU-Es) εξαρτάται από την παρουσία της ερυθροποιητίνης (EPO). Η απομάκρυνση της EPO καταλήγει στην απόπτωση των προβαθμίδων αυτών των ερυθρο-κυττάρων.

Τα ουδετερόφιλα πεθαίνουν με απόπτωση που γίνεται ενδογενώς. Μετά την ανάπτυξη και την ωρίμανση τους στο μυελό των οστών, περνούν στην κυκλοφορία του αίματος όπου παραμένουν για περίπου 12 ώρες. Ακολούθως περνούν στους ιστούς όπου ζουν 3-4 ημέρες για να πεθάνουν εκεί με απόπτωση και να φαγοκυτωθούν από τα παρακείμενα φαγοκύτταρα [16].

Ο θάνατος των λεμφοκυττάρων προκαλείται από εξωγενείς παρεμβάσεις. Τα θυμοκύτταρα στα οποία η γονιδιακή αναδιάταξη αποτυγχάνει στο να κωδικοποιήσει και να εκφράσει τον T-κυτταρικό υποδοχέα, είναι ιδιαίτερα ευαίσθητα στην ενεργοποίηση του αποπτωτικού θανάτου μέσω κορτικοειδών. Τα αυτοαντιδραστικά θυμοκύτταρα, επειδή απειλούν για αυτοάνοση νόσο, απομακρύνονται από τα κυτταρολυτικά T-κύτταρα (CTLs). Η έναρξη της απόπτωσης γίνεται μέσω, (α) του εκκριτικού περφορινικού/γκρανζυμικού συστήματος και (β) του μη εκκριτικού Fas/FasL συστήματος. Και οι δύο αυτοί μηχανισμοί τίθενται σε λειτουργία όταν τα CTL απομακρύνουν τα μη λειτουργικά ή τα αυτο-αντιδραστικά T και B κύτταρα, καθώς επίσης και τα καρκινικά κύτταρα και τα κύτταρα που έχουν μολυνθεί από ιούς. Η πρόσδεση του Fas ligand ή η είσοδος της γκρανζύμης B επιφέρει την ενεργοποίηση των προ-κασπασών και κατ'ακολουθίαν την απόπτωση [17].

#### 2.4. Απόπτωση και νεοπλασίες

Η αύξηση του κυτταρικού καρκινικού πληθυσμού μπορεί να ερμηνευθεί είτε ως αύξηση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού είτε ως μείωση της απόπτωσης των κυττάρων. Η μειωμένη απόπτωση μπορεί να οφείλεται είτε, (α) σε απουσία ή μετάλλαξη του ογκοκατασταλτικού γονιδίου *p53* ή *Rb* (γεγονός παρατηρούμενο στο 50% και 40% των ανθρώπινων όγκων, αντίστοιχα), (β) σε αυξημένη έκφραση του Bcl-2, και (γ) σε μειωμένη δραστηριότητα του Bax. Η απορύθμιση και η υπερέκφραση του Bcl-2 συμβαίνει με τη μετατόπιση του *bcl-2* γονιδίου από το χρωμόσωμα 18 στην Ig περιοχή του χρωμοσώματος 14. Αυτή η μετατόπιση παρατηρείται, για παράδειγμα, στα χαμηλής κακοήθειας μη-Hodgkin's λεμφώματα στα οποία τα νεοπλασματικά κύτταρα δεν πολλαπλασιάζονται γρήγορα αλλά συσσωρεύονται λόγω μειωμένου κυτταρικού θανάτου (απόπτωσης) [17].



***Βιβλιογραφία***

1. Israels GD.& Israels ED. Apoptosis. *Stem Cells*.1999; 17:306-313.
2. Cohen JJ. Apoptosis. *Immunol Today* 1993; 14: 126-130.
3. Ueda N, Shah SV. Apoptosis. *J Lab Clin Med* 1994; 124: 169-177
4. Prives C. Signaling by p53: breaking the MDM2-p53 circuit. *Cell* 1998; 95:5-8
5. Kasten MM, Giordano A. pRb and the Cdks in apoptosis and the cell cycle. *Cell Death Differ* 1998; 5: 132-140.
6. Reed JC. Bcl-2 family proteins. *Oncogene* 1998;17:3225-3236.
7. Korsmeyer SJ. Bcl-2: an antidote to programmed cell death. *Cancer Surv* 1992; 15:105-118.
8. Reed JC. Cytochrome C: can't live with it; can't live without it. *Cell* 1997; 91:559-562.
9. Salvesen GS, Dixit VM. Caspases: intracellular signaling by proteolysis, *Cell* 1997; 91:443-446.
10. Nunez G, Benedict MA, Hu Y et al. Caspases: the proteases of the apoptotic pathway. *Oncogene* 1998; 17-3237-3245.
11. LaCasse EC, Baird S, Korneluk RG et al. The inhibitors of apoptosis (IAPs) and their emerging role in cancer. *Oncogene* 1998; 17:3247-3259.
12. Liu C-C, Walsh CM, Young JD-E. Perforin: structure and function. *Immunol Today* 1995; 16:194-201.
13. Smyth MJ, Trapani JA. Granzymes: exogenous proteinases that induce target cell apoptosis. *Immunol Today* 1995; 16:202-206.
14. Nagata S. Fas and Fas ligand: a death factor and its receptor. *Adv Immunol* 1994; 57:129-144.
15. Nagata S, Golstein P. The Fas death factor. *Science* 1995; 267:1449-1456.
16. Squier MKT, Sehnert AJ, Cohen JJ. Apoptosis in leukocytes. *J Leukoc Biol* 1995;

57:2-10.

17. Thompson CB. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* 1995; 267:1456-1462
-

# Το ερώτημα

Από τα υπάρχοντα βιβλιογραφικά δεδομένα και ιδιαίτερα από τις μελέτες στο Εργαστήριό μας φαίνεται ότι τουλάχιστον τρεις παράγοντες πρέπει να εμπλέκονται στην παθοφυσιολογία της CIN, η μειωμένη παραγωγή ουδετερόφιλων κοκκιοκυττάρων στο μυελό, η αυξημένη έξοδος ουδετερόφιλων στους ιστούς και η αυξημένη κατακράτηση τους στο σπλήνα. Ο βαθμός της πιθανής συμμετοχής των διαφόρων αυτών παραγόντων στον καθορισμό της βαρύτητας της ουδετεροπενίας ποικίλει και οπωσδήποτε χρήζει περαιτέρω έρευνας. Στο Εργαστήριό μας θελήσαμε να προχωρήσουμε σε βάθος και να διερευνήσουμε το μηχανισμό της μειωμένης παραγωγής ουδετερόφιλων πολυμορφοπύρηνων στο μυελό των οστών αφήνοντας τους άλλους παράγοντες για άλλη ερευνητική εργασία.

Είναι γνωστό ότι η μυελική σειρά στο μυελό των οστών ξεκινάει από το αρχέγονο προγονικό αιμοποιητικό κύτταρο, το γνωστό σήμερα ως LTC-IC κύτταρο. Από το κύτταρο αυτό προέρχονται τα μητρικά CD34<sup>+</sup> κύτταρα που είναι γνωστά και ως “πολυδύναμα προγονικά αιμοποιητικά κύτταρα” (P-HSCs). Από τα κύτταρα αυτά γεννιόνται με πολλαπλασιασμό και διαφοροποίηση τα δεσμευμένα για τις διάφορες κυτταρικές σειρές προγονικά κύτταρα, που για τη μυελική σειρά είναι τα CD34<sup>+</sup>/CD33<sup>+</sup>. Από αυτά προέρχονται στη συνέχεια τα περισσότερο ώριμα κύτταρα CD34<sup>-</sup>/CD33<sup>-</sup>/CD15<sup>+</sup> κύτταρα που θα δώσουν τελικά γένεση στα ώριμα ουδετερόφιλα πολυμορφοπύρηννα.

Είναι επίσης γνωστό ότι η διαφοροποίηση των  $CD34^+$  P-HSCs προς δεσμευμένες κυτταρικές προβαθμίδες προϋποθέτει την παρουσία στο μυελό επαγωγικών παραγόντων που αφορούν είτε σε ελεύθερα χυμικά μόρια και φέρονται ως “αυξητικοί αιμοποιητικοί παράγοντες” (hemopoietic growth factors, HGFs), είτε σε μεμβρανικά μόρια που ασκούν την επαγωγική τους δράση στο πλαίσιο της επαφής των κυττάρων μεταξύ τους (cell-to-cell interaction). Η διαφοροποίηση και ωρίμανση των προγονικών προβαθμίδων καθορίζεται επίσης από την παρουσία αναστολέων του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και παραγόντων που επάγουν το θάνατο των κυττάρων (απόπτωση). Έτσι, η διαφοροποίηση και ωρίμανση των προβαθμίδων της μυελικής σειράς καθορίζεται από την επαγωγική δράση των αυξητικών παραγόντων και την κατασταλτική δράση των αναστολέων.

Προηγούμενες μελέτες στο Εργαστήριό μας έχουν δείξει ότι το μυελικό μικροπεριβάλλον των πάσχοντων από CIN έχει επαγωγικούς παράγοντες της αιμοποίησης και συγκεκριμένα αυξημένα ποσά G-CSF και φυσιολογικά ποσά GM-CSF, έχει όμως και αυξημένα ποσά TGF- $\beta_1$  ενός παράγοντα με ισχυρές ανασταλτικές ιδιότητες στο πολλαπλασιασμό των προγονικών μυελικών προβαθμίδων όπως και αυξημένα ποσά TNF- $\alpha$  ενός παράγοντα που επάγει την απόπτωση των κυττάρων.

Πρόσφατες μελέτες στο Εργαστήριό μας έδειξαν ότι στους πάσχοντες από CIN, τα αρχέγονα προγονικά αιμοποιητικά κύτταρα LTC-ICs δεν διαφέρουν ποσοτικά και ποιοτικά από αυτά των φυσιολογικών μαρτύρων. Απεναντίας, τα  $CD34^+$  και  $CD34^+/CD33^+$  κύτταρα βρέθηκαν ελαττωμένα σε αριθμό στους πάσχοντες σε σχέση με τους μάρτυρες. Βρέθηκε ακόμη ότι η απόπτωση μέσα στα διαμερίσματα αυτά ήταν αυξημένη όταν ελέγχθηκε με κυτταρομετρία ροής, και ότι ο βαθμός της απόπτωσης σχετιζόταν με την έκφραση του αντιγόνου Fas και τις συγκεντρώσεις του TNF- $\alpha$  στα υπερκείμενα των μακρόχρονων μυελικών καλλιιεργειών. Έτσι, υποστηρίχθηκε ότι η μειωμένη παραγωγή ουδετερόφιλων κοκκιοκυττάρων στο μυελό μπορεί να οφείλεται σε αναστολή του πολλαπλασιασμού που προκαλείται από την παρουσία του TGF- $\beta_1$  αλλά και στα

αυξημένα ποσά TNF-α που επάγουν την έκφραση του Fas και προάγουν την απόπτωση.

Στην παρούσα μελέτη θελήσαμε να ελέγξουμε την απόπτωση και την έκφραση ορισμένων ογκογονιδίων που εμπλέκονται στην απόπτωση σε ιστολογικές τομές του μυελικού οργάνου των πασχόντων από CIN. Έτσι, μελετήθηκε η απόπτωση *in situ* με την τεχνική της ISEL, η απόπτωση στο διαμέρισμα των CD34<sup>+</sup> και CD15<sup>+</sup> κυττάρων, καθώς και η έκφραση των ογκογονιδίων *p53* και *bcl-2* με την ανοσοϊστοχημική τεχνική της APAAP. Ακόμη μελετήθηκε η απόπτωση στα επιχρίσματα ανοσομαγνητικά διαχωρισθέντων CD34<sup>+</sup>, CD34<sup>+</sup>/CD33<sup>+</sup> και CD34<sup>-</sup>/CD33<sup>+</sup> κυττάρων.

Σκοπός της μελέτης αυτής ήταν κατά ένα μεγάλο μέρος η επιβεβαίωση των ευρημάτων της κυτταρομετρίας ροής. Ωστόσο, θελήσαμε να ελέγξουμε και ορισμένους άλλους δείκτες στο μυελικό όργανο που έχουν σχέση με τον πολλαπλασιασμό και τη μυελική διαφοροποίηση, και συγκεκριμένα την έκφραση του Ki-67 αντιγόνου και της μυελουπεροξειδάσης.

---

# Ασθενείς, Υλικά και Μέθοδοι

## 4.1. Ασθενείς

Τριανταεννέα ασθενείς, 4 άντρες και 35 γυναίκες ηλικίας 23 με 75 ετών (διάμεση ηλικία 53 έτη) περιλήφθηκαν στην παρούσα μελέτη. Όλοι πληρούσαν τα διαγνωστικά κριτήρια της CIN όπως αυτά εφαρμόζονται στην Κλινική μας και έχουν ήδη δημο-σιευθεί [1,2]. Εν συντομία, (α) Επίκτητος χαρακτήρας της διαταραχής (β) Αποκλει-σμός της κυκλικής, οικογενούς ή φυλετικής ουδετεροπενίας, (γ) Έλλειψη χρωμοσω-μιακών ανωμαλιών, (δ) Αρνητικές δοκιμασίες για αντι-ΠΜΠ αντισώματα, (ε) Απου-σία ιστορικού έκθεσης σε ιονίζουσα ακτινοβολία, επαφής με χημικές ουσίες ή λήψης φαρμάκων ικανών να προκαλέσουν ουδετεροπένια, και (στ) Έλλειψη κλινικών ή εργα-στηριακών ενδείξεων υποκείμενης νόσου, στην οποία θα μπορούσε να αποδοθεί η ουδετεροπένια. Όλοι οι ασθενείς που περιλήφθηκαν στην παρούσα μελέτη είχαν αριθμό ουδετεροφίλων κάτω από 1800/ $\mu$ L σε τουλάχιστον 4 αλληπάλληλες μηνιαίες μετρήσεις. Ασθενείς με πρόσφατο ιστορικό ιογενούς ή βακτηριακής λοίμωξης (μέσα στους 2 τελευταίους μήνες) αποκλείστηκαν από την μελέτη. Δώδεκα αιματολογικά υγιή άτομα, που υποβλήθηκαν σε χειρουργικές επεμβάσεις στην Ορθοπεδική Κλινική ή εθελοντές αντίστοιχης ηλικίας και φύλου, χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρες. Ορι-σμένα κλινικά και εργαστηριακά στοιχεία των ασθενών παρουσιάζονται στον Πίνακα 4.1. Συγκατάθεση πάρθηκε από όλους τους ασθενείς και τους εξετασθέντες υγιείς μάρτυρες. Η μελέτη έχει γίνει δεκτή από την Επιτροπή Δεοντολογίας του Πανεπιστη-μιακού Νοσοκομείου.

**Πίνακας 4.1.** Μερικά κλινικά και εργαστηριακά ευρήματα των ασθενών που μελετήθηκαν

	Ασθενείς	Μάρτυρες
Αριθμός ασθενών	39	12
Φύλο (άνδρες/γυναίκες)	4/35	2/10
Ηλικία (έτη)*	53 (23-75)	52 (29-68)
Αιμοσφαιρίνη (g/dl) <sup>&amp;</sup>	13.1 ± 0.7	14.0 ± 1.0
Λευκοκύτταρα (/μl)	3620 ± 748	6122 ± 1208
Ουδετερόφιλα (/μl)	1484 ± 296	4330 ± 872
Λεμφοκύτταρα (/μl)	1715 ± 509	2230 ± 508
Μονοκύτταρα (/μl)	370 ± 133	446 ± 150
Αιμοπετάλια (x10 <sup>3</sup> /μl)	202 ± 43	248 ± 71
Σπληνομεγαλία	Κανείς	Κανείς
Αντι-ΠΜΠ αντισώματα <sup>#</sup>	Αρνητικά	Αρνητικά

\* Διάμεση τιμή και εύρος τιμών.

<sup>&</sup> Όλες οι αριθμητικές τιμές εκφράζονται ως μέσες τιμές ± 1SD.

<sup>#</sup> Ελέγχθηκε με λευκοσυγκόλληση και ανοσοφθορισμό.

## 4.2. Δείγματα του μυελού των οστών

Αναρροφήσεις μυελικού πολφού και οστεομυελικές βιοψίες πάρθηκαν από την οπίσθια λαγόνια άκανθα μετά από τοπική αναισθησία με ξυλοκαΐνη. Οι αναρροφήσεις μυελικού πολφού χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή μυελικών μονοπύρηνων κυτταρικών εναιωρημάτων (BMMCs) με φυγοκέντρηση πάνω σε Lymphoprep (πυ-κνότητα 1.077g/cm<sup>3</sup>, Nycomed Pharma, Oslo, Norway), και για την παρασκευή μυελικών κυτταρικών επιχρισμάτων για τη μορφολογική μελέτη με χρώση May-Grunwald-Giemsa. Τα ιστοτεμάχια των μυελικών βιοψιών μονιμοποιήθηκαν σε 10% φορμαλδεΰδη, αφαιρώθηκαν σε διάλυμα Sheffer's και εγκλείστηκαν σε μπλοκ παραφίνης. Οι ιστολογικές τομές σε αντικειμενοφόρες πλάκες αποπαραφινώθηκαν σε κλίβανο 37<sup>0</sup>C τη νύκτα, εμβαπτίστηκαν σε ξυλόλη και στη συνέχεια σε κατιούσα πυκνότητα οιοπνεύματος. Λεπτομέρειες της τεχνικής που εφαρμόζεται κλασικά στο Παθολογοανατομικό Εργαστήριο του Πανεπιστημίου περιγράφονται σε προηγούμενη δημοσίευση από το Εργαστήριό μας που αναφέρεται στη μορφολογία των μυελικών κυττάρων των αρρώστων με CIN [4].

### 4.3. Απομόνωση CD34<sup>+</sup> και CD33<sup>+</sup> κυττάρων

Τα CD34<sup>+</sup>, CD34<sup>+</sup>/CD33<sup>+</sup> και τα CD34<sup>-</sup>/CD33<sup>+</sup> διαχωρίστηκαν από το σύνολο των μυελικών μονοπύρηνων κυττάρων (BMMCs) με βάση την τεχνική του έμμεσου ανοσομαγνητικού διαχωρισμού (Magnetic Activating Cell Sorting; MACS isolation kit, Miltenyi Biotec GmbH, Germany) ακολουθώντας τις οδηγίες του κατασκευαστή. Το τελικό εναιώρημα αποτελούνταν από CD34<sup>+</sup>, CD34<sup>+</sup>/CD33<sup>+</sup> και CD34<sup>-</sup>/CD33<sup>+</sup> κύτταρα, αντίστοιχα, με καθαρότητα άνω του 96% όπως εδήχθη με κυτταρομετρία ροής. Από τα κύτταρα αυτά παρασκευάστηκαν επιχρίσματα με κυτταροφυγόκεντρο για τον έλεγχο της απόπτωσης. Ο έλεγχος της απόπτωσης και γενικότερα η μελέτη των επιχρισμάτων γίνονταν την ίδια ημέρα από την παρασκευή τους.

### 4.4. Ανίχνευση της απόπτωσης

Ο έλεγχος της απόπτωσης έγινε σε τομές οστεομυελικών βιοψιών χρησιμοποιώντας την *in situ* end-labeling (ISEL) μέθοδο [3]. Σε όλα τα πειράματα χρησιμοποιήθηκε το In Situ Cell Death Detection kit, AP (Roche, Basel, Switzerland). Αποπαραφινωμένα πλακίδια με ιστολογικές τομές 2μ επώαστηκαν στους 37<sup>0</sup>C για 30 min σε ενυδατωμένο επωαστήρα με πρωτεΐνάση (20 μg/ml πρωτεΐνάση K σε 10mM Tris/HCl pH 7.5). Τα πλακίδια ξεπλύθηκαν τρεις φορές σε φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα (PBS) και επώαστηκαν σε 37<sup>0</sup>C για 30 min με το TUNEL reaction mixture που περιέχει την τελική δεοξυνουκλεοτιδυλ-τρανσφεράση και ελεύθερα νουκλεοτίδια. Τα πλακίδια ξεπλύθηκαν στη συνέχεια τρεις φορές με PBS, επώαστηκαν στους 37<sup>0</sup>C για 20 min με Converter-AP (φορίζον αντίσωμα συνδεδεμένο με αλκαλική φωσφατάση) και ξεπλύθηκαν τρεις φορές με PBS. Περαιτέρω, τα πλακίδια επώαστηκαν με το υπόστρωμα της αλκαλικής φωσφατάσης, ξεπλύθηκαν με νερό βρύσης για 5 min, βάφτηκαν με αντίχρωση methyl green 1% για 1 min και καλύφθηκαν με γυάλινη καλυπτρίδα. Σε κάθε πλακίδιο, η αναλογία των αποπτωτικών κυττάρων στα μορφολογικά αναγνωρίσιμα εμπύρηννα κύτταρα αξιολογήθηκε από δύο ανεξάρτητους παρατηρητές με τη βοήθεια ενός Olympus μικροσκοπίου σε 400x μεγένθυση.



#### 4.5. Διπλή χρώση για τη μελέτη της απόπτωσης

Η διπλή χρώση των κυττάρων σε ιστολογικές τομές, χρησιμοποιήθηκε προκειμένου να αναγνωριστεί η προέλευση των αποπτωτικών κυττάρων. Οι τομές παραφίνης προετοιμάστηκαν όπως περιγράφηκε παραπάνω. Αφού αποπαραφινώθηκαν και ενυδατώθηκαν, εμβαπτίστηκαν σε κιτρικό νάτριο και θερμάνθηκαν σε φούρνο μικροκυμάτων στα 350W τρεις φορές για 5' με ενδιάμεση ψύξη σε θερμοκρασία δωματίου. Τα πλακίδια επώαστηκαν σε εφυγραμένο επωαστήρα στους 37<sup>0</sup>C για 30 min με το TUNEL reaction mixture και ξεπλύθηκαν τρεις φορές σε PBS. Στη συνέχεια, τα πλακίδια επώαστηκαν στους 37<sup>0</sup>C για 20 min με το Converter-AP (φθορίζον αντίσωμα συνδεδεμένο με αλκαλική φωσφατάση) και ξεπλύθηκαν τρεις φορές με PBS. Ως διάλυμα χρωμογόνου χρησιμοποιήθηκε το BNTP/BCIP (έτοιμο προς χρήση της εταιρείας DAKO K0598) για 10' σε θερμοκρασία δωματίου. Αφού ξεπλύθηκαν μία φορά σε PBS, σε τρεχούμενο νερό για 2' και μία φορά σε TBS, τα πλακίδια εμβαπτίστηκαν σε 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> για 10' στο σκότος και σε θερμοκρασία δωματίου με σκοπό το μπλοκάρισμα της ενδογενούς δράσης της υπεροξειδάσης. Ακολούθησε ξέπλυμα σε TBS για 5'. Περαιτέρω, τα πλακίδια επώαστηκαν με το κυρίως αντίσωμα αντι-CD34 (κλώνος QBE, DAKO) σε εφυγραμένο επωαστήρα σε θερμοκρασία δωματίου για 1 ώρα και στη συνέχεια ξεπλύθηκαν τρεις φορές με TBS. Επόμενο βήμα ήταν η επώαση με το δευτερογενές αντίσωμα (βιοτινυλιωμένο αντίσωμα αίγας αντι-ποντικού /κονίκλου, biotinylated goat anti-mouse/rabbit Ig) για 30' σε θερμοκρασία δωματίου και μετά ξέπλυμα των πλακιδίων τρεις φορές με TBS. Ακολούθως, τα πλακίδια επώαστηκαν με στρεπταβιδίνη-βιοτινυλιωμένη υπεροξειδάση (streptavidin-biotinylated peroxidase) για 30' σε θερμοκρασία δωματίου. Τα πλακίδια ξεπλύθηκαν τρεις φορές και επώαστηκαν με το χρωμογόνο AEC (DAKO K3464) για 10' σε θερμοκρασία δωματίου. Τα πλακίδια ξεπλύθηκαν στη συνέχεια με άφθονο νερό βρύσης για 2', βάφτηκαν με methyl green (1%) για 1' και καλύφθηκαν με γυάλινες καλυπτρίδες (300μL από το κάθε αντίσωμα χρησιμοποιήθηκε σε κάθε πλακίδιο, αντίστοιχα).

Η ίδια διαδικασία χρησιμοποιήθηκε για τη διπλή χρώση με την TUNEL apoptosis και αντι-CD15 (κλώνος C3D1, DAKO), εκτός από το ότι τα πλακίδια επώαστηκαν με πρωτεΐνάση K για 30' σε εφυγραμένο επωαστήρα στους 37<sup>0</sup>C, αντί για την επώαση με κιτρικό νάτριο στα 350W, όπως έγινε με τα πλακίδια που βάφτηκαν με το αντι-CD34 αντίσωμα. Τα πλακίδια αξιολογήθηκαν σε 400x μεγένθυση και υπολογίστηκαν τα αποπτωτικά κύτταρα στον CD34<sup>+</sup> και CD15<sup>+</sup> κυτταρικό πληθυσμό. Σε όλες τις περιπτώσεις χρησιμοποιήθηκε το kit In situ cell death detection Kit, AP (Roche Cat.No 1684809) και το StreptABCComplex/HRP Duet, Mouse/Rabbit (DAKO K0492).

#### **4.6. Χρώση απόπτωσης σε επιχρίσματα**

Οι επιστρώσεις των κυττάρων που πάρθηκαν με ανοσομαγνητικό διαχωρισμό και παρασκευάστηκαν με κυτταροφυγόκεντρο, ξηράθηκαν στον αέρα και μονιμοποιήθηκαν σε πρόσφατα ετοιμασμένα 4% παραφορμαλδεΐδη σε PBS (pH 7,4) και ακετόνη (1:1) για 30' σε θερμοκρασία δωματίου. Τα πλακίδια ξεπλύθηκαν με PBS και επώαστηκαν σε διάλυμα 0.1% Triton-X σε 0.1% κιτρικού νατρίου για 2' σε πάγο (2-8<sup>0</sup>C). Στη συνέχεια, πλύθηκαν δύο φορές με PBS και επώαστηκαν με 50μL TUNEL Reaction Mixture στους 37<sup>0</sup>C για 30 min. Το επόμενο βήμα ήταν η επώαση των πλακιδίων σε 3% BSA για 20' και το ξέπλυμα αυτών τρεις φορές με PBS. Μετά επώαστηκαν με 100μL Converter-AP ανά πλακίδιο στους 37<sup>0</sup>C και στη συνέχεια ξεπλένονταν τρεις φορές με PBS. Τελικά επώαστηκαν με 300μl Fast Red χρωμογόνο διάλυμα για 20', ξεπλύθηκαν σε τρεχούμενο νερό για 5 min, βάφονταν με methyl green (1%) για 1' και καλύφθηκαν με γυάλινες καλυπτρίδες. Αποτυπώματα αντιδραστικού λεμφαδένα και λεμφώματος Burkitt χρησιμοποιήθηκαν ως θετικοί μάρτυρες. Επιχρίσματα που επώαστηκαν με καθαρό PBS αντί για TUNEL Reaction mixture χρησιμοποιήθηκαν ως αρνητικοί μάρτυρες.

#### **4.7. Μελέτη των p53, Bcl-2 και άλλων πρωτεϊνών**

Ο έλεγχος της έκφρασης των p53, Bcl-2 και άλλων πρωτεϊνών έγινε σε ιστολογικές τομές με την τεχνική της APAAP. Λεπτομέρειες στην τεχνική έχουν αναφερθεί

σε προηγούμενη μελέτη [4]. Η τεχνική εφαρμόστηκε για την ανίχνευση μυελοϋπεροξειδάσης, γλυκοφορίνης-A, CD61, CD68/KP-1, CD68/PGM1, CD20/L26, CD45R/LCA, CD45RA, CD45RO, CD3, CD8, CD34 και Ki-67(MIB-1) δεικτών, όπως και για τον έλεγχο της έκφρασης των ογκογονιδίων *bcl-2* και *p53* στα μυελικά κύτταρα χρησιμοποιώντας τα αντίστοιχα μονοκλωνικά αντισώματα. Ως δευτερογενή αντισώματα χρησιμοποιήθηκαν τα rabbit anti-mouse (Z259) και APAAP συμπλέγματα (D651) της Εταιρείας DAKO. Για την ανίχνευση των CD61, γλυκοφορίνης-A, CD68/PGM1, CD20/L26, CD3, CD8, Ki-67(MIB-1), CD34 και πρωτεϊνών *bcl-2* και *p53* προηγήθηκε της επώασης με το κυρίως αντίσωμα η επώαση σε διάλυμα κιτρικού νατρίου σε φούρνο μικροκυμάτων 350W τρεις φορές με ενδιάμεση ψύξη σε θερμοκρασία δωματίου. Η επώαση με το δευτεροταγές αντίσωμα καθώς και τα συμπλέγματα APAAP επαναλήφθηκαν δύο φορές 10 λεπτά και 5 λεπτά αντίστοιχα, για την ανίχνευση των μορίων Ki-67/MIB-1, *p53* και *Bcl-2*. Ως θετικοί μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν τομές αμυγδαλικού ιστού φυσιολογικού ατόμου για τον έλεγχο του *Bcl-2*, και τομές Hodgkin's λεμφώματος γνωστής θετικότητας για την πρωτεΐνη *p53*.

#### 4.8. Στατιστική ανάλυση

Η ομοιογένεια του δείγματος των μελετηθέντων ασθενών και φυσιολογικών μαρτύρων ελέγχθηκε με το στατιστικό κριτήριο  $\chi^2$ . Η ίδια δοκιμασία χρησιμοποιήθηκε μετά από διόρθωση κατά Yates για τη σύγκριση των αναλογιών των ασθενών και των μαρτύρων με αυξημένη απόπτωση. Τα αριθμητικά στοιχεία αναλύθηκαν με τη δοκιμασία "t" του Student. Όλες οι συσχετίσεις έγιναν με την μη-παραμετρική δοκιμασία Spearman. Μια πιθανότητα ίση ή μικρότερη από 5% θεωρήθηκε στατιστικά σημαντική.

#### **Βιβλιογραφία**

1. Papadaki HA, Palmblad J, Eliopoulos GD. Nonimmune chronic idiopathic neutropenia of adult: an overview. Eur J Haematol 2001; 67: 35-44.
2. Palmblad J, Papadaki HA, Eliopoulos GD. Acute and chronic neutropenias – What is new? J Intern Med 2001; 250: 476-491.

3. Ansari B, Coates PJ, Greenstein BD, Hall PA. In situ end-labelling detects DNA strand breaks in apoptosis and other physiological and pathological states. *J Pathol* 1993; 170: 1-8.
  4. Papadaki HA, Chatzivassili A, Stefanaki K, Koumaki V, Kanavaros P, Eliopoulos GD. Morphologically defined myeloid cell compartments, lymphocyte subpopulations and histological findings of bone marrow in patients with nonimmune chronic idiopathic neutropenia of adults. *Ann Hematol* 2000; 79: 563-570.
-

# Αποτελέσματα

Τα αποτελέσματα της μορφολογικής μελέτης των μυελικών επιχρισμάτων και οστεομυελικών βιοψιών των ασθενών και των υγιών μαρτύρων έχουν ήδη παρουσιαστεί αλλού [1,2]. Σχεδόν όλοι οι ασθενείς με CIN έχουν υποπλαστικό μυελό και στροφή προς τα αριστερά της κοκκιώδους, σειράς με χαμηλή σχέση M/E και αυξημένη σχέση πολλαπλασιαζόμενων προς ωριμάζοντα κύτταρα της κοκκιώδους σειράς.

**Απόπτωση σε ιστολογικές τομές.** Τα αποτελέσματα από τη μελέτη της απόπτωσης σε οστεομυελικές βιοψίες δίνονται στον Πίνακα 5.1. Παίρνοντας αφαίρετα την αναλογία 5% των αποπτωτικών κυττάρων στο ιστολογικό παρασκεύασμα, βρέθηκε ότι η μεγάλη αναλογία των ασθενών είχαν αυξημένη απόπτωση σε σχέση με τους μάρτυρες. Πράγματι, 24 από τους 36 ασθενείς, ήτοι ποσοστό 66.7%, είχαν ποσοστό αποπτωτικών κυττάρων ίσο ή μεγαλύτερο από 5% του συνόλου των εμπύρηνων μυελικών κυττάρων μη συμπεριλαμβανομένων των πολυμορφοπύρηνων κοκ-κιοκυττάρων (Εικόνα 5.1). Η προέλευση των αποπτωτικών κυττάρων δεν είναι εύκολο να καθοριστεί με τη μέθοδο ISEL που χρησιμοποιήθηκε, αλλά σε 5 ασθενείς με σημαντικά αυξημένη απόπτωση, παρατηρήθηκε κοκκίωση στο κυτταρόπλασμα κά-ποιων αποπτωτικών κυττάρων τύπου βλάστης, υποδηλώνοντας πιθανώς την κοκκιο-κυτταρική τους προέλευση. Σχεδόν σε όλους τους ασθενείς βρέθηκαν φαγοκυτω-θέντα αποπτωτικά σώματα στο κυτταρόπλασμα των φαγοκυττάρων του μυελού των οστών.

**Διπλή χρώση.** Προκειμένου να ελεγχθεί η φύση των αποπτωτικών κυττάρων, χρησιμοποιήθηκε διπλή χρώση στα κύτταρα με αντι-CD34 ή αντι-CD15

μονοκλωνικά αντισώματα και με ISEL τεχνική. Αποπτωτικά μυελικά CD34<sup>+</sup> κύτταρα δεν ανιχνεύθηκαν ούτε στο μυελό των ασθενών ούτε στο μυελό των μαρτύρων. Όλα σχεδόν τα CD34<sup>+</sup> κύτταρα που ανιχνεύθηκαν στις τομές ήταν στην ουσία ενδοθηλιακά κύτταρα. Διάσπαρτα αποπτωτικά κύτταρα ανιχνεύθηκαν στα CD15<sup>+</sup> κύτταρα των ασθενών και των μαρτύρων, αλλά σε κανένα από αυτούς το ποσοστό δεν υπερέβαινε το 5% των συνολικών CD15<sup>+</sup> κυττάρων. Έτσι, συμπεραίνεται ότι η αυξημένη απόπτωση που βρέθηκε στην απλή χρώση των ιστολογικών τομών στους πάσχοντες από CIN δεν πρέπει να αφορά στα ώριμα CD15<sup>+</sup> κύτταρα.

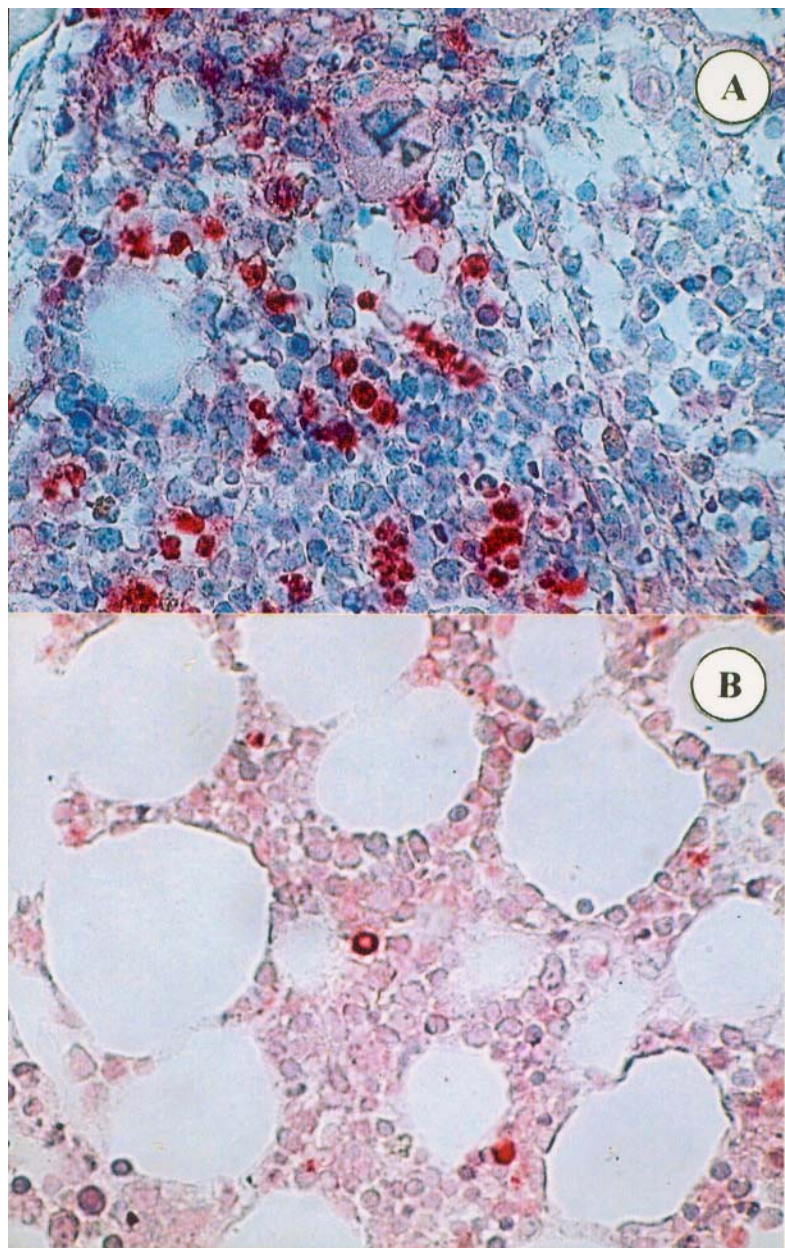
**Πίνακας 5.1.** Αναλογίες πασχόντων από CIN με αποπτωτικά κύτταρα 5% και πάνω των κυττάρων σε οστεομυελικές τομές

Αποπτωτικά κύτταρα	Ασθενείς (n=39)	Μάρτυρες (n=12)	Διαφορές (δείκτης <i>P</i> )*
< 5%	12 (33.3%)	12 (100%)	<i>P</i> < 0.01
≥ 5%	27 (66.7%)	0 (0.0%)	<i>P</i> < 0.01

\*  $\chi^2$  test μετά διόρθωση κατά Yates; Στατιστικά σημαντικό για  $P \leq 0.05$ .

**Απόπτωση σε ανοσομαγνητικά διαχωρισθέντα κύτταρα.** Για την ταυτοποίηση του κυτταρικού πληθυσμού που υπόκειται σε απόπτωση, παρασκευάστηκαν επιχρίσματα ανοσομαγνητικά διαχωρισθέντων καθαρών πληθυσμών CD34<sup>+</sup>, CD34<sup>+</sup>/CD33<sup>+</sup> και CD34<sup>-</sup>/CD33<sup>+</sup> από BMMCs στα οποία μελετήθηκε η απόπτωση με την τεχνική ISEL. Στον CD34<sup>+</sup> πληθυσμό ανιχνεύθηκαν αποπτωτικά κύτταρα σε αναλογία 5.03% ± 1.98% (SD) σε αντίθεση με την αναλογία 0.98% ± 0.42% που βρέθηκε στους υγιείς μάρτυρες. Οι αναλογίες αυτές διέφεραν μεταξύ τους σημαντικά στο επίπεδο του 1 ο/οο ( $P < 0.001$ ). Αυξημένη απόπτωση βρέθηκε επίσης στον CD34<sup>+</sup>/CD33<sup>+</sup> κυτταρικό πληθυσμό σε σχέση με τους φυσιολογικούς μάρτυρες (9.63 ± 2.45 έναντι 2.90 ± 1.10,  $P < 0.02$ ). Αντίθετα, η αναλογία των αποπτωτικών κυττάρων στον CD34<sup>-</sup>/CD33<sup>+</sup> κυτταρικό πληθυσμό δεν διέφερε στατιστικά μεταξύ ασθενών και φυσιολογικών μαρτύρων (Πίνακας 5.2). Τα ευρήματα αυτά υποδηλώνουν ότι η αυξημένη απόπτωση στα κύτταρα του μυελού των οστών οφείλεται, τουλάχιστον εν μέρει, στον αυξημένο

κυτταρικό θάνατο των  $CD34^+$  και  $CD34^+/CD33^+$  κυτταρικών πληθυσμών που αποτελούν προβαθμίδες των μυελικών κυττάρων.



**Εικόνα 5.1.** Παρουσία αποπτωτικών κυττάρων σε ιστολογικές τομές μυελού των οστών ασθενούς με CIN (A) και φυσιολογικού μάρτυρα (B). Η διαφορά στην αναλογία των αποπτωτικών κυττάρων είναι εμφανής.

*Έκφραση των πρωτεϊνών p53 και Bcl-2.* Η πρωτεΐνη p53 δεν ανιχνεύθηκε στις μυελικές ιστολογικές τομές των πασχόντων από CIN ή των φυσιολογικών μαρτύρων. Σε όλες τις περιπτώσεις των ασθενών και μαρτύρων η πρωτεΐνη Bcl-2 ανιχνεύθηκε

σε διάσπαρτα λεμφοκύτταρα και σε όλες τις λεμφοκυτταρικές αθροίσεις που βρέθηκαν σε μη παραδοκιδώδεις θέσεις χωρίς βλαστικά κέντρα στους ασθενείς. Η πρωτεΐνη ανιχνεύθηκε σε ποσοστό κάτω του 1% σε μορφολογικά αναγνωρίσιμες προβαθμίδες των κοκκιοκυττάρων τόσο στους ασθενείς όσο και στους μάρτυρες.

**Πίνακας 5.2.** Αναλογίες αποπτωτικών κυττάρων σε ανοσομαγνητικά διαχωρισμένα κύτταρα του μυελού

Κύτταρα	Ασθενείς	Μάρτυρες	Τιμή P*
CD34 <sup>+</sup>	5.03 ± 1.98	0.98 ± 0.42	P < 0.001
CD34 <sup>+</sup> /CD33 <sup>+</sup>	9.63 ± 2.45	2.90 ± 1.10	P < 0.02
CD34 <sup>-</sup> /CD33 <sup>+</sup>	2.61 ± 0.96	2.02 ± 0.93	NS

\* Student's t-test; Στατιστικά σημαντική διαφορά για P ≤ 0.05.  
NS, στατιστικά μη-σημαντική διαφορά.

**Έκφραση άλλων πρωτεϊνικών δεικτών.** Μυελούπεροξειδάση, γλυκοφορίνη-A και CD61 μόρια ανιχνεύθηκαν σε κύτταρα της μυελικής, ερυθράς και μεγακαρυοκυτταρικής σειράς, αντίστοιχα. Το CD68/KP-1 μόριο ανιχνεύθηκε σε πρόδρομες κοκκιοκυτταρικές προβαθμίδες και ιστιοκύτταρα, ενώ το CD68/PGM<sub>1</sub> μόριο βρέθηκε σε μερικά ιστιοκύτταρα και μονοκύτταρα. Σε όλες τις περιπτώσεις, τα μυελικά λεμφοκύτταρα εξέφραζαν CD45R/LCA μόρια, συχνά με δείκτες T-λεμφοκυττάρων και λιγότερο με δείκτες B-κυτταρικής διαφοροποίησης. Το Ki-67/MIB-1 μόριο που σχετίζεται με τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων εκφράζονταν στους ερυθροβλάστες σε όλους τους ασθενείς. Σε 22 περιπτώσεις, το μόριο εκφράζονταν σε ένα ποσοστό 1%-5% σε πρόδρομες κοκκιοκυτταρικές προβαθμίδες και ενίοτε σε μερικά μεγα-καρυοκύτταρα.

### **Βιβλιογραφία**

1. Papadaki HA, Chatzivassili A, Stefanaki K, Koumaki V, Kanavaros P, Eliopoulos GD. Morphologically defined myeloid cell compartments, lymphocyte subpopulations and histological findings of bone marrow in patients with nonimmune



chronic idiopathic neutropenia of adult. *Ann Hematol* 2000; 79: 563-570.

2. Papadaki HA, Gemetzi C, Damianaki A, Kosteas T, Psyllaki M, Koutala H, Bux J, Eliopoulos GD. Impaired granulocytopoiesis in chronic idiopathic neutropenia may be due to increased apoptosis of myeloid progenitor cells. *Blood* 2003; 101: 2591-2600.
-

## Κεφάλαιο 6°

# Συζήτηση και Συμπεράσματα

### 6.1. Συζήτηση

Όπως ήδη αναφέρθηκε, η πλειονότητα των πασχόντων από CIN έχουν υποκυτταρικό μυελό των οστών με στροφή προς τ' αριστερά της κοκκιώδους σειράς και μειωμένη σχέση μυελικής προς ερυθρά σειρά (M/E). Ελέγχθη ακόμη ότι ο λόγος του αριθμού των πολλαπλασιαζόμενων προς ωριμάζοντα κύτταρα της μυελικής σειράς είναι σαφώς αυξημένος [1]. Οι παρατηρήσεις αυτές οδήγησαν στη διερεύνηση βιολογικών παραμέτρων της αιμοποίησης συμπεριλαμβανομένης της κυτταρικής απόπτωσης, που φυσιολογικά εμπλέκονται στον πολλαπλασιασμό, τη διαφοροποίηση και την ωρίμανση των μυελικών προβαθμίδων. Τα αποτελέσματα από τη μελέτη της απόπτωσης με κυτταρομετρία ροής έχουν ήδη παρουσιασθεί αλλαχού [2]. Στην παρούσα μελέτη παρουσιάζονται τα αποτελέσματα από τη μελέτη της απόπτωσης των μυελικών προβαθμίδων σε ιστολογικές τομές και ανοσομαγνητικά απομονωθέντα καθαρά προγονικά και μορφολογικά αναγνωρίσιμα μυελικά κύτταρα των πασχόντων από CIN με την τεχνική της *in situ* end-labeling χρώσης (ISEL).

Τα αποτελέσματα από τη μελέτη μας αυτή επιβεβαιώνουν και συμπληρώνουν τα ευρήματα που περιγράφηκαν από τη μελέτη της απόπτωσης στους πάσχοντες από CIN με την τεχνική της κυτταρομετρίας ροής. Η μειωμένη παραγωγή ουδετερόφιλων κοκκιοκυττάρων στους πάσχοντες οφείλεται, τουλάχιστον εν μέρει, σε αυξημένη απόπτωση των προγονικών μυελικών κυτταρικών προβαθμίδων. Αναφέρθηκε ήδη ότι τα 2/3 των ασθενών που μελετήθηκαν είχαν αποπτωτικά κύτταρα περισσότερα από 5% του συνόλου των “μονοπύρηνων” κυττάρων του μυελού, ενώ όλοι οι μελετηθέντες φυσιολογικοί μάρτυρες είχαν ποσοστό αποπτωτικών κυττάρων κάτω του 5% του συνόλου των “μονοπύρηνων” μυελικών κυττάρων. Η διαφορά στη συχνότητα των

θετικών (απόπτωση ίση ή άνω του 5%) και αρνητικών (απόπτωση κάτω του 5%) μετα-ξύ ασθενών και φυσιολογικών μαρτύρων ήταν στατιστικά σημαντική με πιθανότητα λάθους μικρότερη του 1 ο/οο.

Επειδή τα κύτταρα του μυελού των οστών αποτελούν έναν ετερογενή κυτταρικό πληθυσμό και η τεχνική ISEL δεν επιτρέπει την ακριβή ταυτοποίηση της κυτταρικής φύσης των αποπτωτικών κυττάρων, εφαρμόσαμε τη διπλή χρώση των ιστολογικών τομών με αντι-CD34 ή αντι-CD15 μονοκλωνικών αντισωμάτων και χρώση κατά την τεχνική ISEL. Το CD34 είναι ένας δείκτης των προγονικών κυττάρων όλων των αιμοποιητικών κυτταρικών σειρών στο μυελό των οστών συμπεριλαμβανομένων των προγονικών προβαθμίδων της κοκκιώδους σειράς. Το CD15 είναι ένας δείκτης που εκφράζεται στα ώριμα και μορφολογικά αναγνωρίσιμα κύτταρα της κοκκιώδους σειράς. Στην παρούσα μελέτη δεν βρέθηκε κάποια σημαντική αύξηση στην αναλογία των αποπτωτικών κυττάρων στα CD15<sup>+</sup> κύτταρα, ενώ η αναλογία των αποπτωτικών CD34<sup>+</sup> κυττάρων δεν ήταν εύκολο να υπολογισθεί αφ' ενός λόγω της μικρής αναλογίας των κυττάρων αυτών μέσα στον πληθυσμό των κυττάρων του μυελού (υπολογίζεται σε 1 ανά 10000 κύτταρα), και αφ' ετέρου λόγω της συχνής έκφρασης του CD34 μορίου στα ενδοθηλιακά κύτταρα.

Έχει αποδειχθεί ότι οι προγονικές προβαθμίδες που είναι δεσμευμένες για την κοκκιώδη και μακροφαγική σειρά εκφράζουν τον επιφανειακό κυτταρικό δείκτη CD33. Αντι-CD33 μονοκλωνικό αντίσωμα κατάλληλο για ιστολογικές τομές που θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί στην παρούσα μελέτη, δεν είναι ακόμα διαθέσιμο. Έτσι, αξιολογήθηκε η απόπτωση σε επιχρίσματα ανοσομαγνητικά διαχωρισθέντων καθαρών κυτταρικών πληθυσμών CD34<sup>+</sup>, CD34<sup>+</sup>/CD33<sup>+</sup> και CD34<sup>-</sup>/CD33<sup>+</sup> κυττάρων. Στη μελέτη αυτή βρέθηκε ότι η απόπτωση ήταν σημαντικά αυξημένη στα CD34<sup>+</sup> και CD34<sup>+</sup>/CD33<sup>+</sup> κυτταρικά επιχρίσματα αλλά όχι και στα CD34<sup>-</sup>/CD33<sup>+</sup> τοιαύτα. Τα ευρήματα αυτά βρίσκονται σε απόλυτη συμφωνία με τα τοιαύτα της κυτταρομετρίας ροής και παρέχουν ισχυρές ενδείξεις ότι η αυξημένη απόπτωση που εμφανίζεται στα κύτταρα του μυελού των οστών των πασχόντων από CIN οφείλεται, τουλάχιστον εν μέρει, στην αυξημένη απόπτωση των CD34<sup>+</sup>/CD33<sup>+</sup> κυττάρων.

Η απόπτωση είναι ένα βιολογικό φαινόμενο που αρχικά περιγράφηκε από τον Kerr και τους συνεργάτες του το 1972 [3] και αργότερα αναγνωρίστηκε ως μια μορφή

κυτταρικού θανάτου που συμπληρώνει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την φυσιολογική ομοιόσταση των ιστών [4]. Η αυξημένη απόπτωση των μυελικών προγονικών κυττάρων του μυελού των οστών εμπλέκεται στην παθογένεια της ουδετεροπενίας που σχετίζεται με συγγενείς αιματολογικές διαταραχές, όπως τη βαριά συγγενή ουδετεροπενία (σύνδρομο Kostmann) [5,6], την κυκλική ουδετεροπενία [5,6], την μυελοκάθεξη [7] και το σύνδρομο Shwachman-Diamond [8]. Η αυξημένη απόπτωση των προγονικών μυελικών κυττάρων του μυελού εμπλέκεται επίσης στην παθογένεια των κυτταροπενιών που συνδέονται με μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα και απλαστική αναιμία [9]. Η αιτία και οι υποκείμενοι μηχανισμοί που οδηγούν στην ενεργοποίηση του αποπτωτικού μονοπατιού σε αυτές τις διαταραχές παραμένουν ακόμα άγνωστες.

Μελέτες από διάφορα εργαστήρια παρέχουν σοβαρές ενδείξεις ότι η απόπτωση στα προγονικά αιμοποιητικά κύτταρα μπορεί να προέλθει είτε από τη στέρωση των αντίστοιχων αιμοποιητικών αυξητικών παραγόντων ή από την ενεργοποίηση των αποπτωτικών μονοπατιών από εξωτερικά ερεθίσματα. Οι αιμοποιητικοί αυξητικοί παράγοντες δεν λείπουν από το αιμοποιητικό μικροπεριβάλλον στους πάσχοντες από CIN, όπως αποδείχθηκε από τα αυξημένα επίπεδα του G-CSF (granulocyte colony-stimulating factor) καθώς και τα φυσιολογικά επίπεδα του GM-CSF (granulocyte-macrophage colony-stimulating factor) που βρέθηκαν στα υπερκείμενα μακρόχρονων μυελικών καλλιεργείων (LTBMC) [10]. Δύο από τα εξωτερικά ερεθίσματα της απόπτωσης, ο TNF- $\alpha$  και ο FasL, μπορεί να παίζουν σημαντικό ρόλο στην ενεργοποίηση της απόπτωσης στα προγονικά κύτταρα της κοκκιώδους σειράς, δεδομένου ότι και τα δύο βρέθηκε ότι υπερεκφράζονται στο μικροπεριβάλλον του μυελού των οστών των ασθενών. Οι ασθενείς με CIN είχαν, πράγματι, αυξημένα επίπεδα TNF- $\alpha$  στο υπερκείμενο των LTBMC [2,10], καθώς επίσης και μία μεγάλη αναλογία CD34<sup>+</sup> προγονικών κυττάρων του μυελού των οστών των ασθενών εξέφραζαν το αντιγόνο Fas που σχετίζεται ισχυρά με το βαθμό της απόπτωσης, όπως αυτή μετρήθηκε με την κυτταρομετρία ροής [2]. Είναι δηλαδή πιθανό ότι η αυξημένη απόπτωση των μυελικών προγονικών κυττάρων των πασχόντων από CIN, να οφείλεται σε εξωτερικά ερεθίσματα συμπεριλαμβανομένου του TNF- $\alpha$  και του FasL, αλλά αυτή η πιθανότητα πρέπει να διερευνηθεί περισσότερο. Εξάλλου, δεν βρέθηκε κάποια αξιολογική έκφραση

των ογκογονιδίων *p53* και *bcl-2* που επηρεάζουν την απόπτωση των μυελικών προβαθμίδων, πράγμα που σημαίνει ότι η αυξημένη απόπτωση στις μυελικές προβαθμίδες της κοκκιώδους σειράς δεν πρέπει να σχετίζεται αιτιολογικά με διαταραγμένη έκφραση των ογκογονιδίων αυτών. Επίσης δεν βρέθηκε αύξηση του πολλαπλασιασμού των κοκκιοκυτταρικών προβαθμίδων με βάση την έκφραση του δείκτη πολλαπλασιασμού Ki-67.

Συμπερασματικά, οι ασθενείς με CIN έχουν αυξημένη απόπτωση στις ιστολογικές τομές του μυελού των οστών, όπως αυτή ανιχνεύθηκε με την τεχνική ISEL. Με διπλή χρώση, βρέθηκε ότι οι CD15<sup>+</sup> μορφολογικά αναγνωρίσιμες προβαθμίδες των κοκκιοκυττάρων δεν έχουν αυξημένη απόπτωση, ενώ η απόπτωση των CD34<sup>+</sup> κυττάρων δεν κατέστη δυνατόν να εκτιμηθεί λόγω της σχετικής σπανιότητάς τους αλλά και λόγω της θετικότητας των ενδοθηλιακών κυττάρων. Σε ανοσομαγνητικά διαχωρισθέντα κύτταρα βρέθηκε ότι αυξημένη απόπτωση έχουν τα CD34<sup>+</sup> και CD34<sup>+</sup>/CD33<sup>+</sup> αλλά όχι και τα CD34<sup>-</sup>/CD33<sup>+</sup> κύτταρα, πράγμα που σημαίνει ότι η βλάβη τοποθετείται στον αωρότερο πληθυσμό των προγονικών κοκκιοκυτταρικών προβαθμίδων. Το γιατί η βλάβη αφορά στον πληθυσμό αυτό δεν είναι γνωστό, πιθανολογείται όμως ότι ο πληθυσμός αυτός πρέπει να είναι περισσότερο ευαίσθητος στα εξωγενή αποπτωτικά ερεθίσματα. Όπως έδειξαν μελέτες στο Εργαστήριό μας με κυτταρομετρία ροής και μακρόχρονες μυελικές καλλιέργειες, το αιμοποιητικό μικροπεριβάλλον των ασθενών με CIN παράγει αυξημένα ποσά TNF-α που επάγουν την απόπτωση κυρίως μέσω της έκφρασης του αντιγόνου Fas. Τα ευρήματα της παρούσης μελέτης επιβεβαιώνουν τα αποτελέσματα της μελέτης της απόπτωσης με κυτταρομετρία ροής με τον έλεγχο του φαινομένου σε ιστολογικές τομές και καθαρούς πληθυσμούς προγονικών κυττάρων της κοκκιώδους σειράς.

### **Βιβλιογραφία**

1. Papadaki HA, Chatzivassili A, Stefanaki K, Koumaki V, Kanavaros P, Eliopoulos GD. Morphologically defined myeloid cell compartments, lymphocyte subpopulations and histological findings of bone marrow in patients with nonimmune chronic idiopathic neutropenia of adult. *Ann Hematol* 2000; 79: 563-570.
2. Papadaki HA, Gemetzi C, Damianaki A, Kosteas T, Psyllaki M, Koutala H, Bux J,

- Eliopoulos GD. Impaired granulocytopoiesis in chronic idiopathic neutropenia may be due to increased apoptosis of myeloid progenitor cells. *Blood* 2003; 101: 2591-2600.
3. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 1972; 26: 239-257.
  4. Raff MC (1992) Social controls on cell survival and cell death. *Nature* 1992; 356: 397-400.
  5. Dale DC, Person RE, Bolyard AA, Aprikyan AG, Bos G, Bonilla MA, Boxer LA, Kannourakis G, Zeidler C, Welte K, Benson KF, Horwitz M. Mutations in the gene encoding neutrophil elastase in congenital and cyclic neutropenia. *Blood* 2000; 96: 2317-2322.
  6. Aprikyan AA, Liles WC, Rodger E, Jonas M, Chi EY, Dale DC. Impaired survival of bone marrow hematopoietic progenitor cells in cyclic neutropenia. *Blood* 2001; 97: 147-153.
  7. Aprikyan AA, Liles WC, Park JR, Jonas M, Chi EY, Dale DC. Myelokathexis, a congenital disorder of severe neutropenia characterized by accelerated apoptosis and defective expression of bcl-x in neutrophil precursors. *Blood* 2000; 95: 320-327.
  8. Dror Y, Freedman MH. Shwachman-Diamond syndrome marrow cells show abnormally increased apoptosis mediated through the Fas pathway. *Blood* 2001; 97: 3011-3016.
  9. Young NS. Bone marrow failure syndromes. W.B.Saunders Company, 2000.
  10. Papadaki HA, Giouremou K, Eliopoulos GD. Low frequency of myeloid progenitor cells in chronic idiopathic neutropenia of adults may be related to increased release of TGF- $\beta_1$  by bone marrow stromal cells. *Eur J Haematol* 1999; 63: 154-162.
-

# Περίληψη

## **Μελέτη της απόπτωσης των μυελικών προγονικών κυττάρων σε οστεομυελικές βιοψίες και ανοσομαγνητικά διαχωρισθέντα μυελικά κύτταρα σε πάσχοντες από χρόνια ιδιοπαθή ουδετεροπενία**

Η χρόνια ιδιοπαθής ουδετεροπενία CIN είναι μια σχετικά συχνή κοκκιοκυτταρική διαταραχή που χαρακτηρίζεται από την παρατεταμένη «ανεξήγητη» ελάττωση του αριθμού των κυκλοφορούντων ουδετεροφίλων πολυμορφοπύρηνων κυττάρων (ΠΜΠ) κάτω από το κατώτερο όριο της φυσιολογικής διακύμανσης που αντιστοιχεί στην ηλικία και τη φυλή του ατόμου. Η αιτιολογία και ο υποκείμενος μηχανισμός της ουδετεροπενίας είναι άγνωστοι. Ωστόσο, προηγούμενες μελέτες στο Εργαστήριό μας έχουν δείξει ότι τουλάχιστον τρεις παράγοντες εμπλέκονται δυνητικά στην παθογένεια της νόσου, μειωμένη παραγωγή ΠΜΠ στο μυελό των οστών, αυξημένη έξοδος ΠΜΠ στους ιστούς και αυξημένη κατακράτηση ΠΜΠ στο σπλήνα.

Η μειωμένη παραγωγή ΠΜΠ στο μυελό έχει διερευνηθεί από πολλούς ερευνητές και έχει αποδοθεί σε μειωμένο αριθμό προγονικών κοκκιοκυτταρικών προβαθμίδων στο μυελό, σε μειονεκτική λειτουργία του αιμοποιητικού μικροπεριβάλλοντος, σε μειωμένη παραγωγή G-CSF και, ακόμη, σε αυξημένη παραγωγή αναστολέων της κοκκιοποίησης. Πρόσφατα, αποδείχθηκε με κυτταρομετρία ροής στο Εργαστήριό μας ότι η μειωμένη παραγωγή ΠΜΠ στους πάσχοντες οφείλεται σε αυξημένη απόπτωση των  $CD34^+/CD33^+$  μυελικών προγονικών προβαθμίδων που σχετίζεται με αυξημένη παραγωγή TNF- $\alpha$  από τα κύτταρα του αιμοποιητικού μικροπεριβάλλοντος.

Στην παρούσα μελέτη διερευνήθηκε το φαινόμενο της απόπτωσης των μυελικών προγονικών προβαθμίδων των ασθενών σε ιστολογικές τομές μυελού των οστών και ανοσομαγνητικά διαχωρισθέντα μυελικά προγονικά κύτταρα χρησιμοποιώντας την τεχνική ISEL (*in situ* end labeling technique). Μελετήθηκαν 39 ασθενείς με CIN και 12 φυσιολογικά άτομα ως μάρτυρες. Η τεχνική εφαρμόστηκε ως

“απλή χρώση” για τον έλεγχο της απόπτωσης στις ιστολογικές τομές και τα ανοσομαγνητικά διαχωρισθέντα  $CD34^+$ ,  $CD34^+/CD33^+$  και  $CD34^-/CD33^+$  κύτταρα, και ως “διπλή χρώση” για τον έλεγχο της απόπτωσης στα  $CD34^+$  και  $CD15^+$  κύτταρα στις ιστολογικές τομές με τη χρήση ειδικών μονοκλωνικών αντισωμάτων. Τα αποτελέσματα ελέγχθηκαν με τις στατιστικές δοκιμασίες  $\chi^2$ -test και t-test του Student.

Βρέθηκε ότι αποπτωτικά κύτταρα σε ποσοστό ίσο ή πάνω από 5% στις ιστολογικές τομές είχαν οι 66.7% των ασθενών αλλά κανένας από τους φυσιολογικούς μάρτυρες ( $P < 0.001$ ). Με τη διπλή χρώση των παρασκευασμάτων βρέθηκε ότι το ποσοστό των αποπτωτικών  $CD15^+$  μυελικών προγονικών κυττάρων δεν διέφερε στατιστικά μεταξύ ασθενών και φυσιολογικών μαρτύρων, ενώ το ποσοστό των αποπτωτικών  $CD34^+$  αιμοποιητικών κυττάρων δεν ήταν δυνατό να υπολογιστεί με ακρίβεια εξ’ αιτίας της παρουσίας των  $CD34^+$  ενδοθηλιακών κυττάρων. Στατιστικά σημαντική αύξηση της απόπτωσης παρατηρήθηκε στα επιχρίσματα  $CD34^+$  και  $CD34^+/CD33^+$  αλλά όχι και  $CD34^-/CD33^+$  ανοσομαγνητικά διαχωρισθέντων κυττάρων των ασθενών σε σχέση με τους μάρτυρες ( $P < 0.001$ ,  $P < 0.02$  και  $P > 0.05$ , αντίστοιχα).

Τα ευρήματα μας αυτά επιβεβαιώνουν και συμπληρώνουν προηγούμενες μελέτες στο Εργαστήριό μας που έγιναν με κυτταρομετρία ροής, και υποδηλώνουν την αυξημένη πράγματι απόπτωση των  $CD34^+$  και  $CD34^+/CD33^+$  κυττάρων στο μυελό των οστών των ασθενών με CIN αλλά όχι και των ωριμότερων  $CD34^-/CD33^+$  και  $CD15^+$  μυελικών προβαθμίδων των ΠΜΠ.

Ως τελικό συμπέρασμα υποστηρίζεται ότι η αυξημένη απόπτωση στα παραπάνω κυτταρικά διαμερίσματα ευθύνεται πιθανότατα για την ελαττωμένη παραγωγή ουδετερόφιλων κοκκιοκυττάρων στους πάσχοντες από CIN.



## Summary

### **Study of apoptosis of myeloid progenitor cells in bone marrow trephine biopsies and immunomagnetically isolated myeloid progenitor cells in patients with chronic idiopathic neutropenia**

CIN is a relatively frequent granulocyte disorder, which is characterized by the persistent unexplained reduction in the number of the circulating neutrophils below the lower limit of the normal distribution for a given ethnic population. The cause and the underlying pathogenetic mechanism of neutropenia are still unknown. However, previous studies in our Laboratory have shown that at least three factors are implicated in the pathogenesis of the disorder, decreased bone marrow neutrophil production, enhanced neutrophil extravasation into the tissues, and increased sequestration and/or extravasation into the spleen.

The decreased bone marrow neutrophil production has been studied by many scientists and has been ascribed to the reduced number of granulocyte progenitor cells in the bone marrow, to the impaired function of the hematopoietic microenvironment, to the reduced local production of G-CSF, and to the increased production of inhibitors of granulopoiesis. Recently, in our Laboratory it has been shown by the use of flow cytometry that the decreased neutrophil production in CIN patients is due to the increased apoptosis in the CD34<sup>+</sup>/CD33<sup>+</sup> myeloid progenitor cells, which correlates with the increased production of TNF- $\alpha$  by the hematopoietic microenvironment.

In the present study, the frequency of apoptotic cells in bone marrow trephine biopsies and cytopins of immunomagnetically isolated myeloid progenitor cells in patients with CIN was detected by the use of the ISEL technique (in situ end labeling technique). 39 patients with chronic idiopathic neutropenia (CIN) and 12 hematologically normal individuals were studied. The technique was applied as a “single stain” for the detection of apoptosis in histological sections and in immunomagnetically isolated CD34<sup>+</sup>, CD34<sup>+</sup>/CD33<sup>+</sup> and CD34<sup>-</sup>/CD33<sup>+</sup> cells and as a “double stain”

for the detection of apoptosis in CD34<sup>+</sup> and CD15<sup>+</sup> cells in histological sections by the use of specific monoclonal antibodies. The results were analyzed with the chi-square test and the student's t-test.

We have found that 66.7% of the patients but none of the controls displayed apoptotic cells equal to or higher than 5% of the total marrow mononuclear cells in bone marrow biopsies ( $P < 0.01$ ). In the double stain, we have also found that the proportion of apoptotic CD15<sup>+</sup> myeloid precursor cells did not differ significantly between patients and control subjects, while the proportion of apoptotic CD34<sup>+</sup> hemopoietic cells could not be estimated with accuracy because of the presence of the CD34<sup>+</sup> endothelial cells. Significantly increased apoptosis was noted in cytopins of immunomagnetically isolated patient CD34<sup>+</sup>, CD34<sup>+</sup>/CD33<sup>+</sup> cells but not CD34<sup>-</sup>/CD33<sup>+</sup> cells, compared to the controls ( $P < 0.001$ ,  $P < 0.02$  and  $P > 0.05$ , respectively).

These findings confirm and extend our previous observations by the use of flow cytometry, indicating that the increased apoptosis in patients' bone marrow cells concerns mainly the CD34<sup>+</sup> and CD34<sup>+</sup>/CD33<sup>+</sup> progenitor cell compartments and not the more mature CD34<sup>-</sup>/CD33<sup>+</sup> and CD15<sup>+</sup> cells. We conclude that this accelerated apoptosis in these compartments may account for the impaired bone marrow neutrophil production in patients with CIN.