

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΗ ΟΓΚΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ
ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ: Β. ΓΕΩΡΓΟΥΛΙΑΣ
ΚΑΘ/ΤΗΣ ΠΑΘΟΛΟΓΙΑΣ - ΟΓΚΟΛΟΓΙΑΣ

**ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΑΙΜΟΠΟΙΗΤΙΚΩΝ
ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ GM-CSF ΚΑΙ GCSF ΣΤΟ
ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ ΚΑΤΑ ΤΗΝ
ΦΑΣΗ ΤΗΣ ΜΥΕΛΙΚΗΣ ΑΝΑΠΛΑΣΗΣ**

ΕΥΑΝΘΙΑ ΕΛ. ΣΑΡΡΑ
ΠΑΘΟΛΟΓΟΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΚΡΗΤΗ 2004

*Σε εκείνον, που υπήρξε για μένα
συμπαραστάτης και δάσκαλος,
οδηγός, που με βοήθησε με τις γνώσεις,
το ήθος και το πάθος του
για την ιατρική και τον άνθρωπο,
να πλησιάσω και να αγγίξω
λίγη από την ευτυχία του
... τι σημαίνει
να ασκείς την ιατρική
ως λειτούργημα.*

Στον καθηγητή μου κ. Βασίλη Γεωργούλια

*Στους γονείς μου
... που η αγνότητα, η ανθρωπιά και η αγάπη τους,
κατόρθωσε να εκμηδενίσει την
χιλιομετρική μας απόσταση και να αποτελεί
την πιο όμορφη δύναμη
για να αγωνίζομαι και να κερδίζω τις μάχες μου.*

*Για την βοήθεια τους ευχαριστώ θερμά τις κυρίες:
Περάκη Μαρία Παπαδάκη Σοφία Αποστολάκη Στέλλα Σαλούστρου Γεωργία Κουταλά Ελένη
από το εργαστήριο Βιολογίας του καρκίνου του Πανεπιστημίου Κρήτης*

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1. <u>ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ</u>	7 – 21
2. <u>ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ</u>	22
α) Εισαγωγή	23 – 26
β) Ανάπτυξη – Ενεργοποίηση Πολλ/μός των Β-λεμφοκυττάρων	27 – 30
γ) Φαινότυπος Β – λεμφοκυττάρων	31 – 34
δ) Ανάπτυξη – ενεργοποίηση – πολλ/μός των Τ – λεμφοκυττάρων	35 – 40
ε) Φαινότυπος Τ – λεμφοκυττάρων	41 – 46
στ) Μνημονικά Β – Τ – κύτταρα	47 – 48
ζ) Φυσικά φονικά κύτταρα (NK)	49 – 50
η) Επίδραση της χημειοθεραπείας στους λεμφοκυτταρικούς υποπληθυσμούς	51 – 53
θ) Λεμφοκυτταρική διαφοροποίηση μετά από μεταμόσχευση μυελού	54 – 56
ι) Αποκατάσταση λεμφοκυτταρικών υποπληθυσμών μετά από χημειοθεραπεία	57 – 59
κ) Αιμοποιητικοί αυξητικοί παράγοντες	60
3. <u>ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ</u>	61
α) Στόχοι μελέτης	62
β) Υλικό – μέθοδοι	63 – 65
γ) Αποτελέσματα	66 – 74
δ) Συζήτηση	75 – 78
4. <u>ΠΕΡΙΛΗΨΗ</u>	79
5. <u>SUMMARY</u>	80
6. <u>ΠΙΝΑΚΕΣ – ΣΧΗΜΑΤΑ</u>	81 – 111
7. <u>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ</u>	112 – 122

ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

Γεννήθηκα το 1969 στην Αλεξανδρούπολη. Αποφοίτησα από το Λύκειο με άριστα το 1987. Το 1988 ξεκίνησα τις σπουδές μου στο Ιατρικό τμήμα του Πανεπιστημίου Αθηνών από όπου και αποφοίτησα το 1996 με βαθμό λίαν καλώς. Υπηρέτησα την υπηρεσία υπαίθρου στο περιφερειακό ιατρείο Ζωνιανών του νομού Ρεθύμνης μέχρι και τον Αύγουστο του 1997. Από τον Σεπτέμβριο του 1997 και για δεκαπέντε μήνες εργαζόμουν ως επιστημονικός συνεργάτης στην Πανεπιστημιακή Παθολογική Ογκολογική Κλινική του ΠΑ.Γ.Ν.Η. υπό την επίβλεψη του καθηγητή κου Γεωργούλια..

Τον Νοέμβριο του 1998 διορίστηκα στην Αθήνα, στο Νομαρχιακό Γενικό Νοσοκομείο Πατησίων για την απόκτηση του τίτλου της ειδικότητας Παθολογίας όπου και παρέμεινα μέχρι τον Νοέμβριο του 2003. Τον Δεκέμβριο του 2003 απέκτησα τον τίτλο ειδικότητας της Γενικής Παθολογίας. Καθόλη της διάρκειας της ειδίκευσης μου συμμετείχα ενεργά σε ερευνητικές εργασίες της Πανεπιστημιακής Παθολογικής Ογκολογικής Κλινικής .

ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΟ ΕΡΓΟ

A) PROCEEDINGS ΣΥΝΕΔΡΙΩΝ - ΒΙΒΛΙΑ

- 1) G.F. Samelis, P. Papacostas, G.P. Stathopoulos, V. Georgoulas, N. Androulakis, Ch. Kouroussis, S. Kakolyris, K. Kalbakis, E. Lydaki, E. Sarra, N. Tsavaris, K. Genatas and Ch. Papadimitriou: Second line treatment of locally advanced and metastatic pancreatic cancer with Docetaxel and Gemcitabine: A phase II trial of the Greek Cooperative Group for pancreatic cancer. Proceedings 2nd Balkan Congress of Oncology pp377-380, 1998.

B) ΒΡΑΒΕΥΘΕΙΣΕΣ ΕΡΓΑΣΙΕΣ

1. Ch. Kouroussis, N. Androulakis, D. Mavroudis, S. Kakolyris, S. Agelaki, E. Sarra, J. Souglakos, T. Kalikaki, G. Perisinaki, K. Mandalaki, V. Georgoulas: Phase I study of weekly docetaxel in advanced solid tumors.
9th International Congress on anti-cancer treatment, February 1999, Paris, France.
- 2) Σ. Κακολύρης, Γ. Σταθόπουλος, Γ. Αραβαντινός, Ν. Τσαβαρής, Ν. Ανδρουλάκης, Χ. Κουρούσης, Ε. Σαμαντάς, Α.Μ. Δημόπουλος, Γ. Φούντζηλας, Ε. Σάρρα, Δ. Χατζιδάκη, Γ. Σαμώνης, Β. Γεωργούλιας: Θεραπείας πρώτης γραμμής με docetaxel (D) και gemcitabine (G) σε ασθενείς με προχωρημένο καρκίνο παγκρέατος: Πολυκεντρική μελέτη φάσης II.
8^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Κλινικής Ογκολογίας, Αθήνα 1-3 Απριλίου 1999.

Γ) ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΙΣ ΣΕ ΕΛΛΗΝΙΚΑ ΣΥΝΕΔΡΙΑ

1. Α.Αλεξόπουλος, Χ.Κουρούσης, Σ.Κακολύρης, Ν.Μαλάμος, Γ.Ρηγάτος, Ν. Ανδρουλάκης, Θ. Γιαννακάκης, Σ. Παπαδούρης, Δ. Μαυρουδής, Ε. Σάρρα, Ι. Σουγκλάκος, Δ. Χατζιδάκη, Β. Γεωργούλιας: Μελέτη φάσης I/II του συνδυασμού Docetaxel (D) και Mitoxantrone (M) σε ασθενείς με μεταστατικό καρκίνο του μαστού.
7^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Κλινικής Ογκολογίας, 2-4 Απριλίου 1998.
2. Δ. Μαυρουδής, Χ. Κουρούσης, Ν. Μαλάμος, Α. Ποταμιάνου, Σ. Κακολύρης, Α. Αλεξόπουλος, Ν. Ανδρουλάκης, Ε. Παπαδάκης, Γ. Βλαχονικολής, Κ. Καλμπάκης, Σ. Αγγελάκη, Θ. Κωτσάκης, Ε. Σάρρα, Γ. Σουγκλάκος, Γ. Σαμώνης και Β. Γεωργούλιας:Μελέτη φάσης II του συνδυασμού Docetaxel-Gemcitabine σαν θεραπεία δεύτερης γραμμής σε μεταστατικό καρκίνο του μαστού.
7^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Κλινικής Ογκολογίας , 2-4 Απριλίου 1998.
3. Σ. Κακολύρης, Χ. Κουρούσης, Ι. Σουγκλάκος, Ν. Ανδρουλάκης, Δ. Μαυρουδής, Κ. Καλμπάκης, Α. Κωτσάκης, Ε. Σάρρα, Σ. Αγγελάκη, Γ. Πρινιανάκης, Ν. Βαρδάκης, Γ. Σαμώνης, Β. Γεωργούλιας: Μελέτη φάσης I με το συνδυασμό irinotecan (CPT-11) και cisplatin (CDDP) στο μεταστατικό μη μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα (ΜΜΚΠ).

7^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Κλινικής Ογκολογίας, 2-4 Απριλίου 1998.

4. Θ. Γιαννακάκης, Σ. Παπαδούρης, Ν. Ζήρας, Χ. Κουρούσης, Δ. Μαυρουδής, Κ. Καλμπάκης, Σ. Κακολύρης, Σ. Αγγελάκη, Δ. Ζιάννη, Ν. Βακαλούδη, Ε. Παπαδάκης, Ν. Ανδρουλάκης, Ι. Σουγκλάκος, Ε. Σάρρα, Δ. Χατζιδάκη, Β. Γεωργούλιας: Μελέτη φάσης I/II του συνδυασμού Docetaxel (DCT) και Carboplatin (CBDCA) σε ασθενείς με μη μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα (ΜΜΚΠ) σταδίου ΙΙβ και ΙV. Πρόδρομα Ανακοίνωση
7^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Κλινικής Ογκολογίας, 2-4 Απριλίου 1998.

- 5) Π. Παπακώστας, Γ.Π. Σταθόπουλος, Χ. Κουρούσης, Σ. Αγγελάκη, Γ. Σαμέλης, Γ. Σουγκλάκος, Ε. Σάρρα, Β. Γεωργούλιας: Θεραπεία 1^{ης} γραμμής με Docetaxel (Taxotere) σε καρκίνο χοληφόρων.
7^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Κλινικής Ογκολογίας, 2-4 Απριλίου 1998.

- 6) Γ. Σουγκλάκος, Δ. Μαυρουδής, Σ. Κακολύρης, Χ. Κουρούσης, Ν. Ανδρουλάκης, Σ. Αγγελάκη, Κ. Καλμπάκης, Ε. Σάρρα, Ν. Βαρδάκης, Δ. Χατζιδάκη, Π. Μαλλιωτάκης, Κ. Μανδαλάκη, Γ. Σαμώνης, Β. Γεωργούλιας: Θεραπεία 1^{ης} γραμμής του προχωρημένου γαστρικού καρκίνου με docetaxel και υποστήριξη με G-CSF.
8^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Κλινικής Ογκολογίας, Αθήνα 1-3 Απριλίου 1999.

- 7) Σ. Κακολύρης, Γ. Σταθόπουλος, Γ. Αραβαντινός, Ν. Τσαβαρής, Ν. Ανδρουλάκης, Χ. Κουρούσης, Ε. Σαμαντάς, Α.Μ. Δημόπουλος, Γ. Φούντζηλας, Ε. Σάρρα, Δ. Χατζιδάκη, Γ. Σαμώνης, Β. Γεωργούλιας: Θεραπείας πρώτης γραμμής με docetaxel (D) και gemcitabine (G) σε ασθενείς με προχωρημένο καρκίνο παγκρέατος: Πολυκεντρική μελέτη φάσης ΙΙ.
8^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Κλινικής Ογκολογίας, Αθήνα 1-3 Απριλίου 1999.

- 8) Κ. Κανδύλης, Κ. Καλμπάκης, Γ. Σταυρακάκης, Γ. Βαρθαλίτης, Θ. Γιαννακάκης, Α. Αθανασιάδης, Α. Ποταμιάνου, Μ. Δεμίρη, Χ. Κουρούσης, Δ. Μαυρουδής, Σ. Κακολύρης, Ε. Σάρρα, Κ. Περυσινάκη, Γ. Σαμώνης, Β. Γεωργούλιας: Χημειοθεραπεία 1^{ης} γραμμής με 5-Φθοριουρακίλη (5-FU), Λευκοβορίνη (LV) και Ιρινοτεκάνη (CPT-11). Στον προχωρημένο κολο-ορθικό καρκίνο: Πολυκεντρική μελέτη φάσης ΙΙ.
8^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Κλινικής Ογκολογίας, Αθήνα 1-3 Απριλίου 1999.

- 9) Χ. Κουρούσης, Δ. Μαυρουδής, Θ. Γιαννακάκης, Ν. Ζήρας, Α. Αθανασιάδης, Σ. Κακολύρης, Ν. Ανδρουλάκης, Σ. Αγγελάκη, Ι. Σουγκλάκος, Ε. Σάρρα, Ν. Βαρδάκης, Α. Καλυκάκη, Β. Γεωργούλιας: Θεραπεία διάσωσης του προχωρημένου καρκίνου του παχέος εντέρου (ΠΚΠ) με συνδυασμό Οξαλιπλατίνας (L-OHP) και υψηλών δόσεων 5-Φλουορουρακίλης (5FU) και Λευκοβορίνης (LV) σε 48-ώρες συνεχή ΙV έκχυση.
8^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Κλινικής Ογκολογίας, Αθήνα 1-3 Απριλίου 1999.

- 10) Α. Ποταμιάνου, Χ. Κουρούσης, Α. Αλεξόπουλος, Ν. Μαλάμος, Θ. Παπαδούρης, Γ. Ρηγάτος, Χ. Κοσμάς, Σ. Κακολύρης, Δ. Μαυρουδής, Ν. Ανδρουλάκης, Ε. Σάρρα, Α. Καλυκάκη, Γ. Σαμώνης,

Β. Γεωργούλιας: Φάση I/II του συνδυασμού docetaxel και epirubicin σε προχωρημένο καρκίνο του μαστού.

8^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Κλινικής Ογκολογίας, Αθήνα 1-3 Απριλίου 1999.

- 11) Δ. Μαυρουδής, Χ. Κουρούσης, Σ. Κακολύρης, Ν. Ανδρουλάκης, Σ. Αγγελάκη, Κ. Καλμπάκης, Ε. Σάρρα, Γ. Σουγκλάκος, Κ. Μανδαλάκη, Γ. Σαμώνης, Β. Γεωργούλιας: Μελέτη φάσης I του συνδυασμού gemcitabine και oxaliplatin σε ασθενείς με συμπαγείς όγκους προχωρημένου σταδίου.

8^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Κλινικής Ογκολογίας, Αθήνα 1-3 Απριλίου 1999.

- 12) Γ. Σουγκλάκος, Α. Κωτσάκης, Ε. Σάρρα, Χ. Κουρούσης, Σ. Κακολύρης, Κ. Καλμπάκης, Ν. Βαρδάκης, Π. Μαλλιωτάκης, Β. Γεωργούλιας, Γ. Σαμώνης: Μη ουδετεροπενικές λοιμώξεις σε ασθενείς που έλαβαν σχήματα με docetaxel για την θεραπεία συμπαγών όγκων.

8^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Κλινικής Ογκολογίας, Αθήνα 1-3 Απριλίου 1999.

- 13) Δ. Μαυρουδής, Χ. Κουρούσης, Σ. Κακολύρης, Ν. Ανδρουλάκης, Σ. Αγγελάκη, Κ. Καλμπάκης, Ε. Σάρρα, Γ. Σουγκλάκος, Ι. Μυξάκη, Π. Μαλλιωτάκης, Γ. Σαμώνης, Β. Γεωργούλιας: Μελέτη φάσης I συνδυασμού gemcitabine και oxaliplatin σε ασθενείς με συμπαγείς όγκους προχωρημένου σταδίου.

10^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Ογκολογίας, Θεσσαλονίκη 24-28 Νοεμβρίου 1999.

- 14) Σ. Κακολύρης, Γ. Σταθόπουλος, Γ. Αραβαντινός, Ν. Τσαβαρής, Δ. Ρέππα, Χ. Κουρούσης, Ε. Σαμαντάς, Α.Μ. Δημόπουλος, Γ. Φούντζηλας, Ε. Σάρρα, Μ. Εργαζάκης, Ε. Κρέμος, Π. Μαλλιωτάκης, Β. Γεωργούλιας: Θεραπεία πρώτης γραμμής με docetaxel (D) και gemcitabine (G) σε ασθενείς με προχωρημένο καρκίνο παγκρέατος. Πολυκεντρική μελέτη φάσης II.

10^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Ογκολογίας, Θεσσαλονίκη 24-28 Νοεμβρίου 1999.

- 15) Χ. Κουρούσης, Ι. Σουγκλάκος, Θ. Γιαννακάκης, Ν. Ζήρας, Ν. Βαρδάκης, Σ. Αγγελάκη, Χ. Πανόπουλος, Α. Αθανασιάδης, Δ. Μαυρουδής, Κ. Καλμπάκης, Α. Ιζμπαράχ, Δ. Ρέππα, Ε. Κρέμος, Ε. Σάρρα, Ι. Μιξάκη, Β. Γεωργούλιας: Θεραπεία διάσωσης με oxaliplatin (L-OHP) και υψηλές δόσεις leucovorin (LV) και 5-fluorouracil (5-FU) σε ασθενείς με προχωρημένο καρκίνο του παχέος εντέρου (ΚΠΕ).

10^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Ογκολογίας, Θεσσαλονίκη 24-28 Νοεμβρίου 1999.

- 16) Β. Γεωργούλιας, Ε. Παπαδάκης, Α. Αλεξόπουλος, Μ. Βεσλεμές, Α. Ράπτη, Χ. Κουρούσης, Ν. Βαρδάκης, Ι. Σουγκλάκος, Ε. Σάρρα, Α. Κωτσάκης, Ε. Κρέμος, Δ. Ρέππα, Ι. Μιξάκη, Β. Ζιάννη: Τυχαίοποιημένη μελέτη του συνδυασμού docetaxel/cisplatin και docetaxel/CDDP σε ασθενείς με προχωρημένο μη-μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονας: Προκαταρκτικά αποτελέσματα της Ελληνικής Συνεργατικής Ομάδας για τον καρκίνο του πνεύμονας. 10^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Ογκολογίας, Θεσσαλονίκη 24-28 Νοεμβρίου 1999.

- 17) Ε.Σάρρα, Α. Κωτσάκης, Γ. Σαμώνης, Β. Γεωργούλιας: Ανίχνευση του m-RNA της κυτταροκερατίνης 19 στο αίμα ασθενών με χειρουργήσιμο καρκίνο του μαστού-Επίδραση της

συμπληρωματικής χημειοθεραπείας και ορμονοθεραπείας. Βήμα Κλινικής Ογκολογίας, Απρίλιος,41:1999 (*abstract*)

- 18)** Χ. Κουρούσης, Γ. Σουγκλάκος, Θ. Γιαννακάκης, Α. Αθανασιάδης, Ν. Ζήρας, Χ. Πανόπουλος, Ι. Μιξιάκη, Ε. Σάρρα, Β. Γεωργούλιας: Θεραπεία διάσωσης προθεραπευμένων με irinotecan με καρκίνο του παχέος εντέρου (ΚΠΕ) με οξαλιπλατίνα (L-OHP) και μεγάλες δόσεις 5-φλουοροουρακίλης και λευκοβορίνης.
9^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Κλινικής Ογκολογίας 15-17 Απριλίου 2000, Λευκωσία.
- 19)** Δ.Μαυρουδής,Λ.Βαμβακάς,Β.Μποζιονέλου,Ε.Αδαμτζίκη,Ζ.Σαρδελής,Χ.Κουρούσης,Σ.Κακολύρης,Σ.Αγγελάκη,Δ.Ρέππα,Ε.Κρέμος,Ε.Σάρρα, Β.Γεωργούλιας.
Paclitaxel-cisplatin-etoposide (TEP) έναντι cisplatin-etoposide (EP) σαν θεραπεία πρώτης γραμμής σε μικροκυτταρικό καρκίνο του πνευμονα (SCLC).Προκαταρκτική ανάλυση μιας πολυκεντρικής τυχαιοποιημένης μελέτης φάσης II.
10^ο Παγκρήτιο Ιατρικό Συνέδριο, Ρέθυμνο 9-12 Νοεμβρίου 2000
- 20)** Ε.Σάρρα, Α.Μητροπούλου, Γ.Μπούτος, Δ.Μαντζουράτος: Μελέτη της επαναπόλωσης του ηλεκτροκαρδιογραφήματος σε άτομα με χολοκυστοπάθεια. 26ο Πανελλήνιο Ιατρικό Συνέδριο, Μάιος 2000 (ανακοίνωση).

Δ) ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΙΣ ΣΕ ΔΙΕΘΝΗ ΣΥΝΕΔΡΙΑ

- 1) S. Papadaki, E. Sarra, Ch. Kouroussis, Th. Kotsakis, L. Vamvakas, E. Stefanakis, E. Mavromanolakis, J. Vlachonikolis, V. Georgoulis: Lymphocyte abnormalities during post-chemotherapy myelosuppression and bone marrow regeneration in patients with solid tumors. 7th International Congress on Anti-cancer Treatment, Paris, France February 1997.
- 2) A. Alexopoulos, Ch. Kouroussis, S. Kakolyris, N. Malamos, G. Rigatos, N. Androulakis, Th. Giannakakis, S. Papadouris, D. Mavroudis, E. Sarra, J. Souglakos, D. Hatzidaki, V. Georgoulis: A phase I/II study of docetaxel (D) and Mitoxantrone (M) in Metastatic breast cancer MBC. Program/Proceedings American Society of Clinical Oncology. Thirty -Fourth Annual Meeting 16-19, 1998 Los Angeles , CA.
- 3) D. Mavroudis, Ch. Kouroussis, N. Malamos, A. Potamianou, S. Kakolyris, A. Alexopoulos, N. Androulakis, E. Papadakis, J. Vlachonikolis, K. Kalbakis, S. Agelaki, Th. Kotsakis, E. Sarra, J. Souglakos, G. Samonis, and V. Georgoulis. For the Greek Breast Cancer Cooperation Group. A phase II trial of Docetaxel and Gemcitabine as second line treatment in metastatic breast cancer. Program/Proceedings American Society of Clinical Oncology. Thirty-fourth Annual Meeting May 16-19 1998 Los Angeles, CA.
- 4) T. Giannakakis, S. Papadouris, N. Ziras, Ch. Kouroussis, D. Mavroudis, K. Kalbakis, S. Kakolyris, S. Agelaki, D. Ziani, N. Vakaloudi, E. Papadakis, N. Androulakis, J. Souglakos, E. Sarra, D. Hatzidaki and V. Georgoulis. For the Greek Lung Cancer Cooperative Group. Phase I/II study of Docetaxel (D) and Carboplatin (CBDCA) as 1st line chemotherapy in advanced non-small cell lung cancer (NSCLC) preliminary results. Program/Proceedings American Society of Clinical Oncology. Thirty -fourth Annual Meeting May 16-19 1998 Los Angeles, CA.
- 5) S. Kakolyris, Ch. Kouroussis, J. Souglakos, N. Androulakis, D. Mavroudis, K. Kalbakis, A. Kotsakis, E. Sarra, S. Agelaki, G. Prinianakis, N. Vardakis, G. Samonis, V. Georgoulis, Department of Medical Oncology, School of Medicine, University of Crete, Greece: Phase I study of irinotecan (CPT-11) and cisplatin (CDDP) combination in metastatic non-small cell lung cancer (NSCLC). Program/Proceedings American Society of Clinical Oncology. Thirty -fourth Annual Meeting May 16-19 1998 Los Angeles, CA.
- 6) D. Mavroudis, N. Malamos, Ch. Kouroussis, S. Agelaki, Th. Giannakakis, A. Alexopoulos, I. Stavrakakis, A. Potamianou. N. Ziras, G. Rigatos, Ch. Kosmas, J. Souglakos, N. Vardakis, E. Sarra, S. Papadouris, Ch. Georganta, V. Georgoulis. From the Greek Breast Cancer Cooperative Group: Department of Medical Oncology, University General Hospital of Heraklion, 71110

Heraklion, Greece: Salvage chemotherapy of metastatic breast cancer with docetaxel and gemcitabine: A multicenter phase II trial.

Journal of BUON, p 47, vol. 3, suppl A, September 1998.

- 7) N. Androulakis, Ch. Kouroussis, S. Kakolyris, E. Sarra, J. Souglakos, K. Kalbakis, S. Aggelaki, T. Kalikaki, S. Kaois, N. Vardakis, G. Samonis, V. Georgoulis. Department of Medical Oncology, University General Hospital of Heraklion, 71110 Heraklion, Greece: Monotherapy with docetaxel and granulocyte colony-stimulating factor in advanced gastric cancer. Journal of BUON, p 35, vol. 3, suppl A, September 1998.
- 8) G. Samelis, P. Papakostas, N. Tsavaris, K. Genatas, G. Aravantinos, N. Androulakis, Ch. Kouroussis, S. Kakolyris, K. Kalbakis, E. Lydaki, Ch. Papadimitriou, E. Sarra, G.P. Stathopoulos, V. Georgoulis. From the Greek Pancreatic Cancer Cooperative Group; Dpt of Medical Oncology, University General Hospital of Heraklion, 71110 Heraklion Crete, Greece: Second-line treatment of locally advanced and metastatic pancreatic cancer with docetaxel and gemcitabine: A phase II trial of the Greek Cooperative Group for lung cancer. Journal of BUON, p 36, vol. 3, suppl A, September 1998.
- 9) A. Alexopoulos, Ch. Kouroussis, N. Malamos, G. Rigatos, Th. Giannakakis, N. Androulakis, S. Kakolyris, D. Mavroudis, E. Stavrinidis, G. Rigatos, S. Agelaki, Ch. Kosmas, J. Souglakos, N. Vardakis, F. Apostolaki, E. Sarra, V. Georgoulis. From the Greek Breast Cancer Cooperative Group: Department of Medical Oncology, University General Hospital of Heraklion, 71110 Heraklion, Greece: Treatment of metastatic breast cancer with intensifies combination of docetaxel and mitoxantrone: A multicenter phase II study. Journal of BUON, p 110, vol. 3, suppl A, September 1998.
- 10) Ch. Kouroussis, D. Mavroudis, S. Kakolyris, N. Androulakis, S. Agelaki, K. Kalbakis, E. Sarra, J. Souglakos, T. Kalikaki, G. Perisinaki, S. Kois, V. Georgoulis. Dpt of Medical Oncology, University General Hospital of Heraklion, 71110 Heraklion, Greece: Phase I study of weekly paclitaxel in advanced solid tumors: A preliminary report. Journal of BUON, p 150, vol 3, suppl A, September 1998.
- 11) S. Kakolyris, Ch. Kouroussis, J. Souglakos, N. Androulakis, D. Mavroudis, K. Kalbakis, A. Kotsakis, E. Sarra, S. Aggelaki, G. Samonis, V. Georgoulis. Department of Medical Oncology, School of Medicine, University of Crete, Greece. Phase I Study of Irinotecan (CPT-11) and cisplatin (CDDP) combination in metastatic non-small cell lung cancer (NSCLC). Journal of BUON, p 253, vol. 3, suppl A, September 1998.
- 12) E. Papadakis, Ch. Kouroussis, N. Androulakis, S. Agelaki, F. Apostolopoulou, E. Palamidas, A. Rapti, E. Sarra, V. Tziani, E. Bania, A. Agelidou, Th. Gianakakis, K. Kandyliis, A. Adravanis, F. Apostolaki, V. Georgoulis. The Greek Cooperative Group for Lung Cancer, Dpt of Medical Oncology, University General Hospital of Heraklion, 71110 Heraklion, Crete, Greece: Second-

line treatment of non- small cell lung carcinomas with vinorelbine and ifosfamide:
Preliminary results of a phase II trial of the Greek Cooperative group for lung cancer.
Journal of BUON, p 254, vol. 3, suppl A, September 1998.

- 13) Th. Giannakakis, D. Mavroudis, S. Papadouris, Ch. Kouroussis, S. Kakolyris, K. Kalbakis, S. Agelaki, D. Zianni, V. Zianni, E. Lidaki, N. Vakaloudi, E. Papadakis, N. Androulakis, J. Souglakos, S. Kois, E. Sarra, D. Hatzidaki, V. Georgoulis. From the Greek Cooperative Group for Lung Cancer, Dpt of Medical Oncology, University General Hospital og Heraklion, 71110 Heraklion, Crete, Greece: Phase I/II trial of docetaxel (D) and carboplatin (CBDCA) as first-line chemotherapy in advanced non-small cell lung cancer (NSCLC).
Journal of BUON, p 255, vol 3, suppl A, September 1998.
- 14) S. Kakolyris, Ch. Kouroussis, J. Souglakos, N. Androulakis, D. Mavroudis, K. Kalbakis, A. Kotsakis, E. Sarra, S. Aggelaki, G. Prinianakis, N. Vardakis, G. Samonis, V. Georgoulis. Department of Medical Oncology, School of Medicine, University of Crete, Greece: Phase I study of irinotecan (CPT-11) and cisplatin (CDDP) combination in metastatic non-small cell lung cancer (NSCLC).
3rd International Congress on Lung Cancer, October 31-November 4, 1998, Rhodes.
- 15) Th. Giannakakis, D. Mavroudis, S. Papadouris, Ch. Kouroussis, N. Ziras, S. Kakolyris, K. Kalbakis, S. Agelaki, D. Zianni, V. Zianni, E. Lidaki, N. Vakaloudi, E. Papadakis, N. Androulakis, J. Souglakos, S. Kois, E. Sarra, D. Hatzidaki, V. Georgoulis. From the Greek Cooperative Group for Lung Cancer. Dpt of Medical Oncology, University General Hospital of Heraklion, 71110 Heraklion, Crete, Greece: Phase I/II trial of docetaxel (D) and carboplatin (CBDCA) as first-line chemotherapy in advanced non-small cell lung cancer (NSCLC).
3rd International Congress on Lung Cancer, October 31-November 4, 1998, Rhodes.
- 16) V. Georgoulis, Ch. Kouroussis, N. Androulakis, S. Kakolyris, M.A. Dimopoulos, E. Papadakis, D. Bouros, F. Apostolopoulou, Ch. Papadimitriou, A. Agelidou, V. Tzianni, F. Apostolaki, K. Hatzakis, K. Kalbakis, A. Kotsakis, E. Sarra, N. Vardakis, J. Vlachonikolis. The Greek Cooperative Group for Lung Cancer. Dpt of Medical Oncology, University General Hospital of Heraklion, 71110 Heraklion, Crete, Greece: Front-line treatment of advanced non-small cell lung cancer with docetaxel and gemcitabine: A multicenter phase II trial.
3rd International Congress on Lung Cancer, October 31-November 4, 1998, Rhodes.
- 17) E. Papadakis, Ch. Kouroussis, N. Androulakis, S. Agelaki, F. Apostolopoulou, F. Palamidis, A. Rapti, E. Sarra, V. Tziani, E. Bania, A. Agelidou, Th. Giannakakis, K. Kandyliis, A. Adravanis, F. Apostolaki, V. Georgoulis. The Greek Cooperative Group for Lung Cancer: Second-line treatment of non-small cell lung carcinomas with vonirelbine and ifosfamide: Preliminary results of a phase II trial of the Greek Cooperative Group for Lung Cancer.
Journal of the International Association for the study of lung cancer, 1998.

- 18) G. Panagos, D. Mavroudis, A. Potamianou, N. Malamos, Ch. Kouroussis, S. Kakolyris, J. Souglakos, E. Sarra, Th. Giannakakis, V. Georgoulas. The Greek Cooperative Group for Breast Cancer: Phase I study of docetaxel and epirubicin in advanced breast cancer. 23rd ESMO Congress, November 6-10 1998, Athens, Greece.
- 19) N. Androulakis, Ch. Kouroussis, S. Kakolyris, E. Sarra, K. Kalbakis, T. Kalikaki, S. Kois, N. Vardakis, G. Samonis, V. Georgoulas. Monotherapy with docetaxel and granulocyte colony-stimulating factor in advanced gastric cancer. 23rd ESMO Congress, November 6-10 1998, Athens, Greece.
- 20) Th. Giannakakis, S. Papadouris, Ch. Kouroussis, K. Kalbakis, V. Tzianni, E. Lidaki, N. Androulakis, J. Souglakos, E. Sarra, V. Georgoulas, from the Greek Cooperative Group for Lung Cancer: Phase I/II trial of docetaxel (D) and Carboplatin (CBDCA) as first-line chemotherapy in advanced non-small cell lung cancer (NSCLC). 23rd ESMO Congress, November 6-10 1998, Athens, Greece.
- 21) V. Geogoulas, Ch. Kouroussis, S. Kakolyris, M.A. Dimopoulos, E. Papadakis, F. Apostolopoulou, A. Agelidou, V. Tzianni, E. Sarra, N. Vardakis, from the Greek Cooperative Group for Lung Cancer: Front-line treatment of advanced non-small cell lung cancer with docetaxel and gemcitabine: A multicenter phase II trial. 23rd ESMO Congress, November 6-10 1998, Athens, Greece.
- 22) S. Agelaki, D. Mavroudis, S. Kakolyris, Ch. Kouroussis, K. Kalbakis, E. Sarra, J. Souglakos, T. Kalikaki, G. Perisinaki, V. Georgoulas: Phase I study of weekly paclitaxel in advanced solid tumors: A preliminary report. 23rd ESMO Congress, November 6-10 1998, Athens, Greece.
- 23) S. Kakolyris, Ch. Kouroussis, J. Souglakos, N. Androulakis, D. Mavroudis, K. Kalbakis, A. Kotsakis, E. Sarra, S. Agelaki, G. Samonis, V. Georgoulas: Phase I study of irinotecan (CPT-11) and cisplatin (CDDP) combination in metastatic non-small cell lung cancer (NSCLC). 23rd ESMO Congress, November 6-10 1998, Athens, Greece.
- 24) S. Kakolyris, Ch. Kouroussis, J. Souglakos, N. Androulakis, D. Mavroudis, K. Kalbakis, A. Kotsakis, E. Sarra, S. Agelaki, G. Samonis, V. Georgoulas: Phase I study of Irinotecan (CPT-11) and Cisplatin (CDDP) combination in metastatic non-small cell lung cancer (NSCLC). 5th Central European Lung Cancer Conference, Prague, September 13-16, 1998.
- 25) Th. Giannakakis, D. Mavroudis, S. Papadouris, Ch. Kouroussis, S. Kakolyris, K. Kalbakis, S. Agelaki, D. Zianni, V. Zianni, E. Lidaki, N. Vakaloudi, E. Papadakis, N. Androulakis, J. Souglakos, S. Kois, E. Sarra, D. Hatzidaki, V. Georgoulas: Phase I/II trial of Docetaxel (D) and Carboplatin (CDDP) as first-line chemotherapy in advanced non-small lung cancer (NSCLC). 5th Central European Lung Cancer Conference, Prague, September 13-16, 1998.

- 26) V. Georgoulas, Ch. Kouroussis, N. Androulakis, S. Kakolyris, AM. Dimopoulos, E. Papadakis, D. Bouros, F. Apostolopoulou, Ch. Papadimitriou, A. Agelidou, V. Tzianni, F. Apostolaki, K. Hatzakis, K. Kalbakis, A. Kotsakis, E. Sarra, N. Vardakis, J. Vlachonikolis, The Greek Cooperative group for Lung Cancer: Front-line treatment of advanced non-small cell lung cancer with docetaxel and gemcitabine: A multicenter phase II trial.
5th Central European Lung Cancer Conference, Prague, September 13-16, 1998.
- 27) E. Papadakis, Ch. Kouroussis, N. Androulakis, S. Agelaki, F. Apostolopoulou, F. Palamidis, A. Rapti, E. Sarra, V. Tzianni, E. Bania, A. Agelidou, Th. Giannakakis, K. Kandyliis, A. Adravanis, A. Apostolaki, V. Georgoulas, the Greek Cooperative Group for Lung Cancer: Second-line treatment of non-small cell lung carcinomas with vinorelbine and ifosfamide: Preliminary results of a phase II trial of the Greek Cooperative Group for Lung Cancer.
5th Central European Lung Cancer Conference, Prague, September 13-16, 1998
- 28) V. Georgoulas, Ch. Kouroussis, E. Papadakis, S. Kakolyris, M.A. Dimopoulos, F. Apostolopoulou, X. Tsiafaki, E. Bania, V. Tzianni, A. Kostakis, E. Sarra, N. Vardakis: Efficacy of docetaxel/gemcitabine combination as first-line treatment of non-small cell lung cancer.
9th International Congress on anti-cancer treatment, February 1999, Paris, France.
- 29) Ch. Kouroussis, D. Mavroudis, Th. Giannakakis, N. Ziras, A. Athanasiadis, S. Kakolyris, N. Androulakis, K. Kalbakis, S. Agelaki, J. Souglakos, E. Sarra, N. Vardakis, V. Georgoulas. The Greek Cooperative Group for Colorectal Cancer: Biweekly Oxaliplatin (L-OHP) with high-dose Leucovorin (LV) and 5-Fluorouracil (5-FU) 48-hour continuous infusion in pretreated patients with advanced colorectal cancer (CRC).
9th International Congress on anti-cancer treatment, February 1999, Paris, France.
- 30) Ch. Kouroussis, N. Androulakis, D. Mavroudis, S. Kakolyris, S. Agelaki, E. Sarra, J. Souglakos, T. Kalikaki, G. Perisinaki, K. Mandalaki, V. Georgoulas: Phase I study of weekly docetaxel in advanced solid tumors.
9th International Congress on anti-cancer treatment, February 1999, Paris, France.
- 31) G. Panagos, D. Mavroudis, A. Potamianou, N. Malamos, Ch. Kosmas, Ch. Kouroussis, S. Kakolyris, E. Xydakis, J. Souglakos, E. Sarra, Th. Giannakakis, V. Georgoulas: Phase I study of docetaxel and epirubicin in advanced breast cancer.
9th International Congress on anti-cancer treatment, February 1999, Paris, France.
- 32) Ch. Kouroussis, A. Alexopoulos, T. Giannakakis, G. Rigatos, S. Papadouris, S. Kakolyris, D. Mavroudis, N. Androulakis, E. Sarra, D. Hatzidaki, G. Samonis, G. Panagos, V. Georgoulas: A phase I/II study of docetaxel and epirubicin in advanced breast cancer (ABC).
Thirty-fifth Annual Meeting of ASCO, May 15-18 Atlanta, 1999

- 33) D. Mavroudis, Ch. Kouroussis, S. Kakolyris, N. Androulakis, S. Agelaki, K. Kalbakis, E. Sarra, J. Souglakos, D. Hatzidaki, G. Samonis, V. Georgoulis: A phase I study of gemcitabine and oxaliplatin combination in patients with advanced solid tumors.
Thirty-fifth Annual Meeting of ASCO, May 15-18 Atlanta, 1999
- 34) S. Kakolyris, G. Stathopoulos, N. Tsavaris, N. Androulakis, Ch. Kouroussis, E. Samantas, A.M. Dimopoulos, G. Foutzilas, E. Sarra, D. Hatzidaki, G. Samonis, V. Georgoulis: First-line treatment with docetaxel (D) and gemcitabine (G) in patients with advanced pancreatic cancer: A multicenter phase II study.
Thirty-fifth Annual Meeting of ASCO, May 15-18 Atlanta, 1999
- 35) D. Mavroudis, S. Kakolyris, Ch. Kouroussis, N. Androulakis, S. Agelaki, K. Kalbakis, E. Sarra, N. Vardakis, J. Souglakos, D. Hatzidaki, P. Malliotakis, G. Samonis, V. Georgoulis: First-line treatment of advanced gastric cancer with docetaxel monotherapy and granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF).
Thirty-fifth Annual Meeting of ASCO, May 15-18 Atlanta, 1999
- 36) S. Agelaki, P. Papakostas, G. Stathopoulos, G. Aravantinos, K. Kalbakis, E. Sarra, J. Souglakos, S. Kakolyris, Ch. Kouroussis, N. Androulakis, N. Vardakis, V. Georgoulis: Phase II study of docetaxel with G-CSF support as first-line treatment for unresectable or advanced biliary tract carcinoma: A multicenter phase II trial.
Thirty-fifth Annual Meeting of ASCO, May 15-18 Atlanta, 1999
- 37) Ch. Kouroussis, D. Mavroudis, Th. Giannakakis, N. Ziras, A. Athanasiadis, S. Kakolyris, N. Androulakis, K. Kalbakis, S. Agelaki, J. Souglakos, E. Sarra, N. Vardakis, V. Georgoulis: Biweekly oxaliplatin (L-OHP) with high-dose leucovorin (LV) and 5-fluorouracil (5-FU) 48-hour continuous infusion in pretreated patients with advanced colorectal cancer (CRC).
Thirty-fifth Annual Meeting of ASCO, May 15-18 Atlanta, 1999
- 38) N. Androulakis, E. Papadakis, E. Bania, F. Apostolopoulou, X. Tsiafaki, C. Kalofonos, A. Rapti, M. Toubis, K. Chainis, Ch. Kouroussis, E. Sarra, N. Vardakis, D. Hatzidaki, V. Georgoulis: Second line treatment with docetaxel (D) and gemcitabine (G) in patients with advanced non-small cell lung cancer (NSCLC): A multicenter phase II trial.
Thirty-fifth Annual Meeting of ASCO, May 15-18 Atlanta, 1999
- 39) K. Kalbakis, N. Kandyliis, J. Stavarakakis, J. Varthalitis, Th. Giannakakis, A. Athanasiadis, A. Potamianou, M. Demiri, Ch. Kouroussis, D. Mavroudis, S. Kakolyris, E. Sarra, D. Hatzidaki, G. Samonis, V. Georgoulis: First line chemotherapy with 5-fluorouracil (5-FU), leucovorin (LV) and Irinotecan (CPT-11) in advanced colorectal cancer (CRC): A multicenter phase II study.
Thirty-fifth Annual Meeting of ASCO, May 15-18 Atlanta, 1999.

- 40) J. Souglakos, A. Kotsakis, E. Sarra, S. Kakolyris, Ch. Kouroussis, S. Agelaki, N. Vardakis, K. Kalbakis, V. Georgoulas: Non neutropenia infections associated with docetaxel containing chemotherapy in patients with solid tumors ECCO-10, Vienna 12-16 September 1999.
- 41) Ch. Kouroussis, S. Kakolyris, D. Mavroudis, K. Kalbakis, S. Agelaki, E. Sarra, J. Souglakos, N. Vardakis, P. Malliotakis, V. Georgoulas: Front-line treatment of metastatic breast cancer (MBC) and non-small-cell lung cancer (NSCLC) with docetaxel and oxaliplatin (L-OHP): a dose escalation study.
10th International Congress on anti-cancer treatment January 31st–February 3rd 2000, Paris.
- 42) S. Agelaki, E. Papadakis, E. Bania, A. Agelidou, Ch. Kouroussis, S. Kakolyris, K. Kalbakis, S. Papadouris, A. Rapti, Ph. Palamidis, X. Tsiafaki, E. Sarra, S. Kremos, V. Georgoulas: Second-line treatment with vinorelbine and carboplatin in patients with advanced non-small cell lung cancer: A multicenter phase II study. 10th International Congress on anti-cancer treatment January 31st–February 3rd 2000, Paris.
- 43) S. Kakolyris, Ch. Kouroussis, D. Mavroudis, N. Androulakis, S. Agelaki, K. Kalbakis, E. Kremos, E. Sarra, J. Souglakos, N. Vardakis, V. Georgoulas: Second-line treatment with cisplatin and irinotecan (CPT-11) in patients with advanced non-small cell lung cancer (NSCLC).
10th International Congress on anti-cancer treatment January 31st–February 3rd 2000, Paris.
- 44) S. Kakolyris, Th. Giannakakis, Ch. Kouroussis, N. Ziras, K. Kalbakis, S. Papadouris, E. Michaelakis, G. Chainis, E. Sarra, M. Ergazakis, N. Vardakis, V. Georgoulas: Front line treatment of non-small cell lung carcinoma with docetaxel and carboplatin: A preliminary analysis of a multicenter phase II study. 10th International Congress on anti-cancer treatment January 31st–February 3rd 2000, Paris.
- 45) Ch. Kouroussis, J. Souglakos, Th. Giannakakis, A. Athanasiadis, N. Ziras, Ch. Panopoulos, S. Kakolyris, N. Androulakis, I. Mixaki, E. Sarra, V. Georgoulas: Biweekly oxaliplatin (L-OHP) with high-dose leukovorin (LV) and 5-fluorouracil (5-FU) in irinotecan pretreated patients with advanced colorectal cancer (ACC). Thirty-sixth Annual Meeting of ASCO, May 20-23, 2000, New Orleans
- 46) G.Michas, A.Papadopoulos, E.Sarra, P.Kotsakis: Extra pyramidal syndrome as a manifestation of temporal arteritis. Annals of the Rheumatic Diseases vol 60 supplement I, 2001(poster)
- 47) P. Papakostas, Ch. Kouroussis, N. Androulakis, G. Samelis, G. Aravantinos, K. Kalbakis, E. Sarra, J. Souglakos, S. Kakolyris, V. Georgoulas: First Line Chemotherapy with Docetaxel for Unresectable or Metastatic Carcinoma of the Biliary Tract.A Multicenter Phase II Study. Thirty-Seventh Annual Meeting of ASCO May12-15, 2001 San Francisco (abstr610).

Ε) ΠΛΗΡΕΙΣ ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ

- 1) Σ.Παπαδάκης, Κ. Καλμπάκης, Ε.Σάρρα, Β.Γεωργούλιας: Μεταβολές Λεμφοκυτταρικών υποπληθυσμών κατά τη φάση της απλασίας και της μυελικής αναγέννησης σε ασθενείς με συμπαγή νεοπλάσματα υπό χημειοθεραπεία. Βήμα Κλινικής Ογκολογίας 1997 1 (1):19-25
- 2) Vamvakas L, Kakolyris S, Sarra E, Georgoulis V: Irinotecan (CPT-11) in combination with infusional 5-fluorouracil and leucovorin(de Gramont regimen) as first-line treatment in patients with advanced colorectal cancer:a multicenter phase II study. Am J Clin Oncol,;25:65-70,2002
- 3) E.Sarra, A.Kotsakis, J.Souglakos, V.Georgoulis: Post-chemotherapy lymphopoiesis in patients with solid tumors is characterized by CD4+ cell proliferation. Anticancer Research 19:471-476, 1999
- 4) Kouroussis C, Souglakos J, Sarra E, Georgoulis V: Oxaliplatin With high-dose leucovorin and infusional 5-fluorouracil in irinotecan-pretreated patients with advanced colorectal cancer. Am J Clin Oncol, ;25:627-31,2002
- 5) Alexopoulos A, Kouroussis C, Sarra E, Georgoulis V: Docetaxel in combination with mitoxantrone and granulocyte colony-stimulating factor as front-line chemotherapy in metastatic breast cancer: a multicenter phase II study. Ann Oncol, ;12:793-8,2001
- 7) Kouroussis C, Kakolyris S, Sarra E, Georgoulis V: A dose-finding Study of the weekly administration of paclitaxel in patients with advanced solid tumors. Am J Clin Oncol. ;24:404-7,2001
- 8) Agelaki S, Bania H, Sarra E, Papadakis E :Vinorelbine-based regimens as salvage treatment in patients with advanced non-small cell lung cancer:Two parallel multicenter phase II trials. Oncology,60:235-41,2001
- 9) Kakolyris S, Papadakis E, Sarra E, Georgoulis V :Docetaxel in combination with gemcitabine plus rhG-CSF support as second- line treatment in non-small cell lung cancer.A multicenter phase II study. Lung Cancer;32:179-87,2001
- 10) Mavroudis D, Kouroussis C, Sarra E, Georgoulis V :Frontline treatment of advanced gastric cancer with docetaxel and granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF). A phase II trial. Am J Clin Oncol.; 23:341-4,2000
- 11) P.Papadakis, S.Agelaki, E.Sarra, V.Georgoulis: Salvage treatment with vinorelbine and ifosfamide in patients with advanced non-small lung cancer.A multicenter phase II study. BUON 5:135-140,2000
- 12) S.Kakolyris, J.Souglakos, E.Sarra, V.Georgoulis : A dose-escalation study of irinotecan (CPT-11) in combination with cisplatin in patients with advanced non-small lung cancer previously treated with a docetaxel-based front line chemotherapy. Lung Cancer 30;193-198,2000

- 13) A.Kotsakis,E.Sarra, M.Perraki,V.Georgoulas:Docetaxel-induced lymphopenia in patients with solid tumors. *Cancer* ,89:1380-6 ,2000
- 14) T.Giannakakis, N.Ziras, S.Kakolyris, E.Sarra, V.Georgoulas. Docetaxel in combination with carboplatin for the treatment of advanced non-cell lung carcinoma: a multicentre phase I study. *European Journal of Cancer* ,36:742-747,2000

**Ζ) ΠΑΡΑΚΟΛΟΥΘΗΣΗ ΣΕΜΙΝΑΡΙΩΝ ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΟΥ ΧΑΡΑΚΤΗΡΑ,
ΙΑΤΡΙΚΩΝ ΣΥΝΕΔΡΙΩΝ, ΣΥΜΠΟΣΙΩΝ ΚΑΙ ΜΕΤΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΩΝ ΜΑΘΗΜΑΤΩΝ**

- 1.) 4ο Μετεκπαιδευτικό Συνέδριο Κλινικής Ογκολογίας, 25-29 Σεπτεμβρίου 1996, Κρήτη
- 2.) 6^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Κλινικής Ογκολογίας, 3-5 Απριλίου 1997, Αθήνα
- 3.) 24^ο Πανελλήνιο Ιατρικό Συνέδριο (Κλινικό Φροντιστήριο), 5-9 Μαΐου 1998, Αθήνα
- 4.) 6^ο Μετεκπαιδευτικό Συνέδριο Κλινικής Ογκολογίας, 30 Σεπτ-4 Οκτωβρ. 1998 Κρήτη
- 5.) 8^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Κλινικής Ογκολογίας, 1-3 Απριλίου 1999, Αθήνα
- 6.) 7^ο Μετεκπαιδευτικό Συνέδριο Κλινικής Ογκολογίας, 27-31 Οκτωβρ., 1999 Κρήτη
- 7.) 6th Mediterranean Medical Congress, 8-10 Sept. 2000, Malta
- 8.) 9^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Κλινικής Ογκολογίας, 15-17 Απριλίου 2000, Κύπρος
- 9.) 13^ο Εαρινό Προσυνεδριακό Σεμινάριο της Ελληνικής Εταιρείας Μελέτης Υπέρτασης, 16 Μαΐου 2000, Αθήνα
- 10.) 26^ο Πανελλήνιο Ιατρικό Συνέδριο, 16-20 Μαΐου 2000, Αθήνα
- 11.) 6^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Παθολογίας, 4-7 Οκτ. 2000, Αθήνα
- 12.) 8^ο Μετεκπαιδευτικό Συνέδριο Κλινικής Ογκολογίας, 22-26 Νοεμ. 2000, Κρήτη
- 13.) 1^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Προληπτικής Ιατρικής, 19-21 Ιαν. 2001, Αθήνα
- 14.) 4^η Ημερίδα Πόνου, 13 Οκτ. 2001, Αθήνα
- 15.) 9^ο Μετεκπαιδευτικό Συνέδριο Κλινικής Ογκολογίας, 14-17 Νοεμβ. 2001, Κρήτη
- 16.) 10^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Κλινικής Ογκολογίας, 29-31 Μαρτίου 2001, Αθήνα
- 17.) 27^ο Πανελλήνιο Ιατρικό Συνέδριο, 8-12 Μαΐου 2001. Αθήνα
- 18.) European School of Oncology, Cyprus, Mar. 15-16, 2002
- 19.) Διήμερο Σεμινάριο στην Καρδιοαναπνευστική Αναζωογόνηση (Βασική και Εξειδικευμένη Υποστήριξη της Ζωής), 29 Σεπτ. 2002, Αθήνα
- 20.) 10^ο Μετεκπαιδευτικό Συνέδριο Κλινικής Ογκολογίας, 13-17 Νοεμ. 2002, Κρήτη

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Το αίμα είναι ρευστός ιστός, που κυκλοφορεί με την βοήθεια της καρδιάς και των αγγείων σε όλα τα όργανα του σώματος. Αποτελείται από έμμορφα στοιχεία (το 45% του όγκου του) και πλάσμα.

Η λειτουργική αποστολή του, είναι συνάρτηση των επιμέρους λειτουργιών, τόσο των έμμορφων στοιχείων του (μεταφορά O_2 από τα ερυθρά αιμοσφαίρια, άμυνα έναντι των λοιμώξεων από τα λευκά αιμοσφαίρια, αιμόσταση από τα αιμοπετάλια κλπ.) όσο και του πλάσματος (μεταφορά θρεπτικών ουσιών, ύδατος, αποβολή άχρηστων μεταβολικών ουσιών κλπ.).

Η αιμοποίηση αρχίζει νωρίς κατά την διάρκεια της εμβρυογένεσης ¹. Εμπύρηντα ερυθροκύτταρα πρωτοεμφανίζονται στις αιμοποιητικές νησίδες του λεκιθικού ασκού και αργότερα και σε άλλους ιστούς του μεσοδέρματος.

Τα εμβρυονικά ερυθροκύτταρα (τα προερχόμενα από τον λεκιθικό ασκό) κατά την διάρκεια της ωρίμανσης τους, δεν χάνουν τον πυρήνα τους, περιέχουν δε μόρια αιμοσφαιρίνης αποτελούμενα από δύο πρωτεϊνικές αλυσίδες α- και ε- (εμβρυονική αιμοσφαιρίνη).

Από τον 2^ο μήνα της κύησης, η παραγωγή των ερυθρών αιμοσφαιρίων γίνεται μόνο στο ήπαρ και τον σπλήνα. Η παραγόμενη δε αιμοσφαιρίνη ², διαφέρει από εκείνη των ενηλίκων ως προς την άλυσσο β, η οποία έχει αντικατασταθεί από την άλυσσο γ (εμβρυϊκή αιμοσφαιρίνη)-HbF.

Από τον 4^ο-5^ο μήνα της κύησης, το κύριο αιμοποιητικό όργανο είναι ο μυελός των οστών, στον οποίο παράγονται και τα άλλα δύο έμμορφα στοιχεία του αίματος. Κατά την γέννηση, ο μυελός των οστών αποτελεί και το αποκλειστικό όργανο αιμοποίησης.³

Η μυελική κοιλότητα, αποτελείται από ένα εκτεταμένο δίκτυο κολποειδών τριχοειδών, έξω από το οποίο εδράζονται τα αιμοποιητικά κύτταρα με την μορφή νησίδων. Μέσα σε αυτές τις νησίδες, σχηματίζεται το κατάλληλο μικροπεριβάλλον που συμβάλλει στην ωρίμανση των προγονικών άωρων προβαθμίδων, σε ώριμες. Τα κολποειδή επαλείφονται από ενδοθηλιακά κύτταρα, που αφήνουν μεταξύ τους μικρά διαστήματα από όπου διέρχονται τα ώριμα κύτταρα του μυελού, στην κυκλοφορία. Στον ενήλικα, ο αιμοποιητικός λειτουργικός μυελός των οστών περιορίζεται στα οστά του κορμού και της κεφαλής (ανώνυμα οστά, στέρνο, πλευρές, θόλος κρανίου) και τις επιφύσεις των μακρών οστών (βραχιόνιο, μηριαίο κλπ.) ενώ το υπόλοιπο μέρος του σκελετού καταλαμβάνεται από τον αδρανή λιπώδη μυελό.⁴

Η μελέτη των Till και McCulloch⁵, εξασφάλισε τα πειραματικά εκείνα δεδομένα, για την μελέτη κυττάρων του μυελού των οστών, ικανών για αυτοανανέωση και παραγωγή απογόνων, με ενδεχόμενη διαφοροποίηση σε ερυθροκύτταρα, κοκκιοκύτταρα, και μεγακαρυοκύτταρα.

Όλα τα κύτταρα του αίματος προέρχονται από το πολυδύναμο αρχέγονο αιμοποιητικό κύτταρο, η διαφοροποίηση του οποίου δίνει γένεση σε δυο προγονικά κύτταρα: ένα λεμφικό αρχέγονο κύτταρο, που οδηγεί στην παραγωγή Β και Τ λεμφοκυττάρων και ένα μυελικό αρχέγονο κύτταρο, που οδηγεί στην παραγωγή ερυθροκυττάρων, κοκκιοκυττάρων, και μεγακαρυοκυττάρων.

Το μυελικό αρχέγονο κύτταρο, δίνει γένεση στην προερυθροβλάστη, την μυελοβλάστη και την μεγακαρυοβλάστη⁶.

Η προερυθροβλάστη είναι το πρώτο κύτταρο που μπορεί με το κοινό μικροσκόπιο να αναγνωριστεί ότι ανήκει στην ερυθρά σειρά. Μετά την παραγωγή της δίνει γένεση, με αλληπάλληλες διαιρέσεις, στην βασεόφιλη ερυθροβλάστη, κύτταρο με μικρή περιεκτικότητα αιμοσφαιρίνης.

Τα κύτταρα των επόμενων γενεών πληρούνται με αιμοσφαιρίνη σε συγκέντρωση περίπου 34%, ο δε πυρήνας τους υφίσταται συρρίκνωση και τελικώς αποβάλλεται από το κύτταρο. Κατά το ίδιο χρονικό διάστημα, το ενδοπλασματικό δίκτυο του κυττάρου απορροφάται, και το κύτταρο σε αυτό το στάδιο λέγεται δικτυοερυθροκύτταρο. Αφού αποβληθούν τα ριβοσωμάτια και τα μιτοχόνδρια του, το δικτυοερυθροκύτταρο δίνει γένεση στο ώριμο ερυθρό αιμοσφαίριο.

Η μυελοβλάστη, με συνεχείς διαιρέσεις, διαφοροποιείται σε προμυελοκύτταρο, από το οποίο τελικώς προκύπτουν, - με ενδιάμεσους σταθμούς το μυελοκύτταρο, το μεταμυελοκύτταρο και τα τρία είδη των πολυμορφοπύρηνων κυττάρων, - τα κοκκιοκύτταρα.

Τα μονοκύτταρα θεωρείται ότι προέρχονται μετά από συνεχή διαφοροποίηση από το αρχικό προμυελοκύτταρο.

Τα κοκκιοκύτταρα παράγονται και αποθηκεύονται στον μυελό των οστών μέχρις ότου απαιτηθεί η παρουσία τους στην κυκλοφορία. Μαζί με τα μονοκύτταρα, αποτελούν τα πλέον σημαντικά κύτταρα της φυσικής έμφυτης ανοσίας, συμμετέχοντας στην διαδικασία της φαγοκύττωσης έναντι των εισβολέων μικροοργανισμών. Η διάρκεια ζωής τους μετά την απελευθέρωση τους από τον μυελό των οστών, είναι τέσσερις έως οκτώ ώρες μέσα στην κυκλοφορία, και άλλες τέσσερις έως πέντε μέρες μέσα στους ιστούς.

Από την μεγακαρυοβλάστη και με την συμβολή της θρομβοποιητίνης, παράγονται τα αιμοπετάλια, κύτταρα απαραίτητα για την ομαλή λειτουργία της αιμόστασης.

Η διαφοροποίηση του αρχέγονου μυελικού κυττάρου, που θα δώσει γένεση στις πρόδρομες μορφές των αιμοπεταλίων, ερυθροκυττάρων καθώς και κοκκιοκυττάρων και μονοκυττάρων, υποβοηθείται από πλειάδα κυτταροκινών, όπως οι ιντερλευκίνες (IL-1, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6), οι αυξητικοί παράγοντες σχηματισμού αποικιών, η ερυθροποιητίνη και η θρομβοποιητίνη.⁷

Οι παράγοντες αυτοί, που είναι σημαντικοί για την αιμοποίηση, προέρχονται βασικά από τα στρωματικά κύτταρα του μυελού των οστών, αλλά επίσης και από ώριμες μορφές διαφοροποιημένων μυελικών και λεμφικών κυττάρων.

♦ Ρύθμιση της μεγακαρυοποίησης: δύο είναι οι παράγοντες που διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην παραγωγή των αιμοπεταλίων – η θρομβοποιητίνη, που αυξάνει την ωρίμανση του πρωτοπλάσματος των μεγακαρυοκυττάρων, και ο παράγοντας Mk-CSF (megakaryocyte colony stimulating Factor) , που διεγείρει την ωρίμανση τους.

♦ Ρύθμιση της κοκκιοποίησης: γίνεται από τους αυξητικούς παράγοντες σχηματισμού αποικιών (CSF-1, GM-CSF, G-CSF, IL-3) οι οποίοι αυξάνουν τον πολλαπλασιασμό και την ωρίμανση των πρόδρομων μορφών ουδετερόφιλων και μακροφάγων αυξάνοντας έτσι την λειτουργική τους ικανότητα.

♦ Οι αυξητικοί παράγοντες των αποικιών παράγονται από πάρα πολλούς ιστούς και κύτταρα, όπως τα διεγερμένα λεμφοκύτταρα, τα μονοκύτταρα, τα κύτταρα

του στρώματος του μυελού των οστών, του πλακούντα, του πνεύμονα, καθώς και από κύτταρα διαφόρων νεοπλασμάτων. Σήμερα υπάρχουν κεκαθαρμένα σκευάσματα ανασυνδυασμένων αιμοποιητικών παραγόντων.

♦ Ρύθμιση της ερυθροποίησης: η παραγωγή των ερυθρών αιμοσφαιρίων και η σύνθεση της αιμοσφαιρίνης *in vitro*, διεγείρεται από την ερυθροποιητίνη, η οποία είναι απαραίτητη και για την *in vivo* διαφοροποίηση και πολλαπλασιασμό των CFU-E. Πρόκειται για μια γλυκοπρωτεΐνη, που συντίθεται στα περισώληναριακά διάμεσα κύτταρα του νεφρού, από ερέθισμα που προκαλεί η ιστική ανοξία. Διεγείρει τόσο την ανάπτυξη και διαφοροποίηση των προγονικών ερυθροποιητικών αποικιών (BFU-E και CFU-E), όσο και των προδρόμων κυττάρων της ερυθράς σειράς στον μυελό των οστών.

Είναι γενικά αποδεκτό, πως η διαφοροποίηση του πολυδύναμου αρχέγονου αιμοποιητικού κυττάρου δίνει γένεση σε δυο προγονικά κύτταρα – το λεμφικό διδύναμο και το μυελικό αρχέγονο κύτταρο.

Από το κοινό προγονικό κύτταρο της λεμφικής σειράς προέρχονται και οι δύο κατηγορίες λεμφοκυττάρων- τα Β και τα Τ λεμφοκύτταρα.

Τα περισσότερα λεμφοκύτταρα, είναι μικρά – δεν εκφράζουν καμμία αντιγονική δραστηριότητα μέχρις ότου συναντήσουν κάποιο αντιγόνο, γεγονός το οποίο πυροδοτεί τον πολλαπλασιασμό τους και την εκδήλωση των εξειδικευμένων λειτουργιών τους⁸.

Τα Β όπως επίσης και τα Τ λεμφοκύτταρα παράγονται στον μυελό των οστών, όπου όμως μόνο τα Β λεμφοκύτταρα παραμένουν για να ωριμάσουν εκεί. Αφού ολοκληρωθεί η ωρίμανση των κυττάρων, αυτά εισέρχονται στην κυκλοφορία από όπου και μεταναστεύουν στα περιφερικά λεμφικά όργανα – περιοχές όπου γίνεται η ενεργοποίηση τους από αντιγόνα.

Τα όργανα του λεμφικού συστήματος, διακρίνονται στα πρωτογενή ή κεντρικά λεμφικά όργανα όπου γίνεται η παραγωγή των λεμφοκυττάρων, και στα δευτερογενή ή περιφερικά λεμφικά όργανα όπου διεγείρεται η ειδική ανοσία. Στα πρωτογενή λεμφικά όργανα περιλαμβάνεται ο μυελός των οστών και ο θύμος αδένας^{9,10,11}.

Αρχέγονες μορφές λεμφοκυττάρων, αναγνωρίζονται ήδη από την 8^η ημέρα, στον λεκιθικό ασκό, ενώ από την 9^η εβδομάδα της κήσεως, την λεμφοποίηση του εμβρύου, αναλαμβάνει το ήπαρ. Αργότερα δε, και καθ' όλη την διάρκεια της ενήλικης ζωής, η λεμφοποίηση τόσο για τα Β όσο και για τα Τ λεμφοκύτταρα γίνεται στον μυελό των οστών. Ωστόσο, αντίθετα από τα Β κύτταρα, τα Τ κύτταρα δεν διαφοροποιούνται εκεί, αλλά μεταναστεύουν σε πολύ πρώιμο στάδιο στον θύμο αδένα.

Ο ανθρώπινος θύμος αδένας είναι πλήρως ανεπτυγμένος πριν την γέννηση – η δε ατροφία του αρχίζει ήδη κατά την εφηβεία και συνεχίζεται καθ' όλη την διάρκεια της ζωής. Κάθε λοβός του θύμου αδένα, αποτελείται από έναν εξωτερικό φλοιό, πλούσιο σε θυμοκύτταρα και έναν εσωτερικό μυελό πλούσιο σε επιθηλιακά κύτταρα.

Τα πρόδρομα θυμοκύτταρα μεταναστεύουν στον έξω φλοιό όπου και πολλαπλασιάζονται, μετακινούνται στην συνέχεια προς τον έσω φλοιό, όπου τα Τ κύτταρα αποκτούν δείκτες επιφανείας και τέλος φθάνουν στον μυελό, όπου καθίστανται ώριμα Τ κύτταρα.

Μόλις τα Β και Τ λεμφοκύτταρα ωριμάσουν, εγκαταλείπουν τα πρωτογενή λεμφικά όργανα, και είναι πλέον ικανά να απαντήσουν στα αντιγονικά ερεθίσματα. Μεταναστεύουν έτσι, στα δευτερογενή ή περιφερικά λεμφικά όργανα, που είναι οι λεμφαδένες, ο σπλήνας και διάφοροι λεμφικοί ιστοί που σχετίζονται με βλεννογόνο (MALT).

Τα MALT είναι διάχυτα οργανωμένες αθροίσεις λεμφοκυττάρων τα οποία προστατεύουν το αναπνευστικό και το γαστρεντερικό σύστημα. Οι αθροίσεις των λεμφοκυττάρων που σχετίζονται με το επιθήλιο του αναπνευστικού συστήματος, συχνά αναφέρονται ως BALT, ενώ εκείνα που σχετίζονται με το επιθήλιο του γαστρεντερικού συστήματος, ως GALT

(οι αμυγδαλές, οι αδενοειδείς εκβλαστήσεις, η σκωληκοειδής απόφυση, καθώς και οι πλάκες του Payer).

Ο σπλήνας αποτελείται: α) από τον ερυθρό πολφό, που είναι περιοχή καταστροφής ερυθρών αιμοσφαιρίων που εναλλάσσεται με λεμφικές περιοχές λευκού πολφού, το έσω τμήμα του οποίου αποτελείται από μια περιαρτηριακή λεμφική θήκη, που περιέχει κυρίως T λεμφοκύτταρα, και β) από την στεφάνη των B κυττάρων πλαγίως.

Οι λεμφαδένες, αποτελούν δομές με εξαιρετική οργάνωση. Αποτελούνται από φλοιό και μυελό –ο φλοιός συνίσταται, από τον έξω φλοιό που αποτελείται από B λεμφοκύτταρα οργανωμένα σε λεμφοζίδια, και από τον εν τω βάθει φλοιό που αποτελείται κυρίως από T λεμφοκύτταρα.

Τα B και T λεμφοκύτταρα που έχουν ωριμάσει στον μυελό των οστών και τον θύμο αδένα, κυκλοφορούν συνεχώς με το αίμα, στους περιφερικούς λεμφικούς ιστούς όπου εκεί γίνεται η ενεργοποίηση και ο πολλαπλασιασμός τους.

Όταν το μικρό λεμφοκύτταρο αναγνωρίσει το αντιγόνο του, σταματά να μεταναστεύει και μετασχηματίζεται. Η χρωματίνη του πυρήνα του γίνεται λιγότερο πυκνή, εμφανίζονται πυρηνίσκοι, ο όγκος του κυτταροπλάσματος αυξάνει και επάγεται η σύνθεση νέου RNA και πρωτεϊνών. Μέσα σε λίγες ώρες, το κύτταρο δείχνει τελείως διαφορετικό και τα ενεργοποιημένα κύτταρα σε αυτό το στάδιο λέγονται λεμφοβλάστες. Αυτά ακολούθως, διαφοροποιούνται σε δραστικά κύτταρα, ικανά να εκκρίνουν αντίσωμα στην περίπτωση των B κυττάρων ή στην περίπτωση των T κυττάρων να καταστρέψουν τα μολυσμένα κύτταρα ή να ενεργοποιήσουν άλλα κύτταρα του ανοσολογικού συστήματος.

Για την ενεργοποίηση των λεμφοκυττάρων, δύο σήματα είναι αναγκαία.

Το πρώτο, δίνεται από την επαφή τους με το αντιγόνο μέσω του ειδικού υποδοχέα για το αντιγόνο που φέρουν στην επιφάνεια τους (TCR-T cell receptor).

Το δεύτερο σήμα, για τα B κύτταρα, δίνεται συνήθως από ένα T κύτταρο, ενώ για τα T κύτταρα από ένα αντιγονοπαρουσιαστικό κύτταρο (APCs)^{12,13}.

Υπάρχουν τρεις τέτοιοι τύποι APC κυττάρων- τα δενδριτικά κύτταρα, τα μακροφάγα και τα B λεμφοκύτταρα. Ανευρίσκονται στους λεμφαδένες, τον σπλήνα, το δέρμα, τον θύμο αδένα, και τέλος, στους βλεννογόνους.

Η ενεργοποίηση των B κυττάρων, δίνει γένεση στα πλασματοκύτταρα, από τα οποία παράγονται οι ανοσοσφαιρίνες που προσφέρουν τα ειδικά για το αντιγόνο αντισώματα, ενώ τα T κύτταρα διακρίνονται σε δύο υποομάδες- τα κυτταροτοξικά T και τα βοηθητικά και φλεγμονώδη T-κύτταρα. Τα βοηθητικά T λεμφοκύτταρα εξειδικεύονται στην B κυτταρική ενεργοποίηση και διαφοροποίηση, ενώ τα φλεγμονώδη T λεμφοκύτταρα ειδικεύονται στην ενεργοποίηση των μακροφάγων που περιέχουν ή έχουν φαγοκυτταρώσει παθογόνα.

Η ανάπτυξη, ενεργοποίηση και ο πολλαπλασιασμός των B και T λεμφοκυττάρων περιγράφεται κατωτέρω εκτενώς.

Η ανάπτυξη των Β κυττάρων ^{14,15}, μπορεί να διαιρεθεί σε δύο στάδια: ένα πρώτο στάδιο, αντιγονο-ανεξάρτητο το οποίο βασικά λαμβάνει χώρα στο εμβρυϊκό ήπαρ και τον μυελό των οστών του εμβρύου και του ενήλικα και ένα δεύτερο στάδιο, αντιγονο-εξαρτώμενο το οποίο λαμβάνει χώρα στα περιφερικά λεμφικά όργανα και κυρίως τον σπλήνα και τους λεμφαδένες.

Το εμβρυϊκό ήπαρ και το επίπλουν, αποτελούν τις κύριες θέσεις παραγωγής Β κυττάρων από την 8^η έως την 14^η εβδομάδα της κύησης, ενώ από το δεύτερο τρίμηνο αυτής και καθόλη την διάρκεια της ενήλικης ζωής, την παραγωγή αναλαμβάνει αποκλειστικά ο μυελός των οστών.

Τα Β κύτταρα αναπτύσσονται από ένα αιμοποιητικό αρχέγονο κύτταρο στον μυελό των οστών και αναδιατάσσουν τους γόνους των ανοσοσφαιρινών τους, με ειδικότητα για ένα και μόνο αντιγόνο.

Η διαδικασία διαφοροποίησης μπορεί να υποδιαιρεθεί σε τέσσερα στάδια και το πρώτο βήμα καταλήγει στην παραγωγή ενός πρώιμου προ-προ Β κυττάρου. Τα κύτταρα αυτά εμφανίζονται πριν αρχίσει η αναδιάταξη των γονιδίων ανοσοσφαιρίνης. Εδώ λαμβάνουν χώρα οι πρώτες αναδιατάξεις των D-γονιδίων με J_H γονίδια δίνοντας έτσι γένεση στα όψιμα προ-προ Β κύτταρα. Στο στάδιο αυτό, τμήμα του V_H γονιδίου ενώνεται με το αναδιατεταγμένο DJ_H, παράγοντας ένα πρό-Β κύτταρο, το οποίο εκφράζει υψηλά επίπεδα κυτταροπλασματικής μ- βαριάς αλυσίδας. Τελικά τα γονίδια ελαφριάς αλυσίδας αναδιατάσσονται και το κύτταρο, τώρα ένα άωρο Β-κύτταρο, εκφράζει και τις βαριές μ αλυσίδες και τις ελαφριές λ, ως μόρια επιφανειακής IgM.

Οι πιο πρώιμοι πρόδρομοι των Β κυττάρων, είναι δεσμευμένοι στην επιφάνεια των στρωματικών κυττάρων του μυελού των οστών, με την συμμετοχή πολλών διακυτταρικών προσκολλητικών μορίων ¹⁶.

Μελέτες καλλιέργειών εμπλέκουν άμεσα την ιντεγκρίνη VLA-4 του προ Β κυττάρου και την σύνδεση της με το μόριο VCAM-1 που εκφράζεται συνεχώς στα στρωματικά κύτταρα. Αντισώματα σε οποιοδήποτε από αυτά τα μόρια, προκαλούν αποκόλληση των λεμφοκυττάρων από τα στρωματικά κύτταρα και αναστέλλουν την παραγωγή τους στον μυελό των οστών.

Αυτά και άλλα διακυττάρια προσκολλητικά μόρια θα μπορούσαν να μεσολαβήσουν στην αμφίδρομη επικοινωνία μεταξύ των πρόδρομων μορφών των Β κυττάρων και του μικροπεριβάλλοντος του μυελού των οστών.

Ο τροφικός παράγοντας του αρχέγονου κυττάρου (Stem cell factor, SCF) είναι μια διαμεμβρανική πρωτεΐνη στα στρωματικά κύτταρα, που συνδέεται με τον Kit, έναν υποδοχέα μεταγωγής σήματος των Β κυττάρων. Ο Kit που φέρει ενδοκυττάρια κινάση τυροσίνης, ενεργοποιείται με την σύνδεση του στο SCF και διεγείρει το πρώιμο προ-προ Β κύτταρο προς πολλαπλασιασμό, αλλά in vivo η αλληλεπίδραση αυτή φαίνεται να είναι περισσότερο σημαντική για την παραγωγή μη λεμφικών κυττάρων παρά προδρόμων Β κυττάρων.

Στις μετέπειτα φάσεις αναπτύξεως των Β κυττάρων άλλα μόρια επάγουν τις προσκολλητικές και αυξητικές αλληλεπιδράσεις. Στο στάδιο του όψιμου προ-προ Β κυττάρου οι υποδοχείς για τον αυξητικό παράγοντα ιντερλευκίνη 7 (IL-7) εμφανίζονται

στην κυτταρική επιφάνεια. Η ιντερλευκίνη 7-εκκρίνεται σε μικρά μόνο ποσά από τα στρωματικά κύτταρα, είναι όμως απολύτως απαραίτητη για να καθοδηγήσει τον πολλαπλασιασμό και την επιβίωση των προ B κυττάρων. Σε αυτό το στάδιο ανάπτυξης τους τα λεμφοκύτταρα χάνουν την εξάρτησή τους από τον SCF, σταματούν να εκφράζουν τον Kit και αποκολλώνται από τον μυελό των οστών.

Η ανάπτυξη των B κυττάρων χαρακτηρίζεται κατά τα σχετικά πρώιμα στάδια από την εμφάνιση δεικτών κυτταρικής επιφανείας, που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την αναγνώριση των B κυττάρων στα διάφορα στάδια. Έτσι το CD19, CD21 και CD45 είναι σημαντικά στο να δίνουν σήματα κατά την διάρκεια ενεργοποίησης των B κυττάρων. Το CD40 συμβάλλει στις αλληλεπιδράσεις των B με τα T κύτταρα ενώ τα μόρια MHC τάξεως II παρουσιάζουν αντιγόνα στα βοηθητικά T κύτταρα.

Τα άωρα B κύτταρα που παράγονται στον μυελό των οστών εκφράζουν μόνο IgM ανοσοσφαιρίνες επιφανείας. Εάν τα άωρα B κύτταρα αναγνωρίσουν αντιγόνο για πρώτη φορά αδρανοποιούνται ή υφίστανται προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο (απόπτωση). Με την διαδικασία αυτή αποκλείονται από την περαιτέρω ωρίμανση και παραγωγή αντισωμάτων, και αυτό καταλήγει σε ένα απόθεμα B κυττάρων τα οποία είναι ανεκτικά έναντι των αυτόλογων ιστών (B κύτταρα μνήμης). Αντίθετα, τα ανώριμα B κύτταρα που δεν συναντούν αντιγόνα στον μυελό των οστών σε αυτό το πρώιμο στάδιο ανάπτυξης, ωριμάζουν κανονικά και μεταναστεύουν από εκεί στους περιφερικούς λεμφικούς ιστούς. Εκεί πια, τα B-κύτταρα, φέρουν IgM και IgD στην επιφάνειά τους.

Καθώς τα B κύτταρα ωριμάζουν, εγκαταλείπουν τον μυελό των οστών και μεταναστεύουν στα λεμφικά θυλάκια (λεμφοζίδια) των λεμφαδένων, τον σπλήνα και άλλους λεμφικούς ιστούς. Πολλά B-κύτταρα βρίσκονται στο λεμφικό ιστό του γαστρεντερικού, όπου πολύ μεγάλα λεμφοζίδια, γνωστά ως πλάκες του Peyer φαίνεται ότι παρέχουν εξειδικευμένες θέσεις, όπου τα B-κύτταρα ωριμάζουν για να εκκρίνουν IgA.

Σε περίπτωση απουσίας του αντιγόνου, τα B-κύτταρα, μεταναστεύουν μέσω των πρωτογενών θυλακίων στην κυκλοφορία.

Αν τα B-κύτταρα συναντήσουν αντιγόνα και κατάλληλα βοηθητικά T-κύτταρα κατά την είσοδό τους στους λεμφικούς ιστούς και ενεργοποιηθούν, τότε πολλαπλασιάζονται, πρώτα στις περιοχές των T-κυττάρων, και κατόπιν, μεταναστεύουν στο κέντρο των λεμφοζιδίων για να δημιουργήσουν τα βλαστικά κέντρα¹⁷.

Η δέσμευση του αντιγόνου στην ανοσοσφαιρίνη επιφανείας, εκπέμπει σήματα στα B-κύτταρα και φαίνεται να παίζει διπλό ρόλο στην ενεργοποίησή τους. Αυτό έχει σαν συνέπεια:(α) να μεταβιβάζει κατευθείαν ένα σήμα στο εσωτερικό του κύτταρου και (β) να αποδίδει το αντιγόνο σε ενδοκυττάριας θέσεις όπου αποδομείται, και στην συνέχεια επιστρέφει στην επιφάνεια των B-κυττάρων ως πεπτίδιο δεσμευμένο σε μόρια MHC τάξεως II.

Το σύμπλεγμα πεπτίδιο:MHC-τάξεως II, στα B-κύτταρα, διεγείρει τα βοηθητικά CD4 T-κύτταρα, να συνθέσουν τα απαραίτητα μόρια, για την ενεργοποίηση των B-κυττάρων.

Το πιο σημαντικό δραστικό μόριο στις πρώιμες φάσεις, είναι ένα μόριο T κυτταρικής επιφανείας της οικογένειας TNF, το οποίο είναι γνωστό ως CD40 ligand, επειδή δεσμεύει στην επιφάνεια του B-κυττάρου, το μόριο CD40¹⁸.

Η δέσμευση του CD40 από τον CD40 συνδέτη, οδηγεί τα ηρεμούντα B κύτταρα στον κυτταρικό κύκλο και είναι βασική για την ανταπόκριση των B-κυττάρων, κατά των

θυμοεξαρτωμένων αντιγόνων (πχ.ασθενείς με μεταλλάξεις στον CD40 συνδέτη, πάσχουν από βαριά ανοσοανεπάρκεια του Β λεμφοκυτταρικού συστήματος).

Εκτός από τον CD40 συνδέτη, τα βοηθητικά Τ-κύτταρα, φαίνεται να εκκρίνουν και διεγερτικές κυτταροκίνες, τις IL-4, IL-5, IL-6, οι οποίες καθοδηγούν τον πολλαπλασιασμό και την διαφοροποίηση του Β-κυττάρου. Ως εκ τούτου, το άμεσο αποτέλεσμα της ενεργοποίησης των Β-κυττάρων από τα βοηθητικά Τ-κύτταρα, είναι και η πρόκληση του πολλαπλασιασμού τους. Αυτό συνοδεύεται και από την παράλληλη διαφοροποίηση των Β-κυττάρων σε πλασματοκύτταρα που εκκρίνουν το αντίσωμα.

Μετά την είσοδο των Β-κυττάρων στους λεμφικούς ιστούς, η ενεργοποίηση και ο πολλαπλασιασμός τους δημιουργεί περιοχές όπου εκεί υφίσταται μετάλλαξη των αναδιατεταγμένων μορίων της μεταβλητής περιοχής της ανοσοσφαιρίνης. Οι περιοχές αυτές καλούνται βλαστικά κέντρα¹⁷. Τα κέντρα αυτά, σχηματίζονται μια εβδομάδα περίπου μετά την αντιγονική διέγερση.

Τα ταχέως πολλαπλασιαζόμενα Β-κύτταρα στα βλαστικά κέντρα, ονομάζονται κεντροβλάστες. Οι στενά συγκεντρωμένοι κεντροβλάστες σχηματίζουν την λεγόμενη "σκοτεινή ζώνη" του βλαστικού κέντρου.

Καθώς τα κύτταρα ωριμάζουν, σταματούν να διαιρούνται και γίνονται μικρά κεντροκύτταρα, μετακινούμενα σε μια περιοχή του βλαστικού κέντρου που καλείται "φωτεινή ζώνη", όπου τα κεντροκύτταρα έρχονται σε επαφή με ένα πυκνό δίκτυο θυλακιωδών δενδριτικών κυττάρων.

Τα κεντροκύτταρα τελικά, παράγουν τα Β-κύτταρα μνήμης και τα πλασματοκύτταρα που εκκρίνουν αντισώματα.

Ποια από αυτές τις δύο πορείες ακολουθεί ένα Β-κύτταρο, φαίνεται ότι προσδιορίζεται με σήματα από τα θυλακιώδη δενδριτικά κύτταρα, και τα Τ-κύτταρα. Αν και το σήμα για την διαφοροποίηση του πλασματοκυττάρου δεν είναι σίγουρα γνωστό, φαίνεται ότι το CD23 που απελευθερώνεται από τα θυλακιώδη δενδριτικά κύτταρα σε διαλυτή μορφή, παίζει κάποιο ρόλο.

Η άλλη πορεία των Β-κυττάρων που αφήνουν το βλαστικό κέντρο αν δεν συναντήσουν τον CD40 συνδέτη, είναι να γίνουν μνημονικά Β-κύτταρα, τα οποία δεν εκκρίνουν αντίσωμα στην κύρια απόκριση αλλά μπορούν γρήγορα να ενεργοποιηθούν με διαδοχικές διεγέρσεις από το ίδιο το αντιγόνο.

Η χυμική ανοσολογική ανταπόκριση επιτυγχάνεται από τα αντισώματα που εκκρίνονται από τα πλασματοκύτταρα. Το μόριο του αντισώματος έχει δύο ξεχωριστές λειτουργίες που διαχωρίζονται δομικώς:^{19,20} η πρώτη λειτουργία, είναι να συνδέεται ειδικά με το αντιγόνο και αυτό γίνεται με την μεταβλητή περιοχή, και η δεύτερη, είναι η εξασφάλιση των δραστικών λειτουργιών του ανοσολογικού συστήματος, και αυτό γίνεται με την σταθερή περιοχή του μορίου.

Υπάρχουν τρεις κύριοι δρόμοι με τους οποίους τα αντισώματα προστατεύουν τον ξενιστή από λοίμωξη,(α) με εξουδετέρωση εμποδίζοντας τις τοξικές επιδράσεις των παθογόνων με το να δεσμεύονται σ' αυτά και(β) με οψωνινοποίηση, όπου επικαλύπτοντας τα παθογόνα, μπορούν να καταστήσουν ικανά τα βοηθητικά κύτταρα που αναγνωρίζουν το Fc τμήμα των αντισωμάτων, να φαγοκυτταρώσουν και να φονεύσουν το παθογόνο και (γ)με ενεργοποίηση του συμπληρώματος, οι πρωτεΐνες του οποίου ενισχύουν την οψωνινοποίηση και μπορούν άμεσα να φονεύσουν βακτηριακά κύτταρα.

Τα πρώτα αντισώματα που παράγονται σε μια χυμική ανοσολογική απόκριση είναι πάντα τα IgM, τα οποία περιορίζουν την παρουσία τους στην κυκλοφορία του αίματος, και η κύρια λειτουργία τους είναι η καταστροφή των παθογόνων με ενεργοποίηση του συμπληρώματος. Τα άλλα αντισώματα IgG, IgA, IgE, είναι μικρότερα, και εύκολα μεταφέρονται με το αίμα και διαχέονται σε άλλους ιστούς.

Η IgG αποτελεσματικά οψωνινοποιεί παθογόνα για την απορρόφηση από τα φαγοκύτταρα και ενεργοποιεί το σύστημα του συμπληρώματος, αντίθετα η IgA είναι μία ασθενής οψωνίνη και ένας αδύναμος ενεργοποιητής του συμπληρώματος. Συντίθεται στα πλασματοκύτταρα που βρίσκονται ακριβώς κάτω από το επιθήλιο του εντέρου, του αναπνευστικού, τους δακρυικούς και σιελογόνους αδένες.

Η IgE παρουσιάζεται μόνο σε πολύ χαμηλά επίπεδα στο αίμα ή στο εξωκυττάριο υγρό αλλά δεσμεύεται από υποδοχείς, στα σιτευτικά κύτταρα.

Τα πλασματοκύτταρα, που διαφοροποιούνται στους λεμφικούς ιστούς, παραμένουν στις μυελώδεις δοκίδες των λεμφαδένων και τον ερυθρό πολφό του σπλήνα, δύο περιοχές που περιέχουν επίσης αρκετά μακροφάγα και μπορούν να βοηθήσουν τον περιορισμό των λοιμογόνων παραγόντων στους λεμφικούς ιστούς. Αλλά Β-κύτταρα, που αφήνουν το βλαστικό κέντρο, σαν πλασμοβλάστες (προ-πλασματοκύτταρα), μεταναστεύουν στον μυελό των οστών για να συμπληρώσουν την διαφοροποίησή τους σε πλασματοκύτταρα.

Αντίθετα, με τη πρωτογενή αντισωματική απάντηση, η οποία χαρακτηρίζεται στις αρχικές της φάσεις από άφθονη παραγωγή IgM αντισώματος, τα κυρίαρχα αντισώματα στην δευτερογενή και συνακόλουθες απαντήσεις είναι IgG με λίγη IgA ή IgE.

Τα αντισώματα αυτά, παράγονται από Β-κύτταρα μνήμης, που έχουν πλήρως στραφεί από παραγωγή IgM, σ' αυτούς τους περισσότερους ώριμους ισοτύπους, και εκφράζουν IgG, IgA και IgE στην επιφάνειά τους.

Όλες αυτές οι αλλαγές, διευκολύνουν την πρόσληψη του αντιγόνου και την παρουσίασή του και επιτρέπουν στα Β-κύτταρα μνήμης να ξεκινήσουν τις κρίσιμες αλληλεπιδράσεις τους με τα βοηθητικά Τ-κύτταρα σε χαμηλότερες δόσεις αντιγόνου.

Μετά την ωρίμανσή τους στον μυελό των οστών τα Β-κύτταρα μεταναστεύουν μέσω του αίματος, στα περιφερικά λεμφικά όργανα.

Τα Β-κύτταρα στους περιφερικούς λεμφικούς ιστούς είναι αρκετά ετερογενή στην μορφολογία, στην εντόπιση και στα μόρια επιφανείας που εκφράζουν. Μέρος αυτής της ετερογένειας, προέρχεται από την ωρίμανση των Β-κυττάρων στην περιφέρεια ως απάντηση στον αντιγονικό ερεθισμό.

Υπάρχει επίσης πληθυσμός Β-κυττάρων που μπορεί να δημιουργηθεί από διαφορετικά αρχέγονα μητρικά κύτταρα πρώιμα στην εξέλιξη και ο οποίος ανανεώνεται με συνεχή διαίρεση στους περιφερικούς λεμφικούς ιστούς.

Κατά την διάρκεια της διαφοροποίησής τους τα Β κύτταρα εκφράζουν στην επιφάνεια τους διάφορα μόρια, τα οποία συνήθως, έχουν ειδικό λειτουργικό ρόλο.

CD5

Τα CD5⁺ Β-κύτταρα, είναι παρόντα σε μεγάλα ποσά κατά την εμβρυική ζωή (50% των IgM⁺ Β-κυττάρων) ελαττώνονται όμως σε αριθμό με την γέννηση, και έτσι σε μειωμένο πια ποσό ανευρίσκονται στα περιφερικά λεμφικά όργανα.

Αποτελούν τον κυρίαρχο Β-κυτταρικό πληθυσμό στην περιτοναϊκή και τις υπεζωκοτικές κοιλότητες, από τον οποίο παράγεται και το μεγαλύτερο ποσό ανοσοσφαιρίνης που βρίσκεται στον ορό. Τα CD5 Β-κύτταρα, προέρχονται από ένα ανώριμο αρχέγονο μητρικό κύτταρο, που είναι πιο ενεργό στην προγεννητική περίοδο.

Υπάρχουν δύο θεωρίες για την γέννηση των CD5 κυττάρων :

Σύμφωνα με την πρώτη, τα CD5⁺ κύτταρα (τα οποία καλούνται και Β-1 κύτταρα) ανήκουν σε μια υποομάδα Β-κυττάρων, αρκετά διαφορετική από τα συνηθισμένα Β-λεμφοκύτταρα. Παράγονται αρκετά νωρίς κατά την εξέλιξη και έχουν την ιδιότητα της αυτοανανέωσης. Πρόδρομες μορφές τους ανευρίσκονται στο εμβρυικό ήπαρ και επίπλουν, αλλά όχι στον ενήλικα μυελό των οστών.

Σύμφωνα με την δεύτερη θεωρία, τα Β-κύτταρα προέρχονται από τα συνήθη Β-λεμφοκύτταρα. Η θεωρία αυτή βασίζεται σε *in vitro* μελέτες, όπου η διέγερση των συνήθων Β-λεμφοκυττάρων με αντι IgM-αντισώματα και IL-6 οδηγεί στον πολλαπλασιασμό κυττάρων που εκφράζουν Β-1 φαινοτύπο.

Αυξημένος αριθμός CD5⁺ Β-κυττάρων ανευρίσκεται σε ασθενείς με ρευματοειδή αρθρίτιδα, σύνδρομο Sjogren, προοδευτική συστηματική σκλήρυνση, αλλά όχι σε συστηματικό ερυθηματώδη λύκο. Στο 95% των ασθενών με χρόνια λεμφοκυτταρική λευχαιμία Β-κυττάρων, τα λευχαιμικά κύτταρα εκφράζουν το CD5 αντιγόνο.

Τα CD5⁺ Β-κύτταρα φαίνεται να έχουν μικρή συνεισφορά στις ειδικές ανοσολογικές ανταποκρίσεις σε πρωτεϊνικά αντιγόνα, αλλά συμβάλλουν έντονα σε μερικές ανταποκρίσεις που δεν απαιτούν Τ-βοηθητικά κύτταρα.

CD19

Ο δείκτης επιφανείας CD19, είναι πιθανά και ο μόνος που εκφράζεται καθ' όλη την διάρκεια ζωής ενός Β-λεμφοκυττάρου, εκτός από τα πολύ μεταγενέστερα στάδια εξέλιξης, επειδή δεν ανιχνεύεται στα κύτταρα του πλάσματος.

Σχηματίζει σύμπλεγμα με το CD21, CD81, και Leu-13. Το σύμπλεγμα αυτό, λειτουργεί ως συν-υποδοχέας με το σύμπλεγμα Ig. Είναι πιθανό το σύμπλεγμα CD19,

μέσω του CD21 μορίου, να συνδέεται με την επιφάνεια Ig, όταν το αντιγόνο παρουσιάζεται στα Β-κύτταρα.

CD20

Εκφράζεται στις πρόδρομες μορφές των Β-κυττάρων αλλά ανακαλύπτεται και στο ένα τρίτο των περιπτώσεων οξείας λευχαιμίας που εμπλέκονται πρόδρομα Β-κύτταρα.

Το CD20, ως επί το πλείστον είναι δείκτης των ώριμων Β-κυττάρων. Δρα ως κανάλι ιόντων Ca^{++} και ρυθμίζει την ροή δια μέσου της κυτταρικής μεμβράνης.

Επειδή τα επίπεδα Ca^{++} ενδοκυτταρίως παίζουν ένα σπουδαίο ρόλο στην πρόοδο του κυτταρικού κύκλου, το CD20 μπορεί να θεωρηθεί ως ένας ρυθμιστής του κυτταρικού κύκλου στα Β-λεμφοκύτταρα.

Μονοκλωνικά αντι-CD20 αντισώματα έχουν χορηγηθεί σε ασθενείς με NHL και βρέθηκε να προκαλούν κλινικές υφέσεις. Τα αντισώματα διατηρούν υψηλές ενδοκυτταρίες συγκεντρώσεις Ca^{++} , το οποίο φαίνεται να αναστέλλει την εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου από την φάση G1 στην φάση S.

CD21

Εκφράζεται στα ώριμα Β-λεμφοκύτταρα, τα θυλακιώδη δενδριτικά κύτταρα καθώς και στα κύτταρα του επιθηλίου του φάρυγγα.

Αποτελεί τον υποδοχέα για τα τμήματα των C3dg και C3d του συμπληρώματος, παράγεται δε κατά την ενεργοποίηση αυτού.

Ρυθμίζει τον πολλαπλασιασμό των Β-κυττάρων απέναντι τόσο σε θυμοεξαρτώμενα όσο και θυμοανεξάρτητα αντιγόνα.

CD22

Φωσφογλυκοπρωτεΐνη 135KD, μέλος της οικογένειας των ανοσοσφαιρινών. Κατά την διαδικασία διαφοροποίησης του Β-λεμφοκυττάρου, το CD22 εκφράζεται στο κυτταρόπλασμα, το σήμα δε που παράγεται από την λειτουργική σύνδεσή του με τον υποδοχέα του αντιγόνου, είναι απαραίτητο για την διέγερση των Β-κυττάρων.

CD23

Ανακαλύφθηκε αρχικά μέσω της συνδέσεώς του με την ανοσοσφαιρίνη IgE, και ήταν γνωστό ως FcεRII.

Στα Β-κύτταρα παίζει ρόλο στην παρουσίαση του αντιγόνου στα Τ-κύτταρα, όταν το αντιγόνο είναι σύμπλεγμα με την ανοσοσφαιρίνη IgE. Ανευρίσκεται στον ορό, σε υψηλές τιμές, σε αρκετές παθήσεις, όπως οι αλλεργίες, η ρευματοειδής αρθρίτιδα και η χρόνια λεμφοκυτταρική λευχαιμία.

CD40

Πρωτεΐνη 40KD, μέλος της οικογένειας του NGF (Nerve growth factor), που εκτός από τον CD40, περιλαμβάνει τους TNF, το μόριο CD27 των Τ-κυττάρων, το αντιγόνο Fas, και το CD30 που αρχικά βρέθηκε στα κύτταρα Reed-Sternberg. Η οικογένεια αυτή, είναι σήμερα γνωστή με την ονομασία, υποδοχέας TNF (TNF receptor).

Το CD40 εκφράζεται στα Β-κύτταρα, μακροφάγα, θυλακιώδη δενδριτικά κύτταρα, κύτταρα του θύμου και στα προγονικά αιμοποιητικά κύτταρα.

Στα Β-λεμφοκύτταρα εκφράζεται σε όλα τα στάδια διαφοροποίησης, εκτός από το στάδιο της τελικής διαφοροποίησης. Στα περιφερικά λεμφικά όργανα, ανιχνεύεται στα πρωτογενή θυλάκια και στα βλαστικά κέντρα.

Η δέσμευση του CD40, με το μόριο που εκκρίνεται παρουσία αντιγόνου από τα βοηθητικά CD4 T-κύτταρα, οδηγεί τα ηρεμούντα Β-κύτταρα στον κυτταρικό κύκλο, πράγμα βασικό για τις ανταποκρίσεις των Β-κυττάρων σε θυμοεξαρτώμενα αντιγόνα.

CD79a και CD79b

Πρόκειται για δύο φωσφοπρωτεΐνες που συσχετίζονται με τον αντιγονικό υποδοχέα των Β-κυττάρων, σχηματίζοντας το σύμπλεγμα αυτού (BCR : B cell receptor).

Η ανάπτυξη του Τ-κυττάρου έχει πολλά κοινά με την ανάπτυξη του Β-κυττάρου.

Όπως τα Β-κύτταρα, έτσι και τα Τ-κύτταρα προέρχονται από κύτταρα του αρχέγονου μητρικού κυττάρου του μυελού των οστών. Φαίνεται όμως πως δεν διαφοροποιούνται εκεί, αλλά μεταναστεύουν σε πολύ πρώιμο στάδιο στον θύμο αδένα, ένα κεντρικό λεμφικό όργανο που παρέχει το εξειδικευμένο μικροπεριβάλλον στο οποίο γίνεται η αναδιάταξη των γονιδίων του υποδοχέα για το αντιγόνο και η ωρίμανση των Τ-κυττάρων.²³

Ο θύμος αδένας, είναι ένα λεμφικό όργανο στο άνω και πρόσθιο μεσοθωράκιο, ακριβώς πάνω από την καρδιά. Στους νεαρούς οργανισμούς, ο θύμος αδένας περιέχει πολλά προγονικά Τ-κύτταρα τοποθετημένα σε ένα επιθηλιακό δίκτυο γνωστό σαν το θυμικό στρώμα, το οποίο παρέχει ένα μοναδικό μικροπεριβάλλον για την ανάπτυξη των Τ-κυττάρων.

Ο θύμος αδένας αποτελείται από πολυάριθμα λόβια, το καθένα ξεκάθαρα διαφοροποιημένο σε μια εξωτερική φλοιώδη περιοχή, το θυμικό φλοιό και σε ένα εσωτερικό, τον μυελό.

Το θυμικό στρώμα αναπτύσσεται κατά την εμβρυική ζωή από τα ενδοδερματικά και τα εξωδερματικά στρώματα των εμβρυϊκών δομών, γνωστών σαν ο τρίτος φαρυγγικός θύλακος και η τρίτη φαρυγγική σχισμή. Το θυμικό αρχέγονο όργανο προσελκύει κύτταρα αιμοποιητικής προέλευσης τα οποία το αποικίζουν - αυτά περιλαμβάνουν δενδριτικά κύτταρα και μακροφάγα μαζί με τους προγόνους των θυμοκυττάρων.

Ο φλοιός του θύμου αδένα αποτελείται από θυμοκύτταρα, φλοιώδη επιθηλιακά κύτταρα και μακροφάγα, που χρησιμεύουν στο να καθαρίζουν τον θύμο αδένα από αποπτωτικά θυμοκύτταρα.

Ο μυελός του αδένα αποτελείται από ώριμα θυμοκύτταρα, επιθηλιακά κύτταρα, μακροφάγα και δενδριτικά κύτταρα. Οι πρόγονοι των Τ-κυττάρων που φτάνουν στον θύμο αδένα από τον μυελό των οστών, εισέρχονται σε μια φάση έντονου πολλαπλασιασμού.

Παρόλη την διαφορά μεταξύ των αριθμών των Τ-κυττάρων που παράγονται συνεχώς στον θύμο αδένα και του αριθμού που φεύγει, ο θύμος αδένας δεν συνεχίζει να αναπτύσσεται σε μέγεθος ή σε αριθμό κυττάρων.

Στα αρχικά στάδια ωρίμανσεως του θυμοκυττάρου, τα γονίδια του υποδοχέα των Τ-κυττάρων περνούν μία προγραμματισμένη σειρά αναδιατάξεων που παράγουν τεράστιους αριθμούς ανώριμων Τ-κυττάρων, καθένα από τα οποία εκφράζει υποδοχείς μοναδικής ειδικότητας.²⁴

Ο αντιγονικός υποδοχέας Τ κυττάρου, μοιάζει με ένα συνδεδεμένο στην κυτταρική μεμβράνη τμήμα Fab ανοσοσφαιρίνης.

Κάθε Τ κύτταρο φέρει περίπου 30000 μόρια αντιγονικών Τ υποδοχέων στην επιφάνεια του.

Κάθε υποδοχέας αποτελείται από δύο διαφορετικές πολυπεπτιδικές αλυσίδες, την α και β, συνδεδεμένες μεταξύ τους με ένα δισουλφιδικό δεσμό.

Αυτά τα α/β ετεροδιμερή ευθύνονται για την αναγνώριση αντιγόνου από όλες τις λειτουργικές τάξεις των Τ-κυττάρων. Υπάρχει και ένας εναλλακτικός τύπος

αντιγονικού υποδοχέα των T- κυττάρων, που δημιουργείται από αλυσίδες γ και δ, η λειτουργική όμως σημασία του δεν είναι σαφής.

Καμία από τις δύο αλυσίδες α και β του αντιγονικού υποδοχέα του T-κυττάρου δεν έχει μεγάλο κυτταροπλασματικό τμήμα που θα μπορούσε να χρησιμεύσει για να δώσει σήμα, ότι ο υποδοχέας έχει δεσμεύσει αντιγόνα.

Η λειτουργία αυτή εκτελείται από ένα σύμπλεγμα έξι πρωτεϊνών, γνωστό ως σύμπλεγμα CD3 το οποίο είναι σταθερά συνδεδεμένο με τον αντιγονικό υποδοχέα του T-κυττάρου, στην επιφάνεια των T-κυττάρων.

Οι πρωτεΐνες CD3 έχουν κυτταροπλασματικές προεκτάσεις στέλνοντας έτσι σήμα στο εσωτερικό του κυττάρου ότι ολοκληρώθηκε η αντιγονική σύνδεση.

Προκύπτουν έτσι δύο T-κυτταρικές σειρές, η μία εκφράζει α/β και η άλλη γ/δ υποδοχείς. Τα πρώτα T-κύτταρα που εμφανίζονται κατά την διάρκεια της εμβρυικής ανάπτυξης, φέρουν γ/δ T-κυτταρικούς υποδοχείς.

Σε μεταγενέστερα στάδια αναπτύξεως, τα T κύτταρα παράγονται αδιάκοπα μάλλον παρά σε κύματα, και τα α/β T-κύτταρα υπερέχουν, αποτελώντας περισσότερο από το 95% των θυμοκυττάρων.

Τα T-κύτταρα που εκφράζουν α/β υποδοχείς αρχικά εμφανίζονται μερικές μέρες μετά από τα πιο πρώιμα γ/δ T-κύτταρα και γρήγορα μετατρέπονται στον πιο συνηθισμένο τύπο λεμφοκυττάρου.

Η αναδιάταξη των γονιδίων της β- και της α- αλυσίδας κατά την διάρκεια της αναπτύξεως του T-κυττάρου, παραλληλίζεται στενά με την αναδιάταξη των γονιδίων ανοσοσφαιρίνης της βαριάς και ελαφριάς αλυσίδας κατά την διάρκεια της αναπτύξεως των B-κυττάρων.

Καθώς τα θυμοκύτταρα πολλαπλασιάζονται και ωριμάζουν σε T-κύτταρα, περνούν από μια σειρά διαφορετικών φάσεων που χαρακτηρίζονται από αλλαγές στην κατάσταση των γονιδίων του T-κυτταρικού υποδοχέα, τους συνυποδοχείς CD4 και CD8 και άλλα μόρια κυτταρικής επιφανείας, που αντανακλούν την κατάσταση λειτουργικής ωρίμανσης του κυττάρου.

Τα πρόγονα θυμοκύτταρα δεν εκφράζουν στην κυτταρική τους μεμβράνη κανένα από τα τρία μόρια κυτταρικής επιφανείας που ξεχωρίζουν τα ώριμα T κύτταρα, όπως το CD4, CD8 και το σύμπλεγμα CD3/T- κυτταρικός υποδοχέας.

Εξαιτίας της απουσίας του CD4 και του CD8, τα κύτταρα αυτά ονομάζονται διπλά-αρνητικά θυμοκύτταρα(CD4⁻CD8⁻).

Μερικά από τα διπλά αρνητικά κύτταρα ²⁵ (περίπου 20%) εκφράζουν τα γονίδια που κωδικοποιούν τον σπάνιο γ/δ T-κυτταρικό υποδοχέα για το αντιγόνο.Σαν διπλά-αρνητικά κύτταρα, τα θυμοκύτταρα πολλαπλασιάζονται και ξεκινούν την διαδικασία αναδιάταξης γονιδίου,η οποία κορυφώνεται με την έκφραση του υποδοχέα κυτταρικής επιφανείας των προ-προ T κυττάρων μαζί με τους συν-υποδοχείς CD4 και CD8,για να παράγουν διπλά-θετικά κύτταρα(CD4⁺CD8⁺).

Αυτά τα διπλά-θετικά κύτταρα βρίσκονται στον φλοιό του θύμου αδένου, όπου υφίστανται θετική και αρνητική επιλογή.

Η θετική επιλογή επιτυγχάνεται αποκλειστικά από τα θυμικά επιθηλιακά κύτταρα και φαίνεται πως η έκφραση των μορίων CD4 και CD8 στα ώριμα κύτταρα, προσδιορίζεται από αυτήν. Πράγματι, στο τέλος αυτής της επιλογής, τα ώριμα θυμοκύτταρα εκφράζουν μόνο έναν από τους δυο συν-υποδοχείς.

Η αρνητική επιλογή φαίνεται να είναι περισσότερο έντονη στην ένωση φλοιού και μυελού του θύμου αδένου, όπου σχεδόν ώριμα θυμοκύτταρα συναντούν άφθονα δενδριτικά κύτταρα.

Τα ώριμα θυμοκύτταρα που επιβιώνουν από αυτή την διπλή επιλογή, ωριμάζουν σε μονά-θετικά T κύτταρα τα οποία και εξέρχονται από τον θύμο αδένου στην κυκλοφορία. Τα κύτταρα αυτά εκφράζουν TCR που αποτελείται από τις αλυσίδες α και β και έτσι υποδιαιρούνται σε δύο ξεχωριστούς πληθυσμούς.²⁶ Ο ένας εκφράζει το μόριο CD4, που συμμετέχει κυρίως σαν βοηθητικό κύτταρο στην ανοσολογική αντίδραση (TH), ενώ ο άλλος, εκφράζει το μόριο CD8 που ελέγχει κυρίως την T-λεμφοκυτταρική κυτταροτοξική αντίδραση (TC).

Τα CD4⁺ T-κύτταρα, αναγνωρίζουν το ειδικό αντιγόνο σε συσχέτιση με το μείζον σύστημα ιστοσυμβατότητας (MHC) τάξεως II, ενώ αντιθέτως τα CD8⁺ T-κύτταρα αναγνωρίζουν αντιγόνα σε συνδυασμό με το MHC τάξεως I.

Τα CD4⁺ T-κύτταρα, μπορούν να διαφοροποιηθούν σε δύο τύπους δραστικών T-κυττάρων: τα φλεγμονώδη T-κύτταρα (TH1) που ενεργοποιούν τα μολυσμένα μακροφάγα ώστε να καταστρέφουν τα ενδοκυττάρια παθογόνα, και τα βοηθητικά T-κύτταρα (TH2) που ενεργοποιούν ειδικά B-κύτταρα να παράγουν αντισώματα.

Όταν ολοκληρώσουν την ανάπτυξη τους στον θύμο αδένου, τα T-κύτταρα εισέρχονται στην κυκλοφορία και μεταναστεύουν σε δευτερεύοντες λεμφικούς ιστούς, όπως είναι οι λεμφαδένες, ο σπλήνας ή οι πλάκες του Payer όπου μπορεί να συναντήσουν αντιγόνα. Όλα αυτά τα λεμφικά όργανα περιέχουν αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα, ειδικά στο να προσλαμβάνουν το αντιγόνο, να το εκφράζουν με μορφή πεπτιδικού αντιγόνου στην επιφάνειά τους και να ενεργοποιούν τα T-κύτταρα.

Οι τρεις κύριοι τύποι αυτών των αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων που βρίσκονται στα περιφερικά λεμφικά όργανα είναι: τα μακροφάγα, τα δενδριτικά κύτταρα και τα B-κύτταρα.

Η αρχική αλληλεπίδραση των T-κυττάρων, με τα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα, γίνεται μέσω των μορίων προσκόλλησης, που είναι οι σελεκτίνες, οι ιντεγκρίνες και μερικά μόρια ανάλογα της βλεννίνης.

Η ενεργοποίηση των αθών (naïve) T-κυττάρων, απαιτεί δύο ανεξάρτητα σήματα^{27,28}.

Το πρώτο σήμα, δίνεται από την δέσμευση στον T-κυτταρικό υποδοχέα για το αντιγόνο, του συμπλέγματος πεπτιδίου:MHC. Το σήμα αυτό όμως δεν είναι αρκετό για να γίνει ενεργοποίηση των αθών T-κυττάρων.

Απαιτεί και την ταυτόχρονη εκπομπή ενός συνδιεγερτικού σήματος από τα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα.

Κατά την αναγνώριση του αντιγόνου τα μόρια CD4 και CD8, γνωστά και ως συν-υποδοχείς, συνδέονται στην επιφάνεια του T-κυττάρου με συστατικά του υποδοχέα του T-κυττάρου. Έτσι όταν τα T-κύτταρα αναγνωρίσουν το ειδικό για αυτά σύμπλεγμα πεπτιδίου:MHC, το σύμπλεγμα του T-κυτταρικού υποδοχέα ενώνεται με τον κατάλληλο συν-υποδοχέα.

Η ενεργοποίηση των T-κυττάρων συντονίζεται και από ένα άλλο μόριο επιφανείας του T-κυττάρου, το CD45. Πρόκειται για διαμεμβρανικό μόριο, του οποίου η κυτταροπλασματική περιοχή έχει δραστηριότητα φωσφατάσης εξειδικευμένης για τυροσίνη. Θεωρείται ότι ενεργοποιεί τις κινάσες της τυροσίνης που συνδέονται με τα μόρια του υποδοχέα και του συν-υποδοχέα. Τα T-κύτταρα που στερούνται του CD45

είναι ελαττωματικά στην σηματοδότηση μέσω του υποδοχέα T-κυττάρου για το αντιγόνο.

Κατά συνέπεια τα δραστικά T-κύτταρα διεγείρονται όταν οι ειδικοί αντιγονικοί υποδοχείς τους καθώς και οι CD4 ή CD8 συν-υποδοχείς τους, δεσμεύονται στα συμπλέγματα πεπτίδιο:MHC μόρια.

Αλλά η σύνδεση του T-κυτταρικού υποδοχέα και του συν-υποδοχέα δεν διεγείρει από μόνη της, τα αθώα T-κύτταρα να πολλαπλασιαστούν και να διαφοροποιηθούν άμεσα σε ειδικά, δραστικά T-κύτταρα.

Η ειδική για κάποιο αντιγόνο κλωνική έκπτυξη των αθών T-κυττάρων απαιτεί ένα δεύτερο συν-διεγερτικό σήμα, το οποίο στην περίπτωση των CD4 T-κυττάρων προσφέρεται από το ίδιο το αντιγονοπαρουσιαστικό κύτταρο επί του οποίου το T-κύτταρο αναγνωρίζει το ειδικό αντιγόνο του. Τα καλύτερα χαρακτηρισθέντα συν-διεγερτικά μόρια στα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα είναι, οι δομικά συγγενείς γλυκοπρωτεΐνες B7.1 και B7.2. Ο υποδοχέας για τα B7 μόρια στα T-κύτταρα είναι το μόριο CD28.

Η σύνδεση του CD28 με το μόριο B7, δίνει και το δεύτερο σήμα για την ενεργοποίηση του T-κυττάρου.

Τα μακροφάγα, τα B-κύτταρα και τα δενδριτικά κύτταρα που είναι και οι κύριοι τύποι αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων, διαφέρουν ως προς τους τρόπους πρόσληψης του αντιγόνου, στην έκφραση των MHC τάξεως II μορίων στα αντιγόνα που παρουσιάζουν στα "αθώα" T-κύτταρα, καθώς και στις εντοπίσεις τους στο ανθρώπινο σώμα.

Έτσι τα μακροφάγα, έχουν μια ποικιλία υποδοχέων που αναγνωρίζουν βακτηριακούς υδατάνθρακες και άλλα μικροβιακά συστατικά, ιδιότητα που τα καθιστά ικανά να φαγοκυτταρώνουν μικροοργανισμούς.

Μόνο τα διεγερμένα μακροφάγα μπορούν να μεταφέρουν το δεύτερο απαραίτητο συνδιεγερτικό σήμα στα T-κύτταρα, και αυτό γιατί φέρουν αρκετά μόρια MHC τάξεως II στην επιφάνειά τους, και μπορούν να εκφράζουν το μόριο B7.

Τα δενδριτικά κύτταρα, που συγκεντρώνονται στους λεμφικούς ιστούς, εκφράζουν υψηλά επίπεδα των μορίων MHC τάξεως I και MHC τάξεως II, καθώς επίσης τα συνδιεγερτικά μόρια B7.1 και B7.2, και τα προσκολλητικά μόρια ICAM-1, ICAM-3 και LFA-3.

Τα κύτταρα που μοιάζουν με τα δενδριτικά κύτταρα, βρίσκονται σε πολλά σημεία και φαίνεται πως τα δενδριτικά κύτταρα των λεμφικών ιστών, προέρχονται από αυτά.

Έτσι, τα κύτταρα του Langerhans – δενδριτικά κύτταρα του δέρματος – προσλαμβάνουν το αντιγόνο στο δέρμα και μεταναστεύουν στα λεμφικά όργανα, όπου το παρουσιάζουν στα T-κύτταρα.

Τα κύτταρα του Langerhans μπορούν να φαγοκυτταρώσουν και να επεξεργαστούν το αντιγόνο αλλά δεν έχουν συν-διεγερτική δραστηριότητα. Μόλις εισέρχονται στον λεμφαδένα διαφοροποιούνται σε δενδριτικά κύτταρα, που εκφράζουν το μόριο B7 και είναι ικανά πια να διεγείρουν τα T-κύτταρα.

Τόσο τα μακροφάγα, όσο και τα δενδριτικά κύτταρα μπορούν αποτελεσματικά να δεσμεύσουν διαλυτά αντιγόνα.

Τα B-κύτταρα, αντίθετα, έχουν την μοναδική ιδιότητα να δεσμεύουν διαλυτά μόρια μέσω της επιφανειακής ανοσοσφαιρίνης τους, και αυτό είναι σημαντικό ώστε να μπορούν να συμπεριφερθούν σαν στόχοι για τα άμεσα δραστικά βοηθητικά T-κύτταρα.

Όμως, τα Β-κύτταρα μπορούν να λειτουργήσουν ως αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα, ενδοκυτταρώνοντας διαλυτά αντιγόνα δεσμευμένα από την επιφανειακή ανοσοσφαιρίνη και παρουσιάζοντας στην συνέχεια πεπτιδικά τμήματα αυτών των αντιγόνων, ως συμπλέγματα ΜHC:πεπτίδιο.

Η αρχική συνάντηση του Τ-κυττάρου με το ειδικό αντιγόνο, όταν συνυπάρχει το απαιτούμενο συν-διεγερτικό σήμα, προκαλεί την ενεργοποίηση του και την είσοδο του στην φάση G1 του κυτταρικού κύκλου.

Το αποτέλεσμα είναι η έκφραση και έκκριση ιντερλευκίνης -2 (IL-2)²⁹.

Τα Τ-κύτταρα που ενεργοποιήθηκαν με αυτόν τον τρόπο, μπορούν να διαιρεθούν δύο με τρεις φορές την ημέρα για πολλές μέρες, επιτρέποντας έτσι σε κάθε κύτταρο να δημιουργήσει χιλιάδες απογόνους, που όλα θα φέρουν έναν ταυτόσημο υποδοχέα για το αντιγόνο.

Η ενεργοποίηση των Τ-κυττάρων προκαλεί επίσης την έκφραση στην κυτταρική επιφάνεια ενός μορίου που ονομάζεται CD40 συνδέτης, διότι δεσμεύει στην επιφάνεια των Β-κυττάρων το μόριο CD40.

Η δέσμευση του CD40 συνδέτη με το μόριο CD40, ενεργοποιεί τα CD40⁺ κύτταρα και επάγει την έκφραση στην κυτταρική μεμβράνη των μορίων, B7.1 και B7.2, που αργότερα καθοδηγούν την Τ-κυτταρική ανταπόκριση.

Διακρίνονται δύο ξεχωριστοί πληθυσμοί Τ-κυττάρων. Από αυτά, τα CD4⁺ Τ-κύτταρα μπορούν να γίνουν είτε φλεγμονώδη (TH1) είτε βοηθητικά (TH2) κύτταρα, ενώ τα CD8⁺ Τ-κύτταρα είναι κατεξοχήν κυτταροτοξικά (TC).

Καθώς τα CD4⁺ Τ-κύτταρα διαφοροποιούνται, φαίνεται να διανύουν ένα ενδιάμεσο στάδιο, γνωστό ως TH0(ανώριμο δραστικό Τ κύτταρο).

Τα TH0 εκφράζουν μερικές διαφοροποιημένες δραστικές λειτουργίες και των φλεγμονωδών και των βοηθητικών Τ κυττάρων.

Το κύτταρο TH0 έχει την δυνατότητα να γίνει είτε φλεγμονώδες (TH 1) είτε βοηθητικό CD4 Τ-κύτταρο (TH 2).

Διάφοροι παράγοντες φαίνεται να αποφασίζουν για την κατεύθυνση αυτής της διαφοροποίησης όπως π.χ οι κυτταροκίνες που παράγονται από λοιμογόνους παράγοντες, οι συν-διεγέρτες που χρησιμοποιούνται, η φύση του συμπλέγματος πεπίδιο:ΜHC.

Έτσι, η επιλεκτική ενεργοποίηση των φλεγμονωδών Τ-κυττάρων θα οδηγήσει στην κυτταρική ανοσία. Αντίθετα, η επιλεκτική παραγωγή των βοηθητικών Τ-κυττάρων, προάγει την χυμική ανοσία.

Τα αθώα CD8⁺ Τ-κύτταρα ενεργοποιούνται άμεσα, όταν συναντήσουν συμπλέγματα πεπίδιο:ΜHC τάξεως Ι στην κυτταρική επιφάνεια των δενδριτικών κυττάρων. Ακολούθως, εκφράζουν IL-2R και επάγοντας την έκφραση των αλύσων της, εκκρίνουν IL-2 και πολλαπλασιάζονται ως ανταπόκριση σ' αυτή. Τελικά, διαφοροποιούνται σε δραστικά κυτταροτοξικά CD8⁺ Τ-κύτταρα.

Οι καλύτερα γνωστές λειτουργίες των άμεσα ειδικών δραστικών Τ-κυττάρων επιτυγχάνονται από εκκρινόμενα μόρια, των οποίων η απελευθέρωση διεγείρεται από την ειδική αναγνώριση του αντιγόνου.

Τα μόρια αυτά ανήκουν σε δύο μεγάλες κατηγορίες³⁰: τις κυτταροξίνες, οι οποίες απελευθερώνονται από τα CD8⁺ κυτταροτοξικά Τ-κύτταρα και από μερικά φλεγμονώδη CD4⁺ Τ-κύτταρα και τις κυτταροκίνες, οι οποίες απελευθερώνονται από όλα τα

δραστικά T- κύτταρα και είναι οι βασικοί μεσολαβητές για την δράση των CD4⁺ T-κυττάρων.

Τα CD8⁺ T-κύτταρα, τα οποία είναι κυρίως φονικά κύτταρα, απελευθερώνουν τις κυτταροξίνες περφορίνη 1 και θρυματίνη καθώς και την κυτταροκίνη IFN- γ , η οποία φαίνεται ότι εμποδίζει την ιική αντιγραφή.

Τα φλεγμονώδη CD4⁺ T-κύτταρα, τα βοηθητικά CD4⁺ T-κύτταρα καθώς και ο πρόδρομος τους TH0, εκκρίνουν διαφορετικά αλλά αλληλοσυμπληρούμενα είδη κυτταροκινών. Τα βοηθητικά T-κύτταρα, εκκρίνουν τις IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, που όλες ενεργοποιούν τα B-κύτταρα.

Τα φλεγμονώδη T-κύτταρα, εκκρίνουν την IFN- γ , και τον TNF α (παράγοντα νέκρωσης των όγκων- α), που ενεργοποιούν τα μακροφάγα .

Η IL-3 και ο GM-CSF (παράγοντας διέγερσης των αποικιών κοκκιοκυττάρων-μακροφάγων), απελευθερώνονται και από τα φλεγμονώδη και από τα βοηθητικά CD4 T-κύτταρα· ασκούν δε την δράση τους στα κύτταρα του μυελού των οστών, διεγείροντας την μυελοποίηση και την παραγωγή κοκκιοκυττάρων και μακροφάγων.

ΦΑΙΝΟΤΥΠΟΣ T - ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΩΝ

Φαίνεται πως υπάρχουν τουλάχιστον δύο δρόμοι που ακολουθούν τα T-κύτταρα κατά την διαφοροποίησή τους στον θύμο αδένα³¹.

Τα περισσότερα από αυτά είναι α/β TCR κύτταρα, τα οποία αποτελούν περίπου το 95% των T-λεμφοκυττάρων που ανευρίσκονται στα δευτερογενή λεμφικά όργανα και την κυκλοφορία.

Φαινοτυπικές αναλύσεις³² έχουν δείξει ότι υφίστανται διαδοχικές αλλαγές στα αντιγόνα επιφανείας κατά την ωρίμανση των T-κυττάρων. Μπορεί έτσι να καταγραφεί ένα μοντέλο, στο οποίο οι φαινοτυπικές αλλαγές, ακολουθούν τρία στάδια: (βλ. σχήμα στο τέλος της ενότητας)

Στάδιο πρώτο : διακρίνουμε δύο φάσεις- Στην πρώτη, τα T κύτταρα εκφράζουν το CD44 και το CD25 και είναι CD4⁻CD8⁻ (διπλά αρνητικά).

Στην δεύτερη φάση, τα κύτταρα χάνουν το μόριο CD44⁻ αλλά συνεχίζουν να εκφράζουν το CD25⁻, και αρχίζει η διαμόρφωση της β-αλυσού του TCR. Αρχίζει ήδη η κυτταροπλασματική αρχική έκφραση του CD3, ενώ κάνουν την εμφάνισή τους οι CD71 και CD38, δείκτες που υποδηλώνουν κυτταρικό πολλαπλασιασμό.

Στάδιο δεύτερο: τα κύτταρα εκφράζουν CD4⁺ και CD8⁺ (διπλά θετικά), συνεχίζει η διαμόρφωση της α-αλυσού και εκφράζεται τώρα σε χαμηλά επίπεδα ο α/βTCR, σε συνδυασμό με το μόριο CD3 ως δείκτη κυτταρικής επιφανείας.

Στάδιο τρίτο : όλα πια τα κύτταρα εκφράζουν το CD44, υψηλές τιμές CD3 σε συνδυασμό με TCR, και γίνεται εμφανής πια η διάκριση σε δύο υποπληθυσμούς κυττάρων, που ο καθένας εκφράζει ή το CD4 ή το CD8. Τα T-κύτταρα αναγνωρίζονται εύκολα με την βοήθεια μονοκλωνικών αντισωμάτων. Οι δείκτες κυτταρικής επιφανείας, διακρίνουν τα T-κύτταρα σε ξεχωριστούς υποπληθυσμούς. Οι δείκτες που ευρύτατα χρησιμοποιούνται είναι ο CD4, ο οποίος αναγνωρίζει έναν υποπληθυσμό με βοηθητική λειτουργία και ο CD8, ο οποίος αναγνωρίζει έναν υποπληθυσμό με κυτταροτοξικές λειτουργίες.

CD1

Ο CD1 ήταν η πρώτη ομάδα που αναγνωρίστηκε το 1984 και αποτελείται από αντιγόνα που ανακαλύφθηκαν στα φλοιώδη θυμοκύτταρα και όχι στα κύτταρα του μυελού του θύμου ή στα περιφερικά ώριμα T-κύτταρα.

CD2

Πρόκειται για μία γλυκοπρωτεΐνη μοριακού βάρους 50 KD, η οποία εκφράζεται νωρίς στην διαφοροποίηση των T-κυττάρων και είναι παρούσα σε όλα τα ώριμα T-κύτταρα.

Εκτελεί δύο λειτουργίες : προσκόλληση και ενεργοποίηση. Το CD2 είναι χαλαρά συνδεδεμένο με τον TCR και μπορεί έτσι να συνεισφέρει στην ενεργοποίηση του T-κυττάρου.

Αποτελεί τον υποδοχέα του LFA-3 (lymphocyte function antigen -3), που βρίσκεται στην επιφάνεια όλων των αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων (APCs).

Η παρουσία του LFA-3 στα ερυθροκύτταρα προβάτου ευθύνεται για τον σχηματισμό τους σε ροζέτες, χρησιμοποιούσαν δε ευρέως για τον προσδιορισμό των T κυττάρων πριν την ανακάλυψη των μονοκλωνικών αντισωμάτων. Ο LFA-3 μεσολαβεί

στην προσκόλληση των T κυττάρων στα APCs και φαίνεται πως φέρει τον TCR στην πιο κατάλληλη απόσταση για να αλληλεπιδράσει με το σύμπλεγμα MHC:πεπτίδιο.

CD3

Πρόκειται για ένα σύμπλεγμα πολυπεπτιδικών αλυσίδων που έχουν τις κατάλληλες κυτταροπλασματικές προεκτάσεις για την μεταγωγή στο εσωτερικό του κυττάρου, ότι ολοκληρώθηκε η αντιγονική σύνδεση με τον TCR.

Το σύμπλεγμα του CD3 μορίου, είναι συνδεδεμένο με τον υποδοχέα για το αντιγόνο του T κυττάρου και φαίνεται πως είναι απαραίτητο για την έκφραση επί της κυτταρικής επιφάνειας του υποδοχέα του T κυττάρου και την μεταγωγή σήματος από αυτόν.

Τρεις από τις πρωτεΐνες του συμπλέγματος η CD3γ, CD3δ και CD3ε, είναι μερικώς ομόλογες με τις ανοσοσφαιρίνες, φέρουν δε στο κυτταροπλασματικό άκρο τους τις ακολουθίες ITAM (Immuno-receptor Tyrosine –based Activation Motifs) που τους επιτρέπει να συνδέονται με κυτταροπλασματικές κινάσες της τυροσίνης, ύστερα από διέγερση του υποδοχέα.

CD4

Το μόριο CD4 είναι γλυκοπρωτεΐνη μοριακού βάρους 55KD αποτελούμενη από τέσσερις περιοχές παρόμοιες με την ανοσοσφαιρίνη.

Οι δύο πρώτες περιοχές (D1 και D2) του μορίου CD4 είναι στενά συνδεδεμένες σχηματίζοντας μία άκαμπτη ράβδο, η οποία θεωρείται ότι ενώνεται δια μέσου μιας ελαστικής άρθρωσης, με μια παρόμοια ράβδο που σχηματίζεται από την τρίτη και τέταρτη περιοχή (D3 και D4). Η κυτταροπλαστική περιοχή αλληλεπιδρά εντόνως με μια κυτταροπλασματική κινάση τυροσίνης που ονομάζεται LcK, η οποία δίνει την δυνατότητα στο μόριο CD4 να συμμετάσχει στην μεταγωγή σήματος.

Το CD4 συνδέεται με μόρια MHC τάξεως II. Η σύνδεση αυτή γίνεται σε ένα σημείο στην περιοχή β2 του μορίου MHC τάξεως II, που βρίσκεται αρκετά μακριά από το σημείο με το οποίο συνδέεται ο υποδοχέας του T-κυττάρου. Η παρουσία CD4 έχει σαν αποτέλεσμα σημαντική αύξηση της ευαισθησίας ενός T-κυττάρου στο αντιγόνο που παρουσιάζεται από τα μόρια MHC τάξεως II.

CD5

Το μόριο CD5 εκφράζεται στα ώριμα T-κύτταρα και σε αρκετά θυμοκύτταρα, όπως επίσης και σε έναν υποπληθυσμό B-λεκφοκυττάρων.

Το CD5 προκαλεί ενεργοποίηση και πολλαπλασιασμό των T-κυττάρων με έκκριση IL-2 και επαγωγή των υποδοχέων της.

Συνδέεται με τον TCR και άλλους συνυποδοχείς στα φυσιολογικά T-κύτταρα, σαν ένα μέρος ενός μεγάλου σύνθετου μορίου που εμπλέκεται με την ενεργοποίηση των T-κυττάρων.

CD7

Το μόριο CD7 είναι μια πρωτεΐνη μοριακού βάρους 40KD. Εκφράζεται στην πλειοψηφία των περιφερικών T λεμφοκυττάρων και όλα τα θυμοκύτταρα. Θεωρείται ένας από τους πρώιμους δείκτες των T κυττάρων και ανευρίσκεται στον μυελό των οστών, όπως επίσης στα ηπατικά κύτταρα του εμβρύου, και στο ανώτερο μεσοθωράκιο την στιγμή του αποικισμού του από τον εμβρυικό θύμο αδένα.

Το μόριο CD7 συσχετίζεται με την κινάση τυροσίνης άμεσα ή έμμεσα, μέσω της σύνδεσης με το CD3 και CD45. Φαίνεται πως δρά σαν συμπληρωματικό μόριο στην ενεργοποίηση των T κυττάρων. Επαναρυθμίζει την προσκόλληση των T κυττάρων, με την μεσολάβηση των β1 και β2 ιντεγκρινών.

CD8

Πρόκειται για ένα ετεροδιμερές μοριακού βάρους 32-34KD που περιλαμβάνει τις αλυσίδες α και β. Οι δύο αλυσίδες έχουν παραπλήσιες δομές, κάθε μία εκ των οποίων περιλαμβάνει μία μόνο περιοχή παρόμοια με την μεταβλητή περιοχή ανοσοσφαιρίνης και μια λωρίδα πεπτιδίου, που συνδέει το πιο πάνω τμήμα με την μεμβράνη του κυττάρου.

Το CD8 συνδέεται αδύναμα από μόνο του με την περιοχή α3 των μοριων MHC τάξεως I, επιτρέποντας της να συνδεθεί ταυτόχρονα με τον υποδοχέα T-κύτταρου.

Επίσης, το CD8 συνδέεται με την LcK δια του κυτταροπλασματικού άκρου του και αυξάνει την ευαισθησία των T-κυττάρων που φέρουν συν-υποδοχέα CD8 στα αντιγόνα που παρουσιάζονται από τα μόρια MHC τάξεως I κατά 100 περίπου φορές.

Το μόριο CD8 λειτουργεί ως συν-υποδοχέας του TCR, η παρουσία του θεωρείται απαραίτητη για τα κυτταροτοξικά T κύτταρα.

Σαν συν-υποδοχέας, το μόριο CD8 επαυξάνει σαφώς την ενεργοποίηση των T κυττάρων.

CD25

Αποτελεί την α-αλυσίδα (MW:55KD) του υποδοχέα της IL-2 και η έκφρασή της, επάγεται κατά την ενεργοποίηση των T-λεμφοκυττάρων.

Η έκφραση του υποδοχέα της IL-2 (IL-2R), είναι κρίσιμο στάδιο στην ενεργοποίηση των T-κυττάρων.³³

Ο υποδοχέας της IL-2 (IL-2R), φαίνεται ότι είναι μόριο αποτελούμενο από τρεις πολυπεπτιδικές αλυσίδες τις α, β και γ, πλήρως εκφρασμένες μόνο σε ενεργοποιημένα T-κύτταρα. Οι αλυσίδες α-και β-δεσμεύουν των IL-2, ενώ η αλυσίδα-γ στέλνει σήμα στο κύτταρο. Στα ήρεμα T-κύτταρα εκφράζεται μόνο η β και γ αλυσίδα. Αυτά, συνδέουν την IL-2 με δεσμούς χαμηλής συγγένειας και έτσι ανταποκρίνονται σε πολύ υψηλές συγκεντρώσεις IL-2.

Όταν τα T-κύτταρα ενεργοποιηθούν, εκφράζουν περισσότερες από 50.000 α-αλυσίδες για κάθε κύτταρο και έτσι ο υποδοχέας της IL-2 (IL-2R) αποτελούμενος τώρα πια από τρεις πεπτιδικές αλυσίδες, έχει υψηλή συγγένεια για IL-2, επιτρέποντας έτσι στα T-κύτταρα να ανταποκρίνονται σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις IL-2.

CD28

Όπως προαναφέρθηκε, για την ενεργοποίηση των αθώων T-κυττάρων απαιτούνται δύο ανεξάρτητα σήματα.

Το πρώτο σήμα, δίνεται από την δέσμευση του συμπλέγματος πεπτιδίου:MHC στον T-κυτταρικό υποδοχέα για το αντιγόνο. Η ειδική για κάποιο αντιγόνο κλωνική έκπτυξη των αθών T-κυττάρων, απαιτεί ένα δεύτερο συν-διεγερτικό σήμα, το οποίο στην περίπτωση των CD4 T-κυττάρων, αποστέλλεται από το ίδιο το αντιγονο-παρουσιαστικό κύτταρο(APC)επί του οποίου το T-κύτταρο αναγνωρίζει το ειδικό αντιγόνο του.

Τα καλύτερα χαρακτηρισθέντα συν-διεγερτικά μόρια στα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα είναι οι δομικά συγγενείς γλυκοπρωτείνες B7.1 και B7.2²⁷ Ο υποδοχέας για τα B7 μόρια στα T-κύτταρα, είναι το μόριο CD28(MB:44KD).

Η σύνδεση του CD28 με το μόριο B7,δίνει και το δεύτερο σήμα για την ενεργοποίηση των T-κυττάρων.

Το κύριο αποτέλεσμα της εκπομπής σημάτων μέσω του CD28 φαίνεται να είναι η σταθεροποίηση του mRNA της IL-2.³⁴

Η σταθεροποίηση του mRNA της IL-2 αυξάνει την σύνθεσή της κατά 20 με 30 φορές και συγχρόνως η δέσμευση του CD28 αυξάνει την μεταγραφή του mRNA της IL-2 περίπου κατά τρεις φορές.

Όταν ένα T-κύτταρο αναγνωρίζει ένα ειδικό αντιγόνο χωρίς να υπάρχει συν-διεγερτικό σήμα μέσω του CD28 μορίου, παράγεται λίγη IL-2 και το T-κύτταρο δεν προάγει αποτελεσματικά τον πολλαπλασιασμό του.

CD45

Είναι μια διαμεμβρανική τυροσινοφωσφατάση,³⁵ με τρία μεταβλητά εξόνια (A,B,C) που κωδικοποιούν μέρος της εξωτερικής του περιοχής.

Η ενεργοποίηση των T-κυττάρων³⁶, συντονίζεται από το μόριο αυτό.

Όπως οι συν-υποδοχείς έτσι και το CD45, θεωρείται ότι συνδέεται φυσικά με το σύμπλεγμα του υποδοχέα του T-κυττάρου για το αντιγόνο.

Στα αθώα T-κύτταρα βρέθηκαν ισομορφές μεγάλου μοριακού βάρους (CD45RA) που δεν σχετίζονται με κανένα T-κυτταρικό υποδοχέα ή συν-υποδοχέα.

Η ενεργοποίηση των T-λεμφοκυττάρων, αλλάζει την ισομορφή του CD45 από CD45RA σε CD45RO(φαινότυπος μνημονικών κυττάρων), μορφή που συνδέεται πια με τον T-κυτταρικό υποδοχέα και τους συν-υποδοχείς.

Η αλλαγή αυτή, γίνεται εξαιτίας της διαφορετικής σύνδεσης εξονίων που κωδικοποιούν την εξωκυτταρική περιοχή του CD45.

Τα ενεργοποιημένα T-κύτταρα μετατρέπονται σε δραστικά T-κύτταρα, πολλά εκ των οποίων πεθαίνουν με απόπτωση καθώς και σε μνημονικά T-κύτταρα.

Οι αλλαγές αυτές στην ισομορφή του μορίου CD45, καθιστούν το T-κύτταρο πιο ευαίσθητο στην ενεργοποίηση από χαμηλές συγκεντρώσεις συμπλεγμάτων, πεπτιδίου:MHC³⁷

CD69

Πρόκειται για γλυκοπρωτείνη τύπου II, μοριακού βάρους 60kDa με λεκτίνη C-τύπου δεσμευμένη σε εξωκυτταρική θέση του μορίου. Το μόριο CD69 εκφράζεται στα περισσότερα κύτταρα της αιμοποιητικής σειράς, συμπεριλαμβανομένου των T- και B-

λεμφοκυττάρων, των NK κυττάρων, ώριμων μακροφάγων, ουδετεροφίλων και ηωσινοφίλων.

Συμβάλλει στην ενεργοποίηση των T-κυττάρων(είσοδος Ca^{++} , σύνθεση διαφόρων κυτοκινών, συμμετοχή στην έκφραση των c-myc και c-fos πρωτοογκογονιδίων), καθώς και στην ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων(είσοδος Ca^{++} , υδρόλυση αραχιδονικού οξέος, συνάθροιση αιμοπεταλίων).

Εκφράζεται σε αυξημένα ποσοστά σε διάφορες φλεγμονώδεις νόσους(ρευματοειδής αρθρίτις, ιογενής ηπατίτιδα, αυτοάνοση θυροειδίτιδα).

Σχήμα 38



Έκφραση των δεικτών κυτταρικής επιφανείας στα διάφορα στάδια διαφοροποίησης των Τ-κυττάρων.

Αποτελεί γενικό κανόνα στην ειδική ανοσία ότι τα αθώα αντιγονοειδικά λεμφοκύτταρα δεν μπορούν να ενεργοποιηθούν από το αντιγόνο όταν αυτό δρα μόνο του.

Τα αθώα T-κύτταρα, απαιτούν ένα συνδιεγερτικό σήμα από τα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα. Τα αθώα B-κύτταρα, απαιτούν σήματα, τα οποία μπορεί να προέρχονται είτε από ένα άμεσο δραστικό βοηθητικό T-κύτταρο ή και σε μερικές περιπτώσεις, απευθείας από μικροβιακά συστατικά.

Τα B-κύτταρα τα οποία έχουν επιτυχώς δεσμεύσει το αντιγόνο και έχουν επιβιώσει από την επιλογή, αφήνουν το βλαστικό κέντρο για να γίνουν είτε μνημονικά B-κύτταρα, είτε πλασματοκύτταρα που εκκρίνουν αντισώματα. Ποια από τις δύο πορείες ακολουθεί ένα δεδομένο B-κύτταρο φαίνεται ότι προσδιορίζεται με σήματα, από τα θυλακιώδη δενδριτικά κύτταρα και τα T-κύτταρα, καθώς τα B-κύτταρα εγκαταλείπουν το βλαστικό κέντρο.⁴¹

Τα B-κύτταρα που εγκαταλείπουν το βλαστικό κέντρο για να γίνουν μνημονικά B-κύτταρα, δεν εκκρίνουν αντισώματα κατά την κύρια ανταπόκριση, αλλά μπορούν γρήγορα να ενεργοποιηθούν από το ίδιο το αντιγόνο.

Φαίνεται, πως τα διάσπαρτα CD4 T-κύτταρα στα βλαστικά κέντρα, τα οποία εκφράζουν τον CD40 συνδέτη, είναι εκείνα που προκαλούν την διαφοροποίηση των B-κυττάρων σε μνημονικά κύτταρα.

Ο CD40 συνδέτης είναι ικανός να επάγει την έκφραση του bcl-2 γονιδίου σε B-κύτταρα, και αυτό φαίνεται πως συμβάλλει στην επιβίωση των μνημονικών B-κυττάρων.

Η ανοσολογική μνήμη στα B-κύτταρα, μπορεί να εξετασθεί μέσω μεμονωμένων B-κυττάρων ποντικών προδιεγερμένων με αντιγόνο, όταν τα κύτταρα αυτά επαναδιεγερθούν με το ίδιο αντιγόνο παρουσία δραστικών T-κυττάρων.⁴²

Με τον τρόπο αυτό, είναι δυνατόν να δειχθεί ότι, τα μνημονικά B-κύτταρα διαφέρουν ποσοτικά και ποιοτικά από τα αθώα B-κύτταρα. Αντίθετα με την πρωτογενή αντισωματική απάντηση που χαρακτηρίζεται από άφθονη παραγωγή IgM, τα αντισώματα που παράγονται από τα μνημονικά B-κύτταρα εκφράζουν IgG, IgA ή IgE στην επιφάνειά τους, καθώς και υψηλότερα επίπεδα μορίων MHC τάξεως II, από ότι χαρακτηριστικά ισχύει για τα αθώα B-κύτταρα.

Όλες αυτές οι αλλαγές διευκολύνουν την πρόσληψη του αντιγόνου και την παρουσίαση του, επιτρέπουν δε στα B-κύτταρα μνήμης να ξεκινήσουν τις κρίσιμες αλληλεπιδράσεις τους με τα βοηθητικά T-κύτταρα σε χαμηλότερες δόσεις αντιγόνου.

Σε αντίθεση με τα μνημονικά B-κύτταρα που μπορούν να διαχωριστούν από τις αλλαγές στα γονίδια των ανοσοσφαιρινών τους, ο υποδοχέας των T-λεμφοκυττάρων για το αντίσωμα δεν υφίσταται τέτοια αλλαγή.⁴³

Πολλά μόρια κυτταρικής επιφανείας αλλάζουν την έκφραση τους στα μνημονικά T-κύτταρα. Οι αλλαγές αυτές αυξάνουν την πρόσδεση του T-κυττάρου στα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα, καθώς και την ευαισθησία τους στην κινητοποίηση μέσω αντιγόνου.

Δεν είναι εύκολο όμως να καθοριστεί πότε αυτά γίνονται μνημονικά T-κύτταρα και πότε μακρόβια δραστικά T-κύτταρα.

Μία πιθανότητα είναι ότι τα ενεργοποιημένα αθώα T-κύτταρα διαφοροποιούνται απευθείας σε μνημονικά T-κύτταρα.

Η άλλη πιθανότητα είναι ότι τα ενεργοποιημένα αθώα T-κύτταρα πρώτα διαφοροποιούνται σε δραστικά T-κύτταρα, μερικά εκ των οποίων είναι βραχύβια και πεθαίνουν με απόπτωση, ενώ κάποια άλλα μετατρέπονται σε μακρόβια μνημονικά T-κύτταρα .

Τα CD4 T-κύτταρα, φαίνεται πως μπορούν να διαφοροποιηθούν είτε σε δραστικά T-λεμφοκύτταρα είτε σε T-κύτταρα μνήμης.

Μετά την έκθεση στο αντιγόνο οι τρεις πρωτεΐνες κυτταρικής επιφανείας, L-σελεκτίνη, CD44 και CD45, υφίστανται σημαντικές αλλαγές. Η αλλαγή του CD45 σε CD45RO(φαινότυπος μνημονικών κυττάρων) το καθιστά ικανό να συνδεθεί με τον T-κυτταρικό υποδοχέα και το CD4, πράγμα που διευκολύνει και την αναγνώριση του αντιγόνου.

Εν τούτοις, μερικά κύτταρα στα οποία συμβαίνουν αυτές οι αλλαγές, έχουν χαρακτηριστικά CD4 T-κυττάρων που βρίσκονται σε ηρεμία, κάτι που υποδηλώνει ότι δεν πρόκειται για άμεσα δραστικά T-κύτταρα.

Μόνο μετά επανέκθεση στο αντιγόνο, θα μπορέσουν να μετατραπούν σε άμεσα δραστικά T-κύτταρα με τα χαρακτηριστικά ενός βοηθητικού ή φλεγμονώδους CD4 T-κυττάρου, εκκρίνοντας IL-4, IL-5 ή IFN- γ και TNF- β αντίστοιχα. Αυτός είναι και ο πληθυσμός των CD4 T-κυττάρων μνήμης.

Φαίνεται λοιπόν, πως η ανοσολογική μνήμη, η αυξημένη δηλαδή ικανότητα απάντησης σε αντιγόνα που προηγούμενα συνάντησε ο οργανισμός, εξαρτάται από την ύπαρξη ενός πληθυσμού λεμφοκυττάρων μνήμης ο οποίος, αποτελείται τόσο από B όσο και T-μνημονικά κύτταρα.

ΦΥΣΙΚΑ ΦΟΝΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ (NK)

Το πρώτο λοιπόν βήμα σε κάθε ανοσολογική απάντηση που οδηγεί σε προστατευτική ανοσία, είναι η ενεργοποίηση των T-κυττάρων στα τελικά λεμφικά όργανα. Έτσι, τα άμεσα πια δραστικά κύτταρα είτε εγκαταλείπουν το λεμφικό όργανο για να δράσουν μέσω της κυτταρικής ανοσίας στις περιοχές λοίμωξης στους ιστούς ή παραμένουν στο λεμφικό όργανο για να πάρουν μέρος στην χυμική ανοσία ενεργοποιώντας τα B-κύτταρα.

Τα μολυσμένα με αντιγόνο κύτταρα, συνήθως καταστρέφονται από T-λεμφοκύτταρα που διεγείρονται από ξένα πεπτίδια τα οποία δημιουργούν σύμπλεγμα με τα MHC μόρια της κυτταρικής μεμβράνης³⁹.

Ωστόσο τα μολυσμένα από ιό κύτταρα, μπορούν επίσης να σηματοδοτήσουν την παρουσία ενδοκυττάριας λοίμωξης, εκφράζοντας πάνω στις επιφάνειές του, ιικές πρωτεΐνες οι οποίες μπορούν να αναγνωριστούν από αντισώματα.

Τα κύτταρα που είναι δεσμευμένα από τέτοια αντισώματα μπορούν να φονευθούν από ένα ειδικό μη-B, μη-T-λεμφικό κύτταρο, που καλείται φυσικό φονικό κύτταρο (NK).

Τα φυσικά φονικά κύτταρα, είναι μεγάλα λεμφοκύτταρα με χαρακτηριστικά κοκκία και αντιπροσωπεύουν μια τρίτη σειρά λεμφικών κυττάρων με συγκροτημένη ικανότητα να επιτυγχάνουν κυτταροτοξικότητα σε παθογόνα κύτταρα-στόχους, και να εκκρίνουν κυττοκίνες⁴⁰.

Αρχικά, ταυτοποιήθηκαν στο περιφερικό αίμα και άλλα λεμφικά όργανα σαν κύτταρα ικανά για εξόντωση μιας ποικιλίας κυττάρων, όπως κύτταρα προερχόμενα από όγκους και κύτταρα προσβεβλημένα από ιούς.

Τα φυσικά φονικά κύτταρα, παρουσιάζονται σαν κυτταροτοξικά κύτταρα με μορφολογία LGL (large granular lymphocytes), όπου (α) κανένα δεν εκφράζει αντιγονικό υποδοχέα ούτε B ούτε T-κυττάρου, (β) εκφράζουν – στην πλειοψηφία των περιπτώσεων – το μόριο CD16 και CD56 στην κυτταρική τους μεμβράνη, και (γ) εκκρίνουν κυττοκίνες ακόμα και σε απουσία αντιγόνου MHC τάξεως I ή II στα κύτταρα στόχους.

Τα φυσικά φονικά κύτταρα προέρχονται από τον μυελό των οστών, από το κοινό προγονικό κύτταρο της λεμφικής σειράς το οποίο δίνει γένεση σε T, B και NK κύτταρα. Η διαφοροποίηση τους, δεν χρειάζεται την παρουσία του θύμου αδένου, αν και πρόδρομες μορφές τους, μπορούν να ανευρεθούν εκεί. Ωριμες μορφές των φυσικών φονικών κυττάρων ως επί το πλείστον ανευρίσκονται στο περιφερικό αίμα (όπου και αποτελούν το 15% των λεμφοκυττάρων) και στον σπλήνα. Στον μυελό των οστών, αποτελούν λιγότερο από το 1% των κυττάρων του, υποδεικνύοντας έτσι ότι δεν αποτελούν έναν απομονωμένο πληθυσμό. Μικρός αριθμός NK κυττάρων ανευρίσκονται ακόμα στο ήπαρ, τους πνεύμονες και τον εντερικό βλεννογόνο.

Τα φυσικά φονικά κύτταρα φαίνεται πως παράγουν IFN- γ και αυξητικούς παράγοντες των αποικιών κοκκιοκυττάρων – μακροφάγων (GM-CSF), ενώ η παρουσία τους εμπλέκεται και στην παραγωγή TNF- α , M-CSF, IL-3, IL-5, IL-8, IL-13 και άλλων κυτταροκινών. Η δράση τους αυξάνεται 20-100 φορές, όταν τα κύτταρα αυτά εκτεθούν στην IFN- α , IFN- β ή την IL-12, που αποτελεί μία από τις κυττοκίνες που παράγονται πρώιμα σε πολλές λοιμώξεις. Η IL-12 σε συνεργασία με τον TNF- α , μπορεί να οδηγήσει στην παραγωγή μεγάλων ποσών IFN- γ , που είναι βασική στον έλεγχο πολλών

λοιμώξεων πριν τα T-κύτταρα ενεργοποιηθούν για την παραγωγή αυτής της κυτταροκίνης. Τα φυσικά φονικά κύτταρα μαζί με τα μακροφάγα, αποτελούν την πρώτη γραμμή άμυνας του οργανισμού απέναντι στις λοιμώξεις. In vitro, τα NK κύτταρα φονεύουν εκλεκτικά, κύτταρα προσβεβλημένα από τους ιούς, με μηχανισμό που εξαρτάται από την παραγωγή IFN-α. In vivo, η ιογενής λοίμωξη και η παραγωγή ιντερφερόνης, συχνά συνοδεύεται από γρήγορη ενεργοποίηση και αύξηση του αριθμού των φυσικών φονικών κυττάρων.

Η απάντηση των NK κυττάρων σε ιογενή λοίμωξη, φθάνει στο μέγιστό της περίπου τρεις μέρες μετά, και ακολουθείται από αντίστοιχη απάντηση των αντιγονοειδικών βοηθητικών T-κυττάρων.

Τα φυσικά φονικά κύτταρα, έχουν περιγραφεί και ως κυτταροτοξικά για βακτήρια και αρκετά παράσιτα. Αυτό φαίνεται να εξηγείται από την παραγωγή υψηλών επιπέδων IFN-γ και GM-CSF σαν απάντηση στην είσοδο ξενιστών στον οργανισμό.

Τέλος, φαίνεται πως τα NK κύτταρα εμπλέκονται και στην ρύθμιση της αιμοποίησης μέσω της παραγωγής κυτταροκινών, όπως ο TNF, η IFN-γ, η IL-3 και οι αυξητικοί παράγοντες GM-CSF και M-CSF.

ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΧΗΜΕΙΟΘΕΡΑΠΕΙΑΣ ΣΤΟΥΣ ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΙΚΟΥΣ ΥΠΟΠΛΗΘΥΣΜΟΥΣ

Η χρήση της χημειοθεραπείας στην αντιμετώπιση διαφόρων συμπαγών νεοπλασμάτων αυξάνει συνεχώς. Για ορισμένα νεοπλάσματα υφίσταται μια σαφής συσχέτιση μεταξύ της εντάσεως της χημειοθεραπείας, και του θεραπευτικού της αποτελέσματος.

Ήδη από τις αρχές της δεκαετίας του '60 ο Skipper και οι συνεργάτες του έθεσαν τις θεωρητικές βάσεις της χημειοθεραπείας με τις μελέτες τους στην λευχαιμία L1210. Αν και η λευχαιμία των τρωκτικών δεν μοιάζει απόλυτα με τους όγκους των ανθρώπων, με εξαίρεση ίσως το λέμφωμα Burkitt, οι παρατηρήσεις του Skipper ήταν πολύτιμες.

Ένα από τα πιο σημαντικά συμπεράσματα των εργασιών του ήταν, ότι τα αντινεοπλασματικά φάρμακα φονεύουν σταθερό κλάσμα καρκινικών κυττάρων, ανεξάρτητα από το μέγεθος του νεοπλασματικού πληθυσμού.

Εκτός όμως από την καταστροφή των νεοπλασματικών κυττάρων, η χημειοθεραπεία προκαλεί και αιματολογική τοξικότητα, επηρεάζοντας και τις τρεις κυτταρικές σειρές στον μυελό των οστών.

Η μυελική απλασία αποτελεί συχνή επιπλοκή της χημειοθεραπείας, που όχι σπάνια επιπλέκεται από την ανάπτυξη λοιμώξεων επικίνδυνων για την ζωή των ασθενών. Η επισυμβαίνουσα μυελοτοξικότητα αφορά την κοκκιώδη σειρά, τα αιμοπετάλια, τα ερυθρά αιμοσφαίρια, αλλά και τα λεμφοκύτταρα.

Τα τελευταία χρόνια, όλο και περισσότερο, παρατηρείται αυξημένη επίπτωση ευκαιριακών λοιμώξεων σε ασθενείς με νεοπλασματική νόσο.⁴⁴

Οι λοιμώξεις αυτές, που είναι ιδιαίτερα συχνές σε ασθενείς με μόλυνση από τον ιό της επίκτητης ανοσολογικής ανεπάρκειας (Human Immuno-deficiency virus), υποδηλώνουν ότι, υφίστανται σημαντικές διαταραχές των T-λεμφοκυττάρων κατά την διάρκεια της χημειοθεραπείας. Κατά συνέπεια, τέτοιες διαταραχές μπορούν να αφορούν τόσο την φυσική μη ειδική ανοσία (μακροφάγα, NK κύτταρα, ουδετερόφιλα) όσο και την ειδική χυμική και κυτταρική ανοσία.

Οι Evans και συνεργάτες⁴⁵ περιέγραψαν μεταβολές της κυτταρικής ανοσίας και ειδικότερα των πληθυσμών των NK κυττάρων και CD8⁺ T- λεμφοκυττάρων σε γυναίκες με HIV λοίμωξη. Η ύφεση της νόσου σε αυτούς τους ασθενείς φαίνεται να έχει αρνητικό αντίκτυπο, τόσο στην φυσική όσο και στην κυτταρική ανοσία. Παρατήρησαν έτσι, υψηλότερα επίπεδα ενεργοποιημένων CD8⁺ T- λεμφοκυττάρων, μείωση της λειτουργικότητας των NK κυττάρων, αυξημένο όμως ικό φορτίο.

Αντιστοίχως οι Mackall και συνεργάτες⁴⁶ διαπίστωσαν σημαντική μείωση του απόλυτου αριθμού των CD4⁺, CD8⁺ κυττάρων, καθώς και των B-λεμφοκυττάρων κατά την διάρκεια της χημειοθεραπείας. Συγχρόνως, οι Brunvald και συνεργάτες⁴⁷ παρατήρησαν μείωση του απόλυτου αριθμού των CD4⁺ κυττάρων και ανάπτυξη πνευμονίας από Pneumocystis Carinii σε δύο γυναίκες που υποβάλλονται σε συμπληρωματική χημειοθεραπεία για καρκίνο του μαστού.

Η ανοσοανεπάρκεια που προκαλείται από την χημειοθεραπεία, είναι πρωταρχικά συνδεδεμένη με μείωση των T-κυττάρων – και μάλιστα μείωση των CD4⁺ μεγαλύτερη από εκείνη των CD8⁺ κυττάρων. Οι ποσοτικές διαταραχές των λεμφοκυττάρων, κατά την διάρκεια της χημειοθεραπείας, δεν αφορούν μόνο τα T-λεμφοκύτταρα αλλά επίσης και τα B-λεμφοκύτταρα.

Δεδομένου του σημαντικού ρόλου των CD4⁺ κυττάρων, στην ενεργοποίηση των Β-λεμφοκυττάρων, μέσω της έκκρισης των κυτταροκινών IL-4, IL-5, και IL-6, ενισχύεται η άποψη ότι οι ασθενείς που εμφανίζουν μυελική απλασία μετά από χημειοθεραπεία παρουσιάζουν και σημαντική έκπτωση της ανοσολογικής τους επάρκειας. Η μείωση του απόλυτου αριθμού των λεμφοκυττάρων εξαρτάται άμεσα από τον βαθμό βαρύτητας της μυελοκαταστολής.

Εκτός όμως από την ποσοτική μείωση των CD4⁺, CD8⁺ και CD20⁺ λεμφοκυτταρικών υποπληθυσμών, φαίνεται πως υφίσταται και διαταραχή της ενεργοποίησής τους, όπως αυτή εκφράζεται μέσω των μορίων ενεργοποίησης (πχ. CD25 και HLA-DR).⁴⁸

Οι Robustelli della Cuna και συνεργάτες⁴⁹ διαπίστωσαν πως τα χημειοθεραπευτικά φάρμακα φαίνεται να προκαλούν μεταλλάξεις στον αντιγονικό υποδοχέα του T-κυττάρου – κάτι που τα καθιστά ανίκανα να αναγνωρίσουν αυτόλογα μόρια MHC ως μέρος του συνδέτη τους, με επακόλουθη απώλεια κάθε ικανότητας αντίδρασης.

Οι ταξάνες (paclitaxel και docetaxel) είναι αντινεοπλασματικοί παράγοντες, που όλο και περισσότερο τα τελευταία χρόνια, χρησιμοποιούνται στην συνδυασμένη χημειοθεραπεία συμπαγών όγκων. Είναι τα πρώτα φάρμακα που δρουν αυξάνοντας την συγκέντρωση των μικροσωληναρίων, καθώς συνδέονται εκλεκτικά και αναστρέψιμα με την β-υπομονάδα της τουμπουλίνης.

Η σύνδεση αυτή, αυξάνει τον πολυμερισμό της τουμπουλίνης σε σταθερούς μικροσωληνίσκους ενώ συγχρόνως αναστέλλεται ο αποπολυμερισμός τους. Έτσι, η φυσιολογική δυναμική ισορροπία μεταξύ συσσώρευσης – αποσυσσώρευσης των μικροσωληνίσκων διαταράσσεται, προς όφελος της συσσώρευσης με καταστροφικές συνέπειες για το διαιρούμενο κύτταρο, που τελικά οδηγείται στον θάνατο.^{50,51}

Πρόσφατα αναφέρθηκε, ότι ασθενείς με μη μικροκυτταρικό καρκίνο πνεύμονα, οι οποίοι υποβάλλονταν σε εβδομαδιαία χορήγηση paclitaxel με ακτινοβολία, εμφάνιζαν σοβαρού βαθμού CD4⁺ λεμφοπενία και διάμεση πνευμονία.⁵²

Ο εκτιμώμενος κίνδυνος να εμφανιστεί από την χορήγηση των ταξανών και ιδιαίτερα του docetaxel, μη ουδετεροπενική λοίμωξη, είναι πολύ μεγαλύτερος από ότι από την χορήγηση άλλων αντινεοπλασματικών φαρμάκων. Ο λόγος φαίνεται να είναι η μείωση συγκεκριμένων λεμφοκυτταρικών υποπληθυσμών κατά την χορήγησή τους. Πράγματι, φαίνεται να έχουμε μετά την χορήγηση του πρώτου κύκλου, μείωση των CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺ και CD56⁺ υποπληθυσμών.⁵³ Αντίθετα, δεν φαίνεται ότι επηρεάζεται ο αριθμός των CD20⁺ λεμφοκυττάρων. Η διακοπή της χορήγησης του docetaxel, οδήγησε σε ανάκαμψη των CD3⁺, CD4⁺ και CD8⁺ εντός 4-6 εβδομάδων.

Πρόσφατα⁵⁴ σε μελέτη φάσης I αναφέρθηκε πως η συνδυασμένη χορήγηση docetaxel-mitoxantrone, σαν πρώτης γραμμής θεραπεία σε ασθενείς με μεταστατικό καρκίνο μαστού, οδήγησε σε στατιστικά σημαντική μείωση όλων των λεμφοκυτταρικών υποπληθυσμών.

Η συν-χορήγηση δε G-CSF εξασφάλισε εκτός από την καλή ανεκτικότητα και ασφάλεια, λόγω του περιορισμού των επεισοδίων παρατεταμένης ουδετεροπενίας.

Μια άλλη κατηγορία κυτταροστατικών φαρμάκων, αποτελούν οι αλκυλιούντες παράγοντες, όπως η κυκλοφωσφαμίδη και ιφωσφαμίδη. Τα φάρμακα αυτά εμποδίζουν τον διπλασιασμό του DNA, δημιουργώντας μόνιμους και σταθερούς δεσμούς μεταξύ των αλύσεων του δίκλωνου DNA, με αποτέλεσμα, να εμποδίζεται το άνοιγμα των αλυσίδων του, στην φάση S του κυτταρικού κύκλου. Η κυκλοφωσφαμίδη επηρεάζει

κυρίως τον αριθμό και την λειτουργικότητα των λεμφοκυττάρων, ιδιαίτερα μετά από την χορήγηση χαμηλών δόσεων από το στόμα.

Η αναφερόμενη μείωση των Β-λεμφοκυττάρων φαίνεται να είναι μεγαλύτερη από εκείνη στα Τ-λεμφοκύτταρα, ενώ μεταξύ των Τ-κυτταρικών υποπληθυσμών, η μείωση των CD8⁺ είναι μεγαλύτερη από εκείνη των CD4⁺.⁵⁵

Τα κυτταροτοξικά φάρμακα διαφέρουν σημαντικά όσο αφορά την κατασταλτική τους δράση στο ανοσολογικό σύστημα. Η γνώση της δράσης τους, καθορίζει και τον ρόλο τους στην θεραπεία των νεοπλασμάτων. Η συνδυασμένη δε χορήγησή τους, φαίνεται να έχει διαφορετική επίδραση στους λεμφοκυτταρικούς υποπληθυσμούς. Έτσι, η συνδυασμένη χορήγηση paclitaxel-carboplatin, σε ασθενείς με καρκίνο ωοθηκών και μη μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα, φαίνεται πως αποτελεί μία ασφαλή θεραπευτική αγωγή, καθώς δεν συνοδεύεται από στατιστικά σημαντικές διαφοροποιήσεις στα Τ-λεμφοκύτταρα ή στους υποπληθυσμούς τους πριν, κατά την διάρκεια ή μετά το πέρας της χημειοθεραπείας.⁵⁶

Αντιθέτως, η συνδυασμένη χορήγηση paclitaxel-doxorubicin σε ασθενείς με καρκίνο μαστού, σύμφωνα με την παρατήρηση των Melichar B. et al.⁵⁷, προκαλεί μείωση σε στατιστικά σημαντικό βαθμό των CD3⁺, CD3⁺CD4⁺, CD3⁺CD8⁺ και CD8⁺CD28⁺ κυττάρων μετά τον πρώτο κύκλο χημειοθεραπείας. Οι στατιστικά αυξημένες τιμές των CD3⁺HLA-DR⁺, CD3⁺CD69⁺ και CD14⁺CD16⁺, πριν την έναρξη της χημειοθεραπείας, υποδηλώνουν πως στους ασθενείς με καρκίνο του μαστού, υφίσταται ενεργοποίηση των Τ-λεμφοκυττάρων, κάτι το οποίο θα μπορούσε να οδηγήσει στην συνδυασμένη χορήγηση ανοσοθεραπείας και χημειοθεραπείας στους ασθενείς αυτούς.

Η γνώση, πως η μυελική απλασία που ακολουθεί την χημειοθεραπεία, οδηγεί σε έκπτωση της ανοσολογικής επάρκειας λόγω των ποσοτικών αλλά και ποιοτικών διαταραχών που υφίστανται και οι τρεις κυτταρικές σειρές στον μυελό των οστών, μας βοηθά να κατανοήσουμε γιατί οι ασθενείς αυτοί έχουν και αυξημένο κίνδυνο για την ανάπτυξη ευκαιριακών λοιμώξεων. Κάτι το οποίο θα πρέπει να λαμβάνεται σοβαρά υπόψη στην αντιμετώπιση λευκοπενικών ασθενών με εμπύρετη λοίμωξη που δεν απαντά στην αγωγή με αντιβιοτικά ευρέος φάσματος.

ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΔΙΑΦΟΡΟΠΟΙΗΣΗ ΜΕΤΑ ΑΠΟ ΜΕΤΑΜΟΣΧΕΥΣΗ ΜΥΕΛΟΥ

Η λεμφοκυτταρική αναγέννηση μετά από χημειοθεραπεία συμπαγών όγκων, πολύ λίγο έχει μελετηθεί. Οι πληροφορίες προέρχονται κυρίως από τις παρατηρήσεις μετά από μεταμόσχευση μυελού των οστών.

Η μεταμόσχευση του μυελού των οστών, αποτελεί δραστική θεραπεία ασθενών με λευχαιμία, απλαστική αναιμία, ανοσοανεπάρκεια και μερικές παθήσεις του μεταβολισμού. Ωστόσο, οι πρώτες εβδομάδες μετά την μεταμόσχευση, χαρακτηρίζονται από διαταραχές της κυτταρικής αλλά και της χυμικής ανοσίας οι οποίες οδηγούν σε αυξημένη νοσηρότητα αλλά και θνησιμότητα, λόγω της ανάπτυξης ευκαιριακών λοιμώξεων.

Πρόσφατα, η χορήγηση υψηλών δόσεων χημειοθεραπείας σε συνδυασμό με αυτόλογη μεταμόσχευση αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων περιφερικού αίματος (PBSCT), έχει αρχίσει να αποτελεί μια σοβαρή θεραπευτική προσέγγιση για αιματολογικές νόσους και συμπαγή νεοπλάσματα.

Στηριζόμενοι στην παρατήρηση πως η αυτόλογη μεταμόσχευση αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων περιφερικού αίματος (PBSCT) επιταχύνει την αποκατάσταση των κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος, οι Katsura et al.⁵⁸ διαπίστωσαν σημαντικά αυξημένα επίπεδα ενεργοποιημένων T-κυττάρων (CD3⁺HLA-DR⁺, CD8⁺HLA-DR⁺), καθώς και κυτταροτοξικών T-κυττάρων (CD8⁺CD11b⁻) σε ασθενείς με καρκίνο του πνεύμονα, παρά με λέμφωμα.

Οι περισσότερες γνώσεις μας για την ανοσοβιολογία της μεταμόσχευσης του μυελού των οστών, έχουν αποκτηθεί από την μελέτη των T-κυττάρων ποντικών με μεταμόσχευση μυελού μετά από θανατηφόρα ακτινοβολία.

Όπως αναφέρθηκε, την μεταμόσχευση του μυελού των οστών ακολουθεί περίοδος ανοσοκαταστολής, κατά την οποία τα νέα T-λεμφοκύτταρα γεννιούνται είτε από τα stem cells ή από τα ανώριμα θυμοκύτταρα. Έχοντας υπόψη την σημαντική δράση της IL-7 στον πολλαπλασιασμό και την διαφοροποίηση των ανώριμων θυμοκυττάρων, αρκετοί συγγραφείς^{59,60} μελέτησαν την δράση της, σε ποντικούς μετά από μεταμόσχευση μυελού. Στους δέκτες που χορηγήθηκε IL-7, παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση των περιφερικών CD4⁺ T-λεμφοκυττάρων καθώς και βελτίωση της λειτουργίας των αντιγονοειδικών T-και B-κυττάρων.

Η μεταμόσχευση του μυελού των οστών, ακολουθείται από αλλαγές στην "δεξαμενή" των T-κυττάρων. Αν και οι μεταβολές αυτές είναι αναμενόμενες τους πρώτους μήνες μετά την μεταμόσχευση, αρκετοί ασθενείς φαίνεται να εξακολουθούν να τις έχουν και αρκετά χρόνια μετά.

Όπως υποστηρίζεται από τους Mackall et al.⁶¹ η ανοσολογική αποκατάσταση μετά από μεταμόσχευση μυελού των οστών, φαίνεται να χαρακτηρίζεται από απώλεια της ποικιλίας του T-αντιγονικού υποδοχέα, καθώς και ποσοτικές μεταβολές των T-λεμφοκυττάρων και κυρίως του CD4⁺ υποπληθυσμού.

Πρόσφατες μελέτες⁶² έχουν αναδείξει τον σημαντικό ρόλο του θυμοεξαρτώμενου δρόμου στην αναγέννηση των T-κυττάρων. Κάτι που μπορεί να βοηθήσει στην κατανόηση της τύχης των T-κυττάρων μετά από μεταμόσχευση.

Πράγματι, οι Donek et al.⁶³ μελετώντας ασθενείς με πολλαπλούν μυέλωμα οι οποίοι υποβλήθηκαν σε αυτόλογη μεταμόσχευση προδρόμων αιμοποιητικών κυττάρων,

προσδιόρισαν και την συνεισφορά του θύμου αδένου στην ανοσολογική αποκατάσταση, μετά την μεταμόσχευση. Η παραγωγή σημαντικού αριθμού νέων παύει T-κυττάρων από τον θύμο αδένου, μπορούσε να ανιχνευθεί 100 περίπου μέρες μετά την μεταμόσχευση, υπήρχε δε αντίστροφη συσχέτιση μεταξύ της ηλικίας και της παραγωγής νέων T-κυττάρων.

Σε πρόσφατη μελέτη οι Min et al.⁶⁴ προσπαθώντας να αποδείξουν, μετά από μεταμόσχευση μυελού των οστών, την λειτουργικότητα του θύμου αδένου, χορήγησαν keratinocyte growth factor (KGF) σε ποντικούς στην περίοδο πριν την μεταμόσχευση του μυελού. Βασιζόμενοι στην γνώση, πως η ανοσοανεπάρκεια που ακολουθεί την μεταμόσχευση του μυελού αποδίδεται ως επί το πλείστον σε απώλεια θυμικών επιθηλιακών κυττάρων και πως ο KGF προστατεύει ειδικά τον KGF-receptor που βρίσκεται στα επιθηλιακά κύτταρα, έδειξαν πως η χορήγηση KGF πριν την μεταμόσχευση του μυελού, προκαλεί σημαντική αύξηση της ικανότητας του θύμου να παράγει θυμοκύτταρα προερχόμενα από τον δότη.

Την λειτουργικότητα του θύμου, ώστε να μπορεί να παράγει αρκετά T-κύτταρα μετά από μεταμόσχευση μυελού των οστών, διατύπωσαν στην μελέτη τους, για τον υποτυπώδη θύμο αδένου νεογέννητων παιδιών με σοβαρή ανοσοανεπάρκεια, οι Patel et al.⁶⁵ Πριν την μεταμόσχευση και αρκετά νωρίς μετά από αυτήν, ο αριθμός των κυκλοφορούντων T-κυττάρων ήταν χαμηλός με υπεροχή των ώριμων CD45RO⁺ T-κυττάρων. Τρεις με έξι εβδομάδες μετά, τα θυμοεξαρτώμενα T-κύτταρα εκφράζουν το CD45RA⁺ στην επιφάνεια τους.

Γνωρίζουμε πως η αποκατάσταση των λεμφοκυττάρων μετά από μεταμόσχευση μυελού των οστών, χαρακτηρίζεται από την πρόωμη εμφάνιση φυσικών φονικών κυττάρων (NK), και χαμηλής αναλογίας T- και B-κυττάρων. Κατά την διάρκεια του πρώτου χρόνου μετά την μεταμόσχευση, ο αριθμός των NK που απομένει, είναι σταθερός, ενώ τα T- και B-κύτταρα βαθμιαία επιστρέφουν στις φυσιολογικές τους τιμές.

Έτσι, για τους ασθενείς με αυτόλογη μεταμόσχευση πολυδύναμων αιμοποιητικών κυττάρων, παρατηρείται γρηγορότερη αποκατάσταση των κυκλοφορούντων μονοκυττάρων (CD14⁺ κύτταρα), των φυσικών φονικών κυττάρων (NK, CD56), των T-βοηθητικών κυττάρων (CD4⁺) καθώς και των αθώνων T-λεμφοκυττάρων (CD45RA⁺). Αντιθέτως, οι ασθενείς μετά από αυτόλογη μεταμόσχευση μυελού των οστών, παρουσίαζαν γρήγορα αύξηση των κυτταροτοξικών T-κυττάρων (CD8⁺), των B-κυττάρων (CD19⁺) των CD34⁺ κυττάρων, των πολυμορφοπύρηνων λευκοκυττάρων και των T-κυττάρων μνήμης (CD45RO⁺).^{66,67,68}

Ο σημερινός ρόλος της έγκαιρης ανοσολογικής αποκατάστασης μελετήθηκε από τους Porraga et al.⁶⁹, σε ασθενείς με καρκίνο του μαστού οι οποίοι υποβλήθηκαν σε αυτόλογη μεταμόσχευση αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων. Βρέθηκε πως 15 ημέρες μετά την μεταμόσχευση: απόλυτος αριθμός λεμφοκυττάρων μεγαλύτερος ή ίσος με 500 κύτταρα/ μl (ALC \geq 500 cells/μl), σχετιζόταν με μεγαλύτερη επιβίωση των ασθενών.

Η μεταμόσχευση του μυελού των οστών, χαρακτηρίζεται και από παρατεταμένη χυμική ανοσοανεπάρκεια, κατά την οποία αρκετοί ασθενείς παρουσιάζουν μη φυσιολογικό B-κυτταρικό πληθυσμό. Μελετώντας την αποκατάσταση των προδρόμων μορφών των B-κυττάρων, στον ήδη μεταμοσχευθέντα μυελό των οστών παρατηρούμε πως μέσα σε ένα μήνα από την μεταμόσχευση, υπάρχει αυξημένη παρουσία ανώριμων B-κυττάρων (το 80% των ώριμων λεμφοκυττάρων) τα οποία παραμένουν για

περισσότερο από έναν χρόνο. Η αύξηση αυτή φαίνεται να είναι ανεξάρτητη της ηλικίας, καθώς είναι ίδια σε ενήλικες και παιδιά^{70,71}. Σε μερικούς μεταμοσχευθέντες ασθενείς, ένα μέρος των αναγεννημένων Β-λεμφοκυττάρων, εκφράζει ασυνήθιστα αντιγόνα κυτταρικής επιφάνειας, τα Leu-1 (CD5). Οι διαφοροποιήσεις στην έκφραση του Leu-1 (CD5), καθορίζουν δύο υποπληθυσμούς, στα αναγεννημένα Β-κύτταρα μετά από μεταμόσχευση μυελού των οστών. Τα Leu-1⁺ Β-κύτταρα είναι πολυκλωνικά, προερχόμενα δε από τον δότη, αποτελούν τον κύριο λεμφοκυτταρικό πληθυσμό μετά την μεταμόσχευση. Τα Leu-1⁺ Β-κύτταρα, εμφανίζονται 2-4 εβδομάδες μετά την μεταμόσχευση και προηγούνται της αναγέννησης των Leu-1⁻ Β-κυττάρων⁷². Αν και στους φυσιολογικούς ενήλικες ανευρίσκονται χαμηλές τιμές Leu-1⁺ Β-κυττάρων (περίπου το 1% των κυκλοφορούντων λεμφοκυττάρων και λιγότερο από το 5% των λεμφοκυττάρων του σπλήνα), ο πληθυσμός αυτών των κυττάρων φαίνεται να είναι ο κυρίαρχος στον εμβρυϊκό σπλήνα, αλλά και στο περιφερικό αίμα ενηλίκων και παιδιών μετά από μεταμόσχευση μυελού των οστών⁷².

Τέλος αξίζει να αναφερθεί, πως οι ασθενείς με μεταμόσχευση μυελού των οστών φαίνεται να έχουν μακράς διάρκειας διαταραχές στα Β-κύτταρα, ιδίως όταν επακολουθεί χρόνια GVHD (graft versus host disease).

Η μελέτη των ποσοτικών και φαινοτυπικών αλλαγών στα κυκλοφορούντα Β-κύτταρα μετά από μεταμόσχευση μυελού των οστών και η σύγκριση τους με την οντογέννηση των Β-κυττάρων, υποδηλώνει ότι σε ασθενείς χωρίς χρόνια GVHD, η ανάπτυξη των μεταμοσχευθέντων Β-κυττάρων, παραλληλίζεται με αυτήν της οντογένεσης.⁷³

ΑΠΟΚΑΤΑΣΤΑΣΗ ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΙΚΩΝ ΥΠΟΠΛΗΘΥΣΜΩΝ ΜΕΤΑ ΑΠΟ ΧΗΜΕΙΟΘΕΡΑΠΕΙΑ.

Παρά το γεγονός ότι οι περισσότερες πληροφορίες για την λεμφοκυτταρική αναγέννηση προέρχονται από τις παρατηρήσεις που υπάρχουν μετά από μεταμόσχευση μυελού των οστών, υφίσταται μία σημαντική διαφορά που αφορά στην ένταση της χημειοθεραπείας στην θεραπεία των συμπαγών όγκων και της μεταμόσχευσης μυελού των οστών.

Η ανοσοανεπάρκεια που ακολουθεί την κυτταροτοξική αντινεοπλασματική θεραπεία, είναι πρωταρχικά συνδεδεμένη με μείωση των T-λεμφοκυττάρων και μάλιστα η μείωση που αφορά τον $CD4^+$ υποπληθυσμό είναι μεγαλύτερη από εκείνη για τον $CD8^+$.

Η αποκατάσταση των T-κυττάρων υποπληθυσμών μετά από ΧΜΘ, είναι μια πολύπλοκη διαδικασία. Η αποτελεσματική αποκατάσταση των $CD4^+$ λεμφοκυττάρων φαίνεται να είναι εκτός από θυμοεξαρτώμενη και εξαρτημένη από ηλικιακούς παράγοντες, κάτι το οποίο διαπιστώνεται από την παρατεταμένη μείωση των $CD4^+$ λεμφοκυττάρων στους ενήλικες.

Αντιστοίχως, ο απόλυτος αριθμός των $CD8^+$ T-κυττάρων, αποκαθίσταται πιο γρήγορα μετά την ΧΜΘ και δεν διαπιστώνονται διαφορές μεταξύ παιδιών και ενηλίκων.⁷⁴

Η ομοιότητα των T-λεμφοκυττάρων φαίνεται να εξαρτάται από την *de novo* παραγωγή τους από το αιμοποιητικό αρχέγονο κύτταρο και την διαφοροποίηση τους που γίνεται στον θύμο αδένα.

Παράγοντες που συσχετίζονται με την ηλικία, είναι ενδεχόμενο να επιδρούν στην αποκατάσταση των T-κυττάρων, όταν αυτά υφίστανται μεταβολές όπως στην λοίμωξη από HIV, μετά από χημειοθεραπεία, καθώς και μετά από μεταμόσχευση μυελού των οστών.

Οι μεταβολές που υφίσταται ο θύμος αδένας με το πέρασμα της ηλικίας, φαίνεται να είναι μάλλον ποσοτικές παρά ποιοτικές και έτσι, σύμφωνα με πρόσφατες μελέτες,^{75,76} ο θύμος αδένας των ενηλίκων μπορεί πραγματικά να συνεισφέρει στην αποκατάσταση των T-κυττάρων.

Χρησιμοποιώντας εξελιγμένες μεθόδους για να προσδιορίσουμε την λειτουργία του θύμου αδένα, βλέπουμε πως οι μεταβολές που υφίστανται τα αθώα T-κύτταρα ασθενών με AIDS που έλαβαν αντιϊκή θεραπεία, κατά ένα μεγάλο μέρος, προέρχονται από τον θύμο. Αυτό αποτελεί και μια άμεση απόδειξη για την λειτουργική επάρκεια του θύμου αδένα των ενηλίκων.

Πράγματι οι Franco et al.⁷⁷, επιβεβαίωσαν το σημαντικό ρόλο που φαίνεται να έχει ο θύμος αδένας στην αποκατάσταση των λεμφοκυττάρων. Η μελέτη τους αφορούσε ασθενείς με HIV-1 λοίμωξη και στους οποίους μετά από χορήγηση ισχυρής αντιϊκής θεραπείας, διαπιστώθηκε στατιστικά σημαντική αύξηση στους πληθυσμούς των αθώνων $CD4^+$ και $CD8^+$ T-κυττάρων.

Παρά το ότι η λειτουργικότητα του θύμου αδένα φαίνεται ότι μειώνεται με την πάροδο της ηλικίας, εν τούτοις δεν είναι τελείως απύσχα. Μελέτες μεταξύ νεαρών και ηλικιωμένων πειραματόζωων, στα οποία έγινε θανατηφόρα ακτινοβολήση και ακολούθως χορήγηση μυελικών T-κυττάρων, έδειξε αυξημένη επέκταση των μυελικών θυμοκυττάρων στα περιφερικά όργανα, και αξιοσημείωτη ικανότητα του ηλικιωμένου πληθυσμού στην παραγωγή TCR Tg⁺ κυττάρων.⁷⁸

Έτσι αν και ο θύμος αδένας παρουσιάζει ουσιώδη μείωση κατά την εφηβεία, θα πρέπει να δεχθούμε ως δεδομένη την συνεισφορά του στην αποκατάσταση των CD4⁺ κυττάρων μετά από έντονη χημειοθεραπεία.

Σύμφωνα λοιπόν με τους Mackall και Fleisher⁷⁹, υφίστανται δύο πιθανότητες :τα προγονικά κύτταρα από τον μυελό των οστών μπορούν να αποκαταστήσουν τον λεμφοκυτταρικό πληθυσμό, ακολουθώντας είτε έναν θυμο-εξαρτώμενο δρόμο, είτε αποκαθιστούν τα περιφερικά λεμφοκύτταρα μέσω ενός θυμο-ανεξάρτητου δρόμου. Επιπλέον, οι ίδιοι συγγραφείς διαπίστωσαν, πως η αποκατάσταση των CD4⁺ κυττάρων έξι μήνες μετά την χημειοθεραπεία ήταν περισσότερο έντονη σε άτομα ηλικίας μικρότερης των 18 ετών, απ' ότι στους πιο ηλικιωμένους ασθενείς. Παρατήρησαν ακόμα πως στα νεαρά άτομα τα CD4⁺ κύτταρα, τόσο κατά την διάρκεια της χημειοθεραπείας όσο και μετά απ' αυτήν, εκφράζουν το μόριο CD45RO (μνημονικά κύτταρα), ενώ μετά το πέρας της χημειοθεραπείας, ο αριθμός των κυττάρων που εξέφραζαν το μόριο CD45RA (αθώα T-κύτταρα) αυξανόταν σημαντικά. Αντιθέτως, για τους ηλικιωμένους ασθενείς παρατήρησαν πως τα CD4⁺ κύτταρα εξέφραζαν το μόριο CD45RO ακόμα και έξι μήνες μετά το πέρας της χημειοθεραπείας.

Σε πρόσφατες μελέτες⁸¹ διαπιστώθηκε παρατεταμένη μείωση των CD4⁺ κυττάρων σε παιδιά και νεαρούς ενήλικες, και άρα ελαττωμένη ανοσολογική ανταπόκριση, για αρκετούς μήνες μετά την συμπλήρωση θεραπείας, που αποτελούταν από διαδοχικούς κύκλους χημειοθεραπείας και επακόλουθη χορήγηση αναλόγων περιφερικών προγονικών κυττάρων.

Οι περιορισμοί στην αποκατάσταση των CD4⁺ κυττάρων, μετά από έντονη χημειοθεραπεία, θεωρείται ότι πιθανόν να σχετίζεται με περιορισμένη ικανότητα αναγέννησης στον θύμο αδένα και αυξημένη ευαισθησία για απόπτωση του περιφερικού CD4⁺ υποπληθυσμού.

Έχει αναφερθεί,⁸⁰ πως η διαδικασία αποκατάστασης των CD4⁺ κυττάρων, μετά από έντονη χημειοθεραπεία ασθενών με καρκίνο του μαστού, ήταν παρατεταμένη, επιτυγχάνοντας έτσι λιγότερο από το 50% των τιμών των CD4⁺ κυττάρων πριν την χημειοθεραπεία.

Δύο μεταβλητές φαίνεται πως είναι σημαντικές για να εξηγήσουν αυτή την αποκατάσταση των CD4⁺ κυττάρων.

Πρώτον, η παραγωγή CD45RA⁺ CD4⁺ κυττάρων, δηλώνει την ύπαρξη θυμοεξαρτώμενων δρόμων για την αναγέννηση των CD4⁺ κυττάρων. Δεν αποτελεί όμως και τον μοναδικό δρόμο για την παραγωγή τους, γιατί η παρουσία των CD45RA⁺ CD4⁺ κυττάρων φαίνεται να περιορίζεται αρκετά, ακόμα και δύο χρόνια μετά την έντονη χημειοθεραπεία σ' αυτούς τους ασθενείς.

Δεύτερον, η συχνότητα για απόπτωση των CD4⁺ κυττάρων, ήταν στενά συνδεδεμένη με την συχνότητα έκφραση του HLA-DR στα T-κύτταρα⁸⁰.

Αν και στους περισσότερους ασθενείς παρατηρείται γρήγορη αποκατάσταση τόσο των B-κυττάρων όσο και των CD8⁺ κυττάρων, η παρατεταμένη μείωση των CD4⁺ λεμφοκυττάρων σε όλους τους ασθενείς, μπορεί να υπάρχει για αρκετούς μήνες μετά, ο δε αριθμός τους φαίνεται να είναι αντιστρόφως ανάλογος της ηλικίας⁸¹. Εύρημα που δηλώνει πως οι μεταβολές αυτές εξαρτώνται από την ηλικία και είναι ως επί το πλείστον υπεύθυνες για την περιορισμένη ανοσολογική αποκατάσταση .

Έτσι παρά το γεγονός ότι η πλειοψηφία των ασθενών μετά από έντονη χημειοθεραπεία εμφανίζουν ενεργό λεμφοποίηση, σε πρόσφατη μελέτη,⁸² έχει αναφερθεί

πως τα CD8⁺ κύτταρα εμφανίζουν ταχύτερη και αποτελεσματικότερη παραγωγή πολλαπλασιασμού από ότι τα CD4⁺ κύτταρα. Σύμφωνα με την μελέτη αυτή, τρεις μήνες μετά την χημειοθεραπεία, ο μέσος αριθμός των CD8⁺ κυττάρων έχει επανέλθει στην αρχική τους τιμή ενώ αντιθέτως ο μέσος αριθμός των CD4⁺ έχει επανέλθει μόνο στο 35% των τιμών πριν την χημειοθεραπεία. Οι διαφορές αυτές οφείλονται πρωταρχικά στην επέκταση των CD8⁺CD57⁺ και CD8⁺CD28⁻ υποπληθυσμών.

Στους τρεις μήνες μετά την χημειοθεραπεία, δεν διαπιστώνεται να υφίσταται συσχέτιση μεταξύ της ηλικίας και του αριθμού των CD8⁺ κυττάρων. Αντίθετα όμως ο αριθμός των CD4⁺ κυττάρων είχε αρνητική συσχέτιση με την ηλικία.

Επομένως, θυμοεξαρτώμενοι παράγοντες μπορούν να εξηγήσουν την άμεση αποκατάσταση των CD8⁺ κυττάρων αλλά όχι των CD4⁺ κυττάρων, μετά από έντονη χημειοθεραπεία^{82,84}.

Οι διαφορές αυτές στην αποκατάσταση μεταξύ των CD8⁺ και CD4⁺ κυττάρων, φαίνεται να έχουν μεγάλη σημασία στις ανοσοθεραπευτικές προσεγγίσεις, που επιχειρούν να εκριζώσουν την υπολειμματική νεοπλασματική νόσο.

Τα ευρήματα αυτά έρχονται σε πλήρη συμφωνία με την παρατήρηση των Ohnishi et al.,⁸³ οι οποίοι μελέτησαν τους λεμφοκυτταρικούς υποπληθυσμούς ασθενών με οξεία μυελοβλαστική λευχαιμία, που βρίσκονται σε πλήρη ύφεση. Παρατήρησαν πως οι ασθενείς αυτοί, παρότι είχαν χαμηλό αριθμό CD4⁺ και CD45RA⁺ CD4⁺ κυττάρων αμέσως μετά την χημειοθεραπεία, επανέρχονταν όμως στα φυσιολογικά επίπεδα, δύο χρόνια μετά.

Παράλληλα, παρατήρησαν υψηλές τιμές DR⁺ T-κυττάρων καθώς και NK κυττάρων, για αρκετά μεγάλο διάστημα μετά την χημειοθεραπεία, επιβεβαιώνοντας έτσι τον σημαντικό ρόλο των ενεργοποιημένων T-κυττάρων καθώς και των NK κυττάρων στην ανοσοεπαγρύπνηση⁸³.

Εξάλλου η έκφραση του CD25 μορίου στα CD4⁺ κύτταρα κατά την διάρκεια της μυελικής αναγέννησης μετά από έντονη χημειοθεραπεία, υποδεικνύει πως τα κύτταρα αυτά είναι ενεργοποιημένα.

Η χρησιμοποίηση εξάλλου των αιμοποιητικών αυξητικών παραγόντων κατά την φάση της μυελοκαταστολής που ακολουθεί την χημειοθεραπεία, φαίνεται ότι συνοδεύεται και από λειτουργικές διαταραχές των T- και B-λεμφοκυττάρων. Προγενέστερες μελέτες^{85,86} έχουν δείξει ότι ο rhG-CSF παρακινεί την κινητοποίηση των κυκλοφορούντων CD34⁺/CD33⁺ μυελικών κυττάρων καθώς και των CD34⁺/CD19⁻ προδρόμων μορφών των B-λεμφοκυττάρων, εξηγώντας έτσι την αύξηση των CD20⁺ κυττάρων κατά την μυελική αναγέννηση.

Η αύξηση των T-κυτταρικών υποπληθυσμών είναι πιο δύσκολο να εξηγηθεί. Μια πιθανότητα μπορεί να είναι ότι η αποκατάσταση των T-λεμφοκυττάρων οφείλεται σε κλωνική επέκταση των υπολειπόμενων ώριμων T-κυττάρων, όπως υποστηρίζεται από τους de Gast et al.⁸⁷, στους αυτομεταμοσχευθέντες ασθενείς. Ωστόσο, οι Varas et al.⁸⁸ από παρατηρήσεις τους στον μυελό των οστών ποντικών, υποστήριξαν ότι ο G-CSF κινητοποιεί προς το περιφερικό αίμα όλες τις πρόδρομες μορφές των αιμοποιητικών κυττάρων,

Φαίνεται λοιπόν πως ενώ η χημειοθεραπεία των συμπαγών νεοπλασμάτων οδηγεί σε σημαντικό βαθμό ποσοτικές διαταραχές τόσο των T-όσο και των B-λεμφοκυττάρων, στην πλειοψηφία των περιπτώσεων η ανωμαλία αυτή αποκαθίσταται με ενεργό λεμφοποίηση.

ΑΙΜΟΠΟΙΗΤΙΚΟΙ ΑΥΞΗΤΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ

Η μεταμόσχευση του μυελού των οστών, αποτελεί ενδεχομένως την ριζική θεραπεία για κάποιες αιματολογικές κακοήθειες.

Από τις πιο σημαντικές αιτίες αυξημένης νοσηρότητας, μετά την μεταμόσχευση φαίνεται ότι είναι οι λοιμώξεις και η αιμορραγία και δευτερευόντως η παρατεταμένη κυτταροπενία.

Οι αιμοποιητικοί αυξητικοί παράγοντες (HGFs), έχει αναφερθεί ότι μπορούν και επιταχύνουν την μυελική αναγέννηση που ακολουθεί την σοβαρή ουδετεροπενία μετά από αυτόλογη μεταμόσχευση μυελού των οστών.

Γνωρίζουμε, πως οι αυξητικοί παράγοντες σχηματισμού αποικιών είναι βασικοί ρυθμιστές της κοκκιοποίησης, αυξάνοντας τον πολλαπλασιασμό και την ωρίμανση των πρόδρομων μορφών ουδετερόφιλων και μακροφάγων, συμβάλλοντας στην αύξηση της λειτουργικής τους ικανότητας. Παράγονται τόσο από στρωματικά κύτταρα του μυελού των οστών, όσο και από ώριμες μορφές διαφοροποιημένων μυελικών και λεμφικών κυττάρων.⁷

Ο αυξητικός παράγοντας των κοκκιοκυττάρων (G-CSF) είναι μια γλυκοπρωτεΐνη που πρωταρχικά παράγεται από κύτταρα της σειράς των μονοκυττάρων-μακροφάγων. Προάγει τον πολλαπλασιασμό και την διαφοροποίηση των πρόδρομων μορφών των ουδετερόφιλων, αυξάνει δε την λειτουργική δραστηριότητα των ώριμων μορφών τους, τόσο *in vivo* όσο και *in vitro*⁸⁹.

Ο αυξητικός παράγοντας των κοκκιοκυττάρων-μακροφάγων (GM-CSF) ασκεί την δράση του, στις προγονικές μορφές των κοκκιοκυττάρων-μακροφάγων και ηωσινοφίλων⁹⁰, μπορεί δε να τροποποιήσει, μέσω ενός μηχανισμού που εξαρτάται από τον TNF την λειτουργική δραστηριότητα των ώριμων κυττάρων, προκαλώντας έτσι αύξηση της κυτταροτοξικής δράσης των μονοκυττάρων⁹¹.

Φαίνεται όμως, πως οι GM-CSF και G-CSF δεν επηρεάζουν μόνο την αναγέννηση των κυττάρων της μυελικής σειράς, αλλά και την αποκατάσταση του ανοσολογικού συστήματος μετά από αυτόλογη μεταμόσχευση των οστών.

Μελετώντας την δράση τους, μετά από αυτόλογη μεταμόσχευση μυελού, οι San Miguel και συνεργάτες⁹², παρατήρησαν πως η χορήγηση G-CSF συνετέλεσε στην σημαντικά πιο γρήγορη αποκατάσταση των CD8⁺ κυττάρων, αντιθέτως η χορήγηση GM-CSF, ευνόησε την γρήγορη αποκατάσταση των CD4⁺ κυττάρων. Καμία επίδραση δεν φάνηκε να υπάρχει στην αποκατάσταση των B-λεμφοκυττάρων.

Κατά ανάλογο τρόπο, οι Perrillo και συνεργάτες⁹³, παρατήρησαν πως, η χορήγηση των αυξητικών παραγόντων GM-CSF και G-CSF, άμεσα μετά την αυτόλογη μεταμόσχευση πρόδρομων αιμοποιητικών κυττάρων, επηρέαζε τον πολλαπλασιασμό των T-λεμφοκυττάρων.

Οι αυξητικοί παράγοντες GM-CSF και G-CSF χρησιμοποιούνται συχνά στην φάση της μυελοκαταστολής που προκαλεί συνήθως η έντονη χημειοθεραπεία, προκειμένου να υποστηρίξουν την μυελική αναγέννηση. Η χορήγηση αυτή συνοδεύεται όμως, εκτός των άλλων, και από λειτουργικές διαταραχές των T- και B-λεμφοκυττάρων. Η παρατήρηση αυτή, αποτελεί και τον στόχο της ερευνητικής αυτής μελέτης.

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΣΤΟΧΟΙ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Η χρήση των αιμοποιητικών αυξητικών παραγόντων (GM-CSF και G-CSF) έχει βοηθήσει σημαντικά στην χορήγηση επιθετικών και μυελοτοξικών χημειοθεραπευτικών σχημάτων. Αυτό έχει σαν συνέπεια την εμφάνιση, συχνά βαρείας αιματολογικής τοξικότητας η οποία συνεπάγεται εκτός των άλλων, σοβαρές λειτουργικές διαταραχές των Τ και Β-λεμφοκυττάρων.

Σκοποί της παρούσας μελέτης είναι:

- 1) Να μελετηθεί η αποκατάσταση των Τ και Β λεμφοκυττάρων κατά την φάση της μυελικής αναγέννησης μετά από έντονη χημειοθεραπεία, σε ασθενείς με συμπαγείς όγκους, και να συγκριθεί με την προ-χημειοθεραπείας κατάσταση.
- 2) Να διερευνηθεί η διαφοροποιημένη επίδραση του G-CSF ή του GM-CSF κατά την λεμφοποίηση στην φάση της μυελικής αναγέννησης μετά από έντονη χημειοθεραπεία σε ασθενείς με συμπαγείς όγκους.

ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Ασθενείς : Μελετήθηκαν 53 ασθενείς με πρωτοδιαγνωσθέν συμπαγές κακόηθες νεόπλασμα που έλαβαν χημειοθεραπεία πρώτης γραμμής και παρουσίασαν μυελική απλασία μετά την αγωγή, με απόλυτο αριθμό πολυμορφοπύρηνων μικρότερο από 800/dl.

Όλοι οι ασθενείς είχαν ιστολογικά ή κυτταρολογικά επιβεβαιωμένο καρκίνο. Από αυτούς οι 15 έπασχαν από μη μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα, οι 24 από καρκίνο μαστού, οι 7 από καρκίνο των ωοθηκών, οι 4 από καρκίνο της ουροδόχου κύστεως, ένας από καρκίνο του στομάχου, ένας από καρκίνο του παχέος εντέρου και ένας από καρκίνο του παγκρέατος.

Από τους 53 ασθενείς, οι 20 ήταν άνδρες και οι 33 γυναίκες, είχαν δε μέσο όρο ηλικίας τα 57 χρόνια.(εύρος 34 έως 80 χρόνια).

Σε όλους τους ασθενείς κατά την φάση της απλασίας χορηγήθηκε είτε rhG-CSF(Granocyte,Aventis Pharma, USA) σε δόση 150 $\mu\text{gr}/\text{m}^2$ /ημερησίως υποδόρια(ΥΔ), είτε rhGM-CSF(Mielogen, Schering Plough, USA) σε δόση 5-10 $\mu\text{gr}/\text{Kgr}$ /ημερησίως Υ.Δ, μέχρι την αποκατάσταση των πολυμορφοπύρηνων (απόλυτος αριθμός >1200/dl).

Κατά την φάση της απλασίας, 9 ασθενείς παρουσίασαν εμπύρετη ουδετεροπενία, αλλά μόνο σε 2 από αυτούς απομονώθηκαν Gram αρνητικά βακτηρίδια από τις καλλιέργειες αίματος. Επιπλέον, 5 ασθενείς εμφάνισαν ευκαιριακή λοίμωξη (3 ασθενείς γενικευμένη καντιντίαση, ένας ασθενής πνευμονία από pneumocystis carinii, και ένας ενεργοποίηση HBV λοίμωξης). Τα χαρακτηριστικά των ασθενών παρουσιάζονται στον Πίνακα 1.

Σε μια δεύτερη φάση της μελέτης 38 ασθενείς με ιστολογικά ή κυτταρολογικά επιβεβαιωμένο καρκίνο, οι οποίοι αντιμετωπίστηκαν με χημειοθεραπεία πρώτης γραμμής και παρουσίασαν grade 3 ή 4 λευκοπενία στον πρώτο κύκλο της χημειοθεραπείας τυχαιοποιήθηκαν να λάβουν είτε rhG-CSF είτε rhGM-CSF μέχρι αποκατάστασης του απόλυτου αριθμού των ουδετεροφίλων. Η διάμεση ηλικία των ασθενών αυτών ήταν 59 έτη (εύρος 33-75 χρόνια), 25 ήταν γυναίκες και το performance status ήταν κατά WHO 0 σε 28 ασθενείς και 1 σε 11 ασθενείς. Οι ασθενείς έπασχαν από μη μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονος (NSCLC), καρκίνο του μαστού, καρκίνο ωοθηκών και του παχέος εντέρου.

Στην μελέτη συμπεριλήφθησαν 10 φυσιολογικοί μάρτυρες καθώς και 10 ασθενείς με πρωτοδιαγνωσθέν συμπαγές νεόπλασμα, οι οποίοι δεν παρουσίασαν απλασία με την χορήγηση χημειοθεραπείας πρώτης γραμμής. Όλα τα άτομα τού υπό μελέτη πληθυσμού, έδωσαν έγγραφη συγκατάθεση, αφού πρώτα ενημερώθηκαν. Η μελέτη εγκρίθηκε από την Επιτροπή Ηθικής και Δεοντολογίας καθώς και από την Επιστημονική Επιτροπή του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Ηρακλείου. Όλοι οι ασθενείς νοσηλεύθηκαν στην Πανεπιστημιακή Παθολογική Ογκολογική Κλινική του ΠΑ.Γ.Ν.Η.

Λήψη δειγμάτων αίματος : Δύο φορές την εβδομάδα, μέχρι την εμφάνιση της απλασίας, γινόταν λήψη 5 ml αίματος, σε EDTA προκειμένου να καθορισθεί ο αριθμός των λευκών αιμοσφαιρίων.

Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας αναλυτή Coulter STKS. Όταν ο αριθμός των λευκών αιμοσφαιρίων ήταν μικρότερος των 1000/dl, το αποτέλεσμα επιβεβαιούτο με άμεση μικροσκοπική εξέταση.

Με την εμφάνιση της απλασίας (απόλυτος αριθμός πολυμορφοπύρηνων < 800/dl) γινόταν καθημερινή λήψη 5ml αίματος σε EDTA, προκειμένου να καθορισθεί η διάρκεια της απλασίας και η πρώτη μέρα όπου ο απόλυτος αριθμός των ουδετεροφίλων ήταν $\geq 1200 / dl$.

Επιπλέον, γινόταν λήψη 6 ml περιφερικού αίματος σε ειδικούς ηπαρινισμένους σωλήνες (Vacutainer, Becton-Dickinson, Meylan, France), για την φαινοτυπική ανάλυση των T και B-λεμφοκυττάρων, στους εξής χρόνους: α) πριν την χορήγηση της χημειοθεραπείας, β) την πρώτη μέρα διαπίστωσης της ουδετεροπενίας και πριν την χορήγηση του αυξητικού παράγοντα G-CSF ή GM-CSF και την πρώτη μέρα που ο απόλυτος αριθμός των κοκκιοκυττάρων ήταν ≥ 1200 κύτταρα/dl.

Μελέτη ανοσοφθορισμού: Η τυποποίηση των λεμφοκυττάρων πραγματοποιήθηκε σε ολικό αίμα με την βοήθεια των παρακάτω μονοκλωνικών αντισωμάτων : anti- CD3 (IOT3), anti-CD4 (IOT4), anti- CD8 (IOT8), anti- CD20 (IOT20), anti- CD56 (IOT56), anti-CD25 (IOT14), HLA-DR (IOT2a), anti-CD69 (IOT69), anti—CD45RO (IOT45RO), anti-CDRA (IOT45RA). Όλα τα αντισώματα προήλθαν από την Immunotech (Lumigny France). Χρησιμοποιήθηκαν, τόσο αντισώματα σημασμένα με FITC (σε πειράματα απλού φθορισμού) όσο και αντισώματα σημασμένα με Rhodamine (σε πειράματα διπλού φθορισμού).

Για την μέθοδο του απλού φθορισμού χρησιμοποιήθηκαν 100 μl από το ολικό αίμα το οποίο τοποθετήθηκε σε δοκιμαστικό σωληνάριο Eppendorf, με την ανάλογη ποσότητα (20μl) του μονοκλωνικού αντισώματος (όπως καθορίζεται από τον κατασκευαστή) σημασμένου με FITC. Το μείγμα φυγοκεντρήθηκε και επώασθηκε για 20 min στους 4°C. Ακολούθως, προστέθηκαν 2ml από το μείγμα λύσης των κυττάρων (Immunoprep Kit, Coulter, USA), και στην συνέχεια τα δείγματα εκπλύθηκαν 2 φορές με PBS (phosphate-buffered saline, pH:7,3), που περιέχει 0,1% v/v sodium azide. Στην συνέχεια, η ανάλυση έγινε με κυτταρόμετρο ροής Elit (Coulter, USA).

Για την μέθοδο του διπλού φθορισμού, 100 μl από το ολικό αίμα τοποθετήθηκαν σε δοκιμαστικό σωληνάριο Eppendorf με σύγχρονη χορήγηση 20μl από το κάθε μονοκλωνικό αντίσωμα, το καθένα σημασμένο με διαφορετικό φθοριόχρωμα (FITC ή PE). Το μείγμα φυγοκεντρήθηκε και επώασθηκε για 20min στους 4°C. Ακολούθως προστέθηκε 2ml Immunoprep και στην συνέχεια τα δείγματα εκπλύθηκαν 2 φορές με PBS +sodium azide, όπως προηγούμενα. Ακολούθησε ανάλυση των λεμφοκυτταρικών πληθυσμών στο κυτταρόμετρο ροής Elit.

Η σύγχρονη χορήγηση δύο σημασμένων (με διαφορετικό φθοριόχρωμα) μονοκλωνικών αντισωμάτων στην μέθοδο του διπλού φθορισμού βοηθάει στην διάκριση τεσσάρων πληθυσμών κυττάρων : αυτά που εκφράζουν το κάθε μόριο χωριστά (είτε κόκκινο είτε πράσινο), αυτά που εκφράζουν και τα δύο (πορτοκαλί) και αυτά που δεν εκφράζουν κανένα (γκρίζο).

Πολλαπλασιασμός των T-κυττάρων : Μελετήθηκε σε 25 τυχαία επιλεγέντες ασθενείς με μοναδικό κριτήριο την επάρκεια των διαθέσιμων κυττάρων.

Το ολικό αίμα, αραιώθηκε (1:10 v/v) με IMDM, και συμπληρωματικά προστέθηκε γενταμυκίνη (80μg/ml) και 2-μερκαπτοαιθανόλη (5×10^{-5} M). 150μl από το αραιωμένο αίμα, επώαστηκαν παρουσία φυτοαιμαγλουτίνης-P (PHA-P Welcome UK) ή του μονοκλωνικού αντισώματος anti-CD3, (για τον καθορισμό του προκαλούμενου πολλαπλασιασμού) ή απουσία τους (για τον καθορισμό του αυτόματου πολλαπλασιασμού), ή με παρουσία μόνο εξωγενούς ανασυνδυασμένης IL-2(1 IU/ml, Amgen, USA)

Οι καλλιέργειες πραγματοποιήθηκαν εις τριπλούν σε μικροπλάκες 96 θέσεων(NUNC, Δανία) και επώαστησαν στους 37° C με παρουσία υγροποιημένου CO₂ 5% στον αέρα, για 3 ημέρες. Μια μέρα πριν το τέλος της επώασης, προστέθηκε σε κάθε βοθρίο 0.4 μCi τριωδωμένης θυμιδίνης (H³TdR). Η σημασμένη θυμιδίνη προσελήφθη από τα κύτταρα που βρίσκονταν σε φάση πολλαπλασιασμού και σύνθεσης DNA. Τα κύτταρα ελήφθησαν με ειδικό αναρροφητήρα και συλλέχθησαν σε ειδικά χάρτινα φύλλα (Hartman). Μετά από επαρκή έκπλυση με απεσταγμένο H₂O και αποξήρανσή τους, τα φύλλα μετρήθηκαν σε ειδικό μετρητή β-ακτινοβολίας.

Μέτρηση κυτταροκινών : Χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος Elisa και ειδικά για κάθε κυτταροκίνη kits (Quantique). 50μl αντιδραστηρίου RD1D(ειδικό μονοκλωνικό αντίσωμα για κάθε κυττοκίνη) τοποθετήθηκε σε μικροπλάκες 96 οπών και επώαστηκε με 200μl του υπό εξέταση ορού για 2,5 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου. Στην συνέχεια, το μείγμα ξεπλύθηκε με προσθήκη 400μl διαλύματος εκπλύσεως σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Ακολούθως προστέθηκε ειδικό για την κάθε κυττοκίνη, δεύτερο μονοκλωνικό αντίσωμα σημασμένο με αλκαλική φωσφατάση και το μείγμα επώαστηκε για άλλες 2,5 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου. Η ενζυμική δραστηριότητα μετρήθηκε με την προσθήκη του ειδικού χρωμογόνου. Η αντίδραση του χρώματος εκτιμήθηκε με φασματοφωτόμετρο (450nm) μέσα σε χρονικό διάστημα 30 λεπτών.

Στατιστική ανάλυση : Η στατιστική ανάλυση μεταξύ ασθενών και φυσιολογικών μαρτύρων, πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας το Fisher's t-test για ανεξάρτητα δείγματα. Ενώ οι συσχετίσεις μεταξύ των τιμών πριν την χορήγηση της χημειοθεραπείας, κατά την διάρκεια της απλασίας ή κατά την μυελική αναγέννηση, πραγματοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας το t-test κατά ζεύγη⁹⁴. Οι συσχετίσεις μεταξύ των διαφόρων λεμφοκυτταρικών υποπληθυσμών, πραγματοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας τον συντελεστή συσχέτισεως του Pearson⁹⁴.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Απόλυτος αριθμός κοκκιοκυττάρων και λεμφοκυττάρων κατά την απλασία και την μυελική αναγέννηση

Κατά το πρώτο μέρος της μελέτης, στην φάση της μυελοκαταστολής, ο απόλυτος αριθμός των κοκκιοκυττάρων ($m \pm SE = 433 \pm 56$ κύτταρα/dl) ήταν σημαντικά ($p < 0.001$) μικρότερος από ότι στην φάση της μυελικής αναγέννησης ($m \pm SE = 11467 \pm 1034$ κύτταρα/dl). Όλοι οι ασθενείς έλαβαν κατά τη φάση της απλασίας rhG-CSF ή rhGM-CSF. Η διάμεση διάρκεια της ουδετεροπενίας ήταν 3 ημέρες (εύρος 2-6) και το 90% των ασθενών αποκατέστησαν τον αριθμό των κοκκιοκυττάρων εντός 3-4 ημερών.

Κατά την φάση της απλασίας, 14 (26%) από τους 53 ασθενείς παρουσίασαν σημαντική λεμφοπενία (< 400 λεμφοκύτταρα/dl). Σε 10 ασθενείς που δεν εμφάνισαν απλασία, δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά του απόλυτου αριθμού των λεμφοκυττάρων από εκείνον στους φυσιολογικούς μάρτυρες. Συνολικά, κατά την απλασία, ο απόλυτος αριθμός των λεμφοκυττάρων ($m \pm SE = 819 \pm 74$ κύτταρα/dl), βρέθηκε να είναι σημαντικά ($p < 0.001$) μικρότερος σε σύγκριση με τον αντίστοιχο αριθμό πριν την χημειοθεραπεία ($m \pm SE: 1580 \pm 609$ κύτταρα/dl) καθώς και με εκείνο των φυσιολογικών μαρτύρων ($m \pm SE: 1601 \pm 64$ κύτταρα/dl, $p < 0.01$).

Η χρησιμοποίηση των αυξητικών παραγόντων (rhG-CSF και rhGM-CSF), οδήγησε σε σημαντική αύξηση τόσο των κοκκιοκυττάρων, όσο και των λεμφοκυττάρων. Πράγματι, κατά την φάση της μυελικής αναγέννησης, ο απόλυτος αριθμός των λεμφοκυττάρων ($m \pm SE: 1757 \pm 156$ κύτταρα/dl) ήταν σημαντικά ($p < 0.001$) υψηλότερος από τον αντίστοιχο αριθμό κατά την φάση της μυελικής απλασίας. Ωστόσο, κατά την φάση αυτή, βρέθηκε πως 2 (4%) από τους 53 ασθενείς, εξακολούθησαν να έχουν απόλυτο αριθμό λεμφοκυττάρων < 400 /dl.

Φαινοτυπική ανάλυση των λεμφοκυττάρων κατά την απλασία και την μυελική αναγέννηση

Οι Πίνακες 2 και 3 παρουσιάζουν τον απόλυτο αριθμό των διαφόρων λεμφοκυτταρικών υποπληθυσμών συγκριτικά, πριν την χορήγηση της χημειοθεραπείας, κατά την μυελική απλασία και κατά την φάση της μυελικής αποκατάστασης αντίστοιχα.

Κατά την φάση της μυελικής απλασίας παρατηρείται σημαντική μείωση του απόλυτου αριθμού όλων των υπό μελέτη λεμφοκυτταρικών υποπληθυσμών: CD4⁺, CD8⁺, CD20⁺, CD56⁺ και HLA-DR⁺, αλλά όχι των CD25⁺ κυττάρων (Πίνακας 2). Κατά την φάση της μυελικής αναγέννησης, ο απόλυτος αριθμός όλων των λεμφοκυτταρικών υποπληθυσμών (T, B, NK) ήταν σημαντικά μεγαλύτερος σε σχέση με τις αντίστοιχες τιμές που υπήρχαν κατά την φάση της μυελικής απλασίας (Πίνακας 3).

Ο Πίνακας 4 παρουσιάζει τον απόλυτο αριθμό των διάφορων λεμφοκυτταρικών υποπληθυσμών κατά την φάση της μυελικής αναγέννησης συγκριτικά με τον αντίστοιχο πριν την χορήγηση της χημειοθεραπείας. Διαπιστώθηκε ότι παρά το γεγονός ότι ο

απόλυτος αριθμός των διαφόρων κυτταρικών υποπληθυσμών ήταν μικρότερος κατά την φάση της μυελικής αναγέννησης, οι διαφορές δεν ήταν στατιστικά σημαντικές. Αντίθετα, κατά την φάση της μυελικής αναγέννησης ο απόλυτος αριθμός των CD25⁺ και HLA-DR⁺ θετικών κυττάρων ήταν στατιστικά μεγαλύτερος από τους αντίστοιχους προ-χημειοθεραπείας (Πίνακας 4).

Ο Πίνακας 5 αναδεικνύει ότι 31 (58%) από τους 53 ασθενείς παρουσίασαν σημαντική CD4⁺ λεμφοπενία κατά την φάση της μυελικής απλασίας με απόλυτο αριθμό CD4⁺ κυττάρων < 400/dl. Κατά την φάση της μυελικής αναγέννησης 20 από τους ασθενείς αυτούς αποκατέστησαν τον απόλυτο αριθμό CD4⁺ κυττάρων σε > 400/dl κύτταρα. Εν τούτοις, 11 (21%) ασθενείς εξακολούθησαν να παρουσιάζουν CD4⁺λεμφοπενία (<400κύτταρα/dl) κατά την φάση της μυελικής αναγέννησης.

Σε 18 ασθενείς διερευνήθηκε ο απόλυτος αριθμός των CD34⁺ κυττάρων στο αίμα, τόσο κατά την μυελική απλασία όσο και κατά την μυελική αναγέννηση. Στην φάση της μυελικής απλασίας ο απόλυτος αριθμός των CD34⁺ κυττάρων ήταν 1,26±1,7 κύτταρα/dl και σε 5 ασθενείς δεν κατέστη δυνατόν να ανιχνευθούν CD34⁺ κύτταρα. Κατά την φάση της μυελικής αναγέννησης ο απόλυτος αριθμός των CD34⁺ κυττάρων ήταν 6,44±10,04 κύτταρα/dl (p<0.0005). Αξίζει να σημειωθεί ότι CD34⁺ κύτταρα ανιχνεύθηκαν σε όλες τις περιπτώσεις που δεν ανιχνεύοντο κατά την φάση της μυελικής απλασίας (Σχήμα 1). Σε 6 ασθενείς ο απόλυτος αριθμός των CD34⁺ κυττάρων αυξήθηκε περισσότερο από 2 φορές .

Η σημαντική αύξηση των CD34⁺ κυττάρων κατά την μυελική αναγέννηση φαίνεται να υποδηλώνει ότι η αύξηση των περισσότερων λεμφοκυτταρικών υποπληθυσμών είναι παράλληλη με εκείνη των πολυδύναμων αιμοποιητικών αρχέγονων κυττάρων.

Έκφραση αθών (naïve) και μνημονικών (memory) T-λεμφοκυττάρων του περιφερικού αίματος κατά την απλασία και την μυελική αναγέννηση:

Σε ένα δείγμα 21 ασθενών μελετήθηκε η παρουσία μνημονικών (memory) και αθών (naïve) T-λεμφοκυττάρων στην φάση της απλασίας συγκριτικά με εκείνη της μυελικής αποκατάστασης εκτός από την μέθοδο του απλού φθορισμού χρησιμοποιήθηκε και η μέθοδος του διπλού φθορισμού, προκειμένου να διευκρινισθεί σε ποιο κυτταρικό υποπληθυσμό (CD4 ή CD8) ανήκουν τα κύτταρα.

Οι Πίνακες 6 και 7 παρουσιάζουν τα συγκεντρωτικά αποτελέσματα της έκφρασης των μορίων CD45RO και CD45RA σε T-λεμφοκυτταρικούς υποπληθυσμούς.

Στον Πίνακα 6 καταγράφεται τόσο ο απόλυτος αριθμός των CD45RO κυττάρων, όσο και των CD4⁺/CD45RO⁺ και CD8⁺/CD45RO⁺ κυττάρων στις φάσεις της απλασίας και της μυελικής αποκατάστασης. Ο απόλυτος αριθμός των CD45RO⁺ κυττάρων στην φάση της απλασίας (m±SE=282,0±234,56 κύτταρα/dl) δεν διέφερε σημαντικά (p=0.538) από εκείνον κατά την μυελική αποκατάσταση (m±SE=322,47±235,32 κύτταρα/dl). Κατά ανάλογο τρόπο, δεν διαπιστώθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά (p=0.72) στις απόλυτες τιμές των CD4⁺/CD45RO⁺ κυττάρων στην φάση της απλασίας (m±SE=152,80±180,12 κύτταρα/dl) και της μυελικής αναγέννησης (m±SE=139,42±123,73 κύτταρα/dl). Τέλος ο απόλυτος αριθμός των CD8⁺/CD45RO⁺ κυττάρων, κατά την φάση της μυελικής απλασίας (m±SE:38,8±51,54 κύτταρα/dl) και την φάση της μυελικής αναγέννησης (m±SE:48,4±52,48 κύτταρα/dl), δεν βρέθηκε να

διαφέρει στατιστικά σημαντικά ($p=0.420$). Εν τούτοις, 10 (53%) από τους 19 εξετασθέντες ασθενείς παρουσίαζαν αύξηση των CD45RO κυττάρων κατά την φάση της μυελικής αναγέννησης σε σχέση με εκείνα που διαπιστώθηκαν στην φάση της μυελικής απλασίας. Επίσης, αυξημένος αριθμός CD4/CD45RO και CD8/CD45RO κυττάρων διαπιστώθηκαν σε 7 (33%) και σε 4 (20%) ασθενείς αντίστοιχα κατά την φάση της μυελικής αναγέννησης. Τα αποτελέσματα αυτά υποδηλώνουν ότι δεν υφίστανται στατιστικά σημαντικές μεταβολές των μνημονικών T-κυττάρων, κατά την φάση της μυελικής αποκατάστασης σε σύγκριση με τις τιμές κατά την απλασία, παρά το γεγονός ότι σε ορισμένους ασθενείς οι διαφοροποιήσεις είναι περισσότερο έντονες.

Κατά ανάλογο τρόπο, στον Πίνακα 7 καταγράφονται οι απόλυτοι αριθμοί των CD45RA⁺, CD4⁺/CD45RA⁺ καθώς και των CD8⁺/CD45RA⁺ κυττάρων, κατά τις φάσεις της μυελικής απλασίας και μυελικής αναγέννησης. Δεν διαπιστώθηκε στατιστικά σημαντική αύξηση των παύει T-λεμφοκυττάρων κατά την φάση της μυελικής αποκατάστασης, σε σύγκριση με τις τιμές κατά την απλασία. Ο απόλυτος αριθμός των CD45RA⁺ κυττάρων ήταν $370,82 \pm 433,05$ κύτταρα/dl κατά την απλασία και $433,0 \pm 305,53$ κύτταρα/dl κατά την μυελική αποκατάσταση ($p=0.347$). Κατά αντίστοιχο τρόπο, ο απόλυτος αριθμός των CD4⁺/CD45RA⁺ κυττάρων ($m \pm SE = 82,93 \pm 70,86$ κύτταρα/dl) κατά την απλασία δεν ήταν στατιστικά σημαντικά διαφορετικός ($p=0.44$) από εκείνον ($m \pm SE: 131,75 \pm 146,43$ κύτταρα/dl) κατά την μυελική αναγέννηση. Τέλος, το ίδιο διαπιστώθηκε και για τον υποπληθυσμό των CD8⁺/CD45RA⁺ κυττάρων, όπου ο απόλυτος αριθμός τους βρέθηκε κατά την απλασία ($m \pm SE: 105,31 \pm 79,72$ κύτταρα/dl) να μην έχει στατιστικά σημαντική διαφορά ($p=0.502$) από εκείνον ($m \pm SE: 131,75 \pm 146,43$ κύτταρα/dl) κατά την μυελική αποκατάσταση. Εν τούτοις ο απόλυτος αριθμός των CD45RA⁺ κυττάρων ήταν αυξημένος κατά την μυελική αναγέννηση σε 7(41%) ασθενείς. Επίσης αυξημένος αριθμός CD4⁺/CD45RA⁺ και CD8⁺/CD45RA⁺ κυττάρων διαπιστώθηκαν σε 4(24%) και 6(35%) ασθενείς, αντίστοιχα.

Έκφραση ενεργοποιημένων μορίων στα λεμφοκύτταρα του περιφερικού αίματος κατά την απλασία και την μυελική αναγέννηση:

Κατά την φάση της μυελικής αναγέννησης διαπιστώθηκε μια σημαντική αύξηση των κυττάρων που εκφράζουν τα μόρια CD25 και HLA-DR, υποδηλώνοντας την παρουσία ενεργοποιημένων κυττάρων (Πίνακας 4).

Προκειμένου να καθορισθεί ο κυτταρικός υποπληθυσμός που εκφράζει τα αντιγόνα ενεργοποίησης, πραγματοποιήθηκε διπλός φθορισμός τόσο κατά το nadir της μυελοκαταστολής, όσο και κατά την μυελική αποκατάσταση.

α) **Έκφραση CD25:** Στον Πίνακα 8, καταγράφεται η έκφραση του μορίου CD25 σε διάφορους λεμφοκυτταρικούς υποπληθυσμούς, τόσο κατά την απλασία, όσο και στη φάση της μυελικής αναγέννησης.

Διαπιστώθηκε σημαντική αύξηση των CD3⁺/CD25⁺ ($p < 0.001$) και των CD4⁺/CD25⁺ ($p < 0.001$) κυττάρων στη φάση της μυελικής αποκατάστασης, σε σχέση με τις αντίστοιχες τιμές κατά την απλασία. Αντίθετα, ο απόλυτος αριθμός των CD8⁺/CD25⁺ και των CD20⁺/CD25⁺ κατά την φάση της μυελικής αποκατάστασης, δεν διέφερε από εκείνον της μυελικής απλασίας. Επιπρόσθετα, στη φάση της

αποκατάστασης του μυελού, παρατηρήθηκε θετική συσχέτιση ($p < 0.001$) μεταξύ του απόλυτου αριθμού των $CD3^+/CD25^+$ κυττάρων και των $CD4^+/CD25^+$ κυττάρων, αλλά όχι των $CD8^+/CD25^+$ κυττάρων. Τούτο υποδηλώνει ότι είναι κύρια ο υποπληθυσμός των $CD4^+$ κυττάρων που είναι ενεργοποιημένος στην φάση της μυελικής αποκατάστασης.

β) Έκφραση μορίων HLA-DR και CD69: Για τον περαιτέρω χαρακτηρισμό των κυτταρικών υποπληθυσμών που βρίσκονται σε φάση ενεργοποίησης, μελετήθηκε η έκφραση του μορίου HLA-DR και η έκφραση του μορίου CD69, τόσο κατά την φάση της μυελικής απλασίας όσο και κατά την φάση της μυελικής αναγέννησης (Πίνακες 9,10).

Κατά την φάση της μυελικής απλασίας ο απόλυτος αριθμός των HLA-DR κυττάρων ($109,87 \pm 92,354$ κύτταρα/dl), βρέθηκε να είναι σημαντικά μειωμένος συγκριτικά με την προ-χημειοθεραπεία περίοδο ($232,43 \pm 134,07$ κύτταρα/dl) ($p < 0.0001$). Κατά την φάση της μυελικής αναγέννησης ο απόλυτος αριθμός των HLA-DR⁺ κυττάρων /dl ήταν $332,11 \pm 334,08$ κύτταρα/dl. Σε σύγκριση με την φάση της μυελικής απλασίας, ο απόλυτος αριθμός των HLA-DR⁺ κυττάρων, ήταν στατιστικά σημαντικά μεγαλύτερος ($p < 0.0001$). Αντίθετα, δεν διαπιστώθηκε σημαντική διαφορά του απόλυτου αριθμού των HLA-DR⁺ κυττάρων κατά την περίοδο πριν την χορήγηση της χημειοθεραπείας και κατά την μυελική αποκατάσταση (Πίνακας 9).

Το Σχήμα 2 παρουσιάζει σε ιστόγραμμα τις μεταβολές του απόλυτου αριθμού των HLA-DR⁺ κυττάρων/dl κατά την φάση πριν την χορήγηση της χημειοθεραπείας καθώς και κατά την μυελική απλασία και αποκατάσταση.

Είναι εμφανές ότι σε 13 (48%) από 27 ασθενείς ο απόλυτος αριθμός των HLA-DR⁺ κυττάρων/dl είναι μεγαλύτερος κατά την φάση της μυελικής αναγέννησης από εκείνον προ-χημειοθεραπείας. Επίσης, σε 21 (78%) από 27 ασθενείς, ο απόλυτος αριθμός των HLA-DR⁺ κυττάρων/dl ήταν σημαντικά μεγαλύτερος κατά την φάση της μυελικής αναγέννησης σε σύγκριση με την φάση της μυελικής απλασίας (Σχήμα 2).

Ο απόλυτος αριθμός των CD69⁺ κυττάρων και η έκφραση του σε διάφορους λεμφοκυτταρικούς υποπληθυσμούς κατά την φάση της μυελικής απλασίας και την φάση της μυελικής αποκατάστασης παρουσιάζονται στον Πίνακα 10. Κατά την φάση της μυελικής απλασίας ο απόλυτος αριθμός των CD69⁺ κυττάρων ήταν $216,13 \pm 266,38$ κύτταρα/dl ενώ κατά την περίοδο της μυελικής αναγέννησης ήταν $236,52 \pm 148,31$ κύτταρα/dl ($p < 0.505$).

Μελετήθηκε επίσης η έκφραση του μορίου CD69⁺ σε διάφορους λεμφοκυτταρικούς υποπληθυσμούς. Ο Πίνακας 10 παρουσιάζει τα συγκεντρωτικά αποτελέσματα κατά τις φάσεις της απλασίας και μυελικής αποκατάστασης για τους πληθυσμούς $CD4^+/CD69^+$, $CD8^+/CD69^+$, και $CD20^+/CD69^+$. Η μελέτη με διπλό φθορισμό κατά τις διάφορες φάσεις ανέδειξε μία στατιστικά σημαντική μείωση του απόλυτου αριθμού των $CD4^+/CD69^+$ ($m \pm SE: 66,73 \pm 61,2$ κύτταρα/dl) ($p < 0.005$) και των $CD20^+/CD69^+$ κυττάρων ($m \pm SE: 58,09 \pm 45,05$ κύτταρα/dl) ($p < 0.01$), κατά την φάση της μυελικής αποκατάστασης, σε σχέση με τον απόλυτο αριθμό των $CD4^+/CD69^+$ ($m \pm SE: 138,84 \pm 150,19$ κύτταρα/dl) και των $CD20^+/CD69^+$ ($m \pm SE: 82,6 \pm 66,50$ κύτταρα/dl) κατά την μυελική απλασία. Αντίθετα ο απόλυτος αριθμός των $CD8^+/CD69^+$ κυττάρων δεν διέφερε σημαντικά κατά την φάση της μυελικής απλασίας και μυελικής αποκατάστασης. (Πίνακας 10)

Το Σχήμα 3 παρουσιάζει σε ιστόγραμμα τις απόλυτες τιμές των CD69⁺ κυττάρων κατά την φάση της μυελικής απλασίας και την φάση της μυελικής αναγέννησης σε 21 ασθενείς. Παρατηρείται ότι μόνο 8 (38%) από τους 21 ασθενείς παρουσιάζουν αύξηση του απόλυτου αριθμού των CD69⁺ κυττάρων κατά την φάση της μυελικής αποκατάστασης.

Τα Σχήματα 4 και 5 παρουσιάζουν με την μορφή ιστογράμματος την έκφραση του CD25 και CD69 στους CD4⁺ και CD8⁺ T-λεμφοκυτταρικούς υποπληθυσμούς στην φάση της μυελικής αναγέννησης, αντίστοιχα. Διαπιστώθηκε στατιστικά σημαντική αύξηση ($p < 0.001$) του πληθυσμού των CD4⁺/CD25⁺ κυττάρων σε σύγκριση με εκείνο των CD4⁺/CD69⁺ κατά την μυελική αναγέννηση. Αντιθέτως, δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά συγκρίνοντας τους πληθυσμούς των CD8⁺/CD69⁺ και CD8⁺/CD25⁺ κυττάρων. Τα δεδομένα αυτά είναι σε συμφωνία με την παρατήρηση πως, κατά την μυελική αναγέννηση διαπιστώνεται στατιστικά σημαντική αύξηση κυρίως των CD4⁺/CD25⁺ κυττάρων. Αντίθετα οι υποπληθυσμοί των CD8⁺/CD25⁺ και CD8⁺/CD69⁺ φαίνεται ότι παραμένουν αμετάβλητοι κατά την φάση της μυελικής αναγέννησης.

In vitro πολλαπλ/μός των περιφερικών λεμφοκυττάρων

Η ανίχνευση λεμφοκυττάρων που εκφράζουν τα μόρια CD25 και HLA-DR κατά την φάση της μυελικής αναγέννησης υποδηλώνει ότι τα κύτταρα αυτά είναι ενεργοποιημένα. Κατά συνέπεια, είναι αναμενόμενο τα κύτταρα να παρουσιάζουν αυξημένο αυτόματο πολλαπλασιασμό in vitro απουσία μιτογονικού ερεθισμού (πχ. PHA ή anti-CD3) ή αυξητικού παράγοντα (πχ. IL-2).

α) Αυτόματος πολλαπλασιασμός:

Ο Πίνακας 11 παρουσιάζει τον αυτόματο πολλαπλασιασμό των λεμφοκυττάρων του αίματος (PBMC) κατά την φάση της μυελικής αναγέννησης συγκριτικά με αυτών προ της χημειοθεραπείας.

Η μέση τιμή cpm των PBMC σε 15 ασθενείς προ της χημειοθεραπείας ήταν $11,07 \pm 8,0 \times 10^3 / 2 \times 10^5$ PBMC και $38,59 \pm 89,2 \times 10^3 / 2 \times 10^5$ PBMC κατά την φάση της μυελικής αναγέννησης. Η διαφορά δεν ήταν στατιστικά σημαντική ($p = 0.253$). Αξίζει να σημειωθεί ότι 9 (60%) από 15 ασθενείς παρουσίασαν αύξηση του ρυθμού πολλαπλασιασμού των PBMC 2 φορές περισσότερο κατά την φάση της μυελικής αναγέννησης σε σύγκριση με εκείνο προ-χημειοθεραπείας (Σχήμα 6).

β) Επαγόμενος με IL-2 κυτταρικός πολλαπλασιασμός:

Δεδομένου ότι τα λεμφοκύτταρα των ασθενών κατά την φάση της μυελικής αναγέννησης εκφράζουν την α-αλυσίδα του IL-2R (CD25 μόριο) και θεωρούνται διεγερμένα, είναι αναμενόμενο η IL-2 χωρίς σύγχρονο μιτογονικό ερεθισμό να διεγείρεται με πολλαπλασιασμό τους.

Ο Πίνακας 12 παρουσιάζει τον in vitro πολλαπλασιασμό PBMC κατά την φάση της μυελικής αναγέννησης παρουσία IL-2. Η μέση τιμή cpm των PBMC σε 15 ασθενείς ήταν $12,29 \pm 9,83 \times 10^3 / 2 \times 10^5$ PBMC απουσία αυξητικού παράγοντα και $640,87 \pm 896,2 \times 10^5 / 2 \times 10^5$ PBMC παρουσία μόνο IL-2 (επαγόμενος με IL-2

πολλαπλασιασμός) .Η διαφορά ήταν στατιστικά σημαντική ($p=0.01$). Ο επαγόμενος με IL-2 κυτταρικός πολλαπλασιασμός βρέθηκε σημαντικά αυξημένος σε 10 (67%) από 15 ασθενείς (Σχήμα 7). Η παρατήρηση αυτή υποδηλώνει την παρουσία διεγερμένων λεμφοκυττάρων τα οποία εκφράζουν λειτουργικούς IL-2R.

γ)Κυτταρικός πολλαπλασιασμός επαγόμενος με μιτογόνα:

Σε μια ομάδα 25 ασθενών μελετήθηκε ο μιτογονικός (με PHA-P και anti-CD3 mAb) επαγόμενος κυτταρικός πολλαπλασιασμός κατά τις διάφορες φάσεις προ και μετά χημειοθεραπεία. Τα αποτελέσματα συγκρίθηκαν με εκείνα μιας ομάδας 10 φυσιολογικών αιμοδοτών.

Για ακόμα μια φορά, διαπιστώνεται ότι απουσία οποιουδήποτε μιτογονικού ερεθίσματος, ο αυτόματος πολλαπλασιασμός κατά την μυελική αναγέννηση είναι 3 φορές περίπου μεγαλύτερος από εκείνον των φυσιολογικών μαρτύρων. Αντίστοιχα, το anti-CD3 mAb και το PHA-P αύξησαν τουλάχιστον έως 4 φορές τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων κατά την μυελική αναγέννηση σε σύγκριση με τους φυσιολογικούς μάρτυρες.

Αντίθετα, ο πολλαπλασιασμός κατά την προ-χημειοθεραπεία περίοδο δεν διέφερε από εκείνο των φυσιολογικών μαρτύρων. Κατά την φάση της μυελικής απλασίας το PHA-P προκαλούσε μια 5πλάσια διέγερση σε σχέση με τους φυσιολογικούς μάρτυρες.

Ο Πίνακας 13 δείχνει πως ο αυθόρμητος κυτταρικός πολλαπλασιασμός (RPMI-1640) κατά την φάση της μυελικής αποκατάστασης ήταν σημαντικά υψηλότερος από ότι κατά την απλασία ($p<0.01$) καθώς και την περίοδο πριν την χορήγηση της χημειοθεραπείας ($p<0.01$). Κατά την μυελική αναγέννηση, ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός ο προκαλούμενος από το anti-CD3mAb ήταν σημαντικά πιο αυξημένος από εκείνον που παρατηρήθηκε κατά την απλασία ($p<0.001$) καθώς και κατά την περίοδο πριν την χορήγηση της χημειοθεραπείας ($p<0.001$). Επιπλέον ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός ο προκαλούμενος από την PHA-P ήταν σημαντικά πιο αυξημένος στην φάση της μυελικής αναγέννησης, σε σύγκριση με τον αντίστοιχο κατά την μυελική απλασία ($p<0.01$) καθώς και στην φάση πριν την χορήγηση της χημειοθεραπείας ($p<0.001$).

Δεν διαπιστώθηκε συσχέτιση κατά την φάση της μυελικής αναγέννησης, μεταξύ του απόλυτου αριθμού των $CD4^+$, $CD4^+/CD25^+$ κυττάρων και του αυθόρμητου (RPMI-1640) και προκαλούμενου (anti-CD3 mAb και PHA-P) κυτταρικού πολλαπλασιασμού.

Προσδιορισμός κυτοκινών στον ορό των ασθενών:

α) Προσδιορισμός IL-2 :

Επειδή τα προαναφερθέντα αποτελέσματα υποδηλώνουν την παρουσία ενεργοποιημένων IL-2-R⁺ κυττάρων, μετρήθηκαν τα επίπεδα IL-2 στον ορό 12 ασθενών πριν την έναρξη της χημειοθεραπείας και κατά την φάση της μυελικής αναγέννησης

(Πίνακας 14). Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι, 4 (25%) από τους 12 ασθενείς παρουσίασαν αυξημένα επίπεδα IL-2 στον ορό κατά την φάση της μυελικής αναγέννησης σε σύγκριση με την προ-χημειοθεραπείας περίοδο. Αντίθετα, 8 (75%) ασθενείς είχαν μειωμένα επίπεδα IL-2 στον ορό κατά την φάση της μυελικής αναγέννησης σε σύγκριση με εκείνα που διαπιστώθηκαν στην προ-χημειοθεραπείας περίοδο. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται διαγραμματικά στο σχήμα 8.

Τα αποτελέσματα αυτά θα πρέπει να αναλυθούν σε συνδυασμό με εκείνα του Πίνακα 11 όπου μελετήθηκε ο αυθόρμητος πολλαπλασιασμός των λεμφοκυττάρων του περιφερικού αίματος. Τα αποτελέσματα εκείνα έδειξαν ότι 9 (60%) από τους 15 ασθενείς παρουσίασαν αυξημένο ρυθμό πολλαπλασιασμού, κατά την φάση της μυελικής αναγέννησης, απουσία εξωγενούς IL-2 σε σύγκριση με τον προ-ΧΜΘ αυτόματο πολλαπλασιασμό των PBMC. Αυτό μπορεί να ερμηνευθεί σαν αποτέλεσμα της ενδογενούς παραγωγής IL-2. Κατά συνέπεια, τα μειωμένα επίπεδα της IL-2 που βρέθηκαν στην φάση της μυελικής αναγέννησης φαίνεται πως οφείλονται μάλλον στην αυξημένη κατανάλωση της από τα ενεργοποιημένα (CD25⁺) κύτταρα.

β) Προσδιορισμός IL-5, IL-6, TNFa, και GM-CSF στον ορό των ασθενών :

Προκειμένου να μελετηθεί περαιτέρω η ενεργοποίηση των λεμφοκυττάρων κατά την φάση της μυελικής αναγέννησης, προσδιορίστηκαν τα επίπεδα διαφόρων κυτοκινών στον ορό των ασθενών. Οι κυτοκίνες αυτές, όπως έχει προαναφερθεί, έχουν σημαντικό ρόλο στον πολλαπλασιασμό των αιμοποιητικών κυττάρων. Ο Πίνακας 15 παρουσιάζει τα επίπεδα IL-5 προ-ΧΜΘ και κατά την φάση της μυελικής αναγέννησης. Η μέση τιμή IL-5 στον ορό προ-ΧΜΘ ήταν $41,95 \pm 21,75$ pg/ml και $54,73 \pm 26,61$ pg/ml κατά την φάση της μυελικής αναγέννησης. Η διαφορά αυτή ήταν στατιστικά σημαντική ($p < 0,04$). Αξίζει να σημειωθεί ότι τα επίπεδα IL-5 του ορού βρέθηκαν αυξημένα κατά την φάση της μυελικής αναγέννησης σε 13 (65%) από τους 20 ασθενείς. Το σχήμα 9 αναπαριστά διαγραμματικά τα αποτελέσματα αυτά.

Στον ίδιο Πίνακα παρουσιάζονται τα επίπεδα IL-6 προ-ΧΜΘ και κατά την φάση της μυελικής αναγέννησης. Η μέση τιμή IL-6 στον ορό προ-ΧΜΘ ήταν $47,67 \pm 78,03$ pg/ml και $66,61 \pm 121,32$ pg/ml κατά την φάση της μυελικής αναγέννησης ($p = 0,55$). Στο σχήμα 10, το οποίο αναπαριστά τα αποτελέσματα διαγραμματικά, καθίσταται σαφές ότι σε 7 (46,66%) από 15 ασθενείς τα επίπεδα της IL-6 στον ορό κατά την φάση της μυελικής αναγέννησης ήταν αυξημένα σε σχέση με τα προ-ΧΜΘ επίπεδα.

Ο Πίνακας 16 παρουσιάζει τα επίπεδα TNFa και GM-CSF προ-ΧΜΘ καθώς και στην φάση της μυελικής αναγέννησης. Η μέση τιμή TNFa στον ορό προ-ΧΜΘ ήταν $86,16 \pm 88,65$ και $208,12 \pm 274,90$ κατά την φάση της μυελικής αναγέννησης. Η διαφορά αυτή ήταν στατιστικά σημαντική ($p < 0,01$). Αξίζει να σημειωθεί πως τα επίπεδα TNFa του ορού βρέθηκαν αυξημένα κατά την φάση της μυελικής αναγέννησης σε 10 (50%) από τους 20 ασθενείς (σχήμα 11).

Τέλος η μέση τιμή GM-CSF στον ορό προ-ΧΜΘ ήταν $44,38 \pm 37,65$ και $99,89 \pm 64,94$ κατά την φάση της μυελικής αναγέννησης. Η διαφορά αυτή ήταν επίσης στατιστικά σημαντική ($p < 0,0001$). Δεκαέξι (80%) από τους 20 ασθενείς στην φάση της μυελικής αναγέννησης διαπιστώθηκε ότι είχαν αυξημένα επίπεδα GM-CSF στον ορό (σχήμα 12).

Φαινοτυπικές μεταβολές των λεμφοκυττάρων μετά την χορήγηση G-CSF ή GM-CSF κατά την φάση της μυελικής απλασίας:

Σε 2 ομάδες των 19 ασθενών μελετήθηκαν οι φαινοτυπικές διαφορές των διαφόρων λεμφοκυτταρικών πληθυσμών μετά την χορήγηση rhG-CSF ή rhGM-CSF.

Ο Πίνακας 17 παρουσιάζει τον απόλυτο αριθμό θετικών κυττάρων προ-χημειοθεραπείας και κατά την φάση της μυελικής αναγέννησης στην ομάδα των ασθενών που έλαβαν rhG-CSF κατά την φάση της μυελικής απλασίας. Η μέση τιμή των CD3⁺ κυττάρων προ-ΧΜΘ ήταν 570±375,54 και κατά την μυελική αναγέννηση 1128±765 (p<0.002). Αντίστοιχα, η μέση τιμή του απόλυτου αριθμού CD4⁺ κυττάρων προ-ΧΜΘ ήταν 301±181 και 578±423 κατά την μυελική αναγέννηση (p<0.01), των CD8⁺ κυττάρων προ-ΧΜΘ ήταν 235±205 και 400±418 κατά την μυελική αναγέννηση (p<0.05), των CD20⁺ κυττάρων προ-ΧΜΘ ήταν 42±35 και 113±110 κατά την μυελική αναγέννηση (p<0.005), των CD25⁺ κυττάρων προ-ΧΜΘ ήταν 102,89±66,69 και 247,21±128,05 κατά την μυελική αναγέννηση (p<0.001), των CD57⁺ κυττάρων προ-ΧΜΘ ήταν 183,78±158,9 και 358,84±390,59 κατά την μυελική αναγέννηση (p<0.05), των HLA-DR⁺ κυττάρων προ-ΧΜΘ ήταν 87,26±68,33 και 222,63±369,15 κατά την μυελική αναγέννηση (p<0.03), των CD4⁺/CD25⁺ κυττάρων προ-ΧΜΘ ήταν 51,47±46,60 και 91,94±57,51 κατά την μυελική αναγέννηση (p<0.01), των CD8⁺/CD25⁺ κυττάρων προ-ΧΜΘ ήταν 12,63±13,16 και 23,15±22,39 κατά την μυελική αναγέννηση (p<0.09), και των CD20⁺/CD25⁺ κυττάρων προ-ΧΜΘ ήταν 3,57±5,87 και 7,57±12,51 κατά την μυελική αναγέννηση (p<0.12).

Κατά την φάση της μυελικής αναγέννησης 16 (84,2%) από τους 19 ασθενείς παρουσίασαν αύξηση του απόλυτου αριθμού των CD3⁺ κυττάρων, 13 (68,42%) αύξηση των CD4⁺ κυττάρων, 13 (68,42%) αύξηση των CD8⁺ κυττάρων, 13 (68,42%) αύξηση των CD20⁺ κυττάρων και 15 (78,94%) αύξηση των CD57⁺ κυττάρων. Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι ο απόλυτος αριθμός όλων των λεμφοκυτταρικών πληθυσμών κατά την φάση της μυελικής αναγέννησης ήταν στατιστικά σημαντικά μεγαλύτερος σε σύγκριση με τον αντίστοιχο προ-ΧΜΘ. Ο διπλός φθορισμός ανέδειξε ότι μόνο τα CD4⁺ ήταν αυξημένα κατά την μυελική αναγέννηση και όχι τα CD8⁺ ή CD20⁺ κύτταρα.

Ο Πίνακας 18 παρουσιάζει τον απόλυτο αριθμό θετικών κυττάρων προ-χημειοθεραπείας και κατά την φάση της μυελικής αναγέννησης στην ομάδα των ασθενών που έλαβαν rhGM-CSF. Η μέση τιμή των CD3⁺ κυττάρων προ-ΧΜΘ ήταν 411,84±270,08 και 854±778,65 κατά την μυελική αναγέννηση (p<0.005), των CD4⁺ κυττάρων προ-ΧΜΘ ήταν 226,62±167,13 και 376,4±400,5 κατά την μυελική αναγέννηση (p<0.01), των CD8⁺ κυττάρων προ-ΧΜΘ ήταν 156±102,2 και 274,7±178,5 κατά την μυελική αναγέννηση (p<0.01), των CD20⁺ κυττάρων προ-ΧΜΘ ήταν 39,2±75,25 και 154,31±157,19 κατά την μυελική αναγέννηση (p<0.002), των CD25⁺ κυττάρων προ-ΧΜΘ ήταν 66±90,69 και 299,89±416,7 κατά την μυελική αναγέννηση (p<0.04), των CD57⁺ κυττάρων προ-ΧΜΘ ήταν 208,5±97,25 και 248,52±276,40 κατά την μυελική αναγέννηση (p<0.01), και των HLA-DR⁺ κυττάρων προ-ΧΜΘ ήταν 89,14±76,94 και 377,37±285,68 κατά την μυελική αναγέννηση (p<0.01).

Κατά την φάση της μυελικής αναγέννησης 13 (68,42%) από τους 19 ασθενείς παρουσίασαν αύξηση του απόλυτου αριθμού των CD3⁺ κυττάρων, 11 (57,89%) αύξηση των CD4⁺ κυττάρων, 11 (57,89%) αύξηση των CD8⁺ κυττάρων, 10 (52,63%) αύξηση των CD20⁺ κυττάρων, 11 (57,89%) αύξηση των CD25⁺ κυττάρων και 12 (63,15%) αύξηση των CD57⁺ κυττάρων.

Τα παραπάνω αποτελέσματα δείχνουν ότι ο απόλυτος αριθμός όλων των λεμφοκυτταρικών πληθυσμών κατά την φάση της μυελικής αναγέννησης ήταν στατιστικά σημαντικά μεγαλύτερος σε σύγκριση με τον αντίστοιχο προ ΧΜΘ. Ο διπλός φθορισμός και πάλι ανέδειξε ότι μόνο τα CD4⁺ ήταν αυξημένα κατά την μυελική αναγέννηση και όχι τα CD8⁺ ή CD20⁺ κύτταρα. Ο πίνακας 19 παρουσιάζει συγκριτικά τις μέσες τιμές±SD του απόλυτου αριθμού των λεμφοκυτταρικών υποπληθυσμών στους αρρώστους που έλαβαν rhG-CSF ή rhGM-CSF.

Όπως φαίνεται, δεν υπάρχουν σημαντικές διαφορές του απόλυτου αριθμού των διαφόρων κυτταρικών υποπληθυσμών ανάλογα με τον χρησιμοποιηθέντα αυξητικό παράγοντα.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Τα αποτελέσματα της παρούσης μελέτης, δηλώνουν ότι η μυελική απλασία που ακολουθεί την χορήγηση χημειοθεραπείας, συνοδεύεται από έντονη λεμφοπενία, όπως χαρακτηριστικά έχει περιγραφεί^{46,47,79,87}. Τόσο ο απόλυτος αριθμός των κοκκιοκυττάρων όσο και των λεμφοκυττάρων, βρέθηκε να είναι σημαντικά μειωμένος στην φάση αυτή. Μάλιστα, το 26% των ασθενών εμφάνισαν σημαντική λεμφοπενία με απόλυτο αριθμό λεμφοκυττάρων <400/dl, ενώ το 58% των ασθενών είχαν CD4⁺ <400 κύτταρα/dl.

Η φαινοτυπική ανάλυση των λεμφοκυττάρων του περιφερικού αίματος, κατά την μυελική απλασία που ακολούθησε, αποκάλυψε ότι η λεμφοπενία αφορά τόσο στα T (CD3⁺), στα B (CD20⁺) όσο και στα NK (CD56⁺) κύτταρα. Ωστόσο, οι Mackall και συνεργάτες⁴⁶ απέτυχαν να διακρίνουν μείωση στα CD56⁺ κύτταρα. Θα μπορούσε ωστόσο η διάσταση των δύο απόψεων να οφείλεται στις διαφορές, που συσχετίζονται με τους πρωτοπαθείς όγκους, την ηλικία των ασθενών, καθώς και το είδος της χημειοθεραπείας που χρησιμοποιήθηκαν στις δύο μελέτες.

Είναι ενδιαφέρον να σημειωθεί, πως στην παρούσα μελέτη η μείωση των CD4⁺ T-κυττάρων κατά την φάση της απλασίας, φαίνεται να είναι πιο έντονη από εκείνη των CD8⁺ κυττάρων, καθώς το 23% των ασθενών παρουσίασε CD4⁺/CD8⁺ λόγο μικρότερο του 1,0 και το 60% από αυτούς είχαν απόλυτο αριθμό CD4⁺ κυττάρων μικρότερο από 400 κύτταρα/dl.

Πρόσφατες μελέτες έχουν αναφέρει ότι ασθενείς με καρκίνο του μαστού που έλαβαν adjuvant χημειοθεραπεία με μεθοτρεξάτη, 5-φλουοροουρακίλη και χλωραμβουκίλη παρουσίασαν μειωμένες τιμές T και non-T-κυττάρων καθώς και μειωμένη ανταπόκριση σε μιτογόνα και αλλο-αντιγόνα⁹⁵. Πρόσφατα οι Reckzeh και συνεργάτες⁹⁶ ανέφεραν, ότι ασθενείς με μη μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα στους οποίους χορηγήθηκε ταυτόχρονα ακτινοθεραπεία και χημειοθεραπεία με πακλιταξέλη, παρουσίασαν CD4⁺ λεμφοπενία, η οποία φάνηκε ότι συσχετιζόταν με αυξημένη επίπτωση διάμεσης πνευμονίας, έρπητα ζωστήρα ή λοιμώξεις οφειλόμενες σε κυτταρομεγαλοϊό.

Οι μελέτες αυτές σε συσχέτιση με τα ευρήματα των Mackall και συνεργατών του⁴⁶, καθώς και με τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης, δείχνουν πως ο πληθυσμός των CD4⁺ T-κυττάρων είναι πολύ ευαίσθητος στην χορήγηση χημειοθεραπείας. Διάφορες μελέτες επιβεβαιώνουν ότι η χορήγηση του συνδυασμού διαφόρων χημειοθεραπευτικών σκευασμάτων, μπορεί να έχει ιδιαίτερα μεγάλη επίδραση στην λεμφοποίηση των CD4⁺ T-κυττάρων⁹⁷⁻¹⁰⁰.

Στην παρούσα μελέτη, παρατηρήθηκε σημαντική μείωση των CD3⁺/CD25⁺, CD4⁺/CD25⁺, CD34⁺ και HLA-DR⁺ κυττάρων, κατά την μυελική απλασία. Η παρατήρηση αυτή δείχνει σαφή μείωση των ενεργοποιημένων T-λεμφοκυττάρων σαν αποτέλεσμα της χορήγησης χημειοθεραπευτικών σχημάτων. Αντιθέτως, αμετάβλητος παρέμεινε ο πληθυσμός τόσο των μνημονικών και naïve T-λεμφοκυττάρων, όσο και των κυττάρων που εκφράζουν το μόριο CD69 στην φάση αυτή.

Η υποδόρια χορήγηση των rhG-CSF και rhGM-CSF βοήθησε σημαντικά την μυελική αποκατάσταση. Πράγματι, η υποδόρια χορήγηση των G-CSF και GM-CSF προκάλεσε στατιστικά σημαντική αύξηση των κυττάρων που εκφράζουν το CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺, CD20⁺ και CD57⁺ ενώ και τα δύο είδη αυξητικών παραγόντων προκάλεσαν

αύξηση των ενεργοποιημένων κυττάρων ($CD25^+$, $HLA-DR^+$). Οι Varas και συνεργάτες⁸⁸, ανέφεραν πως ο rhG-CSF κινητοποιεί στο περιφερικό αίμα για κλωνική έκπτυξη τις πρόδρομες αιμοποιητικές μορφές που παραμένουν στον μυελό των οστών των ποντικών. Επίσης, προγενέστερες μελέτες⁸⁵, έχουν αναφέρει ότι ο rhG-CSF ευοδώνει την κινητοποίηση των κυκλοφορούντων μυελικών κυττάρων $CD34^+/CD33^+$ καθώς και των προδρόμων B-λεμφοκυττάρων $CD34^+/CD19^+$, εξηγώντας έτσι την αύξηση των $CD20^+$ κυττάρων κατά την φάση της μυελικής αποκατάστασης.

Η αύξηση των T-κυτταρικών υποπληθυσμών είναι πιο δύσκολο να εξηγηθεί μετά την χορήγηση rhG-CSF ή rhGM-CSF. Μια πιθανότητα μπορεί να είναι ότι η αποκατάσταση των T-λεμφοκυττάρων μπορεί να οφείλεται σε κλωνική επέκταση των υπολειπόμενων ώριμων T-κυττάρων, όπως υποστηρίζεται από τους de Gast και συνεργάτες¹⁰¹, σε ασθενείς με αυτόλογη μεταμόσχευση μυελού. Αντιθέτως, οι Andrews και συνεργάτες¹⁰² περιέγραψαν σε ακτινοβοληθέντες πθήκους που υποβλήθηκαν σε μεταμόσχευση $CD34^+$ μυελικών κυττάρων (χωρίς την παρουσία T και B-λεμφοκυττάρων) την μυελική και λεμφική αποκατάστασή τους.

Με βάση τα παραπάνω πειραματικά δεδομένα και προκειμένου να ερμηνευθούν τα δεδομένα της παρούσης μελέτης, εκφράζεται η υπόθεση ότι οι αυξητικοί παράγοντες κινητοποιούν τα αιμοποιητικά αρχέγονα κύτταρα του περιφερικού αίματος τα οποία εκφράζουν και άλλα αντιγόνα διαφοροποίησης, όπως το $CD33^+$ (μυελική σειρά), $CD19^+$ (αντιγόνο B-κυττάρου) ή $CD2^+$ (αντιγόνο T-κυττάρου). Τα κύτταρα αυτά στην συνέχεια, είναι σε θέση να οδηγήσουν σε πλήρη λεμφική και αιμοποιητική αποκατάσταση στον μυελό των ξενιστών¹⁰³. Η υπόθεση αυτή υποστηρίζεται από την διαπιστωθείσα στατιστικά σημαντική αύξηση των $CD34^+$ κυττάρων κατά την φάση της μυελικής αναγέννησης και από το γεγονός ότι, η αύξηση των περισσότερων λεμφοκυτταρικών υποπληθυσμών είναι παράλληλη με εκείνη των πολυδύναμων αιμοποιητικών αρχέγονων κυττάρων.

Κατά την φάση της μυελικής απλασίας παρατηρήθηκε σημαντική λεμφοπενία. Πράγματι η αναλογία των ασθενών που παρουσίασαν λιγότερα από 400 λεμφοκύτταρα/dl ήταν 26% κατά την φάση της απλασίας, αλλά μόνο 4% στην φάση της μυελικής αποκατάστασης. Εξάλλου, από τους 31 ασθενείς που κατά την απλασία είχαν $CD4^+ < 400$ κύτταρα/dl, οι 20 από αυτούς αποκατέστησαν τον αριθμό των $CD4^+$ κυττάρων τους κατά την φάση της μυελικής αποκατάστασης. Η λεμφοποίηση αυτή, που φαίνεται να αποκαθιστά τα λεμφοκύτταρα στα προ ΧΜΘ επίπεδα, συσχετίζονταν θετικά με τον αυξημένο απόλυτο αριθμό των $CD3^+$ και $CD56^+$ κυττάρων. Επιπλέον, ο αριθμός των ασθενών που παρουσίασαν αναλογία $CD4^+/CD8^+$ λιγότερη από 1,0 μειώθηκε από 24% κατά την φάση της απλασίας, σε 11% κατά την διάρκεια της μυελικής ανάπλασης.

Οι παρατηρήσεις αυτές δείχνουν ότι στους περισσότερους ασθενείς ο πολλαπλασιασμός των $CD4^+$ κυττάρων είναι περισσότερο έντονος, από εκείνον των $CD8^+$ κυττάρων, κατά την φάση της μυελικής αποκατάστασης. Αυτό, υποστηρίζεται περαιτέρω από την αύξηση του απόλυτου αριθμού των $CD4^+/CD25^+$ κυττάρων.

Η έκφραση του $CD25$ μορίου στα $CD4^+$ κύτταρα κατά την μυελική αποκατάσταση, δείχνει ότι τα κύτταρα αυτά είναι ενεργοποιημένα. Η θετική συσχέτιση μεταξύ $CD3^+/CD25^+$ και $CD4^+/CD25^+$ κυττάρων δείχνει πως ο υποπληθυσμός των $CD4^+$ κυττάρων είναι και ο κύρια ενεργοποιημένος πληθυσμός κατά την φάση της μυελικής αναγέννησης. Παρόμοια "ενεργοποιημένος" φαινότυπος $CD4^+$ κυττάρων έχει περιγραφεί στα λεμφοκύτταρα του περιφερικού αίματος από ασθενείς μετά από

μεταμόσχευση μυελού των οστών¹⁰⁴. Επιπρόσθετα, αυξημένος αριθμός CD4⁺ κυττάρων που εκφράζουν HLA-DR μόρια και χαμηλού μοριακού βάρους CD45, έχουν ήδη περιγραφεί μετά από χημειοθεραπεία⁴⁵. Μελέτες με ποντίκια, φαίνεται να ενισχύουν την άποψη ότι η αποκατάσταση των T-κυττάρων ακολουθεί θυμοανεξάρτητους δρόμους⁸⁴.

Η ενεργοποίηση των CD4⁺ κυττάρων κατά την φάση της μυελικής ανάπλασης υποστηρίζεται από τα πειράματα in vitro πολλαπλασιασμού των κυττάρων. Πράγματι, το 30% των ασθενών κατά την μυελική αναγέννηση διαθέτουν κύτταρα που είτε πολλαπλασιάζονται in vitro απουσία μιτογονικού ερεθισμού ή και αυξητικού παράγοντα, καθώς επίσης και της ικανότητάς τους να πολλαπλασιασθούν μόνο παρουσία IL-2 απουσία μιτογόνου. Η κατάσταση ενεργοποίησης στην οποία βρίσκονται τα T-λεμφοκύτταρα κατά την φάση της μυελικής αναγέννησης ενισχύεται επιπλέον και από την έκφραση των μορίων HLA-DR και CD25 στα κύτταρα αυτά, όπως έδειξαν τα πειράματα διπλού φθορισμού. Επιπλέον, η ενεργοποίηση των κυττάρων αυτών συνοδεύεται και από αυξημένη παραγωγή κυττοκινών (π.χ IL-2, TNF α , IL-5, GM-CSF). Κατά συνέπεια, ένα σύνολο παρατηρήσεων δείχνει ότι τα CD4 κύτταρα είναι ενεργοποιημένα κατά την μυελική αναγέννηση: (1) αυξημένη έκφραση των μορίων CD25 και HLA-DR, (2) η ανεύρεση αυξημένων επιπέδων IL-2 στον ορό των περισσότερων ασθενών (3) ο σημαντικά αυξημένος κυτταρικός πολλαπλασιασμός απουσία αυξητικού παράγοντα ή μιτογόνου (4) ο αυξημένος κυτταρικός πολλαπλασιασμός παρουσία μόνο IL-2 χωρίς σύγχρονη διέγερση με μιτογόνα και (5) τα αυξημένα επίπεδα κυττοκινών (IL-5, TNF, GM-CSF) στον ορό των ασθενών.

Αναλύοντας την κάθε μία ένδειξη χωριστά, είναι ενδιαφέρον να σημειωθεί ότι αυξημένα επίπεδα IL-2 στον ορό διαπιστώθηκαν σε 4 (25%) από 12 ασθενείς, ενώ αυξημένος αυτόματος ή IL-2 επαγόμενος πολλαπλασιασμός διαπιστώθηκε σε 9(60%) από 15 ασθενείς καθώς και σε 5(33%) από 15 ασθενείς, αντίστοιχα. Οι διαφορές αυτές μπορούν να ερμηνευθούν εκ του γεγονότος ότι τα ενεργοποιημένα CD4⁺ κύτταρα που εκφράζουν το μόριο CD25 καταναλίσκουν την παραγόμενη από τα T-κύτταρα IL-2.

Η διαφοροποιημένη έκφραση του CD69 σε σχέση με εκείνη του CD25 και του HLA-DR είναι δύσκολο να ερμηνευθεί με βάση τα δεδομένα της παρούσης μελέτης και θα μπορούσε να αποδοθεί σε διαφορετικές μοριακές οδούς που χρησιμοποιούνται για την έκφραση των αντιστοιχών γονιδίων κατά την ενεργοποίηση των CD4⁺ κυττάρων.

Μία άλλη ενδιαφέρουσα παρατήρηση είναι ότι τα επίπεδα των κυττοκινών IL-5, IL-6, TNF α , και GM-CSF στον ορό των ασθενών είναι αυξημένα κατά την φάση της μυελικής αναγέννησης. Αξίζει να σημειωθεί ότι όλοι αυτοί οι παράγοντες παράγονται και καταναλίσκονται κατά την διάρκεια της αιμοποίησης ή/και διέγερσης των διαφόρων κυτταρικών πληθυσμών του αίματος.

Η μελέτη της συγκριτικής δράσης του rhG-CSF και του rhGM-CSF στην ανάπλαση των διαφόρων λεμφοκυτταρικών πληθυσμών έδειξε ότι δεν υπάρχουν σημαντικές διαφορές μεταξύ των δύο αυξητικών παραγόντων. Από την άλλη μεριά όμως, υποδηλώνουν ισχυρά ότι η διέγερση των CD34 κυττάρων καθώς και αυτή του μονοκυτταρικού / μακροφαγικού συστήματος αποτελούν σημαντικούς παράγοντες που ρυθμίζουν την λεμφοποίηση μετά την χημειοθεραπεία.

Στην παρούσα μελέτη, μερικοί ασθενείς (περίπου το 20% τού υπό μελέτη πληθυσμού) είχαν αναλογία CD4⁺/CD8⁺ μικρότερη κατά την μυελική αποκατάσταση από ότι κατά την απλασία. Η παρατήρηση αυτή δείχνει, ότι στους συγκεκριμένους

ασθενείς ο βαθμός κυτταρικού πολλαπλασιασμού των CD8⁺ κυττάρων ήταν υψηλότερος από εκείνον των CD4⁺ κυττάρων. Ο λόγος δεν είναι ξεκάθαρος. Πιθανόν, υποκλινικές λοιμώξεις με παράσιτα, ιούς, ή μύκητες μπορεί να αποτελούν το έναυσμα για τον πολλαπλασιασμό των κυτταροτοξικών T-κυττάρων.

Μια άλλη διαταραχή των T-κυττάρων κατά την μυελική αποκατάσταση που διαπιστώθηκε, ήταν η αποτυχία των PHA-P και του mAb anti-CD3, να προκαλέσουν ανταποκρίσεις στο 60% και 40% των κυττάρων των ασθενών αντιστοίχως. Παρά την στατιστικά σημαντική αύξηση κατά την φάση της μυελικής αναγέννησης του κυτταρικού πολλαπλασιασμού τού προκαλούμενου τόσο από το μονοκλωνικό αντίσωμα anti-CD3 όσο και την PHA-P, σε 10(40%) από τους 25 ασθενείς (anti-CD3) αλλά και σε 15(60%) από τους 25 ασθενείς (PHA-P), απέτυχε να αυξηθεί ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός. Σε μερικούς, αλλά όχι όλους τους ασθενείς, η ελαττωμένη ανταπόκριση για πολλαπλασιασμό στην PHA-P, συσχετιζόταν με χαμηλό αριθμό CD4⁺ κυττάρων. Αντιθέτως, σε άλλους ασθενείς, συσχετιζόταν με αυξημένο αυθόρμητο κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Προφανώς, ο χαμηλός αριθμός των ασθενών σε κάθε ομάδα, περιορίζει την δυνατότητα εξαγωγής ασφαλών συμπερασμάτων. Μία πιθανή ερμηνεία θα μπορούσε να ήταν ότι τα κύτταρα ήδη βρίσκονται σε φάση έντονου πολλαπλασιασμού και η περαιτέρω μιτογονική τους διέγερση δεν μπορεί να αυξήσει σημαντικά τον πολλαπλασιασμό τους.

Η κλινική σημασία των περιγραφόμενων ανωμαλιών στα T-κύτταρα, είναι δύσκολο να προσδιοριστεί με την παρούσα μελέτη. Λαμβάνοντας υπ' όψη όμως την σημασία των T-λεμφοκυττάρων για την κυτταρική ανοσία, αποκτά κλινική σημασία, η γνώση πως ο μειωμένος αριθμός τους (<400 λεμφοκύτταρα/dl) σχετίζεται με μεγαλύτερη ευπάθεια σε ευκαιριακές λοιμώξεις. Πράγματι, στην παρούσα μελέτη 11 από τους 53 ασθενείς (21%) είχαν κατά την φάση της μυελικής αποκατάστασης σημαντική CD4⁺ λεμφοπενία (CD4⁺<400 κύτταρα/dl) και σε 5 από αυτούς, αναπτύχθηκε ευκαιριακή λοίμωξη (Πίνακας 1).

Κατά συνέπεια, μπορεί κανείς να συμπεράνει ότι παρά το γεγονός ότι η πλειοψηφία των ασθενών παρουσίασε ενεργό αποκατάσταση της λεμφικής σειράς κατά την φάση της μυελικής αναγέννησης, η υφιστάμενη CD4⁺ λεμφοπενία σε κάποιους από αυτούς, μπορεί τουλάχιστον εν μέρει, να ερμηνεύσει και την ανάπτυξη κοινών αλλά και ευκαιριακών λοιμώξεων σ' αυτούς τους ασθενείς. Η παρατήρηση αυτή θα πρέπει να λαμβάνεται σοβαρά υπ' όψη στην αντιμετώπιση εμπύρετων μη ουδετεροπενικών ασθενών.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η μυελοκαταστολή που ακολουθεί την ΧΜΘ ,συχνά αντιμετωπίζεται με τους αιμοποιητικούς αυξητικούς παράγοντες rhGM-CSF ή rhG-CSF οι οποίοι προάγουν την μυελική αναγέννηση. Ωστόσο η επίδραση της χορήγησης αυτών των αυξητικών παραγόντων στην λεμφοποίηση, κατά την φάση της μυελικής αναγέννησης ευθύνεται και για λειτουργικές μεταβολές των T- και B- λεμφοκυττάρων .

Στην παρούσα μελέτη 53 ασθενείς με ιστολογικά ή κυτταρολογικά επιβεβαιωμένο καρκίνο που παρουσίασαν λευκοπενία grade 3 ή 4 μετά από χημειοθεραπεία πρώτης γραμμής, έλαβαν αυξητικό παράγοντα μέχρι την αποκατάσταση της μυελικής απλασίας. Επιπλέον, 38 ασθενείς με επιβεβαιωμένο καρκίνο, που εμφάνισαν grade 3 ή 4 λευκοπενία κατά την διάρκεια πρώτου κύκλου της χημειοθεραπείας, τυχαιοποιήθηκαν και έλαβαν είτε rhG-CSF ή rhGM-CSF. Σε όλους τους ασθενείς η αποκατάσταση των T,B και NK λεμφοκυττάρων αναλύθηκε με έμμεσο ανοσοφθορισμό. Επιπλέον σε κάποιους ασθενείς, η λειτουργία των T-λεμφοκυτταρικών υποπληθυσμών, μελετήθηκε χρησιμοποιώντας in vitro μεθόδους κυτταρικού πολλαπλασιασμού, καθώς και μέτρηση κυττοκινών στον ορό.

Κατά την διάρκεια της μυελοκαταστολής, 26% των ασθενών παρουσίασαν σημαντική λεμφοπενία (<400 κύτταρα/dl). Η λεμφοπενία αφορούσε τόσο στα T , στα B, όσο και στα NK κύτταρα. Επιπλέον, 31 από τους 53 (58%) ασθενείς παρουσίασαν σημαντική CD4+ λεμφοπενία (<400 κύτταρα /dl) . Η χορήγηση των αυξητικών παραγόντων και η αποκατάσταση του μυελού των οστών συσχετίστηκε με ενεργό λεμφοποίηση, η οποία χαρακτηριζόταν με στατιστικά σημαντική αύξηση των T,B και NK κυττάρων. Όλοι οι T-κυτταρικοί υποπληθυσμοί αυξήθηκαν σημαντικά κατά την φάση αυτή. Η χορήγηση των rhG-CSF ή rhGM-CSF δεν οδήγησε σε φαινοτυπικές διαφορές των T- λεμφοκυττάρων .

Επιπρόσθετα , κατά την διάρκεια της μυελικής αποκατάστασης , παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση του απόλυτου αριθμού των IL -2R+(CD25+) και HLA-DR+ κυττάρων. Η διπλή φαινοτυπική ανάλυση αποκάλυψε ότι τα ενεργοποιημένα αυτά μόρια εκφράζονται κυρίως στα CD4+ και λιγότερο στα CD8+ κύτταρα .Επιπλέον σε 4/12 (25%) ασθενείς, ανιχνεύθηκαν αυξημένα επίπεδα IL-2 στον ορό, ενώ αντιθέτως σε 9/15 (60%) ασθενείς τα μονοπύρνα του περιφερικού αίματος μπόρεσαν να πολλαπλασιαστούν in vitro απουσία οποιουδήποτε αυξητικού παράγοντα ή μιτογονικού ερεθισμού .

Ανεξάρτητα από την ενεργό λεμφοποίηση, κατά την φάση της μυελικής αποκατάστασης 11 από τους 53 (21%) ασθενείς εξακολουθούσαν να έχουν CD4+ λεμφοπενία, με αριθμό CD4+ κυττάρων <400/dl. Στους ασθενείς αυτούς παρατηρήθηκαν πέντε περιπτώσεις ευκαιριακών λοιμώξεων .

Συνεπώς, όλα αυτά τα στοιχεία υποστηρίζουν την υπόθεση , ότι η χημειοθεραπεία μπορεί να προκαλέσει σημαντική CD4+ λεμφοπενία και λειτουργικές ανωμαλίες των λεμφοκυττάρων, οι οποίες θα πρέπει να ευθύνονται για την ανάπτυξη ευκαιριακών λοιμώξεων .

SUMMARY

Chemotherapy-induced myelosuppression is frequently treated with the hematopoietic growth factors rhGM-CSF or rhG-CSF which promote bone marrow regeneration. However, the effect of the administration of these growth factors on lymphopoiesis during bone marrow regeneration, causes functional disturbances of T- and B- lymphocytes. In this study, 53 chemotherapy – naive patients with histologically or cytologically confirmed solid tumors who developed grade 3 or 4 leukopenia, were treated with hematopoietic growth factors until bone marrow recovery. In addition 38 chemotherapy patients with different solid tumors who developed grade 3 or 4 leukopenia during the first cycle of chemotherapy were randomized to receive either rhG-CSF or rhGM-CSF. In all patients the regeneration of T, B and NK-lymphocytes was analyzed by indirect immunofluorescence. Moreover, in some patients the function of T-lymphocyte subsets was also studied using in vitro proliferation assays.

During the phase of post –chemotherapy myelosuppression, 26% of the patients presented a severe lymphopenia (<400cells/dl). Both T-,B- and NK cells were affected. Moreover, 31 out of 53(58%)patients presented severe CD4+ lymphopenia (<400cells/dl). The administration of growth factors and the regeneration of bone marrow was associated with an active lymphopoiesis which was characterized by a significant increase of T-,B- and NK-cells. All T- cell subsets were significantly increased during this phase. The administration of rhG-CSF or rhGM-CSF did not result in phenotypic differences of T-lymphocytes. In addition, during the phase of bone marrow regeneration a significantly increase of the absolute number of IL2-R+(CD25+)and HLA-DR+cells was observed; double staining phenotypic analysis revealed that these activation molecules were mainly expressed on CD4+ but also on CD8+cells. In addition in 4/12 (25%) patients,increased serum levels of IL2 were detected whereas in 9/15(60%) patients peripheral blood mononuclear cells were able to proliferate in vitro in the absence of any growth factor or mitogenic stimulation. Despite the active lymphopoiesis during bone marrow regeneration 11 out of 53 patients still presented CD4+ lymphopenia at the time of bone marrow recovery. Five cases of opportunistic infections were observed in these patients. Therefore, all these data support the hypothesis that chemotherapy may induce severe CD4+ lymphopenia and functional defects of lymphocytes which may be responsible for the development of opportunistic infections.

<u>ΠΙΝΑΚΑΣ 1.</u>	Χαρακτηριστικά ασθενών
Αριθμός ασθενών	53
Άνδρες	20
Γυναίκες	33
Μέση ηλικία (χρόνια)	57
Εύρος	34 – 80
Performance status (WHO)	
0	45
1	8
Επεισόδια εμπύρετης ουδετεροπενίας	9
Αποδειχθείσα βακτηριαμία	2
- Gram(+)	-
- Gram (-)	2
Ευκαιριακές λοιμώξεις	
Γενικευμένη καντιντίαση	3
Πνευμονία απο Pneumocystis carinii	1
Αναζωπύρωση HBV λοίμωξης	1
Ιστολογία	
NSCLC	15
Μαστός	24
Ωοθήκες	7
Ουροδόχος κύστη	4
Στόμαχος	1
Παχύ έντερο	1
Πάγκρεας	1

ΠΙΝΑΚΑΣ 2. Φαινοτυπική ανάλυση των λεμφοκυτταρικών υποπληθυσμών πριν την ΧΜΘ και κατά την φάση της μυελικής απλασίας.

ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΑ	ΠΡΟ-ΧΜΘ	ΦΑΣΗ ΑΠΛΑΣΙΑΣ	p-value
CD3+	1557 ± 432	667 ± 61	0,01
CD4+	737 ± 130	357 ± 38	0,01
CD8+	554 ± 126	364 ± 50	0,001
CD20+	94 ± 58	52 ± 7	0,001
CD56+	358 ± 490	161 ± 17	0,001
HLA-DR+	265 ± 52	130 ± 27	0,001
CD25+	109 ± 16	207 ± 37	NS
CD4+/CD8+	1,6 ± 0,9	1,8 ± 1,0	NS

Αίμα σε EDTA ελήφθη προ της ενάρξεως της χημειοθεραπείας και την 1^η ημέρα διαπίστωσης της μυελικής απλασίας. Πραγματοποιήθηκε φαινοτυπική ανάλυση των λεμφοκυττάρων του αίματος με την βοήθεια μονοκλωνικών αντισωμάτων και ανάλυση σε κυτταρομετρητή ροής όπως περιγράφεται στο κεφάλαιο ‘Υλικό και Μέθοδοι ‘.

ΠΙΝΑΚΑΣ 3. Φαινοτυπική ανάλυση των λεμφοκυτταρικών υποπληθυσμών κατά την μυελική απλασία και την μυελική αναγέννηση.

ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΑ	ΜΥΕΛΙΚΗ ΑΠΛΑΣΙΑ	ΜΥΕΛΙΚΗ ΑΝΑΓΕΝΝΗΣΗ	p-value
CD3+	667 ± 61	1224 ± 108	0,001
CD4+	357 ± 38	670 ± 65	0,002
CD8+	364 ± 50	439 ± 60	0,01
CD20+	52 ± 7	127 ± 19	0,001
CD56+	161 ± 17	393 ± 67	0,003
HLA-DR+	130 ± 27	332 ± 64	0,001
CD25+	207 ± 37	464 ± 73	0,001
CD4+/CD8+	1,8 ± 1,0	2,0 ± 1,0	NS

Αίμα σε EDTA ελήφθη την 1^η ημέρα διαπίστωσης της μυελικής απλασίας καθώς και την 1^η ημέρα που ο απόλυτος αριθμός των κοκκιοκυττάρων ήταν >1200κύτταρα/dl. Πραγματοποιήθηκε φαινοτυπική ανάλυση των λεμφοκυττάρων του αίματος με την βοήθεια μονοκλωνικών αντισωμάτων και ανάλυση σε κυτταρομετρητή ροής όπως περιγράφεται στο κεφάλαιο ‘Υλικό και Μέθοδοι’.

ΠΙΝΑΚΑΣ 4. Φαινοτυπικές μεταβολές κατά την προ-ΧΜΘ περίοδο και κατά την φάση της μυελικής αποκατάστασης.

ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΑ	Προ-ΧΜΘ	Μυελική αναγέννηση	p-value
CD3+	1557 ± 432	1224 ± 108	NS
CD4+	737 ± 130	670 ± 65	NS
CD8+	554 ± 126	439 ± 60	NS
CD20+	94 ± 58	127 ± 19	NS
CD56+	358 ± 490	393 ± 67	NS
HLA-DR+	265 ± 52	332 ± 64	<0.01
CD25+	109 ± 16	464 ± 73	<0.001
CD4+/CD8+	1,6 ± 0,9	2,0 ± 1,0	NS

Αίμα σε EDTA ελήφθη προ της ενάρξεως της χημειοθεραπείας και την 1^η ημέρα που ο απόλυτος αριθμός των κοκκιοκυττάρων ήταν >1200 κύτταρα/dl. Πραγματοποιήθηκε φαινοτυπική ανάλυση των λεμφοκυττάρων του αίματος με την βοήθεια μονοκλωνικών αντισωμάτων και ανάλυση σε κυτταρομετρητή ροής όπως περιγράφεται στο κεφάλαιο ‘Υλικό και Μέθοδοι’.

ΠΙΝΑΚΑΣ 5. CD4 λεμφοπενία κατά την φάση της απλασίας και μυελικής αναγέννησης.

	<u>Αριθμός ασθενών</u>	
	CD4⁺>400/dl	CD4⁺<400/dl
Μυελική απλασία	22(42)	31(58)
Μυελική αναγέννηση	42(79)	11(21)

ΠΙΝΑΚΑΣ 6. Μελέτη της έκφρασης του μορίου CD45RO σε T-λεμφοκυτταρικούς πληθυσμούς.

Ασθενής	CD45RO ⁺		CD4 ⁺ /CD45RO ⁺		CD8 ⁺ /CD45RO ⁺	
	απλασία	αναγέννηση	απλασία	αναγέννηση	απλασία	αναγέννηση
1	986 ^a	330	841	255	8	40
2	82	161	60	107	30	49
3	320	210	240	154	24	24
4	129	148	45	48	28	0
5	175	64	147	60	5	2
6	162	49	20	24	27	14
7	680	660	126	35	240	225
8	308	649	40	60	44	59
9	115	912	264	384	36	11
10	192	242	54	21	20	76
11	96	456	90	342	24	22
12	154	204	40	22	12	38
13	24	70	68	304	14	18
14	285	260	77	156	4	7
15	500	378	4	28	60	40
16	308	460	135	80	40	56
17	392	532	80	238	28	80
18	336	162	266	360	84	84
19	114	180	238	98	48	12
20	ΔΕ	ΔΕ	272	132	0	10
21	ΔΕ	ΔΕ	102	20	ΔΕ	ΔΕ

Τα μνημονικά T-κύτταρα του αίματος μελετήθηκαν με την βοήθεια μονοκλωνικών αντισωμάτων κατά την φάση της μυελικής απλασίας και την φάση της μυελικής ανγέννησης. Ο ειδικός T-λεμφοκυτταρικός πληθυσμός (CD4 ή CD8) προσδιορίστηκε με διπλό φθορισμό.

(a : οι τιμές αναφέρονται στον απόλυτο αριθμό θετικών κυττάρων/dl)

ΠΙΝΑΚΑΣ 7. Μελέτη της έκφρασης του CD45RA σε T-λεμφοκυτταρικούς πληθυσμούς.

CD45RA ⁺		CD4 ⁺ /CD45RA ⁺		CD8 ⁺ /CD45RA ⁺	
απλασία	αναγέννηση	απλασία	αναγέννηση	απλασία	αναγέννηση
137 ^a	342	38	80	35	100
390	364	40	28	90	196
75	116	24	36	18	12
322	260	154	172	49	16
46	90	3	2	23	14
342	238	81	42	189	77
780	510	40	60	40	60
616	1121	198	148	154	325
441	276	44	266	76	570
196	1007	21	24	77	0
140	180	8	21	16	70
104	322	120	200	90	140
465	660	240	182	140	112
640	616	112	220	196	240
490	486	140	56	252	98
560	294	64	24	240	78
560	186				

Τα παίνε T-λεμφοκύτταρα του αίματος μελετήθηκαν με την βοήθεια μονοκλωνικών αντισωμάτων κατά την φάση της μυελικής απλασίας και την φάση της μυελικής αναγέννησης. Ο ειδικός T-λεμφοκυτταρικός πληθυσμός (CD4 ή CD8) καθορίστηκε με πειράματα διπλού φθορισμού.

(a:οι τιμές αναφέρονται στον απόλυτο αριθμό θετικών κυττάρων/dl)

Πίνακας 8. Μελέτη της έκφρασης του CD25 μορίου(IL-2R) σε διάφορους λεμφοκυτταρικούς υποπληθυσμούς.

Λεμφοκύτταρα	Απόλυτος αριθμός κυττάρων/ dl		P-value
	Απλασία	Αναγέννηση	
CD3 ⁺ / CD25 ⁺	82 ± 14	214 ± 30	<0.001
CD4 ⁺ / CD25 ⁺	74 ± 16	192 ± 32	<0.001
CD8 ⁺ / CD25 ⁺	26 ± 7	57 ± 17	NS
CD20 ⁺ / CD25 ⁺	3 ± 1	8 ± 5	NS

Ελήφθη ολικό αίμα την 1^η ημέρα διαπίστωσης της απλασίας καθώς και την ημέρα που ο απόλυτος αριθμός των κοκκιοκυττάρων ήταν >1200 κύτταρα/dl. Πραγματοποιήθηκε διπλός φθορισμός των λεμφοκυττάρων του αίματος με την βοήθεια μονοκλωνικών αντισωμάτων ενώ η ανάλυση έγινε σε κυτταρομετρητή ροής, όπως περιγράφεται στο κεφάλαιο ‘ Υλικό και Μέθοδοι ‘.

ΠΙΝΑΚΑΣ 9. Μελέτη της έκφρασης του HLA-DR μορίου στις φάσεις προ-ΧΜΘ, μυελικής απλασίας και μυελικής αναγέννησης.

Απόλυτος αριθμός HLA-DR⁺ κυττάρων/dl

A/α	Προ ΧΜΘ	Απλασία	Αναγέννηση
1	331	151	721
2	92	116	454
3	118	166	310
4	104	95	185
5	204	55	275
6	373	170	408
7	346	92	181
8	144	294	619
9	428	415	895
10	477	218	79
11	225	12	92
12	263	115	340
13	143	34	27
14	139	210	1621
15	248	81	126
16	272	31	185
17	247	150	257
18	165	31	54
19	188	4	189
20	30	81	47
21	81	84	199
22	153	194	61
23	111	32	299
24	273	21	127
25	100	211	438
26	317	119	442
27	579	144	336
28	504	24	ND
29	286	80	ND
30	223	32	ND
31	81	34	ND
32	193	20	ND

Σε ολικό αίμα πραγματοποιήθηκε φαινοτυπική ανάλυση για την παρουσία HLA-DR⁺ κυττάρων τόσο πριν την

χορήγηση της χημειοθεραπείας όσο και στις φάσεις της απλασίας και της μυελικής αναγέννησης. Η τυποποίηση των λεμφοκυττάρων έγινε με την βοήθεια μονοκλωνικών αντισωμάτων ενώ η ανάλυση σε κυτταρομετρητή ροής.

ΠΙΝΑΚΑΣ 10. Μελέτη της έκφρασης του CD69 σε διάφορους λεμφοκυτταρικούς πληθυσμούς.

Απόλυτος αριθμός θετικών κυττάρων / dl

Α/α	CD69 ⁺		CD4 ⁺ /CD69 ⁺		CD8 ⁺ /CD69 ⁺		CD20 ⁺ /CD69 ⁺	
	απλασία	αναγέννηση	απλασία	αναγέννηση	απλασία	αναγέννηση	απλασία	αναγέννηση
1	87	75	16	27	29	30	55	7
2	47	114	60	70	14	34	10	21
3	270	245	27	64	50	70	0	0
4	78	184	42	140	24	44	0	4
5	140	208	5	10	35	28	0	4
6	29	92	117	98	11	8	18	7
7	234	329	180	240	144	105	0	0
8	380	540	550	118	40	30	88	0
9	836	590	36	11	198	207	9	0
10	171	138	65	114	45	32	5	0
11	3	342	48	11	105	38	8	0
12	232	220	20	19	72	66	0	0
13	64	76	28	12	28	38	7	0
14	161	76	270	40	63	30	30	0
15	136	466	100	140	20	84	60	28
16	330	300	182	60	165	60	28	20
17	520	252	308	28	80	112	28	14
18	560	260	176	36	154	60	0	0
19	392	154	408	30	168	98	36	10
20	384	102	ND	ND	224	36	ND	ND
21	540	160	ND	ND	66	10	ND	ND

Σε ολικό αίμα πραγματοποιήθηκε φαινοτυπική ανάλυση για την παρουσία του μορίου CD69⁺ τόσο κατά την φάση της απλασίας όσο και της μυελικής αναγέννησης. Η τυποποίηση των λεμφοκυττάρων έγινε με την βοήθεια μονοκλωνικών αντισωμάτων, τόσο με την μέθοδο του απλού φθορισμού όσο και με την μέθοδο του διπλού φθορισμού, προκειμένου να διευκρινισθεί σε ποιο κυτταρικό πληθυσμό (CD4 ή CD8) ανήκουν τα κύτταρα.

ΠΙΝΑΚΑΣ 11. In vitro πολλαπλασιασμός των PBMC προ ΧΜΘ και κατά την φάση της μυελικής αναγέννησης απουσία εξωγενούς μιτογονικού ερεθισμού ή αυξητικού παράγοντα (IL-2).

cpm ³ HTdR (x10 ³)/2x10 ⁵ PBMC		
A/α	Προ-ΧΜΘ	Μυελική αναγέννηση
1	7,40	13,80
2	5,60	13,60
3	2,70	4,30
4	23,20	12,10
5	4,50	22,00
6	27,20	40,10
7	3,90	7,30
8	10,70	358,00
9	13,80	6,80
10	6,50	4,20
11	4,20	23,90
12	8,10	44,50
13	25,00	9,50
14	12,80	9,60
15	10,50	9,20

2x10⁵/ml PBMC σε RPMI 1640 καλλιεργήθησαν απουσία αυξητικού παράγοντα ή εξωγενούς μιτογονικού ερεθισμού για 72h όπως περιγράφεται στο κεφάλαιο ‘ Υλικό και Μέθοδοι ‘. Τα κύτταρα που βρίσκονται σε φάση πολλαπλασιασμού σημάνθηκαν με ³HTdR(0,4 μCi/ml) για 24hrs και η ενσωματωμένη β- ακτινοβολία μετρήθηκε σε ειδικό αυτόματο μετρητή μετά από ληψη των κυττάρων σε φύλλα Hartmann.

ΠΙΝΑΚΑΣ 12.In vitro πολλαπλασιασμός PBMC κατά την φάση της μυελικής αναγέννησης παρουσία IL2.

A/α	cpm ³ HTdR(x10 ³)/ 2x10 ⁵ PBMC	
	RPMI	IL2
1	13,8	2500
2	13,6	1085
3	4,3	2500
4	12,1	488
5	22	1211
6	40,1	1185
7	7,2	1271
8	3,8	58
9	6,8	8
10	4,2	27
11	23,9	0
12	9,5	2
13	9,6	0
14	9,2	19
15	4,2	9

2x10⁵/ml PBMC καλλιεργήθηκαν με παρουσία μόνο εξωγενούς ανασυνδυασμένης IL-2, προκειμένου να μελετηθεί ο πολλαπλασιασμός των περιφερικών λεμφοκυττάρων in vitro σε σύγκριση με εκείνον απουσία αυξητικού παράγοντα ή εξωγενούς μιτογονικού ερεθισμού. Η μέθοδος περιγράφεται στο κεφάλαιο ‘ Υλικό και Μέθοδοι ‘.

Πίνακας13. Μιτογονικός επαγόμενος πολλαπλός in vitro λεμφοκυττάρων περιφερικού αίματος κατά τις διάφορες φάσεις της χημειοθεραπείας (πριν την ΧΜΘ, στην απλασία, στην μυελική αναγέννηση).

	cpm ³ HTdR($\times 10^3$)/ 2×10^5 PBMC		
	RPMI-1640	Anti-CD3	PHA-P
Φυσιολογικοί μάρτυρες (n=10)	10,1 ± 2,3	18,6 ± 4,3	59,5 ± 10,0
Πριν την ΧΜΘ (n=25)	14,1 ± 3,6	14,1 ± 4,2	84,1 ± 21,3
Μυελική απλασία (n=25)	10,9 ± 1,3	25,6 ± 3,3	252,0 ± 62,9
Μυελική αναγέννηση (n=25)	28,3 ± 69,0	82,71 ± 18,0	545,4 ± 173

Ελήφθη ολικό αίμα από 25 τυχαία επιλεγέντες ασθενείς με μοναδικό κριτήριο την επάρκεια των διαθέσιμων κυττάρων. Μελετήθηκε τόσο ο μιτογονικός (με PHA-P και anti-CD3) επαγόμενος κυτταρικός πολλαπλός, όσο και ο αυθόρμητος κυτταρικός πολλαπλός (RPMI-1640) κατά τις φάσεις, πριν την χορήγηση της χημειοθεραπείας, όσο και στις φάσεις μυελικής απλασίας και μυελικής αναγέννησης. Η μέθοδος περιγράφεται στο κεφάλαιο 'Υλικό και Μέθοδοι'.

ΠΙΝΑΚΑΣ 14.Επίπεδα IL-2 στον ορό ασθενών προ ΧΜΘ και κατά την φάση της μυελικής αναγέννησης.

Α/α	IL- 2(pg/ml) ορού	
	Προ-ΧΜΘ	Μυελική αναγέννηση
1	381	3000
2	150	1132
3	1366	1085
4	2000	2000
5	870	482
6	838	1211
7	2000	1185
8	68	183
9	2000	560
10	482	352
11	714	334
12	670	58

Τα επίπεδα IL-2 ανιχνεύθηκαν στον ορό ασθενών προ-χημειοθεραπείας και κατά την φάση της μυελικής αναγέννησης με την μέθοδο ELISA χρησιμοποιώντας το εμπορικά διαθέσιμο Kit προσδιορισμού IL-2 και ακολουθώντας τις οδηγίες του κατασκευαστού όπως περιγράφεται στο κεφάλαιο ‘ Υλικό και Μέθοδοι ‘.

ΠΙΝΑΚΑΣ 15. Επίπεδα IL-5 και IL-6 στον ορό ασθενών προ-ΧΜΘ και κατά την φάση της μυελικής αναγέννησης.

Α/α	IL-5 (pg/ml) ορού		IL-6 (pg/ml) ορού	
	Προ-ΧΜΘ	Μυελική αναγέννηση	Προ-ΧΜΘ	Μυελική αναγέννηση
1	16,3	45,6	18	16
2	61,1	85,1	50	121
3	27,4	51,2	0	0,5
4	39,7	39,2	12,6	58,6
5	2,8	12,6	14	95,2
6	30,6	47,7	130	481
7	60	62,9	56,4	32,9
8	56,7	145,1	36	10
9	26,6	41,3	22,9	54,2
10	40,3	64,7	73,8	91,8
11	54	74,4	298	36
12	28,7	55	0	0
13	42,8	49,3	1,6	0,7
14	22,4	39,2	0,2	1,2
15	34	41,7	1,6	0
16	25,1	62,2	ND	ND
17	89,1	53,8	ND	ND
18	85,3	57	ND	ND
19	54,3	28,7	ND	ND
20	41,7	37,8	ND	ND

Τα επίπεδα IL-5 και IL-6 ανιχνεύθηκαν στον ορό ασθενών προ-χημειοθεραπείας και κατά την φάση της μυελικής αναγέννησης με την μέθοδο ELISA χρησιμοποιώντας το εμπορικά διαθέσιμο Kit προσδιορισμού IL-5 και IL-6 και ακολουθώντας τις οδηγίες του κατασκευαστού όπως περιγράφεται στο κεφάλαιο ‘ Υλικό και Μέθοδοι ‘.

ΠΙΝΑΚΑΣ 16. Επίπεδα TNFα και GM-CSF στον ορό ασθενών προ-ΧΜΘ και κατά την φάση της μυελικής αναγέννησης.

Α/α	TNFα(pg/ml) ορού		GM-CSF(pg/ml) ορού	
	Προ-ΧΜΘ	Μυελική αναγέννηση	Προ-ΧΜΘ	Μυελική αναγέννηση
1	29	494	0	79
2	61,3	69,7	1,8	18
3	251	578	ND	ND
4	317	324,9	128	163
5	165	66	ND	ND
6	125,4	224,7	35	45
7	206	1000	20	17
8	71,3	405	23	191
9	41,8	609	6	42
10	106	123	26	145
11	144	51,2	99	229
12	27,5	0	51	74
13	16	21	19	74
14	39,3	32,4	32	154
15	17,6	27	40	8
16	12,7	23,8	75	109
17	23	25	50	142
18	31,1	34	48	101
19	7,8	21,7	28	50
20	30,3	32	117	157

Τα επίπεδα TNFα και GM-CSF ανιχνεύθηκαν στον ορό ασθενών προ-χημειοθεραπείας και κατά την φάση της μυελικής αναγέννησης με την μέθοδο ELISA χρησιμοποιώντας το εμπορικά διαθέσιμο Kit προσδιορισμού TNFα και GM-CSF και ακολουθώντας τις οδηγίες του κατασκευαστού όπως περιγράφεται στο κεφάλαιο ‘Υλικό και Μέθοδοι’.

Πίνακας 17. Φαινοτυπική ανάλυση ασθενών σε απλασία, πριν και μετά την χορήγηση αυξητικού παράγοντα G-CSF.

	CD3	CD4	CD8	CD20	CD25	CD57	HLA-DR	CD4/CD25	CD8/CD25	CD20/CD25
1		180/422	82/229	8/18	33/165	119/284	12/92	25/25	8/18	0/0
2	838/1197	380/420	230/275	73/81	94/307	220/340	115/340	31/97	11/32	0/16
3	752/714	524/473	169/223	17/27	220/170	85/196	34/27	194/98	17/18	0/0
4	641/1358	234/394	555/1051	37/219	160/263	308/526	210/1621	62/88	37/44	0/0
5	289/262	136/81	136/30	32/50	72/96	27/40	81/126	32/30	9/0	5/5
6	272/998	164/450	64/98	12/56	48/295	132/323	24/ND	12/28	4/14	0/0
7	303/926	165/543	122/296	35/86	39/259	75/222	31/185	24/37	4/25	4/0
8	624/1052	508/820	187/248	45/108	143/263	53/108	80/ND	53/124	9/15	0/0
9	1373/2138	738/798	574/371	25/57	175/171	399/456	150/257	25/86	0/29	0/29
10	265/495	192/255	54/232	31/70	77/93	54/93	31/54	38/46	12/23	8/15
11	264/3540	148/2124	164/1746	8/94	24/519	140/1699	4/189	12/283	4/0	0/0
12	1063/1866	323/591	458/638	40/472	10/591	498/1016	81/47	40/118	0/94	0/0
13	458/606	344/470	151/163	30/54	96/271	84/54	84/199	48/90	0/18	0/9
4	907/946	518/534	311/243	52/24	259/170	311/303	194/61	143/109	39/0	13/0
15	134/622	48/370	72/275	14/107	76/143	74/239	32/299	6/84	32/12	10/0
16	245/668	141/461	37/127	12/46	87/300	33/138	21/127	25/104	4/0	0/0
17	373/635	246/257	106/166	141/242	148/272	148/212	211/438	77/60	7/15	21/39
18	469/991	244/641	231/336	92/229	86/168	172/259	119/442	59/137	7/31	7/31
19	1300/1782	488/878	759/852	90/103	108/181	560/310	144/336	72/103	36/52	0/0

Σε 19 ασθενείς ελήφθη αίμα σε EDTA κατά την φάση της απλασίας τόσο πριν όσο και μετά την χορήγηση αυξητικού παράγοντα rhG-CSF. Πραγματοποιήθηκε φαινοτυπική ανάλυση των λεμφοκυττάρων του αίματος με την βοήθεια μονοκλωνικών αντισωμάτων και ανάλυση σε κυτταρομετρητή ροής όπως περιγράφεται στο κεφάλαιο ‘Υλικό και Μέθοδοι’. (τα νούμερα αναφέρονται σε απόλυτο αριθμό θετικών κυττάρων /dl)..

ΠΙΝΑΚΑΣ 18.Φαινοτυπική ανάλυση ασθενών σε απλασία, πριν και μετά την χορήγηση αυξητικού παράγοντα GM-CSF.

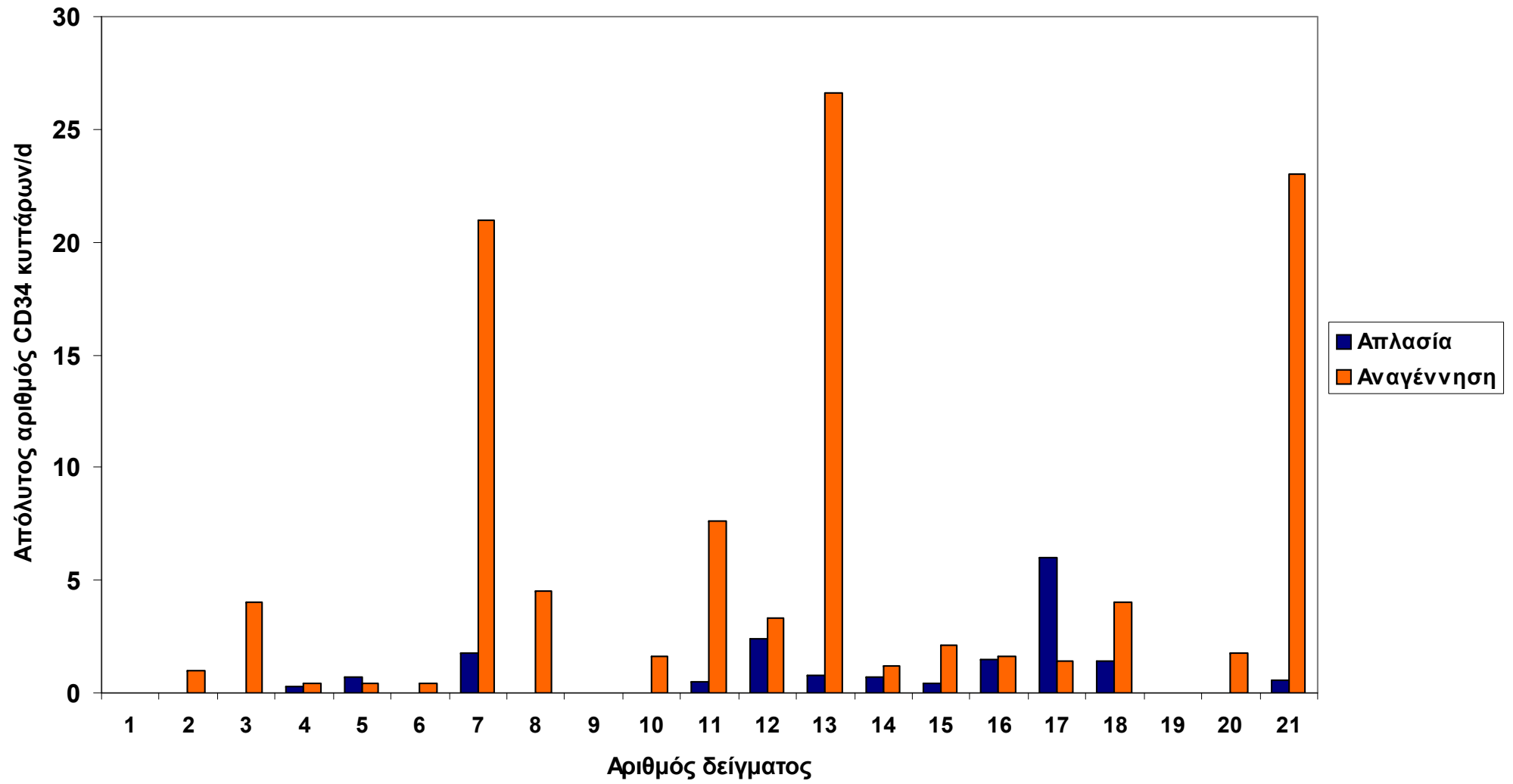
	CD3	CD4	CD8	CD20	CD25	CD57	HLA-DR
1	399/1701	249/1110	116/567	120/236	11/189	61/236	ND/213
2	435/1085	301/697	128/308	38/130	26/81	102/356	32/ND
3	485/490	ND/ND	228/280	23/42	91/19	143/87	34/ND
4	320/325	184/158	72/74	8/14	88/227	28/79	20/46
5	350/622	150/225	300/365	50/75	70/96	ND/268	ND/129
6	400/608	180/253	180/218	100/207	68/92	140/275	ND/126
7	1382/3536	768/1099	403/525	269/669	384/573	384/1147	1210/1099
8	536/233	225/102	285/88	207/135	69/93	104/42	199/214
9	500/1030	195/284	246/664	17/27	153/149	161/352	136/257
10	310/704	191/361	54/285	7/124	14/399	7/67	11/228
11	165/237	156/75	74/127	27/325	52/75	70/94	5/ND
12	291/447	149/223	77/161	6/197	214/188	ND/152	ND/492
13	474/1005	412/897	75/238	31/132	125/1164	62/212	94/794
14	280/321	141/49	ND/160	ND/0	ND/97	120/146	88/292
15	9/761	5/634	ND/140	5/279	10/330	1/89	3/394
16	312/987	132/296	104/522	0/0	118/226	69/268	42/437
17	496/226	360/81	95/39	20/23	122/42	ND/13	231/68
18	465/1759	317/1218	264/352	53/189	63/1624	264/758	74/487
19	222/149	61/68	161/107	118/128	17/34	153/81	92/55

Σε 19 ασθενείς ελήφθη αίμα σε EDTA κατά την φάση της απλασίας , πριν και μετά την χορήγηση αυξητικού παράγοντα rhGM-CSF.Πραγματοποιήθηκε φαινοτυπική ανάλυση των λεμφοκυττάρων του αίματος με την βοήθεια μονοκλωνικών αντισωμάτων και ανάλυση σε κυτταρομετρητή ροής όπως περιγράφεται στο κεφάλαιο ‘Υλικό και Μέθοδοι ‘ .
(τα νούμερα αναφέρονται σε απόλυτο αριθμό θετικών κυττάρων /dl).

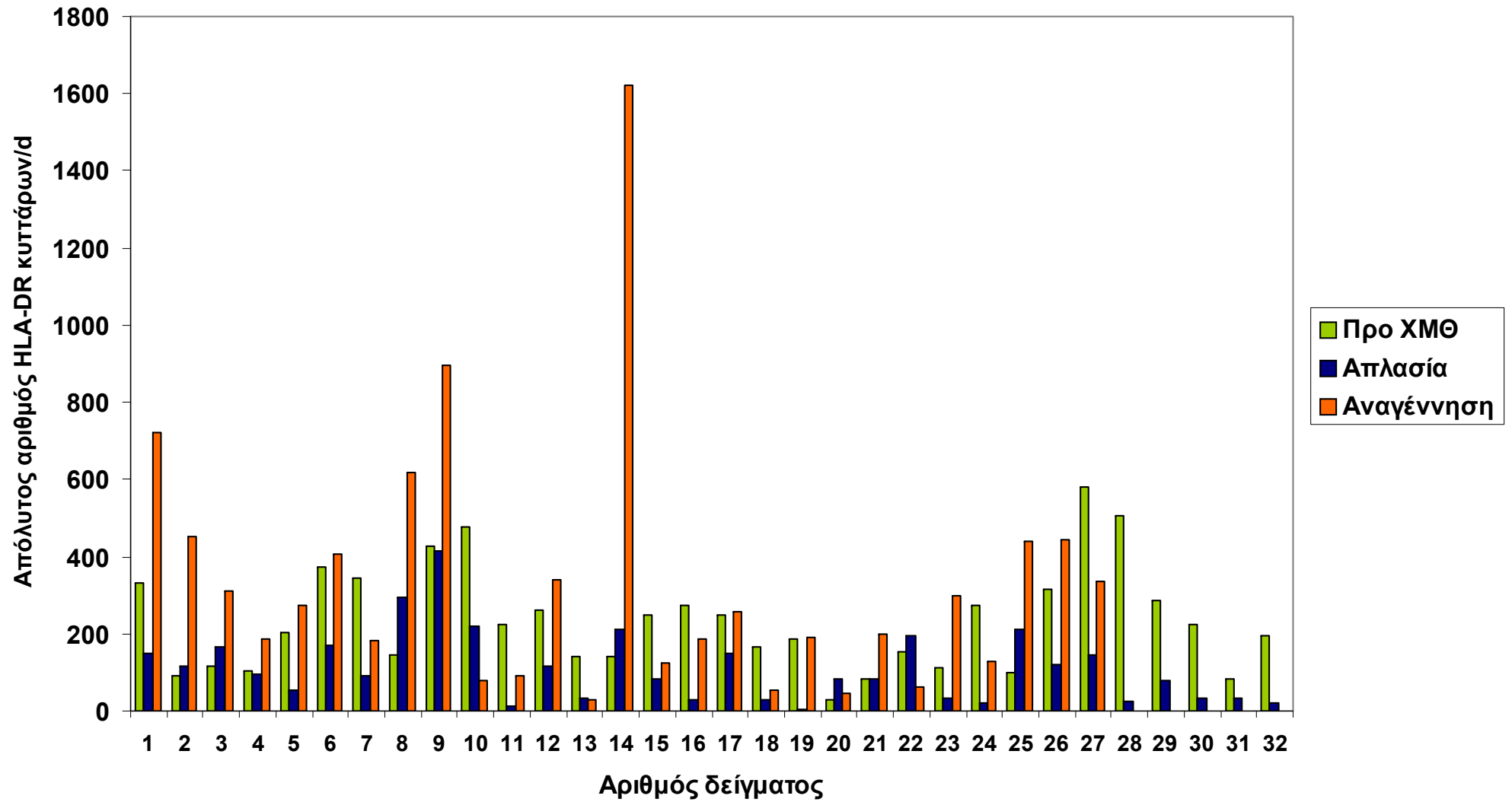
ΠΙΝΑΚΑΣ 19. Σύγκριση των μέσων τιμών \pm SD του απόλυτου αριθμού των λεμφοκυτταρικών υποπληθυσμών σε ασθενείς που έλαβαν rhG-CSF ή rhGM-CSF.

Λεμφοκυτταρικοί Υποπληθυσμοί	ΜΥΕΛΙΚΗ	ΑΝΑΓΕΝΝΗΣΗ
	rhG-CSF	rhGM-CSF
CD3	1128 \pm 765	854 \pm 779
CD4	578 \pm 423	376 \pm 400
CD8	400 \pm 418	275 \pm 178
CD20	113 \pm 110	154 \pm 157
CD57	359 \pm 390	248 \pm 276
CD25	247 \pm 128	300 \pm 417
HLA-DR	223 \pm 369	377 \pm 286

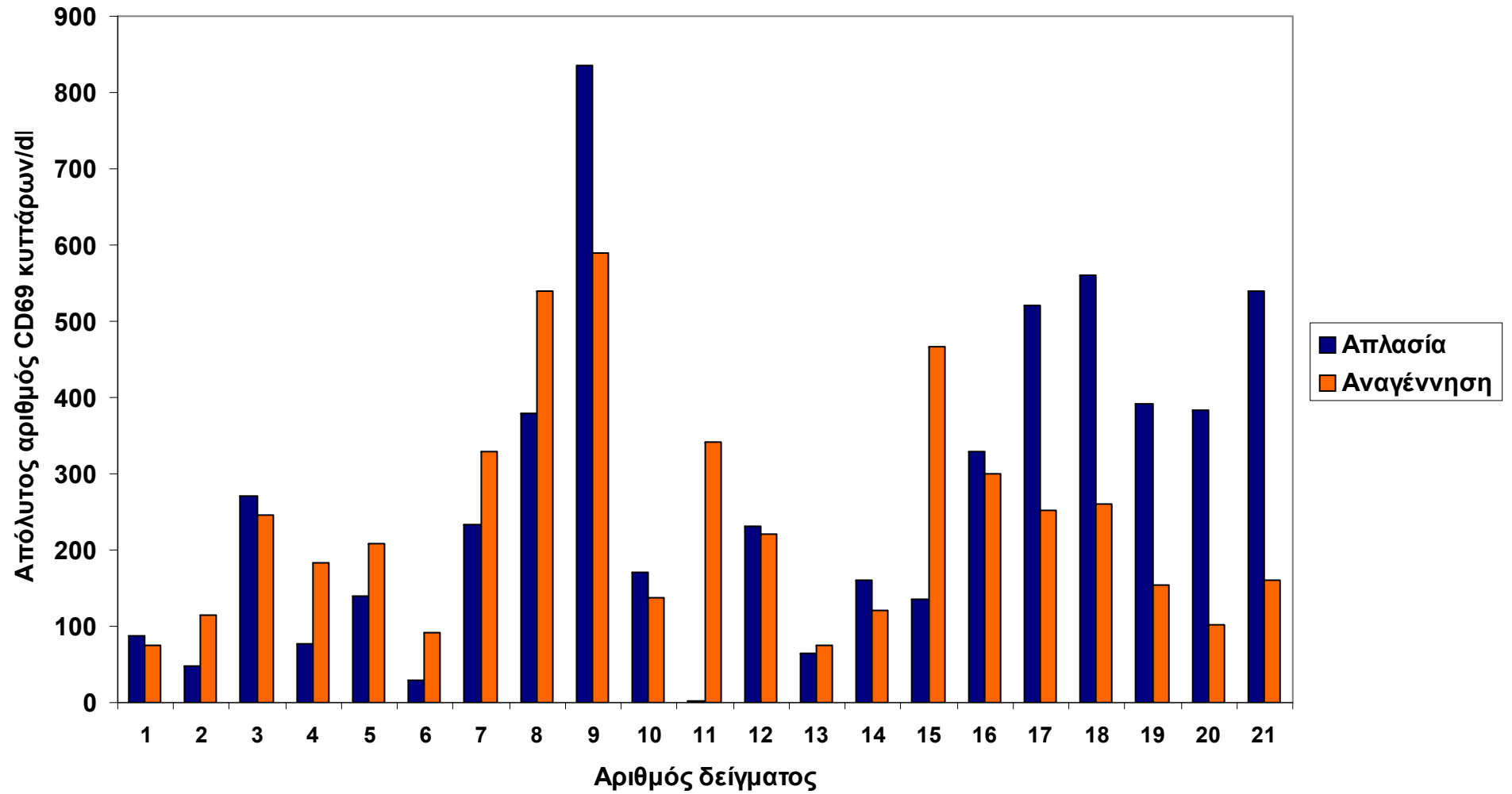
Σχήμα 1



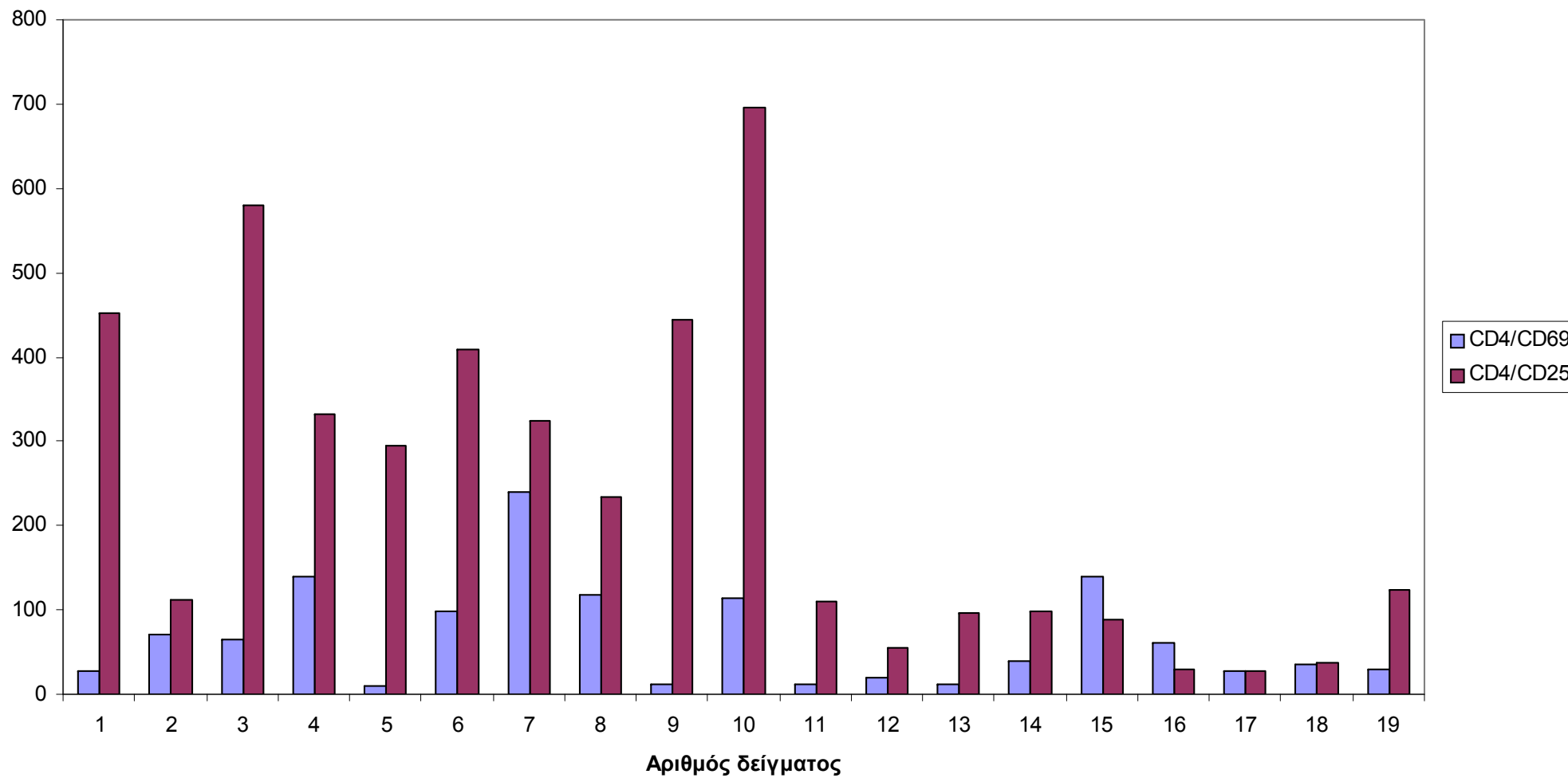
Σχήμα 2



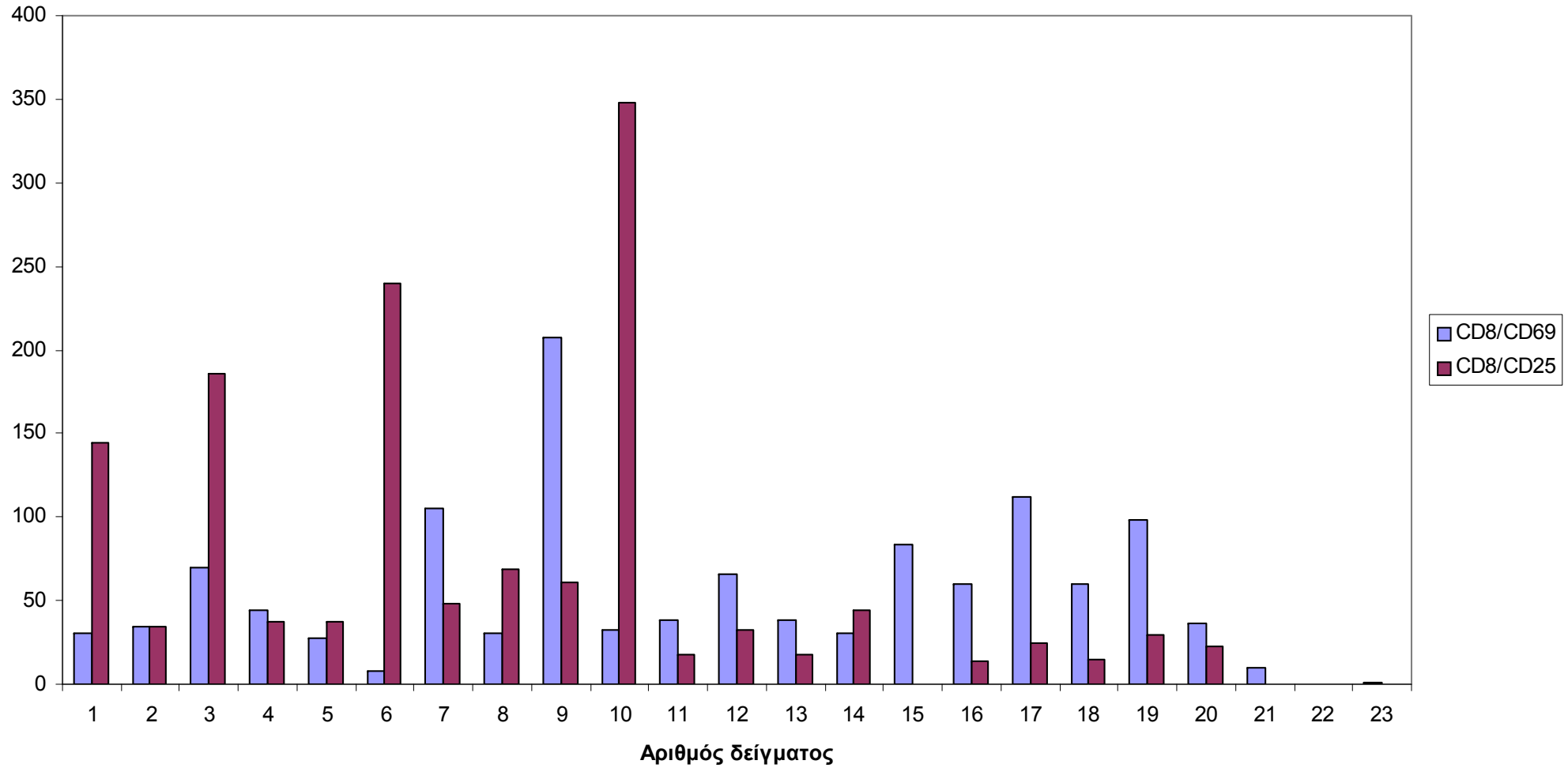
Σχήμα 3



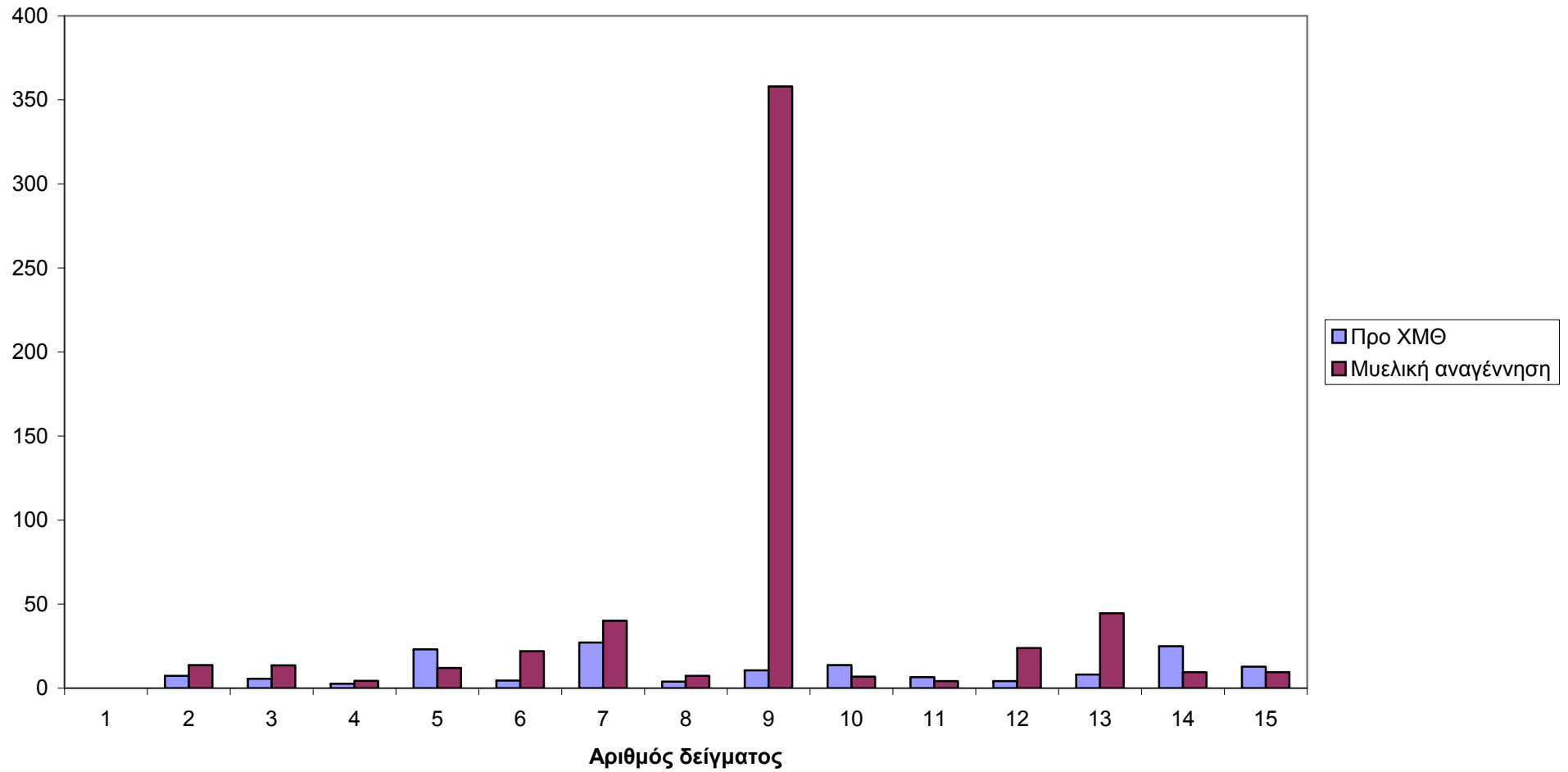
Σχήμα 4.
Έκφραση του CD69 και CD25 σε διάφορους λεμφοκυτταρικούς υποπληθυσμούς στην φάση της
μυελικής αναγέννησης



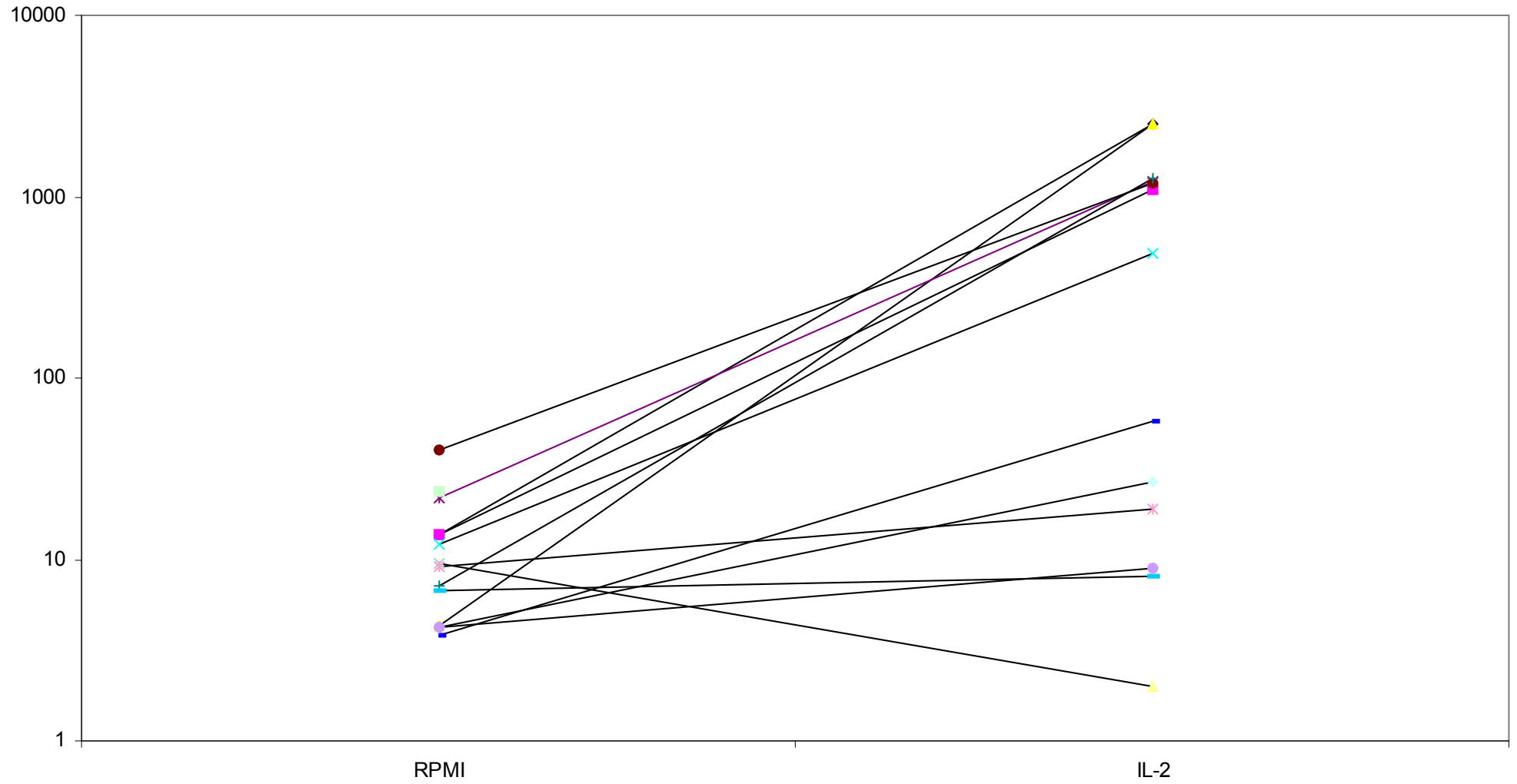
Σχήμα 5.
Έκφραση του CD25 και CD69 σε διάφορους λεμφοκυτταρικούς υποπληθυσμούς στην φάση της
μυελικής αναγέννησης



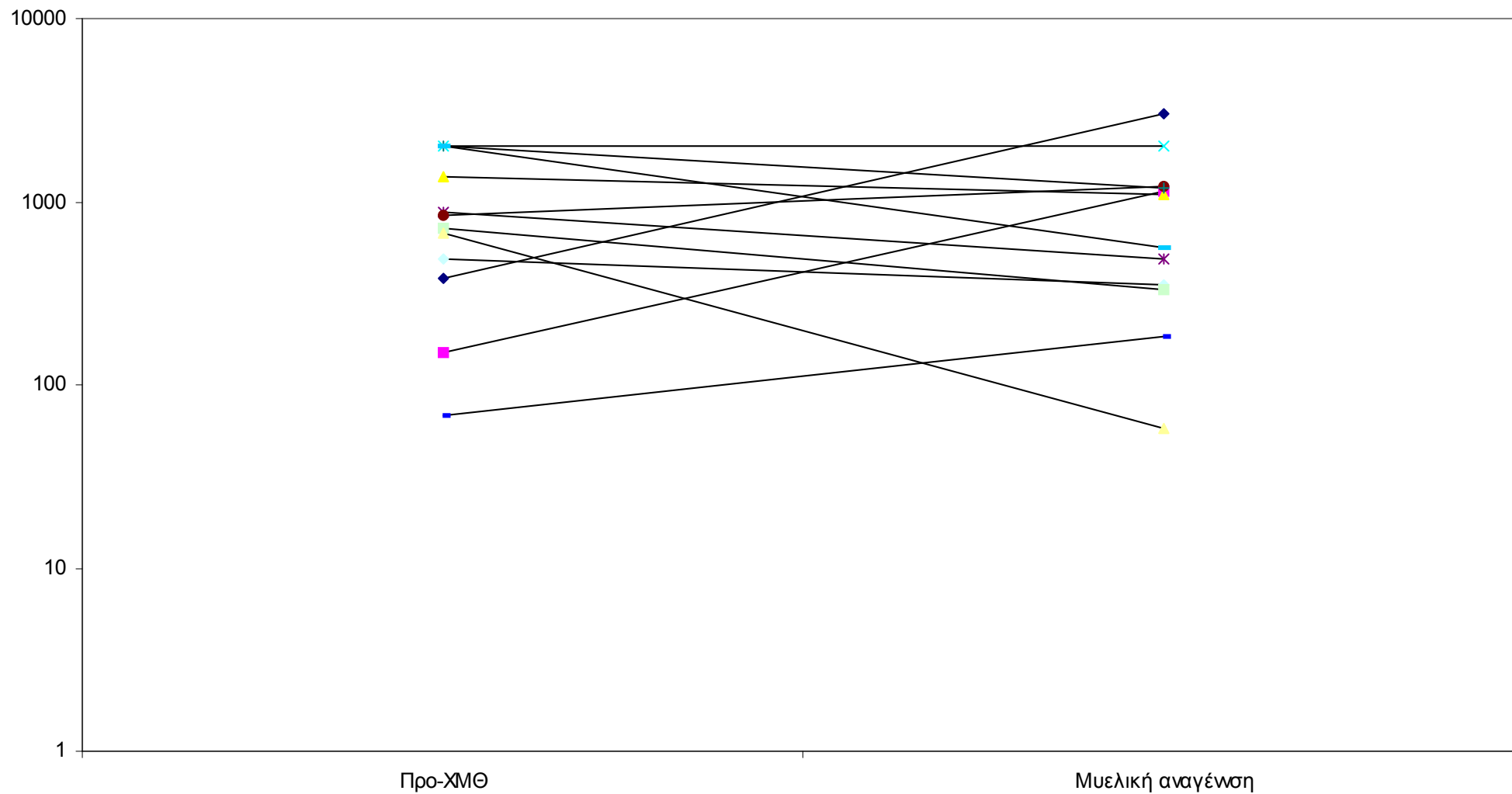
Σχήμα 6.
In vitro πολλαμός των PBMC προ ΧΜΘ και κατά την φάση της μυελικής αναγέννησης απουσία εξωγενούς IL-2



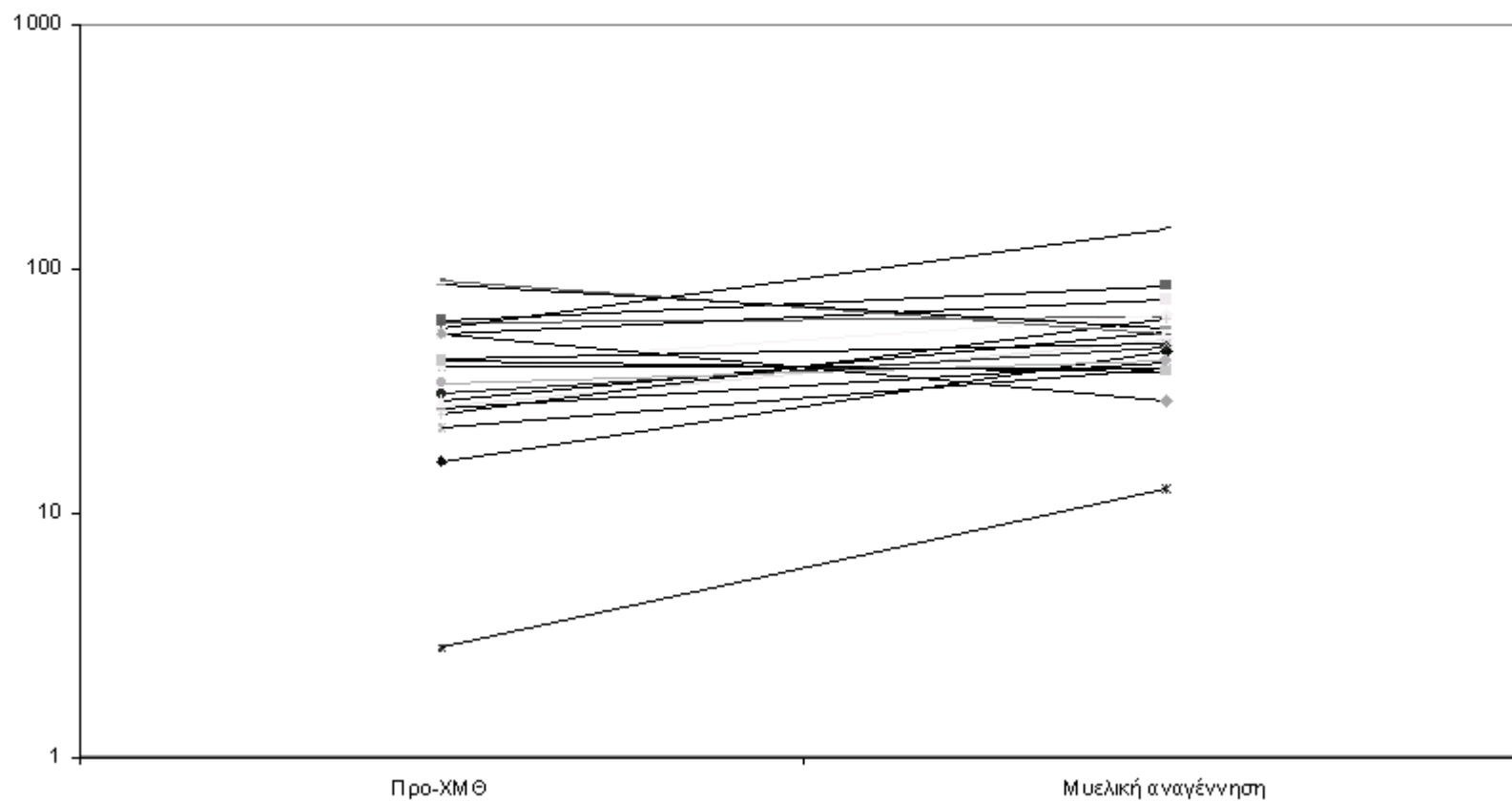
Σχήμα 7.
In vitro πολλαπλασιασμός PBMC κατά την φάση της μυελικής αναγέννησης παρουσία IL-2



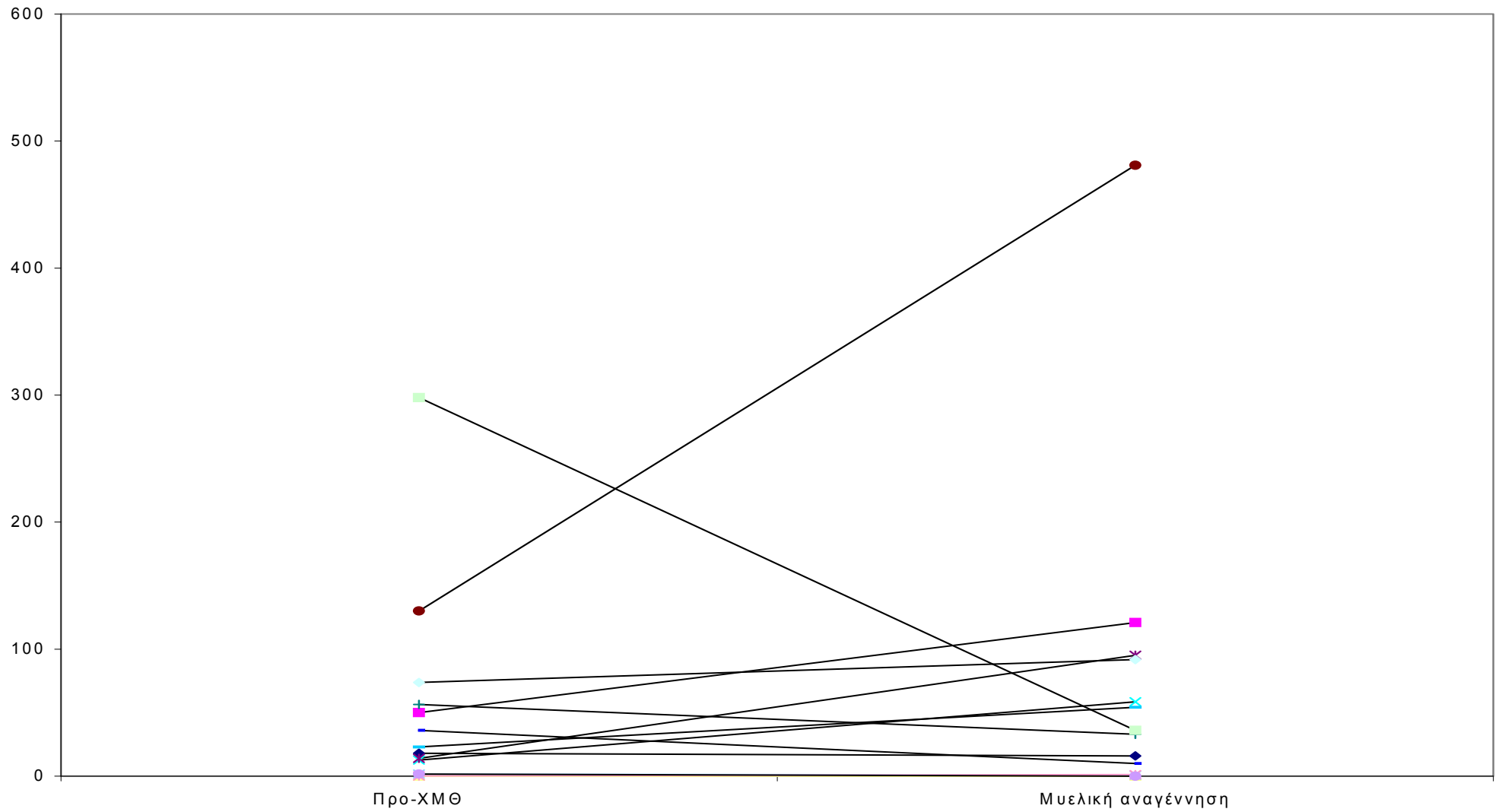
Σχήμα 8.
Επίπεδα IL-2 στον ορό ασθενών προ ΧΜΘ και κατά την φάση της μυελικής αναγέννησης



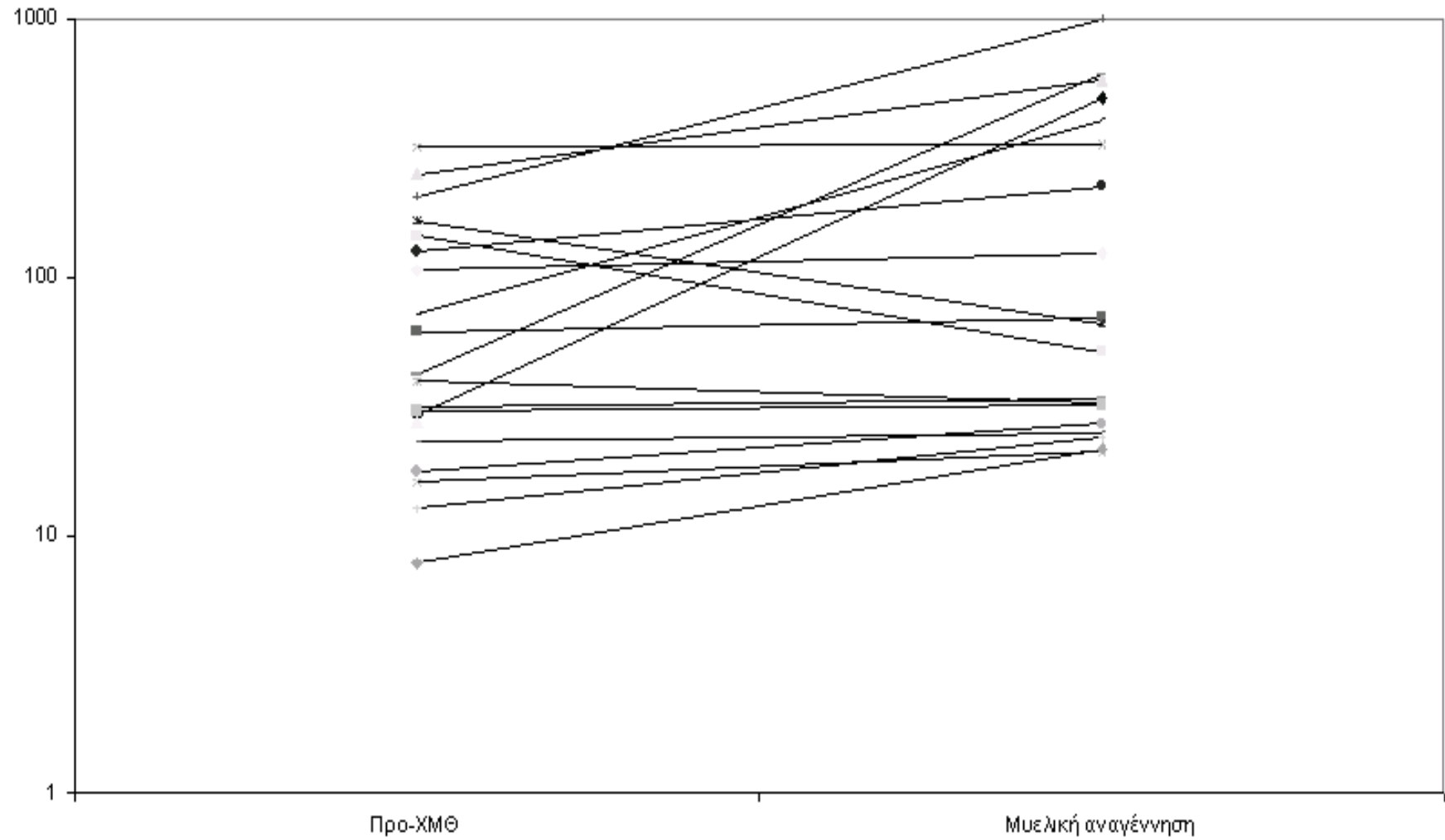
Σχήμα 9.
Επίπεδα IL-5 στον ορό ασθενών προ-ΧΜΘ και κατά την μυελική αναγέννηση



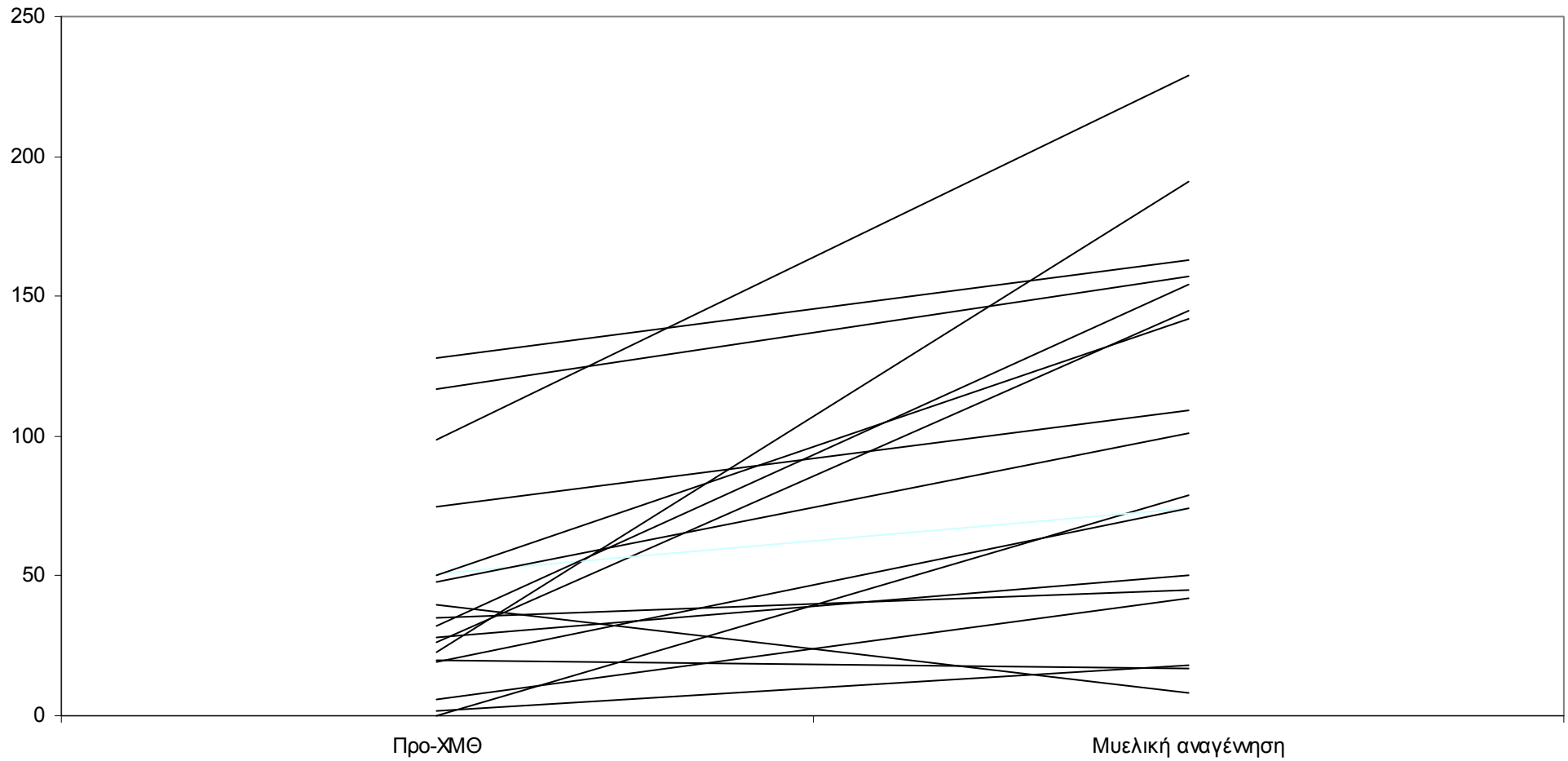
Σχήμα 10.
Επίπεδα IL-6 στον ορό ασθενών προ-ΧΜΘ και κατά την φάση της μυελικής αναγέννησης



Σχήμα 11.
Επίπεδα TNF α στον ορό ασθενών προ-ΧΜΘ και κατά την φάση της μυελικής αναγέννησης



Σχήμα 12.
Επίπεδα GM-CSF στον ορό ασθενών προ-ΧΜΘ και κατά την φάση της μυελικής αναγέννησης



ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- 1.:Dessypris M. Emmanuel: Erythropoiesis;
Wintrobe's Clinical Hematology Chapter 9, p 169; 1998.
- 2.:Ernest Beutler: Production and destruction of erythrocytes.
Williams Clinical Hematology Chapter 29, p 355; 2001
- 3.:Camille N. Abboud, Marshall A. Lichtman: Structure of the marrow and the hematopoietic microenvironment.
Williams Clinical Hematology Chapter 4, p 29; 2001
- 4.:Maurice C. Bondurant, Mark J. Koury: Origin and Development of Blood cells;
Wintrobe's Clinical Hematology Chapter 8, p 145 ;1998.
- 5.Till SE, Mc Culloch EA, Siminovitch L.: A stochastic model of stem cell proliferation based on the growth of spleen colony – forming cells.
Proc. Natl. Acad. Sci U.S.A. 1964; 51:29.
- 6: Dorothy Ford Bainton :Morphology of neutrophils, eosinophils and basophils.
.Williams Clinical Hematology Chapter 63, p 729;2001
- 7.:Peter J. Quesenberry: Hematopoietic stem cells, progenitor cells, and cytokines.
Williams Clinical Hematology Chapter 14, p 153;2001
- 8.: Charles A.Janeway ,Paul Travers:Τα στοιχεία του ανοσολογικού συστήματος *Κλινική Ανοσοβιολογία Janeway – Travers. 1:5 ;1999*
- 9,: Frixos Paraskevas:The Lymphatic system.
Wintrobe's Clinical Hematology Chapter 18, p 430;1998
- 10: Thomas J. Kipps:The lymphoid tissues.
.William's Clinical Hematology, Chapter 5, p 59 ;2001.

- 11.,:Lebien T. W, Bertrand F. E: Lymphocyte ontogeny.
William's Clinical Hematology Chapter 82, p 927;2001.
- 12: Charles A. Janeway, Paul Travers:Αρχές της φυσικής και της ειδικής ανοσίας. *.Κλινική Ανοσοβιολογία Janeway – Travers 1:18 ;1999*
- 13.Roitt I, Brostoff J, Male D :, Cells of the adaptive immune system. *Immunology, 2:22; 2001*
- 14: Charles A. Janeway, Paul Travers:Ανάπτυξη των B – λεμφοκυττάρων. *Κλινική Ανοσοβιολογία, Janeway – Travers 5:1 ;1999*
- 15.Roitt I, Brostoff J, Male D: Development of B. Cells. – *Immunology 8:131;2001*
- 16:Charles A. Janeway, Paul Travers: Παραγωγή B - κυττάρων. *Κλινική Ανοσοβιολογία Janeway – Travers 5:3 ;1999*
- 17.: Charles A. Janeway, Paul Travers:Παραγωγή αντισωμάτων από τα B – λεμφοκύτταρα . *Κλινική Ανοσοβιολογία Janeway – Travers. 8:9; 1998*
- 18: Charles A. Janeway, Paul Travers:Παραγωγή αντισωμάτων από τα B – λεμφοκύτταρα. *.Κλινική Ανοσοβιολογία Janeway – Travers 8 : 5;1998*
- 19.Charles A. Janeway, Paul Travers: Η δομή του μορίου του αντισώματος και των γονιδίων Ανοσοσφαιρίνης. *Κλινική Ανοσοβιολογία Janeway – Travers: 3 : 2;1998*
20. Roitt I., Brostoff J.,Male D.: Antibodies.- *Immunology. 4 : 65;2001*
- 21.Frixos Paraskevas: B – lymphocytes. *Wintrobe's Clinical Hematology 19 : 464;1998:.*
- 22.Frixos Paraskevas: B. cell differentiation .*Wintrobe's Clinical Hematology, Figure 19.1, 19 : 470;1998*
- 23.:Charles A. Janeway, Paul Travers: Ο θύμος αδένας και η ανάπτυξη λεμφοκυττάρων. *Κλινική Ανοσοβιολογία Janeway – Travers 6 : 1;1998.*

24.:Charles A. Janeway, Paul Travers: Οι δρόμοι ανάπτυξης του T – κυττάρου. *Κλινική Ανοσοβιολογία Janeway – Travers 6 : 7;1998.*

25.Charles A. Janeway, Paul Travers: Αλλαγές στα μόρια κυτταρικής επιφανείας επιτρέπουν την διάκριση των θυμοκυτταρικών πληθυσμών. *Κλινική Ανοσοβιολογία Janeway – Travers 6 : 6.;1998.*

26. Roitt I., Brostoff J., Male D: Interactions of MHC molecules with antigenic peptides *.Immunology 5 : 93;2001.*

27: Charles A. Janeway, Paul Travers:Ενεργοποίηση των αθών T-κυττάρων .*Κλινική Ανοσοβιολογία Janeway – Travers . 7: 8;1998*

28: Charles A. Janeway, Paul Travers:Ενεργοποίηση των αθών T-κυττάρων . *Κλινική Ανοσοβιολογία Janeway – Travers 7:10, 7:12, 7:13;1998*

29. Charles A. Janeway, Paul Travers:τα ενεργοποιημένα T-κύτταρα συνθέτουν τον παράγοντα αναπτύξεως των T-κυττάρων, ιντερλευκινών-2 και τον υποδοχέα της. *Κλινική Ανοσοβιολογία Janeway – Travers:. 7 : 15;1998*

30. Charles A. Janeway, Paul Travers:Οι εκτελεστικές λειτουργίες των T-κυττάρων επιτυγχάνονται με την έκφραση μορίων, δεσμευμένων στην κυτταρική μεμβράνη, αλλά και εκκρινόμενων μορίων. *Κλινική Ανοσοβιολογία Janeway – Travers 7 : 25;1998*

31. Roitt I, Brostoff J. Male D : T-cells change their phenotype during maturation. *Immunology ,2 : 32; 2001*

32: Frixos Paraskevas:T-lymphocytes – identification. *Wintrobe's Clinical Hematology 20 : 497;1998*

33 Roitt I, Brostoff J., Male D.,:T-cell activation – 1L – 2 is central to T-cell activation. *.Immunology 6 : 117;2001*

- 34: Charles A. Janeway, Paul Travers: Τα συν-διεγερτικά σήματα είναι απαραίτητα για την σύνθεση και έκκριση της IL-2 . *Κλινική Ανοσοβιολογία Janeway – Travers* 7 : 16;1998
- 35.: Charles A. Janeway, Paul Travers: Ανοσολογική μνήμη. *Κλινική Ανοσοβιολογία Janeway – Travers* 9 : 41;1998
- 36.: Charles A. Janeway, Paul Travers: η αναγνώριση αντιγόνου ενεργοποιεί τις πρωτεϊνικές κινάσες τυροσίνης στο T-κύτταρο. *Κλινική Ανοσοβιολογία Janeway – Travers.* 4 : 41;1998
- 37.: Charles A. Janeway, Paul Travers: η ενεργοποίηση των T-κυττάρων αλλάζει την έκφραση πολλών μορίων επιφανείας *Κλινική Ανοσοβιολογία Janeway – Travers.* 7 : 19; 1998
38. Roitt I, Brostoff J., Male D.: Expression of human T-cell markers during development *.Immunology. Fig 2.39, 2 : 33;2001*
39. Charles A. Janeway, Paul Travers: Οι Fc υποδοχείς ενεργοποιούν τα NK κύτταρα για να καταστρέψουν στόχους επικαλυπτόμενους από αντίσωμα. *Κλινική Ανοσοβιολογία Janeway – Travers* 8 : 27;1998.
- 40.: Giorgio Trinchieri, Lewi L. Lanier: Functions of natural killer cells. *Williams Clinical Hematology. 85 : 959;2001*
41. Charles A. Janeway, Paul Travers: Τα B κύτταρα που αφήνουν το βλαστικό κέντρο διαφοροποιούνται σε πλασματοκύτταρα που εκκρίνουν αντισώματα ή σε B-κύτταρα μνήμης. *Κλινική Ανοσοβιολογία Janeway – Travers* 8 : 13;1998
- 42.: Charles A. Janeway. Paul Travers: Η έκπτυξη κλώνων και η διαφοροποίησή τους, συντελούν και οι δύο στην ανοσολογική μνήμη των B-κυττάρων *Κλινική Ανοσοβιολογία Janeway – Travers.* 9 : 37;1998
43. Charles A. Janeway, Paul Travers.: Τα T-κύτταρα μνήμης είναι αυξημένα σε συχνότητα με διαφορετικές πρωτεΐνες κυτταρικής επιφανείας που τα διακρίνει από τα άμεσα δραστικά κύτταρα. *Κλινική Ανοσοβιολογία Janeway – Travers.* 9 : 40;1998

44.Pizzo PA, Rubin M, Freifeld A, Walsh TJ : The child with cancer and infection, II, Non - bacterial infections. *J. Ped.*, 119 : 845 - 859; 1991

45.Evans DL, Ten Have TR, Douglas SD. et al: Association of depression with viral load,CD8 T lymphocytes and natural killer cells in women with HIV infection. *Am.J.Psychiatry* 2002 Oct;159(10):1752-9

46.Mackall CL, Fleisher TA, Brown MR et al :Lymphocyte depletion during treatment with intensive chemotherapy for cancer. *Blood* 84 : 2221 – 2228, ;1984.

47.Brunvald MW, Collins C. Livingston RB, et al: Pneumonocystis Carinii pneumonia associated with prolonged lymphopenia and abnormal T-lymphocyte subset ratios during treatment for early – stage breast carcinoma.. *Cancer*,: 67 : 2407 – 2413.; 1991

48.Παπαδάκης Σ., Καλμπάκης Κ., Σάρρα Ε.,et al. : Μεταβολές των λεμφοκυτταρικών υποπληθυσμών κατά την φάση της απλασίας και της μυελικής αναγέννησης σε ασθενείς με συμπαγή νεοπλάσματα.

Βήμα κλινικής Ογκολογίας 1 (1) : 19 – 25; 1997

49.Robustelli Della Cuna S., Zibera C., Pedrazolli P. et al : Somatic mutations at the T-cell antigen receptor in antineoplastic drug - exposed populations : Comparison with sister chromatid exchange frequency. *International Archives of Occupational and Environmental Health*,; 72 (5) = 315 – 322. ;1999

50.Ringel I, Horwitz SB. Effect of alkaline pH on taxol – microtubule interactions. *J. Pharmacol Exp. Ther.* ; 259 : 855 – 60; 1991

51.Rao S., Horwitz SB, Ringle I. :Direct photoaffinity labeling of tubulin with taxol. *J. Natl. Cancer Inst.* 84 : 785 – 8 ;1992

52.Reckzeh B., Metre H, Luger KH, :Severe lymphocytopenia and interstitial Pneumonia in patients treated with paclitaxel and simultaneous radiotherapy for NSCLC. *J. Clin. Oncol.* ; 14 : 1071 – 6; 1996

53.Kotsakis A., Sarra E., Peraki M, et al :Docetaxel – Induced Lymphopenia in patients with solid Tumors. *Cancer*; 89 : 1380– 6;2000

54.Kouroussis C, Androulakis N, Kakolyris S. et al : Dose escalation study of docetaxel in combination with mitoxantrone as first –line treatment in patients with metastatic breast cancer. *J.Clin.Oncol.* 1999 Mar ;17(30):862-9

55.Roitt I., Brostoff J., Male D.:Cyclophosphamide acts by covalent alkylation. *Immunology*; 20 : 314 ; 2001

56.Ginopoulos PV, Gogos CA, Thanopoulou E. et al.
Influence of paclitaxel and carboplatin on the immune system of cancer patients during chemotherapy. *Medical Science Research*,; 27 (4) : 227 – 229; 1999

57.Melichar B, Touskova M., Drovak J.,et al:. The peripheral blood leukocyte phenotype in patients with breast cancer: effect of doxorubicin / paclitaxel combination chemotherapy. *Immunopharmacology and Immunotoxicology*, ; 23 (2) : 163 – 73; 2001

58.Katsura K., Nomura S., Ohtani T. et al.Changes of immunological markers after autologous peripheral blood stem cell transplantation. *J. Cancer Res Clin Oncol*; 124 : 633 – 40; 1998

59.Mackall CL, Fry TS, Bare C et al:IL – 7 increases both thymic – dependent and thymic independent T-cell regeneration after bone marrow transplantation. *Blood* 1; 97 (5) : 1491 –7; 2001

60.Bolotin. E. Smogorzewska. M., Smith S et al: Enhancement of Thymopoiesis after Bone Marrow Transplant by in vivo Interleukin – 7. *Blood*, 88 (5) : 1887 – 94; 1996

61.Mackall CL., Gress RE.Pathways of T-cell regeneration in mice and humans: implications for bone marrow transplantation and immunotherapy. *Immunol. Rev.* ; 157 : 61 – 72; 1997

62.H. ViR.T-cell repertoire reconstitution after allogenic bone marrow transplantation: diversity and origin. *Hematology and Cell therapy*, 39 (5): 257 – 260; 1997

63. Douek DC, Vescio RA, Betts MR et al: Assessment of thymic output in adults after haematopoietic stem – cell transplantation and prediction of T-cell reconstitution.

Lancet, 27; 355 (9218): 1875 – 81; 2000

64. Min D, Taylor P.A, Panoskaltsis-Mortari A. et al: Protection from thymic epithelial cell injury by keratinocyte growth factor: a new approach to improve thymic and peripheral T-cell reconstitution after bone marrow transplantation. *Blood* 2002 Jun 15; 99(12): 4592-600

65. Patel DD, Gooding ME, Parrott RE et al: Thymic Function after hematopoietic stem-cell transplantation for the treatment of severe combined immunodeficiency.

N. Eng. J. Med 4; 342 (18): 1325 – 32; 2000

66. Lamb LS Jr, Gee AP, Henslee-Downey PJ et al.: Phenotypic and functional reconstitution of peripheral blood lymphocytes following T- cell depleted bone marrow transplantation from partially mismatched related donors. *Bone Marrow Transplantation*, 21: 461 – 71; 1998

67. Bengtsson M., Toterman TH, Smedmyr B et al.: Regeneration of functional and activated NK and T – Sub sets cells in the marrow and blood after autologous bone marrow transplantation: A prospective phenotypic study with 2/3 – color FACS Analysis.

Leukemia, 3, p 68 – 75; 1998

68. Talmadge JE, Reed E, Ino K, et al.: Rapid immunologic reconstitution following transplantation with mobilized peripheral blood stem cells as compared to bone marrow.

Bone Marrow Transplantation. 19: 161 – 72; 1997

69. Porrata LF, Ingle JN, Lintzow MR et al.: Prolonged survival associated with early lymphocyte recovery after autologous hematopoietic stem cell transplantation for patients with metastatic breast cancer. *Bone Marrow Transplantation*. 28: 865 – 71; 2001

70. Leintenberg D., Rappeport, S, Smith B. R et al. B-cell precursors bone marrow transplantation. *Amer. Journal. of clinical pathology*, 102: 231; 1994

71. Storek S, Hultin L.E., Ferrara S. et al: B-cell dysfunction after bone marrow transplantation is associated with decreased Ca^{++2} flux upon membrane Ig cross-linking. *Clinical Immunology*, 72: 210 – 16; 1994
72. J. H. Antin, K. Ault, J, Rapoport et al: B – Lymphocyte Reconstitution after bone marrow transplantation. *J. Clin. Investig.* 80; 325 – 332; 1987
73. Storek J., Ferrara S, Saxon A. et al: B – cell reconstitution after human bone marrow transplantation: Recapitulation of ontogeny? . *Bone Marrow Transplantation*, 12 (4): 387 – 398; 1993
74. Mackall Cl.: T – cell immunodeficiency following cytotoxic antineoplastic therapy: A review. *Oncologist*; 4 (5): 370 – 8; 1999
75. Douek DC, Koup RA. Evidence for thymic Function in the elderly. *Vaccine Feb 25; 18 (16); 1638 – 41; 2000*
76. Mackall CL, Hakim FT, Gress RE. Restoration of T – cell homeostasis after T-cell depletion. *Semin. Immunol. Dec; 9 (6) : 339 – 46; 1997*
77. Franco SM, Rubio A. Martinez – Moga M., et al: T-cell repopulation and thymic volume in HW-1 infected adult patients after highly active antiretroviral therapy. *Blood May 15; 99 (10): 3702 – 6; 2002*
78. Mackall CL, Punt SA, Morgan P, et al: Thymic Function in young / old chimeras: substantial thymic T-cell regenerative capacity despite irreversible age – associated thymic involution. *Eur. H. Immunolog. Jun; 28 (6): 1886 – 93; 1998*
79. Mackall CL, Fleisher TA, Brown MR, et al.: Age, thymopoiesis and $CD4^+$ T. lymphocyte regeneration after intensive chemotherapy. *N. Eng. J. Med. Jan. 19; 332 (3): 143 – 9; 1995*
80. Hakim FT, Cepeda R., MacKall Clet al.: Constraints on $CD4$ recovery post chemotherapy in adults: thymic insufficiency and apoptotic decline of expanded peripheral $CD4^+$ cells.

Blood Nov. 1; 90 (9): 3789 – 98; 1997

81.Mackall CL. Stein D, Fleisher TA, et al: Prolonged CD4 depletion after sequential autologous peripheral blood progenitor cell infusions in children and young adults.

Blood Jul. 15; 96 (2): 754 – 62.;2000

82.Mackall Cl., Fleisher TA, Brown MR, et al: Distinctions between CD8⁺ and CD4⁺ T-cell regenerative pathways result in prolonged T-cell subset imbalance after intensive chemotherapy.

Blood May 15; 89 (10): 3700 – 7; 1997

83.Ohniski, Yamanishi H, Naito K., et al: Reconstitution of peripheral blood lymphocyte subsets in the long-term disease – free survivors of patients with acute myeloblastic leukemia.

Leukemia Jan; 12 (1): 52 – 8; 1998

84.Mackall CL, Grange L., Sheard MA et al.: T-cell Regeneration after bone marrow transplantation: Differential CD45 isoform expression on thymic – derived versus thymic – independent progeny. *Blood 82: 2585 – 2594, ;1993*

85.Bolwell BS, The use of G-CSF and GM-CSF in bone marrow transplantation.

Cleveland Clinic Journal of Medicine, 60 (4): 291 – 302; 1993

86.Tjounfiord GE, Steen R., Evense AS et al: Characterization of CE34⁺ peripheral blood cells from healthy adults mobilized by recombinant human granulocyte colony – stimulating factor. *Blood 84: 2795 – 2801;1994.*

87.de Gast GC. Verdonk LF., Middeldorp H et all: Recovery of T-cell subsets after autologous bone marrow transplantation is mainly due to proliferation of mature T-cells in the graft. *Blood 66: 428 – 431; 1985.*

88.Varas F., Bernad A., Bueren S.A.: Granulocyte colony – stimulating factor mobilizes into peripheral blood the complete clonal repertoire of hematopoietic precursors residing in the bone marrow of mice. *Blood 88: 2495 – 2501; 1996*

89. Clark S.C: Biological activities of human granulocyte – macrophage colony stimulating Factor. *Int. J. Cell Cloning*. 6 : 365 – 377; 1988.
90. Cannistra S., Vellegna A.: Human granulocyte – monocyte colony stimulating factor and interleukin-3 stimulate monocyte cytotoxicity through a tumor-necrosis factor – dependent mechanism. *Blood*, 71: 672 – 76; 1988.
91. Rettengell Ruth, Gurney H., Radford J. et al: Granulocyte colony – stimulating Factor to prevent dose – limited Neutropenia in Non – Hodgkin’s Lymphoma.
Blood, 80, p 1430 – 36; 1992
92. San Miguel J.S. Hernandez H., Conzalez M. et al.: A randomized study comparing the effect of GM-CSF and G-CSF on immune reconstitution after autologous bone marrow transplantation. *British Journal of Hematology*, 94: 140 – 147; 1996
93. Perillo A., Fantorossi A., Pierelli L., et al: Effects of granulocyte colony stimulating factor and granulocyte / macrophage colony stimulating factor administration on T-cell proliferation and phagocyte cell – surface molecules during hematopoietic reconstitution after autologous peripheral blood progenitor cell transplantation. *Cancer Immunology. Immunother*: 49 (12): 641 – 48 ; 2001
94. Armitage P, Berry G: Statistical Methods in Medical Research 2nd Ed., Blackwell Scientific Publications; 1990
95. Strender LE, Blomgren H, Petrini B et al.; Immunologic monitoring in breast cancer patients receiving postoperative adjuvant chemotherapy. *Cancer* 48:1996-2002; 1981.
96. Reckzeh B, Merie H, Pfluger K.H. et al.: Severe lymphocytopenia and interstitial pneumonia in patients treated with paclitaxel simultaneous radiotherapy for non-small cell lung cancer. *J.Clin. Oncol.* 14: 1071-1076; 1996
97. Schiling PJ, Vadhan-Raj S: Concurrent cytomegalovirus and pneumocystis carinii pneumonia after fludarabine therapy for chronic lymphocytic leukemia. *N. Engl. J.Med.* 323:833-834; 1990

98. Boldt DH, Von Hoff DD, Kuhn JD. et al.: Effects on human peripheral lymphocytes of in vivo administration of 9-b-D-Arabinofuranosyl-2-fluoroadenine-5'-monophosphate (NSC 312887), - A new purine antimetabolite, *Cancer Res* 44:4661-4669;1984.
99. Urba W, Baseler MW, Kopp WC. et al.: Deoxycoformycin-induced immunosuppression in patients with hairy-cell leukemia. *Blood* 73: 38-46;1989
100. Kraut EH, Neff JC, Bouroncle B.A., et al.: Immunosuppressive effects of pentostatin *J. Clin Oncology* 8: 848-855;1990
101. de Gast GC, Verdonk LF, J.M.Middeldorp et al: Recovery of T-cell subsets after autologous bone marrow transplantation is mainly due to proliferation of mature T-cells in the graft. *Blood* 66:428-431; 1985.
102. Andrews RG, Bryant em, Bartelmez S.H, et al.: CD 34⁺ marrow cells devoid of T and B lymphocytes reconstitutes stable lymphopoiesis and myelopoiesis in lethally irradiated allogeneic baboons. *Blood* 80:693-701;1992.
103. Harrison DE, Zhong RK. The same exhanstible multilineage precursors produces both myeloid and lymphoid cells as early as 3-4 weeks after marrow transplantation. *Proc Natl Acad Science (USA)* 89:10134-10138;1992.
104. Bengtsson M, Therman TH, Smiedmyr B. et al: Regeneration of functional and activated NK and Tsub-subset cells in the marrow and blood after autologous bone marrow transplantation; a prospective phenotypic study with 2/3-color FACS analysis. *Leukemia* 3:68-76;1989.