

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**

ΠΑΙΔΙΑΤΡΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ ΑΙΜΑΤΟΛΟΓΙΑΣ-ΟΓΚΟΛΟΓΙΑΣ

Διευθύντρια: Καθηγήτρια Μαρία Καλμαντή

ΜΕΛΕΤΗ ΑΙΜΟΠΟΙΗΣΗΣ ΣΕ ΝΕΟΓΝΑ, ΒΡΕΦΗ, ΠΑΙΔΙΑ.

ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΔΡΑΣΗΣ ΚΥΤΤΑΡΟΚΙΝΩΝ

Χρόνια καλοήθης ουδετεροπενία της βρεφικής και παιδικής ηλικίας

**Διδακτορική Διατριβή
Χρυσούλας Περδικογιάννη
Ιατρού**

**Επιβλέπουσα: Μαρία Καλμαντή
Καθηγήτρια Παιδιατρικής**

**Ηράκλειο Κρήτης
2002**

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**

ΠΑΙΔΙΑΤΡΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ ΑΙΜΑΤΟΛΟΓΙΑΣ-ΟΓΚΟΛΟΓΙΑΣ

Διευθύντρια: Καθηγήτρια Μαρία Καλμαντή

ΜΕΛΕΤΗ ΑΙΜΟΠΟΙΗΣΗΣ ΣΕ ΝΕΟΓΝΑ, ΒΡΕΦΗ, ΠΑΙΔΙΑ.

ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΔΡΑΣΗΣ ΚΥΤΤΑΡΟΚΙΝΩΝ

Χρόνια καλοήθης ουδετεροπενία της βρεφικής και παιδικής ηλικίας

Διδακτορική Διατριβή

Χρυσούλας Περδικογιάννη

ΙΑΤΡΟΥ

Επταμελής εξεταστική επιτροπή:

Μ. Καλμαντή Καθηγήτρια Παιδιατρικής

Γ. Ηλιόπουλος Καθηγητής Αιματολογίας

Ε. Δημητρίου Επίκουρη Καθηγήτρια Εργ Αιματολ/Ογκολογίας

Σ. Σμπυράκης Καθηγητής Παιδιατρικής

Δ. Μαυρουδής Επίκουρος Καθηγητής Εργ Αιματολογίας

Ε. Γαλανάκης Επίκουρος Καθηγητής Παιδιατρικής

Ε. Στειακάκη Επίκουρη Καθηγήτρια Παιδιατρ Αιματολ/Ογκολογίας

Στους γονείς μου

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

	Σελίδα
ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ	6
ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ	14
ΕΙΣΑΓΩΓΗ	16
A. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	
I. ΒΑΣΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΙΜΟΠΟΙΗΣΗ	
1. Αρχέγονα αιμοποιητικά κύτταρα	17
2. Αιμοποιητικό μικροπεριβάλλον	18
3. Καλλιέργειες προγονικών αιμοποιητικών κυττάρων	19
4. Αυξητικοί παράγοντες στη ρύθμιση της αιμοποίησης	21
II. ΚΟΚΚΙΟΠΟΙΗΣΗ	
1. Αυξητικοί παράγοντες στη ρύθμιση της κοκκιοποίησης	22
2. Αυξητικός παράγοντας των κοκκιοκυττάρων (G-CSF)	23
2.1 Ιστορικά στοιχεία-Αναγνώριση του παράγοντα	23
2.2 Παραγωγή G-CSF: Κυτταρικές πηγές, ρύθμιση	24
2.3 Υποδοχέας G-CSF	25
2.4 Βιολογικές ιδιότητες	27
2.4.1 Προγονικά μυελικά κύτταρα	27
2.4.2 Μη αιμοποιητικά κύτταρα-Καρκινικές κυτταρικές σειρές	29
2.4.3 Ώριμα ουδετερόφιλα	29
2.4.3.1 Δράση του G-CSF στην απόπτωση	30
2.4.3.2 Ανοσορυθμιστική δράση	30
2.4.3.3 Επίδραση του G-CSF στην κινητική των ουδετεροφίλων	31
2.4.3.4 Επίδραση του G-CSF στην μορφολογία των ουδετεροφίλων	32
2.4.3.5 Ο ρόλος του G-CSF στις λοιμώξεις	32
2.5 Φαρμακοκινητική	33
2.6 Κλινική χρήση. Ενδείξεις χορήγησης. Ασφάλεια χρήσης	33
3. Κοκκιοκυτταρικές διαταραχές	37
III. ΜΟΡΙΑ ΠΡΟΣΚΟΛΛΗΣΗΣ	
1. Γενικά	38
1.1 Ιντεγκρίνες	38
1.2 Μόρια προσκόλλησης ανοσοσφαιρινικής δομής	39
1.3 Σελεκτίνες	41
2. Ο ρόλος των μορίων προσκόλλησης στην κυκλοφορία των λευκοκυττάρων	43
3. Ο ρόλος των μορίων προσκόλλησης στην αιμοποίηση	44
4. Συμμετοχή των μορίων προσκόλλησης στα διάφορα νοσήματα	45
5. Μελέτη των μορίων προσκόλλησης στην ουδετεροπενία	46

IV. ΟΥΔΕΤΕΡΟΠΕΝΙΕΣ	
1. Γενικά-Ορισμός και Ταξινόμηση	48
2. Ουδετεροπενίες που οφείλονται σε ενδογενείς διαταραχές των μυελικών κυττάρων	51
3. Ουδετεροπενίες που οφείλονται σε εξωγενείς παράγοντες	61
4. Χρόνια καλοήθης ουδετεροπενία της βρεφικής και παιδικής ηλικίας –Πρωτοπαθής αυτοάνοση ουδετεροπενία	72
4.1 Κλινικές εκδηλώσεις	72
4.2 Εργαστηριακά ευρήματα	74
4.3 Παθοφυσιολογικός μηχανισμός	77
4.4 Διάγνωση	77
4.5 Διαφορική Διάγνωση	78
4.6 Πορεία-Πρόγνωση	78
4.7 Θεραπευτική αντιμετώπιση	79
B. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	
V. ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	
1. Ασθενείς	80
2. Μέθοδοι	84
2.1 Καλλιέργειες προγονικών αιμοποιητικών κυττάρων	84
2.2 Επαναποπλασμαστική ικανότητα προγονικών αιμοποιητικών κυττάρων της κοκκιώδους σειράς (CFU-GM)	85
2.3 Προσδιορισμός επιπέδων διαλυτών μορίων E-σελεκτίνης, ICAM-1 και G-CSF, TNF-α και IL-1β	87
2.4 Μελέτη επιχρισμάτων μυελού των οστών	88
2.5 Στατιστική ανάλυση	88
VI. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	
1. Βασικές αιματολογικές παράμετροι	89
2. Μυελός των οστών	92
2.1 Αναλογίες των επιμέρους κυτταρικών πληθυσμών του μυελού των οστών και κυτταρικά διαμερίσματα	92
2.2 Αποικίες προγονικών κυττάρων μυελού των οστών	95
2.3 Επαναποπλασμαστική ικανότητα προγονικών κυττάρων της κοκκιώδους σειράς	97
3. Προσδιορισμός επιπέδων διαλυτών μορίων προσκόλλησης E-σελεκτίνης και ICAM-1 στον ορό	102
4. Προσδιορισμός των επιπέδων G-CSF στον ορό	110
5. Επίπεδα κυτταροκινών TNF-α και IL-1β	119
VII. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	127
VIII. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	140
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	142
SUMMARY	146
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	149

ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

Όνομα:	Περδικογιάννη Χρυσούλα
Όνομα πατρός:	Μηνάς
Ημερομηνία Γέννησης:	30 Ιανουαρίου 1970
Τόπος Γέννησης:	Ηράκλειο Κρήτης
Διεύθυνση:	Αθηνάς 5, 71306 Ηράκλειο Κρήτης
Τηλέφωνο:	224487 e-mail: perdiko@med.uoc.gr
Ξένες γλώσσες:	Αγγλικά, Γαλλικά
Ιδιότητα:	Ιατρός (Σχολή Επιστημών Υγείας, Τμήμα Ιατρικής Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης)
Άδεια ασκήσεως επαγγέλματος	Αρ. άδειας 22795 / 8-12-94 Διεύθυνση Υγιεινής Νομαρχία Ηρακλείου

1. ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ - ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΗ ΔΡΑΣΤΗΡΙΟΤΗΤΑ

Ιούνιος 1987:	Απολυτήριο Λυκείου - Ιδιωτικό Λύκειο Εκπαιδευτηρίου «το Παγκρήτιο» (βαθμός 19 και 10/12)
Οκτ 1987-Νοεμ 1994:	Πτυχίο Ιατρικού Τμήματος Σχολής Επιστημών Υγείας Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης (βαθμός πτυχίου 7.04 “λίαν καλώς”) Εισαγωγή κατόπιν Πανελλαδικών Εξετάσεων
Φεβρ 1995-Αυγ 1996:	Εκπλήρωση Υπηρεσίας Υπαίθρου Κέντρο Υγείας Ανωγείων Κρήτης
Απρ 1997-Οκτ 1999:	Ειδικότητα Παιδιατρικής Γενικό Νομαρχιακό Νοσοκομείο Χανίων Κρήτης.
Νοεμ 1999–Φεβ 2002:	Ερευνητικό έργο στο Εργαστήριο Ιστικών

- Καλλιιεργειών Παιδιατρικής Κλινικής
Αιματολογίας/Ογκολογίας Πανεπιστημίου Κρήτης
- Ιούλιος 2001:** Παρακολούθηση στην Αιματολογική κλινική και στο ερευνητικό Εργαστήριο του νοσοκομείου St George's του Λονδίνου στα πλαίσια χρηματοδοτούμενου προγράμματος κατάρτισης της Ευρωπαϊκής Ένωσης "Leonardo da Vinci"
- Φεβ 2002-σήμερα:** Ειδικότητα Παιδιατρικής στην Α΄ Πανεπιστημιακή Κλινική του Νοσοκομείου Παίδων 'Αγία Σοφία'

2. ΣΥΜΜΕΤΟΧΗ ΣΕ ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΑ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΑ

- Οκτ 1996 – Μαρ 1997:** *«Μεταμόσχευση αίματος ομφάλιου λώρου και πλακούντα σε κακοήθη νοσήματα και αιματολογικές κακοήθειες της παιδικής ηλικίας»*
Γενική Γραμματεία Έρευνας και Τεχνολογίας (ΠΕΝΕΔ)
- Ιούλιος 2000** *«Μελέτη της αιτιοπαθογένειας της χρόνιας καλοήθους ουδετεροπενίας των παιδιών»*
Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Ηρακλείου Κρήτης

3. ΒΡΑΒΕΙΑ

Χορέμιο Έπαθλο (Γ΄ Βραβείο) 1997

35^ο Πανελλήνιο Παιδιατρικό Συνέδριο, Ηράκλειο Κρήτης

«Αίμα ομφάλιου λώρου. Δυνατότητες και περιορισμοί για χρήση του σε μεταμοσχεύσεις στα παιδιά»

Ε. Δημητρίου, Χ. Ματσούκα, Χ. Περδικογιάννη, Ε. Στεικάκη, Ε. Μπολωνάκη,
Ε. Λυδάκη, Α. Μακρυγιαννάκης, Ε. Κουμαντάκης, Μ. Καλμαντή

4. ΜΕΛΟΣ ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΩΝ ΕΤΑΙΡΕΙΩΝ -ΣΥΛΛΟΓΩΝ

- Ελληνική Αιματολογική Εταιρεία (αντεπιστέλλον μέλος)
- Ιατρικός Σύλλογος Αθηνών

5. ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ – ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΙΣ

A. ΠΛΗΡΕΙΣ ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ

1. Phenotypic characteristics of cord blood hematopoietic cells.

H. Dimitriou, Ch. Matsouka, Ch. Perdikogianni, E. Stiakaki, I. Bolonaki, E. Lydaki, E. Koumantakis, M.Kalmanti.

Leuk Res 22: 755-758, 1998.

2. Erythropoiesis and myelopoiesis in childhood leukemia and solid tumors.

H. Dimitriou, Ch. Perdikogianni, E. Lydaki, E. Stiakaki, I. Bolonaki, M. Kalmanti.

Int J Ped Hem / Oncol 6(4): 243-250, 1999.

3. Pleuropulmonary blastoma. An aggressive intrathoracic neoplasm of childhood.

Ch. Perdikogianni, E. Stiakaki, V. Danilatou, M. Kalmanti.

Ped Hematol/Oncol 18: 259-266,2001.

4. Mutations of Retinoblastoma Gene (Rb-1) as a prognostic factor in children with Acute Leukemia and Neuroblastoma.

Markaki E-A, Tsopanomichalou M, Dimitriou H, Perdikoyanni Ch, Stiakaki E, Spandidos D, Kalmanti M.

Ped Hematol/Oncol 18: 101-110, 2001.

5. A novel idea for an organized hospital/school program for children with malignancies. Problems for the realization.

U. Kapelaki, H. Fovakis, H. Dimitriou, Ch. Perdikogianni, E.Stiakaki, M. Kalmanti

Int J Hem/Oncol (in press)

6. Adhesion molecules, endogenous G-CSF levels and replating capacity of progenitors in chronic benign neutropenia of childhood.

Ch. Perdikogianni, H. Dimitriou, E. Stiakaki, E-A Markaki, M. Kalmanti

Eur J Pediatr 2002 (in review)

7. Levels of soluble ICAM-1 in premature and full term neonates with infection

M. Apostolou, H. Dimitriou, J. Kaleyias, Ch Perdikogianni, E. Stiakaki, Ch Costalos, M. Kalmanti

Mediators inflamm 11: 95-98, 2002

Μελέτη της αιμοποίησης σε νοσήματα της παιδικής ηλικίας. Κλινική και προγνωστική αξία των in vitro καλλιέργειών.

Χ. Περδικογιάννη, Ε. Δημητρίου, Ε. Στειακάκη, Ε. Μπολωνάκη, Ε. Λυδάκη, Μ. Καλμαντή

Παιδιατρική 61: 363-370, 1998

B. ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΙΣ

ΞΕΝΟΓΛΩΣΣΕΣ ΔΗΜΟΣΙΕΥΜΕΝΕΣ ΠΕΡΙΛΗΨΕΙΣ

1. Immunophenotypic characteristics of umbilical cord blood. Clonogenicity of CD 34⁺ enriched fraction. Relevance to transplantation.

H. Dimitriou, E. Lydaki, E. Stiakaki, Ch Perdikoyanni, H. Matsouka, I. Bolonaki, M. Kalmanti.

a) XVI Congr Europ Soc Ped Haem Immunol, Ped Res: 41 (5), 54, 1997.

b) XIVth Meeting Int Soc Haem, Stockholm, Sweden, Abstracts: O-028, 43, 1997.

c) 24th Ann Meeting Europ Group for BMT, Courmayeur, Italy, Bone Marrow Transplantation: 21 (1), 89, S25, 1998.

2. Erythropoiesis and granulopoiesis in acute leukemia of childhood.

M. Kalmanti, E. Lydaki, H. Dimitriou, Ch. Perdikoyanni, I. Bolonaki, E. Stiakaki.
24th Conf Union Middle-Eastern Mediterran Paed Soc, Nice: 112, 99, 1997.

3. Hemopoiesis in children with solid tumors and lymphomas.

M. Kalmanti, H. Dimitriou, E. Lydaki, Ch. Perdikoyanni, I. Bolonaki, E. Stiakaki.

a) 24th Conf Union Middle-Eastern Mediterran Paed Soc, Nice: 113, 100, 1997.

b) XXXth SIOP Meeting, 1998, Med Pediatr Oncol 31: 335, 1998

4. Study of self-proliferative capacity of committed haematopoietic progenitor cells using an in vitro replating culture method.

H. Dimitriou, Ch. Perdikianni, E. Stiakaki, M. Kalmanti.

XXXII SIOP Meeting, Med Pediatr Oncol 35: 226, 2000

5. Effect of delivery and gestational age on replating capacity of cord blood haematopoietic progenitor cells.

H. Dimitriou, Ch. Perdikogianni, E. Stiakaki, P.Vorgia, E. Koumantakis, M. Kalmanti. *XXXII SIOP Meeting, Med Pediatr Oncol 35: 331, 2000*

6. The role of CD34+ cell number in the peripheral blood during PBSC collection in children with neoplasia.

E. Stiakaki, E. Lydaki, D. Mavroudis, G. Martimianaki, K. Katsanoulas, E. Dimitriou, C. Perdikogianni, E. Kantidaki, M. Kalmanti.

27th Annual EBMT Meeting, Maastricht, The Netherlands, March 25-28, 2001

7. The role of growth factors and adhesion molecules in the pathogenesis of benign neutropenia of childhood. Could replating capacity of hemopoietic progenitors play a role in differentiating it from secondary neutropenias?

C. Perdikogianni, E. Dimitriou, E. Stiakaki, M. Kalmanti

1st Neutropenia Network Conference, Heraklion Crete, Greece, April 27-28 2001

8. A case of severe congenital neutropenia with leukemic transformation.

E. Stiakaki, C. Perdikogianni, H. Mouratidou, E-A Markaki, A. Kambourakis, M. Kalmanti.

1st Neutropenia Network Conference, Heraklion Crete, Greece, April 27-28 2001

9. An 11-year study of chronic benign neutropenia of childhood in Crete. Clinical characteristics and outcome.

C. Perdikogianni, E. Stiakaki, S. Maraka, E-A Markaki, A. Kambourakis, M. Kalmanti.

1st Neutropenia Network Conference, Heraklion Crete, Greece, April 27-28 2001

10. A case of ataxia-telangiectasia with persistent massive lymphoproliferation.

A. Kambourakis, E. Stiakaki, E-A Markaki, C. Perdikogianni, L. Notarangelo, D. Schindler, M. Kalmanti.

1st Neutropenia Network Conference, Heraklion Crete, Greece, April 27-28 2001

11. Ex vivo expansion of primitive cord blood cells in the presence of thrombopoietin (TPO) and erythropoietin (EPO)

Vorgia P, Dimitriou H, Stiakaki E, Perdikogianni C, Koumantakis E, Kalmanti M.

28th Annual EBMT Meeting, March 2002

12. G-CSF, adhesion molecules and replating capacity of hemopoietic progenitors in chronic benign neutropenia of childhood

C. Perdikogianni, H. Dimitriou, E. Stiakaki, E-A Markaki, M. Kalmanti *EHA Florence, Italy, June 6-9 2002*

ΕΛΛΗΝΙΚΕΣ ΔΗΜΟΣΙΕΥΜΕΝΕΣ ΠΕΡΙΛΗΨΕΙΣ

1. Ουδετεροπενία στα παιδιά. Μελέτη αιμοποίησης – Κλινική πορεία – Θεραπεία.

E. Κουβίδη, E. Στειακάκη, E. Δημητρίου, E. Μπολωνάκη, E. Λυδάκη, X. Περδικογιάννη, E. Χατζηδάκη, A. Καμπουράκης, M. Καλμαντή.
8^ο Παγκρήτιο Ιατρικό Συνέδριο, Αγ. Νικόλαος, Περιλήψεις: σ.203, 1996.

2. In vitro ανάπτυξη και ανοσοφαινοτυπικά χαρακτηριστικά αιμοποιητικών κυττάρων ομφάλιου λώρου.

E. Δημητρίου, X. Ματσούκα, E. Χατζηδάκη, E. Στειακάκη, E. Μπολωνάκη, E. Λυδάκη, X. Περδικογιάννη, A. Μακρυγιαννάκης, E. Κουμαντάκης, M. Καλμαντή.
8^ο Παγκρήτιο Ιατρικό Συνέδριο, Αγ. Νικόλαος, Περιλήψεις: σ.206, 1996.

3. Ανοσοφαινοτυπική μελέτη αιμοποιητικών κυττάρων ομφάλιου λώρου και ex vivo έκπτυξη τους με την προσθήκη κυτοκινών.

E. Δημητρίου, X. Ματσούκα, E. Χατζηδάκη, E. Στειακάκη, E. Μπολωνάκη, E. Λυδάκη, X. Περδικογιάννη, A. Μακρυγιαννάκης, E. Κουμαντάκης, M. Καλμαντή.
Αιματολογικό Διήμερο, Ιωάννινα, Περιλήψεις: σ.44, 3, 1996.

4. In vitro μελέτη κοκκιοποίησης παιδιών με συμπαγείς όγκους.

E. Μπολωνάκη, E. Λυδάκη, X. Περδικογιάννη, E. Στειακάκη, X. Ματσούκα, E. Δημητρίου, A. Καμπουράκης, M. Καλμαντή.
6^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Κλινικής Ογκολογίας, Βήμα Κλινικής Ογκολογίας: 1(2), σ. 227, 70, 1997.

5. Αίμα ομφάλιου λώρου στη μεταμόσχευση. Χρησιμότητα - Περιορισμοί.

E. Δημητρίου, X. Ματσούκα, X. Περδικογιάννη, E. Στειακάκη, E. Μπολωνάκη, E. Λυδάκη, E. Χατζηδάκη, A. Μακρυγιαννάκης, E. Κουμαντάκης, M. Καλμαντή.
7^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Μαιευτικής-Γυναικολογίας, Ηράκλειο, Περιλήψεις: σ.89, 158, 1997.

6. Μειωμένη κοκκιοποίηση αλλά όχι ερυθροποίηση στην ύφεση της οξείας παιδικής λευχαιμίας.

Χ. Περδικογιάννη, Ε. Δημητρίου, Ε. Στειακάκη, Ε.Λυδάκη, Ε. Μπολωνάκη, Μ. Καλμαντή. *35ο Πανελλήνιο Παιδιατρικό Συνέδριο, Αγ. Πελαγία, Κρήτη: σ.78, 71ΒΑ, 1997.*

7. Φυσιολογική αιμοποίηση σε χρόνιες καλοήθεις ουδετεροπενίες και ιδιοπαθείς θρομβοπενίες των παιδιών.

Ε. Δημητρίου, Χ. Περδικογιάννη, Ε.Λυδάκη, Ε. Στειακάκη, Ε. Μπολωνάκη, Μ. Καλμαντή. *35ο Πανελλήνιο Παιδιατρικό Συνέδριο, Αγ. Πελαγία, Κρήτη: σ.80, 73ΒΑ, 1997.*

8. Διαταραχές της αιμοποίησης σε συμπαγείς όγκους και λεμφώματα παιδιών.

Ε. Δημητρίου, Χ. Περδικογιάννη, Ε. Μπολωνάκη, Ε. Στειακάκη, Ε.Λυδάκη, Μ. Καλμαντή.

α) 35ο Πανελλήνιο Παιδιατρικό Συνέδριο, Αγ. Πελαγία, Κρήτη: σ.79, 72ΒΑ, 1997.

β) 8ο Πανελλήνιο Αιματολογικό Συνέδριο, Αθήνα: σ.319, 169, 1997.

9. Μελέτη της αιμοποίησης στην οξεία λευχαιμία της παιδικής ηλικίας.

Ε. Δημητρίου, Χ. Περδικογιάννη, Ε.Λυδάκη, Ε. Στειακάκη, Ε. Μπολωνάκη, Μ. Καλμαντή. *8ο Πανελλήνιο Αιματολογικό Συνέδριο, Αθήνα: σ.292, 142, 1997.*

10. Ex vivo έκπτυξη κυττάρων αίματος ομφάλιου λώρου.

Ε. Δημητρίου, Χ. Περδικογιάννη, Ε. Στειακάκη, Π. Βοργιά, Ε. Κουμαντάκης, Μ. Καλμαντή. *38ο Πανελλήνιο Παιδιατρικό Συνέδριο, Κως: σ174, 338, 2000.*

11. Μελέτη επαναπολλαπλασιαστικής ικανότητας δεσμευμένων αιμοποιητικών κυττάρων με in vitro ανακαλλιέργειες.

Ε. Δημητρίου, Χ. Περδικογιάννη, Ε. Στειακάκη, Μ. Καλμαντή. *38ο Πανελλήνιο Παιδιατρικό Συνέδριο, Κως: σ 69, 130, 2000.*

12. Επίδραση του είδους του τοκετού και της ηλικίας κύησης στην επαναπολλαπλασιαστική ικανότητα των προγονικών κυττάρων αίματος ομφάλιου λώρου.

Ε. Δημητρίου, Χ. Περδικογιάννη, Ε. Στειακάκη, Π. Βοργιά, Ε. Κουμαντάκης, Μ. Καλμαντή. *11ο Πανελλήνιο Αιματολογικό Συνέδριο, Haema (suppl) 3(4): σ 294, 311, 2000.*

13. Ο ρόλος του αριθμού των CD34+ κυττάρων στο περιφερικό αίμα κατά τη συλλογή PBSC σε παιδιά με νεοπλασία.

Ε. Στειακάκη, Ε.Λυδάκη, Γ. Μαρτιμιανάκη, Ε. Δημητρίου, Κ. Κατσανούλας, Χ. Περδικογιάννη, Δ. Μαυρουδής, Ε. Καντιδάκη, Μ. Καλμαντή.

11^ο Πανελλήνιο Αιματολογικό Συνέδριο, *Haema (suppl) 3(4): σ 293, 310, 2000*
39^ο Πανελλήνιο Παιδιατρικό Συνέδριο, σ.14, 2001

14. Εκπαιδευτικό πρόγραμμα υποστήριξης παιδιών με κακοήθεια κατά τη διάρκεια της νοσηλείας τους.

Ο. Καπελλάκη, Η. Φοβάκης, Ε. Στειακάκη, Ε. Δημητρίου, Χ. Περδικογιάννη, Μ. Καλμαντή 39^ο Πανελλήνιο Παιδιατρικό Συνέδριο, σ.16, 2001

15. Επαναπολλαπλασιαστική ικανότητα δεσμευμένων αιμοποιητικών κυττάρων με in vitro ανακαλλιέργειες σε ιδιοπαθείς και δευτεροπαθείς ουδετεροπενίες της παιδικής ηλικίας.

Χ. Περδικογιάννη, Ε. Δημητρίου, Ε. Στειακάκη, Μ. Καλμαντή

11^ο Πανελλήνιο Αιματολογικό Συνέδριο, *Haema (suppl) 3(4): σ 107, 40, 2000.*

16. Επίπεδα διαλυτού ICAM-1 (Intercellular Adhesion Molecule-1) στη νεογνική σηψαιμία.

Μ. Αποστόλου, Ε. Δημητρίου, Χ. Περδικογιάννη, Ι. Καλέγιας, Ε. Στειακάκη, Μ. Καλμαντή 39^ο Πανελλήνιο Παιδιατρικό Συνέδριο, σ.57, 2001

17. G-CSF, μόρια προσκόλλησης και επαναπολλαπλασιαστική ικανότητα των αιμοποιητικών κυττάρων στην παθογένεια των ουδετεροπενιών της παιδικής ηλικίας.

Χ. Περδικογιάννη, Ε. Δημητρίου, Ε. Στειακάκη, Μ. Καλμαντή

12^ο Πανελλήνιο Αιματολογικό Συνέδριο, *Haema 4(suppl1): σ 205-6, 2001*

40^ο Πανελλήνιο Παιδιατρικό Συνέδριο, σελ 28, 2002

18. Χαρακτηρισμός και έκπτυξη AC133+ κυττάρων αίματος ομφαλίου λώρου.

Ε. Δημητρίου, Π Βοργιά, Χ Περδικογιάννη, Ε Στειακάκη, Ε-Α Μαρκάκη, Ε Κουμαντάκης, Κ Παπά, Μ Καλμαντή 40^ο Πανελλήνιο Παιδιατρικό Συνέδριο, σελ 30, 2002

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

ΑΑΠ: Απόλυτος Αριθμός Πολυμορφοκυττάρων
AcSDKP: Τετραπεπτίδιο
ADCC: Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity, Αντισωματοεξαρτώμενη Κυτταροτοξικότητα
a-MEM: a-modified Minimal Essential Medium
AUC: Area Under the Curve
ΒΣ: Βάρος Σώματος
BFU-E: Burst Forming Unit-Erythroid, Μονάδα σχηματισμού αποικιών ερυθράς σειράς τύπου “ έκρηξης”
BSA: Bovine Serum Albumin
C: Complement, Συμπλήρωμα
CD: Cluster Differentiation
CFU-Bas: Colony Forming Unit-Baseophil
CFU-E: Colony Forming Unit-Erythroid, Μονάδα σχηματισμού αποικιών ερυθράς σειράς
CFU-Eo: Colony Forming Unit-Eosinophil
CFU-GEMM: Colony Forming Unit-Granulocyte, Erythroid, Macrophage, Megakaryocyte
CFU-GM: Colony Forming Unit-Granulocyte, Macrophage
CFU-G: Colony Forming Unit-Granulocyte
CFU-M: Colony Forming Unit-Macrophage
CFU-Meg: Colony Forming Unit-Megakaryocyte
CRP: C-Reactive Protein
ELA: Elastase, Ελαστάση
FCS: Fetal Calf Serum
Flt-3: Fms-like tyrosine kinase-3 (fetal liver tyrosine kinase-3)
G-CSF: Granulocyte-Colony Stimulating Factor
G-CSF-R: Granulocyte-Colony Stimulating Factor Receptor
GM-CSF: Granulocyte, Macrophage- Colony Stimulating Factor
HIV: Human Immunodeficiency Virus
ICAM: Intercellular Adhesion Molecule
Ig: Immunoglobulin, Ανοσοσφαιρίνη
IL: Interleukin, Ιντερλευκίνη
Jak: κινάση Jak-Janus protein tyrosine kinase
LAD: Leukocyte Adhesion Deficiency
LFA-1: Lymphocyte Function Antigen-1
LIF: Leukemia Inhibitory Factor
LGL: Large Granular Lymphocytes
LPS: Lipopolysaccharide, Λιποπολυσακχαρίδη
LTC-IC: Long Term Culture-Initiating Cell
MAdCAM: Mucosal Addressin Cell Adhesion Molecule
M-CSF: Macrophage-Colony Stimulating Factor
MIP-1 α: Macrophage Inflammatory Protein-1 α

NK: Natural Killer
ΟΛ: Οξεία Λευχαιμία
ΟΛΛ: Οξεία Λεμφοβλαστική Λευχαιμία
ΟΜΛ: Οξεία Μυελογενής Λευχαιμία
PECAM: Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule
SCF: Stem Cell Factor
SEM: Standard Error of the Mean, Σταθερό σφάλμα της μέσης τιμής
STAT: πρωτεΐνη STAT- Signal Transducers and Activators of Transcription
TGF-β: Transforming Growth Factor-β
TNF-α: Tumor Necrosis Factor-α
TPO: Thrombopoietin
VCAM: Vascular Cell Adhesion Molecule
VEGF: Vascular Endothelial Growth Factor
VLA: Very Late Antigen

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η χρόνια καλοήθης ουδετεροπενία της βρεφικής και παιδικής ηλικίας αποτελεί τη συχνότερη μορφή χρόνιας ουδετεροπενίας των παιδιών. Θεωρείται πρωτοπαθής διαταραχή αυτοάνοσης αιτιολογίας, αλλά το αίτιο που πυροδοτεί τον ανοσολογικό μηχανισμό παραμένει αδιευκρίνιστο. Η μεγάλη ετερογένεια των κλινικών εκδηλώσεων της νόσου, η άλλοτε άλλη ανταπόκριση στη θεραπεία και η συχνά αυτοϊώμενη πορεία της την καθιστούν ενδιαφέρον πεδίο έρευνας. Η μελέτη πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Ιστικών Καλλιέργειών της Παιδιατρικής Κλινικής Αιματολογίας/Ογκολογίας του Τομέα Μητέρας-Παιδιού του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Κρήτης.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την Καθηγήτρια κ. Μαρία Καλμαντή για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε, την επιστημονική και ηθική υποστήριξη που μου παρείχε και την αποτελεσματική καθοδήγηση σε όλη τη διάρκεια εκπόνησης της διατριβής αυτής.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω επίσης τον Καθηγητή κ. Γ. Ηλιόπουλο, μέλος της Τριμελούς Επιτροπής της διατριβής μου, για την εποικοδομητική κριτική του και την επιστημονική υποστήριξη. Ιδιαίτερα αποδοτική ήταν η συνεργασία μου με την κ. Ελένη Δημητρίου, Επίκουρη Καθηγήτρια Τομέα Μητέρας-Παιδιού και μέλος της Τριμελούς Επιτροπής στο σχεδιασμό, την υλοποίηση και την ανάλυση των αποτελεσμάτων της μελέτης αυτής. Ευχαριστώ επίσης την κ. Ευτυχία Στειακάκη, Επίκουρη Καθηγήτρια Παιδιατρικής Αιματολογίας/Ογκολογίας για τη γόνιμη συμβολή της, τον κ. Δ. Μαυρουδή, Επίκουρο Καθηγητή Αιματολογίας και τον κ. Ε. Γαλανάκη που συμμετέχουν στην Εξεταστική Επιτροπή της διατριβής αυτής για την εποικοδομητική κριτική. Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω την Γεωργία Μαρτιμιανάκη, βιολόγο για τη συμπαράσταση στις δύσκολες στιγμές, την Βίκυ Δανηλάτου, ιατρό, για τα πρώτα βήματα που κάναμε μαζί και την τεχνικό Ανδρονίκη Φασουλάκη για τη συμμετοχή της στην εκτέλεση του εργαστηριακού μέρους.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Γιάννη Κοπιδάκη για την ενθάρρυνση και την ουσιαστική υποστήριξη που μου παρείχε σε όλη τη διάρκεια της εκπόνησης της διατριβής αυτής και για κάποιες δύσκολες ώρες μπροστά στον υπολογιστή. Θα ήθελα να αφιερώσω το έργο αυτό στους γονείς μου που πάντα με στηρίζουν και με ενθαρρύνουν να συνεχίσω.

A. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

I. ΒΑΣΙΚΕΣ ΑΡΧΕΣ ΑΙΜΟΠΟΙΗΣΗΣ

1. ΑΡΧΕΓΟΝΑ ΑΙΜΟΠΟΙΗΤΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ

Η αιμοποίηση ξεκινά από ένα μικρό αριθμό αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων. Το αρχέγονο αιμοποιητικό κύτταρο χαρακτηρίζεται από την ικανότητά του να αυτοανανεώνεται και να διαφοροποιείται σε κύτταρα όλων των σειρών του αίματος. Οι αυτοανανεωτικές διαιρέσεις του αιμοποιητικού κυττάρου είναι υπεύθυνες για τη διατήρηση σταθερού αριθμού αιμοποιητικών κυττάρων καθ'όλη τη διάρκεια της ενήλικου ζωής ενός ατόμου και για την έκπτυξη του διαμερίσματος των αρχέγονων κυττάρων κατά τη διάρκεια της εμβρυϊκής ζωής καθώς και μετά από μεταμόσχευση (1). Οι μηχανισμοί που ρυθμίζουν τις διαιρέσεις του αρχέγονου κυττάρου παραμένουν αδιευκρίνιστοι.

Το διαμέρισμα των αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων είναι ετερογενές λόγω των διαφορετικών χρονικά μιτώσεων που παρατηρούνται σε αυτόν τον πληθυσμό (2). Υπό φυσιολογικές συνθήκες η πλειονότητα των κυττάρων αυτών βρίσκεται σε δεδομένη χρονική στιγμή εκτός κυτταρικού κύκλου, σε φάση G₀. Μεταξύ αρχέγονων και ώριμων, λειτουργικών κυττάρων βρίσκεται ένας ενδιάμεσος κυτταρικός πληθυσμός, τα προγονικά αιμοποιητικά κύτταρα. Η μετάβαση από το ένα στάδιο διαφοροποίησης στο άλλο προϋποθέτει τη σταδιακή απώλεια της αυτοανανεωτικής ικανότητας και την ενίσχυση της δέσμευσης προς διαφοροποίηση (commitment).

Η δέσμευση προς διαφοροποίηση εξαρτάται από την ενεργοποίηση μιας σειράς μεταγραφικών παραγόντων όπως οι SCL/TAL-1, LMO2 και οι πιο εξειδικευμένοι για συγκεκριμένη σειρά (lineage restricted) GATA-1 και PU-1 (3). Η επίδραση αυξητικών παραγόντων μπορεί να επηρεάσει την κατεύθυνση διαφοροποίησης εφόσον εξασκείται σε πολυδύναμα ή διδύναμα, αλλά όχι σε μονοδύναμα προγονικά κύτταρα (3). Πολλές μελέτες ασχολούνται με τον τρόπο ρύθμισης της αυτοανανέωσης ή διαφοροποίησης του αρχέγονου αιμοποιητικού

κυττάρου. Οι περισσότερες κλείνουν προς το “στοχαστικό μοντέλο” σύμφωνα με το οποίο η κατεύθυνση επιλέγεται τυχαία και διέπεται από το νόμο των πιθανοτήτων (4). Φαίνεται όμως ότι όσο το κύτταρο διαφοροποιείται, εξωγενείς ρυθμιστικοί παράγοντες παίζουν σημαντικό ρόλο αφού πλέον το κύτταρο καλείται να αντιδράσει σε αλλαγές που συμβαίνουν στο μικροπεριβάλλον του (“ντετερμινιστικοί” μηχανισμοί) (5).

Τα ώριμα κύτταρα του αίματος έχουν περιορισμένο χρόνο ζωής και δεν αυτοανανεώνονται. Η αντικατάσταση αυτών των κυττάρων εξαρτάται από την ύπαρξη και τη λειτουργικότητα των προγονικών και αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων.

Σύμφωνα με το ισχύον πρότυπο αιμοποίησης το αιμοποιητικό σύστημα είναι ιεραρχημένο σε τρία διαμερίσματα με βάση το βαθμό διαφοροποίησης των κυττάρων του όπως αυτός εκτιμάται από *in vitro* δεδομένα. Το πρώτο και ιεραρχικά πιο αρχέγονο διαμέρισμα περιλαμβάνει τα πολυδύναμα αιμοποιητικά κύτταρα που διαθέτουν τις προαναφερθείσες ιδιότητες της αυτοανανέωσης και γένεσης κυττάρων που είναι προγραμματισμένα για διαφοροποίηση. Το δεύτερο διαμέρισμα αποτελείται από τα προγονικά κύτταρα με συγκεκριμένο στόχο εξέλιξης προς μια καθορισμένη σειρά του αίματος. Τα κύτταρα αυτά διαθέτουν ικανότητα πολλαπλασιασμού και περιορισμένη αυτοανανεωτική ικανότητα. Το τρίτο διαμέρισμα περιλαμβάνει τα κύτταρα που αναγνωρίζονται μορφολογικά στο μυελό των οστών και δίνουν γένεση στα ώριμα κύτταρα του αίματος. Τα τελευταία έχουν καθορισμένες λειτουργίες και έχουν χάσει την ικανότητα πολλαπλασιασμού.

2. ΑΙΜΟΠΟΙΗΤΙΚΟ ΜΙΚΡΟΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝ

Όλα τα προγονικά αιμοποιητικά κύτταρα είναι εγκατεστημένα, πολλαπλασιάζονται και διαφοροποιούνται στο μυελό των οστών μέσα σε ένα ιστολογικά ιδιαίτερο χώρο, που επιπλέον ρυθμίζει και την έξοδο των ώριμων κυττάρων στην κυκλοφορία, το αιμοποιητικό μικροπεριβάλλον (6). Το αιμοποιητικό μικροπεριβάλλον αποτελεί ένα πλέγμα από ινίδια, αγγεία και κύτταρα στρώματος που συγκρατούνται μεταξύ τους με μια άμορφη πρωτεϊνούχο ουσία (extracellular matrix)

από κολλαγόνο, λαμινίνη, φμπρονεκτίνη και άλλες πρωτεΐνες προσκόλλησης. Τα κυτταρικά στοιχεία είναι ινοβλάστες, λιποκύτταρα, μακροφάγα, ενδοθηλιακά κύτταρα και κύτταρα του δικτύου. Όλα μαζί αποτελούν τα κύτταρα του στρώματος, τα οποία παράγουν κυτταροκίνες είτε με τη μορφή διαλυτών μορίων είτε με τη μορφή μεμβρανικών παραγόντων (7). Η ρύθμιση των δυο βασικών λειτουργιών των πολυδύναμων αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων, της αυτοανανέωσης/πολλαπλασιασμού και της διαφοροποίησης, γίνεται με τη σύνδεση και αλληλεπίδρασή τους με τα κύτταρα του στρώματος και με τα συστατικά της εξωκυτταρίου ουσίας καθώς και με την επίδραση κυτταροκινών (8,9). Οι αλληλεπιδράσεις κυττάρου με κύτταρο και κυττάρου με εξωκυττάρια ουσία γίνεται μέσω μορίων προσκόλλησης και των υποδοχέων τους (8). Οι χυμικοί παράγοντες που επιδρούν είναι ευοδωτικοί και ανασταλτικοί (9). Εκκρίνονται τοπικά από τα κύτταρα του αιμοποιητικού μικροπεριβάλλοντος ή παράγονται στην περιφέρεια και φτάνουν στο μικροπεριβάλλον του μυελού με την κυκλοφορία. Οι δράσεις των πρωτεϊνικών μορίων (αυξητικών παραγόντων-κυτταροκινών και προσκολλητικών μορίων) που ρυθμίζουν τις λειτουργίες των αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων αλληλοεπικαλύπτονται και/ή πλεονάζουν ώστε να επιτυγχάνεται η ρύθμιση της αιμοποίησης σε διαφορετικές συνθήκες (10).

3. ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ ΠΡΟΓΟΝΙΚΩΝ ΑΙΜΟΠΟΙΗΤΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

Με τη χρήση των καλλιιεργειών σε ημιστερεά υλικά όπως η μεθυλοκυτταρίνη, το άγαρ έγινε δυνατή η μελέτη των προγονικών αιμοποιητικών κυττάρων μέσω της παρατήρησης του σχηματισμού αποικιών υπό την επίδραση αυξητικών παραγόντων.

Τα προγονικά κύτταρα της ερυθράς σειράς αποτελούνται από δυο κυτταρικούς πληθυσμούς που διαφέρουν όσον αφορά το στάδιο ωρίμανσης και το χρόνο που χρειάζονται για να αναπτυχθούν. Οι αποικίες CFU-E που είναι μικρού μεγέθους, αποτελούνται από περισσότερο ώριμα κύτταρα και αναγνωρίζονται την 7^η μέρα της καλλιέργειας, ενώ οι BFU-E περιέχουν λιγότερο διαφοροποιημένα κύτταρα, αποτελούνται από πολλά κυτταρικά αθροίσματα που σχηματίζουν εικόνα

“έκρηξης” και αναγνωρίζονται την 14^η μέρα της καλλιέργειας. Αποικίες μικτού τύπου CFU-GEMM προέρχονται από πολυδύναμα προγονικά κύτταρα και αποτελούνται από κύτταρα τουλάχιστον δύο σειρών του αίματος.

Τα προγονικά κύτταρα της κοκκιάδους σειράς είναι διδύναμα (CFU-GM) και μονοδύναμα (CFU-G, CFU-M). Τα CFU-GM πήραν το όνομά τους από την ιδιότητά τους να σχηματίζουν αποικίες αποτελούμενες από κοκκιοκύτταρα και μονοκύτταρα. Υπό φυσιολογικές συνθήκες τα περισσότερα από αυτά βρίσκονται σε δεδομένη στιγμή σε κάποια φάση του κυτταρικού κύκλου και πολλαπλασιάζονται. Τα θυγατρικά τους κύτταρα διαφοροποιούνται περαιτέρω είτε προς δεσμευμένα μονοδύναμα προγονικά κύτταρα των ουδετερόφιλων κοκκιοκυττάρων (CFU-G), είτε προς προγονικά κύτταρα των μονοκυττάρων/μακροφάγων (CFU-M). Ένα μικρό μέρος από αυτά παραμένει με το βαθμό διαφοροποίησης του μητρικού τους κυττάρου για αυτοσυντήρηση του κυτταρικού τους διαμερίσματος.

Τα CFU-Bas, CFU-Eo και CFU-Meg είναι μονοδύναμα προγονικά κύτταρα που μετά από πολλαπλασιασμό και περαιτέρω διαφοροποίηση δίνουν γένεση στα βασεόφιλα, ηωσινόφιλα και μεγακαρυοκύτταρα αντίστοιχα.

Χρησιμότητα των καλλιιεργειών προγονικών κυττάρων

Οι καλλιιεργειες προγονικών κυττάρων σύντομης διάρκειας (short-term) επέτρεψαν τη διάκριση και απομόνωση ουσιών-αυξητικών παραγόντων, απαραίτητων για την υποστήριξη της ανάπτυξης αποικιών *in vitro*. Η μέθοδος αυτή έχει χρησιμοποιηθεί α) σε *in vitro* δοκιμασίες χημειοθεραπευτικών φαρμάκων και παραγόντων ευδοωτικών ή ανασταλτικών της αιμοποίησης, β) για τον υπολογισμό των προγονικών κυττάρων που περιέχονται στα μοσχεύματα, γ) στη μελέτη της αιμοποίησης σε νοσήματα όπως τα μυελοϋπερπλασικά και η λευχαιμία.

Οι καλλιιεργειες προγονικών κυττάρων μακράς διάρκειας (long-term) (8) παρέχουν τη δυνατότητα ανάπτυξης *in vitro* κυττάρων πολύ αωρότερων αυτών που μελετώνται με τις καλλιιεργειες βραχείας διάρκειας. Ο όρος long term culture initiating cell (LTC-IC) αναφέρεται στο αρχέγονο κύτταρο που προσδιορίζεται με τη μέθοδο αυτή. Κλινικές εφαρμογές της μεθόδου αποτελούν ο καθαρισμός μοσχεύματος (purging) που βασίζεται στη μειονεκτική ανάπτυξη του παθολογικού

κλώνου σε σχέση με τον φυσιολογικό και τεχνικές γονιδιακής θεραπείας. Με την τεχνική αυτή έγινε δυνατή η κατανόηση των μηχανισμών της αιμοποίησης, των αλληλεπιδράσεων των κυττάρων μεταξύ τους και με το αιμοποιητικό μικροπεριβάλλον καθώς και της επίδρασης των αυξητικών και ανασταλτικών παραγόντων στη ρύθμιση της αιμοποίησης.

4. ΑΥΞΗΤΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΣΤΗ ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΗΣ ΑΙΜΟΠΟΙΗΣΗΣ

Οι αυξητικοί αιμοποιητικοί παράγοντες ή παράγοντες που διεγείρουν τη δημιουργία αποικιών των κυτταρικών σειρών του αίματος είναι γλυκοπρωτεΐνες, ανήκουν στην ευρύτερη ομάδα των κυτταροκινών και ρυθμίζουν τον πολλαπλασιασμό, τη διαφοροποίηση, την ωρίμανση, τη βιωσιμότητα και τη λειτουργικότητα των αιμοποιητικών κυττάρων (11, 12). Οι αυξητικοί παράγοντες εκκρίνονται από τα βοηθητικά κύτταρα του αιμοποιητικού μικροπεριβάλλοντος, από μη αιμοποιητικά όργανα, από τα T-λεμφοκύτταρα, ή από τα ίδια τα αιμοποιητικά κύτταρα (13). Η παραγωγή αυξητικών παραγόντων από τα αιμοποιητικά κύτταρα σε διάφορα στάδια διαφοροποίησής τους υποδεικνύει την ύπαρξη μηχανισμών αυτοκρινούς/παρακρινούς ρύθμισης της αιμοποίησης. Η κλωνοποίηση των γονιδίων που τους κωδικοποιούν και η παραγωγή τους σε κεκαθαρμένη μορφή με τεχνική ανασυνδυασμένου DNA οδήγησε σε ευρείας κλίμακας παραγωγή τους για ερευνητική και κλινική χρήση.

Η δράση ενός παράγοντα εξαρτάται από τη συγκέντρωσή του σε δεδομένο περιβάλλον. Αυξητικοί παράγοντες που εκκρίνονται σε συγκεκριμένο κυτταρικό περιβάλλον προάγουν κατά προτίμηση την αυτοανανέωση των αιμοποιητικών κυττάρων, ενώ άλλοι επάγουν τον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση των εν λόγω κυττάρων (8). Η συνεργική δράση πολλών αυξητικών παραγόντων είναι εμφανής ιδιαίτερα στα πρώιμα στάδια της αιμοποίησης, ενώ σε μετέπειτα στάδια οι αυξητικοί παράγοντες εμφανίζουν μεγαλύτερη εξειδίκευση (14).

Η δράση τους μπορεί να είναι ευοδωτική (διεγερτική) ή ανασταλτική. Ευοδωτικοί παράγοντες είναι ο SCF, Flt-3 (συνδετικό μόριο του υποδοχέα της τυροσινικής κινάσης), GM-CSF, G-CSF, IL-3, IL-6, IL-11, TPO καθώς και άλλοι που

δρουν σε πιο διαφοροποιημένα κύτταρα όπως η ερυθροποιητίνη (EPO), IL-5, M-CSF. Ανασταλτικοί παράγοντες με κύριο ρόλο στη ρύθμιση της αιμοποίησης είναι ο LIF (Leukemia Inhibitory Factor), TGF- β (Transforming Growth Factor β), MIP-1 α (Macrophage Inflammatory Protein α), TNF- α (Tumor Necrosis Factor α), το τετραπεπίδιο AcSDKP (15). Η δράση τους εξασκείται μέσω σύνδεσης με υψηλής συγγένειας υποδοχείς στην επιφάνεια των κυττάρων-στόχων. Οι περισσότεροι υποδοχείς αυξητικών παραγόντων ανήκουν στην οικογένεια των υποδοχέων αιμοποιητίνης, ενώ άλλοι στην οικογένεια των υποδοχέων τυροσινικής κινάσης (16, 17).

Εκτός από αυξητικούς παράγοντες και άλλα πρωτεϊνικά μόρια που εκκρίνονται από τα φυσιολογικά αιμοποιητικά κύτταρα μπορεί να επηρεάσουν την αιμοποίηση (μεταλλοπρωτεϊνάσες του στρώματος, πρωτεΐνες του συμπληρώματος C3, διαλυτοί υποδοχείς όπως οι Fas, gp130 και διαλυτά μόρια προσκόλλησης) (13). Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει τελευταία η μελέτη της αλληλεπίδρασης αιμοποιητικών κυττάρων και ενδοθηλίου των αγγείων που εξασκείται μέσω μορίων πρόσφατα κλωνοποιημένων όπως ο VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) (18).

II. ΚΟΚΚΙΟΠΟΙΗΣΗ

1. ΑΥΞΗΤΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΣΤΗ ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΗΣ ΚΟΚΚΙΟΠΟΙΗΣΗΣ

Παράγοντες που ρυθμίζουν τον πολλαπλασιασμό, τη διαφοροποίηση και λειτουργική ενεργοποίηση των αιμοποιητικών κυττάρων της μυελικής σειράς όπως ο G-CSF, ο GM-CSF, SCF (19, 20), η IL-3, IL-6 αποτελούν θετικούς ρυθμιστές της κοκκιοποίησης, η δράση τους είναι συνεργική και εξασκείται σε διαφορετικά στάδια εξέλιξης της μυελικής σειράς (21, 22). Οι περισσότεροι ρυθμίζουν τον πολλαπλασιασμό μυελικών προγονικών κυττάρων που εμφανίζονται νωρίς στη διαδικασία της κοκκιοποίησης και έχουν περιορισμένη ικανότητα να επάγουν διαφοροποίηση και ωρίμανση (23, 24). Ειδικότερα, ο G-CSF έχει ρόλο και στην τελική διαφοροποίηση για την παραγωγή ώριμων ουδετεροφίλων (25, 26, 27, 28).

2. ΑΥΞΗΤΙΚΟΣ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ ΤΩΝ ΚΟΚΚΙΟΚΥΤΤΑΡΩΝ - G-CSF (Granulocyte-Colony Stimulating Factor)

2.1 Ιστορικά στοιχεία-Αναγνώριση του παράγοντα

Αναγνωρίστηκε για πρώτη φορά από τον Metcalf το 1980 από την ικανότητα του να διαφοροποιεί την WEHI-3B+ μυελομονοκυτταρική λευχαιμική σειρά ποντικού (29). Μετά την περιγραφή των βιοχημικών ιδιοτήτων του G-CSF στα ποντίκια το 1983 από τους Nicola και συν (30) ακολούθησε η αναγνώριση ενός παράγοντα με ανάλογες ιδιότητες στον άνθρωπο (31), ενώ παράλληλα οι Welte και συν δημοσίευαν την απομόνωση από την κυτταρική σειρά 5637 καρκινώματος ουροδόχου κύστης ενός ανθρώπινου (ανθρώπειου) παράγοντα με πολυδύναμη δράση στα αιμοποιητικά κύτταρα (“human pluripotent hematopoietic colony-stimulating factor”) (32). Ο παράγοντας αυτός ταυτίστηκε μετά από μελέτες αλληλουχίας και της βιολογικής δράσης του με τον G-CSF (33,34). Η παραγωγή G-CSF από μη αιμοποιητικές, καρκινικές ανθρώπινες κυτταρικές σειρές (κυτταρική σειρά καρκινώματος εκ πλακωδών κυττάρων στοματοφάρυγγα, καρκινική σειρά ηπατώματος, μελανώματος, μεσοθηλιώματος, σαρκώματος, γλοιοβλαστώματος) αποδείχτηκε σχετικά συχνή (35, 36, 37, 38, 39, 40, 41).

Η περαιτέρω αναγνώριση των ιδιοτήτων του παράγοντα αυτού διευκολύνθηκε από την ανακάλυψη του υπεύθυνου γονιδίου για την κωδικοποίησή του και την παραγωγή της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης στα μέσα της δεκαετίας του 1980 (1986-87) (34, 37, 42, 43). Ο ανθρώπινος παράγοντας κωδικοποιείται από ένα και μόνο γονίδιο (37, 42) που εδράζει στο χρωμόσωμα 17q11-22 (44). Ο γόνος ο υπεύθυνος για την παραγωγή του G-CSF στα ποντίκια έχει μεγάλη ομολογία με τον αντίστοιχο γόνο στον άνθρωπο. Η ομολογία αυτή στην αλληλουχία των νουκλεϊνικών οξέων σε περιοχές που κωδικοποιούν ή όχι είναι 69%, ενώ η ομολογία στην αλληλουχία των αμινοξέων στη δομή της πρωτεΐνης είναι 73% (25). Η ύπαρξη εσωτερικών δισουλφιδικών δεσμών στη δομή της πρωτεΐνης είναι απαραίτητη για τη διατήρηση της τεταρτοταγούς δομής και της βιολογικής δραστηριότητας του μορίου (30).

2.2 Παραγωγή G-CSF: κυτταρικές πηγές /ρύθμιση

Ο G-CSF παράγεται κυρίως από κύτταρα της μονοκυτταρικής σειράς (μονοκύτταρα, μακροφάγα) (45, 46) αλλά και από κύτταρα του αγγειακού ενδοθηλίου, ινοβλάστες (47), μεσοθηλιακά κύτταρα και κύτταρα λείων μυικών ινών και ανθρώπινου πλακούντα (40, 48, 49, 50, 51, 52). Η *in vitro* παραγωγή G-CSF επάγεται από την έκκριση ενδοτοξίνης (λιποπολυσακχαρίδης LPS), ιντερφερόνης- γ και κυτταροκινών όπως ο TNF, IL-1, IL-3, IL-4, IL-10, GM-CSF (25, 41). Μερικοί από τους επαγωγείς αυτούς ανάλογα με την κυτταρική πηγή παραγωγής του G-CSF μπορεί να έχουν και κατασταλτική δράση: πχ η IL-4 και IL-10 καταστέλλουν την παραγωγή G-CSF από τα ενεργοποιημένα με IL-1 ή ενδοτοξίνη μονοκύτταρα, ενώ δεν έχουν αντίστοιχη κατασταλτική δράση στο περιβάλλον των ενδοθηλιακών κυττάρων (53, 54).

Η ικανότητα παραγωγής G-CSF από τον πλακούντα παρατηρείται καθ' όλη τη διάρκεια της κύησης (55) και είναι πιθανό να παίζει ρόλο στην ανάπτυξη και λειτουργία του πλακούντα, εκτός από τον κύριο ρόλο του στην εμβρυϊκή αιμοποίηση (49,56).

Η ρύθμιση της έκφρασης του γονιδίου για τον G-CSF φαίνεται να είναι πολύπλοκη δεδομένου της ποικιλίας των κυττάρων των ικανών να παράγουν G-CSF και του εύρους των ερεθισμάτων που επάγουν την παραγωγή του (57, 58, 59). Η έκθεση των υπεύθυνων για την παραγωγή G-CSF κυττάρων σε επαγωγείς όπως η λιποπολυσακχαρίδη, η IL-1 και ο TNF, οδηγεί σε μια παροδική αύξηση του χρόνου ημίσειας ζωής του mRNA του G-CSF, η οποία προκαλεί συσσώρευση του τελευταίου. Η έκτοπη παραγωγή G-CSF από καρκινικά κύτταρα μπορεί να προκαλείται από τέτοιου είδους συσσώρευση mRNA του G-CSF (25). Η ρύθμιση του γόνου του G-CSF γίνεται σε συνεργασία με τη ρύθμιση γόνων υπεύθυνων για την κωδικοποίηση άλλων κυτταροκινών όπως ο GM-CSF και η IL-6 σε κύτταρα όπως οι ινοβλάστες και τα μεσοθηλιακά (57, 58).

Η μεγάλη ποικιλία των κυττάρων που παράγουν G-CSF κάνει δυσχερή την πλήρη κατανόηση των μηχανισμών ρύθμισης της παραγωγής του μέσα σε αυτό το δίκτυο κυτταροκινών, κυττάρων που επάγουν την έκκριση κυτταροκινών και κυττάρων-στόχων που παράγουν αυξητικούς παράγοντες.

2.3 Υποδοχέας G-CSF

Η βιολογική δράση του G-CSF, όπως και άλλων κυτταροκινών, επιτυγχάνεται μέσω σύνδεσης με ειδικούς, υψηλής συγγένειας υποδοχείς στην επιφάνεια των αιμοποιητικών κυττάρων (60).

Ο υποδοχέας για τον G-CSF είναι μια πολυπεπτιδική αλυσος 813 αμινοξέων με μοριακό βάρος 130 (140) *kD* που διαθέτει δομικές ομοιότητες με τους υποδοχείς της ερυθροποιητίνης, ορισμένων ιντερλευκινών και της αυξητικής ορμόνης. Πρώτοι οι Nicola και Metcalf (1984-85) απέδειξαν την ύπαρξη του υποδοχέα στα κύτταρα της κοκκιώδους σειράς (31). Ο υποδοχέας για τον G-CSF εκφράζεται πάνω σε φυσιολογικά μυελικά κύτταρα καθώς επίσης και σε λευχαιμικά κύτταρα και κυτταρικές σειρές (61, 62, 63). Υποδοχείς G-CSF βρίσκονται και στην επιφάνεια των αιμοπεταλίων, μονοκυττάρων, μερικών T και B λεμφικών σειρών και σε μη αιμοποιητικά κύτταρα όπως τα ενδοθηλιακά κύτταρα (52, 64). Ο υποδοχέας εντοπίζεται σε όλες τις βαθμίδες διαφοροποίησης των κοκκιοκυττάρων, από τη μυελοβλάστη ως το ώριμο πολυμορφοπύρηνο. Ο αριθμός των υποδοχέων ανά κύτταρο αυξάνει καθώς τα μυελικά κύτταρα διαφοροποιούνται προς την κοκκιώδη σειρά.

Κωδικοποιείται από γονίδιο που εδράζει στο χρωμόσωμα 1, στην περιοχή 1p35-p34.3 (65). Με βάση τη δομική του ανάλυση ανήκει στην υπεροικογένεια των υποδοχέων των κυτταροκινών (16). Αποτελείται από ένα εξωκυττάριο, ένα διαμεμβρανικό και ένα κυτταροπλασματικό τμήμα. Στο εξωκυττάριο τμήμα βρίσκεται η περιοχή πρόσδεσης στο συνδέτη (ligand), πλούσια σε βάσεις κυστεΐνης. Στο κυτταροπλασματικό τμήμα εντοπίζεται μια περιοχή πλούσια σε προλίνη, κοντά στη μεμβράνη του κυττάρου, απαραίτητη για τη ενεργοποίηση των Jak κινασών και τη μετάδοση σημάτων για την έναρξη μιτωτικών διαιρέσεων. Το απομακρυσμένο από τη μεμβράνη τμήμα της κυτταροπλασματικής περιοχής, το οποίο αποτελεί το καρβοξυτελικό άκρο της πολυπεπτιδικής αλυσος του υποδοχέα, πλούσιο σε βάσεις τυροσίνης, είναι υπεύθυνο για τη μετάδοση σημάτων για ωρίμανση (66).

Η σηματοδότηση γίνεται μέσω επίδρασης του καρβοξυτελικού άκρου του

υποδοχέα με Jak κινάσες (64), η οποία επάγει μια σειρά αντιδράσεων που καταλήγουν στην ενεργοποίηση του γονιδίου και που συνοπτικά περιγράφονται παρακάτω. Την ενεργοποίηση των Jak κινασών ακολουθεί φωσφορυλίωση των βάσεων τυροσίνης του υποδοχέα και των μεταγραφικών πρωτεϊνών Stat1, Stat3, Stat5. Ακολουθεί μετανάστευση των πρωτεϊνών Stat στον πυρήνα του κυττάρου σε δραστική μορφή όπου ενεργοποιούν τη μεταγραφή του γονιδίου (67, 68, 69, 70). Εκτός από την ενεργοποίηση της οδού Jak-Stat ο υποδοχέας του G-CSF ενεργοποιεί και άλλες οδούς όπως η Ras-MAP (71, 72) και των κινασών Lyn Syk (73). Η ενεργοποίηση των Jak κινασών και της οδού Ras-MAP σχετίζεται με τον πολλαπλασιασμό των μυελικών κυττάρων, ενώ οι πρωτεΐνες Stat συμμετέχουν στη διαδικασία της διαφοροποίησης καθώς ενεργοποιούν γονίδια που είναι λειτουργικά συνδεδεμένα με διαφοροποιημένα κύτταρα.

Η ύπαρξη διαφορετικών λειτουργικών περιοχών στον υποδοχέα G-CSF που συμμετέχουν στη διαδικασία του πολλαπλασιασμού και της ωρίμανσης των μυελικών κυττάρων ενισχύει την υπόθεση ότι ο υποδοχέας του G-CSF χρησιμοποιεί διάφορα σηματοδοτικά μονοπάτια για να ενεργοποιήσει διαφορετικές βιολογικές λειτουργίες. Η ακεραιότητα και των δυο περιοχών του υποδοχέα είναι απαραίτητη για τη μετάδοση σήματος ωρίμανσης (74).

Επίκτητες σημειακές μεταλλάξεις που σχετίζονται με αποκοπή του καρβοξυτελικού άκρου του κυτταροπλασματικού τμήματος του υποδοχέα και αναστολή της μετάδοσης σημάτων για ωρίμανση έχουν βρεθεί σε πολλούς από τους ασθενείς με σοβαρή συγγενή ουδετεροπενία που μελετήθηκαν (75, 76, 77, 78, 79). Οι μεταλλάξεις αυτές επισυμβαίνουν τυχαία, δεν κληρονομούνται και δεν αποτελούν την αιτία της ουδετεροπενίας (79). Προκαλούνται από γενετική αστάθεια (genetic instability) και φαίνεται να σχετίζονται με την εξέλιξη της σοβαρής συγγενούς ουδετεροπενίας προς οξεία μυελογενή λευχαιμία (78, 79, 80). Έχουν βρεθεί και μεταλλάξεις που αφορούν βλάβες σε άλλες περιοχές της πολυπεπτιδικής αλυσού του υποδοχέα (81). Πολλά ερωτήματα παραμένουν αναπάντητα σχετικά με τις μεταλλάξεις του γονιδίου για τον υποδοχέα του G-CSF, όπως η καθοριστική ή απλώς συμπληρωματική συμβολή τους στη λευχαιμογένεση και η συμμετοχή τους στην εκδήλωση άλλων διαταραχών της κοκκιοποίησης.

Ο ρόλος του υποδοχέα του G-CSF στη ρύθμιση της κοκκιοποίησης έχει

μελετηθεί σε knock-out ποντίκια στα οποία έχει προκληθεί μετάλλαξη του γονιδίου για τον υποδοχέα του G-CSF. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι ο υποδοχέας του G-CSF ρυθμίζει τον αριθμό των προγονικών αιμοποιητικών κυττάρων, την παραγωγή ώριμων κοκκιοκυττάρων και την επιβίωση των ουδετεροφίλων. Φαίνεται όμως να υπάρχει και μηχανισμός ρύθμισης της κοκκιοποίησης που δεν εξαρτάται από τον υποδοχέα του G-CSF (64).

2.4 Βιολογικές ιδιότητες

Ο G-CSF επάγει τον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση των προγονικών αιμοποιητικών κυττάρων, μπορεί να μεταβάλλει τα λειτουργικά χαρακτηριστικά και τις βιοχημικές ιδιότητες των ώριμων ουδετεροφίλων και προάγει την επιβίωσή τους (82, 83). Έτσι, η θεραπευτική του δράση όταν χορηγείται *in vivo* οφείλεται όχι μόνο στην αύξηση του αριθμού των κυκλοφορούντων ουδετεροφίλων αλλά και στην προαγωγή της λειτουργικότητάς τους συμβάλλοντας στην προστασία έναντι των λοιμογόνων παραγόντων.

Παρακάτω αναλύεται η δράση του G-CSF στους διαφορετικούς τύπους κυττάρων (φυσιολογικά προγονικά αιμοποιητικά κύτταρα, μυελικά λευχαιμικά κύτταρα και κυτταρικές σειρές, ώριμα ουδετερόφιλα και μη αιμοποιητικά κύτταρα) όπως αυτή ασκείται *in vitro* και *in vivo*.

2.4.1 Προγονικά μυελικά κύτταρα

Ο G-CSF επάγει τον πολλαπλασιασμό των προγονικών αιμοποιητικών κυττάρων και την τελική διαφοροποίησή τους προς ώριμα ουδετερόφιλα κοκκιοκύτταρα (27, 84) και αυξάνει τη δεξαμενή ουδετεροφίλων του μυελού των οστών. Η δράση του στα φυσιολογικά αιμοποιητικά κύτταρα περιορίζεται σε ένα πληθυσμό σχετικά ώριμων μυελικών προγονικών κυττάρων ο οποίος έχει ήδη δεσμευτεί προς την κατεύθυνση των ουδετεροφίλων (25). Ο G-CSF μόνος του δεν επάγει την αυτοανανέωση των αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων (25). Σε

συνέργεια όμως με άλλες κυτταροκίνες (IL-3, GM-CSF) διεγείρει τον πολλαπλασιασμό και σε πιο πρώιμα στάδια της αιμοποίησης (25, 27, 85, 86, 87), προάγει την ανάπτυξη αποικιών προγονικών κυττάρων με κατεύθυνση διαφοροποίησης και προς τις τρεις σειρές του αίματος (CFU-GEMM) (25) και ωθεί ένα πληθυσμό αρχέγονων κυττάρων που βρίσκεται σε φάση ηρεμίας να ενταχθεί στη φάση S του κυτταρικού κύκλου, όπως έχουν δείξει *in vitro* μελέτες (86, 88).

Αξίζει να σημειωθεί ότι πολλές από τις συνεργικές δράσεις του G-CSF με άλλες κυτταροκίνες *in vitro* δεν έχουν παρατηρηθεί σε *in vivo* μελέτες. Για παράδειγμα, ο G-CSF θεωρείται λιγότερο δραστικό ερέθισμα για πολλαπλασιασμό σε σύγκριση με την IL-3 ή τον GM-CSF *in vitro*, εντούτοις, *in vivo*, χορηγούμενος σε ποντίκια προκαλεί πολύ μεγαλύτερη αύξηση του αριθμού των κοκκιοκυττάρων στο περιφερικό αίμα από ότι ο GM-CSF ή η IL-3 (27, 22).

Ο G-CSF προάγει και την επιβίωση των πρόδρομων αιμοποιητικών κυττάρων προφυλάσσοντας τα από κυτταρικό θάνατο καταστέλλοντας, όπως και άλλες κυτταροκίνες (IL-3, GM-CSF), την απόπτωση. Συμβάλλει έτσι στη ρύθμιση του μεγέθους των διαφόρων πληθυσμών πρόδρομων αιμοποιητικών κυττάρων στο μυελό των οστών (12, 89).

Πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι η ειδική δράση κάθε κυτταροκίνης εξαρτάται από το κυτταρικό περιβάλλον στο οποίο εκφράζεται ο υποδοχέας της. Έτσι κυτταροκίνες ειδικές για τη διέγερση της ερυθράς ή της κοκκιδώδους σειράς μπορούν να συμβάλλουν και στην μεγακαρυοποίηση εφόσον οι υποδοχείς τους εκφράζονται πάνω σε μεγακαρυοκύτταρα (90). Συγκεκριμένα σύμφωνα με τους Yang και συν ο G-CSF προκάλεσε αύξηση τόσο του αριθμού των αιμοπεταλίων του περιφερικού αίματος όσο και του αριθμού των μεγακαρυοκυττάρων στο σπλήνα διαγονιδιακών (transgenic) ποντικών που εξέφραζαν στην επιφάνειά τους υποδοχείς για αυτόν (90). Η ύπαρξη λειτουργικών υποδοχέων για τον G-CSF στην επιφάνεια των αιμοπεταλίων στον άνθρωπο δεν έχει επαρκώς τεκμηριωθεί.

Ο G-CSF διεγείρει *in vitro* το σχηματισμό αποικιών βλαστικών κυττάρων οξείας μυελογενούς λευχαιμίας (91) τα οποία εκφράζουν στην επιφάνειά τους υποδοχείς για τον G-CSF (92). Διεγείρει επίσης το σχηματισμό αποικιών κυττάρων από τις ανθρώπινες κυτταρικές λευχαιμικές σειρές HL-60 και KG-1 (26). Εντούτοις, μελέτη χορήγησης G-CSF *in vivo* σε ασθενείς με οξεία μυελογενή λευχαιμία σε

υποτροπή έδειξε ότι ο G-CSF επιτάχυνε την ανάκαμψη του αριθμού των ουδετεροφίλων κατά 7 ημέρες και ελάττωσε τον αριθμό των λοιμώξεων (93). Υπάρχουν στη βιβλιογραφία αρκετές αναφορές που υποστηρίζουν την ασφάλεια του G-CSF όταν χορηγείται σε ασθενείς με οξεία μυελογενή λευχαιμία (92, 94).

2.4.2 Μη αιμοποιητικά κύτταρα- Καρκινικές κυτταρικές σειρές

Ο G-CSF επάγει τον πολλαπλασιασμό και τη μετανάστευση ενδοθηλιακών κυττάρων στον άνθρωπο, τα οποία διαθέτουν υποδοχείς και ανταποκρίνονται στη δράση τόσο του G-CSF όσο και του GM-CSF. (26, 52). Η δράση του αυτή φαίνεται να συμβάλλει στη διαδικασία της παραγωγής του μυελικού στρώματος και της υποστήριξης του αιμοποιητικού μικροπεριβάλλοντος.

Ο G-CSF διεγείρει τον πολλαπλασιασμό κυτταρικών σειρών μικροκυτταρικού καρκίνου του πνεύμονα και καρκίνου του παχέος εντέρου (26, 27). Η *in vivo* χορήγηση G-CSF σε ασθενείς με καρκίνο και ουδετεροπενία δεν ευνοεί την ανάπτυξη των καρκινικών κυττάρων (95).

2.4.3 Ώριμα ουδετερόφιλα

Ο G-CSF προάγει τη λειτουργικότητα και την επιβίωση των ώριμων ουδετεροφίλων (60, 96, 97). Διεγείρει την απελευθέρωση αραχιδονικού οξέος και την παραγωγή αλκαλικής φωσφατάσης των λευκοκυττάρων (LAP) και μυελοϋπεροξειδάσης από τα ουδετερόφιλα. Επίσης διεγείρει την παραγωγή ανιόντος του υπεροξειδίου υπό την επίδραση του χημειοτακτικού πεπτιδίου f-Met-Leu-Phe (f-MLP) και προκαλεί αυξημένη αντισωματο-εξαρτώμενη κυτταροτοξικότητα (antibody-dependent cellular cytotoxicity-ADCC) (26, 27). Η ενίσχυση της παραγωγής ανιόντος του υπεροξειδίου παρατηρήθηκε σε *in vitro* και *in vivo* μελέτες χορήγησης G-CSF σε υγιείς εθελοντές και σε ασθενείς με καρκίνο (82). Ενισχύεται επίσης η respiratory burst activity των πολυμορφοκυττάρων υπό την επίδραση του G-CSF σε υγιείς εθελοντές (98).

Ο G-CSF δρα *in vitro* ως χημειοτακτικός παράγοντας για τα φυσιολογικά ουδετερόφιλα (99) και προκαλεί αύξηση της προσκολλητικής τους ικανότητας (adherence), της φαγοκυτταρικής τους ιδιότητας *in vitro* και *in vivo* και της βακτηριοκτόνου δράσης τόσο σε υγιείς όσο και σε ασθενείς με καρκίνο (82, 100).

Αύξηση της χημειοταξίας προκαλεί ο G-CSF και όταν επωάζεται με ουδετερόφιλα ασθενών με μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα που έχουν διαταραγμένη χημειοτακτική και φαγοκυτταρική ικανότητα, σε αντίθεση με τον GM-CSF ο οποίος σε αυτή την περίπτωση προκαλεί περαιτέρω μείωση της χημειοταξίας (82, 101). Ο G-CSF επίσης φαίνεται ότι μπορεί να διορθώσει και τη διαταραγμένη φαγοκυτταρική ικανότητα των ουδετεροφίλων ασθενών με μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα ή αντίδραση μοσχεύματος εναντίον ξενιστή (82).

Η αύξηση της προσκολλητικής ικανότητας των ουδετεροφίλων υπό την επίδραση του G-CSF φαίνεται να σχετίζεται με την ενίσχυση της έκφρασης του αντιγόνου CD11b της οικογένειας των β_2 -ιντεγκρινών στην επιφάνεια των ουδετεροφίλων που παρατηρείται τόσο μετά από χορήγηση G-CSF σε ασθενείς όσο και σε υγιείς (82, 83).

2.4.3.1 Η δράση του G-CSF στην απόπτωση των ουδετεροφίλων

Παρατηρείται καθυστέρηση της απόπτωσης των ώριμων ουδετεροφίλων τόσο υπό την επίδραση του G-CSF όσο και του GM-CSF και ενίσχυση της επιβίωσης των φυσιολογικών ουδετεροφίλων *in vitro* (82, 96, 97, 102) και *in vivo* (83, 103).

Ο μηχανισμός αντι-αποπτωτικής δράσης του G-CSF παραμένει αδιευκρίνιστος. Αυξημένη έκφραση πρωτεϊνών, όπως το CD55, που ρυθμίζουν τη δράση του συμπληρώματος στην επιφάνεια των ουδετεροφίλων μπορεί να αποτελούν ένα προστατευτικό μηχανισμό των ουδετεροφίλων έναντι του συμπληρώματος (103).

2.4.3.2 Ανοσορυθμιστική δράση (immunomodulating effect)

Η ανοσορυθμιστική δράση του G-CSF οφείλεται στην ανασταλτική επίδρασή του στην απελευθέρωση προφλεγμονωδών κυτταροκινών και στην αυξημένη παραγωγή ανταγωνιστών των κυτταροκινών όπως έχει δειχτεί σε μελέτες που

χορηγήθηκε σε υγιείς εθελοντές (98, 104). Η ανοσορυθμιστική δράση του G-CSF δεν επηρεάζεται σε συνθήκες διαταραγμένης ανοσίας (103).

2.4.3.3 Η δράση του G-CSF στην κινητική των ουδετεροφίλων

Η χορήγηση G-CSF σε υγιείς (105) έχει ως συνέπεια την αύξηση της παραγωγής πολυμορφοκυττάρων και τη μείωση του χρόνου ωρίμανσης τους στο μυελό από 5 μέρες σε 1 μέρα χωρίς να επηρεάζεται η κατανομή τους μεταξύ της δεξαμενής των κυκλοφορούντων και των προσκολλημένων στο αγγειακό ενδοθήλιο (marginal) ουδετεροφίλων (98, 106, 107). Η αύξηση του αριθμού των ουδετεροφίλων οφείλεται στην επιτάχυνση της ωρίμανσής τους στο μυελό των οστών και στην αυξημένη απόδοσή τους από το μυελό στο περιφερικό αίμα (60, 106) και εξαρτάται από τη δόση του χορηγούμενου παράγοντα.

Ενδοφλέβια χορήγηση G-CSF προκαλεί παροδική ουδετεροπενία που διαρκεί από 5 έως 60 λεπτά ανάλογα με την οδό χορήγησης και συνοδεύεται από σταθερή αύξηση του αριθμού των ουδετεροφίλων μέσα στις επόμενες ώρες (60, 82). Η ουδετεροφιλία που προκαλεί ο G-CSF οφείλεται στην επίδρασή του σε όλα τα στάδια του σχηματισμού των ουδετεροφίλων (60). Παρατηρείται έκπτυξη του διαμερίσματος των μυελικών κυττάρων κυρίως στο επίπεδο των προμυελοκυττάρων και μυελοκυττάρων στους υγιείς και στο επίπεδο των μυελοβλαστών σε ασθενείς με μυελοδυσπλαστικό σύνδρομο ή οξεία μυελογενή λευχαιμία (98). Με μεγαλύτερες δόσεις G-CSF (≥ 10 $\mu\text{g}/\text{κιλό B}\Sigma$) παρατηρείται μικρή αύξηση και των μονοκυττάρων και λεμφοκυττάρων του περιφερικού αίματος. Η στροφή προς τα αριστερά στον πληθυσμό των κοκκιοκυττάρων που παρατηρείται υπό την επίδραση του G-CSF οφείλεται στην αύξηση των ανώριμων μορφών τους εις βάρος των ωρίμων (28).

Ο χρόνος ημίσειας ζωής των ουδετεροφίλων που παράγονται υπό την επίδραση του G-CSF παραμένει φυσιολογικός στις 8 ώρες (28, 82, 107). Μετά τη διακοπή του παράγοντα, τα επίπεδα των κυκλοφορούντων ουδετεροφίλων επανέρχονται στις βασικές τιμές τους μετά από 4 έως 7 μέρες (28).

2.4.3.4 Η επίδραση του G-CSF στη μορφολογία των ουδετεροφίλων

Τα ουδετερόφιλα που απελευθερώνονται από το μυελό υπό την επίδραση του G-CSF έχουν μερικές μορφολογικές διαφορές συγκρινόμενα με αυτά που παράγονται χωρίς εξωγενή επίδραση G-CSF (82, 106). Είναι μεγαλύτερα σε μέγεθος (82), έχουν μορφολογικά χαρακτηριστικά ανωριμότητας, μειωμένη λόβωση του πυρήνα, μειωμένη κοκκίωση και υπερκατάτμηση. Έχουν διαφορετική έκφραση πρωτεϊνών στην επιφάνειά τους και μειωμένη ικανότητα να μεταναστεύουν στους ιστούς σε συγκεκριμένη φλεγμονώδη εστία, αν δεν υπάρχει πολύ ισχυρό ερέθισμα (106). Η μειωμένη ικανότητα μετανάστευσης (83) σχετίζεται και με την παρατηρούμενη μειωμένη ικανότητα έκφρασης F-ακτίνης (82, 83).

Οι παρατηρούμενες μεταβολές στο φαινότυπο και στη λειτουργία των ουδετεροφίλων μετά από χορήγηση G-CSF μπορεί να οφείλονται σε ενεργοποίηση των ουδετεροφίλων, δευτερογενή παραγωγή κυτταροκινών ή μερική ανωριμότητα των παραγόμενων ουδετεροφίλων.

2.4.3.5 Ο ρόλος του G-CSF στις λοιμώξεις

Σε μη ουδετεροπενικούς ασθενείς με λοιμώξεις ο G-CSF προκαλεί λευκοκυττάρωση και ενισχύει λειτουργίες των ουδετεροφίλων όπως την παραγωγή O_2^- και την προσκολλητική τους ικανότητα. Η ενεργοποίηση φλεγμονωδών αντιδράσεων (inflammatory cascade) σε σοβαρές λοιμώξεις μετά από χορήγηση G-CSF αυξάνει το κίνδυνο για ιστική βλάβη και ανεπάρκειες οργάνων (82). Εντούτοις, η θεραπευτική χορήγησή του σε μη ουδετεροπενικούς ασθενείς με λοιμώξεις είναι αμφιλεγόμενη, όπως αναπτύσσεται εκτενέστερα στο κεφάλαιο 2.6.

Όταν χορηγείται σε ασθενείς με δευτεροπαθή ουδετεροπενία λόγω χημειοθεραπείας ή σοβαρή συγγενή ουδετεροπενία ενισχύει τη λειτουργικότητα και την αντιμικροβιακή δράση των ουδετεροφίλων μειώνοντας έτσι τον αριθμό των επεισοδίων λοιμώξεων (108, 109).

2.5 Φαρμακοκινητική

Ο παράγοντας μπορεί να χορηγηθεί ενδοφλέβια και υποδόρια, με τα ίδια αποτελέσματα στην αύξηση του αριθμού των ουδετεροφίλων (94), συνήθως όμως προτιμάται η υποδόρια οδός.

Η μέγιστη συγκέντρωση στον ορό επιτυγχάνεται 2-8 ώρες μετά από υποδόρια χορήγηση και είναι ανάλογη της χορηγούμενης δόσης (98, 110). 24 ώρες μετά την υποδόρια χορήγηση τα επίπεδα του G-CSF μπορεί να είναι ακόμα αυξημένα (111).

Ο όγκος κατανομής για τη μη-γλυκοζυλιωμένη μορφή είναι κατά μέσο όρο 150 ml/ kg BΣ σε φυσιολογικά άτομα και ο χρόνος ημίσειας ζωής 3-4 ώρες ανεξάρτητα από την οδό χορήγησης (98). Ο ρυθμός κάθαρσης έχει υπολογιστεί σε 0.5–0.7 ml/min/kg και δε συστήνεται προσαρμογή της δόσης σε ασθενείς με νεφρική ή ηπατική ανεπάρκεια.

Η απορρόφηση από την κυκλοφορία ξεκινά αμέσως μετά τη χορήγηση και η βιοδιαθεσιμότητα του παράγοντα επηρεάζεται από την απομάκρυνσή του από την κυκλοφορία μέσω των ουδετεροφίλων που έχουν παραχθεί υπό την επίδρασή του (28, 94, 110, 111). Ο χρόνος ημίσειας ζωής των ουδετεροφίλων φαίνεται να ελαττώνεται όσο αυξάνονται ο αριθμός των ουδετεροφίλων και ο ρυθμός κάθαρσης του G-CSF (110, 111). Ο αρνητικός παλίνδρομος αυτός μηχανισμός συμβάλει στη διατήρηση του αριθμού των ουδετεροφίλων σε επιθυμητά επίπεδα.

2.6 Κλινική χρήση. Ενδείξεις χορήγησης. Ασφάλεια χρήσης

Ανασυνδυσασμένος ανθρώπινος G-CSF έχει παραχθεί με τη μέθοδο της γενετικής μηχανικής και κυκλοφορεί σε δύο μορφές: γλυκοζυλιωμένος (lenograstim) και μη γλυκοζυλιωμένος (filgrastim). Δεν υπάρχει διαφορά στη βιολογική δραστηριότητα μεταξύ των δύο μορφών του παράγοντα (28, 112). Τελευταία παράχθηκε μορφή με την προσθήκη ενός μορίου πολυαιθυλενογλυκόλης στο μόριο

του μη γλυκοζυλιωμένου παράγοντα που έχει σα συνέπεια αυξημένο χρόνο ημίσειας ζωής και μειωμένο ρυθμό κάθαρσης ώστε να είναι δυνατή η χορήγηση μίας μόνο δόσης για την επίτευξη του επιθυμητού αποτελέσματος. Οι μέχρι στιγμής μελέτες δείχνουν ότι έχει την ίδια ικανότητα να διεγείρει την κοκκιοποίηση και την ίδια επίδραση στην κινητική των ουδετεροφίλων με το filgrastim (113, 114).

Η θεραπευτική χορήγηση G-CSF στην κλινική πράξη έχει μελετηθεί εκτενώς στις ακόλουθες ουδετεροπενικές και μη καταστάσεις: αντιμετώπιση της μυελοκαταστολής λόγω χημειοθεραπείας, αντιμετώπιση της εμπύρετης ουδετεροπενίας λόγω χημειοθεραπείας σε ασθενείς με συμπαγείς όγκους και αιματολογικές κακοήθειες, προφυλακτική χορήγηση με σκοπό την εντατικοποίηση της χημειοθεραπείας, ουδετεροπενία μετά από μεταμόσχευση μυελού των οστών, ουδετεροπενία στα πλαίσια μυελοδυσπλαστικού συνδρόμου και απλαστικής αναιμίας, σοβαρή χρόνια ουδετεροπενία (συγγενής ουδετεροπενία, κυκλική, ιδιοπαθής ουδετεροπενία), κινητοποίηση αιμοποιητικών κυττάρων περιφερικού αίματος, μη ουδετεροπενικές καταστάσεις όπως AIDS, λοιμώξεις, νεογνική σηψαιμία, μεταμοσχεύσεις ήπατος (28, 94).

Η αποτελεσματικότητα της θεραπείας με G-CSF κρίνεται από την επίδρασή του στη διάρκεια της ουδετεροπενίας, στη συχνότητα εκδήλωσης λοιμώξεων ή εμπύρετου ουδετεροπενίας, στη διάρκεια χορήγησης αντιβιοτικών, στη συχνότητα και διάρκεια παραμονής σε νοσοκομείο, στη θνησιμότητα λόγω λοιμώξεων, στη δυνατότητα εντατικοποίησης της χημειοθεραπείας για αντιμετώπιση του υποκείμενου κακοήθους νοσήματος και στην ποιότητα ζωής των ασθενών.

Με βάση την αποτελεσματικότητα του G-CSF, όπως εκτιμήθηκε από πολλές κλινικές μελέτες της τελευταίας δεκαετίας (94) που αφορούσαν συνολικά μεγάλο αριθμό κυρίως ενηλίκων ασθενών αλλά και παιδιών (115, 116), διαμορφώθηκαν σαφείς ενδείξεις χορήγησής του (117, 118, 119).

Για τα παιδιά που λαμβάνουν χημειοθεραπεία συνιστάται η χορήγηση G-CSF όταν υπάρχει σοβαρή ουδετεροπενία με συνοδό αποδεδειγμένη βακτηριδιακή ή μυκητιασική λοίμωξη που καθυστερεί τη θεραπεία ή δυο επεισόδια προηγηθείσας σοβαρής και παρατεταμένης ουδετεροπενίας ανεξάρτητα από την εκδήλωση λοίμωξης. Συστητάται η προφυλακτική χορήγηση G-CSF σε ενήλικες ή παιδιά που λαμβάνουν χημειοθεραπεία και αποτελούν ομάδα υψηλού κινδύνου για την

εκδήλωση λοιμώξεων λόγω ιστορικού επανειλημμένων επεισοδίων εμπυρέτου ουδετεροπενίας, ελαττωμένης ανοσολογικής ικανότητας, ενεργού ιστικής λοίμωξης ή εντατικής χημειοθεραπεία λόγω κακοήθειας προχωρημένου σταδίου. Συζητάται επίσης η χορήγηση G-CSF σε ενήλικες με μεγάλης διάρκειας ουδετεροπενία που οδηγεί σε σημαντική μείωση της χορηγούμενης χημειοθεραπευτικής δόσης ή καθυστέρηση της θεραπείας (117).

Ο G-CSF χορηγείται σε ασθενείς που υποβάλλονται σε αυτόλογη ή αλλογενή μεταμόσχευση αιμοποιητικών κυττάρων τόσο για την κινητοποίηση των προγονικών κυττάρων του περιφερικού αίματος όσο και για την ταχύτερη αποκατάσταση της αιμοποίησης μετά τη μεταμόσχευση (118). Σε περίπτωση αποτυχίας εγκατάστασης του μοσχεύματος συνιστάται επίσης η χορήγηση G-CSF (117).

Η χορήγηση του G-CSF μαζί με αντιβιοτικά για την αντιμετώπιση της εμπυρέτου ουδετεροπενίας συνιστάται μόνο στην περίπτωση ουδετεροπενικών ενηλίκων ή παιδιών αυξημένου κινδύνου με συνυπάρχουσα μυκητιασική λοίμωξη, πνευμονία, επιβεβαιωμένη λοίμωξη από *Pseudomonas*, υπόταση ή πολλαπλή δυσλειτουργία οργάνων. Επίσης, επειδή τα βρέφη αποτελούν ομάδα υψηλού κινδύνου συνιστάται η χορήγηση G-CSF σε αυτή την ηλικιακή ομάδα όταν λαμβάνουν χημειοθεραπεία και εκδηλώνουν εμπύρετη ουδετεροπενία (118).

Η χρήση του G-CSF για την αντιμετώπιση της σοβαρής χρόνιας ουδετεροπενίας στα παιδιά ξεκίνησε το 1989 (120, 121, 122). Μια μεγάλη πολυκεντρική τυχαιοποιημένη μελέτη 3^{ης} φάσεως σε 123 ασθενείς με σοβαρή χρόνια ουδετεροπενία (122) έδειξε ότι η θεραπεία με G-CSF είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση του αριθμού των κυκλοφορούντων ουδετεροφίλων και τη μείωση των επεισοδίων λοιμώξεων. Η μακροχρόνια χορήγηση που απαιτείται σε αυτές τις περιπτώσεις δε συνοδεύεται από σοβαρές ανεπιθύμητες ενέργειες ή τοξικότητα, δεν οδηγεί σε εξάντληση του μυελού ή στη δημιουργία αντι-G-CSF αντισωμάτων (123).

Η θεραπευτική δόση του G-CSF για τη συγγενή ουδετεροπενία (σύνδρομο Kostmann) που ξεκινά από 5 μg/kg/ημέρα μπορεί να αυξηθεί σταδιακά μέχρι την επίτευξη αύξησης του αριθμού των ουδετεροφίλων σε επίπεδα $\geq 1 \times 10^9/l$. Σύμφωνα με το Διεθνές αρχείο καταγραφής της σοβαρής χρόνιας ουδετεροπενίας (Severe Chronic Neutropenia International Registry-SCNIR) πάνω από 95% των ασθενών απαντούν στη θεραπεία με G-CSF, οι περισσότεροι λαμβάνοντας δόσεις που κυμαίνονται από 3

έως 10 μg/kg/ημέρα (79).

Έχουν γίνει κλινικές μελέτες για τη χρήση του G-CSF και σε άλλες μορφές ουδετεροπενιών όπως σε αυτή που εμφανίζεται στα πλαίσια του συνδρόμου Shwachman-Diamond (124), στη γλυκογονίαση τύπου 1β (125, 126) καθώς και σε περιπτώσεις πρωτοπαθούς και δευτεροπαθούς αυτοάνοσης ουδετεροπενίας (94), αλλά τα μέχρι στιγμής δεδομένα δε συνιστούν τις παραπάνω περιπτώσεις σαφείς ενδείξεις χορήγησης G-CSF στην κλινική πράξη. Η χρήση του σε αυτές τις καταστάσεις προτείνεται μόνο στην περίπτωση συνύπαρξης με σοβαρές ή απειλητικές για τη ζωή λοιμώξεις. Στην ίδια περίπτωση συνιστάται και η θεραπεία υποστήριξης με G-CSF σε ασθενείς με επίκτητη απλαστική αναιμία ή μυελοδυσπλαστικό σύνδρομο.

Όσον αφορά τη χορήγηση G-CSF στη νεογνική σηψαιμία οι μελέτες που έχουν ολοκληρωθεί μέχρι στιγμής δεν οδηγούν σε σαφή συμπεράσματα για την αναγκαιότητα χρήσης του παράγοντα, αν και τα αποτελέσματά τους δείχνουν μια τάση μείωσης της θνησιμότητας (127). Υπάρχουν μελέτες για την αποτελεσματικότητα της χρήσης του G-CSF στην αντιμετώπιση της αλλοάνοσης νεογνικής ουδετεροπενίας σε τελειόμηνα και πρόωρα νεογνά (128, 129, 130, 131). Οι Christensen και συν συστήνουν τη θεραπεία με G-CSF σε νεογνά με ουδετεροπενία που νοσηλεύονται σε μονάδα εντατικής θεραπείας όταν ο απόλυτος αριθμός πολυμορφοκυττάρων είναι μικρότερος το 500/μl για 2 ή 3 ημέρες ή όταν κυμαίνεται από 501 έως 999/μl για πάνω από 5 έως 7 ημέρες (131). Ωστόσο η ομάδα των ερευνητών που συνέταξε οδηγίες για τη χρήση των αυξητικών παραγόντων στην παιδιατρική πράξη θεωρεί ότι τα δεδομένα από τις μελέτες στα νεογνά δεν επαρκούν για την καθιέρωση της χρήσης του G-CSF στην ομάδα αυτή.

Σε όλες τις μελέτες που έχουν διεξαχθεί μέχρι σήμερα ο G-CSF ήταν καλά ανεκτός και δεν προκάλεσε σοβαρές ανεπιθύμητες ενέργειες. Έχουν αναφερθεί πόνοι στα οστά (10-20%), οστεοπενία, οστεοπόρωση (16%), αγγείτιδες (4%), σπληνομεγαλία, τοπικές αντιδράσεις (σπάνια), θρομβοπενία (2%).

Γενικά, χρήση του G-CSF θεωρείται ασφαλής και οδηγεί σε βελτίωση της ποιότητας της ζωής των ασθενών. Παρ'όλα αυτά, η Αμερικάνικη Εταιρεία Κλινικής Ογκολογίας συνιστά λιγότερη και ακόμα πιο συνετή χρήση του και όλοι οι μελετητές συνηγορούν υπέρ της διεξαγωγής περισσότερων κλινικών δοκιμών για τη διασφάλιση από τις απώτερες επιπλοκές λόγω χορήγησής του. Τελευταία μελέτη αντιμετωπίζει

την πιθανότητα απώτερης επίδρασης του G-CSF στην ανοσία (132).

3. ΚΟΚΚΙΟΚΥΤΤΑΡΙΚΕΣ ΔΙΑΤΑΡΑΧΕΣ

Οι πρωτοπαθείς κοκκιοκυτταρικές διαταραχές είναι σπάνιες και κατά κανόνα εκδηλώνονται στην παιδική ηλικία με συχνές και σοβαρές λοιμώξεις από ευκαιριακά παθογόνα. Συχνά συνοδεύονται και από συστηματικά συμπτώματα. Διακρίνονται σε ποσοτικές και ποιοτικές ανάλογα με το αν επηρεάζεται ο αριθμός ή η λειτουργία των κοκκιοκυττάρων.

Οι ποιοτικές διαταραχές των ουδετεροφίλων διακρίνονται σε διαταραχές του οξειδωτικού ή του μη-οξειδωτικού μηχανισμού άμυνας των ουδετεροφίλων, ανάλογα αν ενεργοποιείται η NADPH οξειδάση για την παραγωγή ενεργών οξειδωτικών παραγώγων για την άμυνα έναντι των παθογόνων. Αφορούν διαταραχές στο σχηματισμό των κοκκίων, στην προσκόλληση των ουδετεροφίλων στην επιφάνεια του ενδοθηλίου, στη μετανάστευση των ουδετεροφίλων στους ιστούς, στη χημειοταξία ή στη φαγοκυτταρική τους ικανότητα. Παραδείγματα διαταραχής του οξειδωτικού μεταβολισμού είναι η χρόνια κοκκιωματώδης νόσος, ενώ του μη-οξειδωτικού μεταβολισμού οι διαταραχές των ουδετεροφιλικών κοκκίων (σύνδρομο Chediak-Higashi) και οι διαταραχές της προσκόλλησης των ουδετεροφίλων στο αγγειακό ενδοθήλιο (Leukocyte Adhesion Deficiency) (133).

Οι ποσοτικές διαταραχές των ουδετεροφίλων παρουσιάζονται αναλυτικά στο κεφάλαιο IV του γενικού μέρους.

III. ΜΟΡΙΑ ΠΡΟΣΚΟΛΛΗΣΗΣ

1. ΓΕΝΙΚΑ

Τα μόρια προσκόλλησης αποτελούν ομάδα μεμβρανικών μορίων που ρυθμίζουν τις αλληλεπιδράσεις των κυττάρων μεταξύ τους, την προσκόλληση των κυττάρων σε δομές του αιμοποιητικού μικροπεριβάλλοντος και την έξοδο των κυττάρων από την κυκλοφορία στους ιστούς. Με βάση τα δομικά χαρακτηριστικά τους διακρίνονται σε τρεις ομάδες: τις *ιντεγκρίνες*, τα *μόρια ανοσοσφαιρινικής δομής* και τις *σελεκτίνες*. Στα μόρια προσκόλλησης εντάσσονται και οι μοριακές δομές που αντιδρούν στερεοχημικά με τις *ιντεγκρίνες*, τα *μόρια ανοσοσφαιρινικής δομής* και τις *σελεκτίνες* και που ονομάζονται « *μόρια σύνδεσης* ». (134, 135, 136, 137, 138)

1.1 *Ιντεγκρίνες*

Οι *ιντεγκρίνες* (139) παίζουν ρόλο στη μετανάστευση των κυττάρων του αίματος, στις διαδικασίες αιμόστασης, θρόμβωσης, επούλωσης τραυμάτων, στην ογκογένεση καθώς και στις αντιδράσεις άμυνας του οργανισμού. Αποτελούνται από δύο τύπους διαμεμβρανικών πολυπεπτιδίων, τις αλυσούς α που ορίζουν τον τύπο και τις β που ορίζουν την ομάδα της *ιντεγκρίνης*. Μέχρι σήμερα έχουν αναγνωριστεί οκτώ είδη β - αλύσεων που ορίζουν οκτώ ομάδες *ιντεγκρινών* ($\beta_1, \beta_2, \dots, \beta_8$) και 15 είδη α - αλύσεων. Στην κυκλοφορία των κυττάρων του αίματος και στις κυτταρικές αλληλεπιδράσεις ιδιαίτερο ρόλο διαδραματίζουν οι *ιντεγκρίνες* των ομάδων $\beta_1, \beta_2, \beta_3$ και β_7 .

Οι β_1 - *ιντεγκρίνες* εμπλέκονται κυρίως στην προσκόλληση των κυττάρων στις πρωτεΐνες της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας του αιμοποιητικού μικροπεριβάλλοντος (extracellular matrix ECM) (139) και περιλαμβάνουν 6 μόρια που φέρονται με την ονομασία αντιγόνα VLA (Very Late Antigen) γιατί εμφανίζονται αργά στην

διαφοροποίηση των κυττάρων (140, 141, 142, 143). Όλα τους χαρακτηρίζονται με το μονοκλωνικό αντίσωμα αντι-CD29.

Οι β_2 -ιντεγκρίνες διαδραματίζουν ρόλο στην προσκόλληση των λευκών αιμοσφαιρίων στο ενεργοποιημένο ενδοθήλιο και τις ανοσολογικές μεταξύ των κυττάρων αντιδράσεις (144). Στην ομάδα αυτή περιλαμβάνονται το LFA-1 (Lymphocyte Function Antigen-1) και οι υποδοχείς του συμπληρώματος CR3 ή Mac-1 ή CD11b/CD18 και CR4 ή p150,95. Και τα τρία αυτά μόρια χαρακτηρίζονται με το μονοκλωνικό αντίσωμα αντι-CD18. Το LFA-1 το οποίο εκφράζεται σχεδόν σε όλα τα λευκά αιμοσφαίρια (145) και εμπλέκεται, μεταξύ άλλων, και στη δίοδο των κυττάρων στους ιστούς μέσω του ενδοθηλίου των αγγείων αντιδρά στερεοχημικά με τα ICAM-1 και ICAM-2 των ενδοθηλίων και με το μόριο ICAM-3 των λευκοκυττάρων που αποτελούν και τα μόρια σύνδεσής του (145, 146, 147). Η συγγενής, μερική ή ολική έλλειψη της β_2 -αλυσού των ιντεγκρινών, γνωστή και ως σύνδρομο LAD-1 (Leukocyte Adhesion Deficiency-1) (145, 148) χαρακτηρίζεται από μειωμένη μετανάστευση των ουδετερόφιλων πολυμορφοπύρηνων στις περιοχές της φλεγμονής, πολυμορφοπυρήνωση στο περιφερικό αίμα και αυξημένη ευαισθησία στις βακτηριακές λοιμώξεις.

Οι β_3 -ιντεγκρίνες εκφράζονται στην επιφάνεια των ενεργοποιημένων αιμοπεταλίων και χαρακτηρίζονται με το μονοκλωνικό αντίσωμα αντι-CD61 (149, 150). Οι β_7 -ιντεγκρίνες παίζουν ρόλο στην εκλεκτική μετανάστευση (homing) των λεμφοκυττάρων στο λεμφικό ιστό ιδιαίτερα του βλεννογόνου του εντέρου και των βρόγχων (134, 151).

1.2 Μόρια προσκόλλησης ανοσοσφαιρινικής δομής

Τα μόρια προσκόλλησης ανοσοσφαιρινικής δομής ανήκουν δομικά στην υπεροικογένεια των ανοσοσφαιρινών. Από αυτά τα ICAM-1 και ICAM-2 (Intercellular Adhesion Molecules-1 και 2), το VCAM-1 (Vascular Cell Adhesion Molecule-1) (152, 153, 154), το PECAM-1 (Platelet- Endothelial Cell Adhesion

Molecule-1) (155) και το MAdCAM-1 (Mucosal Addressin Cell Adhesion Molecule-1) (156) εκφράζονται στα ενδοθηλιακά κύτταρα και παίζουν σημαντικό ρόλο στην προσκόλληση των κυττάρων του αίματος στο αγγειακό ενδοθήλιο προ της εξόδου τους στους ιστούς. Χαρακτηρίζονται με τα αντισώματα αντι-CD54 και αντι-CD102 αντι-CD31 και MECA-367, αντίστοιχα (Πίνακας Α).

Το ICAM-1 είναι μια μεμβρανική γλυκοπρωτεΐνη με ποικίλλοντα βαθμό γλυκοζυλίωσης και μοριακό βάρος 55 kD. Αποτελείται από μία μόνο πολυπεπτιδική άλυσιο, το εξωκυττάριο τμήμα της οποίας έχει πέντε περιοχές ανοσοσφαιρινικής δομής. Εκφράζεται στην επιφάνεια των ενδοθηλιακών κυττάρων μετά από ενεργοποίηση των τελευταίων με την επίδραση της IL-1 β και του TNF- α (135). Η παρουσία του εκεί διευκολύνει την προσκόλληση των λεμφοκυττάρων (μέσω του LFA-1), των ουδετερόφιλων πολυμορφοπύρηνων και των μονοκυττάρων (κυρίως μέσω του Mac-1) στο ενδοθήλιο και το πέρασμα τους στους ιστούς σε περίπτωση ιστικής φλεγμονής και διατηρείται για διάστημα 8 – 96 ωρών από την επίδραση του φλεγμονώδους παράγοντα. Εκφράζεται επίσης στην επιφάνεια των διεγερμένων T και B λεμφοκυττάρων, των NK (Natural Killer) κυττάρων, των αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων και πολλών κυττάρων-στόχων, διευκολύνοντας τη συγκράτηση των κυττάρων μεταξύ τους. Το ICAM-2 απαντάται σχεδόν αποκλειστικά στα ενδοθήλια (137), αλλά η έκφρασή του δεν εξαρτάται από την παρουσία της IL-1 β ή του TNF- α , εξασφαλίζοντας πιθανώς έτσι το πέρασμα των λεμφοκυττάρων στους ιστούς υπό φυσιολογικές συνθήκες. Σε περίπτωση φλεγμονής που απαιτείται μαζική έξοδος κυττάρων το ενδοθήλιο ενεργοποιείται και εκφράζει ICAM-1 μόρια (151).

Το VCAM-1 εκφράζεται στα ενδοθηλιακά κύτταρα μόνο μετά από ενεργοποίηση με IL-1 β , TNF- α ή IL-4 (151, 154). Η γλυκοπρωτεΐνη PECAM-1 εκφράζεται σταθερά στη μεμβράνη των ενδοθηλιακών κυττάρων, όπως επίσης και στα λευκά αιμοσφαίρια και στα αιμοπετάλια. Το μόριο αυτό εκφράζεται στη μεταξύ των ενδοθηλιακών κυττάρων επιφάνεια της μεμβράνης και παίζει σημαντικό ρόλο στη συγκράτηση των ενδοθηλιακών κυττάρων μεταξύ τους και στη μετανάστευση των λευκών αιμοσφαιρίων (transendothelial migration).

Πίνακας Α: Ανοσοσφαιρινικού τύπου μόρια προσκόλλησης

Ομάδα	Κατανομή
ICAM-1(CD 54)	Ενδοθηλιακά κύτταρα, κύτταρα αρθρικού υμένα, δενδριτικά, επιθηλιακά κύτταρα, ενεργοποιημένα λεμφοκύτταρα
ICAM-2 (CD 102)	Ενδοθηλιακά κύτταρα, αιμοποιητικές κυτταρικές σειρές
ICAM-3 (CD 50)	Μη διεγερμένα λευκοκύτταρα
VCAM-1 (CD 106)	Ενδοθηλιακά κύτταρα, κύτταρα αρθρικού υμένα, δενδριτικά κύτταρα, ινοβλάστες μυελού των οστών
PECAM-1 (CD 31)	Ενδοθηλιακά κύτταρα, αιμοπετάλια, λευκοκύτταρα, λείες μυϊκές ίνες
MadCAM-1	Ενδοθήλιο του λεμφικού ιστού βλεννογόνων

1.3 Σελεκτίνες

Οι σελεκτίνες (157) είναι μεμβρανικές γλυκοπρωτεΐνες και διακρίνονται σε τρεις τύπους: την L- σελεκτίνη που εκφράζεται στα λευκοκύτταρα και αντιδρά με το αντίσωμα αντι-CD62L, την P- σελεκτίνη που εκφράζεται στα αιμοπετάλια και το ενδοθήλιο και χαρακτηρίζεται με το αντίσωμα αντι-CD62P και την E- σελεκτίνη που εκφράζεται στα ενεργοποιημένα μετά από επίδραση IL-1β, TNF-α ή ενδοτοξίνης LPS ενδοθηλιακά κύτταρα και αντιδρά με το αντίσωμα αντι-CD62E (Πίνακας Β). Όλες οι σελεκτίνες έχουν την ίδια μοριακή δομή. Αποτελούνται από μια πολυπεπτιδική άλυσο η οποία προς το αμινοξυτελικό άκρο της έχει δομή όμοια με αυτή των λεκτινών (lectin-like domain). Ακολουθεί τμήμα με δομή όμοια με αυτή του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα, μια περιοχή που αποτελείται από επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες, ένα μικρό διαμεμβρανικό τμήμα και ένα κυτταροπλασματικό τμήμα προς το καρβοξυτελικό άκρο. Η σύνθεση των σελεκτινών κωδικοποιείται από γονίδια στο μακρύ σκέλος του χρωμοσώματος 1.

Οι σελεκτίνες παίζουν πρωτεύοντα ρόλο στην πρώτη επαφή (tethering) και τη διολίσθηση (rolling) των κυττάρων του αίματος πάνω στο ενεργοποιημένο ενδοθήλιο των αγγείων (158, 159). Η E-σελεκτίνη (ELAM-1) εκφράζεται στην επιφάνεια των ενδοθηλιακών κυττάρων εντός 4-12 ωρών από την επίδραση του φλεγμονώδους παράγοντα και διατηρείται για 24 ώρες, ενώ στη συνέχεια ελαττώνεται στα βασικά της επίπεδα ακόμα και υπό τη συνεχή επίδραση του παράγοντα που διεγείρει την

έκφρασή της (158). Η έκφραση της E-σελεκτίνης περιορίζεται στο ενεργοποιημένο ενδοθήλιο.

Όλες οι σελεκτίνες αναγνωρίζουν και αντιδρούν με μόρια που φέρουν μικρές υδατανθρακικές αλυσούς πλούσιες σε σιαλικό οξύ και φουκόζη (160). Άτομα με συγγενή διαταραχή του μεταβολισμού της φουκόζης παρουσιάζουν κλινική εικόνα ανάλογη με αυτή του συνδρόμου LAD-1 (Leukocyte Adhesion Deficiency-1), γνωστή και ως LAD-II, οφειλόμενη στην αδυναμία προσκόλλησης των ουδετεροφίλων στην E- και P- σελεκτίνη του ενεργοποιημένου ενδοθηλίου λόγω έλλειψης μεμβρανικών ολιγοσακχαριτών όπως του SLe^x (134, 145).

Πίνακας Β: Σελεκτίνες

Ομάδα	Κατανομή
E-σελεκτίνη (CD62E)	Ενεργοποιημένο ενδοθήλιο
L-σελεκτίνη (CD62L)	Μη ενεργοποιημένα λευκοκύτταρα
P-σελεκτίνη (CD62P)	Ενεργοποιημένο ενδοθήλιο, ενεργοποιημένα αιμοπετάλια

Ενεργοποιημένα T-και B- λεμφοκύτταρα, μονοκύτταρα και ενδοθηλιακά κύτταρα απελευθερώνουν τα μόρια προσκόλλησης που βρίσκονται στην επιφάνειά τους στον ορό σε διαλυτή μορφή μετά από ειδική πρωτεολυτική αποκοπή του εξωκυττάριου τμήματος των μορίων. Τα διαλυτά μόρια προσκόλλησης κυκλοφορούν στον ορό και μπορούν να ανιχνευτούν και να προσδιοριστούν με την ανοσοενζυμική τεχνική ELISA (135). Στον ορό των φυσιολογικών ατόμων ανιχνεύονται οι διαλυτές μορφές των σελεκτινών και των μορίων ανοσοσφαιρινικής δομής (161).

2. Ο ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ ΜΟΡΙΩΝ ΠΡΟΣΚΟΛΛΗΣΗΣ ΣΤΗΝ ΚΥΚΛΟΦΟΡΙΑ ΤΩΝ ΛΕΥΚΟΚΥΤΤΑΡΩΝ

Η κυκλοφορία των λευκοκυττάρων και η μετανάστευσή τους στους ιστούς είναι μια πολύπλοκη διαδικασία που καθορίζεται από το είδος των κυττάρων, το βαθμό ενεργοποίησής τους, από την κατάσταση ενεργοποίησης του αγγειακού ενδοθηλίου και από την παρουσία χημειοτακτικών παραγόντων σε φλεγμαίνουσες περιοχές. Κάθε τύπος κυττάρου ακολουθεί διαφορετικό τρόπο κυκλοφορίας. Έτσι, τα ουδετερόφιλα και τα μονοπύρηννα εξέρχονται στους ιστούς ως απάντηση σε φλεγμονώδες ερέθισμα και δεν επανέρχονται ποτέ στην κυκλοφορία, ενώ τα λεμφοκύτταρα κυκλοφορούν συνεχώς (162).

Τα κυκλοφορούντα λευκοκύτταρα μέσα στα αγγεία, υποβοηθούμενα από τη ροή του αίματος, προσκρούουν (tether) πάνω στο ενεργοποιημένο ενδοθήλιο και συγκρατούνται χαλαρά πάνω σε αυτό λόγω αλληλεπίδρασης μεταξύ σελεκτινών του ενδοθηλίου και σακχαριδικών μορίων της μεμβράνης των λευκοκυττάρων. Στη συνέχεια, η διαδικασία της μετανάστευσης περιλαμβάνει τη διολίσθηση (rolling) των κυττάρων πάνω στο ενεργοποιημένο ενδοθήλιο που υποβοηθείται από την ταχεία έκφραση της P και E- σελεκτίνης στο αγγειακό ενδοθήλιο υπό την επίδραση των φλεγμονωδών κυτταροκινών IL-1 β και TNF- α (159). Με την επιβράδυνση της κίνησής τους τα λευκοκύτταρα έρχονται σε επαφή με κυτταροκίνες, χημειοτακτικούς παράγοντες και μόρια προσκόλλησης της επιφάνειας του ενδοθηλίου, με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση των ιντεγκρινών της επιφάνειάς τους (triggering). Ιδιαίτερη σημασία για την ενεργοποίηση των ιντεγκρινών των ουδετεροφίλων έχει η IL-8 (151). Ακολουθεί ισχυρή προσκόλληση των λευκοκυττάρων στο αγγειακό ενδοθήλιο (firm adhesion), αποτέλεσμα της αλληλεπίδρασης των β_2 -ιντεγκρινών των ουδετεροφίλων με τα μόρια ICAM-1, ICAM-2 και VCAM-1 των ενδοθηλίων. Το πέρασμα των λευκοκυττάρων δια μέσου των ενδοθηλιακών κυττάρων στους φλεγμαίνοντες ιστούς (transendothelial migration) υποβοηθείται από την αλληλεπίδραση των ιντεγκρινών της επιφάνειάς τους με τα ICAM-1, VCAM-1 και PECAM-1 μόρια του ενδοθηλίου. Σε αυτό βοηθά και η αλλαγή του σχήματος των λευκοκυττάρων από την ενεργοποίηση των ιντεγκρινών τους που συνδέονται με τον κυτταροσκελετό. Το τελευταίο στάδιο είναι η υπενδοθηλιακή κατευθυνόμενη

μετανάστευση (subendothelial migration) σε θέσεις με μεγάλη συγκέντρωση χυμοκινών και χημειοτακτικών παραγόντων (χημειοταξία). Τα παραπάνω στάδια πραγματοποιούνται με αυστηρή αλληλουχία (151, 163).

3. Ο ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ ΜΟΡΙΩΝ ΠΡΟΣΚΟΛΛΗΣΗΣ ΣΤΗΝ ΑΙΜΟΠΟΙΗΣΗ

Τα προγονικά αιμοποιητικά κύτταρα εγκαθίστανται στο αιμοποιητικό μικροπεριβάλλον του μυελού των οστών ως αποτέλεσμα αλληλεπιδράσεων μεταξύ αυτών και των στρωματικών στοιχείων του μυελού. Η έκφραση μορίων προσκόλλησης στην επιφάνεια των κυττάρων ευνοεί τις αλληλεπιδράσεις αυτές και την προσκόλληση των αιμοποιητικών κυττάρων στις πρωτεΐνες της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας (136). Τα προγονικά αιμοποιητικά κύτταρα εκφράζουν β₁-ιντεγκρίνες (κυρίως VLA-4 και VLA-5), μόρια LFA-1, LFA-3 PECAM-1 και H-CAM (CD44), γλυκοπρωτεΐνη με θέση πρόσδεσης στο υαλουρονικό οξύ. Καθώς προχωράει η διαφοροποίηση των κυττάρων μειώνεται η έκφραση του VLA-4 για να μπορέσουν οι ώριμες μορφές να αποσπασθούν από το αιμοποιητικό μικροπεριβάλλον και να εξέλθουν στην κυκλοφορία. Μειωμένη έκφραση του VLA-4 σχετίζεται με την κυκλοφορία των αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων (stem cells) σε υγείς και σε άτομα στα οποία χορηγείται G-CSF (164, 165).

Οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ μορίων προσκόλλησης και μορίων σύνδεσης (ligands) εκτός από το να διατηρούν την επαφή μεταξύ των προγονικών αιμοποιητικών κυττάρων και των κυττάρων του στρώματος μπορεί να έχουν ρόλο και στη εξέλιξη και διαφοροποίηση των αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων (142, 166, 167, 168).

Διαταραχή στην έκφραση μορίων προσκόλλησης έχει συσχετισθεί με την παθογένεια ορισμένων αιματολογικών νοσημάτων όπως η χρόνια μυελογενής λευχαιμία και το πολλαπλούν μυέλωμα (169). Οι πρόγονοι των λευχαιμικών κυττάρων παρουσιάζουν ανώμαλη έκφραση και λειτουργικότητα των ιντεγκρινών με αποτέλεσμα μη φυσιολογικό πολλαπλασιασμό και έξοδο στην κυκλοφορία των προδρόμων μορφών των μυελικών κυττάρων (170). Στο πολλαπλούν μυέλωμα τα

πλασματοκύτταρα του παθολογικού κλώνου παρουσιάζουν αυξημένη έκφραση των μορίων VLA-4, LFA-3 και ICAM-1 που έχει ως αποτέλεσμα την προσκόλληση τους στο αιμοποιητικό μικροπεριβάλλον του μυελού ο οποίος με την παραγωγή κυτταροκινών επάγει τον πολλαπλασιασμό των νεοπλασματικών κυττάρων (171).

4. ΣΥΜΜΕΤΟΧΗ ΤΩΝ ΜΟΡΙΩΝ ΠΡΟΣΚΟΛΛΗΣΗΣ ΣΕ ΝΟΣΗΜΑΤΑ

Έχει μελετηθεί ο ρόλος των μορίων προσκόλλησης σε κακοήθειες, λευχαιμίες και λεμφώματα ενηλίκων και έχουν συσχετισθεί τα αυξημένα επίπεδα ICAM-1 στον ορό με μετάσταση στο ήπαρ σε γαστρικό καρκίνο, καρκίνο του παχέος εντέρου και του παγκρέατος (172, 173, 174) καθώς επίσης και με μειωμένη επιβίωση σε ενήλικες ασθενείς με μελάνωμα (175). Υψηλά επίπεδα VCAM-1 έχουν επίσης προσδιοριστεί στον ορό ενηλίκων ασθενών με non-Hodgkin λέμφωμα σε προχωρημένο στάδιο (III και IV) και έχουν συσχετισθεί με χειρότερη πρόγνωση και μικρότερη επιβίωση (176). Υψηλά επίπεδα ICAM-1 στον ορό έχουν σχετισθεί με προχωρημένο στάδιο κακοήθειας παιδιών με σάρκωμα Ewing, νεφροβλάστωμα και λέμφωμα Hodgkin καθώς επίσης και με αυξημένη πιθανότητα υποτροπής του λεμφώματος Hodgkin (177).

Ο προσδιορισμός των επιπέδων των διαλυτών ICAM-1, VCAM-1 και E-σελεκτίνης στον ορό παιδιών με οξεία λεμφοβλαστική λευχαιμία στα διάφορα στάδια της νόσου (διάγνωση, ύφεση, 6 μήνες μετά το τέλος θεραπείας και στην υποτροπή) έδειξε αυξημένα επίπεδα αυτών στην έναρξη της νόσου, αποκατάσταση των επιπέδων στην ύφεση και διατήρηση των φυσιολογικών τιμών μετά το τέλος της θεραπείας, ενώ αύξησή τους παρατηρείται ξανά με την εκδήλωση υποτροπής. Με βάση τα ευρήματα αυτά έχει προταθεί η χρησιμοποίηση των επιπέδων των μορίων στον ορό σαν δείκτη έγκαιρης διάγνωσης της υποτροπής της λευχαιμίας (178).

Εξαιτίας της επαγωγής της έκφρασης του ICAM-1 κατά τη διάρκεια φλεγμονής ως απάντηση σε προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες η παρουσία του έχει μελετηθεί σε διάφορες φλεγμονώδεις και ανοσολογικές διαταραχές (απόρριψη αλλομοσχευμάτων, λεμφοκυτταρική διήθηση σε αυτοάνοση θυρεοειδίτιδα) (161, 171,

179, 180, 181, 182). Τα επίπεδα των διαλυτών ICAM-1 και VCAM-1 έχουν προσδιορισθεί επίσης στον ορό παιδιών με συστηματικό ερυθρεματώδη λύκο και έχουν σχετισθεί με την φάση ενεργού νόσου και την έγκαιρη διάγνωση υποτροπής (183).

Τα επίπεδα του διαλυτού ICAM-1 και της E-σελεκτίνης έχουν αναφερθεί αυξημένα σε τελειόμηνα νεογνά με γενικευμένη λοίμωξη (184), ενώ σύμφωνα με άλλη μελέτη βρέθηκαν αυξημένα τα επίπεδα του ICAM-1 στον ορό σε πρόωρα νεογνά με σηψαιμία (185). Αυξημένα επίπεδα E-σελεκτίνης έχουν αναφερθεί επίσης και σε ενήλικες με σηπτικό shock (186).

Θεραπευτική ωφέλεια μπορεί να προκύψει από τη χρήση μονοκλωνικών αντισωμάτων ή αντινοσηματικών ολιγονουκλεοτιδίων (antisense oligonucleotides) που θα κατευθύνονται εναντίον συγκεκριμένων μορίων προσκόλλησης που εμπλέκονται σε καταστάσεις όπως απόρριψη ξένου μοσχεύματος, οξεία επεισόδια φλεγμονής (σηπτικό shock), χρόνιες φλεγμονώδεις νόσους (ρευματοειδής αρθρίτιδα, πολλαπλή σκλήρυνση) ή κακοήθειες (145, 171).

5. ΜΕΛΕΤΗ ΤΩΝ ΜΟΡΙΩΝ ΠΡΟΣΚΟΛΛΗΣΗΣ ΣΤΗΝ ΟΥΔΕΤΕΡΟΠΕΝΙΑ

Η εκδήλωση ουδετεροπενίας μπορεί να είναι, εκτός άλλων, και αποτέλεσμα διαταραχών στην κυκλοφορία και στην προσκόλληση των ουδετεροφίλων στο αγγειακό ενδοθήλιο ή αυξημένης εξαγγείωσής τους προς τους ιστούς.

Έχει προταθεί πιθανή συμμετοχή λειτουργικά ή δομικά μη φυσιολογικών ιντεγκρινών στην παθογένεια της χρόνιας ιδιοπαθούς ουδετεροπενίας των ενηλίκων που θα μπορούσε να ερμηνεύσει τη μειωμένη ευπάθεια στις λοιμώξεις που παρουσιάζουν οι ασθενείς αυτοί σε σύγκριση με ασθενείς που πάσχουν από άλλης μορφής ουδετεροπενία. Είναι γνωστό ότι οι ιντεγκρίνες λειτουργούν και ως υποδοχείς για βακτηρίδια και οψωνίνες και διευκολύνουν τη φαγοκυττάρωση (135). Έχει δημοσιευτεί περίπτωση ασθενούς με επιμένουσα ουδετεροπενία στην οποία βρέθηκε αυξημένη προσκολλητική ικανότητα των ουδετεροφίλων πιθανώς

οφειλόμενη στη συμμετοχή των β₂-ιντεγκρινών (187). Το εύρημα της μελέτης αυτής δεν επιβεβαιώθηκε από άλλους ερευνητές και αφορά μία μόνο περίπτωση ασθενούς.

Τα επίπεδα των διαλυτών μορφών των ICAM-1, VCAM-1 και E-σελεκτίνης έχουν προσδιοριστεί στον ορό ενήλικων ασθενών με χρόνια ιδιοπαθή ουδετεροπενία μη ανοσολογικής αρχής, η αύξηση των οποίων έχει σχετισθεί με τη σοβαρότητα της ουδετεροπενίας. Τα υψηλά επίπεδα των παραπάνω διαλυτών μορίων στον ορό αποτελούν ένδειξη για την κατάσταση του ενδοθηλίου το οποίο εκφράζει τα αντίστοιχα μόρια στην επιφάνειά του. Σύμφωνα με τους ερευνητές, η ανεύρεση ενεργοποιημένου ενδοθηλίου υποδηλώνει την ύπαρξη λανθάνουσας, φλεγμονής που πιθανώς να ενέχεται στην παθογένεια της χρόνιας ιδιοπαθούς ουδετεροπενίας μη ανοσολογικής αρχής στους ενήλικες (188, 189, 190, 191).

Η παραπάνω μελέτη αποτελεί και τη μόνη βιβλιογραφική αναφορά που συσχετίζει τα μόρια προσκόλλησης ICAM-1, VCAM-1 και E-σελεκτίνη με την χρόνια ιδιοπαθή ουδετεροπενία και αφορά ενήλικο πληθυσμό. Δεν υπάρχει μελέτη που να προσδιορίζει τα επίπεδα των εν λόγω μορίων στον ορό παιδιών με καλοήγη ουδετεροπενία αυτοάνοσης αιτιολογίας. Ο σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η διερεύνηση της συμμετοχής του ενεργοποιημένου ενδοθηλίου στην εκδήλωση χρόνιας καλοήθους ουδετεροπενίας στην παιδική ηλικία μέσω της ανίχνευσης των επιπέδων των διαλυτών μορφών των μορίων προσκόλλησης ICAM-1 και E-σελεκτίνης στον ορό των ασθενών. Τα ευρήματα της παρούσας μελέτης επιβεβαιώνουν αυτά της βιβλιογραφίας που αφορά τους ενήλικες.

V. ΟΥΔΕΤΕΡΟΠΕΝΙΕΣ

1. ΓΕΝΙΚΑ - ΟΡΙΣΜΟΣ ΚΑΙ ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ

Η ουδετεροπενία ορίζεται ως ελάττωση του απόλυτου αριθμού των κυκλοφορούντων ουδετερόφιλων πολυμορφοπυρήνων στο αίμα κάτω από τα κατώτερα όρια της φυσιολογικής διακύμανσης που αντιστοιχεί στην ηλικία του ατόμου. Τα φυσιολογικά επίπεδα των ουδετεροφίλων ποικίλουν ανάλογα με την ηλικία, τη φυλή και άλλους παράγοντες. Στη λευκή φυλή και για βρέφη ηλικίας από 2 εβδομάδων έως 12 μηνών το κατώτερο φυσιολογικό όριο είναι 1000 κύτταρα/μl. Μετά το πρώτο έτος της ζωής το όριο αυτό αυξάνεται σε 1500 κύτταρα/μl ενώ για τους ενήλικες το κατώτερο όριο διακύμανσης έχει οριστεί στα 2500 κύτταρα/μl. Η μαύρη φυλή έχει χαμηλότερα όρια φυσιολογικής διακύμανσης με κατώτερο φυσιολογικό που μπορεί να φτάσει και σε επίπεδα πολύ χαμηλά (200 έως 600 κύτταρα/μl).

Η ουδετεροπενία χαρακτηρίζεται ήπια όταν ο αριθμός των κυκλοφορούντων ουδετεροφίλων κυμαίνεται από 1000 έως 1500 κύτταρα / μl, μέτρια όταν κυμαίνεται από 500 έως 1000 κύτταρα /μl και σοβαρή όταν τα ουδετερόφιλα είναι κάτω από 500 / μl. Η διάκριση αυτή είναι χρήσιμη για την εκτίμηση του κινδύνου για σοβαρές βακτηριδιακές λοιμώξεις. Η ευπάθεια στις βακτηριδιακές λοιμώξεις ποικίλει ανάλογα με τη μορφή της ουδετεροπενίας. Χρόνια χαρακτηρίζεται η ουδετεροπενία όταν η διάρκειά της είναι τουλάχιστον 6 μήνες (192).

Οι ουδετεροπενίες αποτελούν μια ετερόκλητη ομάδα κοκκιοκυτταρικών διαταραχών. Έχουν προταθεί διάφοροι τρόποι ταξινόμησής τους ανάλογα με τον παθοφυσιολογικό μηχανισμό, τη συνύπαρξη με άλλα νοσήματα ή την εμπειρία από την κλινική πράξη.

Παθοφυσιολογικά οι ουδετεροπενίες μπορεί να οφείλονται σε ανεπαρκή παραγωγή ουδετεροφίλων (ουδετεροπενίες απλαστικού τύπου) ή σε μη αποδοτική κοκκιοποίηση, σε αυξημένη καταστροφή των ουδετεροφίλων στην περιφέρεια, σε ανακατανομή των ουδετεροφίλων μεταξύ των δεξαμενών των κυκλοφορούντων και των ιστικών ή των προσκολλημένων στο αγγειακό ενδοθήλιο ουδετεροφίλων, ή σε συνδυασμό των παραπάνω.

Οι **ουδετεροπενίες απλαστικού τύπου** χωρίζονται περαιτέρω σε συγγενείς και επίκτητες. Στις συγγενείς εντάσσονται: η σοβαρή συγγενής ουδετεροπενία (σύνδρομο Kostmann), η κυκλική ουδετεροπενία, η καλοήθης οικογενής ουδετεροπενία, η ουδετεροπενία που συνοδεύεται από παγκρεατική ανεπάρκεια (σύνδρομο Schwachman-Diamond), η ουδετεροπενία που συνοδεύεται από διαταραχή της κυτταρικής ανοσίας με υποπλασία χόνδρων-τριχών (cartilage-hair hypoplasia syndrome), η ουδετεροπενία που συνοδεύει τη συγγενή δυσκεράτωση (dyskeratosis congenital), η ουδετεροπενία που συνοδεύει τη δικτυωτή δυσγενεσία (reticular dysgenesis), η μυελοκαχεξία, η ουδετεροπενία που συνοδεύεται από διαταραχές των ανοσοσφαιρινών και ανοσοανεπάρκειες του τύπου της βαρείας συνδυασμένης ανοσοανεπάρκειας ή την υπεργαμμασφαιριναιμία M (Hyper-IgM syndrome), η ουδετεροπενία που συνοδεύει την συγγενή έλλειψη τρανσκοβαλαμίνης II, η ουδετεροπενία που συνοδεύει τη γλυκογονίαση τύπου Ib, η ουδετεροπενία που συνοδεύει το σύνδρομο Chediak-Higashi, η ουδετεροπενία που συνοδεύεται από πνευματική καθυστέρηση και διαμαρτίες στη διάπλαση (σύνδρομο Cohen), η ουδετεροπενία που συνοδεύεται από καρδιοσκελετική μυοπάθεια (σύνδρομο Barth).

Οι επίκτητες ουδετεροπενίες οφείλονται σε φάρμακα, χημικά προϊόντα, ιονίζουσα ακτινοβολία, λοιμώξεις από ιούς, βακτήρια ή πρωτόζωα, διήθηση του μυελού από νεοπλασματικά κύτταρα ή εκδηλώνονται στα πλαίσια απλαστικής αναιμίας.

Οι **ουδετεροπενίες από μη αποδοτική κοκκιοποίηση** εκδηλώνονται στα πλαίσια έλλειψης βιταμίνης B12 ή φυλλικού οξέος, έλλειψης χαλκού και μυελοδυσπλαστικών συνδρόμων.

Σε **αυξημένη καταστροφή ουδετεροφύλων στην περιφέρεια** αποδίδονται οι ουδετεροπενίες που οφείλονται σε υπερσπληνισμό και οι ουδετεροπενίες που οφείλονται στη δράση αντισωμάτων. Στην τελευταία περίπτωση ανήκουν η ισοάνοση ουδετεροπενία των νεογνών, η πρωτοπαθής αυτοάνοση ουδετεροπενία των βρεφών και των παιδιών, οι ουδετεροπενίες που συνοδεύουν αυτοάνοσα νοσήματα όπως ο συστηματικός ερυθρεματώδης λύκος, το σύνδρομο Felty, αυτοάνοση αιμολυτική αναιμία ή άλλα νοσήματα όπως λευχαιμία, νόσος Hodgkin και οι ουδετεροπενίες που προκαλούνται από φαρμακευτικές αντιδράσεις.

Οι ουδετεροπενίες από διαταραχή της κατανομής των κοκκιοκυττάρων προκαλούνται από μετακίνηση πολυμορφοκυττάρων από το διαμέρισμα των κυκλοφορούντων στο διαμέρισμα των προσκολλημένων στα αγγειακά τοιχώματα κοκκιοκυττάρων (ψευδοουδετεροπενίες) (193)

Μια άλλη παθοφυσιολογική ταξινόμηση (εμπειρική ταξινόμηση) της ουδετεροπενίας της παιδικής ηλικίας με ευρεία χρήση στην κλινική πράξη είναι η παρακάτω:

Ουδετεροπενία που οφείλεται σε ενδογενείς διαταραχές των κυττάρων της μυελικής σειράς ή των προγονικών τους

Δικτυωτή δυσγενεσία

Σοβαρή συγγενής ουδετεροπενία

Κυκλική ουδετεροπενία

Μυελοκαχεξία

Σύνδρομο Shwachman-Diamond

Συγγενής δυσκεράτωση

Σύνδρομο Chediak-Higashi

Καλοήθης οικογενής ουδετεροπενία

Αναμία Fanconi

Σύνδρομα μυελικής ανεπάρκειας

Ουδετεροπενία που οφείλεται σε εξωγενείς παράγοντες

Λοιμώξεις

Φάρμακα

Αυτοάνοση ουδετεροπενία

Νεογνική ουδετεροπενία ανοσολογικής αρχής

Ουδετεροπενία σχετιζόμενη με ανοσολογικές διαταραχές

Ουδετεροπενία σχετιζόμενη με μεταβολικά νοσήματα

Διατροφικές ανεπάρκειες

Καταστροφή στο σύστημα μονοκυττάρων-μακροφάγων (reticuloendothelial sequestration)

Διήθηση του μυελού των οστών

Χρόνια ιδιοπαθής ουδετεροπενία

Στα παρακάτω κεφάλαια θα αναφερθούν τα κύρια χαρακτηριστικά των μορφών ουδετεροπενιών που προαναφέρθηκαν, ο παθοφυσιολογικός μηχανισμός πρόκλησής τους και η γενετική τους βάση όταν είναι γνωστή, με έμφαση σε μελέτες των προγονικών αιμοποιητικών κυττάρων.

2. ΟΥΔΕΤΕΡΟΠΕΝΙΕΣ ΠΟΥ ΟΦΕΙΛΟΝΤΑΙ ΣΕ ΕΝΔΟΓΕΝΕΙΣ ΔΙΑΤΑΡΑΧΕΣ ΤΩΝ ΜΥΕΛΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

Η δικτυωτή δυσγενεσία (*reticular dysgenesis*) αποτελεί σπάνια πρωτοπαθή διαταραχή που εντοπίζεται στο επίπεδο του αρχέγονου αιμοποιητικού κυττάρου και έχει ως αποτέλεσμα σοβαρή ουδετεροπενία και ελάττωση των T και B λεμφοκυττάρων (194). Μπορεί να συνοδεύεται από απουσία λεμφαδένων, αμυγδαλών ή πλακών του Peyer. Κατά κανόνα οι πάσχοντες πεθαίνουν από βαριές βακτηριδιακές, ιογενείς ή μυκητιασικές λοιμώξεις μέσα σε λίγους μήνες από τη γέννηση και δεν ανταποκρίνονται σε θεραπεία με G-CSF. Θετικά αποτελέσματα έχει η μεταμόσχευση μυελού των οστών (195).

Σοβαρή χρόνια ουδετεροπενία είναι ένας γενικός όρος που περιλαμβάνει τις ουδετεροπενίες με απόλυτο αριθμό ουδετερόφιλων πολυμορφοκυττάρων κάτω από 500 κύτταρα/μl σε 3 διαφορετικές μετρήσεις σε διάστημα παρακολούθησης 6 μηνών (196). Σε αυτή την κατηγορία ανήκουν η σοβαρή συγγενής ουδετεροπενία (σύνδρομο Kostmann) και άλλες συγγενείς ουδετεροπενίες όπως η κυκλική ουδετεροπενία, η μυελοκαχεξία, το σύνδρομο Shwachman-Diamond (197), το σύνδρομο Chediak-Higashi αλλά και ουδετεροπενίες που οφείλονται σε εξωγενείς παράγοντες όπως αυτές που συνοδεύουν ενδογενείς διαταραχές του μεταβολισμού και ανοσολογικές διαταραχές (198, 199, 200).

Το σύνδρομο *Kostmann* αποτελεί μια μορφή συγγενούς ουδετεροπενίας που κληρονομείται με σωματικό υπολειπόμενο τρόπο. Άλλες μορφές συγγενούς ουδετεροπενίας που εμφανίζονται ως σποραδικές περιπτώσεις (79) ή κληρονομούνται με τον σωματικό κυρίαρχο τρόπο (201) έχουν περιγραφεί και χαρακτηρίζονται από τον ίδιο αιματολογικό φαινότυπο και κλινικές εκδηλώσεις με το σύνδρομο *Kostmann*.

Υπό τον όρο συγγενή ουδετεροπενία παρακάτω εννοούνται όλες οι μορφές συγγενούς ουδετεροπενίας.

Το σύνδρομο *Kostmann*, όπως και η κυκλική ουδετεροπενία (202), αποτελούν σπάνιες νόσους των οποίων η υπολογιζόμενη συχνότητα εκτιμάται σε 1-2 περιπτώσεις ανά εκατομμύριο πληθυσμού. Το σύνδρομο *Kostmann* περιγράφηκε για πρώτη φορά από τον *Kostmann* (203, 204) ως κληρονομούμενη με σωματικό υπολειπόμενο τρόπο σοβαρή ουδετεροπενία (αριθμός ουδετεροφίλων στο περιφερικό αίμα από 0 έως 200 κύτταρα/μl) και πρόιμη εμφάνιση σοβαρών, υποτροπιαζόντων βακτηριδιακών λοιμώξεων, συνήθως μέσα στο πρώτο χρόνο ζωής. Στην πρόσφατη βιβλιογραφία περιγράφηκαν άλλες 5 περιπτώσεις από την αρχική οικογένεια *Kostmann* με καλή ανταπόκριση στη θεραπεία με G-CSF (205). Οι συνήθειες εντοπίσεις των λοιμώξεων είναι το δέρμα, το ήπαρ το αναπνευστικό σύστημα, οι εν τω βάθει ιστοί και ο ομφαλός στα νεογέννητα. Οι συνηθέστεροι μικροβιακοί παράγοντες είναι ο σταφυλόκοκκος, ο στρεπτόκοκκος, και λιγότερο συχνά η ψευδομονάδα, ο πεπτοστρεπτόκοκκος και μύκητες. Στο περιφερικό αίμα τα ηωσινόφιλα και τα μονοκύτταρα είναι συνήθως αυξημένα, ενώ εκτός από τη βαριά ουδετεροπενία μπορεί να παρατηρηθεί και ήπια αναιμία και θρομβοκυττάρωση. Ο μυελός των οστών είναι νορμοκυτταρικός ή ελαφρά υπερκυτταρικός με χαρακτηριστική αναστολή ωρίμανσης των πρόδρομων μορφών των κοκκιοκυττάρων στο στάδιο του προμυελοκυττάρου ή του μυελοκυττάρου. Μπορεί να παρατηρηθεί ηωσινοφιλία. Τα προμυελοκύτταρα είναι μετρίως αυξημένα και εμφανίζουν ελαττωμένη ή άτυπη κοκκίωση (199). In vitro μελέτες με καλλιέργειες μονοπύρηνων κυττάρων μυελού των οστών έδειξαν ελαττωμένη ανάπτυξη αποικιών κοκκιοκυττάρων – μακροφάγων (CFU-GM) (79, 192).

Η αρχική υπόθεση που απέδιδε την εκδήλωση του συνδρόμου *Kostmann* σε ελαττωμένη παραγωγή G-CSF ή ελαττωματική ανταπόκριση των κοκκιοκυττάρων στον G-CSF ή σε άλλους αυξητικούς αιμοποιητικούς παράγοντες δεν ευσταθεί. Τα ενδογενή επίπεδα G-CSF στον ορό ασθενών με σύνδρομο *Kostmann* έχουν αναφερθεί αυξημένα και η βιολογική δραστηριότητα του εν λόγω παράγοντα έχει βρεθεί φυσιολογική (206). Ο αριθμός των υποδοχέων για τον G-CSF είναι ηπίως αυξημένος, ενώ η σταθερά σύνδεσης (binding constant) του υποδοχέα με τον αυξητικό παράγοντα έχει βρεθεί φυσιολογική (207, 208).

Στο 90% των ασθενών η συστηματική καθημερινή χορήγηση G-CSF, σε δόσεις που συνήθως κυμαίνονται από 3 έως 10 μg/kg/ημέρα, έχει ως αποτέλεσμα την άνοδο του αριθμού των ουδετεροφίλων σε επίπεδα πάνω από τα 1000 κύτταρα/μl και την απαλλαγή από τις σοβαρές λοιμώξεις με συνέπεια την αύξηση της επιβίωσης και τη βελτίωση της ποιότητας ζωής τους (79, 120). Η μεταμόσχευση μυελού των οστών από απόλυτα ιστοσυμβατό αδελφό αποτελεί εναλλακτική θεραπεία για τους ασθενείς που δεν ανταποκρίνονται στον G-CSF, ακόμα και σε μεγάλες θεραπευτικές δόσεις που φτάνουν τα 120 μg/kg/ημέρα (209).

Το 9% όλων των ασθενών με συγγενή ουδετεροπενία θα εμφανίσουν οξεία μυελογενή λευχαιμία ή μυελοδυσπλασία ανεξάρτητα από τη δόση ή τη διάρκεια της θεραπείας ή την ανταπόκριση σε αυτή (196). Καμία περίπτωση λευχαιμίας δεν έχει αναφερθεί σε ασθενείς με κυκλική ή ιδιοπαθή ουδετεροπενία. Επίκτητες κυτταρογενετικές ανωμαλίες όπως η μονοσωμία 7, η μερική απώλεια του χρωμοσώματος 7 (7q-), ανωμαλίες του χρωμοσώματος 21, μεταλλάξεις του ογκογονιδίου *ras* έχουν αναφερθεί σε ασθενείς με συγγενή ουδετεροπενία υπό θεραπεία με G-CSF οι οποίοι αρχικά είχαν φυσιολογικό καρυότυπο. Οι ανωμαλίες αυτές έχουν σχετισθεί με την εκδήλωση λευχαιμίας ή μυελοδυσπλαστικού συνδρόμου αλλά η ακριβής αλληλουχία των γεγονότων που οδηγούν σε λευχαιμογένεση δεν έχει διευκρινιστεί (210). Είναι πιθανό η μακρύτερη επιβίωση των ασθενών με συγγενή ουδετεροπενία μετά τη χορήγηση G-CSF να ευνοεί την έκφραση της προδιάθεσης για λευχαιμία που ίσως να χαρακτηρίζει τη φυσική ιστορία της νόσου (196). Μεταλλάξεις του γονιδίου για τον υποδοχέα του G-CSF που αφορούν το κυτταροπλασματικό τμήμα του έχουν σχετισθεί με την εκδήλωση λευχαιμίας/μυελοδυσπλαστικού συνδρόμου (211, 212). Οι μεταλλάξεις αυτές είναι επίκτητες (213), αφορούν περίπου το 20% των ασθενών με συγγενή ουδετεροπενία (214), αλλά δεν υπεισέρχονται στην παθοφυσιολογία της νόσου.

Η γενετική βάση της συγγενούς ουδετεροπενίας δεν έχει πλήρως διευκρινιστεί. Τελευταίες μελέτες σε μοριακό επίπεδο έχουν εντοπίσει μεταλλάξεις σε ένα ένζυμο που βρίσκεται στα πρωτογενή κοκκία των ουδετεροφίλων, την ελαστάση των ουδετεροφίλων (ELA-2) (215, 216). Αυτό το ένζυμο είναι μια πρωτεάση που σχηματίζεται σε πρώιμο στάδιο της διαφοροποίησης των κοκκιοκυττάρων (217, 218) και απελευθερώνεται από τα ουδετερόφιλα καθώς αυτά μεταναστεύουν στους ιστούς

(219). Η μετάλλαξη εντοπίζεται στη σύνδεση των εξονίων 4 και 5, θέση που βρίσκεται κοντά στο σημείο σύνδεσης του ενζύμου με τους αναστολείς του. Σε μια πρόσφατη μελέτη (215), 22/25 ασθενείς με συγγενή ουδετεροπενία που εξετάστηκαν έφεραν μεταλλάξεις για την ελαστάση, που αφορούσαν διαφορετικές περιοχές του γονιδίου. Η ίδια μελέτη έδειξε ότι οι μεταλλάξεις αυτές εκδηλώνονται με σωματικό κυρίαρχο τρόπο σε μέλη της ίδιας οικογένειας. Σήμερα πιστεύεται ότι οι μεταλλάξεις που αφορούν το γόνιο της ελαστάσης των ουδετεροφίλων αποτελούν την κύρια αιτία της κυκλικής ουδετεροπενίας και ότι συμμετέχουν στην παθογένεια των σποραδικών περιπτώσεων συγγενούς ουδετεροπενίας (220, 221). Φαίνεται να αποτελούν προϋπόθεση για την εκδήλωση των μεταλλάξεων του υποδοχέα για τον G-CSF (216).

Στην παθογένεια της συγγενούς ουδετεροπενίας ενέχεται και η αύξηση του ρυθμού της απόπτωσης των πρόδρομων κυττάρων των ουδετεροφίλων που υποστηρίζεται σε τελευταίες μελέτες (222). Η διαταραχή αυτή είναι πιο σοβαρή στις περιπτώσεις συγγενούς ουδετεροπενίας. Είναι πιθανόν οι μεταλλάξεις της ελαστάσης να προκαλούν τον πρόωρο θάνατο των κοκκιοκυττάρων ενεργοποιώντας την απόπτωσή τους (215, 216).

Η πολυμορφία της νόσου μπορεί να εξαρτάται από το είδος των μεταλλάξεων και το ρυθμό της απόπτωσης των πρόδρομων κυττάρων των κοκκιοκυττάρων. Η μετατροπή της συγγενούς ουδετεροπενίας σε λευχαιμία ή μυελοδυσπλαστικό σύνδρομο μπορεί να είναι αποτέλεσμα της δημιουργίας, μέσω μηχανισμού αντισταθμιστικού στην ουδετεροπενία, ενός πληθυσμού αρχέγονων κυττάρων τα οποία είναι πιο ευάλωτα στη λευχαιμία (216). Τελευταία μελέτη από τους Melk et al αναφέρεται σε αύξηση του ρυθμού ελάττωσης του μήκους του τελομερούς του DNA των λευκοκυττάρων περιφερικού αίματος σε 17 ασθενείς με σοβαρή συγγενή ουδετεροπενία σε σύγκριση με φυσιολογικούς μάρτυρες, εύρημα που μπορεί να συμβάλλει στην αιτιολόγηση της λευχαιμικής μετατροπής στους ασθενείς αυτούς (223).

Η *κυκλική ουδετεροπενία* αποτελεί σπάνια διαταραχή (0.5–1 περίπτωση ανά εκατομμύριο πληθυσμού) που χαρακτηρίζεται από περιοδική ελάττωση του αριθμού των ουδετεροφίλων στην κυκλοφορία (224). Εμφανίζεται συνήθως κάθε 21 ± 3 μέρες και τα επίπεδα των ουδετεροφίλων μπορεί να κυμαίνονται από τα κατώτερα φυσιολογικά επίπεδα έως την πλήρη απουσία. Η περίοδος της ουδετεροπενίας

συνήθως διαρκεί 3-6 μέρες σε κάθε κύκλο και μπορεί να συνοδεύεται από ελάττωση και άλλων στοιχείων του αίματος όπως τα αιμοπετάλια και τα δικτυοερυθροκύτταρα και τα μονοκύτταρα (225). Για το λόγο αυτό χαρακτηρίζεται και ως κυκλική αιμοποίηση. Στη διάρκεια της ουδετεροπενίας οι ασθενείς είναι επιρρεπείς σε βαριές λοιμώξεις που εκδηλώνονται με πυρετό, στοματικά έλκη τραχηλική λεμφαδενίτιδα, έλκη παχέος εντέρου, περιτονίτιδα ή βακτηριαιμία από κλωστηρίδια. Τα συμπτώματα γίνονται πιο ήπια με τη μετάβαση στην ενήλικη ζωή καθώς η σοβαρότητα της ουδετεροπενίας και η διακύμανση του αριθμού των ουδετεροφίλων είναι ελαττωμένα στους ενήλικες σε σύγκριση με τα παιδιά. Περίπου τα 2/3 των περιπτώσεων κυκλικής ουδετεροπενίας έχουν οικογενή χαρακτήρα που υποδηλώνει ότι η διαταραχή κληρονομείται με τον σωματικό επικρατούντα χαρακτήρα. Υπάρχουν και σποραδικές περιπτώσεις κυκλικής ουδετεροπενίας, ενώ και ανάμεσα στα μέλη μιας οικογένειας με σωματικό επικρατούντα τύπο κυκλικής ουδετεροπενίας υπάρχουν παραλλαγές στις κλινικές εκδηλώσεις.

Η βλάβη εντοπίζεται στο επίπεδο του αρχέγονου αιμοποιητικού κυττάρου (225, 226) και μεταφέρεται από το δότη στο λήπτη μετά από μεταμόσχευση μυελού των οστών (227). Οι καλλιέργειες μυελού των οστών έδειξαν ότι τα προγονικά κύτταρα στους περισσότερους ασθενείς με κυκλική ουδετεροπενία έχουν την ικανότητα του πολλαπλασιασμού και της ωρίμανσης για το σχηματισμό ώριμων ουδετεροφίλων (228, 229). Οι Arrikyan και συν. σε μια τελευταία μελέτη σε 8 ασθενείς με κυκλική ουδετεροπενία έδειξαν μειωμένη παραγωγή αποικιών προγονικών κυττάρων της μυελικής σειράς από καλλιέργειες CD34+ κυττάρων και αυξημένη απόπτωση των προγονικών κυττάρων σε όλους τους ασθενείς. Η *in vivo* χορήγηση G-CSF φαίνεται να βελτιώνει την επιβίωση των προγονικών κυττάρων, ενώ ελαττώνει τη διάρκεια και τη σοβαρότητα της ουδετεροπενίας (123, 122, 228, 230).

Η κυκλική ουδετεροπενία έχει ορισμένα κοινά χαρακτηριστικά με τη συγγενή σε κλινικό επίπεδο όπως την κυκλική διακύμανση του αριθμού των ουδετεροφίλων που παρατηρείται και σε περιπτώσεις συγγενούς ουδετεροπενίας (231, 232). Σε μοριακό επίπεδο, μεταλλάξεις του γονιδίου που κωδικοποιεί την ελαστικότητα των ουδετεροφίλων που παρατηρούνται στη συγγενή ουδετεροπενία φαίνεται να αποτελούν τη μοριακή βάση της κυκλικής ουδετεροπενίας. Η διαταραχή εντοπίστηκε

στο χρωμόσωμα 19 p 13.3, στον επίτοπο για ένζυμα που βρίσκονται στα πρωτογενή κοκκία των ουδετεροφίλων (215). Οι Horwitz και συν. μελέτησαν 13 οικογένειες με κυκλική ουδετεροπενία σωματικού κυρίαρχου τύπου και μια σποραδική περίπτωση και βρήκαν 7 διαφορετικές μεταλλάξεις του γονιδίου της ελαστάσης των ουδετεροφίλων (ELA 2) (219). Οι μεταλλάξεις αυτές διαταράσσουν τη φυσιολογική ρύθμιση πιθανώς μέσω ενίσχυσης των λειτουργιών της ελαστάσης.

Η *επίκτητη μορφή της κυκλικής ουδετεροπενίας*, που εκδηλώνεται στην ενήλικη ζωή, συνοδεύεται από μονοκλωνική ή πολυκλωνική αύξηση των μεγάλων κοκκιοκυττάρων T λεμφοκυττάρων (T-cell large granular lymphocytes) (233). Οι κλινικές εκδηλώσεις είναι παρόμοιες με αυτές των παιδιών αλλά η περιοδική ελάττωση των ουδετεροφίλων είναι λιγότερο συχνή και συχνά παρατηρείται επίμονη ακοκκιοκυτταραιμία. Κυκλοσπορίνη-A και κορτικοστεροειδή έχουν χορηγηθεί θεραπευτικά με επιτυχία.

Η *μυελοκαχεξία (myelokathexis)* είναι μια σπάνια διαταραχή που πρωτοπεριγράφηκε το 1964 από τους Zuelzer και συν. και χαρακτηρίζεται από υπερπλασία των κυττάρων της μυελικής σειράς και στοιχεία εκφύλισης των ουδετεροφίλων όπως υπερκατάτμηση του πυρήνα και παρουσία κυτταροπλασματικών κενотоπιών (234). Η συγγενής μορφή κληρονομείται με τον σωματικό επικρατούντα τρόπο, ενώ έχουν αναφερθεί και σποραδικές περιπτώσεις (235, 236). Συχνά οι ασθενείς αυτοί εμφανίζουν σοβαρή λευκοπενία (αρ. λευκών < 500/μl) και υποτροπιάζουσες βακτηριδιακές λοιμώξεις, συνήθως μέτριας βαρύτητας, που αποδίδονται τόσο στην ουδετεροπενία όσο και σε ελαττωμένη λειτουργικότητα των ουδετεροφίλων. Η ελαττωμένη φαγοκυτταρική δραστηριότητα, χημειοταξία και παραγωγή υπεροξειδίων από τα ουδετερόφιλα των ασθενών και η ελαττωμένη απόδοση ουδετεροφίλων από το μυελό των οστών στην κυκλοφορία αποδίδεται σε επιτάχυνση της απόπτωσης (199, 234). Η χορήγηση G-CSF και GM-CSF αυξάνει τον αριθμό των ουδετεροφίλων και προκαλεί βελτίωση της κλινικής εικόνας σε ασθενείς με μυελοκαχεξία (237, 238).

In vitro μελέτες με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο, κυτταρομετρία ροής και ανοσοϊστοχημικές χρώσεις έδειξαν ότι η επιτάχυνση του ρυθμού απόπτωσης των κοκκιοκυτταρικών πληθυσμών του μυελού των οστών και η ελαττωμένη έκφραση του *bcl-x* στις πρόδρομες μορφές των κοκκιοκυττάρων του μυελού των οστών

συμβάλλουν στην εκδήλωση ουδετεροπενίας (234).

Το σύνδρομο Shwachman-Diamond, η συγγενής δυσκεράτωση, η ουδετεροπενία που συνοδεύεται από υποπλασία χόνδρου-τριχών (cartilage-hair hypoplasia), το σύνδρομο Barth (131) και η αναιμία Fanconi ανήκουν στις συγγενείς ουδετεροπενίες που συνοδεύονται από άλλες συγγενείς ανωμαλίες.

Το σύνδρομο *Shwachman-Diamond* περιγράφηκε το 1964 από τους Shwachman και Diamond (239). Κληρονομείται με σωματικό υπολειπόμενο τύπο. Χαρακτηρίζεται από ανεπάρκεια της εξωκρινούς μοίρας του παγκρέατος, μεταφυσιακή δυσπλασία και άλλες σκελετικές ανωμαλίες, νανισμό και δυσλειτουργία του μυελού των οστών που εκδηλώνεται με διαφόρων βαθμών κυτταροπενίες. Όλες οι περιπτώσεις εκδηλώνονται με ουδετεροπενία, η οποία στα 2/3 των περιπτώσεων είναι διαλείπουσα και συνοδεύεται και από ελαττωμένη χημειοταξία των ουδετεροφίλων σε όλες τις περιπτώσεις (240). Παρατηρούνται επίσης άλλοτε άλλου βαθμού αναιμία, αύξηση της αιμοσφαιρίνης F και θρομβοπενία. Στο 1/3 των ασθενών εκδηλώνεται οξεία μυελογενής λευχαιμία ή μυελοδυσπλαστικό σύνδρομο στην πορεία της νόσου (240, 241). Παρουσιάζονται δε και κλωνικές κυτταρογενετικές ανωμαλίες, οι οποίες αφορούν κυρίως το χρωμόσωμα 7 και σε συνδυασμό με δυσπλαστικές αλλοιώσεις του μυελού των οστών αποτελούν προγνωστικό παράγοντα για λευχαιμική μετατροπή (240). Οι κλινικές εκδηλώσεις περιλαμβάνουν καθυστέρηση στην ανάπτυξη, δυσαπορρόφηση, υποτροπιάζουσες λοιμώξεις όπως οξεία μέση ωτίτιδα, παραρινοκολπίτιδα και πνευμονία, λοιμώξεις του δέρματος, οστεομυελίτιδα ή σηψαιμία και εμφανίζονται μέσα στα 3 πρώτα χρόνια της ζωής.

Η βλάβη αφορά το αρχέγονο αιμοποιητικό κύτταρο και το μυελικό μικροπεριβάλλον όπως φαίνεται από μελέτες προγονικών αιμοποιητικών κυττάρων του μυελού των οστών και εκτίμηση της λειτουργίας του μυελικού στρώματος σε καλλιέργειες μικρής και μακράς διάρκειας (241). Αλλογενή μεταμόσχευση μυελού των οστών έχει επιχειρηθεί σε περιορισμένο αριθμό ασθενών με σύνδρομο Shwachman-Diamond, αλλά η συχνότητα των επιπλοκών είναι μεγάλη (242). Αντιβιοτικά και G-CSF (124) χορηγούνται για την αντιμετώπιση των λοιμώξεων και της σοβαρής ουδετεροπενίας.

Η *συγγενής δυσκεράτωση* είναι φυλοσύνδετη νόσος που κληρονομείται με υπολειπόμενο τρόπο και χαρακτηρίζεται από δυστροφία των ονύχων, λευκοπλακία

και υπέρχρωση του δέρματος. Οι περισσότεροι ασθενείς έχουν υποπλαστικό μυελό και το 1/3 αυτών εκδηλώνουν ουδετεροπενία. Οι ασθενείς με συγγενή δυσκεράτωση δεν παρουσιάζουν συνήθως σοβαρές λοιμώξεις (243).

Η ουδετεροπενία που συνοδεύεται από υποπλασία χόνδρου-τριχών (*cartilage-hair hypoplasia*) αποτελεί διαταραχή που κληρονομείται με το σωματικό υπολειπόμενο τρόπο (244). Χαρακτηρίζεται από νανισμό, λεπτότητα τριχών, μέτρια ουδετεροπενία, λεμφοπενία και ευπάθεια σε λοιμώξεις απειλητικές για τη ζωή. Στους ασθενείς αυτούς υπάρχει συνδυασμένη ανεπάρκεια της χυμικής και της κυτταρικής ανοσίας και η θεραπεία εκλογής, ιδιαίτερα όταν οι λοιμώξεις είναι υποτροπιάζουσες είναι η αλλογενής μεταμόσχευση μυελού των οστών από ιστοσυμβατό αδελφό (243).

Η αναιμία *Fanconi* χαρακτηρίζεται από μυελική ανεπάρκεια, ποικίλες διαμαρτίες περί την διάπλαση που αφορούν κυρίως τον σκελετό και τα σπλάχνα και πνευματική καθυστέρηση. Σε ένα μεγάλο ποσοστό η νόσος εξελίσσεται σε οξεία μυελογενή λευχαιμία. Εκτός από την αναιμία *Fanconi* και άλλα σύνδρομα μυελικής ανεπάρκειας μπορεί να εκδηλωθούν ως μεμονωμένη ουδετεροπενία όπως η απλαστική αναιμία (202) και μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα (245).

ΠΙΝΑΚΑΣ Γ

Συγγενείς ουδετεροπενίες που συνοδεύονται από φαινοτυπικές ανωμαλίες

- Σύνδρομο Shwachman-Diamond
- Συγγενής δυσκεράτωση
- Υποπλασία χόνδρου-τριχών (*cartilage-hair hypoplasia*)
- Αναιμία *Fanconi*
- Σύνδρομο Chediak-Higashi

Το σύνδρομο *Chediak-Higashi* είναι σπάνια, κληρονομούμενη νόσος σωματικού υπολειπόμενου τύπου και χαρακτηρίζεται από μερικό αλφισμό, ουδετεροπενία, συχνές, σοβαρές βακτηριδιακές λοιμώξεις, περιφερική νευροπάθεια

και γιγάντια λυσοσωμιακά κοκκία μέσα στο πρωτόπλασμα των κοκκιοκυττάρων, μονοκυττάρων και λεμφοκυττάρων καθώς και κυττάρων άλλων ιστών (133, 244). Η ουδετεροπενία του συνδρόμου είναι αποτέλεσμα μη αποδοτικής κοκκιοποίησης, ενώ στην αυξημένη ευαισθησία των ασθενών στις λοιμώξεις συμβάλλουν διαταραχές της λειτουργικότητας των κοκκιοκυττάρων και λεμφοκυττάρων. Τα ουδετερόφιλα έχουν μειωμένη χημειοταξία, ενώ η διαταραγμένη αποκοκκίωση τα καθιστά ανεπαρκή στη μικροβιοκτονία. Παρατηρείται επίσης ελαττωμένη χημειοταξία των μονοκυττάρων, και μειωμένη λειτουργικότητα των κυττάρων φυσικών φονέων (Natural Killer-NK cells) (133). Τα αιμοπετάλια παρουσιάζουν μειωμένη ικανότητα συσσώρευσης με αποτέλεσμα διαταραχή της πήξης. Συνήθως τα συμπτώματα εμφανίζονται μέσα στα 3 πρώτα έτη ζωής αλλά υπάρχει και η όψιμη φάση της νόσου που εκδηλώνεται μέσα στην 1^η ή 2^η δεκαετία της ζωής. Η φάση αυτή χαρακτηρίζεται από πολυκλωνική αύξηση των T λεμφοκυττάρων μέσα στο σπλήνα, το ήπαρ και το μυελό των οστών. Η γενετική βάση του συνδρόμου έχει πρόσφατα αναγνωριστεί (244) και αφορά μετάλλαξη σε ένα γονίδιο που ονομάζεται *LYST* από τα αρχικά Lysosomal Trafficking και εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 1q43. Το γονίδιο κωδικοποιεί την ομόνυμη πρωτεΐνη, η οποία συμμετέχει στην ταξινόμηση των πρωτεϊνών μέσα στα ενδοκυττάρια κοκκία (246, 247).

ΠΙΝΑΚΑΣ Δ

Συγγενείς ουδετεροπενίες που συνοδεύονται από διαταραχές της λειτουργικότητας των ουδετεροφίλων

- Chediak-Higashi
- Μυελοκαχεξία
- Σύνδρομο Shwachman-Diamond

ΠΙΝΑΚΑΣ Ε

Ουδετεροπενίες με γνωστή γενετική βάση

ΝΟΣΗΜΑ	ΤΥΠΟΣ ΚΛΗΡΟΝΟΜΙΚΟΤΗΤΑΣ	ΓΟΝΙΔΙΟ
Σύνδρομο Kostmann	ΣΥ	<i>G-CSF-R</i> (1q34.3)
Συγγενής ουδετεροπενία	σποραδική, ΣΚ	<i>ELA-2</i> (19p13.3)
Κυκλική ουδετεροπενία	σποραδική, ΣΚ	<i>ELA-2</i> (19p13.3)
Σύνδρομο Shwachman-Diamond	ΣΥ	
Σύνδρομο Chediak-Higashi	ΣΥ	<i>LYST</i> (1q43)
Υποπλασία χόνδρου-τριχών	ΣΥ	<i>CHH</i> (9p13)
Γλυκογονίαση τύπου 1β	ΣΥ	<i>G6PT</i> (11q23.3)
Σύνδρομο Hyper-IgM	Φ	<i>XHIM</i> (Xq26.3)
Αυτοάνοσο λεμφοϋπερπλαστικό σύνδρομο	σποραδική, ΣΚ	<i>APT1</i> (10q24)

* ΣΥ: σωματικός υπολειπόμενος τύπος, ΣΚ: σωματικός κυρίαρχος τύπος, Φ: φυλοσύνδετη κληρονομικότητα, *G-CSF-R*: υποδοχέας του *G-CSF*

** Εντός παρενθέσεως τα χρωμοσώματα στα οποία εντοπίστηκε το μεταλλαγμένο γονίδιο

Η *καλοήθης οικογενής ουδετεροπενία* είναι ήπια ή μέτριας βαρύτητας ουδετεροπενία που εμφανίζεται σε περισσότερα του ενός μέλη μιας οικογένειας. Σε μερικές περιπτώσεις έχει αναγνωριστεί σωματικός κυρίαρχος τύπος κληρονομικότητας. Δεν συνοδεύεται από αυξημένη ευαισθησία στις λοιμώξεις και κατά κανόνα διαδράμει ασυμπτωματικά και ανακαλύπτεται τυχαία. Οικογενής ουδετεροπενία έχει περιγραφεί στη μαύρη φυλή, στους Υμενίτες Ισραηλινούς, σε Γερμανούς, Γάλλους, Αμερικανούς και Νοτιοαφρικανούς. Η ουδετεροπενία που αφορά έθνη ή φυλές αναφέρεται και ως *φυλετική ουδετεροπενία*. Πιθανολογείται ότι η ουδετεροπενία αυτή είναι αποτέλεσμα μειωμένου αριθμού προγονικών κυττάρων στο μυελό των οστών (248).

3. ΟΥΔΕΤΕΡΟΠΕΝΙΕΣ ΠΟΥ ΟΦΕΙΛΟΝΤΑΙ ΣΕ ΕΞΩΓΕΝΕΙΣ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ

Οι ουδετεροπενίες που οφείλονται σε εξωγενείς παράγοντες μπορεί να είναι ιδιοπαθείς, άγνωστης αιτιολογίας και παθογενετικού μηχανισμού και δευτεροπαθείς που συνοδεύουν άλλα νοσήματα. Εμφανίζονται συχνότερα από τις ουδετεροπενίες που οφείλονται σε ενδογενείς διαταραχές των μυελικών κυττάρων. Οι μηχανισμοί πρόκλησης τους περιλαμβάνουν ανώμαλη κατανομή των ουδετεροφίλων μεταξύ της αποθήκης του μυελού και της κυκλοφορίας, συντόμευση της επιβίωσης των ουδετεροφίλων ή ελαττωμένη παραγωγή τους. Ανάλογα με τη διάρκειά τους χαρακτηρίζονται οξείες ή χρόνιες. (243).

Η *χρόνια ιδιοπαθής ουδετεροπενία* αποτελεί επίκτητη χρόνια ουδετεροπενία άγνωστης αιτιολογίας. Στην κατηγορία αυτή υπάγονται οι ασθενείς που δεν ανήκουν στην ομάδα της συγγενούς, νεοπλασματικής ή ανοσολογικής ουδετεροπενίας και δεν εμφανίζουν απλαστική αναιμία ή μυελοδυσπλαστικό σύνδρομο. Το κλινικό φάσμα των εκδηλώσεων στους ασθενείς αυτούς ποικίλει και γενικά όσο βαρύτερη είναι η ουδετεροπενία τόσο συχνότερα είναι τα επεισόδια πυρετού και λοιμώξεων. Πιθανοί αιτιολογικοί παράγοντες είναι ιοί (Ebstein-Barr), τοξίνες (βενζένιο) ή φάρμακα (χλωραμφενικόλη) (199). Μελέτες της κοκκιοποίησης στους ασθενείς αυτούς έδειξαν ότι σε μερικές περιπτώσεις η ελαττωμένη ή ανεπαρκής παραγωγή ουδετεροφίλων αποτελεί τον κύριο μηχανισμό πρόκλησης της ουδετεροπενίας (249). Επίσης έχει ενοχοποιηθεί σε κάποιες περιπτώσεις η ανεπαρκής απόδοση των ουδετεροφίλων από τον μυελό των οστών στην κυκλοφορία (243, 249). Η χρόνια ιδιοπαθής ουδετεροπενία των ενηλίκων ως ξεχωριστή οντότητα πρωτοπεριγράφηκε το 1968 από τους Kyle και Lynman (250). Ο επιπολασμός της νόσου έχει υπολογιστεί σε πρόσφατη μελέτη να είναι 8.2% για τον πληθυσμό της Κρήτης (251).

Υπάρχουν ισχυρές ενδείξεις, σύμφωνα με πρόσφατη μελέτη (252) ότι στην παθογένεια της νόσου πρωταγωνιστούν προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες και χυμοκίνες οι οποίες βρίσκονται αυξημένες στον ορό και στα υπερκείμενα από καλλιέργειες μακράς διάρκειας κυττάρων μυελού των οστών. Η αύξηση αυτή αποτελεί ένδειξη για την ύπαρξη κάποιας χρόνιας υποκλινικής φλεγμονώδους

επεξεργασίας. Μερικές από τις κυτταροκίνες ενεργοποιούν το ενδοθήλιο των αγγείων προκαλώντας αυξημένη έξοδο των ουδετεροφίλων από την κυκλοφορία προς τους ιστούς (TNF-α και IL-1β) ενώ άλλες επιδρούν ανασταλτικά στο μυελό των οστών προκαλώντας ελαττωμένη παραγωγή ουδετεροφίλων (TGF-β₁) (253). Η ουδετεροπενία σε αυτούς τους αρρώστους είναι αποτέλεσμα του συνδυασμού τουλάχιστον 3 παραγόντων: μειωμένης παραγωγής κοκκιοκυττάρων στο μυελό των οστών, αυξημένης εξόδου των ουδετεροφίλων από την κυκλοφορία προς τους ιστούς και αυξημένης καταστροφής των ουδετεροφίλων από το σπλήνα (191). Η πρόγνωση της νόσου είναι καλή και η θεραπευτική αντιμετώπιση συμπτωματική.

Οι δευτεροπαθείς ουδετεροπενίες κατατάσσονται σε 5 ομάδες: τις ουδετεροπενίες λοιμώδους αιτιολογίας, τις ουδετεροπενίες φαρμακευτικής αιτιολογίας, τις ουδετεροπενίες ανοσολογικής αρχής, τις ουδετεροπενίες από μυελοπάθεια και τις ουδετεροπενίες από καταστροφή στο δικτυοενδοθηλιακό σύστημα.

Οι ουδετεροπενίες *λοιμώδους αιτιολογίας* είναι αρκετά συχνές, ιδιαίτερα στα παιδιά. Συνήθως συνοδεύουν λοιμώξεις από ιούς, ρικέτσιες, βακτήρια και πρωτόζωα όπως φαίνεται στον Πίνακα ΣΤ. Πιο συχνές είναι οι ουδετεροπενίες που οφείλονται σε ιούς. Ιοί όπως ο αναπνευστικός συγκυτιακός ιός, ο ιός της ανεμευλογιάς, της ινφλουέντζας Α και Β, της ιλαράς και της ερυθράς έχουν ενοχοποιηθεί για την πρόκληση ουδετεροπενίας με οξεία έναρξη και βραχεία διάρκεια (3 έως 8 ημέρες) που συμπίπτει με την περίοδο της ιαιμίας. Οι ιοί αυτοί προκαλούν ανακατανομή των ουδετεροφίλων από το διαμέρισμα των κυκλοφορούντων στο διαμέρισμα των προσκολλημένων στα αγγεία ουδετεροφίλων. Άλλοι ιοί όπως ο Ebstein-Barr, ο κυτταρομεγαλοϊός, ο ιός της ηπατίτιδας Β και C, ο HIV-1 και ο HIV-2 (133) πιστεύεται ότι προκαλούν ουδετεροπενία μέσω απευθείας ανασταλτικής δράσης στα προγονικά αιμοποιητικά κύτταρα της κοκκιοκυτταρικής σειράς ή μέσω ανοσολογικού μηχανισμού ή λόγω αυξημένης καταστροφής των ουδετεροφίλων από αντιουδετεροφιλικά αντισώματα. Ο παρβοϊός B19 μπορεί επίσης να προκαλέσει παροδική ουδετεροπενία και έχει συσχετιστεί με την εκδήλωση αυτοάνοσης ουδετεροπενίας της παιδικής ηλικίας (254).

Η ουδετεροπενία που προκαλείται στα πλαίσια βακτηριδιακών και

πρωτοζωϊκών λοιμώξεων (βλ. πίνακα) είναι αποτέλεσμα αφ' ενός σπληνομεγαλίας και αυξημένης καταστροφής των ουδετεροφίλων στο σπλήνα, αφ' ετέρου ενεργοποίησης του ενδοθηλίου των αγγείων μέσω κυτταροκινών και αυξημένης προσκόλλησης των ουδετεροφίλων σε αυτό. Η ουδετεροπενία που συνοδεύει τη σηψαιμία, ιδιαίτερα από Gram αρνητικά βακτηρίδια και λοιμώξεις από ρικέτσιες, είναι αποτέλεσμα αυξημένης προσκόλλησης των ουδετεροφίλων στο ενδοθήλιο των αγγείων και αυξημένης καταστροφής των ουδετεροφίλων λόγω συγκόλλησης μεταξύ τους που προκύπτει με την ενεργοποίηση του κλάσματος του συμπληρώματος C5a. Η διαδικασία αυτή προκαλείται με την παρέμβαση κυτταροκινών (TNF-α και IL-1β) και της ενδοτοξίνης. Η ουδετεροπενία στα πλαίσια της νεογνικής σηψαιμίας από βακτηρίδια είναι συνήθως πολύ σοβαρή λόγω γρήγορης εξάντλησης των αποθεμάτων του μυελού (133, 243, 255, 256, 257).

ΠΙΝΑΚΑΣ ΣΤ: Λοιμώξεις σχετιζόμενες με εκδήλωση ουδετεροπενίας

Ιογενείς

Λοίμωξη με αναπνευστικό συγκυτιακό ιό

Ιλαρά

Ερυθρά

Παρωτίτιδα

Ανεμευλογιά

Λοιμώδης ηπατίτιδα

Λοίμωξη από ιούς ινφλουέντζας Α και Β

Λοιμώδης Μονοπυρήνωση (EBV)

Λοίμωξη από κυτταρομεγαλοϊό

Λοίμωξη από HIV-1

Ψιττάκωση

Βακτηριακές

Τυφοειδής πυρετός

Παρατυφοειδής πυρετός

Κεγχροειδής Φυματίωση

Βρουκέλλωση

Τουλαρεμία

Σηψαιμία από Gram αρνητικά βακτήρια

Μυκητιασικές

Ιστοπλάσμωση

Πρωτοζωικές

Ελονοσία

Λείσμανίαση

Ρικέτσιες

Πυρετός βραχυδών ορέων

Άλλες λοιμώξεις από ρικέτσιες (Rickettsial Pox)

Η ουδετεροπενία φαρμακευτικής αιτιολογίας προκαλείται με 2 βασικούς μηχανισμούς: την απ'ευθείας τοξική δράση του φαρμάκου ή των μεταβολιτών του πάνω στα πρόδρομα κύτταρα της κοκκιδώδους σειράς και την ανάπτυξη ανοσολογικού μηχανισμού καταστροφής των κοκκιοκυττάρων στην περιφέρεια. Η τοξική δράση ενός φαρμάκου μπορεί να είναι υποχρεωτική ή δυνητική (ιδιοσυγκρασιακή). Στην πρώτη περίπτωση όλα τα άτομα που λαμβάνουν το φάρμακο θα αναπτύξουν ουδετεροπενία, η βαρύτητα της οποίας θα εξαρτηθεί από τη δόση και τη διάρκεια χορήγησης του φαρμάκου (δοσο-εξαρτόμενη βλάβη). Τέτοια φάρμακα είναι οι αλκυλιούντες παράγοντες, οι αντιμεταβολίτες, οι νιτροζουρίες, χημειοθεραπευτικά αντιβιοτικά, όπως η τριμεθοπρίμη-σουλφαμεθοξαζόλη και ορισμένα αλκαλοειδή της Vinca. Με τον ίδιο τρόπο δρα και η έκθεση σε ιονίζουσα ακτινοβολία.

Για τους ασθενείς με ουδετεροπενία οφειλόμενη στη χορήγηση αντινεοπλασματικής χημειοθεραπείας ο κίνδυνος για την εκδήλωση απειλητικών για τη ζωή βακτηριδιακών ή μυκητιασικών λοιμώξεων σχετίζεται με τον απόλυτο αριθμό των μονοκυττάρων του περιφερικού αίματος (258, 259). Τα κυριότερα παθογόνα μικρόβια είναι ο χρυσίζοντας σταφυλόκοκκος, σταφυλόκοκκοι κοαγκουλάση-αρνητικοί, στρεπτόκοκκοι, ψευδομονάδα, Candida, ασπέργιλος και μύκητες (133). Η δράση της χημειοθεραπείας εκδηλώνεται και στα ώριμα κοκκιοκύτταρα του περιφερικού αίματος επιταχύνοντας την απόπτωσή τους (260). Η σοβαρότητα των λοιμώξεων αυτών επιτείνεται από τη συνύπαρξη με βλάβη του βλεννογόνου του στομάχου λόγω της χημειοθεραπείας και από διαταραγμένη κυτταρική ανοσία που προδιαθέτουν σε τοπικές και συστηματικές λοιμώξεις.

Στη δεύτερη περίπτωση (ιδιοσυγκρασιακή ουδετεροπενία) η εκδήλωση ουδετεροπενίας δεν είναι προβλέψιμη αλλά εξαρτάται από την ευαισθησία του

ατόμου στο οποίο χορηγείται το φάρμακο. Δυνητικά κάθε φάρμακο θα μπορούσε να προκαλέσει ουδετεροπενία σε ευαίσθητα άτομα. Οι γυναίκες εμφανίζουν συχνότερα τέτοιου είδους αντιδράσεις σε σύγκριση με τους άνδρες. Τέτοια φάρμακα είναι οι φαινοθειαζίνες, αντιμικροβιακοί παράγοντες όπως σουλφοναμίδες, πενικιλίνες (261), χλωραμφενικόλη, αντιθυροειδικά φάρμακα, αντιπυρετικά όπως η ασπιρίνη, η ακεταμινοφαίνη, η φαινυλβουταζόνη, αντιρευματικά όπως ο χρυσός και η πενικιλλαμίνη και οι βενζοδιαζεπίνες. Ο μυελός των οστών στους πάσχοντες είναι υποκυτταρικός και τα προγονικά κύτταρα της κοκκιώδους σειράς είναι πολύ ελαττωμένα σε αριθμό ή απουσιάζουν πλήρως. Οι αντιδράσεις υπερευαισθησίας αργούν να εκδηλωθούν και συνήθως συνοδεύονται από πυρετό, εξάνθημα, και συμπτώματα από άλλα όργανα και συστήματα (νεφρίτιδα, πνευμονίτιδα, ηπατίτιδα) ή απλαστική αναιμία.(243). Μπορεί να διαρκέσουν από μερικές μέρες έως και μήνες ή χρόνια.

Για την πρόκληση ουδετεροπενίας από φάρμακα μέσω ανοσολογικού μηχανισμού το φάρμακο πρέπει να δράσει ως απτίνη και να λειτουργήσει ανοσογονικά για την παραγωγή αντισώματος που θα προκαλέσει την καταστροφή των ουδετεροφίλων (262). Αυτού του είδους η αντίδραση προκαλείται συνήθως μετά από 7 έως 14 μέρες από τη λήψη του φαρμάκου ή αμέσως μετά την επανάληψη της έκθεσης στο υπεύθυνο φάρμακο και διαρκεί συνήθως 1 βδομάδα. Μπορεί ενίοτε να θέσει σε κίνδυνο τη ζωή του ανθρώπου και συχνά συνοδεύεται από υψηλό πυρετό, ρίγος ή φλεγμονώδεις βλάβες στη στοματική κοιλότητα, την περιγεννητική και την περιπρωκτική περιοχή. Στο μυελό των οστών τα αποθέματα των πολυμορφοκυττάρων έχουν εξαντληθεί, ενώ βρίσκονται αρκετές άωρες μορφές (μυελοβλάστες και προμυελοκύτταρα). Τα συνηθέστερα φάρμακα που προκαλούν ουδετεροπενία μέσω αυτού του μηχανισμού είναι η αμινοπυρίνη, η ιμπουπροφένη, η πενικιλίνη, η προπυλθιουρακίλη. Το ίδιο φάρμακο μπορεί να προκαλέσει ουδετεροπενία με παραπάνω του ενός μηχανισμούς όπως φαίνεται στον Πίνακα Ζ. Πρόσφατη μελέτη (263) αναφέρεται στην περιγραφή δύο περιπτώσεων αυτοάνοσης ουδετεροπενίας συνεπεία της χορήγησης β-λακταμικών αντιβιοτικών σε δύο βρέφη, η οποία διήρκεσε 1 και 3 μήνες αντίστοιχα.

Συνήθως η ουδετεροπενία θεραπεύεται μετά την απόσυρση του ύποπτου φαρμάκου. Στην περίπτωση που αυτή επιμένει και υπάρχουν κλινικά συμπτώματα

μπορεί να χορηγηθεί G-CSF.

ΠΙΝΑΚΑΣ Ζ: Φάρμακα που προκαλούν ουδετεροπενία

Φάρμακο	Πιθανός μηχανισμός	
	Απ'ευθείας καταστολή του μυελού	Ανοσολογικός
Αναλγητικά-		
Αντιφλεγμονώδη		
Αμινοπυρίνη		+
Ιμπουπροφένη		+
Ινδομεθακίνη	+	
Φαινυλβουταζόνη	+	
Αντιβιοτικά		
Χλωραμφενικόλη	+	
Πενικιλίνη	+	+
Άλλα β-λακταμικά αντιβιοτικά	+	+
Σουλφοναμίδη	+	
Αντιεπιληπτικά		
Φενυτοΐνη		+
Καρβαμαζεπίνη	+	
Αντιψυχωσικά-		
Ηρεμιστικά		
Χλωροπρομαζίνη	+	
Φαινοθειαζίνες	+	
Βενζοδιαζεπίνες	+	
Αντιθυρεοειδικά		
Προπυλθιουρακίλη		+
Καρδιολογικά		
Υδραλαζίνη		+
Προκαΐναμίδη		+
Κινιδίνη		+
Αντιρευματικά		
Χρυσός	+	+
Πενικιλλαμίνη	+	+
Διάφορα		
Σιμετιδίνη, Ρανιτιδίνη	+	

Ουδετεροπενία σχετιζόμενη με *μεταβολικά νοσήματα* εμφανίζεται στα πλαίσια της γλυκογονίασης τύπου Ιβ και της νόσου του Gaucher. Ουδετεροπενία σχετιζόμενη με *διατροφικές ανεπάρκειες* συνοδεύει την έλλειψη βιταμίνης Β12, φυλλικού οξέος, χαλκού σε άτομα που λαμβάνουν για παρατεταμένο χρονικό διάστημα παρεντερική διατροφή (264) την νευρική ανορεξία, το μαρασμό στα βρέφη και την έλλειψη τρανσκοβαλαμίνης (198, 199, 243).

Στις περιπτώσεις διατροφικής ανεπάρκειας η ουδετεροπενία είναι αποτέλεσμα μη αποδοτικής κοκκιοποίησης, ελάττωσης των ωριμαζόντων κυττάρων και των αποθηκών των ουδετεροφίλων. Στη γλυκογονίαση τύπου Ιβ ο μυελός είναι υποκυτταρικός και παρατηρείται αναστολή της ωρίμανσης μετά το στάδιο του μυελοκυττάρου (126). Ανωμαλίες στη χημειοταξία και στη φαγοκυττάρωση έχουν επίσης παρατηρηθεί στα ουδετερόφιλα των πασχόντων, εύρημα που συμβάλει στην αυξημένη ευαισθησία των ασθενών αυτών σε υποτροπιάζουσες λοιμώξεις.

Αυξημένη καταστροφή των ουδετεροφίλων στο δικτυοενδοθηλιακό σύστημα παρατηρείται σε περιπτώσεις αύξησης του μεγέθους του σπληνός λόγω πυλαίας υπέρτασης ή παθήσεων του σπληνός και στην κακοήγη ιστιοκυττάρωση. Η ουδετεροπενία είναι ήπια και συνοδεύεται συνήθως από θρομβοπενία και αναιμία. Ο βαθμός της ουδετεροπενίας εξαρτάται από τους αντισταθμιστικούς μηχανισμούς του μυελού των οστών. Η θεραπεία συνίσταται στην αντιμετώπιση της υποκείμενης νόσου.

Διήθηση του μυελού των οστών από κακοήγη νόσο (λευχαιμία, λέμφωμα, μεταστατική νόσος στο μυελό των οστών) ή μυελοϊνωση οδηγεί στην εκδήλωση ουδετεροπενίας λόγω καταστολής της κοκκιοποίησης.

Οι *ουδετεροπενίες ανοσολογικής αρχής* οφείλονται στην ανάπτυξη ανοσολογικού μηχανισμού που οδηγεί είτε στην καταστροφή ουδετερόφιλων πολυμορφοπύρηνων στην περιφέρεια είτε στην ελάττωση της παραγωγής κοκκιοκυττάρων στο μυελό των οστών. Διακρίνονται σε *ισοάνοσες*, *αυτοάνοσες* και *ουδετεροπενίες* που συνοδεύουν ανοσολογικές.

Η *ισοάνοση νεογνική ουδετεροπενία* οφείλεται σε αλλοαντισώματα μητρικής προελεύσεως, προερχόμενα από ευαισθητοποίηση της μητέρας σε αντιγόνα των ουδετεροφίλων του εμβρύου, που πέρασαν στο έμβρυο μέσω του πλακούντα και

στρέφονται έναντι των NA1 και NA2 αντιγόνων των κοκκιοκυττάρων του νεογνού. Τελευταία έχει αναγνωρισθεί και άλλη αντιγονική περιοχή (SH), που έχει προκύψει από μετάλλαξη του γονιδίου του FcγRIIIB υποδοχέα των ουδετεροφίλων, εναντίον της οποίας στρέφονται τα αλλοαντισώματα της μητέρας σε 4 περιπτώσεις νεογνικής ουδετεροπενίας (265). Ο μυελός των οστών εμφανίζεται υπερπλαστικός, ενώ έχουν εξαντληθεί τα ώριμα ουδετερόφιλα πολυμορφοπύρηνα. Η συχνότητά της είναι 0.5 – 2 περιπτώσεις ανά 1000 γεννήσεις ζώντων νεογνών (255). Η ουδετεροπενία εμφανίζεται τις πρώτες μέρες μετά τη γέννηση και μπορεί να διαρκέσει από από μερικές εβδομάδες έως και 6 μήνες. Τα νεογνά μπορεί να εμφανίσουν λοιμώξεις όπως ομφαλίτιδα, πνευμονία, σηψαιμία ή μηνιγγίτιδα. Συνηθέστερος υπεύθυνος μικροβιακός παράγοντας είναι ο χρυσίζων σταφυλόκοκκος ενώ ενοχοποιούνται συχνά και το κολοβακτηρίδιο ή ο β-αιμολυτικός στρεπτόκοκκος. Συμπτωματική θεραπεία με παρεντερική χορήγηση αντιβιοτικών είναι απαραίτητη ενώ συνιστάται και ο G-CSF (131).

Νεογνική άνοση ουδετεροπενία έχει περιγραφεί και σε νεογνά μητέρων με αυτοάνοση ουδετεροπενία. Τα αντιουδετεροφιλικά αντισώματα που κυκλοφορούν στο αίμα της μητέρας περνούν διαμέσω του πλακούντα και προκαλούν ουδετεροπενία στο νεογνό που μπορεί να διαρκέσει 2 έως 4 εβδομάδες (266). Η περίπτωση αυτή δεν είναι συχνή.

Άλλες αιτίες νεογνικής ουδετεροπενίας αποτελούν η προεκλαμψία της μητέρας, περιγεννητικά συμβάματα όπως περιγεννητική ασφυξία, ενδοκοιλιακή αιμορραγία, σύνδρομο αναπνευστικής δυσχέρειας, και η αιμολυτική νόσος του νεογνού.

Ουδετεροπενία παρατηρείται σε ένα ποσοστό 8% των νεογνών που νοσηλεύονται σε Μονάδα Εντατικής Νοσηλείας αποτελώντας ένα συχνό πρόβλημα σε αυτή την ομάδα των ασθενών (131). Έχει συσχετισθεί με αυξημένη θνησιμότητα σε νεογνά με σηψαιμία. Αποτελεί επίσης παράγοντα κινδύνου για την εκδήλωση βακτηριδιακών λοιμώξεων σε πολύ χαμηλού βάρους γέννησης πρόωρα νεογνά των οποίων η μητέρα εμφάνισε προεκλαμψία (256).

Άλλες ανοσολογικές διαταραχές που συνοδεύονται από ουδετεροπενία είναι: διαταραχές των ανοσοσφαιρινών (X-συνδεδεμένη αγαμμασφαιριναιμία (267), υπερ-IgM σύνδρομο (268), συνδυασμένη ανοσοανεπάρκεια, μεμονωμένη ανεπάρκεια IgA), η υποπλασία χόνδρου-τριχών (που περιγράφηκε στο κεφάλαιο 2) και

διαταραχές στη λειτουργία των T- κυττάρων. Αυτοάνοσα νοσήματα όπως ο συστηματικός ερυθματώδης λύκος και το σύνδρομο επίκτητης ανοσολογικής ανεπάρκειας συνοδεύονται επίσης από ουδετεροπενία, η οποία μπορεί να είναι αποτέλεσμα συνδυασμού παραγόντων όπως ανεπαρκούς κοκκιοποίησης, σχηματισμού αντιουδετεροφιλικών αντισωμάτων, χορήγησης φαρμάκων ή υπερσπληνισμού. Χρόνια ουδετεροπενία συνοδεύει επίσης αύξηση των κυκλοφορούντων μεγάλων κοκκιωδών T-λεμφοκυττάρων (LGL) η οποία αναφέρεται στη βιβλιογραφία ως LGL- λεμφοϋπερπλαστική νόσος ή T-χρόνια λεμφοκυτταρική λευχαιμία. Η διαταραχή μπορεί να συνυπάρχει με ρευματοειδή αρθρίτιδα και ηπατοσπληνομεγαλία, με αιμολυτική αναιμία ή με αμιγή απλασία της ερυθράς σειράς (199). Υποστηρίζεται ότι τα συγκεκριμένα T-λεμφοκύτταρα καταστέλλουν την αιμοποίηση δρώντας πάνω στα προγονικά κύτταρα της κοκκιώδους σειράς πιθανώς μέσω κυτταροκινών όπως ο TNF-α.

Η *αυτοάνοση ουδετεροπενία* είναι διαταραχή που οφείλεται στην αυξημένη καταστροφή των ουδετεροφίλων λόγω αντισωμάτων στο αίμα των ασθενών που στρέφονται κατά των ιδίων κοκκιοκυττάρων. Μπορεί να παρατηρηθεί είτε ως μεμονωμένο φαινόμενο είτε δευτεροπαθώς σε συνδυασμό με άλλα αυτοάνοσα ή με λοιμώξεις, χορήγηση φαρμάκων, κακοήθειες ή μετά από αλλογενή μεταμόσχευση αιμοποιητικών κυττάρων (269, 270).

ΠΙΝΑΚΑΣ Η : Διαταραχές που σχετίζονται με ουδετεροπενία μέσω ανοσολογικού μηχανισμού

Αυτοάνοσα νοσήματα

Αυτοάνοση αιμολυτική αναιμία
Αυτοάνοση θρομβοπενία
Σύνδρομο Evans
Συστηματικός ερυθματώδης λύκος (271)
Σύνδρομο Felty (272, 273)
Ρευματοειδής αρθρίτιδα
Σύνδρομο Sjogren
Χρόνια ενεργός ηπατίτιδα
Νόσος του Crohn (274)
Σκληρόδερμα
Πρωτοπαθής χολική κίρρωση (275)

	Νόσος του Graves (276)
Λοιμώξεις	Λοιμώδης Μονοπυρήνωση
	HIV λοίμωξη
Κακοήθειες	Λευχαιμία
	Non-Hodgkin λέμφωμα
	Νόσος Hodgkin (277)
	Λεμφοϋπερπλαστικά νοσήματα

Διαταραχές ανοσοσφαιρινών

Αντιδράσεις σε φάρμακα

Αλλογενής μεταμόσχευση αιμοποιητικών κυττάρων

Τα αντιπολυμορφοπυρηνικά αντισώματα είναι συνήθως του τύπου των IgG, σπανιότερα των IgM και πολύ σπάνια των IgA μορίων (278). Τα αντιγόνα εναντίον των οποίων στρέφονται τα αυτοαντισώματα είναι συνήθως μεμβρανικά μόρια του αντιγονικού συστήματος N των ουδετεροφίλων (NA1, NA2, NB1). Μπορεί επίσης να είναι ο τρίτος υποδοχέας για το συμπλήρωμα (CR3), η β_2 -ιντεγκρίνη Mac-1 της επιφάνειας του ουδετερόφιλου (CD11b/CD18), η ακτίνη (279, 280) ή άλλες, άγνωστες μέχρι στιγμής, πρωτεϊνικές περιοχές της μεμβράνης των ουδετεροφίλων. Η καταστροφή των επικαλυμμένων με αντίσωμα ουδετεροφίλων γίνεται με φαγοκυττάρωση στο ήπαρ και στο σπλήνα. Οι μηχανισμοί που πυροδοτούν την παραγωγή αυτοαντισωμάτων στις ουδετεροπενίες αυτές παραμένουν άγνωστοι. Ο μυελός των οστών παρουσιάζει φυσιολογική ή αυξημένη κυτταροβρίθεια, συνήθως ελαττωμένο αριθμό ώριμων ουδετεροφίλων και ενίοτε αναστολή της ωρίμανσης των κοκκιοκυττάρων σε προχωρημένα στάδια της διαφοροποίησής τους. Ο αριθμός των κυκλοφορούντων ουδετεροφίλων στο περιφερικό αίμα συνήθως είναι πολύ χαμηλός (κάτω από 500 κύτταρα / μ l) ή πλησιάζει το μηδέν. Η βαρύτητα των λοιμώξεων δεν συμβαδίζει πάντα με το βαθμό της ουδετεροπενίας και η εντόπισή τους συνήθως είναι το δέρμα, η στοματοφαρυγγική κοιλότητα, οι παραρρινικοί κόλποι, η περιπρωκτική και η περιγεννητική χώρα. Ο τίτλος των αντιπολυμορφοπυρηνικών αντισωμάτων δεν επηρεάζει τη βαρύτητα ή την πορεία της ουδετεροπενίας (192, 280, 281).

Αναλυτικά η πρωτοπαθής αυτοάνοση ουδετεροπενία της βρεφικής και της παιδικής ηλικίας θα συζητηθεί στο κεφάλαιο 4.

Δευτεροπαθής ανοσολογικής αρχής ουδετεροπενία έχει περιγραφεί και στη ρευματοειδή αρθρίτιδα και αποδίδεται σε κυκλοφορούντα ανοσοσυμπλέγματα που προσκολλώνται στα κοκκιοκύτταρα και προκαλούν την καταστροφή τους, ενώ στη νόσο του Graves η ουδετεροπενία προκαλείται από μη ειδική προσκόλληση ανοσοσφαιρίνης στην επιφάνεια των ουδετεροφίλων.

4. ΧΡΟΝΙΑ ΚΑΛΟΗΘΗΣ ΟΥΔΕΤΕΡΟΠΕΝΙΑ ΤΗΣ ΒΡΕΦΙΚΗΣ ΚΑΙ ΤΗΣ ΠΑΙΔΙΚΗΣ ΗΛΙΚΙΑΣ- ΠΡΩΤΟΠΑΘΗΣ ΑΥΤΟΑΝΟΣΗ ΟΥΔΕΤΕΡΟΠΕΝΙΑ

Αποτελεί την πιο συχνή αιτία χρόνιας ουδετεροπενίας στα βρέφη και στα παιδιά με συχνότητα 1 περίπτωση ανά 100.000 παιδιά το χρόνο. Στη διαταραχή αυτή ο χαμηλός αριθμός κυκλοφορούντων ουδετεροφίλων είναι το μόνο αιματολογικό εύρημα ενώ απουσιάζουν άλλοι παράγοντες που θα μπορούσαν να προκαλέσουν ουδετεροπενία. Αποτελεί γενικά καλοήγη διαταραχή που συνήθως υφίεται αυτόματα σε αντιδιαστολή με τη σοβαρή συγγενή ουδετεροπενία (Severe Congenital Neutropenia, SCN).

Οι περισσότερες περιπτώσεις που αποκαλούνται “χρόνια καλοήθης διαταραχή της βρεφικής και παιδικής ηλικίας” πιστεύεται ότι είναι αυτοάνοσης αιτιολογίας όπως επίσης οι περιπτώσεις του καλούμενου “lazy leukocyte syndrome”, που χαρακτηρίζεται από σοβαρή ουδετεροπενία και φυσιολογικό μυελό των οστών (282).

Πιστεύεται ότι η συχνότητα της διαταραχής αυτής μπορεί να είναι ακόμη μεγαλύτερη εάν συνυπολογιστούν περιπτώσεις ουδετεροπενίας που δεν έχουν ταυτοποιηθεί ως αυτοάνοσες είτε γιατί έχουν διαλάβει της προσοχής των ιατρών λόγω της καλοήθους πορείας τους, είτε γιατί έχουν ενταχθεί σε άλλη ομάδα ουδετεροπενιών.

4.1 Κλινικές εκδηλώσεις

Παρουσιάζεται σε παιδιά ηλικίας μικρότερης των 3 ετών, με διάμεση ηλικία εκδήλωσης τους 8-11 μήνες και εύρος 8 έως 38 μήνες. Η μελέτη της μεγαλύτερης σειράς ασθενών με πρωτοπαθή αυτοάνοση ουδετεροπενία (240 περιπτώσεις) από τους Bux και συν. (278) έδειξε ότι η μέση ηλικία διάγνωσης ήταν οι 8 μήνες, ενώ τα 2/3 των περιπτώσεων διαγνώστηκαν σε ηλικία από 5 έως 15 μηνών. Η κατανομή της διαταραχής στα δυο φύλα έχει υπολογιστεί ως εξής: κορίτσια 54%, αγόρια 46%.

Η δυνητικά μικρότερη ηλικία πρώτης εκδήλωσης της αυτοάνοσης ουδετεροπενίας στα βρέφη συζητάται. Την πιθανότητα προγεννητικής έναρξης της ουδετεροπενίας ενισχύουν οι Calhoun και συν. σε τελευταία μελέτη τους που αναφέρεται στη

περιγραφή δύο περιπτώσεων συγγενούς αυτοάνοσης ουδετεροπενίας σε πρόωρα νεογνά (283).

Η συχνότητα εκδήλωσης βακτηριδιακών λοιμώξεων δε σχετίζεται πάντα με το βαθμό της ουδετεροπενίας, ενώ η ευαισθησία σε λοιμογόνους παράγοντες ποικίλει από ασθενή σε ασθενή. Συνήθως η ουδετεροπενία εκδηλώνεται με ήπιες λοιμώξεις του δέρματος και του ανώτερου αναπνευστικού συστήματος και σπανιότερα με σοβαρές λοιμώξεις, όπως πνευμονία, μηνιγγίτιδα και σηψαιμία. Στο 8% των περιπτώσεων η ουδετεροπενία εντοπίζεται σε τυχαίο εργαστηριακό έλεγχο (278). Οι λοιμώξεις που εκδηλώνονται σε ασθενείς με αυτοάνοση ουδετεροπενία είναι συνήθως ηπιότερες από αυτές που παρατηρούνται σε ασθενείς με άλλες μορφές ουδετεροπενίας (σοβαρή συγγενής ουδετεροπενία, ουδετεροπενία από τη χρήση μυελοτοξικής χημειοθεραπείας) με αντίστοιχο αριθμό κυκλοφορούντων ουδετεροφίλων. Ο παρακάτω πίνακας δείχνει το είδος των λοιμώξεων που έχουν καταγραφεί στη διάγνωση της πρωτοπαθούς αυτοάνοσης ουδετεροπενίας κατά σειρά συχνότητας.

ΠΙΝΑΚΑΣ : Λοιμώξεις στη διάγνωση της πρωτοπαθούς αυτοάνοσης ουδετεροπενίας

Λοίμωξη ανώτερου αναπνευστικού συστήματος
Οξεία μέση ωτίτιδα
Πυοδερμία
Πυρετός αγνώστου αιτιολογίας
Αποστήματα
Γαστρεντερίτιδα
Πνευμονία
Λεμφαδενίτιδα
Σηψαιμία
Λοίμωξη ουροποιογεννητικού συστήματος
Επιπεφυκίτιδα
Μηνιγγίτιδα

Ήπια σπληνομεγαλία μπορεί να συνυπάρχει με την ουδετεροπενία.

4.2 Εργαστηριακά ευρήματα

Περιφερικό αίμα

Ο αριθμός των κυκλοφορούντων ουδετεροφίλων ποικίλλει μεταξύ 0 και 1500 κύτταρα /μl, με μέση τιμή στην πρωτοδιάγνωση τα 200 κύτταρα / μl. Συχνά ο αριθμός αυτός πλησιάζει το μηδέν. Σχετική μονοκυττάρωση ή ηωσινοφιλία μπορεί να παρατηρηθούν. Παροδικές αυξήσεις του αριθμού των κυκλοφορούντων ουδετεροφίλων σημειώνονται κατά τη διάρκεια επεισοδίων λοιμώξεων (278). Τα υπόλοιπα έμμορφα στοιχεία του αίματος είναι φυσιολογικά αν και έχουν αναφερθεί περιπτώσεις με ήπια θρομβοπενία (αιμοπετάλια ≥ 100.000 / μl).

Μυελός των οστών

Το μυελόγραμμα δείχνει μυελό με φυσιολογική ή αυξημένη κυτταροβρίθεια στην πλειονότητα των περιπτώσεων αυτοάνοσης ουδετεροπενίας. Το 3% των ασθενών σύμφωνα με τη μελέτη των Bux και συν., παρουσιάζει υποπλαστικό μυελό των οστών (278). Ο αριθμός των ραβδοπυρήνων και των ώριμων ουδετεροφίλων συνήθως είναι ελαττωμένος. Ο αριθμός των μεταμυελοκυττάρων μπορεί επίσης να βρεθεί ελαττωμένος. Αναστολή ωρίμανσης μπορεί να παρατηρηθεί στα τελικά στάδια διαφοροποίησης (μεταμυελοκύτταρα, ραβδοπύρηνα), αλλά η ωρίμανση των κοκκιοκυττάρων σε όλες τις περιπτώσεις φτάνει το στάδιο του μυελοκυττάρου/μεταμυελοκυττάρου (278). Σε ορισμένες περιπτώσεις έχει παρατηρηθεί φαγοκυττάρωση των κοκκιοκυττάρων από μακροφάγα του μυελού των οστών, εύρημα ενδεικτικό του ότι η απομάκρυνση των ευαισθητοποιημένων κοκκιοκυττάρων μπορεί να ξεκινάει από το μυελό των οστών. Τα αυτοαντισώματα που προκαλούν τη διαταραχή αυτή ενίοτε στρέφονται και εναντίον των προγονικών κυττάρων της κοκκιώδους σειράς (284, 285).

In vitro μελέτες του μυελού των οστών με καλλιέργειες μονοπύρηνων κυττάρων έχουν δείξει ότι ο αριθμός των αποικιών προγονικών αιμοποιητικών κυττάρων της κοκκιώδους σειράς είναι φυσιολογικός ή αυξημένος (192).

Ο σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν να διερευνηθεί η αντίδραση του μυελού των οστών στην ουδετεροπενία αξιολογώντας ποιοτικά τα προγονικά κύτταρα της

κοκκιδόδους σειράς όσον αφορά την επαναπολλαπλασιαστική τους ικανότητα που συνδέεται άμεσα με την ικανότητα του μυελού να παράγει ώριμα ουδετερόφιλα.

Αντιπολυμορφοπυρηνικά αντισώματα

Πρώτοι οι Lalezari το 1975 (286) και Boxer και συν. (287) έδειξαν ότι ειδικά έναντι των κοκκιοκυττάρων αυτοαντισώματα μπορεί να προκαλέσουν χρόνια ουδετεροπενία.

Αντιπολυμορφοπυρηνικά αντισώματα μπορεί να ανιχνευτούν σχεδόν σε όλους τους ασθενείς με συνδυασμό δοκιμασιών έμμεσου ανοσοφθορισμού (μέθοδος GIFT-Granulocyte Immunofluorescence Test) και μεθόδων συγκόλλησης των κοκκιοκυττάρων (μέθοδος GAT-Granulocyte Agglutination Test) (288). Ο συνδυασμός των μεθόδων αυτών εξασφαλίζει υψηλή ευαισθησία και ειδικότητα. Άλλες μέθοδοι όπως η MAIGA (Monoclonal-Antibody-specific Immobilization of Granulocyte Antigens) και το chemiluminescence test είναι επίσης διαθέσιμες και μπορούν να χρησιμοποιηθούν εναλλακτικά, αλλά δε χαρακτηρίζονται από την ευαισθησία και την ειδικότητα των μεθόδων που προαναφέρθηκαν.

Στόχος των αντισωμάτων είναι ειδικά αντιγόνα της επιφάνειας των ουδετεροφίλων, συχνότερα τα NA1 και NA2 (34%), το NB1. Τα NA1 και NA2 είναι γλυκοζυλιωμένοι ισότοποι του υποδοχέα οψωνινοποίησης των ουδετεροφίλων FcγRIIIb (CD16) και είναι αντιγόνα που εκφράζονται αποκλειστικά στα ουδετερόφιλα. Το 43% των ατόμων της λευκής φυλής είναι θετικά στα NA1 και NA2 αντιγόνα (289), ενώ το 0.1 % του πληθυσμού των Ευρωπαίων δεν εκφράζει τον υποδοχέα FcγRIII πάνω στα ουδετερόφιλα λόγω έλλειψης του υπεύθυνου γονιδίου (265). Η ύπαρξη διαφορετικών αντιγονικών επιτόπων πάνω στον υποδοχέα για το Fc τμήμα των IgG αντισωμάτων είναι αποτέλεσμα γενετικού πολυμορφισμού. Ο υποδοχέας αυτός προσδιορίζεται σε διαλυτή μορφή στο πλάσμα των ασθενών στο οποίο απελευθερώνεται κατά τη διάρκεια της απόπτωσης των ουδετεροφίλων όπως έχουν δείξει in vitro μελέτες (265).

Το NB1 (CD177) είναι γλυκοπρωτεΐνη της μεμβράνης των ουδετεροφίλων και των δευτερευόντων κοκκίων των κοκκιοκυττάρων (280) και πρόσφατα μελετήθηκε σε μοριακό επίπεδο (290). Άλλα αντισώματα στρέφονται εναντίον του μορίου

προσκόλλησης CD11b/CD18 (21% σύμφωνα με τη μελέτη των Bux και συν.), του τρίτου υποδοχέα του συμπληρώματος C3b, CD35 (14%) ή του υποδοχέα FcγRII (2%). Τα αντισώματα έναντι του CD11b/CD18 επηρεάζουν την προσκολλητική ικανότητα των ουδετεροφίλων (279). Τα περισσότερα είναι IgG τύπου, ενώ έχουν βρεθεί και αντισώματα IgM τύπου.

Η ανίχνευση των αντιπολυμορφοπυρηνικών αντισωμάτων παρουσιάζει τεχνικές δυσκολίες και εξαρτάται από τον αριθμό των προς εξέταση κοκκιοκυττάρων, τη φάση της ουδετεροπενίας, το βαθμό ενεργοποίησης των ουδετεροφίλων λόγω φλεγμονής, ενώ παρεμποδίζεται από μη ειδική σύνδεση IgG στους Fcγ υποδοχείς. Επειδή ο τίτλος των αντισωμάτων είναι συνήθως χαμηλός, στο 30% περίπου των περιπτώσεων η αναζήτησή τους στον ορό του ασθενούς πρέπει να επαναληφθεί αρκετές φορές μέχρι την ανίχνευσή τους (288).

Δεν υπάρχει συσχέτιση μεταξύ του τίτλου των αντισωμάτων και της σοβαρότητας των κλινικών εκδηλώσεων (280) και η απουσία ανιχνεύσιμων αντισωμάτων δεν αποκλείει τη διάγνωση της αυτοάνοσης ουδετεροπενίας (192). Τα αντισώματα μπορεί να παραμείνουν στον ορό των ασθενών για παρατεταμένο χρονικό διάστημα (μήνες ή χρόνια) (289), αλλά βαθμιαία γίνονται μη ανιχνεύσιμα πριν την εκδήλωση της κλινικής ύφεσης. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει πρόσφατη αναφορά στη βιβλιογραφία για διαφορετική ειδικότητα των αντιπολυμορφοπυρηνικών αντισωμάτων μεταξύ περιπτώσεων πρωτοπαθούς και δευτεροπαθούς αυτοάνοσης ουδετεροπενίας (289).

Άλλα ευρήματα

Υπάρχει στη βιβλιογραφία μελέτη που συσχετίζει την αυτοάνοση ουδετεροπενία των παιδιών με λοίμωξη από τον παρβοϊό B19 (254), αλλά οι Bux και συν. δεν επιβεβαίωσαν τέτοιου είδους αιτιολογική συσχέτιση (278).

Η συγκέντρωση ανοσοσφαιρινών στον ορό των ασθενών είναι φυσιολογική (280, 291), αν και έχουν αναφερθεί λίγες περιπτώσεις με αυξημένη IgM ή με ελαττωμένες τις υποτάξεις της IgG, IgG2 και IgG3 (291).

4.3 Παθοφυσιολογικός μηχανισμός

Η ουδετεροπενία προκύπτει από την καταστροφή των επικαλυμμένων με αντίσωμα ουδετεροφίλων με φαγοκυττάρωση από το σύστημα των μακροφάγων, αλλά, επιπλέον, η παρουσία αντιπολυμορφοπυρηνικών αντισωμάτων μπορεί να έχει επίπτωση σε διάφορες λειτουργίες των ουδετεροφίλων όπως φαγοκυττάρωση, προσκολλητική ικανότητα, παραγωγή ελεύθερων ριζών, οψωνινοποίηση (279, 292). Όταν τα αντισώματα κατευθύνονται εναντίον των προγονικών κυττάρων της κοκκιάδους σειράς, τότε η ουδετεροπενία τείνει να είναι πιο σοβαρή λόγω ελάττωσης των αποθηκών των ουδετεροφίλων του μυελού (193, 293).

Ο μηχανισμός που προκαλεί την παραγωγή αντισωμάτων στην αυτοάνοση ουδετεροπενία των παιδιών δεν είναι γνωστός και στην παρούσα μελέτη γίνεται προσπάθεια διερεύνησης πιθανών εναυσμάτων. Οι Shastri και Logue (280) προτείνουν δυο μηχανισμούς σχετικά με το ανοσολογικό μηχανισμό της αυτοάνοσης ουδετεροπενίας των ενηλίκων. Σύμφωνα με τον πρώτο, αντισώματα έναντι ξένων αντιγόνων όπως ιοί, βακτήρια, κάνουν διασταυρούμενη αντίδραση με αυτοαντιγόνα. Σε αυτή την περίπτωση τα αντισώματα είναι πολυκλωνικά και η αντίδραση είναι αυτοπεριοριζόμενη σε ένα φυσιολογικό ανοσοποιητικό σύστημα. Σύμφωνα με τον δεύτερο μηχανισμό η ανοσολογική διαταραχή προκύπτει από την αναστολή της καταστολής ενός κλώνου κυττάρων που είναι ικανός να αντιδρά με αυτοαντιγόνα.

Σύμφωνα με μια σημαντική μελέτη του Bux και συν. υπάρχει συσχέτιση μεταξύ των NA1 ειδικών αντισωμάτων και του HLA-DR2 (294). Μέχρι στιγμής λίγα είναι γνωστά για την κλωνικότητα των αυτοαντισωμάτων της αυτοάνοσης ουδετεροπενίας των παιδιών και η αιτιολογία της διαταραχής παραμένει άγνωστη. Είναι πιθανό παραπάνω του ενός μηχανισμοί να είναι υπεύθυνοι για τη νόσο.

4.4 Διάγνωση

Η διάγνωση τίθεται από το ιστορικό και την κλινική εξέταση όταν η ουδετεροπενία παρουσιάζεται στα 2 πρώτα χρόνια της ζωής και δεν υπάρχει ιστορικό σοβαρών λοιμώξεων για διάστημα παρακολούθησης τουλάχιστον 3 μηνών. Η μορφολογία των ουδετεροφίλων αλλά και ο αριθμός των λοιπών εμμόρφων στοιχείων

του αίματος πρέπει να είναι φυσιολογικά και να έχουν αποκλειστεί άλλες μορφές ουδετεροπενίας, συστηματική νόσος που να συνοδεύεται από ουδετεροπενία, έκθεση σε ακτινοβολία ή λήψη κυτταροτοξικού ή μη φαρμάκου που θα μπορούσε να ευθύνεται για την εκδήλωση ουδετεροπενίας. Η εξέταση μυελού των οστών δείχνει φυσιολογική μορφολογία των ουδετεροφίλων, ενώ αναστολή ωρίμανσης των κοκκιοκυττάρων στα τελευταία στάδια διαφοροποίησής τους (μεταμυελοκύτταρα, ραβδοπύρηνα) παρατηρείται σε μερικές περιπτώσεις. Η διάγνωση επιβεβαιώνεται με την ανίχνευση των αντιπολυμορφοπυρηνικών αντισωμάτων, αλλά η απουσία τους δεν την αποκλείει και γι' αυτό δε θεωρείται απαραίτητη, εάν υπάρχουν οι κλινικές ενδείξεις.

4.5 Διαφορική Διάγνωση

Περιλαμβάνει: α) άλλα αίτια αυτοάνοσης ουδετεροπενίας όπως σύνδρομο Evans, αντίδραση σε φάρμακα, β) την παροδική μεταλοιμώδη ουδετεροπενία σε περιπτώσεις που είναι παρατεταμένης διάρκειας, γ) σύνδρομο ανοσοανεπάρκειας, δ) μεταβολικά νοσήματα, ε) χρόνιες συγγενείς ουδετεροπενίες όπως η σοβαρή συγγενής ουδετεροπενία (SCN), η κυκλική ουδετεροπενία, το σύνδρομο Shwachman-Diamond.

4.6 Πορεία – Πρόγνωση

Η πορεία της ουδετεροπενίας είναι συνήθως ήπια και αυτόματες υφέσεις παρατηρούνται σχεδόν σε όλους τους ασθενείς μετά από χρονική περίοδο με διάμεση διάρκεια 20 μήνες και εύρος 6-54 μήνες. Στο 95% των περιπτώσεων ο αριθμός των ουδετεροφίλων έχει ανακάμψει πριν την ηλικία των 4 χρόνων. Με την αύξηση της ηλικίας οι αυτόματες υφέσεις τείνουν να γίνουν λιγότερο πιθανές. Δεν έχει αναφερθεί αυξημένη συχνότητα εκδήλωσης άλλων αυτοάνοσων διαταραχών στο διάστημα παρακολούθησης των ασθενών αυτών (278). Η πρόγνωση της νόσου είναι άριστη αν αντιμετωπίζονται σωστά και έγκαιρα οι λοιμώξεις .

4.7 Θεραπευτική αντιμετώπιση

Η συμπτωματική θεραπεία με αντιβιοτικά μπορεί να αντιμετωπίσει επιτυχώς τα επεισόδια λοιμώξεων σε ποσοστό μεγαλύτερο του 90%. Τους πρώτους μήνες παρακολούθησης έχει ένδειξη η παρεντερική χορήγηση αντιβιοτικών ευρέως φάσματος σε επεισόδια πυρετού. Εάν μετά το πρώτο διάστημα παρακολούθησης ο ασθενής δεν παρουσιάζει σοβαρές λοιμώξεις και ανταποκρίνεται στα αντιβιοτικά, οι επόμενες λοιμώξεις μπορούν να αντιμετωπίζονται όπως σε οποιοδήποτε παιδί. Η προφυλακτική χορήγηση τριμεθοπρίμης-σουλφομεθοξαζόλης επιμηκύνει τα διαστήματα τα ελεύθερα λοιμώξεων σε ασθενείς με υποτροπιάζοντα επεισόδια οξείας μέσης ωτίτιδας.

Για την αύξηση του αριθμού των κυκλοφορούντων ουδετεροφίλων έχουν χρησιμοποιηθεί κορτικοστεροειδή (278), γ-σφαιρίνη (295) και ο G-CSF (296, 297, 298). Η γ-σφαιρίνη προκαλεί παροδική αύξηση του αριθμού των ουδετεροφίλων και μπορεί και η ίδια να προκαλέσει ουδετεροπενία, ενώ τα κορτικοστεροειδή σε παρατεταμένη δράση έχουν ανεπιθύμητες ενέργειες και αλλοιώνουν την άμυνα του οργανισμού. Ο G-CSF είναι αποτελεσματικός στην αύξηση το αριθμού των ουδετεροφίλων αλλά δεν συνιστάται για τη θεραπεία της πρωτοπαθούς καλοήθους ουδετεροπενίας, μια και αυτή έχει καλοήθη πορεία και είναι αυτοπεριοριζόμενη νόσος. Συνιστάται μόνο για την αντιμετώπιση σοβαρών λοιμώξεων και πριν από χειρουργικές επεμβάσεις.

B. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

V. ΑΣΘΕΝΕΙΣ -ΜΕΘΟΔΟΙ

1. ΑΣΘΕΝΕΙΣ

Μελετήθηκαν 35 παιδιά με πρωτοπαθή καλοήγη ουδετεροπενία που εξετάστηκαν και νοσηλεύτηκαν στην κλινική Παιδιατρικής Αιματολογίας/Ογκολογίας του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ηρακλείου κατά το διάστημα 1995-2001 (από τον Ιανουάριο 1995 έως το Δεκέμβριο 2001). Είκοσι δύο από αυτά ήταν κορίτσια και 13 αγόρια (63% : 37%). Η ηλικία στη διάγνωση κυμαίνονταν από 0.8 έως 36 μήνες (διάμεση ηλικία 9 μήνες). Η μέση διάρκεια παρακολούθησης μετά την αρχική διάγνωση και προ της εισαγωγής τους στην κλινική για περαιτέρω έλεγχο ήταν 4 μήνες.

Τα κριτήρια διάγνωσης ήταν: ηλικία έναρξης της νόσου πριν τον 3^ο χρόνο ζωής, απουσία απειλητικών για τη ζωή λοιμώξεων για ένα διάστημα παρακολούθησης μεγαλύτερο από 2-3 μήνες, φυσιολογική μορφολογία των ουδετεροφίλων του περιφερικού αίματος, φυσιολογική ή αυξημένη κυτταροβρίθεια του μυελού των οστών με ή χωρίς αναστολή ωρίμανσης στα τελευταία στάδια διαφοροποίησης των κοκκιοκυττάρων (ραβδοπύρινα, ώριμα ουδετερόφιλα). Η ουδετεροπενία έπρεπε να αποτελεί το μόνο αιματολογικό εύρημα, να μην είναι κυκλική και να έχουν αποκλειστεί όλοι οι άλλοι παράγοντες (υποκείμενο νόσημα, έκθεση σε ακτινοβολία, λήψη φαρμάκων) που θα μπορούσαν να προκαλέσουν ελάττωση του αριθμού των ουδετεροφίλων στο περιφερικό αίμα. Περιπτώσεις παροδικής ουδετεροπενίας λόγω συνυπάρχουσας ή πρόσφατης ιογενούς ή βακτηριδιακής λοίμωξης δε συμπεριλήφθησαν στη μελέτη. Κανένας από τους ασθενείς δεν είχε αυξημένη C-αντιδρώσα πρωτεΐνη (CRP) ή άλλη εργαστηριακή ένδειξη λοίμωξης κατά την ένταξη στη μελέτη.

Η μέση τιμή των ουδετεροφίλων στη διάγνωση ήταν 480 κύτταρα/μl (εύρος 100-1370 κύτταρα/μl). Η πλειονότητα των ασθενών (61.5%) είχε πολύ χαμηλό αριθμό ουδετεροφίλων στη διάγνωση (ΑΑΠ<500).

Οι τιμές των κλασμάτων του συμπληρώματος C3 και C4 ήταν φυσιολογικές σε όλα τα παιδιά με χρόνια καλοήγη ουδετεροπενία. Αντιτυρηνικά αντισώματα δεν ανευρέθησαν. Οι τιμές των ανοσοσφαιρινών IgG, IgA, IgM ήταν φυσιολογικές στην πλειοψηφία των παιδιών. Σε δύο παιδιά ήταν αυξημένα τα επίπεδα της IgM, ένα παιδί είχε αυξημένη IgA, η οποία επανήλθε στα φυσιολογικά επίπεδα μετά από ένα χρόνο παρακολούθησης, ενώ δύο παιδιά είχαν χαμηλά επίπεδα IgG.

Για την εκτίμηση των αποτελεσμάτων οι ασθενείς χωρίστηκαν περαιτέρω σε ομάδες ανάλογα με τον απόλυτο αριθμό πολυμορφοκυττάρων. Η ομάδα της σοβαρής ουδετεροπενίας (ομάδα Α) περιελάμβανε τα περιστατικά με λιγότερο από 500 πολυμορφοκύτταρα στο περιφερικό αίμα ενώ η ομάδα της μέτριας - ήπιας ουδετεροπενίας (ομάδα Β) τα παιδιά με αριθμό πολυμορφοκυττάρων που κυμαίνονταν από 501 έως 1499 /μl περιφερικού αίματος. Τα χαρακτηριστικά των ασθενών με χρόνια καλοήγη ουδετεροπενία συνοπτικά φαίνονται στον πίνακα 1.

Πίνακας 1. Χαρακτηριστικά ασθενών με χρόνια καλοήγη ουδετεροπενία

	Σύνολο	ομάδα Α	ομάδα Β
Αρ. ασθενών	35	21	14
Αναλογία αγοριών/κοριτσιών	13/22		
Ηλικία (μήνες)*	9 (0.8-60)		
Διάρκεια (μήνες)#	16 (6-57)		

* Η ηλικία αναφέρεται στη διάγνωση

Διάρκεια μέχρι την επίτευξη πλήρους ύφεσης

Με σκοπό τη διερεύνηση της διαφοροποίησης της πρωτοπαθούς ουδετεροπενίας της βρεφικής και παιδικής ηλικίας από δευτεροπαθείς ουδετεροπενίες

διαφορετικής αρχής μελετήθηκαν 25 παιδιά με οξεία λευχαιμία (23 ΟΛΛ και 2 ΟΜΛ) μετά την επίτευξη κλινικής ύφεσης. Από αυτά 16 εκδήλωσαν δευτεροπαθή ουδετεροπενία οφειλόμενη στη χορήγηση χημειοθεραπείας. Η διάμεση ηλικία στην ομάδα αυτή ήταν τα 5 χρόνια. Ο αριθμός πολυμορφοκυττάρων του περιφερικού αίματος κυμαινόταν από 200 έως 1499 κύτταρα/μl. Τα παιδιά της ομάδας αυτής μελετήθηκαν πριν από τη χορήγηση G-CSF.

Τριάντα παιδιά αντίστοιχης ηλικίας, χωρίς ουδετεροπενία, αιματολογικές κακοήθειες ή νεοπλασματική νόσο αποτέλεσαν την ομάδα ελέγχου. Σε 15 από αυτά έγινε μυελόγραμμα στα πλαίσια διερεύνησης της νόσου τους (π.χ. πορφυρία, μεταβολικά νοσήματα, ιδιοπαθής θρομβοπενική πορφύρα). Η εξέταση του μυελού των οστών έδειξε φυσιολογική κυτταροβρίθεια και ανάπτυξη των τριών κυτταρικών σειρών του αίματος. Κανένα από τα παιδιά-μάρτυρες δεν παρουσίαζε κλινικά ή εργαστηριακά σημεία λοίμωξης. Για την εκτίμηση των ενδογενών επιπέδων των μορίων προσκόλλησης και του G-CSF χρησιμοποιήθηκαν σαν μάρτυρες 15 υγιή παιδιά, τα οποία προσήλθαν στα Εξωτερικά ιατρεία του Νοσοκομείου για εμβολιασμό.

Για τη διενέργεια της μελέτης ελήφθη η έγγραφη συγκατάθεση των γονέων και το πρωτόκολλο της έρευνας εγκρίθηκε από την επιτροπή δεοντολογίας του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου.

Πίνακας 2. Κριτήρια διάγνωσης της χρόνιας καλοήθους ουδετεροπενίας

- Ηλικία έναρξης πριν από το 3^ο έτος ζωής
 - Απουσία ιστορικού απειλητικών για τη ζωή λοιμώξεων για διάστημα παρακολούθησης μεγαλύτερο ή ίσο με 2-3 μήνες
 - Φυσιολογική μορφολογία ουδετεροφίλων σε επίχρισμα περιφερικού αίματος
 - Φυσιολογικός ή υπερκυτταρικός μυελός των οστών με ή χωρίς αναστολή ωρίμανσης των κοκκιοκυττάρων στα τελευταία στάδια διαφοροποίησής τους
 - Απουσία υποκείμενου νοσήματος που συνδυάζεται με εκδήλωση ουδετεροπενίας
 - Αποκλεισμός κυκλικής ουδετεροπενίας
 - Αποκλεισμός λήψης κυτταροτοξικών ή άλλων φαρμάκων που μπορούν να προκαλέσουν ουδετεροπενία
 - Αποκλεισμός άλλων μορφών συγγενούς ή επίκτητης ουδετεροπενίας με τη διενέργεια του αντίστοιχου ελέγχου
-

2. ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Καλλιέργειες προγονικών αιμοποιητικών κυττάρων

Για την εκτίμηση του παραγόμενου αριθμού αποικιών προγονικών αιμοποιητικών κυττάρων της κοκκιδόδους και της ερυθράς σειράς (CFU-GM, BFU-E αντίστοιχα) μονοπύρρηνα κύτταρα μυελού των οστών, ο οποίος ελήφθη για διαγνωστικούς λόγους, ενοφθαλμίστηκαν σε καλλιέργειες μεθυλοκυτταρίνης. Η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε για τις κυτταρικές καλλιέργειες βασίστηκε στην υπάρχουσα βιβλιογραφία (299) και τροποποιήθηκε στο Εργαστήριο Ιστικών Καλλιεργειών της Παιδιατρικής Κλινικής Αιματολογίας/Ογκολογίας. Ο διαχωρισμός των μονοπύρηνων κυττάρων του μυελού των οστών έγινε με επιστοίβαξη σε Ficoll-Hyraque. Το θρεπτικό υλικό αποτελούνταν από α -MEM εμπλουτισμένο με 10% L-γλουταμίνη, 100 IU/ml πενικιλίνη-στρεπτομυκίνη, 10% ορό εμβρύου βοός (FCS) και 10% πυροσταφυλικό νάτριο και τα παρακάτω υλικά στις αντίστοιχες τελικές συγκεντρώσεις: μεθυλοκυτταρίνη 1%, ορό εμβρύου βοός 30%, λευκωματίνη εμβρύου βοός (BSA) 1%, 2-μερκαπτοαιθανόλη 10^{-4} M και αυξητικούς παράγοντες 10%. Τα κύτταρα ενοφθαλμίστηκαν στην καλλιέργεια σε τελική συγκέντρωση 10^5 / ml του παραπάνω καλλιεργητικού υλικού.

Για τη διέγερση της ερυθράς σειράς προστίθενται στην καλλιέργεια 4 IU/ ml ερυθροποιητίνη (Eprex Cilag), 5 ng/ml GM-CSF (Leukomax, Sandoz/Schering-Plough) και 10 ng/ml IL-3 (R&D Systems Inc, Minneapolis, USA). Για την ανάπτυξη των CFU-GM αποικιών χρησιμοποιούνται GM-CSF, IL-3 και G-CSF σε συγκέντρωση 40 ng/ml ο καθένας. Ακολουθεί επώαση στους 37°C , με 5% CO_2 σε ατμόσφαιρα κεκορεσμένη υδρατμών. Οι BFU-E αποικίες είναι καλά αιμοσφαιρινοποιημένα κυτταρικά αθροίσματα άωρων ερυθροβλαστών (>64 κύτταρα) που έχουν τη μορφή “έκρηξης”, ενώ οι CFU-GM αποτελούν αθροίσματα κοκκιοκυττάρων και μακροφάγων που αριθμούν περισσότερα από 50 κύτταρα. Και οι δυο τύποι αποικιών καταμετρώνται σε ανάστροφο μικροσκόπιο τη 14^η μέρα της καλλιέργειας.

Όλα τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν εις διπλούν.

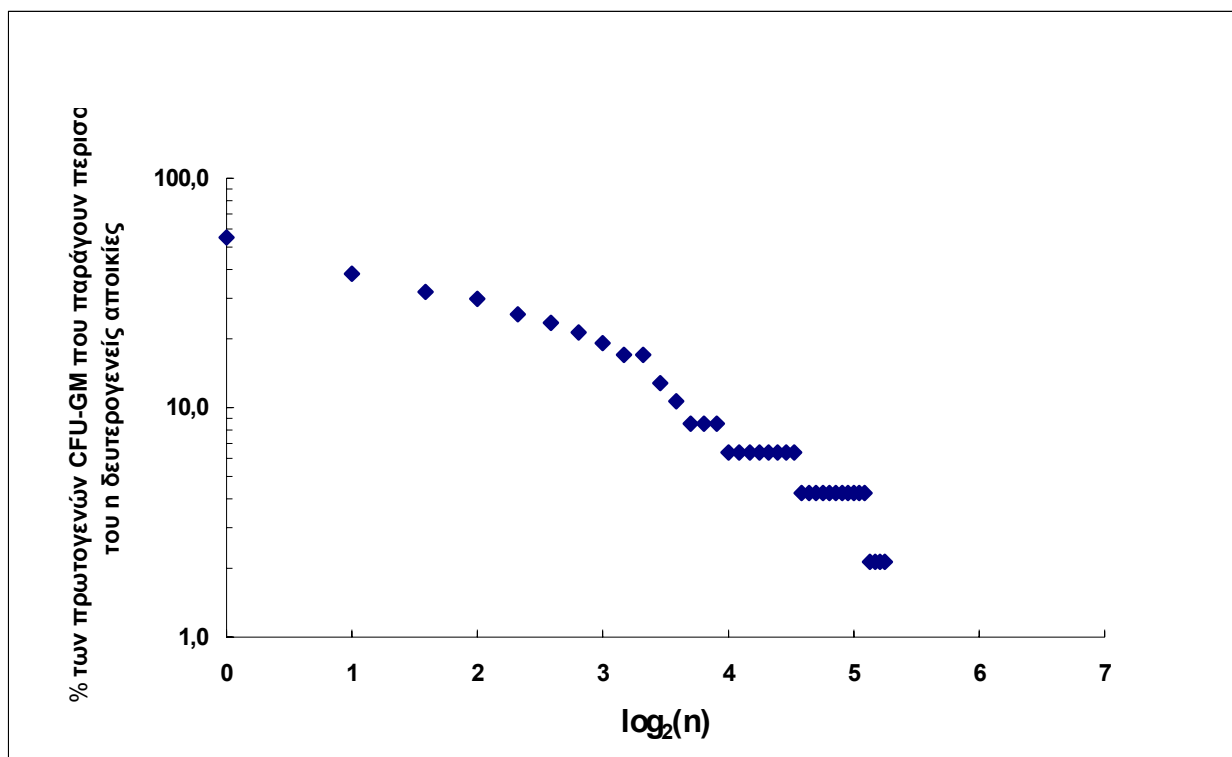
2.2 Επαναπολλαπλασιαστική ικανότητα (replating capacity) προγονικών αιμοποιητικών κυττάρων της κοκκιώδους σειράς (CFU-GM)

Η τεχνική αυτή βασίζεται στη μέθοδο που έχουν αναπτύξει οι Gordon και συν. (JCI 1998). Τα μονοπύρηνια κύτταρα του μυελού των οστών, μετά την απομόνωσή τους σε φικόλη, ενοφθαλμίζονται σε συγκέντρωση 10^5 κύτταρα/ml σε καλλιέργειες μεθυλοκυτταρίνης με την προσθήκη των παρακάτω αυξητικών παραγόντων στις αντίστοιχες συγκεντρώσεις: 1 ng/ml GM-CSF, 100 ng/ml G-CSF, 5 ng/ml IL-3 και 20 ng/ml SCF (Stem Cell Technology, Vancouver, Canada). Μετά από επώαση 7 ημερών στους 37°C , σε ατμόσφαιρα κεκορεσμένη υδρατμών και 5% CO_2 καταμετρώνται οι αποικίες οι αποτελούμενες από περισσότερα από 50 κύτταρα. Εξήντα αποικίες μεταφέρονται από την καλλιέργεια μεθυλοκυτταρίνης μία προς μία σε 100 μl του ίδιου καλλιεργητικού υλικού σε καθένα από τα βοθρία μιας πλάκας 96 βοθρίων. Η επαναπολλαπλασιαστική ικανότητα παρουσιάζει τη μέγιστη τιμή της την $5^{\text{η}}$ - $7^{\text{η}}$ μέρα της πρωτογενούς καλλιέργειας. Η μεταφορά των πρωτογενών αποικιών στην πλάκα 96 βοθρίων γίνεται την $7^{\text{η}}$ μέρα της καλλιέργειας. Μετά από επώαση άλλων 7 ημερών σε ατμόσφαιρα κεκορεσμένη υδρατμών με 5% CO_2 και 37°C καταμετρώνται οι δευτερογενείς αποικίες οι αποτελούμενες από περισσότερα των 50 κύτταρα. Η παρουσία δευτερογενών αποικιών υποδηλώνει τις αυτοανανεωτικές διαιρέσεις που έχουν συμβεί στα κύτταρα των πρωτογενών αποικιών. Ο αριθμός των δευτερογενών αποικιών $-n-$ αναπαριστάται γραφικά ως αθροιστική κατανομή σε συσχέτιση με το ποσοστό των πρωτογενών αποικιών που παρήγαγαν περισσότερες από n νέες αποικίες. Ο άξονας χ που εκφράζεται ως $\log_2 n$ αναπαριστά τον αριθμό των διπλασιασμών του CFU-GM που χρειάστηκαν για να παραχθεί ο καταμετρούμενος αριθμός δευτερογενών αποικιών (Σχήμα 1).

Η περιοχή κάτω από την καμπύλη (Area Under the Curve-AUC) υπολογίζεται με το “νόμο του τραπεζίου” και αποτελεί τη μαθηματική έκφραση και τη μονάδα μέτρησης της ικανότητας πολλαπλασιασμού του συνολικού πληθυσμού των CFU-GM (300). Σύμφωνα με τους Gordon και συν η μέθοδος αυτή δίνει το μέτρο της επαναπολλαπλασιαστικής (αυτοανανεωτικής) ικανότητας των προγονικών κυττάρων CFU-GM που σχετίζεται άμεσα με την ικανότητα του μυελού των οστών

να παράγει ώριμα ουδετερόφιλα. Η περιοχή κάτω από την καμπύλη-AUC- αποτελεί την πιο κατάλληλη μαθηματική έκφραση της ικανότητας αυτής του μυελού των οστών. Είναι ευαίσθητη σε προς τα αριστερά ή δεξιά μετατοπίσεις της καμπύλης και υπολογίζεται με βάση το ποσοστό των επανακαλλιεργούμενων αποικιών που έχουν δυνατότητα γένεσης νέων αποικιών μέσω αυτοανανεωτικών διαιρέσεων και τον αριθμό των δευτερογενών αποικιών. Επίσης για τον υπολογισμό λαμβάνεται υπ'όψιν ο αριθμός των πρωτογενών αποικιών που δεν έδωσαν δευτερογενείς αποικίες.

Η περιοχή κάτω από την καμπύλη-AUC- υπολογίζεται με τη βοήθεια προγράμματος Excel (Windows 98) σε προσωπικό υπολογιστή (PC).



Σχήμα 1. Παράδειγμα καμπύλης υπολογισμού της περιοχής κάτω από την καμπύλη-AUC- που αποτελεί τη μονάδα μέτρησης της επαναπολλαπλασιαστικής ικανότητας των προγονικών κυττάρων CFU-GM

2.3 Συλλογή και φύλαξη ορών

Η συλλογή ορού έγινε με λήψη περιφερικού φλεβικού αίματος υπό στείρες συνθήκες και φυγοκέντρωση στις 3000 rpm (στροφές ανά λεπτό) για 15 λεπτά. Ο ορός φυλάχτηκε στους -20°C μέχρι τη χρησιμοποίησή του για τον προσδιορισμό κυτταροκινών και μορίων προσκόλλησης.

2.4 Προσδιορισμός επιπέδων διαλυτών μορίων E-σελεκτίνης, ICAM-1 και G-CSF, TNF- α και IL-1 β

Η μέτρηση των επιπέδων των διαλυτών μορίων E-σελεκτίνης, ICAM-1 και G-CSF στον ορό των ασθενών και των μαρτύρων έγινε με ανοσοενζυμική τεχνική ELISA (R&D Systems Inc, Minneapolis USA). Όλα τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν εις διπλούν. Ειδικότερα, η τεχνική που χρησιμοποιήθηκε είναι ανοσοενζυμική τεχνική ELISA στερεάς φάσης που αναγνωρίζει τόσο την ανασυνδυασμένη όσο και την ανθρώπινη φυσική μορφή των διαλυτών μορίων που προσδιορίστηκαν.

Η αρχή πάνω στην οποία βασίζεται η μέθοδος περιγράφεται συνοπτικά παρακάτω: Μονοκλωνικό αντίσωμα ειδικό για την προς μέτρηση ουσία έχει επωαστεί σε πλάκα 96 βοθρίων. Τα δείγματα και τα καθορισμένα από τη μέθοδο standards (γνωστή ποσότητα της προς μέτρηση ουσίας σε διαφορετικές συγκεντρώσεις) προστίθενται στα βοθρία της πλάκας και η προς μέτρηση ουσία που περιέχεται σε αυτά δεσμεύεται δίκοινη “sandwich” ανάμεσα στο ειδικό μονοκλωνικό αντίσωμα και σε ένα δεύτερο ειδικό μονοκλωνικό αντίσωμα προσδεδεμένο σε ένζυμο που έχει επίσης προστεθεί στα βοθρία της πλάκας. Μετά από την απομάκρυνση οποιασδήποτε μη συνδεδεμένης ουσίας προστίθεται υπόστρωμα ειδικό για το ένζυμο που έχει σαν αποτέλεσμα την ανάπτυξη χρώματος εντάσεως ανάλογης με την ποσότητα της υπάρχουσας ουσίας που έχει δεσμευτεί. Η αντίδραση διακόπτεται μετά από συγκεκριμένο χρόνο με την προσθήκη ειδικού διαλύματος και η ένταση του χρώματος μετράται σε φωτόμετρο και στο κατάλληλο μήκος κύματος όπως αυτό έχει προσδιοριστεί από τον κατασκευαστή. Η συγκέντρωση διαλυτών μορίων προσκόλλησης και κυτταροκινών στον ορό κάθε ασθενούς υπολογίζεται με βάση την

καμπύλη (4-parameter logistic curve) που κατασκευάζεται από την απορρόφηση δειγμάτων με γνωστή συγκέντρωση ουσίας που αποτελούν τα standards σε ειδικό πρόγραμμα στον υπολογιστή (ORIGIN).

Σύμφωνα με τον κατασκευαστή, η ελάχιστη ανιχνεύσιμη ποσότητα ουσίας της E-σελεκτίνης, του ICAM-1 και του G-CSF ήταν μικρότερη από 0.1 ng/ml 0.35 ng/ml και 20 pg/ml, αντίστοιχα.

Για τον προσδιορισμό των επιπέδων TNF- α και IL-1 β στον ορό των ασθενών χρησιμοποιήθηκε τεχνική ELISA υψηλής ευαισθησίας (R&D Systems Inc, Minneapolis USA). Η ελάχιστη ανιχνεύσιμη ποσότητα ουσίας κυμαίνονταν για τον TNF- α από 0.06 έως 0.32 pg/ml και για την IL-1 β ήταν μικρότερη από 0.1 pg/ml.

2.5 Μελέτη επιχρισμάτων μυελού των οστών

Η μελέτη της μορφολογίας των μυελικών επιχρισμάτων έγινε μετά από χρώση με Wright–Giemsa. Σε κάθε περίπτωση μελετήθηκαν τουλάχιστον 500 μυελικά κύτταρα από το ίδιο άτομο.

2.6 Στατιστική ανάλυση

Για όλες τις παραμέτρους υπολογίστηκαν οι μέσες και διάμεσες τιμές, οι σταθερές αποκλίσεις (SD) και το σταθερό σφάλμα της μέσης τιμής (SEM). Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέση τιμή \pm σταθερό σφάλμα της μέσης τιμής εκτός αν αναφέρεται διαφορετικά. Για τη σύγκριση μεταξύ των μέσων τιμών δυο ομάδων και την εκτίμηση της στατιστικής σημαντικότητας χρησιμοποιήθηκε unpaired two-tailed student's t test με ίσες ή άνισες διακυμάνσεις, ανάλογα. Για το συσχετισμό παραμέτρων μεταξύ τους εφαρμόστηκε ανάλυση γραμμικής συσχέτισης (linear regression analysis) και υπολογίστηκε ο συντελεστής συσχέτισης κατά Pearson (r). Για την εφαρμογή των μεθόδων αυτών έγινε προηγουμένως εκτίμηση της κατανομής των προς ανάλυση τιμών και βρέθηκε ότι αυτή ήταν κανονική. Στατιστικώς σημαντική θεωρήθηκε τιμή του p μικρότερη του 0.05 (301).

VI. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

1. ΒΑΣΙΚΕΣ ΑΙΜΑΤΟΛΟΓΙΚΕΣ ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΙ

Οι βασικές αιματολογικές παράμετροι των παιδιών με χρόνια καλοήγη ουδετεροπενία που μελετήθηκαν φαίνονται στον Πίνακα 3. Οι μέσες τιμές των λευκοκυττάρων και των υποομάδων τους καθώς και των αιμοπεταλίων κυμαίνονταν σε φυσιολογικά όρια για την ηλικία των ασθενών. Η μέση τιμή της αιμοσφαιρίνης στο σύνολο των ασθενών ήταν ηπίως ελαττωμένη συγκριτικά με τη φυσιολογική τιμή για την ηλικία των ασθενών. Μεμονωμένοι ασθενείς εκδήλωσαν ήπια θρομβοπενία (n=2) και αναιμία (n=3) στη διάγνωση της ουδετεροπενίας.

Ο απόλυτος αριθμός των πολυμορφοκυττάρων κυμαίνονταν για το σύνολο των ασθενών από 100 έως 1370. Στο 61.5% αυτών ο αριθμός των πολυμορφοκυττάρων στη διάγνωση ήταν μικρότερος από 500, ενώ στο 54% ήταν μικρότερος του 400. Παρατηρήθηκε στατιστικώς σημαντική διαφορά του απόλυτου αριθμού πολυμορφοκυττάρων μεταξύ των ομάδων A και B ($p < 0.001$).

Η μέση τιμή των μονοκυττάρων ανά μl περιφερικού αίματος στην ομάδα της σοβαρής χρόνιας καλοήθους ουδετεροπενίας ήταν σημαντικά υψηλότερη από την αντίστοιχη τιμή στην ομάδα της ήπιας ουδετεροπενίας ($p = 0.02$). Ο αριθμός των μονοκυττάρων σχετίζεται αρνητικά αλλά όχι στατιστικώς σημαντικά με τον απόλυτο αριθμό πολυμορφοκυττάρων στο περιφερικό αίμα ($r = -0.33$, $p = 0.12$). Για τις υπόλοιπες αιματολογικές παραμέτρους δεν παρατηρήθηκε στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ των ομάδων A και B.

Οι μέσες τιμές των βασικών αιματολογικών παραμέτρων στην ομάδα της δευτεροπαθούς ουδετεροπενίας φαίνονται στον Πίνακα 4. Η μέση τιμή \pm SEM του αριθμού των ουδετεροφίλων του περιφερικού αίματος στην ομάδα της δευτεροπαθούς ουδετεροπενίας ήταν 710.9 ± 80 με εύρος από 220 έως 1300 κύτταρα ανά μl και δε διέφερε στατιστικώς σημαντικά από την αντίστοιχη τιμή του συνόλου των ασθενών με χρόνια καλοήγη ουδετεροπενία ($p = 0.2$).

Πίνακας 3. Βασικές αιματολογικές παράμετροι στη χρόνια καλοήγη ουδετεροπενία

	Χρόνια Καλοήγη Ουδετεροπενία		
	Ομάδα Α¹ (n=21)	Ομάδα Β² (n=14)	Σύνολο (n=35)
Λευκά/μl	6524±653 (6550)	7236±770 (6550)	6872.9±466 (7000)
	*p=0.48		
ΑΑΠ	229±31 (181)	884.5±81.7 (932.5)	480.9±73 (370.5)
	*p<0.001		
Μονοκύτταρα/μl	709±100 (636)	440.9± 53 (444.5)	607±74 (504)
	*p=0.02		
Λεμφοκύτταρα/μl	5291±623 (5278.5)	5202±648 (4466.5)	5259±453 (5229)
	*p=0.76		
Ηωσινόφιλα/μl	286.6±64 (164)	202.4±73 (236)	317±73.5 (236)
	*p=0.45		
Αιμοσφαιρίνη (g/dl)	11.2±0.3 (11.25)	11.8±0.24 (11.7)	11.5±0.23 (11.5)
	*p=0.17		
Αιμοπετάλια /μl (*10³)	342±17.8 (349)	300±32.3 (274)	326±17 (327.5)
	*p=0.1		

¹ Ομάδα Α: ΑΑΠ<500, ²Ομάδα Β: ΑΑΠ>500

Οι τιμές αντιπροσωπεύουν μέσες τιμές του απόλυτου αριθμού των κυττάρων ανά μl περιφερικού αίματος ± SEM. Εντός παρενθέσεως βρίσκονται οι διάμεσες τιμές.

Το *p αναφέρεται στη σύγκριση μεταξύ των ομάδων Α και Β.

Παρατηρήθηκε στατιστικώς σημαντική διαφορά στον αριθμό των λευκοκυττάρων μεταξύ πρωτοπαθών και δευτεροπαθών ουδετεροπενιών. Στις τελευταίες η μέση τιμή του αριθμού των λευκοκυττάρων ήταν χαμηλή, ενώ οι επιμέρους τιμές κυμαίνονταν από 1900 έως 5500 κύτταρα ανά μl περιφερικού αίματος. Παρατηρήθηκε επίσης χαμηλότερη μέση τιμή αιμοσφαιρίνης συγκριτικά με τα φυσιολογικά επίπεδα για την ηλικία των ασθενών. Το εύρος των τιμών της αιμοσφαιρίνης για τις δευτεροπαθείς ουδετεροπενίες κυμαίνονταν από 9.4 έως 13 g/dl.

Πίνακας 4. Βασικές αιματολογικές παράμετροι σε χρόνιες καλοήθεις και δευτεροπαθείς ουδετεροπενίες μετά από χημειοθεραπεία σε παιδιά με οξεία λευχαιμία σε ύφεση

	Δευτεροπαθής ουδετεροπενία (n=16)	Χρόνια καλοήθης ουδετεροπενία (n=35)	
Λευκά/μl	3287.5± 413 (3050)	6872.9±466 (7000)	p<0.001
ΑΑΠ	710.9± 80 (670)	480.9±73 (370.5)	p=0.2
Αιμοπετάλια/μl (*10³)	309.6±48 (303.5)	326±17 (327.5)	p=0.64
Αιμοσφαιρίνη (g/dl)	11±0.5 (10.9)	11.5±0.23 (11.5)	p=0.26

Οι τιμές αντιπροσωπεύουν μέσες τιμές ± SEM για όλες τις αιματολογικές παραμέτρους. Εντός παρενθέσεως καταγράφονται οι διάμεσες τιμές των παραμέτρων. Το p αναφέρεται στη σύγκριση μεταξύ χρόνιας καλοήθους και δευτεροπαθούς ουδετεροπενίας.

2. ΜΥΕΛΟΣ ΤΩΝ ΟΣΤΩΝ

2.1 Αναλογίες των επιμέρους κυτταρικών πληθυσμών του μυελού των οστών και κυτταρικά διαμερίσματα

Ένας μεγάλος αριθμός κυτταρικών πληθυσμών ανευρίσκονται φυσιολογικά στο μυελό των οστών και η κατανομή που παρουσιάζουν είναι μη κανονική. Το εύρος των φυσιολογικών τιμών για τις εκατοστιαίες αναλογίες των επιμέρους κυτταρικών πληθυσμών αναφέρεται ευρύ (302).

Το άθροισμα των άωρων προδρόμων κυττάρων της κοκκιώδους σειράς, μυελοβλαστών και προμυελοκυττάρων, στο σύνολο των ασθενών με χρόνια καλοήγη ουδετεροπενία υπολογίστηκε σε $2.17\% \pm 0.27\%$ του συνόλου των εμπύρηνων κυττάρων του μυελού, ποσοστό αυξημένο σε σχέση με το $0.64\% \pm 0.59\%$ των φυσιολογικών βρεφών σύμφωνα με τη μελέτη των Rosse και συν. Το ποσοστό των μυελοκυττάρων ($7.32\% \pm 1.34\%$) βρέθηκε επίσης αυξημένο συγκριτικά με το φυσιολογικό $2.49\% \pm 1.39\%$, ενώ η εκατοστιαία αναλογία των μεταμυελοκυττάρων υπολογίστηκε στα επίπεδα των φυσιολογικών ($12.42\% \pm 4.15\%$). Το ποσοστό του αθροίσματος των ραβδοκυττάρων και των πολυμορφοκυττάρων του μυελού στο σύνολο των περιστατικών ήταν $21.7\% \pm 1.83\%$, αντίστοιχο του ποσοστού στο μυελό των φυσιολογικών βρεφών ($20.51\% \pm 5.63\%$).

Το διαμέρισμα των πολλαπλασιαζόμενων κυττάρων (ΠΚ) στην ομάδα της χρόνιας καλοήγου ουδετεροπενίας ανέρχονταν σε $8.62\% \pm 1.27\%$, ενώ για τα φυσιολογικά βρέφη σύμφωνα με τη βιβλιογραφία το ποσοστό αυτό κυμαίνεται από 1.15% έως 5.11%. Αντίθετα, το διαμέρισμα των ωριμαζόντων κυττάρων (ΩΚ) στους πάσχοντες βρέθηκε εντός των ορίων που αναφέρονται στη βιβλιογραφία ως φυσιολογικά (23.15% έως 42.74%). Στο σύνολό της η κοκκιώδης σειρά αντιπροσωπεύει το $42.6\% \pm 2.54\%$ των εμπύρηνων κυττάρων του μυελού, αναλογία που βρίσκεται εντός των φυσιολογικών ορίων (24.3% έως 47.85%). Η σχέση μεταξύ των δυο διαμερισμάτων της κοκκιώδους σειράς (ΠΚ/ΩΚ) υπολογίστηκε σε $0.29\% \pm 0.05$. Οι αναλογίες των επιμέρους κυτταρικών πληθυσμών του μυελού των οστών στα παιδιά με χρόνια καλοήγη ουδετεροπενία και οι σχέσεις μεταξύ των κυτταρικών διαμερισμάτων φαίνονται στον Πίνακα 5.

Πίνακας 5. Αναλογίες επιμέρους κυτταρικών πληθυσμών και κυτταρικά διαμερίσματα του μυελού στη χρόνια καλοήγη ουδετεροπενία

	Χρόνια καλοήγη ουδετεροπενία		
	Ομάδα Α (n=15)	Ομάδα Β (n=10)	Σύνολο (n=25)
Βλάστες + Προμυελοκύτταρα	2.25±0.37	1.92±0.45	2.17±0.27
Μυελοκύτταρα	6.08±1.46	3.63±0.9	7.32±1.34
Μεταμυελοκύτταρα	13.46±1.46	10.9±2.88	12±1.32
Ραβδοκύτταρα + Πολυμορφοκύτταρα	24.6±2.58	20.38±3.46	21.7±1.83
Διαμέρισμα Πολλαπλασιαζόμενων κυττάρων (ΠΚ)	7.46±0.7	5.06±0.9	8.62±1.27
Διαμέρισμα Ωριμαζόντων κυττάρων (ΩΚ)	38.08±2.56	31.25±2.83	33.96±2.29
Σύνολο κοκκιώδους σειράς	45.5±2.34	36.3±4.98	42.6±2.54
Σχέση ΠΚ/ΩΚ*	0.21±0.03	0.18±0.04	0.29±0.05
Λεμφοκύτταρα	29.8±3.5	40.6±3.5	34.6±2.52
Μονοκύτταρα	2±0.41	2.67±1.2	2.44±0.4
Ηωσινόφιλα	4.17±0.95	3.4±0.6	3.46±0.54
Ερυθροβλάστες	19.8±3.48	18.2±4.17	18.9±2.2

Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε μέσες τιμές εκατοστιαίας αναλογίας ± το σταθερό σφάλμα της μέσης τιμής (SE). * Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε μέσες τιμές ηλικιακού εκατοστιαίου αναλογιών ± το σταθερό σφάλμα της μέσης τιμής (SE).

Στο σύνολο των ασθενών το ποσοστό των ερυθροβλαστών υπολογίστηκε σε 18.9% ± 2.2%, αλλά για τα φυσιολογικά βρέφη και παιδιά οι αναφορές στη βιβλιογραφία παρουσιάζουν μεγάλο εύρος τιμών. Τα υπόλοιπα κύτταρα του μυελού (λεμφοκύτταρα, μονοκύτταρα, ηωσινόφιλα) δεν παρουσίασαν διαφορές σε σχέση με τις φυσιολογικές τιμές που αναφέρονται στη βιβλιογραφία για την ηλικιακή ομάδα των ασθενών που μελετήθηκαν. Το ποσοστό των μεγακαρυοκυττάρων σε όλες τις περιπτώσεις πλην μιας ήταν φυσιολογικό.

Στον Πίνακα 5 παρουσιάζονται επίσης οι εκατοστιαίες αναλογίες των επιμέρους τύπων μυελικών κυττάρων καθώς και των διαμερισμάτων του μυελού ανάλογα με τη βαρύτητα της ουδετεροπενίας. Στατιστικώς σημαντική διαφορά παρατηρήθηκε μεταξύ των δύο ομάδων στο ποσοστό των μυελοκυττάρων, που βρέθηκε αυξημένο στην ομάδα της βαριάς ουδετεροπενίας ($p=0.03$). Το διαμέρισμα των πολλαπλασιαζόμενων κυττάρων υπολογίστηκε σε $7.46\% \pm 0.7$ για την ομάδα της βαριάς ουδετεροπενίας έναντι $5.06\% \pm 0.9\%$ για την ομάδα της ήπιας ουδετεροπενίας, διαφορά που είναι οριακά στατιστικά σημαντική ($p=0.05$). Για τις υπόλοιπες κατηγορίες κυττάρων δεν παρατηρήθηκαν στατιστικώς σημαντικές διαφορές μεταξύ των ομάδων.

Αξίζει να σημειωθεί ότι παρατηρήθηκαν αρνητικές συσχετίσεις του ποσοστού του αθροίσματος των μυελοβλαστών και των προμυελοκυττάρων ($r= -0.28$, $p=0.35$), των μυελοκυττάρων ($r= -0.31$, $p=0.22$) και του διαμερίσματος των πολλαπλασιαζόμενων κυττάρων ($r = -0.29$, $p=0.31$) με τον απόλυτο αριθμό πολυμορφοκυττάρων και θετική συσχέτιση με το ποσοστό των ώριμων πολυμορφοκυττάρων ($r=0.24$, $p=0.29$), οι οποίες όμως δεν ήταν στατιστικώς σημαντικές.

Στην πλειοψηφία των ασθενών με χρόνια καλοήγη ουδετεροπενία η κυτταροβρίθεια του μυελού βρέθηκε φυσιολογική. Σε ποσοστό 12% του συνόλου των ασθενών ήταν σαφώς αυξημένη, ενώ ένα άλλο 12% είχε φυσιολογική έως ηπίως αυξημένη κυτταροβρίθεια. Υπερπλασία της κοκκιδώδους σειράς στο στάδιο του μυελοκυττάρου και του μεταμυελοκυττάρου παρατηρήθηκε σε ένα παιδί στη διάγνωση. Αναστολή ωρίμανσης στο στάδιο του ραβδοκύτταρου παρατηρήθηκε σε 3 περιστατικά.

2.2 Αποικίες προγονικών κυττάρων μυελού των οστών

Τα αποτελέσματα των καλλιεργειών εκφράζονται ως μέση τιμή αριθμού CFU-GM και BFU-E αποικιών / 10^5 μονοπύρηννα \pm το σταθερό σφάλμα της μέσης τιμής (SEM). Στην ομάδα ελέγχου αναπτύχθηκαν 169.3 ± 15.4 CFU-GM και 145.6 ± 18 BFU-E αποικίες. Κάθε πείραμα έγινε εις διπλούν και υπολογίστηκε η μέση τιμή του αριθμού των αποικιών που αναπτύχθηκαν.

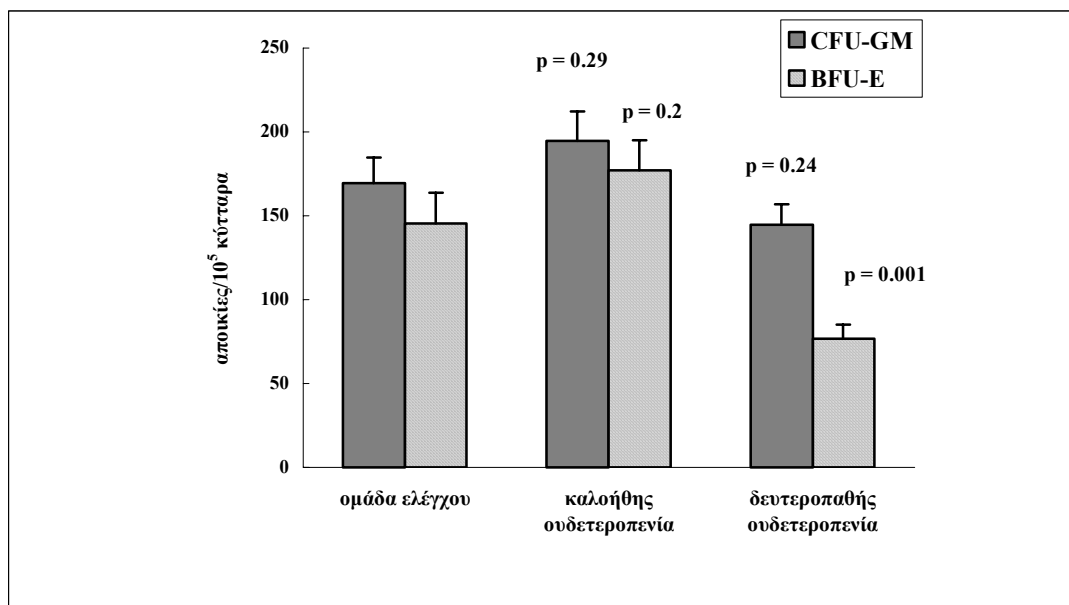
Στην ομάδα των παιδιών με καλοήγη ουδετεροπενία ήταν φυσιολογική η ανάπτυξη αποικιών τόσο της κοκκιώδους ($p=0.29$) όσο και της ερυθράς σειράς ($p=0.2$). Ο αριθμός των αποικιών CFU-GM και BFU-E / 10^5 κύτταρα φαίνεται στον Πίνακα 6 και η σύγκριση των μέσων τιμών μεταξύ των ομάδων αναπαριστάται γραφικά στο Σχήμα 2.

Στην ομάδα των παιδιών με δευτεροπαθή ουδετεροπενία δεν παρατηρήθηκαν στατιστικώς σημαντικές διαφορές στην ανάπτυξη CFU-GM αποικιών συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου, ενώ η ανάπτυξη BFU-E αποικιών ήταν σημαντικά μειωμένη όπως φαίνεται στο Σχήμα 1. Αξίζει εδώ να σημειωθεί ότι σύμφωνα με δημοσιευμένη μελέτη του εργαστηρίου Ιστικών καλλιεργειών της Παιδιατρικής Κλινικής Αιματολογίας Ογκολογίας (303) η κοκκιοποίηση όπως εκτιμάται από την ανάπτυξη αποικιών προγονικών κυττάρων της κοκκιώδους σειράς CFU-GM στην ύφεση της οξείας λευχαιμίας στα παιδιά δε διαφέρει στατιστικώς σημαντικά από τα επίπεδα ανάπτυξης CFU-GM της ομάδας των μαρτύρων ($p = 0.15$), ενώ δε συμβαίνει το ίδιο με τις αποικίες της ερυθράς σειράς BFU-E. Οι τελευταίες παραμένουν σημαντικά ελαττωμένες τόσο κατά τη διάρκεια της ύφεσης όσο και μέσα στο πρώτο εξάμηνο από το τέλος της θεραπείας ($p=0.01$, $p = 0.03$ αντίστοιχα).

Πίνακας 6. Ανάπτυξη αποικιών CFU-GM και BFU-E στις 3 ομάδες παιδιών της μελέτης

	CFU-GM/10 ⁵ κύτταρα	BFU-E/10 ⁵ κύτταρα
Ομάδα ελέγχου (n=28)	169.3 ± 15.4	145.6 ± 18
Χρόνια καλοήθης ουδετεροπενία (n=35)	194.8 ± 17 * p = 0.29	177 ± 17.9 * p = 0.2
Δευτεροπαθής ουδετεροπενία (n= 21)	144.8 ± 12 *p=0.24	76.6 ± 8.7 * p = 0.001

Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε μέσες τιμές αριθμού αποικιών CFU-GM και BFU-E/10⁵ μονοπύρηννα κύτταρα του μυελού των οστών ± το σταθερό σφάλμα της μέσης τιμής (SEM). Τα p αναφέρονται στη σύγκριση με την ομάδα ελέγχου.



Σχήμα 2. Ανάπτυξη αποικιών προγονικών κυττάρων της ερυθράς (BFU-E) και της κοκκιώδους σειράς (CFU-GM) από καλλιέργειες μονοπύρηνων κυττάρων μυελού των οστών παιδιών με καλοήθη ουδετεροπενία στη διάγνωση και δευτεροπαθή ουδετεροπενία μετά τη χορήγηση χημειοθεραπείας. Η τιμή του p αναφέρεται στη σύγκριση των μέσων τιμών των ομάδων με την ομάδα ελέγχου

2.3 Επαναπολλαπλασιαστική ικανότητα προγονικών κυττάρων της κοκκιώδους σειράς

Η επαναπολλαπλασιαστική ικανότητα των CFU-GM στη μελέτη αυτή εκφράζεται σε AUC. Στην ομάδα ελέγχου η ικανότητα αυτή υπολογίστηκε σε 99.05 ± 15 . Στο σύνολο των περιστατικών πρωτοπαθούς καλοήθους ουδετεροπενίας η επαναπολλαπλασιαστική ικανότητα των CFU-GM δε διέφερε στατιστικώς σημαντικά από την ομάδα σύγκρισης ($p=0.12$). Παρατηρήθηκε, όμως, σημαντική αύξηση αυτής στην ομάδα της σοβαρής ουδετεροπενίας, όταν δηλαδή ο αριθμός των κυκλοφορούντων ουδετεροφίλων είναι μικρότερος του 500 / μl περιφερικού αίματος, σε σύγκριση τόσο με την ομάδα ελέγχου ($p=0.03$) όσο και με την ομάδα της ήπιας-μέτριας ουδετεροπενίας ($p=0.009$) όπως φαίνεται στον Πίνακα 7 και αναπαριστάται γραφικά στο Σχήμα 3.

Στο σύνολο των περιστατικών χρόνιας καλοήθους ουδετεροπενίας που εξετάστηκαν η επαναπολλαπλασιαστική ικανότητα των CFU-GM δε σχετίζεται με τον απόλυτο αριθμό πολυμορφοπυρήνων ($r = - 0.48$, $p = 0.26$), όπως φαίνεται στο σχήμα 4α, ή με τα επίπεδα του G-CSF στον ορό ($r=0.24$, $p=0.52$). Δε βρέθηκε συσχέτιση μεταξύ της επαναπολλαπλασιαστικής ικανότητας των CFU-GM και της ηλικίας έναρξης της νόσου ($r= - 0.2$, $p=0.5$) όπως αναπαριστάται γραφικά στο Σχήμα 5.

Ενδιαφέρον επίσης παρουσιάζει η τάση θετικής συσχέτισης της επαναπολλαπλασιαστικής ικανότητας των CFU-GM με την εκατοστιαία αναλογία του διαμερίσματος των πολλαπλασιαζόμενων κυττάρων του μυελού των οστών, η οποία δε φτάνει στα όρια της στατιστικής σημαντικότητας ($r=0.43$, $p=0.25$).

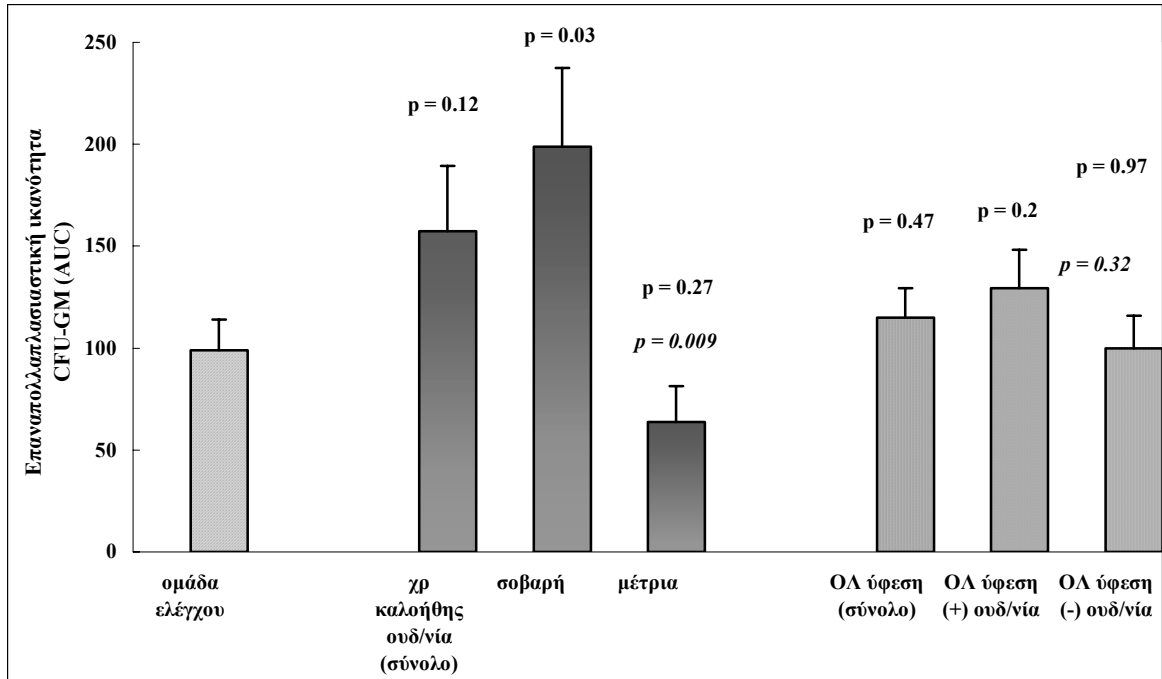
Πίνακας 7. Επαναπολλαπλασιαστική ικανότητα των CFU-GM

Επαναπολλαπλασιαστική ικανότητα CFU-GM		
	AUC	*p
Ομάδα ελέγχου (n=15)	99.05±15	
Χρόνια καλοήθης ουδετεροπενία σύνολο (n=14)	157.36±32.1	0.12
Σοβαρή καλοήθης ουδετεροπενία (n=9)	198.9±38.5	0.03
Ήπια-μέτρια ουδετεροπενία (n=5)	63.9±17.5	** p = 0.009
ΟΛ ύφεση (n=21)	114.9±14.6	0.27
Δευτεροπαθής ουδετεροπενία (n=14)	129.5±18.7	0.2
ΟΛ ύφεση (-) ουδετεροπενία (n=7)	99.9±16	** p = 0.32

Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε AUC και αντιπροσωπεύουν μέσες τιμές ± SE.

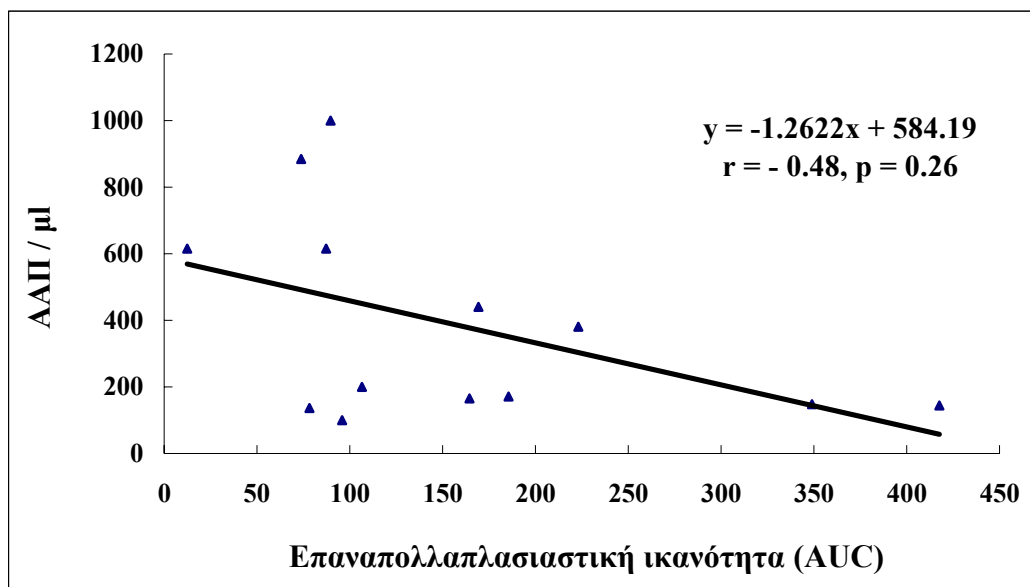
Το *p αναφέρεται στη σύγκριση της μέσης τιμής κάθε ομάδας με την ομάδα ελέγχου, ενώ το ** p στη σύγκριση της μέσης τιμής AUC στην ομάδα της σοβαρής καλοήθους ουδετεροπενίας με τη μέτρια και μεταξύ των ομάδων ΟΛ (οξείας λευχαιμίας) με και χωρίς ουδετεροπενία

Η επαναπολλαπλασιαστική ικανότητα των CFU-GM στην ομάδα των παιδιών με οξεία λευχαιμία σε ύφεση βρέθηκε φυσιολογική (p=0.47) και ανεξάρτητη της εκδήλωσης ουδετεροπενίας όπως φαίνεται από την απουσία στατιστικώς σημαντικής διαφοράς μεταξύ των μέσων τιμών AUC των ομάδων των παιδιών με οξεία λευχαιμία σε ύφεση με και χωρίς ουδετεροπενία (p=0.32) (Πίνακας 7, Σχήμα 3). Η φάση θεραπείας στην ύφεση δε φάνηκε να επηρεάζει την επαναπολλαπλασιαστική ικανότητα των CFU-GM (p=0.24). Στην ομάδα αυτή βρέθηκε ισχυρή αρνητική συσχέτιση μεταξύ της επαναπολλαπλασιαστικής ικανότητας των CFU-GM, η οποία δε διαφέρει από την ομάδα ελέγχου, και του αριθμού των κυκλοφορούντων ουδετεροφίλων του περιφερικού αίματος ($r = - 0.64$, $p = 0.02$) Σχήμα 4β.

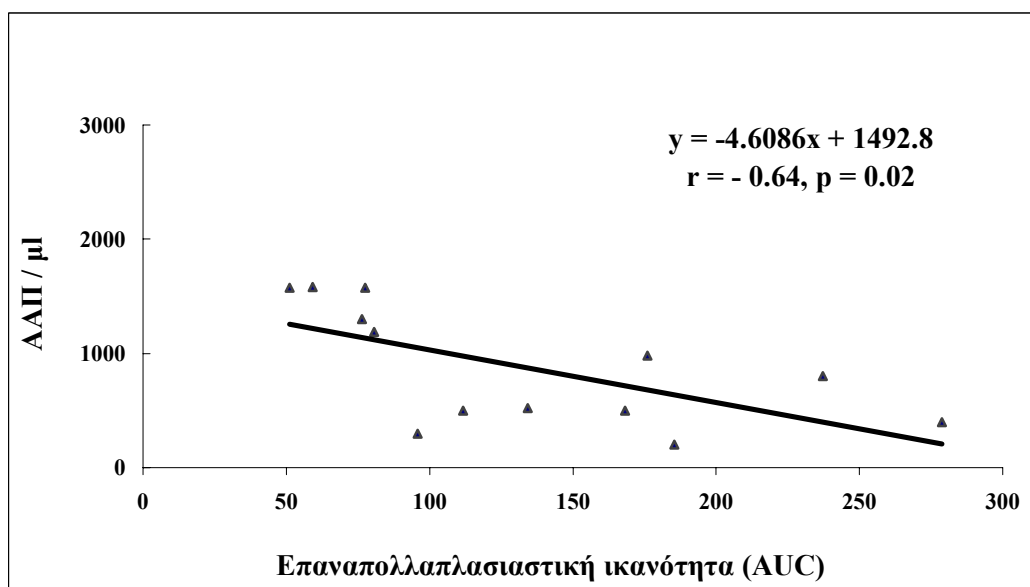


Σχήμα 3. Επαναπολλαπλασιαστική ικανότητα των CFU-GM στην πρωτοπαθή καλοήγη ουδετεροπενία και στη δευτεροπαθή ουδετεροπενία. Το *p* αναφέρεται στη σύγκριση μεταξύ σοβαρής και ήπιας χρόνιας καλοήθους ουδετεροπενίας και οξείας λευκαϊμίας (ΟΛ) με και χωρίς ουδετεροπενία

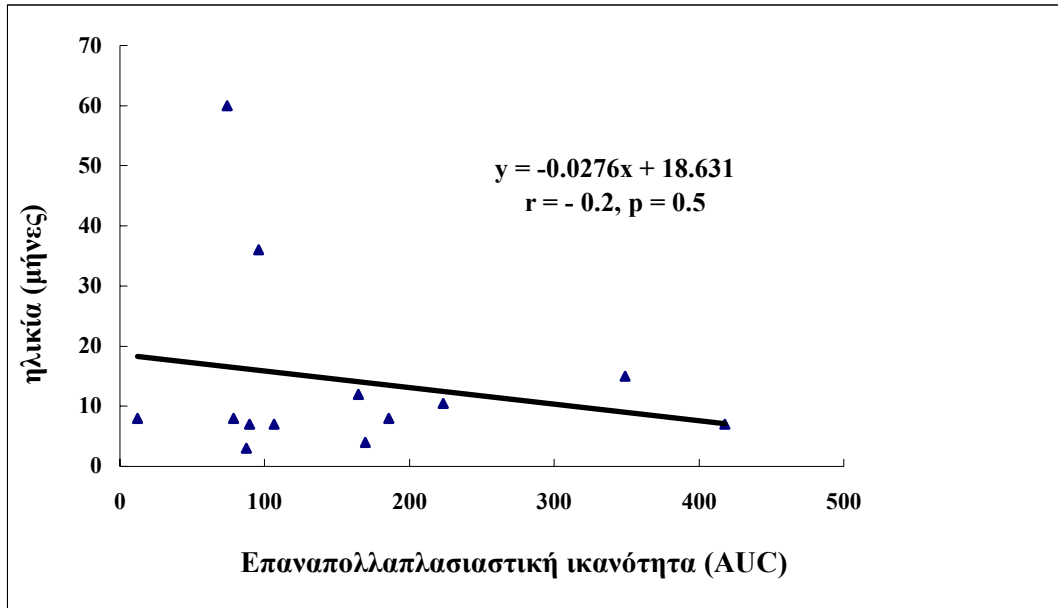
4α



4β



Σχήμα 4α, β. Συσχέτιση επαναπολλαπλασιαστικής ικανότητας των CFU-GM, όπως αυτή εκφράζεται σε AUC, με τον απόλυτο αριθμό πολυμορφοκυττάρων (ΑΑΠ) στη χρόνια καλοήγη ουδετεροπενία (n=13, 4α) και σε δευτεροπαθείς ουδετεροπενίες μετά τη χορήγηση χημειοθεραπείας (n=13, 4β).



Σχήμα 5. Συσχέτιση της επαναπολλαπλασιαστικής ικανότητας των CFU-GM με την ηλικία έναρξης της νόσου στην ομάδα της πρωτοπαθούς καλοήθους ουδετεροπενίας

3. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΕΠΙΠΕΔΩΝ ΔΙΑΛΥΤΩΝ ΜΟΡΦΩΝ ΜΟΡΙΩΝ ΠΡΟΣΚΟΛΛΗΣΗΣ ICAM-1 ΚΑΙ Ε-ΣΕΛΕΚΤΙΝΗΣ ΣΤΟΝ ΟΡΟ

Χρόνια καλοήθης ουδετεροπενία

Η μέση τιμή (\pm σταθερό σφάλμα της μέσης τιμής - SEM) των επιπέδων της διαλυτής μορφής της Ε-σελεκτίνης στον ορό των παιδιών με χρόνια καλοήθης ουδετεροπενία ήταν 94.4 (\pm 9.9) ng/ml και το εύρος τους κυμαίνονταν από 36.12 έως 197.5 ng/ml. Η μέση τιμή δε διέφερε στατιστικώς σημαντικά από την αντίστοιχη τιμή στον ορό των φυσιολογικών παιδιών ($p = 0.56$) Πίνακας 8

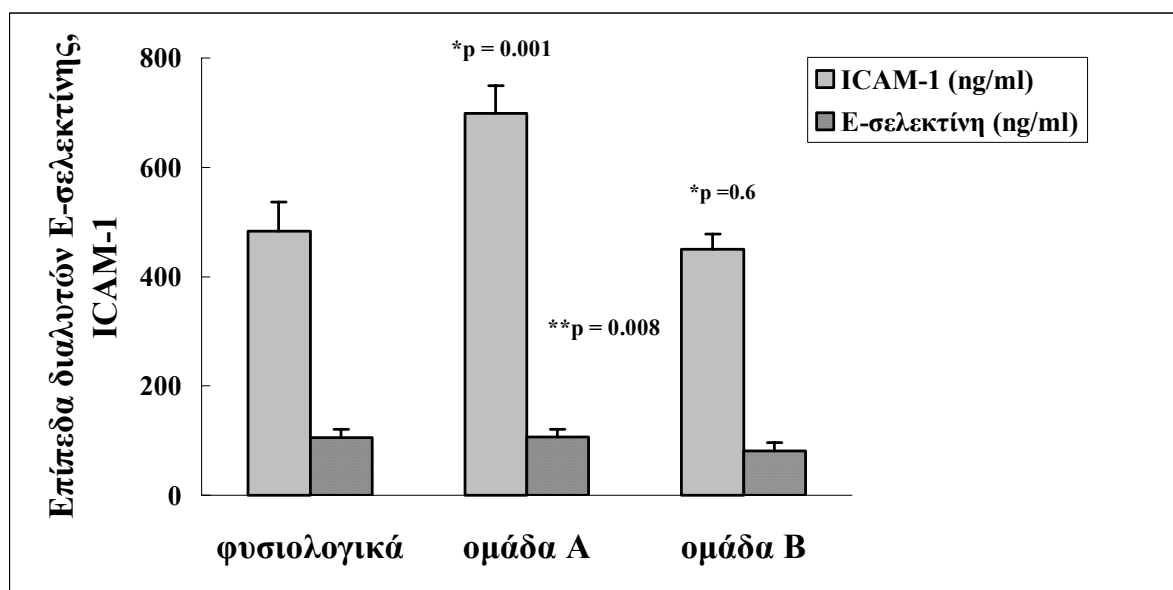
Στην ομάδα των παιδιών με βαρεία ουδετεροπενία (ΑΑΠ <500 - ομάδα Α) η διάμεση τιμή των επιπέδων Ε-σελεκτίνης ήταν αυξημένη (100.75 ng/ml), συγκρινόμενη τόσο με την ομάδα της ήπιας ουδετεροπενίας (68.2 ng/ml) όσο και με την αντίστοιχη τιμή στην ομάδα των φυσιολογικών παιδιών (87.3 ng/ml,) η διαφορά των μέσων τιμών, όμως, δεν ήταν στατιστικώς σημαντική ($p=0.14$, $p=0.9$ αντίστοιχα).

Σε 9 από τα 23 παιδιά (39%) βρέθηκαν αυξημένα επίπεδα Ε-σελεκτίνης σε σχέση με τη διάμεση τιμή στην ομάδα της χρόνιας καλοήθους ουδετεροπενίας. Η αύξηση αυτή κυμαίνονταν από 10% έως 143%.

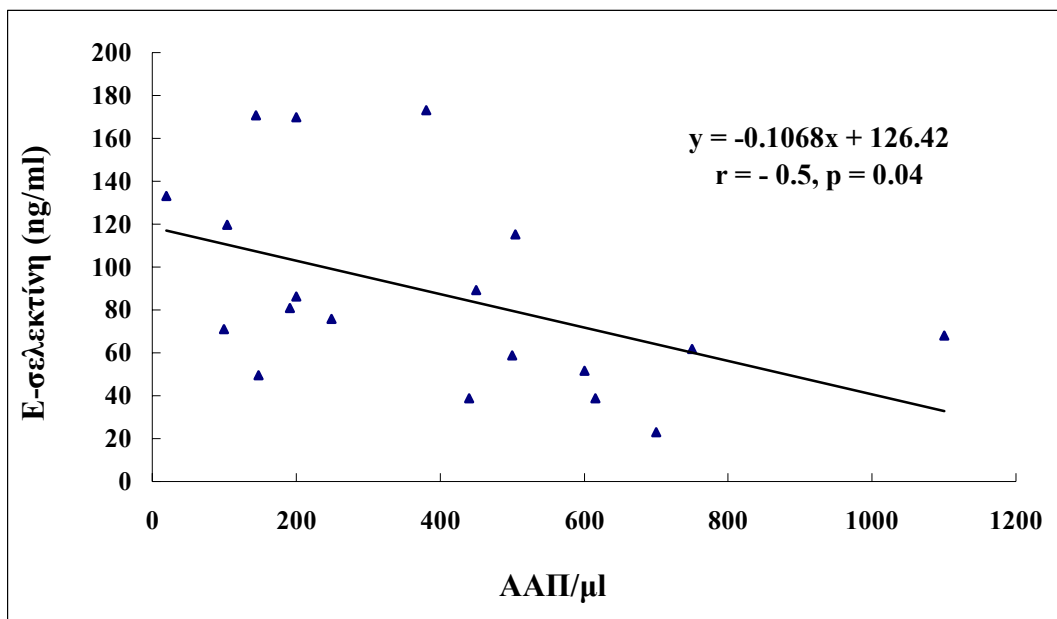
Τα επίπεδα του ICAM-1 ήταν αυξημένα στην ομάδα της χρόνιας καλοήθους ουδετεροπενίας (697.5 ± 38) στο σύνολο των περιπτώσεων και στατιστικώς σημαντικά αυξημένα στην ομάδα της βαρείας ουδετεροπενίας (699.2 ± 50 ng/ml) σε σύγκριση με τα αντίστοιχα επίπεδα στην ομάδα της ήπιας ουδετεροπενίας (450.6 ± 27.6 ng/ml, $p = 0.001$) και με αυτά των φυσιολογικών παιδιών ($p = 0.008$) όπως φαίνεται στο σχήμα 6. Το 45% των μελετηθέντων ασθενών είχαν επίπεδα ICAM-1 υψηλότερα από τη διάμεση τιμή στην ομάδα της χρόνιας καλοήθους ουδετεροπενίας.

Βρέθηκε ισχυρή αρνητική συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων Ε-σελεκτίνης και ICAM-1 στον ορό και του αριθμού των κυκλοφορούντων ουδετεροφίλων του περιφερικού αίματος στο σύνολο των περιπτώσεων χρόνιας καλοήθους ουδετεροπενίας ($r = - 0.5$, $p = 0.04$ και $r = - 0.64$, $p = 0.003$ αντίστοιχα) όπως

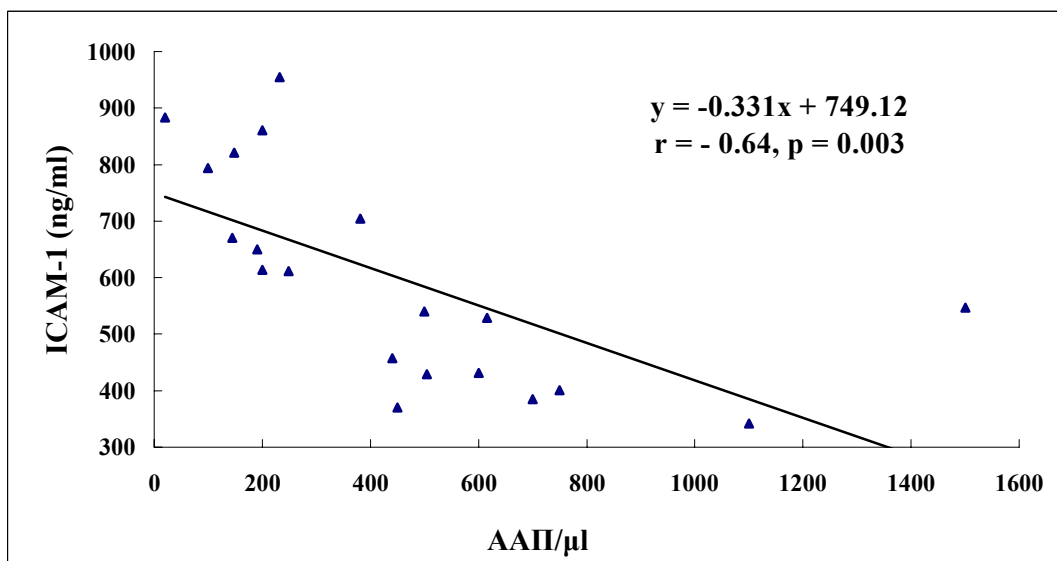
αναπαριστάται γραφικά στο Σχήμα 7 α,β. Επιπλέον, τα επίπεδα των E-σελεκτίνης και ICAM-1 σχετίζονταν θετικά μεταξύ τους ($r= 0.55$, $p =0.015$).



Σχήμα 6. Σύγκριση επιπέδων ICAM-1 και E-σελεκτίνης μεταξύ των ομάδων σοβαρής (ομάδα Α) και ήπιας (ομάδα Β) χρόνιας καλοήθους ουδετεροπενίας. Τα *p αναφέρονται στη σύγκριση της κάθε ομάδας με τα φυσιολογικά, ενώ τα **p στη σύγκριση μεταξύ των ομάδων Α και Β. Όλα τα p αφορούν τα επίπεδα του ICAM-1.



α



β

Σχήμα 7α, β . Συσχέτιση επιπέδων διαλυτών μορφών E-σελεκτίνης και ICAM-1 του ορού ασθενών με χρόνια καλοήγη ουδετεροπενία στη διάγνωση (n=22) με τον αριθμό των ουδετεροφίλων του περιφερικού αίματος

Στον παρακάτω πίνακα φαίνονται τα αποτελέσματα του προσδιορισμού των επιπέδων των διαλυτών μορφών της E-σελεκτίνης και του ICAM-1 στον ορό παιδιών με χρόνια καλοήγη ουδετεροπενία στη διάγνωση και φυσιολογικών παιδιών.

Πίνακας 8. Επίπεδα διαλυτών μορίων προσκόλλησης E-σελεκτίνης και ICAM-1 στη χρόνια καλοήγη ουδετεροπενία

(ng/ml)	Χρόνια καλοήγη ουδετεροπενία			Φυσιολογικά (n=15)
	Ομάδα Α ¹ (n= 12)	Ομάδα Β ² (n= 10)	Σύνολο (n=22)	
E-σελεκτίνη μέση τιμή±SEM	107±13.7	81.2±15.5	94.4± 9.9	104.7±15.6
διάμεση τιμή	100.75	68.2	81.3	87.3
εύρος	38.8-173	36.12-197.5	36.12-197.5	33.9-241.2
	*p=0.9 **p=0.14	*p=0.3	*p=0.56	
ICAM-1 μέση τιμή±SEM	699.2±50	450.6±27.6	607.5±37.9	482.5±54
διάμεση τιμή	687.3	430.4	579.5	525.4
εύρος	370-955	342-546.5	342-951.9	272-778.2
	*p=0.001 **p=0.008	*p=0.6	*p=0.09	

*p αναφέρεται στη σύγκριση κάθε ομάδας με την ομάδα των φυσιολογικών παιδιών

**p αναφέρεται στη σύγκριση μεταξύ των ομάδων Α και Β

¹ Ομάδα Α: ΑΑΠ<500 ² Ομάδα Β: ΑΑΠ>500

Δευτεροπαθείς ουδετεροπενίες μετά τη χορήγηση χημειοθεραπείας σε παιδιά με οξεία λευχαιμία σε ύφεση

Η εκδήλωση ουδετεροπενίας στην ομάδα της οξείας λευχαιμίας σε ύφεση δεν επηρέασε τις τιμές των επιπέδων των διαλυτών E-σελεκτίνης και ICAM-1 στον ορό των ασθενών, όπως φαίνεται από την απουσία στατιστικώς σημαντικής διαφοράς των εν λόγω τιμών μεταξύ των ομάδων της δευτεροπαθούς ουδετεροπενίας και της οξείας λευχαιμίας σε ύφεση χωρίς εκδήλωση ουδετεροπενίας ($p=0.14$, $p=0.3$ αντίστοιχα για τα δύο μόρια προσκόλλησης) Σχήμα 8.

Τα επίπεδα των δύο διαλυτών μορίων προσκόλλησης στις δευτεροπαθείς ουδετεροπενίες βρέθηκαν σημαντικά ελαττωμένα σε σύγκριση με τα αντίστοιχα στην ομάδα της χρόνιας καλοήθους ουδετεροπενίας - Πίνακας 9.

Η βαρύτητα της ουδετεροπενίας δεν επηρέασε τις τιμές των επιπέδων ICAM-1 και E-σελεκτίνης στον ορό των παιδιών που μελετήθηκαν. Στην ομάδα της δευτεροπαθούς ουδετεροπενίας με τιμές πολυμορφοκυττάρων >500 / μl περιφερικού αίματος τα επίπεδα της E-σελεκτίνης κυμαίνονταν από 20.35 έως 84.5 ng/ml με διάμεση τιμή 47.6 ng/ml και μέση τιμή 47 ± 9.6 ng/ml. Οι αντίστοιχες τιμές για την ομάδα της σοβαρής ουδετεροπενίας με τιμές πολυμορφοκυττάρων <500 / μl περιφερικού αίματος ήταν 30.85-89 ng/ml, 46 ng/ml και 52 ± 11 ng/ml. Μεταξύ των μέσων τιμών των δύο ομάδων δεν παρατηρήθηκε στατιστικώς σημαντική διαφορά ($p=0.7$). Επίσης δε βρέθηκε συσχέτιση μεταξύ του απόλυτου αριθμού πολυμορφοκυττάρων και των επιπέδων E-σελεκτίνης στο σύνολο των περιπτώσεων δευτεροπαθούς ουδετεροπενίας ($r= - 0.1$, $p=0.8$).

Αντίστοιχα, στην ομάδα της δευτεροπαθούς ουδετεροπενίας με τιμές πολυμορφοκυττάρων >500 / μl περιφερικού αίματος τα επίπεδα του ICAM-1 κυμαίνονταν από 212.5 έως 483.4 ng/ml, η διάμεση τιμή ήταν 317 ng/ml και η μέση τιμή 337.6 ± 32.6 ng/ml. Οι αντίστοιχες τιμές για την ομάδα της σοβαρής ουδετεροπενίας με τιμές πολυμορφοκυττάρων <500 / μl περιφερικού αίματος ήταν 274-409.4 ng/ml, 387 ng/ml και 364.6 ± 30.8 ng/ml. Μεταξύ των μέσων τιμών των δύο ομάδων δεν παρατηρήθηκε στατιστικώς σημαντική διαφορά ($p=0.6$). Επίσης δε βρέθηκε συσχέτιση μεταξύ του απόλυτου αριθμού πολυμορφοκυττάρων και των

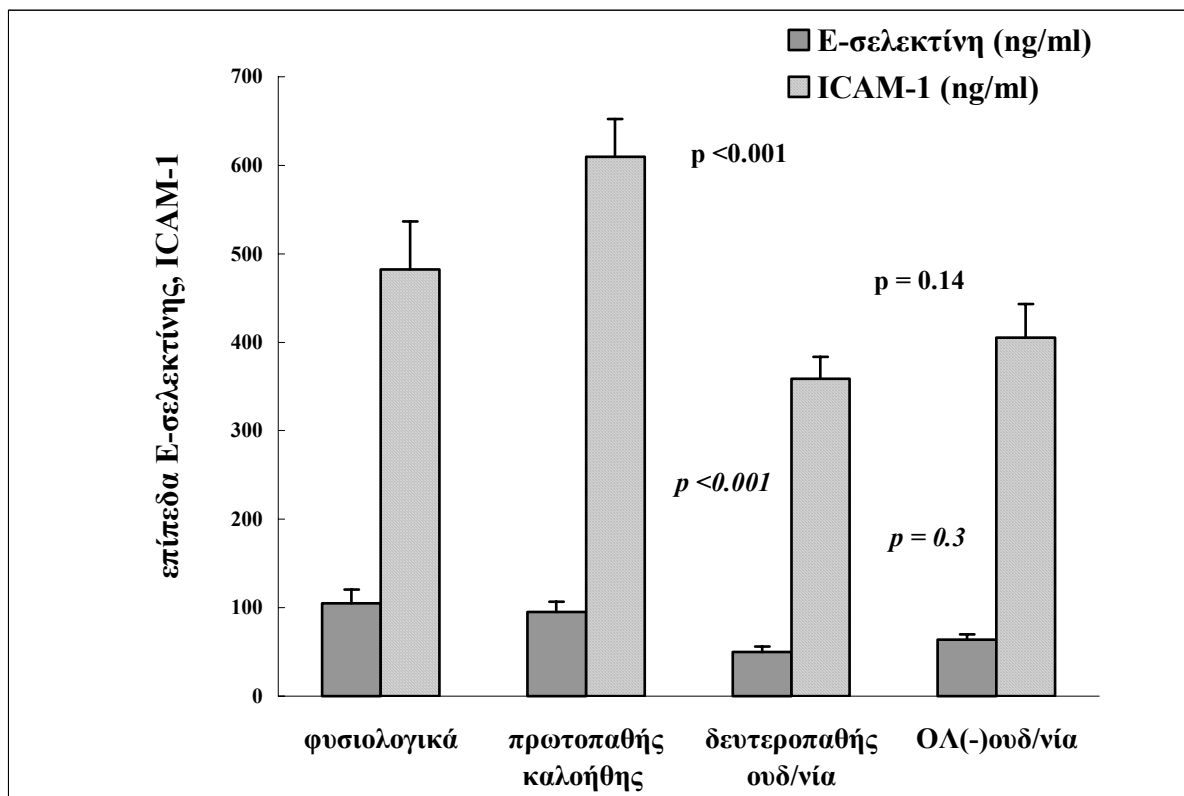
επιπέδων ICAM-1 στο σύνολο των περιπτώσεων δευτεροπαθούς ουδετεροπενίας ($r = -0.48$, $p=0.09$).

Με βάση την ανάλυση διακύμανσης κατά ένα παράγοντα η φάση θεραπείας στην ύφεση δεν επηρέασε τα επίπεδα του ICAM-1 ή της E-σελεκτίνης ($p=0.78$, $p=0.45$ αντίστοιχα).

Πίνακας 9. Επίπεδα διαλυτών μορίων προσκόλλησης E-σελεκτίνης και ICAM-1 σε δευτεροπαθείς ουδετεροπενίες μετά τη χορήγηση χημειοθεραπείας σε παιδιά με οξεία λευχαιμία σε ύφεση (n=24)

	ΟΛ ύφεση			Φυσιολογικά (n=15)
	(+) ουδετεροπενία (n=12)	ΟΛ (-) ουδετεροπενία (n=12)	Σύνολο (n=24)	
E-σελεκτίνη (ng/ml)				
μέση τιμή±SEM	49.8± 6.3	63.69± 6.4	56.8±4.6	104.7±15.6
διάμεση	48.2	74.3	54.9	87.3
εύρος	20.4-89.2	25-88.2	20.4-89.2	33.9-241.2
	*p=0.004	*p=0.03	*p=0.01	
	**p=0.14			
	†p<0.001			
ICAM-1 (ng/ml)				
μέση τιμή±SEM	358.86± 24.8	405.34± 37.6	380.17± 22	482.5± 54
διάμεση	350.6	383.3	370.5	525.35
εύρος	212.5-506	262.3-685	212.5-685	272-778.2
	*p=0.06	*p=0.25	*p=0.1	
	**p=0.3			
	†p<0.001			

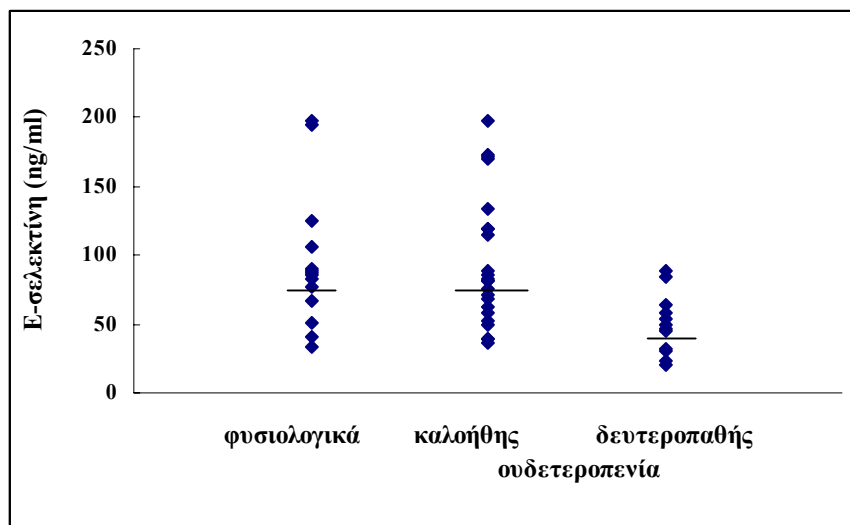
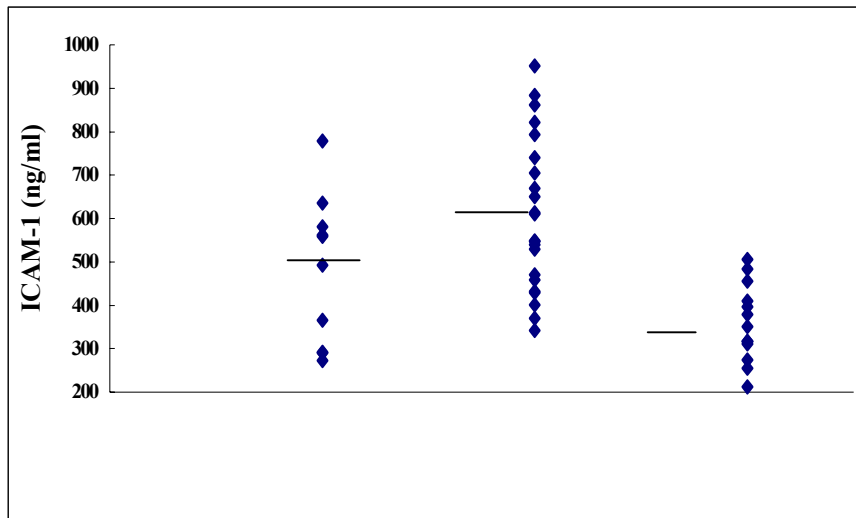
*p αναφέρεται στη σύγκριση κάθε ομάδας με την ομάδα των φυσιολογικών παιδιών
 **p αναφέρεται στη σύγκριση της δευτεροπαθούς ουδετεροπενίας με την ομάδα της οξείας λευχαιμίας (ΟΛ) χωρίς ουδετεροπενία
 †p αναφέρεται στη σύγκριση μεταξύ δευτεροπαθούς και χρόνιας καλοήθους ουδετεροπενίας



Σχήμα 8. Σύγκριση μέσων τιμών των επιπέδων E-σελεκτίνης και ICAM-1 σε πρωτοπαθείς καλοήθεις και δευτεροπαθείς ουδετεροπενίες μετά από χημειοθεραπεία. Οι τιμές του p αναφέρονται στη σύγκριση των μέσων τιμών των επιπέδων της E-σελεκτίνης.

Φαίνονται επίσης τα αποτελέσματα της σύγκρισης μεταξύ των ομάδων της δευτεροπαθούς ουδετεροπενίας και της ομάδας της οξείας λευχαιμίας (ΟΛ) χωρίς εκδήλωση ουδετεροπενίας.

Η κατανομή των τιμών των διαλυτών μορίων ICAM-1 και E-σελεκτίνης στις 3 ομάδες παιδιών που μελετήθηκαν φαίνεται στο Σχήμα 9.



Σχήμα 9α, β. Κατανομή των τιμών ICAM-1 και E-σελεκτίνης στην πρωτοπαθή καλοήθη και στη δευτεροπαθή ουδετεροπενία. Οι μικρές οριζόντιες γραμμές ορίζουν τη διάμεση τιμή για κάθε ομάδα. Το κάθε σημείο αποτελεί τη μέση τιμή δύο μετρήσεων για κάθε δείγμα.

4. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΕΠΙΠΕΔΩΝ G-CSF ΣΤΟΝ ΟΡΟ

Χρόνια καλοήθης ουδετεροπενία

Παρατηρήθηκε μεγάλη διακύμανση των επιπέδων G-CSF στον ορό των παιδιών με χρόνια καλοήθη ουδετεροπενία στη διάγνωση. Οι τιμές τους κυμαίνονταν από 6.92 έως 347 pg/ml. Η διάμεση τιμή τους ήταν 43 pg/ml ενώ η μέση τιμή τους \pm το σταθερό σφάλμα της μέσης τιμής ήταν 141.3 ± 52 pg/ml - Πίνακας 10. Το 50% των παιδιών που μελετήθηκαν είχαν επίπεδα χαμηλότερα του 39 pg/ml όπως και το 60% των φυσιολογικών παιδιών. Το 65% των παιδιών με χρόνια καλοήθη ουδετεροπενία είχαν επίπεδα που κυμαίνονταν στο εύρος των φυσιολογικών (10-81 pg/ml). Το 30% είχε επίπεδα μετρίως αυξημένα σε σχέση με τα επίπεδα των φυσιολογικών (Σχήμα 17).

Πίνακας 10. Επίπεδα ενδογενούς G-CSF στη χρόνια καλοήθη ουδετεροπενία

	Χρόνια καλοήθης ουδετεροπενία			Φυσιολογικά
	Ομάδα A ¹ (n=14)	Ομάδα B ² (n=9)	Σύνολο (n=23)	(n=13)
G-CSF (pg/ml)				
Μέση τιμή \pm SEM	222.6 \pm 35	66.5 \pm 2.8	141.3 \pm 52	34 \pm 7
Διάμεση τιμή	68	37	43	28.4
Εύρος	27.5-347	6.92-187.4	6.92-347	10-81
	*p=0.02	*p=0.2	*p=0.05	
	**p=0.17			

*p αναφέρεται στη σύγκριση κάθε ομάδας με τα επίπεδα των φυσιολογικών παιδιών

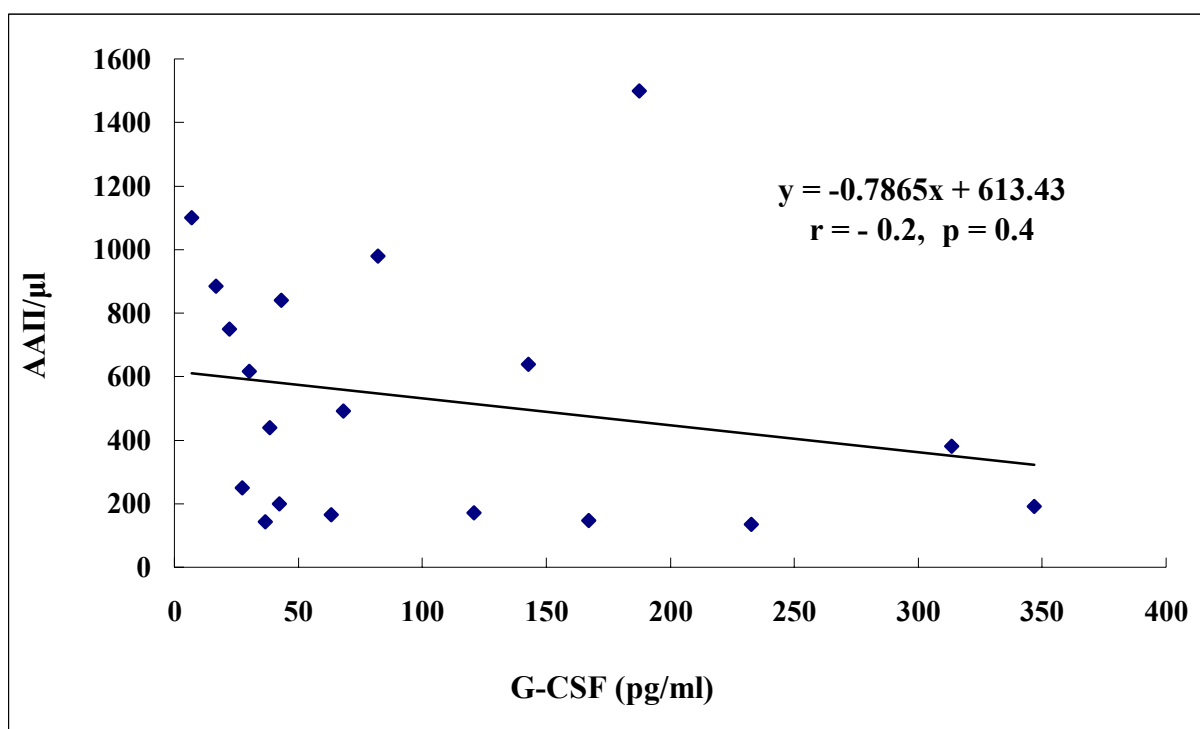
**p αναφέρεται στη σύγκριση μεταξύ των ομάδων A και B

¹ΑΑΠ<500 ²ΑΑΠ>500

Η διαφορά των μέσων τιμών της συγκέντρωσης G-CSF στον ορό των ασθενών με χρόνια καλοήθη ουδετεροπενία και φυσιολογικών παιδιών βρισκόταν στα όρια της στατιστικής σημαντικότητας (p=0.05). Στην ομάδα των παιδιών με βαριά ουδετεροπενία η συγκέντρωση του G-CSF στον ορό βρέθηκε αυξημένη

συγκρινόμενη με τη συγκέντρωση στον ορό των φυσιολογικών παιδιών ($p=0.02$). Στο σύνολο των περιστατικών δε βρέθηκε ισχυρή συσχέτιση των επιπέδων G-CSF του ορού με τον αριθμό των κυκλοφορούντων ουδετεροφύλων στο περιφερικό αίμα ($r= -0.2$, $p=0.4$) όπως φαίνεται στο σχήμα 10 ή με τον αριθμό των λευκοκυττάρων του περιφερικού αίματος ($r= -0.27$, $p=0.27$).

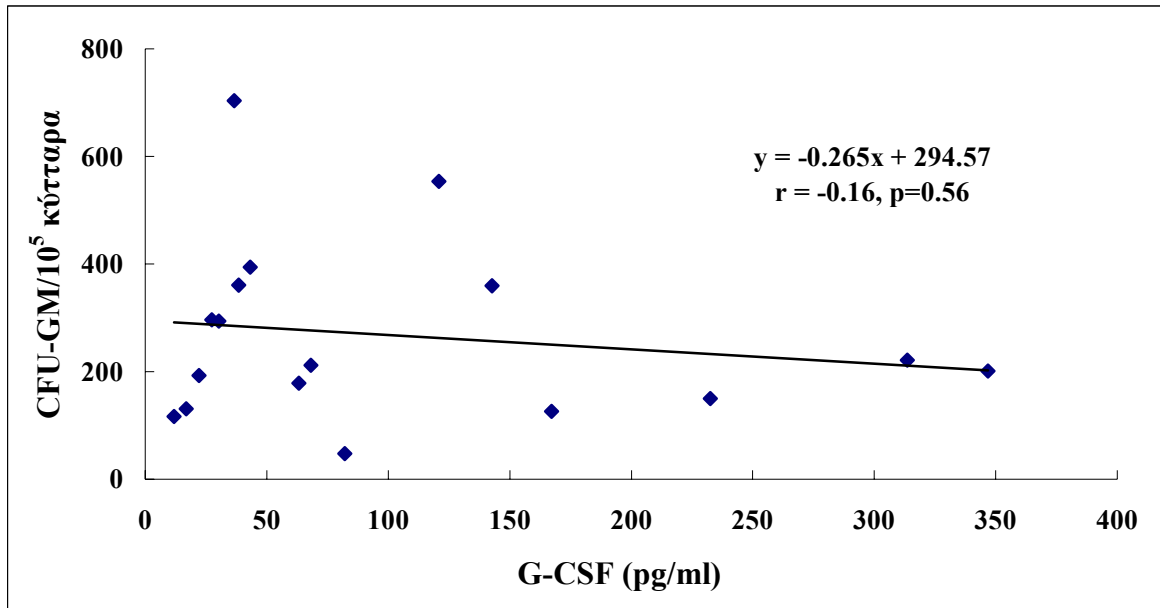
Ενδιαφέρον παρουσιάζει η αρνητική συσχέτιση αν και μη στατιστικώς σημαντική των επιπέδων G-CSF με τον απόλυτο αριθμό πολυμορφοκυττάρων όταν μελετηθούν ξεχωριστά οι περιπτώσεις βαριάς ουδετεροπενίας ($r= -0.33$, $p=0.3$) ενώ η συσχέτιση γίνεται θετική αν και όχι στατιστικώς σημαντική όταν ληφθούν υπ' όψιν οι ήπιες ουδετεροπενίες μόνο ($r=0.49$, $p=0.21$).



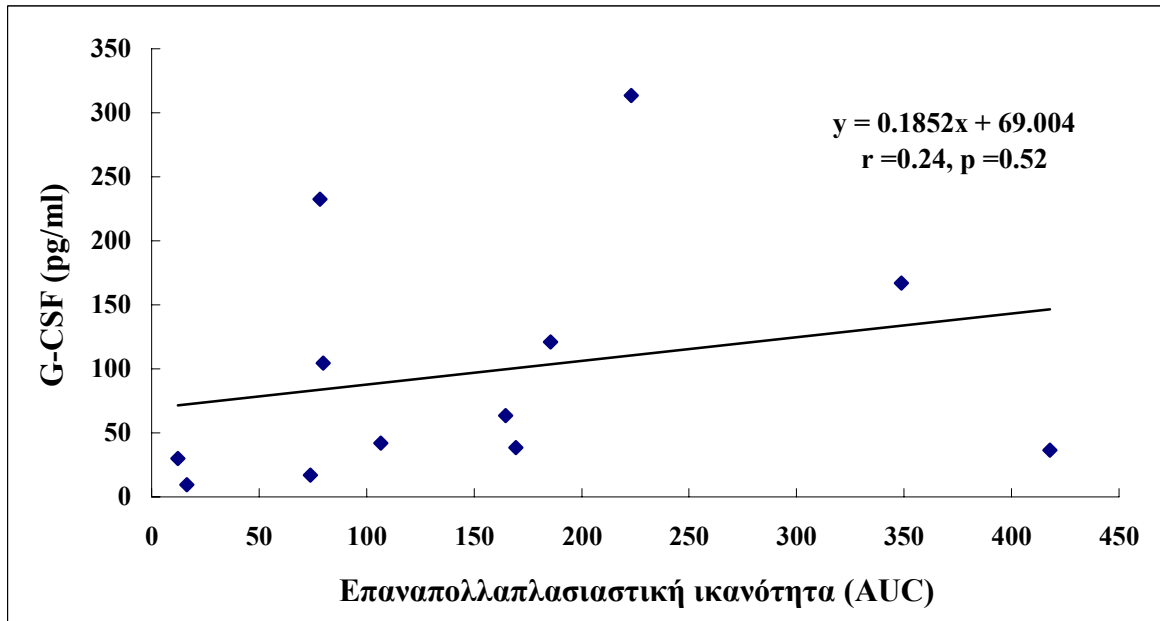
Σχήμα 10. Συσχέτιση των επιπέδων G-CSF στη χρόνια καλοήγη ουδετεροπενία με τον απόλυτο αριθμό πολυμορφοκυττάρων του περιφερικού αίματος

Δε βρέθηκε συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων του G-CSF και του αριθμού των προγονικών κυττάρων της κοκκιώδους σειράς ($r= -0.16$, $p=0.56$) ή της επαναπολλαπλασιαστικής τους ικανότητας ($r=0.24$, $p=0.52$) -Σχήμα 11α,β.

α



β

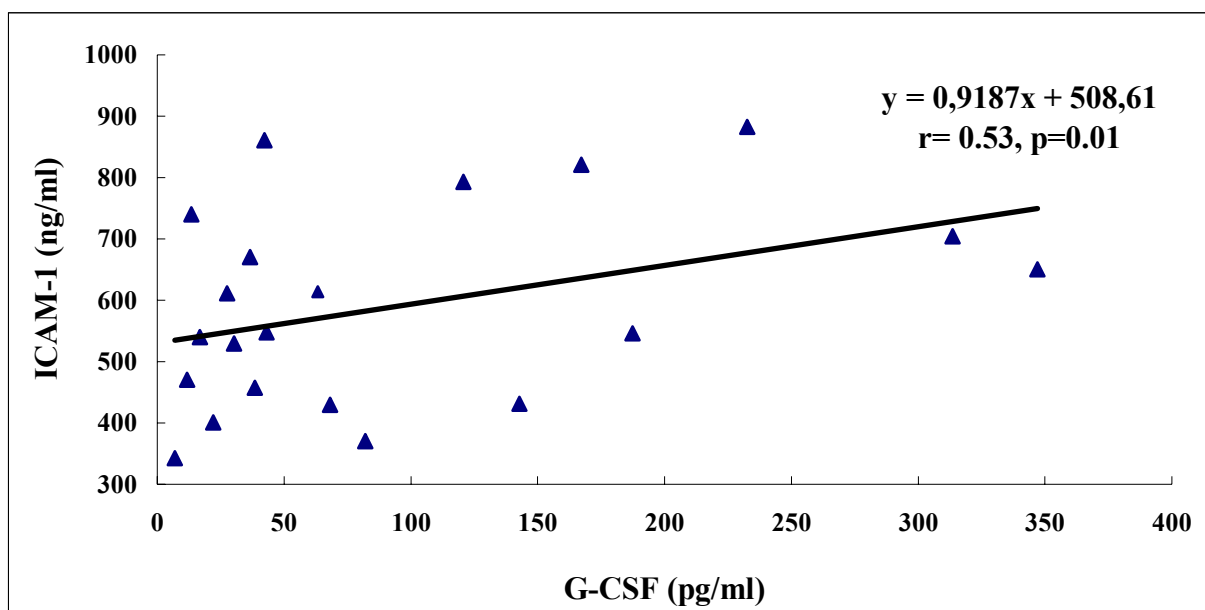


Σχήμα 11α,β. Συσχέτιση των επιπέδων G-CSF με τον αριθμό των προγονικών κυττάρων της κοκκιδώδους σειράς (α) καθώς και με την επαναπολλαπλασιαστική τους ικανότητα (β) στη χρόνια καλοήγη ουδετεροπενία.

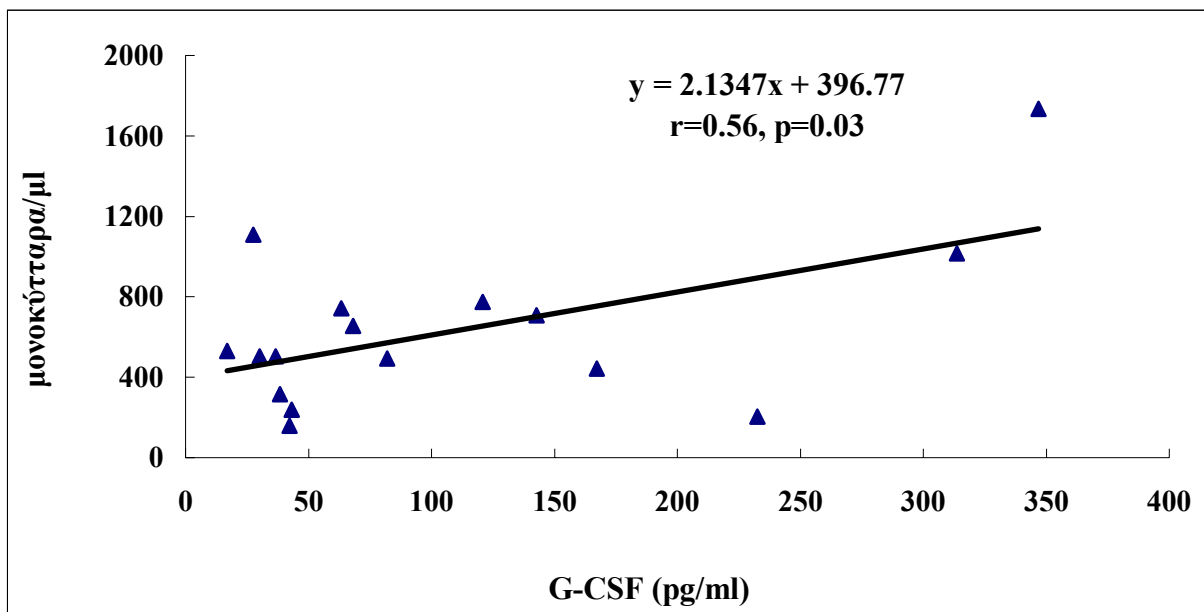
Τα επίπεδα του G-CSF σχετίζονται ισχυρώς θετικά με τα επίπεδα του διαλυτού ICAM-1 στον ορό των παιδιών με πρωτοπαθή καλοήγη ουδετεροπενία ($r = 0.53, p=0.01$) –Σχήμα 12. Βρέθηκε ισχυρή θετική συσχέτιση των επιπέδων G-CSF με τον αριθμό των μονοκυττάρων στο περιφερικό αίμα ($r=0.56, p=0.03$) - Σχήμα 13

Τα επίπεδα του G-CSF σχετίζονται ισχυρώς αρνητικά με το ποσοστό των ραβδοκυττάρων και των πολυμορφοκυττάρων του μυελού των οστών ($r = -0.62$, $p=0.02$) Σχήμα 14 καθώς και με τη δεξαμενή των ωριμαζόντων κυττάρων ($r = -0.45$, $p=0.12$) αλλά όχι στατιστικώς σημαντικά.

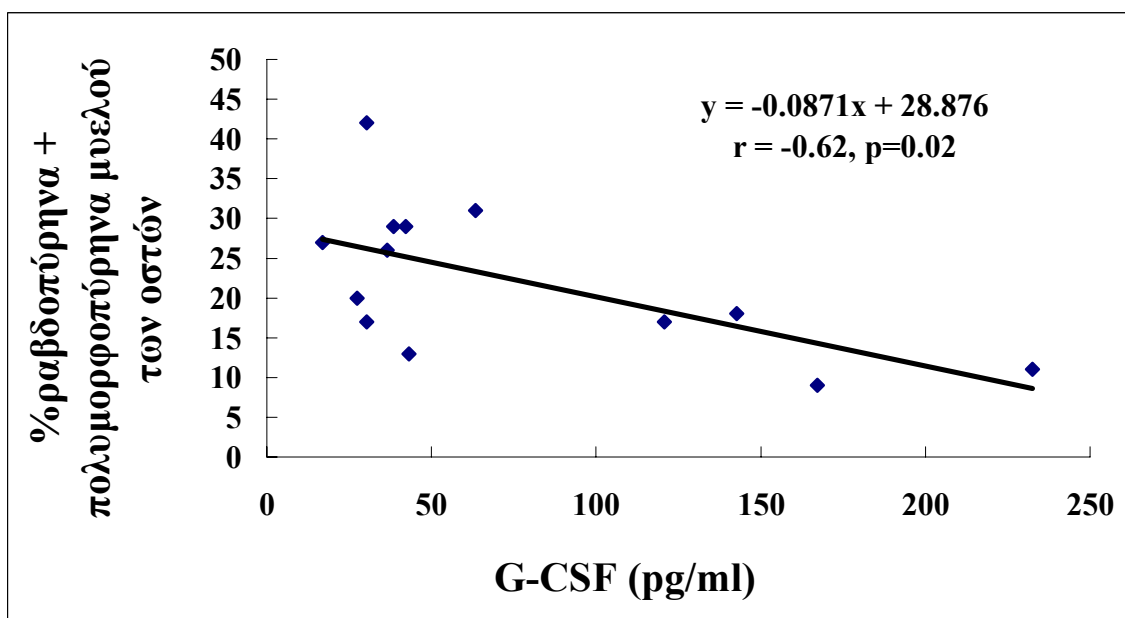
Αξίζει επίσης να σημειωθεί ότι σε 2 από τα 3 περιστατικά στα οποία παρατηρήθηκε αναστολή ωρίμανσης στα τελευταία στάδια διαφοροποίησης των κοκκιοκυττάρων στο μυελό των οστών τα επίπεδα του G-CSF βρέθηκαν αυξημένα σε σχέση με τη διάμεση τιμή των επιπέδων του αυξητικού παράγοντα στην ομάδα της χρόνιας καλοήθους ουδετεροπενίας.



Σχήμα 12. Συσχέτιση επιπέδων διαλυτού G-CSF και ICAM-1 στη χρόνια καλοήθη ουδετεροπενία



Σχήμα 13. Συσχέτιση επιπέδων διαλυτού G-CSF και αριθμού μονοκυττάρων στο περιφερικό αίμα στη χρόνια καλοήγη ουδετεροπενία



Σχήμα 14. Συσχέτιση επιπέδων G-CSF με το ποσοστό του αθροίσματος ραβδοπυρήνων και πολυμορφοπυρήνων του μυελού των οστών στη χρόνια καλοήγη ουδετεροπενία

Δευτεροπαθείς ουδετεροπενίες μετά τη χορήγηση χημειοθεραπείας

Τα επίπεδα του G-CSF στον ορό των παιδιών με δευτεροπαθή ουδετεροπενία κυμαίνονταν από 9.5 έως 213.24 pg/ml, ενώ η μέση τιμή τους δε διέφερε στατιστικώς σημαντικά από την αντίστοιχη τιμή της ομάδας των φυσιολογικών παιδιών ($p=0.17$). Αναλυτικά οι μέσες και οι διάμεσες τιμές καθώς και τα όρια διακύμανσης φαίνονται στον Πίνακα 11. Τα υψηλότερα επίπεδα παρατηρήθηκαν σε ένα παιδί το οποίο 20 ημέρες πριν από τον προσδιορισμό των επιπέδων ελάμβανε αντιμικροβιακή αγωγή λόγω μικροβιαμίας με θετική καλλιέργεια αίματος (*Klebsiella pneumoniae*), αλλά τη στιγμή της μελέτης δεν είχε κλινικά σημεία λοίμωξης ενώ παρουσίαζε μέτρια αύξηση της ταχύτητας καθίζησης των ερυθρών (30 mmHg). Σε κανένα από τα υπόλοιπα παιδιά δε παρατηρήθηκαν κλινικά ή εργαστηριακά σημεία λοίμωξης.

Πίνακας 11. Επίπεδα ενδογενούς G-CSF σε δευτεροπαθείς ουδετεροπενίες μετά τη χορήγηση χημειοθεραπείας σε παιδιά με οξεία λευχαιμία σε ύφεση

	ΟΛ ύφεση			Φυσιολογικά (n=13)
	(+) ουδετεροπενία (n=16)	ΟΛ (-) ουδετεροπενία (n=9)	Σύνολο (n=25)	
G-CSF (pg/ml)				
μέση τιμή \pm SEM	55.8 \pm 13.6	32 \pm 7	47.3 \pm 9.24	34 \pm 7
διάμεση τιμή	37.9	30.6	34.6	28.4
εύρος τιμών	9.5-213.2	5.5-75.8	5.5-213.2	10-81
	*p=0.17	*p=0.85	*p=0.26	
	**p=0.14			
	†p=0.13			

*p αναφέρεται στη σύγκριση κάθε ομάδας με την ομάδα των φυσιολογικών παιδιών

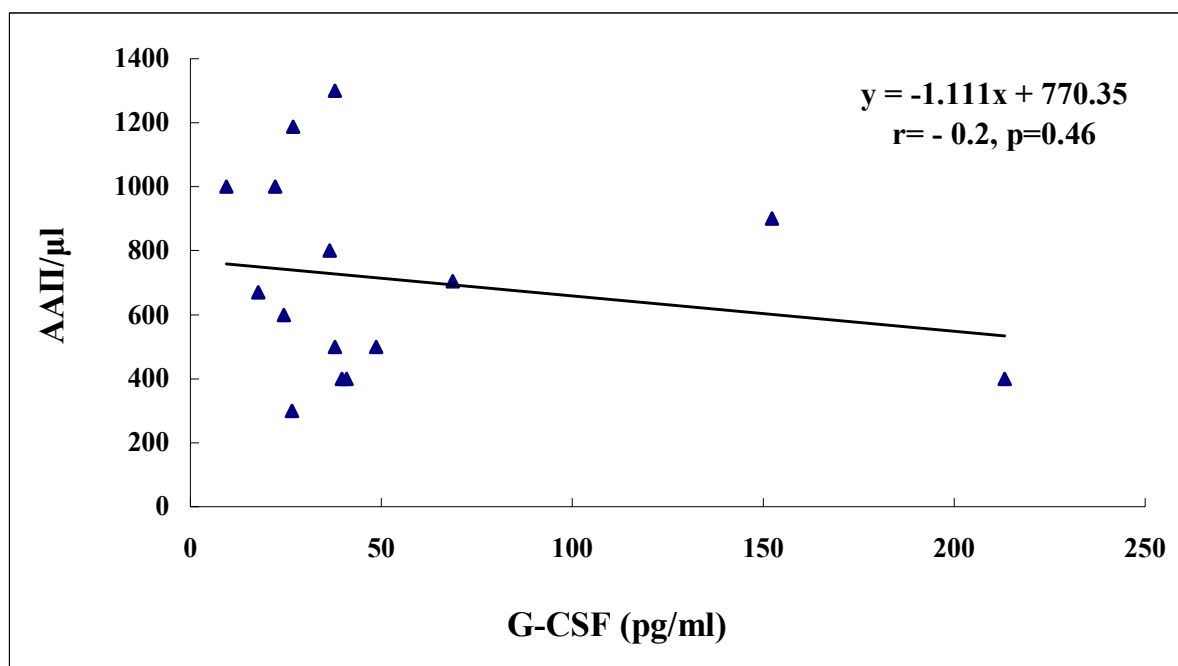
**p αναφέρεται στη σύγκριση της δευτεροπαθούς ουδετεροπενίας με την ομάδα της οξείας λευχαιμίας (ΟΛ) χωρίς ουδετεροπενία

†p αναφέρεται στη σύγκριση μεταξύ δευτεροπαθούς και χρόνιας καλοήθους ουδετεροπενίας

Η μέση τιμή των επιπέδων G-CSF στην ύφεση της οξείας λευχαιμίας ανεξαρτήτως ουδετεροπενίας ήταν χαμηλή και δε διέφερε από την αντίστοιχη τιμή των φυσιολογικών ($p=0.26$). Η φάση θεραπείας στην ύφεση δεν επηρέασε τα επίπεδα του G-CSF στον ορό ($p=0.55$).

Η μέση τιμή της συγκέντρωσης του G-CSF στον ορό στην ομάδα της δευτεροπαθούς ουδετεροπενίας δε διέφερε στατιστικώς σημαντικά από την αντίστοιχη της ομάδας της χρόνιας καλοήθους ουδετεροπενίας ($p=0.13$), αν και στην τελευταία τα επίπεδα παρουσίαζαν μεγαλύτερη διακύμανση τιμών και η μέγιστη τιμή ήταν υψηλότερη συγκρινόμενη με την αντίστοιχη τιμή στην ομάδα της δευτεροπαθούς και δε σχετίζονταν με τη εκδήλωση λοίμωξης.

Δε βρέθηκε ισχυρή αρνητική συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων G-CSF στον ορό των παιδιών με δευτεροπαθή ουδετεροπενία και του απόλυτου αριθμού πολυμορφοκυττάρων ($r= - 0.2, p=0.46$) –Σχήμα 15.

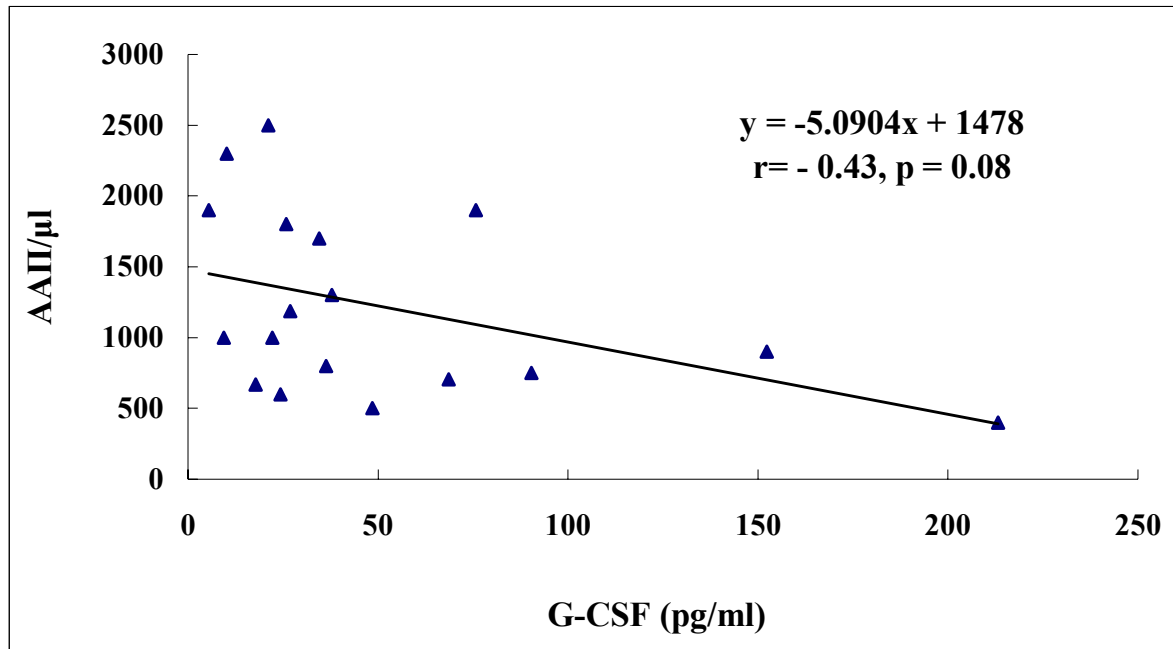


Σχήμα 15. Συσχέτιση επιπέδων G-CSF με τον απόλυτο αριθμό πολυμορφοκυττάρων στις δευτεροπαθείς ουδετεροπενίες μετά από χημειοθεραπεία

Η μέση τιμή της συγκέντρωσης G-CSF στον ορό σε ασθενείς με δευτεροπαθή ουδετεροπενία και απόλυτο αριθμό πολυμορφοκυττάρων <500 (71 ± 25 , διάμεση 40.8) δε διέφερε στατιστικώς σημαντικά, αν και είναι υψηλότερη, από τη μέση τιμή της συγκέντρωσης G-CSF σε περιπτώσεις δευτεροπαθούς ουδετεροπενίας με αριθμό κυκλοφορούντων ουδετεροφίλων >500 (44 ± 14.6 , διάμεση 27) ($p=0.34$), καθώς και από τα επίπεδα στην ομάδα των φυσιολογικών ($p=0.19$).

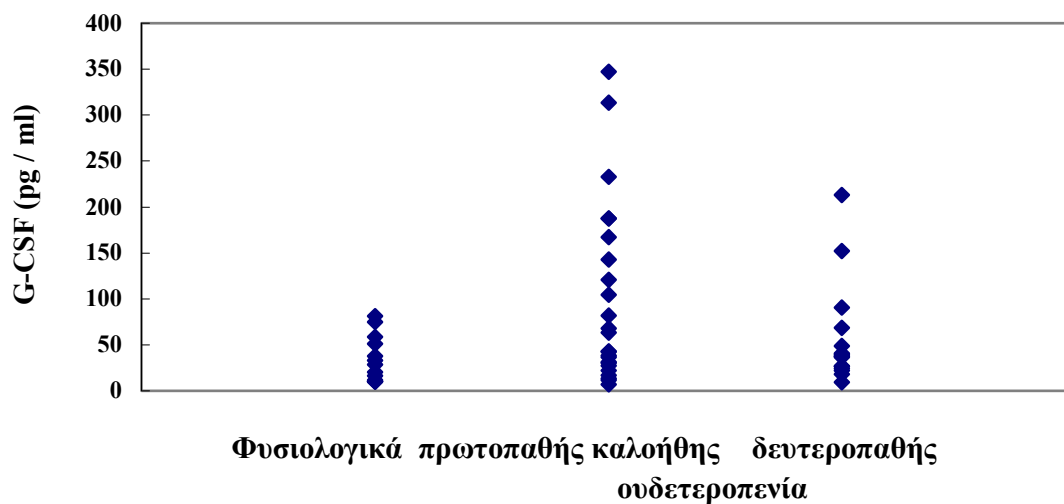
Η συσχέτιση μεταξύ ενδογενούς G-CSF και απόλυτου αριθμού πολυμορφοκυττάρων παραμένει αρνητική όταν συμπεριληφθούν όλες οι περιπτώσεις οξείας λευχαιμίας σε ύφεση και γίνεται πιο ισχυρή, αλλά όχι στατιστικώς σημαντική, όταν δεν ληφθούν υπ' όψιν οι τιμές πολυμορφοκυττάρων περιφερικού αίματος <500 και $>2500/\mu\text{l}$ ($r= - 0.43$, $p=0.08$) (Σχήμα 16). Αρνητική συσχέτιση παρατηρείται επίσης και μεταξύ ενδογενών επιπέδων G-CSF και αριθμού λευκοκυττάρων περιφερικού αίματος, ανεξαρτήτως εκδηλώσεως ουδετεροπενίας ($r= - 0.44$, $p=0.23$).

Δεν παρατηρήθηκε συσχέτιση μεταξύ G-CSF και επιπέδων διαλυτών ICAM-1 στον ορό των ασθενών με δευτεροπαθή ουδετεροπενία ($r= 0.24$).



Σχήμα 16. Συσχέτιση επιπέδων G-CSF με τον απόλυτο αριθμό πολυμορφοκυττάρων στην ύφεση της οξείας λευχαιμίας ανεξάρτητα από την εκδήλωση ουδετεροπενίας.

Η κατανομή των τιμών των επιπέδων του G-CSF στις 3 ομάδες παιδιών που μελετήθηκαν φαίνεται στο παρακάτω σχήμα:



Σχήμα 17. Κατανομή των τιμών των επιπέδων G-CSF στην πρωτοπαθή καλοήθη ουδετεροπενία και σε δευτεροπαθείς ουδετεροπενίες μετά από χημειοθεραπεία σε σύγκριση με τα φυσιολογικά επίπεδα. Κάθε σημείο αποτελεί τη μέση τιμή δύο μετρήσεων.

5. ΕΠΙΠΕΔΑ ΚΥΤΤΑΡΟΚΙΝΩΝ TNF- α ΚΑΙ IL-1 β

Χρόνια καλοήθης ουδετεροπενία

Τα επίπεδα του TNF- α στον ορό των ασθενών με χρόνια καλοήθη ουδετεροπενία (μέση τιμή 2.36 ± 0.36 pg/ml) βρέθηκαν αυξημένα συγκριτικά τόσο με τα φυσιολογικά (μέση τιμή 0.84 ± 0.39) όσο και με τα επίπεδα στην ομάδα των δευτεροπαθών ουδετεροπενιών (μέση τιμή 0.5 ± 0.27) ($p=0.01$, $p<0.001$ αντίστοιχα). Η αύξηση αυτή σε σύγκριση με τα επίπεδα των φυσιολογικών οφείλεται στα υψηλά επίπεδα στην ομάδα της σοβαρής ουδετεροπενίας ($p=0.002$).

Το παιδί με τα υψηλότερα επίπεδα TNF- α στον ορό δεν εμφάνιζε εργαστηριακά ή κλινικά σημεία λοίμωξης τη χρονική στιγμή της λήψης του δείγματος. Σε 9 παιδιά τα επίπεδα ήταν υψηλότερα από τη διάμεση τιμή της ομάδας της χρόνιας καλοήθους ουδετεροπενίας. Ένα από αυτά θετικοποίησε την CRP μια εβδομάδα μετά τον προσδιορισμό του TNF- α στον ορό. Όλα τα παιδιά πλην τριών είχαν υψηλότερα επίπεδα TNF- α από τον μέσο όρο των επιπέδων των φυσιολογικών παιδιών (Σχήμα 18).

Τα επίπεδα στην ομάδα των φυσιολογικών παιδιών ήταν πολύ χαμηλά. Σε 4 από τα δέκα παιδιά τα επίπεδα του TNF- α ήταν μη ανιχνεύσιμα ενώ στην ομάδα της χρόνιας καλοήθους ουδετεροπενίας σε ένα μόνο παιδί τα επίπεδα ήταν μη ανιχνεύσιμα.

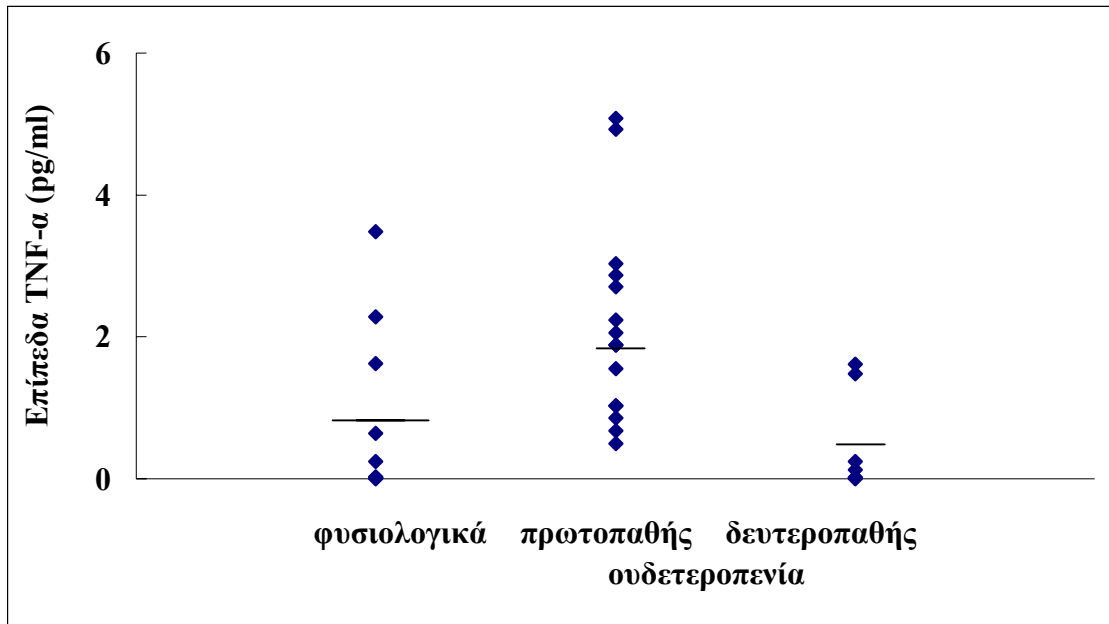
Τα επίπεδα του TNF- α σχετίζονται ισχυρώς αρνητικά με τον απόλυτο αριθμό πολυμορφοκυττάρων στο περιφερικό αίμα ($r= - 0.58$, $p= 0.01$) και ισχυρώς θετικά με τα επίπεδα του διαλυτού ICAM-1 ($r=0.67$, $p<0.01$) και του G-SCF ($r=0.65$, $p=0.01$) στον ορό (Σχήμα 20). Ο TNF- α σχετίζεται θετικά αλλά όχι στατιστικώς σημαντικά με τα επίπεδα της E-σελεκτίνης στον ορό ($r=0.21$).

Πίνακας 12. Επίπεδα TNF-α και IL-1β στον ορό παιδιών με χρόνια καλοήγη ουδετεροπενία

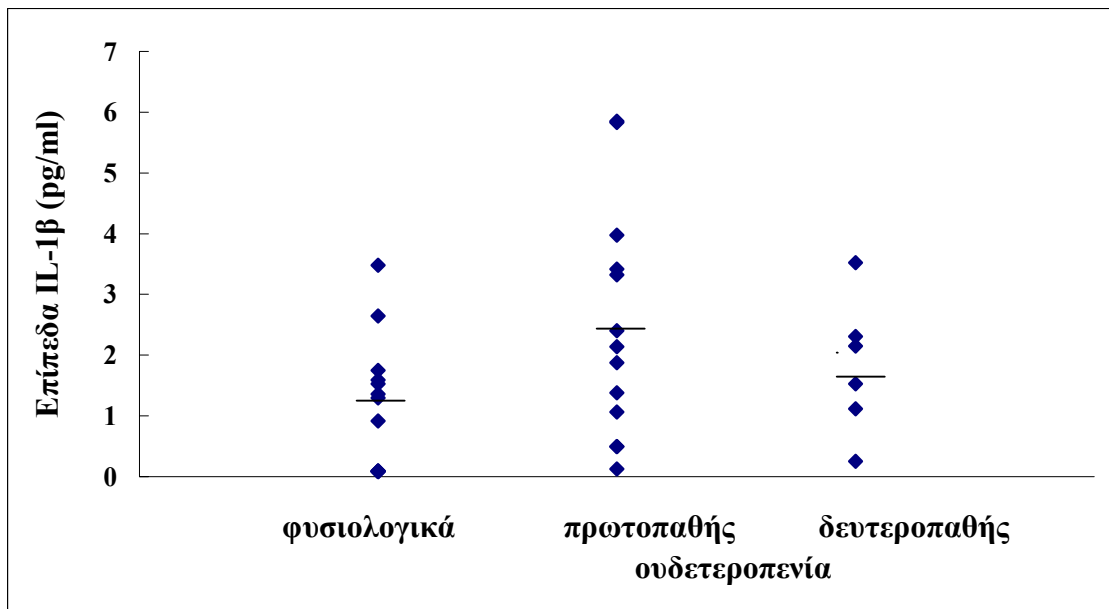
	Χρόνια καλοήγη ουδετεροπενία			Φυσιολογικά (n=10)
	Ομάδα A (n=9)	Ομάδα B (n=8)	Σύνολο (n=17)	
TNF-α (pg/ml)				
μέση τιμή (±SEM)	3.09±0.5	1.65±0.35	2.36±0.36	0.84±0.39
Διάμεση τιμή	2.87	1.54	2.05	0.14
Εύρος τιμών	0.85-5.08	0.67-2.87	0.67-5.08	0.06-3.48
	*p=0.002	*p=0.18	*p=0.01	
	**p=0.06			
IL-1β (pg/ml)				
μέση τιμή (±SEM)	2.39±0.5	1.96±1.01	2.49±0.5	1.15±0.3
Διάμεση τιμή	2.4	1.06	2.14	1.29
Εύρος τιμών	0.125-3.98	0.5-5.85	0.125-5.85	0.08-3.48
	*p=0.04	*p=0.23	*p=0.04	
	**p=0.85			

*p αναφέρεται στη σύγκριση κάθε ομάδας με τα επίπεδα των φυσιολογικών παιδιών

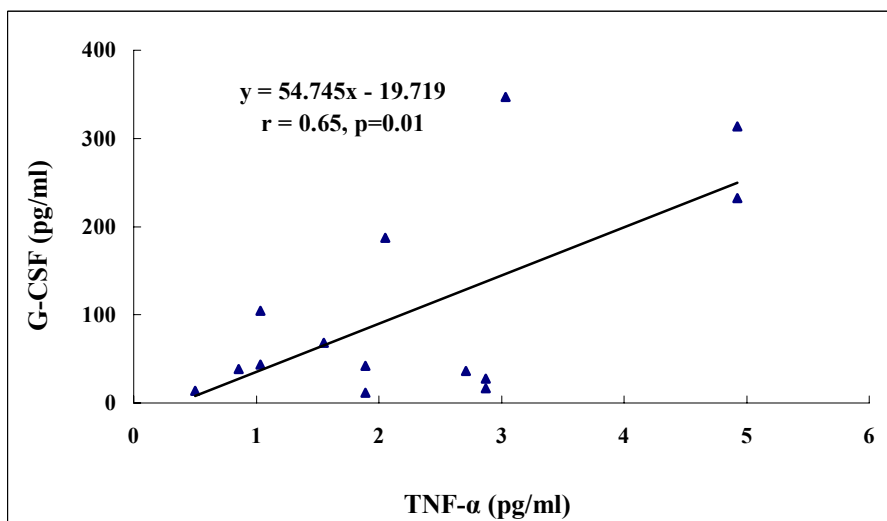
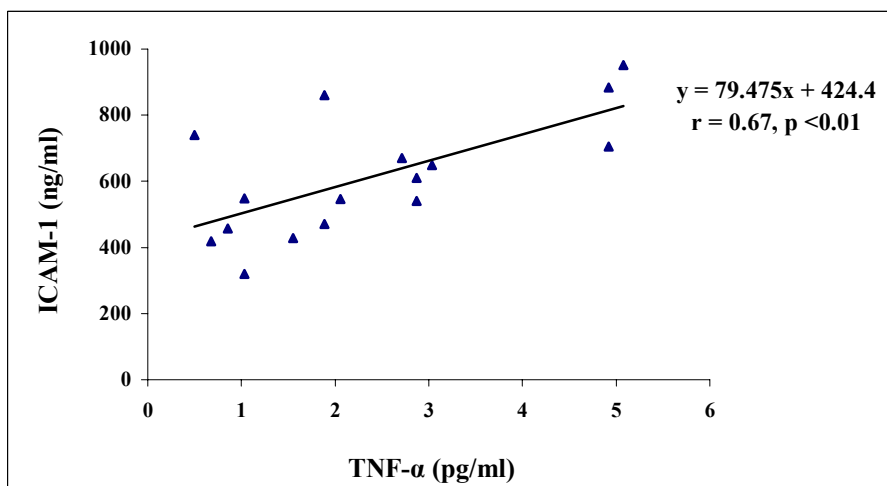
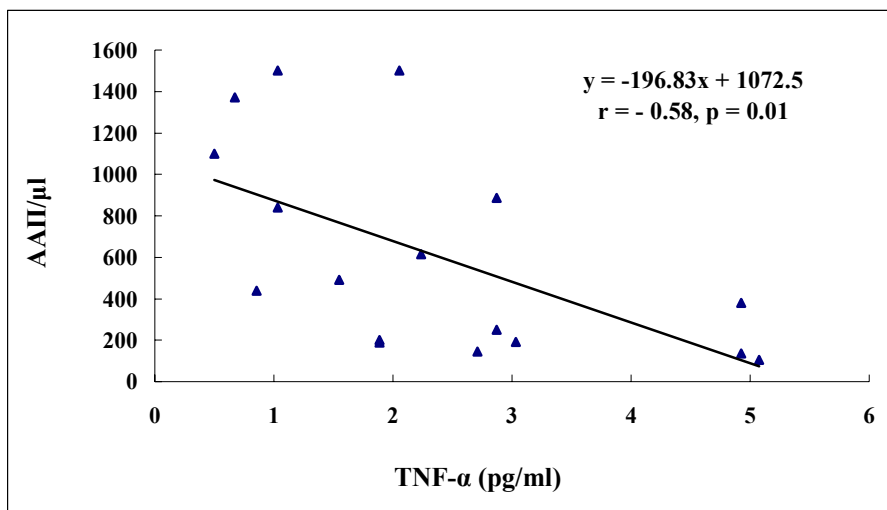
**p αναφέρεται στη σύγκριση μεταξύ των ομάδων A και B



Σχήμα 18. Διασπορά των τιμών TNF- α στον ορό παιδιών με χρόνια καλοήγη ουδετεροπενία και δευτεροπαθή ουδετεροπενία μετά από χημειοθεραπεία σε σύγκριση με την ομάδα των φυσιολογικών παιδιών. Οι οριζόντιες γραμμές ορίζουν τις μέσες τιμές κάθε ομάδας



Σχήμα 19. Διασπορά των τιμών IL-1 β στον ορό παιδιών με χρόνια καλοήγη ουδετεροπενία και δευτεροπαθή ουδετεροπενία μετά από χημειοθεραπεία σε σύγκριση με την ομάδα των φυσιολογικών παιδιών. Οι οριζόντιες γραμμές ορίζουν τις μέσες τιμές κάθε ομάδας



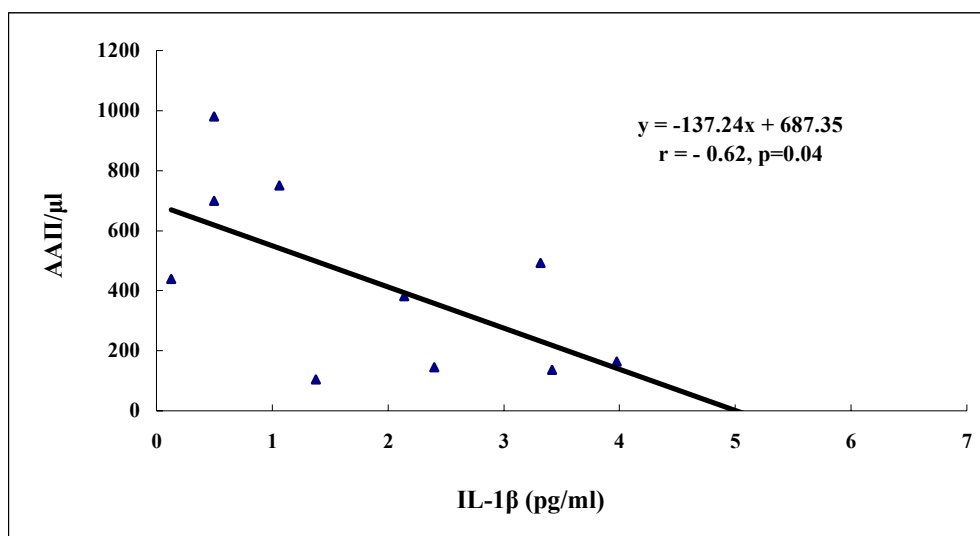
Σχήμα 20. Συσχέτιση των επιπέδων TNF- α με τον αριθμό των κυκλοφορούντων ουδετεροφίλων (α), τα επίπεδα του διαλυτού ICAM-1 (β) και του G-CSF (γ) στον ορό των παιδιών με χρόνια καλοήγη ουδετεροπενία

Τα επίπεδα της IL-1β στον ορό στο σύνολο των ασθενών με χρόνια καλοήγη ουδετεροπενία (μέση τιμή 2.49 ± 0.5) βρέθηκαν αυξημένα συγκριτικά με τα φυσιολογικά (μέση τιμή 1.15 ± 0.3) ($p=0.04$). Η μέση τιμή των επιπέδων στην ομάδα της χρόνιας καλοήθους ουδετεροπενίας ήταν υψηλότερη συγκριτικά με την αντίστοιχη τιμή στην ομάδα της δευτεροπαθούς ουδετεροπενίας (μέση τιμή 1.87 ± 0.56) αλλά η διαφορά αυτή δεν ήταν στατιστικώς σημαντική ($p=0.5$). Στην ομάδα των παιδιών με βαριά ουδετεροπενία η μέση τιμή των επιπέδων της IL-1β ήταν υψηλότερη σε σύγκριση με την αντίστοιχη τιμή στην ομάδα των παιδιών με ήπια ουδετεροπενία και με την ομάδα των φυσιολογικών, αλλά οι διαφορές αυτές δεν ήταν στατιστικώς σημαντικές ($p=0.68$, $p=0.23$ αντίστοιχα) Πίνακας 12.

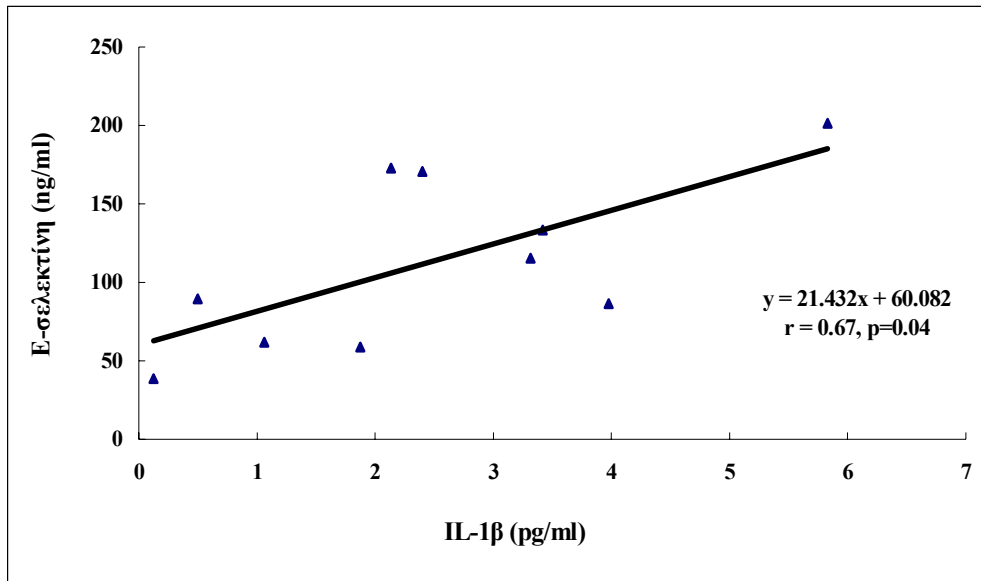
Από τα 6 παιδιά με αυξημένα επίπεδα IL-1β πάνω από τη διάμεση τιμή της ομάδας της χρόνιας καλοήθους ουδετεροπενίας (Σχήμα 19). Το παιδί με τα υψηλότερα επίπεδα δεν παρουσίαζε κλινικά ή εργαστηριακά σημεία λοίμωξης τη στιγμή του προσδιορισμού της IL-1β στον ορό.

Τα επίπεδα της IL-1β σχετίζονται ισχυρώς αρνητικά με τον απόλυτο αριθμό πολυμορφοκυττάρων ($r = -0.62$, $p=0.04$). Σχετίζονται επίσης θετικά με τα επίπεδα του ICAM-1 ($r=0.59$, $p=0.09$), της E-σελεκτίνης ($r=0.67$, $p=0.04$) και του G-CSF ($r=0.67$, $p=0.04$) στον ορό όπως φαίνεται στο Σχήμα 21.

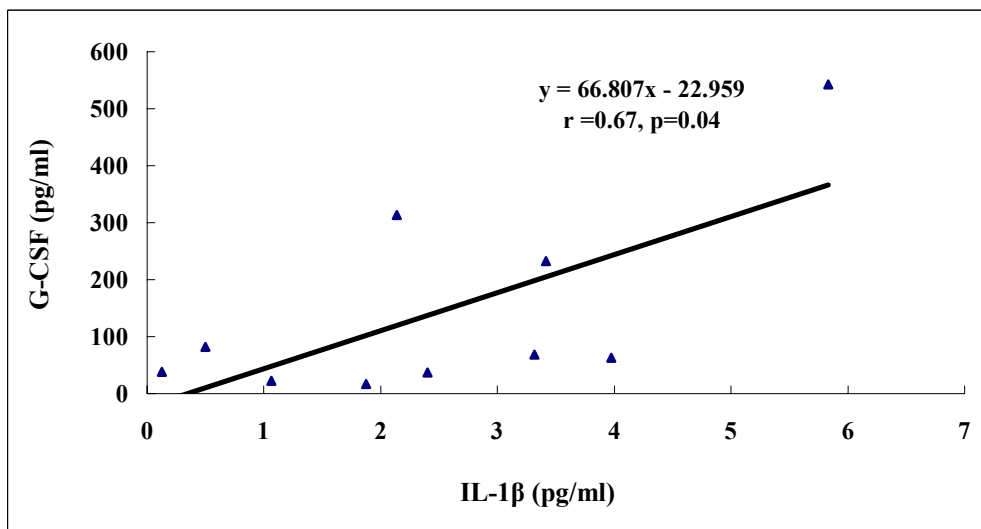
α



β



γ



Σχήμα 21 Συσχέτιση των επιπέδων IL-1β με τον αριθμό των κυκλοφορούντων ουδετεροφίλων (α), τα επίπεδα της διαλυτής E-σελεκτίνης (β) και του G-CSF (γ) στον ορό των παιδιών με χρόνια καλοήγη ουδετεροπενία

Δευτεροπαθείς ουδετεροπενίες μετά τη χορήγηση χημειοθεραπείας σε παιδιά με οξεία λευχαιμία σε ύφεση

Η εκδήλωση ουδετεροπενίας στην ομάδα της οξείας λευχαιμίας σε ύφεση δεν επηρέασε τις τιμές των επιπέδων των TNF-α και IL-1β στον ορό των ασθενών, όπως φαίνεται από την απουσία στατιστικώς σημαντικής διαφοράς μεταξύ των ομάδων της δευτεροπαθούς ουδετεροπενίας και της οξείας λευχαιμίας σε ύφεση χωρίς εκδήλωση ουδετεροπενίας ($p=0.18$, $p=0.78$ αντίστοιχα για τον TNF-α και την IL-1β). Οι τιμές των TNF-α και IL-1β κυμαίνονταν στα επίπεδα των φυσιολογικών ($p=0.53$, $p=0.24$ για τη σύγκριση του TNF-α και της IL-1β με τα φυσιολογικά αντίστοιχα). Σε 5 από τα δέκα παιδιά με οξεία λευχαιμία σε ύφεση οι τιμές ήταν μη ανιχνεύσιμες.

Τα επίπεδα των δύο κυτταροκινών στην ομάδα της δευτεροπαθούς ουδετεροπενίας ήταν ελαττωμένα σε σύγκριση με τα αντίστοιχα στην ομάδα της χρόνιας καλοήθους ουδετεροπενίας και για τον TNF-α στατιστικώς σημαντικά ($p<0.001$) Πίνακας 13.

Η φάση θεραπείας στην ύφεση δεν επηρέασε τις τιμές των επιπέδων TNF-α στον ορό των ασθενών ($p=0.9$). Η βαρύτητα της ουδετεροπενίας δεν σχετίζεται με τις τιμές των επιπέδων TNF-α και IL-1β όπως φάνηκε από την απουσία συσχέτισης μεταξύ των επιπέδων των εν λόγω κυτταροκινών στον ορό των ασθενών και του απόλυτου αριθμού πολυμορφοπυρήνων στο περιφερικό αίμα ($r=-0.08$ για τον TNF-α, $r=-0.47$, $p=0.4$ για την IL-1β).

Πίνακας 13. Επίπεδα TNF- α και IL-1 β σε δευτεροπαθείς ουδετεροπενίες μετά τη χορήγηση χημειοθεραπείας σε παιδιά με οξεία λευχαιμία σε ύφεση

	ΟΛ σε ύφεση		Φυσιολογικά	
	(+) ουδετεροπενία (n=7)	(-) ουδετεροπενία (n=3)	Σύνολο (n=10)	(n=10)
TNF-α (pg/ml)				
μέση τιμή \pm SEM	0.5 \pm 0.27	0.09 \pm 0.07	0.38 \pm 0.2	0.84 \pm 0.4
Διάμεση τιμή	0.12	0.03	0.07	0.14
Εύρος τιμών	0.06-1.62	0.018-0.22	0.06-1.62	0.001-3.48
	*p=0.53	*p=0.09	*p=0.31	
	**p=0.18			
	†p<0.001			
IL-1β (pg/ml)				
μέση τιμή \pm SEM	1.46 \pm 0.48	1.6 \pm 0.76	1.52 \pm 0.39	1.15 \pm 0.3
Διάμεση τιμή	1.63	1.32	2.15	1.29
Εύρος τιμών	0.25-2.31	0.09-2.5	0.09-2.5	0.08-3.48
	*p=0.24	*p=0.47	*p=0.54	
	**p=0.78			
	†p=0.32			

*p αναφέρεται στη σύγκριση κάθε ομάδας με την ομάδα των φυσιολογικών παιδιών

**p αναφέρεται στη σύγκριση της δευτεροπαθούς ουδετεροπενίας με την ομάδα της οξείας λευχαιμίας (ΟΛ) χωρίς ουδετεροπενία

†p αναφέρεται στη σύγκριση μεταξύ δευτεροπαθούς και χρόνιας καλοήθους ουδετεροπενίας

VII. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Όλα τα παιδιά της μελέτης πληρούσαν τα κριτήρια της χρόνιας καλοήθους ουδετεροπενίας της βρεφικής και της παιδικής ηλικίας. Η ουδετεροπενία αποτελούσε το μοναδικό αιματολογικό εύρημα, δεν ήταν κυκλική και από τον εργαστηριακό έλεγχο που διενεργήθηκε δε βρέθηκε υποκείμενο νόσημα στο οποίο θα μπορούσε να αποδοθεί η μείωση του αριθμού των κυκλοφορούντων ουδετεροφίλων στο περιφερικό αίμα. Η μορφολογία των ουδετεροφίλων ήταν φυσιολογική και στις περιπτώσεις που χρειάστηκε να γίνει μυελόγραμμα αυτό έδειξε φυσιολογική κυτταροβρίθεια ή ελαφρά υπερπλασία. Σε ελάχιστες περιπτώσεις παρατηρήθηκε αναστολή ωρίμανσης των κοκκιοκυττάρων στα τελευταία στάδια διαφοροποίησής τους (μεταμυελοκύτταρα, ραβδοπύρηνα), εύρημα που περιστασιακά συναντάται στη χρόνια καλοήθη ουδετεροπενία των παιδιών. Η ηλικία έναρξης της νόσου ήταν πριν από τον 3^ο χρόνο ζωής (διάμεση ηλικία 9 μήνες) και δεν παρατηρήθηκαν σοβαρές ή απειλητικές για τη ζωή λοιμώξεις για ένα διάστημα παρακολούθησης μεγαλύτερο από 2 –3 μήνες.

Η μέση τιμή της αιμοσφαιρίνης κατά τη διάγνωση στο σύνολο των ασθενών ήταν μετρίως ελαττωμένη συγκριτικά με τη φυσιολογική τιμή για την ηλικίας τους. Δύο ασθενείς εκδήλωσαν ήπια θρομβοπενία με αριθμό αιμοπεταλίων $>100 \cdot 10^3$ /μλ. Στο 54% των ασθενών ο αριθμός των πολυμορφοπυρήνων στη διάγνωση ήταν πολύ χαμηλός (<400 κύτταρα/μλ), ενώ παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση του αριθμού των μονοπυρήνων στις περιπτώσεις σοβαρής ουδετεροπενίας. Οι υπόλοιπες αιματολογικές παράμετροι κυμαίνονταν στα φυσιολογικά πλαίσια. Ο υπόλοιπος εργαστηριακός έλεγχος απέβη αρνητικός. Παρατηρήθηκε στροφή προς τα αριστερά της κοκκιώδους σειράς, όπως υποδεικνύει το αυξημένο ποσοστό του διαμερίσματος των πολλαπλασιαζόμενων κυττάρων του μυελού των οστών, τόσο στο σύνολο των περιστατικών όσο και στην ομάδα της σοβαρής ουδετεροπενίας συγκριτικά με τις μέτριες-ήπιες περιπτώσεις. Η κυτταροβρίθεια του μυελού των οστών και το σύνολο της κοκκιώδους σειράς βρέθηκαν εντός φυσιολογικών ορίων. Ανάλογα ευρήματα έχουν δημοσιευτεί και αφορούν τη χρόνια ιδιοπαθή ουδετεροπενία του ενήλικα (249,

304).

Τα ερωτήματα που έγινε προσπάθεια να απαντηθούν με αυτή τη μελέτη αφορούν μερικά αδιευκρίνιστα σημεία για την καλοήγη ουδετεροπενία της βρεφικής και παιδικής ηλικίας:

Ποια είναι τα αίτια που πυροδοτούν τον ανοσολογικό μηχανισμό στην καλοήγη ουδετεροπενία των παιδιών

Ποιός είναι ο ρυθμιστικός ρόλος του G-CSF, πώς σχετίζεται ο G-CSF με τον αριθμό των ουδετεροφίλων στο περιφερικό αίμα, πώς ρυθμίζεται η παραγωγή του

Πώς συμμετέχει ο μυελός των οστών στο επίπεδο των προγονικών κυττάρων της κοκκιώδους σειράς εκτιμώντας την επαναπολλαπλασιαστική τους ικανότητα σε συνδυασμό με την ποσοτική μέτρησή τους. Πως συνδέεται ο μυελός των οστών με την περιφέρεια, πώς μεταδίδονται τα ερεθίσματα της ουδετεροπενίας στο μυελό των οστών

Πώς εξηγείται η μεγάλη ετερογένεια της νόσου όσον αφορά τις κλινικές εκδηλώσεις, την ανταπόκριση στη θεραπεία και την επίτευξη αυτόματης ύφεσης.

Η διερεύνηση της απάντησης του μυελού των οστών στην κυτταροπενία του περιφερικού αίματος έγινε όχι μόνο με ποσοτική αξιολόγηση των προγονικών κυττάρων της κοκκιώδους σειράς αλλά και με ποιοτική εκτίμηση της επαναπολλαπλασιαστικής (αυτοανανεωτικής) τους ικανότητας που συνδέεται άμεσα με την ικανότητα του μυελού να παράγει ώριμα ουδετερόφιλα.

Προηγούμενες *in vitro* μελέτες του μυελού των οστών με καλλιέργειες μονοπύρηνων κυττάρων έχουν δείξει ότι ο αριθμός των αποικιών προγονικών αιμοποιητικών κυττάρων της κοκκιώδους σειράς σε αυτές τις ουδετεροπενίες είναι φυσιολογικός ή αυξημένος (192). Επίσης συχνά είναι αυξημένος ο αριθμός των προδρόμων μορφών των ώριμων ουδετεροφίλων στο μυελό των οστών σαν αντιστάθμισμα στην περιφερική ουδετεροπενία.

Η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε έχει προταθεί στη βιβλιογραφία από τους Gordon και συν. σαν ένα *in vitro* πρότυπο ελέγχου της ικανότητας πολλαπλασιασμού του διαμερίσματος των CFU-GM (300, 305, 306, 307, 308). Ο “ενδιάμεσος” πληθυσμός μεταξύ αρχέγονων και ώριμων αιμοποιητικών κυττάρων που αποτελούν τα CFU-GM διατηρεί περιορισμένη ικανότητα αυτοανανέωσης, η οποία υπόκειται σε έλεγχο από εξωγενείς παράγοντες και μεταβάλλεται ανάλογα με αυτούς. Αυτή η

ικανότητα αυτοανανέωσης των κυττάρων που δεν είναι τα πλέον αρχέγονα θεωρείται απαραίτητη για να παραχθούν οι πληθυσμοί των κοκκιοκυττάρων (ώριμων κυττάρων) που καταμετρώνται στο περιφερικό αίμα (309) και να διατηρηθεί σταθερός ο αριθμός των κυττάρων του αίματος καθόλη τη διάρκεια της ζωής (305). Επίσης, θεωρείται ρυθμιστικός μηχανισμός που προφυλάσσει τα πλέον αρχέγονα κύτταρα (stem cells) από την υπέρμετρη ενεργοποίηση (305, 309).

Στη μελέτη αυτή η επαναπολλαπλασιαστική ικανότητα των προγονικών κυττάρων στη χρόνια καλοήγη ουδετεροπενία βρέθηκε αυξημένη, αλλά όχι σε στατιστικά σημαντικά επίπεδα, όταν εξετάστηκε το σύνολο των περιστατικών. Στην περίπτωση των σοβαρών ουδετεροπενιών (ΑΑΠ<500) η ικανότητα αυτή βρέθηκε σημαντικά αυξημένη συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου και με τις περιπτώσεις ήπιας-μέτριας ουδετεροπενίας. Η αύξηση αυτή μπορεί να συσχετιστεί με τα αυξημένα επίπεδα G-CSF που παρατηρήθηκαν στις περιπτώσεις σοβαρής ουδετεροπενίας. Στο σύνολο των περιστατικών που μελετήθηκαν, όπου περιλαμβάνονται και οι περιπτώσεις ήπιας ουδετεροπενίας, η επαναπολλαπλασιαστική ικανότητα των προγονικών κυττάρων βρέθηκε ανεξάρτητη του αριθμού των κυκλοφορούντων ουδετεροφίλων του περιφερικού αίματος και των επιπέδων του G-CSF στον ορό, εύρημα που δείχνει διαφορετική συμπεριφορά (απαντητική ικανότητα) του μυελού στις περιπτώσεις σοβαρής ουδετεροπενίας που αποτελούν και την πλειοψηφία των περιστατικών καλοήθους ουδετεροπενίας και που μπορεί να σχετίζεται επίσης και με την ευρεία διακύμανση των επιπέδων του G-CSF στον ορό που μοιάζει να εκκρίνεται ιδιοσυστασιακά και όχι να υπόκειται σε σαφείς ρυθμιστικούς μηχανισμούς (αυτόνομη ρύθμιση της αιμοποίησης στην καλοήγη ουδετεροπενία). Επίσης, τοπικοί (χυμικοί) παράγοντες στο περιβάλλον του μυελού που εκκρίνονται από τα βοηθητικά κύτταρα και τα κύτταρα του μυελικού στρώματος (7) ακόμα και ο G-CSF που παράγεται τοπικά από τα κύτταρα του μυελικού στρώματος και όχι όπως προσδιορίζεται από τα επίπεδά του στην κυκλοφορία (310) μπορεί να συμβάλλουν ρυθμιστικά στην αύξηση της επαναπολλαπλασιαστικής ικανότητας των προγονικών κυττάρων. Ιστικοί και όχι αγγειακοί υποδοχείς ενδέχεται να δέχονται το ερέθισμα για αντισταθμιστική στην ουδετεροπενία της περιφέρειας αύξηση της παραγωγής ουδετεροφίλων από το μυελό των οστών, δεδομένο που θα μπορούσε να εξηγήσει την απουσία σημαντικής

συσχέτισης της επαναπολλαπλασιαστικής ικανότητας του μυελού με τον απόλυτο αριθμό πολυμορφοκυττάρων.

Η αντισταθμιστική αύξηση της ικανότητας του μυελού να παράγει ώριμα ουδετερόφιλα στις περιπτώσεις σοβαρής ουδετεροπενίας πιθανώς εξηγεί και την ελαττωμένη συχνότητα σοβαρών λοιμώξεων για το βαθμό της ουδετεροπενίας που παρατηρείται στις περιπτώσεις αυτές. Τα ουδετερόφιλα που παράγονται αντισταθμιστικά, όπως δείχνει η φυσιολογική ή και αυξημένη επαναπολλαπλασιαστική ικανότητα του μυελού, δεν κυκλοφορούν, αλλά πιθανότατα χρησιμοποιούνται στους ιστούς, λόγω λανθάνουσας, υποκλινικής φλεγμονής των ιστών, όπως δείχνουν και οι αυξημένοι δείκτες ενεργοποίησης του αγγειακού ενδοθηλίου (TNF- α , IL-1 β , ICAM-1, E-σελεκτίνη) στις περιπτώσεις σοβαρής ουδετεροπενίας.

Η επαναπολλαπλασιαστική ικανότητα των προγονικών κυττάρων του μυελού σύμφωνα με τους Marley και συν (305) μειώνεται συνεχώς με την ηλικία και αυτή η μείωση ξεκινά από τη γέννηση και αφορά υγιή πληθυσμό όλων των ηλικιών. Με βάση το εύρημα αυτό και με την κλινική παρατήρηση ότι η μικρή ηλικία στη διάγνωση σχετίζεται με μεγαλύτερη πιθανότητα αυτόματης ύφεσης μελετήθηκαν οι πιθανές μεταβολές της επαναπολλαπλασιαστικής ικανότητας των προγονικών κυττάρων του μυελού σε παιδιά με καλοήγη ουδετεροπενία με την ηλικία διάγνωσης. Δε βρέθηκε ισχυρή συσχέτιση μεταξύ των δύο παραπάνω παραγόντων, εύρημα που μπορεί να ερμηνευτεί ως μη συμμετοχή της ηλικίας του παιδιού στη διάγνωση της ουδετεροπενίας στην απάντηση του μυελού στην ουδετεροπενία (αντισταθμιστική στην ουδετεροπενία ικανότητα του μυελού να παράγει ώριμα ουδετερόφιλα).

Στις δευτεροπαθείς ουδετεροπενίες μετά από χημειοθεραπεία σε παιδιά με οξεία λευχαιμία σε ύφεση, που χρησιμοποιήθηκαν ως θετική ομάδα ελέγχου, η επαναπολλαπλασιαστική ικανότητα του μυελού δεν αυξάνεται, αλλά σχετίζεται ισχυρώς αρνητικά με τον απόλυτο αριθμό πολυμορφοκυττάρων. Αξίζει εδώ να σημειωθεί ότι σύμφωνα με μελέτη των Δημητρίου και συν (303) στην ύφεση της οξείας λευχαιμίας ο αριθμός των CFU-GM, ο οποίος στη διάγνωση είναι πολύ χαμηλός, έχει επανέλθει στα επίπεδα των φυσιολογικών. Η χημειοθεραπεία καταστέλλει την παραγωγή ώριμων ουδετεροφίλων με δόσοεξαρτώμενο τρόπο (96), αλλά τα προγονικά κύτταρα είναι ικανά σε αριθμό και δεν επηρεάζεται η

επαναπολλαπλασιαστική τους ικανότητα. Η διαφοροποίηση των καλόηθων ουδετεροπενιών από τις δευτεροπαθείς συνίσταται στην παρατηρούμενη αντισταθμιστική αύξηση της ικανότητας του μυελού να παράγει ώριμα ουδετερόφιλα στις περιπτώσεις σοβαρής καλοήθους ουδετεροπενίας καθώς και στην πιθανή συμμετοχή παραγόντων άλλων από τον αριθμό των κυκλοφορούντων ουδετεροφίλων (ιστικών παραγόντων, τοπικών χυμικών παραγόντων) στην παρατηρούμενη αυτή αύξηση.

Τον καθοριστικό ρόλο του G-CSF στη ρύθμιση της κοκκιοποίησης τόσο σε φυσιολογικές καταστάσεις όσο και σε καταστάσεις stress κατέδειξαν σε παλιότερες μελέτες οι Hammond και συν με το μοντέλο του σκύλου που εκδήλωσε σοβαρή ουδετεροπενία μετά από χορήγηση ανθρώπινου G-CSF λόγω δημιουργίας αντι-G-CSF αντισωμάτων (311) καθώς και οι Lieschke και συν (312) σε μελέτη που χρησιμοποίησαν ποντίκια ανίκανα να παράγουν G-CSF λόγω μετάλλαξης του υπεύθυνου γονιδίου, τα οποία ανέπτυξαν χρόνια ουδετεροπενία, είχαν μειωμένο αριθμό πρόδρομων κυττάρων της κοκκιοκυτταρικής σειράς στο μυελό και μειωμένη ικανότητα απάντησης στη λοίμωξη.

Η ρύθμιση της παραγωγής G-CSF in vivo και ιδιαίτερα ο ρόλος του G-CSF στη διατήρηση της φυσιολογικής αιμοποίησης δεν είναι πλήρως διευκρινισμένος. Τα επίπεδα του G-CSF στον ορό φυσιολογικών ατόμων και σε ασθενείς με διάφορες παθήσεις στις οποίες διαταράσσεται η κοκκιοποίηση έχουν προσδιοριστεί με βιολογικές και ανοσολογικές μεθόδους (25). Τα επίπεδα του G-CSF σε υγιείς ενήλικες και παιδιά έχουν αναφερθεί πολύ χαμηλά, συνήθως στα κατώτερα ή και κάτω από αυτά μετρήσιμα επίπεδα με τις ανοσοενζυματικές μεθόδους (45, 46, 313, 314, 315, 316, 317). Τα επίπεδα του G-CSF αναφέρονται αυξημένα στη γέννηση και στην πρώτη νεογνική περίοδο σε σχέση με τα μετέπειτα στάδια της βρεφικής, της παιδικής ηλικίας και την ενήλικη ζωή, εξαιτίας παραγωγής G-CSF από τον εμβρυικό πλακούντα ή διαπλακουντικής μεταφοράς από τη μητρική κυκλοφορία. Ελαττώνονται την 7^η ημέρα της ζωής και τείνουν να σταθεροποιηθούν στα επίπεδα των ενηλίκων μετά την 4^η εβδομάδα της ζωής (316, 318). Αλλά, η μειωμένη παραγωγή G-CSF μετά από ενεργοποίηση από τα μονοκύτταρα πρόωρων νεογνών σε in vitro μελέτες (46, 319), τα χαμηλά επίπεδα του παράγοντα στον ορό προώρων νεογνών (320) και η ελαττωμένη έκφραση υποδοχέων σε νεογνά σε σχέση με την αντίστοιχη έκφραση σε

ενήλικες και ιδιαίτερα κατά τη διάρκεια λοίμωξης (321) μπορεί εν μέρει να εξηγούν την μειωμένη απάντηση των νεογνών και ιδιαίτερα των προώρων στη λοίμωξη (46).

Δεν παρατηρούνται στατιστικές σημαντικές διαφορές στις τιμές των επιπέδων του G-CSF στις μετέπειτα ηλικίες αν και το εύρος των τιμών μπορεί να είναι πολύ μεγάλο για ένα δεδομένο πληθυσμό υγιών ατόμων (322).

Η μόνη μελέτη στην οποία βρέθηκε ισχυρή θετική συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων G-CSF στον ορό και του αριθμού των λευκοκυττάρων και των ουδετεροφίλων του περιφερικού αίματος ήταν αυτή των Ishiguro και συν (316). Ο πληθυσμός που μελέτησαν αποτελούνταν από 168 υγιή παιδιά ηλικίας 0-15 χρόνων και η μέθοδος για τον προσδιορισμό των επιπέδων G-CSF ήταν διαφορετική από αυτή που χρησιμοποιήθηκε στις περισσότερες από τις άλλες μελέτες. Τέτοια συσχέτιση δεν βρέθηκε σε καμία άλλη σχετική μελέτη που να αφορά υγιή πληθυσμό, οποιασδήποτε ηλικίας (45, 322, 323).

Αυξημένα επίπεδα G-CSF στον ορό έχουν αναφερθεί στη σοβαρή συγγενή ουδετεροπενία (206), στην απλαστική αναιμία (313) και σε ενήλικες και παιδιά με ουδετεροπενία μετά από αυτόλογη ή αλλογενή μεταμόσχευση μυελού των οστών (313, 314) ή αυτόλογη μεταμόσχευση αιμοποιητικών κυττάρων (324). Σε ασθενείς που λαμβάνουν χημειοθεραπεία δεν διαταράσσεται η ικανότητα παραγωγής G-CSF (313, 325). Αυξημένα επίπεδα G-CSF έχουν βρεθεί και σε ασθενείς με ουδετεροπενία μετά από χημειοθεραπεία, όπου η αύξηση των επιπέδων G-CSF στον ορό συμπίπτει με την πτώση του αριθμού των ουδετερόφιλων στο περιφερικό αίμα (313).

Η συνύπαρξη με λοίμωξη αυξάνει τα επίπεδα G-CSF σε περιπτώσεις ουδετεροπενίας λόγω χημειοθεραπείας, αυτοάνοσης ουδετεροπενίας, αλλά και σε μη ουδετεροπενικές καταστάσεις, τόσο σε ενήλικες όσο και σε παιδιά και νεογνά (45, 130, 313, 318, 320, 323, 326 - 330). Η εκδήλωση λοίμωξης και επί απουσίας αιματολογικής διαταραχής, επάγει την παραγωγή G-CSF μέσω κυτταροκινών όπως IL-1β TNF-α (331, 332) ή δια της επαγωγικής δράσης προϊόντων των βακτηρίων (206, 326).

Η σχέση μεταξύ ενδογενούς παραγωγής G-CSF και αριθμού κυκλοφορούντων λευκοκυττάρων, συμπεριλαμβανομένων και των ουδετεροφίλων, δεν είναι ξεκάθαρη τόσο σε φυσιολογικές συνθήκες όσο και σε παθολογικές καταστάσεις. Στις περιπτώσεις απλαστικής αναιμίας, κυκλικής ουδετεροπενίας, τις

πρώτες μέρες μετά από μεταμόσχευση μυελού των οστών, σύμφωνα με τους Cairo και συν (314) (μελέτη σε παιδιά και ενήλικες), και στην ουδετεροπενία μετά από χημειοθεραπεία λόγω κακοήθειας και σε αθροιστική δράση με συνυπάρχουσα λοίμωξη υπάρχει ισχυρή αρνητική συσχέτιση της ενδογενούς παραγωγής G-CSF με τον αριθμό των κυκλοφορούντων ουδετεροφίλων (313). Αντίθετα τέτοια συσχέτιση δεν έχει αναφερθεί στις αυτοάνοσες ουδετεροπενίες των παιδιών στις οποίες τα επίπεδα G-CSF δεν έχουν βρεθεί αυξημένα, παρά μόνο όταν συνυπάρχει λοίμωξη (315, 333).

Η αύξηση των επιπέδων G-CSF όταν τα ουδετερόφιλα είναι χαμηλά στις περιπτώσεις που αναφέρθηκαν παραπάνω στοιχειοθετούν το ρυθμιστικό ρόλο του στη διατήρηση της ομοιόστασης της κοκκιοποίησης. Η σύγχρονη αύξηση του αριθμού των ουδετεροφίλων με τα επίπεδα του G-CSF στον ορό στις λοιμώξεις υποδεικνύει το ρόλο του G-CSF στις επείγουσες καταστάσεις που απαιτείται ενίσχυση της παραγωγής ουδετεροφίλων. Είναι πιθανό ο ρόλος του G-CSF στη διατήρηση της ομοιόστασης της κοκκιοποίησης *in vivo* να μην είναι ρυθμιστικός, αλλά συνεργικός με άλλες κυτταροκίνες (GM-CSF, IL-6, SCF) που εκκρίνονται τοπικά στο περιβάλλον του μυελού και δε μπορούν να προσδιοριστούν με τις υπάρχουσες μεθόδους λόγω των χαμηλών συγκεντρώσεών τους. Ο ρόλος του G-CSF γίνεται καθοριστικός στις καταστάσεις που χρειάζεται επείγουσα παραγωγή ουδετεροφίλων, όπως για την αντιμετώπιση λοιμώξεων όπου παρατηρείται και μεγάλη αύξηση των επιπέδων του στον ορό.

Στην παρούσα μελέτη παρατηρήθηκε μεγάλη διακύμανση των επιπέδων του G-CSF στον ορό των ασθενών με καλοήγη ουδετεροπενία στη διάγνωση. Το 50% των παιδιών που μελετήθηκαν είχαν πολύ χαμηλά επίπεδα όπως και η πλειονότητα των φυσιολογικών παιδιών. Στο 65% των ασθενών τα επίπεδα του G-CSF κυμαίνονταν στα φυσιολογικά πλαίσια ενώ στο 30% η συγκέντρωση του G-CSF στον ορό ήταν μετρίως αυξημένη συγκριτικά με τις φυσιολογικές τιμές, εύρημα ανεξάρτητο από την εκδήλωση εμφανών κλινικώς λοιμώξεων μια και κανένα από τα παιδιά της μελέτης δεν ήταν σε οξεία φάση λοίμωξης. Δεν παρατηρήθηκε στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ των μέσων τιμών των συγκεντρώσεων του G-CSF στον ορό των παιδιών με χρόνια καλοήγη ουδετεροπενία και των φυσιολογικών. Στην ομάδα των παιδιών με βαριά ουδετεροπενία η συγκέντρωση G-

CSF στον ορό βρέθηκε αυξημένη συγκρινόμενη με τη συγκέντρωση στον ορό των φυσιολογικών παιδιών. Στο σύνολο, όμως, των περιστατικών δε βρέθηκε ισχυρή συσχέτιση των επιπέδων του παράγοντα με τον αριθμό των λευκοκυττάρων ή με τον αριθμό των κυκλοφορούντων ουδετεροφίλων στο περιφερικό αίμα. Δε βρέθηκε συσχέτιση με τον αριθμό ή την επαναπολλαπλασιαστική ικανότητα των προγονικών κυττάρων στο μυελό. Η τοπική παραγωγή G-CSF στο περιβάλλον του μυελού πιθανώς δεν αντανακλάται στον προσδιορισμό των επιπέδων του στο περιφερικό αίμα. Η απουσία συσχέτισης με τον αριθμό των ουδετεροφίλων αποτελεί ένδειξη ιδιοσυστασιακής παραγωγής του G-CSF στις περιπτώσεις καλοήθους ουδετεροπενίας, και η μεγάλη διακύμανση των τιμών μπορεί να σχετίζεται με την ετερογένεια της νόσου όσον αφορά τις κλινικές εκδηλώσεις και την απάντηση στη θεραπεία.

Είναι πιθανό η συγκέντρωση του G-CSF να ρυθμίζεται μέσω κατανάλωσής του από τα πρόδρομα κύτταρα της κοκκιώδους σειράς ή από τα ώριμα ουδετερόφιλα μέσω του υποδοχέα του (334). Με βάση το εύρημα υψηλών επιπέδων G-CSF στον ορό των ασθενών με σοβαρή συγγενή ουδετεροπενία θα μπορούσε να υποτεθεί ότι τα πρόδρομα κύτταρα της κοκκιώδους σειράς μετά το προμυελοκύτταρο καταναλώνουν τον G-CSF. Η ισχυρή αρνητική συσχέτιση των επιπέδων G-CSF με τον αριθμό των ραβδοπυρήνων και των ώριμων πολυμορφοπυρήνων του μυελού και με το ποσοστό των ωριμαζόντων κυττάρων που παρατηρήθηκε σε αυτή τη μελέτη ενισχύουν αυτό το μηχανισμό ρύθμισης της παραγωγής G-CSF. Αναφέρεται επίσης ότι σε 2 από τα 3 περιστατικά στα οποία παρατηρήθηκε αναστολή ωρίμανσης στα τελευταία στάδια διαφοροποίησης των κοκκιοκυττάρων στο μυελό των οστών τα επίπεδα του G-CSF βρέθηκαν αυξημένα σε σχέση με τη διάμεση τιμή των επιπέδων σε ολόκληρη την ομάδα.

Είναι πιθανό παραπάνω από ένας μηχανισμοί να συμβάλλουν στη ρύθμιση της παραγωγής G-CSF. Η αναφερόμενη στη βιβλιογραφία αύξηση των επιπέδων G-CSF στις περιπτώσεις καλοήθους ουδετεροπενίας που συνδυάζονται με λοίμωξη (333) πιθανώς να υποδεικνύει ένα πρωταρχικό ρόλο για τον G-CSF στις “επείγουσες” καταστάσεις όπως η λοίμωξη όπου χρειάζεται αυξημένη παραγωγή ουδετεροφίλων για την ενίσχυση της άμυνας έναντι του λοιμογόνου παράγοντα. Αυτό εξηγεί και την αύξηση του αριθμού των κυκλοφορούντων ουδετεροφίλων κατά τη διάρκεια

σοβαρών βακτηριδιακών λοιμώξεων σε βρέφη με καλοήγη ουδετεροπενία. Η σύγχρονη αύξηση των επιπέδων του G-CSF με τα μονοκύτταρα του περιφερικού αίματος καθώς και η συσχέτισή του με τα επίπεδα του ICAM-1 του TNF-α και της IL-1β ενισχύουν το ρόλο του G-CSF στη λοίμωξη και υποδεικνύουν τη συμμετοχή του G-CSF στην ενεργοποίηση του αγγειακού ενδοθηλίου και τη μετανάστευση των ουδετεροφίλων προς τους ιστούς, όπου πιθανώς να υπάρχει εστία λοίμωξης η οποία επάγει την IL-1β και τον TNF-α που με τη σειρά τους διεγείρουν την παραγωγή G-CSF (335, 336).

Ο μηχανισμός ρύθμισης της παραγωγής G-CSF στην καλοήγη ουδετεροπενία των παιδιών έχει αναλογίες με το μηχανισμό ρύθμισης της παραγωγής θρομβοποιητίνης στην ιδιοπαθή θρομβοπενική πορφύρα. Και στις δυο νόσους, που είναι αυτοάνοσης αιτιολογίας, δεν φαίνεται να λειτουργεί αρνητικός μηχανισμός αναπλήρωσης (negative feedback) που να ρυθμίζει την παραγωγή του αυξητικού παράγοντα όταν μειώνονται τα ώριμα κύτταρα στο περιφερικό αίμα (337), αλλά είναι πιθανότερος ο μηχανισμός απομάκρυνσης από τα ώριμα κύτταρα του αυξητικού παράγοντα από την κυκλοφορία μέσω του υποδοχέα του.

Τα επίπεδα του G-CSF στην ύφεση της οξείας λευχαιμίας ανεξάρτητα από την εκδήλωση ουδετεροπενίας βρέθηκαν χαμηλά και δε διέφεραν στατιστικά από τα επίπεδα των φυσιολογικών, ενώ η φάση θεραπείας στην ύφεση δεν επηρέασε τη συγκέντρωση του παράγοντα στον ορό των ασθενών. Το εύρημα αυτό συμφωνεί με την υπάρχουσα βιβλιογραφία και συνηγορεί υπέρ της ικανότητας παραγωγής G-CSF σε λευχαιμικούς ασθενείς παρά τη χορήγηση χημειοθεραπείας (325).

Η συσχέτιση μεταξύ ενδογενούς G-CSF και απόλυτου αριθμού πολυμορφοκυττάρων στην ύφεση της οξείας λευχαιμίας ανεξαρτήτως ουδετεροπενίας είναι αρνητική και ισχυροποιείται όταν δεν ληφθούν υπόψιν οι πολύ χαμηλές τιμές (<500) και οι υψηλές (>2500) τιμές πολυμορφοκυττάρων στο περιφερικό αίμα. Αυτό θα μπορούσε να ερμηνευτεί ως ένδειξη του ρυθμιστικού ρόλου του G-CSF στη διατήρηση της βασικής κοκκιοποίησης αλλά όχι ως αντιστάθμισμα στην πτώση του αριθμού των ουδετεροφίλων όταν αυτό αποτελεί το μοναδικό ερέθισμα.

Η μέση τιμή της συγκέντρωσης G-CSF στον ορό στην ομάδα της δευτεροπαθούς ουδετεροπενίας δε διέφερε στατιστικώς σημαντικά από την αντίστοιχη τιμή στον ορό των παιδιών με καλοήγη ουδετεροπενία. Η διαφοροποίηση

όσον αφορά τα επίπεδα του G-CSF στην ομάδα της καλοήθους ουδετεροπενίας συνίσταται στη μεγάλη διακύμανση των συγκεντρώσεων του παράγοντα στον ορό, κάτι που δεν παρατηρείται στις δευτεροπαθείς ουδετεροπενίες.

Υψηλές τιμές G-CSF έχουν αναφερθεί στη βιβλιογραφία στον ορό ασθενών με ουδετεροπενία μετά από χημειοθεραπεία και συνυπάρχουσα λοίμωξη (313, 325, 326, 327). Στην παρούσα μελέτη τα υψηλότερα επίπεδα G-CSF παρατηρήθηκαν σε ένα παιδί το οποίο 20 μέρες πριν από τη μέτρηση ελάμβανε αντιμικροβιακή θεραπεία λόγω μικροβιαμίας από *Klebsiella pneumoniae* αλλά τη στιγμή της μελέτης δεν είχε κλινικά σημεία λοίμωξης και παρουσίαζε μέτρια αύξηση της ταχύτητας καθίζησης των ερυθρών. Κανένα από τα υπόλοιπα παιδιά με δευτεροπαθή ουδετεροπενία της μελέτης αυτής δεν είχε κλινικά ή εργαστηριακά σημεία λοίμωξης κατά τη μέτρηση των επιπέδων του G-CSF για αυτό και τα αποτελέσματα της μελέτης αυτής δεν μπορούν να συγκριθούν με τα αποτελέσματα παρόμοιων μελετών στη βιβλιογραφία.

Σαφής συσχέτιση μεταξύ του G-CSF και του απόλυτου αριθμού πολυμορφοκυττάρων δεν αναφέρεται στη βιβλιογραφία. Οι Watari και συν (313) αναφέρουν αύξηση των επιπέδων του G-CSF σε δύο περιπτώσεις ουδετεροπενίας μετά από χημειοθεραπεία για οξεία μυελογενή λευχαιμία και μετά από μεταμόσχευση μυελού των οστών που προηγήθηκε της ανάκαμψης των ουδετεροφίλων. Στην παρούσα εργασία δε βρέθηκε ισχυρή αρνητική συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων G-CSF και του αριθμού των κυκλοφορούντων ουδετεροφίλων. Με βάση αυτό το εύρημα και μελέτη που αναφέρεται στη συνεργική δράση του βαθμού της ουδετεροπενίας και της σοβαρότητας της λοίμωξης στην ενδογενή παραγωγή G-CSF σε παιδιά με δευτεροπαθή ουδετεροπενία μετά από χημειοθεραπεία (327) φαίνεται ότι στις δευτεροπαθείς ουδετεροπενίες η λοίμωξη αποτελεί πιο ισχυρό ερέθισμα από την πτώση του αριθμού των ουδετεροφίλων για την παραγωγή G-CSF.

Οι μηχανισμοί που ρυθμίζουν το ρόλο του G-CSF στη λοίμωξη σε καλοήθεις και δευτεροπαθείς ουδετεροπενίες φαίνεται να είναι διαφορετικοί. Μια ένδειξη για αυτό αποτελεί η απουσία συσχέτισης μεταξύ των επιπέδων του G-CSF με τη συγκέντρωση διαλυτού ICAM-1 στον ορό των ασθενών με δευτεροπαθή ουδετεροπενία σε αντίθεση με την ισχυρή θετική συσχέτιση μεταξύ των δύο παραμέτρων στην καλοήθη ουδετεροπενία. Το εύρημα αυτό υποδεικνύει τη συμμετοχή του G-CSF στην ενεργοποίηση του ενδοθηλίου των αγγείων. Ο G-CSF

συμβάλλει στην άμυνα έναντι των λοιμογόνων παραγόντων και ενδεχομένως επάγει τη διαδικασία της φλεγμονής (60). Είναι δε ενδιαφέρον ότι τα ουδετερόφιλα που παράγονται υπό την επίδραση του G-CSF έχουν παρόμοια μορφολογικά χαρακτηριστικά με τα κύτταρα που παράγονται όταν υπάρχει φυσική λοίμωξη, δηλαδή τοξική κοκκίωση, έκφραση του CD64, υψηλή συγγένεια σύνδεσης με την ανοσοσφαιρίνη G και το CD14 (60).

Για να μελετηθεί περαιτέρω η συμβολή του G-CSF στη διαδικασία της φλεγμονής και ο ρυθμιστικός του ρόλος στην καλοήγη ουδετεροπενία και μια και υπάρχουν ενδείξεις αύξησης της παραγωγής των ουδετεροφίλων στις βαριές καλοήθεις ουδετεροπενίες που πιθανότατα χρησιμοποιούνται στους ιστούς εξετάστηκε η συσχέτιση των επιπέδων του G-CSF με την ενεργοποίηση του αγγειακού ενδοθηλίου όπως αυτή αντανακλάται στις συγκεντρώσεις των διαλυτών ICAM-1 και E-σελεκτίνης στον ορό και των κυτταροκινών που επάγουν την έκφραση των παραπάνω μορίων στην επιφάνεια των ενδοθηλιακών κυττάρων.

Τα μόρια προσκόλλησης ICAM-1 και E-σελεκτίνη έχουν κύριο ρόλο σε ανοσολογικές και φλεγμονώδους τύπου αντιδράσεις και συμμετέχουν στη μετακίνηση των ουδετεροφίλων στις θέσεις φλεγμονής (134, 338, 339, 340-342). Εξαιτίας της ανοσολογικής φύσης της καλοήθους ουδετεροπενίας και των ενδείξεων συμμετοχής του ενεργοποιημένου ενδοθηλίου στην παθογένειά της μελετήθηκε η συγκέντρωση στον ορό των ασθενών των διαλυτών μορφών των μορίων προσκόλλησης ICAM-1 και E-σελεκτίνης που προέρχονται από πρωτεολυτική διάσπαση των μορίων της επιφάνειας των ενδοθηλιακών κυττάρων και των κυτταροκινών που επάγουν την έκφρασή τους στην επιφάνεια των τελευταίων, TNF-α και IL-1β.

Δεν υπάρχει άλλη μελέτη στη βιβλιογραφία που να προσδιορίζει τα επίπεδα των μορίων αυτών στην καλοήγη ουδετεροπενία των παιδιών και να τα συσχετίζει με την παθογένειά της. Αναφέρονται αυξημένα επίπεδα E-σελεκτίνης, ICAM-1 και VCAM-1 στον ορό ασθενών με χρόνια ιδιοπαθή ουδετεροπενία του ενήλικα που συσχετίζονται με το βαθμό της ουδετεροπενίας. Σύμφωνα με τους ερευνητές (190) στο ενεργοποιημένο ενδοθήλιο των αγγείων των ασθενών τα κυκλοφορούντα ουδετερόφιλα προσκολλώνται αλληλεπιδρώντας με δομές της επιφάνειας των ενδοθηλιακών κυττάρων και υπό την επίδραση χημειοτακτικών παραγόντων μεταναστεύουν στους ιστούς, στις θέσεις της φλεγμονής.

Τα επίπεδα της E-σελεκτίνης και του ICAM-1 στον ορό των παιδιών με καλοήγη ουδετεροπενία παρουσίασαν ευρεία διακύμανση τιμών. Η μέση τιμή της συγκέντρωσης της E-σελεκτίνης στο σύνολο των περιστατικών δε διέφερε από την αντίστοιχη των φυσιολογικών παιδιών, όπως και η μέση τιμή των επιπέδων του ICAM-1, η οποία ήταν αυξημένη, αλλά όχι σε στατιστικώς σημαντικά επίπεδα. Η μέση τιμή των επιπέδων των δυο διαλυτών μορίων στην ομάδα της βαριάς ουδετεροπενίας παρουσίασε μεγάλη αύξηση σε σύγκριση τόσο με τα φυσιολογικά επίπεδα όσο και με τα επίπεδα στην ομάδα της ήπιας ουδετεροπενίας, ιδιαίτερα για το διαλυτό ICAM-1. Τα επίπεδα του ICAM-1 και της E-σελεκτίνης στον ορό των παιδιών με καλοήγη ουδετεροπενία σχετίζονταν θετικά μεταξύ τους και ισχυρώς αρνητικά με τον απόλυτο αριθμό πολυμορφοκυττάρων, δηλαδή με το βαθμό της ουδετεροπενίας.

Αντίστοιχα ευρήματα δεν παρατηρήθηκαν στις δευτεροπαθείς ουδετεροπενίες. Η εκδήλωση ουδετεροπενίας λόγω χημειοθεραπείας σε παιδιά με οξεία λευχαιμία σε ύφεση δεν επηρέασε τις τιμές των επιπέδων των διαλυτών ICAM-1 και E-σελεκτίνης στον ορό, τα οποία βρέθηκαν σημαντικά ελαττωμένα σε σύγκριση με τα επίπεδα στον ορό των ασθενών με καλοήγη ουδετεροπενία. Η φάση θεραπείας στην ύφεση και η βαρύτητα της ουδετεροπενίας δεν επηρέασαν τις τιμές των επιπέδων των δύο μορίων στον ορό των ασθενών.

Η αύξηση των επιπέδων του διαλυτού ICAM-1 και της E-σελεκτίνης που υποδηλώνουν ενεργοποίηση του ενδοθηλίου των αγγείων και αυξημένη μετανάστευση των ουδετεροφίλων προς τους ιστούς στις περιπτώσεις βαριάς ουδετεροπενίας συνδυάζεται με την αυξημένη παραγωγή ουδετεροφίλων από το μυελό των οστών στις περιπτώσεις αυτές. Η συμμετοχή των παραγόμενων ουδετεροφίλων στους ιστούς, πιθανά σε θέσεις φλεγμονής ενισχύεται από τη συσχέτιση των επιπέδων του ICAM-1 που κυρίως εμπλέκεται στη μετανάστευση των ουδετεροφίλων με τα επίπεδα του G-CSF ο οποίος αυξάνεται στις λοιμώξεις και θεωρείται παράγοντας οξείας φάσης (332).

Υπέρ της ενεργοποίησης του αγγειακού ενδοθηλίου και της ύπαρξης υποκλινικής λανθάνουσας φλεγμονής συνηγορούν και τα αυξημένα επίπεδα των προφλεγμονωδών κυτταροκινών TNF- α και IL-1 β στο ορό των παιδιών με καλοήγη ουδετεροπενία τα οποία σχετίζονται με το βαθμό της ουδετεροπενίας όπως δείχνει η

ισχυρή αρνητική συσχέτισή τους με τον αριθμό των κυκλοφορούντων ουδετεροφίλων στο αίμα. Ο TNF-α και η IL-1β επάγουν την έκφραση των μορίων προσκόλλησης ICAM-1 και E-σελεκτίνης στην επιφάνεια των ενδοθηλιακών κυττάρων (339) αλλά και την παραγωγή G-CSF (60). Τα επίπεδα του TNF-α σχετίζονται θετικά με τα επίπεδα του ICAM-1 και του G-CSF και της IL-1β με τα επίπεδα της E-σελεκτίνης και του G-CSF στο ορό των παιδιών με καλοήγη ουδετεροπενία.

Στην ομάδα της δευτεροπαθούς ουδετεροπενίας λόγω χημειοθεραπείας τα επίπεδα των δυο κυτταροκινών ήταν χαμηλότερα από αυτά των παιδιών με καλοήγη ουδετεροπενία και δε σχετίζονταν με το βαθμό της ουδετεροπενίας.

Όλα τα παραπάνω αποτελούν ισχυρές ενδείξεις της συμμετοχής του ενεργοποιημένου ενδοθηλίου των αγγείων στην καλοήγη ουδετεροπενία και της ύπαρξης υποκλινικής, λανθάνουσας φλεγμονής που κινητοποιεί τα ουδετερόφιλα προς τους ιστούς στις θέσεις της φλεγμονής, ιδιαίτερα στις περιπτώσεις της βαριάς ουδετεροπενίας, εύρημα που την διαφοροποιεί από τη δευτεροπαθή ουδετεροπενία λόγω χημειοθεραπείας.

VIII. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Τα κυριότερα συμπεράσματα της μελέτης είναι τα ακόλουθα:

1. Στη χρόνια καλοήγη ουδετεροπενία των παιδιών η διαταραχή αφορά τα ώριμα πολυμορφοπύρηνια και δεν επηρεάζει ποσοτικά τα προγονικά κύτταρα της κοκκιδούς σειράς τα οποία παρουσιάζουν αυξημένη επαναπολλαπλασιαστική ικανότητα στις περιπτώσεις σοβαρής ουδετεροπενίας. Η αντισταθμιστική αύξηση της ικανότητας του μυελού να παράγει ώριμα ουδετερόφιλα στις σοβαρές καλοήθεις ουδετεροπενίες τις διαφοροποιεί από τις δευτεροπαθείς ουδετεροπενίες διαφορετικής αρχής και υποδηλώνει την ύπαρξη ουδετεροφίλων τα οποία δεν κυκλοφορούν στο αίμα αλλά πιθανότατα κατευθύνονται προς τους ιστούς.

2. Τα επίπεδα του TNF-α και της IL-1β που επάγουν την ενεργοποίηση του ενδοθηλίου και την έκφραση των μορίων προσκόλλησης ICAM-1 και E-σελεκτίνης στην επιφάνειά του είναι αυξημένα στον ορό των ασθενών συγκρινόμενα με τα φυσιολογικά και σχετίζονται θετικά με το βαθμό της ουδετεροπενίας, με τα επίπεδα των ICAM-1 και E-σελεκτίνης και με τη συγκέντρωση του G-CSF στον ορό των ασθενών.

3. Η αύξηση των επιπέδων των μορίων προσκόλλησης ICAM-1 και E-σελεκτίνης στον ορό σχετίζεται με το βαθμό της ουδετεροπενίας. Η ενεργοποίηση του αγγειακού ενδοθηλίου σχετίζεται με το βαθμό της ουδετεροπενίας, εύρημα που διαφοροποιεί την καλοήγη ουδετεροπενία από τη δευτεροπαθή ουδετεροπενία λόγω χημειοθεραπείας.

4. Τα επίπεδα του G-CSF παρουσιάζουν μεγάλο εύρος διακύμανσης αλλά στην πλειοψηφία των περιπτώσεων κυμαίνονται εντός των φυσιολογικών ορίων και δε ρυθμίζονται ανάλογα με τον αριθμό των κυκλοφορούντων ουδετεροφίλων. Η ευρεία διακύμανση των επιπέδων G-CSF αποτελεί ένδειξη ιδιοσυστασιακής παραγωγής και αντανακλά ενδεχομένως την ετερογένεια των κλινικών εκδηλώσεων και της πορείας της νόσου ανάμεσα στους ασθενείς.

5. Η συγκέντρωσή του G-CSF στον ορό σχετίζεται με την ενεργοποίηση του ενδοθηλίου. Ο παράγοντας αυτός φαίνεται να συμμετέχει στην ενεργοποίηση του ενδοθηλίου και να παράγεται ως απάντηση στο ερέθισμα μιας υποκλινικής φλεγμονής.

6. Η ετερογένεια των εκδηλώσεων και της πορείας της νόσου εκτός από την ευρεία διακύμανση του ενδογενούς G-CSF αντανακλάται και στη διακύμανση των επιπέδων των μορίων προσκόλλησης στον ορό και επομένως στη συμμετοχή του ενεργοποιημένου αγγειακού ενδοθηλίου στις εκδηλώσεις της νόσου.

7. Παρατηρείται διαφοροποίηση όσον αφορά στη συμπεριφορά (απαντητική ικανότητα) του μυελού των οστών και στα επίπεδα των κυτταροκινών και των μορίων προσκόλλησης στις σοβαρές ουδετεροπενίες. Η αύξηση της επαναπολλαπλασιαστικής ικανότητας των προγονικών κυττάρων της κοκκιώδους σειράς πιθανώς εξηγεί την ελαττωμένη συχνότητα σοβαρών λοιμώξεων για το βαθμό της ουδετεροπενίας και διαφοροποιεί την καλοήγη ουδετεροπενία από τη δευτεροπαθή ουδετεροπενία ανάλογου βαθμού.

Με βάση όλα τα παραπάνω τίθεται η υποψία συνυπάρχουσας λανθάνουσας, υποκλινικής φλεγμονής που κινητοποιεί τα ουδετερόφιλα προς τους ιστούς ιδιαίτερα στις περιπτώσεις σοβαρής ουδετεροπενίας.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η χρόνια καλοήθης ουδετεροπενία της βρεφικής και παιδικής ηλικίας αποτελεί την πιο συχνή μορφή ουδετεροπενίας των παιδιών. Θεωρείται πρωτοπαθής διαταραχή αυτοάνοσης αιτιολογίας αλλά το αίτιο που πυροδοτεί τον ανοσολογικό μηχανισμό παραμένει αδιευκρίνιστο.

Σκοπός της μελέτης ήταν η ποσοτική και ποιοτική αξιολόγηση των προγονικών κυττάρων της κοκκιώδους σειράς για να διερευνηθεί πως αντιδρά ο μυελός των οστών στην κυτταροπενία και ο προσδιορισμός του ρόλου του ενδογενούς αυξητικού παράγοντα των κοκκιοκυττάρων (G-CSF) και των μορίων προσκόλλησης ICAM-1 και E-σελεκτίνης στην παθογένεια της χρόνιας καλοήθους ουδετεροπενίας των παιδιών και στη διαφοροποίησή της από δευτεροπαθείς ουδετεροπενίες διαφορετικής αρχής. Ο G-CSF επάγει τον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση των προγονικών κυττάρων και προάγει τη λειτουργικότητα και την επιβίωση των ώριμων ουδετερόφιλων, ενώ τα μόρια προσκόλλησης ICAM-1 και E-σελεκτίνη εκφράζονται στην επιφάνεια των ενδοθηλιακών κυττάρων μετά από ενεργοποίηση με IL-1β και TNF-α διευκολύνοντας τη διολίσθηση, την προσκόλληση, την εξαγγείωση και τη μετανάστευση των ουδετεροφίλων στους ιστούς σε θέσεις φλεγμονής.

Μελετήθηκαν 35 παιδιά με πρωτοπαθή καλοήθη ουδετεροπενία στη διάγνωση. Για τη μελέτη της δευτεροπαθούς ουδετεροπενίας χρησιμοποιήθηκαν 25 παιδιά με οξεία λευχαιμία (23 ΟΛΛ, 2 ΟΜΛ) σε ύφεση, 16 από τα οποία είχαν εκδηλώσει ουδετεροπενία λόγω μυελοτοξικής δράσης της χημειοθεραπείας. Την ομάδα ελέγχου αποτέλεσαν 30 παιδιά αντίστοιχης ηλικίας χωρίς κακόηθες νόσημα ή ουδετεροπενία ή εστία λοίμωξης στα οποία το μυελόγραμμα έγινε στα πλαίσια διερεύνησης της νόσου τους.

Έγιναν καλλιέργειες μονοπύρηνων κυττάρων του μυελού των οστών σε μεθυλοκυτταρίνη για την εκτίμηση του παραγόμενου αριθμού αποικιών προγονικών αιμοποιητικών κυττάρων της κοκκιώδους και της ερυθράς σειράς (CFU-GM και

BFU-E αντίστοιχα). Για την εκτίμηση της επαναπολλαπλασιαστικής ικανότητας των CFU-GM που σχετίζεται με την ικανότητα του μυελού να παράγει ώριμα ουδετερόφιλα έγιναν ανακαλλιέργειες CFU-GM την έβδομη μέρα της καλλιέργειας και υπολογισμός του αριθμού και της κατανομής των δευτερογενών αποικιών. Για τον ποσοτικό προσδιορισμό των επιπέδων στον ορό του G-CSF, των διαλυτών μορίων προσκόλλησης ICAM-1 και E-σελεκτίνης και των κυτταροκινών που επάγουν την έκφρασή τους στην επιφάνεια των ενδοθηλιακών κυττάρων TNF-α και IL-1β χρησιμοποιήθηκε η ανοσοενζυμική τεχνική ELISA.

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι στη χρόνια καλοήγη ουδετεροπενία είναι φυσιολογικός ο αριθμός ($p=0.29$) και η επαναπολλαπλασιαστική ικανότητα των CFU-GM στο σύνολο των περιπτώσεων ($p=0.12$). Η τελευταία αυξάνεται στατιστικώς σημαντικά στις περιπτώσεις σοβαρής ουδετεροπενίας με $AAPI < 500$ ($p=0.03$). Στο σύνολο των περιπτώσεων δεν διαπιστώθηκε συσχέτιση της επαναπολλαπλασιαστικής ικανότητας των CFU-GM με τον απόλυτο αριθμό πολυμορφοκυττάρων ($r = -0.45$, $p = 0.26$), με τα επίπεδα του G-CSF στον ορό ($r=0.24$, $p=0.5$) ή με την ηλικία διάγνωσης της νόσου ($r = -0.2$, $p=0.5$). Στις δευτεροπαθείς ουδετεροπενίες μετά από χημειοθεραπεία η επαναπολλαπλασιαστική ικανότητα των CFU-GM παραμένει φυσιολογική ($p=0.2$), αλλά σχετίζεται αρνητικά με τον αριθμό των κυκλοφορούντων ουδετεροφίλων ($r = -0.64$, $p=0.02$).

Τα επίπεδα του ICAM-1 και της E-σελεκτίνης σχετίζονται θετικά μεταξύ τους ($r=0.55$, $p=0.015$) και ισχυρώς αρνητικά με τον απόλυτο αριθμό πολυμορφοκυττάρων ($r= -0.64$, $p=0.003$, $r= -0.5$, $p= 0.04$ για το ICAM-1 και την E-σελεκτίνη αντίστοιχα). Στην ομάδα της οξείας λευχαιμίας σε ύφεση η εκδήλωση ουδετεροπενίας δεν επηρέασε τις τιμές των επιπέδων των εν λόγω μορίων στον ορό των ασθενών ($p=0.14$, $p=0.3$ αντίστοιχα για την E-σελεκτίνη και το ICAM-1). Τα επίπεδα των δύο μορίων προσκόλλησης στην ομάδα της δευτεροπαθούς ουδετεροπενίας είναι σημαντικά χαμηλότερα σε σύγκριση με τα επίπεδα στον ορό των ασθενών με χρόνια καλοήγη ουδετεροπενία ($p < 0.001$ και για τα δύο μόρια) και δε σχετίζονται με τον απόλυτο αριθμό πολυμορφοκυττάρων.

Τα επίπεδα του TNF-α και της IL-1β στον ορό των ασθενών με χρόνια καλοήγη ουδετεροπενία είναι αυξημένα συγκριτικά με τα επίπεδα των φυσιολογικών ($p=0.01$, $p=0.04$ αντίστοιχα) και των δευτεροπαθών ουδετεροπενιών ($p < 0.001$, $p=0.5$

αντίστοιχα) και σχετίζονται ισχυρώς αρνητικά με τον αριθμό των κυκλοφορούντων ουδετεροφίλων ($r = -0.58$, $p=0.01$ για τον TNF- α και $r = -0.62$, $p=0.04$ για την IL-1 β). Τα επίπεδα του TNF- α σχετίζονται θετικά με τα επίπεδα του ICAM-1 και του G-CSF στον ορό ($r= 0.67$, $p<0.01$ και $r=0.65$, $p=0.01$ αντίστοιχα). Τα επίπεδα της IL-1 β σχετίζονται θετικά με τα επίπεδα της E-σελεκτίνης και του G-CSF στον ορό ($r= 0.67$, $p=0.04$ και $r=0.67$, $p=0.04$ αντίστοιχα).

Τα επίπεδα του G-CSF στον ορό των παιδιών με χρόνια καλοήγη ουδετεροπενία στη διάγνωση παρουσίασαν μεγάλη διακύμανση τιμών και η πλειοψηφία αυτών κυμαίνονταν μέσα στο εύρος του φυσιολογικού. Η μέση τιμή της συγκέντρωσης G-CSF στον ορό δε διέφερε στατιστικώς σημαντικά από τα φυσιολογικά επίπεδα ($p=0.05$). Τα επίπεδα του G-CSF ήταν αυξημένα στην ομάδα της σοβαρής ουδετεροπενίας ($p=0.02$) αλλά στο σύνολο των περιστατικών δε βρέθηκε ισχυρή συσχέτιση των επιπέδων G-CSF με τον αριθμό των λευκοκυττάρων ($r= - 0.27$, $p=0.3$) ή με τον απόλυτο αριθμό πολυμορφοπυρήνων ($r= -0.2$, $p=0.4$). Τα επίπεδα του G-CSF σχετίζονται θετικά με τα επίπεδα του διαλυτού ICAM-1 στον ορό ($r= 0.53$, $p=0.01$) και με τον αριθμό των μονοκυττάρων στο περιφερικό αίμα ($r=0.56$, $p=0.03$). Η μέση τιμή της συγκέντρωσης του ενδογενούς G-CSF στην ύφεση της οξείας λευχαιμίας ανεξαρτήτως ουδετεροπενίας ήταν χαμηλή και δεν διέφερε από την αντίστοιχη τιμή των φυσιολογικών ($p=0.26$).

Συμπερασματικά, στη χρόνια καλοήγη ουδετεροπενία των παιδιών η διαταραχή αφορά τα ώριμα πολυμορφοπύρηνα και δεν επηρεάζει ποσοτικά τα προγονικά κύτταρα της κοκκιώδους σειράς τα οποία παρουσιάζουν αυξημένη επαναπολλαπλασιαστική ικανότητα στις περιπτώσεις σοβαρής ουδετεροπενίας.

Ο βαθμός της ουδετεροπενίας σχετίζεται θετικά με τα επίπεδα της E-σελεκτίνης και του ICAM-1 στον ορό των ασθενών. Τα επίπεδα του TNF- α και της IL-1 β που επάγουν την ενεργοποίηση του ενδοθηλίου και την έκφραση των δύο μορίων προσκόλλησης στην επιφάνειά του και την παραγωγή G-CSF είναι αυξημένα στον ορό των ασθενών συγκρινόμενα με τα φυσιολογικά και σχετίζονται θετικά με το βαθμό της ουδετεροπενίας.

Τα επίπεδα του G-CSF παρουσιάζουν μεγάλο εύρος κατανομής αλλά στην πλειοψηφία των περιπτώσεων κυμαίνονται εντός των φυσιολογικών ορίων και δε ρυθμίζονται ανάλογα με τον αριθμό των κυκλοφορούντων ουδετεροφίλων. Η

συγκέντρωσή του G-CSF στον ορό σχετίζεται με την ενεργοποίηση του ενδοθηλίου. Οι ενδείξεις συμμετοχής του ενεργοποιημένου ενδοθηλίου στην εκδήλωση σοβαρής καλοήθους ουδετεροπενίας θέτουν την υποψία συνυπάρχουσας, λανθάνουσας υποκλινικής φλεγμονής.

**Study of hemopoiesis in neonates, infants and children. Evaluation of the
role and action of cytokines**

The case of chronic benign neutropenia of infancy and childhood

Chryssoula Perdikogianni, MD

Thesis

SUMMARY

Chronic benign neutropenia of infancy and childhood is a primary disorder of autoimmune origin considered to be the most common form of neutropenia in this age group. The cause of the immune mechanism as well as the potential regulatory role of G-CSF have not been elucidated.

The aim of this study was to investigate the response of the bone marrow to peripheral cytopenia and to evaluate the role of G-CSF and the adhesion molecules ICAM-1 and E-selectin as markers of endothelial cell activation in the pathogenesis of chronic benign neutropenia and in the differentiation from secondary neutropenias of different origin. G-CSF regulates proliferation and differentiation of hemopoietic progenitor cells and enhances the functional integrity and survival of mature neutrophils. The adhesion molecules ICAM-1 and E-selectin are expressed on the vascular endothelial cells upon activation with IL-1 β and TNF- α and enable rolling, firm adhesion, extravasation and migration of neutrophils into the tissues in sites of inflammation.

Thirty-five children with primary benign neutropenia at diagnosis and 30 children of similar age with normal neutrophil count and without malignancy or infection used as controls were studied. The group of secondary neutropenia consisted of 25 children with acute leukemia in remission, 16 of which had developed neutropenia as a result of chemotherapy. The methods used included hemopoietic progenitor cells' colony growth, replating of CFU-GM of the seventh day of the culture and ELISA for the detection of serum levels of G-CSF, ICAM-1, E-selectin, TNF- α and IL-1 β . The replating capacity of CFU-GM is related to the ability of bone

marrow to generate mature neutrophils and is estimated by the number and the distribution of secondary CFU-GM colonies.

The results showed that in chronic benign neutropenia both the number ($p=0.29$) and the replating capacity of CFU-GM ($p=0.12$) were normal when all the cases were taken into account. The latter increased significantly in cases of severe neutropenias related to both normals ($p=0.03$) and the mild neutropenias ($p=0.009$). For the total of cases, replating capacity of CFU-GM did not correlate with the absolute neutrophil count ($r = - 0.45$, $p = 0.26$), serum levels of G-CSF ($r=0.24$, $p=0.5$) or the age at the onset of disease ($r = - 0.2$, $p=0.5$). In secondary chemotherapy-associated neutropenia, the replating capacity of CFU-GM did not increase ($p=0.2$) and inversely correlated with the number of circulating neutrophils ($r = - 0.64$, $p=0.02$).

In chronic benign neutropenia serum ICAM-1 and E-selectin levels positively correlated with each other ($r=0.55$, $p=0.015$) and inversely with the absolute neutrophil count ($r= -0.64$, $p=0.003$, $r= -0.5$, $p= 0.04$ for ICAM-1 and E-selectin respectively). In the group of acute leukemia in remission the onset of neutropenia did not influence serum ICAM-1 or E-selectin levels ($p=0.3$, $p=0.14$ respectively). In the group of secondary neutropenia serum ICAM-1 and E-selectin levels were significantly lower than the respective levels in the group of benign neutropenias ($p<0.001$ for both the adhesion molecules studied) and did not correlate with the number of neutrophils in the peripheral blood.

Serum TNF- α and IL-1 β levels in benign neutropenias were found increased as compared with normal levels ($p=0.01$, $p=0.04$ respectively) and the corresponding values in secondary neutropenias ($p<0.001$, $p=0.5$ respectively) and inversely correlated with the number of circulating neutrophils ($r = -0.58$, $p=0.01$ for TNF- α and $r = -0.62$, $p=0.04$ for IL-1 β). Serum TNF- α levels positively correlated with ICAM-1 ($r= 0.67$, $p<0.01$) and G-CSF levels ($r=0.65$, $p=0.01$). Serum IL-1 β levels positively correlated with E-selectin ($r=0.67$, $p=0.04$) and G-CSF levels ($r=0.67$, $p=0.04$).

Endogenous serum G-CSF levels in children with benign neutropenia at diagnosis were widely distributed and the majority of them were within normal range. In mean values they did not differ from normal levels in a statistically significant

manner ($p=0.05$). In cases of severe neutropenia serum G-CSF levels significantly increased ($p=0.02$) but in the total of cases they did not correlate with the number of white blood cells ($r= - 0.27$, $p=0.3$) or that of neutrophils in the peripheral blood ($r= - 0.2$, $p=0.4$). Serum ICAM-1 levels ($r= 0.53$, $p=0.01$) and the number of peripheral monocytes ($r=0.56$, $p=0.03$) positively correlated with G-CSF levels. The mean serum G-CSF level in the group of patients with acute leukemia in remission irrespectively of neutropenia was low and did not differ from the corresponding normal mean level ($p=0.26$).

In conclusion, in chronic benign neutropenia of childhood hematopoietic progenitor cells of granulocytic origin are normal in number and show increased self-proliferative capacity in the severe cases, related to their ability to generate mature neutrophils.

The degree of neutropenia correlates with serum ICAM-1 and E-selectin levels markers indicative of an activated endothelium. Serum TNF- α and IL-1 β levels that induce the activation of endothelial cells and G-CSF production are increased compared with normal levels and positively correlate with the degree of neutropenia.

Serum G-CSF levels show a wide distribution of values and in the majority of cases are within normal levels and are not regulated upon the number of circulating neutrophils in the peripheral blood. G-CSF seems to act as an inducer of the activation of endothelium.

The previous findings are indicative of the existence of a latent, low-grade inflammatory process in the cases of severe chronic benign neutropenia.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Glimm H, Eaves CJ. Direct evidence for multiple self-renewal divisions of human in vivo repopulating hematopoietic cells in short-term cultures. *Blood* 1999; 94(7): 2161-2168.
2. Ploemacher RE. Stem cells: characterization and measurement. *Bailleres Clin Haematol* 1997; 10(3): 429-444.
3. Metcalf D. Lineage commitment and maturation in hematopoietic cells: The case for extrinsic regulation. *Blood* 1998; 92(2): 345-348.
4. McCulloch EA. Stem cells in normal and leukemic hemopoiesis (Henry Stratton lecture, 1982). *Blood* 1983; 62(1): 1-13.
5. Enver T, Heyworth CM, Dexter TM. Do stem cells play dice? *Blood* 1998; 92(2): 348-352.
6. Gordon M. Physiology and function of the haemopoietic microenvironment (annotation). *Br J Haematol* 1994; 86: 241-243.
7. Bianco P, Riminucci M, Gronthos S, Gehron Robey P. Bone marrow stromal stem cells: Nature, biology and potential applications. *Stem Cells* 2001; 19: 180-192.
8. Chang J, Dexter TM. Long-term marrow cultures: in vitro purging of leukaemic cells. *Bailleres Clin Haematol* 1991; 4(3): 775-789.
9. Moore M. Clinical implications of positive and negative hematopoietic stem cell regulators. *Blood* 1991; 78(1): 1-19.
10. Metcalf D. Hematopoietic regulators: redundancy or subtlety? *Blood* 1993; 82(12): 3515-3523.
11. Peleraux A, Eliason JF. Proliferation of single hemopoietic progenitor cells in the absence of colony-stimulating factors and serum. *Exp Haematol* 1989; 17: 1032-1037.
12. Williams GT, Smith CA, Spooner E, Dexter M, Taylor DR. Haemopoietic

- colony stimulating factors promote cell survival by suppressing apoptosis. *Nature* 1990; 343: 76-79.
13. Janowska-Wieczorek A, Majka M, Ratajczak J, Ratajczak M. Autocrine/Paracrine mechanisms in human hematopoiesis. *Stem Cells* 2001; 19: 99-107.
 14. McNiece IK. Synergism of hematopoietic colony-stimulating factors. *Am J Pediatr Hematol/Oncol* 1992; 14: 31-38.
 15. Graham GJ. Growth inhibitors in haemopoiesis and leukaemogenesis. *Baillieres Clin Haematol* 1997; 10: 539-559.
 16. Woodcock JM, Bagley CJ, Lopez AF. Receptors of the cytokine superfamily: mechanisms of activation and involvement in disease. *Baillieres Clin Haematol* 1997; 10: 539-559.
 17. D' Andrea AD. Cytokine receptors in congenital hematopoietic disease. *N Engl J Med* 1994; 330: 839-846.
 18. Veikkola T, Alitalo K. VEGFs, receptors and angiogenesis. *Cancer Biol* 1999; 9: 211-220.
 19. Danaeus K, Nilsson K, Jonsson J-I. Distinct actions of Flt3 ligand and stem cell factor on myeloid lineage selection and maturation of granulocytes versus macrophages. *Exp Hematol* 1998; 26: 345-352.
 20. Schibler KR, Yang Y-C, Christensen RD. Effect of interleukin-11 on cycling status and clonogenic maturation of fetal and adult hematopoietic progenitors. *Blood* 1992; 80: 900-903.
 21. Groopman JE, Molina J-M, Scadden DT. Hematopoietic growth factors: biology and clinical applications. *N Engl J Med* 1989; 321: 1449-1459.
 22. Metcalf D. Control of granulocytes and macrophages: molecular, cellular and clinical aspects. *Science* 1991; 254: 529-533.
 23. Lopez AF, Dyson PG, To LB, Elliott MJ, Milton SF, Russell JA, et al. Recombinant human interleukin-3 stimulation of hematopoiesis in humans: Loss of responsiveness with differentiation in the neutrophilic myeloid series. *Blood* 1988; 72: 1797-1801.
 24. Suda T, Yamaguchi Y, Suda J, Miura Y, Okano A, Akiyama Y. Effect of interleukin-6 (IL-6) on the differentiation and proliferation of murine and

- human hemopoietic progenitors. *Exp Hematol* 1988; 16: 891-894.
25. Demetri G, Griffin J. Granulocyte Colony-Stimulating Factor and its receptor. *Blood* 1991; 78: 2791-2808.
 26. Avalos BR, Gasson JC, Hedvat C, Quan SG, Babwin GC, Weisbart RH, et al. Human granulocyte colony-stimulating factor: Biologic activities and receptor characterization on hematopoietic cells and small cell lung cancer cell lines. *Blood* 1990; 75: 851-857.
 27. Avalos B. Molecular analysis of the Granulocyte Colony-Stimulating Factor receptor. *Blood* 1996; 88: 761-777.
 28. Lieschke G, Burgess A. Granulocyte Colony-Stimulating Factor and Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor. *N Engl J Med* 1992; 327: 28-35, 99-106.
 29. Burgess A, Metcalf D. Characterization of a serum factor stimulating the differentiation of myelomonocytic leukemia cells. *Int J Cancer* 1980; 26: 647-654.
 30. Nicola NA, Metcalf D, Matsumoto M, Johnson GR. Purification of a factor inducing differentiation in murine myelomonocytic leukemia cells: Identification as granulocyte colony-stimulating factor. *J Biol Chem* 1983; 258: 9017-9023.
 31. Nicola NA, Begley CG, Metcalf D. Identification of the human analogue of a regulator that induces differentiation in murine leukaemic cells. *Nature* 1985; 314: 625-628.
 32. Welte K, Platzer E, Lu L, Gabilove J, Levi E, Mertelsmann R, Moore M. Purification and biological characterization of human pluripotent hematopoietic colony-stimulating factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985; 82: 1526-1530.
 33. Strife A, Lambek C, Wisniewski D, Gulati S, Gasson J, Golde D, et al. Activities of four purified growth factors on highly enriched human hematopoietic progenitor cells. *Blood* 1987; 69: 1508-1523.
 34. Souza LM, Boone TC, Gabilove J, Lai PH, Zsebo KM, Murdock DC, et al. Recombinant human granulocyte colony-stimulating factor: Effects on normal and leukemic myeloid cells. *Science* 1986; 232: 61-65.

35. Nomura H, Imazeki I, Oheda M, Kubota N, Tamura M, Ono M, et al. Purification and characterization of human granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF). *EMBO J* 1986; 5: 871-876.
36. Gabrilove J, Welte K, Lu L, Castro-Malaspina H, Moore M. Constitutive production of leukemia differentiation, colony-stimulating, erythroid burst-promoting and pluripotent factors by a human hepatoma cell line: Characterization of the leukemia differentiation factor. *Blood* 1985; 66: 407-415.
37. Nagata S, Tsuchiya M, Asano S, Kaziro Y, Yamazaki T, Yamamoto O, et al. Molecular cloning and expression of cDNA for human granulocyte colony-stimulating factor. *Nature* 1986; 319: 415-418.
38. Lilly MB, Delvin PE, Delvin JJ, Rado TA. Production of granulocyte colony-stimulating factor by a human melanoma cell line. *Exp Hematol* 1987; 15: 966-971.
39. Sakai N, Kubota M, Shikita M, Yokota M, Ando K. Intraclonal diversity of fibrosarcoma cells for the production of macrophage colony-stimulating factor and
40. Demetri G, Zenzie B, Rheinwald J, Griffin J. Expression of colony-stimulating factor genes by normal human mesothelial cells and human malignant mesothelioma cell lines in vitro. *Blood* 1989; 74: 940-946.
41. Lai C-F, Baumann H. Interleukin-1 β induces production of Granulocyte Colony-Stimulating Factor in human hepatoma cells. *Blood* 1996; 87: 4143-4148.
42. Nagata S, Tsuchiya M, Asano S, Yamamoto O, Hirata Y, Kubota N, et al. The chromosomal gene structure and two mRNAs for human granulocyte colony-stimulating factor. *EMBO J* 1986; 5: 575-581.
43. Okabe M, Asano M, Kuga T, Komatsu Y, Yamasaki M, Yokoo Y, et al. In vitro and in vivo hematopoietic effect of mutant human granulocyte colony-stimulating factor. *Blood* 1990; 75: 1788-1793.
44. Simmers RN, Webber LM, Shannon MF, Garson OM, Wong G, Vadas MA, et al. Localization of the G-CSF gene on chromosome 17 proximal to the breakpoint in the t(15;17) in acute promyelocytic leukemia. *Blood* 1987; 70:

- 330-332.
45. Kawakami M, Tsutsumi H, Kumakawa T, Abe H, Hirai M, Kurosawa S, et al. Levels of serum granulocyte colony-stimulating factor in patients with infections. *Blood* 1990; 76: 1962-1964.
 46. Schibler KR, Liechty KW, White WL, Christensen RD. Production of Granulocyte Colony-Stimulating Factor in vitro by monocytes from preterm and term neonates. *Blood* 1993; 82: 2478-2484.
 47. Yang Y-C, Tsai S, Wong GG, Clark SC. Interleukin-1 regulation of hematopoietic growth factor production by human stromal fibroblasts. *J Cell Physiol* 1988; 134: 292-296.
 48. Zoellner H, Filonzi EL, Stanton HR, Layton JE, Hamilton JA. Human arterial smooth muscle cells synthesize granulocyte colony-stimulating factor in response to interleukin-1 alpha and tumor necrosis factor alpha. *Blood* 1992; 80: 2805-2810.
 49. Calhoun D, Christensen R. Human developmental biology of granulocyte colony-stimulating factor. *Clin Perinatal* 2000; 27: 559-576.
 50. Koeffler HP, Gasson J, Ranyard J, Souza L, Shepard M, Munker R. Recombinant human TNF alpha stimulates production of granulocyte colony-stimulating factor. *Blood* 1987; 70:55-59.
 51. Zsebo K, Yuschenkoff V, Schiffer S, Chang D, McCall E, Dinarello C, et al. Vascular endothelial cells and granulopoiesis: Interleukin-1 stimulates release of G-CSF and GM-CSF. *Blood* 1988; 71: 99-103.
 52. Bussolino F, Wang JM, Defilippi P, Turrini F, Sanavio F, Edgell C-J S, et al. Granulocyte- and granulocyte-macrophage-colony stimulating factors induce human endothelial cells to migrate and proliferate. *Nature* 1989; 337: 471-473.
 53. Lenhoff S, Sallfors B, Olofsson T. IL-10 as an autocrine regulator of CSF secretion by monocytes: Disparate effects on GM-CSF and G-CSF secretion. *Exp Hematol* 1998; 26: 299-304.
 54. Vellenga E, Dokter W, de Wolf JTM, van de Vinne B, Eselink MT, Halle MR. Interleukin-4 prevents the induction of G-CSF mRNA in human adherent monocytes in response to endotoxin and IL-1 stimulation. *Br J Hematol* 1991;

- 79: 22-26.
55. Calhoun DA, Donnelly WH, Du Y, Dame JB, Li Y, Christensen RD. Distribution of granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) and G-CSF receptor mRNA and protein in the human fetus. *Pediatr Res* 1999; 43: 333-338
 56. McCracken S, Layton JE, Shorter S, Starkey PM, Barlow DH, Mardon HJ. Expression of granulocyte colony-stimulating factor and its receptor is regulated during the development of the human placenta. *J Endocrinol* 1996; 149: 249-258.
 57. Koeffler HP, Gasson J, Tobler A. Transcriptional and posttranscriptional modulation of myeloid colony-stimulating factor expression by tumor necrosis factor and other agents. *Mol Cell Biol* 1988; 8: 3432-3438.
 58. Ernst TJ, Ritchie AR, Demetri GD, Griffin JD. Regulation of granulocyte and monocyte-colony stimulating factor mRNA levels in human blood monocytes is mediated primarily at a posttranscriptional level. *J Biol Chem* 1989; 264: 5700-5703.
 59. Demetri G, Ernst T, Pratt E, Zenzie B, Rheinwald J, Griffin J. Expression of ras oncogenes in cultured human cells alters the transcriptional and posttranscriptional regulation of cytokine genes. *J Clin Invest* 1990; 86: 1261-1269.
 60. Dale DC, Liles WC, Summer WR, Nelson S. Review: Granulocyte Colony-Stimulating Factor- Role and relationships in infectious diseases. *J Infect Dis* 1995; 172: 1061-1075.
 61. Begley CG, Metcalf D, Nicola NA. Binding characteristics and proliferative action of purified granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) on normal and leukemic human promyelocytes. *Exp Hematol* 1988; 16: 71-79.
 62. Nicola NA, Metcalf D. Binding of ¹²⁵I-labeled granulocyte colony-stimulating factor to normal murine hemopoietic cells. *J Cell Physiol* 1985; 124: 313-321.
 63. Shimoda K, Okamura S, Harada N, Ikematsu W, Kondo S, Kawasaki C, et al. Granulocyte colony-stimulating factor receptors on human acute leukemia: Biphenotypic leukemic cells possess granulocyte colony-stimulating factor receptors. *Cancer Res* 1992; 2: 3052-3055.

64. Avalos B. The Granulocyte Colony-Stimulating Factor receptor and its role in disorders of granulopoiesis. *Leuk Lymph* 1998; 28: 265-273.
65. Inazawa J, Fukunaga R, Seto Y, Nakagawa H, Misawa, Abe T, et al. Assignment of the human granulocyte colony-stimulating factor receptor gene (CSF3R) to chromosome 1 at region p35-p34.3. *Genomics* 1991; 10: 1075-1078.
66. Dong F, vanBuitenen C, Pouwels K, Hoefsloot L, Lowenberg LH, Touw IP. Distinct cytoplasmic regions of the human granulocyte colony-stimulating factor receptor involved in induction of proliferation and maturation. *Mol Cell Biol* 1993; 13: 7774-7781.
67. Nicholson SE, Oates AC, Harper AG, Ziemiecki A, Wilks AF, Layton JE. Tyrosine kinase Jak1 is associated with the granulocyte colony-stimulating factor receptor and both become tyrosine phosphorylated after receptor activation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 2985-2988.
68. Avalos BR, Parker JM, Ware DA, Hunter MG, Druker BJ. Dissociation of the Jak kinase pathway from G-CSF receptor signaling in neutrophils. *Exp Hematol* 1997; 25: 160-168.
69. Tian S-S, Tapley P, Sincich C, Stein RB, Rosen J, Lamb P. Multiple signaling pathways induced by granulocyte colony-stimulating factor involving activation of JAKs, STAT5, and/or STAT3 are required for regulation of three distinct classes of immediate early genes. *Blood* 1996; 88: 4435-4444.
70. Tian S-S, Lamb P, Siedel HM, Stein RB, Rosen J. Rapid activation of the STAT3 transcription factor by granulocyte colony-stimulating factor. *Blood* 1994; 84: 1760-1764.
71. Bashley A, Healy L, Marshall CJ. Proliferative but not nonproliferative responses to granulocyte colony-stimulating factor are associated with rapid activation of the p21ras/MAP kinase signaling pathway. *Blood* 1994; 83: 949-957.
72. Okuda K, Ernst TJ, Griffin JD. Inhibition of p21ras activation blocks proliferation but not differentiation of interleukin-3 dependent myeloid cells. *J Biol Chem* 1994; 269: 24602-24607.
73. Corey SJ, Dombrosky PM, Zuo S, Zorich G, Romero G, Donenberg AD, et al.

- Granulocyte colony-stimulating factor receptor signaling involves the formation of a three-component complex with Lyn and Syk protein-tyrosine kinase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 4683-4687.
74. de Koning JP, Touw IP. Advances in understanding the biology and function of the G-CSF receptor. *Curr Opin Hematol* 1996; 3:180-184.
 75. Touw IP, Dong F. Severe congenital neutropenia terminating in acute myeloid leukemia: Disease progression associated with mutations in the granulocyte colony-stimulating factor receptor gene. *Leuk Res* 1996; 20: 629-631.
 76. Dong F, Hoefsloot LH, Schelen AM, Broeders LCAM, Meijer Y, Veerman AJP, et al. Identification of a nonsense mutation in the granulocyte-colony-stimulating factor receptor in severe congenital neutropenia. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 4480-4484.
 77. Dong F, Brynes RK, Tidow N, Welte K, Lowenberg B, Touw IP. Mutations in the gene for the granulocyte colony-stimulating factor receptor in patients with acute myeloid leukemia preceded by severe congenital neutropenia. *N Engl J Med* 1995; 333: 487-493.
 78. Tidow N, Pilz C, Teichmann B, Muller-Brechlin A, Germeshausen M, Kasper B, et al. Clinical relevance of point mutations in the cytoplasmic domain of the granulocyte colony-stimulating factor receptor gene in patients with severe congenital neutropenia. *Blood* 1997; 89: 2369-2375.
 79. Zeidler C, Boxer L, Dale D, Freedman M, Kinsey S, Welte K. Management of Kostmann syndrome in the G-CSF era [review]. *Br J Haematol* 2000; 109: 490-495.
 80. Dong F, Dale DC, Bonilla MA, Freedman M, Fasth A, Neijens HJ, et al. Mutations in the granulocyte colony-stimulating factor receptor gene in patients with severe congenital neutropenia. *Leukemia* 1997; 11: 120-125.
 81. Ward AC, van Aesch YM, Gits J, Schelen AM, de Koning JP, van Leeuwen D, et al. Novel point mutation in the extracellular domain of the granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) receptor in a case of severe congenital neutropenia hyporesponsive to G-CSF treatment. *J Exp Med* 1999; 190: 497-507.
 82. Spiekermann K, Roesler J, Emmendoerffer A, Elsner J, Welte K. Functional

- features of neutrophils induced by G-CSF and GM-CSF treatment: differential effects and clinical implications. *Leukemia* 1997; 11: 466-478.
83. Leavey PJ, Sellins KS, Thurman G, Elzi D, Hiester A, Silliman CC, et al. In vivo treatment with granulocyte colony-stimulating factor results in divergent effects on neutrophil functions measured in vitro. *Blood* 1998; 92: 4366-4374.
84. Metcalf D, Nicola NA. Proliferative effects of purified granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) on normal mouse hematopoietic cells. *J Cell Physiol* 1983; 116: 198-206.
85. Ogawa M. Differentiation and proliferation of hematopoietic stem cells. *Blood* 1993; 81: 2844-2853.
86. Sutherland HJ, Eaves CJ, Lansdorp PM, Thacker JD, Hogge DE. Differential regulation of primitive human hematopoietic cells in long-term cultures maintained on genetically engineered murine stromal cells. *Blood* 1991; 78: 666-672.
87. Ikebuchi K, Clark SC, Ihle JN, Souza LM, Ogawa M. Granulocyte colony-stimulating factor enhances interleukin 3-dependent proliferation of multipotential hemopoietic progenitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; 85: 3445-3449.
88. Ponchio L, Conneally E, Eaves C. Quantitation of the quiescent fraction of long-term culture-initiating cells in normal human blood and marrow and the kinetics of their growth factor-stimulated entry into S-phase in vitro. *Blood* 1995; 86: 3314-3321.
89. Koury M. Programmed cell death (apoptosis) in hematopoiesis. *Exp Hematol* 1992; 20: 391-394.
90. Yang F-C, Tsuji K, Oda A, Ebihara Y, Xu M-J, Kaneko A, et al. Differential effects of human granulocyte colony-stimulating factor (h G-CSF) and thrombopoietin on megakaryopoiesis and platelet function in h G-CSF receptor-transgenic mice. *Blood* 1999; 94: 950-958.
91. Motoji T, Watanabe M, Uzumaki H, Kusaka M, Fukamachi H, Shimosaka A, et al. Granulocyte Colony-Stimulating Factor (G-CSF) receptors on acute myeloblastic leukaemia cells and their relationship with the proliferative response to G-CSF in clonogenic assay. *B J Haematol* 1991; 77: 54-59.

92. Lowenberg B, Tow IP. Hematopoietic growth factors and their receptors in acute leukemia. *Blood* 1993; 81: 281-292.
93. Ohno R, Tomanoga M, Kobayashi T, Kanamaru A, Shirakawa S, Masaoka T, et al. Effect of granulocyte colony-stimulating factor after intensive induction therapy in relapsed or refractory acute leukemia. *N Engl J Med* 1990; 323: 871-877.
94. Welte K, Gabrilove J, Bronchud M, Platzer E, Morstyn G. Filgrastim (r-metHuG-CSF): The first 10 years. *Blood* 1996; 88: 1907-1929.
95. Crawford J, Ozer H, Stoler R, Johnson D, Lymon G, Tabbara I, et al. Reduction by granulocyte colony-stimulating factor of fever and neutropenia induced by chemotherapy in patients with small-cell lung cancer. *N Engl J Med* 1991; 325: 164-170.
96. Lejeune M, Cantinieaux B, Harag S, Ferster A, Devalck C, Sariban E. Defective functional activity and accelerated apoptosis in neutrophils from children with cancer are differentially corrected by granulocyte and granulocyte-macrophage colony stimulating factors in vitro. *Br J Haematol* 1999; 106: 756-761.
97. Colotta F, Re F, Polentarutti N, Sozzani S, Mantovani A. Modulation of granulocyte survival and programmed cell death by cytokines and bacterial products. *Blood* 1992; 80: 2012-2020.
98. Anderlini P, Przepiorka D, Champlin R, Korbling M. Biologic and clinical effects of granulocyte colony-stimulating factor in normal individuals. *Blood* 1996; 88: 2819-2825.
99. Wang JM, Chen ZG, Colella S, Bonilla MA, Welte K, Bordignon C, et al. Chemotactic activity of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor. *Blood* 1988; 72: 1456-1460.
100. Roilides E, Walsh TJ, Pizzo PA, Rubin M. Granulocyte colony-stimulating factor enhances the phagocytic and bactericidal activity of normal and defective human neutrophils. *J Infect Dis* 1991; 163: 579-583.
101. You A, Kitagawa S, Okabe T, Urabe A, Komatsu Y, Itoh S, et al. Recombinant human granulocyte colony-stimulating factor repairs the abnormalities of neutrophils in patients with myelodysplastic syndromes and

- chronic myelogenous leukemia. *Blood* 1987; 70: 404-411.
102. Adachi S, Kubota M, Lin YW, Okuda A, Matsubara K, Wakazono Y, et al. In vivo administration of granulocyte colony-stimulating factor promotes neutrophil survival in vitro. *Eur J Haematol* 1994; 53: 129-134.
 103. Dalhoff K, Hansen F, Dromann D, Shaaf B, Aries SP, Braun J. Inhibition of neutrophil apoptosis and modulation of the inflammatory response by granulocyte colony-stimulating factor in healthy and ethanol-treated human volunteers. *J Infect Dis* 1998; 178: 891-895.
 104. Hartung T, Docke WD, Gantner F, Krieger G, Sauer A, Stevens P, et al. Effect of granulocyte colony-stimulating factor treatment on ex vivo blood cytokine response in human volunteers. *Blood* 1995; 85: 2482-2489.
 105. Chatta GS, Price TH, Allen RC, Dale DC. The effects of in vivo recombinant methionyl human granulocyte colony-stimulating factor (rh G-CSF) on the neutrophil response and peripheral blood colony forming cells in healthy young and elderly volunteers. *Blood* 1994; 84: 2923-2929.
 106. Price TH, Chatta GS, Dale DC. Effect of recombinant granulocyte colony-stimulating factor on neutrophil kinetics in normal young and elderly humans. *Blood* 1996; 88: 335-340.
 107. Lord BI, Bronchud MH, Owens S, Chang J, Howell A, Souza L, Dexter TM. The kinetics of human granulopoiesis following treatment with granulocyte colony-stimulating factor in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86: 9499-9503.
 108. Kalmanti M, Lydaki E, Dimitriou H, Kalmantis Th, Vlachonicolis I, Kambourakis A, et al. Effect of granulocyte colony-stimulating factor on chemotherapy-induced neutropenia in children with cancer. *Ped Hematol Oncol* 1994; 11:147-155.
 109. Lydaki E, Bolonaki E, Stiakaki E, Dimitriou H, Kalmantis Th, Kalmanti M. Efficacy of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor and recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in neutropenic children with malignancies. *Ped Hematol Oncol* 1995; 12: 551-558.
 110. Kearns CM, Wang WC, Stute N, Ihle JN, Evans WE. Disposition of

- recombinant granulocyte colony-stimulating factor in children with severe chronic neutropenia. *J Pediatr* 1993; 123: 471-479.
111. Stute N, Santana VM, Rodman JH, Schell MJ, Ihle JN, Evans WE. Pharmacokinetics of subcutaneous recombinant granulocyte colony-stimulating factor in children. *Blood* 1992; 79: 2849-2854.
 112. Bonig H, Silbermann S, Weller S, Kirschke R, Korholz D, Janssen G, et al. Glycosylated versus non-glycosylated granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF)-results of a prospective randomized monocentre study. *Bone Marrow Transplantation* 2001; 28: 259-264.
 113. Morstyn G, Foote MA, Walker T, Molineux G. Filgrastim (r-met HuG-CSF) in the 21st century: SD/01. *Acta Haematol* 2001; 105:151-155.
 114. Lord BI, Woolford LB, Molineux G. Kinetics of neutrophil production in normal and neutropenic animals during the response to filgrastim (r-met HuG-CSF) or filgrastim SD/01 (PEG-r-met HuG-CSF). *Clin Cancer Res* 2001; 7: 2085-2090.
 115. Bonilla MA, Dale D, Zeidler C, Last L, Reiter A, Rugeiro M, et al. Long-term safety of treatment with recombinant human granulocyte colony-stimulating (r-met HuG-CSF) in patients with severe congenital neutropenias. *Br J Haematol* 1994; 88: 723-730.
 116. Mitchell PLR, Morland B, Stevens MCG, Dick G, Easlea D, Meyer LC, Pinkerton CR. Granulocyte colony-stimulating factor in established febrile neutropenia: A randomized study of pediatric patients. *J Clin Oncol* 1997; 15: 1163-1170.
 117. American Society of Clinical Oncology. Update of recommendations for the use of hematopoietic colony-stimulating factors: evidence-based clinical practice guidelines. *J Clin Oncol* 1996; 14: 1957-1960.
 118. Schaison G, Eden OB, Henze G, Kamps WA, Locatelli F, Ninane J, et al. Recommendations on the use of colony-stimulating factors in children: conclusions of a European panel. *Eur J Pediatr* 1998; 157: 955-966.
 119. Bennett CL, Weeks JA, Somerfield MR, Feinglass J, Smith TJ. Use of hematopoietic colony-stimulating factors: comparison of the 1994 and 1997 American Society of Clinical Oncology surveys regarding ASCO clinical

- practice guidelines. *J Clin Oncol* 1999; 17: 3676-3681.
120. Bonilla MA, Gillio A, Ruggeiro M, Kernan N, Brochstein J, et al. Effects of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor on neutropenia in patients with congenital agranulocytosis. *N Engl J Med* 1989; 320: 1574-1580.
 121. Welte K, Zeidler C, Reiter A, Muller W, Odenwald E, Souza L, et al. Differential effects of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and granulocyte colony-stimulating factor in children with severe chronic neutropenia. *Blood* 1990; 75:1056-1063.
 122. Dale DC, Bonilla MA, Davis MW, Nakanishi AM, Hammond WP, Kurtzberg L, et al. A randomized controlled phase III trial of recombinant granulocyte colony-stimulating factor (Filgrastim) for treatment of severe chronic neutropenia. *Blood* 1993; 81: 2496-2502.
 123. Freedman M. Safety of long-term administration of granulocyte colony-stimulating factor for severe chronic neutropenia. *Curr Opin Hematol* 1997; 4: 217-224.
 124. Adachi N, H Tsuchiya, H Nunoi, S Higushi, I Akaboshi, S Chikazawa. Rh G-CSF for Shwachman's syndrome. *Lancet* 1990; 336: 1136.
 125. Schrotten H, Roesler J, Breidenbach T, Wendel U, Elsner J, Schweitzer S, et al. Granulocyte and granulocyte- macrophage colony-stimulating factors for the treatment of neutropenia in glycogen storage disease type 1b. *J Pediatr* 1991; 119: 748-754.
 126. Calderwood S, Kilpatrick L, Douglas SD, Freedman M, Smith-Whitley K, Rolland M, et al. Recombinant human granulocyte colony-stimulating factor therapy for patients with neutropenia and/or neutrophil dysfunction secondary to glycogen storage disease type 1b. *Blood* 2001; 97: 376-382.
 127. Bernstein HM, Pollock BH, Calhoun DA, Christensen RD. Administration of recombinant granulocyte colony-stimulating factor to neonates with septicemia: A meta-analysis. *J Pediatr* 2001; 138: 917-920.
 128. Bedford Russel AR, Davies EG, Ball SE, Gordon-Smith EC. Granulocyte colony-stimulating factor treatment for neonatal neutropenia. *Arch Dis Child* 1995; 72: 53-54.
 129. Carr R, Modi N. Haemopoietic colony-stimulating factors for preterm

- neonates. *Arch Dis Child* 1997; 76: 128-133.
130. Calhoun DA, Lunoe M, Du Y, Hutson AD, Veerman M, Christensen RD. Granulocyte Colony-Stimulating Factor serum and urine concentrations in neutropenic neonates before and after intravenous administration of recombinant Granulocyte Colony-Stimulating Factor. *Pediatrics* 2000; 105: 392-397.
131. Christensen RD, Calhoun DA, Rimsza LM. A practical approach to evaluating and treating neutropenia in the neonatal intensive care unit. *Clin Perinatal* 2000; 27: 577-601.
132. Falkenburg JHF. G-CSF: early benefits but late risks? *Blood* 2001; 97: 2194.
133. Segal BH, Holland SM. Primary phagocytic disorders of childhood. *Ped Clin N Amer* 2000; 47 (6): 1311-1339.
134. Carlos TM, Harlan JM. Leukocyte-endothelial adhesion molecules. *Blood* 1994; 84: 2068-2101.
135. Springer TA. Adhesion receptors of the immune system. *Nature* 1990; 346: 425-434.
136. Simmons PJ, Levesque J-P, Zannettino ACW. Adhesion molecules in haemopoiesis. *Baillieres Clin Haematol* 1997;10: 485-505.
137. Long MW. Blood cell cytoadhesion molecules. *Exp Hematol* 1992; 20: 288-301.
138. Kinashi T, Springer TA. Adhesion molecules in hematopoietic cells. *Blood Cells* 1994; 20: 25-44.
139. Ruoslahti E. Integrins. *J Clin Invest* 1991; 87: 1-5.
140. Miyake K, Weissman IL, Greenberger JS, Kincade PW. Evidence for a role of the integrin VLA-4 in lympho-hemopoiesis. *J Exp Med* 1991; 173: 599-607.
141. Levesque J-P, Leavesly DI, Niutta S, Vadas M, Simmons PJ. Cytokines increase human hematopoietic cell adhesiveness by activation of very late antigen (VLA)-4 and VLA-5 integrins. *J Exp Med* 1995; 181: 1805-1815.
142. Verfaillie CM, McCarthy JB, McGlave PB. Differentiation of primitive human multipotent hematopoietic progenitors into single lineage clonogenic progenitors is accompanied by alterations in the interaction with fibronectin. *J Exp Med* 1991; 174: 693-703.

143. Williams DA, Rios M, Stephens C, Patel VP. Fibronectin and VLA-4 in hematopoietic stem cell microenvironment. *Nature* 1991; 352: 438-441.
144. Teixido J, Hemler ME, Greenberger JS, Anklesaria P. Role of $\beta 1$ and $\beta 2$ integrins in the adhesion of human CD34^{hi} stem cells to bone marrow stroma. *J Clin Invest* 1992; 90: 358-367.
145. Etzioni A. Adhesion molecules-Their role in health and disease. *Pediatr Res* 1996; 39: 191-198.
146. Kronenwett R, Martin S, Haas R. The role of cytokines and adhesion molecules for mobilization of peripheral blood stem cells. *Stem Cells* 2000; 18: 320-330.
147. Mohle R, Moore MA, Nachman RL, Rafii S. Transendothelial migration of CD34+ and mature hematopoietic cells: an in vitro study using a human bone marrow endothelial cell line. *Blood* 1997; 89: 72-80.
148. Etzioni A, Doerschuk CM, Harlan JM. Of man and mouse: Leukocyte and endothelial adhesion molecule deficiencies. *Blood* 1999; 94: 3281-3288.
149. Soligo D, Schiro R, Luksh R, Manara G, Quirici N, Parravicini C, Lambertenghi Delilieri G. Expression of integrins in human bone marrow. *Br J Haematol* 1990; 76: 323-332.
150. Liesveld JL, Winslow JM, Frediani KE, Ryan DH, Abboud CN. Expression of integrins and examination of their adhesive function in human and leukemic hematopoietic cells. *Blood* 1993; 81: 112-121.
151. Springer TA. Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell* 1994; 76: 301-314.
152. Osborn L, Hession C, Tizard R, Vassallo C, Luhowski S, Chi-Rosso G, et al. Direct expression cloning of vascular cell adhesion molecule 1, a cytokine-induced protein that binds to lymphocytes. *Cell* 1989; 59: 1203-1211.
153. Simmons PJ, Masinovsky B, Longenecker BM, Berenson R, Torok-Storlb B, Gallatin WM. Vascular cell adhesion molecule -1 expressed by bone marrow stromal cells mediates the binding of hematopoietic progenitor cells. *Blood* 1992; 80: 388-395.
154. Bevilacqua MP. Endothelial - leukocyte adhesion molecules. *Ann Rev Immunol* 1993; 11: 767-804.

155. Albelda SM, Muller WA, Buck CA, Newman PJ. Molecular and cellular properties of PECAM-1: A novel vascular cell-cell adhesion molecule. *J Cell Biol* 1991; 114: 1059-1068.
156. Briskin MJ, McEvoy LM, Butcher EC. MAdCAM-1 has homology to immunoglobulin and mucin-like adhesion receptors and to Ig A1. *Nature* 1993; 363: 461-464.
157. Bevilacqua MP, Nelson RM. Selectins. *J Clin Invest* 1993; 91: 379-387.
158. Kansas GS. Selectins and their ligands: current concepts and controversies. *Blood* 1996; 88: 3259-3287.
159. Ley K, Tedder TF. Leukocyte interactions with vascular endothelium. New insights into selectin-mediated attachment and rolling. *J Immunol* 1995; 155: 525-528.
160. Varki A. Selectin ligands: Will the real ones please stand up? *J Clin Invest* 1997; 99: 158-162.
161. Seth R, Raymond FD, Makgoba MW. Circulating ICAM-1 isoforms: diagnostic prospects for inflammatory and immune disorders. *Lancet* 1991; 338: 83-84.
162. Parent C, Eichacker PQ. Neutrophil and endothelial cell interactions in sepsis. *Inf Dis Clin N Amer* 1999; 13: 427-447.
163. Butcher EC. Leukocyte-endothelial cell recognition: three (or more) steps to specificity and diversity. *Cell* 1991; 67: 1033-1036.
164. Papayannopoulou T, Priestley GV, Nakamoto B. AntiVLA-4/VCAM-1 induced mobilization requires cooperative signaling through the kit/mkit ligand pathway. *Blood* 1998; 91: 2231-2239.
165. Belluci R, De Propriis MS, Buccisano F, Lisci A, Leone G, Tabilio A, et al. Modulation of VLA-4 and L-selectin expression on normal CD34+ cells during mobilization with G-CSF. *Bone Marrow Transplant* 1999; 23: 1-8.
166. Roy V, Verfaillie CM. Expression and function of cell adhesion molecules on fetal liver, cord blood and bone marrow hematopoietic progenitors: Implications for anatomical localization and developmental stage specific regulation of hematopoiesis. *Exp Hematol* 1999; 27: 302-312.
167. Papayannopoulou T, Brice M. Integrin expression during erythroid

- differentiation. *Blood* 1992; 79: 1686-1694.
168. Gordon MY, Lewis JL, Marley SB, Grand FH, Goldman JM. Stromal cells negatively regulate primitive haematopoietic progenitor cell activation via a phosphatidylinositol-anchored cell adhesion/ signalling mechanism. *Br J Haematol* 1997; 96: 647-653.
 169. Drillenbug P, Pals ST. Cell adhesion receptors in lymphoma dissemination. *Blood* 2000; 95: 1900-1910.
 170. Bhatia R, Verfaillie CM. Inhibition of *Bcr-abl* expression with antisense oligonucleotides restores beta-1 integrin-mediated adhesion and proliferation inhibition in chronic myelogenous leukemia hematopoietic progenitors. *Blood* 1998; 91: 3414-3422.
 171. Gorski A. The role of cell adhesion molecules in immunopathology. *Immun Today* 1994; 15: 251-255.
 172. Banks RE, Gearing AJH, Hemingway IK, Norfolk DR, Perren TJ, Selby PJ. Circulating intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1), E-selectin and vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) in human malignancies. *Br J Cancer* 1993; 68: 122-124.
 173. Velikova G, Banks RE, Gearing A, Hemingway I, Forbes MA, Preston SR, et al. Circulating soluble adhesion molecules E-cadherin, E-selectin, Intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) and vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) in patients with gastric cancer. *Br J Cancer* 1997; 76: 1398-1404.
 174. Tempia-Caliera AA, Horvath LZ, Zimmermann A, Tihanyi TT, Korc M, Friess H, et al. Adhesion molecules in human pancreatic cancer. *J Surg Oncol* 2002; 79: 93-100.
 175. Franzke A, Probst Kepper M, Buer J, Duensing S, Hoffmann R, Wittke F, et al. Elevated pretreatment serum levels of soluble vascular cell adhesion molecule-1 and lactate dehydrogenase as predictors of survival in cutaneous metastatic malignant melanoma. *Br J Cancer* 1998; 78: 40-45.
 176. Christiansen I, Sundstrom C, Kalkner K-M, Bring J, Totterman TH. Serum levels of vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) are elevated in advanced stages of non-Hodgkin's lymphomas. *Eur J Haematol* 1999; 62: 202-209.

177. Pui C-H, Luo X, Evans W, Martin S, Rugg A, Wilimas J, et al. Serum intercellular adhesion molecule-1 in childhood malignancy. *Blood* 1993; 82: 895-898.
178. Hatzistilianou M, Athanassiadou F, Agguridaki C, Catriou D. Circulating soluble adhesion molecule levels in children with acute lymphoblastic leukemia. *Eur J Pediatr* 1997; 156: 537-540.
179. Adams DH, Hubscher SC, Shaw J, et al. Intercellular adhesion molecule-1 on allografts during rejection. *Lancet* 1989; ii: 1122-1125.
180. Weetman AP, Cohen S, Makgoba MW, Borysiewicz LK. Expression of intercellular adhesion molecule-1, ICAM-1, by human thyroid cells. *J Endocrinol* 1989; 122: 185-191.
181. Aoki S, Imai K, Yachi A. Soluble intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) antigen in patients with rheumatoid arthritis. *Scand J Immun* 1993; 38: 485-490.
182. Kimata H. Increased serum levels of soluble adhesion molecules in young children with atopic dermatitis. *Eur J Pediatr* 1999; 158: 529-530.
183. Κατριού Δ, Αθανασιάδου Φ, Αγγουριδάκη Χ, Παπαγεωργίου Θ, Τσαβδαρίδου Β, Χατζηστυλιανού Μ. Επίπεδα κυκλοφορούντων διαλυτών μορίων προσκόλλησης, s ICAM-1 και s VCAM-1 σε παιδιά με συστηματικό ερυθθηματώδη λύκο. *Παιδιατρική* 1999; 62: 464-467.
184. Austgulen R, Arntzen KJ, Haereid PE, Aag S, Dollner H. Infections in neonates delivered at term are associated with increased serum levels of ICAM-1 and E-selectin. *Acta Paediatr* 1997; 86: 274-280.
185. Apostolou M, Dimitriou H, Kaleyias J, Perdikogianni Ch, Stiakaki E, Costalos Ch, Kalmanti M. Levels of soluble ICAM-1 in premature and full-term neonates with infection. *Mediators Inflamm* 2002; 11: 95-98.
186. Newman W, Beall LD, Carson CW, Hunder GG, Graben N, Randhawa ZI, et al. Soluble E-selectin is found in supernatants of activated endothelial cells and is elevated in the serum of patients with septic shock. *J Immunol* 1993; 150: 644-654.
187. Biasi D, Bambara LM, Carletto A, Caramaschi P, Ortolani R, Perona G, et al. Increased in vitro neutrophil adherence in a case of chronic idiopathic

- neutropenia. *Br J Haematol* 1994; 86: 421-424.
188. Papadaki HA, Eliopoulos GD. Selective loss of peripheral blood CD45RO+ T lymphocytes correlates with increased levels of serum cytokines and endothelial cell-derived soluble cell adhesion molecules in patients with chronic idiopathic neutropenia of adults. *Ann Hematol* 1998; 77: 153-159.
 189. Papadaki H, Katrinakis G, Eliopoulos A, Coulocheri S, Alexandrakis M, Eliopoulos G. Low numbers of peripheral blood natural killer cells in patients with chronic idiopathic neutropenia of adults are probably due to enhanced extravasation into the tissues. *Haema* 1998; 1: 33-40.
 190. Papadaki H, Eliopoulos G. Enhanced neutrophil extravasation may be a contributing factor in the determination of neutropenia in patients with chronic idiopathic neutropenia of adults. *Eur J Hematol* 1998; 61: 272-277.
 191. Papadaki HA, Palmblad J, Eliopoulos GD. Non-immune chronic idiopathic neutropenia of adult: an overview. *Eur J Haematol* 2001; 67: 35-44.
 192. Bernini JK. Diagnosis and management of chronic neutropenia during childhood. *Ped Clin North Am* 1996; 43: 773-792.
 193. van der Veen JPW, Hack CE, Engelfriet CP, Pegels JG, von dem Borne A. Chronic idiopathic and secondary neutropenia: clinical and serological investigations. *Br J Haematol* 1986; 63: 161-171.
 194. Roper M, Parmley RT, Crist WM, Kelly DR, Cooper MD. Severe congenital leukopenia (reticular dysgenesis). Immunologic and morphologic characterization of leukocytes. *Am J Dis Child* 1985; 139: 832-835.
 195. Levisky RJ, Tidedman K. Successful bone marrow transplantation for reticular dysgenesis. *Lancet* 1983; 1: 671-672.
 196. Freedman MH, Bonilla MA, Fier C, Bolyard AA, Scarlata D, Boxer LA, et al. Myelodysplasia syndrome and acute myeloid leukemia in patients with congenital neutropenia receiving G-CSF therapy. *Blood* 2000; 96: 429-436.
 197. Aggett PJ, Cavanagh NP, Matthew DJ, Pincott JR, Sutcliffe J, Harries JT. Shwachman's syndrome. A review of 21 cases. *Arch Dis Child* 1980; 5: 331-347.
 198. Welte K, Dale D. Pathophysiology and treatment of severe chronic neutropenia. *Ann Hematol* 1996; 72: 158-165.

199. Welte K, Boxer L. Severe Chronic Neutropenia: pathophysiology and therapy. *Sem Hematol* 1997; 34: 267-278.
200. Sievers EL, Dale DC. Non-malignant neutropenia. *Blood Rev* 1996;10 :95-100.
201. Briars C, Parry H, Ansari B. Dominantly inherited severe congenital neutropenia. *J Infect* 1996; 33: 123-126.
202. Sieff CA, Nisbet-Brown E, Nathan DG. Congenital bone marrow failure syndromes. *Br J Haematol* 2000; 111: 30-42.
203. Kostmann R. Infantile genetic agranulocytosis. *Acta Paediatr Scand* 1956; *Suppl* 105:1-78.
204. Kostmann R. Infantile genetic agranulocytosis (Review article). *Acta Paediatr Scand* 1975; 64: 362-368.
205. Carlsson G, Fasth A. Infantile genetic agranulocytosis, morbus Kostmann: Presentation of six cases from the original "Kostmann family" and a review. *Acta Paediatr* 2001; 90: 757-764.
206. Mempel K, Pietsch T, Menzel T, Zeidler C, Welte K. Increased serum levels of Granulocyte Colony-Stimulating Factor in patients with severe congenital neutropenia. *Blood* 1991; 77: 1919-1922.
207. Kyas U, Pietsch T, Welte K. Expression of receptors for granulocyte colony-stimulating factor on neutrophils from patients with severe congenital neutropenia and cyclic neutropenia. *Blood* 1992; 79: 1144-1147.
208. Guba S, Sartor C, Hutchinson R, Boxer L, Emerson S. Granulocyte Colony-Stimulating Factor (G-CSF) production and G-CSF Receptor structure in patients with congenital neutropenia. *Blood* 1994; 83: 1486-1492.
209. Zeidler C, Welte K, Barak Y, Barriga F, Bolyard AA, Boxer L, et al. Stem cell transplantation in patients with severe congenital neutropenia without evidence of leukemic transformation. *Blood* 2000; 95: 1195-1198.
210. Karla R, Dale D, Freedman M, Bonilla MA, Weinblatt M, Ganser A, et al. Monosomy 7 and activating Ras mutations accompany malignant transformation in patients with congenital neutropenia. *Blood* 1995; 86: 4579-4586.
211. Dong F, Brynes RK, Tidow N, Welte K, Lowenberg B, Touw I. Mutations in

- the gene for the granulocyte colony-stimulating factor receptor in patients with acute myeloid leukemia preceded by severe congenital neutropenia. *N Engl J Med* 1995; 333: 487-493.
212. Dong F, Dale DC, Bonilla MA, Freedman M, Fasth A, Neijens HJ, et al. Mutations in the granulocyte colony-stimulating factor receptor gene in patients with severe congenital neutropenia. *Leukemia* 1997; 11: 120-125.
 213. Tidow N, Pilz C, Teichmann B, Muller-Brechlin C, Germeshausen M, Kasper B, et al. Clinical relevance of point mutations in the cytoplasmic domain of the granulocyte colony-stimulating factor receptor gene in patients with severe congenital neutropenia. *Blood* 1997; 89: 2369-2375.
 214. Hermans M HA, Touw IP. Significance of neutrophil elastase mutations versus G-CSF receptor mutations for leukemic progression of congenital neutropenia. *Blood* 2001; 97: 2185-2186.
 215. Dale DC, Person RE, Bolyard AA, Aprikyan AG, Bos C, Bonilla MA, et al. Mutations in the gene encoding neutrophil elastase in congenital and cyclic neutropenia. *Blood* 2000; 96: 2317-2322.
 216. Dale DC, Liles WC, Garwich D, Aprikyan AG. Clinical implications of mutations of neutrophil elastase in congenital and cyclic neutropenia. *J Ped Hematol/Oncol* 2001; 23: 208-209.
 217. Gullberg U, Andersson E, Garwicz D, Lindmark A, Olsson I. Biosynthesis, processing and sorting of neutrophil proteins: insight into neutrophil granule development. *Eur J Haematol* 1997; 58: 137-153.
 218. Borregaard N, Cowland JB. Granules of the human neutrophilic polymorphonuclear leukocyte. *Blood* 1997; 89: 3503-3521.
 219. Horwitz M, Benson KF, Person RE, Aprikyan AG, Dale DC. Mutations in ELA2, encoding neutrophil elastase, define a 21-day biological clock in cyclic haematopoiesis. *Nat Genetics* 1999; 23:433-436.
 220. Ancliff PJ, Gle RE, Liesner R, Hann IM, Linch DC. Mutations in the ELA2 gene encoding neutrophil elastase are present in most patients with sporadic severe congenital neutropenia but only in some patients with the familial form of the disease. *Blood* 2001; 98: 2645-2650.
 221. Germeshausen M, Schulze H, Ballmaier M, Zeidler C, Welte K. Mutations in

- the gene encoding neutrophil elastase (ELA2) are not sufficient to cause the phenotype of congenital neutropenia. *Br J Haematol* 2001; 115: 222-224.
222. Aprikyan AG, Liles CW, Person RE, Rodger E, Dale DC. Accelerated apoptosis of bone marrow progenitor cells in severe congenital neutropenia. *Blood* 1999; 94 (suppl): 482a.
223. A Melk, C Zeidler, K Welte, M Germeshausen. Accelerated telomere loss in patients with severe congenital neutropenia. *Blood* 2000; (suppl): 609a.
224. Dale DC, Hammond WP. Cyclic neutropenia: A clinical review. *Blood Rev* 1988; 2: 178-185.
225. Haurie C, Dale DC, Mackey MC. Cyclical neutropenia and other periodic hematological disorders: A review of mechanisms and mathematical models. *Blood* 1998; 92: 2629-2640.
226. Takami A, Nakao S, Koizumi S, Matsuda T. Impaired response of granulocyte-committed progenitor cells to stem cell factor and granulocyte colony-stimulating factor in human cyclic neutropenia. *Ann Hematol* 1999; 78: 197-199.
227. Krance RA, Spruce WE, Forman SJ, Rosen RB, Hecht T, Hammond WP, Blume KG. Human cyclic neutropenia transferred by allogeneic bone marrow grafting. *Blood* 1982; 60: 1263-1266.
228. Aprikyan AAG, Liles WC, Rodger E, Jonas M, Chi EY, Dale DC. Impaired survival of bone marrow hematopoietic progenitor cells in cyclic neutropenia. *Blood* 2001; 97: 147-153.
229. Migliaccio A, Migliaccio G, Dale DC, Hammond WP. Hematopoietic progenitors in cyclic neutropenia: effect of granulocyte colony-stimulating factor in vivo. *Blood* 1990; 75: 1951-1959.
230. Hammond WP, Price TH, Souza LM, Dale DC. Treatment of cyclic neutropenia with granulocyte colony-stimulating factor. *N Engl J Med* 1989; 320: 38-42.
231. Haurie C, Dale DC, Mackey MC. Occurrence of periodic oscillations in the differential blood counts of congenital, idiopathic and cyclic neutropenic patients before and during treatment with G-CSF. *Exp Hematol* 1999; 27: 401-409.

232. Palmer SE, Stephens K, Dale DC. Genetics, phenotype and natural history of autosomal dominant cyclic hematopoiesis. *Am J Med Gen* 1996; 66: 413-422.
233. Jr Loughran TP, Clark EA, Price TH, Hammond WP. Adult-onset cyclic neutropenia is associated with increased large granular lymphocytes. *Blood* 1986; 68: 1082-1087.
234. Aprikyan AAG, Liles WC, Park JR, Jonas M, Chi EY, Dale DC. Myelokathexis, a congenital disorder of severe neutropenia characterized by accelerated apoptosis and defective expression of bcl-x in neutrophil precursors. *Blood* 2000; 95: 320-327.
235. Hord JD, Whitlock JA, Gay JC, Luckens JN. Clinical features of myelokathexis and treatment with hematopoietic cytokines: a case report of two patients and review of the literature. *J Pediatr Hematol Oncol* 1997;19: 443-448.
236. Weltzer M, Talpaz M, Kleinerman ES, King A, Huh YO, Gutterman JU, et al. A new familial immunodeficiency disorder characterized by severe neutropenia, a defective marrow release mechanism and hypogammaglobulinemia. *Am J Med* 1990; 89: 663-672.
237. Weston B, Axtell RA, Todd RF, et al. Clinical and biologic effects of granulocyte colony-stimulating factor in the treatment of myelokathexis. *J Pediatr* 1991; 118: 229-234.
238. Wetzler M, Talpaz M, Kellanger MJ, Gutterman JU, Kurzrock R. Myelokathexis: normalization of neutrophil counts and morphology by GM-CSF. *JAMA* 1992; 267: 2179-2180.
239. Shwachman H, Diamond LK, Oski FA. The syndrome of pancreatic insufficiency and bone marrow dysfunction. *J Pediatr* 1964; 65: 645
240. Smith OP, Hann IM, Chessells JM, Reeves BR, Milla P. Haematological abnormalities in Shwachman-Diamond syndrome. *Br J Haematol* 1996; 94: 279-284.
241. Dror Y, Freedman MH. Shwachman-Diamond syndrome: An inherited preleukemic bone marrow failure disorder with aberrant hematopoietic progenitors and faulty marrow microenvironment. *Blood* 1999; 94: 3048-3054.

242. Okcu F, Roberts WM, Chan KW. Bone marrow transplantation in Shwachman-Diamond syndrome: report of two cases and review of the literature. *Bone Marrow Transplant* 1998; 21: 849-851.
243. Boxer LA, Blackwood A. Leukocyte disorders: quantitative and qualitative disorders of the neutrophil. *Ped Rev* 1996; 17: 19-28, 47-50.
244. Kuijpers TW, Weening RS, Roos D. Clinical and laboratory work-up of patients with neutrophil shortage or dysfunction. *J Immun Methods* 1999; 232: 211-229.
245. Luna- Fineman S, Shannon KM, Atwater SK, Davis J, Masterson M, Ortega J, et al. Myelodysplastic and myeloproliferative disorders of childhood: A study of 167 patients. *Blood* 1999; 93: 459-466.
246. Certain S, Barrat F, Pastural E, et al. Protein truncation test of *LYST* reveals heterogenous mutations in patients with Chediak-Higashi syndrome. *Blood* 2000; 95: 979-983.
247. Haddad E, Le Deist F, Blanche S, Benkerron M, Rohrlich P, Vilmer E, et al. Treatment of Chediak-Higashi syndrome by allogeneic bone marrow transplantation: Report of 10 cases. *Blood* 1995; 85: 3328-3333.
248. Rezvani K, Flanagan AM, Sarma U, Constantinovici N, Brain B. Investigation of ethnic neutropenia by assessment of bone marrow colony-forming cells. *Acta Haematol* 2001; 105: 32-37.
249. Dancy JT, Brubaker LH. Neutrophil marrow in chronic benign idiopathic neutropenia. *Am J Med* 1980; 68: 251-254.
250. Kyle RA, Linman JW. Chronic idiopathic neutropenia: a newly recognised syndrome? *N Engl J Med* 1968; 279: 1015-1019.
251. Papadaki HA, Xylouri I, Coulocheri S, Kalmanti M, Kafatos A, Eliopoulos GD. Prevalence of chronic idiopathic neutropenia of adults among an apparently healthy population living on the island of Crete. *Ann Hematol* 1999; 78: 293-287.
252. Papadaki HA, Coulocheri S, Eliopoulos GD. Patients with chronic idiopathic neutropenia of adults have increased serum concentrations of inflammatory cytokines and chemokines. *Am J Hematol* 2000; 65: 271-277.
253. Papadaki HA, Giouremou K, Eliopoulos GD. Low frequency of myeloid

- progenitor cells in chronic idiopathic neutropenia of adults may be related to increased production of TGF- β 1 by bone marrow stromal cells. *Eur J Haematol* 1999; 63: 154-162.
254. McClain K, Estrov Z, Chen H, Mahoney DH. Chronic neutropenia of childhood: frequent association with parvovirus infection and correlations with bone marrow culture studies. *Br J Haematol* 1993; 85: 57-62.
 255. Al-Mulla ZS, Christensen RD. Neutropenia in the neonate. *Clin Perinatal* 1995; 22: 711-739.
 256. Funke A, Berner R, Traichel B, Schmeisser D, Leititis JU, Niemeyer CN. Frequency, natural course and outcome of neonatal neutropenia. *Pediatrics* 2000; 106: 45-51.
 257. Christensen RD, Rothstein G. Exhaustion of mature marrow neutrophils in neonates with sepsis. *J Pediatr* 1980; 96: 316-318.
 258. Baorto EP, Aquino VM, Mullen CA, Buchanan GR, DeBaun MR. Clinical parameters associated with low bacteremia risk in 1100 pediatric oncology patients with fever and neutropenia. *Cancer* 2001; 92: 909-913.
 259. Klaassen RJ, Goodman TR, Pham B, Doyle JJ. Low risk prediction rule for pediatric oncology patients presenting with fever and neutropenia. *J Clin Oncol* 2000; 18: 1012-1019.
 260. Chukhlovina A. Enhanced ex vivo apoptosis of peripheral granulocytes is a sufficient factor of neutropenia following myeloablative chemotherapy. *Leuk Res* 2000; 24: 507-509.
 261. Murphy MF, Chapman JF, Metcalfe P, Waters AH. Antibiotic-induced neutropenia. *Lancet* 1985; 8467: 1306-1307.
 262. Boxer LA. Immune neutropenias. Clinical and biological implications. *Am J Pediatr Hematol/Oncol* 1981; 3: 89-96.
 263. Taniuchi S, Masuda M, Yamamoto A, Hasui M, Tsuji S, Takahashi H, et al. Two cases of autoimmune neutropenia possibly induced by β -lactam antibiotics in infants. *J Pediatr Hematol/Oncol* 2000; 22: 533-538.
 264. Percival SS. Neutropenia caused by copper deficiency: Possible mechanisms of action. *Nutr Rev* 1995; 53: 59-66.
 265. Bux J, Stein E-L, Bierling P, Fromont P, Clay M, Stroncek D, et al.

- Characterization of a new alloantigen (SH) on the human neutrophil Fcγreceptor IIIb. *Blood* 1997; 89: 1027-1034.
266. Kameoka J, Funato T, Miura T, Harigae H, Saito J, Yokoyama H, et al. Autoimmune neutropenia in pregnant women causing neonatal neutropenia. *Br J Haematol* 2001; 114: 198-200.
267. Kozłowski C, Evans DI. Neutropenia associated with X-linked agammaglobulinaemia. *J Clin Pathol* 1991; 44: 388
268. Levy J, Espanol-Boren T, Thomas C, Fischer A, Tovo P, Bordigoni P, et al. Clonical spectrum of X-linked hyper- IgM syndrome. *J Pediatr* 1997; 131: 47-54.
269. Pocock CF, Lucas GF, Giles C, Vassiliou G, Cwynarski K, et al. Immune neutropenia associated with anti-human neutrophil antigen-2a (NB1) antibodies following urelated donor stem cell transplantation for chronic myeloid leukemia: perpetuation by granulocyte colony-stimulating factor. *Br J Haematol* 2001; 113: 483-485.
270. Klumpp TR. Antibody-mediated neutropenia following bone marrow transplantation. *Int J Clin Lab Res* 1993; 23: 4-7.
271. Starkebaum G, Price TH, Lee MY, Arend WP. Autoimmune neutropenia in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1978; 21: 504.
272. Choi MFV, Munt MJ, Turner AR, et al. Successful reversal of neutropenia in Felty's syndrome with recombinant granulocyte colony-stimulating factor. *Br J Haematol* 1994; 86: 663-664.
273. Breedveld FC, Lafeber GJM, De Vries E, et al. Immune complexes and pathogenesis of neutropenia in Felty's syndrome. *Ann Rheum Dis* 1986; 45: 696-702.
274. Stevens C, Peppercorn MA, Grand RJ. Chron's disease associated with autoimmune neutropenia. *J Clin Gastroenterol* 1991; 13: 328.
275. Bux J, Robertz-Vaupel GM, Glasmacher A, Dengler HJ, Mueller-Eckerhardt C. Autoimmune neutropenia due to NA1 specific antibodies in primary biliary cirrhosis. *Br J Haematol* 1991; 77: 121
276. Knight J, Laing P, Knight A, et al. Thyroid stimulating autoantibodies usually contain only lambda light chains: Evidence for the "forbidden" clone theory. *J*

- Clin Endocrinol Metab* 1986; 62: 342-347.
277. Gordon BG, Kiwanuka J, Kadushin J. Autoimmune neutropenia and Hodgkin's disease: Successful treatment with intravenous gammaglobulin. *Am J Pediatr Hematol Oncol* 1991; 13: 164.
278. Bux J, Behrens G, Jaeger G, Welte K. Diagnosis and clinical course of autoimmune neutropenia in infancy: Analysis of 240 cases. *Blood* 1998; 91: 181-186.
279. Hartman K, Wright D. Identification of autoantibodies specific for the neutrophil adhesion glycoproteins CD11b/CD18 in patients with autoimmune neutropenia. *Blood* 1991; 78: 1096-1104.
280. Shastri K, Logue G. Autoimmune neutropenia. *Blood* 1993 ; 81 : 1984-1995.
281. Logue G, Shastri K, Laughlin M, Shimm D, Ziolkowski L, Iglehart J. Idiopathic neutropenia: Antineutrophil antibodies and clinical correlations. *Am J Med* 1991; 90: 211-216.
282. Miller ME, Oski FA, Harris MB. Lazy – leukocyte syndrome: a new disorder of neutrophil function. *Lancet* 1971; 1: 665-669.
283. Calhoun DA, Rimsza LM, Burchfield DJ, Millsaps M, Christensen RD, Budania J, et al. Congenital autoimmune neutropenia in two premature neonates. *Pediatrics* 2001; 108: 181-184.
284. Hartman KR, LaRussa VF, Rothwell SW, Atolagbe TO, Ward FT, Klipple G. Antibodies to myeloid precursor cells in autoimmune neutropenia. *Blood* 1994; 84: 625-631.
285. Cline M, Golde D. Immune suppression of hematopoiesis. *Am J Med* 1978; 64: 301-310.
286. Lalezari P, Jiang A, Lee S. A chronic autoimmune neutropenia due to anti-NA2 antibody. *N Engl J Med* 1975; 293: 747
287. Boxer LA, Greenberg MS, Boxer GJ. Auto-immune neutropenia. *N Engl J Med* 1975; 293: 748
288. Bux J, Chapman J. Report on the Second International Granulocyte Serology Workshop. *Transfusion* 1997; 37: 977-983.
289. Bruin M, Von dem Borne A, Tamminga R, Kleijer M, Buddelmeijer L, de Haas M. Neutrophil antibody specificity in different types of childhood

- autoimmune neutropenia. *Blood* 1999; 94: 1797-1802.
290. Kissel K, Santoso S, Hofmann C, Stroncen D, Bux J. Molecular basis of the neutrophil glycoprotein NB1 (CD177) involved in the pathogenesis of immune neutropenias and transfusion reactions. *Eur J Immunol* 2001; 31: 1301-1309.
291. Lyall EGH, Lucas GF, Eden OB. Autoimmune neutropenia of infancy. *J Clin Pathol* 1992; 45: 431-434.
292. Macey MG, Sangster J, Veys PA. Flow cytometric analysis of the functional ability of neutrophils from patients with autoimmune neutropenia. *J Microsc* 1990; 159: 277
293. Harmon DC, Weitzman SA, Stossel TP. The severity of immune neutropenia correlates with the maturational specificity of antineutrophil antibodies. *Br J Haematol* 1984; 58: 209-215.
294. Bux J, Mueller-Eckhardt G, Mueller-Eckhardt C. Autoimmunization against the neutrophil-specific NA1 antigen is associated with HLA-DR2. *Hum Immunol* 1991; 30:18
295. Bussel J, Lalezari P, Hilgartner M, Partin J, Fikrig S, O'Malley J, et al. Reversal of neutropenia with intravenous gammaglobulin in autoimmune neutropenia of infancy. *Blood* 1983; 62: 398
296. Bauduer F. G-CSF: a very efficient therapy in chronic autoimmune neutropenia. A brief review of the literature. *Hematol Cell Ther* 1998; 40: 189-191.
297. Bernini C, Wooley R, Buchanan R. Low -dose recombinant human granulocyte colony-stimulating factor therapy in children with symptomatic chronic idiopathic neutropenia. *J Pediatr* 1996; 129: 551-558.
298. Kuijpers T, de Haas M, de Groot C, von dem Borne AE, Weening R. The use of rh-G-CSF in chronic autoimmune neutropenia: reversal of autoimmune phenomena, a case history. *Br J Hematol* 1996; 94: 464-469.
299. Caracciolo D, Clark S, Rovera G. Differential activity of recombinant colony-stimulating factors in supporting proliferation of human peripheral blood and bone marrow myeloid progenitors in culture. *Br J Haematol* 1989; 72: 306-311
300. Gordon MY, Marley SB, Lewis JL, Davidson RJ, Nguyen DX, Grand FH, et

- al. Treatment with interferon-alfa preferentially reduces the capacity for amplification of granulocyte-macrophage progenitors (CFU-GM) from patients with CML, but spares normal CFU-GM. *J Clin Invest* 1998; 102: 710-715.
301. Snedecor GW, Cochran W. Statistical Methods. 6th ed, Iowa USA, Iowa State University Press 1984.
302. Rosse C, Krauner MJ, Dillon TL, et al. Bone marrow cell populations of normal infants: The predominance of lymphocytes. *J Lab Clin Med* 1977; 89:1225-1240.
303. Dimitriou H, Perdikoyanni Ch, Lydaki E, Stiakaki, Bolonaki I, Kalmantis Th, Kalmanti M. Erythropoiesis and myelopoiesis in childhood leukemia and solid tumors. *Int J Ped Hematol/Oncol* 1999; 6: 243-250.
304. Papadaki HA, Chatzivassili A, Stefanaki K, Koumaki V, Kanavaros P, Eliopoulos GD. Morphologically defined myeloid cell compartments, lymphocyte subpopulations, and histological findings of bone marrow in patients with nonimmune chronic idiopathic neutropenia. *Ann Hematol* 2000; 79: 563-570.
305. Marley SB, Lewis JL, Davidson RJ, Roberts IAG, Dokal I, Goldman JM, et al. Evidence of a continuous decline in haematopoietic cell function from birth: application to evaluating bone marrow failure in children. *Br J Haematol* 1999; 106: 162-166.
306. Shlebak AA, Marley SB, Roberts IAG, Davidson RJ, Goldman JM, Gordon MY. Optimal timing for processing and cryopreservation of umbilical cord haematopoietic stem cells for clinical transplantation. *Bone Marrow Transplant* 1999; 23: 131-136.
307. Marley SB, Deininger MWN, Davidson RJ, Goldman JM, Gordon MY. The tyrosine kinase inhibitor STI571, like interferon-a, preferentially reduces the capacity for amplification of granulocyte-macrophage progenitors from patients with Chronic Myeloid Leukemia. *Exp Hematol* 2000; 28: 551-557.
308. Marley SB, Davidson RJ, Goldman JM, Gordon MY. Combination of interferon alpha with either Ara-C or ATRA in vitro reduces the selective action of interferon against CML CFU-GM. *Leukemia* 2000; 14: 1396-1400.

309. Gordon MY, Blackett NM. Reconstitution of the hematopoietic system after stem cell transplantation. *Cell Transplantation* 1998; 7: 339-344.
310. Papadaki H, Gibson F, Rizzo S, Gordon-Smith Ed, Marsh J. Assessment of bone marrow stem cell reserve and stromal cell function in patients with autoimmune cytopenias. *Blood* 2000; 96: 3272-3275.
311. Hammond W, Csiba E, Canin A, Hockman H, Souza L, Layton J, et al. Chronic neutropenia: A new canine model induced by human Granulocyte Colony-Stimulating Factor. *J Clin Invest* 1991; 87: 704
312. Lieschke GJ, Grail D, Hodgson G, Metcalf D, Stanley E, Cheers C, et al. Mice lacking Granulocyte Colony-Stimulating Factor have chronic neutropenia, granulocyte and macrophage progenitor cell deficiency and impaired neutrophil mobilization. *Blood* 1994; 84: 1737
313. Watari K, Asano S, Shirafuji N, Kodo H, Ozawa, Takaku F, et al. Serum Granulocyte Colony-Stimulating Factor levels in healthy volunteers and patients with various disorders as estimated by enzyme immunoassay. *Blood* 1989; 73: 117-122.
314. Cairo M, Suen Y, Sender L, Gillan E, Winston H, Plunkett M, van deVen C. Circulating Granulocyte Colony-Stimulating Factor levels after allogeneic and autologous bone marrow transplantation: endogenous G-CSF production correlates with myeloid engraftment. *Blood* 1992; 79: 1869-1873.
315. Corbacioglu S, Bux J, Koning A, Gabrilove J, Welte K, Bussel J. Serum granulocyte colony-stimulating factor levels are not increased in patients with autoimmune neutropenia of infancy. *J Pediatr* 2000; 137: 96-99.
316. Ishiguro A, Inoue K, Nakahata T, Nishihira H, Kojima S, Ueda K, et al. Reference intervals for serum granulocyte colony-stimulating factor levels in children. *J Pediatr* 1996; 128: 208-212.
317. Ichikawa T, Kuwaki T, Tachibana K, Yanagida M, Matsuki S. A highly sensitive enzyme immunoassay for G-CSF in human plasma. *Exp Hematol* 1995; 23: 192-195.
318. Gessler P, Kirchmann N, Kientsch-Engel R, Haas N, Lasch P, Kachel W. Serum concentrations of Granulocyte Colony-Stimulating Factor in healthy term and preterm neonates and in those with various diseases including

- bacterial infections. *Blood* 1993; 82: 3177-3182.
319. Ohls RK, Li Y, Abdel-Mageed A, Buchanan G, Mandell L, Christensen RD. Neutrophil pool sizes and Granulocyte Colony-Stimulating Factor production in human mid-trimester fetuses. *Pediatr Res* 1995; 37: 806-811.
320. Chirico G, Ciardelli L, Cecchi P, De Amici M, Gasparoni A, Rondini G. Serum concentration of granulocyte colony-stimulating factor in term and preterm infants. *Eur J Pediatr* 1997; 156: 269-271.
321. Gessler P, Neu S, Mebe T, Speer CP. Granulocyte Colony-Stimulating Factor receptor expression on neutrophils of term and preterm neonates with and without signs of infection. *Eur J Pediatr* 1999; 158:497-500.
322. Shimada M, Minato M, Takada M, Takahashi S, Harada K. Plasma concentration of granulocyte colony-stimulating factor in neonates. *Acta Pediatr* 1996; 85: 351-355.
323. Bedford Russel AR, Davies EG, McGuigan S, Scopes GJD, Daly S, Gordon-Smith EC. Plasma granulocyte colony-stimulating factor concentration in the early neonatal period. *Br J Haematol* 1994; 86: 642-644.
324. Saito S-I, Kawano Y, Watanabe T, Okamoto Y, Abe T, Kurada Y, et al. Serum Granulocyte Colony-Stimulating Factor kinetics in children receiving chemotherapy with or without stem cell support. *J Hematother* 1999; 8: 291-297.
325. Sallerfors B, Olofsson T. Granulocyte-macrophage colony –stimulating factor (GM-CSF) and granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) in serum during induction treatment of acute leukemia. *B J Haematol* 1991; 78: 343-351.
326. Cebon J, Layton J, Maher D, Morstyn G. Endogenous hemopoietic growth factors in neutropenia and infection. *Br J Hematol* 1994; 86: 265-274.
327. Bonig H, Hannen M, Lex C, Wolfel S, Banning U, Nurnberger, et al. Additive effects of infection and neutropenia on the induction of granulocytopoiesis activity in vitro. *Cancer* 1999; 86: 340-348.
328. Fukushima K, Ishiguro A, Shimbo T. Transient elevation of Granulocyte Colony-Stimulating Factor levels in cerebrospinal fluid at the initial stage of aseptic meningitis in children. *Pediatr Res* 1995; 37: 160-164.

329. Pauksen K, Elfman L, Ulfgren AK, Venge P. Serum levels of Granulocyte Colony-Stimulating Factor (G-CSF) in bacterial and viral infections, and in atypical pneumonia. *Br J Haematol* 1994; 88: 256-260.
330. Kennon C, Overturf G, Bessman S, Sierra E, Smith KJ, Brann B. Granulocyte colony-stimulating factor as a marker for bacterial infection in neonates. *J Pediatr* 1996; 128: 765-769.
331. Broudy VC, Kaushansky K, Segal GM, Harlan JM, Adamson JW. Tumor necrosis factor type alpha stimulates human endothelial cells to produce granulocyte/macrophage colony stimulating factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986; 83: 7467-7471.
332. Kaushanski K, Lin N, Adamson JW. Interleukin 1 stimulates fibroblasts to synthesize granulocyte-macrophage and granulocyte colony-stimulating factors. Mechanism for the hematopoietic response to inflammation. *J Clin Invest* 1988; 81: 92-97.
333. Bux J, Hofmann C, Welte K. Serum G-CSF levels are not increased in patients with antibody-induced neutropenia unless they are suffering from infectious diseases. *Br J Haematol* 1999; 105: 616-617.
334. Kobayashi M, Ueda K, Kojima S, Nishihira H, Ishiguro A, Shimbo T, Nakahata T. Serum granulocyte colony-stimulating factor levels in patients with chronic neutropenia of childhood: modulation of G-CSF levels by myeloid precursor cell mass. *Br J Hematol* 1999; 105: 486-490.
335. Sieff CA, Niemeyer CM, Mentzer SJ, Faller DV. Interleukin-1, tumor necrosis factor, and the production of colony stimulating factors by cultured mesenchymal cells. *Blood* 1988; 72: 1316-1323.
336. Bussolino F, Ziche M, Wang JM, Alessi D, Morbidelli L, Cremona O, et al. In vitro and in vivo activation of endothelial cells by colony-stimulating factors. *J Clin Invest* 1991; 87: 986-995.
337. Cremer M, Schultze H, Linthorst G, Folman C, Wehnert S, Straub G, von dem Borne AE, Welte K, Ballmaier M. Serum thrombopoietin, IL-11 and IL-6 in pediatric thrombocytopenias. *Ann Hematol* 1999; 78: 401-407.
338. Hogg N, Berlin C. Structure and function of adhesion receptors in leukocyte trafficking. *Immunol Today* 1995; 16: 327-330.

339. Haraldsen G, Kvale D, Lien B, Farstad I, Brandtzaeg P. Cytokine-regulated expression of E-selectin, ICAM-1 and VCAM-1 in human microvascular endothelial cells. *J Immunol* 1996; 156: 2558-2565.
340. Olofsson A M, Arfors K-E, Ramezani L, Wolitzky BA, Butcher EC, von Andrian UH. E-selectin mediates leukocyte rolling in Interleukin-1 – treated rabbit mesentery venules. *Blood* 1994; 84: 2749-2758.
341. Frenette PS, Mayadas TN, Rayburn H, Hynes RO, Wagner DD. Susceptibility to infection and altered hematopoiesis in mice deficient in both P- and E-selectins. *Cell* 1996; 84: 563-574.
342. Lasky LA. Selectins: interpreters of cell-specific carbohydrate information during inflammation. *Science* 1992; 258: 964-969.