

2. Βασικά στοιχεία που αφορούν την κινητική των κυττάρων της κοκκιώδους σειράς

Γ. Χρ. Μελέτης, Ε. Τέρπος

ΚΥΡΙΑ ΣΗΜΕΙΑ

- Η κινητική των κυττάρων της κοκκιώδους κοκκιώδους σειράς ελέγχεται με πολύπλοκες μεθόδους που στηρίζονται στη χρήση ραδιενεργών ισοτόπων για τον καθορισμό του ρυθμού παραγωγής, κατανομής, μετανάστευσης και χρόνου επιδίωξης των κυττάρων.
- Διακρίνονται διαμερίσματα διαιρούμενων κυττάρων, ωριμαζόντων κυττάρων, αποθηκευμένων στον μυελό, ευρισκόμενων στο περιφερικό αίμα (κυκλοφορούσα και περιθωριακή δεξαμενή) καθώς και κυττάρων που μεταναστεύουν στους ιστούς.
- Η συμπεριφορά των πολυμορφοπύρηνων του αίματος φαίνεται να ελέγχεται από πρωτεΐνες προσκόλλησης στις μεμβράνες όπως οι σελεκτίνες και οι ιντεγκρίνες.
- Η διακίνηση της κυκλοφορούσας και περιθωριακής δεξαμενής επηρεάζεται από ουσίες όπως κορτικοειδή, ενδοτοξίνη, επινεφρίνη και άλλα φάρμακα και ποικίλες φυσιολογικές και παθολογικές καταστάσεις.

1. ΚΙΝΗΤΙΚΗ ΤΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΤΗΣ ΚΟΚΚΙΩΔΟΥΣ ΣΕΙΡΑΣ

Οι μέθοδοι που χρησιμοποιούνται για τη μελέτη της κινητικής της κοκκιώδους σειράς αφορούν α) την κένωση ή την καταστροφή των κυττάρων για τον καθορισμό του μεγέθους και του ρυθμού κινητοποίησης των αποθηκών και το επίπεδο της αντισταθμιστικής κοκκιοποίησης, β) την χρήση ραδιενεργών σημαντών για τον καθορισμό της κατανομής των πολυμορφοπύρηνων, του ρυθμού παραγωγής και τον χρόνο επιδίωξης, γ) τους μιτωτικούς δείκτες της κοκκιώδους σειράς στον μυελό για την εκτίμηση του ρυθμού πολλαπλασιασμού και των φάσεων του κυτταρικού κύκλου και δ) την προαγωγή φλεγμονωδών αντιδράσεων για την μελέτη της μετανάστευσης των πολυμορφοπύρηνων από το αίμα προς τους ιστούς.

Τα κοκκιοκύτταρα του μυελού μπορεί να διαιρεθούν στο διαιρούμενο διαμέρισμα (μυελοδλάστες, προμυελοκύτταρα-ΠΜΚ και μυελοκύτταρα-ΜΚ) και

στο ωριμάζον/αποθηκευμένο (μεταμυελοκύτταρα-MMK, ραβδοκύτταρα, πολυμορφοκύτταρα) διαμερίσμα. Ο αριθμός των κυτταρικών διαιρέσεων από τον μυελοβλάστη μέχρι το μυελοκύτταρο εκτιμάται ότι είναι 4-5. Με ραδιενεργό disopropyl fluorophosphate (DF³²P) βρέθηκε ότι στο στάδιο του μυελοκυττάρου γίνονται τρεις διαιρέσεις και έτσι η δεξαμενή των μυελοκυττάρων είναι περί τις 4 φορές μεγαλύτερη από εκείνη των προμυελοκυττάρων. Ο χρόνος διόδου είναι περίπου 24 ώρες για τους μυελοβλάστες, 26-78 ώρες για τα ΠΜΚ, 17-126 ώρες για τα ΜΚ, 8-108 ώρες για τα ΜΜΚ, 12-96 ώρες για τα ραβδοκύτταρα και 0-120 ώρες για τα πολυμορφοκύτταρα. Η μιτωτική δεξαμενή έχει μάζα περίπου $2.11 \pm 0.36 \times 10^9$ κύτταρα/kg την ημέρα και η ωριμάζουσα δεξαμενή περίπου $5.59 \pm 0.9 \times 10^9$ κύτταρα/kg την ημέρα, με τελική παραγωγή 0.85×10^9 πολυμορφοκύτταρα/kg την ημέρα. Με διάφορες τεχνικές σήμανσης έχει βρεθεί ότι ο χρόνος από τη δημιουργία του μυελοκύτταρου μέχρι την έξοδο του πολυμορφοκύτταρου στο αίμα είναι 5-7 ημέρες, ενώ σε περίπτωση λοίμωξης αυτό μπορεί να γίνει και σε 48 ώρες. Σε μερικές παθολογικές καταστάσεις όλη αυτή η διαδικασία δεν είναι απόλυτα αποτελεσματική και αρκετά κύτταρα της κοκκιδώδους σειράς καταστρέφονται ενδομυελικά (μη αποδοτική κοκκιοποίηση).

Με την ολοκλήρωση της ωρίμανσης τους τα πολυμορφοκύτταρα αποθηκεύονται στον μυελό και αποτελούνται τις εφεδρείες των πολυμορφοκυττάρων του μυελού (mature neutrophil reserve) που είναι κατά πολύ μεγαλύτερη από τα κυκλοφορούντα στο αίμα πολυμορφοκύτταρα. Αυτή η μυελική δεξαμενή των πολυμορφοκυττάρων μπορεί εύκολα και ταχύτατα να αποδοθεί στην κυκλοφορία σε καταστάσεις stress.

Τα πολυμορφοκύτταρα που κυκλοφορούν στο περιφερικό αίμα σε μια δεδομένη χρονική περίοδο αντιπροσωπεύουν την ολική δεξαμενή των πολυμορφοκυττάρων του περιφερικού αίματος (total blood granulocyte pool, TBGP) που υπολογίζεται με βάση την αραιώση των χορηγούμενων σημασμένων πολυμορφοκυττάρων (φυσιολογικά κυμαίνεται από $27-128 \times 10^9$ πολυμορφοκύτταρα/kg). Η ολική αυτή δεξαμενή κατανέμεται σε δύο περίπου ίσα διαμερίσματα, την περιθωριακή δεξαμενή (marginal pool, MGP) που αποτελείται από τα πολυμορφοκύτταρα που είναι κολλημένα στα τοιχώματα των μετατριχοειδικών αγγείων και την κυκλοφορούσα δεξαμενή (circulating pool, CGP) που αντιπροσωπεύει τα πολυμορφοκύτταρα που κυκλοφορούν και τα οποία μετράμε με τις εξετάσεις ρουτίνας (φυσιολογικά τα πολυμορφοκύτταρα της περιθωριακής δεξαμενής κυμαίνονται από $13-49 \times 10^9$ /kg και της κυκλοφορούσας δεξαμενής από $8-115 \times 10^9$ /kg).

Ο χρόνος που ένα κύτταρο της κοκκιδώδους σειράς αρχίζει να πολλαπλασιάζεται και να ωριμάζει στο μυελό των οστών, κυκλοφορεί στο περιφερικό αίμα και επιζεί μετά την έξοδό του στους ιστούς, παριστάνει το χρόνο επιβίωσης (survival time), ενώ ο χρόνος κατά τον οποίον ο αριθμός των χορηγούμενων σημασμένων πολυμορφοκυττάρων ελαττώνεται στο 50% παριστάνει την

ημπερίοδο ζωής των πολυμορφοπύρηνων στο περιφερικό αίμα (εκφράζεται σαν “ειδική ραδιενέργεια” και φυσιολογικά κυμαίνεται από 4-10 ώρες). Ο αριθμός των πολυμορφοπύρηνων που εισέρχονται από το μυελό και εξέρχονται από το περιφερικό αίμα προς τους ιστούς μέσα σε ένα 24ωρο παριστάνει το ρυθμό μεταβολισμού των πολυμορφοπύρηνων (granulocyte turnover rate, GTR) που φυσιολογικά κυμαίνεται από $62-400 \times 10^9/\text{kg}$ το 24ωρο.

Η συμπεριφορά των πολυμορφοπύρηνων του αίματος φαίνεται να ελέγχεται από πρωτεΐνες προσκόλλησης στις μεμβράνες όπως οι σελεκτίνες και οι ιντεγκρίνες. Στην δράση μεταξύ πολυμορφοπύρηνων και ενδοθηλιακών κυττάρων σημαντικό ρόλο παίζουν η L-σελεκτίνη (πολυμορφοπύρηνου) και η E-σελεκτίνη (ενδοθηλιακό κύτταρο) με αποτέλεσμα την αναστρεπτή προσκόλληση των πολυμορφοπύρηνων στο ενδοθήλιο. Οι κύριες ιντεγκρίνες των πολυμορφοπύρηνων είναι η $\alpha_1\beta_2$ (CD11a/CD18) και $\alpha\text{M}\beta_2$ (CD11b/CD18) που αντιδρούν με τον ενδοκυττάριο παράγοντα προσκόλλησης-1 (ICAM-1) των ενδοθηλιακών κυττάρων με αποτέλεσμα προσκόλληση και δίοδο των πολυμορφοπύρηνων προς τους ιστούς με σύγχρονη φωσφορυλίωση της PECAM-1 (platelet-endothelial cell adhesion molecule) ή CD31. Η όλη διαδικασία εμφανίζεται σαν απάντηση στην ενδοτοξίνη και τον PAF (platelet-activating factor) με αποτέλεσμα ευόδωση της διόδου των πολυμορφοπύρηνων στους ιστούς.

Τα σημασμένα με DF^{32}P πολυμορφοπύρηνου εξαφανίζονται από την κυκλοφορία με χρόνο ημίσειας ζωής ($T_{1/2}$) περί τις 6-7 ώρες και μάλιστα κατά τυχαίο τρόπο, άσχετα με τον χρόνο εξόδου τους από τον μυελό, ενώ αρκετά απομακρύνονται μέσω του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου. Ο χρόνος της διακίνησης των πολυμορφοπύρηνων (turnover rate, NTR) μπορεί να υπολογιστεί από το $T_{1/2}$ και την ολική δεξαμενή των πολυμορφοπύρηνων του αίματος (TBNP) [$\text{NTR} = 0.693 \times \text{TBNP} / T_{1/2}$]. Σε φυσιολογικές συνθήκες ο χρόνος διακίνησης των πολυμορφοπύρηνων αντιπροσωπεύει τον βαθμό της αποδοτικής κοκκιοποίησης και η ικανότητα παραγωγής έχει μεγάλες ικανότητες αύξησης ιδιαίτερα σε φλεγμονώδη ερεθίσματα όπου μπορεί να αυξηθεί κατά πολλές φορές.

1.1 Παράγοντες που τροποποιούν την κινητική

Τα κορτικοειδή μπορεί να αυξήσουν την ολική δεξαμενή των κυκλοφορούντων πολυμορφοπύρηνων αυξάνοντας την προσφορά πολυμορφοπύρηνων από τις αποθήκες του μυελού, προκαλώντας αύξηση της κυκλοφορούσας δεξαμενής εις βάρος της περιθωριακής δεξαμενής, αύξηση του $T_{1/2}$ των πολυμορφοπύρηνων, ενώ συγχρόνως μειώνουν τη μετανάστευση πολυμορφοπύρηνων από τον ενδαγγειακό χώρο προς τους ιστούς (μια φαρμακολογική δόση αυξάνει τα πολυμορφοπύρηνου κατά $4 \times 10^9/\text{L}$) που επανέρχονται σε φυσιολογικά επίπεδα μετά 24 ώρες περίπου.

Η ενδοτοξίνη αρχικά αυξάνει την περιθωριακή δεξαμενή και την συνάθροι-

ση των πολυμορφοπύρηνων (παροδική ουδετεροπενία), ενώ μετά μερικές ώρες εμφανίζεται πολυμορφοπυρήνωση σαν αποτέλεσμα μεταφοράς πολυμορφοπύρηνων από τον μυελό (ανάλογα με το μέγεθος των αποθηκών).

Η επινεφρίνη προκαλεί παροδική αύξηση πολυμορφοπύρηνων μετά 5-10 λεπτά, διάρκειας 20-30 λεπτών, λόγω μεταφοράς κυττάρων από την περιθωριακή στην κυκλοφορούσα δεξαμενή.

Φάρμακα και διάφορες τοξικές ουσίες μπορεί να μειώσουν τον πολλαπλασιασμό και την ωρίμανση των κυττάρων της κοκκιώδους σειράς στο μυελό. Επίσης μπορεί να παρουσιαστεί ανοσολογική διαταραχή στα πολυμορφοπύρηνια του μυελού ή του περιφερικού αίματος (καταστροφή πολυμορφοπύρηνων μέσω αυτοαντισωμάτων ανάλογη με την αυτοάνοση αιμολυτική αναιμία). Η αύξηση της περιθωριακής δεξαμενής των πολυμορφοπύρηνων μπορεί να οφείλεται σε αυξημένη προσκόλλησή τους στο ενδοθήλιο των αγγείων (ιδιαίτερα στους πνεύμονες και στο σπλήνα), ενώ μπορεί να επηρεάζεται και από την ενεργοποίηση του συμπληρώματος (διάφορες φλεγμονές, εξωσωματική κυκλοφορία).

Τα πολυμορφοπύρηνια μεταναστεύουν, ιδιαίτερα σε περιπτώσεις φλεγμονής προς τους ιστούς, και κυρίως στους πνεύμονες, στοματική κοιλότητα, πεπτικό σωλήνα, ήπαρ και σπλήνα. Εκεί είτε αποβάλλονται ή καταστρέφονται ιδιαίτερα από τα μακροφάγα. Ο χρόνος ζωής των ώριμων πολυμορφοπύρηνων είναι πολύ βραχύς, αν και μπορεί να φτάσει τις 2 εβδομάδες. Η επιβίωση των πολυμορφοπύρηνων βραχύνεται σημαντικά σε περίπτωση που φαγοκυτταρώνουν (μικρόβια, σωματίδια κλπ) και καταστρέφονται στα σημεία φλεγμονής όπου συγκεντρώνονται μετά χημειοτακτικά ερεθίσματα (C5a, IL-8 κλπ).

Ο αριθμός των λευκών και ο απόλυτος αριθμός των πολυμορφοπύρηνων γενικά αντιπροσωπεύουν πολύ καλά την παραγωγή της κοκκιώδους σειράς. Αποτελούν πολύ αξιόπιστη παράμετρο για την αξιολόγηση των αποτελεσμάτων της κυτταροτοξικής θεραπείας, αν και δεν παρέχουν πολύ καλές πληροφορίες για την ποιοτική κατάσταση ή τον ρυθμό παραγωγής και καταστροφής των κοκκιοκυττάρων, την κατάσταση των μυελικών αποθηκών ή την παρουσία διαταραχών της κατανομής των πολυμορφοπύρηνων.

Η εκτίμηση της κοκκιοποίησης από τα μυελικά επιχρίσματα, τη βιοψία ή το περιφερικό αίμα αρκετές φορές υστερεί σε πληροφορίες σε σχέση με άλλες πιο ειδικές τεχνικές εκτίμησης της κινητικής των κυττάρων. Για παράδειγμα η ανεύρεση στο μυελό “αναστολής ωρίμανσης” της κοκκιώδους σειράς δεν μπορεί να κάνει διάκριση μεταξύ αληθούς ανεπάρκειας ωρίμανσης και της ταχείας κινητοποίησης των κοκκιοκυττάρων από τον μυελό. Παρόμοια είναι συχνά δύσκολη η διάκριση της μορφολογικά ανεπαρκούς κοκκιοποίησης επί ουδετεροπενίας και της περιφερικής καταστροφής των πολυμορφοπύρηνων. Παρά τα παραπάνω, αν ληφθούν υπόψιν τόσο ο απόλυτος αριθμός των πολυμορφοπύρηνων και η κυτταροδριθεία του μυελού, παρέχονται χρήσιμες πληροφορίες για τις περισσότερες κλινικές περιπτώσεις. Γενικά αν ο απόλυτος αριθμός των

πολυμορφοπύρηνων είναι κάτω από 1000/ μ L και ο μυελός είναι επανηλλημένα υποκυτταρικός, μάλλον πρόκειται για διαταραχή παραγωγής των κοκκιοκυττάρων, αν και όταν τα πολυμορφοπύρηνια είναι πάνω από 1000/ μ L τούτο δεν σημαίνει φυσιολογική παραγωγή. Κλινικά πολύ χαμηλός απόλυτος αριθμός πολυμορφοπύρηνων (<500/ μ L) φαίνεται να προδιαθέτει σε μικροβιακές ή μυκητιασικές λοιμώξεις.

Παράγοντες που διεγείρουν την παραγωγή κοκκιοκυττάρων (κορτικοειδή, ενδοτοξίνη, ετιοχολανολίνη) έχουν χρησιμοποιηθεί για την κλινική αξιολόγηση των αποθηκών των πολυμορφοπύρηνων παλαιότερα. Σήμερα έχουν αντικατασταθεί με την χρήση του ανασυνδυασμένου G-CSF που προκαλεί σε θεραπευτικές δόσεις αύξηση των πολυμορφοπύρηνων στο αίμα σαν αποτέλεσμα τόσο διέγερσης της κοκκιοποίησης (αύξηση των μιτώσεων στο διαιρούμενο διαμερίσμα καθώς και βράχυνση του χρόνου ωρίμανσης από το MK στο πολυμορφοπύρηνιο από 4-5 μέρες σε κάτω από 1 μέρα) όσο και απελευθέρωσης πολυμορφοπύρηνων από τις αποθήκες του μυελού. Εντούτοις ο G-CSF δεν παρέχει πληροφορίες για τα πολυμορφοπύρηνια της περιθωριακής και κυκλοφορούσας δεξαμενής που δίνονται με τη χορήγηση επινεφρίνης (φυσιολογικά αύξηση των πολυμορφοπύρηνων περίπου κατά 50%).

Πλην των παραπάνω αλλά και άλλων τεχνικών ([^3H]TdR, DF ^{32}p , ^{51}Cr , ^{111}In , μιτωτικός δείκτης) για τη μελέτη του διαιρούμενου διαμερίσματος της κοκκιδώδους σειράς και την μελέτη της κινητικής της, πληροφορίες για την παραγωγή μπορεί να δοθούν με τη μέτρηση της λυσοζύμης (κυρίως για τη αξιολόγηση της μονοκυτταρικής σειράς) ή της τρανσκοβαλαμίνης I (μεγαλύτερη παρουσία στα ώριμα κύτταρα, υψηλή σε ΧΜΛ, πολυκυτταραιμία, λευκοκυττάρωση σε φλεγμονές).

Αρκετές πληροφορίες μπορεί να δοθούν με την *in vitro* ανάπτυξη των CFU-GM αν και οι πληροφορίες αφορούν την σχετική συγκέντρωσή τους στα μυελικά κύτταρα και όχι τον ολικό αριθμό τους. Τα κυκλοφορούνται CFU-GM στο αίμα μάλλον αντανakλούν την κατανομή παρά την παραγωγή τους. Η αναστολή της ανάπτυξης *in vitro* πιθανόν να βοηθά στην επιβεβαίωση της υποψίας ύπαρξης αντιπολυμορφοπυρηνικών αντισωμάτων.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Dreyfus B. Hematologie, Flammarion, Paris, 1987.
2. Hoffbrand AV, Pettit JE, Moss PAH. Essential Haematology, 4th Edition, Blackwell Scientific Publ. London, 2001.
3. Testa NG, Molineux G. Haemopoiesis. A practical approach. IRL Press. Oxford University Press, 1993.
4. Beutler E, Lichtman MA, Coller BS, KIPps TJ, Seligsohn U. Williams Hematology, McGraw-Hill Publishing Company, 6th Edition, New York, 2001.

5. Wintrobe MM. Clinical Hematology, 8th edition, Lea and Febinger, New York, 1991.
6. Γιαταγάνας Ξ. Αιμοποιητικό σύστημα-Λευκά αιμοσφαίρια. Κοκκιώδης σειρά. Στο: Αξιολόγηση των εργαστηριακών εξετάσεων. Εκδόσεις Π.Χ. Πασχαλίδης, Αθήνα 1997, σελ 44-56.
7. Ηλιόπουλος Γ. Φυσιολογία και φυσιοπαθολογία του αίματος και των αιμοποιητικών οργάνων. Εκδόσεις Π.Χ. Πασχαλίδης, Αθήνα, 1989.
8. Ηλιόπουλος Γ. Αυξητικοί αιμοποιητικοί παράγοντες και αναστολείς της αιμοποίησης. Σεμιν. Εσωτ. Παθολ. 1, 99-110, 1994.
9. Κυριάκου Δ, Αλεξανδράκης Μ, Ηλιόπουλος Γ. Εισαγωγή στην Αιμοποίηση. Ιατρικές Εκδόσεις “Αιμοβιολογική”, Ηράκλειο Κρήτης, 1966.
10. Μελέτης Ι. Από το Αιματολογικό Εύρημα στη Διάγνωση. Εκδόσεις “Νηρέας”, 6^η Έκδοση, Αθήνα, 2003.
11. Μελέτης Ι. Μεταμόσχευση Μυελού των Οστών στην Βαριά Απλαστική Αναμία. Εκδόσεις “Νηρέας”, Αθήνα 1989.
12. Μελέτης Ι. Άτλας Αιματολογίας. Εκδόσεις “Νηρέας”, Αθήνα 2000.
13. Μελέτης Ι, Μελέτης Χρ. Σαμάργκος Μ, Γιαταγάνας Ξ, Λουκόπουλος Δ. CDROM Άτλας Αιματολογίας. Εκδόσεις “Νηρέας”, Αθήνα 1996.
14. Μελέτης Ι, Μελέτης Χρ. CDROM Αιματολογία-Διαγνωστική Προσέγγιση. Εκδόσεις “Νηρέας”, Αθήνα 1998.
15. Μελέτης Ι. Απλαστική αναμία. Εκδόσεις “Ζήτα”, Αθήνα 1998.
16. Μελέτης Ι. Αιμοποιητικό σύστημα-Ερυθροκύτταρα. Στο Αξιολόγηση των εργαστηριακών εξετάσεων. Εκδόσεις Π.Χ. Πασχαλίδης, Αθήνα 1997, σελ. 19-43.

ΕΡΩΤΗΣΕΙΣ

- A.** Ποια κύτταρα της κοκκιώδους σειράς αποτελούν το διαιρούμενο και το μη-διαιρούμενο/ωριμάζον διαμέρισμα στο μυελό των οστών;
- B.** Στη συνήθη πρακτική ποια είναι η δεξαμενή των πολυμορφοπύρηνων που μετρώνται κατά στη γενική αίματος;
- Γ.** Ποιες μεταβολές προκαλούν στην κινητική των πολυμορφοπύρηνων τα κορτικοειδή, η ενδοτοξίνη και η αδρεναλίνη;
- Δ.** Αναφέρατε μόρια προσκόλλησης που επηρεάζουν την συμπεριφορά των πολυμορφοπύρηνων.
- Ε.** Πως γίνεται η εκτίμηση της κοκκιοποίησης από τα επιχρίσματα του μυελού των οστών;