

Ο φυσιολογικός μυελός των οστών

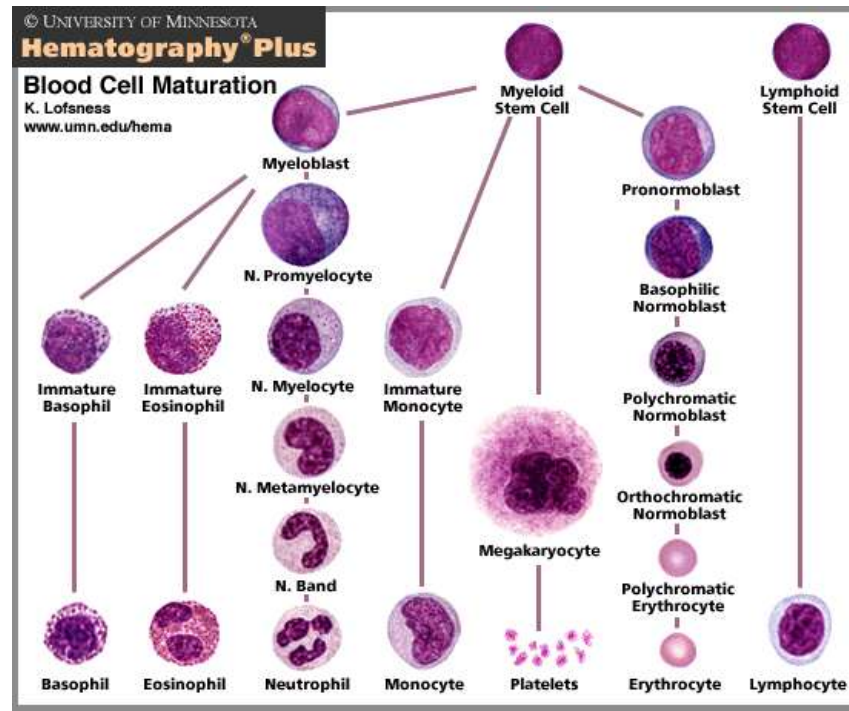
Κατερίνα Ψαρρά

Τμήμα Ανοσολογίας - Ιστοσυμβατότητας

Γ.Ν.Α. "Ο Ευαγγελισμός"

ΜΥΕΛΟΣ ΤΩΝ ΟΣΤΩΝ

- πολύπλοκος
- όλες οι κυτταρικές σειρές από αρχέγονο αδιαφοροποίητο κύτταρο μέχρι ώριμο



Μελέτη μυελού των οστών

- Μορφολογία (χρώσεις May Grunwald Giemsa - Wright Giemsa)
- Κυτταροχημικές χρώσεις (ενζυματικές αντιδράσεις)
- Gold standard



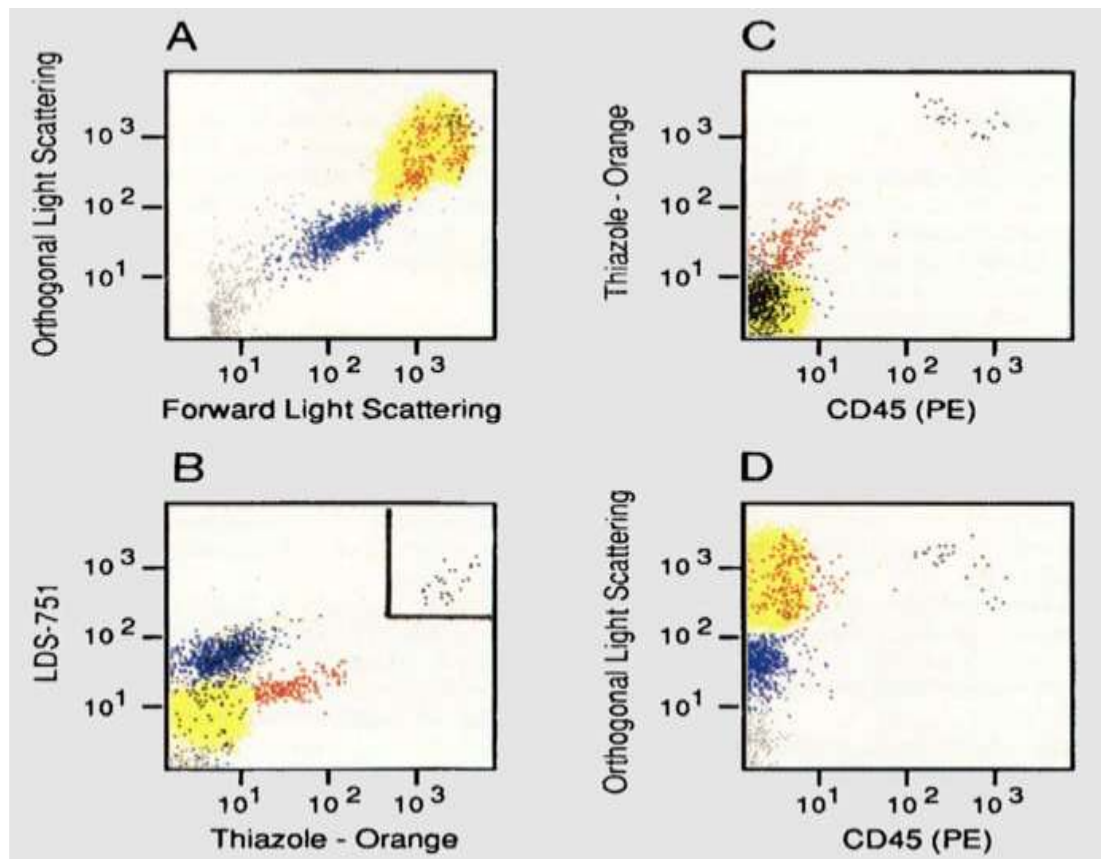
Μέχρι την εμφάνιση της ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΙΑΣ

Cytometry 9:548-556 (1988)

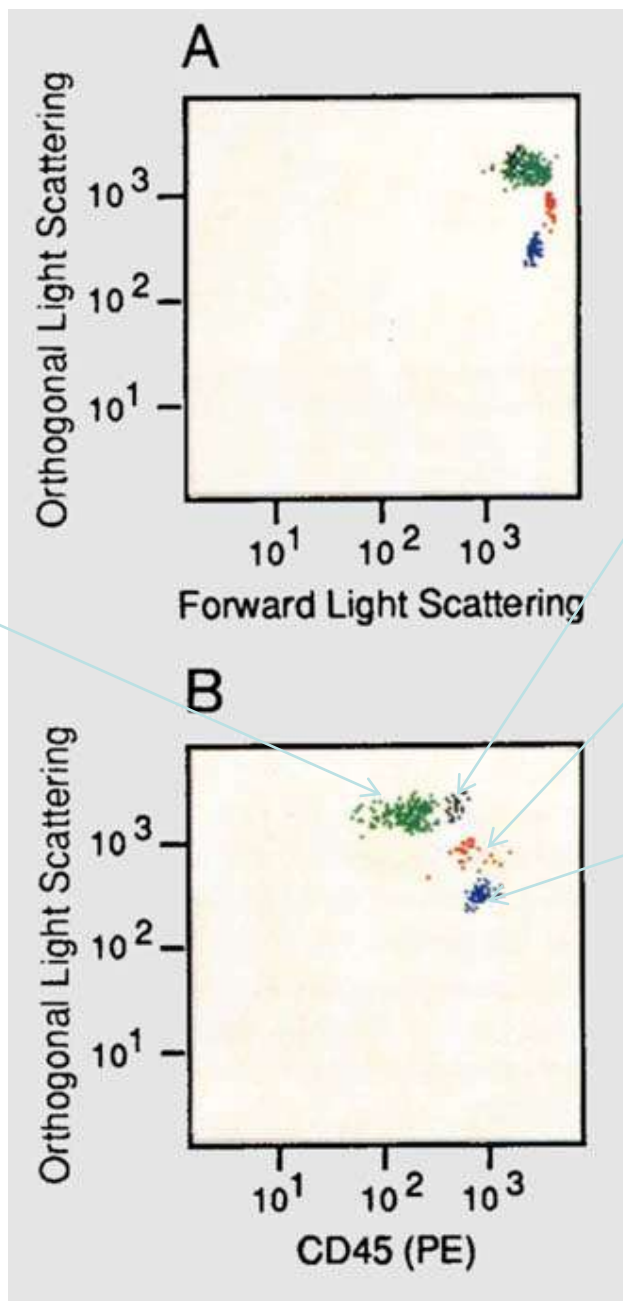
*Five-Dimensional Flow Cytometry as a
New Approach Blood and Bone Marrow
Differentials*

Leon W.M.M. Terstappen and
Michael R. Loken

Περιφερικό αίμα



κοκκιοκύτταρα

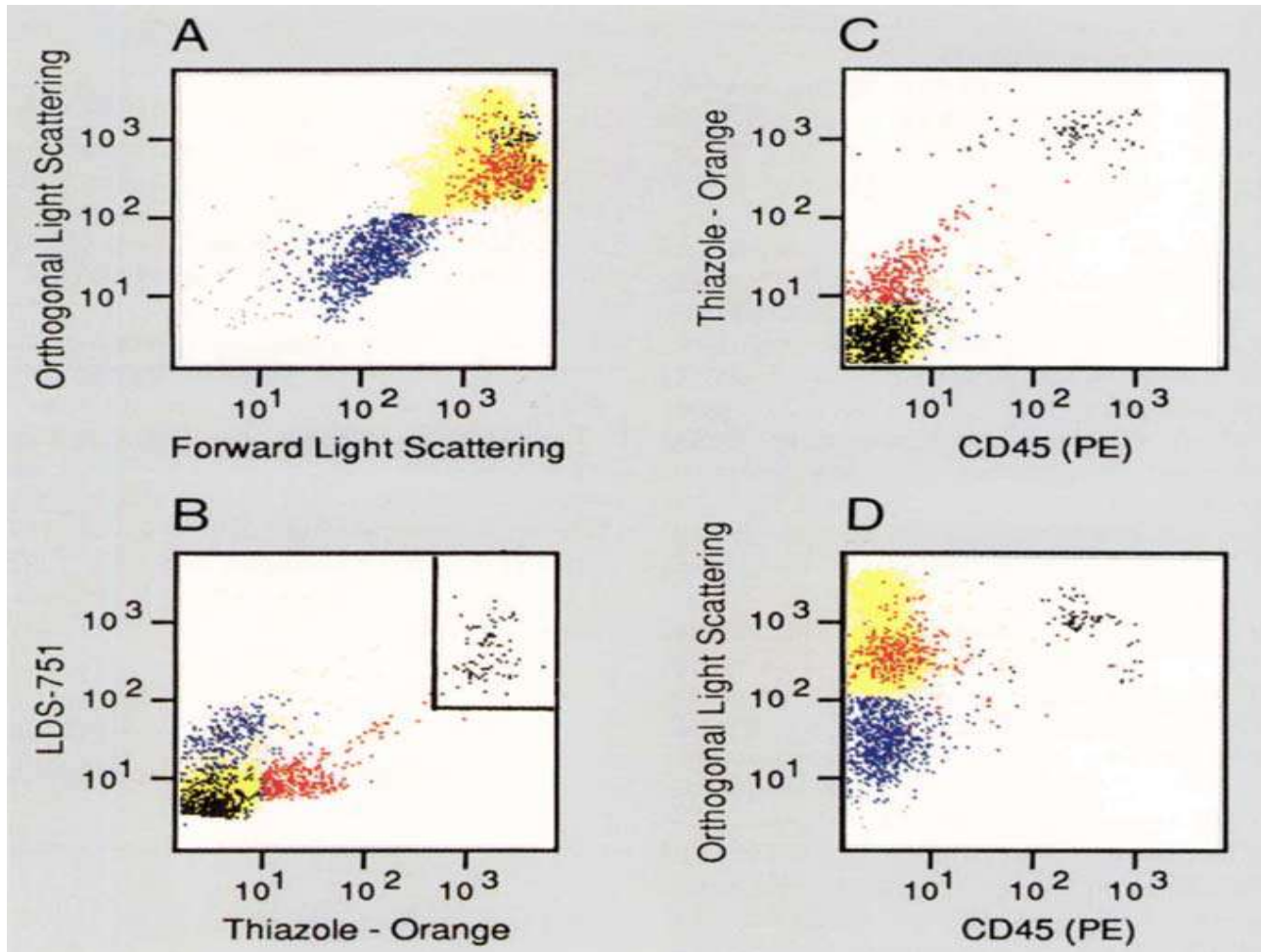


ηωσινόφιλα

μονοκύτταρα

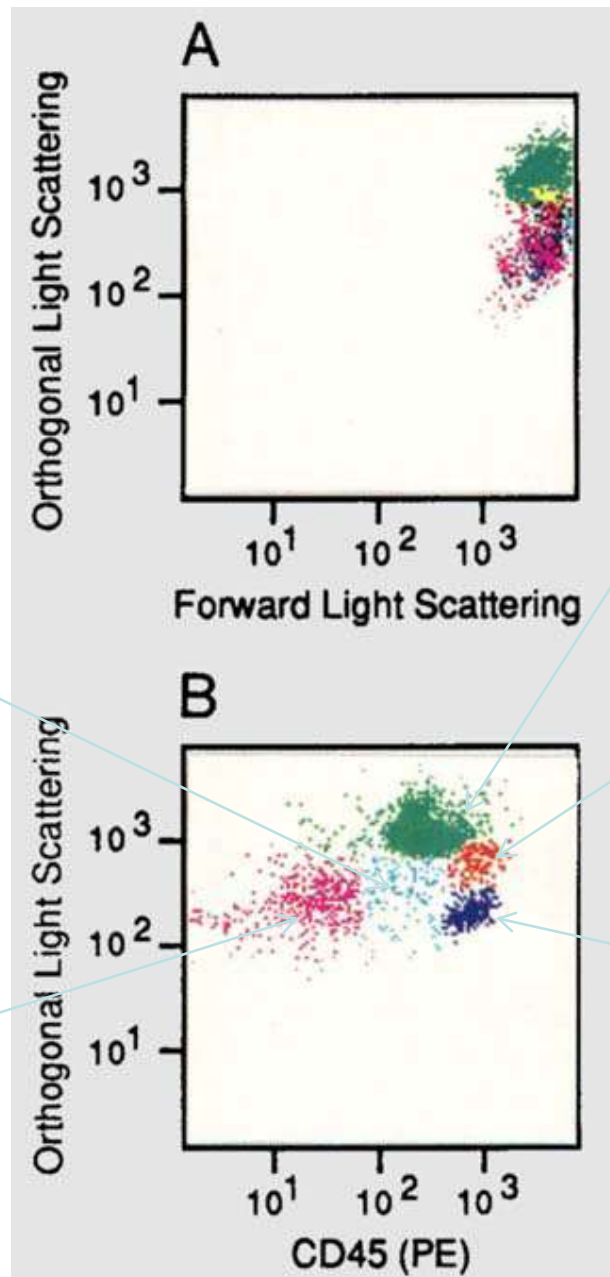
λεμφοκύτταρα

Μαύρο = εμπύρηννα κύτταρα



Άωρα κύτταρα

Ερυθρά σειρά



κοκκιοκύτταρα

μονοκύτταρα

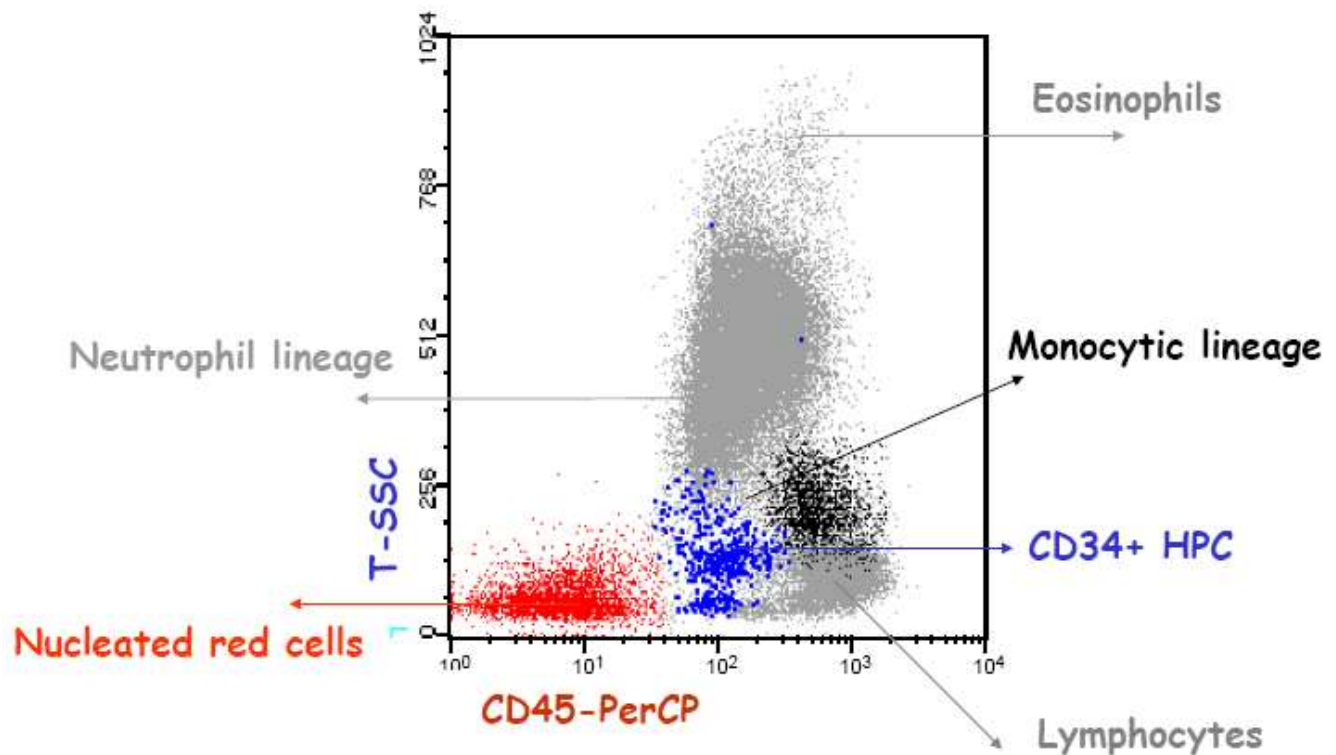
λεμφοκύτταρα

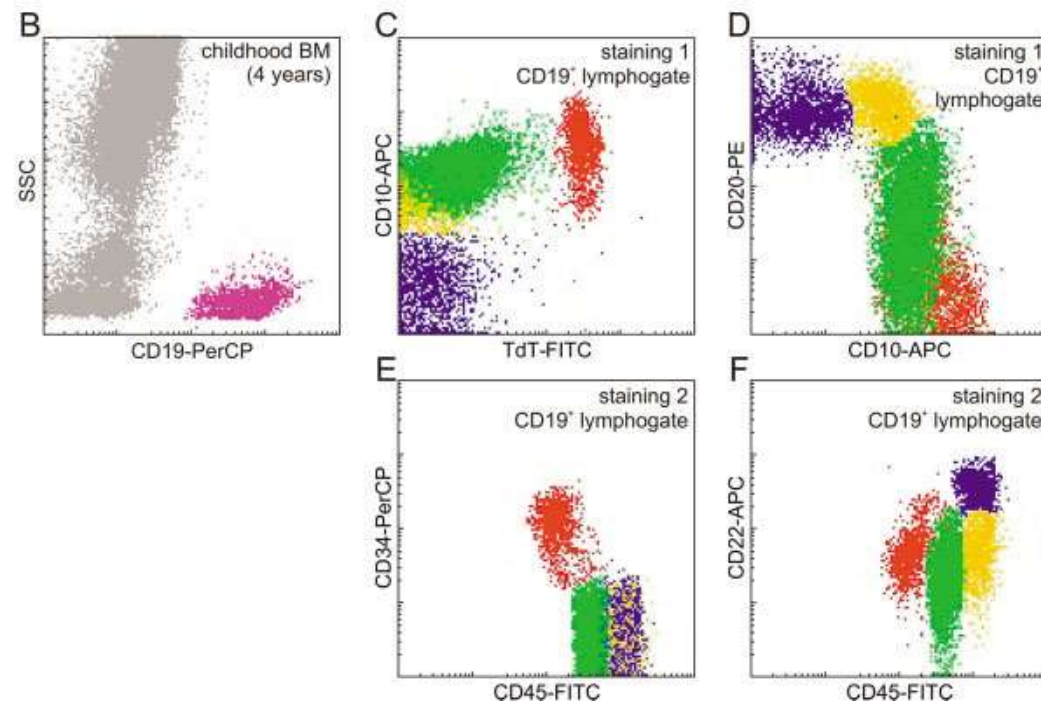
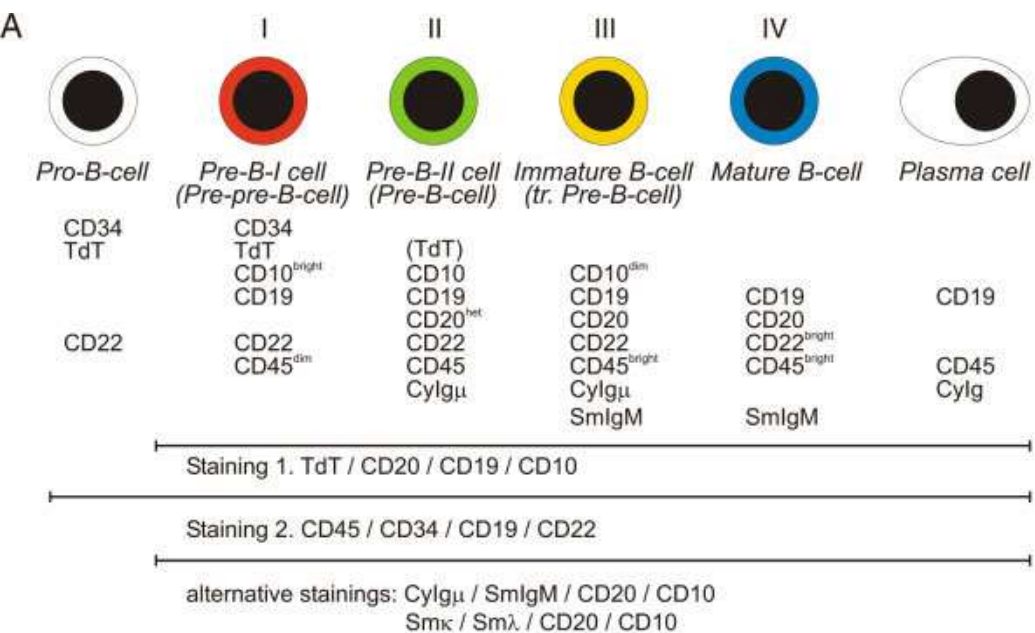
Αίτια παθολογικής κατανομής κυτταρικών σειρών στο ΒΜ

- Αναστολή διαφοροποίησης
- Αναγέννηση ΒΜ ή αυξημένος πολλαπλασιασμός μετά από ανοσοκαταστολή, λοίμωξη, ή περιφερική απομάκρυνση κυττάρων
- Δυσπλασία σε μια ή περισσότερες σειρές
- Επέκταση νεοπλασματικών αιμοποιητικών κυττάρων

Γιατί πρέπει να γνωρίζουμε το φυσιολογικό μυελό;

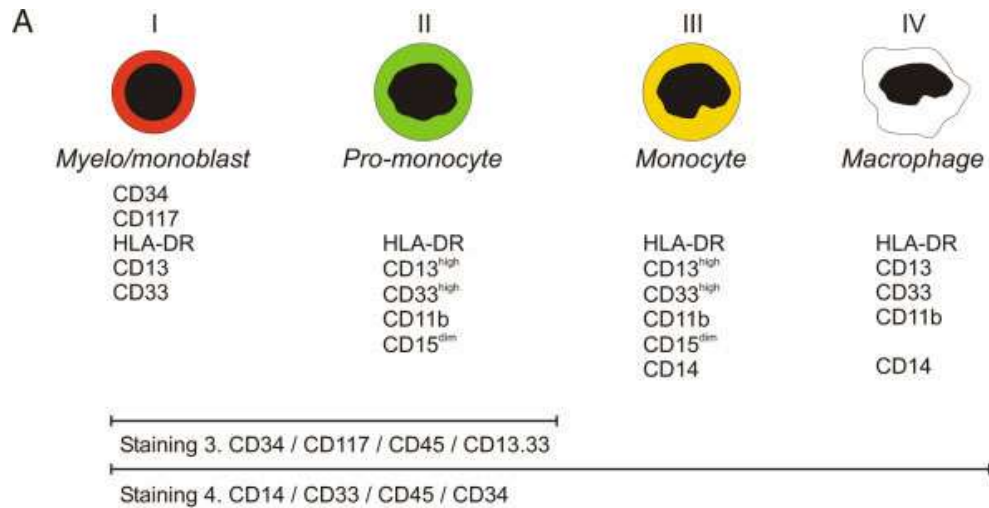
- Για να αναγνωρίζουμε την παθολογική κατανομή κυτταρικών σειρών



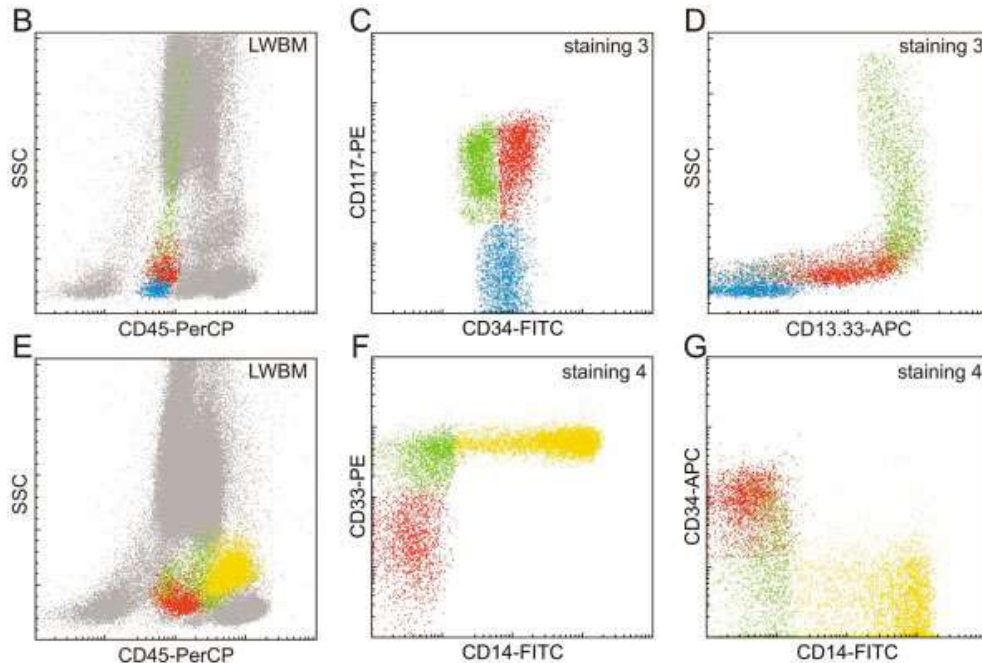


διαφοροποίηση Β
λεμφοκυτταρικής
σειράς

E.G. van Lochem et al
Cytometry 2004



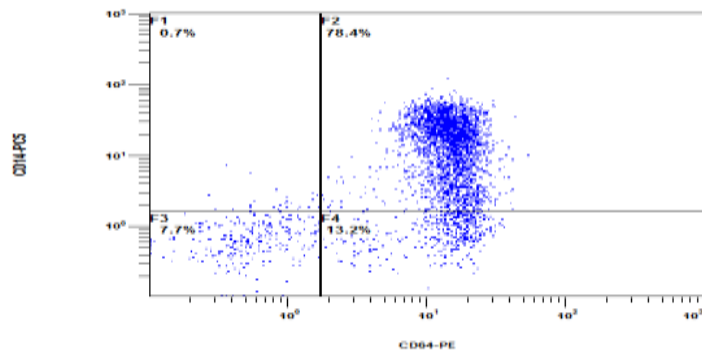
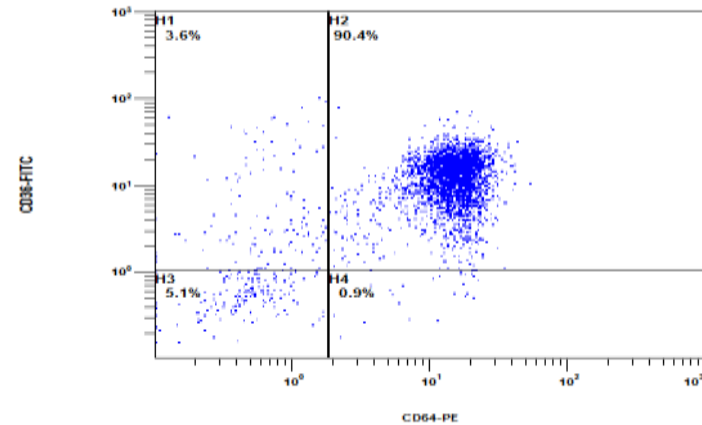
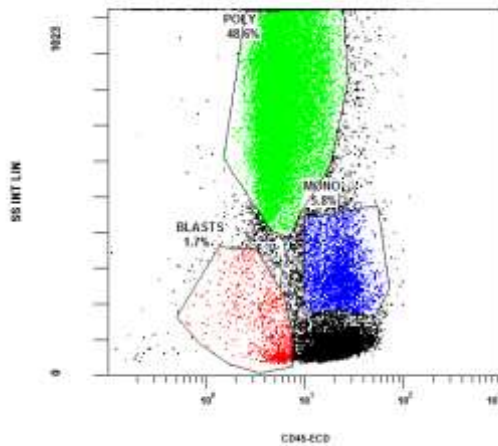
Διαφοροποίηση μονοκυτταρικής σειράς

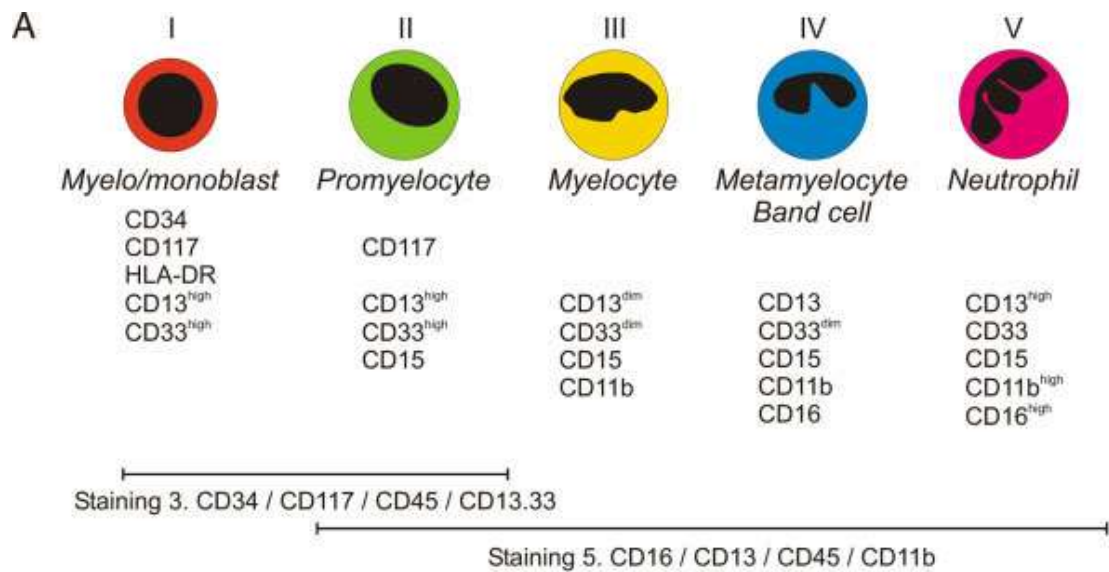


E.G. van Lochem et al
Cytometry 2004

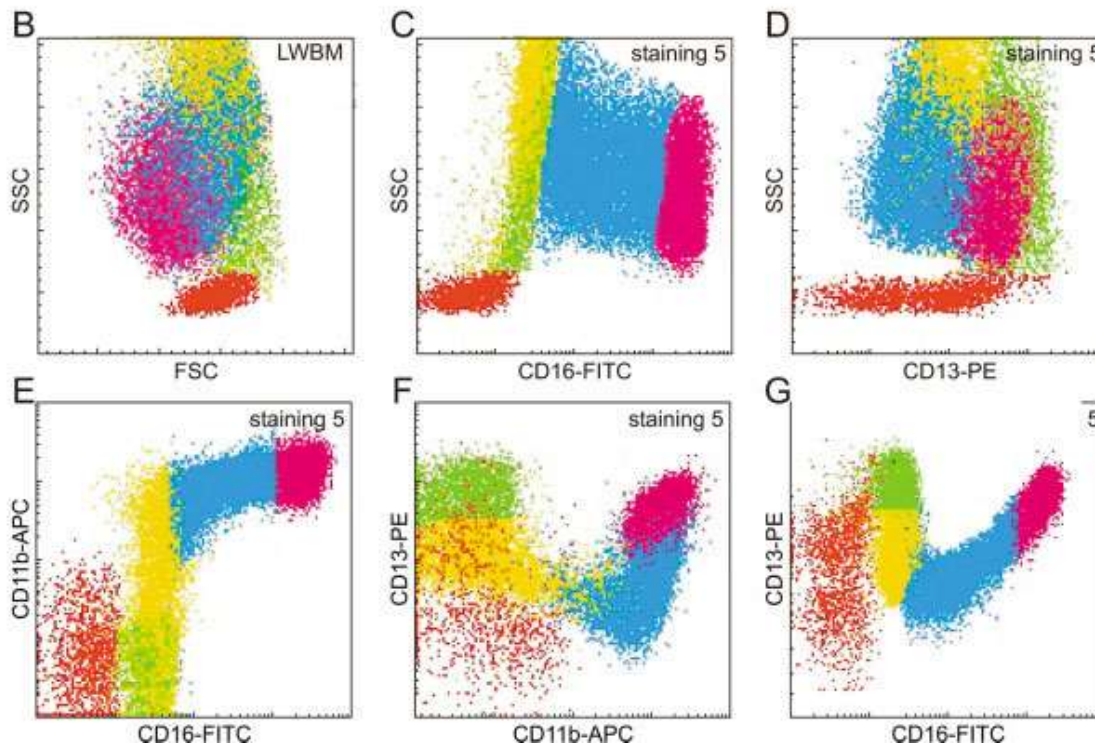
Πρόσθετα αντιγόνα για τη μελέτη της μονοκυτταρικής σειράς

- CD64, CD36, CD4 (weak), CD14



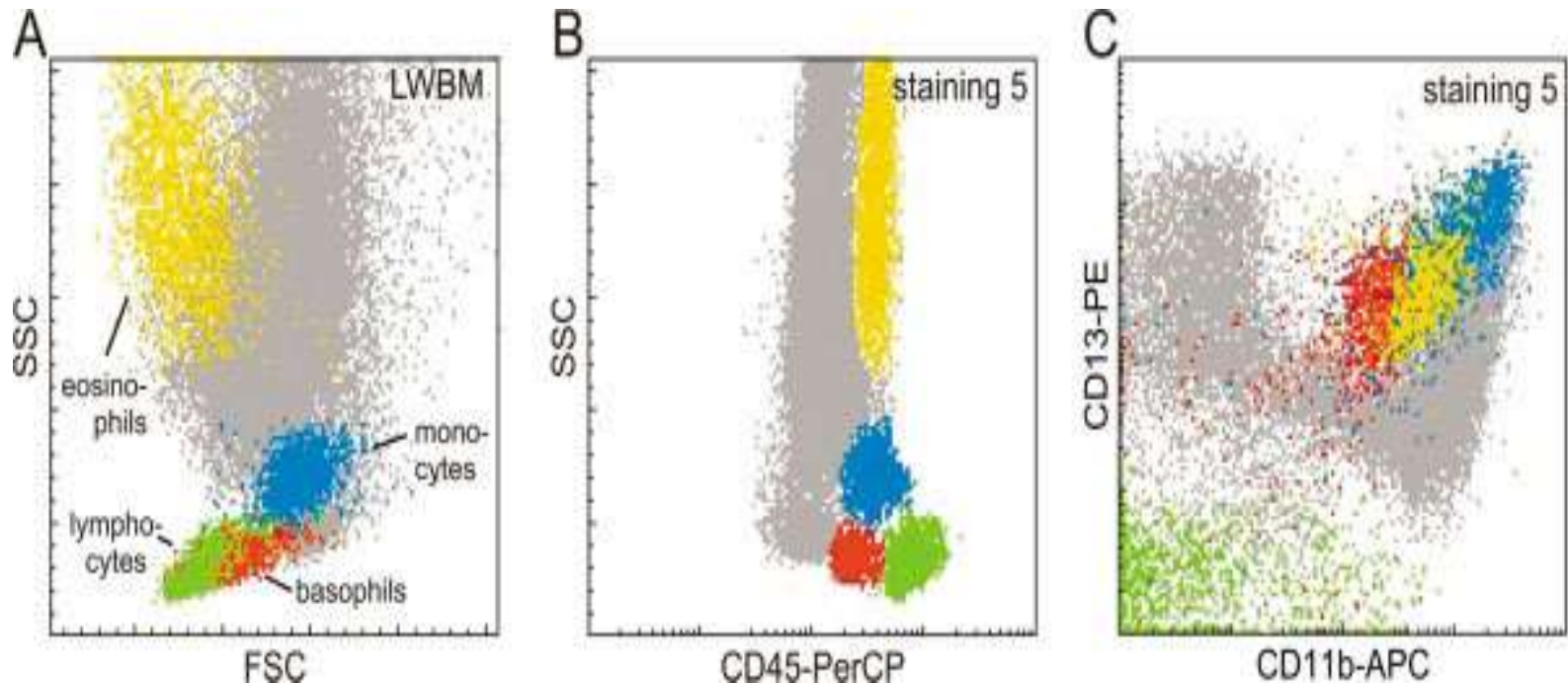


διαφοροποίηση
σειράς
κοκκιοκυττάρων



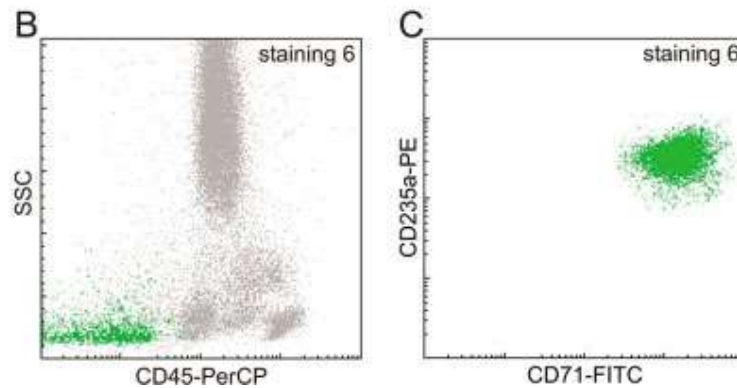
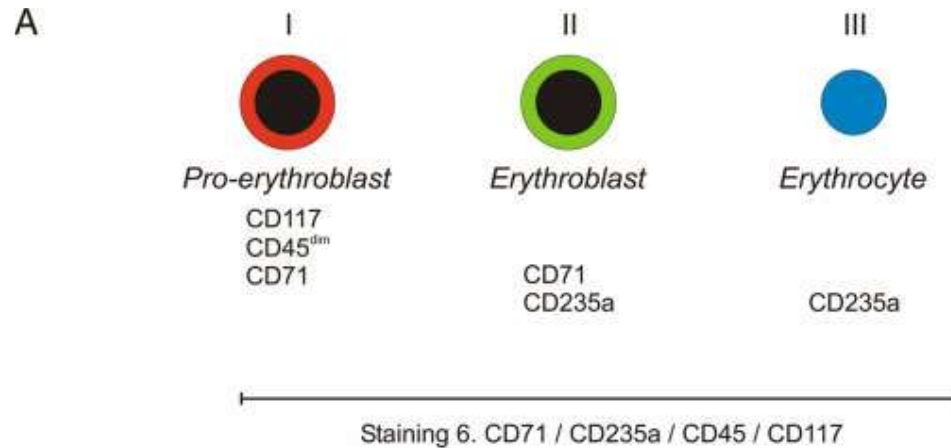
E.G. van Lochem et al
Cytometry 2004

βασεόφιλα, ηωσινόφιλα, μονοκύτταρα σε ασθενή με CML

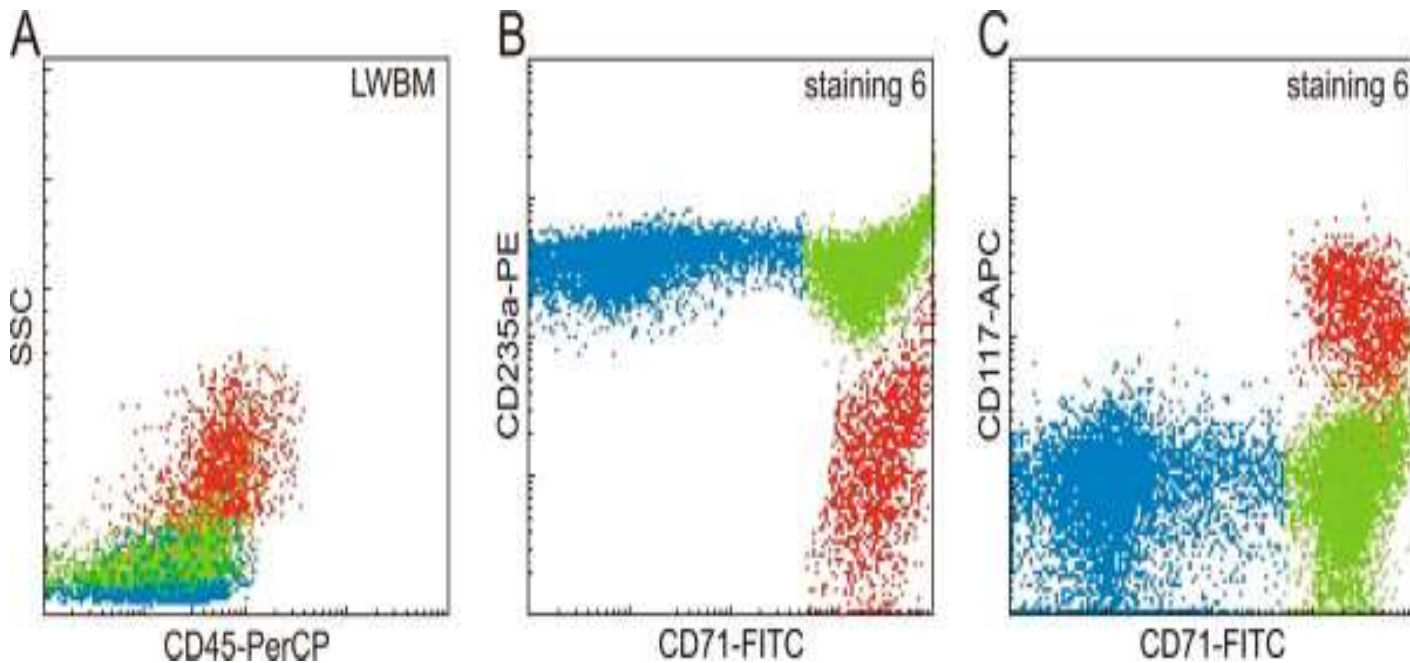


E.G. van Lochem et al Cytometry 2004

διαφοροποίηση ερυθράς σειράς



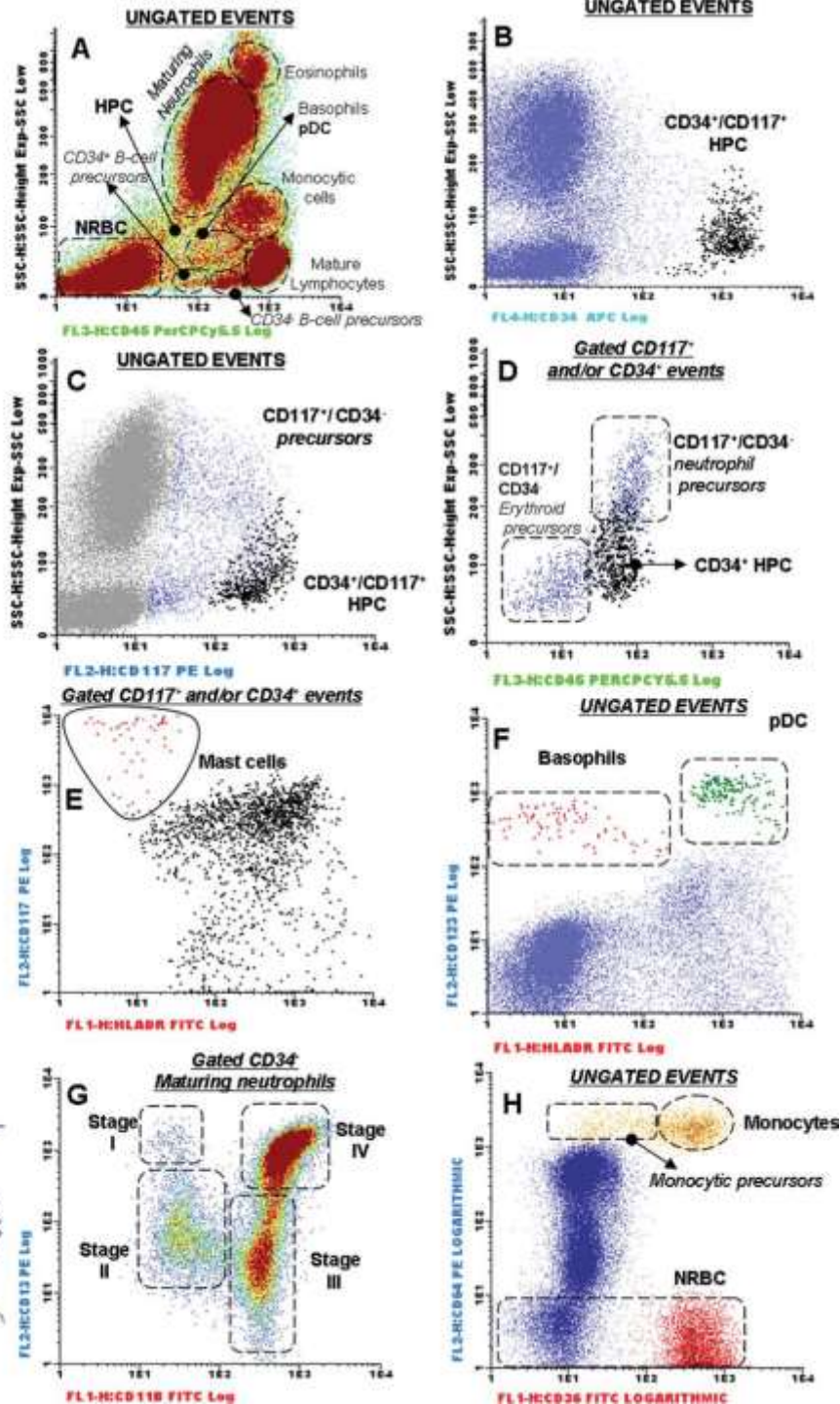
διαφοροποίηση ερυθράς σειράς



Ποσοστά αώρων κυττάρων στο φυσιολογικό BM

CD34+ σύνολο	0,8±0,3 (0,2-1,6%)
CD34-CD117+	1,0±0,8 (0-2%)
	34% ερυθρά σειρά
	62% μυελική σειρά

Πίνακας 1 S. Matarraz et al Cytometry B 2010



Στικτογράμματα που δείχνουν τα διάφορα διαμερίσματα

- προγονικών,
- ωριμαζόντων
- ωρίμων

κυττάρων των αιμοποιητικών σειρών στο φυσιολογικό ΒΜ

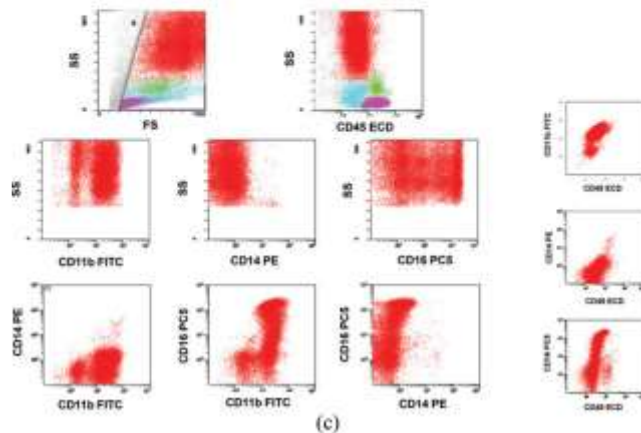
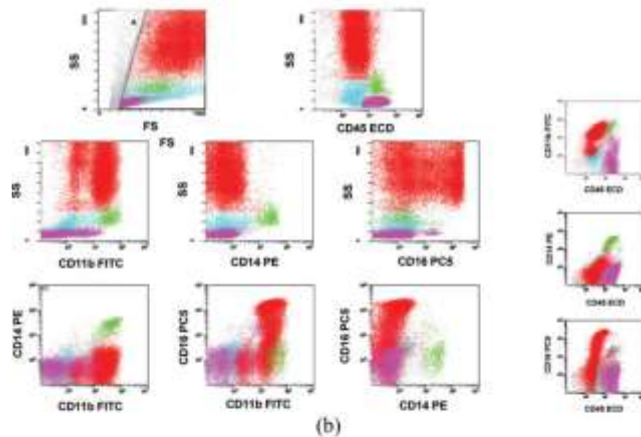
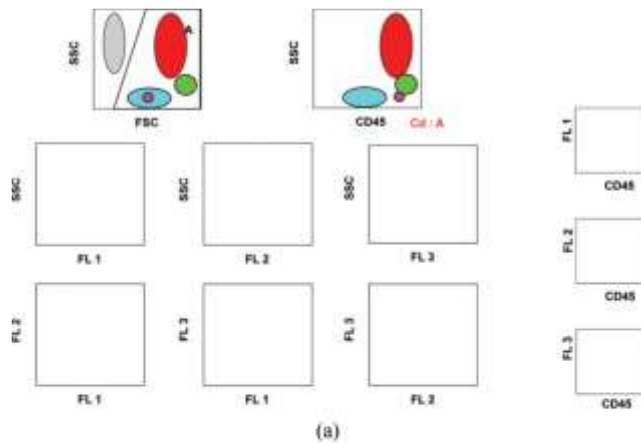
S. Matarraz et al
Cytometry B 2010

Η προσέγγιση κατά GEIL και GTLLF

Table 1. Antibody Combinations Used for the Analysis of Normal Human Bone Marrow

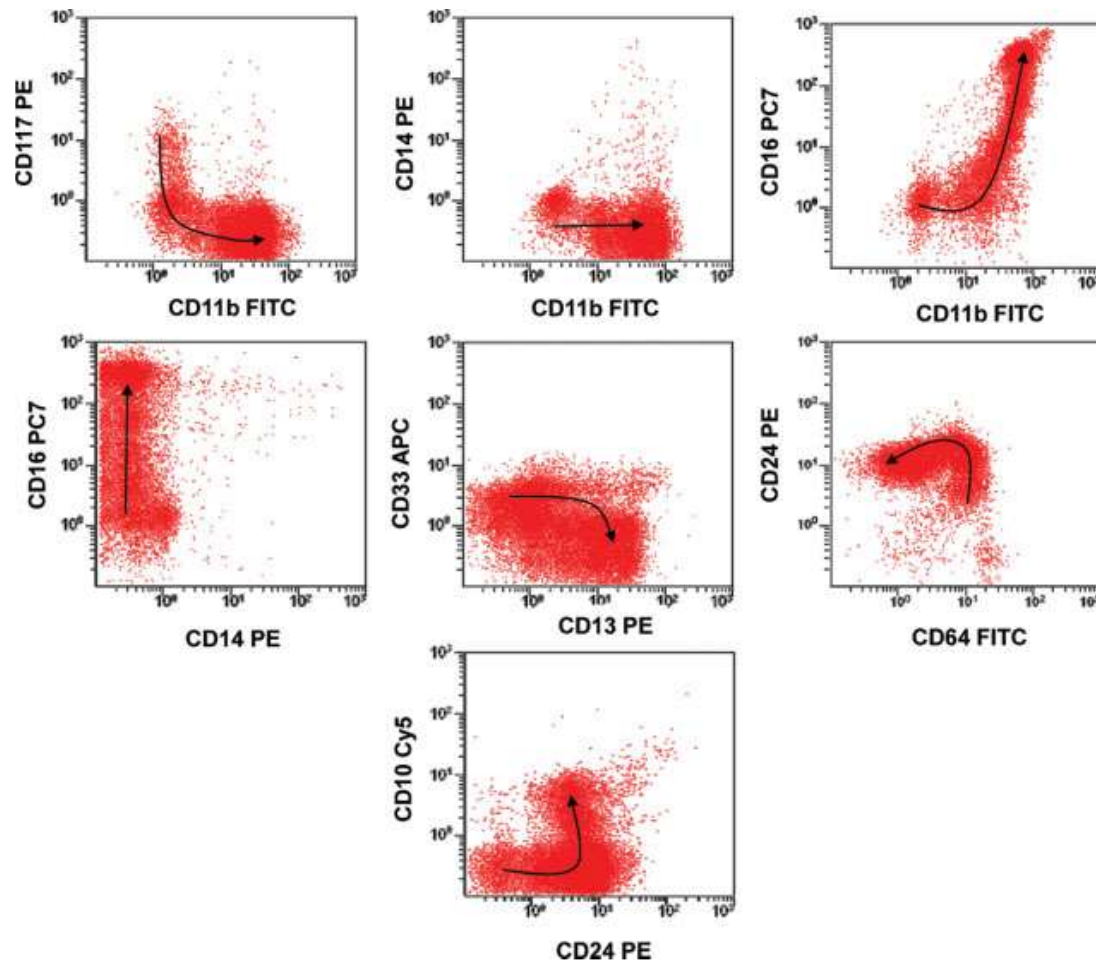
Combination number	Color 1 ^a	Color 2 ^a	Color 3 ^a	CD45
1	CD11b	CD14	CD16	CD45
2	CD11b	CD117	CD34	CD45
3	CD36	CD13	CD33	CD45
4	CD34	CD13	CD33	CD45
5	CD38	DR	CD34	CD45
6	CD38	CD10	CD19	CD45
7	DR	CD117	CD34	CD45
8	CD34	CD56	CD19	CD45
9	CD64	CD24	CD10	CD45
10	CD7	CD117	CD34	CD45
11	CD22	CD10	CD20	CD45
12	CD4	CD2	CD56	CD45

a The colors indicated are not necessarily related to fluorochrome excitation wavelengths, as shown in Table 2.



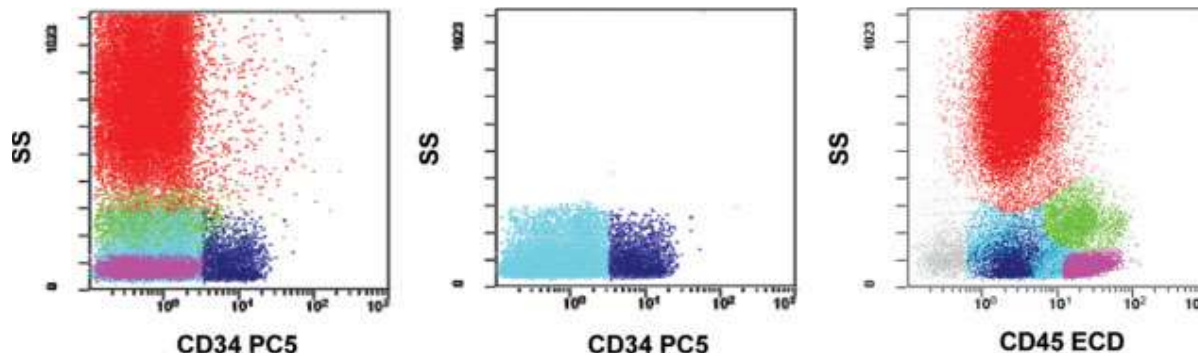
- Έδωσαν χρώμα στον κάθε υποπληθυσμό, αφού έκαναν gate στα ζωντανά κύτταρα.
- Ό,τι περίσσεψε από λεμφοκύτταρα, μονοκύτταρα, κοκκιοκύτταρα η αχαρτογράφητη περιοχή των «**βερμούδων**»

Ωρίμανση κοκκιοκυττάρων



C. Arnoulet et al Cytometry
2010

CD34+ κύτταρα στο βλαστικό παράθυρο - «βερμούδες»



Υπάρχουν και CD34- κύτταρα στις
«βερμούδες»

C. Arnoulet et al Cytometry
2010

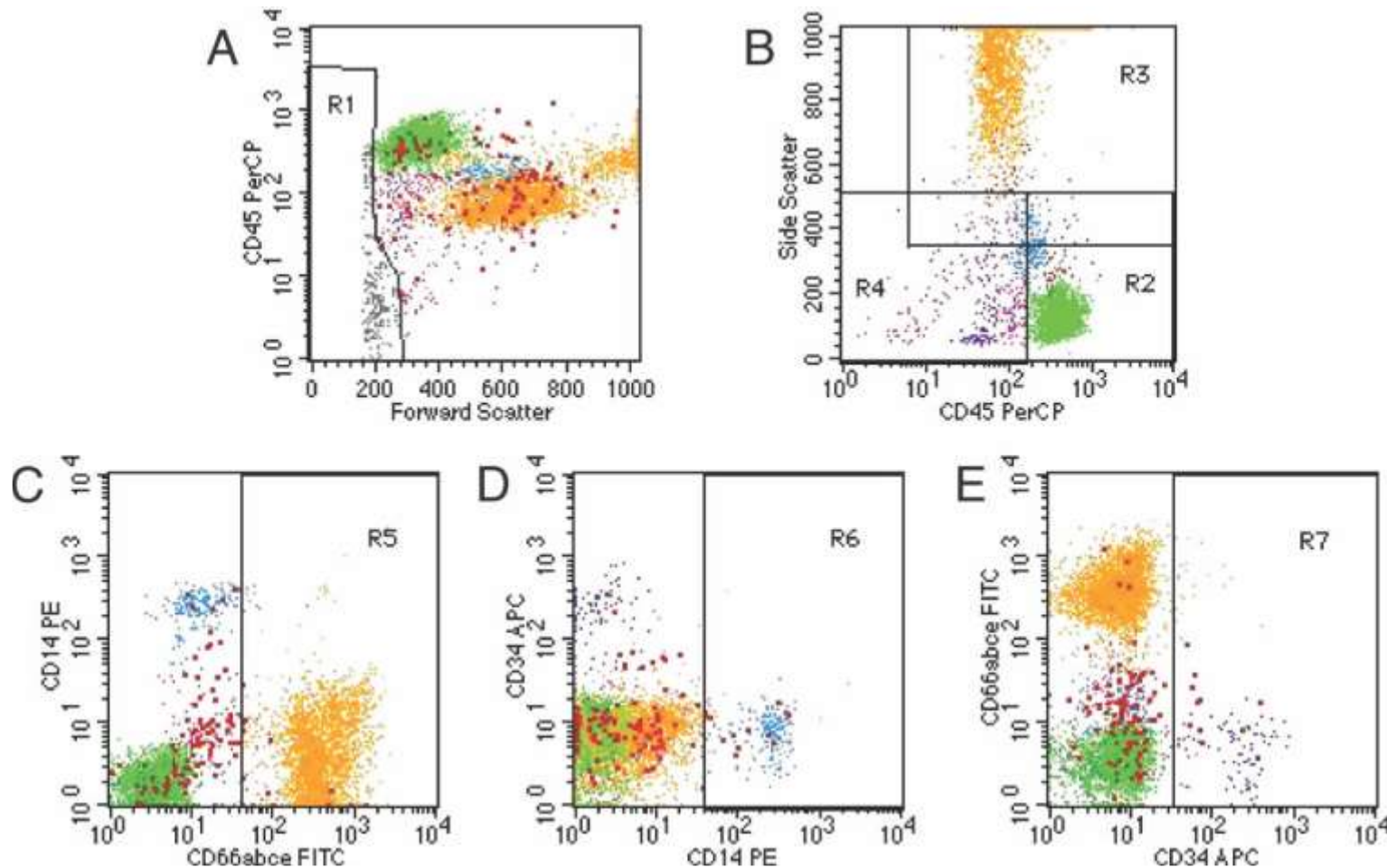
Κατανομή κυττάρων στο φυσιολογικό ΒΜ

Table 1. Immunophenotypic Definitions and Gating Strategy to Define the Various Leukocyte Populations Present in Bone Marrow

Population ^a		Parameter					
		FSC	SSC	CD45	CD66	CD14	CD34
Lymphocytes (green)	Definition:	int./hgh	low	pos	neg	neg	neg
	Gate:	not R1		R2	not R5	not R6	not R7
Monocytes (blue)	Definition:	int./hgh	low/int.	dim/pos	–	pos	neg
	Gate:	not R1		R2 or R4	–	R6	not R7
Mature myeloid (orange)	Definition:	int./hgh	int./high	dim	pos	–	neg
	Gate:	not R1		R3	R5	–	not R7
Immature CD34– (pink)	Definition:	int./hgh	low/int.	neg/dim	neg	neg	neg
	Gate:	not R1		R4	not R5	not R6	not R7
Immature CD34+ (purple)	Definition:	int./hgh	low/int.	neg/dim	neg	neg	pos
	Gate:	not R1		R4	not R5	not R6	R7

a Colors correspond to the dot plots in Figure 1. The depicted red-colored dots in all dot plots are remaining cells that were excluded from the definitions of the analysis.

Κατανομή κυττάρων στο φυσιολογικό ΒΜ



Μέθοδος Holdrinet et al

Bonemarrow purity =

[1-

(erythrocytes_{BM}/erythrocytes_{PB})
x (leukocytes_{PB}/leukocytes_{BM})]

x 100%

Προσπάθεια διόρθωσης αιμοαραίωσης

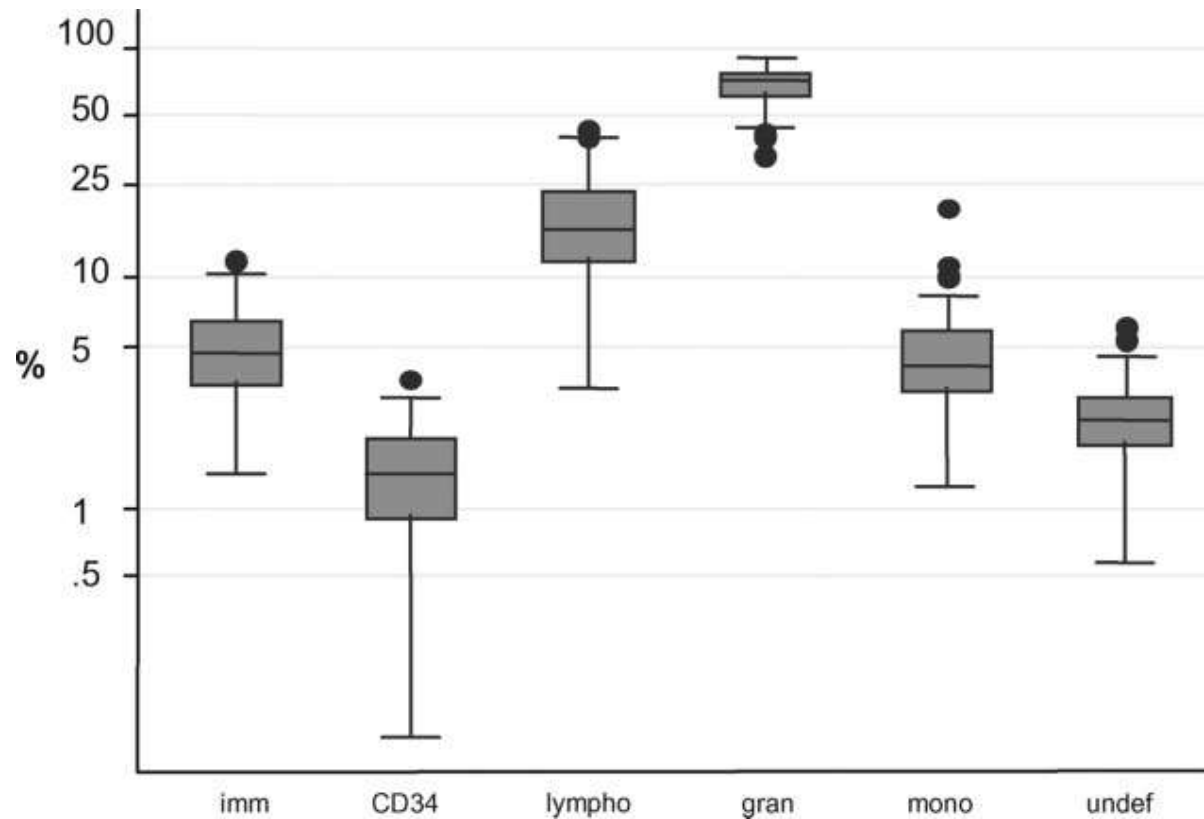
Κατανομή κυττάρων στο φυσιολογικό ΒΜ

Table 2. Reference Values of Leukocyte Populations Present in Bone Marrow Aspirates of Healthy Individuals

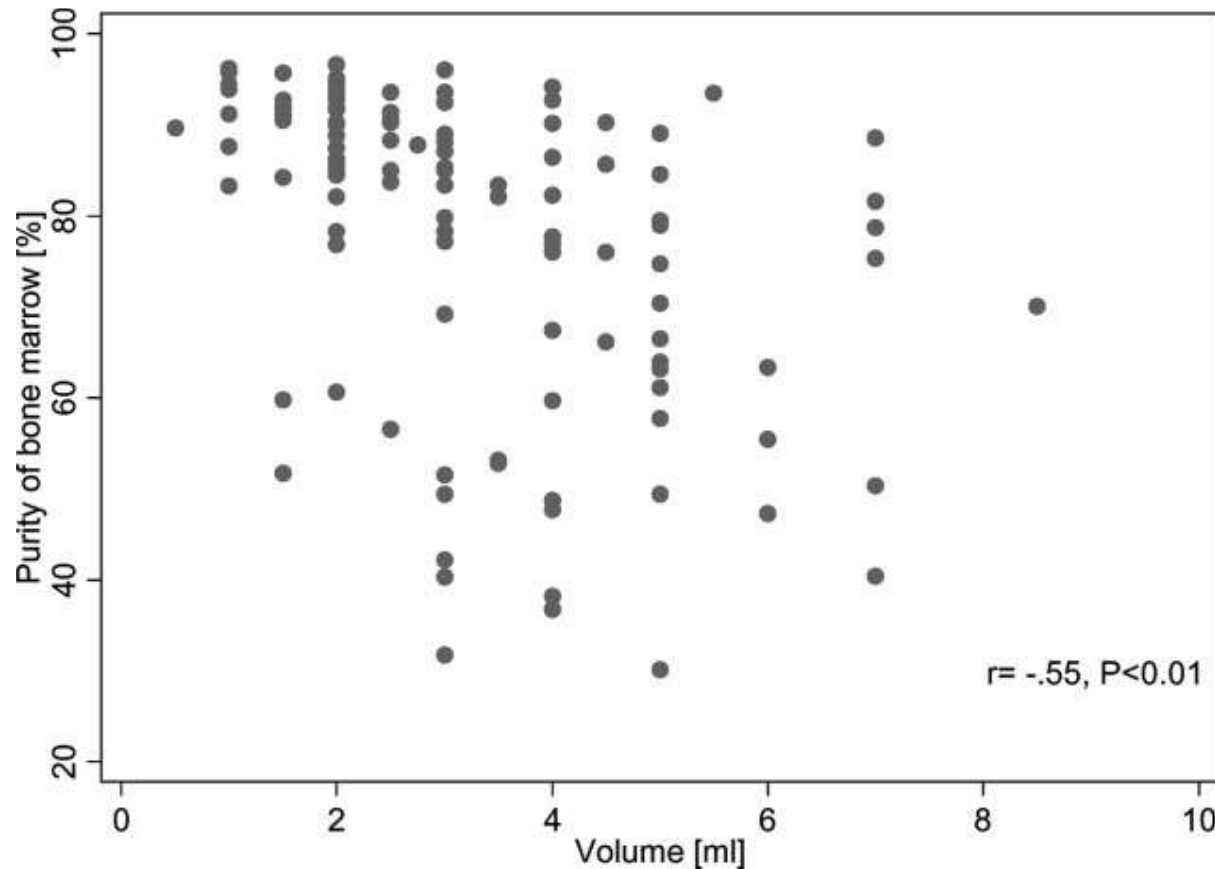
Cell type	n ^a	Min.	P5	Median	P95	Max.	Mean	SD
CD34+ cells	78	0.1	0.7	1.8	2.8	3.6	1.8	0.7
Immature cells	78	2.4	2.5	5.9	9.2	10.5	5.9	2.0
Lymphocytes	78	3.3	5.7	13.4	25.0	30.9	14.2	5.8
Granulocytes	78	53.9	59.5	73.7	85.5	91.0	73.4	7.6
Monocytes	78	1.3	2.0	3.5	5.8	8.5	3.7	1.2
Remaining cells	78	0.9	1.4	2.5	4.5	18.8	2.8	2.0

a Selected specimens with >80% purity of the bone marrow as determined by the Holdrinet method.

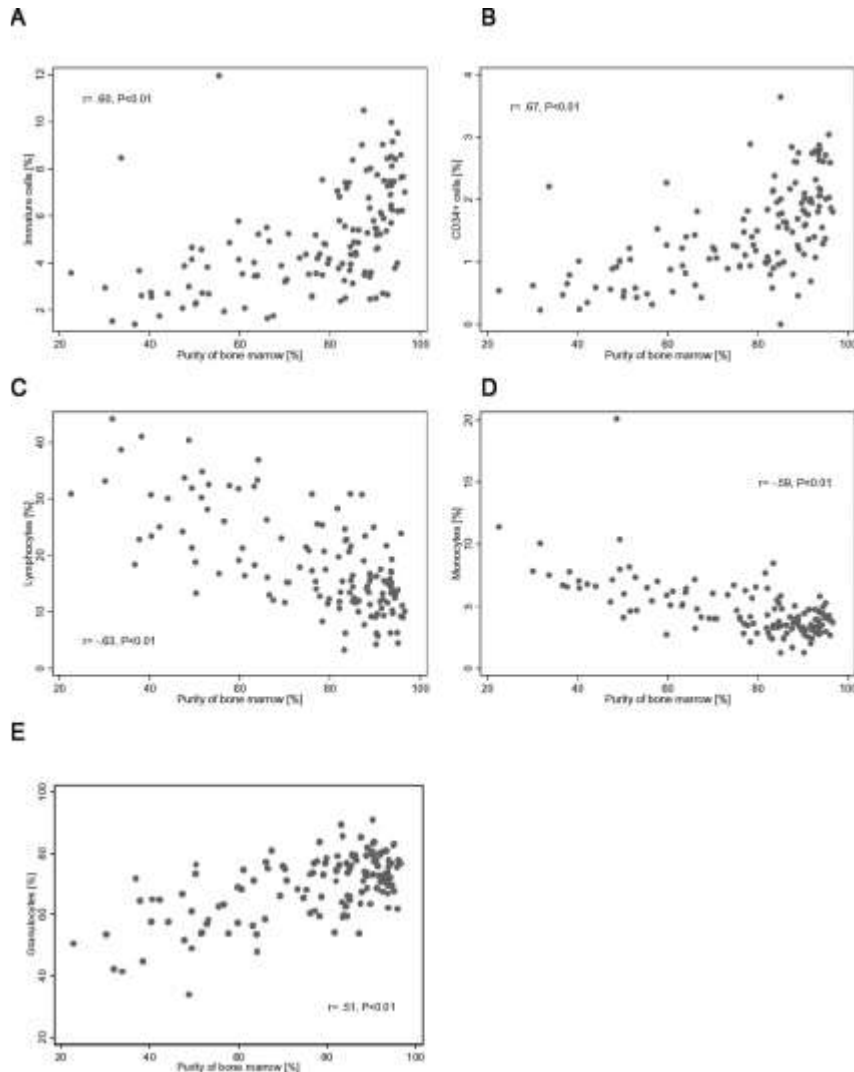
μέσες τιμές λευκοκυτταρικών πληθυσμών στο φυσιολογικό ΒΜ



καθαρότητα ΒΜ ανάλογα με τον όγκο δείγματος



Συσχέτιση καθαρότητας και ποσοστού κυτταρικών υποπληθυσμών στο ΒΜ



- Α άωρα vs καθαρότητα
- Β CD34+ vs καθαρότητα
- Γ λεμφοκύτταρα vs καθαρότητα
- Δ μονοκύτταρα vs καθαρότητα
- Ε κοκκιοκύτταρα vs καθαρότητα

Απόρριψη δείγματος ΒΜ?

Όταν (λεμφοκύτταρα + μονοκύτταρα > 30%)
?????

Το δείγμα ΒΜ είναι πολύτιμο !!!!

Διαδοχικές αναρροφήσεις ΒΜ

Σταδιακή ελάττωση του ποσοστού των

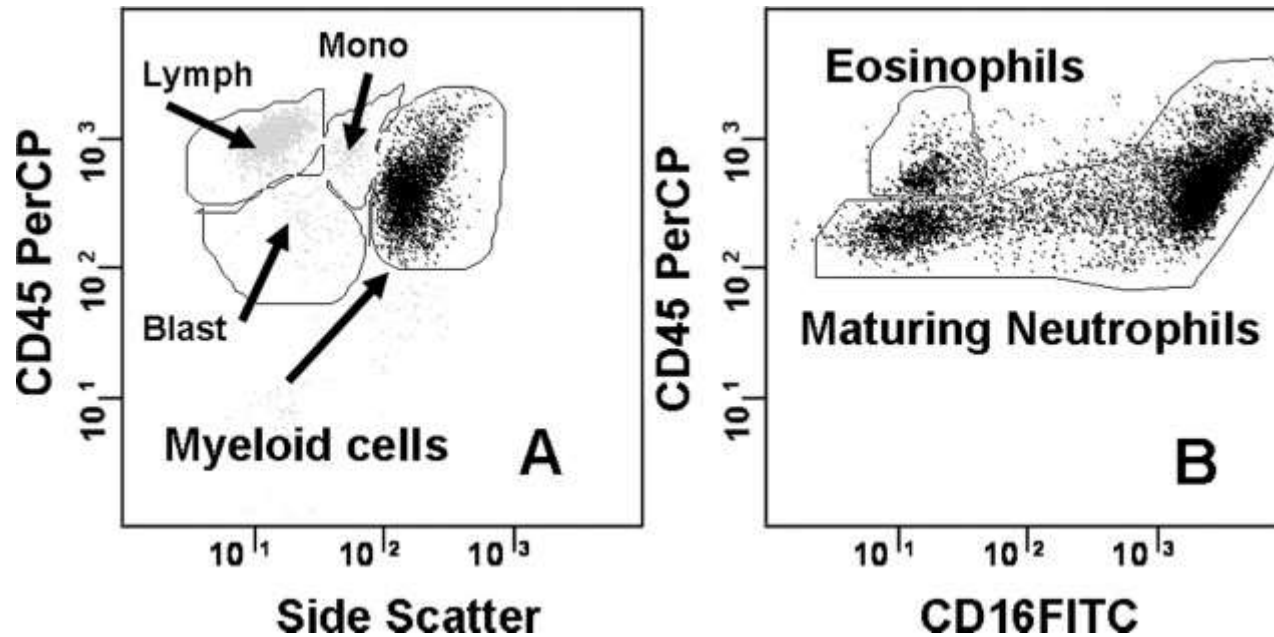
HLADR+ CD11b- κυττάρων

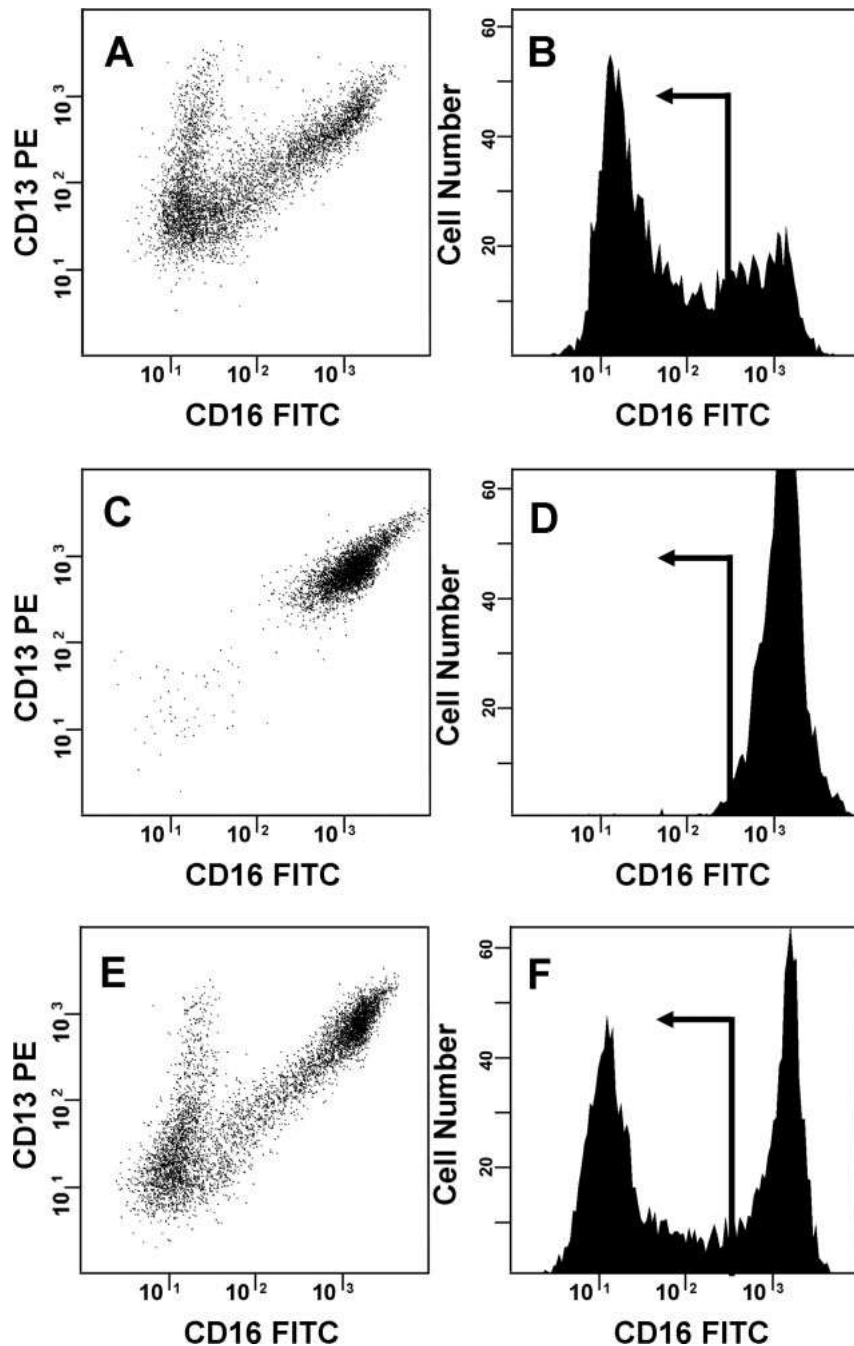
CD34+ HLADR+ κυττάρων

σε όλα τα δείγματα

Σύγκριση οστεομυελικής βιοψίας - στερνικής παρακέντησης

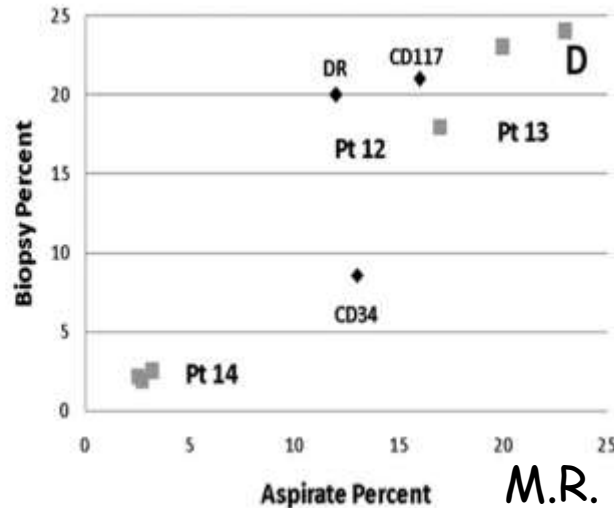
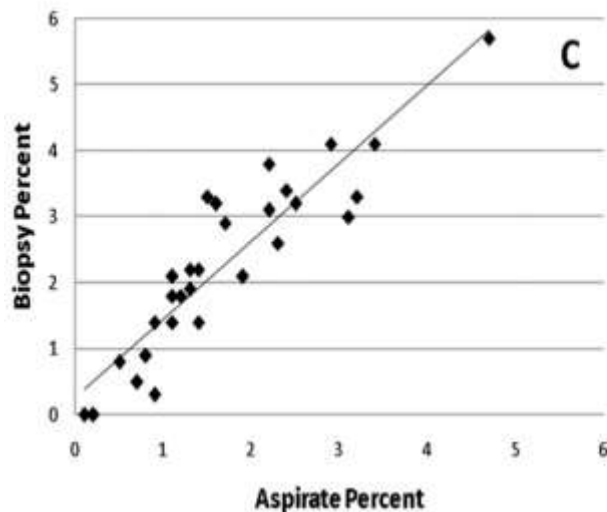
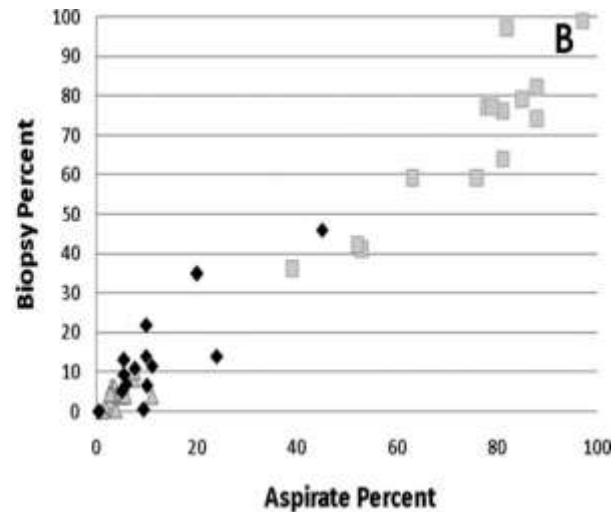
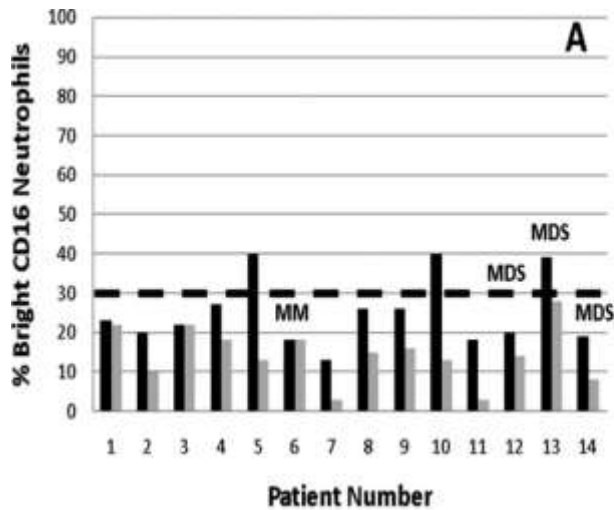
Οριοθέτηση κυττάρων μυελικής σειράς που ωριμάζουν





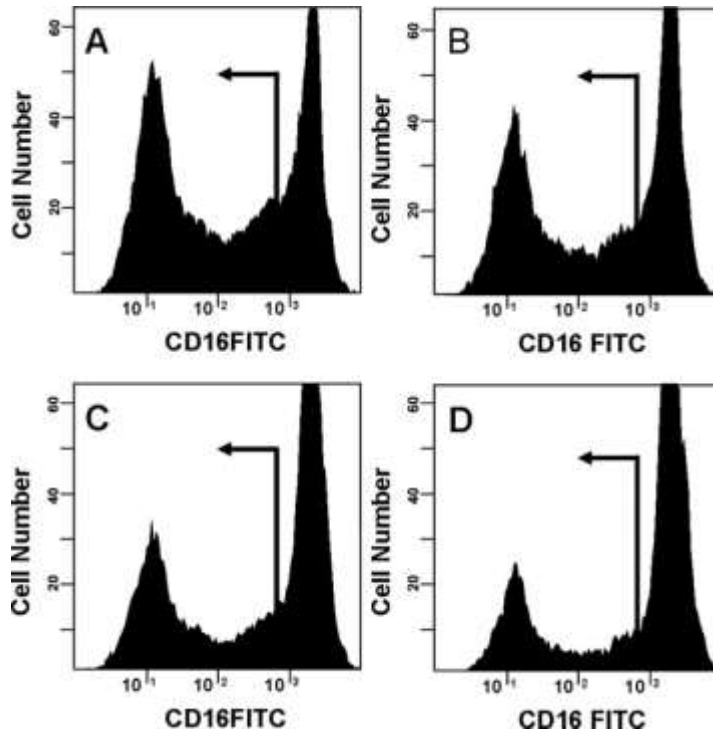
- A, B : οστεομυελική βιοψία CD16str 22%
- C, D : περιφερικό αίμα CD16str 96%
- E, F : αναρρόφηση μυελού CD16str 44%

Σύγκριση οστεομυελικής βιοψίας - στερνικής παρακέντησης



Πρόταση εξομάλυνσης τιμών που προκύπτουν από αναρρόφηση στις τιμές οστεομυελικής βιοψίας

80% / % dim CD16 * ποσοστό βλαστών = εξομαλυμένο ποσοστό βλαστών



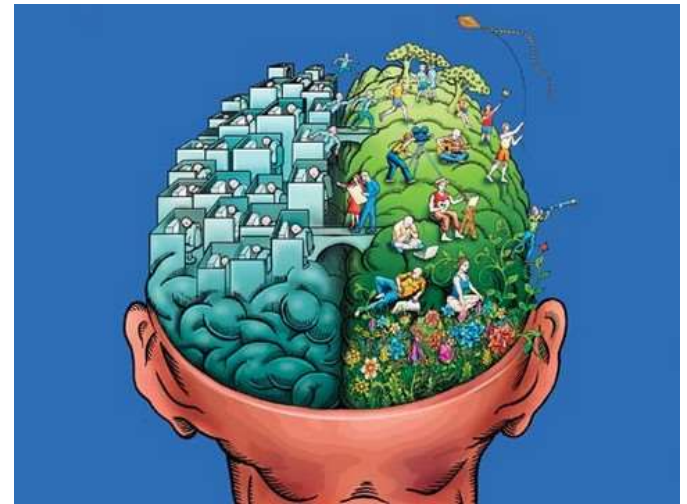
Υπολογισμός CD16dim

Σημασία ΚΡ στη μέτρηση των βλαστών

- Στατιστική σημασία - μέτρηση πολύ περισσότερων κυττάρων
- Πολυπαραμετρικός προσδιορισμός ώρων κυττάρων
- Σημασία προσδιορισμού της αιμοαραίωσης και αντίστοιχης ομαλοποίησης του αριθμού

Φυσιολογικός μυελός των οστών

- Στον εγκέφαλο του κάθε κυτταρομέτρη με τους δικούς του συνδυασμούς με το δικό του λογισμικό



- Στα νέα λογισμικά με χρήση των αντίστοιχων συνδυασμών