



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**

ΧΕΙΡΟΥΡΓΙΚΟΣ ΤΟΜΕΑΣ

ΚΛΙΝΙΚΗ ΠΛΑΣΤΙΚΗΣ ΧΕΙΡΟΥΡΓΙΚΗΣ ΚΑΙ ΕΓΚΑΥΜΑΤΩΝ

**ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΑΝΟΣΟΛΟΓΙΚΗΣ
ΑΠΟΚΡΙΣΗΣ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΙΝΟΥ ΟΡΓΑΝΙΣΜΟΥ ΣΕ ΕΝΘΕΜΑΤΑ
ΣΙΛΙΚΟΝΗΣ**

**ΓΕΩΡΓΙΟΣ Ε. ΠΑΠΑΝΙΚΟΛΑΟΥ
ΠΛΑΣΤΙΚΟΣ ΧΕΙΡΟΥΡΓΟΣ**

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

**ΙΩΑΝΝΙΝΑ
2017**

«Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από το Τμήμα Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνώμων του συγγραφέα Ν. 5343/32, άρθρο 202, παράγραφος 2 (νομική κατοχύρωση του Ιατρικού Τμήματος)»

Ημερομηνία αίτησης του κ. Παπανικολάου Γεωργίου: 14-9-2010

Ημερομηνία ορισμού Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής: 631^α/18-3-2008

Μέλη Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:

Επιβλέπων

Λυκούδης Ευστάθιος, Επίκουρος Καθηγητής Πλαστικής Χειρουργικής

Μέλη

Μπατιστάτου Άννα Επίκουρη Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομικής

Μπάτσης Χαράλαμπος, Επίκουρος Καθηγητής Χειρουργικής

Ανασύσταση Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής: Αριθμ Συνεδρ. 792^α/25-11-2016

Επιβλέπων

Λυκούδης Ευστάθιος Καθηγητής Πλαστικής Χειρουργικής

Μέλη

Μπατιστάτου Άννα Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομίας

Χαρίσης Χαράλαμπος, Αναπληρωτής Καθηγητής Γενική Χειρουργική-Μεταμοσχεύσεις

Ημερομηνία ορισμού θέματος: 5-9-2008

«Κυτταρομετρικός προσδιορισμός της ανοσολογικής απόκρισης του ανθρώπινου οργανισμού σε ενθέματα σιλικόνης»

ΟΡΙΣΜΟΣ ΕΠΤΑΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ : 794^α/31-1-2017

1. Λυκούδης Ευστάθιος Καθηγητής Πλαστικής Χειρουργικής, του Τμήματος Ιατρικής του Παν/μίου Ιωαννίνων
2. Μπατιστάτου Άννα Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομίας του Τμήματος Ιατρικής του Παν/μίου Ιωαννίνων
3. Εξαρχάκος Γεώργιος, Αναπληρωτής Καθηγητής Ωτορινολαρυγγολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Παν/μίου Ιωαννίνων
4. Καστανιουδάκης Ιωάννης, Αναπληρωτής Καθηγητής Ωτορινολαρυγγολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Παν/μίου Ιωαννίνων
5. Μήτσης Μιχαήλ, Αναπληρωτής Καθηγητής Χειρουργικής-Μεταμοσχεύσεων του Τμήματος Ιατρικής του Παν/μίου Ιωαννίνων
6. Χαρίσης Χαράλαμπος, Αναπληρωτής Καθηγητής Γενική Χειρουργική-Μεταμοσχεύσεις του Τμήματος Ιατρικής του Παν/μίου Ιωαννίνων
7. Τζίμας Πέτρος, Επίκουρος Καθηγητής Αναισθησιολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Παν/μίου Ιωαννίνων

Έγκριση Διδακτορικής Διατριβής με βαθμό «ΑΡΙΣΤΑ» στις 24-3-2017

ΠΡΟΕΔΡΟΣ ΤΟΥ ΤΜΗΜΑΤΟΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

Πασχόπουλος Μηνάς

Καθηγητής Μαιευτικής-Γυναικολογίας



*Αφιερώνεται στους γονείς μου και στην
οικογένειά μου*

Ευχαριστίες

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον καθηγητή μου κ. Ε. Λυκούδη, καθώς και τον κ. Γ. Βαρθολομάτο για την επιστημονική, πνευματική και ηθική υποστήριξη που μου παρείχαν καθ' όλη την διάρκεια εκπόνησης της διδακτορικής διατριβής και την εμπιστοσύνη που έδειξαν στο πρόσωπο μου όλα αυτά τα χρόνια. Επίσης, είμαι ευγνώμων στα υπόλοιπα μέλη της εξεταστικής επιτροπής της διατριβής μου, καθηγητές κ. Μπατιστάτου Α., Χαρίση Χ., Εξαρχάκο Γ., Καστανιουδάκη Ι., Μήτση Μ. και Τζίμα Π. για την προσεκτική ανάγνωση της εργασίας μου και για τις πολύτιμες υποδείξεις τους. Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον ιατρό κ. Δούκα Μ. για την πολύτιμη συμβολή του στην παθολογοανατομική ανάλυση των ιστολογικών δειγμάτων, καθώς και την ιατρό κ. Ηλιού Κ. για την πολύτιμη βοήθειά της στη στατιστική ανάλυση των δεδομένων.

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η χρήση των ενθέματων σιλικόνης ως προσωρινά ή μόνιμα υλικά αποτελεί ένα από τα σημαντικότερα επιτεύγματα στην ειδικότητα της Πλαστικής Χειρουργικής. Συγκεκριμένα τα προσωρινά ενθέματα σιλικόνης (διατατήρες ιστού) χρησιμοποιούνται ευρέως στην αντιμετώπιση συγγενών και επίκτητων δυσμορφιών του δέρματος και των μαλακών μορίων, ενώ τα μόνιμα ενθέματα σιλικόνης χρησιμοποιούνται με επιτυχία κυρίως στην αισθητική και επανορθωτική χειρουργική του μαστού. Παρ'όλα αυτά όμως η σιλικόνη μπορεί να δράσει ως ειδικό αντιγόνο ευαισθητοποίησης του ανοσοποιητικού συστήματος προκαλώντας είτε τοπική φλεγμονώδη αντίδραση είτε συστηματική ενεργοποίηση του ανοσοποιητικού συστήματος. Η κυτταρομετρία ροής (flow cytometry) είναι ικανή να ανιχνεύσει με υψηλή ειδικότητα και ευαισθησία τον φαινότυπο των λεμφοκυττάρων που εκφράζονται σε ασθενείς που φέρουν ενθέματα σιλικόνης.

Σκοπός της παρούσας μελέτης είναι ο ποσοτικός προσδιορισμός του ανοσολογικού προφίλ στο περιφερικό αίμα ασθενών, όπου έχουν τοποθετηθεί ενθέματα σιλικόνης, καθώς και η εκτίμηση της ανοσιακής απάντησης σε συσχέτιση με την κλινική πορεία των ασθενών, μελετώντας τους υποπληθυσμούς των λεμφοκυττάρων, όπως επίσης και δείκτες χαρακτηριστικούς ενεργοποίησής τους.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

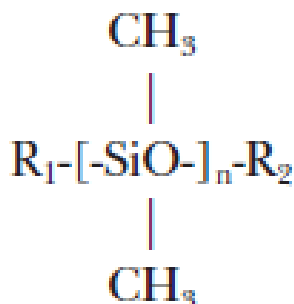
ΕΙΣΑΓΩΓΗ	5-37
ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΣ.....	38-50
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	51-59
ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	60-73
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	74
ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΗ ΕΡΕΥΝΑ	75
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	76-78
ΠΕΡΙΛΗΨΗ ΣΤΑ ΑΓΓΛΙΚΑ (ABSTRACT)	79-97
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	98-111

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Μόνιμα Ενθέματα Σιλικόνης

Εισαγωγή

Το πυρίτιο (silicon, Si) είναι το δεύτερο σε αφθονία στοιχείο στη γη και συνήθως δημιουργεί δεσμούς με το οξυγόνο (O₂). Η σιλικόνη (silicone) [R₂SiO]_n που χρησιμοποιείται για ιατρικούς σκοπούς προέρχεται μετά από πολυμερισμό του σιλοξανίου (Si-O-Si) και κυρίως του πολυδιμεθυλοσιλοξανίου (polydimethylsiloxane, PDMS) (**Εικόνα 1**). Είναι ένα μικτό ανόργανο-οργανικό πολυμερές, όπου R μπορεί να είναι μια ομάδα όπως μεθυλομάδα, αιθυλομάδα, φαινυλομάδα, υδρογόνο, αμινομάδα και υδροξυλομάδα [1]. Με διάφορα μήκη αλυσίδων -Si-O-, πλευρικών ομάδων και διασταυρώσεων μπορεί να συντεθούν σιλικόνες με ποικίλο εύρος ιδιοτήτων και σύστασης. Η ιατρική σιλικόνη στην ελαστομερή της μορφή περιέχει περίπου 20-25% πυρογενές μη κρυσταλλοποιημένο πυρίτιο ενισχύοντας κατ'αυτόν τον τρόπο τις μηχανικές της ιδιότητες [2]. Η γέλη σιλικόνης δημιουργείται από διασταυρούμενα μόρια σιλικόνης και πλευρικές ομάδες γραμμικού πολυδιμεθυλοσιλοξανίου (λάδι σιλικόνης). Η πυκνότητα της γέλης μπορεί να μεταβληθεί τροποποιώντας το μήκος των αλυσίδων -Si-O- πολυμερισμού [3].



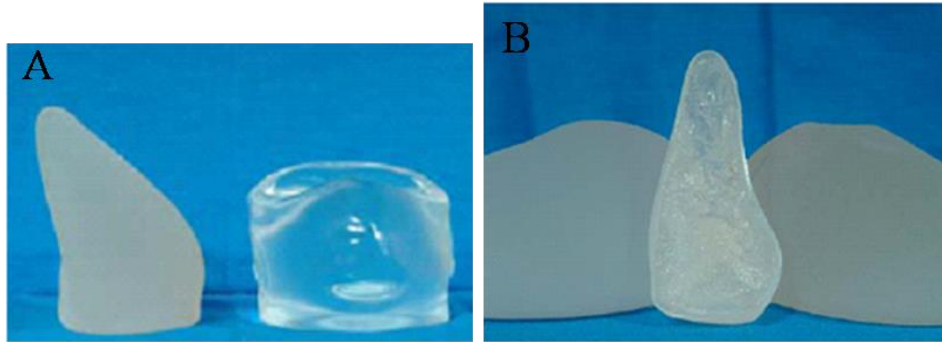
Εικόνα 1. Χημικός τύπος του πολυδιμεθυλοσιλοξανίου (PDMS).

Ιστορική αναδρομή

Η πρώτη αναφορά στη χρήση ενθεμάτων σιλικόνης ανέρχεται τον Σεπτέμβριο του 1962, όταν οι Cronin και Gerow κατασκεύασαν ένα ένθεμα με στρογγυλό σχήμα, λεία επιφάνεια, περίβλημα σιλικόνης και περιεχόμενο μαλακή γέλη σιλικόνης [4]. Στα μέσα της δεκαετίας του 1960 έγινε χρήση του πρώτου ενθέματος με περίβλημα σιλικόνης και περιεχόμενο φυσιολογικό ορό [5]. Κατά τη διάρκεια της δεκαετίας του 1970 η τεχνολογική εξέλιξη έφερε και την κατασκευή ενθεμάτων ανατομικού σχήματος (tear drop shape), με τραχεία επιφάνεια καθώς και με διπλό αυλό παρέχοντας την δυνατότητα ρύθμισης του τελικού όγκου του ενθέματος [6-9]. Το αποτέλεσμα ήταν η σημαντική μείωση στη συχνότητα δημιουργίας ρικνωτικής κάψας (capsular contracture) και η βελτίωση του αισθητικού αποτελέσματος.

Παρ'όλα αυτά όμως στις 6 Ιανουαρίου 1992 ο Αμερικανικός Οργανισμός Φαρμάκων και Τροφίμων (FDA) απαγορεύει προσωρινά την χρήση ενθεμάτων σιλικόνης με περιεχόμενο γέλη σιλικόνης για αισθητικές επεμβάσεις αυξητικής μαστών λόγω πιθανής συσχέτισης με ανάπτυξη παθήσεων του συνδετικού ιστού [10]. Τελικά στις 17 Νοεμβρίου 2006 το FDA παρέχει την έγκριση για την χρήση των ενθεμάτων σιλικόνης στην αυξητική του μαστού, μετά από μια σειρά μετα-αναλύσεων και ερευνών που αποδείκνυαν την αθωότητά τους [11].

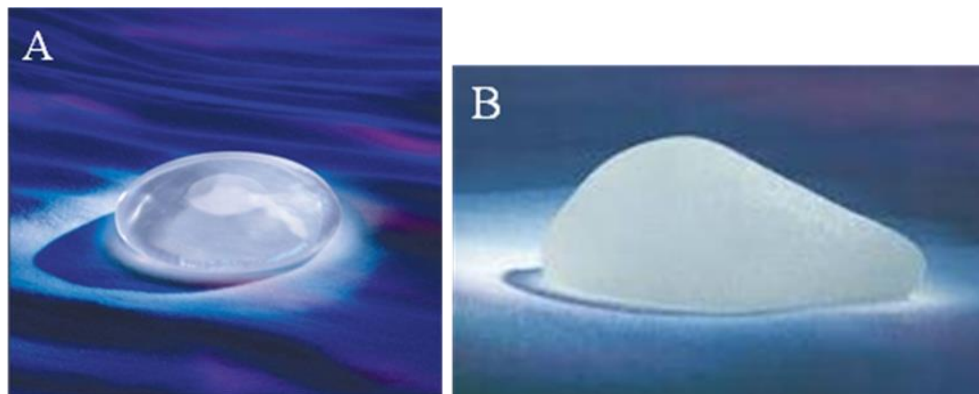
Στη σύγχρονη εποχή χρησιμοποιούνται πλέον μόνιμα ενθέματα σιλικόνης υψηλής συνεκτικότητας (Cohesive II-III) 5^{ης} γενιάς με κύρια χρήση στην αισθητική και επανορθωτική χειρουργική του μαστού [11]. Παρέχουν μαλακή και φυσική αίσθηση διατηρώντας το σχήμα και την όρθια θέση τους, ενώ σε περίπτωση ρήξης διατηρούν την ακεραιότητά τους χωρίς να διαχέονται στον μαζικό αδένα (**Εικόνα 2**).



Εικόνα 2. (A, B). Μόνιμα ενθέματα σιλικόνης με διατήρηση του σχήματος και της ακεραιότητάς τους.

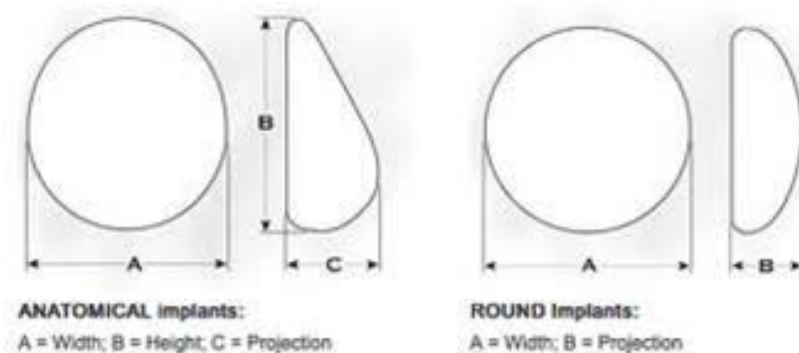
Χαρακτηριστικά των μόνιμων ενθεμάτων σιλικόνης

Ανάλογα με την υφή του περιβλήματος διακρίνονται σε: α) λείας επιφανείας (smooth surface), β) τραχείας επιφανείας (textured surface). Επίσης ανάλογα με το περιεχόμενο σε: α) γέλη σιλικόνης (silicone gel), β) φυσιολογικό όρο (saline), γ) διπλού αυλού (double lumen). Τέλος ανάλογα με το σχήμα σε: α) στρογγυλά (round), β) ανατομικά (anatomic, contour) (**Εικόνα 3**).



Εικόνα 3. A. Μόνιμο ένθεμα σιλικόνης στρογγυλού σχήματος με λεία επιφάνεια και περιεχόμενο φυσιολογικό ορό. **B.** Μόνιμο ένθεμα σιλικόνης ανατομικού σχήματος, τραχείας επιφανείας και περιεχόμενο γέλη σιλικόνης.

Κάθε ένθεμα παρουσιάζει τέσσερις μεταβλητές, όπως: α) όγκος (volume), β) πλάτος (width), γ) ύψος (high), και δ) προβολή (projection). Η συσχέτιση μεταξύ των τεσσάρων αυτών μεταβλητών και των ιδιαίτερων ανατομικών χαρακτηριστικών του ασθενούς θα μας οδηγήσουν στην επιλογή του καταλληλότερου ενθέματος (**Εικόνα 4**).



Εικόνα 4. Ενθέματα σιλικόνης με τις μεταβλητές τους.

Επιπλέον ένα ένθεμα σιλικόνης για να θεωρηθεί ιδανικό θα πρέπει να πληρεί τα εξής χαρακτηριστικά: α) να μην επηρεάζεται από τις φυσικές ιδιότητες του οργανισμού (κυρίως θερμοκρασία), β) να είναι χημικά αδρανές και σταθερό, γ) να μην προκαλεί άσηπτη φλεγμονή ή αντίδραση, δ) να μην είναι καρκινογόνο, ε) να μην προκαλεί αλλεργία ή υπερευαισθησία, στ) να είναι ανθεκτικό στην εξωτερική τάση και πίεση, ζ) να λαμβάνει εύκολα το επιθυμητό σχήμα, η) να μπορεί να αποστειρώνεται [12].

Χρήση των μόνιμων ενθεμάτων σιλικόνης

Τα τελευταία χρόνια παρατηρείται αύξηση της χρήσης των ενθεμάτων σιλικόνης. Ενδεικτικά το έτος 2010 στις Η.Π.Α η αυξητική μαστού ήταν η πιο συχνή επέμβαση Αισθητικής Χειρουργικής με συνολικά 318.128 περιστατικά [13].

Στην Αισθητική Πλαστική Χειρουργική τα μόνιμα ενθέματα σιλικόνης χρησιμοποιούνται κυρίως για αύξηση του όγκου του μαστού, αλλά και σε άλλες περιοχές του σώματος, όπως ο πάγωνας και η κνήμη. Όσον αφορά τη χρήση τους για αύξηση του όγκου των μαστών μπορούν να

τοποθετηθούν διαμέσου τομής που δύναται να γίνει στην υπομαστική πτυχή, περιθηλαία ή στην πρόσθια μασχαλιαία γραμμή. Κατόπιν δημιουργείται η κατάλληλη θήκη και το ένθεμα μπορεί να τοποθετηθεί κάτωθεν του μαζικού αδένου, κάτωθεν του μείζονος θωρακικού μυ ή σε διπλό επίπεδο (dual plane) [14-18].

Στην Επανορθωτική Πλαστική Χειρουργική τα μόνιμα ενθέματα μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την αποκατάσταση συγγενών δυσμορφιών του μαστού, όπως η υποπλασία, η ανισομαστία, ο σωληνοειδής μαστός και το σύνδρομο Poland, καθώς για την αποκατάσταση επίκτητων παθήσεων του μαστού, όπως η πτώση του μαζικού αδένου και μετά από μαστεκτομή [17-23]. Ειδικότερα στις περιπτώσεις μετά από ριζική μαστεκτομή διακρίνουμε την άμεση αποκατάσταση που πραγματοποιείται στον ίδιο χειρουργικό χρόνο με την μαστεκτομή και την αψώτερη αποκατάσταση που γίνεται συνήθως είτε μετά από 3 μήνες από την μαστεκτομή, είτε 6 μήνες μετά την ολοκλήρωση των συμπληρωματικών θεραπειών (κυρίως ακτινοθεραπεία). Και στις δύο περιπτώσεις συνήθως το 1^ο στάδιο περιλαμβάνει την τοποθέτηση του διατατήρα ιστού και μετά από περίπου 3-6 μήνες ακολουθεί το 2^ο στάδιο αντικατάστασης του προσωρινού με μόνιμο ένθεμα σιλικόνης [21-23]. Επιπλέον στις ασθενείς που έχουν υποβληθεί σε μερική μαστεκτομή (π.χ ογκεκτομή, τεταρτεκτομή) γίνεται χρήση τεχνικών ογκοπλαστικής χειρουργικής του μαστού, όπου μπορεί να τοποθετηθεί ένα μόνιμο ένθεμα σιλικόνης στην περιοχή της μαστεκτομής προς αποκατάσταση του όγκου και ένα μόνιμο ένθεμα σιλικόνης στον ετερόπλευρο μαστό προς αποκατάσταση της συμμετρίας [24-26].

Ασφάλεια και επιπλοκές

Οι επιπλοκές που σχετίζονται με την τοποθέτηση μόνιμων ενθεμάτων σιλικόνης διαχωρίζονται σε τοπικές και συστηματικές. Επιπλέον οι τοπικές επιπλοκές μπορεί να οφείλονται είτε στην αρχική χειρουργική επέμβαση, είτε σε αυτό καθ'αυτό το ένθεμα.

Η συχνότητα εμφάνισης των τοπικών επιπλοκών κυμαίνεται μεταξύ 17% και 36% [27]. Οι κυριότερες και πιο συχνές που σχετίζονται κυρίως με την επέμβαση είναι το αιμάτωμα με επίπτωση 0.5%-5%, η ανάπτυξη λοίμωξης με ποσοστό 1%-7% οφειλόμενη κυρίως στον *Staphylococcus epidermidis* και στο *Propionibacterium* *ances*, η ορώδης συλλογή (0%-1%), η διάσπαση του τραύματος, η ανάπτυξη υπετροφικής ουλής και χηλοειδούς (6%), το θωρακικό άλγος και η εμφάνιση πνευμοθώρακα, το σύνδρομο Mondor, οι αισθητικές διαταραχές του συμπλέγματος θηλής-θηλαίας άλω με εμφάνιση παροδικής υπαισθησίας σε περίπου 10%-47% των ασθενών και μόνιμη υπαισθησία σε λιγότερο από 1% των περιπτώσεων, καθώς και πιθανή διαταραχή του θηλασμού ιδιαίτερα εάν η τοποθέτηση του ενθέματος γίνει μέσω περιθηλαίας προσπέλασης [11,27-29].

Όσον αφορά τις επιπλοκές που σχετίζονται με το ένθεμα, η ανάπτυξη ρικνωτικής κάψας αποτελεί την σημαντικότερη με επίπτωση 4%-74% [11]. Οφείλεται κυρίως στη συνεργική ανάπτυξη αιματώματος και τοπικής λοίμωξης, ενώ έχει αποδειχθεί ότι η χρήση ενθεμάτων σιλικόνης με τραχεία επιφάνεια και η τοποθέτησή τους κάτω από τον μείζονα θωρακικό μυ μειώνει σημαντικά την συχνότητα εμφάνισής της [30-32]. Επιπλέον μπορεί να παρατηρηθεί μετατόπιση, ρήξη ή αναδίπλωση και έκθεση του ενθέματος, καθώς και ασυμμετρία με σημαντικά αισθητικά προβλήματα [11,27].

Αρκετές επιδημιολογικές μελέτες στο παρελθόν είχαν επικεντρωθεί στην διερεύνηση πιθανής συσχέτισης των ενθεμάτων σιλικόνης με την ανάπτυξη συστηματικών παθήσεων, όπως διάφοροι είδη καρκίνου και κυρίως καρκίνου του μαστού, καθώς και αυτοάνοσων νοσημάτων. Πλέον στο σύνολό τους αναδρομικές μελέτες και μετα-αναλύσεις έχουν αποδείξει ότι δεν υπάρχει καμία αιτιολογική συσχέτιση μεταξύ ενθεμάτων σιλικόνης και οποιουδήποτε τύπου καρκίνου, παθήσεων του συνδετικού ιστού και νευρολογικών διαταραχών [11,27,33-35].

Προσωρινά Ενθέματα Σιλικόνης (διατατήρες ιστού)

Ιστορική αναδρομή

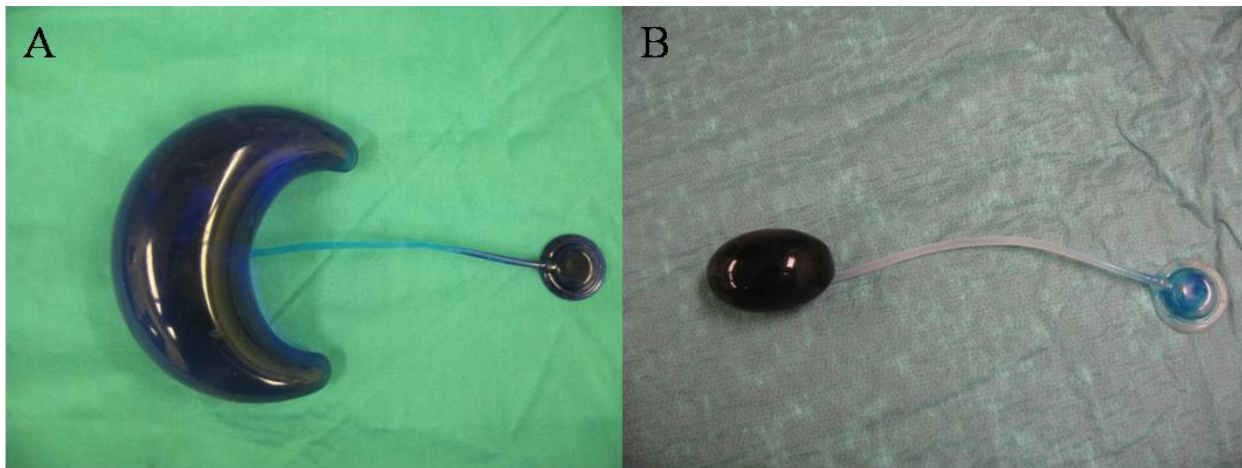
Η χρήση διατατήρων ιστού αποτελεί ένα σημαντικό επίτευγμα στο πεδίο της Πλαστικής Χειρουργικής τις τελευταίες δεκαετίες. Η πρώτη κλινική εφαρμογή τους ανέρχεται το 1957, όταν ο Neumann τοποθέτησε διατατήρα ιστού στην κροταφική περιοχή για την αποκατάσταση συγγενούς μικρωπίας [36]. Ακολούθησε το 1978 ο Radovan, ο οποίος τοποθέτησε για πρώτη φορά διατατήρα ιστού για την αποκατάσταση του μαστού μετά από μαστεκτομή [37]. Έκτοτε η έννοια της διάτασης των ιστών με την χρήση προσωρινών ενθεμάτων σιλικόνης απέκτησε ευρεία αποδοχή και πλέον αποτελεί την μέθοδο εκλογής για την αποκατάσταση πληθώρας συγγενών και επίκτητων δυσμορφιών τόσο σε παιδιά όσο και σε ενήλικες.

Βασικές αρχές διάτασης των ιστών

Η έννοια της διάτασης των ιστών βασίζεται στη φυσική ικανότητα του δέρματος να διατείνεται ως απάντηση στην ύπαρξη υποκείμενης δύναμης. Η προοδευτική πλήρωση του διατατήρα με φυσιολογικό ορό προκαλεί αύξηση της πίεσης στους υπερκείμενους και παρακείμενους ιστούς. Το υπό διάταση δέρμα εμφανίζει μια σειρά από ιστολογικές μεταβολές, όπως: α) η επιδερμίδα εμφανίζει αυξημένη μιτωτική δράση με αποτέλεσμα την δημιουργία περίσσειας επιδερμικού ιστού, β) το χόριο παρουσιάζει σταδιακή λέπτυνση, γ) υπάρχει αύξηση της αγγείωσης του δέρματος ως αποτέλεσμα της νεοαγγειογένεσης, και δ) δημιουργείται ινώδης καψιδικός ιστός πέριξ του διατατήρα [38-40]. Το τελικό αποτέλεσμα είναι η δημιουργία περίσσειας δέρματος ικανής να καλύψει μεγάλα ελλείμματα δέρματος και μαλακών μορίων σε κάθε ανατομική περιοχή του ανθρώπινου σώματος.

Οι διατατήρες ιστού είναι ειδικά ενθέματα κατασκευασμένα από σιλικόνη με λεία ή τραχεία επιφάνεια, ενώ η πλήρωσή τους γίνεται με φυσιολογικό ορό μέσω ενσωματωμένης ή

απομακρυσμένης βαλβίδας έγχυσης (port). Υπάρχουν σε διάφορα σχήματα, όπως: α) στρογγυλά (round), β) ορθογώνια (rectangular), γ) μηνοειδή (crescent), και δ) ελλειπτικά/οβάλ (elliptical/oval), ενώ υπάρχει η δυνατότητα πλήρωσής τους με όγκους από 25cc έως 1500cc (**Εικόνα 5**). Στην αποκατάσταση του μαστού χρησιμοποιούνται κυρίως διατατήρες ιστού με τραχεία επιφάνεια και ενσωματωμένη βαλβίδα πλήρωσης, ενώ στην επανορθωτική χειρουργική των υπόλοιπων περιοχών του σώματος γίνεται χρήση διατατήρων ιστού με λεία επιφάνεια και απομακρυσμένη βαλβίδα πλήρωσης.



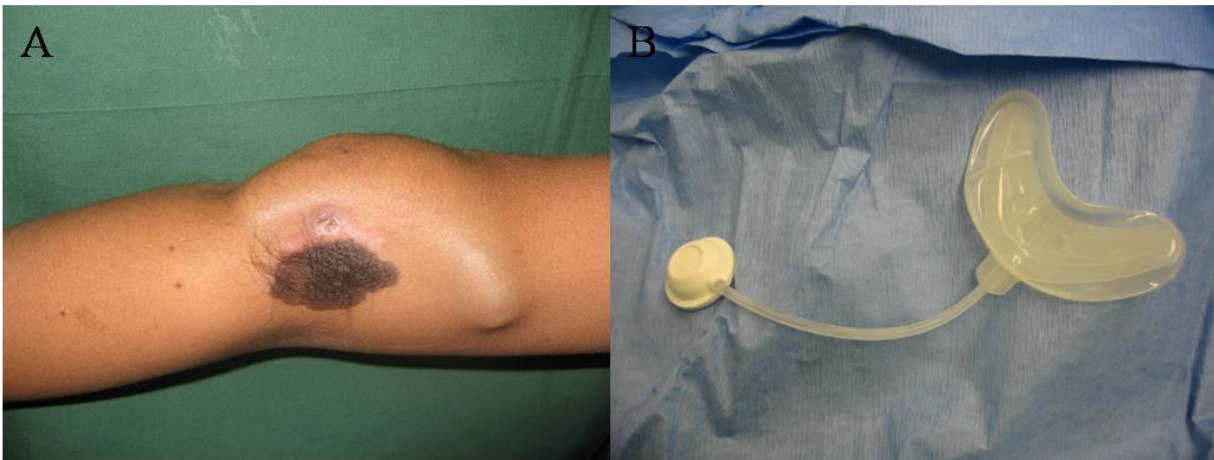
Εικόνα 5. Α. Διατατήρας ιστού με μηνοειδές σχήμα και απομακρυσμένη βαλβίδα πλήρωσης.

Β. Διατατήρας ιστού με ελλειπτικό/οβάλ σχήμα και απομακρυσμένη βαλβίδα πλήρωσης.

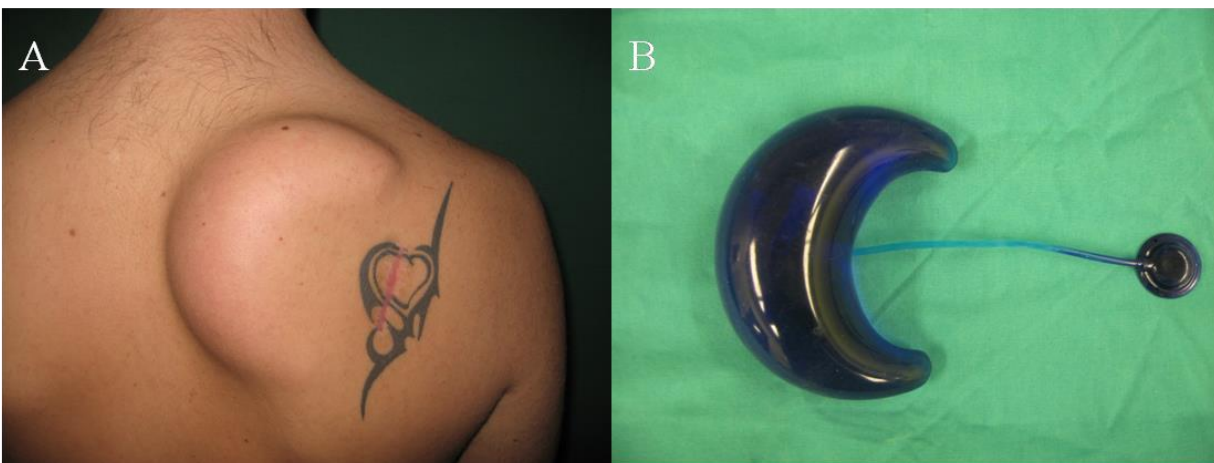
Χρήση των διατατήρων ιστού

Οι διατατήρες ιστού χρησιμοποιούνται ευρέως στην Επανορθωτική Πλαστική Χειρουργική για την αποκατάσταση συγγενών και επίκτητων δυσμορφιών τόσο σε παιδιά όσο και σε ενήλικες [38,41-43]. Οι κυριότερες ενδείξεις αφορούν την αντιμετώπιση εγκαυμάτων, γιγαντιαίων συγγενών σπύλων, μετατραυματικά ελλείμματα του δέρματος και των μαλακών μορίων, μετεγχειρητικές ουλές, αλωπεκία και όγκους δέρματος και μαλακών μορίων [38,41,44] (**Εικόνα 6, 7**). Δύναται να

τοποθετηθούν σε κάθε σημείο του ανθρώπινου σώματος, αλλά οι πιο συχνές εντοπίσεις αφορούν το τριχωτό της κεφαλής και τον κορμό.



Εικόνα 6. Α. Τοποθέτηση διατατήρα ιστού σε ασθενή με γιγαντιαίο συγγενή σπίλο δεξιού άνω άκρου. **Β.** Ο διατατήρας ιστού έχει μηνοειδές σχήμα και φέρει απομακρυσμένη βαλβίδα έγχυσης.



Εικόνα 7. Α. Τοποθέτηση διατατήρα ιστού σε ασθενή με δερματοστιξία (τατουάζ) στη δεξιά ωμοπλάτη. **Β.** Ο διατατήρας ιστού έχει μηνοειδές σχήμα και φέρει απμακρυσμένη βαλβίδα έγχυσης.

Όσον αφορά την χειρουργική τεχνική τοποθέτησής τους, αρχικά γίνεται μια τομή περίξ της πρωτοπαθούς βλάβης και κατόπιν με ενδοσκοπική και/ή ανοικτή μέθοδο δημιουργείται η κατάλληλη υποδόρια ή υπομυϊκή θήκη, όπου και τοποθετείται ο διατατήρας ιστού. Ανάλογα με την έκταση της

βλάβης ή του ελλείμματος μπορεί να τοποθετηθούν δύο ή και περισσότεροι διατατήρες. Μετά από 10-15 ημέρες ξεκινάει η διαδικασία πλήρωσης του διατατήρα με αποστειρωμένο ισότονο φυσιολογικό ορό ανα τακτά χρονικά διαστήματα (περίπου κάθε 15-20 ημέρες) και με όγκους ανάλογα με την χωρητικότητα του διατατήρα, αλλά και την ανεκτικότητα του ασθενούς. Η συνολική περίοδος διάτασης είναι συνήθως από 3 έως 9 μήνες ή και περισσότερο ανάλογα με την πάθηση. Κατόπιν ο ασθενής υποβάλλεται σε δεύτερη χειρουργική επέμβαση αφαίρεσης του διατατήρα ιστού και αποκατάστασης της πρωτοπαθούς δυσμορφίας με χρήση του πλεονάζοντος δέρματος, καθώς και τοπικών κρημνών από τους παρακείμενους ιστούς.

Τα βασικά πλεονεκτήματα της χρήσης των διατατήρων ιστού είναι η σημαντική μείωση της νοσηρότητας της δότριας περιοχής, η δημιουργία περίσσειας τοπικού δέρματος εξαιρετικής ποιότητας με διατήρηση του χρώματος και της υφής, η διατήρηση της αισθητικότητας και της τριχοφυΐας. Όσον αφορά τα μειονεκτήματα απαιτείται η συχνή επίσκεψη του ασθενούς στο Ιατρείο για την πλήρωση του διατατήρα, ενώ για μια περίοδο ο ασθενής θα πρέπει να δεχθεί την δημιουργία δυσμορφίας, γεγονός που προκαλεί δυσανεξία.

Ασφάλεια και επιπλοκές

Ιδιαίτερα σημαντική κρίνεται η μελέτη της ανάπτυξης επιπλοκών μετά από την τοποθέτηση διατατήρων ιστού. Στην διεθνή βιβλιογραφία αναφέρονται ιδιαίτερα υψηλά ποσοστά επιπλοκών που κυμαίνονται μεταξύ 11% και 40% [38,41,44-46]. Παράγοντες που συνδέονται πιο συχνά με την εμφάνιση επιπλοκών είναι η παιδιατρική ηλικία, η τοποθέτηση διατατήρα στα κάτω άκρα (κυρίως λόγω πτωχής αιμάτωσης και ανεπάρκειας διαθέσιμων ιστών), καθώς και ο αριθμός διατατήρων ιστού ανα περιοχή [47-49].

Οι επιπλοκές μπορούν να διαχωρισθούν σε ελάσσονες και μείζονες. Στις ελάσσονες επιπλοκές είναι αρκετή κάποια ιατρική επέμβαση, όπως η χορήγηση αντιβιοτικής θεραπείας, αλλά δεν είναι αναγκαία η νοσηλεία ή η χειρουργική επέμβαση. Αντίθετα στις μείζονες επιπλοκές

κρίνεται απαραίτητη η νοσηλεία του ασθενούς και πιθανόν η εκτέλεση χειρουργικής επέμβασης. Οι πιο συχνές επιπλοκές είναι: α) η εκδήλωση λοίμωξης, β) η έκθεση του διατατήρα, γ) η διάσπαση του χειρουργικού τραύματος, δ) η ορώδης συλλογή, ε) το αιμάτωμα, στ) η ρήξη/διάτρηση του διατατήρα, ζ) η μερική ή πλήρης νέκρωση του δέρματος ύπερθεν του διατατήρα.

Η σωστή επιλογή του ασθενούς σε συνάρτηση με την κατάλληλη χειρουργική τεχνική μπορούν να μειώσουν σημαντικά την επίπτωση των επιπλοκών. Επίσης η χρήση διατατήρων ιστού που φέρουν πιστοποίηση ποιότητας εγγυάται το καλύτερο δυνατό αισθητικό και λειτουργικό αποτέλεσμα. Πλέον στη σύγχρονη επιστήμη της βιοιατρικής η τήρηση αυστηρών κανόνων υγιεινής και κατασκευής των υλικών σε συνδυασμό με την τεχνολογική εξέλιξη αποτελούν εγγύηση για την ασφαλή χρήση των προσωρινών ενθεμάτων σιλικόνης.

Ανοσοποιητικό Σύστημα

Βασικές αρχές ανοσολογίας

Το ανοσοποιητικό σύστημα αποτελεί το βασικό αμυντικό σύστημα του ανθρώπινου οργανισμού και αποτελείται από ένα σύνολο οργάνων και κυττάρων που συνεργάζονται στενά μεταξύ τους με στόχο την προστασία του οργανισμού έναντι βλαπτικών παραγόντων του εξωτερικού ή εσωτερικού περιβάλλοντος. Ο όρος ανοσία εμφανίστηκε για πρώτη φορά στις αρχές του 20^{ου} αιώνα για να δηλώσει την προστασία έναντι λοιμωδών νόσων και δηλώνει την απόκριση του ξενιστή έναντι ξένων συστατικών είτε αυτά είναι μικροοργανισμοί είτε μακρομόρια. Η ανοσία διακρίνεται σε φυσική (εγγενής) και επίκτητη (προσαρμοστική) [50,51].

Η φυσική ανοσία δεν απαιτεί προηγούμενη έκθεση στο παθογόνο και δεν είναι ειδική καθώς αναγνωρίζει τα κύρια συστατικά ενός μικροοργανισμού μέσω υποδοχέων αναγνώρισης μοτίβων (pattern recognition) που βρίσκονται σε όλα τα κύτταρα [52,53]. Περιλαμβάνει την φαγοκυττάρωση μικροοργανισμών, την καταστροφή τους από το όξινο έκκριμα του στομάχου και από τα πεπτικά ένζυμα, καθώς και την παρουσία στο αίμα ορισμένων ουσιών οι οποίες προκαλούν την καταστροφή των μικροοργανισμών. Επάγει μια γρήγορη απάντηση (οξείας φάσης) και την ανάπτυξη φλεγμονώδους αντίδρασης διαμέσω κυτταρικής και χυμικής αντίδρασης. Η κυτταρική ανοσία αντιπροσωπεύεται από την δράση των φαγοκυττάρων, των μακροφάγων, των πολυμορφοπύρηνων κυττάρων και των κυττάρων φυσικών φονέων (Natural Killer cells, NK-cells). Η χυμική ανοσία εκτελείται από την παραγωγή και έκκριση ουσιών, όπως οι κυτταροκίνες και το σύστημα του συμπληρώματος.

Η επίκτητη ανοσία παρέχει στον οργανισμό εξαιρετικά ισχυρή προστασία και δεν αναπτύσσεται παρά μόνο όταν ο οργανισμός υποστεί πρώτα επίθεση από μικροβιακή νόσο ή τοξίνη, ενώ για να ενεργοποιηθεί απαιτείται χρονικό διάστημα εβδομάδων ή μηνών [54,55]. Διακρίνεται σε κυτταρική και χυμική ανοσία. Η κυτταρική ανοσία επάγεται μετά από αντιγονικό ερέθισμα και

λαμβάνει χώρα διαμέσω της δράσης των T-λεμφοκυττάρων, ενώ η χυμική ανοσία διαμέσω των B-λεμφοκυττάρων και την παραγωγή αντισωμάτων. Χαρακτηρίζεται από ειδική αναγνώριση του παθογόνου και μέγιστη αποτελεσματικότητα. Επίσης έχει την ιδιότητα να αναπτύσσει ανοσολογική μνήμη μέσω της οποίας υπάρχει ταχύτερη αντίδραση στην επανέκθεση στο ίδιο αντιγόνο ή παθογόνο φορέα.

Η ανατομική διαίρεση του ανοσοποιητικού συστήματος περιλαμβάνει τα πρωτογενή λεμφικά όργανα (λεμφογένεση, θύμος αδένας, εμβρικό ήπαρ και μυελός των οστών) που παράγουν τα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος και τα δευτερογενή λεμφικά όργανα (λεμφαδένες, σπλήνας και λεμφικός ιστός συνδεδεμένος με τους βλεννογόνους-MALT-), όπου λαμβάνει χώρα η ανοσολογική απόκριση.

Η ανοσιακή απάντηση επιτυγχάνεται από τη συγχρονισμένη λειτουργία διαφόρων κυττάρων καθώς και από διαλυτά μόρια που αυτά εκκρίνουν, όπως είναι τα αντισώματα, οι κυτταροκίνες, το συμπλήρωμα και οι παράγοντες φλεγμονής. Το ανοσοποιητικό σύστημα αποτελείται από δύο βασικές ομάδες κυττάρων, τα κύτταρα της μυελικής σειράς και τα κύτταρα της λεμφικής σειράς. Τα κύτταρα της μυελικής σειράς αποτελούνται από τα μονοκύτταρα/μακροφάγα, τα δενδριτικά κύτταρα και τα πολυμορφοπύρηνα (ουδετερόφιλα, ηωσινόφιλα και βασεόφιλα). Τα κύτταρα της λεμφικής σειράς περιλαμβάνουν τα λεμφοκύτταρα και πιο συγκεκριμένα τα B-λεμφοκύτταρα, τα T-λεμφοκύτταρα και τα φυσικά φονικά κύτταρα (NK cells).

Τα ουδετερόφιλα αποτελούν τον κύριο πληθυσμό της οξείας φλεγμονώδους αντίδρασης και ενεργοποιούνται από τις κυτταροκίνες που παράγουν τα μακροφάγα ενώ σε σημαντικό βαθμό εκτελούν λειτουργίες μακροφάγων, όπως η αποδόμηση ιστών και η φαγοκυττάρωση. Τα ηωσινόφιλα έχουν παρόμοιες δράσεις με αυτές των ουδετερόφιλων και συμμετέχουν κυρίως στην αλλεργική αντίδραση. Επιπλέον τα βασεόφιλα εκφράζουν υποδοχείς της ανοσοσφαιρίνης IgE και απελευθερώνουν μεταβιβαστές της φλεγμονής, όπως η ισταμίνη και οι προσταγλαδίνες.

Τα μονοκύτταρα κυκλοφορούν για λίγο στο αίμα και συνήθως αποικίζουν τους ιστούς, όπου ενεργοποιούνται και μετατρέπονται σε μακροφάγα ή μετατρέπονται σε κύτταρα του ιστού στον οποίο μεταναστεύουν. Οι κύριες λειτουργίες των μονοκυττάρων/μακροφάγων είναι η φαγοκυττάρωση, η παραγωγή κυτταροκινών και η δράση τους ως αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα (Antigen Presenting Cells, APCs) ενεργοποιώντας τα T-λεμφοκύτταρα [56,57]. Η λειτουργία αυτών των κυττάρων είναι η πρόσληψη και επεξεργασία εξωγενών αντιγόνων και κατόπιν η παρουσίασή τους στα T-λεμφοκύτταρα μέσω ειδικών μορίων που εκφράζονται στην επιφάνειά τους και ονομάζονται μείζον σύμπλεγμα ιστοσυμβατότητας II (Major Histocompatibility Complex Class II, MHC II) ή αντιγόνα των ανθρωπίνων λευκοκυττάρων (Human Leukocyte Antigens, HLA-DR, DP, DQ).

Μελέτη των υποπληθυσμών των λεμφοκυττάρων

Στον υγιή ανθρώπινο οργανισμό ανευρίσκονται περισσότερα από 10^{12} λεμφοκύτταρα. Είναι κύτταρα μικρά και στρογγυλά διαμέτρου 5-12 μm με σφαιρικό πυρήνα. Το κυτταρόπλασμά τους περιέχει μιτοχόνδρια και ελεύθερα ριβοσωμάτια. Όπως προαναφέρθηκε διακρίνονται 3 κατηγορίες λεμφοκυττάρων: 1) τα T-λεμφοκύτταρα, 2) τα B-λεμφοκύτταρα και 3) τα κύτταρα φυσικοί φονείς (Natural Killer cells, NK-cells).

Τα λεμφοκύτταρα εκφράζουν στην επιφάνεια τους ένα μεγάλο αριθμό διαφορετικών πρωτεϊνικών μορίων που μπορεί να χρησιμοποιηθούν ως διακριτοί δείκτες μεταξύ των κυτταρικών πληθυσμών. Αυτοί οι ειδικοί δείκτες καλούνται αντιγόνα (αντιγόνα επιφανείας) γιατί ανιχνεύονται με τη χρήση ειδικών μονοκλωνικών αντισωμάτων, όπως συμβαίνει με την χρήση της κυτταρομετρίας ροής. Ο επιφανειακός δείκτης που χαρακτηρίζει επακριβώς μια κυτταρική σειρά ή ένα στάδιο διαφοροποίησης, έχει καθοριστική δομή και ονομάζεται μέλος ομάδας διαφοροποίησης (**Cluster of Differentiation, CD**), καθώς αναγνωρίζεται από μια ομάδα -cluster- μονοκλωνικών αντισωμάτων (**anti-CD**) [58,59]. Επομένως τα χαρακτηριστικά αυτά αντιγόνα ονομάζονται δείκτες

επιφανείας ή αντιγόνα διαφοροποίησης και αναφέρονται με τον όρο CD και ένα αριθμητικό προσδιορισμό, όπως CD1, CD2 κλπ.

Τα T-λεμφοκύτταρα παράγονται στο μυελό των οστών και μεταναστεύουν στο θύμο αδένι κατά τη διάρκεια της εμβρυικής και νεογνικής ζωής, όπου διαφοροποιούνται και ωριμάζουν. Τα ώριμα T-λεμφοκύτταρα υπάρχουν κυρίως στον περιφερικό λεμφικό ιστό, στο περιφερικό αίμα και στη λέμφο. Αποτελούν το 70-85% των περιφερικών λεμφοκυττάρων και συμμετέχουν κυρίως στην επίκτητη κυτταρική ανοσία. Η κυριότερη δράση τους είναι η ρύθμιση της λειτουργίας τόσο των ίδιων, όσο των B-λεμφοκυττάρων και μακροφάγων δια μέσου διαλυτών ουσιών που εκκρίνουν, όπως είναι οι κυτταροκίνες. Επίσης έχουν την δυνατότητα να δρουν ως κύτταρα καταστροφής αντιγόνων και άλλων κυττάρων. Τα T-λεμφοκύτταρα εκφράζουν στην επιφάνειά τους το αντιγονικό σύμπλεγμα CD3, το οποίο αποτελεί μέρος του υποδοχέα του T-λεμφοκυττάρου (T-cell receptor, TCR) [60]. Η αναγνώριση του αντιγόνου γίνεται με τον υποδοχέα TCR και μόνο όταν το αντιγόνο συμπαρασιάζεται από εκείνα τα κύτταρα που φέρουν τις γλυκοπρωτεΐνες MHC τάξης I ή II (πρωτεΐνες του μείζονος συστήματος ιστοσυμβατότητας) [61]. Τα T-λεμφοκύτταρα υποδιαιρούνται σε δύο κύριους υποπληθυσμούς: 1) τα βοηθητικά T-λεμφοκύτταρα (T-helper cells) και 2) τα κυτταροτοξικά T-λεμφοκύτταρα (Cytotoxic T-Lymphocytes, CTLs).

Τα βοηθητικά T-λεμφοκύτταρα (T-helper cells) εκφράζουν στην επιφάνειά τους τον δείκτη CD4, φέρουν τον φαινότυπο CD3+/CD4+ και αναγνωρίζουν αντιγόνα σε συνδυασμό με τα μόρια της τάξης II του MHC (MHC II, HLA-DR, DP, DQ) που εκφράζονται κυρίως από τα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα. Αποτελούν το 28-59% του συνολικού πληθυσμού των λεμφοκυττάρων. Οι κυριότερες δράσεις τους είναι ρυθμιστικές και συγκεκριμένα ενεργοποιούν τα κυτταροτοξικά T-λεμφοκύτταρα, τα B-λεμφοκύτταρα και τα μακροφάγα δια μέσω της παραγωγής και έκκρισης κυτταροκινών, όπως οι ιντερλευκίνες (IL-2, IL-4, IL-5) η γ-ιντερφερόνη [62,63].

Τα κυτταροτοξικά T-λεμφοκύτταρα (CTLs) εκφράζουν στην επιφάνειά τους τον δείκτη CD8, επομένως φέρουν τον φαινότυπο CD3+/CD8+ και αναγνωρίζουν αντιγόνα σε συνδυασμό με τα

μόρια της τάξης I του MHC (MHC I, HLA-A, HLA-B, HLA-C). Αποτελούν το 13-32% του συνολικού πληθυσμού των T-λεμφοκυττάρων. Παρουσιάζουν κυτταρολυτική δραστηριότητα καταστρέφοντας κύτταρα μολυσμένα από ιούς, κύτταρα όγκων και κύτταρα αλλομοσχεύματος [64,65]. Η δράση τους πραγματοποιείται είτε μέσω έκκρισης ειδικών ουσιών (περφορίνες, κοκκιοένζυμα), είτε με επαγωγή της απόπτωσης.

Ιδιαίτερο ρόλο στην ομοιόσταση του ανοσοποιητικού συστήματος διαδραματίζει κι ένας επιπλέον υποπληθυσμός των T-λεμφοκυττάρων, τα λεγόμενα ρυθμιστικά T-λεμφοκύτταρα (CD4+/CD25+, Tregs) Πρόκειται για κύτταρα που αποτελούν το 5-10% των περιφερικών T-βοηθητικών κυττάρων (CD4+ T cells) που εμπλέκονται στην ανοσοανοχή, ρυθμίζοντας την ενεργοποίηση και την επέκταση των αυτοαντιδραστικών T-λεμφοκυττάρων, τον μηχανισμό της περιφερικής ανοχής, καθώς και τον έλεγχο της ανοσιακής ανοχής έναντι αυτό-αντιγόνων (self-Ags) και άλλο-αντιγόνων (allo-Ags) [66-68]. Αναπτύσσονται στον θύμο αδένα και στην περιφέρεια, ενώ εκφράζουν τους δείκτες CD4, CD25 και FoxP3 (CD4+/CD25+/FoxP3+, Tregs cell). Η κύρια δράση τους είναι η καταστολή των T-λεμφοκυττάρων (effector T cells) δια μέσω κυτοκινών (IL-10, TGFb), κυτταρόλυσης (εκφράζουν τα granzyme A & B), διαταραχής των μεταβολικών οδών και επέμβασης στην ωρίμανση και λειτουργία των δενδριτικών κυττάρων. Αξίζει να σημειωθεί ότι ο ρόλος των Tregs είναι δύσκολο να καθοριστεί, καθώς χαρακτηρίζονται από ετερογένεια του πληθυσμού τους και οι περισσότερες μελέτες γίνονται σε περιφερικό αίμα και όχι στην περιοχή της βλάβης. Στην κλινική πράξη η μείωση του πληθυσμού των T ρυθμιστικών κυττάρων ενέχεται στην ανάπτυξη αυτοάνοσων νοσημάτων, όπως ο σακχαρώσης διαβήτης τύπου I, η ψωρίαση, η μυασθένια Gravis και η ρευματοειδής αρθρίτιδα [69-70]. Αντίθετα αυξημένη έκφραση των Tregs έχει βρεθεί σε ασθενείς με κακοήθεις νεοπλασίες και λοιμώδεις νόσους [70-71]. Ιδιαίτερα σε ασθενείς με καρκίνο αυξημένες συγκεντρώσεις των Tregs σχετίζονται με υψηλή θνητότητα και μειωμένο διάστημα ελεύθερο νόσου.

Τα B-λεμφοκύτταρα προέρχονται από προγονικά κύτταρα του μυελού των οστών και κατόπιν μεταναστεύουν στο περιφερικό αίμα, λέμφο και στα λεμφικά όργανα [72-74]. Αποτελούν το

10-15% των λεμφοκυττάρων του περιφερικού αίματος. Η κύρια λειτουργία τους είναι η παραγωγή ανοσοσφαιρινών (Ig), δηλαδή αντισωμάτων (Ab), που δρουν ως αντιγονικοί υποδοχείς, ενώ ένας μικρός αριθμός τους εξελίσσεται σε Β-κύτταρα μνήμης παραμένοντας μακροχρόνια στο λεμφικό ιστό. Υπάρχουν 5 ομάδες ανοσοσφαιρινών: IgG, IgA, IgD, IgM, IgE και είναι είτε συνδεδεμένες με μεμβράνες στην επιφάνεια του κυττάρου είτε εκκρίνονται. Τα αντισώματα δρουν απενεργοποιώντας τις τοξίνες και τους ιούς ενεργοποιώντας ταυτόχρονα μη ειδικές απαντήσεις, όπως η φαγοκυττάρωση και το σύστημα του συμπλέγματος. Η έκθεση των Β-λεμφοκυττάρων στα αντιγόνα διαφοροποιεί περαιτέρω τα κύτταρα αυτά ώστε να τροποποιηθούν σε πλασματοκύτταρα και να παράγουν τις ανοσοσφαιρίνες που στρέφονται κατά των αντιγόνων. Τα Β-λεμφοκύτταρα εκφράζουν στην επιφάνειά τους το αντιγόνο CD19 (CD19+ cells), καθώς και μόρια της τάξης II του MHC λειτουργώντας ως αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα (APCs) για την ενεργοποίηση των Τ-λεμφοκυττάρων.

Τα φυσικά φονικά κύτταρα (NK cells) είναι μεγάλα λεμφοκύτταρα με χαρακτηριστικά κυτταροπλασματικά κοκκία που προέρχονται από τον μυελό των οστών και μεταναστεύουν στο περιφερικό αίμα, ενώ αποικίζουν τους λεμφαδένες και το σπλήνα [75-76]. Αποτελούν το 10-15% των περιφερικών λεμφοκυττάρων του αίματος και στην επιφάνειά τους εκφράζουν διάφορους αντιγονικούς δείκτες, όπως τον CD16 και τον CD56 (φαινότυπος CD16+/CD56+). Έχουν την ικανότητα να φονεύουν ορισμένα καρκινικά κύτταρα καθώς και κύτταρα μολυσμένα από ορισμένους ιούς μέσω έκκρισης τοξινών υπό μορφή κοκκίων. Παρ'όλα αυτά όμως η καταστροφή είναι μη ειδική, δηλαδή δεν είναι ειδική για τον ιό ή τα καρκινικά αντιγόνα. Επίσης συνθέτουν τον παράγοντα νέκρωσης των όγκων (TNF) και την γ-ιντερφερόνη (IFN-γ). Χαρακτηριστικό των φυσικών φονικών κυττάρων είναι ότι δεν εκφράζουν τον Τ-κυτταρικό υποδοχέα (TCR) και επομένως για να ενεργοποιηθούν δεν απαιτείται προηγουμένως επαφή με κάποιο αντιγόνο.

Κυτταρομετρία Ροής

Εισαγωγή

Οι πρώτες μελέτες με την χρήση κυτταρομετρίας ροής ανέρχονται το 1934 από τον A. Moldovan και συνεχίστηκαν με τις εργασίες του W. Coulter [77,78]. Κατόπιν κατά την δεκαετία του '60 έγιναν οι πρώτες εφαρμογές της κυτταρομετρίας ροής στην Ιατρική από τους L. Kamensky και M. Fulwyler [79,80]. Η ανακάλυψη των μονοκλωνικών αντισωμάτων από τους Kohler και Milstein (βραβείο Nobel Ιατρικής-Ανοσολογίας το 1984) άνοιξε τον δρόμο στη σύγχρονη κυτταρομετρία ροής διευρύνοντας σημαντικά το πεδίο των κλινικών εφαρμογών [81].

Η Κυτταρομετρία χωρίζεται σε δύο βασικές κατηγορίες την **Κυτταρομετρία Ροής** (*Flow Cytometry*) και την **Κυτταρομετρία Ανάλυσης Εικόνας** (*Image Cytometry*). Η Κυτταρομετρία Ροής είναι η τεχνολογία με την οποία γίνονται ποικίλες μετρήσεις και προσδιορισμοί σε κατάλληλα προετοιμασμένα κύτταρα ή οργανίδια κυττάρων (πυρήνες, χρωμοσώματα κλπ.). Η προετοιμασία των κυττάρων ή οργανιδίων αυτών έγκειται στη σήμανσή τους με φθορίζουσες χρωστικές. Κυτταρικά επιφανειακά και κυτταροπλασματικά μόρια μπορούν ευκρινώς να ανιχνευθούν με ανοσοφθορισμό με την χρήση μονοκλωνικών αντισωμάτων. Τα υπό έλεγχο σωματίδια, ρέουν με μορφή εναιωρήματος μπροστά από μία φωτεινή ακτίνα LASER, δια μέσου θαλάμου με ταχύτητα αρκετών χιλιάδων ανά δευτερόλεπτο. Η μέτρηση, αναγνώριση και η διαλογή γίνεται με βάση τον εκπεμπόμενο φθορισμό και τη σκέδαση του φωτός. Τα εκπεμπόμενα φωτεινά σήματα από το κάθε κύτταρο ή οργανίδιο αναλύονται, κατευθύνονται στους ανιχνευτές και στη συνέχεια μετατρέπονται σε ηλεκτρικά σήματα. Αυτά τα σήματα ενισχύονται, μετρούνται και τέλος διοχετεύονται υπό μορφή ψηφιακών ενδείξεων σε ηλεκτρονικό υπολογιστή, ο οποίος με ειδικό πρόγραμμα τα επεξεργάζεται και τα παρουσιάζει. Στο κάθε κύτταρο ή οργανίδιο μετρούνται το μέγεθος, η κοκκίωση και τα άλλα χαρακτηριστικά της ενδοκυττάριας ή εξωκυττάριας επιφάνειας, που έχουν σημανθεί με τις

φθορίζουσες χρωστικές. Με βάση αυτά τα δεδομένα, τα κύτταρα ή τα σωματίδια ταξινομούνται σε σύνολα και υποσύνολα και στη συνέχεια γίνεται η στατιστική επεξεργασία τους [82-84].

Προέκταση της τεχνολογίας αυτής είναι ο Κυτταροδιαχωρισμός Ροής (*cell sorting*), κατά τον οποίο οποιοδήποτε μεμονωμένο κύτταρο ή σωματίδιο, που έχει τις προαναφερθείσες πληροφορίες, απομακρύνεται επιλεκτικά από το εναιώρημα. Αυτό επιτυγχάνεται με τον εγκλωβισμό τους σε σταγονίδια, τα οποία φορτίζονται ηλεκτρικά επιλεκτικά. Στη συνέχεια τα σταγονίδια οδηγούνται σε ηλεκτροστατικό πεδίο, όπου, εκείνα που επιλέχθηκαν, εκτρέπονται από την πορεία τους και οδηγούνται για να συλλεχθούν σε ειδικό χώρο. Η σπουδαιότητα της μεθόδου έγκειται στο ότι εξασφαλίζει τη μέτρηση και ανάλυση των σημάτων του κάθε κυττάρου ή σωματιδίου τα οποία εστιάζονται ένα-ένα στο σημείο ανάλυσης, όπου γίνεται η μέτρηση των διαφόρων παραμέτρων.

Στην Κυτταρομετρία Ανάλυσης Εικόνας τα κύτταρα βρίσκονται ακινητοποιημένα σε κατάλληλα επεξεργασμένο επίχρισμα ενώ πάνω στα κύτταρα έχουν δεσμευτεί οι φθορίζουσες χρωστικές. Ο στόχος επιλέγεται είτε αυτόματα, είτε από τον παρατηρητή και κάθε κύτταρο εξετάζεται από το όργανο ξεχωριστά με ταχύτητα μερικών εκατοντάδων κυττάρων ανά δευτερόλεπτο.

Η Κυτταρομετρία Ροής είναι μία τεχνολογία με τεράστιες εφαρμογές, όπως: - Διάγνωση νοσημάτων, - Καρυστυπική ανάλυση, - Παρακολούθηση καρκινικής θεραπείας, - Κυτταρική κινητική, - Ανάλυση κυτταρικής λειτουργίας, - Ανίχνευση εμβρυϊκών κυττάρων, - Ταυτοποίηση καρκινικών κυττάρων, - Κυτταρογενετική, - Θεμελιώδης κυτταρική βιολογία.

Όλες οι εφαρμογές, που αναφέρθηκαν παραπάνω, βασίζονται σε μερικές ιδιότητες των κυττάρων και των συστατικών τους, τις οποίες ο κυτταρομετρητής έχει την δυνατότητα να μετρά

(Πίνακας 1).

Γενικά, ο κυτταρομετρητής μπορεί να αναλύσει οποιοδήποτε κυτταρικό συστατικό στο οποίο μπορεί να προσδεθεί χρωστική. Εάν η σύνδεση της χρωστικής είναι στοιχειομετρική (δηλ. η

ποσότητα της δέσμευσης της χρωστικής είναι ανάλογη της ποσότητας του κυτταρικού συστατικού), η μέτρηση είναι ποσοτική και υψηλής ακριβείας.

Πίνακας 1. Ιδιότητες και συστατικά των κυττάρων που μετρώνται με Κυτταρομετρία Ροής.

ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ	ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ
Κυτταρική Διάμετρος	DNA
Κατανομή Χρωστικής	Πυρηνικά Αντιγόνα
Εσωτερική Δομή	Ένζυμα
Δυναμικό Μembrάνης	Πρωτείνες
Πυρηνική Διάμετρος	RNA
Εμβαδόν Επιφανείας	Ορμόνες
Όγκος	Αντιγόνα Επιφανείας

Βασικές αρχές λειτουργίας του Κυτταρομετρητή Ροής

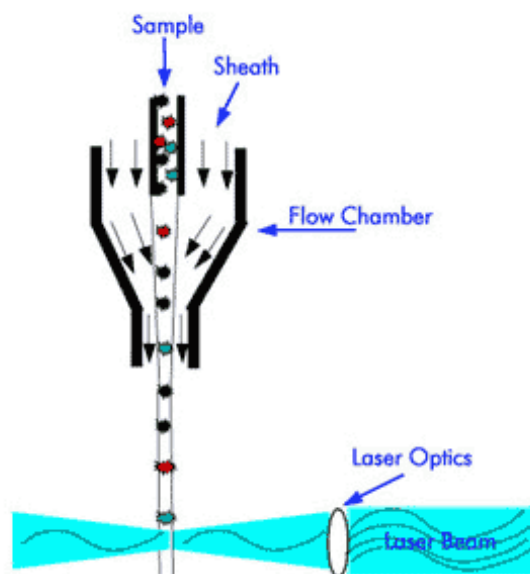
Ένας Κυτταρομετρητής Ροής αποτελείται από τρία συστήματα: 1. Σύστημα Ροής, 2. Οπτικό Σύστημα, 3. Σύστημα ανίχνευσης, επεξεργασίας και μετατροπής σε ηλεκτρονικό σήμα [85-87].

1. Σύστημα Ροής

Πρόκειται για ένα υδραυλικό σύστημα, που εξαναγκάζει τα κύτταρα ή τα σωματίδια να ρέουν το ένα μετά το άλλο μπροστά από την ακτίνα Laser (από τα αρχικά Light Amplification of Stimulated Emission of Radiation), απορροφώντας τα από το εναιώρημα εργασίας. Αυτό επιτυγχάνεται με τη εισαγωγή του δείγματος στο κέντρο ενός καναλιού, στο οποίο ρέει ένα αδρανές υγρό (Sheath Fluid). Το κανάλι είναι κατάλληλα σχεδιασμένο προκειμένου το δείγμα να ρέει κατά μήκος του κεντρικού του άξονα, περιβαλλόμενο από το αδρανές υγρό χωρίς να αναμιγνύεται, δηλαδή σαν να βρίσκεται μέσα σε μια θήκη (sheath). Το κανάλι τοποθετείται μέσα στο θάλαμο ροής

(flow chamber). Εκεί, ανάλογα με τις υδροδυναμικές ρυθμίσεις, επιτυγχάνεται και η υδροδυναμική εστίαση, έτσι ώστε το κύτταρο ή το σωματίδιο να έρχεται σε επαφή με την ακτίνα Laser με προσέγγιση $+1\mu\text{m}$.

Οι θάλαμοι ροής διακρίνονται σε θαλάμους νηματικής ροής (Luminar Flow) και σε θαλάμους στροβιλώδους ορίου (turbulent boundary), ανάλογα με την υδροδυναμική τους αρχή (Σχήμα 1). Επίσης, οι θάλαμοι ροής διακρίνονται και σε θαλάμους ανάλυσης (analytical chambers), για κυτταρομετρητές μέτρησης της σκέδασης και του φθορισμού, και σε θαλάμους διαλογής (sorting chambers), γι' αυτούς που διαθέτουν και σύστημα διαλογής κυττάρων ή σωματιδίων.

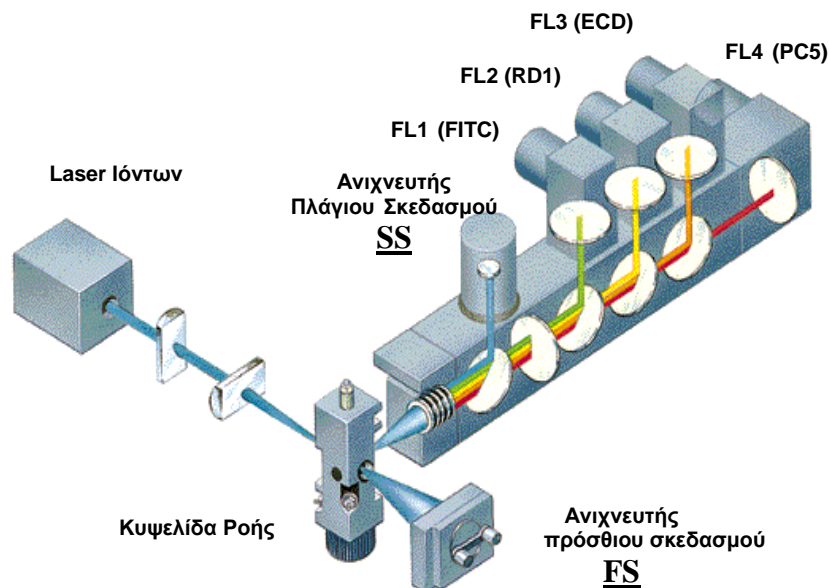


Σχήμα 1. Διάταξη κυψελίδας σε Κυτταρομετρητή Ροής. Διακρίνεται η κεντρική ροή του δείγματος, η περιβάλλουσα ροή (sheath), η προερχόμενη από laser φωτεινή δέσμη ακτινοβολίας και η σκέδαση της ακτινοβολίας μετά από πρόσπτωση σε ένα κύτταρο.

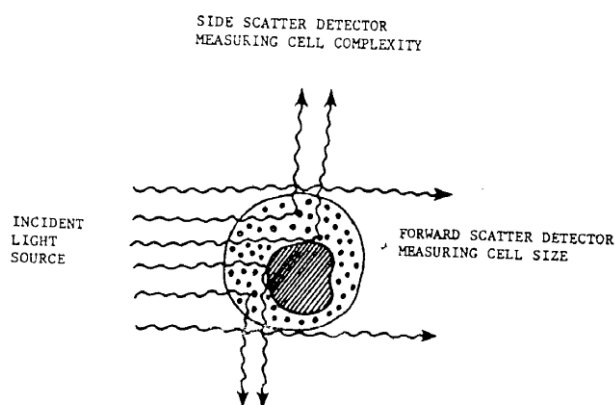
2. Οπτικό Σύστημα

Το σύστημα αυτό συλλέγει τα φωτεινά σήματα που εκπέμπονται από τα κύτταρα ή τα σωματίδια όταν προσπίπτει πάνω τους η φωτεινή δέσμη φωτός της λυχνίας. Στη συνέχεια αναλύεται η συλλεγόμενη ακτινοβολία, η οποία αντιστοιχεί στη σκέδαση του φωτός και στον εκπεμπόμενο φθορισμό καθορισμένης έντασης με βάση το φθοριόχρωμα (**Σχήμα 2**).

Η σκέδαση του φωτός δημιουργείται όταν το κύτταρο ή το σωματίδιο δέχεται την κάθετη προς τη διεύθυνση ροής δέσμη της λυχνίας. Η προσπίπτουσα ακτινοβολία απορροφάται κατά ένα μέρος από το κύτταρο και κατά το υπόλοιπο σκεδάζεται προς όλες τις κατευθύνσεις. Η ακτινοβολία που σκεδάζεται στην κατεύθυνση της προέκτασης της ακτίνας Laser, με γωνία 1° - 20° , ονομάζεται πρόσθια σκεδαζόμενη ακτινοβολία (Forward Light Scatter, FSC) και είναι ανάλογη προς το μέγεθος του κυττάρου ή του σωματιδίου. Η ακτινοβολία που σκεδάζεται σε κατεύθυνση κάθετη προς τον άξονα της ακτίνας Laser, με γωνία 90° , ονομάζεται κάθετη ή πλάγια σκεδαζόμενη ακτινοβολία (Right Angle Scatter, ή Side Scatter, SSC) και είναι ανάλογη προς την κοκκίωση του κυτταροπλάσματος του κυττάρου ή σωματιδίου (**Σχήμα 3**).



Σχήμα 2. Σχηματική απεικόνιση της οπτικής διάταξης ενός κυτταρομετρητή ροής. Διαθέτει μία φωτεινή πηγή Laser ιόντων Αργού (488 nm) και τέσσερις φωτοπολλαπλασιαστές για την ταυτόχρονη ανίχνευση 4 φθοριοχρωμάτων (FITC, PE, ECD/PI και PC5/PercP/PC5.5).

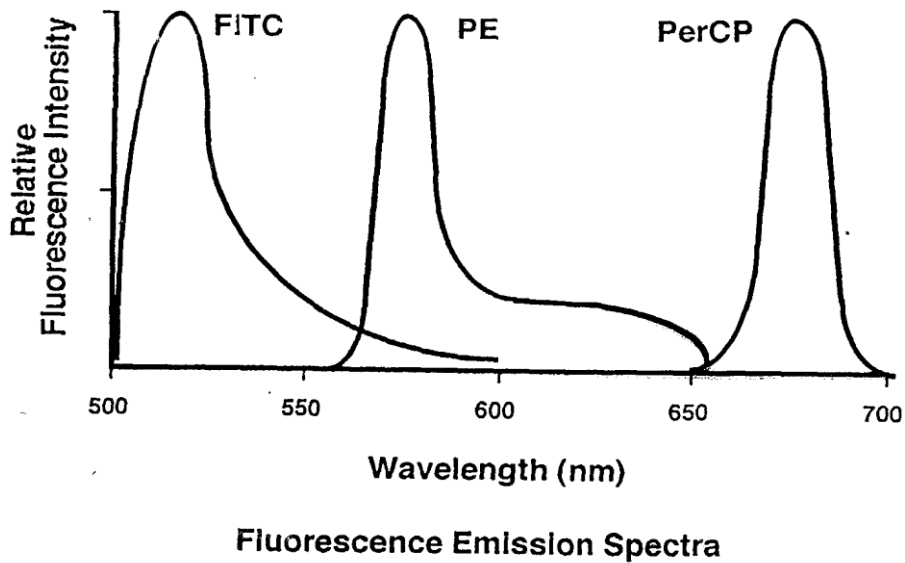


Σχήμα 3. Σχηματική ανάλυση κυττάρου ως προς την κοκκίωση (SSC) και το μέγεθός του (FSC).

Όταν κατά τη διαδικασία προετοιμασίας του δείγματος τα κύτταρα ή τα σωματίδια σημανθούν με φθορίζουσες ουσίες, όπως η ισοθειοκυανική φλουορεσκεΐνη **FITC (πράσινο)**, η τετραμεθυλοροδαμίνη, η R-φυκοερυθρίνη **PE (κόκκινο)**, η περιδινούχος χλωροφύλλη-A-πρωτεΐνη **PerCP, Texas Red** ή άλλες φθορίζουσες ουσίες προσδεδεμένες στα μονοκλωνικά αντισώματα, παράγεται φθορισμός [85]. Τα φθοριοχρώματα αυτά διεγείρονται από την προσπίπτουσα ακτινοβολία (διεγείρουσα) και στη συνέχεια εκπέμπουν ακτινοβολία μεγαλύτερου μήκους κύματος της διεγείρουσας, το οποίο είναι χαρακτηριστικό για κάθε φθοριοχρώμα (**Πίνακας 2**). Στο **Σχήμα 4** παρουσιάζονται τα φάσματα εκπομπής των φθοριοχρωμάτων FITC, PE και PerCP, που είναι τα περισσότερο διαδεδομένα δεσμευμένα φθοριοχρώματα στα αντισώματα του εμπορίου.

Πίνακας 2. Φθοριοχρώματα που χρησιμοποιούνται στη Κυτταρομετρία Ροής.

ΦΘΟΡΙΖΟΥΣΑ ΟΥΣΙΑ	ΜΗΚΟΣ ΚΥΜΑΤΟΣ ΔΙΕΓΕΡΣΗΣ LASER (nm)	ΜΗΚΟΣ ΚΥΜΑΤΟΣ ΕΚΠΟΜΠΗΣ (nm)
FITC	488 nm	525 nm
PE	488 nm	578 nm
ECD	488 nm	613 nm
PerCP	488 nm	675 nm
Alexa Fluor 405	405, 407	421
Alexa Fluor 430	405, 407	541
Alexa Fluor 488	488	519
Alexa Fluor 633	633, 635, 647	647
Alexa Fluor 647	633, 635, 647	665
Alexa Fluor 660	633, 635, 647	690
Alexa Fluor 680	633, 635, 647	702
APC	633, 635, 647	661



Σχήμα 4. Τα φάσματα εκπομπής των φθοριοχρωμάτων FITC, PE και PerCP.

Οι χρωστικές PE, FITC και PerCP μπορούν να συνδεθούν με κατάλληλα μονοκλωνικά ή πολυκλωνικά αντισώματα, που αναγνωρίζουν τις αντιγονικές καθορίζουσες της κυτταρικής επιφάνειας ή της ενδοκυττάριας επιφάνειας. Με αυτόν τον τρόπο δίνεται η δυνατότητα της ανίχνευσης των καθοριζουσών στην επιφάνεια του καθενός από τα μετρούμενα κύτταρα, με αποτέλεσμα την δυνατότητα χαρακτηρισμού και ταξινόμησης του κάθε κυττάρου σε υποπληθυσμούς, σύμφωνα με τους συνδυασμούς που έχουν σχεδιαστεί. Με την ολοκλήρωση των μετρήσεων των φωτεινών σημάτων σκέδασης και φθορισμού, σε κάθε κύτταρο αντιστοιχεί μια τετράδα τιμών (FSC, SSC, FL1, FL2), η οποία μας δίνει τα δεδομένα για το μέγεθος, την κοκκίωση και το βαθμό έκφρασης των δύο αντιγονικών καθοριζουσών.

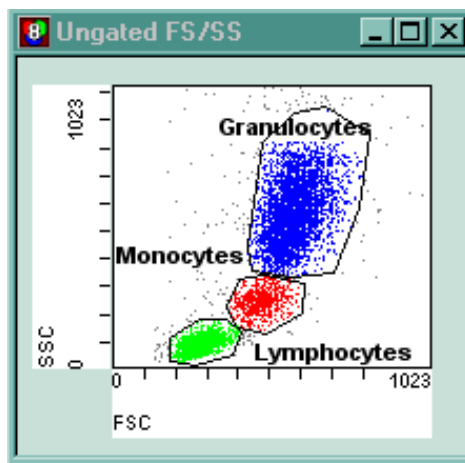
3. Σύστημα Ανίχνευσης, Επεξεργασίας και Μετατροπής σε Ηλεκτρονικό Σήμα

Στους κυτταρομετρητές ροής χρησιμοποιούνται δύο συστήματα ανίχνευσης των φωτεινών δεδομένων που προέρχονται από την σκέδαση και το φθορισμό: α) οι φωτοдиодοι (PIN diodes) και β) οι φωτοπολλαπλασιαστές (photomultiplier tubes PMTs).

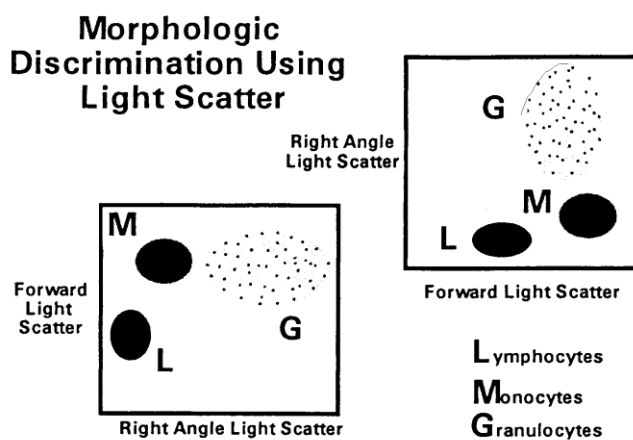
Οι PIN έχουν ευαισθησία στις μετρήσεις FSC και SSC, ενώ παρουσιάζουν μειωμένη ευαισθησία στον φθορισμό. Οι PMTs, αν και μικρότερου φάσματος, διαθέτουν, συγκρινόμενες με τις PIN, μεγαλύτερη ευαισθησία, όχι μόνο στις μετρήσεις FSC και SSC, αλλά και στον φθορισμό. Το παλμικό σήμα που παράγεται μένει στην έξοδο για 15-120 μsec . Κατά τη διάρκεια αυτού του χρονικού διαστήματος, το οποίο λέγεται νεκρός χρόνος, δεν καταγράφονται άλλα σήματα στο σύστημα. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα ο παρατεταμένος χρόνος να επηρεάζει κυρίως τη διαλογή και σε μικρότερο βαθμό την αναλυτική ικανότητα του Κυτταρομετρητή.

Το παλμικό σήμα αναλύεται ως προς το ύψος, το πλάτος και την επιφάνεια, δίνοντας έτσι πληροφορίες για το μέγεθος, την κοκκίωση και τον φθορισμό των κυττάρων ή σωματιδίων. Η επεξεργασία μπορεί να γίνει είτε γραμμικά, είτε λογαριθμικά μετά από χρήση ενισχυτή (amplifier). Με αυτόν τον τρόπο έχουμε ενίσχυση των ασθενών σημάτων και ταυτόχρονα περιορισμό των ενδείξεων που αντιστοιχούν στα ισχυρά σήματα. Έτσι, όλες οι τιμές λαμβάνονται στην ίδια κλίμακα. Τα δυαδικά αυτά σήματα μεταβιβάζονται στη μνήμη ηλεκτρονικού υπολογιστή, ώστε να ακολουθήσουν οι ανάλογες επεξεργασίες των δεδομένων.

Υπάρχουν διάφοροι τρόποι παρουσίασης των αποτελεσμάτων όπως τα **Κυτταρογράμματα (Dot Plot)**, τα οποία σχετίζουν δύο παραμέτρους και χρησιμοποιούνται ευρύτερα. Στο **Σχήμα 5** ένα κυτταρογράμμα παρουσιάζει το μέγεθος και την κοκκίωση των κυττάρων του περιφερικού αίματος. Στα κυτταρογράμματα ανάλογα με τα δεδομένα που δίδονται στις συντεταγμένες, είναι δυνατόν να παίρνουμε: α) την κοκκίωση στον άξονα των χ και το μέγεθος στον άξονα των ψ , ή β) το αντίστροφο (**Σχήμα 6**).



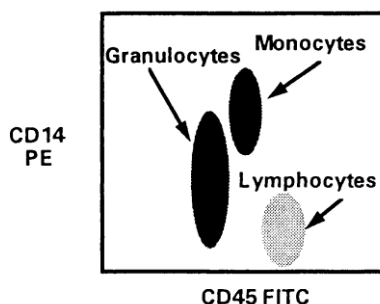
Σχήμα 5. Κυτταρόγραμμα ως προς το μέγεθος FSS (άξονας χ) και την κοκκίωση SSC (άξονας ψ), μετά από λύση των ερυθρών αιμοσφαιρίων περιφερικού αίματος. Διακρίνονται οι τρεις βασικοί υποπληθυσμοί των λευκοκυττάρων (λεμφοκύτταρα, μονοκύτταρα, πολυμορφοπύρηνα).



Σχήμα 6. Σχηματική μορφολογική κατανομή των κυττάρων του περιφερικού αίματος σύμφωνα με το μέγεθος και την κοκκίωση (L –λεμφοκύτταρα, M-μονοκύτταρα, G-πολυμορφοπύρηνα) σε FSC, SSC.

Επίσης, είναι δυνατόν το κυτταρόγραμμα να παρουσιάζει την ένταση ανοσοφθορισμού της έκφραση του παν-λευκοκυτταρικού αντιγόνου CD45 FITC και του CD14 PE (**Σχήμα 7**).

CD45 vs CD14 Expression on Peripheral Blood Leukocytes

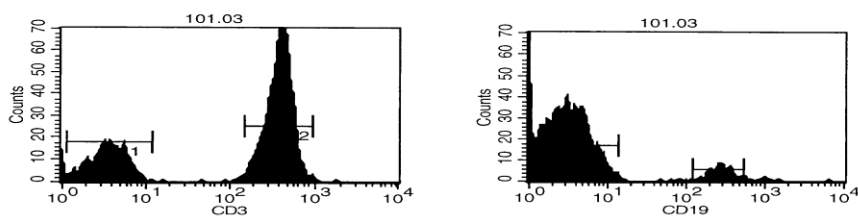


Σχήμα 7. Σχηματική κατανομή των κυττάρων του περιφερικού αίματος σύμφωνα με την ένταση του ανοσοφθορισμού με τα αντισώματα CD45 FITC και CD14 PE.

Άλλοι τρόποι παρουσίας και επεξεργασίας των αποτελεσμάτων είναι τα διαγράμματα:

- α) κατανομής συχνοτήτων ή **Ιστόγραμμα** (στο **Σχήμα 8** φαίνεται η ένταση φθορισμού -άξονας χ-, προς τον αριθμό των συμβάντων -άξονας ψ-),
- β) **ισοΨών καμπυλών (counter plot)** (**Σχήμα 9**)
- γ) **ισομετρικών (isometric plot)** (**Σχήμα 10**)
- δ) **όψης διαμαντιού (diamond view)** (**Σχήμα 11**)

Τα διαγράμματα αυτά προσφέρουν στον ερευνητή τη δυνατότητα εντοπισμού και ανάλυσης ακόμη και του μικρότερου παθολογικού ή μη πληθυσμού.



Histogram Statistics

File: 101.03
 Sample ID:
 Patient Name: BC
 Acquisition Date: 12-Oct-0
 Gated Events: 2104
 X Parameter: FL1-H CD3 (Log)
 Log Data Units: Linear Values
 Patient ID: 1
 Case Number: 1
 Gate: G1
 Total Events: 12000

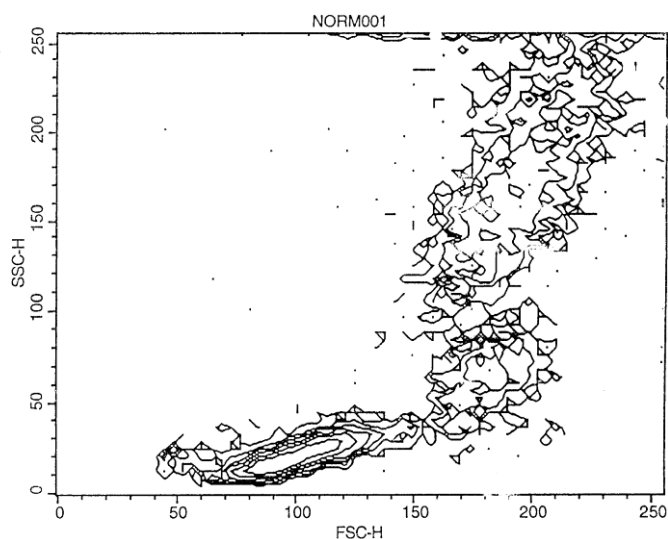
Marker	Left, Right	Events	% Gated	% Total	Mean	Geo Mean	CV	Median	Peak Ch
All	1, 9647	2104	100.00	17.53	271.16	95.54	73.73	305.05	365
M1	1, 12	570	27.09	4.75	3.93	3.53	45.80	3.65	3
M2	143, 931	1493	70.96	12.44	377.04	358.14	31.80	365.17	365

Histogram Statistics

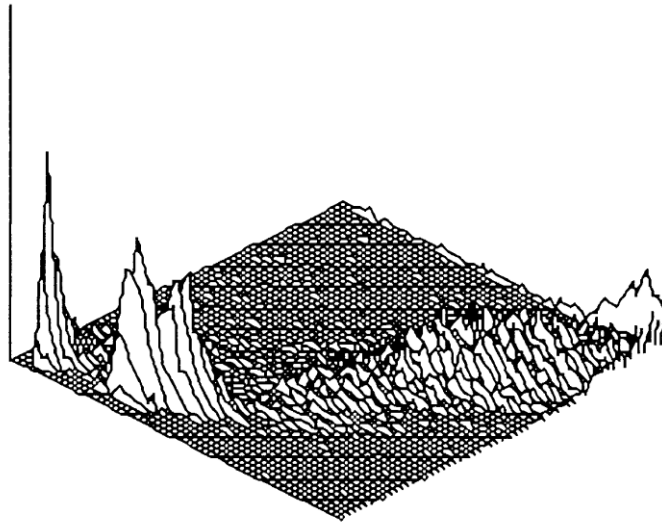
File: 101.03
 Sample ID:
 Patient Name: E
 Acquisition Date: 12-Oct-0
 Gated Events: 2104
 X Parameter: FL2-H CD19 (Log)
 Log Data Units: Linear Values
 Patient ID: 1
 Case Number: 1
 Gate: G1
 Total Events: 12000

Marker	Left, Right	Events	% Gated	% Total	Mean	Geo Mean	CV	Median	Peak Ch
All	1, 9647	2104	100.00	17.53	33.20	3.96	499.11	2.94	1
M1	1, 13	1527	72.58	12.73	3.89	3.33	59.43	3.28	3
M2	115, 523	158	7.51	1.32	272.38	259.99	30.84	264.16	237

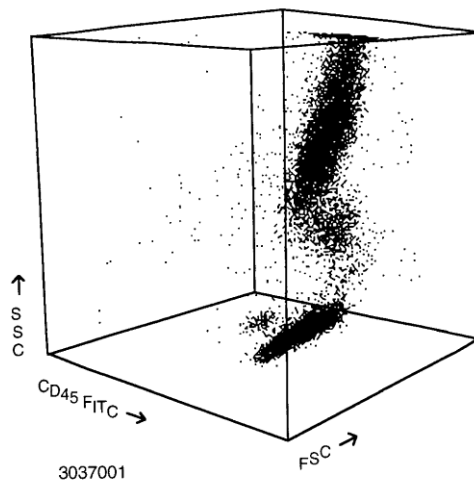
Σχήμα 8. Ιστόγραμμα συχνότητας. Στον άξονα χ απεικονίζεται η ένταση του φθορισμού και στον άξονα ψ ο αριθμός των συμβάντων. Συγχρόνως παρουσιάζεται και η στατιστική ανάλυση των δεδομένων (CD3 αριθμός T-λεμφοκυττάρων, CD19 αριθμός B-λεμφοκυττάρων).



Σχήμα 9. Διάγραμμα ισοψών καμπυλών (counter plot) της FSC (άξονας χ) και SSC (άξονας ψ).



Σχήμα 10. Ισομετρικό διάγραμμα (isometric plot) της FSC (άξονας χ) έναντι του SSC (άξονας ψ) και του αριθμού των συμβάντων (άξονας z).



Σχήμα 11. Διαγράμματα όψης διαμαντιού (diamond view) Στο διάγραμμα αποδίδονται περισσότερα του ενός κυτταροδιαγράμματα.

Στη συνέχεια ο ερευνητής, χρησιμοποιώντας τα προγράμματα στατιστικής ανάλυσης των δεδομένων και τη δυνατότητα οριοθέτησης ορισμένων περιοχών στα κυτταρογράμματα [gate, «παράθυρο»], έχει την ευκαιρία να αναλύσει και να εξάγει σημαντικές παρατηρήσεις από την οριοθετημένη περιοχή. Η στατιστική ανάλυση βεβαίως αναφέρεται στο συγκεκριμένο υποπληθυσμό. Με τον τρόπο αυτό επιτυγχάνεται ο εμπλουτισμός του εξεταζόμενου δείγματος σε κύτταρα ή σωματίδια.

Κλινικές και ερευνητικές εφαρμογές της Κυτταρομετρίας Ροής

Οι εφαρμογές της Κυτταρομετρίας Ροής είναι ποικίλες με πρωτεύοντα ρόλο στην Αιματολογία ενώ ακολουθεί η Ανοσολογία, η Λοιμωξιολογία, η Ογκολογία, η Ουρολογία, η Μαιευτική και Γυναικολογία, καθώς επίσης και στο τομέα των Μεταμοσχεύσεων έχει τα τελευταία χρόνια πολύτιμη συμμετοχή η τεχνογνωσία αυτή (Πίνακας 3) [86-87].

Πίνακας 3. Εφαρμογές της Κυτταρομετρίας Ροής.

Αιματολογία	Τυποποίηση Λευχαιμιών /Λεμφωμάτων
Ανοσολογία	Μελέτη της πλοειδίας και των φάσεων του κυτταρικού κύκλου των Αιματολογικών κακοηθειών
Λοιμωξιολογία	Ανοσολογικές Ανεπάρκειες
Ογκολογία	Παρακολούθηση Μεταμοσχεύσεων
Ουρολογία	Παρακολούθηση Θεραπειών
Μαιευτική και Γυναικολογία	Αυτοάνοσα Νοσήματα
Στον τομέα των Μεταμοσχεύσεων	HLA-τυποποίηση
Παιδιατρική	Διάγνωση ΡΝΗ
Παθολογοανατομία	Ποσοτικοποίηση των Αρχέγονων Αιμοποιητικών κυττάρων
Κυτταρολογία	Μέτρηση των ΔΕΚ
Πνευμονολογία	Παρακολούθηση της Σήψης
Νευρολογία	Οξειδωτική έκρηξη - Φαγοκυττάρωση
Οφθαλμολογία	Μελέτη του ανοσοφαινότυπου της Λευχαιμικής Υπολειμματικής Νόσου
	Βασικός έλεγχος των HIV+ ατόμων
	Μελέτη της ενεργοποίησης των Αιμοπεταλίων
	Θετική διαλογή προγονικών αιμοποιητικών κυττάρων
	DNA-Ανάλυση
	Μελέτη της αντοχής στα χημειοθεραπευτικά
	Μελέτη της Απόπτωσης

Η κυτταρομετρική ανάλυση μπορεί να εφαρμοσθεί σε δείγματα κυττάρων, ιστών καθώς και βιολογικών υγρών, όπως το περιφερικό αίμα, ο μυελός των οστών, το βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα (BAL), το αρθρικό υγρό, το πλευριτικό υγρό, το ασκитικό υγρό, το περιτοναϊκό υγρό, το περικαρδιακό υγρό και το εγκεφαλονωτιαίο υγρό (ENY).

Η Παθολογία με την Παιδιατρική συχνά χρησιμοποιούν την ανοσολογική διαγνωστική της αξία στην καθημερινή κλινική πράξη, ενώ η Παθολογοανατομία με την Κυτταρολογία έχουν ένα πολύτιμο συνεργάτη στην διαφοροδιάγνωση πολλών νοσημάτων. Η Πνευμονολογία στη μελέτη του βρογχοκυψελιδικού εκπλύματος, η Νευρολογία στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό, η Νευροχειρουργική στην διάγνωση και θεραπεία των εγκεφαλικών όγκων, η Οφθαλμολογία στο υαλοειδές και υδατοειδές υγρό, είναι οι νέες ειδικότητες, οι οποίες σήμερα μπορούν να αξιοποιήσουν τις δυνατότητες της κυτταρομετρίας ροής [88-90].

Η χρήση της κυτταρομετρίας ροής στην Αιματολογία κατέχει την μερίδα του λέοντος. Η βασική εξέταση που έκανε την κυτταρομετρία ροής να κατέχει μία ξεχωριστή θέση στην καθημερινή κλινική πρακτική είναι η μελέτη των υποπληθυσμών των λεμφοκυττάρων. Η πανδημία του AIDS αναμφίβολα απογείωσε την κυτταρομετρία ροής στην ιατρική διαγνωστική, γιατί η μέτρηση του απόλυτου αριθμού των CD4+ T-λεμφοκυττάρων χρησιμεύει διαγνωστικά, προγνωστικά, αλλά και στην παρακολούθηση της νόσου.

Επίσης αφορά διάφορα αιματολογικά νοσήματα και μάλιστα στις κακοήθειες, όπου ο ρόλος της δεν είναι μόνο διαγνωστικός, αλλά και προγνωστικός κατά την ανίχνευση της υπολειπόμενης νόσου κατά την διάρκεια της θεραπείας [91-94]. Η ακριβής διάγνωση είναι ο πρώτος στόχος που πρέπει να επιτευχθεί για να επιλεγεί η σωστή θεραπεία στους ασθενείς με οξεία λευχαιμία. Σήμερα η ανοσοφαινοτυπική ανάλυση των λευχαιμικών κύτταρων με την μέθοδο της κυτταρομετρίας ροής θεωρείται απαραίτητη στη μελέτη της οξείας λευχαιμίας, για να συμπληρωθούν οι πληροφορίες του απλού μικροσκοπίου και της κυτταροχημείας, γιατί η κυτταρομετρία ροής επιτρέπει την ταχεία

ανάλυση μεγάλου αριθμού κυττάρων, ακόμη και σε μικρά δείγματα δίνοντας υψηλή στατιστική ακρίβεια.

Στην κλινική διαγνωστική οι παιδίατροι μπορεί να ζητούν υποπληθυσμούς των λεμφοκυττάρων στα πλαίσια διερεύνησης μιας συγγενούς ανοσοανεπάρκειας όπου η διαφοροδιάγνωση διαφέρει ανάλογα με την έλλειψη ή την εξεσημασμένη μείωση των T, B, ή και NK λεμφοκυττάρων. Επίσης, η εξέταση αυτή χρησιμοποιείται προκειμένου να εκτιμηθεί το ανοσολογικό κλάσμα κάποιου ασθενούς, στην οποία ζητούνται η αναλογία και ο απόλυτος αριθμός των CD4+ και CD8+ λεμφοκυττάρων [95].

Η ανοσοφαινοτυπική μελέτη των κυττάρων του περιφερικού αίματος, όπως και των κυττάρων που διηθούν το μόσχευμα, περιλαμβάνεται σε όλα τα πρωτόκολλα παρακολούθησης ατόμων που έχουν υποβληθεί σε μεταμόσχευση καρδιάς, νεφρού, ήπατος. Η συνεισφορά της κυτταρομετρίας ροής στις μεταμοσχεύσεις οργάνων βασίζεται στην ειδική ορολογική διασταύρωση (flow cytometry crossmatch - FCXM), η οποία είναι μια πολύ ευαίσθητη μέθοδος ανίχνευσης αντισωμάτων έναντι των αντιγόνων HLA. Γενικά, η FCXM θεωρείται σήμερα η καταλληλότερη για την παρακολούθηση της μακροχρόνιας πρόγνωσης και επιβίωσης του μοσχεύματος, λόγω της ικανότητάς της να διαγιγνώσκει τη μειωμένη λειτουργία του μοσχεύματος και ιδιαίτερα τη πρόιμη οξεία απόρριψή του. Μέθοδο επιλογής αποτελεί επίσης και η παρακολούθηση των κυτταρικών υποπληθυσμών στο βροχοκυψελιδικό έκπλυμα στους ασθενείς που έχουν υποβληθεί σε μεταμόσχευση πνευμόνων. Η παρακολούθηση του απόλυτου αριθμού των T- λεμφοκυττάρων μετά την χορήγηση αντιθυμοκυτταρικής ή αντιλεμφοκυτταρικής σφαιρίνης καθώς και του μονοκλωνικού αντισώματος OKT3 σε ασθενείς που απορρίπτουν το μόσχευμά τους, αποτελεί μέθοδο ελέγχου της αποτελεσματικότητας των ανοσοκατασταλτικών αυτών σχημάτων [96].

Η κυτταρομετρία ροής αποτελεί μια αντικειμενική μέθοδο με την οποία επιτυγχάνεται η αναγνώριση του παθολογικού πληθυσμού και ο προσδιορισμός της κυτταρικής σειράς. Η μελέτη του κυτταρικού κύκλου, η ανάλυση της κλωνικότητας μαζί με τις κυτταρογενετικές και μοριακές

μελέτες του παθολογικού πληθυσμού αποτελούν την ολοκληρωμένη διαγνωστική προσέγγιση ενός νοσήματος, σύμφωνα με τα διεθνή πρωτόκολλα. Η κυτταρομετρία ροής δίνει τη δυνατότητα της ποσοτικής μέτρησης της έκφρασης των αντιγόνων στα αιμοποιητικά κύτταρα και η ταυτοποίηση σύνθετων αντιγονικών συνδυασμών, που σχετίζονται με συγκεκριμένες μοριακές βλάβες και συγκεκριμένη κυτταρική βιολογία.

ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΣ

Κατηγοριοποίηση ασθενών σε Ομάδες

Πρόκειται για μια προοπτική κλινικο-εργαστηριακή μελέτη στην οποία συμπεριελήφθησαν συνολικά 25 ασθενείς (7 άντρες, 18 γυναίκες, μέση ηλικία: 28 έτη, εύρος: 16-44 έτη) στους οποίους τοποθετήθηκαν προσωρινά και μόνιμα ενθέματα σιλικόνης κατά το χρονικό διάστημα Σεπτέμβριος 2006 έως Νοέμβριος 2009. Ανάλογα με το είδος και τον λόγο χρήσης των ενθεμάτων σιλικόνης οι ασθενείς χωρίστηκαν σε 2 (δύο) ομάδες.

Η Ομάδα Α περιελάμβανε 11 ασθενείς στους οποίους τοποθετήθηκε προσωρινό ένθεμα σιλικόνης (7 άντρες, 4 γυναίκες, μέση ηλικία: 26.5 έτη, εύρος: 16-35 έτη). Όλοι οι ασθενείς έπασχαν από συγγενή ή επίκτητη πάθηση του δέρματος και των μαλάκων μορίων και πιο συγκεκριμένα 7 ασθενείς έφεραν δύσμορφη ουλή (5 μετεγχειρητικής αιτιολογίας, 2 μετεγκαυματικής αιτιολογίας), 3 ασθενείς έφεραν συγγενή γιγαντιαίο σπίλο και ένας ασθενής έπασχε από ιατρογενή αλωπεκία. Τα δημογραφικά στοιχεία των ασθενών της Ομάδας Α είναι συγκεντρωμένα στον **Πίνακα 4**.

Η Ομάδα Β περιελάμβανε 14 ασθενείς (14 γυναίκες, μέση ηλικία: 29.3 έτη, εύρος: 18-44 έτη) στις οποίες έγινε αυξητική μαστών και τοποθετήθηκε μόνιμο ένθεμα σιλικόνης για επανορθωτική ή αισθητική αποκατάσταση. Τα δημογραφικά στοιχεία των ασθενών της Ομάδας Β είναι συγκεντρωτικά στον **Πίνακα 5**.

Και στις δύο Ομάδες ασθενών έγινε λήψη και πλήρης καταγραφή του ιστορικού, καθώς και παρακολούθηση για τυχόν εμφάνιση επιπλοκών κατά την άμεση και απώτερη μετεγχειρητική περίοδο. Όλοι οι ασθενείς ήταν υγιείς, ενώ τα κριτήρια αποκλεισμού περιελάμβαναν ασθενείς με ιστορικό ή συμπτώματα ρευματοειδούς πάθησης, διαταραχές του συνδετικού ιστού καθώς και η ύπαρξη συστηματικού αυτοάνοσου νοσήματος.

Πίνακας 4. Δημογραφικά στοιχεία των ασθενών της Ομάδας Α. Α=άρρεν, Θ=θήλυ

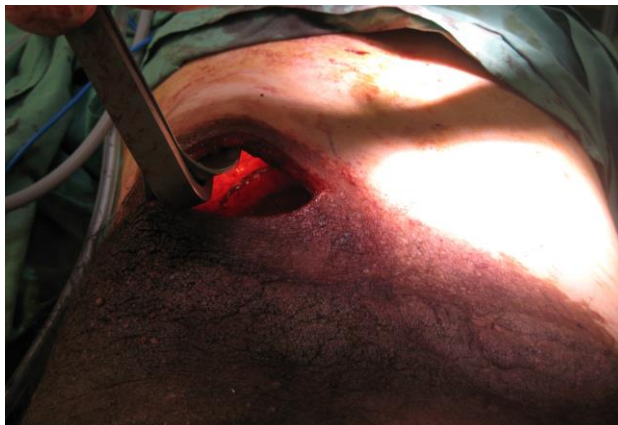
Ασθενής	Ηλικία / Φύλο	Διάγνωση	Εντόπιση	Αριθμός διατατήρων ιστού	Σχήμα / Όγκος διατατήρα ιστού
Κ.Χ	33/Α	Μετεγχειρητική ουλή (αφαίρεση τατουάζ)	Βραχίονας	2	Μηνοειδές / 200cc & 300cc
Δ.Β	31/Θ	Μετεγκουματική ουλή	Βραχίονες άμφω	2	Μηνοειδές / 100cc & 200cc
Ε.Π	16/Θ	Γιγαντιαίος σπίλος	Κοιλία	2	Μηνοειδές & Ελλειπτικό / 100cc (μηνοειδές) & 50cc (ελλειπτικό)
Ν.Ε	27/Θ	Μετεγχειρητική ουλή (χειρουργηθείσα οξεία κοιλία)	Κοιλία	4	2 Μηνοειδή & 2 Ελλειπτικά / 100cc (μηνοειδή) & 50cc (ελλειπτικά)
Θ.Θ	29/Α	Μετεγχειρητική ουλή (κάταγμα κνήμης)	Κνήμη	2	Ελλειπτικό / 125cc & 250cc
Π.Ε	31/Α	Γιγαντιαίος σπίλος	Κρόταφος	1	Στρογγυλό / 150cc
Λ.Ο	31/Θ	Μετεγχειρητική ουλή (αρθροπλαστική ισχίων)	Ισχίο άμφω	2	Μηνοειδές / 400cc
Κ.Χ	20/Α	Ιατρογενής αλωπεκία	Τριχωτό κεφαλής	1	Μηνοειδές / 100cc
Τ.Τ	31/Α	Γιγαντιαίος σπίλος	Οσφύ	4	3 Μηνοειδή & 1 ορθογώνιο / 500cc, 700cc, 850cc (μηνοειδή), 1500cc (ορθογώνιο)
Ν.Χ	35/Α	Μετεγχειρητική ουλή (χειρουργηθέν κερατοακάνθομα)	Μέτωπο	1	Ελλειπτικό / 25cc
Κ.Λ	35/Α	Μετεγκουματική ουλή	Βραχίονας-Αντιβράχιο	2	Μηνοειδές / 250cc & 360cc

Πίνακας 5. Δημογραφικά στοιχεία των ασθενών της Ομάδας Β. Θ=θήλυ

Ασθενής	Ηλικία / Φύλο	Διάγνωση	Σχήμα / Όγκος ενθέματος σιλικόνης
M.M	20/Θ	Σύνδρομο Poland	Ανατομικό / 350cc
K.E	26/Θ	Σωληνωτοί μαστοί	Ανατομικό / 245cc
M.A	25/Θ	Αυξητική μαστών	Ανατομικό / 215cc
Σ.Σ	18/Θ	Αυξητική μαστών	Ανατομικό / 280cc
Λ.Μ	45/Θ	Αυξητική μαστών	Ανατομικό / 275cc
T.I	32/Θ	Αυξητική μαστών	Στρογγυλό / 225cc
E.Φ	30/Θ	Αυξητική μαστών	Ανατομικό / 280cc
K.A	44/Θ	Αυξητική μαστών	Στρογγυλό / 225cc
K.A	32/Θ	Αυξητική μαστών	Ανατομικό / 225cc
N.Φ	32/Θ	Αυξητική μαστών	Ανατομικό / 250cc
N.Σ	29/Θ	Αυξητική μαστών	Ανατομικό / 250cc
M.X	18/Θ	Αυξητική μαστών	Ανατομικό / 280cc
Λ.Σ	31/Θ	Αυξητική μαστών	Ανατομικό / 320cc
Γ.Λ	32/Θ	Αυξητική μαστών	Ανατομικό / 280cc

Περιγραφή της χειρουργικής επέμβασης

Στην Ομάδα Α η τοποθέτηση των διατατήρων ιστού έγινε με την συνδυαστική χρήση της ανοικτής και ενδοσκοπικής μεθόδου. Αρχικά πραγματοποιήθηκε τομή περίξ της βλάβης για κάθε έναν διατατήρα ιστού. Η επιλογή της θέσης των δερματικών τομών έγινε με γνώμονα την καλύτερη δυνατή τοποθέτηση και διάταση των ενθεμάτων, αλλά και για την επίτευξη του καλύτερου αισθητικού αποτελέσματος. Κατόπιν υπό άμεση όραση και την χρήση του ενδοσκοπίου έγινε η παρασκευή της κατάλληλης υποδορίου θήκης και επιμελής αιμόσταση (**Εικόνα 8**). Ακολούθησε η τοποθέτηση παροχετεύσεων κενού και τέλος η τοποθέτηση των διατατήρων ιστού και η συρραφή των χειρουργικών τραυμάτων. Χρησιμοποιήθηκαν διατατήρες ιστού κάθε σχήματος (στογγυλό, μηνοειδές, ορθογώνιο και ελλειπτικό) και όγκου (25cc μέχρι 1500cc), ενώ όλοι είχαν απομακρυσμένη βαλβίδα πλήρωσης. Η διάταση ξεκίνησε διεγχειρητικά και ακολούθως ανα τακτά χρονικά διαστήματα, αναλόγως με την επούλωση και την ανεκτικότητα των ασθενών (**Εικόνα 9**). Κατά τον 2^ο χειρουργικό χρόνο αφαίρεσης των διατατήρων ιστού (μέσος όρος παραμονής: 6.5 μήνες, εύρος: 4-8 μήνες) οι ασθενείς υποβλήθηκαν σε ευρεία εκτομή της πρωτοπαθούς βλάβης και κάλυψη του ελλείματος με την χρήση της περίσσειας δέρματος που δημιουργήθηκε, καθώς και με την χρήση τοπικών και περιοχικών κρημών (**Εικόνα 10**).



Εικόνα 8. Χρήση ενδοσκοπικού συστήματος ψυχρού φωτισμού για την τοποθέτηση του διατατήρα ιστού σε ασθενή με συγγενή γιγαντιαίο σπίλο οσφύος.

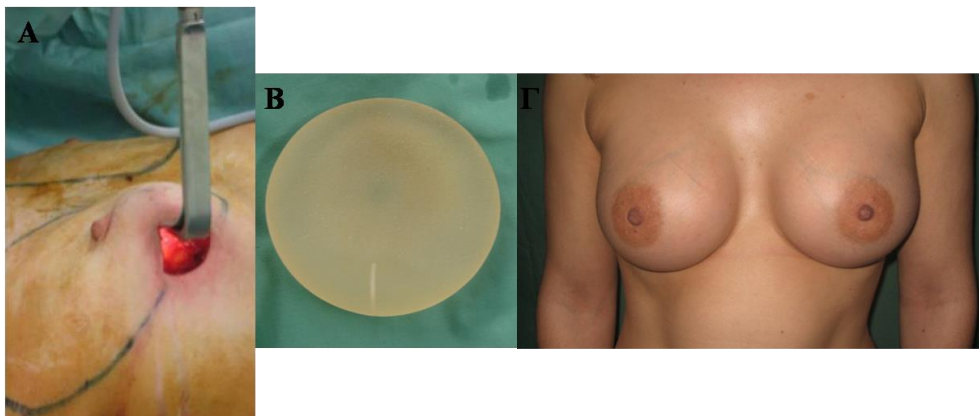


Εικόνα 9. Ασθενής με συγγενή γιγαντιαίο σπίλο στην αριστερή κροταφική χώρα μετά από πλήρη διάταση του προσωρινού ενθέματος το οποίο τοποθετήθηκε στην κροταφοβρεγματική περιοχή.



Εικόνα 10. **A.** Ασθενής με μετεγχειρητική ουλή μετώπου συνέπεια χειρουργηθέντος κερατοακανθώματος. **B.** Τομή άνωθεν της πρωτοπαθούς βλάβης και τοποθέτηση διατατήρα ιστού ελλειπτικού σχήματος και όγκου 25cc. **Γ.** Άμεσο μετεγχειρητικό αποτέλεσμα.

Στην Ομάδα Β πραγματοποιήθηκε αυξητική μαστών διαμέσου τομής στην υπομαστική πτυχή και σε μία ασθενή αυξητική μαστών διαμέσω τομής στην πρόσθια μασχαλιαία πτυχή. Με τη χρήση ενδοσκοπίου ψυχρού φωτισμού έγινε η δημιουργία υπομυϊκής θήκης και κατόπιν επιμελούς αιμόστασης και τοποθέτησης παροχέτευσης κενού έγινε η τοποθέτηση των μόνιμων ενθεμάτων σιλικόνης κάτωθεν του μείζονος θωρακικού μυός (**Εικόνα 11**). Σε όλες τις ασθενείς χρησιμοποιήθηκαν μόνιμα ενθέματα σιλικόνης τραχείας επιφανείας με περιεχόμενο γέλη σιλικόνης υψηλής συνεκτικότητας. Σε 12 ασθενείς τοποθετήθηκαν ενθέματα ανατομικού σχήματος και σε 2 ασθενείς ενθέματα στρογγυλού σχήματος, ενώ ο όγκος των ενθεμάτων κυμάνθηκε μεταξύ 215cc και 350cc.



Εικόνα 11. Α. Χρήση ενδοσκοπικού συστήματος ψυχρού φωτισμού για την παρασκευή υπομυϊκής θήκης διαμέσω τομής στην υπομαστική πτυχή σε ασθενή με υποπλασία μαστών. **Β.** Τοποθέτηση ανατομικού ενθέματος σιλικόνης τραχείας επιφανείας και όγκου 320cc. **Γ.** Άμεσο μετεγχειρητικό αποτέλεσμα.

Λήψη δείγματος καψιδικού ιστού

Στην Ομάδα Α κατά τον 2^ο χειρουργικό χρόνο αφαίρεσης των διατατήρων ιστού πραγματοποιήθηκε και λήψη τμήματος του καψιδικού ιστού που σχηματίστηκε γύρω από το προσωρινό ένθεμα, το οποίο και εστάλει για ιστολογική εξέταση. Όλα τα δείγματα μονιμοποιήθηκαν σε 10% φορμαλδεΐδη και ακολούθως έγινε εμβυθισμός και έγκλεισή τους σε κύβους παραφίνης. Κατόπιν, κόπηκαν ιστολογικές τομές πάχους 4μm, οι οποίες χρώστηκαν με την ιστοχημική χρώση αιματοξυλίνης-ηωσίνης. Οι τομές εξετάστηκαν με τη χρήση οπτικού μικροσκοπίου.

Κατά την ιστολογική εξέταση μελετήθηκαν τα εξής μικροσκοπικά χαρακτηριστικά:

1. βαθμός χρόνιας φλεγμονής (inflammation grade) ταξινομούμενος ως: απουσία, ελάχιστος, μέτριος, σοβαρός
2. τύπος κυττάρων (cell types) όπως: ινοβλάστες, μυοϊνοβλάστες, μακροφάγα, πολυμορφοπύρρηνα, λεμφοκύτταρα, πλασματοκύτταρα και μαστοκύτταρα
3. χαρακτηριστικά των ινών κολλαγόνου όπως: προσανατολισμός και πυκνότητα
4. μεταπλασία συνοβιακού τύπου (synovial-like)
5. επασβεστώσεις
6. παρουσία διπλοθλαστικού υλικού και αντίδραση τύπου ξένου σώματος (refracting material, foreign body reaction)

Επίσης έγινε συσχέτιση του αποτελέσματος των ιστολογικών εξετάσεων με τα κλινικά ευρήματα, όσον αφορά την εμφάνιση επιπλοκών, καθώς και με τα αποτελέσματα της κυτταρομετρίας ροής του περιφερικού αίματος.

Χρήση της Κυτταρομετρίας Ροής

Κατά την περίοδο της μελέτης πραγματοποιήθηκε σειρά αιμοληψιών που περιλάμβανε την λήψη 5 ml περιφερικού αίματος μέσω φλεβοκέντησης. Τα χρονικά διαστήματα αιμοληψιών καθορίστηκαν ως εξής:

Α' Ομάδα (προσωρινό ένθεμα σιλικόνης)

1^ο δείγμα: προεγχειρητικά, 0 ημέρα

2^ο δείγμα: 3 μήνες μετεγχειρητικά (από τον 1^ο χειρουργικό χρόνο)

3^ο δείγμα: 12 μήνες μετεγχειρητικά (από τον 1^ο χειρουργικό χρόνο)

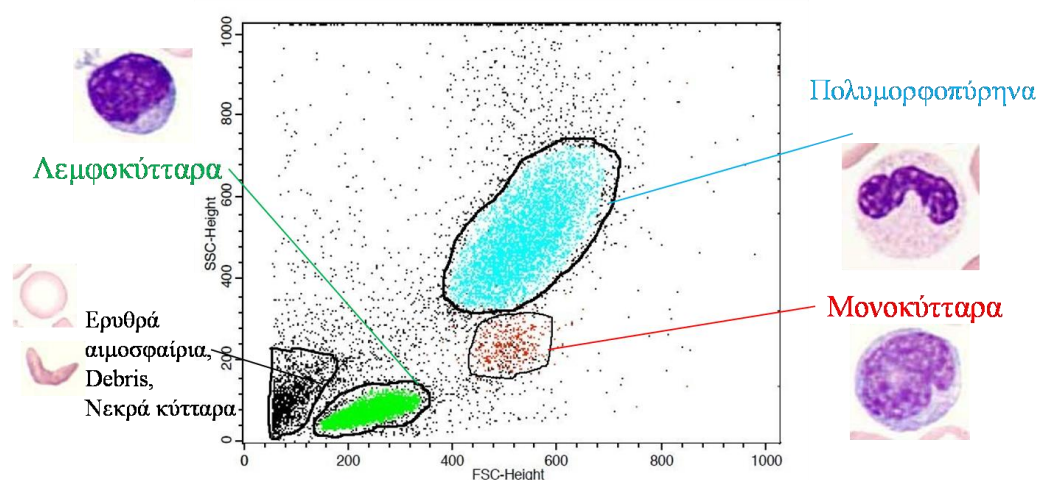
Β' Ομάδα (μόνιμο ένθεμα σιλικόνης)

1^ο δείγμα: προεγχειρητικά, 0 ημέρα

2^ο δείγμα: 3 μήνες μετεγχειρητικά

3^ο δείγμα: 12 μήνες μετεγχειρητικά

Εν συνεχεία το περιφερικό αίμα υποβλήθηκε εντός 24 ωρών σε ειδική επεξεργασία με την χρήση του κυτταρομετρητή ροής για την ανάλυση των λευκών αιμοσφαιρίων και των φαινοτύπων των λεμφοκυτταρικών υποπληθυσμών σε κάθε ασθενή (**Εικόνα 12**). Συγκεκριμένα για τον σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκαν ειδικά μονοκλωνικά αντισώματα για την αναζήτηση των αντίστοιχων επιφανειακών αντιγόνων των λεμφοκυττάρων υποπληθυσμών, όπως φαίνονται στον **Πίνακα 6**.



Εικόνα 12. Ανάλυση του φαινοτύπου των περιφερικών λευκών αιμοσφαιρίων με τη χρήση κυτταρομετρίας ροής.

Πίνακας 6. Τύποι μονοκλωνικών αντισωμάτων που χρησιμοποιήθηκαν για την ανίχνευση των υποπληθυσμών των λεμφοκυττάρων.

CD (clone)	Μείζων ειδική ομάδα	Φθορίζουσα ουσία	Διάλυση	Πηγή
anti-CD45 (Hle-1, 2D1)	Πανλευκοκυτταρικός δείκτης	FITC	1:1	BD
anti-CD14 (Leu-M3, MφP9)	Μονοκύτταρα	PE	1:1	BD
Control (IgG ₁ /IgG _{2a} , X40/X39)	Αντισώματα κατά των Ig ποντικών		1:1	BD
anti-CD3 (Leu-4, SK7)	T-λεμφοκύτταρα	FITC ή PE	1:1	BD
anti-CD19 (Leu-12, 4G7)	B-λεμφοκύτταρα	PE	1:1	BD
anti-CD4 (Leu-3a, SK3)	T-βοηθητικά λεμφοκύτταρα	FITC	1:1	BD
anti-CD8 (Leu-2a, SK1)	T-κυτταροτοξικά λεμφοκύτταρα	PE	1:1	BD
anti-CD16+56 (Leu-11c + Leu-19, B73.1) MY31)	NK (φυσικοί φονείς) λεμφοκύτταρα	FITC	1:1	BD
anti-CD25 (IL-2R, 2A3)	Υποδοχέας IL-2	PE	1:1	BD
anti-HLA-DR (L243), anti-MHC-II	B-λεμφοκύτταρα, Μείζον σύστημα ιστοσυμβατότητας II	FITC	1:1	BD
anti-CD2 (Leu-5b, S5.2)	T-λεμφοκύτταρα	FITC	1:1	BD
anti-CD56 (Leu-19, MY31)	NK (φυσικοί φονείς) λεμφοκύτταρα	PE	1:1	BD

CD: Cluster of Differentiation

BD: Becton Dickinson Immunocytometry Systems, Calif, USA

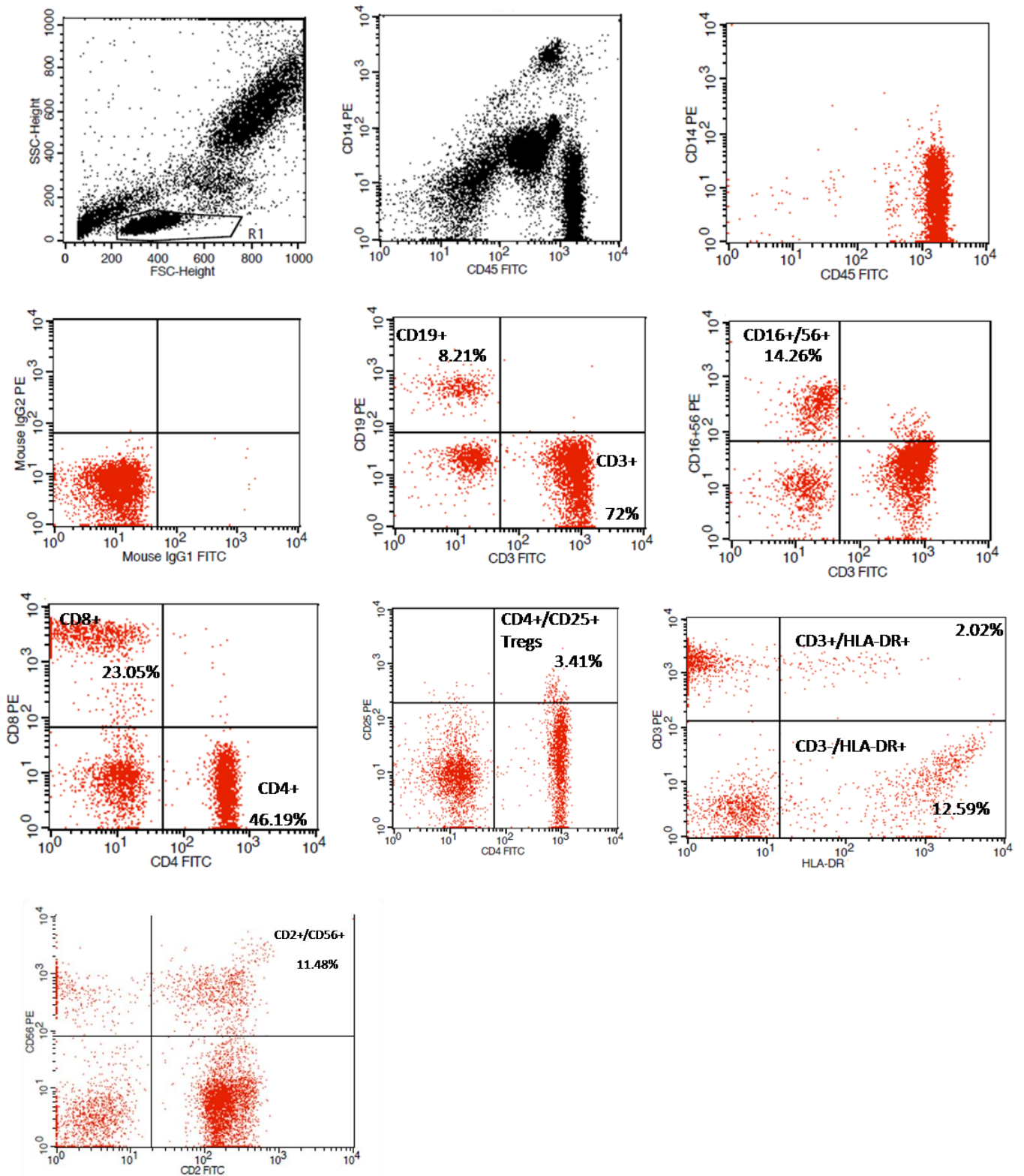
FITC: Fluorescein Isothiocyanate

PE: Phycoerythrin

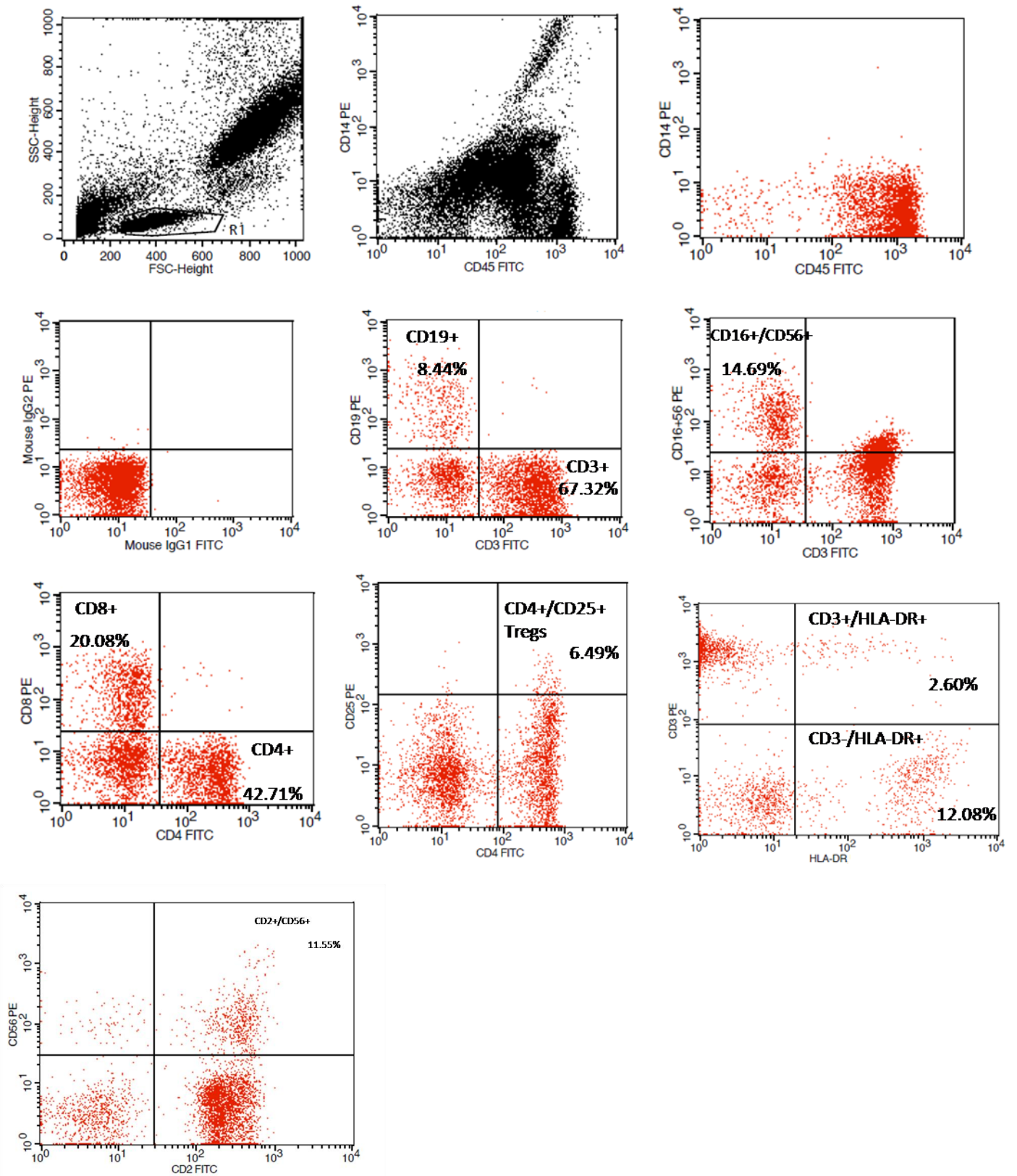
Η επεξεργασία των επιφανειακών αντιγόνων περιελάμβανε την εξής διαδικασία:

Σε αρχικό στάδιο μέσα σε ειδικά σωληνάρια τοποθετήθηκαν 10μl μονοκλωνικού αντισώματος και 100μl ολικού αίματος τα οποία επώαστηκαν για 15 λεπτά στο σκοτάδι. Εν συνεχεία τα ερυθροκύτταρα εξαλείφθηκαν μέσω λύσης, με προσθήκη 2ml διαλύματος FACSLyse (Becton Dickinson, Calif, USA). Κατόπιν στο δείγμα προστέθηκαν 2ml διαλύματος PBS (Phosphate-Buffered Saline) και πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρηση για 10 λεπτά στις 3500 στροφές. Έπειτα έγινε απόχυση και ανάδευση του δείγματος και 2^η φυγοκέντρηση αφού πρώτα έγινε προσθήκη 2ml PBS, προς απομάκρυνση τυχόν υπολειμμάτων των ερυθρών. Μετά το τέλος της φυγοκέντρησης έγινε εκ νέου απόχυση και ανάδευση και στα λευκοκύτταρα που παραμένουν ανεπηρέαστα από αυτό το βήμα, προστέθηκαν 0.5ml PBS, αναδεύθηκαν και τελικώς το δείγμα ήταν έτοιμο για ανάλυση στον κυτταρομετρητή ροής (Becton Dickinson, Calif, USA).

Ο κυτταρομετρητής ροής μετράει τη διάχυση όπως και τον φθορισμό των κυττάρων. Επιτρέπει τον περιορισμό του πληθυσμού στόχου στο εσωτερικό ενός ηλεκτρονικού παραθύρου (gate), που ορίζεται σε ένα ιστόγραμμα που συσχετίζει την πλάγια σκέδαση (Side Scatter, SSC) με την πρόσθια σκέδαση (Forward Scatter, FSC). Ο φθορισμός των περιορισμένων κυττάρων αναλύεται ώστε να γίνει διάκριση μεταξύ των θετικά σημασμένων κυττάρων που εκφράζουν το προς ανάλυση σχετιζόμενο αντιγόνο, από τα κύτταρα τα οποία δεν εκφράζουν το προς ανάλυση σχετιζόμενο αντιγόνο. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως το ποσοστό των κυττάρων που εμφανίζουν έκφραση σε σχέση με το σύνολο των κυττάρων που έχει υποστεί ηλεκτρονικό περιορισμό (**Εικόνα 13, 14**).



Εικόνα 13. Ανάλυση των λεμφοκυτταρικών υποπληθυσμών με τη χρήση κυτταρομετρίας ροή σε ασθενή της Ομάδας Α (προσωρινό ένθεμα σιλκόνης).



Εικόνα 14. Ανάλυση των λεμφοκυτταρικών υποπληθυσμών με τη χρήση κυτταρομετρίας ροή σε ασθενή της Ομάδας Β (μόνιμο ένθεμα σιλκόνης).

Στατιστική ανάλυση

Η στατιστική ανάλυση των δεδομένων έγινε με την χρήση του συστήματος SPSS version 18.0 (Chicago, Ill., USA). Αρχικά η επεξεργασία περιελάμβανε την εφαρμογή του Kolmogorov-Smirnov test και του Shapiro-Wilk test για να ελέγξουμε εάν τα δεδομένα ακολουθούσαν κανονική κατανομή. Ακολούθως, η περαιτέρω ανάλυση των δεδομένων περιελάμβανε το παραμετρικό Anova test (repeated measures ANOVA test) για δεδομένα που ακολουθούσαν κανονική κατανομή και το μη παραμετρικό Friedman test για δεδομένα που δεν ακολουθούσαν κανονική κατανομή. Η στατιστική σύγκριση μεταξύ των δύο Ομάδων έγινε με τη χρήση του t test και του Mann-Whitney test ανάλογα με το εάν τα δεδομένα ακολουθούσαν κανονική ή μη κατανομή.

Έγινε καταγραφή των τιμών των μέσων όρων καθώς και των τυπικών αποκλίσεων (standard deviation, SD) όλων των προς ανάλυση στατιστικών δεδομένων. Το διάστημα εμπιστοσύνης (confidence interval, CI) ήταν 95%. Το επίπεδο της στατιστικής σημαντικότητας ορίστηκε στο $p < 0.05$.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

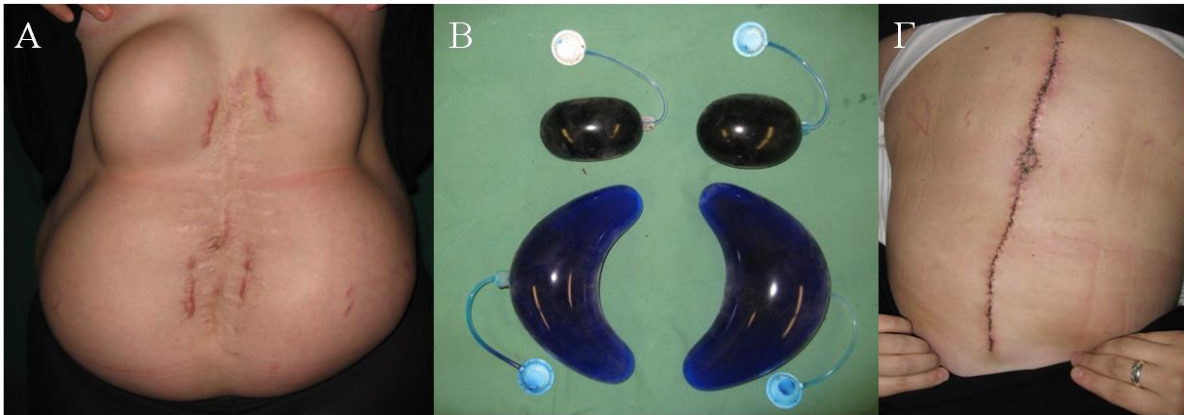
Ασθενείς με προσωρινό ένθεμα σιλικόνης – Ομάδα Α

Στην Ομάδα Α που περιελάμβανε συνολικά 11 ασθενείς (7 άντρες, 4 γυναίκες, μέση ηλικία: 26.5 έτη, εύρος: 16-35 έτη) η κυριότερη αιτία τοποθέτησης του προσωρινού διατατήρα ιστού ήταν η αποκατάσταση επίκτητης δύσμορφης ουλής (5 μετεγχειρητικής και 2 μετεγκαυματικής αιτιολογίας) (**Εικόνα 15**), ενώ σε 3 ασθενείς η παρουσία συγγενούς γιγαντιαίου σπίλου (**Εικόνα 16**) και σε έναν ασθενή η ιατρογενής αλωπεκία.

Συνολικά τοποθετήθηκαν 23 διατατήρες ιστού (εύρος: από 1 έως 4 σε κάθε ασθενή), όπου σε 3 ασθενείς τοποθετήθηκε ένας διατατήρας, σε 6 ασθενείς 2 διατατήρες και σε 2 ασθενείς 4 διατατήρες στον ίδιο χειρουργικό χρόνο. Όλα τα προσωρινά ενθέματα είχαν λεία επιφάνεια, η πλήρωση έγινε μέσω απομακρυσμένης βαλβίδας, ενώ έγινε χρήση διατατήρων κάθε σχήματος (στογγυλό, μηνοειδές, ορθογώνιο και ελλειπτικό) και ποικίλου όγκου (από 25cc μέχρι 1500cc).

Οι ανατομικές περιοχές τοποθέτησης των διατατήρων ιστού ήταν η κεφαλή (3 ασθενείς), το άνω άκρο (3 ασθενείς), ο κορμός (3 ασθενείς) και το κάτω άκρο (2 ασθενείς), ενώ ο μέσος όρος παραμονής τους ήταν 6.5 μήνες (εύρος: 4-8 μήνες).

Συνολικά 5 ασθενείς (45.45%) εμφάνισαν επιπλοκές κατά το χρονικό διάστημα μεταξύ των δύο χειρουργικών χρόνων αλλά και κατά την μετέπειτα παρακολούθηση. Ελάχιστονες επιπλοκές παρουσίασαν 2 ασθενείς (18.18%) και πιο συγκεκριμένα ανέπτυξαν υπετροφική ουλή, ενώ μείζονες επιπλοκές παρουσίασαν 3 ασθενείς (27.27%) και πιο συγκεκριμένα ανέπτυξαν διαπύηση του τραύματος, όπου σε 2 περιπτώσεις έγινε αφαίρεση του διατατήρα και σε μία περίπτωση παροχέτευση της συλλογής.



Εικόνα 15. **A.** Ασθενής (N.E) φέρει μετεγχειρητική και δύσμορφη ουλή κοιλίας. **B.** Έγινε τοποθέτηση 4 διατατήρων ιστού, εκ των οποίων οι 2 διατατήρες είχαν ελλειπτικό σχήμα (άνω) και οι άλλοι 2 διατατήρες είχαν μηνοειδές σχήμα (κάτω). **Γ.** Άμεσο μετεγχειρητικό αποτέλεσμα.



Εικόνα 16. **A.** Ασθενής (T.T) φέρει συγγενή γιγαντιαίο σπίλο οσφύος. **B.** Έγινε τοποθέτηση 4 διατατήρων ιστού, εκ των οποίων οι 3 διατατήρες είχαν μηνοειδές σχήμα και ένας διατατήρας είχε ορθογώνιο σχήμα. **Γ.** Άμεσο μετεγχειρητικό αποτέλεσμα.

Η κυτταρομετρία ροής ανέδειξε και στις 3 περιόδους αιμοληψίας (προεγχειρητικά, 3 μήνες μετεγχειρητικά και 12 μήνες μετεγχειρητικά) ως κυριότερο υποπληθυσμό των λεμφοκυττάρων τα T-λεμφοκύτταρα (CD3⁺, T cells), ακολουθούμενα από τα κύτταρα φυσικοί φονείς (CD3⁻/CD16⁺/CD56⁺, NK cells) και τέλος τα B-λεμφοκύτταρα (CD3⁻/CD19⁺, B cells). Τα περιφερικά T-λεμφοκύτταρα ήταν κυρίως βοηθητικά T-λεμφοκύτταρα (CD3⁺/CD4⁺, T-helper cells) και κατόπιν κυτταροτοξικά T-λεμφοκύτταρα (CD3⁺/CD8⁺, CTLs) και ρυθμιστικά T-λεμφοκύτταρα (CD4⁺/CD25^{high}, Tregs^{high}). Σημαντική αύξηση, ως προς την χρονική κατανομή, παρουσίασε η έκφραση του HLA-DR στα CD3⁻ κύτταρα, τα οποία αντιπροσωπεύονται από τα B-λεμφοκύτταρα (φαινότυπος CD3⁻/HLA-DR⁺, $p=0.033$). Όλοι οι υπόλοιποι φαινότυποι των λεμφοκυττάρων του περιφερικού αίματος δεν παρουσίασαν στατιστικά σημαντική διαφορά στην χρονική κατανομή τους (Πίνακας 7, 8).

Πίνακας 7. Κατανομή των υποπληθυσμών των λευκών αιμοσφαιρίων στο περιφερικό αίμα των ασθενών της Ομάδας Α.

Λευκά Αιμοσφαίρια	Μέση τιμή (%) ± SD			p value
	Προεγχειρητικά	3 μήνες MTX	12 μήνες MTX	
Ουδετερόφιλα	60.93 ± 11.02	57.02 ± 9.02	59.17 ± 10.08	0.529
Μονοκύτταρα	6.00 ± 1.58	5.98 ± 1.82	5.66 ± 2.64	0.761
Λεμφοκύτταρα	30.16 ± 9.99	33.26 ± 8.57	31.29 ± 9.55	0.307

SD: standard deviation, MTX: Μετεγχειρητικά

Πίνακας 8. Κατανομή των υποπληθυσμών των λεμφοκυττάρων στο περιφερικό αίμα των ασθενών της Ομάδας Α.

Φαινότυπος	Μέση τιμή (%) ± SD			p value
	Προεγχειρητικά	3 μήνες MTX	12 μήνες MTX	
CD3 ⁺ (T-cells)	71.83 ± 7.15	69.69 ± 5.75	70.11 ± 7.05	0.393
CD19 ⁺ (B-cells)	10.34 ± 3.95	11.47 ± 4.73	11.75 ± 4.35	0.069
CD16 ⁺ /CD56 ⁺ (NK-cells)	10.99 ± 5.70	12.66 ± 5.24	12.82 ± 5.85	0.220
CD3 ⁺ /CD4 ⁺ (T-helper cells)	41.47 ± 7.43	38.77 ± 8.03	38.90 ± 10.11	0.271
CD3 ⁺ /CD8 ⁺ (CTL)	29.91 ± 5.29	30.42 ± 6.13	30.35 ± 4.52	0.747
CD4 ⁺ /CD25 ^{high} (Tregs ^{high} cells)	4.24 ± 1.93	4.23 ± 1.43	4.44 ± 1.72	0.929
CD3 ⁺ /HLA-DR ⁺	5.71 ± 2.03	5.81 ± 3.38	6.00 ± 3.12	0.936
CD3 ⁻ /HLA-DR ⁺	11.63 ± 4.26	12.59 ± 6.08	13.95 ± 5.67	0.033
CD2 ⁺ /CD56 ⁺	11.56 ± 4.85	12.69 ± 5.43	13.01 ± 7.43	0.539

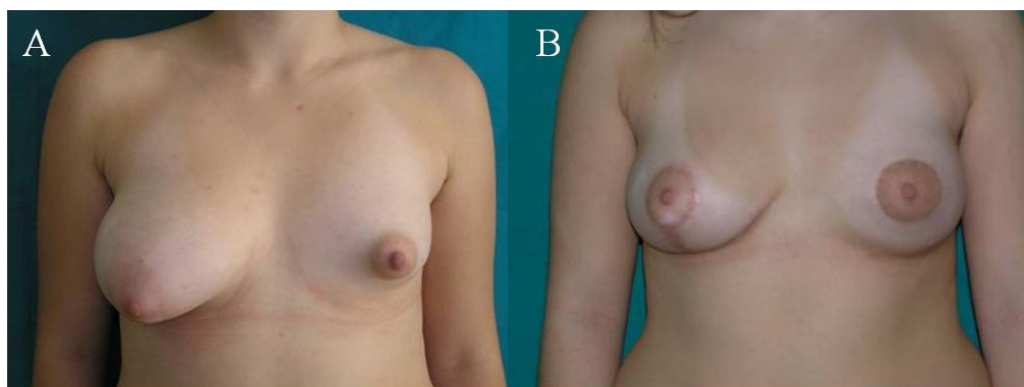
SD: standard deviation, MTX: Μετεγχειρητικά

Ασθενείς με μόνιμο ένθεμα σιλικόνης – Ομάδα Β

Η Ομάδα Β περιελάμβανε 14 ασθενείς (14 γυναίκες, μέση ηλικία: 29.3 έτη, εύρος: 18-44 έτη), όπου πραγματοποιήθηκε αυξητική μαστών και το μόνιμο ένθεμα σιλικόνης τοποθετήθηκε σε όλες τις περιπτώσεις κάτωθεν του μείζονος θωρακικού μύος (**Εικόνα 17**).

Σε όλες τις ασθενείς χρησιμοποιήθηκαν μόνιμα ενθέματα σιλικόνης τραχείας επιφανείας με περιεχόμενο γέλη σιλικόνης υψηλής συνεκτικότητας. Σε 12 ασθενείς (86%) τοποθετήθηκαν ενθέματα ανατομικού σχήματος και σε 2 ασθενείς (14%) ενθέματα στρογγυλού σχήματος, ενώ ο όγκος των ενθεμάτων κυμάνθηκε μεταξύ 215cc και 350cc.

Η άμεση μετεγχειρητική πορεία, καθώς και η απώτερη παρακολούθηση των ασθενών ήταν ομαλή και χωρίς επιπλοκές, με εξαίρεση μια ασθενή που ανέπτυξε υπερτροφική ουλή στο σημείο της χειρουργικής τομής στην υπομαζική πτυχή.



Εικόνα 17. **A.** Ασθενής με συγγενή ανισομαστία, **B.** Στον δεξιό μαστό πραγματοποιήθηκε τοποθέτηση μόνιμου ενθέματος σιλικόνης και μαστοπηξία, ενώ στον αριστερό μαστό μόνο τοποθέτηση μόνιμου ενθέματος σιλικόνης.

Η ανάλυση των δεδομένων με τη χρήση της κυτταρομετρίας ροής κατά τα ακόλουθα χρονικά διαστήματα: προεγχειρητικά, 3 μήνες μετεγχειρητικά και 12 μήνες μετεγχειρητικά, ανάδειξε ομαλή κατανομή των λευκών αιμοσφαιρίων, καθώς και όλων των υποπληθυσμών των λεμφοκυττάρων στο περιφερικό αίμα, χωρίς στατιστικά σημαντικές διαφορές στα ποσοστά έκφρασής τους (**Πίνακας 9, 10**). Τα T-λεμφοκύτταρα ήταν ο κυριότερος φαινότυπος τόσο προεγχειρητικά (μέσος όρος: 74.12% \pm 5.41), όσο και στους 3 μήνες (μέσος όρος: 73.52% \pm 4.94) και στους 12 μήνες (μέσος όρος: 72.83% \pm 4.99). Ακολούθησαν τα κύτταρα φυσικοί φονείς (**προεγχειρητικά**, μέσος όρος: 11.87% \pm 5.77, **3 μήνες μετεγχειρητικά**, μέσος όρος: 13.08% \pm 6.07, **12 μήνες μετεγχειρητικά**, μέσος όρος: 12.98% \pm 5.45) και τα B-λεμφοκύτταρα ((**προεγχειρητικά**, μέσος όρος: 8.85% \pm 2.95, **3 μήνες μετεγχειρητικά**, μέσος όρος: 9.24% \pm 2.78, **12 μήνες μετεγχειρητικά**, μέσος όρος: 8.96% \pm 3.47). Επιπλέον τα βοηθητικά T-λεμφοκύτταρα εξακολούθησαν να είναι ο κυριότερος φαινότυπος των T-λεμφοκυττάρων και κατά την μετεγχειρητική περίοδο, ακολουθούμενα από τα κυτταροτοξικά T-λεμφοκύτταρα και τα ρυθμιστικά T-λεμφοκύτταρα.

Πίνακας 9. Κατανομή των υποπληθυσμών των λευκών αιμοσφαιρίων στο περιφερικό αίμα των ασθενών της Ομάδας Β.

Λευκά Αιμοσφαίρια	Μέση τιμή (%) ± SD			p value
	Προεγχειρητικά	3 μήνες MTX	12 μήνες MTX	
Ουδετερόφιλα	60.36 ± 6.16	58.49 ± 6.91	58.16 ± 4.65	0.461
Μονοκύτταρα	5.75 ± 1.64	5.19 ± 1.89	5.24 ± 1.51	0.468
Λεμφοκύτταρα	31.24 ± 4.89	33.26 ± 5.78	33.31 ± 5.11	0.375

SD: standard deviation, MTX: Μετεγχειρητικά

Πίνακας 10. Κατανομή των υποπληθυσμών των λεμφοκυττάρων στο περιφερικό αίμα των ασθενών της Ομάδας Β.

Φαινότυπος	Μέση τιμή (%) ± SD			p value
	Προεγχειρητικά	3 μήνες MTX	12 μήνες MTX	
CD3+ (T-cells)	74.12 ± 5.41	73.52 ± 4.94	72.83 ± 4.99	0.319
CD19+ (B-cells)	8.85 ± 2.95	9.24 ± 2.78	8.96 ± 3.47	0.526
CD16+/CD56+ (NK-cells)	11.87 ± 5.77	13.08 ± 6.07	12.98 ± 5.45	0.571
CD3+/CD4+ (T-helper cells)	42.25 ± 8.19	40.91 ± 8.31	40.23 ± 8.29	0.189
CD3+/CD8+ (CTL)	31.54 ± 6.77	31.21 ± 8.83	31.84 ± 7.17	0.883
CD4+/CD25 ^{high} (Tregs ^{high} cells)	4.50 ± 1.15	4.87 ± 1.18	4.78 ± 2.04	0.457
CD3+/HLA-DR+	4.76 ± 3.01	5.07 ± 2.49	4.89 ± 3.25	0.921
CD3-/HLA-DR+	8.63 ± 3.95	9.01 ± 3.26	10.38 ± 3.69	0.110
CD2+/CD56+	11.86 ± 6.87	13.11 ± 6.81	11.96 ± 6.48	0.208

SD: standard deviation, MTX: Μετεγχειρητικά

Συγκριτική ανάλυση μεταξύ των δύο Ομάδων

Η συγκριτική ανάλυση των δεδομένων μεταξύ των δύο Ομάδων και στις 3 χρονικές στιγμές (προεγχειρητικά, 3 μήνες μετεγχειρητικά και 12 μήνες μετεγχειρητικά) δεν ανέδειξε καμία στατιστική σημαντική διαφορά σε κανέναν τύπο κυττάρων και σε καμία χρονική στιγμή (**Πίνακας 12,13,14**).

Πίνακας 12. Συγκριτική κατανομή των υποπληθυσμών των λευκών αιμοσφαιρίων και των λεμφοκυττάρων κατά την **προεγχειρητική περίοδο** στο περιφερικό αίμα μεταξύ της Ομάδας A και της Ομάδας B.

Φαινότυπος	Μέση τιμή (%) ± SD		p value
	Ομάδα A (n=11)	Ομάδα B (n=14)	
Ουδετερόφιλα	60.93 ± 11.02	60.36 ± 6.16	0.870
Μονοκύτταρα	6.00 ± 1.58	5.75 ± 1.64	0.704
Λεμφοκύτταρα	30.16 ± 9.99	31.24 ± 4.89	0.725
CD3+ (T-cells)	71.83 ± 7.15	74.12 ± 5.41	0.370
CD19+ (B-cells)	10.34 ± 3.95	8.85 ± 2.95	0.291
CD16+/CD56+ (NK-cells)	10.99 ± 5.70	11.87 ± 5.77	0.709
CD3+/CD4+ (T-helper cells)	41.47 ± 7.43	42.25 ± 8.19	0.806
CD3+/CD8+ (CTL)	29.91 ± 5.29	31.54 ± 6.77	0.520
CD4+/CD25 ^{high} (Tregs ^{high} cells)	4.24 ± 1.93	4.50 ± 1.15	0.679
CD3+/HLA-DR+	5.71 ± 2.03	4.76 ± 3.01	0.385
CD3-/HLA-DR+	11.63 ± 4.26	8.63 ± 3.95	0.082
CD2+/CD56+	11.56 ± 4.85	11.86 ± 6.87	0.903

SD: standard deviation

Πίνακας 13. Συγκριτική κατανομή των υποπληθυσμών των λευκών αιμοσφαιρίων και των λεμφοκυττάρων **3 μήνες μετεγχειρητικά** στο περιφερικό αίμα μεταξύ της Ομάδας A και της Ομάδας B.

Φαινότυπος	Μέση τιμή (%) ± SD		p value
	Ομάδα A (n=11)	Ομάδα B (n=14)	
Ουδετερόφιλα	57.02 ± 9.02	58.49 ± 6.91	0.648
Μονοκύτταρα	5.98 ± 1.82	5.19 ± 1.89	0.303
Λεμφοκύτταρα	33.26 ± 8.57	33.26 ± 5.78	1.000
CD3+ (T-cells)	69.69 ± 5.75	73.52 ± 4.94	0.089
CD19+ (B-cells)	11.47 ± 4.73	9.24 ± 2.78	0.154
CD16+/CD56+ (NK-cells)	12.66 ± 5.24	13.08 ± 6.07	0.857
CD3+/CD4+ (T-helper cells)	38.77 ± 8.03	40.91 ± 8.31	0.522
CD3+/CD8+ (CTL)	30.42 ± 6.13	31.21 ± 8.83	0.830
CD4+/CD25 ^{high} (Tregs ^{high} cells)	4.23 ± 1.43	4.87 ± 1.18	0.226
CD3+/HLA-DR+	5.81 ± 3.38	5.07 ± 2.49	0.533
CD3-/HLA-DR+	12.59 ± 6.08	9.01 ± 3.26	0.071
CD2+/CD56+	12.69 ± 5.43	13.11 ± 6.81	0.867

SD: standard deviation

Πίνακας 14. Συγκριτική κατανομή των υποπληθυσμών των λευκών αιμοσφαιρίων και των λεμφοκυττάρων **12 μήνες μετεγχειρητικά** στο περιφερικό αίμα μεταξύ της Ομάδας Α και της Ομάδας Β.

Φαινότυπος	Μέση τιμή (%) ± SD		p value
	Ομάδα Α (n=11)	Ομάδα Β (n=14)	
Ουδετερόφιλα	59.17 ± 10.08	58.16 ± 4.65	0.739
Μονοκύτταρα	5.66 ± 2.64	5.24 ± 1.51	0.624
Λεμφοκύτταρα	31.29 ± 9.55	33.31 ± 5.11	0.502
CD3+ (T-cells)	70.11 ± 7.05	72.83 ± 4.99	0.270
CD19+ (B-cells)	11.75 ± 4.35	8.96 ± 3.47	0.095
CD16+/CD56+ (NK-cells)	12.82 ± 5.85	12.98 ± 5.45	0.942
CD3+/CD4+ (T-helper cells)	38.90 ± 10.11	40.23 ± 8.29	0.720
CD3+/CD8+ (CTL)	30.35 ± 4.52	31.84 ± 7.17	0.553
CD4+/CD25 ^{high} (Tregs ^{high} cells)	4.44 ± 1.72	4.78 ± 2.04	0.659
CD3+/HLA-DR+	6.00 ± 3.12	4.89 ± 3.25	0.511
CD3-/HLA-DR+	13.95 ± 5.67	10.38 ± 3.69	0.069
CD2+/CD56+	13.01 ± 7.43	11.96 ± 6.48	0.709

SD: standard deviation

Ιστολογική ανάλυση του καψιδικού ιστού

Οκτώ στους 11 ασθενείς (72.72%) παρουσίασαν μετρίου έως σοβαρού βαθμού φλεγμονή, ενώ οι κυριότεροι τύποι κυττάρων ήταν τα λεμφοκύτταρα, τα μακροφάγα και τα πλασματοκύτταρα. Η πυκνότητα των ινών κολλαγόνου ήταν κυρίως μέτρια (7/11, 63.64%) και σε όλες τις περιπτώσεις η διάταξη των ινών του κολλαγόνου ήταν οριζόντια (παράλληλη δηλαδή προς την επιφάνεια). Τρεις ασθενείς (27.27%) παρουσίασαν μεταπλασία συνοβιακού τύπου, ενώ σε κανένα δείγμα δεν βρέθηκαν στοιχεία επασβέστωσης. Τρεις ασθενείς (27.27%) εμφάνισαν αντίδραση τύπου ξένου σώματος, όπως είναι η παρουσία φαγοκοκκιώματος με γιγαντοκύτταρα που περιέχουν διπλοθλαστικό υλικό (refracting material, foreign body reaction, giant cells) στο ιστολογικό δείγμα (Πίνακας 11).

Πίνακας 11. Ιστολογικά χαρακτηριστικά του καψιδικού ιστού των ασθενών της Ομάδας Α.

Ασθενής	Βαθμός Φλεγμονής	Τύποι κυττάρων	Πυκνότητα Ινών Κολλαγόνου*	Μεταπλασία συνοβιακού τύπου	Επασβέστωση	Διπλοθλαστικό υλικό/Αντίδραση τύπου ξένου σώματος
Κ.Χ	Ελάχιστος	Λεμφοκύτταρα, μακροφάγα, πλασματοκύτταρα, μαστοκύτταρα	Πυκνή	ΟΧΙ	ΟΧΙ	ΝΑΙ
Δ.Β	Μέτριος / Σοβαρός	Λεμφοκύτταρα, πλασματοκύτταρα	Μέτρια	ΝΑΙ	ΟΧΙ	ΟΧΙ
Ε.Π	Μέτριος	Λεμφοκύτταρα, ηωσινόφιλα, πλασματοκύτταρα, μαστοκύτταρα	Μέτρια	ΟΧΙ	ΟΧΙ	ΝΑΙ
Ν.Ε	Μέτριος	Λεμφοκύτταρα, ηωσινόφιλα, πλασματοκύτταρα	Πυκνή	ΝΑΙ	ΟΧΙ	ΟΧΙ
Θ.Θ	Μέτριος	Λεμφοκύτταρα, πλασματοκύτταρα, πολυμορφοπύρηνα	Μέτρια	ΟΧΙ	ΟΧΙ	ΟΧΙ
Π.Ε	Μέτριος	Λεμφοκύτταρα	Μέτρια	ΟΧΙ	ΟΧΙ	ΟΧΙ
Λ.Ο	Μέτριος	Λεμφοκύτταρα, Πλασματοκύτταρα	Μέτρια	ΟΧΙ	ΟΧΙ	ΝΑΙ
Κ.Χ	Σοβαρός	Λεμφοκύτταρα, πλασματοκύτταρα, πολυμορφοπύρηνα	Χαλαρή	ΟΧΙ	ΟΧΙ	ΟΧΙ
Τ.Τ	Ελάχιστος	Μακροφάγα, Πλασματοκύτταρα	Πυκνή	ΟΧΙ	ΟΧΙ	ΟΧΙ
Ν.Χ	Ελάχιστος	Λεμφοκύτταρα, Πλασματοκύτταρα	Μέτρια	ΟΧΙ	ΟΧΙ	ΟΧΙ
Κ.Λ	Μέτριος	Λεμφοκύτταρα, Πλασματοκύτταρα, Μακροφάγα	Μέτρια	ΝΑΙ	ΟΧΙ	ΟΧΙ

* Σε όλες τις περιπτώσεις η φορά των ινών του κολλαγόνου ήταν οριζόντια (παράλληλη προς την επιφάνεια).

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η επίδραση μίας χειρουργικής επέμβασης ή ενός τραύματος στον ανθρώπινο οργανισμό μπορεί να προκαλέσει μια πλειάδα μεταβολών στο ανοσοποιητικό μας σύστημα. Το αποτέλεσμα είναι οι ασθενείς να είναι πιο ευάλωτοι σε μετεγχειρητικές επιπλοκές, όπως η εμφάνιση λοίμωξης και η καθυστέρηση στην επούλωση των τραυμάτων [97]. Διάφορες μελέτες έχουν διαπιστώσει ότι κατά την άμεση μετεγχειρητική περίοδο εμφανίζονται μια σειρά από μεταβολές στην έκφραση και δράση των υποπληθυσμών των λευκών αιμοσφαιρίων στο περιφερικό αίμα, όπως η αύξηση του ποσοστού των ουδετερόφιλων κυττάρων καθώς και η μείωση του πληθυσμού των μονοκυττάρων και των λεμφοκυττάρων [98-101]. Ο Bartal και συνεργάτες (συν) μελέτησε την κατανομή των λευκών αιμοσφαιρίων και των υποπληθυσμών των λεμφοκυττάρων στο περιφερικό αίμα ασθενών προεγχειρητικά και κατά την άμεση (πρώτες 4 ημέρες) μετεγχειρητική περίοδο, όπου και διαπίστωσαν μείωση της έκφρασης του HLA-DR στα λεμφοκύτταρα των ασθενών προεγχειρητικά, ενώ μετεγχειρητικά υπήρξε μείωση του αριθμού των λεμφοκυττάρων, αύξηση του αριθμού των πολυμορφοπύρηνων κυττάρων και μειωμένη έκφραση του HLA-DR στα μονοκύτταρα και λεμφοκύτταρα [102].

Η αρχική μετεγχειρητική περίοδος χαρακτηρίζεται από μια προ-φλεγμονώδη αντίδραση που προκαλεί ενεργοποίηση του ανοσοποιητικού συστήματος τοπικά στο σημείο της βλάβης. Κατόπιν εκδηλώνεται μια συστηματική αντι-φλεγμονώδης αντίδραση που εκφράζεται από την καταστολή της κυτταρικής ανοσίας. Δεν έχει γίνει ακόμη γνωστός ο μηχανισμός αυτής της συστηματικής ανοσιακής απάντησης, παρ'όλα αυτά όμως φέρονται να παίζουν ρόλο διάφοροι παράγοντες, όπως η υποκείμενη νόσος, η φαρμακευτική αγωγή και το ψυχολογικό stress των ασθενών. Ειδικά ο ρόλος του stress έχει αποδειχθεί και από την αύξηση των επιπέδων της κορτιζόλης στο αίμα ασθενών που είναι σε αναμονή για χειρουργική επέμβαση [102].

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει επίσης η επίδραση διαφόρων βιοϋλικών, που χρησιμοποιούνται στη σύγχρονη Ιατρική, στο προφίλ του ανοσοποιητικού συστήματος. Κατά τις πρώτες δύο με τέσσερις εβδομάδες μετά την εισαγωγή στον ανθρώπινο οργανισμό μίας ιατρικής συσκευής (π.χ βηματοδότης), πρόθεσης (π.χ αρθροπλαστική ισχίου), μόσχευματος (π.χ πλέγμα αποκατάστασης κηλών, αγγειοχειρουργικό μόσχευμα Dacron), ενθέματος ή ακόμα και ενός βιοαπορροφήσιμου ράμματος εκδηλώνεται μια σειρά αντιδράσεων τοπικά στους ιστούς πέριξ του βιοϋλικού που οδηγούν στην εναπόθεση μακροφάγων κυττάρων και στον σχηματισμό γιγαντιαίων κυττάρων (foreign body giant cells) [103].

Η αρχική φάση της τοπικής φλεγμονώδους αντίδρασης αφορά την χημειοτακτική εξαγγείωση και μετανάστευση των μονοκυττάρων/μακροφάγων από το περιφερικό αίμα στο σημείο εμφύτευσης του βιοϋλικού. Ακολουθεί η εναπόθεση των μακροφάγων στην επιφάνεια του βιοϋλικού και η συγχώνευσή τους για την δημιουργία των γιγαντιαίων κυττάρων. Τα μονοκύτταρα/μακροφάγα καθώς και τα γιγαντιαία κύτταρα έχουν εντοπισθεί στην επιφάνεια των βιοϋλικών, καθώς και στον χώρο που δημιουργείται μεταξύ του βιοϋλικού και της αντιδραστικής ινώδους κάψας [103]. Η αλληλουχία των αιματολογικών και ιστολογικών αυτών μεταβολών φαίνεται να ρυθμίζεται από την έκκριση κυτταροκινών, όπως η ιντερλευκίνη-4 (IL-4) και η ιντερλευκίνη-13 (IL-14) εκ μέρους των μαστοκυττάρων και των T βοηθητικών κυττάρων τάξεως II [104-106].

Οι συνέπειες της τοπικής αυτής αντίδρασης τύπου ξένου σώματος μπορεί να είναι ιδιαίτερα σημαντικές. Τα μακροφάγα και τα γιγαντιαία κύτταρα μπορούν να απελευθερώσουν μια σειρά από τοξικές ουσίες στο μικροπεριβάλλον μεταξύ της κυτταρικής τους μεμβράνης και της επιφάνειας των βιοϋλικών, όπως είναι οι ελεύθερες ρίζες του οξυγόνου (ROIs, oxygen free radicals), υδρολυτικά ένζυμα και οξέα [107, 108]. Επομένως η χημική σύσταση της επιφάνειας των βιοϋλικών παίζει καθοριστικό ρόλο στην επιδεκτικότητα βιοαποικοδόμησής τους και στην κλινική τους λειτουργία [109-111]. Επίσης έχει αποδειχθεί ότι τα μακροφάγα και τα γιγαντιαία κύτταρα, καθώς και άλλα φλεγμονώδη κύτταρα παρουσιάζουν μειωμένη βακτηριοκτόνο δράση, ενώ η αυξημένη απόπτωσή

τους μειώνει σημαντικά την ικανότητά τους να επιτίθενται σε ξένους οργανισμούς [112]. Η ενσωμάτωση βιολογικών παραγόντων αλλογενούς ή ξενογενούς προέλευσης, όπως και η χρήση βλαστοκυττάρων στην κατασκευή ιατρικών υλικών αποτελεί πεδίο έρευνας στον τομέα της μηχανικής των ιστών και της αναγεννητικής ιατρικής. Η μελέτη της αλληλεπίδρασης του ανοσοποιητικού συστήματος με διάφορα βιοϋλικά καθορίζει σε σημαντικό βαθμό την ασφάλεια, την λειτουργία καθώς και την βιοσυμβατότητά τους.

Στην σύγχρονη Ιατρική χρησιμοποιούνται διάφορες συσκευές και υλικά που έχουν ως πρώτη ύλη την σιλικόνη σε διάφορες μορφές (π.χ υγρή, στερεή και γέλη). Αν και αρχικά η σιλικόνη είχε θεωρηθεί ότι είναι αδρανής για το ανθρώπινο σώμα, αργότερα αποδείχθηκε ότι ο πολυμερισμός της, τα υδροφοβικά χαρακτηριστικά της, καθώς και τα ηλεκτροστατικά φορτία και οι πλάγιες οργανικές ομάδες που φέρει μπορούν να της προσδώσουν δυνητική ανοσογόνο ιδιότητα [113]. Αρκετές μελέτες έχουν συνδέσει την χρήση σιλικονούχων ιατρικών υλικών με την εκδήλωση επιπλοκών που αφορούν την ανάπτυξη φλεγμονωδών αντιδράσεων, ρευματικών παθήσεων και λεμφαδενοπάθειας [114-117].

Η αντίδραση του ανθρώπινου σώματος μετά την τοποθέτηση ενθέματος σιλικόνης χαρακτηρίζεται από την δημιουργία ινώδους κάψας και αντιδραστικού εξιδρωματικού υγρού πέριξ του ενθέματος. Πλέον έχει αποδειχθεί η παρουσία σωματιδίων σιλικόνης υπό την μορφή κυστικού τύπου σχηματισμών καθώς και εντός των μακροφάγων στον καψιδικό ιστό και στο αντιδραστικό υγρό σε ασθενείς που είχαν υποβληθεί σε αυξητική μαστού και ανέπτυξαν κάποιου βαθμού ρικνωτική κάψα [118-123]. Εκτός όμως από την τοπική ιστική αντίχνευση μορίων σιλικόνης, ο Ojo-Amaize και συν σε μια αρχική μελέτη διαπίστωσε ότι ασθενείς που είχαν υποβληθεί σε αυξητική μαστού και ακολούθως εκδήλωσαν διάφορα συστηματικά συμπτώματα (π.χ κόπωση, μυαλγίες, αρθραλγίες και κεφαλαλγία) είχαν υψηλά επίπεδα πυριτίου (Si) στο περιφερικό αίμα (>0.18 mg/liter), ενώ αργότερα σε παρόμοια έρευνά του αναφέρει ότι ασθενείς που επίσης είχαν υποβληθεί σε αυξητική μαστού είχαν υψηλότερα επίπεδα ιντερλευκίνης-1β (IL-1β) και του ανταγωνιστή υποδοχέα

της (IL-1ra) [124, 125]. Επίσης ο Iannello και συν αναφέρει την παρουσία μορίων σιλκόνης στο περιφερικό αίμα και στο ήπαρ ασθενούς που είχε υποβληθεί σε αμφοτερόπλευρη αποκατάσταση μαστού με ενθέματα σιλκόνης και αργότερα εκδήλωσε συμπτωματολογία ρευματοειδούς αρθρίτιδας [126]. Ο Prantl και συν μελέτησε 25 ασθενείς που ανέπτυξαν ρικνωτική κάψα μετά από αυξητική μαστού και ανίχνευσε ιδιαίτερα υψηλά ποσοστά ($p < 0.05$) συγκέντωσης υαλουρονικού οξέος στο περιφερικό τους αίμα (26 ± 14 microg/l) σε σχέση με υγιείς γυναίκες (12 ± 6 microg/l) [118].

Η τοπική καθώς και η συστηματική ανίχνευση μορίων σιλκόνης καθιστά σημαντική την αναγνώριση της αντιγονικής συμπεριφοράς τους. Αρκετές μελέτες έχουν αναδείξει την παρουσία διαφόρων τύπων αυτοαντισωμάτων (αντιπυρηνικά, αντι-κολλαγόνου, αντικαρδιολιπίνης IgG και IgM, ρευματοειδής παράγοντας, αντι-Ro, αντι-La) σε ασθενείς με ενθέματα σιλκόνης [113, 127-130]. Παρόμοιες μελέτες αναφέρουν την παρουσία αυξημένων επιπέδων αντισωμάτων (κυρίως τύπου IgG) κατά μορίων σιλκόνης στο αίμα ασθενών που είχαν υποβληθεί σε αυξητική μαστού και ιδιαίτερα όταν μετέπειτα εμφάνισαν ρήξη/διαφυγή εκ του ενθέματος ή συστηματικά συμπτώματα ρευματοειδούς πάθησης [131-133]. Βέβαια, ο Evans και συν μετά από την ιστολογική εξέταση 10 πτωματικών παρασκευασμάτων αναφέρει ότι ακόμα και σε υγιή άτομα εμφανίζονται ίχνη αντισιλικονούχων αντισωμάτων σε διάφορους ιστούς, όπως είναι το υποδόριο λίπος, ο μαζικός αδένας, η θηλή, οι λεμφαδένες, το ήπαρ και ο σπλήνας [134]. Ο Bekerecioglu και συν συνέκρινε σειρά 15 ασθενών με μετεγκαυματικές ουλές στους οποίους τοποθετήθηκαν διατατήρες ιστού με 15 ασθενείς επίσης με μετεγκαυματικές ουλές, όπου έγινε αποκατάσταση χωρίς την χρήση διατατήρων ιστού, ως προς την ανάπτυξη αντισιλικονούχων αντισωμάτων και μη ειδικών ανοσοσφαιρινών (IgG, IgA, IgM, IgE) στον καψιδικό ιστό και στο περιφερικό αίμα. Αναφέρει αυξημένα επίπεδα αντισιλικονούχων αντισωμάτων στον καψιδικό ιστό (0.59 ± 0.16 vs 0.030 ± 0.012 ; $p < 0.001$), καθώς και αυξημένα επίπεδα αντισωμάτων IgE στο περιφερικό αίμα (205.3 ± 56.9 vs 32.4 ± 8.7 ; $p < 0.001$) στους ασθενείς όπου έγινε αποκατάσταση με την χρήση διατατήρα ιστού [135].

Επομένως γίνεται προφανής η κλινική σημασία της μελέτης της ανοσιακής απόκρισης μετά από την χρήση ενθεμάτων σιλικόνης. Η μελέτης μας αρχικά δεν ανέδειξε καμία στατιστικά σημαντική διαφορά στην χρονική κατανομή των υποπληθυσμών των λευκών αιμοσφαιρίων (πολυμορφοπύρρηνα, μονοκύτταρα, λεμφοκύτταρα) στο περιφερικό αίμα και των δύο υπό μελέτη Ομάδων. Η ομοιογενής αυτή κατανομή αναδεικνύει ότι οι ασθενείς που υποβλήθηκαν σε τοποθέτηση προσωρινού ή μόνιμου ενθέματος σιλικόνης δεν ανέπτυξαν κάποιου είδους συστηματική φλεγμονώδη αντίδραση τουλάχιστον κατά την χρονική περίοδο της μελέτης. Ο Tavazzani και συν μελέτησε *in vitro* την αντίδραση της ενσωμάτωσης σωματιδίων σιλικόνης μικρότερα από 8μm σε ίνες κολλαγόνου τύπου I μετά την έκθεσή τους σε μακροφάγα κύτταρα μονοκυτταρικής και ανθρώπινης προέλευσης. Η ιστολογική ανάλυση ανέδειξε κυτταρική ενεργοποίηση και αυξημένη έκκριση ιντερλευκίνης-1 (IL-1), παρ'όλα αυτά όμως δεν υπήρξε αύξηση του πληθυσμού των T-λεμφοκυττάρων ούτε της τοξικότητας των μακροφάγων [136]. Ανάλογη είναι και η *in vitro* αμφίδρομη ενεργοποίηση μεταξύ λεμφοκυττάρων και μονοκυττάρων/μακροφάγων μετά από έκθεση σε διάφορα βιοϋλικά [137,138]. Όσον αφορά τα πολυμορφοπύρρηνα κύτταρα (ιδιαίτερα τα ουδετερόφιλα κύτταρα, CD10+ cells) είναι γνωστή η σημαντική μείωση του πληθυσμού τους σε καταστάσεις συστηματικής φλεγμονής όπως είναι η σηπτική καταπληξία [139,140].

Η παρούσα μελέτη με την χρήση της κυτταρομετρίας ροής ταυτοποίησε τον φαινότυπο των περιφερικών λεμφοκυττάρων σε ασθενείς με ενθέματα σιλικόνης. Τα T-λεμφοκύτταρα (CD3+) αποτέλεσαν τον κυριότερο υποπληθυσμό σε όλες τις χρονικές περιόδους και στις δύο ομάδες, ενώ ακολούθησαν τα φυσικά φονικά κύτταρα (CD3-/CD16+/CD56+, NK cells) με μικρή ποσοσταία διαφορά σε σχέση με τα B-λεμφοκύτταρα (CD19+). Παρόμοιες μελέτες στο παρελθόν έχουν αναδείξει την επικράτηση της έκφρασης των T-λεμφοκυττάρων σε ασθενείς με μόνιμα ενθέματα σιλικόνης στους μαστούς [141,142]. Ο Smalley και συν μελέτησε την αντίδραση των περιφερικών λεμφοκυττάρων μετά από ενεργοποίηση με διοξείδιο του πυριτίου (SiO₂) σε 70 ασθενείς με

ενθέματα σιλικόνης μαστού που παρουσίασαν συμπτώματα ρευματοειδούς πάθησης σε σχέση με 76 υγιή άτομα (ομάδα ελέγχου) και 18 ασθενείς με ρευματική νόσο. Στα αποτελέσματα αναφέρει ότι η πλειοψηφία (91.3%) των ασθενών με ενθέματα σιλικόνης παρουσιάζουν συστηματική ενεργοποίηση των λεμφοκυττάρων σε σχέση με την ομάδα ελέγχου (S.I, 195.0 ± 19.3 vs 11.4 ± 0.73 , $p < 0.0001$) [143]. Επίσης ο Vojdani και συν διαπίστωσαν ότι ασθενείς με ενθέματα σιλικόνης στους μαστούς παρουσίασαν σημαντικά μειωμένη κυτταροτοξική δραστηριότητα των κυττάρων φυσικοί φονείς σε σχέση με υγιή άτομα χωρίς ένθεμα σιλικόνης [144].

Η κυτταρομετρική ανάλυση του φαινοτύπου των T-λεμφοκυττάρων (CD3+) στο περιφερικό αίμα δεν ανέδειξε στατιστικά σημαντική διαφορά στην χρονική κατανομή τους τόσο ξεχωριστά όσο και συγκριτικά μεταξύ των δύο Ομάδων. Τα βοηθητικά T-λεμφοκύτταρα (CD3+/CD4+, T-helper cells) αποτέλεσαν τον κυριότερο υποπληθυσμό ακολουθούμενα από τα κυτταροτοξικά T-λεμφοκύτταρα (CD3+/CD8+, CTLs). Παρόμοια αποτελέσματα αναφέρει σε πρόσφατη μελέτη του ο Prantl και συν, όπου τα περιφερικά βοηθητικά T-λεμφοκύτταρα ήταν ποσοστιαία περισσότερα σε σχέση με τα κυτταροτοξικά T-λεμφοκύτταρα σε ασθενείς που είχαν αναπτύξει ρικνωτική κάψα μετά από αυξητική μαστού με μόνιμα ενθέματα σιλικόνης. Επίσης στην ίδια μελέτη αναφέρεται ότι τα T-λεμφοκύτταρα αποτέλεσαν επίσης τον κυριότερο πληθυσμό των περιφερικών λεμφοκυττάρων ακολουθούμενα από τα B-λεμφοκύτταρα και κατόπιν από τα φυσικά φονικά κύτταρα, ενώ καμία στατιστικά σημαντική διαφορά δεν διαπιστώθηκε στην κατανομή των υποπληθυσμών των περιφερικών λεμφοκυττάρων σε σχέση με την Ομάδα ελέγχου των υγιών ατόμων [145].

Ο Katzin και συν μελέτησε την έκφραση του φαινοτύπου των T-λεμφοκυττάρων στον καψιδικό ιστό/αντιδραστικό υγρό πέριξ του ενθέματος και στο περιφερικό αίμα 209 ασθενών που υποβλήθηκαν σε αφαίρεση του ενθέματος σιλικόνης από τους μαστούς με ταυτόχρονη καψεκτομή. Αναφέρει σημαντική αύξηση της έκφρασης του αντιγόνου CD29 στα βοηθητικά T-λεμφοκύτταρα (CD4+/CD29+) τόσο στον καψιδικό ιστό/αντιδραστικό υγρό σε σχέση με το περιφερικό αίμα ($p=0.043$), όσο και στο περιφερικό αίμα των ασθενών σε σχέση με την υγιή ομάδα ελέγχου

($p=0.022$). Επίσης διαπίστωσε μείωση της έκφρασης του αντιγόνου CD45RO στα βοηθητικά T-λεμφοκύτταρα (CD4+/CD45RO+) στον καψιδικό ιστό/αντιδραστικό υγρό σε σχέση με το περιφερικό αίμα των ιδίων ασθενών [146]. Επιπλέον, ο Ojo-Amaize και συν αναφέρει αύξηση του πληθυσμού των βοηθητικών T-λεμφοκυττάρων (CD4+ T cells) σε ασθενείς με μόνιμο ένθεμα σιλικόνης μαστών μετά από έκθεσή τους με παράγωγα του πυριτίου (διοξείδιο του πυριτίου, πυρίτιο, γέλη σιλικόνης) σε σύγκριση με υγιή άτομα χωρίς ενθέματα σιλικόνης. Μάλιστα η ενεργοποίηση των βοηθητικών T-λεμφοκυττάρων ήταν εντονότερη σε ασθενείς που είχαν είτε εκδηλώσει διάφορα συστηματικά συμπτώματα (χρόνια κόπωση, μυαλγίες, αρθραργίες, δερματικές διαταραχές) είτε είχαν αναπτύξει νόσο του συνδετικού ιστού και κατόπιν υποβληθεί σε αφαίρεση των ενθεμάτων μαστού [124].

Όπως προαναφέρθηκε ιδιαίτερο ρόλο στην ομοιόσταση του ανοσοποιητικού συστήματος διαδραματίζουν τα λεγόμενα T ρυθμιστικά λεμφοκύτταρα (CD4+/CD25+, Tregs). Η κύρια δράση τους είναι η καταστολή των T-λεμφοκυττάρων (effector T cells), καθώς και ο έλεγχος της ανοσιακής ανοχής έναντι αυτό-αντιγόνων (self-Ags) και άλλο-αντιγόνων (allo-Ags). Η έρευνά μας επικεντρώθηκε στη μελέτη των λεγόμενων υψηλών T ρυθμιστικών λεμφοκυττάρων (CD4+/CD25^{high}, Tregs^{high}), καθώς έχει αποδειχθεί ότι αποτελούν το 2-3% των περιφερικών CD4+ T λεμφοκυττάρων και είναι αυτά που ασκούν την κύρια ρυθμιστική δράση [147-148]. Η χρονική κατανομή των Tregs^{high} ήταν φυσιολογική και στις δύο Ομάδες ασθενών, χωρίς να βρεθούν στατιστικά σημαντικές διαφορές. Πρόκειται για την πρώτη μελέτη της δράσης των Tregs^{high} στο περιφερικό αίμα ασθενών με μόνιμα ή προσωρινά ενθέματα σιλικόνης που δεν εμφάνισαν κάποια τοπική ή συστηματική επιπλοκή που να σχετίζεται με ενεργοποίηση του ανοσοποιητικού συστήματος. Ο Wolfram και συν μελέτησε σε 33 ασθενείς, που είχαν υποβληθεί σε αυξητική μαστού με μόνιμα ενθέματα σιλικόνης, την ανοσολογική απόκριση μετά την ανάπτυξη ρικνωτικής κάψας. Αρχικά αναφέρει σημαντική αύξηση των Tregs^{high} (CD4+/CD25^{high}/Foxp3+/CD127-) στον καψιδικό ιστό σε σχέση με το περιφερικό αίμα (5.2% vs 0.7%, $p<0.01$), αλλά ταυτόχρονα υπήρξε μείωση του

πληθυσμού τους σε ασθενείς με σοβαρού βαθμού καψιδική ρίκνωση (Baker grade III, IV) σε σχέση με ασθενείς με μετρίου βαθμού καψιδική ρίκνωση (Baker grade I, II) (1.4% vs 8.5%, $p < 0.01$). Επίσης παρατήρησε ότι τα Tregs^{high} από τον καψιδικό ιστό παρουσίασαν υψηλότερη κατασταλτική δράση σε σχέση με εκείνα στο περιφερικό αίμα, παρ'όλα αυτά όμως τα ίδια τα Tregs^{high} του καψιδικού ιστού κατέστειλαν πιο αποτελεσματικά τα T-λεμφοκύτταρα του περικού αίματος σε σχέση με εκείνα του καψιδικού ιστού [149]. Γίνεται επομένως κατανοητή η πολυπλοκότητα της δράσης των T ρυθμιστικών κυττάρων κάνοντας αναγκαία την περαιτέρω μελέτη τους σε ασθενείς με ενθέματα σιλκόνης.

Ο υποδοχέας HLA-DR αποτελεί μέλος του μείζονος συστήματος ιστοσυμβατότητας τάξεως II (MHC II) και εκφράζεται κυρίως στην επιφάνεια των αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων (μονοκύτταρα/μακροφάγα, δενδριτικά κύτταρα, B-λεμφοκύτταρα), αλλά και από τα ενεργοποιημένα T-λεμφοκύτταρα [150]. Ο ρόλος του είναι η παρουσίαση του αντιγόνου σχεδόν αποκλειστικά στα βοηθητικά T-λεμφοκύτταρα διαμέσω του υποδοχέα τους (T cell receptor, TCR). Ιδιαίτερα σημαντικό εύρημα της παρούσας έρευνας αποτελεί η ανεύρεση αυξημένης έκφρασης του υποδοχέα HLA-DR στα κύτταρα με φαινότυπο CD3-/HLA-DR+ στο περιφερικό αίμα των ασθενών με προσωρινό ένθεμα σιλκόνης (Ομάδα Α). Ενώ η προεγχειρητική τιμή τους ήταν 11.63% (± 4.26 SD), 3 μήνες μετεγχειρητικά παρουσίασαν αύξηση σε 12.59% (± 6.08 SD) και 12 μήνες μετεγχειρητικά ακόμα μεγαλύτερη αύξηση σε 13.95 (± 5.67 SD) ($p = 0.033$). Παρ'όλα αυτά όμως η σύγκριση της έκφρασης των κυττάρων με φαινότυπο CD3-/HLA-DR+ στους ασθενείς με προσωρινό ένθεμα σιλκόνης (Ομάδα Α) σε σχέση με τους ασθενείς με μόνιμο ένθεμα σιλκόνης (Ομάδα Β) δεν ανέδειξε στατιστικά σημαντικές διαφορές ως προς την χρονική κατανομή τους. Επίσης φυσιολογική ήταν και η έκφραση του HLA-DR στα T-λεμφοκύτταρα (CD3+/HLA-DR+) είτε στις δύο Ομάδες ξεχωριστά, είτε συγκρητικά μεταξύ τους.

Η ανάλυση του κυτταρικού φαινοτύπου CD3-/HLA-DR+ μας επιτρέπει να υποθέσουμε ότι στην μελέτη μας η αυξημένη έκφραση του HLA-DR εκδηλώνεται κυρίως στα B-λεμφοκύτταρα

(CD3-/CD19+/HLA-DR+ cells). Όπως έχει ήδη αναφερθεί τα B-λεμφοκύτταρα δρουν και ως αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα, με κύρια δράση στην παρουσίαση του αντιγόνου στα βοηθητικά T-λεμφοκύτταρα (T-helper cells) διαμέσου του HLA-DR (αναφερόμενο και ως MHC II). Πρόκειται για μια συστηματική, αλλά μη ειδική διαφοροποίηση του ανοσοποιητικού συστήματος έναντι ενός ξένου σώματος, που στην προκειμένη περίπτωση είναι ο διατατήρας ιστού, καθώς θα πρέπει να τονίσουμε ότι σε αυτούς τους ασθενείς η τοποθέτηση του διατατήρα ιστού φαίνεται να μην αποτελεί τον μοναδικό εκκλητικό παράγοντα αυξημένης έκφρασης των CD3-/CD19+/HLA-DR+ κυττάρων. Η υποκείμενη νόσος, η φαρμακευτική αγωγή καθώς και το ψυχολογικό stress μπορεί να έχουν επιδράσει στο ανοσολογικό προφίλ των ασθενών αυτών, όπως άλλωστε συμβαίνει σε ασθενείς που υποβάλλονται σε χειρουργική επέμβαση [102]. Επίσης πρέπει να τονίσουμε ότι ένα σημαντικό ποσοστό των ασθενών αυτών (5/11, 45.45%) παρουσίασαν κάποιου είδους επιπλοκή (3 ασθενείς ελλάσωνα επιπλοκή, 2 ασθενείς μείζωνα επιπλοκή), που ως τοπική φλεγμονώδης αντίδραση μπορεί να επηρεάσει την ανοσιακή απόκρισή τους. Επιπλέον το 2^ο χειρουργείο (αφαίρεση διατατήρα ιστού και αποκατάσταση της πρωτοπαθούς βλάβης) πραγματοποιήθηκε 4 με 8 μήνες μετά το 1^ο χειρουργείο (τοποθέτηση διατατήρα ιστού), δηλαδή μεταξύ της 2^{ης} (στους 3 μήνες) και 3^{ης} (12 μήνες) αιμοληψίας, γεγονός που επίσης μπορεί να επέδρασε στην ποσοστιαία έκφραση των λευκών αιμοσφαιρίων του περιφερικού αίματος.

Αρκετές μελέτες έχουν αναδείξει την μείωση της έκφρασης του HLA-DR στα περιφερικά μονοκύτταρα (CD14+ cells) ασθενών με σοβαρές παθήσεις, όπως η σηπτική καταπληξία, το έγκαυμα, η κίρρωση του ήπατος και το εγκεφαλικό επεισόδιο [150-154]. Το αποτέλεσμα αρχικά είναι η ανάπτυξη ανοσοκαταστολής και ακολούθως η εκδήλωση λοιμώξεων που μπορούν να επηρεάσουν άμεσα την επιβίωση των ασθενών αυτών. Παρ'όλα αυτά όμως λίγες έρευνες έχουν μελετήσει την έκφραση των αντιγόνων HLA-DR,DP,DQ και ειδικά του HLA-DR σε ασθενείς με ενθήματα σιλικόνης. Ο O'Hanlon και συν αναφέρει αυξημένη συχνότητα του HLA-DQA1*0102 και μειωμένη έκφραση του HLA-DQA1*0501 και του HLA-DRB1*0301 σε ασθενείς με ενθήματα

σιλικόνης που εκδήλωσαν μυοσίτιδα, ενώ ο Young και συν διαπίστωσε σημαντική συσχέτιση μεταξύ της έκφρασης των περιφερικών HLA-DQ2 και HLA-DRw53 και την ανάπτυξη συμπτωμάτων σε ασθενείς με ενθέματα σιλικόνης [155,156]. Ο Katzin και συν αναφέρει αυξημένη έκφραση του HLA-DR στα T-λεμφοκύτταρα (CD3+/HLA-DR+) στον καψιδικό ιστό ασθενών με ενθέματα σιλικόνης σε σχέση με το περιφερικό αίμα ($25\% \pm 8.1$ vs 7.9 ± 3.8 , $p < 0.001$), ενώ ο Granchi και συν σε παρόμοια μελέτη δεν διαπίστωσε σημαντική αύξηση του πληθυσμού και της λειτουργικότητας των HLA-DR στα T-λεμφοκύτταρα στο περιφερικό αίμα ασθενών που ανέπτυξαν ρικνωτική κάψα μετά από τοποθέτηση ενθεμάτων σιλικόνης στους μαστούς [146,157].

Η ανάπτυξη του καψιδικού ιστού πέριξ του ενθέματος σιλικόνης αποτελεί μια φυσιολογική και προστατευτική τοπική αντίδραση του οργανισμού. Την τοποθέτηση του ενθέματος σιλικόνης ακολουθεί μια τοπική φλεγμονώδης αντίδραση χαρακτηριζόμενη αρχικά από την φάση της οξείας φλεγμονής με παρουσία κυρίως μαστοκυττάρων και πολυμορφοπύρηνων κυττάρων, κατόπιν αναπτύσσεται χρόνια φλεγμονή με συσσώρευση μονοκυττάρων/μακροφάγων και λεμφοκυττάρων, ακολουθεί η φάση του σχηματισμού κοκκιδώδους ιστού με πολλαπλασιασμό των ινοβλαστών και νέο-αγγειογένεση, καταλήγοντας στον σχηματισμό του καψιδικού ιστού [103].

Ιστολογικά, ο καψιδικός ιστός αποτελείται από 3 στρώματα: α) το έσω στρώμα που είναι σε επαφή με το περίβλημα του ενθέματος, αποτελείται από μια υάλινη μεμβράνη και περιλαμβάνει κυρίως μακροφάγα κύτταρα και ινοβλάστες, β) το μεσαίο στρώμα, σχηματίζεται από χαλαρό συνδετικό ιστό και το έσω αγγειακό δίκτυο, γ) το έξω στρώμα, σχηματίζεται από πυκνό συνδετικό ιστό και το έξω αγγειακό δίκτυο [118,119,158]. Οι κυριότεροι τύποι φλεγμονωδών κυττάρων που έχουν ανιχνευθεί είναι τα μακροφάγα, τα γιγαντιαία κύτταρα, τα λεμφοκύτταρα, τα πλασματοκύτταρα, τα μαστοκύτταρα, οι ινοβλάστες και τα πολυμορφοπύρηνια κύτταρα [118,158, 159]. Όσον αφορά τον ανοσοφαινότυπο των λεμφοκυττάρων, έχει αποδειχθεί ότι τα T-λεμφοκύτταρα (CD3+) και ιδιαίτερα τα CD4+ T-λεμφοκύτταρα (CD3+/CD4+) αποτελούν τον κυριότερο υποπληθυσμό [118,146,149,160].

Στην παρούσα μελέτη η ιστολογική εξέταση αφορούσε τμήμα καψιδικού ιστού που ελήφθη κατά την αφαίρεση του διατατήρα ιστού και την αποκατάσταση της πρωτοπαθούς βλάβης στους ασθενείς της Ομάδας Α. Ο κυριότερος κυτταρικός τύπος έκφρασης ήταν τα λεμφοκύτταρα, ακολουθούμενα από τα μακροφάγα, τα πλασματοκύτταρα και τα μαστοκύτταρα. Παρουσιάστηκε κυρίως μετρίου βαθμού φλεγμονώδης αντίδραση, ενώ δεν υπήρξαν στοιχεία επασβέστωσης. Οι περισσότεροι ασθενείς δεν ανέπτυξαν μεταπλασία συνοβιακού τύπου, αλλά ούτε και αντίδραση τύπου ξένου σώματος, όπως είναι η παρουσία φαγοκοκκιώματος και γιγαντοκυττάρων (refracting material, foreign body reaction, giant cells) στο ιστολογικό δείγμα. Τέλος σε όλες τις περιπτώσεις η διάταξη των ινών του κολλαγόνου ήταν οριζόντια (παράλληλη δηλαδή προς την επιφάνεια) και η πυκνότητά του ήταν κυρίως μέτρια (εύρος: από χαλαρή έως πυκνή). Όλα τα προαναφερθέντα ευρήματα είναι σε απόλυτη συμφωνία με αρκετές μελέτες που έχουν γίνει σε δείγματα καψιδικού ιστού που ελήφθησαν από ασθενείς που είχαν υποβληθεί σε αυξητική μαστού και ανέπτυξαν ρικνωτική κάψα διαφορετικού βαθμού [118, 158-161].

Σε όλα τα περιστατικά της μελέτης μας χρησιμοποιήθηκαν προσωρινά ή μόνιμα ενθέματα σιλικόνης τραχείας επιφανείας (textured surface) και κατά το χρονικό διάστημα παρακολούθησής τους κανένας ασθενής δεν ανέπτυξε ρικνωτική κάψα (capsular contracture). Στις περισσότερες περιπτώσεις η ρικνωτική κάψα εμφανίζεται κατά τους πρώτους μήνες από την τοποθέτηση του ενθέματος, παρ'όλα αυτά όμως τα πρώτα κλινικά σημεία μπορεί να παρουσιαστούν μετά από 5 χρόνια [158]. Η συχνότητα εμφάνισης ρίκνωσης κυμαίνεται μεταξύ 4% και 74%, ενώ αποτελεί μια απρόβλεπτη και ιδιαίτερα ενοχλητική επιπλοκή [11, 118]. Οι σημαντικότεροι αιτιολογικοί παράγοντες είναι η εκδήλωση υποκλινικής βακτηριακής λοίμωξης (subclinical bacterial contamination), το αιμάτωμα, ο τοπικός μηχανικός ερεθισμός και η τάση που ασκείται από το ένθεμα, η υπομαζική τοποθέτηση του ενθέματος, καθώς και η χρήση ενθεμάτων με λεία επιφάνεια και περιεχόμενο φυσιολογικό ορό [162-166].

Όπως έχει ήδη αναφερθεί στην εισαγωγή, τόσο τα προσωρινά (διατατήρες ιστού) όσο και τα μόνιμα ενθέματα σιλικόνης που χρησιμοποιούνται στη σύγχρονη Πλαστική Επανορθωτική και Αισθητική Χειρουργική είναι απολύτως ασφαλή υλικά. Η πρόοδος της τεχνολογίας σε συνδυασμό με τις πλέον σύγχρονες τεχνικές αποκατάστασης συγγενών και επίκτητων παθήσεων έχουν ελαχιστοποιήσει την εμφάνιση επιπλοκών και βελτιστοποιήσει τα αισθητικά αποτελέσματα. Πρόσφατα όμως ιδιαίτερο ενδιαφέρον και ανησυχία έχει προκαλέσει η πιθανή αιτιολογική συσχέτιση μεταξύ των ενθεμάτων σιλικόνης που χρησιμοποιούνται στην αυξητική μαστού και της εμφάνισης αναπλαστικού λεμφώματος από μεγάλα κύτταρα (Anaplastic Large Cell Lymphoma, ALCL) στον μαστό των ιδίων ασθενών. Πρόκειται για ένα T-λέμφωμα που αναπτύσσεται στο καψιδικό ιστό πέριξ του ενθέματος και συνήθως έχει καλοήγη πορεία και εξαιρετική πρόγνωση. Είναι μία πολύ σπάνια οντότητα, καθώς στη διεθνή βιβλιογραφία έχουν αναφερθεί από 54 έως 80 περιστατικά, ενώ ο μέσος χρόνος εμφάνισης είναι τα 11 έτη [167-169]. Κλινικά εκδηλώνεται κυρίως με την εμφάνιση ορώδους συλλογής και οιδήματος στον μαστό, ενώ συνήθως συνυπάρχουν ψηλαφητή μάζα, άλγος, ερύθημα, ρικνωτική κάψα και ψηλαφητοί μασχαλιαίοι λεμφαδένες. Σημαντικό ρόλο στη διάγνωση του ALCL διαδραματίζει η κυτταρομετρία ροής, καθώς έχει αποδειχθεί ότι τα νεοπλασματικά κύτταρα δεν εκφράζουν την κινάση του αναπλαστικού λεμφώματος (Anaplastic Lymphoma Kinase, ALK), ενώ παρουσιάζουν υψηλή έκφραση των αντιγόνων CD3, CD4, CD8 και CD30 (φαινότυπος CD3+/CD4+/CD30+/ALK- και CD3+/CD8+/CD30+/ALK-) [169-171]. Η θεραπεία χαρακτηρίζεται από αφαίρεση του ενθέματος και ολική καψεκτομή σε συνδυασμό με χημειοθεραπεία και/ή ακτινοθεραπεία.

Η έρευνά μας αποτελεί την πρώτη προοπτική μελέτη κυτταρομετρικού προσδιορισμού και σύγκρισης της ανοσιακής απόκρισης σε ασθενείς με ενθέματα σιλικόνης (προσωρινά και μόνιμα) όπου περιλαμβάνεται λήψη δείγματος αίματος προεγχειρητικά και επομένως οι ίδιοι οι ασθενείς αποτελούν και την ομάδα ελέγχου (control group). Επομένως, σε περιπτώσεις μεταβολής του ανοσοφαινότυπου των περιφερικών λεμφοκυττάρων μπορούμε να ταυτοποιήσουμε με μεγαλύτερη

ακρίβεια τους ασθενείς αυτούς και να παρακολουθήσουμε την κλινική τους πορεία. Στην Ομάδα Α των ασθενών με διατατήρα ιστού έγινε για πρώτη φορά εφαρμογή της κυτταρομετρίας ροής και παράλληλα λήψη και ιστολογική εξέταση του καψιδικού ιστού. Επίσης είναι η πρώτη εφαρμογή της κυτταρομετρίας ροής σε ασθενείς που υποβλήθηκαν σε αυξητική μαστού με μόνιμα ενθέματα σιλικόνης (Ομάδα Β) και δεν ανέπτυξαν ρικνωτική κάψα ή κάποια άλλη επιπλοκή. Ιδιαίτερη σημαντική είναι και η μελέτη της έκφρασης συγκεκριμένων αντιγόνων στα περιφερικά λεμφοκύτταρα, όπως του CD25 στα CD4+ T-λεμφοκύτταρα (CD4+/CD25+, Tregs) και του HLA-DR στα T-λεμφοκύτταρα (CD3+/HLA-DR+) και στα B-λεμφοκύτταρα (CD3-/CD19+/HLA-DR+), καθώς λίγες είναι οι παρόμοιες μελέτες που έχουν αναδείξει τον πιθανό παθογενετικό τους ρόλο στην ενεργοποίηση της κυτταρικής ανοσίας τοπικά στους ιστούς ή συστηματικά στο περιφερικό αίμα.

Βέβαια πρέπει να τονίσουμε ότι η μελέτη μας παρουσιάζει και ορισμένους περιορισμούς, κυριότερος τον οποίων είναι ο μικρός αριθμός των ασθενών που συμπεριελήφθησαν στην ανάλυση. Αν και προεγχειρητικά οι ασθενείς και από τις δύο Ομάδες αποτελούσαν έναν αρκετά ικανοποιητικό αριθμητικό πληθυσμό, τόσο η άμεση όσο και η απώτερη παρακολούθησή τους παρουσίασε διάφορες δυσκολίες με αποτέλεσμα να χρειαστεί να αποκλείσουμε αρκετούς ασθενείς έτσι ώστε το τελικό δείγμα να είναι όσο το δυνατόν πιο ομοιογενές. Επίσης η τελευταία αιμοληψία και κυτταρομετρική ανάλυση πραγματοποιήθηκε χρονικά στους 12 μήνες μετά το χειρουργείο, γεγονός που καθιστά τα αποτελέσματά μας πιο ενδεικτικά μίας πρώιμης αντίδρασης του ανοσοποιητικού συστήματος στη τοποθέτηση ενθεμάτων σιλικόνης. Κρίνεται επομένως απαραίτητη η χρονική επέκταση της λήψης δειγμάτων αίματος τουλάχιστον εντός της πρώτης 5ετίας, καθώς έτσι θα μπορέσουμε να έχουμε πιο αξιόπιστα αποτελέσματα ως προς την έκφραση του ανοσοφαινότυπου των περιφερικών λεμφοκυττάρων και επομένως ως προς την ανοσολογική απόκριση του ανθρώπινου οργανισμού στα ενθέματα σιλικόνης.

Σημαντικό ρόλο στην πραγματοποίηση της μελέτης μας διαδραμάτισε η κυτταρομετρία ροής. Όπως αναφέρθηκε η εφαρμογή της κυτταρομετρίας ροής στην κλινική πράξη αποτελεί ένα από τα σημαντικότερα επιτεύγματα στην Μοριακή Βιολογία και Ιατρική. Ο κυτταρομετρικός προσδιορισμός του ανοσοφαινότυπου των λεμφοκυττάρων στο περιφερικό αίμα ασθενών με προσωρινά και μόνιμα ενθέματα σιλικόνης αποτελεί μια αξιόπιστη μέθοδο, η οποία μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως *in vivo* test για την εκτίμηση της βιοσυμβατότητας των ενθεμάτων σιλικόνης στον ανθρώπινο οργανισμό, όχι μόνο πρώιμα, αλλά και σε βάθος χρόνου με τη συστηματική παρακολούθηση των ασθενών για τυχόν ανίχνευση ανοσολογικής αντίδρασης, σε συνδυασμό ή μη με την εκδήλωση κλινικής συμπτωματολογίας.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Σύμφωνα με τα ευρήματά μας τόσο τα προσωρινά όσο και τα μόνιμα ενθέματα σιλिकόνης αποτελούν αδρανή υλικά, που μπορούν να χρησιμοποιηθούν με απόλυτη ασφάλεια για την αποκατάσταση συγγενών και επίκτητων ανωμαλιών στην ειδικότητα της Πλαστικής Επανορθωτικής και Αισθητικής Χειρουργικής. Η αυξημένη έκφραση του φαινοτύπου CD3-/CD19+/HLA-DR+ στο περιφερικό αίμα των ασθενών με διατατήρα ιστού αποτελεί ένδειξη μη ειδικής συστηματικής διαφοροποίησης του ανοσοποιητικού συστήματος, η οποία όμως, όπως προαναφέρθηκε, φαίνεται να είναι πολυπαραγοντική. Συνεπώς είναι απαραίτητο να πραγματοποιηθούν μελέτες, που θα περιλαμβάνουν μεγαλύτερο αριθμό ασθενών για να αξιολογηθεί περαιτέρω και να τεκμηριωθεί το προαναφερόμενο εύρημα. Χωρίς αμφιβολία η κυτταρομετρία ροής μας επιτρέπει να ταυτοποιήσουμε με υψηλή αξιοπιστία τον ανοσοφαινότυπο των περιφερικών λεμφοκυττάρων σε ασθενείς με ενθέματα σιλικόνης, ενώ μπορεί να χρησιμοποιηθεί και ως screening test για την παρακολούθηση της κλινικής πορείας των ασθενών αυτών και την ανίχνευση ανοσολογικής αντίδρασης σε περιπτώσεις εκδήλωσης συμπτωματολογίας. Συνεπώς μπορεί να αποτελέσει ένα πολύτιμο εργαλείο στην περαιτέρω έρευνα, όσον αφορά την ασφάλεια χρήσης ενθεμάτων σιλικόνης σε μεγάλο βάθος χρόνου.

ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΗ ΕΡΕΥΝΑ

Από την παρούσα διδακτορική διατριβή προκύπτουν νέοι ενδιαφέροντες ορίζοντες προς μελέτη. Η κυτταρομετρία ροής αποτελεί μια συνεχώς εξελισσόμενη διαγνωστική μέθοδος και η χρήση ειδικών μονοκλωνικών αντισωμάτων θα μας επιτρέψει την περαιτέρω αναγνώριση του ανοσοφαινότυπου των λεμφοκυττάρων τόσο τοπικά στον καψιδικό ιστό/αντιδραστικό υγρό, όσο και συστηματικά στο περιφερικό αίμα των ασθενών με ενθέματα σιλικόνης. Ειδικότερα η μακροχρόνια παρακολούθηση σε μεγαλύτερο δείγμα των ασθενών αυτών και η συνεχής ανάλυση της έκφρασης ειδικών αντιγόνων όπως CD3, CD19, CD4, CD8, CD16, CD25, CD56, HLA-DR θα μας επιτρέψει να εξάγουμε πιο αξιόπιστα αποτελέσματα. Η τεχνολογική εξέλιξη στην κατασκευή των ενθεμάτων σιλικόνης σε συνδυασμό με την εφαρμογή των πλέον σύγχρονων χειρουργικών τεχνικών στο πεδίο της Πλαστικής Χειρουργικής μπορεί να εγγυηθεί την ασφαλή χρήση των ενθεμάτων σιλικόνης επιτυγχάνοντας το καλύτερο δυνατό λειτουργικό και αισθητικό αποτέλεσμα.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Εισαγωγή: Τα μόνιμα ενθέματα σιλικόνης χρησιμοποιούνται τις τελευταίες τέσσερις δεκαετίες τόσο στην επανορθωτική όσο και στην αισθητική πλαστική χειρουργική. Είναι προϊόντα που αποτελούνται από ένα εξωτερικό περίβλημα κατασκευασμένο από διαδοχικές διακλαδούμενες στρώσεις μορίων ελαστομερούς σιλικόνης, που προσδίδει στα ενθέματα την ελαστικότητα και την ακεραιότητά τους, ενώ το περιεχόμενο μπορεί να αποτελείται από γέλη ελαστομερούς σιλικόνης ή από αποστειρωμένο ισότονο φυσιολογικό ορό. Οι κυριότερες ενδείξεις χρήσης των μόνιμων ενθεμάτων σιλικόνης είναι η αποκατάσταση μαστού μετά από μαστεκτομή και η αύξηση του όγκου των μαστών για αισθητικούς λόγους ή για αποκατάσταση συγγενών δυσμορφιών. Τα προσωρινά ενθέματα σιλικόνης ή διατατήρες ιστών (tissue expanders) αποτελούνται από ένα διογκούμενο εξάρτημα πλήρωσης κατασκευασμένο από ελαστομερές σιλικόνης και φέρει ένα αποσπώμενο θόλο έγχυσης (βαλβίδα), επίσης από ελαστομερές σιλικόνης, μέσω του οποίου γίνεται η έγχυση αποστειρωμένου φυσιολογικού ορού σε τακτικά χρονικά διαστήματα. Οι διατατήρες ιστών χρησιμοποιούνται σε ένα μεγάλο αριθμό διεργασιών για την ανάπτυξη δερματικών κρημνών με σκοπό την αποκατάσταση συγγενών και επίκτητων ανωμαλιών τόσο σε παιδιά όσο και σε ενήλικες. Η σιλικόνη αν και θεωρείται ανενεργό υλικό μπορεί να δράσει ως ειδικό αντιγόνο ευαισθητοποίησης *in vivo* του ανοσοποιητικού συστήματος μέσω της κυτταρικής (cellular) ή μοριακής (humoral) αντίδρασης. Η ενεργοποίηση του ανοσοποιητικού συστήματος του ανθρώπου έπεται από την τοποθέτηση ενός μη αυτόλογου βιοϋλικού, όπως είναι η σιλικόνη έχει μελετηθεί με την χρήση διαφόρων μεθόδων, μεταξύ των οποίων είναι και η κυτταρομετρία ροής. Η κυτταρομετρία ροής είναι ικανή να ανιχνεύσει με υψηλή ειδικότητα και ευαισθησία τον φαινότυπο των λεμφοκυττάρων που εκφράζονται σε ασθενείς που φέρουν ενθέματα σιλικόνης.

Σκοπός: Κύριος σκοπός της παρούσας μελέτης είναι η εκτίμηση της ειδικής κυτταρικής αντίδρασης του ανοσοποιητικού συστήματος στο περιφερικό αίμα ασθενών που έχει τοποθετηθεί προσωρινό ή

μόνιμο ένθεμα σιλικόνης με την χρήση κυτταρομετρίας ροής. Πιο συγκεκριμένα, η ανάλυση του ανοσοφαινοτύπου των περιφερικών λεμφοκυττάρων που εκφράζονται ως απόκριση στην τοποθέτηση ενθεμάτων σιλικόνης. Επίσης, έγινε διερεύνηση της προγνωστικής αξίας της ενεργοποίησης του ανοσοποιητικού συστήματος σε σχέση με την εκδήλωση συμπτωμάτων και επιπλοκών από την χρήση ενθεμάτων σιλικόνης, καθώς και εκτίμηση της δυνατότητας της κυτταρομετρίας ροής να ελέγχει την βιοσυμβατότητα υλικών σιλικόνης.

Υλικό και Μέθοδος: Πρόκειται για μια προοπτική κλινικο-εργαστηριακή μελέτη στην οποία συμπεριελήφθησαν συνολικά 25 ασθενείς (7 άντρες, 18 γυναίκες, μέση ηλικία: 28 έτη, εύρος: 16-44 έτη) στους οποίους τοποθετήθηκαν προσωρινά (Ομάδα Α, 11 ασθενείς) και μόνιμα (Ομάδα Β, 14 ασθενείς) ενθέματα σιλικόνης κατά το χρονικό διάστημα Σεπτέμβριος 2006 έως Νοέμβριος 2009. Επιπλέον, στην Ομάδα Α έγινε λήψη δείγματος καψιδικού ιστού κατά τον χειρουργικό χρόνο αφαίρεσης του διατατήρα ιστού, το οποίο εστάλη για ιστολογική εξέταση. Κατά την περίοδο της μελέτης πραγματοποιήθηκε σειρά αιμοληψιών και πιο συγκεκριμένα προεγχειρητικά, 3 μήνες μετεγχειρητικά και 12 μήνες μετεγχειρητικά και στις δύο Ομάδες ασθενών. Το περιφερικό αίμα υποβλήθηκε εντός 24 ωρών σε ειδική επεξεργασία με την χρήση του κυτταρομετρητή ροής για την ανάλυση των λευκών αιμοσφαιρίων και του φαινοτύπου του λεμφοκυτταρικού πληθυσμού σε κάθε ασθενή με την χρήση των εξής αντισωμάτων: anti-CD3, anti-CD19, anti-CD16/CD56, anti-CD4, anti-CD8, anti-CD25, anti-HLA-DR, anti-CD2, anti-CD56. Η στατιστική ανάλυση των δεδομένων έγινε με την χρήση του συστήματος SPSS version 18.0 (Chicago, Ill., USA). Αρχικά η επεξεργασία περιελάμβανε την εφαρμογή του Kolmogorov-Smirnov test και του Shapiro-Wilk test για να ελέγξουμε εάν τα δεδομένα ακολουθούσαν κανονική κατανομή. Ακολούθως, η περαιτέρω ανάλυση των δεδομένων περιελάμβανε το παραμετρικό Anova test (repeated measures ANOVA test) για δεδομένα που ακολουθούσαν κανονική κατανομή και το μη παραμετρικό Friedman test για δεδομένα που δεν ακολουθούσαν κανονική κατανομή. Η στατιστική σύγκριση μεταξύ των δύο Ομάδων έγινε με τη χρήση του Student's *t* test και του Mann-Whitney test ανάλογα με το εάν τα

δεδομένα ακολοθούσαν κανονική ή μη κατανομή. Το διάστημα εμπιστοσύνης (confidence interval, CI) ήταν 95%. Το επίπεδο της στατιστικής σημαντικότητας ορίστηκε στο $p < 0.05$.

Αποτελέσματα: Ο ποσοτικός προσδιορισμός του υποπληθυσμού των λευκών αιμοσφαιρίων και των λεμφοκυττάρων δεν ανέδειξε στατιστικά σημαντική διαφορά στην χρονική κατανομή τους τόσο ξεχωριστά σε κάθε Ομάδα όσο και συγκριτικά μεταξύ των δύο Ομάδων. Μοναδική εξαίρεση αποτέλεσε η σχετικά αυξημένη έκφραση του HLA-DR στα CD3- κύτταρα, που αντιπροσωπεύονται από τα Β-λεμφοκύτταρα (CD3-/CD19+/HLA-DR+) ($p=0.033$). Η ιστολογική εξέταση του καψιδικού ιστού ανέδειξε ως κυριότερο κυτταρικό τύπο έκφρασης τα λεμφοκύτταρα, ακολουθούμενα από τα μακροφάγα, τα πλασματοκύτταρα και τα μαστοκύτταρα. Παρουσιάστηκε κυρίως μετρίου βαθμού φλεγμονώδη αντίδραση, ενώ δεν υπήρξαν στοιχεία επασβέστωσης. Οι περισσότεροι ασθενείς δεν ανέπτυξαν μεταπλασία συνοβιακού τύπου, αλλά ούτε και αντίδραση ξένου σώματος. Τέλος σε όλες τις περιπτώσεις η διάταξη των ινών του κολλαγόνου ήταν οριζόντια (παράλληλη δηλαδή προς την επιφάνεια) και η πυκνότητά του κυρίως μέτρια.

Συμπεράσματα: Πρόκειται για την πρώτη κλινική και προοπτική μελέτη που οι ίδιοι οι ασθενείς στους οποίους τοποθετήθηκε ένθεμα σιλικόνης αποτέλεσαν και την ομάδα ελέγχου. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της έρευνάς μας τα ενθέματα σιλικόνης (προσωρινά και μόνιμα) είναι ανενεργά υλικά, επιβεβαιώνοντας τη βιολογική τους αδράνεια και επομένως την ασφαλή κλινική τους χρήση. Η αυξημένη έκφραση του φαινοτύπου CD3-/CD19+/HLA-DR+ στο περιφερικό αίμα των ασθενών με διατατήρα ιστού αποτελεί ένδειξη μη ειδικής και συστηματικής διαφοροποίησης του ανοσοποιητικού συστήματος, η οποία όμως φαίνεται να είναι πολυπαραγοντική και περισσότερες μελέτες σε περισσότερους ασθενείς είναι απαραίτητες για την τεκμηρίωσή της. Η κυτταρομετρία ροής αποτελεί μια αξιόπιστη μέθοδο, η οποία μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως *in vivo* test για την εκτίμηση της βιοσυμβατότητας των ενθεμάτων σιλικόνης στον ανθρώπινο οργανισμό, όχι μόνο πρώιμα, αλλά και σε βάθος χρόνου με τη συστηματική παρακολούθηση των ασθενών για τυχόν ανίχνευση ανοσολογικής αντίδρασης, σε συνδυασμό ή μη με κλινική συμπτωματολογία.

ABSTRACT

Systemic Immune Response to Silicone Implants Detected by Flow Cytometric Analysis

Georgios E. Papanikolaou

Introduction

Permanent silicone implants

Silicon (Si) is the second most abundant element on the earth's surface and is usually bound to oxygen. The term silicone refers to polymers of siloxane (usually polydimethylsiloxane, PDMS) and represents a broad class of compounds with many different functional groups, which are widely used in medical devices and supplies. Silicone in the elastomer form consists of fully polymerized silicone with fumed silica filler. The gel form consists of cross-linked silicone with side chains of silicone oils. The viscosity of the gel may be altered by changing the length of these polymer chains.

Silicone implants used in Plastic Surgery are constructed of an outer shell that surrounds the filler material. The implant shell is made of silicone elastomer, while the filler substances vary in composition (silicone gel, saline, double lumen). First introduced in 1962 by Cronin and Gerow for breast augmentation, silicone-gel filled breast implants were commercially available in the early 1960s, and saline breast implants became available in the 1970s. Silicone implants currently available are of high cohesiveness (Cohesive II-III) and 5th generation, maintaining their original shape and in case of rupture they preserve their integrity.

The main structural characteristics of silicone implant are surface (textured and smooth), shape (round and anatomical/contour), and filler material (silicone gel, saline, double lumen). Permanent silicone implants are used mainly in breast augmentation either for aesthetic reasons or for reconstructive purposes such as tuberous breast, Poland syndrome as well as congenital and

developmental breast asymmetries (e.g. breast hypoplasia, anisomastia). Breast augmentation is the most common aesthetic surgical procedure with more than 300.000 cases performed in 2010 in the USA. In addition to their use in augmentation, silicone implants have been used extensively for breast reconstruction following mastectomy.

Despite their popularity, the use of silicone implants is associated with some adverse outcomes that can be divided into local complications and systemic effects. In addition, local complications can be attributed to either the initial surgery or to the implant itself. The most common local complications are wound dehiscence, infection, hematoma, seroma, capsular contracture, implant displacement and rippling. Regarding the systemic effects, the epidemiologic evidence does not support a causal association between breast implants and breast or any other type of cancer, definite or atypical connective tissue disease, adverse offspring effects, or neurologic disease.

Temporary silicone implants (tissue expanders)

Tissue expansion has developed as a routine procedure in Plastic Surgery in the past three decades. First described by Newmann in 1957 for microtia reconstruction, this form of soft tissue reconstruction is based on the natural ability of the skin to stretch in response to an underlying force. In 1976, Radovan used the tissue expander concept for reconstruction of the breast after mastectomy. Subsequently, the use of tissue expanders has become well accepted among plastic surgeons for the reconstruction of large and difficult wounds.

Tissue expanders are silicone envelopes that have self-sealing injection ports. Currently, tissue expanders are available in different shapes, such as round, rectangular, crescent, oval/elliptical and with sizes from 25cc to over 1500cc. At various intervals, saline is progressively injected through the port and passes into the expander, which enlarges. As the volume inside the implant increases, tension placed on the overlying and adjacent tissues increases. The expanded skin undergoes histological changes that are well documented: a) the epidermis exhibits increased mitotic

activity and there is recruitment of adjacent tissue, b) the dermis thins considerably, c) the vascularity is increased, d) there is formation of thick capsular tissue around the implant.

Cutaneous expansion is used in Reconstructive Plastic Surgery for the treatment of a variety of congenital and acquired defects in pediatric patients and adults. The main indications include reconstruction of burns, traumas, scars, naevi, alopecia and tumors. Tissue expansion is a useful method of achieving reconstruction of any site of body where there is little available tissue. Advantages of tissue expansion include: a) the recruitment of high quality local skin with matching color, texture and thickness, b) preservation of sensation and hair-bearing quality, c) avoidance of distant flaps, and d) minimal donor site morbidity. Disadvantages are frequent office visits for inflation, discomfort, a period of increased deformity, and the necessity of two operations.

Despite the usefulness of expansion, the procedure has several complications divided into major complications (those that require either an operation or hospitalization) and minor complications (those that require some medical intervention including oral antibiotics but did not require an operation or hospitalization to treat). The overall rates reported are 11% to 40%, and include primarily infection, exposure of the implant, hematoma, seroma, wide scars, necrosis over expansion, and wound dehiscence.

Nevertheless, tissue expansion is a safe and reliable reconstructive technique for a variety of soft tissue defects. Based on careful patient selection, meticulous pre-operative planning and involvement of a multidisciplinary team we can achieve the best functional result with optimal aesthetic outcome.

Immune system

The immune system is the main defense system of the human body that protects it against foreign elements such as microorganisms and macromolecules. The immunity can be classified into innate and adaptive. Immunology made a great advance toward the beginning of the 20th century,

through rapid developments, in the study of humoral and cellular immunity. Innate immunity is the first line of defense that refers to non-specific defense mechanisms that become activated immediately or within hours and do not rely on the clonal expansion of antigen-specific lymphocytes. Induce an acute inflammation reaction through a humoral response represented by the secretion of cytokines and complement, and through a cellular response represented by the action of macrophages, granulocytes and natural killer cells (NK cells). Adaptive immunity refers to antigen-specific immune response and also includes a memory that makes future responses against a specific antigen more efficient. Adaptive immunity can be distinguished into humoral and cellular. The humoral response is mediated by the B-lymphocytes and secretion of antibodies (Ab), and cellular response is mediated by the specific action of the lymphocytes.

The cells of the immune system are derived from the myeloid and lymphoid stem cells. The myeloid series is represented by the polymorphonuclear cells, monocytes/macrophages and dendritic cells. On the other hand the lymphoid cells include the T, B, and NK-lymphocytes. T-lymphocytes are divided into T-helper cells, Cytotoxic T cells (CTLs), and Natural Killer cells (NK-cells) and play a central role in cell-mediated immunity. B-lymphocytes function by secreting antibodies and as antigen-presenting cells (APCs) to activate T-lymphocytes. Furthermore, NK-cells are effector lymphocytes of the innate immune system that control several types of tumors and microbial infections by limiting their spread and subsequent tissue damage. All the different lymphocytic subpopulations express in their surface a series of protein molecules named Cluster of Differentiation (CD), which indicates a defined subset of cellular surface receptors (epitopes) that identify cell type and stage of differentiation, and which are recognized by antibodies. There are more than 250 identified clusters, each a different molecule, coating the surface of lymphocytes.

Flow cytometry

Flow cytometry is a diagnostic biotechnology that is used to analyse the physical and chemical characteristics of cells and particles by suspending cells in a stream of fluid and passing them by an electronic detection apparatus. It is employed in cell counting, cell sorting, biomarker detection and protein engineering, and routinely used in the diagnosis of health diseases. The first studies in flow cytometry and its application in counting cells automatically while in flow was reported by Moldavan in 1934, but the development of monoclonal antibody technology by Kohler and Milstein (for which they awarded the Nobel Prize in 1984) paved the way to modern flow cytometry and broadening the field of clinical applications.

Flow cytometry system consists of three main elements: a) a flow system, b) an optical system, and c) electronics to amplify and process the resulting signals. It integrates electronics, fluidics, computer, optics, software, and laser technologies in a single platform. This is a technology that simultaneously measures and then analyses multiple physical characteristics of single particles, usually cells, as they flow in a fluid stream through a beam of light. The properties measured include a particle's relative size, relative granularity or internal complexity, and relative fluorescence intensity. These characteristics are determined using an optical-to-electronic coupling system that records how the cell or particle scatters incident laser light and emits fluorescence.

Flow cytometry is the technological process that allows for the individual measurements of cell fluorescence and light scattering. This process is performed at rates of thousands of cells per second. This information can be used to individually sort or separate subpopulations of cells. Notably, in order to identify the immunophenotype of lymphocytes in the peripheral blood samples we use monoclonal antibodies that are artificially conjugated to fluorochromes and can recognize specific molecules, called cluster of differentiation (CD), in the surface of some cells. When the cells are analyzed by flow cytometry the cells expressing the marker for which the antibody is specific will manifest fluorescence. Cells that lack the marker will not manifest fluorescence.

Flow cytometry is finding increased use in routine clinical laboratories for the diagnosis, prognosis and monitoring of various diseases. Flow cytometric analysis can be applied in cytologic and histologic samples, as well as in biologic fluids such as peripheral blood, bone marrow, bronchoalveolar lavage (BAL), synovial fluid, pleural fluid, pericardiac fluid, peritoneal fluid and cerebrospinal fluid. Moreover, it is an important diagnostic tool in many fields of modern medicine and mainly in Hematology, Oncology, Pediatrics, Neurology, Urology, Gynecology and Obstetrics, and in organ transplantation.

Objective

The aim of our study is to investigate the distribution of leykocytes, and quantify the specific immunologic profile of lymphocytes in the peripheral blood of patients with permanent and temporary silicone implants.

Material and Methods

Categorization of patients and demographics

Our prospective and clinic-laboratory study included 25 patients (7 males, 18 females, average age, 28 years, range, 16-44 years) with placement of temporary (tissue expander) or permanent silicone implants, during the period between September 2006 and November 2009. Patients were divided into two groups depending on the type and use of the silicone implants.

Group A included 11 patients underwent placement of silastic shell tissue expanders (7 males, 4 females, average age 26.5 years, range, 16-35 years). Indications for tissue expansion were revision of scars in 7 patients (scars from previous surgery in 5 patients, and post-burn scars in 2 patients), excision of congenital giant naevi in 3 patients, and iatrogenic alopecia in one patient.

Group B included 14 female patients (average age, 29.3 years, range, 18-44 years) underwent breast augmentation with permanent silicone implants for aesthetic and reconstructive purposes.

All patients were healthy, according to history and general physical examination and had no symptoms of connective tissue disease, rheumatologic disorder, or autoimmune disease at the time of implantation. During the follow-up period the clinical course and the emergence of complications were recorded.

Description of the surgical technique

In patients of Group A a combined open and endoscopically assisted approach to placement of tissue expanders was used in all cases. A single incision was made for implantation of each tissue expander. Firstly, under direct visualization and with the use of the endoscope with an accompanying endoretractor, a subcutaneous pocket was created into which the tissue expander was placed. Tissue expanders of all shapes (crescentic, round, rectangular, and elliptical/oval) and sizes (25 to 1500cc) were placed in each pocket. All tissue expanders contained remote ports. Tissue expansion was initiated at varying times postoperatively and continued for a mean period of 6.5 months (range, 4-8 months). During the second operation tissue expanders were explanted, the primary lesion was excised and the defect was covered with the additional amount of tissue created by the previous expansion.

Patients of Group B underwent endoscopic placement of silicone implants in a subpectoral position and almost exclusively through an inframmary crease incision (13 of 14 cases). In one case the implant was placed through an anterior axillary approach. In all cases were used textured and silicone gel-filled implants of high cohesiveness. In 12 patients was placed anatomic implants and in 2 patients round shape implants, while the size ranged from 215cc to 350cc.

Capsular tissue histological analysis

Sections of capsular tissue were received in the operating room and examined in the fresh state. All specimens were harvested in blocks, fixed in 10% formaldehyde, processed and embedded in paraffin blocks. Four micron thick sections were obtained and stained with hematoxylin and eosin. The stained sections were examined by light microscopy.

The following histological features were assessed: a) the degree of inflammation that was scored on a four-grade scale (negative, mild, moderate, and severe), b) the types of inflammatory cells, c) the density and orientation of collagen fibers, d) the inner layer of synovial-like metaplasia, e) the capsular calcification, and f) the presence of refracting material.

Flow cytometric analysis

Peripheral venous blood samples were obtained before, three, and twelve months after the operation for both the groups of patients. Briefly, 5 ml of blood drawn by standard venipuncture was placed into tubes containing acid citrate dextrose as anticoagulant and transported to the laboratory within 24 hours for testing. Flow cytometric analysis was carried out in order to assess the distribution of total leukocytes and particularly the expression of specific lymphocyte subsets, used monoclonal antibodies against CD2, CD3, CD4, CD8, CD14, CD16/CD56, CD19, CD25, CD45, and HLA-DR. Flow cytometric acquisition was performed using FACS Scan (Becton Dickinson, San Jose, Calif.).

Initially, 100µl of blood sample was added to the appropriate tubes and mixed with 10µl of mouse monoclonal antibodies directly conjugated with fluorescein isothiocyanate (FITC) or phycoerythrin (PE). The samples were then incubated at room temperature out of direct light for 15 minutes. After that, erythrocytes were lysed by incubation with 2ml of FACSLyse solution (Becton Dickinson, San Jose, Calif.). Following lysis of erythrocytes, peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were washed with 2ml of phosphate-buffered saline (PBS) solution and isolated with

centrifugation at 3500rpm for 10 minutes. Cells were then washed again adding 2ml of PBS and a second round of centrifugation were performed in order to eliminate any erythrocytic residual. The cell pellet was resuspended in 0.5ml of PBS for fixation. Finally, cells were analyzed on a FACScan flow cytometer (Becton Dickinson). Lymphocytes were gated by forward and right-angle light scattering.

Statistical Analysis

The data were analyzed using SPSS version 18.0 (Chicago, Ill., USA). The Kolmogorov-Smirnov test and Shapiro-Wilk test of normality were used to determine whether or not the data were normally distributed. For data analysis, the repeated measures ANOVA test and the non parametric Friedman test were used. Statistical comparisons between the two groups of patients were made using the *t* test for normally distributed variables and the Mann-Whitney test for non-normally distributed data. The means and standard deviations of the variables were recorded for their descriptive statistical analysis. A p value <0.05 was considered to represent a statistically significant difference. The confidence interval was 95%.

Results

Patient clinical profile

In 11 patients of Group A were placed 23 tissue expanders (range, 1-4). Three patients had one tissue expander placed, 6 patients had 2 tissue expanders placed, and 2 patients had 4 tissue expanders placed at the same operation time. All of the silastic shell tissue expanders had smooth surface with remote ports, and implants of all shapes (crescentic, round, rectangular, oval/elliptic) and sizes (25cc to 1500cc) were used in all cases. The anatomic sites of expansion included the scalp (3 expansions), trunk (3 expansions), upper extremities (3 expansions), and lower extremities (2 expansions). The implant remained in the site for a mean period of 6.5 months (range, 4-8 months).

Complications were identified in 5 out of 11 patients (45.45%). Minor complications (hypertrophic scarring) occurred in 2 patients (18.18%), and major complications (wound infection) occurred in 2 patients (27.27%).

There were 14 female patients in Group B underwent breast augmentation with placement of permanent silicone gel-filled breast implants. All of the implants were high cohesiveness, they had textured surface, and volume ranged from 215cc to 350cc. In 12 cases (86%) the implants had anatomic (contour) shape, and in 2 cases (14%) round shape. In all cases the implant was placed in a submuscular pocket. Early and late postoperative course was uneventful in all but one case, where hypertrophic scarring occurred at the incision site. The functional and aesthetic results were optimal in all patients.

Flow cytometry

During the three periods of blood examination (preoperatively, 3 and 12 months postoperatively) the immunophenotypic analysis showed that the vast majority of the peripheral blood lymphocytes consisted of T lymphocytes (CD3+), followed by NK cells (CD16+/CD56+), and B lymphocytes (CD19+) either in group A or in Group B of patients. Moreover, in both groups of patients the peripheral blood T lymphocyte subsets were predominantly T-helper lymphocytes (CD3+/CD4+), followed by cytotoxic T-lymphocytes (CD3+/CD8+, CTLs) and a small percentage were T regulatory cells (CD4+/CD25+).

Flow cytometric immunophenotypic analysis showed no statistically significant differences of the white cell subsets and lymphocytic subpopulations, with normal temporal distribution for both group of patients. The only exception were presented in Group A (tissue expander patients), where there was an increased expression of HLA-DR by the CD3- cells, which were represented by the B-lymphocytes (CD3-/CD19+/HLA-DR+) ($p=0.033$). Furthermore, the statistical comparison between

the two groups of patients showed again no significant differences in the temporal distribution of peripheral blood white cells and lymphocytes.

Histology of the capsular tissue

The cellular composition of capsular tissue showed a predominance of lymphocytes, along with macrophages, scattered plasma cells and mast cells. Evidence of mild chronic inflammatory reaction was detected in 3 specimens (27.28%), and moderate to severe chronic inflammation reaction was detected in 8 specimens (72.72%). The collagen fibers in all specimens were oriented parallel to the capsular surface with moderate density, and in 3 patients (27.28%), we found an inner layer of synovial-like metaplasia. There was no evidence of focal calcification in any of our 11 patients. Furthermore, refracting material was observed in 3 specimens (27.28%).

Discussion

The impact of surgery and trauma on patient's immunologic profile could be detrimental and can induce several complications such as infections and delayed wound healing. The post-surgical immune suppression has been reported in different studies, including increased in the percentage of neutrophils, decreased lymphocyte numbers, and reduced expression of HLA-DR (MHC II) by circulating monocytes and lymphocytes. During the immediate postoperative period, there is an immune activation at the site of injury, which induces a systemic anti-inflammatory response that in turns causes suppression of the cellular immunity. Moreover, the altered immunologic status of those patients could be the result of the use of medications, underlying disease, and psychological stress.

The implantation of biomaterials, such as prosthesis and medical devices can induce several local reactions, including acute inflammation, chronic inflammation, granulation tissue development, foreign body formation, and fibrous capsule formation around the implant. Particularly, the biomaterial's surface properties play an important role in modulating the foreign body reaction,

which is represented by monocyte/macrophage extravasation and migration, monocyte/macrophage adhesion, and macrophage fusion to form foreign body giant cells at the implant site. The sequence of events involved in inflammatory and wound healing responses leading to foreign body giant cell and capsular tissue formation is mainly regulated by the action of mast cells and T-helper lymphocytes with the production of IL-4 and IL-13. Furthermore, inflammatory cells can release mediators of degradation such as oxygen free radicals, degradative enzymes, and acids into the implant site and influence the integrity of the biomaterial surface. Also, these inflammatory cells has been shown to exhibit a reduced bacteriocidal capability, leaving them incapable of attacking foreign organisms that may be adherent to the biomaterial.

The use of silicone medical devices is very common in modern medical practice. Although silicone was originally regarded as being inert in the human body, its polymeric and hydrophobic characteristics and the presence of electrostatic charges and organic side groups render silicone a potentially ideal immunogen. Studies have reported the causal association between silicone products and development of various complications such as inflammatory reaction, rheumatic diseases, and lymphadenopathy, which may involve the activation of the immune system.

The tissue response to silicone implants is characterized by the formation of a fibrous capsule and accumulation of reactive and exudative fluid around the implant. Currently, there is evidence that silicone particles are frequently present in macrophages and as cystic-like spaces within capsular tissue in patients underwent breast augmentation with silicone implants. Moreover, some studies have demonstrated the presence of elevated serum silicon (Si) levels in symptomatic women with silicone gel breast implants, as well as silicone compounds in the blood and liver of symptomatic patients underwent implant-based breast reconstruction.

The evidence of local and systemic detection of silicone particles suggests that silicone may itself have antigenic properties, causing the activation of a humoral-mediated immunologic response. Actually, studies have identified several types of antibodies (antinuclear antibodies, anticollagen

antibodies, anticardiolipin antibodies IgG and IgM, rheumatoid factor, anti-Ro, and anti-La) against different self antigens in patients with silicone implants. Increased levels of antibodies to silicone elastomers (antisilicone antibodies) have been reported in the serum and capsular tissue of patients with tissue expanders or silicone breast implants, especially after leakage or frank rupture. However, the presence of these antisilicone antibodies has little or no clinical importance and further long-term studies are needed.

The ability of silicone implants to induce a specific immune reaction versus a nonspecific inflammatory response remains controversial. In our study, we demonstrate that there is no statistically significant difference in the temporal distribution of the peripheral blood leukocyte subsets (polymorphonuclear cells, monocytes, lymphocytes) either at each group of patients separately, or in comparison between the two groups. This means that during the period of our study there was no evidence of systematic inflammatory reaction to the breast silicone implants and tissue expanders.

Despite the widespread use of silicone implants, there have been few systematic studies on the immunophenotyping analysis of the peripheral blood lymphocyte subpopulations in patients with silicone implants. With the use of flow cytometry, we demonstrated that the vast majority of the peripheral lymphocytes consisted of T-lymphocytes (CD3+) either during the preoperative period, or 3 months and 12 months postoperatively in both group of patients, followed by the NK cells (CD16+/CD56+) and B-lymphocytes (CD19+). Smalley et al. reported an immunologic stimulation of T-lymphocytes by silica after use of silicone mammary implants, while Vojdani et al. found a significantly reduced ability by NK cells to kill tumor target cells in patients with silicone implants compared to healthy control individuals.

In our study, the peripheral T-lymphocytes were predominantly helper T-lymphocytes (CD3+/CD4+) and cytotoxic T-lymphocytes (CD3+/CD8+, CTLs) in both groups of patients. Prantl and colleagues report the predominance of T-helper cells in the serum of patients with capsular

contracture after silicone-based breast augmentation, similar to those in healthy controls. Katzin et al. demonstrated that capsular tissue-associated lymphocytes showed an increased expression of CD29 and decrease in expression of CD45RO by the CD4⁺ cells (phenotype, CD4⁺/CD29⁺/CD45RO⁻) in comparison with peripheral blood lymphocytes in patients with silicone breast implants. Moreover, Ojo-Amaize et al. reported an abnormal CD4⁺ cell proliferative response in women with silicone-gel breast implants after exposure to silicon dioxide (silica, SiO₂), silicon (Si), or silicone gel.

In addition, we determined the distribution of T cell subpopulation, namely T regulatory cells (CD4⁺/CD25⁺/Foxp3⁺, Tregs). Naturally occurring Treg cells constitute 5-10% of peripheral CD4⁺ cells in normal humans, but only the CD4⁺/CD25^{high} cells (Treg^{high} cells) which constitute 2-3% of the CD4⁺ T cells are really regulator. Their main function is to suppress activation and effector functions of autoreactive T cells and control the immunologic tolerance to self-antigens and nonself-antigens. We found that the expression of Treg^{high} cells remain invariable up to one year after surgery in patients with silicone breast implants and in those with tissue expander placement. This is the first study on the Tregs cells function at the peripheral blood of patients with silicone implants that they didn't demonstrate any immunologic-related symptom. Wolfram et al. reported an increase of percentage and activity of Treg cells in the capsular tissue compared with the periphery in patients with peri-silicone implant capsular fibrosis, and ratios of intracapsular Treg cells inversely proportional to the clinical degree of capsular fibrosis. There is now evidence that the decrease of numbers and functional activity of Treg cells are associated with the development of several chronic inflammatory and autoimmune diseases, and the prevalence of Treg cells was found to be increased in the peripheral blood and tumour microenvironment of cancer patients, as well as in infectious diseases.

The receptor, namely Human Leukocyte Antigen DR (HLA-DR) is part of the Major Histocompatibility Complex II (MHC II), and is mainly expressed on the cellular surface of the antigen-presenting cells (monocytes/macrophages, dendritic cells, B-lymphocytes, APCs), but also

by the activated T-lymphocytes. HLA-DR plays a crucial role in the cellular immunity, since it is responsible for the antigen-presentation exclusively to the T-lymphocytes. Flow cytometric analysis of the peripheral blood samples in patients with tissue expanders, demonstrated an increase expression of HLA-DR by the CD3⁺ cells (CD3⁺/HLA-DR⁺) during the study period. The preoperative value was 11.63% (± 4.26 SD), while 3 months postoperatively was 12.59% (± 6.08 SD), and 12 months postoperatively increased in 13.95 (± 5.67 SD) ($p=0.033$). Although, the expression of HLA-DR by the CD3⁺ cells in tissue expander patients was similar to silicone breast implant patients. Moreover, normal was the temporal distribution of CD3⁺/HLA-DR⁺ cells either at any group separately, or between the two groups of patients.

The predominance of the immunophenotype CD3⁺/HLA-DR⁺ allow us to assume that HLA-DR is mainly expressed by B-lymphocytes (CD3⁺/CD19⁺/HLA-DR). This finding is consistent with a systemic and non-specific immunologic response against a foreign material, such as tissue expander, but we must highlight that other causative factors could have attributed to this phenomenon. Firstly, the underlying disease and the use of medications may have influenced the immune competence of those patients. Moreover, it is our hypothesis that preoperative acute or chronic stress is a significant contributor to the above immune perturbation. Last, patients with tissue expanders developed a relative high percentage of complications (45.45%), which as a local inflammatory reaction could have influenced their immunologic profil. All those factors were shown to alter metabolic and endocrine processes, including high plasma corticosteroids (cortisol) and catecholamines levels.

Several studies have shown a decreased expression of HLA-DR on monocytes (CD14⁺) in patients with severe systemic diseases, such as sepsis, burns, liver cirrhosis, and stroke, which can directly affect their prognosis. However, currently there is little evidence about the expression of HLA-DR on leukocytes in patients with silicone implants. O'Hanlon et al. reported elevated frequency of HLA-DQA1*0102, and decreased frequencies of HLA-DQA1*0501 and HLA-

DRB1*0301 in patients which developed myositis after they received silicone breast implants, while Young et al. described significant associations with HLA-DQ2 and HLA-DRw53 in symptomatic women with silicone implants. Moreover, Katzin and colleagues reported an increased expression of HLA-DR by T-lymphocytes (CD3+/HLA-DR+) on capsular tissue of silicone breast implants in comparison with peripheral blood samples, while Granchi et al. in a similar study reported that there were no statistically significant differences on HLA-DR expression and activity by T-lymphocytes in peripheral blood of patients with capsular contracture after breast augmentation with silicone implants. We conclude that measurement of HLA-DR expression on peripheral leukocytes is a useful parameter for monitoring the immune function, but further investigations are needed in order to confirm their prognostic value in patients with silicone implants.

The tissue response to silicone implants includes formation of a fibrous capsule. Histologically, this capsular tissue show a three-layer composition: a) the inner layer in contact with the silicone surface appeared to be single or multilayered, containing macrophages and fibroblasts, b) the middle layer consisted of loosely arranged connective tissue including the internal vascular layer, and c) the outer layer of dense connective tissue with an external vascular supply. In our study, in Group A of patients specimens of capsular tissue were received during the 2nd operation of tissue expander removal and reconstruction of the primary lesion. Histological analysis shown that there were mainly moderate to severe degree of chronic inflammation, and the most common cell types were lymphocytes, macrophages and plasma cells. In 3 specimens (27.27%) we found an inner layer of synovial-like metaplasia, while the collagen fibers in all patients were oriented parallel to the capsular surface. Furthermore, refracting material was found within the substance of 3 specimens (27.27%), but no focal calcification was observed in any of our 11 patients. Our results are in absolute concordance with similar studies, which have been performed mainly in patients with capsular contracture after silicone-based breast augmentation.

In all of our breast augmentation cases (Group B) we used silicone gel-filled implants with textured surface, and there was no evidence of capsular contracture. This complication is still an unpredictable and distressing phenomenon, while the incidence may vary from 4% to 74%. In most cases capsular contracture develops within the first months after implantation, even though it is also possible for the first clinical signs to appear after 5 or more years. The most common etiologic factors include subclinical bacterial contamination, haematoma, local shear forces, subglandular pocket, and the use of saline-filled silicone implants with smooth surface.

Breast implants and tissue expanders are considered safe and inert biomaterials. Nevertheless, there is evidence that a type of anaplastic large cell lymphoma (ALCL) is associated with breast implants. Anaplastic large cell lymphoma is a rare T-cell lymphoma involving capsular tissue and/or effusions associated with breast implants. However, the course in those patients seems to be unusually benign compared to other systemic ALCL. It is a rare entity, with an overall frequency of 54 to 80 cases reported in literature. Clinical findings include late-onset seroma, swelling, a palpable breast mass, pain, capsular contracture, and axillary lymphadenopathy. Flow cytometry can aid in the diagnostic approach of tissue samples, effusion, and peripheral blood in patients with signs of local inflammation after breast augmentation with silicone implants. Several case series have shown that tumor cells express the phenotype CD3+/CD4+/CD30+/ALK-, and CD3+/CD8+/CD30+/ALK-. The therapy of ALCL cases involves implant explantation, total capsulectomy, and eventually adjuvant chemotherapy, radiotherapy, or stem cell transplantation.

This is the first prospective study where the same patients who underwent silicone implantation were used as a control group, since flow cytometric analysis included the preoperative peripheral blood sampling. Therefore, flow cytometry can define any immunophenotype variation of the peripheral lymphocytes and identify more precisely those patients during the follow-up period. Moreover, in Group A (tissue expander patients) we apply for the first time the flow cytometry in parallel with fibrous tissue histologic analysis, and in Group B (silicone breast implant patients) we

used the flow cytometry to determine the immunologic reaction specifically to the silicone material, since those patients didn't show any complication. Furthermore, few studies have focused on the expression of CD24+ by the CD4+ cells (CD4+/CD25+, Tregs), and the expression of HLA-DR by the CD3+ and CD3- cells. These markers have been demonstrated to play an important role to the immune response either locally or systematically after silicone implantation.

However, there are several inherent limitations in our study, regarding mainly the small number of patients included in the statistical analysis, since many patients have been lost during the follow-up period. Afterwards, the last peripheral blood sample was taken 12 months postoperatively, which makes our results as an indicator of the early immune response to the silicone implants and therefore further long-term follow-up is needed in order to assess with higher sensitivity the immunologic activity of those patients.

Flow cytometry is an important diagnostic tool in modern medicine and particularly in the diagnosis of several diseases, and for monitoring the immune function in patients during their follow-up assessment. The flow cytometric analysis of the peripheral blood lymphocyte subpopulations is a reliable method that can be used as an *in vivo* test to evaluate the biocompatibility of silicone implants and also to observe patients with immune activity for possible clinical manifestation of symptoms in the future. The safety of silicone implants is already established, though better study of host immune response is needed.

Conclusion

Based on our results silicone breast implants and tissue expanders are inert biomaterials that can be used with absolute safety for aesthetic and reconstructive purposes in Plastic Surgery. The increased expression of the immunophenotype CD3-/CD19+/HLA-DR+ at the peripheral blood in patients with tissue expanders is an indication of a non-specific and systematic differentiation of the immune system, which is attributed to several factors and studies with more patients and long-term follow-up is necessary in order to document this immunologic alteration. Flow cytometry allow us to determine with high precision the immunophenotypic expression of the peripheral lymphocytes in patients with silicone implants, and therefore can be used as a screening test able to identify any immune response in the clinical setting of those patients.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- 1) Gampper TJ, Khoury H, Gottlieb W, et al. Silicone gel implants in breast augmentation and reconstruction. *Ann Plast Surg* 2007; 59(5): 581-590.
- 2) Brandon HJ, Young VL, Jerina KL, et al. Variability in the properties of silicone gel breast implants. *Plast Reconstr Surg* 2001; 108(3): 647-655.
- 3) Brody GS. Silicone technology for the plastic surgeon. *Clin Plast Surg* 1988; 15(4): 517-520.
- 4) Cronin TD, Gerow FJ. Augmentation Mammoplasty: A new “natural feel” prosthesis. *Transactions of the IIIrd Congress of Plastic Surgery*, 1963: 41-49.
- 5) Arion HG. Presentation d’ une prothese retromammaire. *J Soc Fr Gynecol* 1965; 35: 427.
- 6) Cronin TD, Greenberg RL. Our experience with the silastic gel breast prosthesis. *Plast Reconstr Surg* 1970; 46: 1-7.
- 7) Ashley FL. Further studies on the natural-Y breast prosthesis. *Plast Reconstr Surg* 1972; 49(4): 414-419.
- 8) Hartley JH. Specific applications of the double lumen prosthesis. *Clin Plast Surg* 1976; 3: 247-263.
- 9) Becker H. Breast augmentation using the expander mammary prosthesis. *Plast Reconstr Surg* 1987; 79(2): 192-199.
- 10) Spear S. The breast implant story. *Ann Plast Surg* 2006; 56(5): 573-583.
- 11) Gampper TJ, Khoury H, Gottlieb W, Morgan RF. Silicone gel implants in breast augmentation and reconstruction. *Ann Plast Surg* 2007; 59(5): 581-590.
- 12) Scales JT. Discussion on metals and synthetic materials in relation to tissues. *Proc R Soc Med* 1953; 46(8): 641-652.
- 13) American Society of Plastic Surgeons. 2010 Cosmetic plastic surgery statistics. Available at: <http://www.plasticsurgery.org>.

- 14) Hidalgo DA, Spector JA. Breast Augmentation. *Plast Reconstr Surg* 2014; 133(4):567e-583e
- 15) Hidalgo DA. Breast Augmentation: choosing the optimal incision, implant, and pocket plane. *Plast Reconstr Surg* 2000; 105(6): 2202-2216.
- 16) Tebbetts JB. Dual plane breast augmentation: optimizing implant-soft-tissue relationships in a wide range of breast types. *Plast Reconstr Surg* 2006; 118(7 Suppl): 81S-98S.
- 17) Lam T, Brennan M. Cosmetic and reconstructive breast surgery. *Aust Fam Physician* 2006; 35(6): 423-428.
- 18) Neligan PC. *Plastic Surgery 3rd edition (Elsevier Eds). Volume Five: Breast.* 2013.
- 19) Nahabedian MY. Breast deformities and mastopexy. *Plast Reconstr Surg* 2011; 127(4): 91e-102e.
- 20) Seyfer AE, Fox JP, Hamilton CG. Poland syndrome: evaluation and treatment of the chest wall in 63 patients. *Plast Reconstr Surg* 2010; 126(3): 902-911.
- 21) Ahmed S, Snelling A, BAins M, et al. Breast reconstruction. *BMJ* 2005; 330(7497): 943-948.
- 22) Cordeiro PG, McCarthy CM. A single surgeon's 12-year experience with tissue expander/implant breast reconstruction: part I. A prospective analysis of early complications. *Plast Reconstr Surg* 2006; 118(4): 825-831.
- 23) Cordeiro PG, McCarthy CM. A single surgeon's 12-year experience with tissue expander/implant breast reconstruction: part II. A prospective analysis of early complications. *Plast Reconstr Surg* 2006; 118(4): 832-839.
- 24) Macmillan RD, McCulley SJ. Oncoplastic breast surgery: what, when and for whom? *Curr Breast Cancer Rep* 2016; 8: 112-117.
- 25) Savalia NB, Silverstein MJ. Oncoplastic breast reconstruction: patient selection and surgical techniques. *J Surg Oncol.* 2016; 113(8): 875-82.
- 26) Noguchi M, Yokoi-Noguchi M, Ohno Y, et al. Oncoplastic breast conserving surgery: volume replacement vs. volume displacement. *Eur J Surg Oncol.* 2016 Jul;42(7):926-34.

- 27) McLaughlin JK, Lipworth L, Murphy DK, et al. The safety of silicone gel-filled breast implants: a review of the epidemiologic evidence. *Ann Plast Surg.* 2007; 59(5): 569-580.
- 28) Iwuagwu FC, Frame JD. Silicone breast implants: complications. *Br J Plast Surg.* 1997; 50(8): 632-636.
- 29) Brown LS. Epidemiology of silicone-gel breast implants. *Epidemiology.* 2002; 13 Suppl 3: S34-39.
- 30) Berry MG, Cucchiara V, Davies DM. Breast augmentation: Part II-adverse capsular contracture. *J Plast Reconstr Aesthet Surg.* 2010; 63(12): 2098-2107.
- 31) Schaub TA, Ahmad J, Rohrich RJ. Capsular contracture with breast implants in the cosmetic patient: saline versus silicone--a systematic review of the literature. *Plast Reconstr Surg.* 2010; 126(6): 2140-2149.
- 32) Barnsley GP, Sigurdson LJ, Barnsley SE. Textured surface breast implants in the prevention of capsular contracture among breast augmentation patients: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Plast Reconstr Surg.* 2006; 117(7): 2182-2190.
- 33) Brinton LA, Brown SL. Breast implants and cancer. *J Natl Cancer Inst.* 1997; 89 (18):1341-1349.
- 34) McCarthy CM, Pusic AL, Disa JJ, et al. Breast cancer in the previously augmented breast. *Plast Reconstr Surg.* 2007; 119(1): 49-58.
- 35) Lipworth L, Tarone RE, McLaughlin JK. Silicone breast implants and connective tissue disease: an updated review of the epidemiologic evidence. *Ann Plast Surg.* 2004; 52(6): 598-601.
- 36) Neumann CG. The expansion of an area of skin by progressive distension of a subcutaneous balloon. *Plast Reconstr Surg.* 1957; 19(2): 124-130.
- 37) Radovan C. Reconstruction of the breast after radical mastectomy using temporary expander. *Plast Surg Forum.* 1978; 1: 41-45.

- 38) Cunha MS, Nakamoto HA, Herson MR, et al. Tissue expander complications in plastic surgery: a 10-year experience. *Rev Hosp Clin Fac Med Sao Paulo*. 2002; 57(3): 93-97.
- 39) Argenta LC. Tissue expansion. In: Aston SJ, Beasley RW & Thorne CHM – *Plastic Surgery*. 5th ed. New York, Lippincott-Raven, 1997. p.91.
- 40) Austad ED. The origin of expanded tissue. *Clin Plast Surg*. 1987; 14: 431-433.
- 41) Farzaneh FC, Kaldari S, Becker M, et al. Tissue expansion 1984-1999: a 15-year review. *Scand J Plast Reconstr Surg Hand Surg*. 2006; 40(2): 89-92.
- 42) Argenta LC, Marks MW, Pasyk KA. Advances in tissue expansion. *Clin Plast Surg*. 1985; 12(2): 159-171.
- 43) Bauer BS, Vicari FA, Richard ME. The role of tissue expansion in pediatric plastic surgery. *Clin Plast Surg*. 1990; 17(1): 101-112.
- 44) Toranto JD, Yu D, Cederna RS. Endoscopic versus open tissue-expander placement: is less invasive better? *Plast Reconstr Surg*. 2007; 119(3): 894-906.
- 45) Manders EK, Schenden MJ, Furrey JA, et al. Soft-tissue expansion: concepts and complications. *Plast Reconstr Surg*. 1984; 74(4): 493-507.
- 46) Antonyshyn O, Gruss JS, Mackinnon SE, et al. Complications of soft tissue expansion. *Br J Plast Surg*. 1988; 41 (3): 239-250.
- 47) Wang J, Huang X, Liu K, et al. Complications in tissue expansion: an updated retrospective analysis of risk factors. *Handchir Mikrochir Plast Chir*. 2014; 46(2) :74-79.
- 48) Hoffmann JF. Tissue expansion in the head and neck. *Facial Plast Surg Clin North Am*. 2005; 13(2): 315-324.
- 49) LoGiudice J, Gosain AK. Pediatric tissue expansion: indications and complications. *J Craniofac Surg*. 2003; 14(6): 866-872.
- 50) Delves PJ, Roitt IM. The immune system. First of two parts. *N Eng J Med*. 2000; 343(1): 37-49.

- 51) Delves PJ, Roitt IM. The immune system. Second of two parts. *N Eng J Med.* 2000; 343(2): 108-117.
- 52) Turvey SE, Broide DH. Innate immunity. *J Allergy Clin Immunol.* 2010; 125(2 Suppl 2): S24-32.
- 53) Hoffmann J, Akira S. Innate immunity. *Curr Opin Immunol.* 2013; 25(1): 1-3.
- 54) Bonilla FA, Oettgen HC. Adaptive immunity. *J Allergy Clin Immunol.* 2010; 125(2 Suppl 2): S33-40.
- 55) Janeway CA, Bottomly K. Signals and signs for lymphocyte responses. *Cell.* 1994; 76(2): 275-285.
- 56) Yona S, Jung S. Monocytes: subsets, origins, fates and functions. *Curr Opin Hematol.* 2010; 17(1) :53-59.
- 57) Geissmann F, Manz MG, Jung S, et al. Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells. *Science.* 2010; 327(5966): 656-61.
- 58) Bernard A, Boumsell L. The clusters of differentiation (CD) defined by the First International Workshop on human leucocyte differentiation antigens. *Hum Immunol.* 1984; 11(1): 1-10.
- 59) Zola H, Swart B, Boumsell L, et al. Human Leucocyte Differentiation Antigen nomenclature: update on CD nomenclature. Report of IUIS/WHO Subcommittee. *J Immunol Methods.* 2003; 275(1-2): 1-8.
- 60) Nikolich-Zugich J, Slifka MK, Messaoudi I. The many important facets of T-cell repertoire diversity. *Nat Rev Immunol.* 2004; 4(2): 123-132.
- 61) von Bubnoff D, Geiger E, Bieber T. Antigen-presenting cells in allergy. *J Allergy Clin Immunol.* 2001; 108(3): 329-339.
- 62) Mucida D, Cheroutre H. The many face-lifts of CD4 T helper cells. *Adv Immunol.* 2010; 107: 139-152.
- 63) Luckheeram RV, Zhou R, Verma AD, et al. CD4+ T cells: differentiation and functions. *Clin Dev Immunol.* 2012;2012:925135.
- 64) Andersen MH, Schrama D, Thor Straten P, et al. Cytotoxic T cells. *J Invest Dermatol.* 2006; 126(1): 32-41.
- 65) Zhang N, Bevan MJ. CD8(+) T cells: foot soldiers of the immune system. *Immunity.* 2011; 35(2): 161-168.
- 66) Corthay A. How do regulatory T cells work? *Scand J Immunol.* 2009; 70(4): 326-336.

- 67) Hori S. Developmental plasticity of Foxp3⁺ regulatory T cells. *Curr Opin Immunol.* 2010; 22(5): 575-582.
- 68) Ohkura N, Sakaguchi S. Regulatory T cells: roles of T cell receptor for their development and function. *Semin Immunopathol.* 2010; 32(2): 95-106.
- 69) Grant CR, Liberal R, Mieli-Vergani G, et al. Regulatory T-cells in autoimmune diseases: challenges, controversies and -yet- unanswered questions. *Autoimmun Rev.* 2015; 14(2): 105-116.
- 70) Allan SE, Broady R, Gregori S, et al. CD4⁺ T-regulatory cells: toward therapy for human diseases. *Immunol Rev.* 2008; 223: 391-421.
- 71) Mougiakakos D, Choudhury A, Lladser A, et al. Regulatory T cells in cancer. *Adv Cancer Res.* 2010; 107: 57-117.
- 72) Pieper K, Grimbacher B, Eibel H. B-cell biology and development. *J Allergy Clin Immunol.* 2013; 131(4): 959-971.
- 73) Cooper MD. The early history of B cells. *Nat Rev Immunol.* 2015; 15(3): 191-197.
- 74) Gitlin AD, Nussenzweig MC. Immunology: Fifty years of B lymphocytes. *Nature.* 2015; 517(7533): 139-141.
- 75) Caligiuri MA. Human natural killer cells. *Blood.* 2008; 112(3): 461-469.
- 76) Vivier E, Tomasello E, Baratin M, et al. Functions of natural killer cells. *Nat Immunol.* 2008; 9(5): 503-510.
- 77) Moldovan A. Photo-electric technique for the counting of microscopical cells. *Science* 1934: 188-189.
- 78) Coulter WH. Means for counting particles suspended in a fluid. U.S. patent #2,656,508. Application August 27, 1949. Patented October 20, 1953.
- 79) Kamensky, LA, Melamed, MR and Derman, H. Spectrophotometer: New Instrument for Ultrarapid Cell Analysis. *Science* 1965; 150: 630-631.
- 80) Fulwyler, MF. Electronic Separation of Biological Cells by Volume. *Science* 1965; 150: 910-911.

- 81) Weltman JK. The 1984 Nobel laureates in medicine (immunology): J. F. Kohler, C. Milstein, N. K. Jerne. *N Engl J Med*. 1985; 6(1): 84-5.
- 82) Marti GE, Stetler-Stevenson M, Bleesing JJ, et al. Introduction to flow cytometry. *Semin Hematol*. 2001; 38(2): 93-99.
- 83) Han Y, Gu Y, Zhang AC, et al. Review: imaging technologies for flow cytometry. *Lab Chip*. 2016; 16(24): 4639-4647.
- 84) Herzenberg LA, De Rosa SC. Monoclonal antibodies and the FACS: complementary tools for immunobiology and medicine. *Immunol Today*. 2000; 21(8): 383-390.
- 85) Du L, Grover A, Ramanan S, Litwin V. The evolution of guidelines for the validation of flow cytometric methods. *Int J Lab Hematol*. 2015; 37 Suppl 1: 3-10.
- 86) Betters DM. Use of flow cytometry in clinical practice. *J Adv Pract Oncol*. 2015; 6(5):435-440.
- 87) Virgo PF, Gibbs GJ. Flow cytometry in clinical pathology. *Ann Clin Biochem*. 2012; 49(Pt 1): 17-28.
- 88) Mortaz E, Gudarzi H, Tabarsi P, et al. Flow cytometry applications in the study of immunological lung disorders. *Iran J Allergy Asthma Immunol*. 2015; 14(1): 12-18.
- 89) Vartholomatos G, Alexiou GA, Batistatou A, et al. GV/GA Sarissa-Lancet: A proposed real-time flow cytometer for intraoperative identification of glioma margins. *Surg Innov*. 2016; 23(1): 104-105.
- 90) Vartholomatos G, Alexiou GA, Gerogianni P, et al. Is there a role for intraoperative flow cytometry in brain tumor surgery? *Cytometry B Clin Cytom*. 2015; 88(5): 289-290.
- 91) Grimwade LF, Fuller KA, Erber WN. Applications of imaging flow cytometry in the diagnostic assessment of acute leukaemia. *Methods*. 2016 Jul 6. pii: S1046-2023(16)30198-0. [Epub ahead of print].

- 92) Béné MC, Le Bris Y, Robillard N, et al. Flow cytometry in hematological nonmalignant disorders. *Int J Lab Hematol*. 2016; 38(1): 5-16.
- 93) Craig FE, Foon KA. Flow cytometric immunophenotyping for hematologic neoplasms. *Blood*. 2008; 111(8): 3941-3967.
- 94) Stetler–Stevenson M, Braylan RC. Flow cytometric analysis of lymphomas and lymphoproliferative disorders. *Semin Hematol*. 2001, Apr; 38(2): 111-23.
- 95) Fleisher TA, Madkaikar M, Rosenzweig SD. Application of flow cytometry in the evaluation of primary immunodeficiencies. *Indian J Pediatr*. 2016; 83(5): 444-449.
- 96) Maguire O, Tario JD Jr, Shanahan TC, et al. Flow cytometry and solid organ transplantation: a perfect match. *Immunol Invest*. 2014; 43(8): 756-774.
- 97) Angele MK, Faist E. Clinical review: immunodepression in the surgical patient and increased susceptibility to infection. *Crit Care*. 2002; 6(4): 298-305.
- 98) Smith JW, Gamelli RL, Jones SB, et al. Immunologic responses to critical injury and sepsis. *J Intensive Care Med*. 2006; 21(3): 160-172.
- 99) Franke A, Lante W, Kurig E, et al. Hyporesponsiveness of T cell subsets after cardiac surgery: a product of altered cell function or merely a result of absolute cell count changes in peripheral blood? *Eur J Cardiothorac Surg*. 2006; 30(1): 64-71.
- 100) Ayala A, Ertel W, Chaudry IH. Trauma-induced suppression of antigen presentation and expression of major histocompatibility class II antigen complex in leukocytes. *Shock*. 1996; 5(2): 79-90.
- 101) Walsh DS, Thavichaigarn P, Pattanapanyasat K, et al. Characterization of circulating monocytes expressing HLA-DR or CD71 and related soluble factors for 2 weeks after severe, non-thermal injury. *J Surg Res*. 2005; 129(2): 221-230.
- 102) Bartal I, Melamed R, Greenfeld K, et al. Immune perturbations in patients along the perioperative period: alterations in cell surface markers and leukocyte subtypes before and after surgery. *Brain Behav Immun*. 2010; 24(3): 376-386.

- 103) Anderson JM, Rodriguez A, Chang DT. Foreign body reaction to biomaterials. *Semin Immunol.* 2008; 20(2): 86-100.
- 104) Anderson JM. Biological responses to materials. *Annu Rev Mater Res.* 2001; 31: 81-110.
- 105) Gretzer C, Emanuelsson L, Liljensten E, et al. The inflammatory cell influx and cytokines changes during transition from acute inflammation to fibrous repair around implanted materials. *J Biomater Sci Polym Ed.* 2006; 17(6): 669-687.
- 106) Luttikhuisen DT, Harmsen MC, Van Luyn MJ. Cellular and molecular dynamics in the foreign body reaction. *Tissue Eng.* 2006; 12(7):1955-1970.
- 107) Henson PM. The immunologic release of constituents from neutrophil leukocytes. I. The role of antibody and complement on nonphagocytosable surfaces or phagocytosable particles. *J Immunol.* 1971; 107(6): 1535-1546.
- 108) Henson PM. The immunologic release of constituents from neutrophil leukocytes. II. The role of antibody and complement on nonphagocytosable surfaces or phagocytosable particles. *J Immunol.* 1971; 107(6): 1547-1557.
- 109) Kao WJ, Zhao QH, Hiltner A, et al. Theoretical analysis of in vivo macrophage adhesion and foreign body giant cell formation on polydimethylsiloxane, low density polyethylene, and polyetherurethanes. *J Biomed Mater Res.* 1994; 28(1): 73-79.
- 110) Christenson EM, Anderson JM, Hiltner A. Oxidative mechanisms of poly(carbonate urethane) and poly(ether urethane) biodegradation: in vivo and in vitro correlations. *J Biomed Mater Res A.* 2004; 70(2): 245-255.
- 111) Labow RS, Meek E, Santerre JP. Hydrolytic degradation of poly(carbonate)-urethanes by monocyte-derived macrophages. *Biomaterials.* 2001; 22(22) :3025-3033.
- 112) Brodbeck WG, Shive MS, Colton E, et al. Influence of biomaterial surface chemistry on the apoptosis of adherent cells. *J Biomed Mater Res.* 2001; 55(4): 661-668.
- 113) Yoshida SH, Chang CC, Teuber SS, et al. Silicon and silicone: theoretical and clinical implications of breast implants. *Regul Toxicol Pharmacol.* 1993; 17(1): 3-18.

- 114) Digby JM. Malignant lymphoma with intranodal silicone rubber particles following metacarpophalangeal joint replacements. *Hand*. 1982; 14(3): 326-328.
- 115) Endo LP, Edwards NL, Longley S, et al. Silicone and rheumatic diseases. *Semin Arthritis Rheum*. 1987; 17(2): 112-118.
- 116) Gordon M, Bullough PG. Synovial and osseous inflammation in failed silicone-rubber prostheses. *J Bone Joint Surg Am*. 1982; 64(4): 574-580.
- 117) Rogers LA, Longtine JA, Garnick MB, Pinkus GS. Silicone lymphadenopathy in a long distance runner: complication of a silastic prosthesis. *Hum Pathol*. 1988; 19(10): 1237-1239.
- 118) Prantl L, Pöppel N, Horvat N, et al. Serologic and histologic findings in patients with capsular contracture after breast augmentation with smooth silicone gel implants: is serum hyaluronan a potential predictor? *Aesthetic Plast Surg*. 2005; 29(6): 510-518.
- 119) Wolfram D, Rainer C, Niederegger H, et al. Cellular and molecular composition of fibrous capsules formed around silicone breast implants with special focus on local immune reactions. *J Autoimmun*. 2004; 23(1): 81-91.
- 120) Baker JL Jr, LeVier RR, Spielvogel DE. Positive identification of silicone in human mammary capsular tissue. *Plast Reconstr Surg*. 1982; 69(1): 56-60.
- 121) Hardt NS, Yu LT, La Torre G, et al. Fourier transform infrared microspectroscopy used to identify foreign materials related to breast implants. *Mod Pathol*. 1994; 7(6): 669-676.
- 122) Rudolph RJ, Abraham T, Vecchione S, et al. Myofibroblasts and free silicon around breast implants. *Plast Reconstr Surg*. 1978; 62: 185-196.
- 123) Thomsen JL, Christensen L, Nielsen M, et al. Histologic changes and silicone concentrations in human breast tissue surrounding silicone breast prostheses. *Plast Reconstr Surg*. 1990; 85(1): 38-41.
- 124) Ojo-Amaize EA, Conte V, Lin HC, et al. Silicone-specific blood lymphocyte response in women with silicone breast implants. *Clin Diagn Lab Immunol*. 1994; 1(6): 689-695.
- 125) Ojo-Amaize EA, Lawless OJ, Peter JB. Elevated concentrations of interleukin-1 beta and interleukin-1 receptor antagonist in plasma of women with silicone breast implants. *Clin Diagn Lab Immunol*. 1996; 3(3): 257-259.

- 126) Iannello S, Belfiore F. Silicone breast prosthesis and rheumatoid arthritis: a new systemic disease: siliconosis. A case report and a critical review of the literature. *Minerva Med.* 1998; 89(4): 117-130.
- 127) Press RI, Peebles CL, Kumagai Y, et al. Antinuclear autoantibodies in women with silicone breast implants. *Lancet.* 1992; 340(8831): 1304-1307.
- 128) De Jong WH, Goldhoorn CA, Kallewaard M, et al. Study to determine the presence of antipolymer antibodies in a group of Dutch women with a silicone breast implant. *Clin Exp Rheumatol.* 2002; 20(2): 151-160.
- 129) Teuber SS, Rowley MJ, Yoshida SH, et al. Anti-collagen autoantibodies are found in women with silicone breast implants. *J Autoimmun.* 1993; 6(3): 367-377.
- 130) Karlson EW, Hankinson SE, Liang MH, et al. Association of silicone breast implants with immunologic abnormalities: a prospective study. *Am J Med.* 1999; 106(1): 11-19.
- 131) Kossovsky N, Zeidler M, Chun G, et al. Surface dependent antigens identified by high binding avidity of serum antibodies in a subpopulation of patients with breast prostheses. *J Appl Biomater.* 1993; 4: 281-288.
- 132) Wolf LE, Lappé M, Peterson RD, et al. Human immune response to polydimethylsiloxane (silicone): screening studies in a breast implant population. *FASEB J.* 1993; 7(13): 1265-1268.
- 133) Vojdani A, Brautbar N, Campbell AW. Antibody to silicone and native macromolecules in women with silicone breast implants. *Immunopharmacol Immunotoxicol.* 1994; 16(4): 497-523.
- 134) Evans GR, Slezak S, Rieters M, et al. Silicon tissue assays in nonaugmented cadaveric patients: is there a baseline level? *Plast Reconstr Surg.* 1994; 93(6): 1117-1122.
- 135) Bekerecioglu M, Onat AM, Tercan M, et al. The association between silicone implants and both antibodies and autoimmune diseases. *Clin Rheumatol.* 2008; 27(2): 147-150.
- 136) Tavazzani F, Xing S, Waddell JE, et al. In vitro interaction between silicone gel and human monocyte-macrophages. *J Biomed Mater Res A.* 2005; 72(2): 161-167.
- 137) Brodbeck WG, Macewan M, Colton E, et al. Lymphocytes and the foreign body response: lymphocyte enhancement of macrophage adhesion and fusion. *J Biomed Mater Res A.* 2005; 74(2): 222-229.

- 138) MacEwan MR, Brodbeck WG, Matsuda T, et al. Student Research Award in the Undergraduate Degree Candidate category, 30th Annual Meeting of the Society for Biomaterials, Memphis, Tennessee, April 27-30, 2005. Monocyte/lymphocyte interactions and the foreign body response: in vitro effects of biomaterial surface chemistry. *J Biomed Mater Res A*. 2005; 74(3): 285-293.
- 139) Martens A, Eppink GJ, Woittiez AJ, et al. Neutrophil function capacity to express CD10 is decreased in patients with septic shock. *Crit Care Med*. 1999; 27(3): 549-553.
- 140) Kaneko T, Stearns-Kurosawa DJ, Taylor F Jr, et al. Reduced neutrophil CD10 expression in nonhuman primates and humans after in vivo challenge with *E. coli* or lipopolysaccharide. *Shock*. 2003; 20(2): 130-137.
- 141) Raso DS. Breast prostheses, the immune response, and B- and T-lymphocytes. *Plast Reconstr Surg*. 1994; 93: 649-650.
- 142) Rowlands C, Green FHY. Tissue responses to silicone breast implants. *Mod. Pathol*. 1994; 7: 21A.
- 143) Smalley DL, Shanklin DR, Hall MF, et al. Immunologic stimulation of T lymphocytes by silica after use of silicone mammary implants. *FASEB J*. 1995; 9(5): 424-427.
- 144) Vojdani A, Campbell A, Brautbar N. Immune functional impairment in patients with clinical abnormalities and silicone breast implants. *Toxicol Ind Health*. 1992; 8(6): 415-429.
- 145) Prantl L, Fichtner-Feigl S, Hofstaedter F, et al. Flow cytometric analysis of peripheral blood lymphocyte subsets in patients with silicone breast implants. *Plast Reconstr Surg*. 2008; 121(1): 25-30.
- 146) Katzin WE, Feng LJ, Abbuhl M, et al. Phenotype of lymphocytes associated with the inflammatory reaction to silicone gel breast implants. *Clin Diagn Lab Immunol*. 1996; 3(2): 156-161.
- 147) Mottet C, Golshayan D. CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells: from basic research to potential therapeutic use. *Swiss Med Wkly*. 2007; 137(45-46): 625-634.
- 148) Baecher-Allan C, Brown JA, Freeman GJ, et al. CD4+CD25high regulatory cells in human peripheral blood. *J Immunol*. 2001; 167(3): 1245-1253.
- 149) Wolfram D, Rabensteiner E, Grundtman C, et al. T regulatory cells and TH17 cells in peri-silicone implant capsular fibrosis. *Plast Reconstr Surg*. 2012; 129(2): 327e-337e.

- 150) Cheadle WG. The human leukocyte antigens and their relationship to infection. *Am J Surg.* 1993; 165(2A Suppl): 75S-81S.
- 151) Haveman JW, Muller Kobold AC, Tervaert JW, et al. The central role of monocytes in the pathogenesis of sepsis: consequences for immunomonitoring and treatment. *Neth J Med.* 1999; 55(3): 132-141.
- 152) Yang HM, Yu Y, Chai JK, et al. Low HLA-DR expression on CD14+ monocytes of burn victims with sepsis, and the effect of carbachol in vitro. *Burns.* 2008; 34(8): 1158-1162.
- 153) Berres ML, Schnyder B, Yagmur E, et al. Longitudinal monocyte human leukocyte antigen-DR expression is a prognostic marker in critically ill patients with decompensated liver cirrhosis. *Liver Int.* 2009; 29(4): 536-543.
- 154) Zhang DP, Yan FL, Xu HQ, et al. A decrease of human leucocyte antigen-DR expression on monocytes in peripheral blood predicts stroke-associated infection in critically-ill patients with acute stroke. *Eur J Neurol.* 2009; 16(4): 498-505.
- 155) O'Hanlon T, Koneru B, Bayat E, et al. Immunogenetic differences between Caucasian women with and those without silicone implants in whom myositis develops. *Arthritis Rheum.* 2004; 50(11): 3646-3650.
- 156) Young VL, Nemecek JR, Schwartz BD, et al. HLA typing in women with and without silicone gel-filled breast implants. *Curr Top Microbiol Immunol.* 1996; 210: 209-225.
- 157) Granchi D, Cavedagna D, Ciapetti G, et al. Silicone breast implants: the role of immune system on capsular contracture formation. *J Biomed Mater Res.* 1995; 29(2): 197-202.
- 158) Prantl L, Schreml S, Fichtner-Feigl S, et al. Clinical and morphological conditions in capsular contracture formed around silicone breast implants. *Plast Reconstr Surg.* 2007; 120(1): 275-284.
- 159) Siggelkow W, Faridi A, Spiritus K, et al. Histological analysis of silicone breast implant capsules and correlation with capsular contracture. *Biomaterials.* 2003; 24(6): 1101-1109.
- 160) Kamel M, Protzner K, Fornasier V, et al. The peri-implant breast capsule: an immunophenotypic study of capsules taken at explantation surgery. *J Biomed Mater Res.* 2001; 58(1): 88-96.
- 161) May JW Jr, Bucky LP, Sohoni S, et al. Smooth versus textured expander implants: a double-blind study of capsule quality and discomfort in simultaneous bilateral breast reconstruction patients. *Ann Plast Surg.* 1994; 32(3): 225-232; discussion 232-233.

- 162) Berry MG, Cucchiara V, Davies DM. Breast augmentation: Part II--Adverse capsular contracture. *J Plast Reconstr Aesthet Surg.* 2010; 63(12): 2098-2107.
- 163) Schreml S, Heine N, Eisenmann-Klein M, et al. Bacterial colonization is of major relevance for high-grade capsular contracture after augmentation mammoplasty. *Ann Plast Surg.* 2007; 59(2): 126-130.
- 164) Barnsley GP, Sigurdson LJ, Barnsley SE. Textured surface breast implants in the prevention of capsular contracture among breast augmentation patients: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Plast Reconstr Surg.* 2006; 117(7): 2182-2190.
- 165) Dancey A, Nassimizadeh A, Levick P. Capsular contracture - What are the risk factors? A 14 year series of 1400 consecutive augmentations. *J Plast Reconstr Aesthet Surg.* 2012; 65(2): 213-218.
- 166) Schaub TA, Ahmad J, Rohrich RJ. Capsular contracture with breast implants in the cosmetic patient: saline versus silicone--a systematic review of the literature. *Plast Reconstr Surg.* 2010; 126(6): 2140-2149.
- 167) Gidengil CA, Predmore Z, Mattke S, et al. Breast implant-associated anaplastic large cell lymphoma: a systematic review. *Plast Reconstr Surg.* 2015; 135(3): 713-720.
- 168) Hwang MJ, Brown H, Murrin R, et al. Breast implant-associated anaplastic large cell lymphoma: a case report and literature review. *Aesthetic Plast Surg.* 2015; 39(3): 391-395.
- 169) Ramos-Gallardo G, Cuenca-Pardo J, Rodríguez-Olivares E, et al. Breast Implant and Anaplastic Large Cell Lymphoma Meta-Analysis. *J Invest Surg.* 2016; 18: 1-10.
- 170) Santanelli di Pompeo F, Laporta R, et al. Breast Implant-Associated Anaplastic Large Cell Lymphoma: Proposal for a Monitoring Protocol. *Plast Reconstr Surg.* 2015; 136(2): 144e-151e.
- 171) Wu D, Allen CT, Fromm JR. Flow cytometry of ALK-negative anaplastic large cell lymphoma of breast implant-associated effusion and capsular tissue. *Cytometry B Clin Cytom.* 2015; 88(1): 58-63.