



**ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ
Β' ΠΡΟΠΑΙΔΕΥΤΙΚΗ ΧΕΙΡΟΥΡΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ**

**ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΗΣ ΧΡΟΝΙΑΣ ΛΕΜΦΟΓΕΝΟΥΣ
ΛΕΥΧΑΙΜΙΑΣ ΜΕ ΜΕΘΟΔΟΥΣ ΚΛΑΣΣΙΚΗΣ ΚΑΙ
ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΚΥΤΤΑΡΟΓΕΝΕΤΙΚΗΣ**

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

**ΚΑΡΑΚΩΣΤΑ ΜΑΡΙΑ
ΒΙΟΛΟΓΟΣ**

ΑΘΗΝΑ 2014

ΙΣΤΟΡΙΚΟ ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ

Η αίτηση εκπόνησης της Διδακτορικής Διατριβής έλαβε χώρα στη γραμματεία των Διδακτορικών Διατριβών του τμήματος της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Αθηνών στις 29-10-2008. Ο ορισμός της Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής πραγματοποιήθηκε στις 03-06-2009 (Αρ. Πρωτ. 9728) και συγκροτήθηκε με απόφαση της Γ.Σ.Ε.Σ. (9728/ 29-04-2004) της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Αθηνών ως εξής:

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή

Επιβλέπων:

Γρηγόριος. Κουράκλης, Καθηγητής και Διευθυντής της Β' Προπαιδευτικής Χειρουργικής Κλινικής της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Αθηνών.

Μέλη:

- 1) **Αλικιβιάδης Κωστάκης**, Ομότιμος Καθηγητής Χειρουργικής και Μεταμοσχεύσεων της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Αθηνών.
- 2) **Καλλιόπη Μανωλά**, Βιολόγος-Κυτταρογενετίστρια, Ερευνήτρια Β' βαθμίδας του εργαστηρίου Υγειοφυσικής, Ραδιοβιολογίας και Κυτταρογενετικής του Εθνικού Κέντρου Έρευνας Φυσικών Επιστημών (ΕΚΕΦΕ) «ΔΗΜΟΚΡΙΤΟΣ».

Το θέμα της Διατριβής καθορίστηκε και εγκρίθηκε από τη Γ.Σ.Ε.Σ. της Ιατρικής Σχολής στη συνεδρίαση της στις 03-11-2009 και έχει ως εξής: *«Διερεύνηση της Χρόνιας Λεμφογενούς Λευχαιμίας με μεθόδους Κλασσικής και Μοριακής κυτταρογενετικής»*. Το πρόγραμμα κατάθεσης εκθέσεων προόδου της Διατριβής τηρήθηκε σύμφωνα με τον ισχύοντα Εσωτερικό Κανονισμό Εκπόνησης Διδακτορικών Διατριβών της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Αθηνών (άρθρο 9 του Ν 3685/08) ως εξής:

Ημερομηνία κατάθεσης 1^{ης} Εκθέσεως Προόδου: 24/10/10

Ημερομηνία κατάθεσης 2^{ης} Εκθέσεως Προόδου: 02/11/11

Ημερομηνία κατάθεσης 3^{ης} Εκθέσεως Προόδου: 14/12/12

Ο ορισμός της Επταμελούς Εξεταστικής Επιτροπής έλαβε χώρα στις 03-06-2014 (Αρ. Πρωτ. 6518) και συγκροτήθηκε με απόφαση της Γ.Σ.Ε.Σ. της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Αθηνών ως εξής:

Επταμελής Εξεταστική Επιτροπή

Γρηγόριος. Κουράκλης, Καθηγητής και Διευθυντής της Β' Προπαιδευτικής Χειρουργικής Κλινικής, Ιατρική Σχολή, ΕΚΠΑ (επιβλέπων)

Αλικιβιάδης Κωστάκης, Ομότιμος Καθηγητής Χειρουργικής και Μεταμοσχεύσεων, Ιατρική Σχολή, ΕΚΠΑ.

Καλλιόπη Μανωλά, Βιολόγος-Κυτταρογενετίστρια, Ερευνήτρια Β' βαθμίδας, Εργαστήριο Υγειοφυσικής, Ραδιοβιολογίας και Κυτταρογενετικής ΕΚΕΦΕ «ΔΗΜΟΚΡΙΤΟΣ».

Κωνσταντόπουλος Κωνσταντίνος, Καθηγητής Παθολογίας – Αιματολογίας, Διευθυντής Αιματολογικής Κλινικής, Ιατρική Σχολή, ΕΚΠΑ.

Βουλγαρέλης Μιχάλης, Αν. Καθηγητής Παθολογικής Φυσιολογίας – Αιματολογίας, Ιατρική Σχολή, ΕΚΠΑ.

Βόνιου Νόρα, Επίκουρη Καθηγήτρια Αιματολογίας, Α' Παθολογική Κλινική, Ιατρική Σχολή, ΕΚΠΑ

Βασιλακόπουλος Θεόδωρος, Επίκουρος Καθηγητής Αιματολογίας, Αιματολογική Κλινική, Ιατρική Σχολή, ΕΚΠΑ

Ο ΟΡΚΟΣ ΤΟΥ ΙΠΠΟΚΡΑΤΟΥΣ

ΟΡΚΙΖΟΜΑΙ ΕΤΟΙΜ ΑΠΟΛΛΩΝΑ ΤΟΝ ΙΑΤΡΟ ΚΑΙ ΕΤΟΙΜ ΑΣΚΛΗΠΙΟ ΚΑΙ ΕΤΗΝ ΥΓΕΙΑ ΚΑΙ ΕΤΗΝ ΠΑΝΑΚΕΙΑ ΚΑΙ Ε' ΟΛΟΥΣ ΤΟΥΣ ΘΕΟΥΣ ΕΠΙΚΑΛΟΥΜΕΝΟΥΣ ΤΗΝ ΜΑΡΤΥΡΙΑ ΤΟΥΣ, ΝΑ ΤΗΡΗΣΩ ΠΙΣΤΑ ΚΑΤΑ ΤΗ ΔΥΝΑΜΗ ΚΑΙ ΤΗΝ ΚΡΙΣΗ ΜΟΥ ΑΥΤΟ ΤΟΝ ΟΡΚΟ ΚΑΙ ΤΟ ΣΥΜΒΟΛΑΙΟ ΜΟΥ ΑΥΤΟ. ΝΑ ΘΕΩΡΩ ΑΥΤΟΝ ΠΟΥ ΜΟΥ ΔΙΔΑΣΕ ΑΥΤΗ ΤΗΝ ΤΕΧΝΗ ΙΣΟ ΜΕ ΤΟΥΣ ΓΟΝΕΙΣ ΜΟΥ ΚΑΙ ΝΑ ΜΟΙΡΑΕΤΩ ΜΑΖ ΤΟΥ ΤΑ ΥΠΑΡΧΟΝΤΑ ΜΟΥ ΚΑΙ ΤΑ ΧΗΜΑΤΑ ΜΟΥ ΑΝ ΕΧΕΙ ΑΝΑΡΧΗ ΦΡΟΝΤΙΔΑΣ. ΝΑ ΘΕΩΡΩ ΤΟΥΣ ΑΠΟΓΟΝΟΥΣ ΤΟΥΣ ΙΣΟΥΣ ΜΕ Τ' ΑΔΕΛΦΙΑ ΜΟΥ ΚΑΙ ΝΑ ΤΟΥΣ ΔΙΔΑΣΩ ΤΗΝ ΤΕΧΝΗ ΑΥΤΗ ΑΝ ΘΕΛΟΥΝ ΝΑ ΤΗ ΜΑΘΟΥΝ, ΧΩΡΙΣ ΑΜΟΙΒΗ ΚΑΙ ΣΥΜΒΟΛΑΙΟ ΚΑΙ ΝΑ ΜΕΤΑΔΩΣΩ ΜΕ ΓΑΡΑΓΓΕΛΙΚΕΣ, ΟΔΗΓΙΚΕΣ ΚΑΙ ΣΥΜΒΟΥΛΑΣ ΟΛΗ ΤΗΝ ΥΠΟΛΟΙΠΗ ΓΝΩΣΗ ΜΟΥ ΚΑΙ ΕΤΑ ΠΑΙΔΙΑ ΜΟΥ ΚΑΙ ΕΤΑ ΠΑΙΔΙΑ ΕΚΕΙΝΟΥ ΠΟΥ ΜΕ ΔΙΔΑΣΕ ΚΑΙ ΕΤΟΥΣ ΑΛΛΟΥΣ ΜΑΘΗΤΕΣ ΠΟΥ ΕΧΟΥΝ ΚΑΝΕΙ ΤΡΑΠΗΤΗ ΣΥΜΦΩΝΙΑ ΜΑΖΙ ΜΟΥ ΚΑΙ Ε' ΑΥΤΟΥΣ ΠΟΥ ΕΧΟΥΝ ΟΡΚΙΣΘΕΙ ΕΤΟΙΜ ΙΑΤΡΙΚΟ ΝΟΜΟ ΚΑΙ ΕΕ ΚΑΝΕΝΑΝ ΑΛΛΟ ΚΑΙ ΝΑ ΘΕΡΑΠΕΥΩ ΤΟΥΣ ΠΑΣΧΟΝΤΕΣ ΚΑΤΑ ΤΗ ΔΥΝΑΜΗ ΜΟΥ ΚΑΙ ΤΗΝ ΚΡΙΣΗ ΜΟΥ ΧΩΡΙΣ ΤΟΤΕ, ΕΚΟΥΣΙΩΣ, ΝΑ ΤΟΥΣ ΒΛΑΨΩ Ή ΝΑ ΤΟΥΣ ΑΔΙΚΗΣΩ. ΚΑΙ ΝΑ ΜΗ ΔΩΣΩ ΠΟΤΕ ΕΕ ΚΑΝΕΝΑ, ΕΣΤΩ ΚΙ ΑΝ ΜΟΥ ΤΟ ΖΗΤΗΣΕΙ, ΘΑΝΑΤΗΦΟΡΟ ΦΑΡΜΑΚΟ, ΟΥΤΕ ΝΑ ΔΩΣΩ ΠΟΤΕ ΤΕΤΟΙΑ ΣΥΜΒΟΥΛΗ. ΟΜΟΙΩΣ, ΝΑ ΜΗ ΔΩΣΩ ΠΟΤΕ ΕΕ ΓΥΝΑΙΚΑ ΦΑΡΜΑΚΟ ΓΙΑ Ν' ΑΠΟΒΑΛΕΙ. ΝΑ ΔΙΑΤΗΡΗΣΩ ΔΕ ΤΗ ΖΩΗ ΜΟΥ ΚΑΙ ΤΗΝ ΤΕΧΝΗ ΜΟΥ ΚΑΘΑΡΗ ΚΑΙ ΔΙΓΜΗ. ΚΑΙ ΝΑ ΜΗ ΧΕΙΡΟΥΡΓΗΣΩ ΠΑΣΧΟΝΤΕΣ ΑΠΟ ΛΙΘΟΥΣ ΑΛΛΑ Ν' ΑΦΗΣΩ ΤΗΝ ΠΡΑΞΗ ΑΥΤΗ ΓΙΑ ΤΟΥΣ ΕΔΙΚΟΥΣ. ΚΑΙ Ε' ΟΠΟΙΑ ΣΠΙΤΙΑ ΚΙ ΑΝ ΜΠΩ, ΝΑ ΜΠΩ ΓΙΑ ΤΗΝ ΩΦΕΛΕΙΑ ΤΩΝ ΠΑΣΧΟΝΤΩΝ ΑΠΟΦΕΥΓΟΝΤΑΣ ΚΑΘΕ ΕΚΟΥΣΙΑ ΑΔΙΚΙΑ ΚΑ ΒΛΑΒΗ ΚΑΙ ΚΑΘΕ ΓΕΝΕΤΗΣΙΑ ΠΡΑΞΗ ΚΑΙ ΜΕ ΓΥΝΑΙΚΕΣ ΚΑΙ ΜΕ ΑΝΔΡΕΣ, ΕΛΕΥΘΕΡΟΥΣ ΚΑΙ ΔΟΥΛΟΥΣ. ΚΑΙ ΟΤΙ ΔΩ Ή ΑΚΟΥΣΩ ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΔΕΚΗΝ ΤΟΥ ΕΠΑΓΓΕΛΜΑΤΟΣ ΜΟΥ, Ή ΚΙ' ΕΚΤΟΣ, ΓΙΑ ΤΗ ΖΩΗ ΤΩΝ ΑΝΘΡΩΠΩΝ, ΠΟΥ ΔΕΝ ΠΡΕΠΕΙ ΠΟΤΕ ΝΑ ΚΟΙΝΟΠΟΙΗΘΕΙ, ΝΑ ΣΙΩΠΗΣΩ ΚΑΙ ΝΑ ΤΟ ΤΗΡΗΣΩ ΜΥΣΤΙΚΟ. ΑΝ ΤΟΝ ΟΡΚΟ ΜΟΥ ΑΥΤΟ ΤΗΡΗΣΩ ΠΙΣΤΑ ΚΑΙ ΔΕΝ ΤΟΝ ΑΦΕΤΗΣΩ, ΕΙΘΕ Ν' ΑΠΟΛΑΨΩ ΓΙΑ ΠΑΝΤΑ ΤΗΝ ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΟΛΩΝ ΤΩΝ ΑΝΘΡΩΠΩΝ ΓΙΑ ΤΗ ΖΩΗ ΜΟΥ ΚΑΙ ΓΙΑ ΤΗΝ ΤΕΧΝΗ ΜΟΥ, ΑΝ ΟΜΩΣ ΠΑΡΑΒΩ ΚΑΙ ΑΦΕΤΗΣΩ ΤΟΝ ΟΡΚΟ ΜΟΥ ΝΑ ΥΠΟΣΤΩΤΑ ΑΝΤΙΘΕΤΑ ΑΠΟ ΑΥΤΑ.

*Στους πολυαγαπημένους μου γονείς, Βασίλη και Κωνσταντίνα
Στον αδερφό μου Ευάγγελο
Στον συμπαραστάτη μου Γιάννη*



CINDERELLA

Chronic lymphocytic leukemia (CLL), long considered the "Cinderella" of blood cancers, is receiving increasing attention from biologists and clinicians

(Caligaris-Cappio F., 2009)

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα Διδακτορική Διατριβή εκπονήθηκε τα ακαδημαϊκά έτη 2008-2013 στο τμήμα Ιατρικής του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών με επιβλέποντα τον Καθηγητή της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Αθηνών Γ. Κουράκλη και σε συνεργασία με το Εργαστήριο Υγειοφυσικής Ραδιοβιολογίας και Κυτταρογενετικής του Ινστιτούτου ΙΠΡΕΤΕΑ του Εθνικού Κέντρου Έρευνας Φυσικών Επιστημών (Ε.Κ.Ε.Φ.Ε.) «ΔΗΜΟΚΡΙΤΟΣ» με επιστημονική υπεύθυνη την Δρ. Καλλιόπη Μανωλά, Ερευνήτρια Β΄ βαθμίδας. Η εκπόνηση της παρούσας διατριβής υποστηρίχθηκε με τετραετή υποτροφία από το Ε.Κ.Ε.Φ.Ε. «Δημόκριτος».

Θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους τους δασκάλους, συνεργάτες και φίλους που με υποστήριξαν και με βοήθησαν στην εκπόνηση της παρούσας διατριβής.

Πρώτους από όλους, ευχαριστώ θερμά τον **Καθηγητή κ. Γρηγόριο Κουράκλη** για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε στην ανάθεση της παρούσας Διδακτορικής Διατριβής. Τον ευχαριστώ ιδιαίτερα για τις χρήσιμες συμβουλές του, την επιστημονική του καθοδήγηση, τις εύστοχες υποδείξεις του και την πολύτιμη υποστήριξή του καθ' όλη τη διάρκεια αυτού του κύκλου σπουδών. Όλα τα παραπάνω συνέβαλαν ουσιαστικά στην επιτυχή έκβαση της παρούσας διατριβής.

Επίσης ευχαριστώ θερμά τη **Δρ. Καλλιόπη Μανωλά** για την ουσιαστική καθοδήγηση της διατριβής αυτής και για την επιστημονική της εμπειρία που μοιράστηκε απλόχερα μαζί μου. Το καθημερινό της ενδιαφέρον και η άψογη συνεργασία κατά τη διεξαγωγή των πειραμάτων ήταν ανεκτίμητη. Επίσης την ευχαριστώ θερμά για την προθυμία της και την άμεση ανταπόκρισή της να ασχοληθεί με καθημερινά προκύπτοντα ζητήματα αλλά και για την ηθική της συμπαράσταση.

Θερμές ευχαριστίες απευθύνω στον **Καθηγητή κ. Αλικιβιάδη Κωστάκη**, μέλος της τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής, για την υποστήριξη και την εμπιστοσύνη που έδειξε απέναντι στις προσπάθειές μου κατά τη διάρκεια της εκπόνησης αυτής της διατριβής καθώς και για τις χρήσιμες συμβουλές του.

Τις θερμές μου ευχαριστίες επιθυμώ να απευθύνω επίσης στους δασκάλους και συνεργάτες του Εργαστηρίου Υγειοφυσικής & Περιβαλλοντικής Υγείας στο ΕΚΕΦΕ «Δημόκριτος».

Ευχαριστώ θερμά τον **Δρ. Γαβριήλ. Παντελιά**, Ερευνητή Α' και Διευθυντή του Εργαστηρίου Υγειοφυσικής Ραδιοβιολογίας και Κυτταρογενετικής του ΕΚΕΦΕ «Δημόκριτος», ο οποίος αποτέλεσε για εμένα παράδειγμα επιστήμονα οξύνοντας το επιστημονικό μου ενδιαφέρον και διδάσκοντας μου αρετές όπως επιμονή και υπομονή για το πειραματικό αποτέλεσμα. Τον ευχαριστώ επίσης θερμά για την ευκαιρία μου δόθηκε να συμμετάσχω σε εθνικά και διεθνή επιστημονικά συνέδρια καθώς και σε ερευνητικά προγράμματα.

Θέλω επίσης να ευχαριστήσω ιδιαίτερα τη **Δρ. Γεωργία Τερζούδη**, Ερευνήτρια Β' του ΕΚΕΦΕ «Δημόκριτος». Το αμέριστο ενδιαφέρον και η συμπαράστασή της κυρίως κατά τη διάρκεια συγγραφής της παρούσας διατριβής με βοήθησαν να ολοκληρώσω επιτυχώς και το τελευταίο αλλά ιδιαίτερα σημαντικό στάδιο της διατριβής.

Θερμές ευχαριστίες επίσης απευθύνω στη **Δρ. Κωνσταντίνα Σαμπάνη**, Ερευνήτρια Α' του ΕΚΕΦΕ «Δημόκριτος», για την πολύτιμη βοήθειά της όποτε τη χρειάστηκα και τη φιλική της παρουσία.

Ευχαριστώ θερμά την **Δρ. Βασιλική Χατζή**, Συνεργαζόμενη Ερευνήτρια του ΕΚΕΦΕ «Δημόκριτος» για την αμέριστη ηθική της συμπαράσταση, την έμπρακτη υποστήριξή της και τις πολύτιμες φιλικές συμβουλές της κατά το δύσκολο στάδιο της συγγραφής της παρούσας διατριβής.

Θεωρώ επίσης ότι χρωστώ ευχαριστίες και σε όλο το προσωπικό του Εργαστηρίου Υγειοφυσικής Ραδιοβιολογίας και Κυτταρογενετικής του ΕΚΕΦΕ «Δημόκριτος», στους πολύτιμους συναδέλφους (υποψήφιους) διδάκτορες Βασίλη Γεωργακάκο, Σοφία Ζαχάκη, Αγγελική Δαράκη και Κατερίνα Κακοσαίου, τους παρασκευαστές Κωνσταντίνα Παναγιωτοπούλου, Παναγιώτη Νακόπουλο, Δόμνα Παντελιά και Μαριάννα Μαργαρίτη, τους τεχνικούς Μαρίνα Καλομοιράκη και Βιβή Διαμαντοπούλου, τη γραμματέα Ιωάννα Τσαλικίδη καθώς και τους δότες του πειραματικού υλικού οι οποίοι συνέβαλαν ουσιαστικά στη διατριβή αυτή.

Ευχαριστώ ιδιαίτερα τον **Καθηγητή κ. Ιωάννη Ρόμπο** αλλά και τη **Δρ. Βασιλική Καλότυχου**, για την άψογη συνεργασία και ζεστή φιλοξενία που μου πρόσφεραν στο Ερευνητικό Εργαστήριο της Α' Παθολογικής Κλινικής του ΕΚΠΑ όπου πραγματοποιήθηκαν οι τεχνικές της Μοριακής Βιολογίας.

Η Δρ. Βασιλική Καλότυχου αποτελεί τον επιστημονικό μου μέντορα από τα πρώτα βήματα της εργαστηριακής μου δραστηριότητας και την ευχαριστώ ιδιαίτερα

για την επιστημονική της εμπειρία και γνώση που απλόχερα μου έχει προσφέρει. Το αμέριστο ενδιαφέρον της, η άψογη συνεργασία, η πολύτιμη βοήθειά της είναι ανεκτίμητα. Η έμπρακτη συμπαράστασή της και η φιλική συμβουλή της με βοήθησαν να αντιμετωπίσω επιτυχώς όσες δυσκολίες παρουσιάστηκαν. Η Δρ. Βασιλική Καλότυχου με τη φιλία της και το ήθος της αποτελεί για μένα ένα πρότυπο επιστήμονα και συνεργάτη.

Τέλος ευχαριστώ από καρδιάς την πολυαγαπημένη μου οικογένεια και τους φίλους μου για την αμέριστη συμπαράστασή τους, την κατανόηση και την υποστήριξη που απλόχερα μου πρόσφεραν.

Μαρία Καρακώστα

Αθήνα, Απρίλιος 2014

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

<u>ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ</u>	1
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	2
1.1. ΛΕΥΧΑΙΜΙΕΣ	3
1.2. ΧΡΟΝΙΑ ΛΕΜΦΟΓΕΝΗΣ ΛΕΥΧΑΙΜΙΑ (ΧΛΛ)	5
1.2.1. ΓΕΝΙΚΑ.....	5
1.2.2. ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ	6
1.2.3. ΑΙΤΙΟΛΟΓΙΑ	8
1.2.4. ΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑ.....	12
1.2.5. ΚΛΙΝΙΚΗ ΕΙΚΟΝΑ	17
1.2.6. ΔΙΑΓΝΩΣΗ	18
1.2.7. ΣΤΑΔΙΟΠΟΙΗΣΗ.....	20
1.2.8. ΠΡΟΓΝΩΣΗ	22
1.2.9. ΘΕΡΑΠΕΙΑ.....	24
1.3. ΚΥΤΤΑΡΟΓΕΝΕΤΙΚΗ	26
1.3.1. ΓΕΝΙΚΑ.....	26
1.3.2. ΚΑΡΥΟΤΥΠΟΣ:	27
1.3.2.1. ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΖΩΝΩΠΟΙΗΣΗΣ ΧΡΩΜΟΣΩΜΑΤΩΝ.....	30
1.3.2.2. ΚΑΝΟΝΕΣ ΚΥΤΤΑΡΟΓΕΝΕΤΙΚΗΣ - ΟΝΟΜΑΤΟΛΟΓΙΑ....	32
1.3.3. ΜΟΡΙΑΚΗ ΚΥΤΤΑΡΟΓΕΝΕΤΙΚΗ - ΦΘΟΡΙΖΟΝ ΕΠΙΤΟΠΙΟΣ /	
ΥΒΡΙΔΙΣΜΟΣ (Fluorescence In Situ Hybridization, FISH)	35
1.3.3.1. ΜΟΡΙΑΚΟΙ ΙΧΝΗΘΕΤΕΣ	37
1.3.4. ΚΥΤΤΑΡΟΓΕΝΕΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΣΤΗ ΧΛΛ	40
1.3.4.1. ΧΡΩΜΟΣΩΜΙΚΕΣ ΑΝΩΜΑΛΙΕΣ ΣΤΗ ΧΛΛ ΚΑΙ	
ΠΡΟΓΝΩΣΤΙΚΗ ΑΞΙΑ	42
1.3.4.2. ΗΣΥΜΒΟΛΗ ΤΗΣ ΚΥΤΤΑΡΟΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΣΤΗ ΧΛΛ	51
1.4. ΓΟΝΙΔΙΑ ΑΠΟΤΘΕΙΚΟΠΟΙΗΣΗΣ ΣΤΗ ΧΛΛ:	53
1.4.1. ΓΕΝΙΚΑ:.....	53
1.4.2. UDP- ΓΛΥΚΟΥΡΟΝΥΛΟΤΡΑΝΣΦΕΡΑΣΕΣ (UGTs) :.....	55
1.4.2.1. UGT1A1 ΓΟΝΙΔΙΟ:.....	56
1.4.2.2. UGT1A1*28 ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΣ:.....	58

<u>ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ</u>	60
2. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ.....	61
3. ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ.....	63
3.1. ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΑΣΘΕΝΩΝ.....	64
3.2. ΚΛΑΣΙΚΗ ΚΥΤΤΑΡΟΓΕΝΕΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ	65
3.2.1. ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ	66
3.2.1.1. ΚΥΤΤΑΡΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ	66
3.2.1.2. ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΧΡΩΜΟΣΩΜΙΚΩΝ ΠΑΡΑΣΚΕΥΑΣΜΑΤΩΝ: ..	72
3.2.1.3. ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΚΗ ΠΑΡΑΤΗΡΗΣΗ ΚΑΙ ΚΑΡΥΟΤΥΠΗΣΗ	74
3.2.1.4. ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ	76
3.3. ΜΟΡΙΑΚΗ ΚΥΤΤΑΡΟΓΕΝΕΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ	
- ΦΘΟΡΙΖΟΝ IN SITU ΥΒΡΙΔΙΣΜΟΣ (FISH)	77
3.3.1. ΜΟΡΙΑΚΟΙ ΑΝΙΧΝΕΥΤΕΣ	78
3.3.2. ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ	81
3.3.2.1. ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ ΜΕΘΟΔΟΥ FISH - ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ	82
3.3.2.2. ΣΤΑΔΙΑ ΜΕΘΟΔΟΥ FISH.....	84
3.4. ΓΟΝΟΤΥΠΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ UGT1A1*28 ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΥ	91
3.4.1. ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ	92
3.4.2. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ DNA.....	93
3.4.3. ΓΟΝΟΤΥΠΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΟΥ ΥΠΟΚΙΝΗΤΗ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ	
UGT1A1	94
3.4.3.1. ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ	
ΠΡΑΓΜΑΤΙΚΟΥ ΧΡΟΝΟΥ (REAL TIME -PCR, RT-PCR)..	95
3.4.3.2. ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (PCR)	97
3.4.3.3. ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΣ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ PCR ΣΕ ΠΗΚΤΩΜΑ	
ΠΟΛΥΑΚΡΥΛΑΜΙΔΗΣ 12%	99
3.5. ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΚΙΝΔΥΝΟΥ ΓΙΑ ΤΗΝ ΕΚΔΗΛΩΣΗ ΤΗΣ ΧΛΛ	101
3.6. ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ	106
4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	107
4.1. ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΑΣΘΕΝΩΝ.....	108
4.2. ΚΛΑΣΙΚΗ ΚΥΤΤΑΡΟΓΕΝΕΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ	110
4.2.1. ΜΕΛΕΤΗ ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΩΝ ΚΑΡΥΟΤΥΠΩΝ	111
4.2.2. ΔΙΕΓΕΡΤΕΣ ΤΩΝ ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΩΝ Β-ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΤΗΣ ΧΛΛ .	122
4.2.3. ΣΥΧΝΟΤΗΤΑ ΧΡΩΜΟΣΩΜΙΚΩΝ ΑΛΛΟΙΩΣΕΩΝ ΣΕ ΣΧΕΣΗ ΜΕ	

ΤΗΝ ΗΛΙΚΙΑ ΤΩΝ ΑΣΘΕΝΩΝ	125
4.2.4. ΠΑΡΑΘΕΣΗ ΚΑΡΥΟΤΥΠΩΝ ΑΣΘΕΝΩΝ	128
4.3. FISH ΑΝΑΛΥΣΗ	131
4.3.1. ΠΡΟΤΥΠΑ ΥΒΡΙΔΙΣΜΟΥ ΜΟΡΙΑΚΩΝ ΑΝΙΧΝΕΥΤΩΝ.....	132
4.3.2. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ FISH ΑΝΑΛΥΣΗΣ.....	137
4.3.3. ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ ΚΑΡΥΟΤΥΠΟΥ ΚΑΙ FISH	139
4.3.4. ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΕΥΡΗΜΑΤΩΝ FISH ΜΕ ΤΟ ΦΥΛΟ ΤΩΝ ΑΣΘΕΝΩΝ	
.....	141
4.4. ΓΟΝΟΤΥΠΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΟΥ UGT1A1*28 ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΥ..	142
4.4.1. ΑΠΕΙΚΟΝΙΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ REAL TIME –PCR.....	143
4.4.2. ΑΠΕΙΚΟΝΙΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ ΕΠΕΙΤΑ ΑΠΟ ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟ	
ΤΩΝ PCR ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ ΣΕ ΠΗΚΤΩΜΑ ΑΚΡΥΛΑΜΙΔΗΣ	145
4.4.3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΓΟΝΟΤΥΠΙΚΗΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΤΟΥ	
UGT1A1*28 ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΥ	146
4.4.4. ΓΟΝΟΤΥΠΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΟΥ UGT1A1*28	
ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΥ ΚΑΙ ΚΥΤΤΑΡΟΓΕΝΕΤΙΚΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	
.....	147
4.4.4.1. ΓΟΝΟΤΥΠΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΚΑΙ ΚΑΡΥΟΤΥΠΙΚΑ	
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	148
4.4.4.2. ΓΟΝΟΤΥΠΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΚΑΙ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ FISH ...	
.....	150
4.5. ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΚΙΝΔΥΝΟΥ ΚΑΙ ΧΛΛ	152
4.5.1. ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΠΡΟΔΙΑΘΕΣΗ ΚΑΙ ΕΚΘΕΣΗ ΣΕ ΓΕΝΟΤΟΞΙΚΟΥΣ	
ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ	152
4.5.2. ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΚΙΝΔΥΝΟΥ ΚΑΙ ΕΙΔΙΚΕΣ ΧΡΩΜΟΣΩΜΙΚΕΣ	
ΑΛΛΟΙΩΣΕΙΣ ΤΗΣ ΧΛΛ	156
5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	160
5.1. ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΑΣΘΕΝΩΝ.....	161
5.1.1. ΗΛΙΚΙΑ	161
5.1.2. ΦΥΛΟ.....	163
5.2. ΚΥΤΤΑΡΟΓΕΝΕΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ	164
5.2.1. ΚΑΡΥΟΤΥΠΟΣ	164
5.2.1.1. ΚΑΤΑΛΛΗΛΟΤΕΡΟΣ ΔΙΕΓΕΡΤΗΣ ΓΙΑ ΤΑ ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΑ	
B-ΚΥΤΤΑΡΑ ΤΗΣ ΧΛΛ	164

5.2.1.2.	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΡΥΟΤΥΠΙΚΗΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ.....	166
5.2.2.	ΜΟΡΙΑΚΗ ΚΥΤΤΑΡΟΓΕΝΕΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ.....	175
5.2.2.1.	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ FISH ΑΝΑΛΥΣΗΣ	176
5.2.3.	Η ΑΞΙΑ ΤΟΥ ΚΑΡΥΟΤΥΠΟΥ ΚΑΙ ΤΗΣ FISH ΣΤΗ ΧΛΛ	178
5.3.	Ο ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΣ UGT1A1*28 ΣΤΗ ΧΛΛ	181
5.4.	ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΠΡΟΔΙΑΘΕΣΗ ΚΑΙ ΕΚΘΕΣΗ ΣΕ ΓΕΝΟΤΟΞΙΚΟΥΣ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΣΤΗ ΧΛΛ.....	185
5.4.1.	ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ ΚΙΝΔΥΝΟΥ ΜΕ ΤΗΝ ΕΚΔΗΛΩΣΗ ΤΗΣ ΧΛΛ.....	185
5.4.2.	ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ ΚΙΝΔΥΝΟΥ ΜΕ ΤΗΝ ΕΚΔΗΛΩΣΗ ΤΩΝ ΕΙΔΙΚΩΝ ΑΛΛΟΙΩΣΕΩΝ ΤΗΣ ΧΛΛ	193
5.5.	ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	195
6.	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	199
7.	ΠΕΡΙΛΗΨΗ	207
7.1.	ΠΕΡΙΛΗΨΗ ΣΤΑ ΕΛΛΗΝΙΚΑ	208
7.2.	ΠΕΡΙΛΗΨΗ ΣΤΑ ΑΓΓΛΙΚΑ.....	211
8.	ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ	213
8.1.	ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ ΣΕ ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΑ ΠΕΡΙΟΔΙΚΑ	214
8.2.	ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΙΣ ΣΕ ΔΙΕΘΝΗ ΚΑΙ ΕΛΛΗΝΙΚΑ ΣΥΝΕΔΡΙΑ.....	215
9.	ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ	217
10.	ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ.....	225

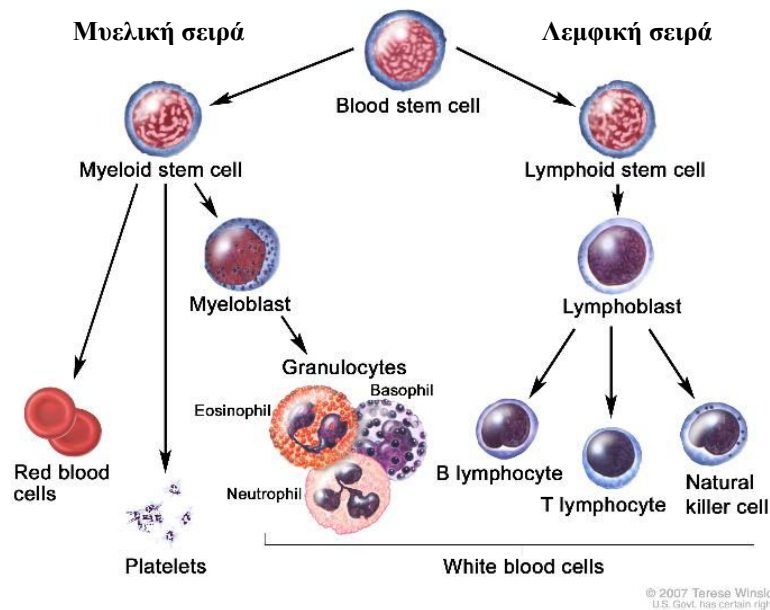
ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 ΛΕΥΧΑΙΜΙΕΣ

Οι λευχαιμίες συνιστούν μια ετερογενή ομάδα κακοήθων αιματολογικών νοσημάτων που προκύπτουν από βλάβες των αρχέγονων, πολυδύναμων αιμοποιητικών κυττάρων του μυελού των οστών, κυρίως των λευκοκυττάρων. Τα καρκινικά κύτταρα πολλαπλασιάζονται ανεξέλεγκτα υπό τη μορφή μεμονωμένων κυτταρικών κλώνων (βλάστες) διηθώντας το μυελό των οστών και εμποδίζοντας έτσι τη φυσιολογική λειτουργία των υπολοίπων κυττάρων του αίματος.

Οι αιμοποιητικές κυτταρικές σειρές είναι οι μητρικές κυτταρικές προβαθμίδες που αναγνωρίζονται μορφολογικά ή με άλλες τεχνικές μεθόδους στα αιμοποιητικά όργανα και δίνουν γένεση στις επιμέρους κατηγορίες έμμορφων συστατικών του αίματος. Τα μητρικά αυτά κύτταρα (precursor cells) διακρίνονται σε κύτταρα της μυελικής και της λεμφικής σειράς τα οποία απεικονίζονται παρακάτω (εικόνα 1).



Εικόνα 1. Κυτταρικές σειρές του μυελού των οστών

Ανάλογα με την αιμοποιητική κυτταρική σειρά η οποία βλάπτεται οι λευχαιμίες διακρίνονται, σε λεμφογενείς ή λεμφοβλαστικές (λεμφική σειρά) και μυελογενείς ή μυελοβλαστικές (μυελική σειρά) [1]. Η περαιτέρω διάκρισή τους σε οξείες και χρόνιες πραγματοποιείται με βάση τη χρονική εξέλιξη της νόσου, τα κλινικά της χαρακτηριστικά και το στάδιο διαφοροποίησης των κυττάρων. Οι οξείες

λευχαιμίες εμφανίζονται σε οποιαδήποτε ηλικία και χαρακτηρίζονται από την ξαφνική εκδήλωση και ταχεία εξέλιξη της νόσου ενώ διακριτικό γνώρισμα της νόσου αποτελεί ένας πληθυσμός άωρων κυττάρων που εντοπίζεται στο μυελό των οστών και το περιφερικό αίμα. Αντιθέτως, οι χρόνιες λευχαιμίες εκδηλώνονται συχνότερα σε προχωρημένη ηλικία, με ηπιότερη συμπτωματολογία και αργή αλλά και λιγότερο επιθετική εξέλιξη της νόσου, διότι οι καρκινικοί κλώνοι προέρχονται από ώριμα κύτταρα του αιμοποιητικού συστήματος. Αναφορικά, τα τέσσερα βασικά είδη λευχαιμίας είναι τα εξής: 1. Οξεία Μυελογενής, 2. Χρόνια Μυελογενής, 3. Οξεία Λεμφογενής, 4. Χρόνια Λεμφογενής.

1.2 ΧΡΟΝΙΑ ΛΕΜΦΟΓΕΝΗΣ ΛΕΥΧΑΙΜΙΑ

1.2.1 ΓΕΝΙΚΑ

Η Χρόνια Λεμφογενής Λευχαιμία (ΧΛΛ) ορίζεται ως ένα νεόπλασμα που αποτελείται από μονοκλωνικά, ώριμα, στρογγυλά έως ελαφρώς ασύμμετρα Β-λεμφοκύτταρα τα οποία αθροίζονται στο περιφερικό αίμα, στο μυελό των οστών, στο σπλήνα και στους λεμφικούς ιστούς, μαζί με προλεμφοκύτταρα και παρανοσοβλάστες σχηματίζοντας κέντρα πολλαπλασιασμού στους ιστούς που διηθούν [2]. Αν και ονομάζεται λευχαιμία πρόκειται για ένα χαμηλού βαθμού κακοήθειας νεόπλασμα. Ως εκ τούτου η ονομασία της είναι βαρύτερη από την αληθινή πρόγνωση της νόσου, η οποία αν και είναι μη ιάσιμη νεοπλασία, επιτρέπει στο πλείστο των περιπτώσεων παρατεταμένη επιβίωση με σχετικά καλή ποιότητα ζωής.

Η ΧΛΛ συγκαταλέγεται στις Β- Χρόνιες Λεμφοπερπλαστικές Παθήσεις (Β-ΧΛΥΠ) με βάση το αναθεωρημένο σύστημα ταξινόμησης του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας (World Health Organisation, WHO) [2]. Η συγκεκριμένη κατάταξη των νεοπλασματικών αιματολογικών νόσων είναι η πλέον πρόσφατη και αποτελεί την κοινά αποδεκτή ιστολογική ταξινόμηση στην κλινική πράξη αλλά και την επιστημονική έρευνα. Στον πίνακα που ακολουθεί φαίνονται αναλυτικά όλες οι Β-ΧΛΥΠ που περιλαμβάνονται στην κατάταξη WHO (πίνακας 1)

Πίνακας 1: Β-ΧΛΥΠ που περιλαμβάνονται στην ταξινόμηση WHO

1. Β-Χρόνια Λεμφογενής Λευχαιμία/Λέμφωμα από μικρά Λεμφοκύτταρα
2. Β-Προλεμφοκυτταρική Λευχαιμία
3. Λεμφολασματοκυτταρικό Λέμφωμα
4. Σπληνικό Λέμφωμα της Οριακής ζώνης
5. Λευχαιμία Τριχωτών Κυττάρων
6. Εξωλεμφαδενικό Λέμφωμα από Β-κύτταρα της Οριακής Ζώνης του λεμφικού ιστού που συνδέεται με τους βλεννογόνους (MALT-Λέμφωμα)
7. Λεμφαδενικό Λέμφωμα της Οριακής Ζώνης
8. Οζώδες Λέμφωμα
9. Λέμφωμα από Κύτταρα του μανδύα

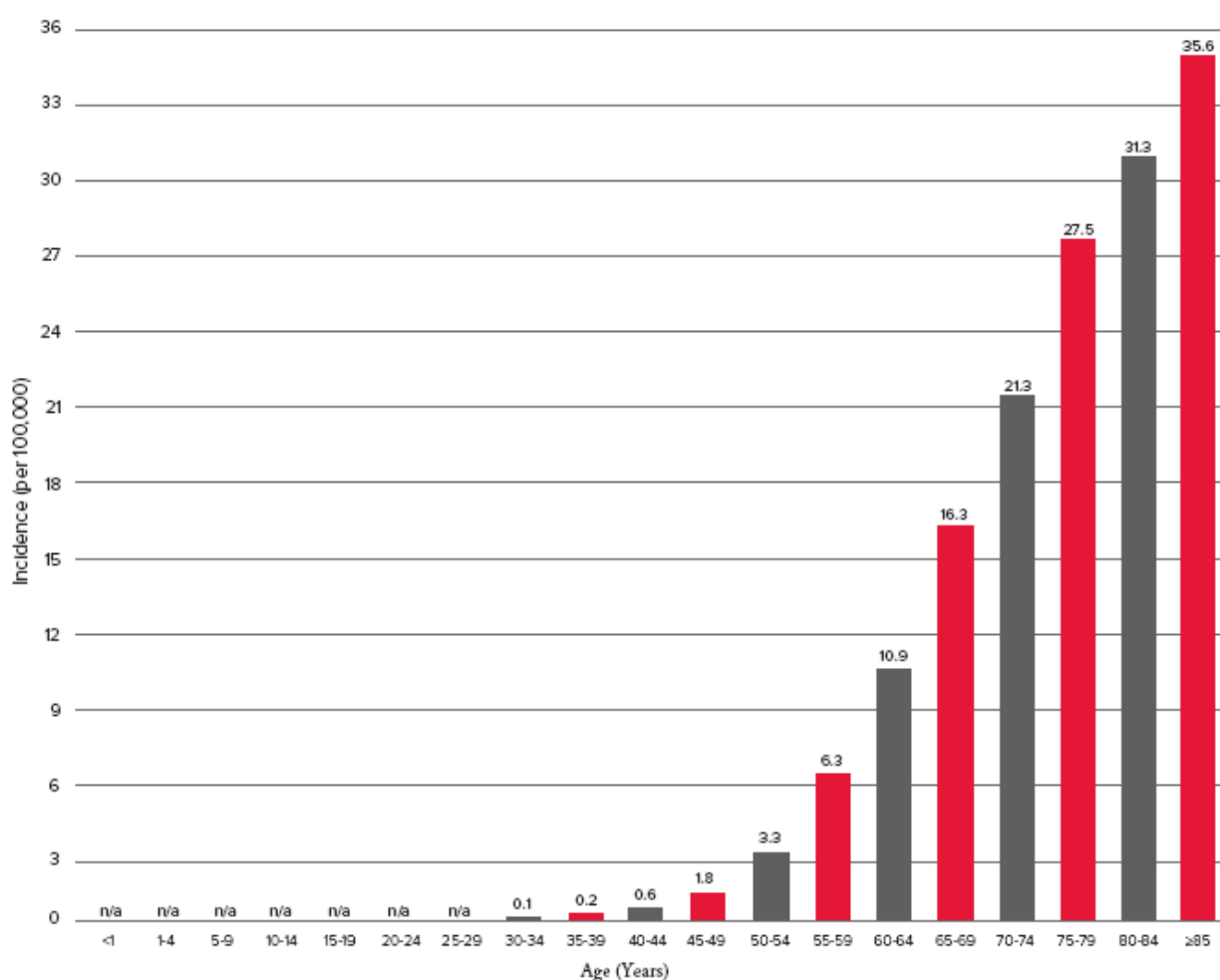
1.2.2 ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ

Δυο χαρακτηριστικά της νόσου αποτελούν τροχοπέδη για τον ακριβή προσδιορισμό της συχνότητάς της. Το πρώτο είναι το γεγονός ότι η διάγνωση της νόσου γίνεται τυχαία και δεύτερον πολλές μελέτες έχουν αποτύχει να διακρίνουν τη ΧΛΛ από τα άλλα χαμηλής κακοήθειας νεοπλάσματα λόγω της μεγάλης ετερογένειας που εμφανίζει η νόσος, με αποτέλεσμα την μεγάλη διαφορά στη συχνότητα εμφάνισης της νόσου μεταξύ των χωρών [3]. Παρόλα αυτά, είναι κοινώς αποδεκτό ότι πρόκειται για το συνηθέστερο τύπο λευχαιμίας των ηλικιωμένων του Δυτικού ημισφαιρίου, καλύπτοντας το ~30% του συνόλου των λευχαιμιών [2]. Η συχνότητα εμφάνισης της νόσου κυμαίνεται από 2 – 6 περιστατικά ανά 100.000 κατοίκους το χρόνο και αυξάνεται με την ηλικία αγγίζοντας τα 12,8/100.000 περιστατικά στην ηλικία των 65 ετών [2]. Το 80% των ασθενών είναι άνω των 60 ετών με διάμεση ηλικία στη διάγνωση τα 72 έτη [4]. Η ΧΛΛ προσβάλλει με σχεδόν διπλάσια συχνότητα τους άνδρες από ότι τις γυναίκες – η επίπτωσή της στις ΗΠΑ ανέρχεται στο 3,35 -3,69/100.000 για τους άνδρες και στο 1,61-1,92/100.000 για τις γυναίκες [2].

Γενικότερα, η ΧΛΛ είναι πιο κοινή στους Καυκάσιους και η συχνότητά της μειώνεται με κατιούσα σειρά μεταξύ των Μαύρων, Ισπανών, Ινδών και των Ασιατών [5]. Στις Ηνωμένες Πολιτείες, κάθε χρόνο περίπου 7500 άνθρωποι εμφανίζουν ΧΛΛ και σχεδόν 5000 πεθαίνουν από την ασθένεια [6]. Ο αριθμός των διαγνωσμένων για πρώτη φορά ασθενών κάθε χρόνο αγγίζει τους 180.000 παγκοσμίως [7]. Επίσης τα τελευταία δεδομένα δείχνουν ότι περίπου το 6% του υγιούς ηλικιωμένου πληθυσμού αναπτύσσει μονοκλωνική Β λεμφοκυττάρωση, η οποία μπορεί να μεταπέσει σε ΧΛΛ στο 1% -2% των περιπτώσεων [1]. Αντιθέτως στην Ασία η εμφάνισή της είναι σπάνια και αυτή η χαμηλή συχνότητα εμφάνισης διατηρείται σε μεταναστευτικούς πληθυσμούς, με αποτέλεσμα να μπορούμε να μιλήσουμε για μια γενετική προδιάθεση της νόσου [6].

Το οικογενειακό ιστορικό της ΧΛΛ ή άλλης λεμφοϋπερπλαστικής νόσου αποτελεί επίσης ισχυρό παράγοντα κινδύνου και ισχύει στο 10% των περιπτώσεων, αυξάνοντας έτσι τον κίνδυνο για τους πρώτου βαθμού συγγενείς νοσούντων κατά 30 φορές [8]. Επίσης, έχει περιγραφεί σε ποσοστό 13,5% υποκλινική μορφή της νόσου μεταξύ των συγγενών πρώτου και δεύτερου βαθμού (μονοκλωνική Β-

λεμφοκυττάρωση), δηλαδή ανίχνευση λεμφοκυττάρων στο αίμα με τον τυπικό ανοσοφαινότυπο, χωρίς να μπορεί να γίνει πρόβλεψη για τη μετάπτωση σε νόσο [9,10]. Οι ασθενείς με την οικογενή μορφή της νόσου είναι κατά μέσο όρο 10 χρόνια νεότεροι από εκείνους με τη σποραδική, ενώ τα προσβληθέντα παιδιά τους νοσούν 15–20 χρόνια νωρίτερα από τους γονείς [11,12]. Ωστόσο, δεν πρέπει να παραβλέπεται το γεγονός ότι τα τελευταία χρόνια όλο και πιο συχνά διαγιγνώσκονται νέοι ασθενείς με ΧΛΛ, με ηλικίες κάτω των 55 ετών [6,13,14]. Τα παιδιά όμως δε νοσούν σχεδόν ποτέ από ΧΛΛ [15].



Διάγραμμα 1: Απεικόνιση περιστατικών με ΧΛΛ με βάση την ηλικία. Ο οριζόντιος άξονας δείχνει διαστήματα 5 ηλικίας ετών. Ο κάθετος άξονας δείχνει τη συχνότητα νέων περιπτώσεων ΧΛΛ ανά 100.000 ανθρώπους σε μια συγκεκριμένη ηλικιακή ομάδα. Πηγή: SEER, Cancer Statistics Review, 1975-2008, National Cancer Institute. Bethesda, MD, www.seer.cancer.gov/csr/1975_2008/, based on November 2010 SEER data submission, posted to the SEER website, 2011.

1.2.3 ΑΙΤΙΟΛΟΓΙΑ: Πιθανοί παράγοντες κινδύνου

Η αιτιολογία της Χρόνιας Λεμφογενούς Λευχαιμίας είναι κατά κύριο λόγο άγνωστη. Αυτό οφείλεται σε περιορισμούς και δυσκολίες που συναντώνται κατά τη διεξαγωγή των μελετών, όπως η όψιμη εκδήλωση της ασθένειας, η συγκαταλογή της σε άλλα είδη λευχαιμίας ή λεμφωμάτων αλλά και η καθυστέρηση ανάμεσα στην αρχική έκθεση σε τοξικές ουσίες ή ακτινοβολίες και στη διάγνωση της νόσου [16,17]. Οι παράγοντες υψηλής επικινδυνότητας που ενοχοποιούνται για την εκδήλωση της ΧΛΛ παρουσιάζονται παρακάτω.

Ακτινοβολία: Παλαιότερα η ΧΛΛ φαινόταν να μη σχετίζεται με την ιονίζουσα ακτινοβολία. Ωστόσο μελέτες των τελευταίων ετών συνδέουν τη ΧΛΛ με την ακτινοθεραπεία, τα αποτελέσματα όμως που παρουσιάζουν χαρακτηρίζονται ως ανεπαρκή λόγω του περιορισμένου αριθμού ασθενών και του γεγονότος ότι δεν παρουσιάζεται δοσοεξαρτώμενη σχέση ακτινοβολίας και εκδήλωσης της νόσου [18]. Έτσι επισημαίνονται οι βιολογικοί, επιδημιολογικοί και μεθοδολογικοί περιορισμοί που δυσχεραίνουν τις προσπάθειες για να εκτιμηθεί κατά πόσον η ιονίζουσα ακτινοβολία σχετίζεται με την εκδήλωση της νόσου [18]. Επίσης κάποιες μελέτες που περιλαμβάνουν εργάτες πυρηνικής βιομηχανίας που εκτίθονταν σε εξωτερικές πηγές ακτινοβολίας και πλουτωνίου προτείνουν πιθανή συσχέτιση της νόσου με τη ραδιενέργεια [19,20]. Τέλος έρευνα που προέρχεται από τη Νορβηγία έδειξε σύνδεση της ΧΛΛ με ενήλικους που εργάζονται ή ζουν κοντά σε γραμμές υψηλής τάσης [21]. Όμως η σχέση των ραδιοσυχνοτήτων με τον κίνδυνο εκδήλωσης της ΧΛΛ δεν έχει μελετηθεί.

Η επιδημιολογική βιβλιογραφία στη μη ιονίζουσα ακτινοβολία είναι ακόμα πιο περιορισμένη. Μελέτες σε εργαζομένους που εκτίθενται σε ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία, παρόλο που το δείγμα ήταν μικρό, συμπεραίνουν ότι αποτελεί παράγοντα κινδύνου για τη ΧΛΛ, αν όχι τόσο για την πρόκληση της νόσου, όσο για την επιδείνωσή της [22].

Χημικές ενώσεις: Μελέτες ετών εστιάζουν στον αυξημένο κίνδυνο που φαίνεται να έχουν τα άτομα που ασχολούνται με αγροτικές εργασίες, χωρίς, όμως, να ενοχοποιούν συγκεκριμένες γεωργικές χημικές ουσίες [18]. Κάποιες έρευνες προτείνουν τη συσχέτιση των παρασιτοκτόνων, ειδικότερα εντομοκτόνων (καρβονικό άλας, φωσφορικό άλας, DDT) με την εκδήλωση της ΧΛΛ [23]. Το 2003

γνωστοποιήθηκε ότι οι παλαιάμαχοι του πολέμου στο Βιετνάμ, οι οποίοι είχαν έρθει σε επαφή με τεράστιες ποσότητες ζιζανιοκτόνων που χρησιμοποιήθηκαν ως χημικά όπλα, όπως το Agent Orange (μίγμα 1:1 δύο ζιζανιοκτόνων σε εστεροποιημένη μορφή, του 2,4-διχλωροφαινόξυοξικού οξέος και του 2,4,5-τριχλωροφαινόξυοξικού οξέος), είχαν αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης της νόσου.

Γενικότερα, η ΧΛΛ τείνει να έχει μεγαλύτερη συχνότητα, κατά κύριο λόγο, σε περιοχές με χαμηλή δόση χρόνιων τοξικών επιδράσεων, όπως λιπάσματα και παρασιτοκτόνα [24]. Επίσης, περιστατικά λεμφογενούς λευχαιμίας έχουν αναφερθεί σε άτομα που εργάζονται με καουτσούκ και πετρέλαιο. Η τελευταία συστηματική βιβλιογραφική ανασκόπηση αναφέρει ότι η έκθεση σε βενζόλιο στην εργασία αυξάνει τον κίνδυνο για την εκδήλωση της ΧΛΛ [25]. Ο παρακάτω πίνακας αναφέρει συνοπτικά τις ενοχοποιημένες ουσίες για την εκδήλωση της νόσου [16].

Πίνακας 2: Χημικές ουσίες που έχουν ενοχοποιηθεί για την εκδήλωση της νόσου [16]

Chemical	Evidence in humans		Haematotoxicity in animals
	CLL	NHL/MM	
Pesticides	Yes	Yes	Yes
Solvents	Yes	Yes	Yes
Benzene	One study	Yes	Yes
Butadiene	Yes	Yes	Yes
Formaldehyde	No	No	Yes
Dioxins	No	Yes	Yes
Ethylene oxide	No	Yes	Yes

NHL, non-Hodgkin lymphoma; MM, multiple myeloma; CLL, chronic lymphocytic leukaemia.

Ιατρική κατάσταση και θεραπείες: Τα τελευταία χρόνια η έρευνα έχει στραφεί προς τη διαλεύκανση του ρόλου των αντιγόνων, των αυτοαντιγόνων και της ΧΛΛ αφού δεν έχει ξεκαθαριστεί η σχέση της με τα αυτοάνοσα νοσήματα και τις αλλεργικές αντιδράσεις [26]. Δύο μελέτες από τη Σκανδιναβία υποδεικνύουν ότι η εμφάνιση ενός ή περισσότερων επεισοδίων πνευμονίας εντός 5 ετών πριν από τη διάγνωση της ΧΛΛ θα μπορούσε να χρησιμεύσει ως ένα πιθανό έναυσμα για την ανάπτυξη της νόσου, αν και είναι πιθανό ότι η πνευμονία θα μπορούσε να είναι συνέπεια της ανοσολογικής ανεπάρκειας που προκαλείται από την εκδήλωση της

ίδιας της ΧΛΛ [18]. Ενδιαφέρον πάντως έχει το γεγονός ότι και οι δύο μελέτες υπέδειξαν ότι η χρόνια λήψη αντιβιοτικών λόγω χρόνιων ιατρικών προβλημάτων συνδέεται με μειωμένη πιθανότητα για την εκδήλωση της νόσου.

Τρόπος Ζωής: Το κάπνισμα έχει αναγνωριστεί ως καρκινογόνο εδώ και πολλές δεκαετίες αλλά μόλις το 1986 συνδέθηκε με τη λευχαιμογένεση [27]. Αρκετές έρευνες, αλλά όχι όλες, έχουν δείξει θετική συσχέτιση της ΧΛΛ με το κάπνισμα και ειδικότερα με την αυξανόμενη διάρκεια καπνίσματος. Ωστόσο, πολλές από αυτές δεν είναι στατιστικά σημαντικές [18].

Από την άλλη, διάφορες μελέτες διεξάγονται ως προς την επίδραση της κοσμετολογίας στη λευχαιμογένεση. Πιο συγκεκριμένα η ΧΛΛ, σε αντίθεση με τα υπόλοιπα ΧΛΥΠ νοσήματα, δεν έχει συνδεθεί με την προσωπική χρήση της βαφής μαλλιών εκτός ελαχίστων εξαιρέσεων [18]. Τέλος, κάποια συσχέτιση διαφαίνεται μεταξύ του δείκτη μάζας σώματος και της ΧΛΛ, ενώ περαιτέρω πληροφορίες απαιτούνται για τον πιθανό ρόλο της φυσικής άσκησης ή διαίτας στον κίνδυνο εμφάνισης της νόσου [18].

Γενετικοί Παράγοντες: Το οικογενειακό ιστορικό με προσβεβλημένα μέλη από ΧΛΛ ή άλλο ΧΛΥΠ νόσημα αποτελεί έναν από τους ισχυρότερους παράγοντες κινδύνου εμφάνισης της ΧΛΛ. Η σχέση έχει βασιστεί σε ευρήματα των τελευταίων εξήντα χρόνων, που αφορούν σε δίδυμα, πολλαπλούς συγγενείς και πολλαπλές γενιές όπως προκύπτει από πρόσφατη ανασκοπική μελέτη [18]. Πιο συγκεκριμένα, ο κίνδυνος για τους α' βαθμού συγγενείς νοσούντων αυξάνεται κατά 30 φορές ενώ οι ασθενείς με την οικογενή μορφή της νόσου είναι κατά μέσο όρο 10 χρόνια νεότεροι από εκείνους με τη σποραδική και τα προσβεβλημένα παιδιά τους νοσούν 15-20 χρόνια νωρίτερα [28].

Η συνάθροιση των περιστατικών με ΧΛΛ που παρατηρείται στις οικογένειες, τείνει να αποδοθεί τα τελευταία χρόνια στη γενετική προδιάθεση παρά στην έκθεση σε κοινούς περιβαλλοντικούς παράγοντες. Υπάρχουν αυξημένες πιθανότητες συγκεκριμένα γονίδια να σχετίζονται με την εκδήλωση της ΧΛΛ, αλλά και με άλλα συναφή ΧΛΥΠ [5]. Ωστόσο, η αδυναμία των μελετών να εντοπίσουν μια συγκεκριμένη μετάλλαξη γονιδίου με μεγάλη επίπτωση στον ασθενή (όπως το BRCA1 για τον καρκίνο του μαστού) πιθανότατα υποδεικνύει ότι στη ΧΛΛ παίζουν ρόλο πολλά γονίδια με μικρότερες επιπτώσεις το κάθε ένα ξεχωριστά και δρώντας συνεργατικά συμβάλλουν στην εκδήλωση της ΧΛΛ [5]. Αυτά τα γονίδια μπορεί να είναι πιο δύσκολο να εντοπιστούν, αλλά η έρευνα που επικεντρώνεται σε μεγάλης

κλίμακας γονιδιακές μεθόδους και δύναται να εφαρμοστεί σε μεγάλο αριθμό δειγμάτων είναι πολλά υποσχόμενη για τον προσδιορισμό εκείνων των γονιδίων που ενέχονται στην εκδήλωση της νόσου. Η έρευνα προς αυτή την κατεύθυνση αναπτύσσεται διεξοδικότερα στο κεφάλαιο της Μοριακής Βιολογίας.

1.2.4 ΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑ

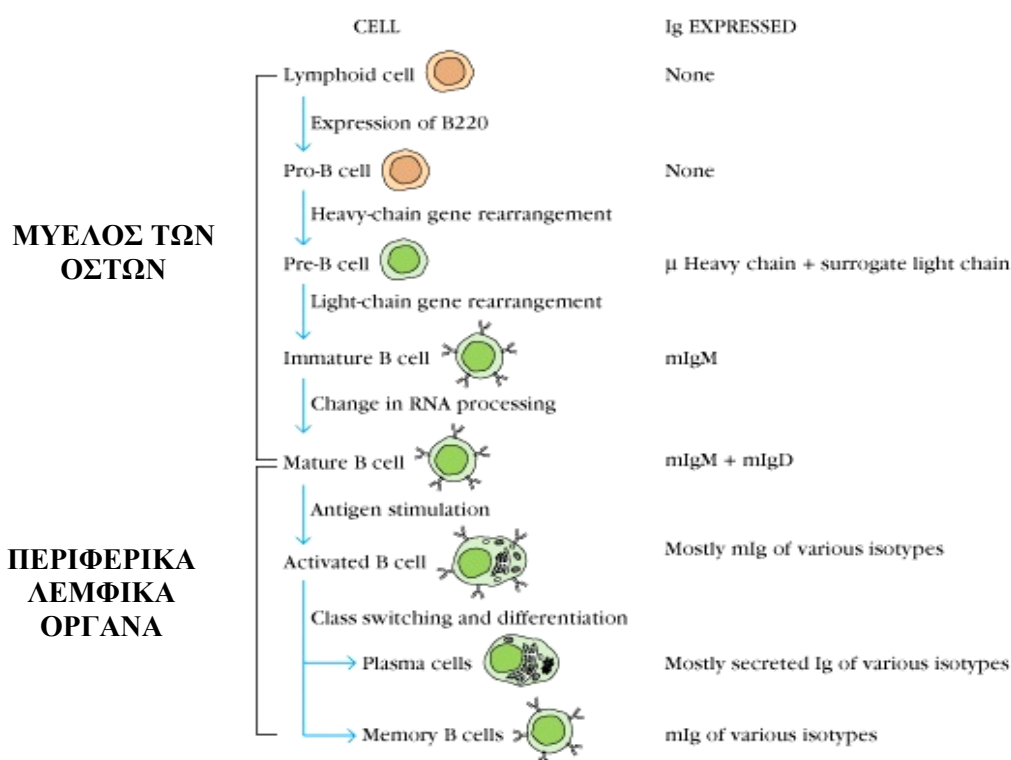
Βιολογία της νόσου: Οι έρευνες των τελευταίων ετών έχουν βοηθήσει στην καλύτερη κατανόηση της βιολογίας της νόσου. Έτσι, η ΧΛΛ διακρίνεται σε δύο υπότυπους ανάλογα με την ύπαρξη (*μεταλλαγμένος τύπος*) ή την απουσία μεταλλάξεων (*μη μεταλλαγμένος τύπος*) στην υπερμεταβλητή περιοχή του γονιδίου της ανοσοσφαιρίνης (IGH). Η περιοχή αυτή αφορά το τμήμα του γονιδιώματος του λεμφοκυττάρου από το οποίο συντίθεται η περιοχή του ειδικού αντισώματος που έρχεται σε άμεση επαφή με το αντιγόνο. Ο ανασυνδυασμός αυτού του γονιδίου είναι που δημιουργεί μοναδικά αντισώματα και επομένως, μοναδικούς κλώνους ενεργοποιημένων Β-λεμφοκυττάρων. Όταν η αλληλουχία βάσεων του γονιδίου αυτού στα κύτταρα της νόσου διαφέρει >2% σε σύγκριση με το αντίστοιχο γονίδιο των κυττάρων της βλαστικής σειράς (πρώιμα κύτταρα), το γονίδιο θεωρείται μεταλλαγμένο.

Στη μεταλλαγμένη μορφή της ΧΛΛ το κύτταρο έχει περάσει από το βλαστικό κέντρο, αφού πραγματοποιούνται σε αυτό σωματικές μεταλλαγές, και χαρακτηρίζεται από μία μορφή ανοσολογικού αυτισμού [29-31]. Αντίθετα, στην αμετάλλακτη μορφή της ΧΛΛ το κύτταρο δεν πέρασε από το βλαστικό κέντρο και φέρει ενεργό BCR υποδοχέα, οπότε συνεχίζει ν' αποκρίνεται [29]. Οι διαφορές των δύο υποτύπων είναι τόσο καθοριστικές ώστε να καθορίζουν σχεδόν διαφορετική νόσο αφού αφορούν την προέλευση, την παθογένεια, αλλά και τη βιολογική συμπεριφορά του κακοήθους κυττάρου. Η πιο χαρακτηριστική όμως διαφορά είναι η σημαντικά χειρότερη πρόγνωση του μη μεταλλαγμένου τύπου. Η διαπίστωση αυτή έκτοτε καθιέρωσε τη μελέτη των βιολογικών παραμέτρων της νόσου χωριστά και συγκριτικά για τους δύο τύπους [28].

Τα τελευταία χρόνια έχει διαπιστωθεί ότι πολλοί ασθενείς με ΧΛΛ φέρουν ομοιότητες στις μεταβλητές περιοχές της βαριάς αλλά και της ελαφριάς αλυσίδας, στα σημεία υποδοχής του αντιγόνου [32,33]. Αυτό σημαίνει ότι οι υποδοχείς των β-κυττάρων συνδέουν όμοια αντιγόνα τα οποία προφανώς παίζουν ρόλο στην παθογένεια της νόσου. Περίπου το 10% των περιστατικών της ΧΛΛ εμφανίζει κοινούς υποδοχείς, αλλά το φαινόμενο αυτό αφορά κυρίως το μη μεταλλαγμένο τύπο όπου εκεί το ποσοστό ανέρχεται στο 20% [34]. Το παραπάνω γεγονός οδηγεί στην υπόθεση ότι συγκεκριμένα αντιγόνα και αλλά συγκεκριμένες περιοχές πρόσδεσης του

αντιγόνου ευθύνονται για την υπερπλασία που παρατηρείται στα παθολογικά κύτταρα της ΧΛΛ χωρίς όμως να έχει διευκρινιστεί ακόμα αν πρόκειται για ιούς, βακτήρια, περιβαλλοντικά αντιγόνα ή και αυτοαντιγόνα [28,35].

Το παθολογικό κύτταρο της ΧΛΛ προκύπτει από ένα προγονικό κύτταρο το οποίο σταμάτησε σε ένα ώριμο στάδιο της διαφοροποίησης πριν όμως γίνει ώριμο πλασματοκύτταρο με συνέπεια όλα τα κύτταρα του κλώνου να φέρουν την ίδια ανασυνδυασμένη αλυσίδα ανοσοσφαιρινών (IgV_H). Το στάδιο διαφοροποίησης του παθολογικού κλώνου συνδέεται με την κλινική πορεία του ασθενή, με αποτέλεσμα ο αμετάλλακτος υπότυπος της νόσου να έχει χειρότερη κλινική εξέλιξη από το μεταλλαγμένο (εικ. 2) [36].



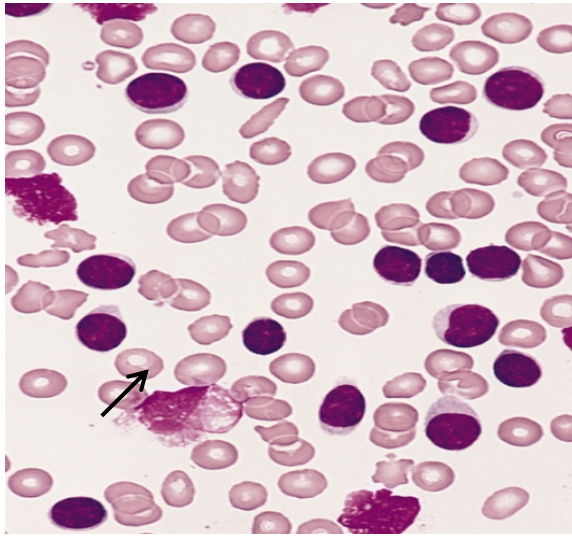
Εικόνα 2. Στάδια διαφοροποίησης B-κυττάρων. Μεταξύ του σταδίου του πρώιμου λεμφοκυττάρου και του προλεμφοκυττάρου, στο μυελό των οστών πραγματοποιούνται οι ανασυνδυασμοί των γονιδιακών τμημάτων (εξωνίων) της μεταβλητής (V) περιοχής της βαριάς (H) αλυσίδας, δημιουργώντας λειτουργικά γονίδια ανοσοσφαιρινών. Ανασυνδυαστικό μοντέλο Dreyer-Bennet [37].

Στην επιφάνεια των παθολογικών κυττάρων της ΧΛΛ εκφράζεται ο δείκτης CD5 ο οποίος φυσιολογικά εκφράζεται στα T – λεμφοκύτταρα και μόνο σε ένα μικρό ποσοστό των φυσιολογικών B- λεμφοκυττάρων των δευτερευόντων λεμφικών οργάνων των ενηλίκων. Αυτό οδήγησε στη σκέψη μήπως τα κύτταρα της ΧΛΛ προκύπτουν από τα παραπάνω. Ωστόσο, συγκρίνοντας τα λευχαιμικά κύτταρα με

ώρα Β κύτταρα, κύτταρα της βλαστικής σειράς, CD5⁺ κύτταρα και κύτταρα μνήμης, βρέθηκε ότι μοιάζουν περισσότερο με τα τελευταία, εξού και ο δείκτης CD27 που φέρουν στην επιφάνειά τους τα κύτταρα της ΧΛΛ [36]. Το γεγονός αυτό υποδηλώνει την προέλευσή τους από το ενεργοποιημένο λεμφοκύτταρο που έχει έρθει σε επαφή με αντιγόνο [28].

Τα περισσότερα παθολογικά κύτταρα είναι αδρανή, παραμένοντας στην G₀ φάση του κυτταρικού κύκλου. Με τον τρόπο αυτό μπορούν να επιβιώσουν για μερικούς μήνες, ενώ ήταν προγραμματισμένα να επιβιώσουν για μόλις λίγες μέρες. Παραδοσιακά λοιπόν η κακοήθεια της νόσου αποδίδεται στη συσσώρευση των παθολογικών κυττάρων υποδηλώνοντας έτσι ότι ο ενδογενής μηχανισμός απόπτωσης είναι ελαττωματικός. Όμως τα σύγχρονα δεδομένα δείχνουν ότι τα κύτταρα της ΧΛΛ υφίστανται αυτόματα απόπτωση *in vitro*, ενώ ταυτόχρονα παρατηρείται ένας υπέρμετρος πολλαπλασιασμός ορισμένων παθολογικών κλώνων ο οποίος μάλιστα συνδέεται με επιθετικότερη νόσο [1,28]. Σε αυτό συνηγορεί και το γεγονός ότι σε ασθενείς με επιθετική νόσο ανιχνεύονται μικρότερα τελομερή στο γενετικό τους υλικό, τα οποία ως γνωστόν βραχύνονται σε κάθε κυτταρική διαίρεση. Επίσης για τη συσσώρευση των παθολογικών κυττάρων έχει ενοχοποιηθεί το εξωτερικό μικροπεριβάλλον, του οποίου οι επιδράσεις συντηρούν τα κύτταρα εν ζωή. Τα στοιχεία του εξωτερικού μικροπεριβάλλοντος που ενοχοποιούνται γι' αυτή τη λειτουργία είναι τα γειτονικά κύτταρα που έρχονται σε επαφή με τα λευχαιμικά αλλά και τα σήματα επιβίωσης, όπως οι κυτταροκίνες, τα οποία προάγουν την επιβίωση [28]. Τα παραπάνω σε συνδυασμό με την απορρύθμιση των αντι-αποπτωτικών γονιδίων λόγω μεταλλάξεων που παρατηρείται, όπως τα *BCL-2*, *surviving* και *MCL-1*, δρουν συνεργατικά και προάγουν την επιβίωση των παθολογικών κλώνων [28]. Το αποτέλεσμα είναι η συσσώρευση των κλωνικών κυττάρων της ΧΛΛ και η πιθανή μετανάστευσή τους από τα κέντρα πολλαπλασιασμού στο περιφερικό αίμα και τα δευτερογενή λεμφικά όργανα [38].

Μορφολογικά, τα κύτταρα της ΧΛΛ χαρακτηρίζονται από μικρό μέγεθος, στρογγυλό πυρήνα, με μερικώς πυκνή χρωματίνη, χωρίς ευδιάκριτο πυρηνίσκο και λιγιστό κυτταρόπλασμα περιφερειακά. Διακριτικό γνώρισμα των παθολογικών λεμφοκυττάρων αποτελεί η ευθραυστότητά τους η οποία είναι υπεύθυνη για την άρση της λειτουργικότητά τους [39]. Σε επίχρισμα περιφερικού αίματος παρατηρούνται τα παθολογικά σπασμένα λεμφοκύτταρα, γνωστά ως **πυρηνικές σκιές Gumprecht** (εικόνα 3).



Εικόνα 3α. Μορφολογία Β-ΧΛΛ κυττάρων. Στο βέλος φαίνεται η σκιά Gumprecht (πηγή: www.leukemia-lymphoma.org)

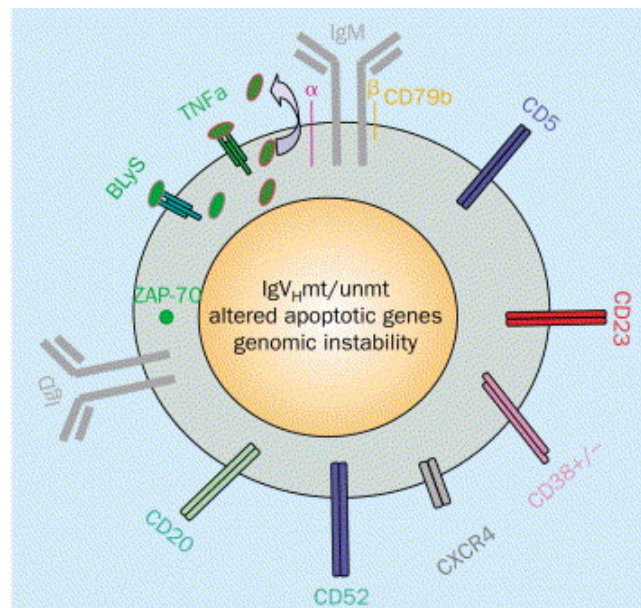


Εικόνα 3β. Γραφική απεικόνιση των Β-ΧΛΛ κ�ττάρων

Ο χαρακτηριστικός ανοσοφαινότυπος της ΧΛΛ (εικόνα 4) συνιστά ένα αξιόπιστο εργαλείο για την πρωτοδιάγνωση της νόσου, εφαρμόζοντας την τεχνική της κυτταρομετρίας ροής [2]. Τα κυττάρα της ΧΛΛ είναι CD5+, CD19+, CD23+, FMC7-, ενώ οι δείκτες CD20, CD79b/CD22 και οι επιφανειακές ανοσοσφαιρίνες ανευρίσκονται σε χαμηλά επίπεδα με ασθενή έκφραση. Οι δείκτες CD19 και CD20 είναι τυπικοί για Β-λεμφοκύτταρα, όχι όμως και ο CD5, ο οποίος αποτελεί αντιγονικό δείκτη διαφοροποίησης των Τ-λεμφοκυττάρων. Ο CD23 είναι δείκτης ενεργοποίησης και υφιστάμενος αυτόματη πρωτεόλυση, παράγει αυξημένα επίπεδα CD23 στον ορό, τα οποία είναι ενδεικτικά της προόδου της νόσου [40]. Ο CD79b είναι συστατικό του συμπλέγματος αντιγόνου-υποδοχέα στην επιφάνεια των Β-λεμφοκυττάρων. Ο FMC7 ανευρίσκεται αρνητικός στο 84% των ασθενών και είναι δείκτης προλεμφοκυτταρικής λευχαιμίας και λευχαιμίας εκ τριχωτών κυττάρων [28]. Η παραπάνω όμως συνθήκη δεν είναι αναγκαία ούτε επαρκής για τη διάγνωση της νόσου καθώς υπάρχουν ασθενείς με ΧΛΛ οι οποίοι εμφανίζουν άτυπο ανοσοφαινότυπο, όπως CD5⁻ ή CD23⁻ και έτσι σε αυτές τις περιπτώσεις η ύπαρξη της νόσου πρέπει να αποδεικνύεται και από άλλους δείκτες.

Από την άλλη, ο δείκτης CD38 όντας διαμεμβρανική γλυκοπρωτεΐνη τύπου II, έχει κύριο ρόλο στην έναρξη αλλά και στην επεξεργασία μηνυμάτων που εισέρχονται στο κύτταρο από το μικροπεριβάλλον. Η επιθετικότητα των CD38⁺ κυττάρων φαίνεται να επιδεινώνεται από την ικανότητά τους να μεταναστεύουν επωφελούμενα

των αλληλεπιδράσεων με το μικροπεριβάλλον [41]. Η έκφραση του CD38 στα κύτταρα της ΧΛΛ ποικίλει αποτελώντας ένα μέτρο κυτταρικής διαίρεσης και ανάπτυξης *in vivo*. Ως εκ τούτου η ανεξάρτητη έκφραση του συγκεκριμένου δείκτη χρησιμοποιείται ως ανεξάρτητος αρνητικός προγνωστικός παράγοντας και συνήθως συνδυάζεται με το μη μεταλλαγμένο τύπο της νόσου [28]. Τέλος επισημαίνεται ότι ο χαρακτηριστικός ανοσοφαινότυπος της ΧΛΛ παρατηρείται και στη μονοκλωνική λεμφοκυττάρωση (MBL), η σχέση των οποίων παραμένει αντικείμενο έρευνας [42]



Εικόνα 4. Τυπικός Ανοσοφαινότυπος λεμφοκυττάρων της ΧΛΛ.
(πηγή: <http://commons.wikimedia.org>)

1.2.5 ΚΛΙΝΙΚΗ ΕΙΚΟΝΑ

Στο 50-70% των περιπτώσεων η νόσος είναι ασυμπτωματική, καθιστώντας τη διάγνωση δυσκολότερη και τυχαίο γεγονός [28,43]. Η υποψία τίθεται με τυχαία ανεύρεση μεμονωμένης λεμφοκυττάρωσης στο αίμα ή διαπίστωση λεμφαδενοπάθειας ή και σπληνομεγαλίας κατά την κλινική εξέταση. Όταν υπάρχει συμπτωματολογία, αυτή θα αφορά σε καταβολή, λεμφαδενοπάθεια, λοιμώξεις (βακτηριακή πνευμονία) και σπάνια πυρετό ή απώλεια βάρους [28].

Στην όψιμη κλινική εικόνα ανήκει η ανοσοανεπάρκεια λόγω υπογαμμασφαιριναιμίας (περίπου στο 50% των ασθενών με ΧΛΛ) καθώς και διαταραχές στη λειτουργία των T-λεμφοκυττάρων, του συμπληρώματος και των ουδετεροφίλων [44]. Αποτέλεσμα των παραπάνω μεταβολών σε συνδυασμό με τη βαριά χημειοθεραπεία αποτελεί η εξασθένηση του ανοσοποιητικού συστήματος με συνέπεια την προσβολή από τυπικές βακτηριακές και ευκαιριακές λοιμώξεις, οι οποίες υποτροπιάζουν σ' ένα ποσοστό 80% και αποτελούν τον κύριο λόγο θανάτου [28].

Τα αυτοάνοσα νοσήματα ειδικά του αιμοποιητικού εμφανίζονται συχνά στη ΧΛΛ ενώ το 7,7-35% των νοσούντων αναπτύσσουν Coombs θετική αυτοάνοση αιμολυτική αναιμία κατά την εξέλιξη της νόσου. Πιο συγκεκριμένα, παράγονται αυτοαντισώματα, κατά κανόνα από μη κακοήγη Β-λεμφοκύτταρα, που «στρέφονται» εναντίον IgG και λίγες φορές IgM ερυθροκυτταρικών αντισωμάτων. Ως πιθανός παθογενετικός μηχανισμός προτείνεται η βλάβη στο σύστημα Fas, που φυσιολογικά λαμβάνει μέρος στην απομάκρυνση μέσω απόπτωσης των αυτοαντιδρώντων Β-κυττάρων. Σπανιότερα παρατηρείται απλασία της ερυθράς σειράς, θρομβοπενία, νεφρωσικό σύνδρομο, αγγειοοίδημα και παρανεοπλασματική πέμφιγα [28].

1.2.6 ΔΙΑΓΝΩΣΗ

Μετά το διεθνές workshop IWCLL (Λονδίνο 2007), δημοσιεύτηκαν νέες κατευθυντήριες γραμμές για τη διάγνωση αλλά και τη θεραπεία της Β-ΧΛΛ. Οι οδηγίες αυτές αποτελούν στην ουσία την ενημέρωση και αναθεώρηση των κριτηρίων του NCI του 1996 με βάση όλα τα νεότερα δεδομένα [39]. Έτσι για τη διάγνωση της νόσου είναι αναγκαία η εξέταση του αριθμού, της μορφολογίας και του ανοσοφαινότυπου των λεμφοκυττάρων της κυκλοφορίας του αίματος [39]. Συγκεκριμένα, για τη διάγνωση χρησιμοποιούνται τα εξής κριτήρια:

1. Αριθμός λεμφοκυττάρων πάνω από $5 \times 10^9/L$ για διάστημα μεγαλύτερο των τριών μηνών με 55% να είναι άτυπα.
2. Χαρακτηριστικός ανοσοφαινότυπος: CD5+, CD19+, CD23+, CD79a+, CD43+, CD20 (ασθενώς), SmIg (ασθενώς), CD10-, FMC7-, CD79b-
3. Βιοψία μυελού των οστών και λεμφαδένων: Διάμεση, σπάνια οζώδης, συχνότερα μικτή ή διάχυτη διήθηση με λεμφοκύτταρα στο μυελό των οστών πάνω από 30% και διάχυτη στους λεμφαδένες [44].

Επιπροσθέτως, πολύ σημαντική είναι η επιβεβαίωση ότι ο ασθενής πάσχει από ΧΛΛ και όχι από κάποια άλλη λεμφοϋπερπλαστική νόσο (διαφορική διάγνωση). Ο ανοσοφαινότυπος και ειδικά τα αντιγόνα CD5 διαχωρίζει τη ΧΛΛ από άλλες κακοήθειες των Β-κυττάρων και χρησιμοποιείται για την αρχική διάγνωση [2]. Έχει αναπτυχθεί δε, το σύστημα βαθμολόγησης Matutes (Matutes scoring system) που αξιολογεί την έκφραση πέντε αντιγόνων για τη διαφορική διάγνωση της Β-ΧΛΛ από τις υπόλοιπες Β-ΧΛΥΠ [45,46]. Το σύστημα αυτό παρουσιάζεται στον ακόλουθο πίνακα (πίνακας 2).

Πίνακας 3: Σύστημα βαθμολόγησης Matutes για τη διαφορική διάγνωση της ΧΛΛ

Δείκτης	Βαθμολογία	
	1	0
CD5	θετικό	αρνητικό
CD23	θετικό	αρνητικό
FMC7	αρνητικό	θετικό
sIg	ασθενής	μέτρια/ ισχυρή
CD22/CD79b	ασθενές/αρνητικό	μέτριο/ισχυρό

Η βαθμολογία της Β-ΧΛΛ συνήθως κυμαίνεται μεταξύ 3-5 ενώ των υπολοίπων Β-ΧΛΥΠ μεταξύ 0-2

Στη διαφορική διάγνωση της ΧΛΛ επίσης λαμβάνεται υπόψη και η έκφραση της κυτταροπλασματικής τυροσινικής κινάσης ZAP-70, η οποία φυσιολογικά εκφράζεται στα Τ-λεμφοκύτταρα και κύτταρα φυσικούς φονείς διαδραματίζοντας σημαντικό ρόλο στην έναρξη της σηματοδότησης. Η ανώμαλη έκφραση της πρωτεΐνης αυτής στα κύτταρα της ΧΛΛ έχει συνδεθεί με επιθετικότερη νόσο και μικρότερο χρόνο επιβίωσης. Τα υψηλά επίπεδα ZAP-70 σχετίζονται με τον μη μεταλλαγμένο τύπο της ΧΛΛ αποτελώντας μάλιστα ισχυρότερο προγνωστικό παράγοντα από εκείνον [28]. Τέλος σημαντικό ρόλο στη διαφορική διάγνωση παίζουν ο δείκτης CD38, η β2-μικροσφαιρίνη, ο λόγος των mRNAs των LPL/ADAM29 αλλά και ευρήματα από την Κλασική και Μοριακή Κυτταρογενετική ανάλυση τα όποια αναφέρονται διεξοδικότερα στο κεφάλαιο της Κυτταρογενετικής (§2.3).

1.2.7 ΣΤΑΔΙΟΠΟΙΗΣΗ

Η σταδιοποίηση της νόσου γίνεται σύμφωνα με τα δύο συστήματα Rai και Binet, τα οποία χρησιμοποιούνται στην κλινική πράξη και είναι καθοριστικά για την έκβαση της νόσου [47,48]. Και τα δύο χρησιμοποιούν απλά κλινικά δεδομένα σχετικά με την έκταση της λεμφαδενοπάθειας και την παρουσία ή όχι οργανομεγαλίας και βασικές αιματολογικές παραμέτρους, δηλαδή την παρουσία ή όχι αναιμίας και θρομβοπενίας, διακρίνοντας τη νόσο σε αρχικό, ενδιάμεσο και προχωρημένο στάδιο. Προγενέστερο είναι το σύστημα Rai και στη συνέχεια αναπτύχθηκε το σύστημα Binet που είναι ακόμη απλούστερο. Η σταδιοποίηση με βάση και τα δύο συστήματα απεικονίζεται στους πίνακες 4 και 5. Τα συστήματα αυτά παρότι ωφέλιμα και ευρέως χρησιμοποιούμενα, στερούνται προβλεπτική αξίας σε ασθενείς αρχικών σταδίων, αφού δεν μπορούν να εκφράσουν τη δυνητικά επιθετική νόσο. Η σταδιοποίηση της ΧΛΛ ούσα καθοριστική για την εξέλιξη της νόσου αποτελεί κρίσιμο προγνωστικό δείκτη και καθορίζει σε μεγάλο βαθμό την κλινική απόφαση για έναρξη ή όχι θεραπείας.

Πίνακας 4. Κλινική σταδιοποίηση της ΧΛΛ κατά Rai.

Στάδιο κατά Rai	Κλινικό εύρημα	Ύπαρξη/ Απουσία	Μέση Επιβίωση
0	Λεμφοκυττάρωση ¹	+	>10 χρόνια
I	Λεμφοκυττάρωση Λεμφαδενοπάθεια	+	9 χρόνια
II	Λεμφοκυττάρωση Σπληνομεγαλία Λεμφαδενοπάθεια	+	7 χρόνια
III	Λεμφοκυττάρωση Αναιμία ² Λεμφαδενοπάθεια ή σπληνομεγαλία	+	5 χρόνια
IV	Λεμφοκυττάρωση Θρομβοπενία ³ Αναιμία Λεμφαδενοπάθεια Σπληνομεγαλία	+	5 χρόνια

1: Λεμφοκυττάρωση: $> 5 \times 10^9/L$ για > 4 εβδομάδες.

2: Αναιμία: Αιμοσφαιρίνη $< 11 \text{ g/dL}$, λόγω μικρού αριθμού ερυθροκυττάρων.

3: Θρομβοπενία: αιμοπετάλια $< 100 \times 10^9/L$.

Πινάκας 5. Κλινική σταδιοποίηση της ΧΛΛ κατά Binnet.

Στάδιο κατά Binnet	Αιμοσφαιρίνη	Αιμοπετάλια	Προσβεβλημένες περιοχές*	Μέση Επιβίωση
A	≥ 10	≥ 100000	≤ 2	>10 χρόνια
B	≥ 10	≥ 100000	≥ 3	7 χρόνια
C	< 10	> 100000	Όποιος αριθμός	5 χρόνια

* Οι προσβεβλημένες περιοχές μπορεί να είναι το ήπαρ, ο σπλήνας, οι τραχηλικοί, μασχαλιαίοι ή βουβωνικοί λεμφαδένες είτε οι λεμφαδένες της κεφαλής .

Τα παραπάνω κλινικά και εργαστηριακά ευρήματα που χρησιμοποιούνται για τη σταδιοποίηση αποτελούν ένα μέρος μόνο της πρόβλεψης της μέσης επιβίωσης. Αυτό συμβαίνει διότι η πρόγνωση για ένα δεδομένο ασθενή εξαρτάται από τις σύνθετες σχέσεις μεταξύ:

- των χαρακτηριστικών του ασθενούς (ηλικία, φύλο, ταυτόχρονη νοσηρότητα, κατάσταση υγείας)
- των χαρακτηριστικών της ασθένειας (ιδιότητες και βιολογία όγκου) και
- της απόκρισης στη θεραπεία [49]

1.2.8 ΠΡΟΓΝΩΣΗ

Η κλινική πορεία της ΧΛΛ ποικίλει εξαιρετικά, λόγω της ετερογένειας της νόσου, με την επιβίωση να κυμαίνεται από μερικούς μήνες έως αρκετά χρόνια [50]. Σχετικές μελέτες δείχνουν ότι η κλινική ετερογένεια της νόσου είναι συνυφασμένη με ετερογένεια σε γενετικό, βιολογικό και ανοσοφαινοτυπικό επίπεδο [51]. Το γεγονός αυτό οδήγησε στην αναζήτηση προγνωστικών παραγόντων για την πρόμνη διάγνωση των ασθενών με στόχο την έγκαιρη και πιο αποτελεσματική αντιμετώπιση. Τα δυο συστήματα σταδιοποίησης που αναφέρθηκαν παραπάνω μολονότι προσφέρουν πληροφορίες για την επιβίωση δεν μπορούν να προβλέψουν με ακρίβεια την εξέλιξη της νόσου σε ασθενείς που διαγιγνώσκονται σε πρώιμο στάδιο. Έτσι τα τελευταία χρόνια η έρευνα έχει στραφεί προς την καλύτερη κατανόηση της παθογένειας της νόσου με αποτέλεσμα την εισαγωγή μιας σειράς βιολογικών δεικτών οι οποίοι δύνανται να προβλέψουν με μεγαλύτερη ακρίβεια την έκβαση των ασθενών. Οι δύο πλέον αποδεκτοί βιολογικοί δείκτες είναι η ύπαρξη μεταλλαγμένων ή αμετάλλακτων βαρέων αλυσίδων των ανοσοσφαιρινών και οι κυτταρογενετικές ανωμαλίες [52]. Ως εκ τούτου, η χρήση επιπλέον νέων προγνωστικών δεικτών και η εφαρμογή τους σε επίπεδο ρουτίνας είναι επιτακτική ανάγκη. Η ανασκοπική μελέτη των Moreno C και Monsterrat E στοχεύει στο να παρουσιάσουν όλοι οι γνωστοί προγνωστικοί δείκτες και ταυτόχρονα καλεί την επιστημονική κοινότητα να μελετήσει εκτενέστερα τους νέους και φαινομενικά χρήσιμους βιολογικούς δείκτες (πίνακας 6) [49].

Πίνακας 6. Κλασικοί και βιολογικοί προγνωστικοί δείκτες για τη Χρόνια Λεμφογενή Λευχαιμία [49].

Κλασικοί προγνωστικοί δείκτες	
<input type="checkbox"/> Κλινικό στάδιο	Ευρεία πρακτική σε επίπεδο ρουτίνας
<input type="checkbox"/> Αριθμός λεμφοκυττάρων στο περιφερικό αίμα	
<input type="checkbox"/> Μορφολογία λεμφοκυττάρων στο περιφερικό αίμα	
<input type="checkbox"/> Χρόνος διπλασιασμού λεμφοκυττάρων αίματος	
<input type="checkbox"/> Βαθμός διήθησης μυελού των οστών	
Βιολογικοί δείκτες	
<input type="checkbox"/> Δείκτες πλάσματος	Εκτενώς μελετημένοι
-Κινάση της θυμιδίνης	
-β2 μικροσφαιρίνη	
-Διαλυτό CD23	
<input type="checkbox"/> Υπερμεταλλάξεις IgV _H	
<input type="checkbox"/> Κυτταρογενετική	
-Καλή πρόγνωση: 13q, φυσιολογικός καρυότυπος, +12	
-Κακή πρόγνωση: 17p, 11q, σύνθετος καρυότυπος	
<input type="checkbox"/> Έκφραση CD38 (κακή πρόγνωση)	
<input type="checkbox"/> Έκφραση ZAP-70 (κακή πρόγνωση)	
<input type="checkbox"/> Χρωμοσωμικές μεταθέσεις	Απαιτείται εκτενέστερη μελέτη
<input type="checkbox"/> Έκφραση <i>CLL1</i>	
<input type="checkbox"/> MicroRNAs	
<input type="checkbox"/> Γονίδιο <i>TCL-1</i>	
<input type="checkbox"/> Αντιαποπτωτικά γονίδια	
-Έκφραση <i>MCL-1</i>	
- <i>Bcl-2/Bax</i>	
<input type="checkbox"/> Γονίδια <i>MDR1/MDR-3</i>	
<input type="checkbox"/> Ενεργοποίηση-επαγωγή mRNA της διαμινάσης της κυτιδίνης (AID)	
<input type="checkbox"/> Έκφραση Λιποπρωτεϊνικής λιπάσης A	
<input type="checkbox"/> Έκφραση <i>ADAM29</i>	
<input type="checkbox"/> VEGF	
<input type="checkbox"/> Θρομβοποιητίνη	
<input type="checkbox"/> Μήκος τελομερών και λειτουργία τελομεράσης	
<input type="checkbox"/> CD49d	
<input type="checkbox"/> CD69	
<input type="checkbox"/> FCRL	

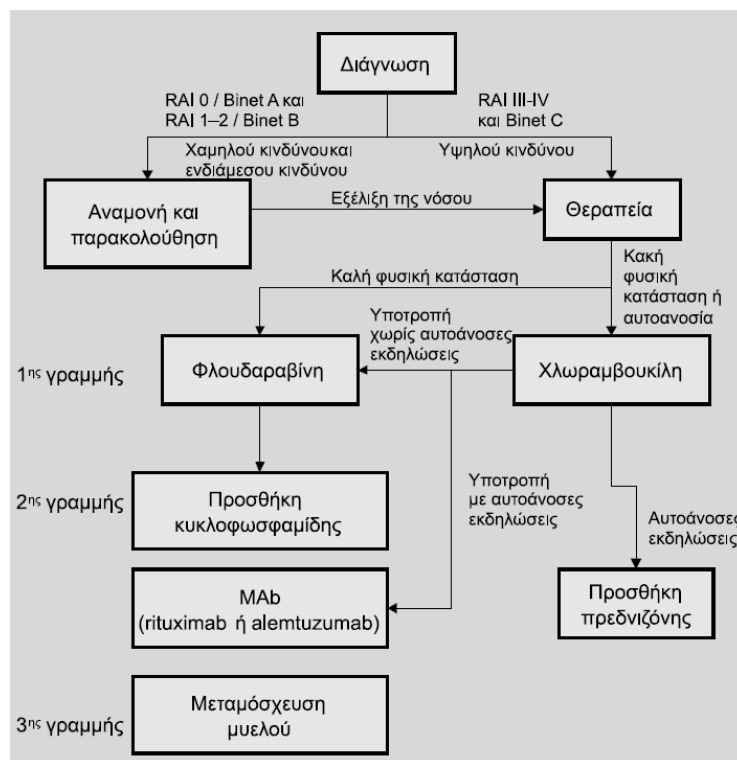
1.2.9 ΘΕΡΑΠΕΙΑ

Η ΧΛΛ αποτελεί νόσημα με συνήθως βραδεία εξέλιξη. Οι περισσότεροι ασθενείς κατ' αρχήν δεν απαιτούν θεραπεία, αλλά ακόμα και όταν αυτή απαιτείται δε στοχεύει στην ίαση αλλά στην παράταση της επιβίωσης χωρίς νόσο και της ολικής επιβίωσης. Η μόνη θεραπεία που ίσως μπορεί να υποσχεθεί ίαση είναι η αλλογενής μεταμόσχευση μυελού των οστών αλλά στη ΧΛΛ η εφαρμογή της δεν είναι πάντα εφικτή εξαιτίας της προχωρημένης ηλικίας των ασθενών.

Οι ασθενείς στη σταθερή αδρανή φάση της νόσου μπορούν να παραμείνουν εκτός θεραπείας έως ότου πληρούνται συγκεκριμένα κριτήρια για την έναρξη της (στρατηγική watch and wait). Έτσι η έναρξη μιας κυτταροστατικής αγωγής ενδείκνυται σε ασθενείς με συμπτώματα (γενικά συμπτώματα ή έντονη κόπωση), επαπειλούμενη βλάβη «ευγενών οργάνων», διπλασιασμό του αριθμού των λεμφοκυττάρων σε <6 μήνες, προοδευτικώς επιδεινούμενη ή ογκώδη λεμφαδενοπάθεια ή/και σπληνομεγαλία, αναιμία ή/και θρομβοπενία. Η αρχική χημειοθεραπευτική αντιμετώπιση της Β-ΧΛΛ δεν είναι τυποποιημένη και τα στοιχεία για την υπεροχή κάποιου συνδυασμού έναντι των άλλων όσον αφορά τη συνολική επιβίωση είναι πολύ περιορισμένα. Κατά συνέπεια τα διάφορα αποδεκτά σχήματα πρώτης γραμμής μπορούν να χρησιμοποιηθούν και ως σχήματα δεύτερης ή τρίτης γραμμής. Η αντιμετώπιση της Β-ΧΛΛ εξαρτάται από την ηλικία και τη φυσική κατάσταση του ασθενούς ενώ ο ρόλος συγκεκριμένων κυτταρογενετικών ανωμαλιών με δυσμενή προγνωστική σημασία παίζει κυρίαρχο ρόλο [π.χ. del(17p)].

Στη θεραπεία 1ης γραμμής χορηγούνται ανάλογα πουργινών και συνίσταται σε ηλικιωμένους αλλά και σε ασθενείς με κακή φυσική κατάσταση. Στη θεραπεία 2ης γραμμής χορηγούνται συγκεκριμένα χημειοθεραπευτικά σχήματα συνήθως σε συνδυασμό με Rituximab (μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι του CD20 και ενώ όταν χορηγείται μόνο του δεν έχει σημαντική δράση, σε συνδυασμό με χημειοθεραπεία δρα συνεργικά) τα οποία επιλέγονται με βάση την αρχική θεραπεία, τα συνυπάρχοντα νοσήματα, την ηλικία και τη φυσική κατάσταση του ασθενούς. Σε ασθενείς βέβαιοι με μακρά πρώτη ύφεση μπορεί να χορηγηθεί εκ νέου η αρχική θεραπεία. Στη θεραπεία 3ης γραμμής συναντώνται πάλι συγκεκριμένα χημειοθεραπευτικά σχήματα αλλά και η μεταμόσχευση μυελού των οστών. Η τελευταία δεν προβλέπεται ως καθιερωμένη θεραπευτική προσέγγιση, προσφέρει όμως δυνητικά ίαση και έτσι μελετάται για τους

νεότερους ασθενείς που έχουν επιβαρυντικούς προγνωστικούς παράγοντες (δηλαδή μη μεταλλαγμένο τύπο ΧΛΛ και ελλείψεις στα χρωμοσώματα 17 και 11), οι οποίοι δεν αναμένεται να ωφεληθούν από την κλασική χημειοθεραπεία και ταυτόχρονα μπορούν να υπομείνουν μια τέτοια επιθετική θεραπεία. Τέλος εναλλακτική θεραπευτική προσέγγιση αποτελεί η γονιδιακή θεραπεία, με στόχο την ενεργοποίηση του CD40 υποδοχέα, που είναι θεραπευτικός στόχος σε αρκετές αιματολογικές κακοήθειες [53]. Το παρακάτω σχεδιάγραμμα παρουσιάζει τη θεραπευτική στρατηγική της ΧΛΛ (εικόνα 5).



Εικόνα 5. Θεραπευτικός αλγόριθμος στη ΧΛΛ [28]

1.3 ΚΥΤΤΑΡΟΓΕΝΕΤΙΚΗ

1.3.1. ΓΕΝΙΚΑ

Η Κυτταρογενετική (Cytogenetics) αποτελεί κλάδο της βιολογίας, που έχει ως αντικείμενο τη μελέτη του ανθρώπινου γενετικού υλικού σε επίπεδο χρωμοσωμάτων ή κυττάρων. Διακρίνεται σε i) κλασική κυτταρογενετική (καρυότυπος), βάση της οποίας αποτελεί η μελέτη του γονιδιώματος σε επίπεδο χρωμοσωμάτων με τεχνικές ζωνοποίησης (banding techniques) των μεταφασικών χρωμοσωμάτων, και σε ii) μοριακή κυτταρογενετική, που περιλαμβάνει τις καινοτόμες τεχνικές της FISH, multicolour FISH και το συγκριτικό υβριδισμό του γονιδιώματος (CGH). Οι εφαρμογές της κυτταρογενετικής εκτείνονται σε δύο βασικά πεδία:

- ⇒ Στην έγκαιρη διάγνωση και πρόγνωση διαφόρων ασθενειών, καθώς και επιλογή και έλεγχο κατάλληλων θεραπευτικών στρατηγικών.
- ⇒ Στην έρευνα για συσχέτιση κληρονομικών ή επίκτητων χρωμοσωμικών ατυπιών με συγκεκριμένες ασθένειες, καθώς και για τη διερεύνηση των μηχανισμών της παθογένειάς τους.

Αντικείμενα της παρούσας διατριβής αποτελούν ο καρυότυπος και η FISH, μέθοδοι που περιγράφονται αναλυτικά παρακάτω (§ 2.3.2 και 2.3.3 αντίστοιχα)

1.3.2 ΚΑΡΥΟΤΥΠΟΣ

Η απεικόνιση των μεταφασικών χρωμοσωμάτων ανά ζεύγη και κατά ελαττούμενο μέγεθος, ανάλογα με τη θέση του κεντρομεριδίου και το πρότυπο ζώνωσης ονομάζεται καρυότυπος. Για την ταξινόμηση των χρωμοσώματων, απαιτείτο παραδοσιακά η φωτογράφησή τους με φωτογραφική κάμερα η οποία ήταν προσαρμοσμένη στο μικροσκόπιο. Σήμερα χρησιμοποιούνται ειδικά λογισμικά συστήματα απεικόνισης και ανάλυσης ψηφιακής εικόνας μέσω των οποίων πραγματοποιείται ο καρυότυπος. Όταν η αναπαράσταση του καρυοτύπου γίνεται σχηματικά τότε αναφερόμαστε σε ιδεόγραμμα (εικόνα 6).

Τα χρωμοσώματα ταξινομούνται κατά ζεύγη από το 1 έως το 23, σύμφωνα με το πρότυπο σύστημα ονοματολογίας που προτάθηκε το 1960 στο συνέδριο Κυτταρογενετικής στο Denver. Επίσης ο Patau πρότεινε τα χρωμοσώματα να κατηγοριοποιούνται σε ομάδες (Α έως Γ) βάσει του μεγέθους και των ιδιοτήτων τους. Οι ομάδες αυτές παρουσιάζονται παρακάτω:

Ομάδα Α (χρωμοσώματα 1 έως 3): περιλαμβάνονται μετακεντρικά και υπομετακεντρικά χρωμοσώματα. Το χρωμόσωμα 1 είναι το μεγαλύτερο μετακεντρικό χρωμόσωμα. Το κεντρομερίδιό του βρίσκεται στο μέσον. Το χρωμόσωμα 2 είναι το μεγαλύτερο υπομετακεντρικό χρωμόσωμα. Το χρωμόσωμα 3 είναι μετακεντρικό, μικρότερο από το 1.

Ομάδα Β (χρωμοσώματα 4 και 5): Σε αυτήν ανήκουν τα μεγάλα υπομετακεντρικά χρωμοσώματα.

Ομάδα C (χρωμοσώματα 6 έως 12): Περιλαμβάνονται τα μεσαίου μεγέθους υπομετακεντρικά χρωμοσώματα καθώς και το Χ φυλετικό χρωμόσωμα. Το Χ διαφέρει από τα υπόλοιπα της ομάδας. Το μήκος του είναι παρόμοιο με αυτό των μεγαλύτερων χρωμοσωμάτων της ομάδας C και ο άνω βραχίονας είναι αναλογικά πιο μεγάλος συγκρινόμενος με αυτούς των άλλων χρωμοσωμάτων της ομάδας.

Ομάδα D (χρωμοσώματα 13 έως 15): Περιλαμβάνει τα ακροκεντρικά χρωμοσώματα τα οποία φέρουν δορυφόρους. Ο μικρός τους βραχίονας χαρακτηρίζεται από ποικιλομορφία, ως προς το μέγεθος, την ύπαρξη και το μέγεθος των δορυφόρων.

Ομάδα E (χρωμοσώματα 16 έως 18): Περιλαμβάνει μικρά μετακεντρικά ή υπομετακεντρικά χρωμοσώματα. Το συνολικό μήκος του χρωμοσώματος 16 είναι το 1/3 του χρωμοσώματος 1.

Ομάδα F (χρωμοσώματα 19 και 20): Περιλαμβάνονται τα μικρά μετακεντρικά χρωμοσώματα.

Ομάδα G (χρωμοσώματα 20 και 21): Συνίσταται από τα ακροκεντρικά χρωμοσώματα καθώς και από το φυλετικό χρωμόσωμα Y. Οι βραχίονες p αυτής της ομάδας χαρακτηρίζονται από ποικιλομορφία, όπως και της ομάδας D. Το Y χρωμόσωμα είναι συνήθως μεγαλύτερο από τα χρωμοσώματα της ομάδας G.

Οι μικροί βραχίονες των D και G χρωμοσωμάτων περιέχουν τους οργανωτές πυρηνίσκου. Επίσης στους δορυφόρους των ακροκεντρικών χρωμοσωμάτων σε όλο το μήκος του φυλετικού Y αλλά και τις δευτερογενείς περισφίξεις των χρωμοσωμάτων 1, 9 και 16 παρατηρούνται ετερομορφισμοί οι οποίοι μπορεί να χρησιμοποιηθούν στις ανευλοειδίες (ανωμαλία στον αριθμό των χρωμοσωμάτων) προκειμένου να καθοριστεί η πατρική ή μητρική προέλευση του υπεράριθμου ή ελλείποντος χρωμοσώματος αλλά και στις μεταμοσχεύσεις για την αναγνώριση του προέλευσης του κυττάρου που αξιολογείται (δότη ή δέκτη).



Εικόνα 2. Ιδεόγραμμα ανθρώπινων χρωμοσωμάτων. Διακρίνονται τα κεντρομερίδια με την έντονη γαλάζια ζώνη, το rDNA με τη διακεκομμένη γαλάζια γραμμή και η ετεροχρωματίνη με λευκό χρώμα (R ζωνοποίηση). Στα αριστερά του κάθε χρωμοσώματος αναγράφονται οι περιοχές, οι ζώνες και υποζώνες [54]

1.3.2.1 ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΖΩΝΩΠΟΙΗΣΗΣ ΧΡΩΜΟΣΩΜΑΤΩΝ

Τα χρωμοσώματα μελετώνται στη μετάφαση της μίτωσης, αφού στο στάδιο αυτό η χρωματίνη είναι στο μέγιστο της συμπύκνωσης και τα χρωμοσώματα είναι ορατά στο οπτικό μικροσκόπιο. Για να γίνουν ορατές οι ζώνες στα μεταφασικά χρωμοσώματα, έτσι ώστε να διακρίνονται ευκολότερα το ένα από το άλλο, είναι απαραίτητη η εφαρμογή των τεχνικών ζωνοποίησης. Το κάθε ζεύγος χρωμοσωμάτων αναγνωρίζεται από το μοναδικό πρότυπο ζώνωσης όπως περιγράφηκε παραπάνω. Έχουν αναπτυχθεί διάφορες μέθοδοι ζώνωσης με ποικίλες χρωστικές και «στόχους» αυτών.

- Η **Q ζωνοποίηση** αποτελεί την πρώτη τεχνική που ανακαλύφθηκε και προκύπτει έπειτα από χρώση με τη φθορίζουσα χρωστική μουσταρδί της κινανικρίνης (Quanicrine) και ανάλυση σε μικροσκόπιο φθορισμού. Μία εξήγηση για το σχηματισμό προτύπων Q ζωνών είναι το γεγονός ότι η κινανικρίνη βάφει πιο ανοιχτόχρωμες τις πλούσιες A-T αλληλουχίες από τις πλούσιες σε C-G αλληλουχίες.
- Η **G ζωνοποίηση** προκύπτει έπειτα από χρώση με Giemsa αφού πρώτα γίνει προεργασία με διάλυμα αλάτων ή με πρωτεολυτικό ένζυμο (θρυψίνη), έτσι ώστε ν' αποδιαταχθούν οι προσδεδεμένες στο DNA πρωτεΐνες. Τα πρότυπα ζωνοποίησης που δημιουργούνται είναι πανομοιότυπα με αυτά της Q, δηλαδή οι ανοιχτόχρωμες ζώνες περιλαμβάνουν C-G πλούσιες περιοχές και οι σκουρόχρωμες (εντονότερη χρώση) A-T αλληλουχίες (εικ. 15). Οι σκουρόχρωμες περιοχές είναι φτωχές σε ενεργά γονίδια (ετεροχρωματίνη). Αντιθέτως, οι ανοιχτόχρωμες ζώνες, είναι πλούσιες σε ενεργά γονίδια (ευχρωματίνη), τα οποία αντιγράφονται στην αρχή της S φάσης.
- Η **R ζωνοποίηση** αποτελεί το φωτογραφικό αρνητικό των δύο προηγούμενων ζωνώσεων C και G, επειδή βάφει τις περιοχές που δε χρωματίζονται στις άλλες μεθόδους. Αποκτάται μετά ελεγχόμενη και εκλεκτική αποδιάταξη του DNA με θερμότητα και βάψιμο με Giemsa ή με πορτοκαλί της ακρινιδίνης. Ειδικότερα, οι ακολουθίες πλούσιες σε G-C, ως ανθεκτικότερες στη θερμική αποδιάταξη από τις A-T, παραμένουν ακέραιες, βάφονται λοιπόν και ορίζουν τις R ζώνες.
- Εκτός από τις τεχνικές χρώσης ολόκληρου του χρωμοσώματος, υπάρχουν και οι ειδικές τεχνικές, όπως η **C ζωνοποίηση**. Προκύπτει ύστερα από αποδιάταξη του

DNA με θερμότητα ή αλκάλι, γρήγορη αναδιάταξη και τέλος χρώση με Giemsa. Κατά την γρήγορη αναδιάταξη, οι αλληλουχίες που επανέρχονται στη σωστή δίκλωνη μορφή είναι οι επαναλαμβανόμενες. Επομένως, η μέθοδος αυτή σηματοδοτεί τη συστατική ετεροχρωματίνη των κεντρομεριδίων, καθώς και τις διακριτές ποικιλόμορφες ετεροχρωματινικές περιοχές των χρωμοσωμάτων 1, 9, 16 και Y, που συνίστανται από δορυφορικό DNA.

- Η **T ζώνωση** είναι μία παραλλαγή της R, κατά την οποία βάφονται εντονότερα τα τελικά σημεία των χρωμοσωμάτων.
- Στη μέθοδο της **NOR ζώνωσης** χρωματίζονται ειδικά με διάλυμα νιτρικού αργύρου οι οργανωτές του πυρηνίσκου (nucleolar organizing regions-NOR), οι οποίοι απαντώνται στους δορυφορικούς μίσχους των ακροκεντρικών χρωμοσωμάτων.
- Η χρήση του **DAPI / Distamycin A** είναι σημαντική στην ανίχνευση περικεντρικών θραύσεων σε ανακατατάξεις και στην ταυτοποίηση ανωμαλιών σε μικρά χρωμοσώματα που με τις κλασικές τεχνικές δεν είναι ορατές. Βάφει την ετεροχρωματίνη των κεντρομεριδίων των χρωμοσωμάτων 1, 9, 16 και το Yq. Βασίζεται στη μεθυλίωση του DNA.
- Η **5 βρωμοδεοξουριδίνη (BrdU)** ενσωματώνεται στο τέλος της σύνθεσης του DNA και καθιστά δυνατή την κατάδειξη του βραδέως διπλασιαζόμενου X χρωμοσώματος.

Η ζωνοποίηση με Giemsa παραμένει η πιο ευρέως χρησιμοποιούμενη τεχνική για κυτταρογενετικές πρακτικές ρουτίνας, αφού έχει χαμηλό κόστος και δυνατότητα αναγνώρισης ισορροπημένων και μη μεταλλάξεων [42]. Η ίδια τεχνική εφαρμόστηκε και στην παρούσα μελέτη.

1.3.2.2 ΚΑΝΟΝΕΣ ΚΥΤΤΑΡΟΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΚΑΙ ΟΝΟΜΑΤΟΛΟΓΙΑ

Ένας κυτταρικός πληθυσμός με ένα συγκεκριμένο είδος μεταλλαγμένου χρωμοσωμικού προτύπου προκύπτει από ένα και μόνο προγονικό μεταλλαγμένο κύτταρο (ιδρυτικό κύτταρο καρκινικής σειράς) και καλείται **κλώνος** (θεωρία μονοκλωνικής ανάπτυξης). Υπάρχουν ενδείξεις πως για να εκδηλωθεί ένας καρκινικός φαινότυπος, το ιδρυτικό κύτταρο πρέπει να υποστεί έξι έως επτά μεταλλάξεις (θεωρία πολλαπλών χτυπημάτων). Επίσης πολλές φορές κατά την εξέλιξη ενός όγκου από έναν κλώνο προκύπτουν και δευτερογενείς αλλοιώσεις (υποκλώνοι).

Όσον αφορά την καρυοτύπηση ο γενικός κανόνας που ισχύει σήμερα είναι ότι αρκεί να βρεθούν **δύο ή περισσότερα** κύτταρα με τον ίδιο συνδυασμό δομικών αλλοιώσεων ή υπεραριθμιών για να υφίστανται ένας κλώνος και να περιγραφθεί στον καρυότυπο (ISCN 2013) [55]. Εξαίρεση στον κανόνα αποτελεί η απώλεια χρωμοσώματος, που για να δηλωθεί απαιτούνται απαραίτητα **τρεις** μεταφάσεις με την ίδια ανωμαλία ώστε πιστοποιηθεί ο κλώνος.

Εκτός από την ταξινόμηση των χρωμοσωμάτων, που αναλύθηκε παραπάνω, έχουν θεσπιστεί επιπλέον κανόνες για τον χαρακτηρισμό των ζωνών και οδηγός για την καταγραφή των αποτελεσμάτων της καρυοτύπησης, τα οποία περιλαμβάνονται στο διεθνές σύστημα ISCN 2013 [55]. Μετά τη ζωνοποίηση οι βραχίονες κάθε χρωμοσώματος χωρίζονται σε περιοχές (regions), οριοθετημένες με διακριτά και σταθερά στοιχεία, οι οποίες αριθμούνται διαδοχικά ξεκινώντας από το κεντρομερίδιο. Κάθε περιοχή διαιρείται σε ζώνες (bands), που ορίζονται ως χρωμοσωμικοί τομείς με σκούρο ή ανοιχτό χρώμα. Είναι δυνατή η εμφάνιση «υποζωνών» (subbands), δηλαδή υποδιαιρέσεων των ζωνών, μετά από ζώνωση υψηλής διακριτικότητας, όταν τα κύτταρα βρίσκονται στην πρόιμη μετάφαση. Η αρίθμηση τόσο των ζωνών όσο και των υποδιαιρέσεών τους ακολουθεί τον ίδιο κανόνα με τις περιοχές (εικ. 6). Επομένως, για τον προσδιορισμό μιας συγκεκριμένης υποζώνης απαιτούνται τα εξής:

- ♣ Ο αριθμός του χρωμοσώματος, πχ 11
- ♣ το σύμβολο του βραχίονα, q ή p
- ♣ ο αριθμός της περιοχής, πχ 2
- ♣ ο αριθμός της ζώνης μέσα στην περιοχή, πχ 2
- ♣ και ο αριθμός της υποζώνης, εφόσον είναι εμφανής, πχ 3.

Τα στοιχεία αυτά γράφονται σε σειρά χωρίς κενά ή σημεία στίξης ανάμεσά τους, εκτός από το τελευταίο στοιχείο που χωρίζεται από τα προηγούμενα με μία τελεία (.), πχ. 11q22.3.

Κατά την περιγραφή του καρυοτύπου, αρχικά, αναγράφουμε το συνολικό αριθμό των χρωμοσωμάτων του υπό μελέτη κυττάρου και συνεχίζουμε με κόμμα (,) για να ακολουθήσει ο τύπος των φυλετικών χρωμοσωμάτων. Εάν βρεθούν χρωμοσωμικές ανωμαλίες, αναγράφονται στη συνέχεια, η μία μετά την άλλη με ένα κόμμα (,) ενδιάμεσά τους. Στην περίπτωση αριθμητικής ανωμαλίας, σημειώνουμε συν (+) ή πλην (-) πριν από τον αριθμό του χρωμοσώματος που υπερέχει ή λείπει αντίστοιχα, πχ. 47,XY,+12.

Όσον αφορά στις δομικές χρωμοσωμικές ανωμαλίες, έχουν προταθεί συντημήσεις που αναφέρονται στις αντίστοιχες ατυπίες, οι οποίες παρατίθενται στον πίνακα 7. Μετά από αυτές ακολουθεί σε παρένθεση ο αριθμός του χρωμοσώματος ή του τμήματος που έχει μεταβληθεί. Εάν στην ατυπία συμπεριλαμβάνονται πάνω από ένα χρωμόσωμα, τότε αυτά χωρίζονται με το σύμβολο του ελληνικού ερωτηματικού (;). Πρώτο στην παρένθεση αναγράφεται το φυλετικό χρωμόσωμα, εάν αυτό εμπλέκεται, διαφορετικά, το μικρότερο σε αριθμό χρωμόσωμα. Τα σημεία θραύσης ακολουθούν και σημειώνονται μέσα σε μία άλλη παρένθεση, διαχωρισμένα το ένα από το άλλο με ερωτηματικό. Ωστόσο, όταν τα σημεία θραύσης ανήκουν σε ένα χρωμόσωμα, λόγω εσωτερικής ανακατάταξης, αυτά αναγράφονται συνεχόμενα χωρίς σημείο στίξης.

Παράδειγμα σύνθετου καρυοτύπου:

45,XY,del(6)(q23q27),t(14;19)(q32;q13.2),-17,der(21)t(17;21)(q11.2;q11)

Πίνακας 7. Συντμήσεις χρωμοσωμικών ανωμαλιών

add	Προσθήκη χρωμοσωμικού υλικού άγνωστης προέλευσης
del	Έλλειψη
der	Παράγωγο χρωμόσωμα
h	Συστατική ετεροχρωματίνη,
hsr	Ομοιογενώς χρωματισμένη περιοχή
inv	Αναστροφή
mar	Χρωμόσωμα δείκτης
i	Ισοχρωμόσωμα
dup	Διπλασιασμός
r	Δακτυλιοειδές χρωμόσωμα
ins	Παρεμβολή
t	Μετατόπιση
-	Έλλειψη χρωμοσώματος
+	Προσθήκη χρωμοσώματος

1.3.3 ΜΟΡΙΑΚΗ ΚΥΤΤΑΡΟΓΕΝΕΤΙΚΗ - ΦΘΟΡΙΖΟΝ

ΕΠΙΤΟΠΙΟΣ ΥΒΡΙΔΙΣΜΟΣ

(Fluorescence In Situ Hybridization, FISH)

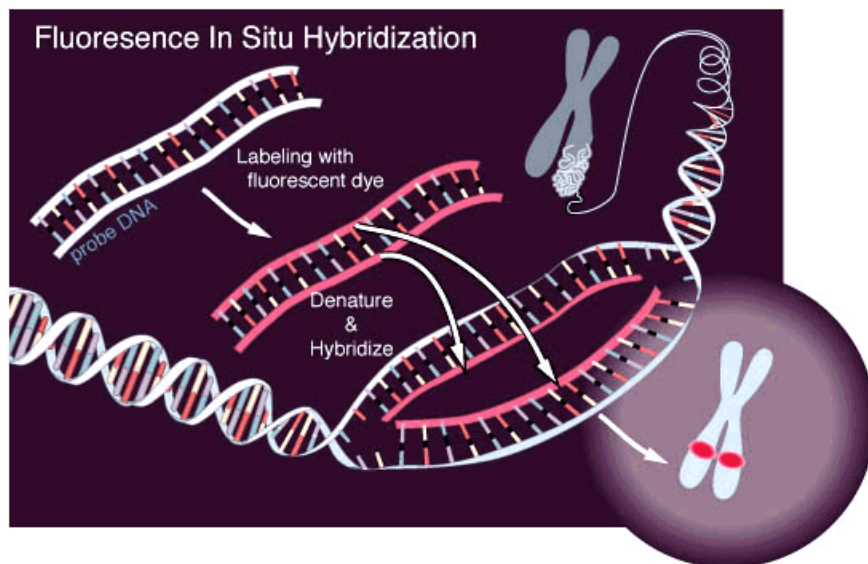
Η αρχή της μεθόδου του φθορίζοντος επιτόπιου ή εντοπισμένου (in situ) υβριδισμού (Fluorescence In Situ Hybridization, FISH) βασίζεται στη συμπληρωματικότητα των βάσεων (αδενίνη-θυμίνη, κυτοσίνη-γουανίνη) των δύο αντιπαράλληλων κλώνων της αλυσίδας του DNA (εικ. 18). Η ιδιότητα αυτή των νουκλεϊκών οξέων επιτρέπει την υβριδοποίηση δύο μονόκλωνων μορίων όταν αυτά έχουν την κατάλληλη - συμπληρωματική ακολουθία. Έτσι όταν το γενωμικό DNA εκτεθεί σε υψηλή θερμοκρασία, οι υδρογονικοί δεσμοί των συμπληρωματικών βάσεων των δύο αλυσίδων σπάζουν και το μόριο αναδιατάσσεται αντιστρεπτά. Αν σε αυτό το περιβάλλον και υπό την κατάλληλη θερμοκρασία βρεθούν μονόκλωνοι ιχνηθέτες - ανιχνευτές (probes) δημιουργούνται δεσμοί υδρογόνου, ανάμεσα στις συμπληρωματικές αλληλουχίες του DNA στόχου και των ιχνηθετών (υβριδισμός) (εικ. 7).

Κατά τον φθορίζοντα in situ υβριδισμό (fluorescence in situ hybridization) οι ιχνηθέτες είναι σημασμένοι με φθοριοχρώματα, μέσω του συστήματος βιοτίνης (βιταμίνη) – στρεπταβιδίνης (γλυκοπρωτεΐνη), και επιτρέπουν την απευθείας μικροσκοπική παρατήρηση σε μικροσκόπιο φθορισμού. Τα σήματα των ιχνηθετών γίνονται ορατά χρησιμοποιώντας ειδικά φίλτρα για τον ακριβή διαχωρισμό των φθοριοχρωμάτων. Έτσι με τον κατάλληλο συνδυασμό φθοριοχρωμάτων διαφόρων μηκών κύματος επιτυγχάνεται η παράλληλη ανίχνευση αρκετών χρωμοσωμικών στόχων στην ίδια πειραματική σειρά. Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται κάποια από τα φθοριοχρώματα που χρησιμοποιούνται στη μέθοδο FISH (πίνακας 8).

Πίνακας 8. Φθοριοχρώματα που χρησιμοποιούνται στην FISH [56]

Fluorochrome	Wavelength ^a		Color
	Excitation (nm)	Emission (nm)	
AMCA	351	450	Blue
Fluorescein-isothiocyanate (FITC)	492	528	Green
5-(6)-carboxyfluorescein-N-hydroxysuccinimide-ester (FluoX™)	488	520	Green
Tetramethyl-rhodamine-isothiocyanate (TRITC)	557	576	Red
Texas Red [®]	578	600	Red
Cyanine Dyes			
Cy3™	550	570	Orange/red
Cy5™	651	674	Infrared

Με τη μέθοδο αυτή είναι δυνατός ο προσδιορισμός μιας συγκεκριμένης αλληλουχίας DNA και κατά συνέπεια ο εντοπισμός των πιθανών αριθμητικών και δομικών χρωμοσωμικών ανωμαλιών. Η μέθοδος αυτή εφαρμόζεται σε μεταφασικά χρωμοσώματα (metaphase FISH) και σε μεσοφασικούς πυρήνες (Interphase FISH) αλλά ακόμα και σε ινίδια χρωματίνης, παρακάμπτοντας έτσι τους περιορισμούς (απουσία, ή κακή μορφολογία μεταφάσεων) που κάποιες φορές προκύπτουν από το χαμηλό μιτωτικό δείκτη των νεοπλασματικών κυττάρων, όπως συμβαίνει και στη ΧΛΛ. Επίσης πλεονέκτημα της συγκεκριμένης μεθόδου έναντι των άλλων κλασικών μοριακών τεχνικών αποτελεί η ικανότητα να προσδιορίσουμε σε ποια και πόσα κύτταρα υπάρχει η αλληλουχία που μας ενδιαφέρει αλλά και να προσδιορίσουμε σε ποιο υποκυτταρικό διαμέρισμα (κυτταρόπλασμα, πυρήνας) αυτή βρίσκεται. Τελικά, σήμερα η FISH χρησιμοποιείται για την ανεύρεση υπομικροσκοπικών στοχευμένων περιοχών, που ενοχοποιούνται για πολλές νεοπλασματικές ασθένειες ή σύνδρομα. Αποτελεί εργαλείο διάγνωσης ποικίλων νόσων, εκτίμησης της πρόγνωσης αλλά και παρακολούθησης της πορείας της νόσου ή της έγκαιρης ανίχνευσης υποτροπών σε περιπτώσεις ασθενών με κακοήθεια.



Εικόνα 7. Η τεχνική της FISH [57].

1.3.3.1 ΜΟΡΙΑΚΟΙ ΙΧΝΗΘΕΤΕΣ

Οι ιχνηθέτες/ανιχνευτές που χρησιμοποιούνται στη FISH είναι ειδικοί για μία μοναδική αλληλουχία και κατασκευάζονται από ενίσχυση του γενωμικού DNA, κλωνοποιημένου σε βιβλιοθήκες από ποικίλους φορείς. Υπάρχουν αρκετά είδη μοριακών ιχνηθετών τα οποία χρησιμοποιούνται ανάλογα με το είδος της υποπτευόμενης χρωμοσωμικής ανωμαλίας που δύναται να βρεθεί κάθε φορά. Παρακάτω παρουσιάζονται τα είδη των διάφορων ανιχνευτών.

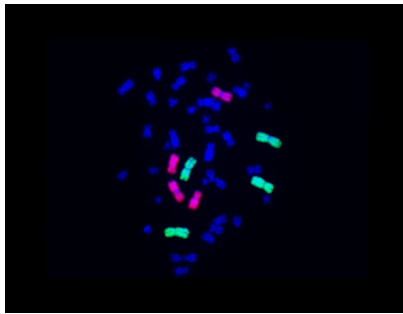
- **Μοριακοί ιχνηθέτες ειδικών περιοχών (Locus Specific Identifier, LSI Probes).** Αυτή η αλληλουχία μπορεί να περιλαμβάνει ένα γνωστό γονίδιο (το οποίο μπορεί να απουσιάζει ή να επαναλαμβάνεται ανώμαλα) ή ένα σημείο θραύσης χαρακτηριστικό μίας ασθένειας. Οι ανιχνευτές αυτοί χρησιμοποιούνται για τη μελέτη δομικών ανωμαλιών στα χρωμοσώματα. Συγκεκριμένα ανιχνεύουν προσθήκες, ελλείψεις, αναστροφές, μεταθέσεις γενετικού υλικού. Στη ΧΛΛ οι τρεις από τους τέσσερις κοινούς ιχνηθέτες που χρησιμοποιούνται στη μέθοδο FISH ανήκουν σε αυτή την κατηγορία.
- **Κεντομεριδιακοί ιχνηθέτες (centromeric probe, CEP).** Ανιχνεύει την απουσία ή υπεραριθμία του χρωμοσωμικού στόχου και με τον τρόπο αυτό ταυτοποιούνται οι μονοσωμίες και οι τρισωμίες συγκεκριμένων χρωμοσωμάτων .
- **Τελομεριδιακοί ιχνηθέτες (subtelomeric probe, SUB probe).** Είναι κατάλληλοι για την ανίχνευση μετατόπισης τελομεριδίων σε άλλο χρωμόσωμα.
Οι ιχνηθέτες για κεντρομερίδια, τελομερή, περιοχών του οργανωτή του πυρηνίσκου και πολυμορφικών δορυφόρων συνίστανται από επαναλαμβανόμενο DNA [αλφα-δορυφορικές αλληλουχίες (alpha-satellite)]
- **Ολοχρωματικοί ιχνηθέτες (whole chromosome painting probe, WCP).** Οι ανιχνευτές αυτοί είναι ειδικοί για ένα ολόκληρο χρωμόσωμα ή ένα βραχίονα χρωμοσώματος και χρησιμοποιούνται κυρίως για την ανίχνευση χρωμοσωμικών μετατοπίσεων.
- **Ειδικοί ιχνηθέτες για υβριδικά γονίδια (LSI Dual Color, Dual Fusion Translocation Probe).** Ανιχνεύουν την ύπαρξη ή μη κάποιου υβριδικού γονιδίου. Τα υβριδικά γονίδια αναγνωρίζονται χρησιμοποιώντας δύο ανιχνευτές με διαφορετικό φθοριόχρωμα για κάθε γονίδιο που συμμετέχει στη μετατόπιση και το τελικό σήμα του υβριδικού γονιδίου είναι σύνθεση των δύο χρωμάτων από το

κάθε γονίδιο. Υπάρχουν αρκετές παραλλαγές της τεχνικής αυτής που με τη χρήση δύο ή περισσότερων χρωμάτων επιτρέπουν την ανίχνευση υβριδικών γονιδίων που δημιουργούνται κυρίως από μετατοπίσεις .

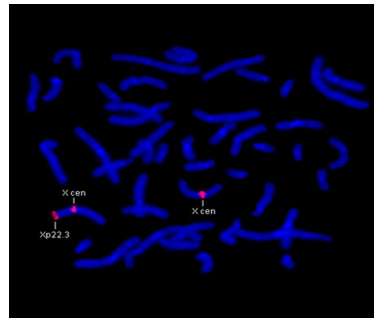
- **Διαιρούμενοι ιχνηθέτες (Split probes) αναδιάταξης διπλού χρώματος (LSI Dual Color, Break Apart Rearrangement Probe)**. Ανιχνεύουν ανακατατάξεις ενός γονιδίου, πχ. θραύση της αλληλουχίας του και μετατόπιση τμήματός του σε άλλο χρωμόσωμα. Η ανίχνευση των γονιδίων που έχουν αναδιαταχθεί ακολουθεί ακριβώς την αντίθετη λογική από αυτή των υβριδικών γονιδίων που περιγράφηκε παραπάνω .

Ανάλογα με τον αριθμό των φλουοροχρωμάτων που χρησιμοποιείται κάθε φορά η τεχνική μπορεί να χαρακτηριστεί είτε ως FISH με ένα χρώμα (single FISH), είτε ως FISH με δύο χρώματα (dual FISH), είτε τέλος ως FISH με περισσότερα χρώματα (multicolor FISH). Κατά την multicolor FISH, πραγματοποιείται ταυτόχρονη υβριδοποίηση διαφορετικά σημασμένων ανιχνευτών και ο προσδιορισμός πολλών διαφορετικών χρωμοσωμάτων ή πολλών διαφορετικών ζωνών κατά μήκος των χρωμοσωμάτων. Η εφαρμογή αυτή είναι ιδιαίτερα χρήσιμη για την επίλυση σύνθετων δομικών ανωμαλιών μειονεκτεί όμως όταν πρόκειται για μικρά θραύσματα χρωμοσωμικού υλικού. Πρόσφατα αναπτύχθηκε η multiplex color FISH η οποία βασίζεται στον ταυτόχρονο υβριδισμό 24 ανιχνευτών που επιτρέπουν την ταυτόχρονη πολυχρωματική κατάδειξη όλων των ανθρώπινων χρωμοσωμάτων [58].

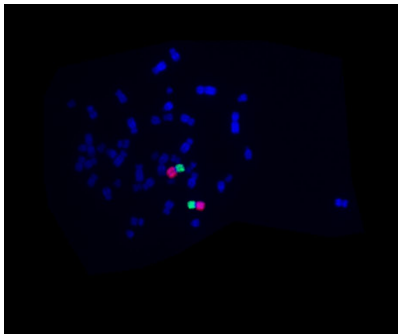
Ολοχρωμοσωματικοί



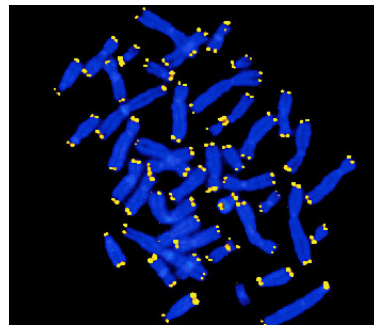
Κεντρομεριδιακός και Γονιδιακός



Ανιχνευτές ειδικοί για βραχίονες p και q



Τελομεριδιακοί



Εικόνα 8: Τύποι μοριακών ανιχνευτών

1.3.4 ΚΥΤΤΑΡΟΓΕΝΕΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΣΤΗ ΧΡΟΝΙΑ

ΛΕΜΦΟΓΕΝΗ ΛΕΥΧΑΙΜΙΑ

Η κυτταρογενετική ανάλυση αποτελεί ένα πολλά υποσχόμενο προγνωστικό εργαλείο για τη ΧΛΛ, ανάμεσα στους κλασικούς κλινικούς και νέους βιολογικούς δείκτες. Όμως μέχρι προσφάτως ο καρυότυπος είχε μικρό προγνωστικό ρόλο στη ΧΛΛ εξαιτίας των τεχνικών προβλημάτων που προκύπτουν από τον περιορισμένο πολλαπλασιασμό των κυττάρων της ΧΛΛ *in vitro*. Όπως ήδη προαναφέρθηκε (βλ. 2.2.3), η πλειοψηφία των παθολογικών κυττάρων της ΧΛΛ δεν πολλαπλασιάζεται *in vitro*, αλλά παραμένει στη φάση G₀ [7]. Αποτέλεσμα είναι ο χαμηλός μιτωτικός δείκτης των κυττάρων, η κακή ποιότητα των μεταφάσεων αλλά και η ανίχνευση κλωνικών χρωμοσωμικών ανωμαλιών μόνο σε ένα πολύ μικρό ποσοστό [59]. Για το λόγο αυτό απαιτείται μιτωτική διέγερση των παθολογικών κυττάρων ώστε ο ήδη υπάρχων παθολογικός κλώνος να προχωρήσει στη φάση της μίτωσης και να ανιχνευτεί στον καρυότυπο.

Κατά καιρούς έχουν αξιολογηθεί αρκετά μιτογόνα για την ανεύρεση του καταλληλότερου διεγέρτη των κυττάρων της ΧΛΛ. Αρχικά, χρησιμοποιήθηκε το μόριο-συνδέτης CD40L, το οποίο βελτίωσε ικανοποιητικά την ανίχνευση μεταφάσεων, ωστόσο δεν ήταν εφαρμόσιμο στη διάγνωση σε επίπεδο ρουτίνας [60]. Ένας άλλος, διεγέρτης που χρησιμοποιείται ευρέως έως και σήμερα, είναι το είναι 12-*O*-Tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) χωρίς όμως να δίνει ικανοποιητικά αποτελέσματα. Έτσι ακόμα και με την παρουσία των παραπάνω διεγερτών η ανίχνευση κλωνικών χρωμοσωμικών ανωμαλιών παραμένει προβληματική αφού ανέρχεται μόνο στο 40-50% των περιπτώσεων [61].

Προσφάτως προτάθηκε στη βιβλιογραφία ένας καινούριος συνδυασμός διεγερτών, CpG-ολιγονουκλεοτίδιο DSP-30 και ιντερλευκίνη-2 (IL-2), ως ο καταλληλότερος γιατί επάγει αποτελεσματικά τον κυτταρικό κύκλο των κυττάρων της ΧΛΛ *in vitro* και καθιστά εφικτή την ανίχνευση χρωμοσωμικών ανωμαλιών στον καρυότυπο σε ποσοστό έως και 83%. Το ποσοστό αυτό θεωρείται αξιόλογο αφού είναι συγκρίσιμο, αν όχι μεγαλύτερο, με αυτό που ανευρίσκεται με τη μέθοδο FISH (~80%) όταν χρησιμοποιούνται οι ειδικοί για τη ΧΛΛ ιχνηθέτες [50]. Έκτοτε ακολούθησαν αρκετές μελέτες ενώ άλλες διενεργούνται έως και σήμερα προς επιβεβαίωση του συγκεκριμένου συνδυασμού διεγερτών ως τον καταλληλότερο

[62,63]. Τα τελευταία δεδομένα πάντως δείχνουν ότι η γενωμική πολυπλοκότητα που χαρακτηρίζει τη ΧΛΛ μπορεί να γίνει ανιχνεύσιμη στον καρυότυπο διεγείροντας *in vitro* τα κύτταρα της ΧΛΛ με το συνδυασμό μιτογόνων DSP-30/IL-2, ιδιαίτερα στις περιπτώσεις εκείνες που στη FISH εμφανίζονται φυσιολογικά πρότυπα υβριδισμού [64].

1.3.4.1 ΧΡΩΜΟΣΩΜΙΚΕΣ ΑΝΩΜΑΛΙΕΣ ΣΤΗ ΧΡΟΝΙΑ ΛΕΜΦΟΓΕΝΗ ΛΕΥΧΑΙΜΙΑ ΚΑΙ ΠΡΟΓΝΩΣΤΙΚΗ ΑΞΙΑ

Γενικά, οι χρωμοσωμικές αλλοιώσεις που σχετίζονται με νεοπλασίες μπορούν να καταταχθούν σε τρία είδη: 1) τις πρωτογενείς, που συνιστούν απαραίτητη προϋπόθεση για την εγκαθίδρυση του όγκου, 2) τις δευτερογενείς, που αναπτύσσονται αργότερα, αλλά είναι καθοριστικές για την εξέλιξη της νόσου καθώς μπορεί να αλλάξουν σημαντικά την πρόγνωση ενός ασθενούς και 3) τις τυχαίες ασήμαντες μεταλλαγές [42]. Οι πρωτογενείς αλλοιώσεις σχετίζονται άμεσα με το νεόπλασμα και συχνά απαντώνται ως μοναδικές ανωμαλίες στα πρώιμα στάδια της καρκινογένεσης σε αντίθεση με τις δευτερογενείς οι οποίες συνήθως συνυπάρχουν με τις πρωτογενείς σε ήδη μεταλλαγμένα κύτταρα [42].

Η ΧΛΛ χαρακτηρίζεται κυρίως από μη ισοζυγισμένες ανωμαλίες, οι οποίες περιλαμβάνουν: τρισωμίες, απώλεια χρωμοσωμικού υλικού, μη αμοιβαίες μετατοπίσεις και σπανιότερα ισοζυγισμένες ανακατατάξεις, όπως αμοιβαίες μετατοπίσεις. [42]. Οι κυριότερες, πιο συχνές και περισσότερο μελετημένες χρωμοσωμικές ανωμαλίες που έχουν σχετιστεί με τη ΧΛΛ, κατά σειρά μειούμενης συχνότητας που ανευρίσκονται στον καρυότυπο είναι η τρισωμία 12 (+12), η έλλειψη στο μεγάλο βραχίονα του χρωμοσώματος 13 [**del(13q)**], η έλλειψη στο μεγάλο βραχίονα του χρωμοσώματος 11 [**del(11q)**], και η έλλειψη στο μικρό βραχίονα του χρωμοσώματος 17 [**del(17p)**]. Οι δύο τελευταίες ελλείψεις συνήθως ανευρίσκονται ως δευτερογενείς αλλοιώσεις κατά την εξέλιξη της νόσου με σαφώς χειρότερη πρόγνωση για τον ασθενή [42]. Όλες οι παραπάνω ανωμαλίες απαντώνται κατά κύριο λόγο ανεξάρτητα η μία από την άλλη. Οποιοσδήποτε όμως συνδυασμός τους είναι δυνατόν να βρεθεί σε κλώνο και να έχει διαφορετική επίπτωση (συνήθως χειρότερη) στην πρόγνωση του ασθενούς. Παρακάτω παρουσιάζονται αναλυτικά οι ειδικές για τη ΧΛΛ χρωμοσωμικές ανωμαλίες.

Η τρισωμία 12 είναι η συχνότερη αναφερθείσα αλλοίωση της ΧΛΛ που ανευρίσκεται στον καρυότυπο εξαιτίας της εύκολης ανίχνευσής της. Η συχνότητα της ανέρχεται στο 10-20% των ασθενών [64]. Έχει σχετιστεί με ενδιάμεση πρόγνωση αφού θεωρείται ότι έχει χειρότερη πρόγνωση από τον φυσιολογικό καρυότυπο ή την **del(13q)**, αλλά καλύτερη αν συγκριθεί με τις **del(11q)** και **del(17p)** χρωμοσωμικές αλλοιώσεις [65]. Η τρισωμία 12 συναντάται συχνά σε παραλλαγές της ΧΛΛ όπως η

Προλεμφοκυτταρική Λευχαιμία και η άτυπη ΧΛΛ οπότε και έχει συνδεθεί με την άτυπη μορφολογία της νόσου ή τον άτυπο ανοσοφαινότυπο [28,64].

Το τρίτο χρωμόσωμα 12 έχει αποδειχθεί ότι προέρχεται κυρίως από διπλασιασμό του ενός χρωμοσώματος και διατήρηση του άλλου ομολόγου [65]. Σε ορισμένες περιπτώσεις η τρισωμία 12 συνοδεύεται από επιπρόσθετες γενετικές βλάβες, όπως *del(6q)*, *del(13)(q14)*, *t(14;19)(q32;q13)* (συμβαίνει σύντηξη *IGH-BCL3* γονιδίων), *t(14;18)(q32;q21)* (συμβαίνει σύντηξη *IGH-BCL2*) και *del(14)(q24q32)* (σημείο θραύσης στο *IGH*) [42,44]. Επιπροσθέτως ανιχνεύεται παράλληλα με την τρισωμία 19 ή 18 χωρίς όμως να είναι γνωστό αν αποτελεί πρωτογενή ή δευτερογενή αλλοίωση [42].

Όσον αφορά τα γονίδια που εντοπίζονται στην περιοχή 12q, δεν έχουν χαρακτηριστεί επαρκώς αυτά που ενοχοποιούνται για την παθογένεια της ΧΛΛ. Γενικά, μοριακές τεχνικές έχουν δείξει ότι τα γονίδια αυτά μεταγράφονται σε μεγαλύτερο βαθμό στην τρισωμία σε σύγκριση με τα φυσιολογικά κύτταρα, αλλά σε επίπεδο πρωτεΐνης δεν υπάρχουν διαφορές, υποδηλώνοντας την ενεργοποίηση μετα-μεταφραστικών μηχανισμών [44]. Στην περιοχή όμως 12q13-q15 εντοπίζονται γονίδια ελέγχου της ογκογένεσης, ρύθμισης του κυτταρικού κύκλου και της απόπτωσης, όπως *CDK2*, *CDK4* (κινάσες εξαρτώμενες από κυκλίνες), *STAT6*, *APAF-1* (αποπτωτικό) και *MDM-2* [44]. Ειδικά η πρωτεΐνη του τελευταίου γονιδίου (*MDM-2*) προσδένεται φυσιολογικά στη μη φωσφορυλιωμένη πρωτεΐνη του ογκοκατασταλτικού γονιδίου *TP53* (p53), προκαλώντας την καταστροφή της. Έτσι στην τρισωμία 12, τα επίπεδα του ελεύθερου p53 μειώνονται δραστικά αφού η *MDM-2* υπερεκφράζεται [28]. Επιπροσθέτως το πιθανώς πρώτο ταυτοποιημένο ειδικό για τη ΧΛΛ γονίδιο, *CLL1* που εντοπίζεται στην περιοχή 12q22, έχει προταθεί ως ανεξάρτητος προγνωστικός δείκτης για τους ασθενείς ηλικίας <70 ετών αφού η υπερέκφρασή του σχετίζεται με μικρότερη επιβίωση [64]. Η υπερέκφραση όμως αυτή δεν έχει αποδειχθεί ότι συνδέεται με την τρισωμία 12 [66].

Η έλλειψη στο μεγάλο βραχίονα του χρωμοσώματος 13 αφορά συνήθως σε ενδιάμεση έλλειψη στη ζώνη 13q14 ή μεγαλύτερης περιοχής που την περιλαμβάνει. Ειδικότερα η *del(13)(q14.3)* είναι η πιο κοινή χρωμοσωμική αλλοίωση της ΧΛΛ καταλαμβάνοντας το 40-60% των περιπτώσεων. Ωστόσο το μεγαλύτερο ποσοστό είναι μη ανιχνεύσιμο στον καρυότυπο αφού η συγκεκριμένη έλλειψη είναι υπομικροσκοπική, καθιστώντας τη μέθοδο FISH μοναδικό εργαλείο για την ανίχνευσή της στα περισσότερα από τα μισά περιστατικά [65]. Η *del(13)(q14)*

απαντάται κυρίως ως πρωτογενής αλλοίωση σε πρώιμο στάδιο και συνδέεται σχεδόν αποκλειστικά με το μεταλλαγμένο τύπο της ΧΛΛ [67]. Σε αντίθεση με τις άλλες ειδικές χρωμοσωμικές ανωμαλίες, η del(13)(q14.3) μπορεί να βρεθεί και σε ομόζυγη κατάσταση (στο 24% των περιστατικών) όπου η έλλειψη του δεύτερου αντιγράφου συμβαίνει σε ένα πιο προχωρημένο στάδιο της νόσου [64].

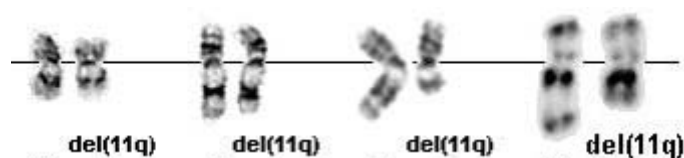
Ως μοναδική γενετική βλάβη έχει καλή πρόγνωση ενώ αξιολογείται ότι είναι το γεγονός ότι η πρόγνωσή της είναι ακόμα καλύτερη από αυτή του φυσιολογικού καρυοτύπου. Όταν όμως βρίσκεται σε συνδυασμό με άλλες γενετικές βλάβες τότε η πρόγνωση χειροτερεύει και ίσως αυτό να προκαλείται από τη δευτερογενή αλλοίωση [50]. Πρόσφατα δεδομένα περιπλέκουν τα προηγούμενα, αφού συσχετίζουν την πρόγνωση με το ποσοστό των κυττάρων που φέρουν την έλλειψη είτε το μέγεθος της έλλειψης [68,69]. Έτσι αν τα κύτταρα των ασθενών που φέρουν 13q- είναι >80% τότε οι ασθενείς αυτοί εμφανίζουν μικρότερη επιβίωση και μικρότερο χρόνο για την πρώτη θεραπεία σε σχέση με αυτούς που εμφανίζουν την έλλειψη σε ποσοστό <80% [64]. Επίσης τα σημεία τομής είναι ετερογενή με αποτέλεσμα να δημιουργούνται διαφορετικά μεγέθη ελλείψεων που κυμαίνονται από ~300kbp έως και >70mbp [64]. Οι μεγαλύτερες ελλείψεις έχουν προσφάτως συνδεθεί με πιο επιθετική νόσο [64]. Μελέτες ετών έχουν δείξει ότι στην περιοχή της έλλειψης εδράζεται το καλά μελετημένο ογκοκατασταλτικό γονίδιο του ρετινοβλαστώματος, *RB1*, το οποίο θεωρείται «ελεγκτής» του κυτταρικού κύκλου, καθώς ρυθμίζει τη μετάβαση των κυττάρων από τη φάση G₁ στη φάση S. Μεταλλαγές στο ένα ή στα δύο αλληλόμορφα του συγκεκριμένου γονιδίου προδιαθέτουν ισχυρά για καρκινογένεση. Η παντελής έλλειψή του *RB1* είναι σπάνια στη ΧΛΛ αλλά ετερόζυγη έλλειψη παρατηρείται στο 30% των ασθενών. Ωστόσο, ορισμένοι ερευνητές θεωρούν ότι το *RB1* δεν εμπλέκεται στην παθογένεια της νόσου [42]. Επίσης επιπλέον γενετικοί τόποι περιφερειακά της 13q14, όπως οι D13S25 και D13S319 έχουν ταυτοποιηθεί και συχνά σχετίζονται με τη νόσο. Πάντως έως και σήμερα, συνεχίζονται οι προσπάθειες για τον ακριβή χαρακτηρισμό αυτών των περιοχών με αποτέλεσμα να έχουν προταθεί 8 υπεύθυνα γονίδια, τα *Leu-1*, *Leu-2*, *Leu-5*, *CLLD6-CLLD8*, *KPNA3* και *LOC511131*, που κανένα όμως από αυτά δεν έχει δώσει υποσχόμενα αποτελέσματα [2]. Πλέον οι περισσότερες μελέτες κάνουν λόγο για έναν πολύπλοκο ρυθμιστικό επιγενετικό ογκοκατασταλτικό μηχανισμό που ελέγχει την έκφραση της συγκεκριμένης περιοχής [64].

Από την άλλη πρόσφατα βιβλιογραφικά δεδομένα αναδεικνύουν το ρόλο που έχουν στη ΧΛΛ μη κωδικοποιούσες περιοχές του γονιδιώματος. Πιο συγκεκριμένα, περιοχές που εντοπίζονται τα γονίδια των micro-RNAs, τα οποία ρυθμίζουν τη γονιδιακή έκφραση άλλων γονιδίων είτε αποδομώντας το mRNA τους είτε εμποδίζοντας τη μετάφρασή τους [41]. Τα miRs εμφανίζουν διττή σημασία για τη γονιδιακή έκφραση αφού έχοντας ως στόχους διαφορετικά γονίδια μπορούν να δράσουν ως ογκογονίδια ή ως ογκοκατασταλτικά [41]. Ειδικότερα, το 68% των ασθενών με ΧΛΛ εμφανίζει έλλειψη ή αδρανοποίηση των *miR15a* και *miR16-1*, που εντοπίζονται στη θέση 13q14.3 μαρτυρώντας την εμπλοκή τους στην παθογένεια της νόσου [64]. Αποτέλεσμα της δυσλειτουργίας αυτής είναι η υπερέκφραση της αντιαποπτωτικής πρωτεΐνης BCL-2 με συνέπεια το παθολογικό κύτταρο να παρουσιάζεται ανθεκτικότερο στο θάνατο μέσω απόπτωσης [41]. Ακόμα, υποψήφιο στόχο των συγκεκριμένων miRs, αποτελεί και το γονίδιο *TCL1*, του οποίου ο φυσιολογικός ρόλος είναι η επαγωγή της κυτταρικής επιβίωσης. Άρα, η έλλειψη ή αδρανοποίηση των *miR15a/16-1* προκαλεί την αύξηση της πρωτεΐνης TCL1 με αποτέλεσμα το παθολογικό κύτταρο να αποφεύγει τον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο [7]. Γενικότερα, τα *miR15a/16-1* φαίνεται να ρυθμίζουν την έκφραση αρκετών γονιδίων που εμπλέκονται στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την κυτταρική απόπτωση, ενώ αρκετές μελέτες έχουν συνδέσει την έλλειψη τους με τη μονοκλωνική β λεμφοκυττάρωση η οποία τελικά οδηγεί σε ΧΛΛ με μικρή διεισδυτικότητα [70]. Τέλος η σημασία και ο λειτουργικός ρόλος των *miR15a/16-1* στη ΧΛΛ ενισχύεται από το γεγονός ότι παρόμοιες μεταλλάξεις απουσιάζουν από άλλα είδη καρκίνου.

Η έλλειψη στο μεγάλο βραχίονα του χρωμοσώματος 11. (εικ. 28) συναντάται στο ~15% των ασθενών με ΧΛΛ, οι οποίοι μάλιστα είναι μικρότερης ηλικίας [64]. Οι ασθενείς αυτοί εμφανίζουν γρήγορη εξέλιξη, ενώ εκδηλώνουν τα περισσότερα β- συμπτώματα της νόσου όπως εκτεταμένες ογκώδεις αδenoπάθειες [64]. Επίσης φέρουν τον αμετάλλακτο τύπο της νόσου, γεγονός που συνάδει με τη μικρή επιβίωση και την επιθετική νόσο που εμφανίζουν [41]. Συμπερασματικά, η del(11q) συνδέεται την κακή πρόγνωση [41].

Η μικρότερη περιοχή που απουσιάζει στην έλλειψη αυτή είναι η 11q22.3 – 23.1, η οποία περιλαμβάνει τα γονίδια *ATM*, *FDX*, *MLL*, *PZLF*, *Mre11* και *RDX*. Το πιο γνωστό και ενοχοποιημένο για κακοήθεια γονίδιο είναι το *ATM* το όνομα του οποίου έχει προκύψει από το αυτοσωμικό υπολειπόμενο σύνδρομο της αταξίας

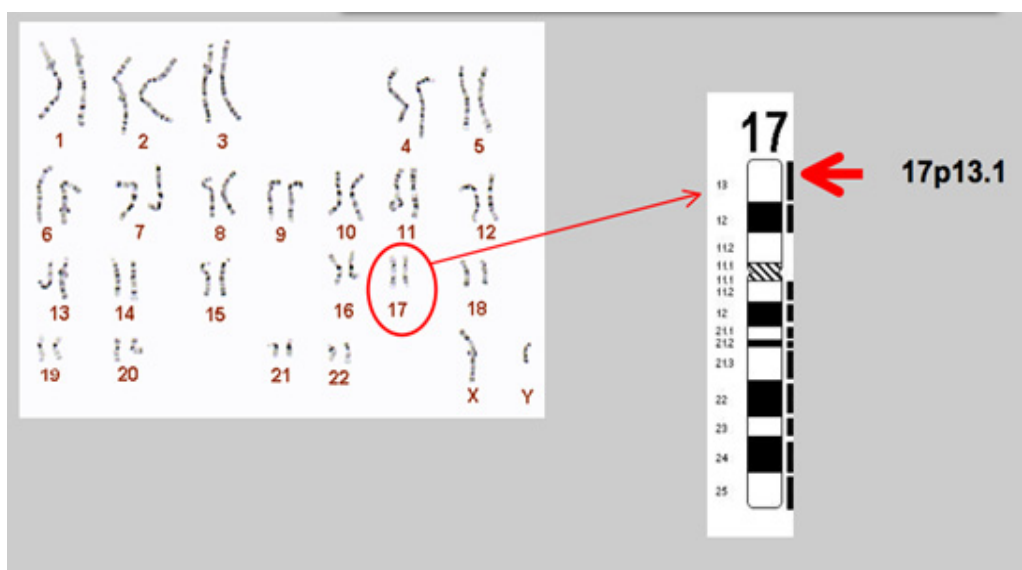
τηλεγγειεκτασίας. Το σύνδρομο αυτό εκδηλώνεται με νευρολογικές ανωμαλίες, στειρότητα, βλάβες στο DNA λόγω επαγόμενης υπερευαισθησίας στην ακτινοβολία και αυξημένη επιδεκτικότητα σε ποικίλες μορφές καρκίνου. Ο φυσιολογικός ρόλος του γονιδίου αυτού έγκειται στην ενεργοποίηση των σημείων ελέγχου (check points) του κυτταρικού κύκλου, προκαλώντας απόπτωση σε απάντηση των σπασιμάτων που δημιουργούνται στη δίκλωνη έλικα του DNA επεμβαίνοντας, κατά τον τρόπο αυτό, άμεσα στην επιδιόρθωσή του. Η έλλειψη του *ATM* έχει ενοχοποιηθεί για την αυξημένη επιθετικότητα αλλά και την κλωνική εξέλιξη της νόσου εξαιτίας των νέων γενετικών κλωνικών αλλοιώσεων που δημιουργούνται από την αποτυχημένη επιδιόρθωση του DNA [64].



Εικόνα 9. Έλλειψη στο μεγάλο βραχίονα του χρωμοσώματος 11 [65].

Η Έλλειψη στο μικρό βραχίονα του χρωμοσώματος 17 απαντάται στο 3-8% των ασθενών με ΧΛΛ συνδέεται με εξαιρετικά κακή πρόγνωση και με το μη μεταλλαγμένο τύπο της νόσου. Οι ασθενείς αυτοί εκδηλώνουν γρήγορη εξέλιξη μέσα σε 1 με 2 χρόνια εμφανίζοντας έντονη κλινική συμπτωματολογία, όπως εκτεταμένη σπληνομεγαλία και λεμφαδενοπάθεια, φτωχή απάντηση στη χημειοθεραπεία και τελικά σύντομη επιβίωση [64]. Το ποσοστό δε, των κυττάρων που εμφανίζουν *del(17p)* φαίνεται να σχετίζεται με την πρόγνωση της νόσου. Έχει αποδειχθεί ότι η παρουσία της έλλειψης σε ποσοστό κυττάρων > 20% συνδέεται με χειρότερη πρόγνωση σε σύγκριση με τους υπόλοιπους ασθενείς της κατηγορίας αυτής [64]. Επίσης το ποσοστό των κυττάρων που φέρουν την έλλειψη φαίνεται να αυξάνεται σε ασθενείς που δεν ανταποκρίνονται στη θεραπεία ή που υποτροπιάζουν αμέσως μετά [41]. Γενικότερα, στους νοσούντες που φέρουν τη συγκεκριμένη έλλειψη συστήνεται η αλλογενής μεταμόσχευση μυελού των οστών [71]. Γέφυρα προς την αλλογενή μεταμόσχευση αποτελεί και η μοναδική ενδεδειγμένη θεραπεία με χημιαϊκό μονοκλωνικό αντίσωμα εναντίον του μορίου CD52 η δραστικότητα του οποίου εκτιμάται μεγαλύτερη, όταν η νόσος εντοπίζεται στο μυελό των οστών [72].

Η έλλειψη περιλαμβάνει πάντα τη ζώνη 17p13, στην οποία εδράζεται το γνωστό ογκοκατασταλτικό γονίδιο *TP53*, συνήθως όμως καλύπτει το μεγαλύτερο μέρος του μικρού βραχίονα του χρωμοσώματος 17. Η ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη p53 παίζει ουσιαστικό ρόλο στην επαγωγή της απόπτωσης και στην αναστολή του κυτταρικού κύκλου μετά από βλάβες στο DNA. Επίσης συμμετέχει στην αγγειογένεση αλλά και στους επιδιορθωτικούς μηχανισμούς του DNA με εκτομή, όταν αυτό βλάπτεται. Έτσι τυχόν χρωμοσωμικές ανωμαλίες στο μικρό βραχίονα του χρωμοσώματος 17 έχουν ως συνέπεια τη διατάραξη της γενωμικής ακεραιότητας, γεγονός που τις συνδέει την ιδιαίτερα κακή πρόγνωση. Οι χρωμοσωμικές μεταλλάξεις στο γονίδιο *TP53* παρατηρούνται σε όψιμο στάδιο της νόσου και εμφανίζονται στο 30% των ασθενών με εκτροπή σε σύνδρομο Richter.



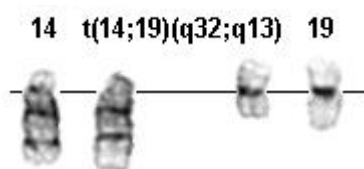
Εικόνα 10. Καρυότυπος που φέρει del(17p) και η θέση εντόπισης γονιδίου *TP53* στο ανθρώπινο γονιδίωμα.

Η έλλειψη στο μεγάλο βραχίονα του χρωμοσώματος 6 ανιχνεύεται σποραδικά και σχετικά σπάνια σε ασθενείς με ΧΛΛ, αλλά κατ' επανάληψη σε ποσοστό ~6% [64]. Κυρίως συναντάται στο Λέμφωμα από μικρά Λεμφοκύτταρα (SLL) [44]. Συγκεκριμένα στη ΧΛΛ, η περιοχή που κατά κύριο λόγο λείπει είναι η 6q21-23 [73]. Η del(6q) συνδέεται με πιο εμφανή λεμφοκυττάρωση μη τυπικής μορφολογίας, και σπληνομεγαλία ενώ σχετίζεται με υψηλά ποσοστά θετικότητας του δείκτη CD38 και δεν συνδέεται με τη μεταλλαγμένη κατάσταση του γονιδίου *IGHV*

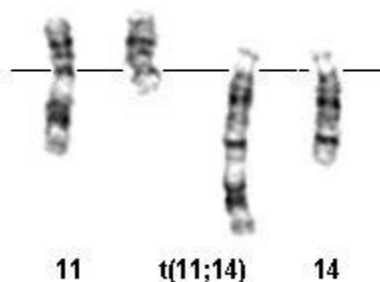
[64]. Έτσι τα τελευταία δεδομένα στη ΧΛΛ δείχνουν ότι η $del(6)(q21)$ συνδέεται με κακή πρόγνωση [65].

Οι αλλοιώσεις του χρωμόσωματος 14 ανιχνεύονται στο 6-14% των περιστατικών με ΧΛΛ και συχνότερα οφείλονται σε μετατοπίσεις ή προσθήκη χρωμοσωμικού υλικού, παρά σε έλλειψη. Το χρωμόσωμα 14 περιέχει το γονίδιο της βαριάς αλυσίδας της ανοσοσφαιρίνης Ig στη ζώνη q32 η οποία συμμετέχει σε χρωμοσωμικές μετατοπίσεις [65]. Μία από αυτές που έχει παρατηρηθεί επαναλαμβανόμενα στη ΧΛΛ είναι η $t(14;19)(q32;q13)$ (εικ. 11) όπου στην περιοχή 19q13 βρίσκεται το γονίδιο *BCL3* το οποίο ενοχοποιείται για την παθογένεια της νόσου ενώ αρκετές φορές συνδυάζεται με τρισωμία 12 [42]. Η μετατόπιση αυτή σχετίζεται με άτυπη μορφολογία κυττάρων ενώ οι ασθενείς που τη φέρουν εμφανίζουν νεαρή ηλικία και με ταχεία εξέλιξη της νόσου [65].

Στις σπάνιες μεν, αλλά κατά επανάληψη δε, παρατηρούμενες μετατοπίσεις ανήκουν οι: $t(11;14)(q13;q32)$, $t(2;14)(p13;q32)$, $t(14;18)(q32;q21)$ και $t(8;14)(q24;q32)$. Η μετάθεση $t(11;14)(q13;q32)$ στην οποία εμπλέκεται το γονίδιο *CCND1*, συναντάται στη ΧΛΛ σε μικρό ποσοστό, ενώ θεωρείται χαρακτηριστική του Λεμφώματος από κύτταρα του Μανδύα (MCL) [42,44] (εικ. 12). Η $t(2;14)(p13;q32)$, $t(14;18)(q32;q21)$ και $t(8;14)(q24;q32)$ οδηγούν στο σχηματισμό των υβριδικών γονιδίων *IGH-BCL11A*, *IGH-BCL2* και *IGH-MYC* αντίστοιχα [42].



Εικόνα 11. Μετάθεση μεταξύ των χρωμοσωμάτων 14 και 19 όπου εμπλέκονται οι περιοχές 14q32 και 19q13 [65].



Εικόνα 12. Μετάθεση μεταξύ των χρωμοσωμάτων 11 και 14 όπου εμπλέκονται οι περιοχές 11q13 και 14q32, $t(11;14)(q13;q32)$ [59].

Άλλες σπάνιες χρωμοσωμικές ανωμαλίες όπως οι t(18;22)(q21;q11) και t(2;18)(p12;q21) αναφέρονται ως δευτερογενείς αλλοιώσεις σε περιστατικά της ΧΛΛ που φέρουν τρισωμία 12, αλλά ταυτόχρονα ανευρίσκονται και σε περιστατικά καλοήθους λεμφοκυττάρωσης [42]. Οι τρισωμίες των χρωμοσωμάτων 3, 8 και 18, καθώς και αλλοιώσεις των περιοχών 2p24-25, 3q26-27, και 8q24, ανήκουν στο ευρύ φάσμα κυτταρογενετικών ανωμαλιών που απαντώνται σπάνια αλλά επαναλαμβανόμενα στη ΧΛΛ και, συνεπώς, βρίσκονται κάτω από το πρίσμα εκτενέστερων ερευνών [64]. Τέλος 2 περιστατικά με 5q- ως μοναδικές ανωμαλίες έχουν αναφερθεί στη ΧΛΛ που πιθανότατα συνδέονται με τη βραδεία εξέλιξη της νόσου [74].

Ο σύνθετος καρυότυπος (ανίχνευση ≥ 3 χρωμοσωμικών αλλοιώσεων στον καρυότυπο) ανευρίσκεται στο ~20% των περιστατικών της ΧΛΛ, αποτελώντας συνήθως σημάδι εξέλιξης της νόσου. Οριοθετεί δε, ένα υποσύνολο ασθενών με προοδευτική και επιθετική νόσο, μικρή επιβίωση, καθώς και μειωμένη θεραπευτική αποτελεσματικότητα [64].

Σύμφωνα λοιπόν με τα παραπάνω, οι χρωμοσωμικές ανωμαλίες μπορούν να σχετιστούν με καλή, ενδιάμεση ή κακή πρόγνωση. Στην πρόγνωση περιλαμβάνεται η μέση επιβίωση και η ποιότητα ζωής των ασθενών. Με εξαίρεση τις βασικότερες χρωμοσωμικές ανωμαλίες της ΧΛΛ, οι οποίες παρουσιάζονται συνοπτικά στον παρακάτω πίνακα, η πρόγνωση για τις υπόλοιπες, σχετιζόμενες με τη ΧΛΛ, αλλοιώσεις δεν έχει ακόμα εξακριβωθεί (πίνακας 9). Επιπροσθέτως ο μεταλλαγμένος τύπος της ΧΛΛ σχετίζεται με καλή πρόγνωση και μεγάλη επιβίωση με μέσο όρο περίπου τα 25 έτη, ενώ χαρακτηριστική χρωμοσωμική ανωμαλία του τύπου αυτού αποτελεί η del(13q). Σε αντίθεση, ο αμετάλλακτος τύπος συνδέεται με τις κακής πρόγνωσης ελλείψεις del(17p) και del(11q) αλλά και με τη μικρή επιβίωση των ασθενών [75]. Στον πίνακα 9 που ακολουθεί παρουσιάζεται η προγνωστική αξία των βασικότερων αλλοιώσεων της ΧΛΛ και σχετίζεται με το καλής ή κακής πρόγνωσης πρότυπο μεταλλάξεων στην υπερμεταβλητή περιοχή του γονιδίου της ανοσοσφαιρίνης (IGH)

Πίνακας 9. Προγνωστική σημασία χρωμοσωμικών ανωμαλιών στη ΧΑΛ και συσχετίσή τους με το πρότυπο υπερμεταλλάξεων [67,76]

ΑΝΩΜΑΛΙΑ	ΠΡΟΓΝΩΣΗ	Μεταλλαγμένο VH N= 132 (44%)	Αμετάλλακτο VH N= 168 (56%)
del(13)(q14)	Καλή	65%	48%
+12	Ενδιάμεση	15%	19%
del(11)(q22)	Κακή	4%	27%
del(17)(p13)	Κακή	3%	10%
del(6q)	Κακή (?)	?	?
Αναδιατάξεις του 14q32	Κακή	?	?
Σύνθετος καρύοτυπος	Κακή	?	?

1.3.4.2 Η ΣΥΜΒΟΛΗ ΤΗΣ ΚΥΤΤΑΡΟΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΣΤΗ ΧΛΛ

Όπως περιγράφηκε αναλυτικότερα παραπάνω (§2.3.2) με τον καρυότυπο επιτρέπεται η μελέτη του γονιδιώματος των ασθενών με ΧΛΛ σε επίπεδο χρωμοσωμάτων. Με τον τρόπο αυτό παρέχεται η δυνατότητα ελέγχου ολόκληρου του γονιδιώματος και επομένως καθίσταται δυνατή η ταυτοποίηση όλων των ορατών στο οπτικό μικροσκόπιο, χρωμοσωμικών ανωμαλιών που συνδέονται με τη νόσο. Επίσης καθίσταται δυνατή η ανίχνευση της γενετικής πολυπλοκότητας της νόσου, αφού με τον τρόπο αυτό αναδεικνύεται ο σύνθετος καρυότυπος ο οποίος αποτελεί αρνητικό προγνωστικό δείκτη, όπως ήδη ειπώθηκε.

Η ΧΛΛ όμως, έχει συνδεθεί και με μικροσκοπικές αλλοιώσεις που δε δύναται να ανιχνευτούν στον καρυότυπο με προγνωστική αξία και αντίκτυπο στη θεραπεία των ασθενών αλλά και σημαντικό ρόλο στη διάγνωση της νόσου. Οι υπομικροσκοπικές αυτές αλλοιώσεις είναι δυνατόν να αναδειχτούν μέσω της FISH ανάλυσης η οποία επιτρέπει τον προσδιορισμό μιας συγκεκριμένης αλληλουχίας DNA και κατά συνέπεια καθίσταται δυνατή η με ακρίβεια διερεύνηση των ειδικών αυτών μικροσκοπικών αλλοιώσεων. Επίσης η FISH παρακάμπτει τους περιορισμούς που επιβάλλει ο χαμηλός μιτωτικός δείκτης των κυττάρων της ΧΛΛ και η κακή ποιότητα των μεταφάσεων καθώς εφαρμόζεται κυρίως σε μεσοφασικούς πυρήνες.

Από τα παραπάνω γίνεται αντιληπτό ότι οι δύο κυτταρογενετικές μέθοδοι μπορεί να έχουν διαφορετικές εφαρμογές αλλά είναι εξίσου χρήσιμες αφού εξυπηρετούν τον ίδιο σκοπό προσφέροντας τα μέγιστα στη διερεύνηση της νόσου στην κλινική πράξη αλλά και την έρευνα. Κατά τον τρόπο αυτό η κυτταρογενετική ανάλυση στη ΧΛΛ συμβάλλει:

- Στην ακριβή διάγνωση της νόσου αφού με τις 2 παραπάνω μεθόδους είναι δυνατόν να ανιχνευτούν οι κυτταρογενετικές ανωμαλίες που έχουν σχετιστεί με τη νόσο.
- Στην καθιέρωση αξιόπιστων και εύχρηστων προγνωστικών δεικτών, οι οποίοι παρέχουν πληροφορία για ενδεχόμενη κυτταρογενετική ύφεση ή υποτροπή. Ο κυτταρογενετικός έλεγχος σε τακτά χρονικά διαστήματα μπορεί να πληροφορεί για τη διάρκειά της ύφεσης, αλλά και τον κίνδυνο της κυτταρογενετικής υποτροπής με απώτερο στόχο τον καλύτερο υπολογισμό της επιβίωσης του ασθενούς.

-
- Στην επιλογή των καταλληλότερων, αποτελεσματικότερων θεραπευτικών στρατηγικών ιδιαίτερα στις περιπτώσεις των ασθενών που φέρουν ανθεκτικές στα συνηθισμένα σχήματα θεραπείας, χρωμοσωμικές αλλοιώσεις [π.χ. del(17p)] έτσι ώστε να αποφευχθούν φαινόμενα υποτροπής και να αυξηθεί ο χρόνος και η ποιότητα ζωής των ασθενών.
 - Στην εκτίμηση του θεραπευτικού αποτελέσματος. Ο κυτταρογενετικός επανέλεγχος μετά τη θεραπευτική αγωγή πληροφορεί τον κλινικό ιατρό για την αποτελεσματικότητα της εφαρμοζόμενης θεραπείας και τον καθοδηγεί για τη μετέπειτα θεραπευτική αντιμετώπιση.
 - Στην παρακολούθηση της αλλογενούς μεταμόσχευσης.
 - Στην έρευνα με
 - την περαιτέρω διερεύνηση και προγνωστική αξιολόγηση σπάνιων χρωμοσωμικών αλλοιώσεων και άρα την αξιολόγηση της ετερογένειας της νόσου.
 - την περαιτέρω διερεύνηση της χρωμοσωμικής αλλοίωσης σε επίπεδο γονιδίου και πρωτεΐνης με μοριακές τεχνικές, με σκοπό την ταυτοποίηση των γονιδίων εκείνων που εμπλέκονται στη παθογένεια της ΧΛΛ
 - την διερεύνηση γονιδίων που συμμετέχουν στη παθογένεια της νόσου με στόχο τη δημιουργία εξατομικευμένων, στοχευμένων και μη τοξικών θεραπειών για τους ασθενείς.

1.4 ΓΟΝΙΔΙΑ ΑΠΟΤΟΞΙΚΟΠΟΙΗΣΗΣ ΣΤΗ ΧΡΟΝΙΑ ΛΕΜΦΟΓΕΝΗ ΛΕΥΧΑΙΜΙΑ

1.4.1 ΓΕΝΙΚΑ

Τα τελευταία δεδομένα αποδίδουν την παθογένεια της ΧΛΛ σε ένα συνδυασμό γενετικής προδιάθεσης αλλά και έκθεσης σε περιβαλλοντικούς παράγοντες. Ουσίες όπως, φυτοφάρμακα, διαλύτες, βουταδιένιο και βενζόλιο κ.α. θεωρούνται άμεσα ή έμμεσα μεταλλαξογόνα και έχουν ήδη συνδεθεί με την παθογένεια της νόσου εδώ και δεκαετίες (αναλύθηκαν στην §2.2.3) [77]. Η αποτοξικοποίηση των γονοτοξικών παραγόντων στον ανθρώπινο οργανισμό καταλύεται από ειδικά ένζυμα του μεταβολισμού. Ωστόσο, γενετικοί πολυμορφισμοί στα γονίδια αποτοξικοποίησης ευθύνονται για τη μειωμένη ή και καθόλου έκφραση των ενζύμων τους με συνέπεια τη συσσώρευση και εναπόθεση τοξικών ουσιών αλλά και δραστικών ενδιάμεσων προϊόντων του μεταβολισμού στους ανθρώπινους ιστούς. Οι τοξικοί αυτοί μεταβολίτες δεν επηρεάζουν μόνο το ήπαρ όπου διενεργείται ο μεταβολισμός αλλά και άλλους ιστούς, όπως ο λεμφικός, ο οποίος μάλιστα μέσω της κυκλοφορίας διασπείρει τις ουσίες αυτές και σε άλλα μακρινά όργανα. Έτσι η συσσώρευση των τοξικών παραγόντων οι οποίοι έχουν την ικανότητα να επιδρούν μη αντιστρεπτά στο DNA προκαλώντας ανεπανόρθωτες βλάβες, μπορεί να οδηγήσει σε μεταλλάξεις και χρωμοσωμικές αλλοιώσεις με κίνδυνο την εμφάνιση καρκίνου [77]. Στις προηγούμενες παραγράφους έγινε σαφής η σύνδεση των χρωμοσωμικών ανωμαλιών με τις αιματολογικές κακοήθειες και ειδικότερα τη ΧΛΛ.

Ωστόσο, τα δεδομένα στο πεδίο της ΧΛΛ σχετικά με τα γονίδια μεταβολισμού είναι περιορισμένα και μερικές φορές αντιφατικά ενώ οι έως και σήμερα θετικές συσχετίσεις αφορούν πολυμορφικά γονίδια που εμπλέκονται κυρίως στην επιδιόρθωση του DNA και τον έλεγχο του κυτταρικού κύκλου [78-80]. Η μόνη αποδεδειγμένη σχέση μεταξύ της ΧΛΛ και των γονιδίων αποτοξικοποίησης αφορά τα γονίδια της οικογένειας των τρανσφερασών της γλουταθειονίνης (GST) τα οποία κωδικοποιούν μια μεγάλη ομάδα ενζύμων που συμμετέχει στη φάση II του μεταβολισμού. Συγκεκριμένα, έχει αποδειχτεί ότι αν υπάρχουν πολυμορφισμοί που

προκαλούν απώλεια της ενζυμικής δράσης σε περισσότερα από ένα γονίδια της οικογένειας αυτής είναι πιθανό να αυξηθεί σημαντικά ο κίνδυνος ανάπτυξης για ΧΛΛ [78,80]. Περαιτέρω έρευνα των πολυμορφισμών σε ένζυμα αποτοξίνωσης θα μπορούσε να παρέχει πολύτιμες πληροφορίες για την παθογένεια και τον κίνδυνο ανάπτυξης της ΧΛΛ.

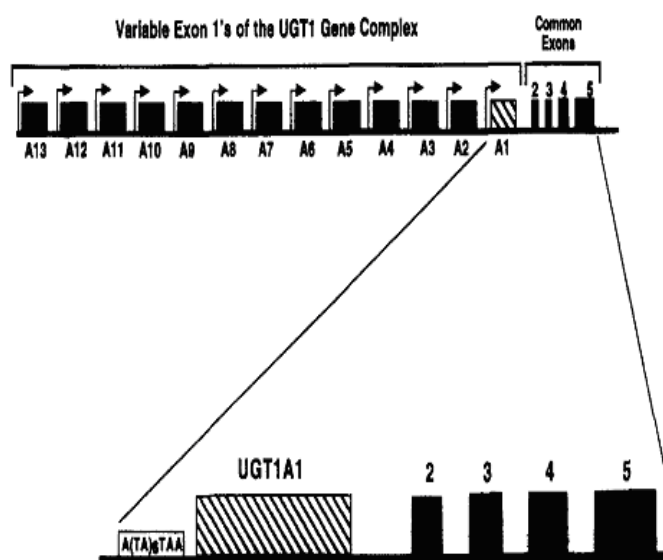
1.4.2 UDP- ΓΛΥΚΟΥΡΟΝΥΛΟΤΡΑΝΣΦΕΡΑΣΕΣ (UGTs)

Ένας μεγάλος αριθμός περιβαλλοντικών και διατροφικών παραγόντων που συμβάλλουν στην καρκινογένεση μεταβολίζονται από την υπεροικογένεια των UDP-γλυκουρονοσυλτρανσφερασών (UGTs), μια σημαντική κατηγορία ενζύμων της Φάσης II του μεταβολισμού. Η γλυκουρονιδίωση (σύζευξη με γλυκουρονικό οξύ), η οποία κυρίως συντελείται από τα UGTs, λειτουργεί ως μηχανισμός αποτοξικοποίησης πολλών ενδογενών αλλά και εξωγενών παραγόντων που περιέχουν υδροξυλομάδες όπως, περιβαλλοντικοί ρύποι, καρκινογόνες ουσίες, ναρκωτικά, διάφορες διατροφικές χημικές ενώσεις, καθώς και τα προϊόντων οξείδωσης αυτών που προκύπτουν από τη φάση I του μεταβολισμού. Στη διαδικασία αυτή, που διενεργείται κύρια στο ήπαρ και καλείται αποτοξίνωση, εμπλέκονται και άλλα όργανα και ιστοί. Ως εκ τούτου, η λειτουργικότητα των UGTs ταυτίζεται με τη διατήρηση της γενικότερης γενωμικής ακεραιότητας και συνεπώς με σημαντική κυτταροπροστατευτική δράση [81].

1.4.2.1 UGT1A1 ΓΟΝΙΔΙΟ

Ο UGT1 γονιδιακός τόπος αποτελείται από 13 μεταβλητά εξόνια που κωδικοποιούν για τους διαφορετικούς ισοτύπους UGT γλυκουρονοσυλτρανσφερασών και 4 κοινά εξόνια (εξόνια 2-5) (εικόνα 13). Στο 5' άκρο του UGT1 συμπλέγματος βρίσκονται τα 13 μοναδικά εξόνια 1 διατεταγμένα σε διαδοχική σειρά που συμβολίζονται ως A1, A2, A3 ...- A13. Στο 3' άκρο του συμπλέγματος βρίσκονται τα 4 κοινά εξόνια (2-5), που λαμβάνουν μέρος στη συγκρότηση των 13 διαφορετικών μεταγράφων. Η ρυθμιστική περιοχή του υποκινητή προηγείται του 5' άκρου κάθε εξωνίου 1. Από το εναλλακτικό μάτισμα της περιοχής, προκύπτουν τα ανασυνδυασμένα τμήματα mRNA από κάθε μοναδικό εξόνιο με τμήματα των τεσσάρων κοινών εξωνίων. Τα ώριμα RNAs που παράγονται έχουν μοναδικά 5' άκρα και ίδια 3' άκρα. Κατά τον τρόπο αυτό προκύπτουν οι 13 διαφορετικοί ισοτύποι. Τα μοναδικά αμινοτελικά άκρα των πεπτιδίων που προκύπτουν είναι υπεύθυνα για τη σύνδεση με τα διαφορετικά υποστρώματα, ενώ στα όμοια καρβοξυτελικά άκρα γίνεται η σύνδεση με το κοινό UDP- γλυκουρονικό οξύ [82].

Το σύμπλεγμα που περιγράφηκε παραπάνω καλύπτει μία έκταση 85 kb πάνω στο μεγάλο βραχίονα του χρωμοσώματος 2 (2q37) ενώ έχουν παρατηρηθεί αρκετοί πολυμορφισμοί σε κωδικοποιούσες και μη περιοχές του [83].



Εικόνα 13. Σχηματική παράσταση της δομής του γονιδιακού συμπλέγματος UGT1 και του UGT1A1 γονιδίου (1190bp) [83].

Το UGT1A1 ένζυμο είναι ένα από τα σημαντικότερα UGTs καθώς όντας ειδικό για αρκετά διαφορετικά υποστρώματα, εμπλέκεται στην αποτοξικοποίηση πολλών ενδογενών και εξωγενών ενώσεων, προλαμβάνοντας πιθανές αλλοιώσεις του DNA που προκαλούνται από τα ενδιάμεσα τοξικά δραστικά προϊόντα της φάσης I του μεταβολισμού. Ειδικότερα, καταλύει πρωτίστως τη γλυκουρονιδίωση της χολερυθρίνης και τη βιομετατροπή πολλών ορμονών (οιστραδιόλη, εικοσανοειδή, θυροξίνη) ενώ συμμετέχει στο μεταβολισμό πληθώρας φαρμάκων (χημειοθεραπευτικά ιρινοτεκάνη, παρακεταμόλη) [81,84,85]. Το ενδιαφέρον όμως στη συγκεκριμένη διατριβή, εστιάζεται στη συμμετοχή του ενζύμου αυτού, στην αποτοξικοποίηση εισπνεόμενων κυρίως τοξικών ουσιών, όπως βενζοπυρένιων ετεροκυκλικών αμινών, αρωματικών υδρογονανθράκων και πολυακόρεστων λιπαρών οξέων, τα οποία έχουν παράλληλα αναφερθεί ως πιθανοί παράγοντες κινδύνου για την ανάπτυξη της ΧΛΛ [84,86].

1.4.2.2 UGT1A1*28 ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΣ

Η δομή του υποκινητή του *UGT1A1* γονιδίου είναι παρόμοια με αυτή των υποκινητών που μεταγράφονται από την RNA πολυμεράση II. Μία αλληλουχία με δομή TATAAA(T), γνωστή ως «TATA box» βρίσκεται σε απόσταση 25-30 bp από το σημείο έναρξης της μεταγραφής (θέση CAP) και αποτελεί θέση πρόσδεσης του μεταγραφικού παράγοντα TFIID (transcription factor IID) [87]. Η φυσιολογική αλληλουχία του υποκινητή στην περιοχή TATA αποτελείται από 6 επαναλήψεις TA και συμβολίζεται A(TA)₆TAA.

Ο UGT1A1*28 πολυμορφισμός χαρακτηρίζεται από την προσθήκη ενός παραπάνω δινουκλεοτιδίου TA στο «TATA box» του υποκινητή του γονιδίου *UGT1A1* [A(TA)₇TAA]. Η εισαγωγή αυτή στον υποκινητή επηρεάζει τη μεταγραφή του υποκείμενου γονιδίου *UGT1A1* αφού βρίσκεται στην περιοχή TATA όπου συνδέεται ο μεταγραφικός παράγοντας TFDIID [87]. Οι μεταλλαγές στην περιοχή TATA μειώνουν τη μεταγραφική ενεργότητα, αφού τροποποιείται η ικανότητα πρόσδεσης των παραγόντων έναρξης μεταγραφής. Συνέπεια των μεταλλαγών αυτών είναι η μειωμένη έκφραση της UDP-γλυκουρονοσυλτρανσφεράσης 1. Συγκεκριμένα τα ομόζυγα για τον πολυμορφισμό άτομα (TA₇/TA₇) έχουν προβληματικό μεταβολισμό αφού παρουσιάζουν 80% μείωση στην ενεργότητα του ενζύμου, ενώ οι ετεροζυγώτες παρουσιάζουν μέτρια ενζυμική ενεργότητα [88].

Ο UGT1A1*28 πολυμορφισμός αναφέρθηκε για πρώτη φορά στη βιβλιογραφία από τον Bosma και συνεργάτες, ως η γενετική βάση του συνδρόμου Gilbert, μια ήπια υπερχολερυθριναιμία έμμεσου τύπου που προκαλείται από τη μειωμένη ενζυμική δραστηριότητα της UDP-γλυκουρονικής τρανσφεράσης, η οποία μάλιστα κληρονομείται με αυτοσωμικό υπολειπόμενο τρόπο [88]. Πολύ αργότερα, οι French και συνεργάτες πρότειναν ότι ο UGT1A1*28 πολυμορφισμός επηρεάζει το προφίλ της γενικής γονιδιακής έκφρασης στο λεμφικό ιστό και ες εκ τούτου ο υποκινητής του *UGT1A1* γονιδίου θεωρήθηκε ότι παίζει καθοριστικό ρόλο στη γενικότερη γονιδιακή έκφραση [89]. Επίσης, οι Grant και Bell ανέφεραν ότι τα άτομα με μειωμένη ενεργότητα ενζύμου πιθανότατα να είναι πιο ευαίσθητα στις βλάβες που προκαλούνται μέσω οξειδωτικού στρες, οι οποίες ως γνωστόν οδηγούν σε αυξημένο κίνδυνο για καρκινογένεση [88].

Επιπροσθέτως, οι δραστικοί ενδιάμεσοι μεταβολίτες που προκύπτουν κατά τη διάρκεια της βιομετατροπής προ-καρκινογόνων ουσιών στα άτομα με τη μειωμένη ενεργότητα της UDP-γλυκουρονικής τρανσφεράσης μπορούν να αλληλεπιδράσουν με βιολογικά μόρια όπως το DNA, RNA και πρωτεΐνες και να σχηματίσουν σύμπλοκα [89]. Εάν αυτά, κυρίως τα DNA σύμπλοκα, έρθουν σε επαφή με αιμοποιητικά βλαστικά κύτταρα, τότε είναι πιθανό να εκδηλωθούν αιματολογικές κακοήθειες [90].

Ωστόσο, ενώ ο ρόλος του UGT1A1*28 πολυμορφισμού έχει τεκμηριωθεί στην ανάπτυξη συμπαγών όγκων - όπως θα αναφερθεί και παρακάτω (§6), στη λευχαιμογένεση παραμένει προς το παρόν άγνωστος. Συνεπώς ένα από τα αντικείμενα αυτής της διατριβής αποτελεί και η διερεύνηση του συγκεκριμένου γενετικού πολυμορφισμού στη ΧΛΛ.

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

2. ΣΚΟΠΟΣ

Η ΧΛΛ, η συχνότερη μορφή λευχαιμίας του Δυτικού κόσμου, αποτελεί αντικείμενο εντατικής μελέτης τα τελευταία χρόνια. Μέχρι σήμερα το σύνολο των χρωμοσωμικών αλλοιώσεων της ΧΛΛ καθώς και η πρόγνυσή τους παραμένει άγνωστη εξαιτίας των τεχνικών προβλημάτων που προκύπτουν από τον περιορισμένο πολλαπλασιασμό των κυττάρων της ΧΛΛ in vitro. Επίσης, πρόσφατα δεδομένα υποδεικνύουν ότι ένας συνδυασμός γενετικής προδιάθεσης και έκθεσης σε τοξικούς περιβαλλοντικούς παράγοντες συμβάλλει σημαντικά στην παθογένεια της νόσου. Έτσι πολλά ερωτήματα όσον αφορά στην αιτιοπαθογένεια της ΧΛΛ εξακολουθούν να παραμένουν αναπάντητα. Σήμερα η Κλασική Κυτταρογενετική με τη χρήση νέων διεγερτών, η Μοριακή Κυτταρογενετική με την τεχνική FISH αλλά και άλλες μοριακές μέθοδοι δίνουν τη δυνατότητα να διερευνηθούν περαιτέρω τα παραπάνω ζητήματα.

Η παρούσα διατριβή αποσκοπεί:

- ♣ Στην ανεύρεση του καταλληλότερου διεγέρτη για την in vitro επαγωγή του κυτταρικού κύκλου των παθολογικών κυττάρων της ΧΛΛ, λόγω του οποίου καθίσταται δύσκολη η ανίχνευση κλωνικών αλλοιώσεων.
- ♣ Στην κυτταρογενετική μελέτη των ασθενών με ΧΛΛ ώστε να επιτευχτεί η ταυτοποίηση των συνηθέστερων κλωνικών αλλοιώσεων και της συχνότητάς τους στον Ελλαδικό χώρο, αλλά και να ανευρεθούν οι σπάνιες αλλά επαναλαμβανόμενες χρωμοσωμικές αλλοιώσεις της νόσου. Η ταυτοποίηση των κυτταρογενετικών αλλοιώσεων θα συμβάλλει στη διάγνωση, πρόγνωση, σταδιοποίηση και θεραπευτική προσέγγιση των ασθενών αλλά και στην έρευνα που αφορά στην παθογένεια της νόσου.
- ♣ Στην ταυτοποίηση συγκεκριμένων παραγόντων κινδύνου όπως η γενετική προδιάθεση και η έκθεση σε γενοτοξικούς παράγοντες που πιθανότατα εμπλέκονται στην παθογένεια και επομένως στην εκδήλωση της νόσου.
- ♣ Στην διερεύνηση του πιθανού ρόλου του UGT1A1*28 πολυμορφισμού του γονιδίου *UGT1A1* ως έναν από τους πιθανούς προδιαθεσικούς παράγοντες της ΧΛΛ. Το συγκεκριμένο γονίδιο συμμετέχει στην αποτοξικοποίηση ουσιών που ενοχοποιούνται για την εκδήλωση της ΧΛΛ.



3. ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1 ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΑΣΘΕΝΩΝ

Στην παρούσα διατριβή χρησιμοποιήθηκαν 237 δείγματα μυελού των οστών ή/και περιφερικού αίματος που προέρχονται από ασθενείς με ΧΛΛ. Η διάγνωση των συγκεκριμένων ασθενών όπως και η συλλογή των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε από τον εκάστοτε παραπέμποντα ιατρό στις Αιματολογικές και Παθολογικές Κλινικές των Νοσοκομείων της Χώρας. Ακολούθησε η άμεση αποστολή των δειγμάτων υπό άσηπτες συνθήκες σε ηπαρινισμένα σωληνάρια (30-100U/ml heparin-sodium) στο τμήμα Κυτταρογενετικής του εργαστηρίου Υγειοφυσικής, Ραδιοβιολογίας και Κυτταρογενετικής, ΙΠΡΕΤΕΑ του Ε.Κ.Ε.Φ.Ε. «ΔΗΜΟΚΡΙΤΟΣ», το οποίο δέχεται καθημερινά δείγματα ασθενών με αιματολογικές κακοήθειες για κυτταρογενετική ανάλυση.

Επιπροσθέτως για τη μελέτη του UGT1A1*28 πολυμορφισμού χρησιμοποιήθηκαν 108 δείγματα αίματος από υγιείς δότες (μάρτυρες). Τα 73 από τα δείγματα αυτά προέρχονται από Α΄ Παθολογική Κλινική της Ιατρικής σχολής του Πανεπιστημίου Αθηνών και ήταν γονοτυπικά χαρακτηρισμένα για τον UGT1A1*28 πολυμορφισμό. Τα υπόλοιπα προήλθαν από υγιείς δότες που ήρθαν για κυτταρογενετικό έλεγχο στο εργαστήριο Υγειοφυσικής και Περιβαλλοντικής Υγείας, του Ε.Κ.Ε.Φ.Ε. «ΔΗΜΟΚΡΙΤΟΣ».

3.2 ΚΛΑΣΙΚΗ ΚΥΤΤΑΡΟΓΕΝΕΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

Για την Κυτταρογενετική ανάλυση χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα μυελού των οστών ή/και περιφερικού αίματος από 237 ασθενείς με ΧΛΛ. Τα βασικά στάδια της Κυτταρογενετικής ανάλυσης περιλαμβάνουν:

- 1) Κυτταροκαλλιέργειες
- 2) Παρασκευή χρωμοσωμικών παρασκευασμάτων
- 3) Μικροσκοπική παρατήρηση και καρυοτύπηση
- 4) Αξιολόγηση των αποτελεσμάτων

Τα στάδια αυτά αναφέρονται αναλυτικά παρακάτω (§ 3.2.1).

3.2.1 ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

3.2.1.1 ΚΥΤΤΑΡΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ

Το δείγμα μυελού των οστών αποτελεί την καλύτερη πηγή νεοπλασματικών κυττάρων για τις αιματολογικές κακοήθειες συμπεριλαμβανομένου και της ΧΛΛ. Ωστόσο, περιφερικό αίμα μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε περιπτώσεις που δεν είναι εφικτή η λήψη μυελού των οστών ή όπου ανιχνεύεται υψηλό ποσοστό λευχαιμικών κυττάρων και στο περιφερικό αίμα. Επίσης η τήρηση και ο έλεγχος των συνθηκών υπό τις οποίες πραγματοποιούνται και διατηρούνται οι κυτταροκαλλιέργειες αποτελεί κρίσιμο σημείο για την σωστή ανάπτυξη των κυττάρων. Θα πρέπει γενικά να τηρούνται και να ελέγχονται συστηματικά τα παρακάτω:

Η κατάλληλη θερμοκρασία: Η ιδανικότερη θερμοκρασία για την ανάπτυξη των ανθρώπινων κυττάρων και ιστών είναι 37°C. Θερμοκρασίες μεγαλύτερες από 39°C, έχουν ως αποτέλεσμα τον θάνατο των κυττάρων, ενώ χαμηλότερες των 36°C εξασθενίζουν τον κυτταρικό μεταβολισμό, καθυστερούν την ανάπτυξη των κυττάρων και γενικότερα έχουν δυσμενή επίπτωση στην ανάπτυξη των καλλιιεργειών, χωρίς όμως να σκοτώνουν τα κύτταρα.

Κατάλληλα θρεπτικά υλικά: Η βάση όλων των καλλιιεργητικών υλικών που χρησιμοποιούνται είναι ένα μίγμα άλατος και γλυκόζης το οποίο ελέγχει το pH και την ωσμωτική πίεση, ενώ ταυτόχρονα λειτουργεί και ως πηγή ενέργειας. Το θρεπτικό υπόστρωμα πρέπει να περιέχει όλα τα απαραίτητα συστατικά που είναι αναγκαία για την αύξηση των κυττάρων, καθώς και αντιμικροβιακούς παράγοντες (αντιβιοτικά, μυκητοκτόνα), οι οποίοι αποτρέπουν τον πολλαπλασιασμό βλαβερών για την κυτταροκαλλιέργεια μικροοργανισμών. Συνήθως χρησιμοποιείται ο συνδυασμός αντιβιοτικών, πενικιλίνη / στρεπτομυκίνη. Το πρώτο αναστέλλει τη σύνθεση του βακτηριακού τοιχώματος, ενώ το δεύτερο προσδένεται στη ριβοσωμική υπομονάδα 30S των G+ και G- βακτηρίων παρεμποδίζοντας το σύμπλοκο έναρξης.

Το pH θα πρέπει να παραμένει σταθερό στο 7-7,4 σύμφωνα με αυτό των υγρών του σώματος. Ο αέρας στον επωαστικό κλίβανο περιέχει 5% CO₂, συμβάλλοντας στην επίτευξη σταθερού, ουδέτερου pH, επειδή διατηρείται σε

ισορροπία η συγκέντρωση των διττανθρακικών ανιόντων (HCO_3^-) και η μερική πίεση του CO_2 .

Αποστείρωση: Πολλοί μικροοργανισμοί αναπτύσσονται γρηγορότερα από τα ανθρώπινα κύτταρα στις καλλιέργειες, αλλοιώνουν και εξαντλούν τη σύσταση του θρεπτικού μέσου, ενώ οι περισσότεροι από αυτούς παράγουν τοξίνες επιβλαβείς για τα καλλιεργούμενα κύτταρα. Η διατήρηση των κυττάρων *in vitro*, συνεπώς, δυσχεραίνεται από την ύπαρξη μολυσματικών παραγόντων του περιβάλλοντος, συνήθως μυκήτων και βακτηρίων. Συνεπώς η τήρηση άσηπτων συνθηκών, η αποστείρωση των χώρων, των σκευών και των θρεπτικών υλικών κρίνεται αναγκαία.

Επιμέρους βήματα των κυτταροκελλιεργειών αποτελούν: 1) Η παρασκευή του πλήρους θρεπτικού υλικού, 2) Ο εμβολιασμός του δείγματος στο θρεπτικό υλικό (με πιθανή προσθήκη διεγέρτη), 3) Η επώαση, 4) Η συλλογή και μονιμοποίηση των κυττάρων

I) Παρασκευή του πλήρους θρεπτικού υλικού

Σε επωαστικό θάλαμο κάθετης νηματικής ροής στείρου αέρα παρασκευάζεται το πλήρες θρεπτικό υλικό σύμφωνα με την παρακάτω σύσταση:

ΠΛΗΡΕΣ ΘΡΕΠΤΙΚΟ ΥΛΙΚΟ	500ML
McCoy's 5A	440ml
Εμβρυϊκός ορός μόσχου (FCS)	50ml
L-γλουταμίνη (200)	5ml
Διάλυμα αντιβιοτικών Πενικιλίνη/Στρεπτομυκίνη, 10000U/10000μg/ml	5ml

Το McCoy's 5 A θεωρείται το καταλληλότερο θρεπτικό υλικό για την ανάπτυξη ανθρώπινων διπλοειδικών κυτταρικών σειρών.

Ο εμβρυϊκός ορός μόσχου αποτελεί υγρό μέσο που προκύπτει μετά από πήξη του αίματος και χρησιμεύει στην προώθηση της ανάπτυξης των κυττάρων αφού περιέχει όλους τους απαραίτητους αυξητικούς παράγοντες, πρωτεΐνες, πολυπεπίδια, ορμόνες, άλατα, μεταβολίτες και θρεπτικά συστατικά που δρουν διεγερτικά ωθώντας τα κύτταρα σε αλληπάλληλες διαιρέσεις. Τα κύτταρα χρειάζονται τη διέγερση αυτή ειδικότερα μετά το στάδιο της μίτωσης αφού στον υπόλοιπο κύκλο λειτουργούν με βάση το αρχικό ερέθισμα. Από την άλλη, υπερβολική ποσότητα ορού μπορεί να

αποβεί επιβλαβής για την ανάπτυξη των κυττάρων. Ως βιολογικό υγρό, είναι επιρρεπής στις μολύνσεις, ιδιαίτερα από μυκόπλασμα.

Η L-γλουταμίνη είναι απαραίτητο αμινοξύ που δρα ως βοηθητικός παράγοντας στον διπλασιασμό του DNA κατά τη φάση σύνθεσης S. Ούσα ασταθής σε θερμοκρασία δωματίου, αποθηκεύεται στους -20°C και προστίθεται λίγο πριν τη χρήση του καλλιεργητικού μέσου.

Τα αντιβιοτικά, όπως περιγράφηκε παραπάνω, αναστέλλουν την ανεπιθύμητη ανάπτυξη μικροβίων (α και β αιμολυτικών στρεπτόκοκκων, σταφυλόκοκκων, E.coli καθώς και άλλων που βρίσκονται κανονικά στο δέρμα). Η πενικιλίνη και η στρεπτομυκίνη έχουν το πλεονέκτημα να παραμένουν αναλλοίωτες στα καλλιεργητικά μέσα στους 37°C έως και τρεις μέρες - αν και η δράση της πενικιλίνης μπορεί να ελαττωθεί ως και 30% παρουσία του ορού.

Τέλος, το θρεπτικό υλικό περιέχει τον δείκτη μεταβολής του pH, ερυθρό της φαινόλης, έτσι ώστε πιθανή αλλαγή του χρώματός του, λόγω αλλοίωσης, να γίνεται ορατή μακροσκοπικά πριν τη χρήση. Το πλήρες θρεπτικό υλικό διατηρείται έως και 15 ημέρες στους $+2$ έως $+8^{\circ}\text{C}$.

** Όλα τα παραπάνω υλικά θα πρέπει να ξεπαγώνονται πριν χρησιμοποιηθούν, με εξαίρεση την L-γλουταμίνη.*

II) Εμβολιασμός του δείγματος στο θρεπτικό υλικό

Κατά την παραλαβή του δείγματος τα στοιχεία του ασθενούς καταχωρούνται σε ηλεκτρονικό αρχείο. Ο κωδικός, η ημερομηνία παραλαβής του δείγματος, η διάρκεια επώασης και τα αρχικά BM (μυελός των οστών) ή PB (περιφερικό αίμα) αναγράφονται πάνω στην αντίστοιχη φλάσκα (πεπλατυσμένη φιάλη με λοξό λαιμό) καλλιέργειας. Ο εμβολιασμός του δείγματος στις φλάσκες πραγματοποιείται υπό στείρες συνθήκες σε θάλαμο κάθετης νηματικής ροής στείρου αέρα. Για κάθε δείγμα BM ή PB που προέρχεται από ασθενή με ΧΛΑ πραγματοποιούνται συνολικά 4 καλλιέργειες δύο ειδών. Η πρώτη κατηγορία περιλαμβάνει αδιέγερτες καλλιέργειες, δηλαδή χωρίς την προσθήκη διεγερτών, ενώ η δεύτερη περιλαμβάνει διεγερμένες καλλιέργειες με μιτογόνα των β-κυττάρων.

Αναλυτικότερα για την παρασκευή των αδιέγερτων καλλιεργιών χρησιμοποιούνται 2 φλάσκες. Στην κάθε μία τοποθετούνται, χρησιμοποιώντας αποστειρωμένες πιπέτες μιας χρήσεως τα εξής:

- 6 ml πλήρους θρεπτικού υλικού
- 0,2-0,4 ml BM ή PB

Στη συνέχεια ακολουθεί καλή ανακίνηση και μεταφορά των καλλιέργειών στον επωαστικό κλίβανο για 24 ώρες (h) για τη μία και 48 h για την άλλη [καλλιέργειες μικρής διάρκειας επώασης (short-term cultures)].

Για τις διεγερμένες καλλιέργειες χρησιμοποιήθηκε ο διεγέρτης των β-κυττάρων, TPA, αλλά ο και συνδυασμός διεγερτών DSP-30/IL-2 που επάγει τον πολλαπλασιασμό των παθολογικών κυττάρων της ΧΛΛ. Για το λόγο αυτό παρασκευάστηκαν τα εξής διαλύματα:

- 1) **Διάλυμα TPA: Μητρικό διάλυμα (stock solution):** Διαλύουμε αρχικά 1mg σκόνης TPA σε 1000μL DMSO. Αραιώνουμε επιπλέον το διάλυμα (αραίωση 1:20) προσθέτοντας 19mL DMSO. Προκύπτει διάλυμα συγκέντρωσης 50μg/mL. Στη συνέχεια παρασκευάζεται το διάλυμα εργασίας (working solution) αραιώνοντας 1:50 το stock solution με αποσταγμένο H₂O (συγκέντρωση 1μg/mL). Τέλος για τις καλλιέργειες (τελικού όγκου 5mL), χρησιμοποιούνται 100 μL από το working solution έτσι ώστε η τελική συγκέντρωση του TPA στην καλλιέργεια να είναι 20ng/mL.
- 2) **Διάλυμα DSP-30:** Διαλύουμε το λυοφιλωμένο DSP-30 σε 1 mL απεσταγμένου νερού. Το διάλυμα διατηρείται σε κλάσματα εργασίας των 120μL σε αποστειρωμένα eppendorfs, στους -20°C. Στην καλλιέργεια τελικά χρησιμοποιούνται 24 μL από το working solution με τελική συγκέντρωση του DSP-30 στην καλλιέργεια τα 2μM.

** Ο χειρισμός των παραπάνω διαλυμάτων γίνεται σε συνθήκες χαμηλού φωτισμού.*

Για την παρασκευή των διεγερμένων καλλιέργειών χρησιμοποιούνται 2 φλάσκες στις οποίες τοποθετείται το πλήρες θρεπτικό υλικό με τον BM / PB όπως περιγράφηκε κατά την προετοιμασία των αδιέγερτων καλλιέργειών. Επιπροσθέτως, στην κάθε καλλιέργεια ξεχωριστά, προστίθενται και τα παρακάτω:

- 1^η διεγερμένη καλλιέργεια: 100 μL TPA (διεγέρτης β-κυττάρων) από το διάλυμα εργασίας 0.2mg/mL. Η επώαση της καλλιέργειας διαρκεί 92h στον επωαστικό κλίβανο.
- 2^η διεγερμένη καλλιέργεια: 24 μL DSP30 (Immunostimulatory CpG-ODN) με τελική συγκέντρωση 2μM και 120 μL IL-2 (Interleukin-2,

human (hIL-2) recombinant (E. coli) Solution (ανθρώπινη ανασυνδυασμένη σε βακτήριο E. Coli) με τελική συγκέντρωση 2μM. Η καλλιέργεια επωάζεται για 72h στον επωαστικό κλίβανο.

III) Επώαση

Η επώαση πραγματοποιείται σε κλίβανο στους 37°C και σε ατμόσφαιρα 5% CO₂ για 24, 48, 72 ή 96 ώρες, ανάλογα με το είδος των κυτταροκαλλιιεργειών. Οι φλάσκες δεν πωματίζονται αεροστεγώς, με σκοπό η καλλιέργεια να έρχεται σε επαφή με τον αέρα. Η κατάλληλη θερμοκρασία και σωστή μερική πίεση CO₂ είναι απαραίτητες για την ταχεία ανάπτυξη των κυττάρων.

Μία ώρα πριν την λήξη της επώασης σε κάθε καλλιέργεια προστίθενται 50μl **κολσεμίδιο** (colsemid) (τελική συγκέντρωση 0,02μg/ml) και επανατοποθετείται στον κλίβανο για 1h. Το κολσεμίδιο είναι αναστολέας της πρωτεϊνοσύνθεσης των μικροσωληνίσκων της μιτωτικής ατράκτου. Κατά συνέπεια, τα διαιρούμενα κύτταρα σταματούν τον κυτταρικό τους κύκλο στην φάση της μετάφασης. Επιτυγχάνεται, έτσι, συγχρονισμός και συσσώρευση των κυττάρων στη μετάφαση όπου τα χρωμοσώματα έχουν τη μέγιστη συσπείρωση και επομένως γίνονται ευδιάκριτα στο οπτικό μικροσκόπιο.

**Απαιτείται προσοχή στο χρόνο δράσης του κολσεμιδίου. Αν δράσει λιγότερη ώρα, θα εντοπιστούν ελάχιστα κύτταρα στο στάδιο της μετάφασης. Από την άλλη, αν ο χρόνος επώασης υπερβεί τα όρια, και μεν θα ανιχνευτούν περισσότερες μεταφάσεις, αλλά τα χρωμοσώματα θα είναι υπερβολικά συσπειρωμένα αφού το κολσεμίδιο επιδρά στις πρωτεΐνες που λειτουργούν προστατευτικά γύρω από το DNA, αλλοιώνοντας την μορφολογία των χρωμοσωμάτων.*

IV) Σύλλογή και μονιμοποίηση των κυττάρων

- Μετά το πέρας της περιόδου επώασης, όλη η καλλιέργεια μεταγγίζεται από τη φλάσκα σε δοκιμαστικό σωληνάριο πολυστυρενίου (falcon 14ml), αφού προηγηθεί καλή ανακίνηση.
- Ακολουθεί φυγοκέντρωση για 10 min στις 1300 στροφές /min και λαμβάνεται μόνο το ίζημα, στο οποίο καθιζάνουν τα λευκά και ερυθρά αιμοσφαίρια, ενώ

το υπερκείμενο με τα υπόλοιπα συστατικά της καλλιέργειας αποχύνεται προσεχτικά.

- Στη συνέχεια στο ίζημα τοποθετούνται 8-10ml **υπότονου διαλύματος KCl** (75mM) σταδιακά και υπό ανάδευση και αφήνεται να δράσει για περίπου 5min. Στο στάδιο αυτό έχει σημασία η καλή ανάμειξη του εναιωρήματος. Λόγω ωσμωτικής διαφοράς μεταξύ εξωκυττάριου και ενδοκυττάριου χώρου, νερό εισέρχεται στα κύτταρα με αποτέλεσμα τη διόγκωσή τους και τελικά το σπάσιμο της πλασματικής μεμβράνης. Σε αυτό το στάδιο επίσης πραγματοποιείται και η αιμόλυση των ερυθρών κυττάρων, με αποτέλεσμα να απομακρυνθεί η αιμοσφαιρίνη και τα υπόλοιπα κατεστραμμένα συστατικά τους με το υπερκείμενο.
- Επαναλαμβάνεται φυγοκέντρηση στις 1300 στροφές/min για 10min και απόχυση του υπερκείμενου.
- Στο ίζημα προστίθενται 8-10ml **μονιμοποιητή Carnoy's (μεθανόλη/οξικό οξύ, 3/1, v/v)** με πιπέτα Pasteur στάγδην με τακτική ανάδευση. Αρχικά προστίθενται λίγες σταγόνες, στη συνέχεια περισσότερες, με σύγχρονη ανάδευση μετά από κάθε προσθήκη, ώστε να μην αλλάξουν απότομα οι συνθήκες και να ομογενοποιηθεί πλήρως το διάλυμα. Με τη μονιμοποίηση των κυττάρων αντικαθίστανται τα ενδοκυτταρικά υγρά από το διάλυμα μονιμοποιητή.
**Η εργασία αυτή πραγματοποιείται κάτω από απαγωγό για να αποφεύγεται η εισπνοή των αναθυμιάσεων από το διάλυμα μονιμοποίησης.*
- Ακολουθεί ξανά φυγοκέντρηση (1300 στροφές/min για 10min) και απόχυση του υπερκείμενου.
- Έπεται επαναιώρηση σε 8-10ml μονιμοποιητή Carnoy's.
**Εάν το διάλυμα δεν είναι αρκετά διαυγές γίνεται επανάληψη της φυγοκέντρωσης και επαναιώρησης 2-3 φορές.*
- Το τελικό ίζημα αραιώνεται με προσθήκη περίπου 0,5ml μονιμοποιητή, ανάλογα με την ποσότητα του κυτταρικού ιζήματος.

3.2.1.2 ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΧΡΩΜΟΣΩΜΙΚΩΝ ΠΑΡΑΣΚΕΥΑΣΜΑΤΩΝ

Η διαδικασία περιλαμβάνει τα εξής κύρια στάδια:

- A. Προετοιμασία των χρωμοσωμικών παρασκευασμάτων – Επίστρωση
- B. Τεχνική ζώνωσης.

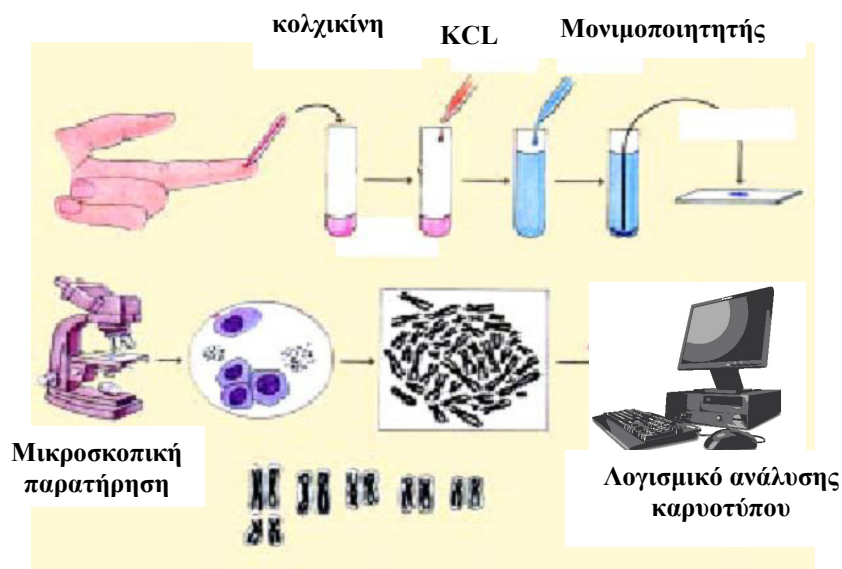
A. Η προετοιμασία των χρωμοσωμικών παρασκευασμάτων

- Κατά τη φάση της επίστρωσης των χρωμοσωματικών παρασκευασμάτων η θερμοκρασία του εργαστηρίου πρέπει να είναι ~ 25°C. Για κάθε ασθενή δημιουργούνται οκτώ παρασκευάσματα, δηλαδή προετοιμάζονται δύο πλακάκια από κάθε καλλιέργεια.
- Πρώτο βήμα αποτελεί η καταγραφή με μολύβι επάνω στο πλακάκι των στοιχείων αναγνωρισιμότητας: κωδικός του δείγματος, ημερομηνία παραλαβής, αρχικά «BM» ή «PB» και δίπλα οι ώρες επώασης και ο διεγέρτης.
- 2 σταγόνες εναιωρήματος κυττάρων (~30μl συνολικά) επιστρώνονται με πιπέτα Pasteur, ή αυτόματη πιπέτα ρυθμιζόμενου όγκου, σε καθαρή και υγρή αντικειμενοφόρο πλάκα. Οι πλάκες αφήνονται να στεγνώσουν σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Σε αυτό το σημείο ελέγχεται η ποιότητα των πλακακίων σε μικροσκόπιο αντίθεσης φάσης σε διάφορα οπτικά πεδία με κριτήρια την πυκνότητα και καλή διασπορά πυρήνων και μεταφάσεων.
- Οι αντικειμενοφόροι πλάκες αφήνονται να στεγνώσουν σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Έπειτα, επωάζονται σε ειδικό ξηρό κλίβανο στους 90°C περίπου για 1h, για να εξατμιστεί το νερό και να επιτευχθεί παλαίωση των παρασκευασμάτων.

B. Η τεχνική ζώνωσης χρωμοσωμάτων: Μέθοδος G-banding-Trypsin-Giemsa, (GTG).

- Οι αντικειμενοφόρες πλάκες με το χρωμοσωμικό υλικό επωάζονται σε ισοτονικό διάλυμα θρυψίνης 0,05% για ~60sec. Κατόπιν το ένζυμο απομακρύνεται με πλύσιμο της πλάκας με φυσιολογικό ορό (διάλυμα NaCl 0,9%w/v).

- Ακολουθεί χρώση σε διάλυμα Giemsa (5% σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών αλάτων, Sorensen buffer, pH 6.8) για ~10min
Το διάλυμα χρώσης της Giemsa παρασκευάζεται ως εξής : ένα δισκίο Sorensen διαλύεται σε 1L απεσταγμένο νερό (πυκνό δ/μα). Ακολουθεί αραίωση 1/10 του πυκνού δ/ματος με απεσταγμένο νερό (αραιό δ/μα). Έπειτα, 2ml πυκνής Giemsa αναμειγνύονται με ~70ml αραιού ρυθμιστικού διαλύματος Sorensen phosphate buffer (pH=6.8) σε δοχείο τύπου coplin jar.
- Στη συνέχεια οι πλάκες ξεπλένονται σε νερό βρύσης και αφήνονται να στεγνώσουν.
- Προστίθενται 2 σταγόνες Edellant σε κάθε πλακάκι και καλυπτρίδα, Μετά το πέρας ~1h τα πλακάκια είναι έτοιμα για μικροσκοπική παρατήρηση.



Εικόνα 14. Βασικά βήματα επεξεργασίας δείγματος για δημιουργία και παρατήρηση χρωμοσωμικών παρασκευασμάτων.

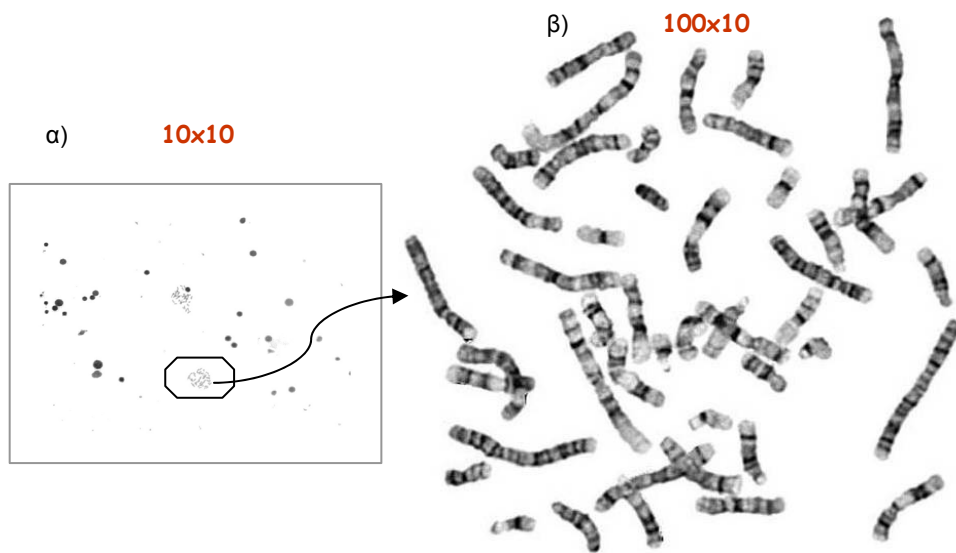
3.2.1.3 ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΚΗ ΠΑΡΑΤΗΡΗΣΗ & ΚΑΡΥΟΤΥΠΗΣΗ

Τα δείγματα παρατηρούνται και αναλύονται σε οπτικό μικροσκόπιο εφοδιασμένο με ψηφιακή κάμερα και με λογισμικό ψηφιακής ανάλυσης εικόνας Ikaros, της εταιρίας Metasystems (Metasystems, GmbH, Alltusheim, Germany) ως εξής:

1. Άναμμα της λάμπας μικροσκοπίου.
2. Άναμμα του ηλεκτρονικού υπολογιστή και του λογισμικού Ikaros.
3. Δημιουργία νέου αρχείου όπου θα καταχωρηθούν τα δεδομένα κυτταρογενετικής ανάλυσης του συγκεκριμένου δείγματος (κωδικός του δείγματος και των λοιπών αναγνωριστικά του στοιχεία του παρασκευάσματος).
4. Σκανάρισμα της αντικειμενοφόρου πλάκας με αντικειμενικό φακό 10x για την ανεύρεση κατάλληλων μεταφάσεων προς ανάλυση (με μετακίνηση της τράπεζας) (εικ. 38α).

** Αναλύσιμες μεταφάσεις θεωρούνται εκείνες που έχουν καλή ποιότητα χρωμοσωμάτων στις οποίες το σύνολο των χρωμοσωμάτων εντός του επιτρεπτού πεδίου έχει ικανοποιητική διασπορά, έτσι ώστε να ελαχιστοποιούνται οι απαγορευτικές προς μελέτη αλληλοεπικαλύψεις και να επιτυγχάνεται η μέγιστη ανάλυση ζώνωσης. Οι μεταφάσεις με πολύ συμπυκνωμένα χρωμοσώματα ή χωρίς εμφανή ζωνοποίηση δεν προτιμούνται.*

5. Τοποθέτηση της μετάφασης στο κέντρο του οπτικού πεδίου.
6. Χρήση καταδυτικού αντικειμενικού φακού 100x έπειτα από τοποθέτηση κεδρελαίου στην αντικειμενοφόρο πλακά (εικ. 38β).
7. Αποθήκευση της εικόνας για κάθε μετάφαση που προσμετράται στην ανάλυση
8. Επανάληψη της διαδικασίας για 10 μεταφάσεις αδιέγερτων κυττάρων (24h και 48h), 10 μεταφάσεις διεγερμένων με TPA και 10 διεγερμένων με DSP-30/IL-2 (σύνολο 30 μεταφάσεις, εφόσον υπάρχουν).
9. Καρυοτύπηση μέσω του προγράμματος Ikaros και σύμφωνα με τους κανόνες που αναφέρθηκαν στην εισαγωγή (§2.3.3.2).



Εικόνα 15. α) Εικόνα παρατήρησης με αντικειμενικό φακό 10x. β) Εικόνα παρατήρησης με αντικειμενικό φακό 100x, η οποία αποθηκεύεται στον Η/Υ για καρυστύπηση.

3.2.1.4 ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

- Η αξιολόγηση των αποτελεσμάτων και η περιγραφή του καρυότυπου γίνεται σύμφωνα με το ισχύον διεθνές σύστημα κυτταρογενετικής ονοματολογίας ανθρώπου ISCN 2013 (An International System for Human Cytogenetic Nomenclature) [55].
- Για να στοιχειοθετηθεί αλλοιωμένος κλώνος θα πρέπει να ανιχνευθούν τουλάχιστον δύο κύτταρα με την ίδια αλλοίωση. Ειδικά για τις μονοσωμίες θα πρέπει να ανιχνευθούν τρία κύτταρα με την ίδια απώλεια χρωμοσώματος.
- Τα μονιμοποιημένα, αναλυμένα πλέον πλακάκια αποθηκεύονται σε θερμοκρασία δωματίου.

3.3 ΜΟΡΙΑΚΗ ΚΥΤΤΑΡΟΓΕΝΕΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ - ΦΘΟΡΙΖΟΝ IN SITU ΥΒΡΙΔΙΣΜΟΣ (FISH)

Η μοριακή κυτταρογενετική ανάλυση (FISH) είναι αναγκαία για τη διερεύνηση των υπομικροσκοπικών αλλοιώσεων της ΧΛΛ, και πιο συγκεκριμένα των ελλείψεων των χρωμοσωματικών περιοχών 13q14, 11q22 και 17p13, οι οποίες δε δύνανται να ανιχνευτούν στον καρυότυπο ενώ παίζουν σπουδαίο ρόλο στη διάγνωση, πρόγνωση και θεραπεία των ασθενών με ΧΛΛ. Η διερεύνηση των αλλοιώσεων αυτών μέσω της FISH κρίνεται σημαντική κατά τα αρχικά στάδια αλλά και κατά την πορεία της νόσου έχοντας αντίκτυπο στη θεραπεία των ασθενών. Η FISH ανάλυση πραγματοποιήθηκε σε 126 από τα 237 δείγματα ασθενών με ΧΛΛ, οι οποίοι είχαν προηγουμένως καρυοτυπηθεί. Η μελέτη μεγαλύτερου αριθμού περιστατικών δεν ήταν εφικτή, λόγω του ιδιαίτερα υψηλού κόστους της τεχνικής αυτής. Προτεραιότητα δόθηκε κυρίως στα νεότερα σχετικά άτομα, εξαιτίας του γεγονότος ότι το ποσοστό των ατόμων αυτών στον Ελλαδικό χώρο τείνει να αυξάνεται και ταυτόχρονα η νόσος τείνει να έχει μια πιο επιθετική εξέλιξη. Επίσης προτιμήθηκαν οι ασθενείς με φυσιολογικό καρυότυπο, έτσι ώστε να ελεγχθεί η ύπαρξη πιθανής χρωμοσωμικής αλλοίωσης, που δεν ήταν εφικτό να ανιχνευτεί στον καρυότυπο και θα μπορούσε να βοηθήσει στην πρόγνωση των ασθενών.

Ειδικότερα για τη μέθοδο αυτή χρησιμοποιήθηκαν μονιμοποιημένα κύτταρα από διεγερμένες καλλιέργειες μυελού των οστών ή περιφερικού αίματος με το συνδυασμό DSP-30/IL-2. Η επιλογή αυτή δεν είναι τυχαία αλλά οφείλεται στο γεγονός ότι στις συγκεκριμένες καλλιέργειες αυξάνεται η πιθανότητα ανεύρεσης του παθολογικού κλώνου ιδιαίτερα σε μεταφάσεις λόγω της διέγερσης των κυττάρων της ΧΛΛ .

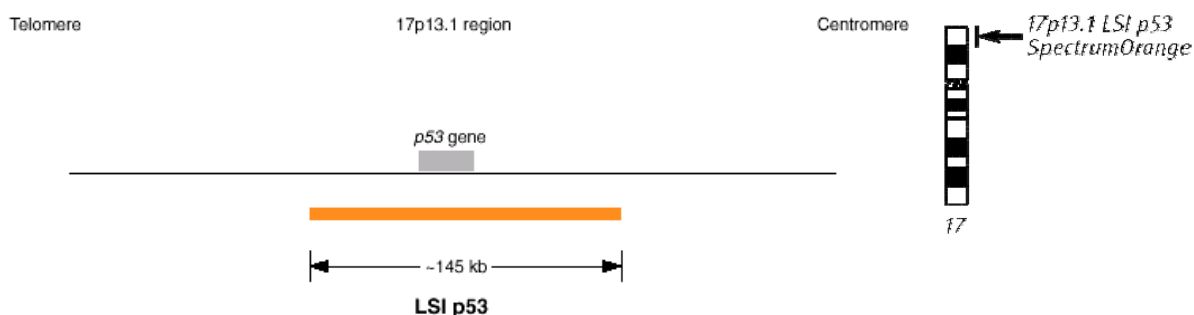
3.3.1 ΜΟΡΙΑΚΟΙ ΑΝΙΧΝΕΥΤΕΣ

Οι μοριακοί ιχνηθέτες που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα διατριβή είναι ειδικοί για τη διερεύνηση των πέντε συνηθέστερων χρωμοσωμικών αλλοιώσεων που ενοχοποιούνται για την παθογένεια της ΧΛΛ. Συγκεκριμένα χρησιμοποιήθηκαν οι συνδυασμοί εμπορικών ιχνηθετών, **1) LSI p53 / LSI ATM και 2) LSI D13S319 / LSI 13q34 / CEP 12**, οι οποίοι είναι ειδικοί για τις χρωμοσωμικές περιοχές που φαίνονται στον παρακάτω πίνακα (πίνακας 13):

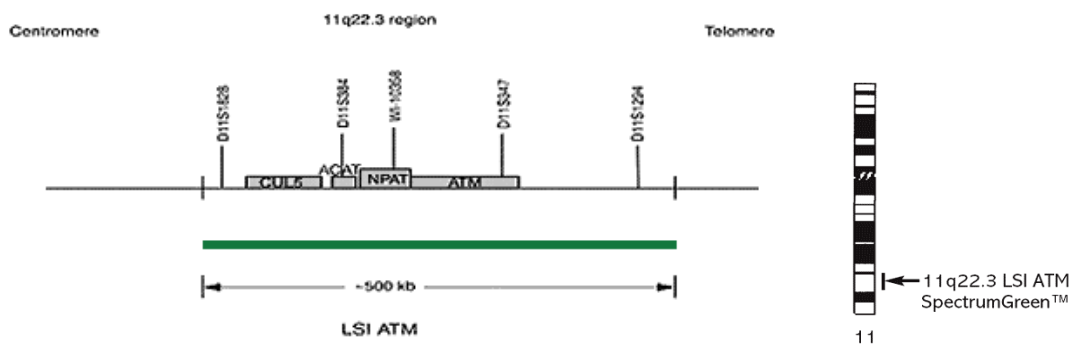
Πίνακας 10. Συγκεντρωτικά οι κύριοι ιχνηθέτες που χρησιμοποιήθηκαν για τη διερεύνηση της ΧΛΛ.

Όνομα Ιχνηθέτη	Θέση Ιχνηθέτη	Φθοριοχρώματα
Vysis LSI p53	17p13.1	SpectrumOrange
Vysis LSI ATM	11q22.3	SpectrumGreen
Vysis LSI D13S319	13q14.3	SpectrumOrange
Vysis LSI 13q34	13q34	SpectrumAqua
Vysis CEP 12	12p11.1-q11	SpectrumGreen

Αναλυτικότερα ο πρώτος συνδυασμός ιχνηθετών περιλαμβάνει τον ιχνηθέτη LSI p53 σημασμένο με SpectrumOrange και μήκος ~145 kb, ο οποίος είναι ειδικός για την περιοχή 17p13.1 η οποία περιέχει ολόκληρο το γονίδιο *TP53* (εικόνα 40). Επίσης περιέχει τον ιχνηθέτη LSI ATM, μήκους ~ 500 kb και σήμανση με SpectrumGreen, ο οποίος είναι ειδικός για την περιοχή 11q22.3 στην οποία περιλαμβάνεται ολόκληρο το γονίδιο *ATM* (εικ.41).

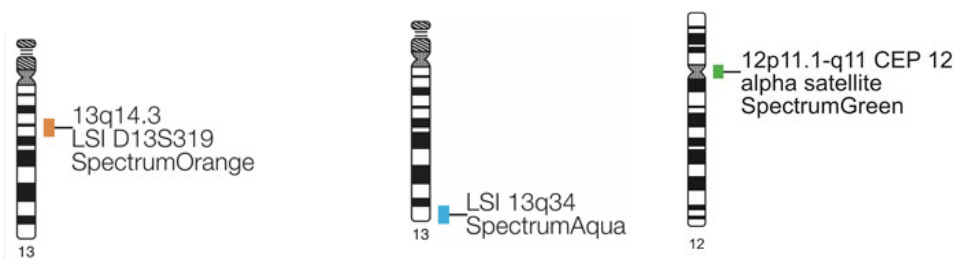


Εικόνα 16: Ιχνηθέτης SpectrumOrange LSI p53 (TP53: γονίδιο ογκοπρωτεΐνης p53). Απεικονίζεται η περιοχή 17p13.1

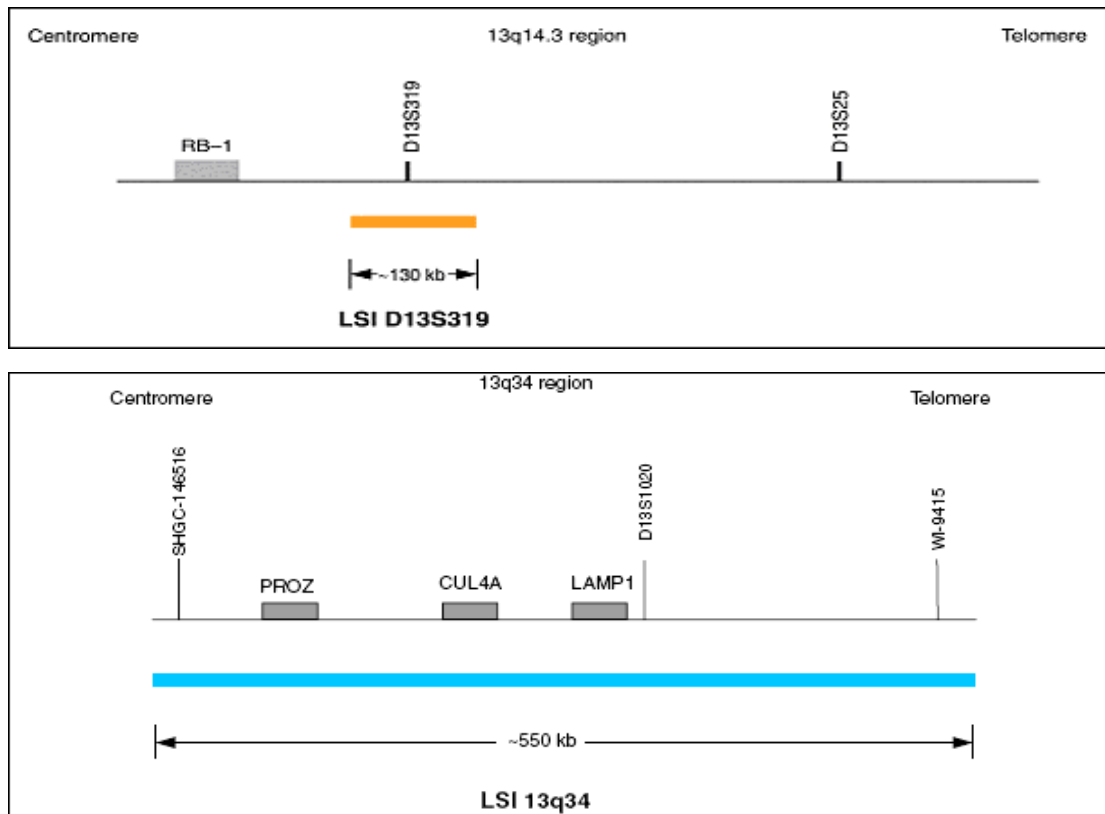


Εικόνα 17: Ιχνηθέτης SpectrumGreen ATM. Απεικονίζεται η περιοχή 11q22.3 και το γονίδιο *ATM* (μεταλλαγμένο γονίδιο Αταξίας Τελαγγειεκτασίας).

Ο δεύτερος συνδυασμός ιχνηθετών περιλαμβάνει τον ιχνηθέτη LSI D13S319 (13q14.3) μήκους ~ 130 kb, τον ιχνηθέτη LSI 13q34 (13q34.3) με μήκος ~ 550 kb αλλά και τον CEP 12, ο οποίος περιέχει την άλφα αλληλουχία δορυφόρο D12Z3 που βρίσκεται στο κεντρομερίδιο του χρωμοσώματος 12 (εικ. 44, 45). Οι παραπάνω ανιχνευτές είναι σημασμένοι με SpectrumOrange, SpectrumAqua και SpectrumGreen αντίστοιχα ο κάθε ένας.



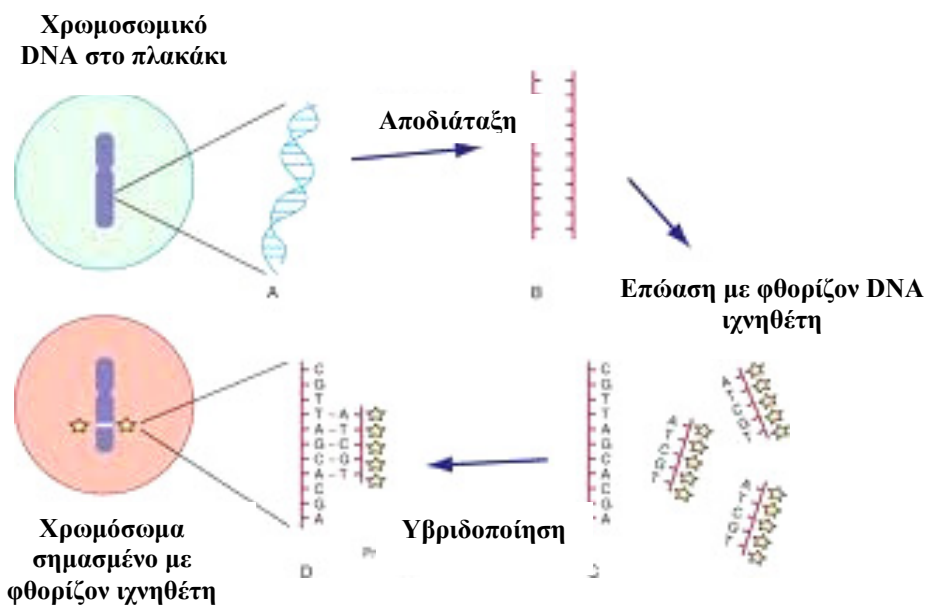
Εικόνα 18: Χρωμοσωμικές περιοχές ειδικές για τον συνδυασμό ιχνηθετών LSI D13S319 / LSI 13q34 / CEP 12



Εικόνα 19: Περιοχές του χρωμοσώματος 13 όπου στοχεύουν οι ανιχνευτές του 2ου συνδυασμού ανιχνευτών .

3.3.2 ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

Τα κύρια στάδια της μεθόδου τα οποία και αναλύονται παρακάτω (§3.3.2.2) είναι: 1) Η ταυτόχρονη αποδιάταξη γενωμικού DNA και μοριακών ανιχνευτών και ακολούθως η υβριδοποίηση των ανιχνευτών στους DNA στόχους (εικ. 20). 2) Η οπτικοποίηση των αποτελεσμάτων σε μικροσκόπιο φθορισμού. 3) Η αξιολόγηση των αποτελεσμάτων.



Εικόνα 20: Στάδιο 1^ο: Αποδιάταξη και υβριδοποίηση.

3.3.2.1 ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ ΜΕΘΟΔΟΥ FISH - ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ

Παρασκευή 20x SSC (3M χλωριούχου νατρίου, 0,3M κιτρικού νατρίου, pH 5.3)

Αναμιγνύονται:

- 88,2gr Tri-Natrium citrate -2H₂O σε σκόνη (C₆H₅Na₃O₇-2H₂O, MW 294.10)
- 175,3gr Sodium Chloride (NaCl, MW 58.44)
- Απεσταγμένο H₂O έως ότου ο συνολικός όγκος γίνει 1 L
- Καλή ανάδευση και ρύθμιση του pH στο 5.3, με προσθήκη συμπυκνωμένου HCl.

** Αποθηκεύση σε θερμοκρασία δωματίου, έως 6 μήνες.*

Παρασκευή 2x SSC

Αραιώνονται 5ml του διαλύματος 20x SSC σε 45ml απεσταγμένου νερού (pH 8.3). Το pH του διαλύματος ρυθμίζεται στο ~7.3 (7,2-7,4) προσθέτοντας ελάχιστη ποσότητα υδροχλωρικού οξέος (HCl 5M).

Παρασκευή διαλυμάτων αιθανόλης

Παρασκευάζουμε διαλύματα αιθυλικής αλκοόλης, αραιώσης 70%, 85% και 100% (v/v) χρησιμοποιώντας 100% αιθανόλη και απεσταγμένο νερό.

** Τα διαλύματα αυτά μπορούν να χρησιμοποιούνται για μία εβδομάδα, εκτός αν παρατηρηθεί εξάτμιση, ή αν το διάλυμα υποστεί αραιώση λόγω υπερβολικής χρήσης.*

Παρασκευή ρυθμιστικού διαλύματος έκπλυσης (Solution A)

Το διάλυμα αυτό, Solution A (0.4 X SSC/0,3% NP-40), χρησιμοποιείται μετά τον υβριδισμό και προκύπτει από την ανάμιξη των παρακάτω συστατικών με τελικό όγκο διαλύματος 1 L.

- 20 mL 20X SSC με pH 5.3
- 977 mL απεσταγμένο νερό
- 30 mL αραιό διάλυμα NP-40

Ακολουθεί καλή ανάμιξη και ρύθμιση του pH στο 7.0-7.5 χρησιμοποιώντας περίπου 9μl πυκνό HCl 37%.

** Το pH του συγκεκριμένου διαλύματος είναι ιδιαίτερα σημαντικό για τη διατήρηση της δομής της χρωματίνης, τόσο σε μεταφασικά χρωμοσώματα, όσο και στους μεσοφασικούς πυρήνες.*

** Το διάλυμα αποθηκεύεται σε θερμοκρασία δωματίου, έως 6 μήνες, εκτός εάν νωρίτερα παρουσιάσει «σημάδια» μόλυνσης ενώ το ήδη χρησιμοποιημένο διάλυμα πρέπει να απορρίπτεται στο τέλος της διαδικασίας.*

Παρασκευή ρυθμιστικού διαλύματος έκπλυσης (Solution A*)

Το διάλυμα, Solution A* (0.4 X SSC/0,1% NP-40), χρησιμοποιείται μετά τον υβριδισμό σε θερμοκρασία 74°C, αναμειγνύοντας:

- 20mL 20X SSC με pH 5.3
- 977 mL Απεσταγμένο νερό
- 3 mL NP-40

Τελικός όγκος 1000 mL.

3.3.2.2 ΣΤΑΔΙΑ ΜΕΘΟΔΟΥ FISH

1) ΑΠΟΔΙΑΤΑΞΗ - ΥΒΡΙΔΟΠΟΙΗΣΗ

i. Επίστρωση χρωμοσωμικού υλικού σε αντικειμενοφόρες πλάκες.

Η επίστρωση πραγματοποιήθηκε ακριβώς όπως και στη διαδικασία του καρυοτύπου (περιγραφή στην § 3.2.1.2) και η επιστρωμένη περιοχή της αντικειμενοφόρου χωρίστηκε σε 2 περιοχές υβριδισμού που οριοθετήθηκαν με ειδική γραφίδα, για τους 2 συνδυασμούς μοριακών ιχνηθετών που αναφέρθηκαν παραπάνω. Απαραίτητος κρίνεται ο έλεγχος της κατανομής των πυρήνων και των μεταφάσεων πάνω στην πλάκα σε μικροσκόπιο αντίθεσης φάσης, δεδομένου ότι η υπερβολική πυκνότητα κυττάρων μπορεί να οδηγήσει σε παρουσία μη ειδικού σήματος (background). Ακολούθησε θέρμανση των πλακιδίων σε θερμαινόμενη πλάκα στους 60°C για μία περίπου ώρα.

ii. Καθαρισμός και αφυδάτωση σε σειρά αιθανολών

Η αποφυγή μη ειδικού σήματος κατά την φθορίζουσα υβριδοποίηση αποτελεί κύριο μέλημα του ερευνητή. Για να επιτευχθεί αυτό, τα πλακάκια εμβαπτίζονται στο διάλυμα 2xSSC για 5 min και ακολούθως στα διαλύματα αιθυλικής αλκοόλης αραίωσης 70%, 85%, 100% (ethanol series) για 3 min στο καθένα και σε θερμοκρασία δωματίου. Σε όλα τα διαλύματα εκτός από την αιθανόλη 100% η επώαση έγινε με ταυτόχρονη ανάδευση. Τα πλακάκια αφέθηκαν να στεγνώσουν στον αέρα.

iii. Προετοιμασία ιχνηθετών

Οι ιχνηθέτες της Vysis που χρησιμοποιήθηκαν περιλαμβάνουν ήδη το κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα (buffer). Περιέχουν, επιπλέον, φορμαμίδη, η οποία σταθεροποιεί τις αποδιατεταγμένες έλικες του DNA που θα προκύψουν. Οπότε, απευθείας το υλικό τους αναδεύεται και είναι έτοιμο προς χρήση.

**Απαιτείται ιδιαίτερη προσοχή κατά τον χειρισμό των probes, καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος, διότι η φορμαμίδη είναι ισχυρό καρκινογόνο και διαβρωτικό.*

iv. Τοποθέτηση ιχνηθετών

Στο στεγνό πλέον πλακάκι και σε συνθήκες χαμηλού φωτισμού, επιστρώνονται 10λ διαλύματος του 1^ο συνδυασμού ιχνηθετών στη μια περιοχή υβριδισμού και 10λ διαλύματος από το 2^ο συνδυασμό ιχνηθετών στην άλλη.

Ακολουθεί άμεση κάλυψη των περιοχών υβριδισμού με καλυπτρίδα 18x18 και το διάλυμα των ιχνηθετών απλώνεται ομοιόμορφα κάτω από τις καλυπτρίδες.

** Στο στάδιο αυτό ιδιαίτερη προσοχή απαιτεί η αποφυγή δημιουργίας φυσαλίδων αέρα αφού αποτελεί παράγοντα παρεμπόδισης του υβριδισμού.*

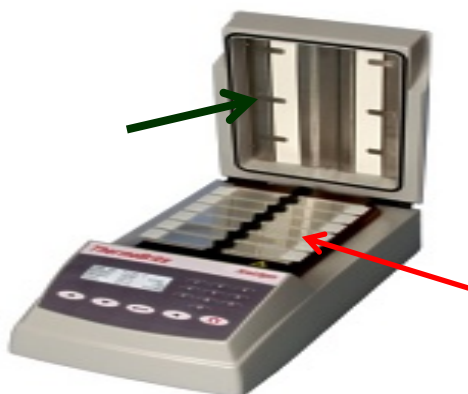
Στη συνέχεια, οι αντικειμενοφόρες πλάκες στεγανοποιούνται, με προσθήκη κόλλας ελαστικού (Sement glue) περιφερικά κάθε καλυπτρίδας και αφήνονται να στεγνώσουν στο σκοτάδι.

v. Αποδιάταξη και υβριδοποίηση

Τα πλακάκια τοποθετούνται στην ειδική επωαστική συσκευή (Vysis Hybrite™) (εικ. 21), σε περιβάλλον υγρασίας, η οποία ρυθμίζεται σε κατάλληλο πρόγραμμα επώασης επιτυγχάνοντας έτσι:

1. **την ταυτόχρονη αποδιάταξη** των δίκλωνων μορίων του γενωμικού DNA και των μοριακών ιχνηθετών σε θερμοκρασία (T_m) 74°C για 1 λεπτό και
2. **τον υβριδισμό** των συμπληρωματικών μορίων DNA (ιχνηθέτη και DNA στόχου) στους 37°C για ~16 ώρες (over night).

** Η διάρκεια υβριδισμού εξαρτάται από το είδος του μοριακού ιχνηθέτη. Σύμφωνα με το τεχνικό εγχειρίδιο της Vysis η επώαση υβριδισμού των ανιχνευτών διαρκεί από 30 min έως 16 ώρες (overnight).*



Εικόνα 21. Thermobrite. Διακρίνονται οι θέσεις των αντικειμενοφόρων (κόκκινο βέλος) και οι λωρίδες βαμβακιού (πράσινο βέλος). Οι λωρίδες βαμβακιού του οργάνου διαβρέχονται και επανατοποθετούνται στη θέση τους. Με τον τρόπο αυτό δημιουργείται υγρασία κατά την επώαση.

Σε αυτό το σημείο θα πρέπει να ειπωθεί ότι στο στάδιο της αποδιάταξης επιδιώκουμε τον πλήρη αποχωρισμό των 2 αλυσίδων του DNA έτσι ώστε να καθίσταται ελεύθερη η πρόσβαση των μοριακών ανιχνευτών στο συμπληρωματικό τμήμα του DNA. Επίσης ο υβριδισμός επιτυγχάνεται με αργή και σταδιακή μείωση της θερμοκρασίας έτσι ώστε να υπάρχει επαρκής χρόνος συνάντησης των απόλυτα συμπληρωματικών αλληλουχιών μεταξύ τους. Σε απότομη ψύξη θα ευνοηθούν λανθασμένες συνδέσεις, γεγονός που θα αποτελέσει σφάλμα για το πείραμα.

vi. Εκπλύσεις και κατάδειξη σήματος υβριδισμού

- Παραλαβή των αντικειμενοφόρων πλακών από το συσκευή επώασης thermobrite και προσεκτική αφαίρεση της κόλλας ελαστικού αλλά της και καλυπτρίδας με τη βοήθεια λεπτής λαβίδας, σε συνθήκες χαμηλού φωτός.
- Τοποθέτηση των αντικειμενοφόρων πλακών στο διάλυμα έκπλυσης Solution A για 1 λεπτό σε θερμοκρασία δωματίου, με ταυτόχρονη ανακίνηση.
- Τοποθέτηση των αντικειμενοφόρων πλακών στο διάλυμα έκπλυσης Solution A* για 2 λεπτά στους 72°C

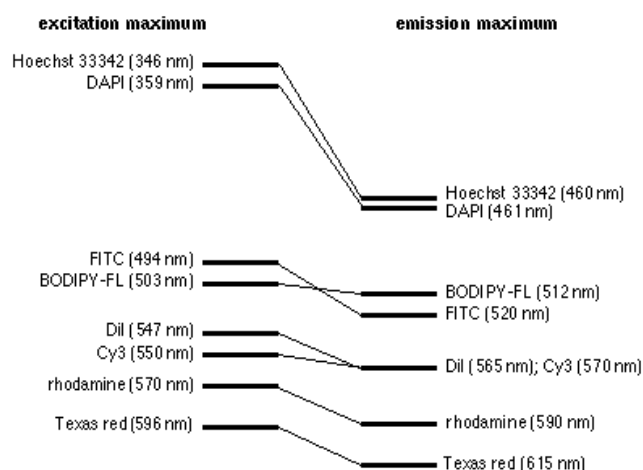
** Οι εκπλύσεις στα συγκεκριμένα διαλύματα βοηθούν στην αποφυγή της λήψης μη ειδικών σημάτων*

- Αφυδάτωση με διαδοχική εμβάπτιση των αντικειμενοφόρων πλακών για 1 λεπτό σε καθένα από τα διαλύματα αιθανόλης 70%, 85% και 100%.
- Στέγνωμα των αντικειμενοφόρων στον αέρα, σε σκοτεινό περιβάλλον και σε όρθια θέση.
- Προσθήκη 10 μ l χρωστικής αντίχρωσης DAPI (1 μ g/ μ L) σε κάθε περιοχή υβριδισμού και τοποθέτηση μεγάλης καλυπτρίδας 24x50mm.
- Τοποθέτηση αντικειμενοφόρων πλακών σε σκοτεινό περιβάλλον στους 4°C σε ειδικές χάρτινες θήκες για τουλάχιστον 30 λεπτά.
- Ακολουθεί η παρατήρηση σε μικροσκόπιο φθορισμού.

2) ΠΑΡΑΤΗΡΗΣΗ & ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Η παρατήρηση των αντικειμενοφόρων πλακών πραγματοποιείται σε μικροσκόπιο φθορισμού. Το λευκό φως που προκύπτει από τη λάμπα-πηγή που περιέχει το μικροσκόπιο φιλτράρεται, έτσι ώστε μόνο τα μήκη κύματος που

διεγείρουν τα φθοριοχρώματα να προσπίπτουν στο δείγμα. Η εκπομπή δευτερεύουσας ακτινοβολίας από τα διαφορετικά φθοριοχρώματα έχει ως αποτέλεσμα διαφορετικά μήκη κύματος να γίνονται ορατά ως φωτεινά χρωματισμένα σήματα (εικόνα 22).



Εικόνα 22. Μήκη κύματος ακτινοβολίας διέγερσης και εκπομπής φθοριοφόρων που μπορεί να σημάνουν μοριακούς ιχνηθέτες [73].

Η επεξεργασία των εικόνων που λήφθηκαν από το μικροσκόπιο φθορισμού πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια του λογισμικού προγράμματος ISIS Metasystems. Τα βήματα που ακολουθήθηκαν είναι.

1. Άνοιγμα της λυχνίας υδραργύρου του μικροσκοπίου φθορισμού.
2. Έναρξη λειτουργίας μικροσκοπίου φθορισμού με πρώτη θέση παρατήρησης το φίλτρο DAPI και άνοιγμα H/Y και λογισμικού συστήματος Isis.
3. Καταχώρηση του κωδικού FISH του περιστατικού στη βάση δεδομένων. Έτσι δημιουργείται το νέο ηλεκτρονικό αρχείο στο οποίο θα αποθηκευθούν τα επιμέρους στοιχεία και τα δεδομένα ανάλυσης για το συγκεκριμένο δείγμα.
4. Σε όλες τις μελέτες μεσοφασικού FISH (Interphase FISH, iFISH) πρώτο μέλημα συνιστά ο έλεγχος της ειδικότητας του σήματος αναλύοντας τουλάχιστον 10 μεταφάσεις (εάν υπάρχουν) αφού πρώτα εκτιμηθεί η καταλληλότητα των παρασκευασμάτων.
5. Η ανεύρεση περιοχών που είναι κατάλληλες για καταμέτρηση πυρήνων αποφεύγοντας τα εξής:
 - περιοχές στις οποίες τα όρια των πυρήνων είναι ασαφή
 - πυρήνες για τα σήματα των οποίων υπάρχει υποκειμενική κρίση

-
- περιοχές όπου τα σήματα έχουν μικρή ένταση και μικρή ειδικότητα ή για τα οποία υπάρχει θόρυβος στο υπόβαθρο (background).
 - πυρήνες στους οποίους η αντίχρωση DAPI δεν επαρκεί για τον προσδιορισμό των ορίων τους

Συνεπώς για την αξιολόγηση λαμβάνονται υπόψη μόνο οι πυρήνες που εμφανίζουν ευκρινή σήματα

6. Καταμέτρηση τουλάχιστον 200 πυρήνων.

- Η καταμέτρηση πραγματοποιήθηκε, χρησιμοποιώντας τον αντικειμενικό καταδυτικό φακό 100x και συγκεκριμένα μετρήθηκε ο αριθμός των σημάτων εντός του ορίου του μεσοφασικού πυρήνα σε καθένα από τα 200 αξιολογήσιμα κύτταρα.
- Έχοντας υπόψη την τριδιάστατη στερεοδομή του πυρήνα, η εστίαση με το μικρομετρικό κοχλία στα διαφορετικά επίπεδα πραγματοποιήθηκε σε κάθε πυρήνα ώστε να καταμετρηθούν όλα τα υπάρχοντα σήματα.
- Δύο σήματα του ίδιου μεγέθους που χωρίζονται με μια απόσταση ίση ή μικρότερη από τη διάμετρο του σήματος, πρέπει να μετρώνται ως ένα σήμα (πρόκειται για κύτταρα που έχουν διπλασιάσει το DNA τους, και βρίσκονται πιθανόν στη G₂ φάση του κυτταρικού κύκλου).

7. Η αξιολόγηση επιτυχούς υβριδισμού και κατάδειξης σήματος πραγματοποιήθηκε με βάση τα παρακάτω κριτήρια:

Ένταση σήματος ιχνηθέτη: Τα σήματα πρέπει να είναι φωτεινά, ευκρινή και εύκολα αξιολογήσιμα. Το σχήμα των σημάτων πρέπει να είναι ωοειδές, φωτεινό και συμπαγές. Παρουσία πολλών μικρών φθορίζοντων σημάτων στους πυρήνες και στις μεταφάσεις ενδέχεται να οφείλονται σε παρουσία μη ειδικού σήματος (background).

Υπόβαθρο: Το υπόβαθρο πρέπει να είναι σκούρο ή μαύρο, χωρίς πολλά φθορίζοντα σωματίδια που είναι ένδειξη παρουσίας μη ειδικού σήματος υποβάθρου (background).

Η ύπαρξη μη ειδικού σήματος από έναν δίκλωνο ολιγονουκλεοτιδικό ιχνηθέτη μπορεί να οφείλεται σε ποικίλους λόγους. Οι κυριότεροι από αυτούς είναι:

- ↪ Η μερική αποδόμηση του ιχνηθέτη (π.χ. λόγω απότομης αύξησης θερμοκρασίας).

-
- Η υπερβολικά μεγάλη συγκέντρωση του ολιγονουκλεοτιδικού ιχνηθέτη σε σχέση με την πυκνότητα των κυττάρων.
 - Λάθος στη διαδικασία εκπλύσεων μετά τον υβριδισμό.
 - Η κακή ποιότητα του κυτταρικού παρασκευάσματος.
7. Επιπλέον αξιολόγηση 20 μεταφάσεων (metaphaseFISH, mFISH), με σκοπό την εντόπιση της συγκεκριμένης περιοχής που διερευνούμε η οποία μπορεί να βοηθήσει στην ανεύρεση των σημείων τομής πιθανών ελλείψεων ή μετατοπίσεων που έχουν ή δεν έχουν ανιχνευτεί στον καρυότυπο.
 8. Αποθήκευση αντιπροσωπευτικών εικόνων πυρήνων και μεταφάσεων σε ηλεκτρονική μορφή.
 9. Μετά το πέρας της ανάλυσης, οι αντικειμενοφόρες πλάκες υβριδισμού αρχειοθετούνται σε ειδικές θήκες και αποθηκεύονται στους -20°C απουσία φωτός.

3) ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Αναμενόμενα αποτελέσματα

Κάθε ιχνηθέτης πρέπει να παράγει ένα σήμα για κάθε αντίγραφο της αλληλουχίας στόχου του. Συνεπώς, από τον υβριδισμό του 1^{ου} συνδυασμού ανιχνευτών αναμένεται να ληφθούν δύο κόκκινου χρώματος σήματα p53 και δύο σήματα πράσινου χρώματος ATM στα κύτταρα με δύο φυσιολογικά αντίγραφα των χρωμοσωμάτων 17 και 11 αντίστοιχως. Ομοίως, ο υβριδισμός του 2^{ου} συνδυασμού ανιχνευτών αναμένεται να παράγει δύο κόκκινου χρώματος σήματα D13S319, δύο πράσινα σήματα CEP12 και δύο σήματα LSI 13q34 γαλάζιου χρώματος στα κύτταρα με δύο φυσιολογικά αντίγραφα των χρωμοσωμάτων 12 και 13. Η περίσσεια ή απώλεια σήματος ενός ιχνηθέτη σε κάποιο πυρήνα υποδεικνύει την προσθήκη ή την απώλεια της αντίστοιχης χρωμοσωμικής περιοχής για την οποία είναι ειδικός ο συγκεκριμένος ιχνηθέτης.

Ολοκλήρωση διαδικασίας

Μετά την ολοκλήρωση της μικροσκοπικής ανάλυσης, εξάγεται το αποτέλεσμα ποιοτικά και ποσοτικά. Δηλαδή αποφαινεται αν το δείγμα είναι αρνητικό ή θετικό για

κάποια αλλοίωση (ποιοτικό αποτέλεσμα) και ταυτόχρονα υπολογίζονται τα ποσοστά των ανώμαλων πυρήνων και μεταφάσεων επί του συνόλου των παρατηρηθέντων κυττάρων (ποσοτικό αποτέλεσμα).

Τα τελικά αποτελέσματα της συγκεκριμένης μελέτης περιγράφηκαν σύμφωνα με το διεθνές σύστημα Ονοματολογίας: An International System for Human Cytogenetic Nomenclature, 2013- ISCN 2013.

3.4 ΓΟΝΟΤΥΠΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ UGT1A1*28 ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΥ

Η γονοτυπική ανάλυση του πολυμορφισμού UGT1A1*28 πραγματοποιήθηκε σε 109 από τα 237 δείγματα ασθενών με ΧΛΛ και επιπροσθέτως σε 108 δείγματα τα οποία προέρχονται από υγιείς δότες (μάρτυρες). Η μοριακή ανάλυση και των 237 ασθενών δεν ήταν δυνατή εξαιτίας της έλλειψης βιολογικού υλικού. Ειδικότερα, χρησιμοποιήθηκαν δείγματα DNA των παραπάνω ατόμων, τα οποία αναλύθηκαν γονοτυπικά με την τεχνική της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (Real Time -PCR, RT-PCR) αλλά και με την τεχνική της απλής PCR και τον διαχωρισμό των προϊόντων της σε πήκτωμα ακρυλαμίδης 12%.

3.4.1 ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

Συνοπτικά οι διαδικασίες που έλαβαν χώρα για την γονοτυπική ανάλυση του UGT1A1*28 πολυμορφισμού περιλαμβάνουν:

- 1) Απομόνωση του γενωμικού DNA από κύτταρα ασθενών και μαρτύρων.
- 2) Γονοτυπικό χαρακτηρισμό των δειγμάτων με τη μέθοδο RT-PCR.
- 3) Επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων με απλή PCR και ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα ακρυλαμίδης 12%.

3.4.2 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ DNA

Η απομόνωση του DNA πραγματοποιήθηκε σε κύτταρα του μυελού των οστών ή περιφερικού αίματος ασθενών με ΧΛΛ με το QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Το συγκεκριμένο kit επιλέχθηκε ώστε να ληφθεί όσο το δυνατόν υψηλότερη ποιότητα μοριακού DNA, το οποίο απαιτείται στη μέθοδο RT-PCR. Γενικά τα βήματα που ακολουθούνται είναι τα εξής:

- Λύση ερυθρών αιμοσφαιρίων και διαδοχικές πλύσεις λευκών αιμοσφαιρίων.
- Λύση λευκών αιμοσφαιρίων και απελευθέρωση του DNA σε διαλυτή μορφή.
- Διαδοχικές επώσεις του DNA με κατάλληλα αντιδραστήρια έτσι ώστε να απαλλαγθεί από τα μακρομόρια (πρωτεΐνες, νουκλεάσες, RNA κ.α.) που προκύπτουν μετά από το σπάσιμο των κυτταρικών μεμβρανών και οργανιδίων.
- Συλλογή του DNA μετά από έκλουση από τη στήλη του kit.

3.4.3 ΓΟΝΟΤΥΠΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΟΥ ΥΠΟΚΙΝΗΤΗ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ *UGT1A1*

Ο αριθμός των TA επαναλήψεων στην περιοχή «TATA box» του υποκινητή του γονιδίου *UGT1A1* αναλύθηκε με δύο τεχνικές στα DNA δείγματα των ασθενών και των μαρτύρων:

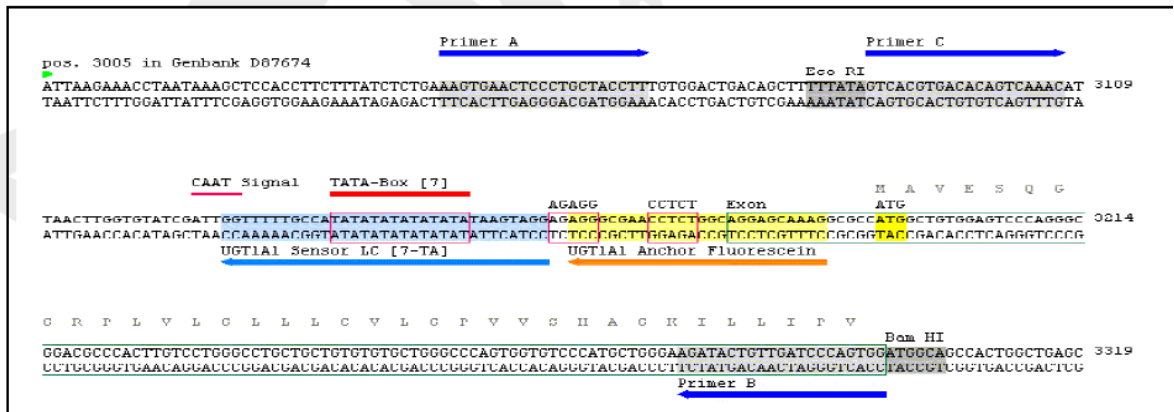
- 1) Με την τεχνική της Real Time PCR (RT-PCR) και
- 2) Την τεχνική της συμβατικής PCR και διαχωρισμό των προϊόντων/αλληλομόρφων σε πήκτωμα ακρυλαμίδης 12% προς επίτευξη διπλής διασταύρωσης των αποτελεσμάτων.

3.4.3.1 ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ ΠΡΑΓΜΑΤΙΚΟΥ ΧΡΟΝΟΥ (REAL TIME -PCR, RT-PCR)

Ο αριθμός των επαναλήψεων TA στην περιοχή «TATA box» του υποκινητή του γονιδίου *UGT1A1* αναλύθηκε με την τεχνική της Real Time PCR (RT-PCR) χρησιμοποιώντας το σύστημα LightCycler 1.5 Real-Time PCR System (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland). Πρόκειται για μια ακριβή και ταχεία τεχνική που μετρά τη συγκέντρωση των προϊόντων PCR κατά τη διάρκεια της εκθετικής φάσης της αντίδρασης σε κινητική αντίδρασης φθορισμού. Έτσι η πληροφορία παρέχεται καθώς η ενίσχυση βρίσκεται σε εξέλιξη χωρίς να απαιτούνται μετά-PCR χειρισμοί.

Η ανάλυση της αλληλουχίας «TATA box» του υποκινητή του *UGT1A1* γονιδίου πραγματοποιήθηκε για πρώτη φορά - πλύν του Borlak και συνεργατών - με την τεχνική της RT-PCR και χρήση της τεχνολογίας *Hybridization Probes* (*HybProbes*) [91]. Για τον λόγο αυτό οι εκκινητές και οι probes κατασκευάστηκαν ειδικά, κατόπιν παραγγελίας, από εξειδικευμένη εταιρία (Roche Diagnostics Basel, Switzerland), με στόχο την ενίσχυση περιοχής μεγέθους 226bp. Η περιοχή που ενισχύθηκε, οι αλληλουχίες των probes και των εκκινητών, καθώς και η περιοχές για τις οποίες είναι ειδικοί απεικονίζονται παρακάτω (εικόνα 23).

947859	Borlak et al. (2000) UGT1 rs5839491		D87674	Tm
Primer A	AAgTgAACTCCCTgCTACCTT	S	3045-3065	54,8°C
Primer B	CCACTgggATCAACAgTATCT	A	3297-3277	52,6°C
Anchor	CTTTgCTCCTgCCAgAggTTCgCCCT-FL	A	3188-3163	72,2°C
S7 (640)	640-CCTACTTATATATATATATATATggCAAAAACC p	A	3160-3128	53,8°C



Εικόνα 23: Αλληλουχίες των ειδικών εκκινητών και probes καθώς και η αλληλουχία της περιοχής που ενισχύθηκε.

Ειδικότερα, οι δύο probes αναγνωρίζουν γειτονικές περιοχές οι οποίες χωρίζονται από 2 βάσεις, με τον μικρότερο probe να έχει συμπληρωματική αλληλουχία με αυτή που φέρει τη μετάλλαξη. Σαν δότης του φλουροφόρου χρησιμοποιήθηκε η Φλουορεσκεΐνη, η οποία και μπλόκαρε την επιμήκυνση που πραγματοποιήθηκε από τον probe κατά τη διάρκεια της PCR αντίδρασης. Ο LC-Red 640 χρησιμοποιήθηκε ως ο δέκτης της FRET διαδικασίας ώστε το 39 φωσφορυλιωμένο άκρο του να μπλοκάρει την επιμήκυνση. Οι probes συντέθηκαν από την TIB MOLBIOL (Βερολίνο, Γερμανία). Η μεγαλύτερη σταθερότητα του μεγαλύτερου probe συνδέθηκε με την απώλεια φθορισμού καθώς ο βραχύτερος probe τήκεται από την αλληλουχία μήτρα.

Η μέθοδος αυτή προσφέρει μεγαλύτερη ακρίβεια και αμεσότητα σε σχέση με την έως σήμερα χρησιμοποιούμενη χρονοβόρα και επίπονη μέθοδο ανίχνευσης της εκτεταμένης διαμόρφωσης του υποκινητή (PCR και διαχωρισμός προϊόντων σε πηκτώμα ακρυλαμίδης). Στον πίνακα που ακολουθεί απεικονίζονται οι συνθήκες της συγκεκριμένης μεθόδου και οι συγκεντρώσεις των εκκινητών και των probes που χρησιμοποιήθηκαν (πίνακας 11). Όλα τα δείγματα αναλύθηκαν δύο φορές το κάθε ένα σε κάθε αντίδραση που πραγματοποιήθηκε.

Πίνακας 11: Συνθήκες αντίδρασης RT-PCR

20 µL reaction mixture		Parameter	Value			Parameter	Value		
Primer A	0,4 µM	Cycles	45			Cycles	1		
Primer B	0,4 µM	Analysis Mode	<i>Quantification</i>			Analysis Mode	<i>Melting Curve</i>		
HybProbe FL	0,1 µM		<i>Segment</i>				<i>Segment</i>		
HybProbe FL	0,1 µM		1	2	3		1	2	3
MgCl ₂	4 mM	Target Temp [°C]	95	55	72	Target Temp [°C]	95	40	85
Roche Diagnostics DNA Master		Incubation Time [sec]	0	7	12	Incubation Time [sec]	20	20	0
		Transition Rate [°C/s]	20	20	20	Transition Rate [°C/s]	20	20	0,2
		Acquisition Mode	none	single	none	Acquisition Mode	none	none	cont

Για την ανάλυση και αξιολόγηση των αποτελεσμάτων που προέκυψαν χρησιμοποιήθηκαν οι καμπύλες τήξεως των προϊόντων της αντίδρασης (απεικόνιση στην § 4.4.1). Σε αυτές ο φθορισμός μετατράπηκε σε κορυφές τήξης με τη βοήθεια κατάλληλου λογισμικού συστήματος, με αποτέλεσμα την απεικόνιση σε διάγραμμα των αρνητικών παράγωγων του φθορισμού κάθε προϊόντος σε σχέση με τη θερμοκρασία.

3.4.3.2 ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (PCR)

Τα δείγματα DNA αναλύθηκαν επιπροσθέτως και με απλή PCR ώστε να επιβεβαιωθούν τα αποτελέσματα της παραπάνω πρωτότυπης αντίδρασης RT-PCR. Η αλληλουχία του γονιδιώματος που ενισχύθηκε αφορά μια περιοχή 71-73 bp στον υποκινητή του *UGT1A1* και εκτείνεται από το νουκλεοτίδιο 6 έως και το 78 αναρροϊκά της κωδικής περιοχής του γονιδίου και για το λόγο αυτό χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές που φαίνονται στον πίνακα 12 (πίνακας 12).

Πίνακας 12: Αλληλουχίες εκκινητών.

Μέγεθος περιοχής ενίσχυσης	Αλληλουχίες εκκινητών
71-73 bp	Forward: 5' – CTTGGTGTATCGATTGGTTTTTG – 3'
	Reverse: 5' – TTTGCTCCTGCCAGAGGTTTCG – 3'

Αναλυτικότερα όσον αφορά στη διαδικασία που ακολουθήθηκε, σε ένα σωληνάριο τύπου eppendorf τοποθετήθηκαν τα εξής:

- Το ολικό γενωμικό DNA 0,5–1 µg
- Ρυθμιστικό διάλυμα 10X (1/10 του τελικού όγκου)
- MgCl₂ σε τελική συγκέντρωση 2,5 mM
- dNTPs σε τελική συγκέντρωση 200 µM για το καθένα
- Οι ειδικοί εκκινητές σε τελική συγκέντρωση 0,5 pmoles/λ
- 2,5 U ένζυμο Taq πολυμεράση
- ddH₂O μέχρι τελικού όγκου 100λ

Τέλος τα δείγματα μεταφέρθηκαν στο θερμικό κυκλοποιητή εισάγοντας το κατάλληλο πρόγραμμα κύκλων το οποίο παρουσιάζεται στον πίνακα που ακολουθεί (πίνακας 13).

Πίνακας 13: Συνθήκες αντίδρασης PCR

Στάδια	Συνθήκες
1. Αρχική αποδιάταξη γενωμικού DNA	92 °C για 5 min
2. Αποδιάταξη	94 °C για 30 sec
3. Υβριδισμός	57 °C για 30 sec
4. Επιμήκυνση	72 °C για 45 sec
5. Επιμήκυνση τελευταίου κύκλου	72 °C για 10 min
6. Συντήρηση δειγμάτων	4 °C
Κύκλοι	30

3.4.3.3 ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΣ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ PCR ΣΕ ΠΗΚΤΩΜΑ ΠΟΛΥΑΚΡΥΛΑΜΙΔΗΣ 12%

Ο διαχωρισμός των προϊόντων μεγέθους 71 ή 73 ζευγών βάσεων (bp) που προέκυψαν από την αντίδραση της παραπάνω PCR πραγματοποιήθηκε σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης 12%. Ύστερα από την ηλεκτροφόρηση του πηκτώματος γίνεται δυνατός ο διαχωρισμός των προϊόντων που διαφέρουν έστω και κατά 1 ζεύγος βάσεων και έτσι πραγματοποιείται ο γονοτυπικός προσδιορισμός των δειγμάτων για τον πολυμορφισμό UGT1A1*28.

ΥΛΙΚΑ

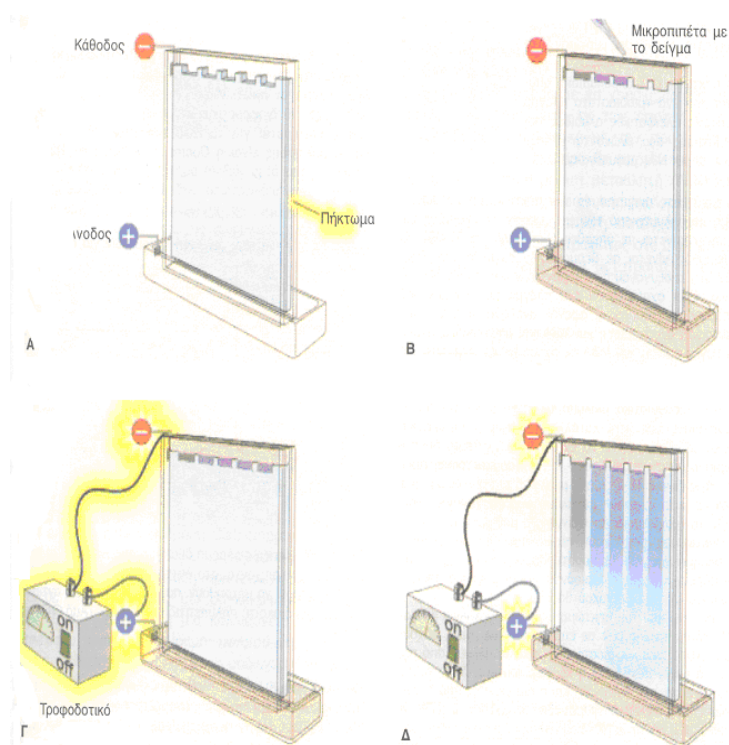
- 9 ml διαλύματος ακρυλαμίδης 40% w/v (με αναλογία ακρυλαμίδης / bis ακρυλαμίδης 19/1)
- 15ml ddH₂O
- 6ml TBE 5x
- 250λ APS
- 25λ TEMED
- TBE 1x (χρησιμοποιείται για την πλήρωση της συσκευής)

Τελικός όγκος ~30 ml

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

- Στερεώνεται μια κατασκευή από δύο τζάμια διαστάσεων 20x20 cm με τσιμπίδες ώστε η μεταξύ τους απόσταση να είναι 0,8 mm (πάχος πηκτώματος ακρυλαμίδης) και ειδικό χτένι ανάμεσά τους έτσι ώστε να δημιουργηθούν οι θέσεις φόρτωσης.
- Η μείξη των παραπάνω συστατικών γίνεται αρκετά γρήγορα προς αποφυγή του πολυμερισμού του μείγματος, και κατευθείαν αποχύνεται ανάμεσα στα δύο τζάμια, προσέχοντας τη δημιουργία κενών αέρος.
- Πολυμερισμός του μείγματος έπειτα από ~30 min αναμονής, και τοποθέτηση της κατασκευής σε κατάλληλη συσκευή ηλεκτροφόρησης. Χρησιμοποιείται το ρυθμιστικό διάλυμα της ηλεκτροφόρησης 1X TBE.
- 30λ από κάθε προϊόν της PCR αναμιγνύονται με 8λ διαλύματος χρωστικής η οποία περιέχει κυανούν της ξυλόλης (0,25%) και μπλε της βρωμοφαινόλης (0,25%) και «φορτώνονται» στις θέσεις ηλεκτροφόρησης.

- Συνθήκες ηλεκτροφόρησης: 190kV/h, 90W, 40mA. Χρόνος ηλεκτροφόρησης: 5 ώρες περίπου
- Ακολουθεί η αποσύνδεση της συσκευής από το τροφοδοτικό και το πήκτωμα τοποθετείται σε διάλυμα βρωμιούχου αιθιδίου (0,5 μg/ml) για 15–20 min, ώστε να αναδειχθούν οι ζώνες του DNA
- Το πήκτωμα τοποθετείται σε λάμπα υπεριώδους ακτινοβολίας και φωτογραφίζεται.



Εικόνα 24: Κατακόρυφη ηλεκτροφόρηση πολυακρυλαμίδης

3.5 ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΚΙΝΔΥΝΟΥ ΓΙΑ ΤΗΝ ΕΚΔΗΛΩΣΗ ΤΗΣ ΧΛΛ

Στα πλαίσια των πρόσφατων δημοσιευμένων δεδομένων ότι η παθογένεια της ΧΛΛ οφείλεται σε ένα συνδυασμό έκθεσης σε τοξικούς περιβαλλοντικούς παράγοντες και γενετικής προδιάθεσης έγινε προσπάθεια συσχέτισης της ΧΛΛ με συγκεκριμένους γονοτοξικούς παράγοντες. Η προσπάθεια αυτή βασίστηκε στη λήψη συγκεκριμένων ερωτηματολογίων που αφορούσε σε προσωπικά στοιχεία των ασθενών (δημογραφικά και κλινικά) και πιθανή τους έκθεση σε ενοχοποιημένους για τη ΧΛΛ γονοτοξικούς παράγοντες. Η λήψη των συγκεκριμένων ερωτηματολογίων έγινε μέσω προσωπικών συνεντεύξεων των ίδιων των ασθενών ή των α΄ βαθμού συγγενών τους. Επίσης κρίθηκε απαραίτητη η λήψη των ίδιων ερωτηματολογίων από άτομα υγιούς πληθυσμού (μάρτυρες) ώστε να είναι εφικτή η σύγκριση και στατιστική επεξεργασία των δεδομένων. Το πλήθος των ασθενών και των μαρτύρων που συμπεριλήφθησαν στη συγκεκριμένη επιδημιολογική μελέτη ήταν 137 και 141 αντιστοίχως. Επίσης δόθηκε προσοχή στην επιλογή των συγκεκριμένων μαρτύρων ώστε το ηλικιακό τους εύρος αλλά και ο μέσος όρος της ηλικίας τους να συμπίπτει με αυτά των ασθενών προς αποφυγή άστοχων συσχετίσεων που πιθανότατα να οφείλονται στη διαφορά ηλικίας

Η λήψη των συγκεκριμένων ερωτηματολογίων πραγματοποιήθηκε ύστερα από την ενυπόγραφη συγκατάθεση ασθενών και μαρτύρων ενώ τα προσωπικά τους δεδομένα προστατεύονται αυστηρά και τηρείται απόλυτη εχεμύθεια. Το επιδημιολογικό δελτίο, στο οποίο στηρίχτηκε η έρευνα καταστρώθηκε βάση ανασκοπικών επιδημιολογικών μελετών της παγκόσμιας βιβλιογραφίας και παρατίθεται παρακάτω [5,16,18].

**ΕΡΩΤΗΜΑΤΟΛΟΓΙΟ ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑΣ ΤΗΣ ΧΡΟΝΙΑΣ
ΛΕΜΦΟΓΕΝΟΥΣ ΛΕΥΧΑΙΜΙΑΣ**

Όνοματεπώνυμο:

Τηλέφωνο:

Διεύθυνση

Ηλικία:

Οικογενειακή κατάσταση:

Επάγγελμα:

Καταγωγή:

Ημερομηνία διάγνωσης:

Έναρξη θεραπείας:

Καπνιστής: Διάρκεια

Τσιγάρα ημερησίως:

Κατανάλωση Αλκοολ:

Συχνότητα:

Άλλα επάγγελα:

Χρόνια:

1) Συγγενείς πρώτου βαθμού με διάγνωση ΧΛΛ ή ΗΛΔ

ΝΑΙ:

ΟΧΙ:

2) Είχατε νοσήσει από πνευμονία-λοίμωξη του αναπνευστικού- το πολύ πέντε χρόνια πριν από τη διάγνωση της ΧΛΛ

ΟΧΙ

ΝΑΙ:

ΠΟΤΕ

3) Χρησιμοποιείτε βαφή μαλλιών

ΟΧΙ:

ΝΑΙ:

ΠΟΣΑ ΧΡΟΝΙΑ:

4) Εργάζεσθε στο χώρο της κοσμετολογίας

ΟΧΙ

ΝΑΙ:

ΠΟΣΑ ΧΡΟΝΙΑ:

5) Εργάζεσθε ως νοσηλεύτης/τρια με χημειοθεραπευτικά

ΟΧΙ

ΝΑΙ

ΠΟΣΑ ΧΡΟΝΙΑ

Λαμβάνετε μέτρα προστασίας

ΟΧΙ

ΝΑΙ

6) Εάν είστε εργάτης Βιομηχανίας Μετάλλου είχατε εργασθεί με τις παρακάτω ουσίες:

Χρώμιο	Νικέλιο	Αρσενικό	Θάλλιο	Αμίαντο
Χαλκό	Μόλυβδο	Κάδμιο		

7) Έχετε εργασθεί σε πρατήριο βενζίνης;

ΟΧΙ	ΝΑΙ	ΠΟΣΑ ΧΡΟΝΙΑ
-----	-----	-------------

8) Έχετε εργασθεί ως ελαιοχρωματιστής;

ΟΧΙ	ΝΑΙ	ΠΟΣΑ ΧΡΟΝΙΑ
-----	-----	-------------

9) Έχετε επαφή με κόλλες (Βιομηχανία Υποδημάτων);

ΟΧΙ	ΝΑΙ	ΠΟΣΑ ΧΡΟΝΙΑ
-----	-----	-------------

10) Έχετε επαφή με κάποια χημική ουσία ή ακτινοβολία στο χώρο εργασίας σας ή αλλού;

ΟΧΙ	ΝΑΙ	ΤΙ	ΠΟΣΑ ΧΡΟΝΙΑ
-----	-----	----	-------------

11) Εκτίθεστε σε ραδιενέργεια (ραδιοισοτοπα-Ακτινοθεραπεία-ακτινοσκόπηση) – υπερβαίνετε τα όρια στους ελέγχους που γίνονται (100mSv 5 χρόνια);

ΟΧΙ	ΝΑΙ	ΠΟΣΑ ΧΡΟΝΙΑ
-----	-----	-------------

12) Η κατοικία σας είναι κοντά σε δρόμο μεγάλης κυκλοφορίας

ΟΧΙ	ΝΑΙ	ΠΟΣΑ ΧΡΟΝΙΑ
-----	-----	-------------

Πόσο κοντά;

5-10 μέτρα	10-20 μέτρα	20-40 μέτρα
------------	-------------	-------------

13) Είναι ή ήταν η κατοικία σας κοντά σε πυλώνες υψηλής τάσης ή υποσταθμούς

ΟΧΙ	ΝΑΙ	ΠΟΣΑ ΧΡΟΝΙΑ
-----	-----	-------------

Πόσο κοντά;

5-10 μέτρα	10-20 μέτρα	20-40 μέτρα
------------	-------------	-------------

ΕΝΗΜΕΡΩΣΗ ΑΣΘΕΝΩΝ

Σκοπός της μελέτης είναι η διερεύνηση της παθογένειας της νόσου, τα αίτια που την προκαλούν, και η ταυτόποίηση των χρωμοσωμικών αλλοιώσεων που εμπλέκονται κυρίως στα αρχικά της στάδια της. Η διερεύνηση των αλλοιώσεων της ΧΛΛ που εμπλέκονται με την παθογένεια της νόσου θα βοηθήσει στην εφαρμογή εξατομικευμένης θεραπείας μέσω δημιουργίας νέων μη τοξικών φαρμάκων με στοχευμένη δράση με απώτερο στόχο την υποστρόφη ή ακόμα και ίαση της νόσου. Τα αποτελέσματα της έρευνας δεν πρόκειται να χρησιμοποιηθούν για οικονομικούς ή εμπορικούς σκοπούς.

ΣΥΓΚΑΤΑΘΕΣΗ ΑΣΘΕΝΩΝ

Βεβαιώνω ότι έχω ενημερωθεί για την έρευνα και το σκοπό της και συμφωνώ να λάβω μέρος και να χρησιμοποιηθούν οι πληροφορίες που δίνω, υπό την προϋπόθεση ότι εξασφαλίζεται η ανωνυμία και η προφύλαξη των προσωπικών μου δεδομένων.

Όνομα Ασθενούς

Ημερ/νία

Όνομα Ερευνητή

3.6 ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

Στη συγκεκριμένη διατριβή ελέγχθηκε κυρίως η ύπαρξη συσχετίσεων μεταξύ διαφόρων παραμέτρων. Πιο συγκεκριμένα, η κατανομή των γονοτύπων και αλληλομόρφων του *UGT1A1* γονιδίου μεταξύ ασθενών και μαρτύρων αλλά και η κατανομή γονοτύπων και αλληλομόρφων του ίδιου γονιδίου μεταξύ ασθενών με συγκεκριμένες χρωμοσωμικές αλλοιώσεις σε σχέση με τους μάρτυρες αξιολογήθηκε με βάση χ^2 στατιστική δοκιμασία (Chi-square test) με διόρθωση συνέχειας (continuity correction). Η ίδια στατιστική δοκιμασία χρησιμοποιήθηκε προκειμένου να αξιολογηθεί η συσχέτιση των παραγόντων κινδύνου με την εκδήλωση της ΧΛΑ. Στη συνέχεια, προκειμένου να αναδειχθούν οι ανεξάρτητοι προγνωστικοί παράγοντες κινδύνου ως προς την εκδήλωση της νόσου, όλοι οι στατιστικά σημαντικοί παράγοντες κινδύνου που κατέδειξε η χ^2 στατιστική δοκιμασία εισήλθαν σε μοντέλο πολλαπλής λογιστικής παλινδρόμησης. Το εύρος της συσχέτισης μεταξύ των παραγόντων κινδύνου και της νόσου αποδόθηκε διαμέσου του λόγου των αναλογιών πιθανοτήτων (Odds Ratio, OR) και του αντίστοιχου 95% διαστήματος εμπιστοσύνης (Confidence Interval, CI). Όλοι οι έλεγχοι ήταν αμφίπλευροι και το επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας τέθηκε στο 5% ($\alpha=0,05$).

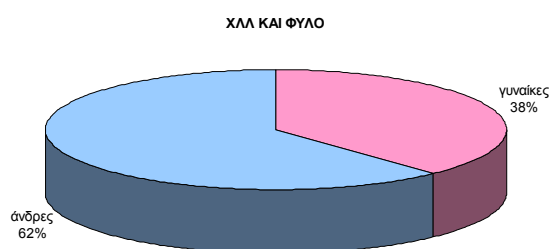
4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

4.1 ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΑΣΘΕΝΩΝ

Μελετήθηκαν συνολικά 237 ασθενείς με ΧΛΛ εκ των οποίων οι 215 διαγνώστηκαν με Β- ΧΛΛ, οι 5 με Τ- ΧΛΛ, ενώ οι 22 έφεραν ταυτόχρονα με τη ΧΛΛ και κάποιο άλλο αιματολογικό νόσημα (NHL, CMML, MDS και DBLCL).

Φύλο και Ηλικία

Από τους 237 ασθενείς που μελετήθηκαν, οι 147 ήταν άνδρες και οι 90 ήταν γυναίκες (αναλογία ανδρών/γυναικών: 1,63). Στο διάγραμμα 2 απεικονίζονται τα αντίστοιχα ποσοστά στο σύνολο των μελετημένων ασθενών.

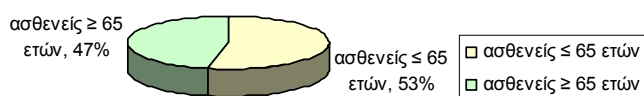


Διάγραμμα 2. Διάγραμμα τύπου πίτας όπου απεικονίζεται η κατανομή των ασθενών με ΧΛΛ με βάση το φύλο.

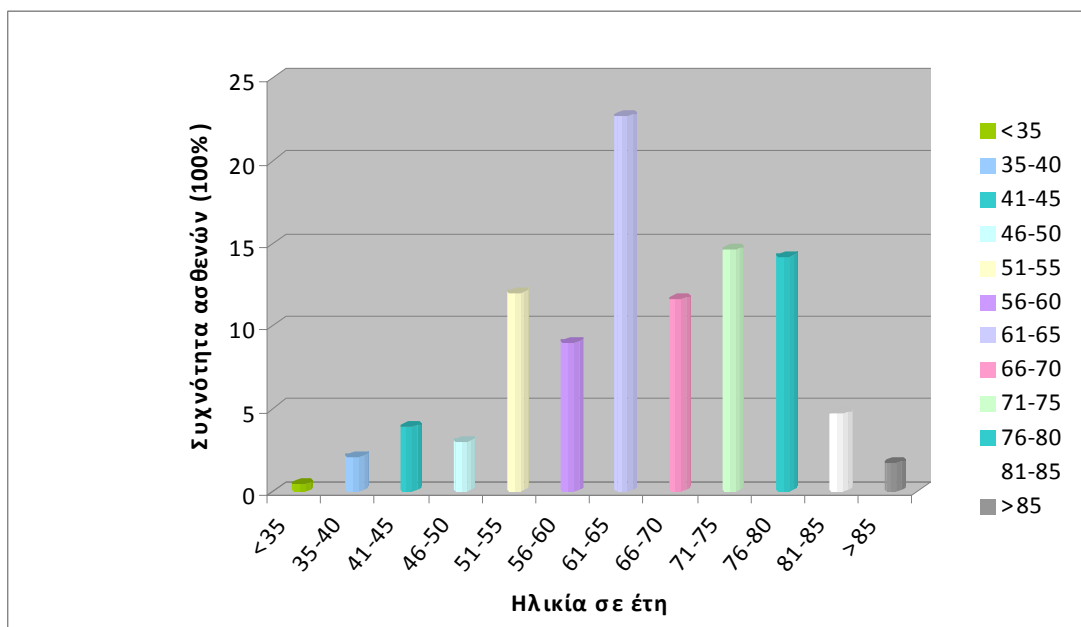
Η ηλικία ήταν διαθέσιμη για τους 233 από τους 237 ασθενείς. Η ηλικία κυμάνθηκε από τα 32 έως 94 έτη (εύρος $R = x_{\text{μεγ}} - x_{\text{ελαχ}} = 94 - 32 = 62$ έτη) με μέση τιμή τα 64.9 έτη χωρίς να υπάρχουν σημαντικές διαφορές ανάμεσα στα 2 φύλα (μέση τιμή ηλικίας ανδρών = 65.1 έτη, μέση τιμή ηλικίας γυναικών = 64.6 έτη).

Από τους 233 ασθενείς με ΧΛΛ οι 124 (53.2%) ήταν ≤ 65 ετών ενώ οι ασθενείς ηλικίας >65 ετών ήταν 109 (46,8%) (διάγραμμα 3). Επίσης πραγματοποιήθηκε κατανομή των ασθενών σε ηλικιακές κλάσεις εύρους 5 ετών. Η κλάση με το μεγαλύτερο ποσοστό ασθενών (22,7%) ήταν αυτή των 61-65 ετών η οποία συγκέντρωσε 53 ασθενείς. Ακολούθησαν κατά σειρά συχνότητας οι κλάσεις ηλικίας 71-75 (14,6%), 76-80 (14,2%), 51-55 (12,0%), 66-70 (11,6%), 56-60 (9,0%), 81-85 (4,7%), 41-45 (3,9%), 46-50 (3,0%), 35-40 (2,1%), >85 (1,7%) και τέλος <35 ετών (0,4%) (διάγραμμα 4).

ΧΛΛ ΚΑΙ ΗΛΙΚΙΑ



Διάγραμμα 3. Διάγραμμα τύπου πίτας όπου απεικονίζεται η κατανομή των ασθενών με ΧΛΛ με βάση την ηλικία.

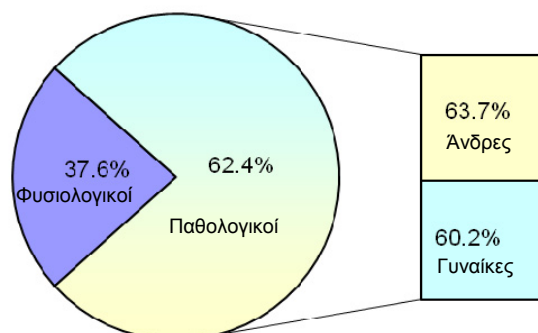


Διάγραμμα 4. Διαγραμματική απεικόνιση της κατανομής των 233 ασθενών με ΧΛΛ σε ηλικιακές ομάδες εύρους 5 ετών.

4.2 ΚΛΑΣΙΚΗ ΚΥΤΤΑΡΟΓΕΝΕΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

Στην παρούσα μελέτη αναλύθηκαν κυτταρογενετικά με τη μέθοδο του καρυοτύπου συνολικά 237 άτομα με ΧΛΛ. Η κυτταρογενετική ανάλυση ήταν επιτυχής στα 218 άτομα (92%) ενώ η ανάλυση των υπόλοιπων 19 (8%) δεν κατέστη δυνατή εξαιτίας της απουσίας ή του πολύ μικρού αριθμού μεταφάσεων. Από τους 218 ασθενείς με ΧΛΛ, τα 82 άτομα (37,6%) παρουσίασαν φυσιολογικό καρυότυπο, ενώ τα υπόλοιπα 136 (62,4%) έφεραν ανώμαλο καρυότυπο με τουλάχιστον μία κλωνική κυτταρογενετική αλλοίωση (διάγραμμα 5). Όσον αφορά στην κατανομή παθολογικών και φυσιολογικών καρυοτύπων ανάμεσα στα 2 φύλα, δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές (διάγραμμα 5)

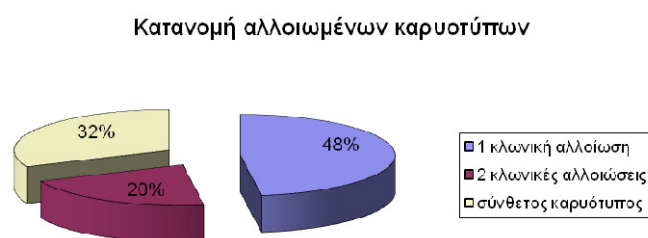
Κατανομή φυσιολογικών και παθολογικών καρυοτύπων



Διάγραμμα 5: Διάγραμμα τύπου πίτας όπου απεικονίζεται η αναλογία φυσιολογικών και παθολογικών καρυοτύπων αλλά και η κατανομή των παθολογικών καρυοτύπων ανάμεσα στα 2 φύλα.

4.2.1 ΜΕΛΕΤΗ ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΩΝ ΚΑΡΥΟΤΥΠΩΝ

Από τους 136 ασθενείς με αλλοιωμένο καρυότυπο, οι 65 (47.79%) έφεραν μεμονωμένες χρωμοσωμικές αλλοιώσεις, οι 28 (20.59%) παρουσίασαν 2 κυτταρογενετικές κλωνικές αλλοιώσεις και οι υπόλοιποι 43 (31.62%) έφεραν σύνθετους καρυότυπους (≥ 3 αλλοιώσεις) (διάγραμμα 6).



Διάγραμμα 1. Διάγραμμα τύπου πίτας όπου φαίνεται ο διαχωρισμός των παθολογικών καρυοτύπων ανάλογα με τον αριθμό των αλλοιώσεων.

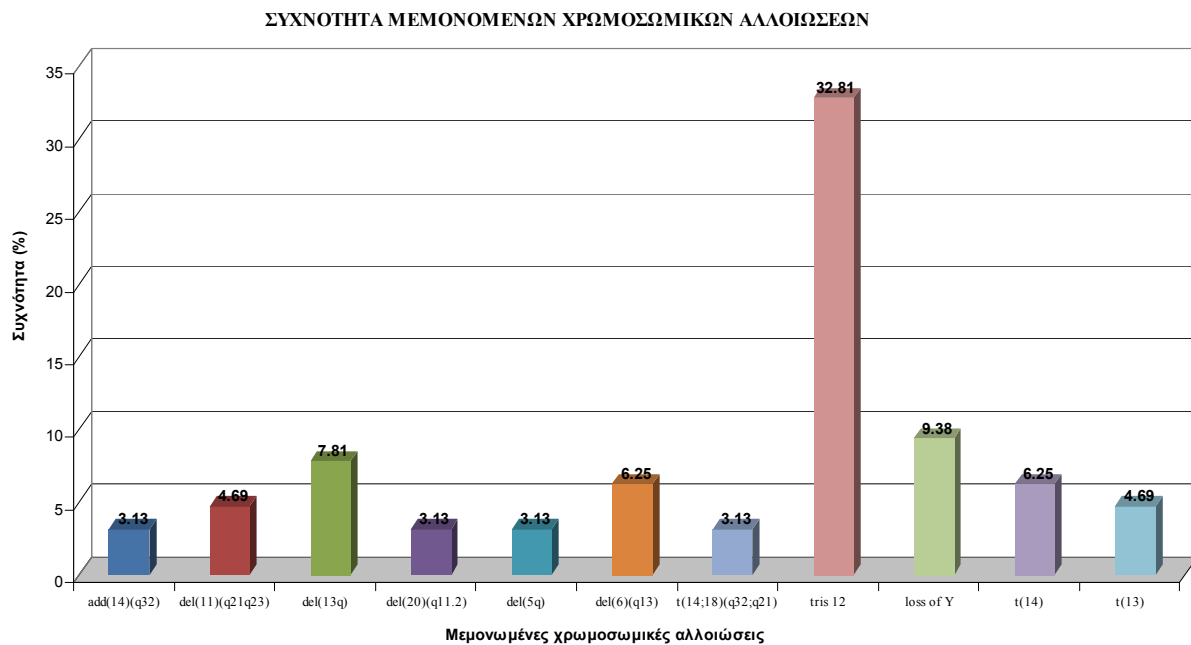
Από τη μελέτη των ανώμαλων καρυοτύπων προέκυψε ότι η συχνότερη χρωμοσωμική αλλοίωση που ανιχνεύτηκε στο σύνολο των 218 επιτυχώς αναλυθέντων περιστατικών ήταν η τρισωμία 12 (21,10%). Ως δεύτερη συχνότερη χρωμοσωμική αλλοίωση αναδείχτηκε η έλλειψη του μεγάλου βραχίονα του χρωμοσώματος 13, [del(13q)] (10,55%) και ακολουθούν η μονοσωμία του φυλετικού χρωμοσώματος Y (8,29%), οι μεταθέσεις του χρωμοσωμικού βραχίονα 14q (6,42%) και οι ελλείψεις, del(11q) (5,96%) και del(6q) (5,50%). Η έλλειψη του μικρού βραχίονα του χρωμοσώματος 17, [del(17)(p11.2)] με τη μέθοδο του καρυότυπου ανιχνεύτηκε μόνο σε 2 ασθενείς (0,92%). Αναλυτικότερα όλες οι επαναλαμβανόμενες χρωμοσωμικές ανωμαλίες που ανιχνεύτηκαν παρουσιάζονται κατά σειρά συχνότητας στον πίνακα 13 ενώ στο διάγραμμα 7 που ακολουθεί απεικονίζονται οι πιο συχνές από αυτές. Τα χρωμοσώματα δείκτες (markers) ανιχνεύτηκαν στο 11,47% των συνολικών περιπτώσεων.

Πίνακας 13: Οι χρωμοσωμικές αλλοιώσεις και η συχνότητά τους στο σύνολο των επιτυχώς αναλυθέντων καρυοτύπων και στο σύνολο των ανώμαλων καρυοτύπων.

ΧΡΩΜΟΣΩΜΙΚΕΣ ΑΝΩΜΑΛΙΕΣ	ΑΠΟΛΥΤΟΣ ΑΡΙΘΜΟΣ	% ΣΥΧΝΟΤΗΤΑ (στο σύνολο των καρυοτύπων, N=218)	% ΣΥΧΝΟΤΗΤΑ (στο σύνολο των αλλοιωμένων καρυοτύπων, N=136)
+12	46	21,10	34,56
Χρωμοσώματα δείκτες	25	11,47	18,36
del(13q)	23	10,55	16,91
-Y	18	8,29	13,24
μεταθέσεις του χρωμ/τος 14 [t(14q)]	14	6,42	10,29
del(11q)	13	5,96	9,56
del(6q)	12	5,50	8,82
-17	10	4,59	7,35
μεταθέσεις του χρωμ/τος 13 [t(13)]	8	3,67	5,88
μεταθέσεις του χρωμ/τος 6 [t(6)]	8	3,67	5,88
add(14)(q32)	7	3,21	5,15
-18	7	3,21	5,15
μεταθέσεις του χρωμ/τος 12 [t(12)]	7	3,21	5,15
-14	6	2,75	4,41
μεταθέσεις του χρωμ/τος 18 [t(18)]	5	2,29	3,68
-8	4	1,83	2,94
del(1)(q32)	4	1,83	2,94
t(11;14)(q13;q32)	4	1,83	2,94
-5	4	1,83	2,94
-X	4	1,83	2,94
μεταθέσεις του χρωμ/τος 3 [t(3)]	4	1,83	2,94
t(14;19)	3	1,38	2,21
t(14;18)	3	1,38	2,21
add(11)(q23)	3	1,38	2,21
add(13)(q34)	3	1,38	2,21
add(3)(q27)	3	1,38	2,21
-11	3	1,38	2,21
add(7)(q32)	3	1,38	2,21
add(9q)	3	1,38	2,21
-15	3	1,38	2,21
del(20)(q11.2)	3	1,38	2,21
der(13)	3	1,38	2,21
-7	3	1,38	2,21
del(7)(q32)	3	1,38	2,21

-22	3	1,38	2,21
-13	3	1,38	2,21
-12	3	1,38	2,21
der(8)	3	1,38	2,21
tris 19	3	1,38	2,21
μεταθέσεις του χρωμ/τος 19 [t(19)]	3	1,38	2,21
μεταθέσεις του χρωμ/τος 1 [t(1)]	3	1,38	2,21
del(5q)	2	0,92	1,47
add(11)(p15)	2	0,92	1,47
add(16q)	2	0,92	1,47
tris 8	2	0,92	1,47
mon 6	2	0,92	1,47
+6	2	0,92	1,47
t(2;18)	2	0,92	1,47
add(17q)	2	0,92	1,47
del(14q)	2	0,92	1,47
del(2p)	2	0,92	1,47
del(17)(p11.2)	2	0,92	1,47
del(9p)	2	0,92	1,47
-21	2	0,92	1,47
der(4)t(4;17)	2	0,92	1,47
+ 7	2	0,92	1,47
-16	2	0,92	1,47
add(10p)	2	0,92	1,47
add(8p)	2	0,92	1,47
der(1q)	2	0,92	1,47

Από τους 64 ασθενείς που έφεραν 1 κλωνική αλλοίωση στον καρυότυπό τους, η τρισωμία 12 ανιχνεύτηκε σε 21 (34.56%) από αυτούς και αναδείχτηκε ως η πιο συχνή μεμονωμένη αλλοίωση ενώ δεύτερη σε συχνότητα αναδείχτηκε η απουσία του φυλετικού χρωμοσώματος Y η οποία βρέθηκε σε 6 (9.38%) ασθενείς. Ακολουθούν οι αλλοιώσεις del(13q) που ανιχνεύτηκε σε 5 ασθενείς (7.81%), del(6)(q13) σε 4 (6.25%), del(11)(q21q23) σε 3 (4.69%) και add(14)(q32), del(20)(q11.2) και del(5q) οι οποίες ανιχνεύτηκαν σε 2 ασθενείς (3.13%) η κάθε μία. Στο διάγραμμα 8 παρουσιάζονται αναλυτικότερα οι μεμονωμένες χρωμοσωμικές αλλοιώσεις και η συχνότητά τους που ανευρέθηκαν στο σύνολο των 64 αλλοιωμένων καρυοτύπων που χαρακτηρίζονταν από 1 μόνο κλωνική αλλοίωση.



Διάγραμμα 8. Ραβδόγραμμα στο οποίο απεικονίζονται τα ποσοστά των μεμονωμένων χρωμοσωμικών αλλοιώσεων στο σύνολο των καρυοτύπων με 1 κλωνική αλλοίωση

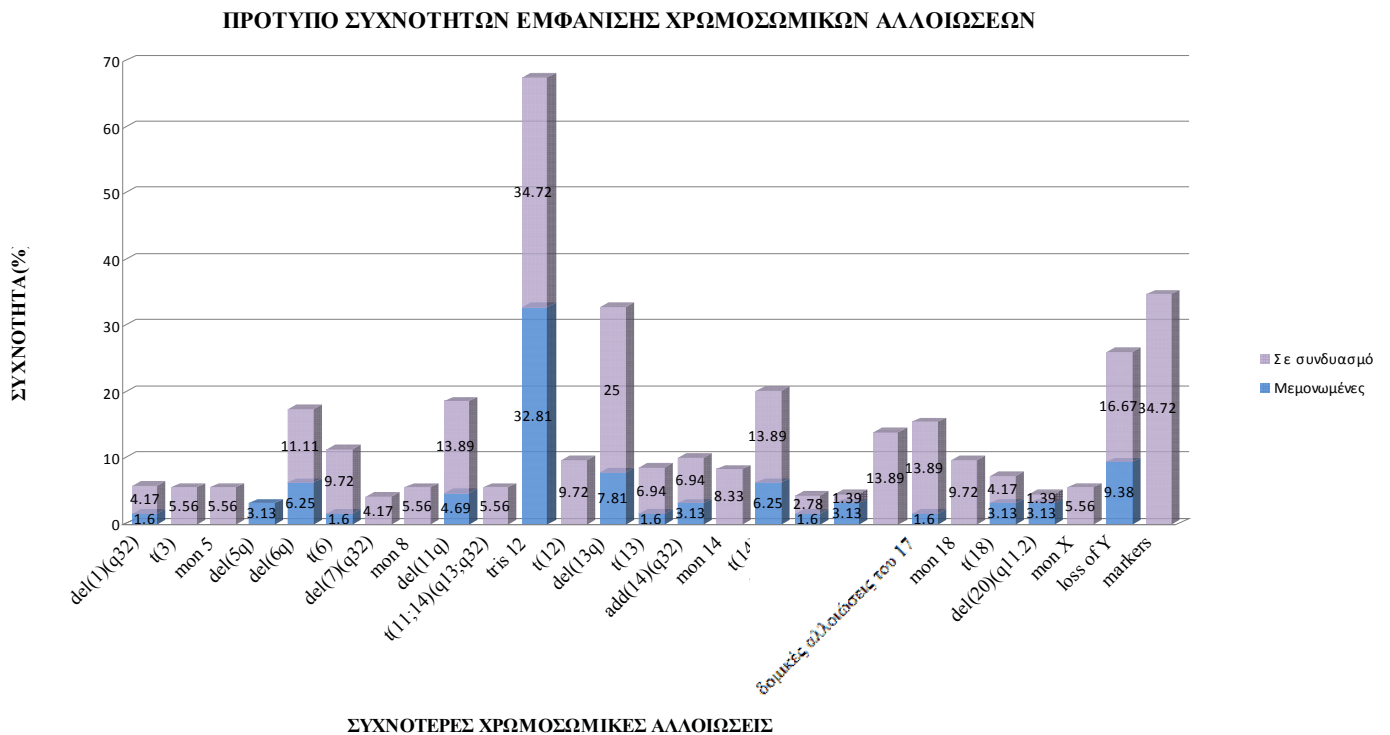
Όσον αφορά στη μελέτη των 43 σύνθετων καρυοτύπων η τρισωμία 12 αναδείχτηκε και σε αυτήν την περίπτωση ως η πιο συχνή χρωμοσωμική αλλοίωση αφού ανιχνεύτηκε σε 16 ασθενείς (37,21%), ακολουθούμενη από την del(13q) η οποία ανευρέθηκε σε 10 ασθενείς (23,26%). Στη συνέχεια ακολουθούθησαν οι μεταθέσεις του χρωμοσωμικού βραχίονα 14q και οι μονοσωμίες των χρωμοσωμάτων 14 και 18 (13,95% η κάθε μία). Τα χρωμοσώματα δείκτες εντοπίστηκαν σε 13

ασθενείς (30,23%) με σύνθετο καρυότυπο (markers). Πιο αναλυτικά οι πιο συχνές αλλοιώσεις και οι συχνότητές τους που ανευρέθηκαν στο σύνολο των σύνθετων καρυοτύπων παρουσιάζονται στο διάγραμμα 9.



Διάγραμμα 9. Ραβδόγραμμα στο οποίο απεικονίζονται τα ποσοστά των χρωμοσωμικών αλλοιώσεων στο σύνολο των σύνθετων καρυοτύπων.

Στο διάγραμμα 10 που ακολουθεί απεικονίζονται οι συχνότερα χρωμοσωμικές αλλοιώσεις που ανιχνεύθηκαν στην παρούσα μελέτη και διακρίνεται το ποσοστό αυτών που απαντήθηκαν ως μεμονωμένες ή σε συνύπαρξη με άλλες ανωμαλίες.

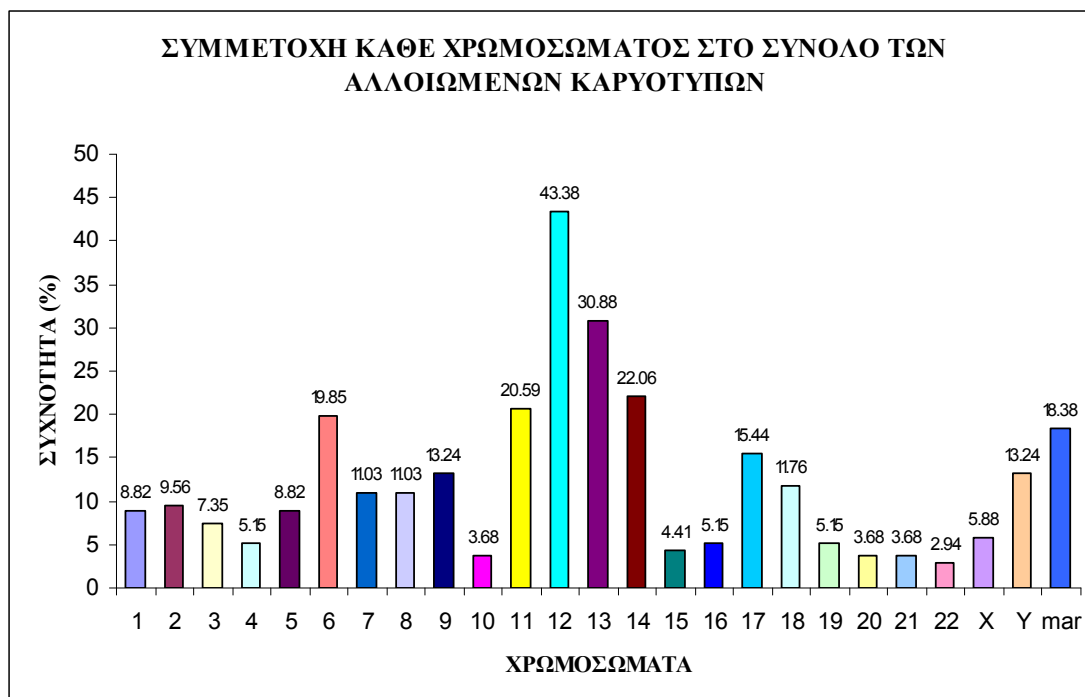


Διάγραμμα 10. Γραφική απεικόνιση του προτύπου της συχνότητας εμφάνισης των χρωμοσωμικών ανωμαλιών.

Συνολικά ανευρέθηκαν 404 χρωμοσωμικές αλλοιώσεις από την καρυοτυπική ανάλυση των 218 επιτυχώς αναλυθέντων περιστατικών με ΧΛΑ. Οι περισσότερες αλλοιώσεις παρατηρήθηκαν στο χρωμόσωμα 12 σε ποσοστό 14,60% και ακολουθούν οι αλλοιώσεις των χρωμοσωμάτων 13 (10,40%), 14 (7,43%), 11 (6,93%), 6 (6,68%) και 17 (5,20%). Στον πίνακα 14 παρουσιάζεται το άθροισμα των αλλοιώσεων κάθε χρωμοσώματος και η συχνότητά τους στο σύνολο των 404 χρωμοσωμικών αλλοιώσεων ενώ στη γραφική παράσταση που ακολουθεί απεικονίζονται τα αντίστοιχα ποσοστά στο σύνολο των 136 αλλοιωμένων καρυοτύπων (διάγραμμα 11) .

Πίνακας 14. Συμμετοχή κάθε χρωμοσώματος στο σύνολο των χρωμοσωμικών αλλοιώσεων σε απόλυτο αριθμό και ποσοστιαία.

ΧΡΩΜΟΣΩΜΑ	ΑΛΛΟΙΩΣΕΙΣ (N=404)	
	Απόλυτος αριθμός	Συχνότητα (%)
1	12	2,97
2	13	3,22
3	10	2,48
4	7	1,73
5	12	2,97
6	27	6,68
7	15	3,71
8	15	3,71
9	18	4,46
10	5	1,24
11	28	6,93
12	59	14,60
13	42	10,40
14	30	7,43
15	6	1,49
16	7	1,73
17	21	5,20
18	16	3,96
19	7	1,73
20	5	1,24
21	5	1,24
22	4	1,00
X	8	1,98
Y	18	4,46
markers	25	6,19



Διάγραμμα 11. Ραβδόγραμμα με τα ποσοστά των αλλοιώσεων που ανιχνεύθηκαν σε κάθε χρωμόσωμα στο σύνολο των αλλοιωμένων καρυοτύπων.

Αναλυτικότερα, στον πίνακα 15 παρουσιάζονται και ταυτόχρονα ταξινομούνται όλα τα είδη των χρωμοσωμικών ανωμαλιών που ανιχνεύθηκαν σε κάθε χρωμόσωμα ξεχωριστά και παρατίθεται η επιμέρους συχνότητα εμφάνισής τους στο σύνολο των 404 αλλοιώσεων που αναδείχθηκαν από την επιτυχή καρυοτυπική ανάλυση των 218 ασθενών με ΧΛΛ.

Πίνακας 15. Η ετερογένεια των αλλοιώσεων κάθε χρωμοσώματος στη ΧΛΛ και τα ποσοστά εμφάνισής των αλλοιώσεων αυτών στο σύνολο των 404 χρωμοσωμικών αλλοιώσεων .

ΧΡΩΜΟΣΩΜΑ	ΧΡΩΜΟΣΩΜΙΚΕΣ ΑΛΛΟΙΩΣΕΙΣ [N (%)]							
	+ (tris)	- (mon)	add	del	t	der	inv	i
1	1(0.25)	-	1(0.25)	4(0.99)	3(0.74)	2(0.50)	1(0.25)	-
2	1(0.25)	1(0.25)	3(0.74)	2(0.50)	6(1.49)	-	-	-
3	1(0.25)	-	3(0.74)	-	4(0.99)	2(0.50)	-	-
4	-	-	1(0.25)	-	4(0.99)	2(0.50)	-	-
5	1(0.25)	4(0.99)	2(0.50)	3(0.74)	2(0.50)	-	-	-
6	2(0.50)	2(0.50)	-	13(3.22)	8(1.98)	2(0.50)	-	-
7	2(0.50)	3(0.74)	4(0.99)	4(0.99)	1(0.25)	1(0.25)	-	-
8	2(0.50)	4(0.99)	2(0.50)	1(0.25)	3(0.74)	3(0.74)	-	--
9	-	1(0.25)	3(0.74)	2(0.50)	1(0.25)	-	11(2.72)	-
10	-	1(0.25)	2(0.50)	-	2(0.50)	-	-	-
11	1(0.25)	3(0.74)	5(1.24)	13(3.22)	5(1.24)	1(0.25)	-	-
12	47(11.63)	3(0.74)	1(0.25)	-	7(1.73)	1(0.25)	-	-
13	2(0.50)	3(0.74)	3(0.74)	23(5.69)	8(1.98)	3(0.74)	-	-
14	-	6(1.49)	7(1.73)	2(0.50)	14(3.47)	1(0.25)	-	-
15	-	3(0.74)	-	1(0.25)	2(0.50)	-	-	-
16	-	2(0.50)	3(0.74)	-	2(0.50)	-	-	-
17	-	10(2.48)	3(0.74)	3(0.74)	4(0.99)	-	-	1(0.25)
18	1(0.25)	7(1.73)	-	-	7(1.73)	1(0.25)	-	-
19	2(0.50)	-	2(0.50)	-	3(0.74)	-	-	-
20	1(0.25)	1(0.25)	-	3(0.74)	-	-	-	-
21	1(0.25)	2(0.50)	1(0.25)	-	1(0.25)	-	-	-
22	1(0.25)	3(0.74)	-	-	-	-	-	-
X	4(0.99)	-	1(0.25)	1(0.25)	1(0.25)	1(0.25)	-	-
Y	-	18(4.46)	-	-	-	-	-	-
mar	25(6.19)	-	-	-	-	-	-	-

Στον πίνακα που ακολουθεί παρουσιάζονται τα είδη των αλλοιώσεων που ανιχνεύτηκαν στο συγκεκριμένο δείγμα ασθενών και η συχνότητά τους στο σύνολο των επιτυχώς αναλυθέντων καρυοτύπων (218) άλλα και στο σύνολο των παθολογικών καρυοτύπων (πίνακας 16). Γίνεται αντιληπτό ότι στο συγκεκριμένο δείγμα ασθενών υπερτερούν οι ελλείψεις ολόκληρων χρωμοσωμάτων ή τμημάτων τους.

Πίνακας 16: Συχνότητα των διαφορετικών κατηγοριών των χρωμοσωμικών αλλοιώσεων

ΕΙΔΗ ΧΡΩΜΟΣΩΜΙΚΩΝ ΑΛΛΟΙΩΣΕΩΝ	ΑΠΟΛΥΤΟΣ ΑΡΙΘΜΟΣ	ΣΥΧΝΟΤΗΤΑ (%) ΣΤΟ ΣΥΝΟΛΟ ΤΩΝ ΚΑΡΥΟΤΥΠΩΝ (N=218)	ΣΥΧΝΟΤΗΤΑ (%) ΣΤΟ ΣΥΝΟΛΟ ΤΩΝ ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΩΝ ΚΑΡΥΟΤΥΠΩΝ (N=136)
Μονοσωμίες	84	38.53	61.76
Τρισωμίες	67	30.73	49.26
Ελλείψεις	72	33.03	52.94
Προσθήκες	44	20.18	32.35
Μεταθέσεις	46	21.10	33.82

4.2.2 ΔΙΕΓΕΡΤΕΣ ΤΩΝ ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΩΝ Β-ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΤΗΣ ΧΛΛ

Η κυτταρογενετική ανάλυση πραγματοποιήθηκε σε αδιέγερτα και διεγερμένα κύτταρα με μιτογόνα των Β κυττάρων στις περιπτώσεις με Β-ΧΛΛ και μιτογόνα των Τ κυττάρων στα περιστατικά με Τ-ΧΛΛ. Πιο συγκεκριμένα σε όλους τους ασθενείς (N=237) πραγματοποιήθηκαν αδιεγέρτες καλλιέργειες 24 και 48 ωρών, ενώ παράλληλα:

- α) στους 204/237 ασθενείς με Β-ΧΛΛ πραγματοποιήθηκαν επιπλέον καλλιέργειες με το νέο συνδυασμό διεγερτών DSP-30/IL2,
- β) στους 176/237 με Β-ΧΛΛ πραγματοποιήθηκαν επιπλέον καλλιέργειες με το έως και σήμερα χρησιμοποιούμενο μιτογόνο ΤΡΑ και
- γ) σε 5/237 ασθενείς οι οποίοι είχαν διαγνωστεί με Τ-ΧΛΛ πραγματοποιήθηκαν επιπλέον καλλιέργειες με την προσθήκη του μιτογόνου ΡΗΑ, το οποίο είναι κατάλληλο για τη διέγερση των Τ- κυττάρων.

Στα περιστατικά με Β-ΧΛΛ ο αρχικός στόχος ήταν να πραγματοποιηθούν και τα 3 είδη καλλιεργείων (αδιέγερτες 24 και 48 ωρών, διεγερμένες με DSP-30/IL2, διεγερμένες με ΤΡΑ), αυτό όμως ήταν πρακτικώς ανέφικτο λόγω της ανεπαρκούς ποσότητας του βιολογικού δείγματος κάποιων περιστατικών. Στον πίνακα 17 παρουσιάζονται τα ποσοστά ανεύρεσης κλωνικών αλλοιώσεων χάρη στην προσθήκη των παραπάνω μιτογόνων αλλά και τα ποσοστά των κλωνικών αλλοιώσεων που ανιχνεύτηκαν στις αδιεγέρτες καλλιέργειες. Επίσης διακρίνεται ότι το ποσοστό ανίχνευσης κυτταρογενετικών αλλοιώσεων όταν τα κύτταρα έχουν διεγερθεί με το συνδυασμό DSP-30/IL2 (61,76%) υπερέχει κατά πολύ σε σχέση με αυτό του μιτογόνου ΤΡΑ (13,22%) αλλά και το αντίστοιχο ποσοστό που προκύπτει από τις αδιεγέρτες καλλιέργειες (11,57%).

Πίνακας 17: Ποσοστά ανίχνευσης κλωνικών αλλοιώσεων στις καλλιέργειες των Β κυττάρων

ΚΛΩΝΙΚΕΣ ΑΛΛΟΙΩΣΕΙΣ	Αδιέγερτες (N=216)	DSP/IL-2 (N=204)	ΤΡΑ (N=176)
Απόλυτος αριθμός	25	126	23
Ποσοστό (%)	11,57	61,76	13,22

Δείγμα μελέτης για την ανεύρεση του καταλληλότερου διεγέρτη των παθολογικών β- κυττάρων της ΧΛΑ αποτέλεσαν οι 167 ασθενείς στους οποίους κατέστη δυνατό να πραγματοποιηθούν όλων των ειδών οι καλλιέργειες. Από τη μελέτη αυτών των περιστατικών ανιχνεύτηκαν κλωνικές αλλοιώσεις σε 103 καρυότυπους ενώ οι υπόλοιποι 67 ήταν φυσιολογικοί. Οι αλλοιωμένοι καρυότυποι ανιχνεύτηκαν είτε σε όλων των ειδών τις καλλιέργειες, είτε μόνο σε καλλιέργειες διεγερμένες με τα μιτογόνα των β- κυττάρων είτε μόνο στις αδιέγερτες. Εδώ θα πρέπει να αναφερθεί ότι στις περιπτώσεις εκείνες που ο παθολογικός κλώνος ανιχνεύτηκε και στις 2 ειδών διεγερμένες καλλιέργειες, σε όλες τις περιπτώσεις το ποσοστό του παθολογικού κλώνου ήταν μεγαλύτερο σε αυτές που είχαν διεγερθεί με DSP-30/IL2.

Πιο συγκεκριμένα, ο νέος συνδυασμός διεγερτών DSP-30/IL2 ανέδειξε κλωνικές αλλοιώσεις στο 58,08% των αναλυθέντων δειγμάτων, ενώ το TPA στο 12,57%, ποσοστό αντίστοιχο με αυτό των αδιέγερτων καλλιεργειών (πίνακας 17). Αξιοσημείωτο είναι δε, το γεγονός ότι περίπου το 70% (71/103) των παθολογικών καρυοτύπων ανιχνεύθηκε μόνο στις καλλιέργειες που είχαν διεγερθεί με DSP-30/IL2 ενώ ταυτόχρονα οι αδιέγερτες καλλιέργειες και οι διεγερμένες με TPA των ίδιων δειγμάτων παρουσίασαν φυσιολογικό καρυότυπο. Το αντίστοιχο ποσοστό αλλοιωμένων καρυοτύπων που αναδείχτηκε μόνο με το έως και σήμερα χρησιμοποιούμενο TPA ανέρχεται μόλις στο 0,97% (1/103). Η ανίχνευση αλλοιωμένων καρυοτύπων μόνο στις αδιέγερτες καλλιέργειες βρέθηκε περίπου στο 7% (7/103) και αφορούσε στις 5 από τις 7 περιπτώσεις την απώλεια του φυλετικού χρωμοσώματος Y ως μοναδική αλλοίωση η οποία μπορεί να μην συνδέεται με τη νόσο αλλά με την προχωρημένη ηλικία των ασθενών (πίνακας 18).

Στον πίνακα 18 που ακολουθεί παρουσιάζονται τα ποσοστά ανίχνευσης κλωνικών αλλοιώσεων με την προσθήκη ή μη των 2 διεγερτών στο δείγμα των 167 ασθενών, που χρησιμοποιήθηκε για τη ανεύρεση του καταλληλότερου διεγέρτη των παθολογικών κυττάρων της ΧΛΑ. Από τη στατιστική ανάλυση που πραγματοποιήθηκε προέκυψε ότι ο νέος συνδυασμός διεγερτών DSP-30/IL2 έχει στατιστικώς σημαντικά μεγαλύτερη πιθανότητα να ανιχνεύσει κλωνικές αλλοιώσεις ειδικές για τη νόσο σε σχέση με την προσθήκη TPA ή την απουσία διεγερτών ($P=0.0001$) (πίνακας 18). Ειδικότερα ο συνδυασμός DSP-30/IL2 εμφανίζει περίπου 121,5 φορές μεγαλύτερη ικανότητα να ανιχνεύσει τον παθολογικό κλώνο σε σχέση με

το έως και σήμερα χρησιμοποιούμενο μιτογόνο TPA (OR=121,51, 95% CI= 16,62-888,51, $P=>0,0001$) (πίνακας 18).

Πίνακας 18: Ποσοστά ανίχνευσης κλωνικών αλλοιώσεων και σύγκριση στα διάφορα είδη καλλιέργειών

ΚΛΩΝΙΚΕΣ ΑΛΛΟΙΩΣΕΙΣ	ΕΙΔΗ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ			P-value	OR (95% CI)
	Αδιέγερτες	DSP/IL-2	TPA		
Ποσοστό επί του συνόλου των καρυοτύπων (N=167)	12,57% (21/167)	58,08 (97/167)	12,57% (21/167)	0,0001^a	
Ποσοστό επί του συνόλου των παθολογικών καρυοτύπων (N=103)	20,39% (21/103)	94,17% (97/103)	20,39% (21/103)	>0,0001^b	9.63 (5.55-16.72)
Ποσοστό που ανιχνεύτηκε <u>μόνο</u> στη συγκεκριμένη καλλιέργεια επί του συνόλου των παθολογικών καρυοτύπων (N=103)	6,80% (7/103)	68,93% (71/103)	0,97% (1/103)	>0,0001^γ	121,51 (16,62-888,51)

^a Το P-value υπολογίστηκε με βάση τη μέθοδο χ^2 , συγκρίνοντας τον αριθμό φυσιολογικών και παθολογικών καρυοτύπων που ανιχνεύτηκαν ανάμεσα στις διεγερμένες με DSP-30/IL2 καλλιέργειες, στις διεγερμένες με TPA και στις αδιέγερτες καλλιέργειες.

^b Το P-value υπολογίστηκε με βάση το Fisher's exact test, συγκρίνοντας τον αριθμό φυσιολογικών και παθολογικών καρυοτύπων που ανιχνεύτηκαν χρησιμοποιώντας ως διεγέρτη το DSP-30/IL2 και το TPA.

^γ Το P-value υπολογίστηκε με το Fisher's exact test, συγκρίνοντας τον αριθμό των παθολογικών καρυοτύπων που εντοπίστηκε μόνο σε καλλιέργειες που είχαν διεγερθεί με DSP-30/IL2 με τον αντίστοιχο αριθμό που εντοπίστηκε μόνο σε καλλιέργειες διεγερμένες με TPA.

4.2.3 ΣΥΧΝΟΤΗΤΑ ΧΡΩΜΟΣΩΜΙΚΩΝ ΑΛΛΟΙΩΣΕΩΝ ΣΕ ΣΧΕΣΗ ΜΕ ΤΗΝ ΗΛΙΚΙΑ ΤΩΝ ΑΣΘΕΝΩΝ

Όπως ήδη προαναφέρθηκε, από τους 237 ασθενείς με ΧΛΛ η κυτταρογενετική ανάλυση ήταν επιτυχής για τους 218. Εξ αυτών η ηλικία ήταν διαθέσιμη για τους 214. Οι συγκεκριμένοι ασθενείς χωρίστηκαν με βάση την ηλικία τους σε δύο κατηγορίες: 1) ομάδα Α, στην οποία περιλαμβάνονται 110 ασθενείς με ηλικία ≤ 65 ετών και 2) ομάδα Β που περιλαμβάνει 104 ασθενείς ηλικίας >65 ετών.

Ακολούθησε περαιτέρω ομαδοποίηση της κάθε μίας ομάδας ξεχωριστά με βάση την γνωστή πρόγνωση των ειδικών κυτταρογενετικών αλλοιώσεων της ΧΛΛ (προαναφέρθηκε στην § 2.3.4.1) που εντοπίστηκαν στην καρυοτυπική ανάλυση. Έτσι δημιουργήθηκαν 3 επιπλέον κατηγορίες για κάθε μία ομάδα:

1. Ασθενείς με καλή πρόγνωση που φέρουν $del(13q)$ ως μοναδική αλλοίωση.
2. Ασθενείς με ενδιάμεση πρόγνωση που φέρουν στον καρυότυπό τους $+12$ ή $del(13q)$ σε συνδυασμό με άλλες αλλοιώσεις εκτός των $del(11q)$, $del(17p)$, -11 -17 και $t(14;19)$.
3. Ασθενείς με κακή πρόγνωση που φέρουν σύνθετους καρυοτύπους ή τουλάχιστον μια από τις ακόλουθες χρωμοσωμικές αλλοιώσεις: $del(11q)$, $del(17p)$, $del(6q)$, -11 , -17 ή $t(14;19)$ ως μοναδικές αλλοιώσεις ή σε συνδυασμό με άλλες.

Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε σύγκριση ως προς την ύπαρξη ή όχι παθολογικού κλώνου αλλά και ως προς την προγνωστική αξία των γνωστών κυτταρογενετικών αλλοιώσεων ανάμεσα στις ομάδες που δημιουργήθηκαν (πίνακας 19). Από τη στατιστική ανάλυση που πραγματοποιήθηκε δεν προέκυψαν στατιστικώς σημαντικές διαφορές μεταξύ των ασθενών ηλικίας ≤ 65 ετών και άνω των 65 ετών όσον αφορά στα ποσοστά εμφάνισης παθολογικού κλώνου ($P=0.275$) αλλά και ως προς τη προγνωστική αξία των ειδικών κλωνικών αλλοιώσεων της νόσου που ανιχνεύτηκαν στους παθολογικούς καρυοτύπους ($P=0.587$) (πίνακας 19). Στον πίνακα 19 που ακολουθεί παρουσιάζονται αναλυτικότερα τα αποτελέσματα από τη σύγκριση των παραπάνω ομάδων.

Πίνακας 19: Ποσοστά κλωνικών αλλοιώσεων σε ασθενείς ≤65 και >65 ετών και στις 3 προγνωστικές ομάδες.

ΚΑΡΥΟΤΥΠΟΣ	ΟΜΑΔΑ Α (≤65 ετών) (N=110)	ΟΜΑΔΑ Β (>65 ετών) (N=104)	P-value
Φυσιολογικός	46/110 (41.82%)	35/104 (33.65%)	
Παθολογικός	64/110 (58.18%)	69/104 (66.35%)	0.275
Προγνωστικές ομάδες	N=99	N=88	
Καλή πρόγνωση	49/99 (49.49%)	37/88 (42.05%)	
Ενδιάμεση πρόγνωση	14/99 (14.14%)	15/88 (17.05%)	
Κακή πρόγνωση	36/99 (36.36%)	36/88 (40.91%)	0.587
Άγνωστη πρόγνωση	11/110	16/104	

Προκειμένου να εξαχθεί πληρέστερη πληροφορία από τη μελέτη ασθενών νεότερης και μεγαλύτερης ηλικίας εφαρμόστηκε η παραπάνω ομαδοποίηση και στις 3 παρακάτω ηλικιακές κλάσεις με τα μεγαλύτερα ποσοστά ασθενών όπως αυτά απεικονίστηκαν στο διάγραμμα 4 (§ 4.1):

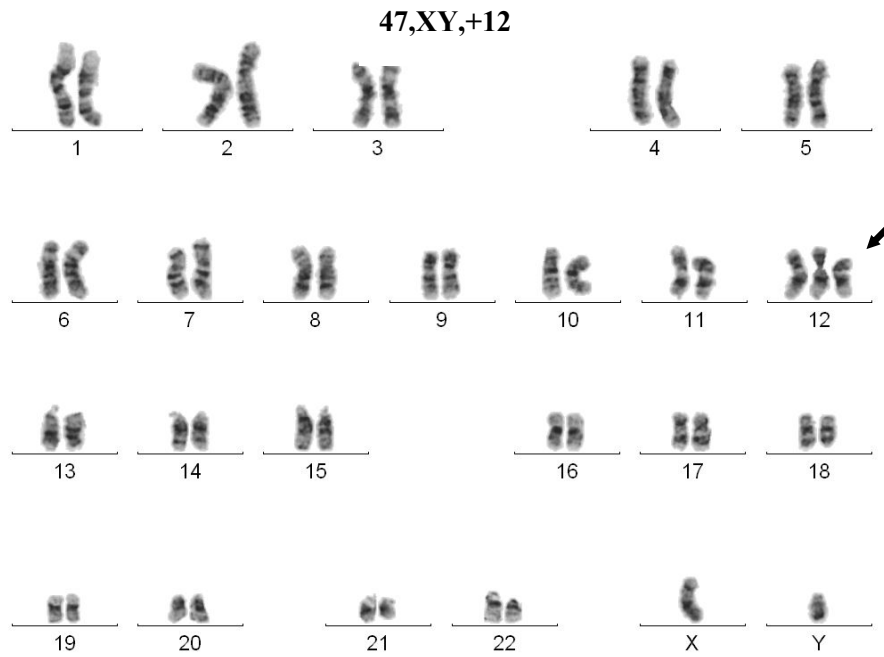
- 51-55 έτη στην οποία περιλαμβάνονται 28 ασθενείς και αποτελεί την κλάση με το μεγαλύτερο ποσοστό ασθενών κάτω των 65 ετών
- 61-66 έτη στην οποία περιλαμβάνονται 53 ασθενείς και αποτελεί την πολυπληθέστερη κλάση ασθενών γενικότερα
- 71-75 έτη στην οποία περιλαμβάνονται 34 ασθενείς και είναι η πολυπληθέστερη κλάση ασθενών ηλικίας άνω των 65 ετών.

Στον πίνακα 20 που ακολουθεί παρουσιάζεται η ομαδοποίηση αυτή και τα αποτελέσματα που προκύπτουν από τη σύγκριση των ασθενών που ανήκουν στις 3 αυτές ηλικιακές κλάσεις. Ειδικότερα το 60,71% των ασθενών ηλικίας 51-55 ετών εμφάνισαν παθολογικούς καρυοτύπους ενώ το αντίστοιχο ποσοστό για τις ηλικιακές κλάσεις 61-66 και 71-76 ήταν 50,94% και 52,94% αντιστοίχως. Η διαφορά αυτή δεν είναι στατιστικώς σημαντική ($P=0.740$) παρόλο την εμφανή αυξητική τάση των ασθενών μικρότερης ηλικίας να εμφανίσουν κυτταρογενετικές αλλοιώσεις. Από τη συγκριτική μελέτη των 3 ηλικιακών κλάσεων ως προς την προγνωστική αξία των κυτταρογενετικών αλλοιώσεων προέκυψε μια κλιμακωτή αύξηση του ποσοστού των ασθενών που φέρουν κυτταρογενετικές αλλοιώσεις κακής προγνωστικής αξίας (40.00% > 29.78% > 23.33%) όσο μειώνεται η ηλικία τους, χωρίς όμως το εύρημα αυτό να είναι στατιστικώς σημαντικό ($P=0.642$) (πίνακας 20)

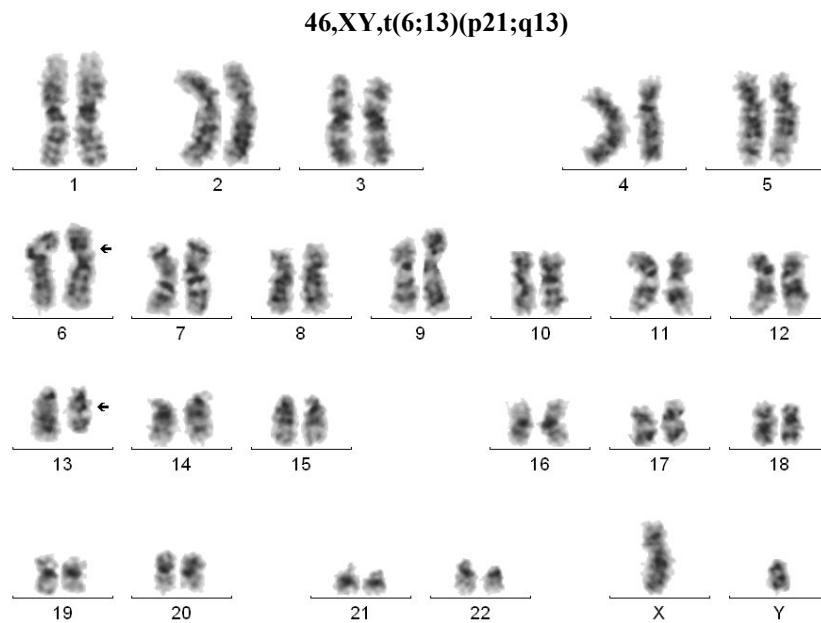
Πίνακας 20: Διαχωρισμός των ασθενών σε ηλικιακές κλάσεις με βάση την πρόγνωση των κυτταρογενετικών τους ευρημάτων

ΚΑΡΥΟΤΥΠΟΣ	Ηλικιακή κλάση 51-55 έτη (N=28)	Ηλικιακή κλάση 61-66 έτη (N=53)	Ηλικιακή κλάση 71-76 έτη (N=34)	P-value
Φυσιολογικός	11/28 (39.29%)	26/53 (49.01%)	16/34 (47.06%)	
Παθολογικός	17/28 (60.71%)	27/53 (50.94%)	18/34 (52.94%)	0.697
Προγνωστικές ομάδες	N=25	N=47	N=30	
Καλή πρόγνωση	11/25 (44.00%)	26/47 (55.32%)	18/30 (60.00%)	
Ενδιάμεση πρόγνωση	4/25 (16.00%)	7/47 (14.89%)	5/30 (16.67%)	
Κακή πρόγνωση	10/25 (40.00%)	14/47 (29.78%)	7/30 (23.33%)	0.740
Άγνωστη πρόγνωση	3/28	4/53	4/34	

4.2.4 ΠΑΡΑΘΕΣΗ ΚΑΡΥΟΤΥΠΩΝ ΑΣΘΕΝΩΝ

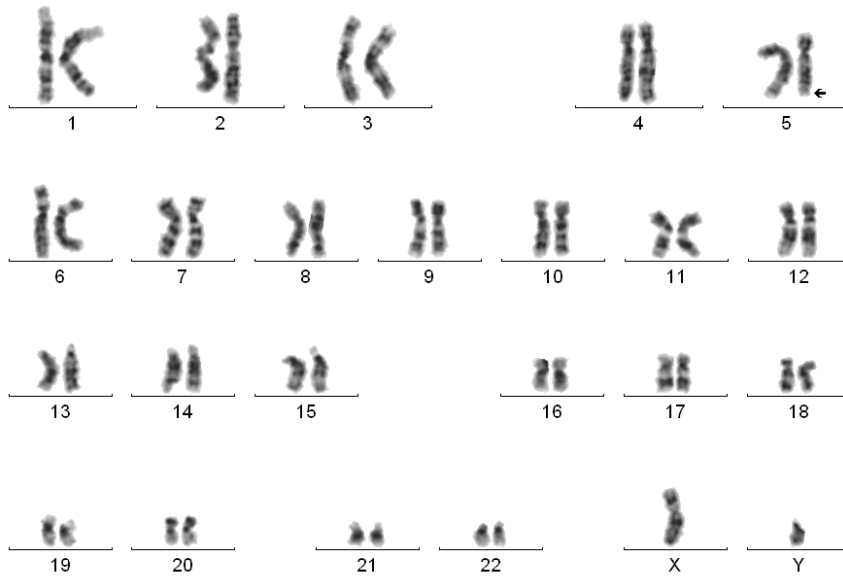


Εικόνα 25. Καρυότυπος ασθενούς με τρισωμία 12.



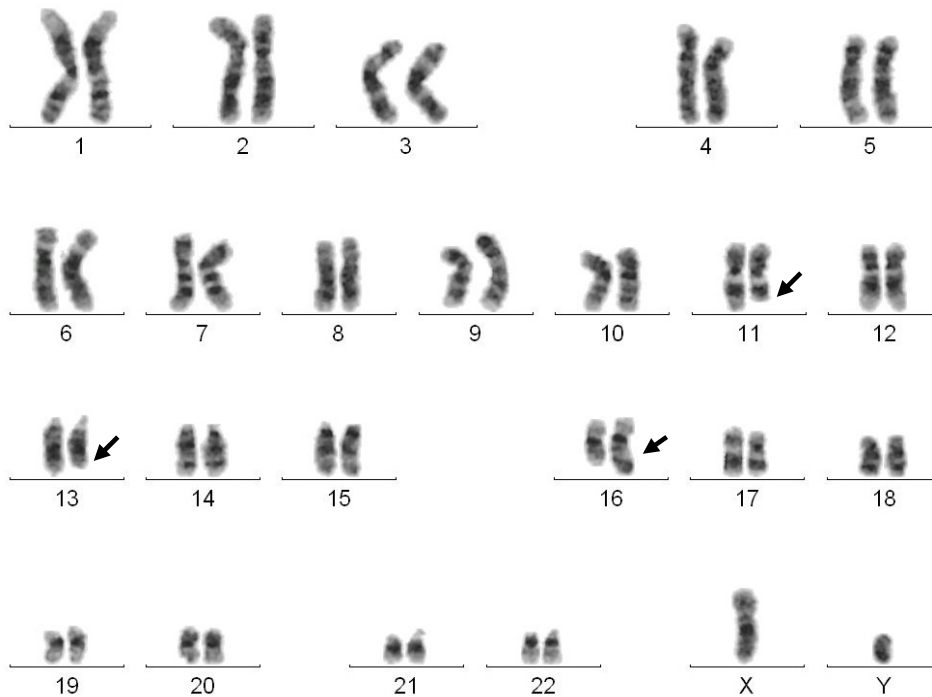
Εικόνα 26. Καρυότυπος ασθενούς με αμοιβαία μετατόπιση μεταξύ των χρωμοσωμάτων 6 και 13 [92]

46,XY,del(5)(q33q35)

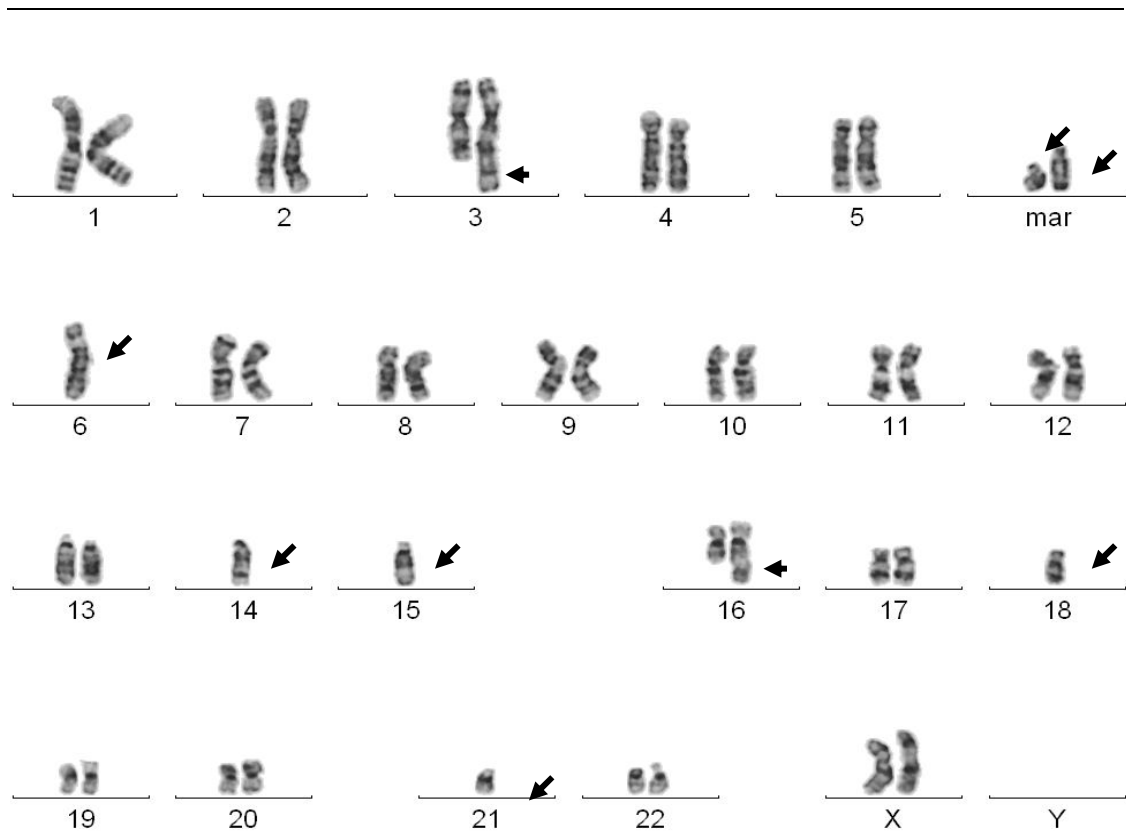


Εικόνα 27. Καρυότυπος ασθενούς με ενδιάμεση έλλειψη στο μεγάλο βραχίονα του χρωμοσώματος 5 [74]

46,XY,del(11)(q22q23),del(13)(q12q14),add(16)(q22)



Εικόνα 28. Σύνθετος καρυότυπος που χαρακτηρίζεται από έλλειψη στο 11q και στο 13q και πρόσθετο χρωμοσωμικό υλικό άγνωστης προέλευσης στο 16q.



Εικόνα 29. Σύνθετος καρυότυπος με πολλαπλές χρωμοσωμικές ανωμαλίες.

4.3 FISH ΑΝΑΛΥΣΗ

Η μοριακή κυτταρογενετική ανάλυση εφαρμόστηκε στους 126 από τους 237 ασθενείς με ΧΛΛ εξαιτίας του ιδιαίτερα υψηλού κόστους της τεχνικής αυτής. Οι συγκεκριμένοι ασθενείς προτιμήθηκαν κυρίως λόγω του νεαρού της ηλικίας τους, της απουσίας μεταφάσεων στην κλασική κυτταρογενετική ανάλυση ή την ύπαρξη φυσιολογικού καρυοτύπου.

4.3.1 ΠΡΟΤΥΠΑ ΥΒΡΙΔΙΣΜΟΥ ΜΟΡΙΑΚΩΝ ΑΝΙΧΝΕΥΤΩΝ

Η τεχνική της FISH πραγματοποιήθηκε σε μεσοφασικούς πυρήνες (interphase FISH) και μεταφάσεις (metaphase FISH) και όπως ήδη προαναφέρθηκε (§ 3.3.1) οι μοριακοί ανιχνευτές που χρησιμοποιήθηκαν ήταν:

- 1) Ο διπλός συνδυασμός Vysis LSI p53/ LSI ATM Multi-Color Probe, τα φθοριοχρώματα των οποίων αλλά και οι χρωμοσωμικές περιοχές με τις οποίες εμφανίζουν συμπληρωματικότητα παρουσιάζονται στον πίνακα 21.

Πίνακας 21. Ο διπλός συνδυασμός Vysis LSI p53/ LSI ATM Multi-Color Probe.

Όνομα Ιχνηθέτη	Θέση Ιχνηθέτη	Φθοριοχρώματα
Vysis LSI p53	17p13.1	SpectrumOrange
Vysis LSI ATM	11q22.3	SpectrumGreen

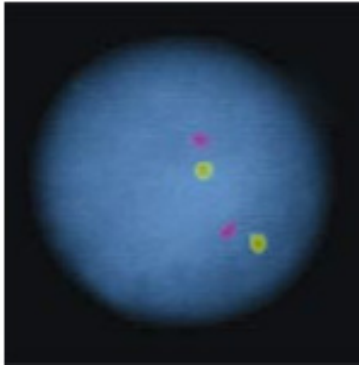
- 2) Ο τριπλός συνδυασμός Vysis LSI D13S319/ LSI 13q34/ CEP 12 Multi-Color Probe. Οι χρωμοσωμικές περιοχές για τις οποίες είναι ειδικοί οι συγκεκριμένοι ιχνηθέτες αλλά και τα φθοριοχρώματα με τα οποία είναι σημασμένοι παρουσιάζονται στον πίνακα 22.

Πίνακας 22. Ο τριπλός συνδυασμός Vysis LSI D13S319/ LSI 13q34/ CEP 12 Multi-Color Probe.

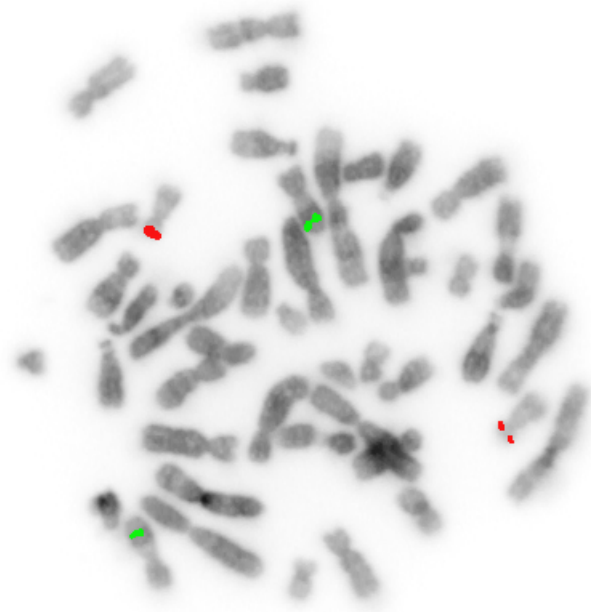
Όνομα Ιχνηθέτη	Θέση Ιχνηθέτη	Φθοριοχρώματα
Vysis LSI D13S319	13q14.3	SpectrumOrange
Vysis LSI 13q34	13q34	SpectrumAqua
Vysis CEP 12	12p11.1-q11	SpectrumGreen

Φυσιολογικά πρότυπα υβριδισμού

Φυσιολογικό πρότυπο υβριδισμού για τον 1^ο διπλό συνδυασμό ιχνηθετών αποτελούν τα 2 πράσινα σήματα (LSI ATM) που αντιστοιχούν στην περιοχή 11q22.3 η οποία περιλαμβάνει το γονίδιο *ATM* και τα 2 κόκκινα σήματα (LSI p53) που είναι ειδικά για την περιοχή 17p13.1 στην οποία περιλαμβάνεται το ογκοκατασταλτικό γονίδιο *TP53*. Στην εικόνα 30 που ακολουθεί διακρίνεται το φυσιολογικό πρότυπο υβριδισμού των συγκεκριμένων ανιχνευτών σε μεσοφασικό πυρήνα και μετάφαση.



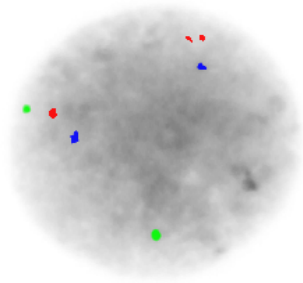
Εικόνα 30α.



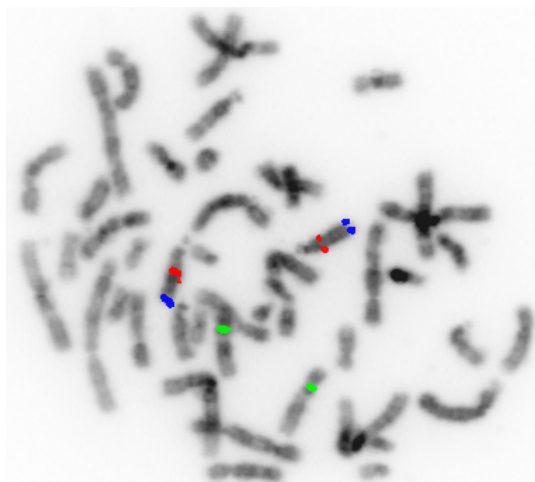
Εικόνα 30β.

Εικόνα 30: Φυσιολογικό πρότυπο υβριδισμού των μοριακών ανιχνευτών LSI p53/ LSI ATM **α)** σε μεσοφασικό πυρήνα και **β)** σε μετάφαση. Διακρίνονται δύο κόκκινα σήματα, ειδικά για την περιοχή 17p13.1 (περιλαμβάνεται το γονίδιο *TP53*) που βρίσκονται στα 2 αλληλόμορφα χρωμοσώματα 17 και τα δύο πράσινα σήματα ειδικά για την περιοχή 11q22.3 (περιλαμβάνει το γονίδιο *ATM*) που βρίσκονται στα 2 αλληλόμορφα χρωμοσώματα 11.

Το φυσιολογικό πρότυπο υβριδισμού για τον 2^ο τριπλό συνδυασμό ιχνηθετών αποτελούν τα 2 πράσινα σήματα (CEP 12) που αντιστοιχούν στην κεντρομεριδιακή περιοχή 12p11.1-q11, τα 2 κόκκινα σήματα (LSI D13S319) που είναι ειδικά για την περιοχή 13q14.3 και τα 2 γαλάζια σήματα (LSI 13q34), που είναι ειδικά για την περιοχή 13q34. Στην παρακάτω εικόνα διακρίνεται το φυσιολογικό πρότυπο υβριδισμού των συγκεκριμένων ανιχνευτών σε μεσοφασικό πυρήνα και σε μετάφαση (εικόνα 31).



Εικόνα 31α.

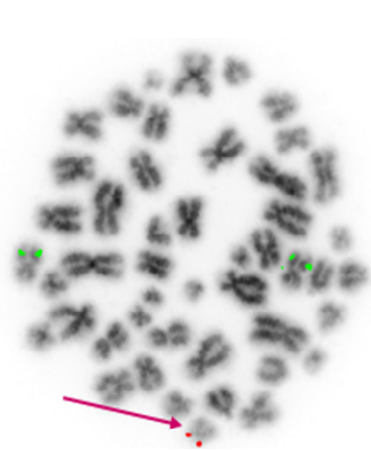


Εικόνα 31β.

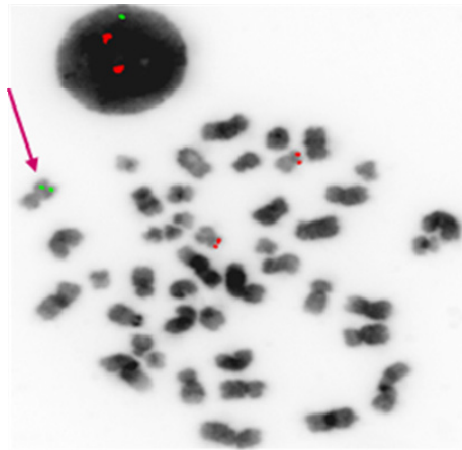
Εικόνα 31: Φυσιολογικό πρότυπο υβριδισμού των μοριακών ανιχνευτών LSI D13S319/ LSI 13q34/ CEP 12 **α)** σε μεσοφασικό πυρήνα και **β)** σε μετάφαση. Διακρίνονται 2 κόκκινα σήματα, ειδικά για την περιοχή 13q14.3 και 2 γαλάζια σήματα, ειδικά για την περιοχή 13q34 τα οποία βρίσκονται στα 2 αλληλόμορφα χρωμοσώματα 13. Τα 2 πράσινα σήματα, ειδικά για την περιοχή του κεντρομεριδίου 12p11.1-q11 διακρίνονται στα 2 αλληλόμορφα χρωμοσώματα 12.

Ανώμαλα πρότυπα υβριδισμού

Η ύπαρξη ενός αντί για δύο σήματα του ίδιου χρώματος σε έναν μεσοφασικό πυρήνα ή μετάφαση δηλώνει την έλλειψη της συγκεκριμένης περιοχής-στόχου ή ολόκληρου του αλληλομόρφου χρωμοσώματος. Η παντελής όμως έλλειψη σήματος (έλλειψη και των 2 σημάτων του ίδιου χρώματος) από ένα κύτταρο μαρτυρά την ομόζυγη έλλειψη της αντίστοιχης χρωμοσωμικής περιοχής-στόχου. Από την άλλη, η ανίχνευση 3 σημάτων του ίδιου χρώματος υποδηλώνει τρισωμία, εφόσον πρόκειται για τον κεντρομεριδιακό ιχνηθέτη του χρωμοσώματος 12, ή την ύπαρξη επιπλέον αντιγράφου της περιοχής-στόχου όσον αφορά στους υπόλοιπους ιχνηθέτες. Στις εικόνες που ακολουθούν αποτυπώνονται τα ανώμαλα πρότυπα υβριδισμού των 2 συνδυασμών ιχνηθετών που χρησιμοποιήθηκαν για τη μελέτη των ειδικών υπομικροσκοπικών ελλείψεων της νόσου και της τρισωμίας 12 (εικόνες 32 και 33).

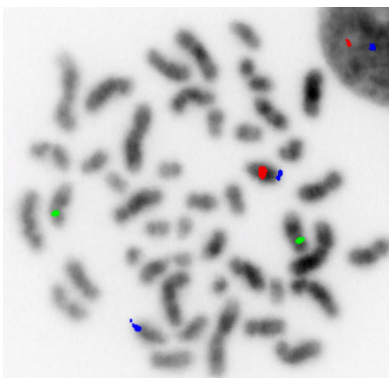


Εικόνα 32α

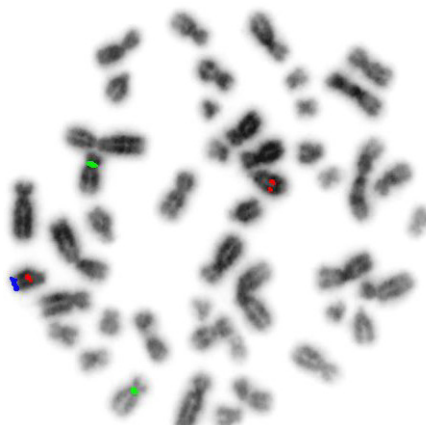


Εικόνα 32β

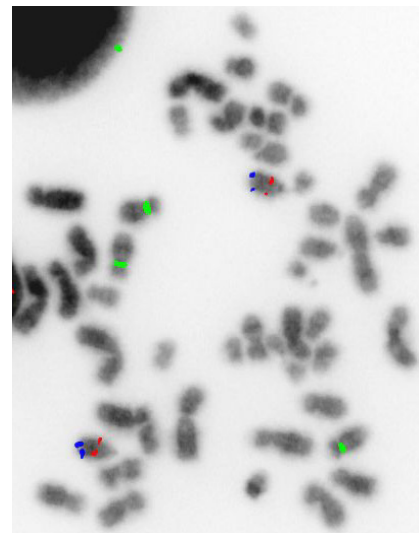
Εικόνα 32: Ανώμαλα πρότυπα υβριδισμού του συνδυασμού μοριακών ανιχνευτών LSI p53/ LSI ATM. α) Ανώμαλο πρότυπο υβριδισμού του ιχνηθέτη LSI p53. Διακρίνεται η απουσία του ενός εκ των 2 κόκκινων σημάτων, γεγονός που υποδηλώνει την έλλειψη της περιοχής 17p13.1 σε ετερόζυγη κατάσταση. β) Ανώμαλο πρότυπο υβριδισμού του ιχνηθέτη LSI ATM. Φαίνεται η απουσία του ενός από τα 2 πράσινα σήματα γεγονός που υποδηλώνει την ετερόζυγη έλλειψη της περιοχής 11q22.3



Εικόνα 33α



Εικόνα 33β



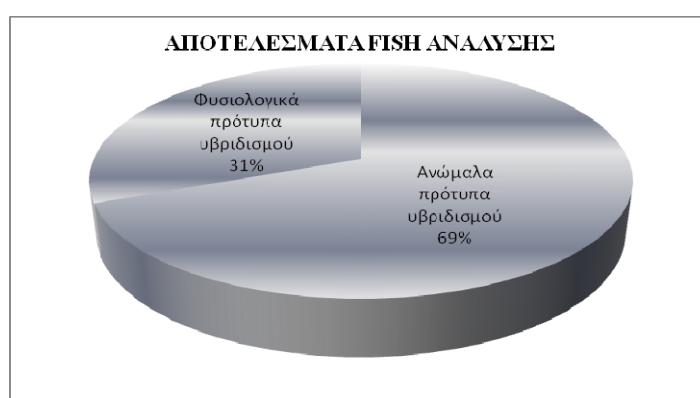
Εικόνα 33γ

Εικόνα 33: Ανώμαλα πρότυπα υβριδισμού του συνδυασμού μοριακών ανιχνευτών LSI D13S319/ LSI 13q34/ CEP 12. α) Φυσιολογικά πρότυπα υβριδισμού για τους ιχνηθέτες LSI 13q34 και CEP 12 και ανώμαλο πρότυπο υβριδισμού του ιχνηθέτη LSI D13S319. Διακρίνεται η έλλειψη του ενός κόκκινου σήματος στο ένα εκ των 2 ομόλογων χρωμοσωμάτων 13, γεγονός που μαρτυρά την απουσία της περιοχής 13q14.3 στο χρωμόσωμα αυτό. β) Φυσιολογικά πρότυπα υβριδισμού για τους ιχνηθέτες LSI D13S319 και CEP 12 και ανώμαλο πρότυπο υβριδισμού του ιχνηθέτη LSI 13q34. Φαίνεται η έλλειψη του ενός από τα δύο γαλάζια σήματα στο ένα από τα 2 ομόλογα χρωμόσωματα 13, γεγονός που υποδηλώνει την απουσία της περιοχής 13q34 σε ετερόζυγη μορφή. γ) Φυσιολογικά πρότυπα υβριδισμού για τους ιχνηθέτες LSI D13S319 και LSI 13q34 και ανώμαλο πρότυπο υβριδισμού του ιχνηθέτη CEP 12. Διακρίνεται το 1 επιπλέον πράσινο σήμα πάνω σε ένα υπεράριθμο χρωμόσωμα 12 το οποίο μαρτυρά την τρισωμία 12.

*Θετικό αποτέλεσμα για την ύπαρξη μιας από τις παραπάνω χρωμοσωμικές αλλοιώσεις κρίνεται εκείνο που εμφανίζεται σε ποσοστό μεγαλύτερο του 6% στο σύνολο των 200 κυττάρων που αξιολογούνται κάθε φορά σε κάθε ασθενή και για κάθε μοριακό ανιχνευτή ξεχωριστά.

4.3.2 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ FISH ΑΝΑΛΥΣΗΣ

Η FISH ανάλυση ήταν επιτυχής και στα 126 (100%) δείγματα ασθενών με ΧΛΛ που μελετήθηκαν. Εξ αυτών οι 39 ασθενείς (30,95%) παρουσίασαν φυσιολογικά πρότυπα υβριδισμού και για τους 5 μοριακούς ανιχνευτές ενώ οι υπόλοιποι 87 (69,05%) ασθενείς εμφάνισαν ανώμαλα πρότυπα υβριδισμού για έναν ή περισσότερους ανιχνευτές (διάγραμμα 13). Στον πίνακα 23 που ακολουθεί παρουσιάζονται τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την μελέτη των 87 ασθενών που έφεραν ανώμαλα πρότυπα υβριδισμού.

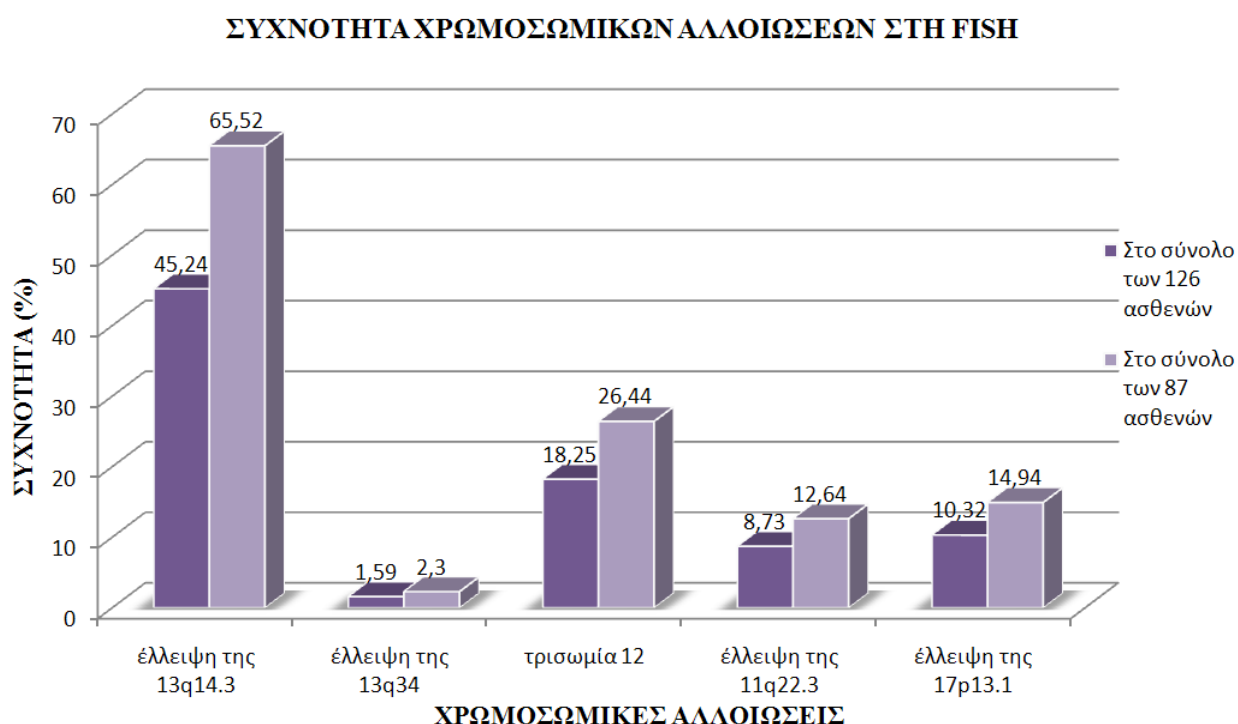


Διάγραμμα 13. Διάγραμμα τύπου πίτας όπου απεικονίζεται η κατανομή των ασθενών με ΧΛΛ με βάση το φυσιολογικό ή ανώμαλο πρότυπο υβριδισμού που ανιχνεύτηκε με τη FISH ανάλυση.

Πίνακας 23. Αποτελέσματα FISH

ΧΡΩΜΟΣΩΜΙΚΕΣ ΑΛΛΟΙΩΣΕΙΣ	ΑΠΟΛΥΤΟΣ ΑΡΙΘΜΟΣ ΑΣΘΕΝΩΝ	ΣΥΧΝΟΤΗΤΑ (% στο σύνολο των ασθενών, N=126)	ΣΥΧΝΟΤΗΤΑ (% στο σύνολο των παθολογικών ασθενών, N=87)
Έλλειψη της 17p14.3 περιοχής (TP53)	13	10,32	14,94
Έλλειψη της 11q22.3 περιοχής (ATM)	11	8,73	12,64
Έλλειψη της 13q14.3 περιοχής	57	45,24	65,52
Ομόζυγη έλλειψη της 13q14.3 περιοχής	13	10,32	14,94
Έλλειψη της 13q34 περιοχής	2	1,59	2,30
Τρισωμία 12	23	18,25	26,44

Από τη μελέτη των 87 ασθενών που εμφάνισαν ανώμαλα πρότυπα υβριδισμού προέκυψε ότι η πιο συχνή χρωμοσωμική αλλοίωση που ανιχνεύτηκε με τη FISH ανάλυση ήταν η υπομικροσκοπική έλλειψη της περιοχής 13q14.3 σε ποσοστό 65,52% των αλλοιωμένων καρυοτύπων, ακολουθούμενη από την τρισωμία 12 η οποία είχε αρκετά μικρότερη συχνότητα (26,44%). Στο διάγραμμα 14 απεικονίζονται αναλυτικότερα τα ποσοστά των ανωμαλιών που ανιχνεύτηκαν στο σύνολο των ασθενών που μελετήθηκαν με τη μέθοδο FISH.



Διάγραμμα 14. Ραβδόγραμμα με τις συχνότητες των αλλοιώσεων που ανιχνεύτηκαν με τη FISH στους 87 ασθενείς που έφεραν αλλοιώσεις αλλά και στο σύνολο των 126 ασθενών.

4.3.2 ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ ΚΑΡΥΟΤΥΠΟΥ ΚΑΙ FISH

Όπως ήδη αναφέρθηκε, στη FISH δόθηκε προτεραιότητα κυρίως σε νέους σχετικά ασθενείς και σε εκείνους που έφεραν φυσιολογικό καρυότυπο ή η καρυοτυπική τους ανάλυση ήταν ανεπιτυχής (65/126). Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι από τη μελέτη αυτών των ασθενών οι 35/65 (53,85%) έφεραν υπομικροσκοπικές ελλείψεις οι οποίες ανιχνεύτηκαν μόνο στη FISH ανάλυση. Συγκεκριμένα οι 30 από αυτούς παρουσίασαν υπομικροσκοπικές ελλείψεις που σχετίζονται με καλή πρόγνωση (έλλειψη της 13q14.3 χρωμοσωμικής περιοχής) ενώ οι 5 εμφάνισαν υπομικροσκοπικές ελλείψεις κακής πρόγνωσης (το 1/5 έλλειψη της 11q22.3 και τα 4/5 έλλειψη της 17p13.1 χρωμοσωμικής περιοχής) με άμεσο αντίκτυπο στη θεραπεία τους. Στο διάγραμμα 15 που ακολουθεί παρουσιάζεται η κατανομή των 65 ασθενών που έφεραν φυσιολογικό καρυότυπο ή η καρυοτυπική ανάλυση ήταν ανεπιτυχής με βάση τα ευρήματα της FISH, οι οποίοι κατηγοριοποιούνται περαιτέρω με βάση την προγνωστική αξία των ευρημάτων αυτών.



Διάγραμμα 15: Κατανομή 65 ασθενών με φυσιολογικά ή καθόλου καρυοτυπικά αποτελέσματα με βάση τα ευρήματα της FISH

Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι σε 10 ασθενείς με παθολογικά καρυοτυπικά αποτελέσματα, η προγνωστική αξία των ευρημάτων της FISH ήταν διαφορετική από αυτή του καρυοτύπου. Σε αυτούς τους ασθενείς οι ανωμαλίες που ανιχνεύτηκαν στον καρυότυπο και δεν ήταν δυνατόν να ανιχνευτούν στη FISH

ανάλυση ήταν διαφορετικές και μάλιστα χειρότερης πρόγνωσης σε σχέση με την πρόγνωση αυτών που ανευρέθηκαν στη FISH. Στον πίνακα 24 παρουσιάζονται αναλυτικά τα κυτταρογενετικά ευρήματα των 10 αυτών ασθενών που προέκυψαν από τις 2 μεθόδους ξεχωριστά και σχετίζονται με την πρόγνωση.

Πίνακας 24: Προγνωστική αξία ευρημάτων καρυοτύπου και FISH ανάλυσης

Ασθενείς	FISH ανάλυση		Καρυοτυπική ανάλυση	
	Ευρήματα	Πρόγνωση	Ευρήματα	Πρόγνωση
1	Έλλειψη της περιοχής 13q14.3	Καλή	Σπασίματα στο χρωμόσωμα 12	Ενδιάμεση
2	Έλλειψη της περιοχής 13q14.3	Καλή	t(6;13)(p21;q14)	Κακή [92]
3	Έλλειψη της περιοχής 13q14.3	Καλή	Σύνθετος με del(11)(q13)	Κακή
4	Έλλειψη της περιοχής 13q14.3	Καλή	Σύνθετος	Κακή
5	Έλλειψη της περιοχής 13q14.3	Καλή	t(14;19)(q32;p13)	Κακή
6	Τρισωμία 12	Ενδιάμεση	Σύνθετος με +12 και t(11;14)(q13;q14)	Κακή
7	Τρισωμία 12	Ενδιάμεση	Σύνθετος με +12	Κακή
8	Τρισωμία 12	Ενδιάμεση	Σύνθετος με +12	Κακή
9	Τρισωμία 12	Ενδιάμεση	Σύνθετος με +12	Κακή
10	Τρισωμία 12	Ενδιάμεση	del(6)(q21q23)	Κακή

4.3.3 ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΕΥΡΗΜΑΤΩΝ FISH ΜΕ ΤΟ ΦΥΛΟ ΤΩΝ ΑΣΘΕΝΩΝ

Από τους 126 ασθενείς που αναλύθηκαν με FISH οι 77 ήταν άνδρες και οι 49 γυναίκες (αναλογία ανδρών/γυναικών: 1,57). Επίσης εξετάστηκαν τα ευρήματα της FISH ανάλυσης και κυρίως τα ανώμαλα πρότυπα υβριδισμού των μοριακών ανιχνευτών σε σχέση με το φύλο. Δεν βρέθηκαν συσχετίσεις μεταξύ του συνόλου των ανώμαλων προτύπων υβριδισμού και του φύλου. Ομοίως καμία συσχέτιση δεν παρατηρήθηκε μεταξύ του φύλου των ασθενών και κάποιας από τις χρωμοσωμικές αλλοιώσεις, που εξετάστηκαν στη FISH ανάλυση, ξεχωριστά. Τα συγκεκριμένα αποτελέσματα παρουσιάζονται αναλυτικά στον πίνακα 25.

Πίνακας 25: Αποτελέσματα FISH σε σχέση με το φύλο των ασθενών

FISH ΑΝΑΛΥΣΗ	ΦΥΛΟ ΑΣΘΕΝΩΝ		P-value
	Άρην (N=77)	Θύλη (N=49)	
Φυσιολογικό πρότυπο υβριδισμού	23	16	1,000
Ανώμαλο πρότυπο υβριδισμού	54	33	1,000
Έλλειψη της 13q14.3 περιοχής	35	25	0,841
Τρισωμία 12	14	9	0,841
Έλλειψη της 11q22.3 περιοχής (ATM)	6	5	0,669
Έλλειψη της 17p14.3 περιοχής (TP53)	9	4	0,566

4.4 ΓΟΝΟΤΥΠΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΟΥ UGT1A1*28 ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΥ

Η γονοτυπική ανάλυση του πολυμορφισμού UGT1A1*28 ήταν επιτυχής και στα 109 δείγματα ασθενών με ΧΛΛ αλλά και στα 108 δείγματα των υγιών μάρτυρων (controls). Κάθε δείγμα ελέγχθηκε 2 φορές ξεχωριστά με τις 2 παρακάτω μεθόδους που αναλύθηκαν στην § 3.4.3:

α) την τεχνική της Real Time –PCR (RT-PCR) με χρήση της τεχνολογίας *Hybridization Probes (HybProbes)* και

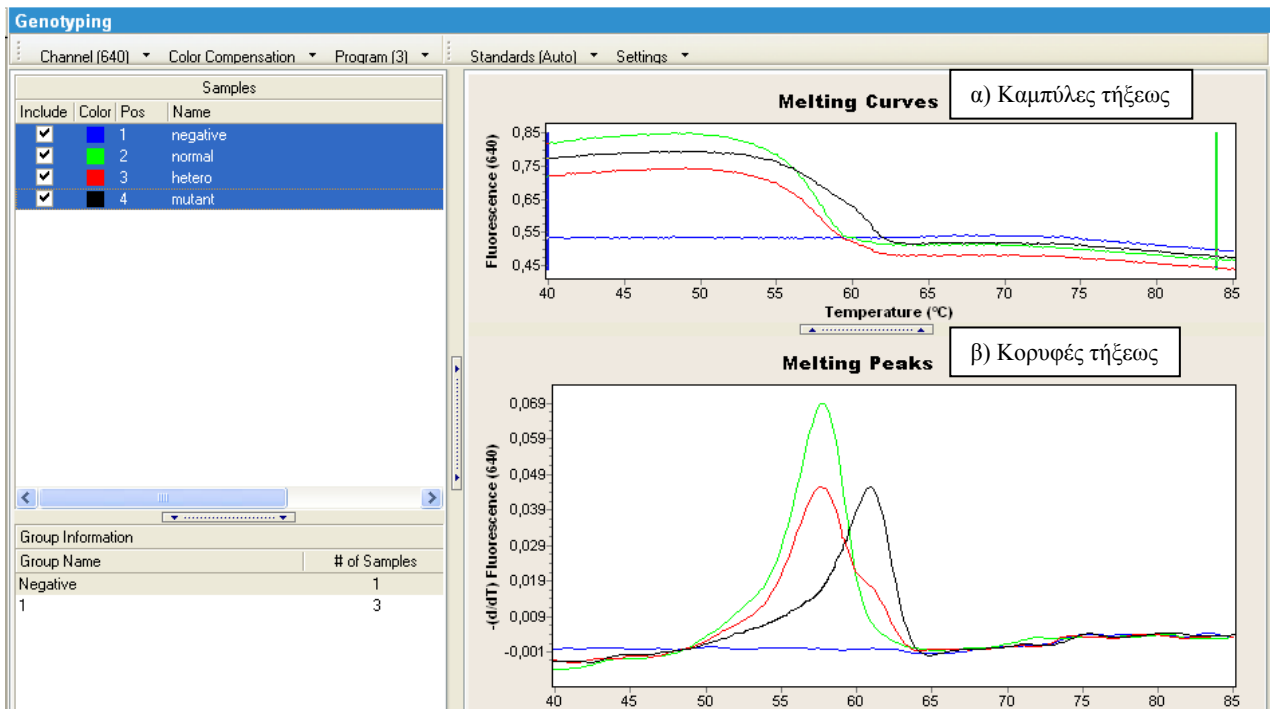
β) την τεχνική της απλής PCR και τον διαχωρισμό των προϊόντων της σε πήκτωμα ακρυλαμίδης.

Κατά τον τρόπο αυτό, το κάθε ένα από τα δείγματα ασθενών και μαρτύρων αναλύθηκε και ελέγχθηκε 4 φορές. Επίσης όλα τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τις 2 μεθόδους ήταν σύμφωνα μεταξύ τους. Επομένως η συγκεκριμένη τεχνική της RT-PCR που χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά ειδικά για τον γονοτυπικό χαρακτηρισμό του UGT1A1*28 πολυμορφισμού κρίθηκε κατάλληλη αφού αποδείχθηκε όχι μόνο ακριβής αλλά και πιο άμεση σε σχέση με την έως και σήμερα χρησιμοποιούμενη συμβατική PCR και τον χρονοβόρο και επίπονο διαχωρισμό των προϊόντων της σε πήκτωμα ακρυλαμίδης.

4.4.1 ΑΠΕΙΚΟΝΙΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ REAL TIME –PCR

Για την ανάλυση και αξιολόγηση των αποτελεσμάτων που προέκυψαν χρησιμοποιήθηκαν οι καμπύλες τήξεως των προϊόντων της αντίδρασης PCR. Σε αυτές ο φθορισμός μετατράπηκε σε κορυφές τήξης με τη βοήθεια κατάλληλου λογισμικού συστήματος, με αποτέλεσμα την απεικόνιση σε διάγραμμα, των αρνητικών παράγωγων του φθορισμού κάθε προϊόντος σε σχέση με τη θερμοκρασία.

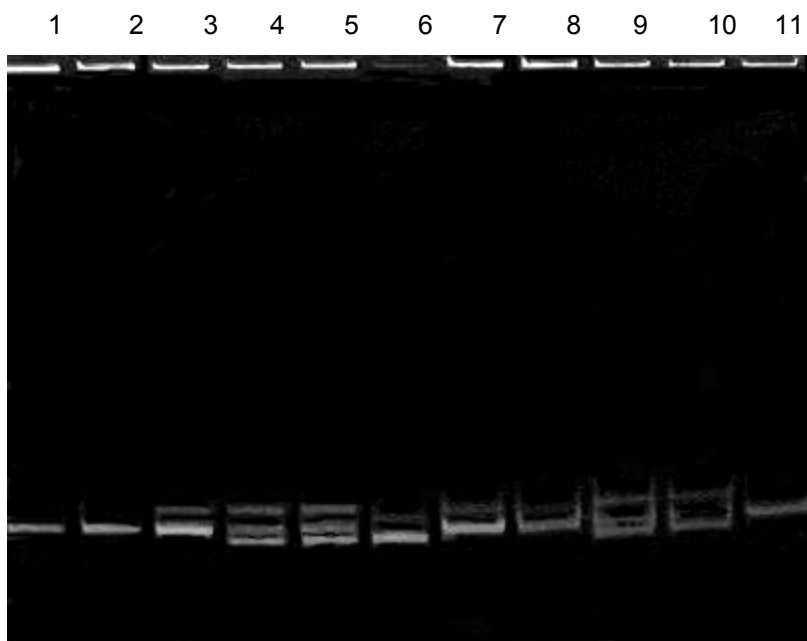
Τα δεδομένα που προέκυψαν από τις καμπύλες τήξεως χρησιμοποιήθηκαν για τη διάκριση του αλληλομόρφου που φέρει την εκτεταμένη διαμόρφωση του υποκινητή με τις 7 επαναλήψεις TA [(TA)₇], *UGT1A1*28*, από το φυσιολογικό αλληλόμορφο *UGT1A1*1* με τις 6 επαναλήψεις TA [(TA)₆]. Οι ειδικοί probes που υβριδίστηκαν στη φυσιολογική (6 επαναλήψεις TA) ή στην εκτεταμένη περιοχή (7 επαναλήψεις TA) του υποκινητή αποδιατάσσονται σε διαφορετικές χαρακτηριστικές, για την κάθε περίπτωση, θερμοκρασίες. Έτσι όταν ενισχύθηκε το φυσιολογικό αλληλόμορφο (TA)₆ προέκυψε η χαρακτηριστική κορυφή τήξης στους 57°C, ενώ το αλληλομόρφο που έφερε το επιπλέον δινοκλεοτίδιο, (TA)₇ συνδέθηκε με κορυφή τήξης στους 60,4°C. Όταν αμφότερα τα αλληλόμορφα (TA)₆ και (TA)₇ ενισχύθηκαν (περίπτωση ετεροζυγώτη), τότε προέκυψαν 2 κορυφές τήξης, μία στους 57°C και μία στους 60,4°C αντιστοίχως. Συμπερασματικά η προσθήκη του επιπλέον δινοκλεοτιδίου TA είχε ως αποτέλεσμα τη μετατόπιση της θερμοκρασίας τήξεως περίπου 3,5°C επιτρέποντας έτσι την εύκολη ανίχνευση του εκτεταμένου από το φυσιολογικό αλληλόμορφο. (εικόνα 34).



Εικόνα 34 : Διακρίνονται οι: α) Καμπύλες τήξεως των προϊόντων της αντίδρασης και β) οι κορυφές τήξεως όπου ξεχωρίζουν οι διαφορετικοί γονότυποι. Η μπλε καμπύλη αντιστοιχεί σε δείγμα που δεν περιέχει DNA (αρνητικό δείγμα, negative). Η πράσινη καμπύλη αντιστοιχεί σε δείγμα που φέρει την φυσιολογική διαμόρφωση του υποκινητή [(TA)₆] σε ομοζυγωτία. Η κόκκινη καμπύλη αντιστοιχεί σε δείγμα ετεροζυγώτη ο οποίος φέρει τη φυσιολογική [(TA)₆] αλλά και την εκτεταμένη διαμόρφωση του υποκινητή [(TA)₇]. Η μαύρη καμπύλη αντιστοιχεί σε δείγμα που φέρει την εκτεταμένη διαμόρφωση του υποκινητή [(TA)₇] σε ομοζυγωτία. Η απεικόνιση πραγματοποιήθηκε με βάση το λογισμικό του συστήματος LightCycler 1.5 Real-Time PCR System (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland)

4.4.2 ΑΠΕΙΚΟΝΙΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ ΕΠΕΙΤΑ ΑΠΟ ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟ ΤΩΝ PCR ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ ΣΕ ΠΗΚΤΩΜΑ ΑΚΡΥΛΑΜΙΔΗΣ

Η αλληλουχία του γονιδιώματος που ενισχύθηκε αφορά περιοχή μήκους 71-73 bp ανάλογα με το αν υπάρχει ή όχι η εκτεταμένη διαμόρφωση του υποκινητή του *UGT1A1* γονιδίου. Τα προϊόντα που προέκυψαν διαχωρίστηκαν με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα ακρυλαμίδης 12% αφού κατά τον τρόπο αυτό καθίσταται δυνατόν να διαχωριστούν ακόμη και προϊόντα που διαφέρουν μόνο κατά 1 ζεύγος βάσεων. Έτσι πραγματοποιήθηκε ο γονοτυπικός προσδιορισμός των δειγμάτων για τον πολυμορφισμό *UGT1A1**28 (εικόνα 35).



Εικόνα 34: Διαχωρισμός των προϊόντων PCR μήκους 71-73 bp που προέκυψαν από την ενίσχυση της περιοχής που εκτείνεται από το νουκλεοτίδιο 6 έως και το 78 αναρροϊκά της κωδικής περιοχής του γονιδίου *UGT1A1*, σε πήκτωμα ακρυλαμίδης 12%. Στη θέση 6 διακρίνεται η φυσιολογική διαμόρφωση (TA_6/TA_6) του υποκινητή. Στις θέσεις 4, 5, 9 και 10 φαίνεται η διαμόρφωση TA_6/TA_7 (ετεροζυγώτες) και στις θέσεις 1, 2, 3, 7 και 8 διακρίνεται η TA_7/TA_7 διαμόρφωση του υποκινητή (ομοζυγώτες).

4.4.3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΓΟΝΟΤΥΠΙΚΗΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ UGT1A1*28 ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΥ

Τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τη γονοτυπική ανάλυση των 109 ασθενών με ΧΛΛ και των 108 υγιών μαρτύρων παρουσιάζονται αναλυτικά στον πίνακα 26. Οι συχνότητες των γονοτύπων του *UGT1A1* γονιδίου στους μάρτυρες ήταν σύμφωνες με προηγούμενες εκτιμήσεις σε άλλους Καυκάσιους πληθυσμούς [86,91]. Η κατανομή των γονοτύπων του *UGT1A1* δεν διέφερε σημαντικά μεταξύ ασθενών και μαρτύρων. Παρατηρήθηκε όμως μία αυξητική τάση του μεταλλαγμένου γονοτύπου TA₇/TA₇ στους ασθενείς (20.2%) έναντι των μαρτύρων (14.8%) χωρίς όμως να είναι στατιστικά σημαντική ($P = 0,546$). Ομοίως, η συχνότητα του αλληλομόρφου TA₇ δε διέφερε μεταξύ των ασθενών και των μαρτύρων ($P = 0,607$) ενώ δεν παρατηρήθηκαν διαφορές στην κατανομή των γονοτύπων όσον αφορά στην ηλικία και στο φύλο των ασθενών.

Πίνακας 26: Συχνότητες γονοτύπων και αλληλομόρφων του *UGT1A1* γονιδίου στους 109 ασθενείς με ΧΛΛ και στους 108 υγιείς μάρτυρες

Γονότυποι / Αλληλόμορφα	Μάρτυρες (%)	Ασθενείς (%)	P-value
TA ₆ /TA ₆	43 (39.8)	43 (39.4)	
TA ₆ /TA ₇	49 (45.4)	44 (40.4)	
TA ₇ /TA ₇	16 (14.8)	22 (20.2)	0.546
TA ₆	135 (62.5)	130 (59.6)	
TA ₇	81 (37.5)	88 (40.4)	0.607

4.4.4 ΓΟΝΟΤΥΠΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ UGT1A1*28 ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΥ ΚΑΙ ΚΥΤΤΑΡΟΓΕΝΕΤΙΚΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Λαμβάνοντας υπόψη την άποψη ότι ο UGT1A1*28 πολυμορφισμός μπορεί να επηρεάσει την εμφάνιση των ειδικών χρωμοσωμικών αλλοιώσεων της ΧΛΛ (όπως αναλύθηκε στην § 2.4.2.2) έγινε συσχέτιση του πολυμορφισμού με τα καρυοτυπικά αποτελέσματα και με τα ευρήματα της FISH των ασθενών. Από τους 109 ασθενείς που αναλύθηκαν γονοτυπικά υπήρχαν καρυοτυπικά αποτελέσματα για όλους, εκ των οποίων οι 59 έφεραν κλωνικές χρωμοσωμικές αλλοιώσεις, ενώ αποτελέσματα FISH υπήρχαν για τους 64 εκ των οποίων οι 43 έφεραν ανώμαλα πρότυπα υβριδισμού των ιχνηθετών που χρησιμοποιήθηκαν (§ 3.3.1). Έτσι οι ασθενείς κατηγοριοποιήθηκαν με βάση τα κυτταρογενετικά τους ευρήματα που προέκυψαν από τον καρυότυπο (59/109) και από τη FISH ανάλυση (43/64) ώστε να συγκριθούν οι συχνότητες των γονοτύπων και των αλληλομόρφων μεταξύ των κατηγοριών αυτών αλλά και με τους μάρτυρες.

4.4.4.1 ΓΟΝΟΤΥΠΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΚΑΙ ΚΑΡΥΟΤΥΠΙΚΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Οι ασθενείς ομαδοποιήθηκαν σε καρυοτυπικές ομάδες και πραγματοποιήθηκε σύγκριση μεταξύ των ομάδων αυτών αλλά και με τους μάρτυρες όσον αφορά στην κατανομή των γονότυπων και τις συχνότητες των αλληλομόρφων γονιδίων. Οι συχνότητες των γονότυπων και των αλληλομόρφων κατανεμήθηκαν ομοιόμορφα ανάμεσα στους μάρτυρες και στους ασθενείς με φυσιολογικό ή ανώμαλο καρυότυπο ($P = 0.438$). Ομοίως, δεν παρατηρήθηκαν διαφορές όσον αφορά στον αριθμό των καρυοτυπικών ανωμαλιών ($P = 0,728$). Αντιθέτως οι ασθενείς με τρισωμία 12 εμφάνισαν υψηλότερη συχνότητα του αλληλομόρφου TA₇ σε σχέση με τους μάρτυρες, διαφορά η οποία ήταν οριακά στατιστικά σημαντική ($P = 0,052$). Στον πίνακα 27 συνοψίζονται οι κατανομές των γονοτύπων και οι συχνότητες των αλληλομόρφων γονιδίων εντός των διαφορετικών κυτταρογενετικών υποομάδων που δημιουργήθηκαν σύμφωνα με τα αποτελέσματα του καρυοτύπου.

Πίνακας 27: Συχνότητες γονοτύπων και αλληλομόρφων του *UGT1A1* γονιδίου στους 109 ασθενείς κατηγοριοποιημένους με βάση τα αποτελέσματα του καρυότυπου

ΚΑΡΥΟΤΥΠΟΙ	ΧΡΩΜ/ΚΕΣ ΑΛΛΟΙΩΣΕΙΣ	TA ₆ /TA ₆ n (%)	TA ₆ /TA ₇ n (%)	TA ₇ /TA ₇ n (%)	P-value (vs. controls)	TA ₆ n (%)	TA ₇ n (%)	P-value (vs. controls) ^a
Φυσιολογικοί		22 (44.0)	21 (42.0)	7 (14.0)		65 (65.0)	35 (35.0)	
Ανώμαλοι	Όλες	21 (35.6)	23 (39.0)	15 (25.4)	0.438 ^b	65 (55.1)	53 (44.9)	0.270 ^b
	Τρισωμία 12	5 (26.3)	7 (36.8)	7 (36.8)	0.068	17 (44.7)	21 (55.3)	0.052
	del(13q)	3 (27.3)	5 (45.5)	3 (27.3)	0.502	11 (50.0)	11 (50.0)	0.359
	del(11q)	1 (14.3)	3 (42.9)	3 (42.9)	0.119	5 (35.7)	9 (64.3)	0.087
	del(17q) και -17	0	2 (50.0)	2 (50.0)		2 (25.0)	5 (75.0)	
	Απώλεια του Y	1 (20.0)	1 (20.0)	3 (60.0)		3 (30.0)	7 (70.0)	
	Άλλες	4 (21.1)	11 (57.9)	4 (21.1)	0.290	19 (50.0)	19 (50.0)	0.203
Καρυότυποι με 1 αλλοίωση		19 (59.4)	10 (31.3)	4 (12.5)		48 (73.0)	18 (27.0)	
Καρυότυποι με 2 αλλοιώσεις		4 (36.4)	4 (36.4)	3 (27.3)		12 (54.5)	10 (45.5)	
Σύνθετοι καρυότυποι		5 (25.0)	10 (50.0)	5 (25.0)	0.728 ^c	20 (50.0)	20 (50.0)	0.686 ^γ

^a Fisher's exact test

^b Το P-value υπολογίστηκε συγκρίνοντας την κατανομή των γονοτύπων ή τις συχνότητες των αλληλομόρφων ανάμεσα στους μάρτυρες και στους ασθενείς με φυσιολογικό και ανώμαλο καρυότυπο

^γ Το P-value υπολογίστηκε συγκρίνοντας την κατανομή των γονοτύπων ή τις συχνότητες των αλληλομόρφων ανάμεσα στους ασθενείς με ανώμαλο καρυότυπο με 1,2 και ≥ 3 ανωμαλίες

4.4.4.2 ΓΟΝΟΤΥΠΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΚΑΙ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ FISH

Η ίδια στρατηγική ανάλυσης εφαρμόστηκε και στα αποτελέσματα της FISH συγκρίνοντας πάντα τις συχνότητες των γονοτύπων και των αλληλομόρφων εντός των κυτταρογενετικών υποομάδων αλλά και με τους μάρτυρες (πίνακας 28). Από τη σύγκριση αυτή προέκυψε ότι ο γονότυπος TA₇/TA₇ εμφανίστηκε σημαντικά αυξημένος στους ασθενείς με ανώμαλα πρότυπα υβριδισμού (P=0.006) και μάλιστα η συχνότητα αυτή αυξάνεται ανάλογα με τον αριθμό των ανωμαλιών. Επίσης οι ασθενείς που φέρουν το παθολογικό αλληλόμορφο TA₇ έχουν περίπου διπλάσια πιθανότητα να εμφανίσουν τις ειδικές αλλοιώσεις της νόσου (OR=1.89, 95% CI= 1.10-3.03, P=0.026) ενώ ταυτόχρονα διατρέχουν τετραπλάσιο κίνδυνο να εκδηλώσουν 2 από αυτές τις αλλοιώσεις (OR=3.89, 95% CI= 1.44-10.52, P=0.009). Επίσης στους ασθενείς με +12 βρέθηκε αυξημένη συχνότητα του γονοτύπου TA₇/TA₇ η οποία ήταν στατιστικώς σημαντική (P=0.011), ενώ οι ασθενείς με del(11q) εμφάνισαν αυξημένη συχνότητα του TA₇ αλληλομόρφου (OR=3.09, 95% CI= 1.19-8.08, P=0.030). Αυξημένη επίσης παρατηρήθηκε και η συχνότητα του γονοτύπου TA₇/TA₇ στους ασθενείς με del(17)(p13) ή/και del(13)(q34) χωρίς όμως να χαρακτηρίζεται στατιστικά σημαντική πιθανόν εξαιτίας του μικρού αριθμού ασθενών με τις συγκεκριμένες ανωμαλίες.

Επιπροσθέτως οι ασθενείς κατηγοριοποιήθηκαν στις παρακάτω 3 προγνωστικές ομάδες βάση των αλλοιώσεων που βρέθηκαν στη FISH:

1. Καλή πρόγνωση: ασθενείς με del(13)(q14) ως μοναδική αλλοίωση
2. Ενδιάμεση πρόγνωση: ασθενείς με +12 ως μοναδική αλλοίωση, φυσιολογικό πρότυπο υβριδισμού και για τους 5 ιχνηθέτες, del(13)(q14) ακολουθούμενη από +12 ή del(13)(q34).
3. Κακή πρόγνωση: ασθενείς με del(11)(q22) ή/και del(17)(p13).

Από τη σύγκριση των προγνωστικών ομάδων παρατηρήθηκε άνιση κατανομή των γονοτύπων (P=0.009) και μάλιστα ο TA₇/TA₇ υπερείχε στους ασθενείς με ενδιάμεσης (P=0.003) και κακής (P=0.016) πρόγνωσης χρωμοσωμικές αλλοιώσεις. Ειδικότερα η συχνότητα του μεταλλαγμένου αλληλομόρφου TA₇ στους ασθενείς με φτωχή πρόγνωση ήταν 3,6 φορές μεγαλύτερη από εκείνη των ασθενών με καλή ή ενδιάμεση πρόγνωση (OR=3.6, 95% CI= 1.3-10.4, P=0.027) (πίνακας 28).

Πίνακας 28: Συχνότητες γονοτύπων και αλληλομόρφων του *UGT1A1* γονιδίου στους 65 ασθενείς κατηγοριοποιημένους με βάση τα ευρήματα της FISH.

ΠΡΟΤΥΠΑ ΥΒΡΙΔΙΣΜΟΥ	ΧΡΩΜ/ΚΕΣ ΑΛΛΟΙΩΣΕΙΣ	TA ₆ /TA ₆ n (%)	TA ₆ /TA ₇ n (%)	TA ₇ /TA ₇ n (%)	P-value (vs. controls)	TA ₆ n (%)	TA ₇ n (%)	P-value (vs. controls) ^a	OR (95% CI)
Φυσιολογικό πρότυπο		9 (42.6)	6 (28.6)	7 (28.6)	0.206	23 (54.8)	20 (47.6)	0.241	
Ανόμαλο πρότυπο	Όλες	14 (32.6)	13 (30.2)	16 (37.2)	0.006	41 (47.7)	45 (52.3)	0.026	1.89 (1.10-3.03)
	del(13)(q14)	11 (37.9)	10 (34.5)	8 (27.6)	0.249	32 (55.2)	26 (44.8)	0.388	
	+12	3 (25.0)	2 (16.7)	7 (58.3)	0.001	8 (33.3)	16 (66.7)	0.011	3.33 (1.37-8.14)
	del(11)(q22)	1 (10.0)	5 (50.0)	4 (40.0)	0.059	7 (35.0)	13 (65.0)	0.030	3.09 (1.19-8.08)
	del(13)(q34)	0	1 (25.0)	3 (75.0)		1 (12.5)	7 (87.5)		
	del(17)(p13)	1 (25.0)	1 (25.0)	2 (50.0)		3 (37.5)	5 (62.5)		
Ασθενείς με 1 αλλοίωση		12 (40.0)	9 (30.0)	9 (30.0)	0.098	33 (55.0)	27 (45.0)	0.292	
Ασθενείς με 2 αλλοιώσεις		2 (20.0)	2 (20.0)	6 (60.0)	0.002	6 (30.0)	14 (70.0)	0.009	3.89 (1.44-10.52)
Προγνωστικές ομάδες	Καλή^β	9 (47.4)	7 (36.8)	3 (15.8)	0.778	25 (65.8)	13 (34.2)	0.837	
	Ενδιάμεση^γ	12 (37.5)	7 (21.9)	13 (40.6)	0.003	31 (48.4)	33 (51.6)	0.062	
	Κακή^δ	2 (15.4)	5 (38.5)	6 (46.2)	0.016 / 0.174^ε	9 (34.6)	17 (65.4)	0.012 / 0.027^ε	3.14 (1.34-7.39) / 3.6 (1.30-10.40)

^a Fisher's exact test

^β Καλή πρόγνωση: ασθενείς με del(13)(q14) ως μοναδική αλλοίωση

^γ Ενδιάμεση πρόγνωση ασθενείς με +12 ως μοναδική αλλοίωση, φυσιολογικό πρότυπο υβριδισμού, del(13)(q14) ακολουθούμενη από +12 ή del(13)(q34)

^δ Κακή πρόγνωση ασθενείς με del(11)(q22), del(17)(p13)

^ε Το P-value υπολογίστηκε συγκρίνοντας την κατανομή των γονοτύπων ή τις συχνότητες των αλληλομόρφων ανάμεσα στους ασθενείς με καλή, ενδιάμεση και κακή πρόγνωση

4.5 ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΚΙΝΔΥΝΟΥ ΚΑΙ ΧΛΛ

4.5.1 ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΠΡΟΔΙΑΘΕΣΗ & ΕΚΘΕΣΗ ΣΕ ΓΕΝΟΤΟΞΙΚΟΥΣ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ

Ο κίνδυνος που διατρέχουν τα άτομα που εκτίθενται σε συγκεκριμένους τοξικούς περιβαλλοντικούς παράγοντες να εκδηλώσουν ΧΛΛ ελέγχθηκε με τη λήψη καταστρωμένων, με βάση τη βιβλιογραφία, επιδημιολογικών δελτίων [5,16,18]. Κατά τον τρόπο αυτό μέσω προσωπικών συνεντεύξεων και ενυπόγραφων συγκαταθέσεων συμπληρώθηκαν κατάλληλα τα ειδικά δελτία και αξιολογήθηκαν τα δεδομένα 138 ασθενών και 142 μαρτύρων. Τα δεδομένα των 2 ομάδων (ασθενών και μαρτύρων) συγκρίθηκαν μεταξύ τους και επεξεργάστηκαν στατιστικώς ώστε να αναδειχτούν ή όχι οι πιθανοί γενοτοξικοί παράγοντες που συμβάλλουν στην εκδήλωση της ΧΛΛ.

Στον πίνακα 29 που ακολουθεί παρουσιάζεται ο έλεγχος της γενετικής προδιάθεσης της νόσου συγκρίνοντας το οικογενειακό ιστορικό των συγγενών α' βαθμού των ασθενών σε σχέση με αυτό των μαρτύρων. Από τη σύγκριση αυτή προέκυψε ότι οι ασθενείς είχαν συχνότερα συγγενείς α' βαθμού με ΧΛΛ ή άλλους καρκίνους ($P<0,0001$). Ειδικότερα η μητέρα ($P=0,003$) ή τα αδέρφια ($P=0,014$) των ασθενών ήταν εκείνα τα άτομα της οικογένειας που υπέφεραν συχνότερα από ΧΛΛ ή άλλη κακοήθεια σε σχέση με τους μάρτυρες.

Πίνακας 29: Γενετική προδιάθεση

ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑΚΟ ΙΣΤΟΡΙΚΟ ΚΑΚΟΗΘΕΙΑΣ		ΜΑΡΤΥΡΕΣ (%)	ΑΣΘΕΝΕΙΣ (%)	P-value
Συγγενείς α' βαθμού	Συμπαγής όγκος	12/141 (8,5)	25/137 (18,2)	
	ΧΛΛ	1/141 (0,7)	17/137 (12,4)	<0,0001
Μητέρα	Συμπαγής όγκος	1/141 (0,7)	9/137 (6,6)	
	ΧΛΛ	0/141 (0)	4/137 (2,9)	0,003
Πατέρας	Συμπαγής όγκος	8/141 (5,7)	11/137 (8,0)	
	ΧΛΛ	0/141 (0)	4/137 (2,9)	0,087
Αδέρφια	Συμπαγής όγκος	3/141 (2,1)	10/137 (7,3)	
	ΧΛΛ	0/141 (0)	4/137 (2,9)	0,014

Στον πίνακα 30 που ακολουθεί παρουσιάζονται αναλυτικά οι παράγοντες κινδύνου που ελέγχθηκαν για την εκδήλωση της ΧΛΛ και τα ευρήματα που προέκυψαν από τη συγκριτική μελέτη των ασθενών και μαρτύρων. Θετική βρέθηκε η συσχέτιση της νόσου με το κάπνισμα. Ειδικότερα το ποσοστό των ασθενών που ήταν πρώην καπνιστές για αρκετά μεγάλο χρονικό διάστημα (>5 έτη) στη ζωή τους πριν την εκδήλωση της νόσου ήταν ιδιαίτερα αυξημένο σε σχέση με αυτό των μαρτύρων ($P=0,005$). Επίσης η εμφάνιση ενός ή περισσότερων επεισοδίων πνευμονίας εντός 5 ετών πριν από τη διάγνωση της νόσου αναδείχτηκε ως παράγοντας κινδύνου για την εμφάνιση της ΧΛΛ αφού τα άτομα αυτά διατρέχουν περίπου τριπλάσιο κίνδυνο να εμφανίσουν τη νόσου ($OR=3.12$, $95\% CI= 1.30-8.78$, $P=0.016$). Όσον αφορά στην έκθεση στη ραδιενέργεια λόγω ακτινοθεραπείας ή άλλων ακτινοδιαγνωστικών εξετάσεων, το ποσοστό των ασθενών που εκτέθηκε σε αυτήν εξαιτίας της θεραπείας κάποιας νόσου πλην της ΧΛΛ ή λόγω επανειλημμένων εξετάσεων, πριν την εκδήλωση της ΧΛΛ, εμφανίστηκε ιδιαίτερα αυξημένο, σχεδόν τριπλάσιο, σε σχέση με αυτό των μαρτύρων ($OR=3.38$, $95\% CI= 1.49-6.56$, $P=0.003$)

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι τα άτομα που είχαν εκτεθεί σε πετρελαιοειδή είτε μέσω της εργασίας τους (βενζινοπώλες, μηχανικοί αυτοκινήτων, επαγγελματίες οδηγοί, ναυπηγοί, εργάτες μηχανοστασίων, οδηγοί βυτιοφόρων, εργάτες σε δεξαμενόπλοια κ.α.) είτε επειδή η οικία τους βρισκόταν δίπλα σε βενζινάδικο (απόσταση $\leq 30m$) παρουσίασαν περίπου 6 φορές μεγαλύτερη πιθανότητα για την εκδήλωση της νόσου ($OR=5.73$, $95\% CI= 2.12-15.49$, $P<0.0001$). Επίσης τα άτομα που είχαν εκτεθεί σε μέταλλα (χρώμιο, νικέλιο, αρσενικό, θάλλιο, αμίαντο, χαλκό, μόλυβδο, κάδμιο) κυρίως μέσω του εργασιακού τους περιβάλλοντος (σιδηρουργοί, μηχανικοί αυτοκινήτων, ναυπηγοί, συγκολλητές, торναδόροι, λιθογράφοι, αμμοβολιστές, εργάτες σε χυτήρια και μηχανουργεία κ.α) είχαν περίπου διπλάσια πιθανότητα να εκδηλώσουν τη νόσο ($OR=2.15$, $95\% CI= 1.14-4.04$, $P=0.024$). Θετική βρέθηκε επίσης η συσχέτιση μεταξύ της νόσου και της χρήσης απορρυπαντικών (κυρίως της χλωρίνης) τα οποία κυρίως χρησιμοποιήθηκαν από τα άτομα λόγω της εργασίας τους (καθαριστές σε ιδιωτικούς ή δημόσιους φορείς/χώρους, εργάτες σε εργοστάσια παραγωγής απορρυπαντικών) ($P<0.0001$). Επιπροσθέτως επαγγέλματα όπως αυτό του αγρότη (ή εργάτης σε εργοστάσια παραγωγής φυτοφαρμάκων) κρίθηκαν ιδιαίτερα επιβαρυντικά λόγω της χρήσης φυτοφάρμακων αφού σε αυτή την περίπτωση ο κίνδυνος εμφάνισης της νόσου γίνεται σχεδόν τετραπλάσιος ($OR=3.8$, $95\% CI= 1.98-7.43$, $P<0.0001$). Το ίδιο ισχύει και με

τους ψήστες/μάγειρες εξαιτίας των αναθυμιάσεων που εκπέμπονται κατά την διάρκεια του ψησίματος του κόκκινου ή λευκού κρέατος (OR=1.06, 95% CI= 1.02-1.11, $P=0.003$).

Επίσης, η τοποθεσία της οικίας ή της εργασίας των ατόμων κρίθηκε σημαντική. Έτσι το ποσοστό των ασθενών που έμεναν δίπλα ή δούλευαν κοντά (απόσταση $\leq 30m$) σε εργοστάσιο με ενεργή καμινάδα ήταν σημαντικά αυξημένο (σχεδόν τετραπλάσιο) σε σχέση με αυτό των μαρτύρων (OR=3.82, 95% CI= 1.37-10.67, $P=0.007$). Το ίδιο ισχύει και για τους ασθενείς που κατοικούσαν ή δούλευαν σε ή κοντά (απόσταση $\leq 30m$) σε υποσταθμούς της ΔΕΗ και πυλώνες υψηλής τάσης αφού το ποσοστό των ατόμων αυτών εμφανίστηκε περίπου 6 φορές υψηλότερο συγκρινόμενο με αυτό των μαρτύρων (OR=1.06, 95% CI= 1.02-1.11, $P<0.0001$). Οι υπόλοιποι παράγοντες κινδύνου που ελέγχθηκαν και δεν βρέθηκε θετική συσχέτιση με τη νόσο φαίνονται στον πίνακα 30.

Πίνακας 30: Συσχέτιση της έκθεσης των ασθενών σε τοξικούς παράγοντες με την εκδήλωση της ΧΛΑ

ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΚΙΝΔΥΝΟΥ		ΜΑΡΤΥΡΕΣ (%)	ΑΣΘΕΝΕΙΣ (%)	P-value	OR (95% CI)
Κάπνισμα	Νυν	52/141 (36,9)	38/137 (27,7)		
	Πρώην	9/141 (6,4)	26/137 (19,0)	0,005	
Πνευμονία		11/141 (7,8)	28/137 (20,9)	0,003	3,12(1,49-6,56)
Βαφή μαλλιών για ίδια χρήση		34/141 (24,1)	33/137 (23,9)	1,000	
Πετρελαιοειδή		5/141 (3,5)	24/137 (17,4)	<0,0001	5,73(2,12-15,49)
Μπογιές / Διαλυτικά χρωμάτων / Λούστρα		22/141 (15,6)	33/137 (23,9)	0,111	
Μέταλλα		18/141 (12,8)	33/137 (23,9)	0,024	2,15(1,14-4,04)
Κόλλες υποδημάτων/επίπλων/ξύλων		13/141 (9,2)	19/137 (13,8)	0,315	
Απορρυπαντικά		0/141 (0)	18/137 (13,0)	<0,0001	1,15(1,08-1,23)
Ραδιενέργεια (εξετάσεις/ακτινοθεραπεία)*		6/141 (4,3)	18/137 (13)*	0,016	3,38(1,30-8,78)
Καυσαέρια αυτοκινήτων		27/141 (19,1)	32/137 (23,2)	0,492	
Φυτοφάρμακα		14/141 (9,9)	41/137 (29,7)	<0,0001	3,8(1,98-7,43)
Πλαστικά /λάστιχα/καουτσούκ		1/141 (0,7)	4/137 (2,9)	0,354	
Υψηλή τάση		4/141 (2,8)	20/137 (14,5)	<0,0001	5,8(1,93-17,46)
Καμινάδα εργοστάσιου		5/141 (3,5)	17/137 (12,3)	0,007	3,82(1,37-10,67)
Μάγειρας / Ψήστης		0/141 (0)	8/137 (5,8)	0,003	1,06(1,02-1,11)
Οικοδόμος		9/141 (6,4)	12/137 (8,7)	0,613	
Χημειοθεραπευτικά στην εργασία		0/141 (0)	2/137 (1,4)	0,244	
Ξυλεία (επεξεργασία φρέσκου ξύλου)		1/141 (0,7)	4/137 (2,9)	0,210	
Αρωματικές ύλες		6/141 (4,3)	2/137 (1,4)	0,282	
Εργασία στην κοσμετολογία		0/141 (0)	3/137 (2,2)	0,121	

Οι παραπάνω παραγόντες κινδύνου των οποίων η συσχέτιση με τη ΧΛΛ κρίθηκε στατιστικώς σημαντική επεξεργάστηκαν περαιτέρω με πολυπαραγοντική στατιστική ανάλυση. Η ανάλυση αυτή ανέδειξε ως ιδιαίτερα σημαντικούς παράγοντες κινδύνου για την εκδήλωση της ΧΛΛ την έκθεση σε πετρελαιοειδή, σε ραδιενέργεια και φυτοφάρμακα αλλά και το οικογενειακό ιστορικό της ΧΛΛ ή άλλης κακοήθειας, αφού τα ποσοστά των ασθενών που είχαν εκτεθεί στους παραπάνω παράγοντες κινδύνου ήταν ιδιαίτερα αυξημένα σε σχέση με τους μάρτυρες. Επίσης ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η μελέτη του αριθμού των διαφορετικών εκθέσεων που δέχεται ένα άτομο. Από την ανάλυση αυτή βρέθηκε ότι όσο αυξάνεται ο αριθμός των διαφορετικών εκθέσεων τόσο αυξάνεται και η πιθανότητα να ασθενήσει ένα άτομο με ΧΛΛ.

4.5.2 ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΚΙΝΔΥΝΟΥ ΚΑΙ ΕΙΔΙΚΕΣ ΧΡΩΜΟΣΩΜΙΚΕΣ ΑΛΛΟΙΩΣΕΙΣ ΤΗΣ ΧΛΑ

Λαμβάνοντας υπόψη το γεγονός ότι οι τοξικοί μεταλλαξογόνοι παράγοντες επιδρούν στο DNA και μπορεί να προκαλέσουν θραύσεις, οι οποίες είναι η αρχή όλων των χρωμοσωμικών αλλοιώσεων, έγινε συσχέτιση των παραπάνω εκθέσεων (πίνακας 28) με τα καρυοτυπικά αποτελέσματα των ασθενών. Από τους 138 ασθενείς που συμπεριλήφθηκαν στη συγκεκριμένη επιδημιολογική μελέτη, οι 73 (52,90%) έφεραν αλλοιωμένους καρυοτύπους. Οι πιο συχνές χρωμοσωμικές αλλοιώσεις που απαντήθηκαν στο συγκεκριμένο πλήθος ασθενών ήταν: +12 (38,03%), del(13q) (18.31%), del(17p) (12.68%), del(11q) (11.27%), del(6q) (11.27%), -Y (8.45%) και add(14q) (7.04%).

Στον πίνακα 31 που ακολουθεί παρουσιάζονται αναλυτικά οι συσχετίσεις που πραγματοποιήθηκαν μεταξύ των παράγοντων κινδύνου και των πιο συχνά απαντώμενων χρωμοσωμικών αλλοιώσεων της νόσου στο σύνολο των 138 ασθενών. Από τις αλλοιώσεις αυτές η έλλειψη del(11q) βρέθηκε σε αυξημένο ποσοστό (περίπου τετραπλάσιο) στους ασθενείς που είχαν εκτεθεί σε φυτοφάρμακα σε σχέση με αυτούς που δεν είχαν εκτεθεί (OR=4.34, 95% CI= 1,00-19,16, P= 0,050). Επίσης όσοι είχαν επαφή εξαιτίας της εργασίας τους με λάστιχα, πλαστικά και γενικότερα καουτσούκ εμφάνισαν μεγαλύτερη πιθανότητα, να εκδηλώσουν την έλλειψη del(13q) (OR=11.18, 95% CI= 1.43-82.27, P= 0,044). Τέλος δεν βρέθηκε καμία συσχέτιση όταν εξετάστηκε η σχέση του καθενός από τους παραγόντες κινδύνου με τον αριθμό των χρωμοσωμικών αλλοιώσεων που βρέθηκαν στον παθολογικό καρυότυπο των ασθενών.

Πίνακας 31: Συσχέτιση των ειδικών αλλοιώσεων της νόσου με τους παράγοντες κινδύνου

ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΚΙΝΔΥΝΟΥ	ΧΡΩΜΟΣΩΝΙΚΕΣ ΑΛΛΟΙΩΣΕΙΣ						
	+12 (%)	del(13q) (%)	del(17p) (%)	del(11q) (%)	del(6q) (%)	-Y (%)	add(14q) (%)
Νυν καπνιστής	5 (13,2)	3 (7,9)	0	4 (10,5)	2 (5,3)	1 (2,6)	3 (7,9)
Πρώην καπνιστής	9 (34,6)	3(11,5)	2 (7,7)	1 (3,8)	1 (3,8)	2 (7,7)	0
P-value / OR (95% CI)	0,071	0,887	0,149	0,349	0,841	0,615	0,212
Πνευμονία	3 (10,7)	3 (10,7)	3 (10,7)	2 (7,1)	3 (10,7)	3 (10,7)	0
P-value / OR (95% CI)	0,195	0,734	0,363	0,673	0,363	0,105	0,583
Βαφή μαλλιών για ίδια χρήση	4 (12,1)	2 (6,1)	4 (12,1)	0	3 (9,1)	1 (3,0)	0
P-value / OR (95% CI)	0,315	0,733	0,217	0,198	0,397	0,558	0,338
Πετρελαιοειδή	6 (25,0)	1 (4,2)	3 (12,5)	1 (4,2)	2 (8,3)	0	1 (4,2)
P-value / OR (95% CI)	0,571	0,466	0,190	1,000	0,628	0,590	1,000
Μπογιές / Διαλυτικά χρωμάτων / Λούστρα	7 (21,2)	2 (6,2)	1 (3,0)	1 (3,0)	1 (3,0)	1 (3,0)	0
P-value / OR (95% CI)	0,804	0,356	0,352	0,680	0,680	1,000	0,338
Μέταλλα	10 (30,3)	4 (12,1)	2 (6,1)	1 (3,0)	1 (3,0)	2 (6,1)	1 (3,0)
P-value / OR (95% CI)	0,083	0,510	1,000	0,680	0,680	0,629	1,000
Κόλλες υποδημάτων/επίπλων/ξύλων	5 (26,3)	1 (5,3)	0	0	1 (5,3)	1 (5,3)	1 (5,3)
P-value / OR (95% CI)	0,532	1,000	0,611	0,599	0,697	1,000	0,529
Απορρυπαντικά	1 (5,6)	4 (22,2)	0	2 (11,1)	1 (5,6)	2 (11,1)	0
P-value / OR (95% CI)	0,198	0,069	0,605	0,280	1,000	0,176	1,000
Ραδιενέργεια (εξετάσεις/ακτινοθεραπεία)*	3 (16,7)	0	0		0	0	0
P-value / OR (95% CI)	1,000	0,217	0,605		0,596	1,00	1,00
Καυσαέρια αυτοκινήτων	5(15,6)	0	2 (6,3)	0	2 (6,3)	1 (3,1)	0
P-value / OR (95% CI)	0,618	0,039	1,000	0,198	1,000	1,000	0,590
Φυτοφάρμακα	4 (9,8)	5 (12,2)	2 (4,9)	5 (12,2)	3 (7,3)	1 (2,4)	1 (2,4)
P-value / OR (95% CI)	0,064	0,528	1,000	0,050 / 4,35 (1,00-19,16)	0,695	0,669	1,000
Πλαστικά /λάστιχα/καουτσούκ	1 (25,0)	2 (50,0)	0	0	0	1 (25,0)	0
P-value / OR (95% CI)	1,000	0,044 / 11,18 (1,43-87,27)	1,000	1,000	1,000	0,165	1,000
Υψηλή τάση	4 (20,0)	0	0	0	1 (5,0)	0	1 (5,0)
P-value / OR (95% CI)	1,000	0,214	0,857	0,603	1,000	0,593	0,549

Καμινάδα εργοστάσιου	4 (23,5)	2 (11,8)	0	1 (5,9)	0	1 (5,9)	0
P-value / OR (95% CI)	0,744	0,663	0,601	1,000	0,595	0,553	1,000
Μάγειρας / Ψήστης	2 (25,0)	0	1 (12,5)	1 (12,5)	1 (12,5)	0	0
P-value / OR (95% CI)	0,654	1,000	0,425	0,388	0,388	0,694	1,000
Οικοδόμος	1 (8,3)	1 (8,3)	0	1 (8,3)	0	2 (16,2)	0
P-value / OR (95% CI)	0,460	1,000	1,000	0,527	1,000	0,086	1,000
Χημειοθεραπευτικά στην εργασία	1 (50,0)	0	0	0	0	0	0
P-value / OR (95% CI)	-	-	-	-	-	-	-
Ξυλεία (επεξεργασία φρέσκου ξύλου)	1 (50,0)	0	0	0	0	0	0
P-value / OR (95% CI)	0,623	1,000	-	-	-	-	-
Αρωματικές ύλες	0	0	0	0	0	0	0
P-value / OR (95% CI)	0,586	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
Εργασία στην κοσμετολογία	0	0	0	0	0	0	0
P-value / OR (95% CI)	-	-	-	-	-	-	-

Από τον έλεγχο του οικογενειακού ιστορικού των ασθενών με ΧΛΛ ως προς τις χρωμοσωμικές αλλοιώσεις που έφεραν προέκυψε ότι οι ασθενείς που είχαν α' βαθμού συγγενείς οι οποίοι έπασχαν από ΧΛΛ ή κάποιο άλλο είδος κακοήθειας εμφάνισαν συχνότερα την έλλειψη del(11q) ($P=0.019$). Ιδιαίτερα όσοι έφεραν τις ελλείψεις del(11q) ($P=0.000$) και del(13q) ($P=0.034$) αλλά και την +12 ($P=0.014$) είχαν σε μεγαλύτερο ποσοστό πατέρα που έπασχε από ΧΛΛ ή από κάποια άλλη κακοήθεια. Στον πίνακα 32 που ακολουθεί παρουσιάζονται αναλυτικά όλες οι θετικές ή αρνητικές συσχετίσεις που πραγματοποιήθηκαν.

Πίνακας 32: Σύσχεση των ειδικών αλλοιώσεων της νόσου με το οικογενειακό ιστορικό των ασθενών

ΧΡΩΜΟΣΩΜΙΚΕΣ ΑΛΛΟΙΩΣΕΙΣ	ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑΚΟ ΙΣΤΟΡΙΚΟ ΚΑΚΟΗΘΕΙΑΣ											
	Μητέρα			Πατέρας			Αδέλφια			Συγγενείς α' βαθμού		
	ΧΛΛ (%)	Συμπαγής όγκος (%)	P- value	ΧΛΛ (%)	Συμπαγής όγκος (%)	P- value	ΧΛΛ (%)	Συμπαγής όγκος (%)	P- value	ΧΛΛ (%)	Συμπαγής όγκος (%)	P- value
+12	1	0	-	3 (75,0)	1 (9,1)	0,014	1	2	-	4 (23,5)	3 (12,0)	0,548
del(13q)	1	0	-	1 (25,0)	3 (27,3)	0,034	0	2	-	2 (11,8)	4 (16,0)	0,281
del(17p)	1	1	-	0	1	-	0	1	-	1 (5,9)	2 (8,0)	0,948
del(11q)	0	1	-	1 (25,0)	3 (27,3)	0,000	0	2	-	1 (5,9)	4 (16,0)	0,019
del(6q)	0	1	-	0	0	-	0		-	0	1 (4,0)	0,532
-Y	1	0	-	1	0	-	0	1	-	2 (11,8)	0	0,186
add(14q)	0	0	-	0	0	-	0	1	-	0	1 (4,0)	0,692

5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

5.1 ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΑΣΘΕΝΩΝ

5.1.1 ΗΛΙΚΙΑ

Η ΧΛΛ εμφανίζεται κυρίως σε άτομα ηλικίας άνω των 65 ετών, ενώ περίπου το 70% των ασθενών έχουν μέση ηλικία στη διάγνωση τα 72 έτη [93]. Ο υψηλός αυτός μέσος όρος ηλικίας είναι πιθανό να οφείλεται εν μέρει στην καθυστερημένη διάγνωση της νόσου, αφού η έναρξή της είναι σε πολλές περιπτώσεις ασυμπτωματική. Κατά συνέπεια, ο ασθενής είναι ανυποψίαστος, μέχρι να εμφανιστούν μετά από ένα μεγάλο χρονικό διάστημα τα πρώτα συμπτώματα της νόσου ή η διάγνωσή της να γίνει τυχαία μετά από γενική εξέταση αίματος ρουτίνας όπου αναδεικνύεται η λεμφοκυττάρωση ($>5 \times 10^9/L$ λεμφοκύτταρα). Αλλά ακόμα και όταν αυτό πραγματοποιηθεί, το έργο του κλινικού ιατρού όσον αφορά στη διαφορική διάγνωση είναι εξαιρετικά δύσκολο. Επίσης αιτία για την εμφάνιση της νόσου σε μεγάλη ηλικία μπορεί να είναι η πιθανή χρόνια αντιγονική διέγερση που δέχεται ένα άτομο κατά τη διάρκεια της ζωής του. Μελέτες της τελευταίας εικοσαετίας έδειξαν ότι ανεξαρτήτως της ετερογένειας της νόσου σε ανοσοφαινοτυπικό, κυτταρογενετικό και μοριακό επίπεδο όλες οι περιπτώσεις της ΧΛΛ προέρχονται από λεμφοκύτταρα με εμπειρία αντιγόνου το οποία όμως παραμένουν έως και σήμερα άγνωστα [7,94].

Στην παρούσα μελέτη ο μέσος όρος ηλικίας των ασθενών ήταν τα 64,9 έτη ενώ το 53% του συνόλου των ασθενών ήταν κάτω των 65 ετών. Επίσης δείχτηκε (διάγραμμα 4) ότι η κατανομή των ασθενών σε ηλικιακές κλάσεις εύρους 5 ετών ήταν ανομοιογενής και διαφορετική από εκείνη που παρουσιάζεται στη βάση δεδομένων SEER (Cancer Statistics Review) (διάγραμμα 1) όπου η συχνότητα των ασθενών φαίνεται ότι αυξάνεται αναλογικά αυξανόμενης της ηλικίας, το οποίο αποτελεί και τη γενικότερη άποψη που επικρατεί στην παγκόσμια βιβλιογραφία. Ωστόσο, δεν πρέπει να παραβλέπεται το γεγονός ότι τα τελευταία χρόνια η διάμεση ηλικία των νοσούντων τείνει να μειωθεί ενώ ταυτόχρονα διαγιγνώσκονται όλο και πιο συχνά νεότεροι ασθενείς (<65 ετών) [2,13,14].

Στην παρούσα μελέτη η ηλικιακή κλάση με τη μεγαλύτερη πληθώρα ασθενών ήταν αυτή των 61-65 ετών η οποία περιλάμβανε 53 ασθενείς (22.7%) και αμέσως

μετά ακολούθησαν οι ηλικιακές κλάσεις των 71-75 και 76-80 ετών. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον όμως εντοπίζεται στην τέταρτη σε συχνότητα (12.0%) ηλικιακή κλάση των 51-55 ετών όπου συγκεντρώθηκαν 28 ασθενείς αφού εδώ διαφαίνεται η πρόσφατη τάση της νόσου να εμφανίζεται σε μικρότερες ηλικίες. Επίσης το ποσοστό των ατόμων με ηλικία μικρότερη των 45 ετών ήταν 6.44%, αυτών με ηλικία 46-55 ήταν 15.02%, 56-65 31.76%, 66-75 26.18%, 76-85 18,88% και ηλικίας >85 ετών 1,7%. Τα αντίστοιχα ποσοστά που εμφανίζονται στη βιβλιογραφία διαφοροποιούνται από τα παραπάνω κυρίως στις μικρές και μεγάλες ηλικίες ασθενών, αφού το ποσοστό των νοσούντων ηλικίας κάτω των 45 ετών υπολογίζεται μόλις στο 2%, ενώ το αντίστοιχο των ασθενών άνω των 85 ετών είναι 13,2% [71]. Η διαφορά που εντοπίζεται στο δείγμα μελέτης της παρούσας διατριβής, υποδεικνύει μία τάση αύξησης της συχνότητας εμφάνισης της νόσου πλέον και στις μικρότερες ηλικίες, στον Ελλαδικό χώρο η οποία είναι ιδιαίτερα ανησυχητική.

Επιπροσθέτως από τη συσχέτιση της ηλικίας των ασθενών με το πλήθος αλλά και την προγνωστική αξία των χρωμοσωμικών αλλοιώσεων που έφεραν δεν παρατηρήθηκαν διαφορές όσον αφορά στη διάμεση ηλικία μεταξύ των ασθενών που έφεραν μεμονωμένες αλλοιώσεις (66.6%) και αυτών που εμφάνισαν σύνθετους καρυοτύπους (68.1%). Από την άλλη, τα αποτελέσματα που αφορούν στην πρόγνωση των ασθενών βάση των χρωμοσωμικών τους αλλοιώσεων ήταν ιδιαίτερα ανησυχητικά. Οι ασθενείς μικρότερης ηλικίας (<65 ετών) έφεραν πιο συχνά κυτταρογενετικές αλλοιώσεις σε σχέση με τους ασθενείς μεγαλύτερης ηλικίας. Ταυτόχρονα αποκαλύφθηκε μια κλιμακωτή αύξηση του ποσοστού των ασθενών με κακής πρόγνωσης κυτταρογενετικές αλλοιώσεις όσο μειωνόταν η ηλικία τους. Τα παραπάνω ευρήματα μολονότι δεν είναι στατιστικώς σημαντικά, υποδεικνύουν την τάση της νόσου να αυξάνεται στις μικρότερες ηλικίες αλλά και να εμφανίζεται σε αυτές με χειρότερη πρόγνωση και άρα με επιθετικότερη μορφή.

5.1.2 ΦΥΛΟ

Το φύλο είναι ένας από τους παράγοντες που παίζουν καθοριστικό ρόλο στη ΧΛΛ αφού γενικά εμφανίζεται με διπλάσια περίπου συχνότητα στους άνδρες [3,93]. Στην παρούσα μελέτη η αναλογία ανδρών/γυναικών βρέθηκε ίση με 1.63, ποσοστό το οποίο συμφωνεί με τη βιβλιογραφία, αφού στις περισσότερες μελέτες η αναλογία αυτή βρίσκεται ~1.5 [2,93].

Πρόσφατα δεδομένα συσχετίζουν το φύλο με συγκεκριμένες χρωμοσωμικές αλλοιώσεις. Μελέτη από τις ΗΠΑ συσχέτισε την έλλειψη del(11)(q22.3q23.1) με το άρρεν φύλο έπειτα από τον έλεγχο 4698 ασθενών με ΧΛΛ χρησιμοποιώντας την τεχνική FISH [93]. Στη μελέτη αυτή το ποσοστό των ανδρών που έφεραν την έλλειψη del(11)(q22.3q23.1) αποδείχτηκε μετά από στατιστική επεξεργασία ότι ήταν 2,5 φορές μεγαλύτερο από αυτό των γυναικών και δεν συμφωνούσε με τη συνηθισμένη αναλογία ανδρών/γυναικών επί του συνόλου των ασθενών (~1.5) [93].

Στην παρούσα διατριβή ελέγχθηκε παρομοίως η σχέση του φύλου των ασθενών με τις ειδικές χρωμοσωμικές αλλοιώσεις της νόσου που ανιχνεύτηκαν με την τεχνική FISH. Η στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων δεν υπέδειξε συσχέτιση του φύλου των ασθενών με το συνολικό αριθμό των χρωμοσωμικών αλλοιώσεων ή κάποιας χρωμοσωμικής αλλοίωσης ξεχωριστά (πίνακας 24). Η ασυμφωνία μεταξύ των δεδομένων της παρούσας διατριβής και της δημοσιευμένης εργασίας πιθανότατα να οφείλεται στο μικρότερο δείγμα ασθενών που ήταν εφικτό να μελετηθεί με την FISH στην παρούσα διατριβή.

5.2 ΚΥΤΤΑΡΟΓΕΝΕΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

5.2.1 ΚΑΡΥΟΤΥΠΟΣ

5.2.1.1 ΚΑΤΑΛΛΗΛΟΤΕΡΟΣ ΔΙΕΓΕΡΤΗΣ ΓΙΑ ΤΑ ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΑ Β-ΚΥΤΤΑΡΑ ΤΗΣ ΧΛΛ

Στην παρούσα διατριβή χρησιμοποιήθηκαν δύο ειδών μιτογόνα για την *in vitro* επαγωγή του κυτταρικού κύκλου των παθολογικών κυττάρων της ΧΛΛ, το καθιερωμένο ΤΡΑ, με ποσοστά ανίχνευσης του παθολογικού κλώνου 30-50% και ο πολλά υποσχόμενος συνδυασμός διεγερτών DSP30/IL-2 [59,61]. Την τελευταία πενταετία δείχτηκε ότι τα νεοπλασματικά κύτταρα των περισσότερων κακοηθειών β-κυτταρικής προέλευσης, με εξαίρεση το πλασμοκύττωμα, απαντούν στη διέγερση με CpG ολιγονουκλεοτίδια με αύξηση της έκφρασης συνδιεγερτικών, αντιγονοπαρουσιαστικών μορίων και του CD20 και αύξηση της πολλαπλασιαστικής ικανότητας των κακοήθων κυττάρων [59,95].

Τα αποτελέσματα της παρούσας διατριβής ήταν ιδιαίτερα ενθαρρυντικά ως προς την απαντητική ικανότητα των κυττάρων της ΧΛΛ στο νέο συνδυασμό διεγερτών DSP30/IL-2 αφού η χρήση του βελτίωσε κατά πολύ τη δυνατότητα επίτευξης μεταφάσεων και κατάδειξης του παθολογικού κλώνου. Ειδικότερα, το DSP30/IL-2 ανέδειξε χρωμοσωμικές αλλοιώσεις στο ~62% των συνολικών περιστατικών με ΧΛΛ ενώ το έως και σήμερα χρησιμοποιούμενο μιτογόνο ΤΡΑ ανέδειξε παθολογικούς κλώνους μόλις στο ~13%, ποσοστό που πλησιάζει αυτό που αναδείχτηκε από την καρυοτυπική ανάλυση των αδιεγερτων καλλιέργειών (~12%). Επιπροσθέτως από την αξιολόγηση των περιστατικών στα οποία είχαν πραγματοποιηθεί παράλληλα καλλιέργειες με ΤΡΑ και DSP30/IL-2, καταλληλότερος διεγέρτης για τα κύτταρα της ΧΛΛ αναδείχτηκε ο δεύτερος συνδυασμός διεγερτών. Το DSP-30/IL-2 ανέδειξε κλωνικές αλλοιώσεις στα 97 (94,17%) από τα 103 παθολογικά περιστατικά, ενώ το ΤΡΑ στα 21/103 (12,57%). Επίσης παρατηρήθηκε ότι το 70% (71/103) των παθολογικών καρυοτύπων ανιχνεύθηκε μόνο σε

καλλιέργειες που είχαν διεγερθεί με DSP-30/IL-2. Επομένως αποδείχθηκε ότι ο νέος συνδυασμός διεγερτών DSP-30/IL-2 έχει μεγαλύτερη πιθανότητα να ανιχνεύσει κλωνικές αλλοιώσεις ειδικές για τη νόσο σε σχέση με την προσθήκη TPA ή καθόλου διεγέρτη ($P=0.0001$). Πιο συγκεκριμένα, το DSP-30/IL-2 εμφανίζει ~121,5 φορές μεγαλύτερη ικανότητα να ανιχνεύσει τον παθολογικό κλώνο σε σχέση με το έως και σήμερα χρησιμοποιούμενο TPA (OR=121,51, 95% CI= 16,62-888,51, $P=>0,0001$). Επομένως φάνηκε να αντιμετωπίστηκαν προβλήματα όπως ο χαμηλός μιτωτικός δείκτης των παθολογικών κυττάρων αλλά και το γεγονός ότι έως και σήμερα στη ΧΛΛ μόνο ένα μικρό μέρος του νεοπλασματικού κλώνου εμφανίζει καρυοτυπικές ανωμαλίες [96].

Επιπροσθέτως, το ποσοστό ανίχνευσης αλλοιώσεων που εντοπίστηκαν από την καρυοτυπική ανάλυση των καλλιιεργειών διεγερμένων με το συνδυασμό DSP-30/IL-2 (~62%) πλησιάζει το ποσοστό των χρωμοσωμικών αλλοιώσεων που ανιχνεύτηκαν με τη FISH (~69%). Το γεγονός αυτό συμφωνεί με τα πρόσφατα βιβλιογραφικά δεδομένα τα οποία υποστηρίζουν ότι τα ποσοστά ανίχνευσης χρωμοσωμικών αλλοιώσεων με τη χρήση DSP-30/IL-2 αγγίζουν ή ξεπερνούν τα αντίστοιχα της FISH ανάλυσης, ποσοστά πολύ υψηλά όσον αφορά στην καρυοτυπική ανάλυση της ΧΛΛ αφού ακόμα και σήμερα είναι δύσκολη η ανεύρεση προγνωστικών κυτταρογενετικών δεικτών μέσω της τεχνικής αυτής. [50,59,63].

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι τα παραπάνω αποτελέσματα λειτούργησαν ως καταπέλτης για την ένταξη του συνδυασμού διεγερτών DSP-30/IL-2 στη ρουτίνα του εργαστήριου όπου πραγματοποιήθηκε η συγκεκριμένη διατριβή, αφού κρίθηκε καταλληλότερος για την *in vitro* επαγωγή του κυτταρικού κύκλου των κυττάρων της ΧΛΛ.

5.2.1.2 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΡΥΟΤΥΠΙΚΗΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ

Η ταυτοποίηση συγκεκριμένων αριθμητικών και δομικών χρωμοσωμικών ανωμαλιών, όπως έχει προαναφερθεί, είναι σημαντική για την κατανόηση, τη διάγνωση και την πρόγνωση της ΧΛΛ, αλλά και την επιλογή του κατάλληλου θεραπευτικού σχήματος που πρέπει να ακολουθηθεί.

Στην παρούσα διατριβή εντοπίστηκαν χρωμοσωμικές ανωμαλίες στο 62.4% του συνόλου των περιστατικών με ΧΛΛ που αναλύθηκαν καρυοτυπικά με την τεχνική της G ζωνοποίησης. Το ποσοστό αυτό ξεπερνά το σύνηθες 30-50%, το οποίο ανευρίσκεται χάρη στη χρήση των έως και σήμερα χρησιμοποιούμενων μιτογόνων των β-κυττάρων, αφού στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε επιπλέον και ο νέος συνδυασμός διεγερτών DSP-30/IL-2 [61]. Από την άλλη πλευρά το ποσοστό αυτό είναι μικρότερο από εκείνο που εμφανίζεται σε πρόσφατες μελέτες στις οποίες έχει χρησιμοποιηθεί ο παραπάνω συνδυασμός διεγερτών [59,61]. Μία λογική εξήγηση για τη διαφορά αυτή προσφέρει το γεγονός ότι δεν ήταν δυνατόν σε όλα τα δείγματα των ασθενών να πραγματοποιηθούν παράλληλα και καλλιέργειες με την προσθήκη DSP-30/IL-2 εξαιτίας της μικρής ποσότητας του δείγματος (προτεραιότητα δόθηκε στις αδιέγερτες καλλιέργειες). Επίσης η διαφορά αυτή μπορεί να οφείλεται στο μικρότερο αριθμό ασθενών που αναλύθηκαν με την προσθήκη DSP-30/IL2 συγκριτικά με τις παραπάνω μελέτες. Πιο συγκεκριμένα, οι Haferlach και συνεργάτες που ανέδειξαν ποσοστό ανίχνευσης χρωμοσωμικών αλλοιώσεων με τη χρήση DSP-30/IL2 στο 83% περιπτώσεων είχαν ως δείγμα μελέτης περίπου 2,5 φορές μεγαλύτερο σε σχέση με αυτό της παρούσας διατριβής [59].

Επιπροσθέτως στην παρούσα εργασία, περίπου οι μισοί ασθενείς με παθολογικό καρυότυπο (47,79%) έφεραν μεμονωμένες χρωμοσωμικές αλλοιώσεις, ενώ εξίσου υψηλό ήταν και το ποσοστό των σύνθετων καρυότυπων (≥ 3 χρωμοσωμικές αλλοιώσεις) (31,62%). Ο σύνθετος καρυότυπος, που δεν δύναται να καταδειχτεί με τη μέθοδο FISH, φαίνεται να σχετίζεται με καθιερωμένους δυσμενείς βιολογικούς προγνωστικούς παράγοντες στη ΧΛΛ και επηρεάζει το ίδιο δυσμενώς την επιβίωση και στα δύο άκρα της προγνωστικής διαστρωμάτωσης, δηλαδή σε ασθενείς με διαταραχή του 17p (κακή πρόγνωση) και σε ασθενείς με το μεταλλαγμένο τύπο της νόσου (καλή πρόγνωση) [71,96]. Επομένως ο σύνθετος καρυότυπος αποκτά τη βαρύτητα του ανεξάρτητου προγνωστικού δείκτη έχοντας

δυσμενή επίπτωση στην πρόγνωση των ασθενών και κατά τον τρόπο αυτό χρησιμοποιήθηκε και στην παρούσα διατριβή [42].

Συχνότερες χρωμοσωμικές αλλοιώσεις
στο σύνολο των επιτυχώς αναλυθέντων καρυοτύπων

Η τρισωμία 12 (+12) αναδείχτηκε ως η συχνότερη χρωμοσωμική αλλοίωση αφού ανιχνεύτηκε στο 21,10% του συνόλου των ασθενών που καρυοτυπήθηκαν επιτυχώς. Το εύρημα αυτό είναι σύμφωνο με τη βιβλιογραφία αφού η +12 αποτελεί τη συχνότερη αναφερθείσα καρυοτυπική αλλοίωση της ΧΛΛ εξαιτίας της εύκολης ανίχνευσής της ακόμα και σε κακής ποιότητας μεταφάσεις, σε ποσοστό 10-20% [64]. Παλαιότερα η +12 σχετιζόταν με σχετικά καλή πρόγνωση, ενώ τα τελευταία δεδομένα την σχετίζουν με ενδιάμεση πρόγνωση [65]. Στο συγκεκριμένο δείγμα μελέτης η +12 αναδείχτηκε η συχνότερη αλλοίωση στο σύνολο των παθολογικών καρυοτύπων, ως μεμονωμένη αλλοίωση αλλά και στο σύνολο των σύνθετων καρυοτύπων. Στην περίπτωση που η τρισωμία 12 συνοδεύεται από άλλη αλλοίωση, η πρόγνωση των ασθενών διαφοροποιείται και συνήθως χειροτερεύει. Στο συγκεκριμένο δείγμα ασθενών η +12 συνοδεύεται από επιπρόσθετες βλάβες του χρωμοσωμικού υλικού που αφορούσαν τις εξής αλλοιώσεις: - 17, +19, + 8, +18, t(14;18)(q32;q21), del(11q), del(13q), add(14q), -Y. Οι περισσότερες από αυτές τις αλλοιώσεις εμφανίζονται σπάνια αλλά επαναλαμβανόμενα στη βιβλιογραφία, σε συνδυασμό με τη +12 και επομένως έχουν συχνηστεί μαζί της ενισχύοντας και τα αποτελέσματα της παρούσας διατριβής [42,44].

Η έλλειψη του μεγάλου βραχίονα του χρωμοσώματος 13 [del(13q)] αναδείχτηκε ως δεύτερη συχνότερη χρωμοσωμική αλλοίωση στο 10,55% του συνόλου των περιστατικών με ΧΛΛ. Η συχνότητα της συγκεκριμένης αλλοίωσης με βάση τη βιβλιογραφία στον καρυότυπο είναι 10-20% και θεωρείται υποεκτιμημένο αφού ως υπομικροσκοπική συνήθως αλλοίωση ο καρυότυπος δεν αποτελεί την καλύτερη μέθοδο για την ανίχνευσή της [42,44,50]. Στο συγκεκριμένο δείγμα η del(13q) συνοδεύεται και από άλλες αλλοιώσεις στην πλειοψηφία των περιστατικών (17/23). Στις περιπτώσεις αυτές η πολύ καλή πρόγνωση με την οποία έχει συχνηστεί (καλύτερη ακόμα και αυτή του φυσιολογικού καρυότυπου) χάνεται και σχεδόν καθορίζεται από τη δευτερογενή αλλοίωση. Στο συγκεκριμένο δείγμα ασθενών η del(13q) βρέθηκε σε συνδυασμό κυρίως με τις αλλοιώσεις +12, del(11q), t(11;14),

t(2;18), del(8p), add(14q), del(6q), add(17p), -Y. Στις περιπτώσεις αυτές η επιβίωση μπορεί να είναι αρκετά μικρότερη. Ο συνδυασμός των παραπάνω αλλοιώσεων με την del(13q) έχει αναφερθεί και σε άλλα περιστατικά της βιβλιογραφίας με εξαίρεση την del(8p) [97].

Η έλλειψη του φυλετικού χρωμοσώματος Y (-Y) (8.29%) δεν είναι γνωστό αν σχετίζεται με τη νόσο ή αποτελεί συνέπεια της προχωρημένης ηλικίας. Το γεγονός ότι η ΧΛΛ είναι νόσος της προχωρημένης ηλικίας και μάλιστα η διάμεση ηλικία των ασθενών που έφεραν την συγκεκριμένη αλλοίωση ήταν μεγαλύτερη (72.2 έτη) σε σχέση με τη διάμεση ηλικία του συνόλου των ασθενών (64.9 έτη) συνηγορεί υπέρ της προχωρημένης ηλικίας. Το ίδιο υποδεικνύει η ανίχνευση του -Y ως μοναδική αλλοίωση στις αδιέγερτες καλλιέργειες των αρρένων ασθενών ενώ στις διεγερμένες με DSP30/IL-2 καλλιέργειες των ίδιων ασθενών όπου είχαν διεγερθεί επιλεκτικά τα κύτταρα της ΧΛΛ ανιχνευόταν κυτταρικός κλώνος με ειδικές για τη νόσο χρωμοσωμικές αλλοιώσεις χωρίς να απουσιάζει το Y χρωμόσωμα.

Οι μεταθέσεις του χρωμοσώματος 14 ανιχνεύτηκαν στο 6.42% του συνόλου των περιστατικών, ποσοστό που συμφωνεί με τα βιβλιογραφικά δεδομένα (6-14%) [65]. Γενικά η συμμετοχή της περιοχής 14q32 πλην όμως συγκεκριμένων μεταθέσεων θεωρείται καλής πρόγνωσης για τη ΧΛΛ (διάμεση επιβίωση > 15 ετών) [65]. Ειδικότερα, στο συγκεκριμένο δείγμα ασθενών ανιχνεύτηκαν οι μεταθέσεις t(11;14)(q13;32), t(14;18)(q32;q21) και t(14;19)(q32;q13) στο 1.83% των συνολικών περιπτώσεων η κάθε μία. Η τελευταία εξ αυτών συναντάται σπάνια στη ΧΛΛ και έχει συνδεθεί με μικρή επιβίωση των ασθενών [65]. Από την άλλη, η t(11;14)(q13;32) εμφανίζεται συχνότερα και γενικά έχει συνδεθεί με αργή εξέλιξη της νόσου [65].

Η **del(11q)** ανευρέθηκε στο ~6% των περιπτώσεων, ενώ η συχνότητα εμφάνισής της στους ασθενείς σύμφωνα με τη βιβλιογραφία είναι ~15% [64]. Η διαφορά αυτή πιθανότατα να οφείλεται στο γεγονός ότι στις περισσότερες περιπτώσεις η del(11q) είναι υπομικροσκοπική και δεν δύναται να ανιχνευτεί στον καρυότυπο. Η πρόγνωση της συγκεκριμένης αλλοίωσης είναι ως γνωστόν άσχημη και συνήθως συναντάται στις μικρότερες ηλικίες. Πράγματι στο συγκεκριμένο δείγμα ασθενών με del(11q) το ~50% των ασθενών είχε εύρος ηλικίας 43-61 έτη ενώ η διάμεση ηλικία ήταν τα 51.6 έτη.

Η **del(6q)** ανιχνεύτηκε στο ~6% του συνόλου των περιστατικών, ποσοστό απολύτως σύμφωνο με αυτό της βιβλιογραφίας (~6%) [64]. Τα τελευταία δεδομένα δείχνουν ότι συνδέεται με κακή πρόγνωση [65]. Η συγκεκριμένη αλλοίωση

ανιχνεύτηκε στο 45.5% των περιπτώσεων ως μεμονωμένη αλλοίωση και μάλιστα η διάμεση ηλικία αυτών των ασθενών βρέθηκε ίση με 54,2 έτη, αρκετά μικρότερη από αυτή του συνόλου των ασθενών (64.9). Ωστόσο, οι ασθενείς που εμφάνισαν την del(6q) σε συνδυασμό με άλλη μία ή περισσότερες χρωμοσωμικές αλλοιώσεις, είχαν διάμεση ηλικία τα 70.7 έτη. Ίσως αυτό να εξηγείται από το γεγονός ότι με το πέρας της ηλικίας δημιουργούνται στους ασθενείς δευτερογενείς αλλοιώσεις οι οποίες φαίνεται να δυσχεραίνουν ακόμα περισσότερο την επιβίωση τους.

H del(17)(p11.2) που είναι συνυφασμένη με την κακή πρόγνωση της ΧΛΛ ανιχνεύτηκε μόνο σε 2 ασθενείς (0,92%) στον καρύοτυπο, διότι στην πλειοψηφία των περιπτώσεων είναι υπομικροσκοπική και η ανίχνευσή της επιτυγχάνεται καλύτερα με τη μέθοδο FISH. Κατά γενική ομολογία, σε κάθε ασθενή και πριν την έναρξη θεραπείας θα πρέπει να πραγματοποιείται εστιασμένη στο 17p μοριακή κυτταρογενετική ανάλυση για ταυτοποίηση τυχόν έλλειψης στην συγκεκριμένη περιοχή στην οποία συμπεριλαμβάνεται το ογκοκατασταλτικό γονίδιο p53 αφού οι φορείς της έλλειψης αυτής δεν ανταποκρίνονται στη θεραπεία και υποτροπιάζουν έντονα [98]. Καρυοτυπικό αποτέλεσμα της συγκεκριμένης διατριβή αποτελεί και η μονοσωμία του χρωμοσώματος 17 (-17) στο ~5% των συνολικών περιπτώσεων στην οποία απουσιάζει ολόκληρο το χρωμόσωμα 17 στο οποίο εδράζονται εκτός από το ογκοκατασταλτικό γονίδιο p53 και άλλα γονίδια με σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου και της απόπτωσης. Η μονοσωμία 17 βρισκόταν πάντα σε συνδυασμό με μία ή περισσότερες χρωμοσωμικές αλλοιώσεις, γεγονός που δυσχεραίνει ακόμα περισσότερο την ούτως ή άλλως κακή της πρόγνωση. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι η αναλογία ανδρών/γυναικών των ασθενών αυτών ήταν 1/1, διαφορετική από τη συνηθισμένη αναλογία ~1,5 που συναντάται γενικά στη ΧΛΛ και η οποία βρέθηκε και στο δείγμα της παρούσας διατριβής. Διαφαίνεται λοιπόν μια τάση της -17 να εμφανίζεται με την ίδια συχνότητα στα δύο φύλα, χωρίς όμως αυτό να μπορεί να επιβεβαιωθεί στατιστικώς εξαιτίας του μικρού αριθμού ασθενών που φέρουν την αλλοίωση αυτή στο συγκεκριμένο δείγμα ασθενών που εξετάστηκε.

Σπάνιες αλλά επαναλαμβανόμενες χρωμοσωμικές αλλοιώσεις

Στις σπάνιες αλλά επαναλαμβανόμενες χρωμοσωμικές αλλοιώσεις συγκαταλέγονται οι der(1), del(2p), t(2;18), der(4)t(4;17), del(5q), -6, +6, +7, +8, add(8p), del(9p), add(10p), del(14q), add(11p), add(16q), -16, add(17q), και -21 οι οποίες ανιχνεύτηκαν στο σύνολο των επιτυχώς αναλυθέντων καρυοτύπων σε συχνότητα 0.92% (2/218) η κάθε μία. Επίσης, πραγματοποιήθηκε ανασκόπηση της παγκόσμιας βιβλιογραφίας μέσω της βάσης δεδομένων Milteman ώστε να γίνει συσχέτιση των παραπάνω ευρημάτων με τα βιβλιογραφικά δεδομένα [97].

Γενικότερα, στη βιβλιογραφία έχουν αναφερθεί 3 περιστατικά με **del(2)(p12)** σε συνδυασμό με άλλες χρωμοσωμικές αλλοιώσεις μεταξύ των οποίων ήταν και η +12. Κατά τον ίδιο τρόπο εμφανίστηκε και στο δείγμα της παρούσας διατριβής η συγκεκριμένη αλλοίωση. Η πρόγνωση ασθενών με del(2)(p12) παραμένει άγνωστη έως και σήμερα.

Η **t(2;18)(p12;q21)** γενικότερα αναφέρεται ως δευτερογενής αλλοίωση σε περιστατικά της ΧΛΛ που φέρουν +12 και επίσης συναντάται σε περιπτώσεις ήπιας λεμφοκυττάρωσης [42]. Υπάρχουν 8 αναφορές περιστατικών στη βιβλιογραφία με τη μετατόπιση αυτή χωρίς όμως να έχει γίνει λόγος για την πρόγνωσή της. Στην παρούσα μελέτη η t(2;18)(p12;q21) ανιχνεύτηκε στην πρώτη περίπτωση σε σύνθετο καρυότυπο παρουσία της +12, και στη δεύτερη σε συνδυασμό με την del(13q). Ο τελευταίος συνδυασμός αλλοιώσεων [t(2;18)(p12;q21), del(13q)] έχει ανιχνευτεί και σε άλλη μελέτη [99].

Η **der(4)t(4;17)** ανιχνεύτηκε στην παρούσα μελέτη σε 2 ασθενείς με διαφορετικά σημεία τομής αλλά και στις 2 περιπτώσεις συνοδευόταν από την -17. Στη βιβλιογραφία έχει αναφερθεί μόνο σε 2 περιστατικά με ΧΛΛ σε σύνθετους καρυοτύπους και με διαφορετικά σημεία τομής, χωρίς όμως να γίνεται αναφορά για το αν και πως επηρεάζει την πρόγνωση ή εξέλιξη της νόσου [75].

Η **τρισωμία 8** έχει αναφερθεί στη βιβλιογραφία σε 37 περιστατικά με ΧΛΛ. Παρόλα αυτά, η προγνωστική της αξία παραμένει ακόμα άγνωστη. Η μελέτη των Pozdnyakova και συνεργατών που αφορά σε 2 περιστατικά με ΧΛΛ και +8 ως μοναδική αλλοίωση, έδειξαν ότι ο παθολογικός κλώνος αφορούσε κύτταρα της μυελικής σειράς και ότι πιθανότατα σηματοδοτούσε την αρχή ενός μυελοδυσπλαστικού συνδρόμου [50].

Η **del(9)(p22)** στο συγκεκριμένο δείγμα ασθενών ανιχνεύτηκε συνοδευόμενη από +12 και από τη μετάθεση **t(14;19)(q32;q13)**. Η **t(14;19)(q32;q13)** έχει παρατηρηθεί επαναλαμβανόμενα στη ΧΛΛ, ως δευτερογενής αλλοίωση της +12, όπως βρέθηκε και στον συγκεκριμένο ασθενή [42,65]. Στη βιβλιογραφία η **del(9)(p22)** έχει ανιχνευτεί μόνο σε 1 περιστατικό σε συνδυασμό όμως με την **t(18;22)(q21;q11)**, μετάθεση η οποία γενικά θεωρείται ότι συμβαίνει δευτερογενώς της +12 [61].

Η μονοσωμία 21 (**-21**) στο συγκεκριμένο δείγμα ασθενών βρέθηκε σε 2 ασθενείς με σύνθετους καρυοτύπους. Γενικά στη βιβλιογραφία υπάρχουν 45 αναφορές σε περιστατικά με ΧΛΛ που φέρουν τη συγκεκριμένη έλλειψη σε συνδυασμό κυρίως με άλλες χρωμοσωμικές αλλοιώσεις. Μόνο σε 5 από τις παραπάνω περιπτώσεις ανιχνεύτηκε ως μοναδική αλλοίωση και στην περίπτωση αυτή, οι Cuneo και συνεργάτες έδειξαν ότι η -21 πιθανότατα αντιπροσωπεύει πρωτογενής αλλοίωση του γενετικού υλικού [100].

Γενικότερα όσον αφορά στα βιβλιογραφικά δεδομένα, οι -6, +6, +7, -16 και **add(8p)** έχουν ανιχνευτεί σε 34, 17, 25, 20 και 27 περιστατικά με ΧΛΛ αντιστοίχως. Οι παραπάνω αλλοιώσεις ανιχνεύτηκαν κυρίως ή μόνο σε σύνθετους καρυοτύπους, όπως άλλωστε συνέβη και στη συγκεκριμένη διατριβή. Επειδή οι αλλοιώσεις αυτές παρουσιάστηκαν ως καρυοτυπικά αποτελέσματα σε πίνακες μετά από έλεγχο μεγάλης σειράς ασθενών δεν έχει γίνει λόγος στη βιβλιογραφία για την προγνωστική τους αξία.

Επιπροσθέτως, αποτελέσματα της παρούσας διατριβής αποτελούν και 2 δημοσιευμένες εργασίες που αφορούν σε περιστατικά με ΧΛΛ τα οποία έφεραν τις σπάνιες αλλά σχετιζόμενες με τη ΧΛΛ αλλοιώσεις **t(6;13)(p21;q14)** και **del(5q)** [74,92]. Στην πρώτη εργασία παρουσιάστηκε για πρώτη φορά η μετατόπιση **t(6;13)(p21;q14)** η οποία εκδηλώθηκε ως δευτερογενής αλλοίωση της **del(13)(q14.3)**. Ο συγκεκριμένος ασθενής είχε σταδιοποιηθεί ως Rai III, 4 χρόνια μετά τη διάγνωση του και με βάση την άσχημη κλινική του κατάσταση θα περίμενε κανείς να αποβιώσει σε λιγότερο από 2 χρόνια. Ωστόσο, πέθανε από σηπτικό σοκ 7 χρόνια αργότερα και συνολικά 11 έτη μετά τη διάγνωση. Στη συγκεκριμένη εργασία δείχτηκε ότι η **t(6;13)(p21;q14)** είναι πιθανό να συνέβαλε στην εκτροπή του ασθενούς αυτού, 4 χρόνια μετά τη διάγνωσή του [92]. Επίσης η **t(6;13)(p21;q14)** εμφάνισε ανθεκτικότητα απέναντι στα καθιερωμένα πρωτοκόλλα θεραπείας της ΧΛΛ [92]. Επομένως, η **t(6;13)(p21;q14)** συνδέθηκε με το στάδιο Rai III, χωρίς όμως να

ευθύνεται για τη δυσμενή έκβαση του συγκεκριμένου ασθενούς, καθώς αυτός πέθανε από σηπτικό σοκ 4 χρόνια μετά την πρώτη ανάλυση καρυοτύπου όπου και ανιχνεύτηκε η συγκεκριμένη αλλοίωση μολονότι δεν αποκλείεται το ενδεχόμενο η αλλοίωση αυτή να προϋπήρχε [92]. Έκτοτε άλλη μία αναφορά έχει γίνει στη βιβλιογραφία με τη $t(6;13)(p21;q14)$ σε συνδυασμό όμως με +12 και αφορά σε ασθενή με σταδιοποίηση Binet A, με καλή κλινική κατάσταση του ασθενούς 3 έτη μετά τη διάγνωση και χωρίς ανάγκη θεραπευτικής αγωγής.

Στη δεύτερη δημοσίευση παρουσιάστηκε η σπάνια αλλά επαναλαμβανόμενη για τη νόσο ενδιάμεση έλλειψη στο 5q ως μοναδική αλλοίωση, η οποία ανιχνεύτηκε σε 2 ασθενείς με ΧΛΛ [74]. Και οι δύο αυτοί ασθενείς δεν είχαν προηγούμενο ιστορικό έκθεσης σε χημειοθεραπεία ή ακτινοθεραπεία ενώ είχαν σταδιοποιηθεί ως Binet A, 17 και 28 μήνες μετά τη διάγνωση, χωρίς να έχουν λάβει καμία θεραπεία χάρη στην καλή τους κλινική κατάσταση. Στην εργασία αυτή, προτάθηκε ότι η $del(5q)$ σχετίζεται μάλλον με την ήπια έκβαση της νόσου και επίσης ότι δεν συνδέεται με αλλοιώσεις που προκαλούνται από τη θεραπεία [74].

Συμμετοχή κάθε χρωμοσώματος στο σύνολο των χρωμοσωμάτων αλλοιώσεων

Στο συγκεκριμένο δείγμα ασθενών παρατηρήθηκαν συνολικά 404 αλλοιώσεις. Το πρώτο σε συχνότητα (14.6%) χρωμόσωμα που παρουσίασε τις περισσότερες από αυτές (59/404) ήταν το χρωμόσωμα 12. Το αποτέλεσμα αυτό συνάδει με τα βιβλιογραφικά δεδομένα αφού η +12 αποτελεί τη συχνότερη χρωμοσωμική αλλοίωση που συναντάται στη ΧΛΛ ως καρυοτυπικό εύρημα. Ακολούθησαν κατά σειρά τα χρωμοσώματα 13 (10.4%), 14 (7.43%), 11 (6.93%), 6 (6.68%) και 17 (5.2%) (πίνακας 14). Οι υψηλές συχνότητες αλλοιώσεων των χρωμοσωμάτων αυτών ήταν αναμενόμενες αφού οι ειδικές και συχνότερες αλλοιώσεις της ΧΛΛ όπως οι +12, $del(13q)$, $del(11q)$, $del(17p)$ και οι μεταθέσεις του χρωμοσώματος 14 εδράζονται στα συγκεκριμένα χρωμοσώματα.

Ωστόσο, η $del(17p)$ που έχει σχετιστεί με τη νόσο ανευρέθηκε με τον καρυότυπο μόνο σε 2 ασθενείς αφού αποτελεί υπομικροσκοπική αλλοίωση. Το γεγονός αυτό μαρτυρά την ύπαρξη άλλων χρωμοσωμικών αλλοιώσεων που εντοπίζονται στο χρωμόσωμα 17. Στο συγκεκριμένο δείγμα ασθενών ανιχνεύτηκε έλλειψη ολόκληρου του χρωμοσώματος 17 (10 ασθενείς), προσθήκης γενετικού υλικού αλλά και μεταθέσεις (4 ασθενείς σε κάθε περίπτωση), καθώς επίσης και η σπάνια περίπτωση του ισοχρωμοσώματος 17 (1 ασθενής) (πίνακας 15). Οι

περισσότερες από αυτές τις βλάβες, μολονότι έχουν αναφερθεί στη βιβλιογραφία, δεν έχουν χαρακτηριστεί ως ειδικές χρωμοσωμικές αλλοιώσεις της νόσου αλλά ούτε και είναι γνωστή η πρόγνωσή τους αφού κυρίως συναντώνται σε σύνθετους καρυοτύπους [65]. Ωστόσο εξαιτίας της γνωστής και ιδιαίτερα κακής πρόγνωσης που φέρει η del(17p) και λαμβάνοντας υπόψη το γεγονός ότι στη ζώνη 17p13 εδράζεται το γνωστό ογκοκατασταλτικό γονίδιο *TP53* με σημαντικό ρόλο στην απόπτωση, αγγειογένεση και στους επιδιορθωτικούς μηχανισμούς του DNA, οποιεσδήποτε χρωμοσωμικές ανωμαλίες στο μικρό βραχίονα του χρωμοσώματος 17 θα είχαν ως συνέπεια τη διατάραξη της γενωμικής ακεραιότητας και άρα θα μπορούσαν να συνδεθούν με κακή πρόγνωση.

Είδη χρωμοσωμικών αλλοιώσεων που ανιχνεύτηκαν

Όπως ειπώθηκε το σύνολο των χρωμοσωμικών ανωμαλιών που ανιχνεύθηκαν στους παθολογικούς καρυοτύπους ήταν 404. Από αυτές τη μεγαλύτερη συχνότητα είχαν οι ελλείψεις χρωμοσωμάτων (38.53%) καθώς επίσης και οι ελλείψεις χρωμοσωμικών περιοχών (33.03%). Συνεπώς, η έλλειψη γενετικού υλικού φαίνεται να κατέχει σημαντικό ρόλο στην παθογένεια της νόσου. Οι ελλείψεις αυτές θα μπορούσαν να συνδυαστούν με την απώλεια συγκεκριμένων γονιδίων αλλά και ρυθμιστικών περιοχών που επιδρούν αρνητικά ή θετικά στην έκφραση γονιδίων επηρεάζοντας όχι μόνο τον κυτταρικό κύκλο και την απόπτωση αλλά και τη μεταφορά μηνυμάτων μέσω του υποδοχέα των B-κυττάρων, φαινόμενα με τα οποία έχει συνδεθεί η παθογένεια της ΧΛΛ [56].

Ακολούθησαν οι τρισωμίες χρωμοσωμάτων (30.73%), οι οποίες μαζί με την παρουσία πρόσθετου χρωμοσωμικού υλικού αγνώστου προέλευσης (20.18%) πιθανότατα να επάγουν την υπερέκφραση ή απορρύθμιση γονιδίων που εμπλέκονται στην παθογένεση της νόσου.

Επίσης, η συχνότητα των μεταθέσεων που ανιχνεύτηκαν στο συγκεκριμένο δείγμα ασθενών βρέθηκε στο 21.10% των περιπτώσεων το οποίο βρίσκεται σε συμφωνία με άλλες μελέτες [42]. Κύρια συνέπεια των μεταθέσεων είναι η δημιουργία υβριδικών γονιδίων, των οποίων τα προϊόντα φαίνεται να διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη βιολογία άλλων τύπων λευχαιμίας όπως το υβριδικό γονίδιο Bcr-Abl στη Χρόνια Μυελογενή Λευχαιμία. Αξιοσημείωτο είναι ότι η ΧΛΛ δεν έχει συσχετιστεί με ειδικά υβριδικά γονίδια. Ακόμη, στο συγκεκριμένο δείγμα ασθενών οι ασθενείς που έφεραν μεταθέσεις έτειναν να φέρουν πιο σύνθετους καρυοτύπους, κάτι το οποίο

έχει παρατηρηθεί γενικότερα [42]. Συνήθως οι μεταθέσεις στη ΧΛΛ εμφανίζουν τα ίδια σημεία τομής με αυτά των ειδικών ελλείψεων της νόσου ενώ ταυτόχρονα φέρουν και μικροελλείψεις σε αυτά οι οποίες συνήθως δεν γίνονται αντιληπτές στον καρυότυπο [42]. Πρόσφατες, πάντως, μελέτες έχουν συνδέσει τις μεταθέσεις στη ΧΛΛ με μικρή επιβίωση και φτωχή ανταπόκριση στη θεραπεία [56].

Χρωμοσώματα δείκτες

Τα χρωμοσώματα δείκτες (markers) αποτελούν ανώμαλα χρωμοσώματα στα οποία δεν είναι εφικτή η ταυτοποίηση της προέλευσής τους. Στο συγκεκριμένο δείγμα ασθενών απαντήθηκαν συχνότερα στους σύνθετους καρυότυπους. Σε αρκετούς ασθενείς παρατηρήθηκαν διαφορετικοί markers στον ίδιο κλώνο.

Συμπερασματικά

Λόγω της μέχρι σήμερα χαμηλής μιτωτικής δραστηριότητας των Β-ΧΛΛ κυττάρων, λίγες είναι οι χρωμοσωμικές αλλοιώσεις που έχουν σχετιστεί ειδικά με τη ΧΛΛ καθώς και ελάχιστα είναι γνωστά για την πρόγνωση τους. Ωστόσο, τα αποτελέσματα της παρούσας κυτταρογενετικής μελέτης ανέδειξαν ποικίλες, ετερογενείς, αλλά και σπάνιες επαναλαμβανόμενες αλλοιώσεις που συνδέονται με τη νόσο, πέρα των ήδη γνωστών. Συνεπώς, τα δεδομένα της παρούσας διατριβής συμβάλλουν στη σκιαγράφηση του προφίλ των χρωμοσωμικών αλλοιώσεων της νόσου στον Ελλαδικό χώρο, αφού όχι μόνο βρέθηκαν νέες αλλοιώσεις που συνδέθηκαν με τη νόσο αλλά και επιβεβαιώθηκε ο τρόπος ανίχνευσης αυτών μέσω της προσθήκης του νέου συνδυασμού διεγερτών DSP30/IL-2 στις καλλιέργειες των δειγμάτων των ασθενών.

5.2.2 ΜΟΡΙΑΚΗ ΚΥΤΤΑΡΟΓΕΝΕΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

Εφαρμόζοντας την τεχνική της FISH στην παρούσα διατριβή κατέστη δυνατή η μελέτη των ειδικών υπομικροσκοπικών ελλείψεων της νόσου που δεν ήταν δυνατόν να ανιχνευτούν στον καρυότυπο. Με τη FISH δόθηκε η δυνατότητα της αξιολόγησης τουλάχιστον 200 μεσοφασικών πυρήνων ακόμη και στις περιπτώσεις εκείνες που στον καρυότυπο δεν ήταν δυνατόν να αξιολογηθεί ο απαιτούμενος αριθμός μεταφάσεων λόγω κακής μορφολογίας των χρωμοσωμάτων ή λόγω του χαμηλού μιτωτικού δείκτη των κυττάρων. Επίσης η FISH σε μεταφασικά χρωμοσώματα διευκόλυνε την αξιολόγηση του καρυότυπου ιδιαίτερα στις περιπτώσεις εκείνες που εξαιτίας της κακής ποιότητας των μεταφάσεων δεν ήταν ευκρινή τα σημεία τομής μιας έλλειψης ή μετατόπισης. Εξαιτίας της εντοπισμένης θέσης των ανιχνευτών πάνω στα χρωμοσώματα ήταν ευκολότερο να οριοθετηθεί μια συγκεκριμένη χρωμοσωμική περιοχή που έλλειπε ή να τεκμηριωθεί η μετατόπισή της σε άλλο χρωμόσωμα.

Από την άλλη, η FISH έδωσε τη δυνατότητα να μετρηθεί πολύ μεγαλύτερος αριθμός κυττάρων (200) σε σχέση με αυτόν που αναλύθηκε στον καρυότυπο (συνήθως <25) και να υπολογιστεί ακριβέστερα το ποσοστό του αλλοιωμένου κλώνου όταν αυτός υπήρχε στο δείγμα του ασθενούς. Γενικά επικρατεί η άποψη ότι όσο μεγαλύτερος είναι ο κλώνος των παθολογικών κυττάρων, τόσο μειώνεται ο διαθέσιμος χώρος για τα φυσιολογικά κύτταρα του αίματος και η εξέλιξη της νόσου θεωρείται ταχύτερη. Ειδικότερα το ποσοστό των κυττάρων που φέρουν την έλλειψη της περιοχής 13q14 έχει σχετιστεί με την εξέλιξη της ΧΛΛ. Έτσι αν τα κύτταρα των ασθενών που φέρουν έλλειψη είναι >80% τότε οι ασθενείς εμφανίζουν μικρότερη επιβίωση και μικρότερο χρόνο για την πρώτη θεραπεία σε σχέση με αυτούς που εμφανίζουν την έλλειψη σε ποσοστό <80% [64]. Επίσης το ποσοστό των κυττάρων που εμφανίζουν έλλειψη της περιοχής 17p έχει σχετιστεί με την πρόγνωση της νόσου αφού η έλλειψη σε ποσοστό κυττάρων >20% έχει συνδεθεί με χειρότερη πρόγνωση σε σχέση με τους υπόλοιπους ασθενείς της κατηγορίας αυτής [64]. Επίσης το ποσοστό των κυττάρων που φέρουν την έλλειψη 17p είναι αυξημένο σε ασθενείς που δεν ανταποκρίνονται στη θεραπεία ή που υποτροπιάζουν αμέσως μετά τη θεραπεία.

5.2.2.1 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ FISH ΑΝΑΛΥΣΗΣ

Η FISH ανάλυση εφαρμόστηκε σε 126 ασθενείς και ανέδειξε ανώμαλα πρότυπα υβριδισμού για έναν ή περισσότερους από τους 5 ιχνηθέτες που χρησιμοποιήθηκαν, στο ~70% των ασθενών. Συχνότερη αλλοίωση αναδείχτηκε η έλλειψη της περιοχής 13q14.3 σε ποσοστό 45.24%, όπως άλλωστε ήταν αναμενόμενο αφού η συχνότητα ανεύρεσής της μέσω της FISH με βάση τα βιβλιογραφικά δεδομένα είναι ~50% [42]. Αντιθέτως το ποσοστό ανίχνευσης της del(13q) με τη μέθοδο του καρυοτύπου είναι γενικά πολύ χαμηλότερο ~10%, όπως βρέθηκε και στο συγκεκριμένο δείγμα ασθενών [42]. Το γεγονός αυτό μαρτυρά ότι τις περισσότερες φορές η συγκεκριμένη έλλειψη είναι υπομικροσκοπική καθιστώντας τη μέθοδο FISH αποτελεσματικότερη μέθοδο για την ανίχνευσή της [50]. Επομένως, η εφαρμογή της τεχνικής FISH κρίνεται αναγκαία για την ανίχνευση της συγκεκριμένης αλλοίωσης ώστε να ταυτοποιηθεί ο πραγματικός αριθμός των ασθενών που φέρουν την έλλειψη αυτή αλλά και να εκτιμηθεί το ακριβές ποσοστό του παθολογικού κλώνου το οποίο σχετίζεται με την πρόγνωση των ασθενών τόσο κατά τη διάγνωση όσο και κατά την πορεία της νόσου. Επίσης, σε αντίθεση με τις άλλες αλλοιώσεις της ΧΛΛ η έλλειψη της περιοχής 13q14.3, μπορεί να απαντηθεί και σε ομοζυγωτία [24% των περιπτώσεων με del(13q)] η οποία συμβαίνει σε ένα πιο προχωρημένο στάδιο της νόσου [64]. Στην παρούσα μελέτη, η ομόζυγη έλλειψη της 13q14.3 ανιχνεύτηκε στο 10.32% των συνολικών περιπτώσεων ενώ το αντίστοιχο ποσοστό στους ασθενείς με del(13q) ήταν 22.81%, παρόμοιο με αυτό της βιβλιογραφίας [64].

Η τρισωμία 12 ήταν η δεύτερη συχνότερη αλλοίωση η οποία ανιχνεύτηκε στο 18.25% των ασθενών, συχνότητα παρόμοια με αυτή που βρέθηκε στον καρυότυπο (21.10%) της παρούσας διατριβής αλλά και σε άλλες μελέτες [64]. Η συγκεκριμένη αλλοίωση δεν είναι υπομικροσκοπική και για το λόγο αυτό οι 2 τεχνικές εμφανίζουν την ίδια δυνατότητα ως προς την ανίχνευσή της.

Η έλλειψη της περιοχής 17p14.3 ανιχνεύτηκε στο 10.32% των συνολικών περιπτώσεων, ποσοστό οριακά αυξημένο σε σχέση με το 5-10% άλλων μελετών που χρησιμοποίησαν τη FISH για την ανεύρεσή της [42]. Η del(17p) τις περισσότερες φορές είναι υπομικροσκοπική αφού με βάση τη βιβλιογραφία ανευρίσκεται στο ~5% των περιπτώσεων με τη μέθοδο του καρυοτύπου. Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι στο παρόν δείγμα αυτή η τόσο κακής προγνωστικής αξίας αλλοίωση ανιχνεύτηκε

στον καρυότυπο μόλις στο 0.92% (2/218 ασθενείς), ενώ στην πραγματικότητα υπήρχε στο 10,32% (13/126 ασθενείς) των ασθενών που ελέγχθηκαν με FISH. Η διαφορά αυτή μπορεί να μεγάλωνε ακόμα περισσότερο αν ήταν δυνατόν να εφαρμοστεί σε όλους τους ασθενείς η ανάλυση FISH. Επομένως, η FISH θα πρέπει να εφαρμόζεται κατά τη διάγνωση, πριν τη θεραπεία αλλά και στον επανέλεγχο των ασθενών αφού οι φορείς της del(17p) δεν ανταποκρίνονται στα συνηθισμένα θεραπευτικά σχήματα της ΧΛΛ υποτροπιάζοντας έντονα.

Παρομοίως το ποσοστό ανίχνευσης της έλλειψης της περιοχής 11q22.3 με την τεχνική της FISH ήταν μεγαλύτερο από αυτό του καρυότυπου (FISH: 8.73% vs καρυότυπος: 5.96%). Το γεγονός αυτό μαρτυρά ότι και αυτή η έλλειψη είναι στις περισσότερες των περιπτώσεων υπομικροσκοπική και χρειάζεται η εφαρμογή της FISH για την ανίχνευσή της. Επίσης όσον αφορά στο συγκεκριμένο δείγμα ασθενών η συχνότητα ανεύρεσης της έλλειψης της περιοχής 11q22.3 FISH διέφερε από αυτή άλλων μελετών (15-20%), γεγονός που μπορεί να αντανάκλα το διαφορετικό γενετικό υπόβαθρο των ασθενών με ΧΛΛ ή την διαφορετική έκθεση σε γενοτοξικούς παράγοντες [42].

5.2.3 Η ΑΞΙΑ ΤΟΥ ΚΑΡΥΟΤΥΠΟΥ ΚΑΙ ΤΗΣ FISH ΣΤΗ ΧΛΛ

Η συμβολή της FISH τονίστηκε ιδιαίτερα στην παρούσα μελέτη καθώς τα 65 από τα 126 δείγματα που αναλύθηκαν με τη μέθοδο αυτή είχαν φυσιολογικά ή καθόλου καρυοτυπικά αποτελέσματα. Οι 35 από τους 65 παραπάνω ασθενείς (53,85%) τελικά έφεραν υποmikροσκοπικές ελλείψεις οι οποίες ανιχνεύθηκαν μόνο στη FISH ανάλυση. Συγκεκριμένα οι 30 από αυτούς παρουσίασαν υποmikροσκοπικές ελλείψεις της περιοχής 13q14.3 και σχετίστηκαν με καλή πρόγνωση ενώ οι υπόλοιποι 5 εμφάνισαν υποmikροσκοπικές ελλείψεις κακής προγνωστικής αξίας (1/5 έλλειψη της 11q22.3 και 4/5 έλλειψη της 17p13.1). Ιδιαίτερα η πολύ κακής πρόγνωσης έλλειψη 17p13.1 που ανιχνεύτηκε σε 4 ασθενείς έχει άμεσο αντίκτυπο στη θεραπεία και θα πρέπει να γνωστοποιείται η ύπαρξή της από τη διάγνωση ώστε ο κλινικός γιατρός να προτείνει συγκεκριμένο πρωτόκολλο θεραπείας. Αν στους παραπάνω ασθενείς είχε εφαρμοστεί μόνο ο καρυότυπος τότε τα αποτελέσματα θα ήταν φυσιολογικά και η πρόγνωση του ασθενούς θα θεωρούταν καλή και πιθανότατα δε θα δίδοταν θεραπεία, ενώ στην πραγματικότητα η ασθένεια θα εξελισσόταν πολύ γρηγορότερα και ο ασθενής θα είχε κακή έκβαση. Επίσης ο κλινικός γιατρός δε θα ήταν σε θέση να αντιμετωπίσει θεραπευτικά τη νόσο και τις πιθανές της υποτροπές, αφού η del(17p) είναι ανθεκτική στα συνηθισμένα σχήματα θεραπείας της ΧΛΛ και χρειάζεται, ανάλογα με την κλινική κατάσταση του ασθενούς, να εξεταστεί η περίπτωση της αλλογενούς μεταμόσχευσης ή να χορηγηθεί ειδική θεραπεία με το anti-CD52 μονοκλωνικό αντίσωμα (Alemtuzumab) [72]. Βιβλιογραφικά, έχουν τονιστεί περιπτώσεις ασθενών όπου η κλασική κυτταρογενετική ήταν ανέφικτη ενώ η FISH επέτρεψε την εξαγωγή κυτταρογενετικών αποτελεσμάτων αφού δίνεται η δυνατότητα μελέτης μεσοφασικών πυρήνων αφηφώντας το χαμηλό μιτωτικό δείκτη των κυττάρων της ΧΛΛ και την απουσία ή την κακή ποιότητα των μεταφάσεων [64].

Από την άλλη, από τους ασθενείς που εξετάστηκαν με καρυότυπο και FISH, το 7.94% (10/126) εμφάνισε ευρήματα που ήταν διαφορετικά στη μία και στην άλλη τεχνική και το σημαντικότερο είναι ότι η πρόγνωση διέφερε ανάλογα με το ποια τεχνική θα λαμβανόταν υπόψη (πίνακας 24). Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι σε όλους αυτούς τους ασθενείς οι ανωμαλίες που ανευρέθηκαν στον καρυότυπο και δεν ήταν δυνατόν να ανιχνευτούν στη FISH είχαν χειρότερη πρόγνωση σε σχέση με αυτών που ανιχνεύθηκαν στη FISH (πίνακας 24). Ο

καρυότυπος παρέχει τη δυνατότητα ελέγχου ολόκληρου του γονιδιώματος και έτσι ταυτοποιούνται όλες οι ορατές στο οπτικό μικροσκόπιο, χρωμοσωμικές ανωμαλίες που μπορεί να συνδέονται με τη νόσο. Ο σύνθετος καρυότυπος που είναι συνηφασμένος με τη γενετική πολυπλοκότητα και ετερογένεια της νόσου αλλά και με δυσμενή πρόγνωση δε δύναται να αναδειχτεί μέσω της FISH ανάλυσης. Επιπροσθέτως, η ανεύρεση κυτταρογενετικών αλλοιώσεων μέσω της FISH προϋποθέτει την ύπαρξη του κατάλληλου ιχνηθέτη. Η γενετική πληροφορία που λαμβάνεται μέσω της FISH είναι τόσο περιορισμένη όσο εντοπισμένη είναι η δράση των ειδικών ανιχνευτών που χρησιμοποιούνται, γεγονός που υποτιμά τη γενετική πολυπλοκότητα που μπορεί να φέρει ένας ασθενής [64]. Έτσι λόγω της ετερογένειας της νόσου πολλές χρωμοσωμικές περιοχές μένουν ανεξερεύνητες με την τεχνική της FISH είτε διότι δεν έχουν σχεδιαστεί οι ειδικοί ιχνηθέτες είτε εξαιτίας του περιορισμένου αριθμού ανιχνευτών που μπορούν να χρησιμοποιηθούν. Το γεγονός αυτό δυσχεραίνει ακόμα περισσότερο τη διαγνωστική ρουτίνα και έρευνα αν αναλογιστεί κανείς το πλήθος σε συνδυασμό με το υψηλό κόστος των ιχνηθετών που θα πρέπει να χρησιμοποιηθούν προκειμένου να διερευνηθούν όσο το δυνατόν περισσότερες χρωμοσωμικές περιοχές ιδιαίτερα όταν δεν υπάρχουν καρυοτυπικά αποτελέσματα.

Γεννιέται λοιπόν το ερώτημα: «Μπορεί η μία τεχνική να αντικαταστήσει την άλλη;» Η απάντηση είναι «Όχι», διότι όπως ήδη προαναφέρθηκε και αποδείχθηκε στην παρούσα διατριβή η FISH προσφέρει δυνατότητες, όπως είναι:

- Η ανίχνευση υπομικροσκοπικών χρωμοσωμικών ανωμαλιών.
- Ο έλεγχος μεσοφασικών πυρήνων, ιδιαίτερα στις περιπτώσεις εκείνες που δεν υπάρχουν μεταφάσεις λόγω του χαμηλού *in vitro* μιτωτικού δείκτη των κυττάρων της ΧΛΛ ή της κακής ποιότητας των χρωμοσωμάτων.
- Η ακριβέστερη εκτίμηση του ποσοστού του αλλοιωμένου κλώνου η οποία φαίνεται ότι σχετίζεται με την εξέλιξη της νόσου.
- Η περαιτέρω διερεύνηση των αλλοιώσεων που ανιχνεύονται στον καρυότυπο για την ταυτοποίηση των εμπλεκόμενων γονιδίων.

Από την άλλη ο καρυότυπος δεν μπορεί να αντικατασταθεί διότι:

- Παρέχει τη δυνατότητα ελέγχου ολόκληρου του γονιδιώματος και επομένως καθίσταται δυνατή η ταυτοποίηση όλων των ορατών στο

οπτικό μικροσκόπιο, χρωμοσωμικών ανωμαλιών. Αντιθέτως, η πληροφορία που παρέχεται από τη FISH είναι περιορισμένη αφού προέρχεται αποκλειστικά από τους επιλεγμένους γενετικούς τόπους στους οποίους εφαρμόζονται οι ειδικοί ιχνηθέτες.

- Ο σύνθετος καρυότυπος που πρόσφατα σχετίστηκε με τη δυσμενή έκβαση της νόσου, δύναται να αποκαλυφθεί μόνο στον καρυότυπο, αφού στη FISH χρησιμοποιείται περιορισμένος αριθμός ανιχνευτών που αφορά μόνο στις πλέον γνωστές αλλοιώσεις της ΧΛΛ υποτιμώντας έτσι την ετερογένεια των χρωμοσωμικών αλλοιώσεων της νόσου.
- Η πρόγνωση μιας μεμονωμένης υπομικροσκοπικής αλλοίωσης που ανιχνεύθηκε στη FISH [πχ. del(13)(q14)] μπορεί να μεταβληθεί με τη συνύπαρξη επιπρόσθετων χρωμοσωμικών ανωμαλιών που εντοπίζονται στον καρυότυπο.

Συμπερασματικά γίνεται αντιληπτό ότι οι δύο κυτταρογενετικές μέθοδοι εμφανίζουν διαφορετικές δυνατότητες και είναι εξίσου χρήσιμες στην κλινική πράξη προσφέροντας τα μέγιστα στη διερεύνηση της ΧΛΛ. Συμβάλλουν και οι δύο στη διάγνωση, στην πρόγνωση, στη σταδιοποίηση και τη θεραπευτική προσέγγιση των ασθενών αλλά και στην έρευνα της παθογένειας της νόσου. Επομένως κρίνεται αναγκαία η παράλληλη εφαρμογή τους τόσο στη διάγνωση όσο και στην πορεία της νόσου αφού είναι δυνατόν να ανευρεθούν νέοι παθολογικοί κλώνοι με τη μία ή την άλλη τεχνική παρεμβαίνοντας έτσι στην πρόγνωση και τη θεραπευτική αντιμετώπιση των ασθενών.

5.3 Ο ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΣ UGT1A1*28 ΣΤΗ ΧΛΛ

Όπως ήδη ειπώθηκε η ΧΛΛ αποτελεί χρόνια νόσο του λεμφικού ιστού η οποία εκδηλώνεται σε μεγάλη ηλικία. Η προχωρημένη ηλικία στην οποία εμφανίζεται η ΧΛΛ θα μπορούσε να εξηγηθεί από τη χρόνια έκθεση σε γενοτοξικούς παράγοντες που έχουν ήδη συνδεθεί με την παθογένεια της νόσου. Η εκδήλωση της νόσου σε κάποια από τα άτομα των υπερηλικών θα μπορούσε να αποδοθεί στον μη αποτελεσματικό μεταβολισμό των τοξικών ουσιών. Συγκεκριμένα, η μειωμένη ενεργότητα των ενζύμων αποτοξικοποίησης που εμφανίζουν κάποια άτομα λόγω πολυμορφισμών οδηγεί σε ανεπαρκή μεταβολισμό των γενοτοξικών αυτών παραγόντων με αποτέλεσμα τη συσσώρευση και την χρόνια αθροιστική δράση τοξικών ενδιάμεσων προϊόντων στους ιστούς τους. Ωστόσο, τα δεδομένα σχετικά με την παθογένεια της νόσου και τα γονίδια που εμπλέκονται στο μεταβολισμό είναι περιορισμένα και πολλές φορές αντιφατικά [101]. Μέχρι σήμερα, οι θετικές συσχετίσεις που έχουν βρεθεί μεταξύ της νόσου και πολυμορφισμών του γενετικού υλικού αφορούν γονίδια τα οποία συμμετέχουν στον κυτταρικό κύκλο και τους επιδιορθωτικούς μηχανισμούς του DNA [101-103]. Η μόνη ενδεδειγμένη σχέση μεταξύ της ΧΛΛ και γονιδίων αποτοξικοποίησης αφορά στις τρανσφεράσες της γλουταθειόνης (GSTs), μια υπεροικογένεια ενζύμων της φάσης II του μεταβολισμού. Ειδικότερα οι Yuille και συνεργάτες έδειξαν ότι οι συχνότητες των ομόζυγων για τον πολυμορφισμό γονότυπων των γονιδίων *GSTM1* και *GSTT1* (null genotypes) αλλά και του αλληλομόρφου *GSTP1-Ile105Val* ήταν σημαντικά αυξημένες στους ασθενείς με ΧΛΛ σε σχέση με τα υγιή άτομα [101]. Επομένως κατέληξαν στο γεγονός ότι οι τρεις αυτοί γονότυποι αποτελούν παράγοντες κινδύνου για την εκδήλωση της ΧΛΛ και μάλιστα οι φορείς αυτών έχουν 2.8 φορές μεγαλύτερη πιθανότητα να εκδηλώσουν τη νόσο [101].

Στην παρούσα διατριβή έγινε προσπάθεια να συσχετιστεί ο UGT1A1*28 πολυμορφισμός του *UGT1A1* γονιδίου με τη ΧΛΛ, λόγω της άγνωστης επίπτωσής του στην λευχαιμογένεση. Ο συγκεκριμένος πολυμορφισμός που συμμετέχει στο μεταβολισμό τοξικών ουσιών, μερικές από τις οποίες ενοχοποιούνται για την εκδήλωση της ΧΛΛ, έχειδειχθεί ότι συμμετέχει στην ανάπτυξη συμπαγών όγκων. Συγκεκριμένα, υπάρχουν αρκετές αναφορές ότι UGT1A1*28 πολυμορφισμός

ενέχεται στην εμφάνιση καρκίνου του παχέος εντέρου, του λάρυγγα και κεφαλής αλλά και του μαστού [79,86,104-106]. Επιπλέον, ο UGT1A1*28 πολυμορφισμός που αποτελεί τη γενετική βάση του συνδρόμου Gilbert's και κληρονομείται ως αυτοσωμικός υπολειπόμενος χαρακτήρας, έχει συχνότητα εμφάνισης 3%-10% στο σύνολο του γενικού πληθυσμού επικρατώντας στους Καυκάσιους σε σχέση με τους πληθυσμούς της Ανατολής (Ασιάτες Ιάπωνες) [86,107]. Η ΧΛΛ έχει επίσης χαμηλότερη συχνότητα εμφάνισης στους Ασιάτες σε σχέση με τους Ευρωπαίους του Καυκάσου ή τους Αμερικάνους [108]. Τα παραπάνω γεγονότα σε συνδυασμό με την οικογενή μορφή της νόσου θα μπορούσαν να συνηγορήσουν υπέρ ενός προφίλ κληρονομικών γενετικών παραγόντων συμπεριλαμβανομένου πιθανότατα και του *UGT1A1* γονιδίου που προδιαθέτουν στην εκδήλωση της ΧΛΛ του Δυτικού κόσμου [109].

Στην παρούσα διατριβή διερευνήθηκε η πιθανή σχέση του UGT1A1*28 πολυμορφισμού με την εμφάνιση της νόσου αλλά και των ειδικών χρωμοσωμικών αλλοιώσεων της που ανιχνεύτηκαν με μεθόδους κλασικής και μοριακής κυτταρογενετικής. Παρατηρήθηκε μια αυξητική τάση του ομόζυγου γονοτύπου με την εκτεταμένη διαμόρφωση του υποκινητή TA₇/TA₇ στους ασθενείς (20.2%) έναντι των μαρτύρων (14.8%) χωρίς όμως να είναι στατιστικώς σημαντική. Έτσι οι γονότυποι κατανεμήθηκαν σχεδόν ομοιόμορφα ανάμεσα στις 2 ομάδες και για το λόγο αυτό δεν συμπεράθηκε συσχέτιση μεταξύ του πολυμορφισμού και της εκδήλωσης της νόσου. Αντιθέτως, βρέθηκε θετική συσχέτιση μεταξύ του γονοτύπου TA₇/TA₇ και των ειδικών χρωμοσωμικών αλλοιώσεων της ΧΛΛ. Ειδικότερα, οι ασθενείς που έφεραν το γονότυπο TA₇/TA₇ εμφάνισαν περίπου διπλάσιο κίνδυνο να εκδηλώσουν τις ειδικές χρωμοσωμικές ανωμαλίες που ανιχνεύτηκαν στη FISH. Η συχνότητα του γονοτύπου TA₇/TA₇ βρέθηκε στατιστικώς σημαντικά αυξημένη στους ασθενείς που έφεραν +12 ή έλλειψη της περιοχής 11q22. Ειδικότερα, οι ασθενείς που έφεραν το αλληλόμορφο TA₇ εμφάνισαν τριπλάσια πιθανότητα να εμφανίσουν τις δύο παραπάνω κυτταρογενετικές αλλοιώσεις. Ως εκ τούτου, προτείνεται ότι ο UGT1A1*28 πολυμορφισμός ενδέχεται να σχετίζεται με ορισμένες μορφές της ΧΛΛ και ιδιαίτερα με εκείνες που φέρουν τις χρωμοσωμικές ανωμαλίες +12 και del(11)(q22). Αυτό μπορεί να δικαιολογηθεί από την μεγάλη ετερογένεια της νόσου που αντικατοπτρίζεται και στη μεγάλη ετερογένεια των χρωμοσωμικών ανωμαλιών που εμπλέκονται στη παθογένειά της. Οι διαφορετικές αυτές κυτταρογενετικές ανωμαλίες οδηγούν στην εκδήλωση μιας και μόνο νόσου, της ΧΛΛ, η οποία όμως

είναι ταυτόχρονα εξαιρετικά ετερογενής όσον αφορά στην πρόγνωση και κλινική κατάσταση των ασθενών.

Η θετική συσχέτιση που βρέθηκε μεταξύ του πολυμορφισμού και της τρισωμίας 12 μπορεί να ενισχυθεί από α) την παρατήρηση ότι η τρισωμία 12 είναι δυνατόν να προκληθεί από επαγγελματική έκθεση σε υψηλά επίπεδα βενζολίου κατά ένα, μάλιστα, δοσοεξαρτώμενο τρόπο [110] και β) το γεγονός ότι τα παράγωγα του βενζολίου όπως τα βενζοπυρένια, τα οποία έχουν συνδεθεί με την εκδήλωση της ΧΛΛ, μεταβολίζονται εν μέρει από την οικογένεια των ενζύμων UGTs της φάση II του μεταβολισμού [84]. Λαμβάνοντας υπόψη τα παραπάνω, προκύπτει ότι η σημαντικά μειωμένη ενεργότητα του UGT1A1 ενζύμου ως αποτέλεσμα του πολυμορφισμού η οποία οδηγεί στο σχηματισμό ενδιάμεσων ενεργών τοξικών μεταβολιτών, θα μπορούσε ενδεχομένως να συμβάλλει στην ενεργοποίηση συγκεκριμένων γενετικών μηχανισμών που μπορεί να επάγουν το σχηματισμό της τρισωμίας 12.

Επιπλέον αναδείχθηκε θετική συσχέτιση μεταξύ του αλληλομόρφου TA₇ και της έλλειψης της περιοχής 11q22.3. Το συγκεκριμένο εύρημα αναδείχθηκε στη FISH και όχι στον καρυότυπο και οφείλεται στο γεγονός ότι η έλλειψη της περιοχής 11q22.3 όπως ήδη ειπώθηκε είναι υπομικροσκοπική. Επομένως ο αριθμός των ασθενών που έφεραν την έλλειψη αυτή ήταν μεγαλύτερος στη FISH σε σχέση με τον καρυότυπο και άρα ήταν εφικτή η στατιστική επεξεργασία των δεδομένων και η διερεύνηση της πιθανής συσχέτισης. Γενικότερα, έχει παρατηρηθεί ότι η έκθεση στο βενζόλιο μπορεί να συμβάλει στα σπασίματα της συγκεκριμένης χρωμοσωμικής περιοχής, τα οποία είναι και η αιτία των ελλείψεων [78]. Η έλλειψη της εν λόγω περιοχής αποτελεί ως γνωστόν ειδική αλλοίωση της ΧΛΛ. Έτσι, τα άτομα που εμφανίζουν μειωμένη ενεργότητα ενζύμου εξαιτίας του πολυμορφισμού ενδέχεται να μην μπορούν να μεταβολίσουν επαρκώς το βενζόλιο, το οποίο μπορεί να συμβάλλει στην απώλεια γενετικού υλικού στην περιοχή 11q22.3, με την οποία συσχετίστηκε και ο UGT1A1*28 πολυμορφισμός στη συγκεκριμένη διατριβή. Η πρόταση αυτή θα μπορούσε να ενισχυθεί από τις ήδη αναφερθείσες χρωμοσωμικές αλλοιώσεις που έχουν παρατηρηθεί σε ασθενείς με άλλους τύπους λευχαιμίας, οι οποίοι είχαν εκτεθεί σε τοξικούς παράγοντες, όπως το βενζόλιο [110-112].

Όταν οι ασθενείς κατηγοριοποιήθηκαν στις 3 προγνωστικές ομάδες με βάση την προγνωστική αξία των αλλοιώσεων που ανευρέθηκαν στη FISH παρατηρήθηκε άνιση κατανομή των γονοτύπων και μάλιστα ο TA₇/TA₇ υπερείχε στους ασθενείς με

ενδιάμεσης και κακής πρόγνωσης χρωμοσωμικές αλλοιώσεις. Το συγκεκριμένο εύρημα είναι σύμφωνο με τη θετική συσχέτιση που προαναφέρθηκε μεταξύ του πολυμορφισμού και των +12 και del(11)(q22), κυτταρογενετικών αλλοιώσεων που έχουν ενδιάμεση και κακή πρόγνωση αντιστοίχως. Επίσης η συχνότητα του αλληλομόρφου TA₇ στους ασθενείς με φτωχή πρόγνωση ήταν 3,6 φορές μεγαλύτερη από εκείνη των ασθενών με καλή ή ενδιάμεση πρόγνωση. Η ομάδα κακής πρόγνωσης περιλαμβάνει και την έλλειψη της περιοχής 17p, για την οποία όμως δεν ήταν εφικτό να εφαρμοστεί στατιστική επεξεργασία εξαιτίας του ιδιαίτερα μικρού αριθμού των ασθενών που έφεραν την συγκεκριμένη αλλοίωση.

Επιπλέον στο συγκεκριμένο δείγμα η συχνότητα του TA₇ βρέθηκε αυξημένη στους ασθενείς με έλλειψη του φυλετικού χρωμοσώματος Y, χωρίς όμως το αποτέλεσμα αυτό να έχει στατιστική αξία εξαιτίας του μικρού αριθμού ασθενών που έφεραν την έλλειψη αυτή. Λαμβάνοντας υπόψη το γεγονός ότι οι άνδρες είναι πιο εκτεθειμένοι σε τοξικούς παράγοντες στα εργασιακά τους περιβάλλοντα σε συνδυασμό με τα τοξικά ενδιάμεσα προϊόντα που δημιουργούνται από το μεταβολισμό αυτών εξαιτίας της μειωμένης ενεργότητας του ενζύμου, θα μπορούσε να υποθεθεί ότι η έλλειψη του Y χρωμοσώματος μπορεί να εκδηλώνεται σε προχωρημένη ηλικία εξαιτίας της χρόνιας συσσώρευσης τοξικών παραγόντων στον λεμφικό ιστό.

Συμπερασματικά, στην παρούσα διατριβή δείχθηκε ότι ο πολυμορφισμός UGT1A1*28 ενδέχεται να αποτελεί έναν προδιαθεσικό παράγοντα για τη δημιουργία της τρισωμίας 12 και της έλλειψης της περιοχής 11q22, στη ΧΛΛ, αλλά και γενικότερα των ενδιάμεσης ή κακής πρόγνωσης αλλοιώσεων που ανιχνεύτηκαν στη παρούσα μελέτη με τη FISH. Τα συγκεκριμένα αποτελέσματα έχουν δημοσιευτεί και δίνουν για πρώτη φορά το έναυσμα να διευκρινιστεί ο πιθανός ρόλος του UGT1A1*28 στην παθογένεια της ΧΛΛ θεωρώντας τον ως έναν από τους πιθανούς γενετικούς παράγοντες που ενδέχεται να ενέχεται στην παθογένεια της νόσου.

5.4 ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΠΡΟΔΙΑΘΕΣΗ ΚΑΙ ΕΚΘΕΣΗ ΣΕ ΓΕΝΟΤΟΞΙΚΟΥΣ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΣΤΗ ΧΛΛ

5.4.1 ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ ΚΙΝΔΥΝΟΥ ΜΕ ΤΗΝ ΕΚΔΗΛΩΣΗ ΤΗΣ ΧΛΛ

Η αιτιοπαθογένεια της ΧΛΛ δεν έχει ακόμα αποσαφηνιστεί, μολονότι τελευταία αποδίδεται σε ένα συνδυασμό γενετικής προδιάθεσης και έκθεσης σε τοξικούς περιβαλλοντικούς παράγοντες. Οι περισσότεροι όμως από αυτούς δεν έχουν ταυτοποιηθεί εξαιτίας των αντιφατικών αποτελεσμάτων που προκύπτουν συνεχώς. Συνεπώς δεν έχουν καθιερωθεί οι παράγοντες κινδύνου που ενέχονται στην εκδήλωση της ΧΛΛ όπως συμβαίνει σε άλλους τύπους λευχαιμίας. Ωστόσο υπάρχουν σοβαρές ενδείξεις ότι η έκθεση σε διάφορους γενοτοξικούς παράγοντες κυρίως στα εργασιακά περιβάλλοντα παίζουν σημαντικό ρόλο στην εκδήλωση της νόσου. Η άποψη αυτή ενισχύεται από: α) το γεγονός ότι η νόσος εμφανίζεται σχεδόν με διπλάσια συχνότητα στους άνδρες από ότι στις γυναίκες και κυρίως στους άνδρες μεγαλύτερης ηλικίας β) την παρουσία επικίνδυνων παραγόντων στα εργασιακά περιβάλλοντα κυρίως των ανδρών και γ) τη μεγαλύτερη συχνότητα που εμφανίζει η νόσος στις ανεπτυγμένες βιομηχανικά χώρες. Μελέτες έχουν ενοχοποιήσει ουσίες όπως φυτοφάρμακα, χρώματα/μπογιές, πετρελαιοειδή, καουτσούκ, προϊόντα επεξεργασίας ξύλου, κόλλες, διαλύτες όπως βουταδιένιο και βενζόλιο τα οποία θεωρούνται άμεσα ή έμμεσα μεταλλαξογόνα και φαίνεται ότι ενεργοποιώντας συγκεκριμένους μηχανισμούς λευχαιμογένεσης, παίζουν ρόλο στην παθογένεια της ΧΛΛ [18]. Η χρόνια συσσώρευση των παραγόντων αυτών στους ανθρώπινους ιστούς και κυρίως στο λεμφικό ιστό μπορεί να επιδράσει στο DNA προκαλώντας σπασίματα, από τα οποία προκύπτουν και οι χρωμοσωμικές αλλοιώσεις, με τις οποίες σχετίζεται η βιολογία της ΧΛΛ [77].

Στην παρούσα μελέτη ελέγχθηκε το οικογενειακό ιστορικό, ο τρόπος διαβίωσης (κάπνισμα, κατανάλωση αλκοόλ, χρήση προϊόντων κοσμετολογίας) και η πιθανή έκθεση των ασθενών σε ενοχοποιημένους για τη ΧΛΛ γενοτοξικούς παράγοντες σε σχέση με άτομα του υγιούς πληθυσμού (μάρτυρες). Στην παρούσα

διατριβή δεν εξετάστηκε μόνο μια ομάδα εργατών από ένα συγκεκριμένο εργασιακό περιβάλλον, όπως συμβαίνει στις περισσότερες μελέτες, όπου η έκθεση τελικά αφορά σε συγκεκριμένους τοξικούς παράγοντες και επομένως η εκδήλωση της νόσου εξετάζεται σε σχέση μόνο με αυτούς. Αντιθέτως εξετάστηκε ένα πλήθος ασθενών που προερχόταν όχι μόνο από διαφορετικά εργασιακά περιβάλλοντα αλλά και από διαφορετικούς τόπους διαβίωσης του Ελλαδικού χώρου. Επομένως ελέγχθηκε η έκθεση των ατόμων σε διάφορους γενοτοξικούς παράγοντες και προέκυψαν αρκετές συσχετίσεις των οποίων η εγκυρότητα και επαναληψιμότητα επιβεβαιώθηκε από τις κατάλληλες στατιστικές δοκιμασίες.

Οικογενειακό ιστορικό

Στην παρούσα διατριβή προέκυψε θετική συσχέτιση της νόσου με το οικογενειακό ιστορικό των ασθενών. Ειδικότερα, οι ασθενείς είχαν συχνότερα συγγενείς α' βαθμού με ΧΛΛ ή άλλους τύπους καρκίνου ($P<0,0001$) και πιο συγκεκριμένα οι μητέρες ($P=0,003$) και τα αδέρφια ($P=0,014$) ήταν τα άτομα της οικογένειας που έπασχαν συχνότερα. Η θετική αυτή συσχέτιση ήταν αναμενόμενη αφού είναι γνωστό ότι το οικογενειακό ιστορικό αποτελεί έναν από τους ισχυρότερους παράγοντες κινδύνου εμφάνισης της ΧΛΛ και μάλιστα ο κίνδυνος ανάπτυξης της νόσου για τους α' βαθμού συγγενείς των ασθενών αυξάνεται κατά 30 φορές. Επίσης οι ασθενείς με την οικογενή μορφή της ΧΛΛ είναι κατά μέσο όρο 10 έτη νεότεροι από εκείνους με τη σποραδική [28]. Παρόλα αυτά, δεν έχει ακόμα διαπιστωθεί αν η κληρονομικότητα που εμφανίζει η νόσος είναι μητρικής ή πατρικής προέλευσης.

Τρόπος ζωής

Η εκδήλωση της ΧΛΛ εξετάστηκε σε σχέση με τον τρόπο ζωής των ατόμων ως προς το κάπνισμα και ως προς τα προϊόντα κοσμετολογίας που χρησιμοποιούσαν αφού η βιβλιογραφία έχει ενοχοποιήσει και τους δύο αυτούς παράγοντες. Προέκυψε θετική συσχέτιση με τη νόσο όσον αφορά στο κάπνισμα σε αντίθεση με τη χρήση προϊόντων κοσμετολογίας.

Αναλυτικότερα, το ποσοστό των ασθενών που δήλωσαν πρώην καπνιστές ήταν στατιστικώς σημαντικά αυξημένο σε σχέση με αυτό των μαρτύρων ($P=0,005$). Οι συγκεκριμένοι ασθενείς κάπνιζαν αρκετά (>10 τσιγάρα ημερησίως) και για ένα μεγάλο χρονικό διάστημα (>5 έτη). Γενικότερα, ο καπνός θεωρείται καρκινογόνος

ουσία και έχει συνδεθεί με τη λευχαιμογένεση κυρίως με την εκδήλωση της Οξείας Μυελογενούς Λευχαιμίας [27]. Τα δεδομένα της βιβλιογραφίας που αφορούν στη σχέση καπνίσματος και ΧΛΛ είναι αντιφατικά. Υπάρχουν μελέτες που δείχνουν ότι δεν αυξάνεται ο κίνδυνος εμφάνισης της νόσου όταν κάποιος καπνίζει, αλλά και αρκετές άλλες που έχουν συσχετίσει το κάπνισμα με τη νόσο [18]. Πιο συγκεκριμένα, οι Morton και συνεργάτες όχι μόνο συσχέτισαν τον καπνό με τη ΧΛΛ αλλά και ανέδειξαν την τάση της νόσου να αυξάνεται αυξανόμενης της διάρκειας του καπνίσματος [113]. Επιπροσθέτως, τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης ενισχύονται από το γεγονός ότι το κάπνισμα ενός και μόνο τσιγάρου απελευθερώνει 80-150μg βενζολίου, το οποίο δρα άμεσα στο λεμφικό ιστό και έχει συνδεθεί με την παθογένεια της ΧΛΛ [114].

Όσον αφορά στη σχέση της ΧΛΛ με την κοσμετολογία γενικότερα, έχει παρατηρηθεί ότι οι εργαζόμενοι σε αυτόν τον τομέα είναι πιθανόν να διατρέχουν μεγαλύτερο κίνδυνο για την εμφάνιση ενός λεμφοϋπερπλαστικού νοσήματος [18]. Όσον όμως αφορά στη βαφή μαλλιών τα αποτελέσματα της παρούσας διατριβής έδειξαν ότι η νόσος δεν σχετίζεται με αυτή. Όχι μόνο δεν παρατηρήθηκε καμία διαφορά ανάμεσα στους ασθενείς και τους μάρτυρες που χρησιμοποιούσαν τη βαφή μαλλιών για ίδια χρήση αλλά δεν παρατηρήθηκε και καμία συσχέτιση της νόσου με τα επαγγέλματα στα οποία γίνεται χρήση τέτοιων προϊόντων. Παρόμοια ευρήματα προκύπτουν και άλλες μελέτες πλην ελαχίστων εξαιρέσεων [115-121].

Πνευμονία

Έχει αναφερθεί ότι η εμφάνιση ενός ή περισσότερων επεισοδίων πνευμονίας εντός 5 ετών πριν από τη διάγνωση της ΧΛΛ θα μπορούσε να πυροδοτήσει την εκδήλωσή της, μολονότι η πνευμονία θα μπορούσε να αποτελεί και συνέπεια της ανοσολογικής ανεπάρκειας που προκαλείται από την εκδήλωση της ίδιας της νόσου [18]. Η παραπάνω σχέση ενισχύεται από το γεγονός ότι σε περιπτώσεις χρόνιας λήψης αντιβιοτικών λόγω χρόνιων ιατρικών προβλημάτων, έχει παρατηρηθεί μειωμένος κίνδυνος για την εκδήλωση της νόσου [122,123]. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η θετική συσχέτιση που βρέθηκε στην παρούσα διατριβή. Τα άτομα που εμφάνισαν μία ή περισσότερες φορές πνευμονία σε διάστημα 5 ετών πριν τη διάγνωση της νόσου διέτρεχαν περίπου τριπλάσιο κίνδυνο να εμφανίσουν ΧΛΛ (OR=3.12, 95% CI= 1.30-8.78, P=0.016). Το αποτέλεσμα αυτό ενισχύεται από την άποψη των Landgren και συνεργατών οι οποίοι διατύπωσαν ότι το συγκεκριμένο

αντιγονο-εξαρτώμενο νόσημα πιθανότατα να εμπλέκεται στην εκδήλωση της ΧΛΛ [122,123]. Επίσης δεν θα πρέπει να παραβλεφθεί το γεγονός ότι η έρευνα που αφορά τη βιολογία της νόσου έχει στραφεί τα τελευταία χρόνια, προς τη διαλεύκανση του ρόλου των αντιγόνων και των αυτοαντιγόνων ενώ οι περισσότερες μελέτες καταλήγουν στο γεγονός ότι όλες οι περιπτώσεις της ΧΛΛ προέρχονται από κύτταρα που έχουν εμπειρία αντιγόνου τα οποία όμως παραμένουν έως και σήμερα άγνωστα [94].

Ακτινοβολία

Ιονίζουσα: Είναι γνωστό εδώ και έναν αιώνα περίπου, ότι η ιονίζουσα ακτινοβολία αποτελεί παράγοντα κίνδυνου για τη λευχαιμογένεση. Παλαιότερα δεν υπήρχαν δεδομένα που να συσχετίζουν τη ΧΛΛ με την ιονίζουσα ακτινοβολία. Αντίθετα πρόσφατες μελέτες συνδέουν την εκδήλωση της νόσου κυρίως με την ακτινοβολία που χρησιμοποιείται για θεραπευτικούς ή διαγνωστικούς σκοπούς [18]. Στην παρούσα διατριβή βρέθηκε ότι το ποσοστό των ασθενών που εκτέθηκε σε ιονίζουσα ακτινοβολία πριν την εκδήλωση της ΧΛΛ, εξαιτίας της ακτινοθεραπείας κάποιου άλλου νοσήματος ή λόγω επανειλημμένων ακτινοδιαγνωστικών εξετάσεων (αξονικές τομογραφίες ή ακτινογραφίες κυρίως στη σπονδυλική στήλη), εμφανίστηκε στατιστικώς σημαντικά αυξημένο σε σχέση με αυτό των μαρτύρων. Επομένως αποκαλύφθηκε μια θετική συσχέτιση της νόσου με την έκθεση στην ιονίζουσα ακτινοβολία και αναδείχτηκε ότι ο κίνδυνος εμφάνισης της ΧΛΛ τριπλασιάζεται στα άτομα που έχουν εκτεθεί σε αυτή (OR=3.38, 95% CI= 1.49-6.56, P=0.003). Το εύρημα αυτό συμφωνεί και με πολλές άλλες μελέτες που αφορούν στην ιονίζουσα ακτινοβολία που δέχεται κάποιος για ιατρικούς λόγους αλλά και στη ραδιενέργεια που εκτίθενται κάποια άτομα στο εργασιακό τους περιβάλλον (εργάτες σε πυρηνικά εργοστάσια, βιομηχανίες εξόρυξης ουρανίου, πλουτωνίου κ.α.) [124-128].

Μη ιονίζουσα: Γενικά η πληροφορία για τη σχέση της ΧΛΛ με τη μη ιονίζουσα ακτινοβολία είναι πολύ περιορισμένη [18]. Από τις λιγοστές αξιολογήσεις που υπάρχουν σχετικά με τις επιπτώσεις της ακτινοβολίας στην υγεία που προέρχεται από τα υψηλής συχνότητας ηλεκτρομαγνητικά πεδία, πολύ λίγα μπορούν να ειπωθούν για τη σχέση της με τη ΧΛΛ [18]. Μία μόνο μελέτη εξέτασε και ανέδειξε τη συσχέτιση της νόσου με την έκθεση σε μη ιονίζουσα ακτινοβολία στο εργασιακό αλλά και οικιακό περιβάλλον. Ειδικότερα οι Tynes και Haldorsen έδειξαν ότι ο κίνδυνος για την εκδήλωση της ΧΛΛ τριπλασιάστηκε στους ενήλικες που έμεναν

κοντά σε γραμμές υψηλής τάσης όπου η έκθεση ήταν >0.2 Μτ [21]. Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι στην παρούσα διατριβή βρέθηκε παρόμοια συσχέτιση. Το ποσοστό των ασθενών που κατοικούσαν ή δούλευαν σε ή κοντά σε (απόσταση \leq 30m) υποσταθμούς της ΔΕΗ και πυλώνες υψηλής τάσης, εμφανίστηκε σημαντικά υψηλότερο συγκρινόμενο με αυτό των μαρτύρων. Επίσης βρέθηκε ότι ο κίνδυνος ανάπτυξης ΧΛΛ περίπου εξαπλασιάζεται όταν υπάρχει η συγκεκριμένη έκθεση (OR=5.8, 95% CI= 1.39-17.46, $P<0.0001$).

Πετρελαιοειδή

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζουν τα αποτελέσματα της παρούσας διατριβής που αφορούν στην έκθεση των ασθενών σε χημικές ουσίες κυρίως στα εργασιακά τους περιβάλλοντα. Πιο συγκεκριμένα, τα άτομα που είχαν εκτεθεί σε πετρελαιοειδή μέσω της εργασίας τους (βενζινοπώλες, μηχανικοί αυτοκινήτων, επαγγελματίες οδηγοί, ναυπηγοί, εργάτες μηχανοστασίων, οδηγοί βυτιοφόρων, εργάτες σε δεξαμενόπλοια κ.α) είτε επειδή η οικία τους βρισκόταν δίπλα σε βενζινάδικο (απόσταση \leq 30m) παρουσίασαν περίπου 6 φορές μεγαλύτερη πιθανότητα να εκδηλώσουν τη νόσο (OR=5.73, 95% CI= 2.12-15.49, $P<0.0001$). Το γεγονός αυτό υποδεικνύει τη συμμετοχή των πετρελαιοειδών στην εκδήλωση της νόσου. Ενισχύεται δε, και από άλλες μελέτες της βιβλιογραφίας στις οποίες οι ενήλικες που εκτέθηκαν στον τοξικό αυτόν παράγοντα διέτρεχαν πολλαπλάσιο κίνδυνο εκδήλωσης ΧΛΛ [16,129,130]. Επιπροσθέτως, σε ανασκοπική μελέτη της βιβλιογραφίας παρουσιάστηκε η τάση της νόσου να εκδηλώνεται συχνότερα σε εργαζομένους που εκτίθενται σε πετρελαιοειδή ενώ οι Lewis και συνεργάτες παρατήρησαν σημαντική αύξηση της θνησιμότητας λόγω ΧΛΛ σε εργαζομένους διυλιστηρίων και βιομηχανιών πετρελαίου και πετροχημικών της Λουϊζιάνα [129,131].

Γεωργία

Τα αποτελέσματα των μελετών που έχουν αξιολογηθεί ειδικά για τη ΧΛΛ και το επάγγελμα του αγρότη είναι αντιφατικά, αφού πολλά παρουσιάζουν θετική και άλλα αρνητική συσχέτιση με τη νόσο [16]. Ωστόσο υπάρχουν αρκετές ενδείξεις ότι η ΧΛΛ σχετίζεται με το επάγγελμα αυτό εξαιτίας της χρήσης ενοχοποιημένων χημικών προϊόντων. Στη συγκεκριμένη διατριβή συμπεριλήφθηκαν μόνο εκείνοι οι αγρότες που εμφάνιζαν συστηματική ενασχόληση με φυτοφάρμακα, χημικά λιπάσματα και παρασιτοκτόνα, χημικές ουσίες με τις οποίες πιθανώς σχετίζεται η ΧΛΛ [16]. Επίσης

λαμβάνοντας υπόψη το γεγονός ότι ο κίνδυνος ανάπτυξης της ΧΛΛ αυξάνεται σε κατοίκους των επαρχιακών πόλεων που διαμένουν κοντά σε αγρούς που καλλιεργούνται με τη χρήση φυτοφαρμάκων, στην παραπάνω κατηγορία συμπεριλήφθηκαν και οι κάτοικοι τέτοιων περιοχών [132]. Το ποσοστό των ασθενών με τη συγκεκριμένη έκθεση βρέθηκε στατιστικώς σημαντικά αυξημένο σε σχέση με αυτό των μαρτύρων οπότε και δείχθηκε ότι ο κίνδυνος εμφάνισης της νόσου γίνεται σχεδόν τετραπλάσιος στα άτομα που ασχολούνται με τη συστηματική χρήση χημικών λιπασμάτων και φυτοφαρμάκων (OR=3.8, 95% CI= 1.98-7.43, $P<0.0001$). Το εύρημα αυτό ενισχύεται από προηγούμενες θετικές συσχετίσεις της βιβλιογραφίας [23,121,133-135].

Μέταλλα

Στο παρόν δείγμα το ποσοστό των ασθενών που είχε εκτεθεί στα μέταλλα χρώμιο, νικέλιο, αρσενικό, θάλλιο, αμίαντο, χαλκό, μόλυβδο και κάδμιο κυρίως μέσω του εργασιακού τους περιβάλλοντος (σιδηρουργοί, μηχανικοί αυτοκινήτων, ναυπηγοί, συγκολλητές, τορναδόροι, λιθογράφοι, αμμοβολιστές, μεταλλωρύχοι, εργάτες χυτηρίων και μηχανουργείων) ήταν περίπου διπλάσιο σε σχέση με αυτό των μαρτύρων. Το γεγονός αυτό υποδεικνύει τον πιθανό ρόλο των συγκεκριμένων μετάλλων στην παθογένεια της ΧΛΛ, αφού τα άτομα που είχαν εκτεθεί σε αυτά διέτρεχαν σχεδόν διπλάσιο κίνδυνο να εκδηλώσουν τη νόσο (OR=2.15, 95% CI= 1.14-4.04, $P=0.024$). Παρόμοιες περιπτώσεις έχουν αναφερθεί στη βιβλιογραφία όπως η συσχέτιση της νόσου με την έκθεση στον αμίαντο [136,137]. Ως προς τα άλλα μέταλλα δεν έχει αναφερθεί συσχέτιση με τη ΧΛΛ, μολονότι υπάρχουν μελέτες που τα συσχετίζουν με την εκδήλωση της λευχαιμίας γενικότερα [136].

Απορρυπαντικά

Θετική επίσης βρέθηκε η συσχέτιση της νόσου με τη χρήση απορρυπαντικών κυρίως χλωρίνης. Το ποσοστό των ασθενών που χρησιμοποιούσε συστηματικά χλωριωμένους υδρογονάνθρακες λόγω της εργασίας του ή εξαιτίας της υπερβολικής ιδιωτικής χρήσης άνευ προφύλαξης (γάντια, μάσκα) τέτοιων προϊόντων ήταν σημαντικά αυξημένο σε σχέση με αυτό των μαρτύρων ($P<0.0001$). Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι στην ομάδα αυτή των ασθενών ανήκαν υπάλληλοι καθαριότητας σε νοσοκομεία, σχολεία και άλλους δημόσιους ή ιδιωτικούς φορείς/χώρους, αλλά και εργάτες σε εργοστάσια παραγωγής απορρυπαντικών. Το

εύρημα αυτό ενισχύεται και από τις υπάρχουσες συσχετίσεις της ΧΛΛ με τέτοιου είδους επαγγέλματα, στη βιβλιογραφία, όπως υπάλληλοι καθαριότητας και εργάτες σε στεγνοκαθαριστήρια [136,138,139]. Επίσης οι Seidler και συνεργάτες υπέδειξαν σχέση μεταξύ της νόσου και των τετραχλωρανθράκων και χλωριωμένων υδρογονανθράκων, χημικές ενώσεις που περιέχονται στα περισσότερα καθαριστικά [140].

Άλλοι τοξικοί παράγοντες και επαγγέλματα

Γενικότερα στη βιβλιογραφία υπάρχουν ενδείξεις ότι η ΧΛΛ συνδέεται με επαγγέλματα όπως ελαιοχρωματιστές, υποδηματοποιοί, επιπλοποιοί, οικοδόμοι, εργάτες σε βιομηχανίες πλαστικού, κυρίως λόγω των εισπνεόμενων τοξικών ουσιών (κόλλες, χρώματα, διαλυτικά, πλαστικό) που εκλύονται στα συγκεκριμένα εργασιακά περιβάλλοντα, χωρίς όμως αυτή η σχέση να έχει πλήρως διαλευκανθεί [16,136]. Στην παρούσα διατριβή το ποσοστό των ασθενών που ασκούσε τέτοιου είδους επαγγέλματα υπερίσχυσε σε σχέση με τους μάρτυρες, χωρίς όμως η διαφορά αυτή να είναι στατιστικώς σημαντική.

Επίσης, στην παρούσα μελέτη ελέγχθηκε και η σχέση της νόσου με το επάγγελμα του μάγειρα/ψήστη. Το 5.8% του συνόλου των ασθενών καταγράφηκε ως επαγγελματίες μάγειροι ενώ στο δείγμα των μαρτύρων δε βρέθηκε κανένα άτομο με το επάγγελμα αυτό. Η διαφορά αυτή ήταν στατιστικά σημαντική και θεωρήθηκε ότι υπάρχει θετική συσχέτιση με την εκδήλωση της νόσου (OR=1.06, 95% CI= 1.02-1.11, P=0.003), μολονότι παρόμοια συσχέτιση στη βιβλιογραφία δεν υπάρχει. Ωστόσο το αποτέλεσμα αυτό ενισχύεται από μελέτη του Εθνικού Ινστιτούτου Καρκίνου στις ΗΠΑ διαπιστωθήκαν υψηλά επίπεδα βενζοπυρενίου στο καλοψημένο κόκκινο και λευκό κρέας [141]. Το βενζοπυρενίο είναι παράγωγο του βενζολίου, ένωση που έχει συνδεθεί άμεσα με τη ΧΛΛ και δρα απευθείας στο DNA προκαλώντας αλλοιώσεις. Επομένως ο συνδυασμός της ουσίας αυτής αλλά και του μονοξειδίου του άνθρακα που εκλύεται κατά τη διάρκεια του ψησίματος ίσως να αποτελούν παράγοντες κινδύνου για την εκδήλωση της ΧΛΛ.

Αριθμός διαφορετικών εκθέσεων

Επίσης είναι σημαντικό να ειπωθεί ότι στην παρούσα διατριβή αξιολογήθηκε με πολυπαραγοντική στατιστική ανάλυση και ο αριθμός των διαφορετικών εκθέσεων που δέχτηκαν ασθενείς και μάρτυρες. Το ποσοστό των ασθενών που είχε δεχτεί 2 ή

περισσότερες εκθέσεις στους παραπάνω παράγοντες ήταν αυξημένο σε σχέση με αυτό των μαρτύρων. Παρατηρήθηκε ότι όσο αυξάνεται ο αριθμός των διαφορετικών εκθέσεων που δέχεται ένα άτομο τόσο αυξάνεται και η πιθανότητα να ασθενήσει από ΧΛΛ. Επομένως είναι πιθανό η έκθεση σε ένα συγκεκριμένο τοξικό παράγοντα να μην σχετίζεται από μόνη της με τη ΧΛΛ αλλά να χρειάζεται η συνεργατική δράση πολλών ώστε να ενεργοποιηθεί η λευχαιμογένεση. Το γεγονός αυτό συνάδει με παρόμοιες παρατηρήσεις στην καρκινογένεση γενικότερα. Ο ανθρώπινος οργανισμός συνήθως είναι ικανός ως ένα βαθμό να αποτοξικοποιεί τοξικές ουσίες αλλά όταν πρέπει να γίνει ταυτόχρονα αποτοξικοποίηση πολλών τότε ίσως τα ενδιάμεσα προϊόντα μεταβολισμού που προκύπτουν να αντιδρούν μεταξύ τους σχηματίζοντας ενεργούς τοξικούς μεταβολίτες οι οποίοι άμεσα ή έμμεσα να ενεργοποιούν τη λευχαιμογένεση.

Γενικά δεν είναι γνωστός ο τρόπος επίδρασης των παραπάνω παραγόντων στην παθογένεια της ΧΛΛ μολονότι συνεχώς παρατηρείται αύξηση της εμφάνισης της νόσου σε άτομα που εκτίθενται σε γενοτοξικούς παράγοντες [16]. Πιστεύεται όμως ότι η απορύθμιση του ανοσοποιητικού συστήματος που προκαλείται από τους παράγοντες αυτούς επηρεάζει την ανάπτυξη της ΧΛΛ όπως και άλλων λεμφικών νεοπλασμάτων. Μερικές μάλιστα από τις χημικές ουσίες που συζητήθηκαν παραπάνω έχει αποδειχθεί ότι μπορούν να προκαλέσουν χρωμοσωμικές αλλοιώσεις, οι οποίες αποτελούν κύριο χαρακτηριστικό της νόσου [16].

5.4.2 ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ ΚΙΝΔΥΝΟΥ ΜΕ ΤΗΝ ΕΚΔΗΛΩΣΗ ΤΩΝ ΕΙΔΙΚΩΝ ΑΛΛΟΙΩΣΕΩΝ ΤΗΣ ΧΛΛ

Όπως ειπώθηκε παραπάνω κάποιες χημικές ουσίες όπως φυτοφάρμακα και πετρελαιοειδή μπορούν να προκαλέσουν χρωμοσωμικές αλλοιώσεις, οι οποίες αποτελούν κύριο χαρακτηριστικό της νόσου και να συμβάλλουν στην παθογένεια της ΧΛΛ [142-145]. Στην παρούσα διατριβή μελετήθηκε η σχέση της έκθεσης των ασθενών σε διάφορους γενοτοξικούς παράγοντες με την εκδήλωση των συνηθέστερων χρωμοσωμικών αλλοιώσεων της νόσου. Έτσι προέκυψαν δύο θετικές συσχετίσεις που αφορούσαν την έλλειψη της περιοχής 11q και την έλλειψη της περιοχής 13q.

Ειδικότερα το ποσοστό των ασθενών που είχαν εκτεθεί σε χημικά λιπάσματα/φυτοφάρμακα έφερε συχνότερα την έλλειψη del(11q) σε σχέση με αυτούς που δεν είχαν εκτεθεί. Επίσης παρατηρήθηκε ότι οι ασθενείς που είχαν εκτεθεί στα χημικά αυτά διέτρεχαν 4.34 φορές μεγαλύτερο κίνδυνο να εμφανίσουν την del(11q) και επομένως να έχουν σημαντικά χειρότερη πρόγνωση σε σχέση με τους καρυοτυπικά φυσιολογικούς ασθενείς (OR=4.34, 95% CI= 1.00-19.16, P= 0.050). Έπειτα από ανασκόπηση της βιβλιογραφίας βρέθηκε ότι δεν έχει μέχρι σήμερα παρατηρηθεί συσχέτιση της del(11q) με την έκθεση στα χημικά λιπάσματα/φυτοφάρμακα. Οι μοναδικές ενδείξεις που υπάρχουν αφορούν την έκθεση στο βενζόλιο η οποία μπορεί να δημιουργήσει θραύσεις στη χρωμοσωμική περιοχή 11q23 [78]. Η αναζήτηση των τοξικών ουσιών που περιέχονται στα φυτοφάρμακα οδήγησε στην ανακάλυψη ότι πολλά από αυτά έχουν ως κύριο συνθετικό τους το βενζόλιο. Τα τελευταία μάλιστα θεωρούνται από τα καλύτερα εντομοκτόνα και για αυτό χρησιμοποιούνται ευρέως (~40 σκευάσματα) στη γεωργία για την απολύμανση των προς φύτευση ή προς βρώση σπόρων αλλά και σε άλλες εφαρμογές του εδάφους [146]. Επίσης η φωσφίνη που περιέχεται σε αρκετά φυτοφάρμακα έχει ενοχοποιηθεί για χρωμοσωμικές θραύσεις και ελλείψεις κυρίως στις περιοχές 1p13, 14q32 και 21q22 οι οποίες έχουν σχετιστεί με το λέμφωμα non-Hodgkin [142].

Στην παρούσα διατριβή η έλλειψη χρωμοσωμικής περιοχής στον βραχίονα 13q συνδέθηκε με τους ασθενείς των οποίων τα επαγγέλματα ήταν σχετικά με την κατασκευή πλαστικού, ελαστικών και γενικότερα καουτσούκ. Όσοι από τους ασθενείς είχαν εκτεθεί στους παραπάνω παράγοντες είχαν μέχρι και ~11 φορές

μεγαλύτερη πιθανότητα να εμφανίσουν del(13q) (OR=11.18, 95% CI= 1.43-82.27, P=0,044). Οι εργαζόμενοι σε αυτές τις βιομηχανίες δέχονται καθημερινά έκθεση σε διάφορες καρκινογόνες ουσίες όπως αρωματικές αμίνες, νιτροζαμίνες, πολυκυκλικούς αρωματικούς υδρογονάνθρακες, διαλύτες, και αμιάντο [147]. Όπως ήδη ειπώθηκε αναλυτικά παραπάνω (§5.4.1) οι περισσότερες από αυτές τις ουσίες έχουν συνδεθεί με την εκδήλωση της νόσου. Επίσης υπάρχουν αναφορές εργαζομένων σε βιομηχανίες ελαστικών που παρουσίασαν υψηλότερη συχνότητα εκδήλωσης χρωμοσωμικών ανωμαλιών [148]. Όμως βιβλιογραφικές αναφορές για τη σχέση της del(13q) με την έκθεση στους συγκεκριμένους παράγοντες δεν υπάρχουν.

Οικογενειακό ιστορικό

Στην παρούσα εργασία οι ασθενείς κατηγοριοποιήθηκαν με βάση τις χρωμοσωμικές τους αλλοιώσεις και ελέγχθηκαν ως προς την ύπαρξη ή μη οικογενειακού ιστορικού. Προέκυψε ότι οι ασθενείς που είχαν συγγενείς α΄ βαθμού οι οποίοι έπασχαν από ΧΛΛ ή κάποιο άλλο είδος κακοήθειας εμφάνισαν συχνότερα την έλλειψη del(11q) (P=0.019). Επίσης, όσοι ασθενείς έφεραν τις ελλείψεις del(11q) (P=0.000) και del(13q) (P=0.034) αλλά και την τρισωμία 12 (P=0.014) είχαν σε μεγαλύτερο ποσοστό πατέρα που έπασχε από ΧΛΛ ή από κάποια άλλη κακοήθεια. Παρόλο που είναι γνωστή η γενετική προδιάθεση της νόσου παρόμοιες συσχετίσεις δεν έχουν αναφερθεί στη βιβλιογραφία με εξαίρεση την έλλειψη στην περιοχή 13q. Συγκεκριμένα, οι Ng και συνεργάτες εξέτασαν 14 περιστατικά με οικογενή ΧΛΛ εκ των οποίων τα 12 (85.7%) έφεραν την έλλειψη del(13q), η οποία συνήθως ανιχνεύεται σε αρκετά μικρότερο ποσοστό (50-60%) στη σποραδική ΧΛΛ [149]. Επίσης σε μελέτη που αφορούσε μια 15μελή οικογένεια 3 γενεών, στην οποία τα 7 άτομα ήταν διαγνωσμένα με ΧΛΛ, ανιχνεύτηκε στα 6 από τα 7 άτομα με ΧΛΛ η έλλειψη del(13q), εκ των οποίων οι 2 έφεραν τη del(13q) σε συνδυασμό με την τρισωμία 12 [150]. Είναι αξιοσημείωτο το γεγονός ότι στην συγκεκριμένη οικογένεια έπασχε αρχικά ο πατέρας ο οποίος «κληρονόμησε» τη νόσο σε όλους τους απογόνους του οι οποίοι τύχαινε να είναι άρρενες [150]. Το εύρημα αυτό ενισχύει τα αποτελέσματα της παρούσας διατριβής που αφορούν στην πιθανή κληρονομική μορφή της νόσου με del(13q) και +12. Από την άλλη η μοναδική πληροφορία που υπάρχει για την έλλειψη del(11q) έρχεται από τις ΗΠΑ όπου σε μελέτη 4698 ασθενών με ΧΛΛ βρέθηκε ότι το ποσοστό των ανδρών που έφερε τη συγκεκριμένη έλλειψη ήταν 2,5 φορές μεγαλύτερο σε σχέση με αυτό των γυναικών [93].

5.5 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Εν κατακλείδι από την παρούσα διατριβή προέκυψαν τα παρακάτω συμπεράσματα

- ♣ Η μέση ηλικία των ασθενών ήταν τα 64.9 έτη, παρόμοια με αυτήν της βιβλιογραφίας με τη διαφορά ότι το ποσοστό των ασθενών ηλικίας <45 ήταν αυξημένο γεγονός που υποδεικνύει την τάση της ΧΛΛ να εμφανίζεται πλέον συχνότερα και σε νεότερες ηλικίες.
- ♣ Οι ασθενείς μικρότερης ηλικίας (<65 ετών) έφεραν συχνότερα κυτταρογενετικές αλλοιώσεις, οι οποίες μάλιστα ήταν χειρότερης πρόγνωσης μειούμενης της ηλικίας. Επομένως η ΧΛΛ φαίνεται να εμφανίζεται στις μικρότερες ηλικίες με χειρότερη πρόγνωση και άρα με επιθετικότερη μορφή.
- ♣ Η ΧΛΛ προσβάλλει με μεγαλύτερη συχνότητα τους άνδρες από ότι τις γυναίκες (Α/Γ: 1.63).
- ♣ Ο νέος συνδυασμός διεγερτών DSP-30/IL-2 αποδείχθηκε καταλληλότερος για την διέγερση των παθολογικών β-κυττάρων της ΧΛΛ αφού αποδείχτηκε ότι αυξάνει το μιτωτικό δείκτη των κυττάρων της ΧΛΛ και ανιχνεύει κλωνικές αλλοιώσεις οι οποίες τις περισσότερες φορές δεν ανιχνεύονται στις αδιέγερτες και στις διεγερμένες με το TPA καλλιέργειες.
- ♣ Από την καρυοτυπική ανάλυση προέκυψαν χρωμοσωμικές ανωμαλίες στο 62.4% των ασθενών με ΧΛΛ εκ των οποίων το 31.6% εμφάνισε σύνθετους καρυοτύπους και το 47.8% έφερε καρυότυπο με μία μόνο κλωνική αλλοίωση.
- ♣ Στους ανώμαλους καρυοτύπους τη μεγαλύτερη συχνότητα εμφάνισαν οι ελλείψεις χρωμοσωμάτων και χρωμοσωμικών περιοχών γεγονός που υποδεικνύει ότι η έλλειψη γενετικού υλικού που πιθανότατα έχει ως αποτέλεσμα την απώλεια ή αδρανοποίηση γονιδίων φαίνεται να κατέχει σημαντικό ρόλο στην παθογένεια της νόσου.

-
- ♣ Οι συχνότερες χρωμοσωμικές αλλοιώσεις που ανιχνεύτηκαν στον καρυότυπο ήταν η τρισωμία 12 και η έλλειψη del(13q).
 - ♣ Τα καρυοτυπικά αποτελέσματα της παρούσας κυτταρογενετικής μελέτης ανέδειξαν ένα πλήθος διαφορετικών χρωμοσωμικών αλλοιώσεων μεταξύ των οποίων και κάποιες σπάνιες ή πρωτοπεριγραφόμενες αλλοιώσεις. Η προγνωστική αξία της πλειοψηφίας αυτών είναι ως τώρα άγνωστη και χρειάζεται περαιτέρω διερεύνηση.
 - ♣ Η τεχνική FISH η οποία πραγματοποιήθηκε στοχευμένα για τις 5 συνηθέστερες αλλοιώσεις της ΧΛΛ ανέδειξε ανώμαλα πρότυπα υβριδισμού στο ~70% των ασθενών με συχνότερη την έλλειψη της περιοχής 13q14.3. Επίσης οι ελλείψεις των περιοχών 17p14.3 και 11q22.3 ανιχνεύτηκαν με μεγαλύτερη συχνότητα στη FISH σε σχέση με τον καρυότυπο διότι είναι υπομικροσκοπικές καθιστώντας τη μέθοδο FISH καλύτερη τεχνική για την ανίχνευσή τους.
 - ♣ Η κυτταρογενετική πολυπλοκότητα και ετερογένεια των υπό μελέτη ΧΛΛ δειγμάτων αναδείχτηκε μέσω του καρυότυπου ο οποίος παρέχει τη δυνατότητα ελέγχου ολόκληρου του γονιδιώματος.
 - ♣ Η FISH που εφαρμόζεται τόσο σε μεσοφασικούς πυρήνες όσο και σε μεταφάσεις υπερτερεί του καρυότυπου στην ανίχνευση υπομικροσκοπικών χρωμοσωμικών αλλοιώσεων της νόσου και στη δυνατότητα μελέτης του δείγματος απουσία μεταφάσεων ή ύπαρξης κακής μορφολογίας χρωμοσωμάτων.
 - ♣ Οι διαφορετικές δυνατότητες του καρυότυπου και της FISH επιβάλλουν την παράλληλη εφαρμογή τους για τη διερεύνηση της ΧΛΛ συμβάλλοντας έτσι στη διάγνωση, πρόγνωση, σταδιοποίηση και θεραπευτική προσέγγιση των ασθενών αλλά και στην έρευνα για την παθογένεια της νόσου.
 - ♣ Ο πολυμορφισμός UGT1A1*28 ενδέχεται να αποτελεί προδιαθεσικό παράγοντα κινδύνου για τις περιπτώσεις της ΧΛΛ που φέρουν τρισωμία 12 ή/και έλλειψη της περιοχής 11q22 λόγω της μειωμένης ενζυμικής ενεργότητας εξαιτίας του

πολυμορφισμού που έχει ως αποτέλεσμα τον ανεπαρκή μεταβολισμό των τοξικών εκείνων ουσιών που εμπλέκονται στην παθογένεια της ΧΛΛ.

♣ Ως ανεξάρτητοι πιθανοί παράγοντες κινδύνου για την εκδήλωση της ΧΛΛ αναδείχτηκαν:

1. Το οικογενειακό ιστορικό των ασθενών που έχουν συγγενείς α΄ βαθμού με ΧΛΛ ή άλλου είδους κακοήθεια.
2. Η ιονίζουσα ακτινοβολία αφού τα άτομα που είχαν εκτεθεί σε αυτή εξαιτίας ιατρικών σκοπών εμφάνισαν τριπλάσιο κίνδυνο εκδήλωσης ΧΛΛ
3. Τα πετρελαιοειδή αφού τα άτομα που είχαν εκτεθεί κυρίως μέσω της εργασίας τους παρουσίασαν περίπου 6 φορές μεγαλύτερη πιθανότητα να εκδηλώσουν τη νόσο
4. Τα φυτοφάρμακα/χημικά λιπάσματα. Τα άτομα που ασχολούνται με τη συστηματική χρήση χημικών λιπασμάτων και φυτοφαρμάκων διατρέχουν περίπου τετραπλάσιο κίνδυνο για την εκδήλωση της ΧΛΛ
5. Ο αριθμός των διαφορετικών εκθέσεων. Το ποσοστό των ασθενών που είχε δεχτεί 2 ή περισσότερες εκθέσεις στους παραπάνω παράγοντες κινδύνου ήταν αυξημένο σε σχέση με αυτό των μαρτύρων. Παρατηρήθηκε ότι όσο αυξάνεται ο αριθμός των διαφορετικών εκθέσεων που δέχεται ένα άτομο τόσο αυξάνεται και η πιθανότητα να ασθενήσει από ΧΛΛ.

♣ Ως πιθανοί παράγοντες κινδύνου για τη δημιουργία των ειδικών αλλοιώσεων της ΧΛΛ αναδείχτηκαν:

1. Το οικογενειακό ιστορικό των ασθενών. Οι ασθενείς που είχαν πατέρα με ΧΛΛ εμφάνιζαν συχνότερα τις χρωμοσωμικές αλλοιώσεις del(11q), del(13q) και την τρισωμία 12 σε σχέση με τους υπόλοιπους ασθενείς.
2. Χημικά λιπάσματα/φυτοφάρμακα. Οι ασθενείς που είχαν εκτεθεί στα χημικά αυτά διέτρεχαν 4.34 φορές μεγαλύτερο κίνδυνο να εμφανίσουν την del(11q) και επομένως να έχουν σημαντικά χειρότερη πρόγνωση σε σχέση με τους καρυοτυπικά φυσιολογικούς ασθενείς

-
3. Καουτσούκ. Η έλλειψη del(13q) συσχετίστηκε με τους ασθενείς των οποίων τα επαγγέλματα ήταν σχετικά με την κατασκευή πλαστικού, ελαστικών και γενικότερα καουτσούκ και βρέθηκε ότι διέτρεχαν ~11 φορές μεγαλύτερη πιθανότητα να εμφανίσουν τη συγκεκριμένη έλλειψη.

6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

-
- [1] Smolewski P, Witkowska M, Korycka-Wolowicz A. New Insights into Biology, Prognostic Factors, and Current Therapeutic Strategies in Chronic Lymphocytic Leukemia. *ISRN Oncol* 2013;2013:740615.
- [2] Müller-Hermelink H, Montserrat E, Catovsky D. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer, 2008.
- [3] Speedy HE, Sava G, Houlston RS. Inherited susceptibility to CLL. *Adv Exp Med Biol* 2013;792:293-308.
- [4] Δήμου Μ, Παναγιωτίδης Π. Νέες θεραπείες στη Χρόνια Λεμφοκυτταρική Λευχαιμία (ΧΛΛ). *Haema* 2013;4 (4):41-9.
- [5] Goldin LR, Slager SL. Familial CLL: genes and environment. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2007:339-45.
- [6] Σταματόπουλος Κ, Smilevska T, Χατζή Κ, Χατζηδημητρίου Α. Μοριακοί Δείκτες. *Haema*. Αθήνα: Αιματολογική Κλινική και Μονάδα Μεταμόσχευσης Αιμοποιητικών Κυττάρων, Νοσοκομείο 'Γ. Παπανικολάου', 2004. pp. 130-6.
- [7] Chen J, McMillan NA. Molecular basis of pathogenesis, prognosis and therapy in chronic lymphocytic leukaemia. *Cancer Biol Ther* 2008;7 (2):174-9.
- [8] Ishibe N, Sgambati MT, Fontaine L, Goldin LR, Jain N, Weissman N, Marti GE, Caporaso NE. Clinical characteristics of familial B-CLL in the National Cancer Institute Familial Registry. *Leuk Lymphoma* 2001;42 (1-2):99-108.
- [9] Rawstron AC, Yuille MR, Fuller J, Cullen M, Kennedy B, Richards SJ, Jack AS, Matutes E, Catovsky D, Hillmen P, Houlston RS. Inherited predisposition to CLL is detectable as subclinical monoclonal B-lymphocyte expansion. *Blood* 2002;100 (7):2289-90.
- [10] Marti GE, Rawstron AC, Ghia P, Hillmen P, Houlston RS, Kay N, Schleinitz TA, Caporaso N. Diagnostic criteria for monoclonal B-cell lymphocytosis. *Br J Haematol* 2005;130 (3):325-32.
- [11] Wiernik PH, Ashwin M, Hu XP, Paietta E, Brown K. Anticipation in familial chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol* 2001;113 (2):407-14.
- [12] Yuille MR, Houlston RS, Catovsky D. Anticipation in familial chronic lymphocytic leukaemia. *Leukemia* 1998;12 (11):1696-8.
- [13] Hamblin TJ. Just exactly how common is CLL? *Leuk Res* 2009;33 (11):1452-3.
- [14] de Lima M, O'Brien S, Lerner S, Keating MJ. Chronic lymphocytic leukemia in the young patient. *Semin Oncol* 1998;25 (1):107-16.
- [15] www.leukemia-lymphoma.org.
- [16] Blair A, Purdue MP, Weisenburger DD, Baris D. Chemical exposures and risk of chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol* 2007;139 (5):753-61.
- [17] Richardson DB, Wing S, Schroeder J, Schmitz-Feuerhake I, Hoffmann W. Ionizing radiation and chronic lymphocytic leukemia. *Environ Health Perspect* 2005;113 (1):1-5.
- [18] Linet MS, Schubauer-Berigan MK, Weisenburger DD, Richardson DB, Landgren O, Blair A, Silver S, Field RW, Caldwell G, Hatch M, Dores GM. Chronic lymphocytic leukaemia: an overview of aetiology in light of recent developments in classification and pathogenesis. *Br J Haematol* 2007;139 (5):672-86.
- [19] Vrijheid M, Cardis E, Ashmore P, Auvinen A, Gilbert E, Habib RR, Malke H, Muirhead CR, Richardson DB, Rogel A, Schubauer-Berigan M, Tardy H, Telle-Lamberton M. Ionizing radiation and risk of chronic lymphocytic leukemia in the 15-country study of nuclear industry workers. *Radiat Res* 2008;170 (5):661-5.
- [20] Schubauer-Berigan MK, Daniels RD, Fleming DA, Markey AM, Couch JR, Ahrenholz SH, Burphy JS, Anderson JL, Tseng CY. Chronic lymphocytic leukaemia and radiation: findings among workers at five US nuclear facilities and a review of the recent literature. *Br J Haematol* 2007;139 (5):799-808.
- [21] Tynes T, Haldorsen T. Residential and occupational exposure to 50 Hz magnetic fields and hematological cancers in Norway. *Cancer Causes Control* 2003;14 (8):715-20.
- [22] Floderus B, Persson T, Stenlund C, Wennberg A, Ost A, Knave B. Occupational exposure to electromagnetic fields in relation to leukemia and brain tumors: a case-control study in Sweden. *Cancer Causes Control* 1993;4 (5):465-76.
- [23] Nanni O, Amadori D, Lugaresi C, Falcini F, Scarpi E, Saragoni A, Buiatti E. Chronic lymphocytic leukaemias and non-Hodgkin's lymphomas by histological type in farming-animal breeding workers: a population case-control study based on a priori exposure matrices. *Occup Environ Med* 1996;53 (10):652-7.

-
- [24] Hatzissabas I, Krueger GR, Medina JR, Bedoya VA, Papadakis T. Environmental pollution and malignant lymphomas: a tentative contribution to geographic pathology. *Anticancer Res* 1993;13 (2):411-7.
- [25] Khalade A, Jaakkola MS, Pukkala E, Jaakkola JJ. Exposure to benzene at work and the risk of leukemia: a systematic review and meta-analysis. *Environ Health* 2010;9:31.
- [26] Caligaris-Cappio F. Chronic lymphocytic leukemia: "Cinderella" is becoming a star. *Mol Med* 2009;15 (3-4):67-9.
- [27] Austin H, Cole P. Cigarette smoking and leukemia. *J Chronic Dis* 1986;39 (6):417-21.
- [28] Tzoura E, Roussou P. B-chronic lymphocytic leukemia – latest developments. *Archives of Hellenic Medicine* 2008;25 (1):60-72.
- [29] Stevenson FK, Caligaris-Cappio F. Chronic lymphocytic leukemia: revelations from the B-cell receptor. *Blood* 2004;103 (12):4389-95.
- [30] Hamblin T. Chronic lymphocytic leukaemia: one disease or two? *Ann Hematol* 2002;81 (6):299-303.
- [31] Martin-Subero JI, Lopez-Otin C, Campo E. Genetic and epigenetic basis of chronic lymphocytic leukemia. *Curr Opin Hematol*;20 (4):362-8.
- [32] Fais F, Ghiotto F, Hashimoto S, Sellars B, Valetto A, Allen SL, Schulman P, Vinciguerra VP, Rai K, Rassenti LZ, Kipps TJ, Dighiero G, Schroeder HW, Jr., Ferrarini M, Chiorazzi N. Chronic lymphocytic leukemia B cells express restricted sets of mutated and unmutated antigen receptors. *J Clin Invest* 1998;102 (8):1515-25.
- [33] Ghiotto F, Fais F, Valetto A, Albesiano E, Hashimoto S, Dono M, Ikematsu H, Allen SL, Kolitz J, Rai KR, Nardini M, Tramontano A, Ferrarini M, Chiorazzi N. Remarkably similar antigen receptors among a subset of patients with chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Invest* 2004;113 (7):1008-16.
- [34] Messmer BT, Albesiano E, Efremov DG, Ghiotto F, Allen SL, Kolitz J, Foa R, Damle RN, Fais F, Messmer D, Rai KR, Ferrarini M, Chiorazzi N. Multiple distinct sets of stereotyped antigen receptors indicate a role for antigen in promoting chronic lymphocytic leukemia. *J Exp Med* 2004;200 (4):519-25.
- [35] Tobin G. The immunoglobulin genes: structure and specificity in chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Lymphoma* 2007;48 (6):1081-6.
- [36] Klein U, Tu Y, Stolovitzky GA, Mattioli M, Cattoretti G, Husson H, Freedman A, Inghirami G, Cro L, Baldini L, Neri A, Califano A, Dalla-Favera R. Gene expression profiling of B cell chronic lymphocytic leukemia reveals a homogeneous phenotype related to memory B cells. *J Exp Med* 2001;194 (11):1625-38.
- [37] Goldsby R, Kindt T, Osborne B, Kuby J. *Ανοσολογία*. Αθήνα: Ιατρικές Εκδόσεις Πασχαλίδης, 2007.
- [38] Bertilaccio MT, Scielzo C, Muzio M, Caligaris-Cappio F. An overview of chronic lymphocytic leukaemia biology. *Best Pract Res Clin Haematol* 2010;23 (1):21-32.
- [39] Hallek M, Cheson BD, Catovsky D, Caligaris-Cappio F, Dighiero G, Dohner H, Hillmen P, Keating MJ, Montserrat E, Rai KR, Kipps TJ. Guidelines for the diagnosis and treatment of chronic lymphocytic leukemia: a report from the International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia updating the National Cancer Institute-Working Group 1996 guidelines. *Blood* 2008;111 (12):5446-56.
- [40] DiRaimondo F, Albitar M, Huh Y, O'Brien S, Montillo M, Tedeschi A, Kantarjian H, Lerner S, Giustolisi R, Keating M. The clinical and diagnostic relevance of CD23 expression in the chronic lymphoproliferative disease. *Cancer* 2002;94 (6):1721-30.
- [41] Chiorazzi N. Implications of new prognostic markers in chronic lymphocytic leukemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2012;2012:76-87.
- [42] Heim S, Mitelman F. *Cancer Cytogenetics*, 2009.
- [43] Montserrat E, Moreno C. Chronic lymphocytic leukaemia: a short overview. *Ann Oncol* 2008;19 Suppl 7:vii320-5.
- [44] Inamdar KV, Bueso-Ramos CE. Pathology of chronic lymphocytic leukemia: an update. *Ann Diagn Pathol* 2007;11 (5):363-89.
- [45] Matutes E, Owusu-Ankomah K, Morilla R, Garcia Marco J, Houlihan A, Que TH, Catovsky D. The immunological profile of B-cell disorders and proposal of a scoring system for the diagnosis of CLL. *Leukemia* 1994;8 (10):1640-5.
- [46] Matutes E, Wotherspoon A, Catovsky D. Differential diagnosis in chronic lymphocytic leukaemia. *Best Pract Res Clin Haematol* 2007;20 (3):367-84.
- [47] Rai KR, Sawitsky A, Cronkite EP, Chanana AD, Levy RN, Pasternack BS. Clinical staging of chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 1975;46 (2):219-34.

-
- [48] Binet JL, Auquier A, Dighiero G, Chastang C, Piguët H, Goasguen J, Vaugier G, Potron G, Colona P, Oberling F, Thomas M, Tchernia G, Jacquillat C, Boivin P, Lesty C, Duault MT, Monconduit M, Belabbès S, Gremy F. A new prognostic classification of chronic lymphocytic leukemia derived from a multivariate survival analysis. *Cancer* 1981;48 (1):198-206.
- [49] Moreno C, Montserrat E. New prognostic markers in chronic lymphocytic leukemia. *Blood Rev* 2008;22 (4):211-9.
- [50] Dohner H, Stilgenbauer S, Benner A, Leupolt E, Krober A, Bullinger L, Dohner K, Bentz M, Lichter P. Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 2000;343 (26):1910-6.
- [51] Chiorazzi N, Rai KR, Ferrarini M. Chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 2005;352 (8):804-15.
- [52] Gribben JG. Molecular profiling in CLL. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2008:444-9.
- [53] Adams GP, Weiner LM. Monoclonal antibody therapy of cancer. *Nat Biotechnol* 2005;23 (9):1147-57.
- [54] <http://t2.gstatic.com/images?q=tbn:ZNK Cp8jFmt->
- [55] Shaffer L, McGowan-Jordan J, Schmid M. An International System for Human Cytogenetic Nomenclature, ISCN (2013), 2013.
- [56] Kienle DL, Korz C, Hosch B, Benner A, Mertens D, Habermann A, Krober A, Jäger U, Lichter P, Dohner H, Stilgenbauer S. Evidence for distinct pathomechanisms in genetic subgroups of chronic lymphocytic leukemia revealed by quantitative expression analysis of cell cycle, activation, and apoptosis-associated genes. *J Clin Oncol* 2005;23 (16):3780-92.
- [57] Leja D. <http://www.genome.gov/12514471> National Human Genome Research Institute (NHGRI)
- [58] Veldman T, Vignon C, Schrock E, Rowley JD, Ried T. Hidden chromosome abnormalities in haematological malignancies detected by multicolour spectral karyotyping. *Nat Genet* 1997;15 (4):406-10.
- [59] Haferlach C, Dicker F, Schnittger S, Kern W, Haferlach T. Comprehensive genetic characterization of CLL: a study on 506 cases analysed with chromosome banding analysis, interphase FISH, IgV(H) status and immunophenotyping. *Leukemia* 2007;21 (12):2442-51.
- [60] Buhmann R, Kurzeder C, Rehkla J, Westhaus D, Bursch S, Hiddemann W, Haferlach T, Hallek M, Schoch C. CD40L stimulation enhances the ability of conventional metaphase cytogenetics to detect chromosome aberrations in B-cell chronic lymphocytic leukaemia cells. *Br J Haematol* 2002;118 (4):968-75.
- [61] Dicker F, Schnittger S, Haferlach T, Kern W, Schoch C. Immunostimulatory oligonucleotide-induced metaphase cytogenetics detect chromosomal aberrations in 80% of CLL patients: A study of 132 CLL cases with correlation to FISH, IgVH status, and CD38 expression. *Blood* 2006;108 (9):3152-60.
- [62] Rigolin GM, Cibien F, Martinelli S, Formigaro L, Rizzotto L, Tammiso E, Saccenti E, Bardi A, Cavazzini F, Ciccone M, Nichele I, Pizzolo G, Zaja F, Fanin R, Galieni P, Dalsass A, Mestichelli F, Testa N, Negrini M, Cuneo A. Chromosome aberrations detected by conventional karyotyping using novel mitogens in chronic lymphocytic leukemia with "normal" FISH: correlations with clinicobiologic parameters. *Blood* 2012;119 (10):2310-3.
- [63] Shi M, Cipollini MJ, Crowley-Bish PA, Higgins AW, Yu H, Miron PM. Improved detection rate of cytogenetic abnormalities in chronic lymphocytic leukemia and other mature B-cell neoplasms with use of CpG-oligonucleotide DSP30 and interleukin 2 stimulation. *Am J Clin Pathol* 2013;139 (5):662-9.
- [64] Rodriguez-Vicente AE, Diaz MG, Hernandez-Rivas JM. Chronic lymphocytic leukemia: a clinical and molecular heterogeneous disease. *Cancer Genet* 2013;206 (3):49-62.
- [65] Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Hematology, atlasgeneticsoncology.org
- [66] Buhl AM, Jurlander J, Jorgensen FS, Ottesen AM, Cowland JB, Gjerdrum LM, Hansen BV, Leffers H. Identification of a gene on chromosome 12q22 uniquely overexpressed in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2006;107 (7):2904-11.
- [67] Krober A, Seiler T, Benner A, Bullinger L, Brückle E, Lichter P, Dohner H, Stilgenbauer S. V(H) mutation status, CD38 expression level, genomic aberrations, and survival in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2002;100 (4):1410-6.
- [68] Van Dyke DL, Shanafelt TD, Call TG, Zent CS, Smoley SA, Rabe KG, Schwager SM, Sonbert JC, Slager SL, Kay NE. A comprehensive evaluation of the prognostic significance of

-
- 13q deletions in patients with B-chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol*;148 (4):544-50.
- [69] Dal Bo M, Rossi FM, Rossi D, Deambrogi C, Bertoni F, Del Giudice I, Palumbo G, Nanni M, Rinaldi A, Kwee I, Tissino E, Corradini G, Gozzetti A, Cencini E, Ladetto M, Coletta AM, Luciano F, Bulian P, Pozzato G, Laurenti L, Forconi F, Di Raimondo F, Marasca R, Del Poeta G, Gaidano G, Foa R, Guarini A, Gattei V. 13q14 deletion size and number of deleted cells both influence prognosis in chronic lymphocytic leukemia. *Genes Chromosomes Cancer*;50 (8):633-43.
- [70] Klein U, Lia M, Crespo M, Siegel R, Shen Q, Mo T, Ambesi-Impimbato A, Califano A, Migliazza A, Bhagat G, Dalla-Favera R. The DLEU2/miR-15a/16-1 cluster controls B cell proliferation and its deletion leads to chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Cell*;17 (1):28-40.
- [71] Gribben JG. How I treat CLL up front. *Blood* 2010;115 (2):187-97.
- [72] Stilgenbauer S, Dohner H. Campath-1H-induced complete remission of chronic lymphocytic leukemia despite p53 gene mutation and resistance to chemotherapy. *N Engl J Med* 2002;347 (6):452-3.
- [73] Mehes G. Chromosome abnormalities with prognostic impact in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Pathol Oncol Res* 2005;11 (4):205-10.
- [74] Karakosta M, Tsakiridou A, Korantzis I, Manola KN. Deletion of 5q as a rare abnormality in chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Genet Cytogenet* 2010;200 (2):175-9.
- [75] Shanafelt TD, Geyer SM, Kay NE. Prognosis at diagnosis: integrating molecular biologic insights into clinical practice for patients with CLL. *Blood* 2004;103 (4):1202-10.
- [76] Cavazzini F, Hernandez JA, Gozzetti A, Russo Rossi A, De Angeli C, Tiseo R, Bardi A, Tammiso E, Crupi R, Lenoci MP, Forconi F, Lauria F, Marasca R, Maffei R, Torelli G, Gonzalez M, Martin-Jimenez P, Maria Hernandez J, Rigolin GM, Cuneo A. Chromosome 14q32 translocations involving the immunoglobulin heavy chain locus in chronic lymphocytic leukaemia identify a disease subset with poor prognosis. *Br J Haematol* 2008;142 (4):529-37.
- [77] Ganster C, Neesen J, Zehetmayer S, Jager U, Esterbauer H, Mannhalter C, Kluge B, Fonatsch C. DNA repair polymorphisms associated with cytogenetic subgroups in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Genes Chromosomes Cancer* 2009;48 (9):760-7.
- [78] Yuille M, Condie A, Hudson C, Kote-Jarai Z, Stone E, Eeles R, Matutes E, Catovsky D, Houlston R. Relationship between glutathione S-transferase M1, T1, and P1 polymorphisms and chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2002;99 (11):4216-8.
- [79] Shulman K, Cohen I, Barnett-Griness O, Kuten A, Gruber SB, Lejbkowitz F, Rennert G. Clinical implications of UGT1A1*28 genotype testing in colorectal cancer patients. *Cancer* 2011;117 (14):3156-62.
- [80] Crowther-Swanepoel D, Corre T, Lloyd A, Gaidano G, Olver B, Bennett FL, Doughty C, Toniolo D, Caligaris-Cappio F, Ghia P, Rossi D, Rawstron AC, Catovsky D, Houlston RS. Inherited genetic susceptibility to monoclonal B-cell lymphocytosis. *Blood* 2010;116 (26):5957-60.
- [81] Girard H, Thibaudeau J, Court MH, Fortier LC, Villeneuve L, Caron P, Hao Q, von Moltke LL, Greenblatt DJ, Guillemette C. UGT1A1 polymorphisms are important determinants of dietary carcinogen detoxification in the liver. *Hepatology* 2005;42 (2):448-57.
- [82] Gong QH, Cho JW, Huang T, Potter C, Gholami N, Basu NK, Kubota S, Carvalho S, Pennington MW, Owens IS, Popescu NC. Thirteen UDPglucuronosyltransferase genes are encoded at the human UGT1 gene complex locus. *Pharmacogenetics* 2001;11 (4):357-68.
- [83] Clarke DJ, Moghrabi N, Monaghan G, Cassidy A, Boxer M, Hume R, Burchell B. Genetic defects of the UDP-glucuronosyltransferase-1 (UGT1) gene that cause familial non-haemolytic unconjugated hyperbilirubinaemias. *Clin Chim Acta* 1997;266 (1):63-74.
- [84] Hu Z, Wells PG. Human interindividual variation in lymphocyte UDP-glucuronosyltransferases as a determinant of in vitro benzo[a]pyrene covalent binding and cytotoxicity. *Toxicol Sci* 2004;78 (1):32-40.
- [85] Bock KW. Functions and transcriptional regulation of adult human hepatic UDP-glucuronosyl-transferases (UGTs): mechanisms responsible for interindividual variation of UGT levels. *Biochem Pharmacol* 2010;80 (6):771-7.
- [86] Lacko M, Roelofs HM, Te Morsche RH, Voogd AC, Ophuis MB, Peters WH, Manni JJ. Genetic polymorphism in the conjugating enzyme UGT1A1 and the risk of head and neck cancer. *Int J Cancer* 2010;127 (12):2815-21.
- [87] Iolascon A, Faienza MF, Centra M, Storelli S, Zelante L, Savoia A. (TA)8 allele in the UGT1A1 gene promoter of a Caucasian with Gilbert's syndrome. *Haematologica* 1999;84 (2):106-9.

-
- [88] Grant DJ, Bell DA. Bilirubin UDP-glucuronosyltransferase 1A1 gene polymorphisms: susceptibility to oxidative damage and cancer? *Mol Carcinog* 2000;29 (4):198-204.
- [89] French D, Wilkinson MR, Yang W, de Chaisemartin L, Cook EH, Das S, Ratain MJ, Evans WE, Downing JR, Pui CH, Relling MV. Global gene expression as a function of germline genetic variation. *Hum Mol Genet* 2005;14 (12):1621-9.
- [90] Ekins S, Wrighton SA. The role of CYP2B6 in human xenobiotic metabolism. *Drug Metab Rev* 1999;31 (3):719-54.
- [91] Borlak J, Thum T, Landt O, Erb K, Hermann R. Molecular diagnosis of a familial nonhemolytic hyperbilirubinemia (Gilbert's syndrome) in healthy subjects. *Hepatology* 2000;32 (4 Pt 1):792-5.
- [92] Karakosta M, Voulgarelis M, Vlachadami I, Manola KN. Translocation (6;13)(p21;q14.1) as a rare nonrandom cytogenetic abnormality in chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Genet Cytogenet* 2010;198 (1):66-70.
- [93] Cantu ES, McGill JR, Stephenson CF, Hoffmann HM, Tang L, Yan J, Glassman AB. Male-to-female sex ratios of abnormalities detected by fluorescence in situ hybridization in a population of chronic lymphocytic leukemia patients. *Hematol Rep* 2013;5 (1):13-7.
- [94] Παπακωνσταντίνου Ν, Μπέλεση Χ. Χρόνια Λεμφοκυτταρική Λευχαιμία: Βιολογία και προγνωστικοί δείκτες. *Haema* 2013;4 (2):135-43.
- [95] Jahrsdorfer B, Muhlenhoff L, Blackwell SE, Wagner M, Poeck H, Hartmann E, Jox R, Giese T, Emmerich B, Endres S, Weiner GJ, Hartmann G. B-cell lymphomas differ in their responsiveness to CpG oligodeoxynucleotides. *Clin Cancer Res* 2005;11 (4):1490-9.
- [96] Αναστασιάδου Α. Κλασική και μοριακή κυτταρογενετική ανάλυση χρόνιων Β λεμφοϋπερπλαστικών νοσημάτων. *Haema* 2013;4 (2):128-34.
- [97] <http://cgap.nci.nih.gov/Chromosomes/Mitelman>. Mitelman Database of Chromosome Aberrations and Gene Fusions in Cancer. Cancer Genome Anatomy Project.
- [98] Zenz T, Mertens D, Dohner H, Stilgenbauer S. Molecular diagnostics in chronic lymphocytic leukemia - pathogenetic and clinical implications. *Leuk Lymphoma* 2008;49 (5):864-73.
- [99] Baseggio L, Geay MO, Gazzo S, Berger F, Traverse-Glehen A, French M, Hayette S, Callet-Bauchu E, Verney A, Morel D, Jallades L, Magaud JP, Salles G, Felman P. In non-follicular lymphoproliferative disorders, IGH/BCL2-fusion is not restricted to chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol* 2012;158 (4):489-98.
- [100] Cuneo A, Roberti MG, Bigoni R, Minotto C, Bardi A, Milani R, Tieghi A, Campioni D, Cavazzini F, De Angeli C, Negrini M, Castoldi G. Four novel non-random chromosome rearrangements in B-cell chronic lymphocytic leukaemia: 6p24-25 and 12p12-13 translocations, 4q21 anomalies and monosomy 21. *Br J Haematol* 2000;108 (3):559-64.
- [101] Gra OA, Glotov AS, Nikitin EA, Glotov OS, Kuznetsova VE, Chudinov AV, Sudarikov AB, Nasedkina TV. Polymorphisms in xenobiotic-metabolizing genes and the risk of chronic lymphocytic leukemia and non-Hodgkin's lymphoma in adult Russian patients. *Am J Hematol* 2008;83 (4):279-87.
- [102] Rudd MF, Sellick GS, Webb EL, Catovsky D, Houlston RS. Variants in the ATM-BRCA2-CHEK2 axis predispose to chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2006;108 (2):638-44.
- [103] Slager SL, Kay NE, Fredericksen ZS, Wang AH, Liebow M, Cunningham JM, Vachon CM, Call TG, Cerhan JR. Susceptibility genes and B-chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol* 2007;139 (5):762-71.
- [104] Fretzayas A, Moustaki M, Liapi O, Karpathios T. Gilbert syndrome. *Eur J Pediatr* 2012;171 (1):11-5.
- [105] Bajro MH, Josifovski T, Panovski M, Jankulovski N, Nestorovska AK, Matevska N, Petrushevska N, Dimovski AJ. Promoter length polymorphism in UGT1A1 and the risk of sporadic colorectal cancer. *Cancer Genet* 2012;205 (4):163-7.
- [106] Szanyi I, Rath G, Moricz P, Somogyvari K, Revesz P, Gerlinger I, Orsos Z, Ember I, Kiss I. Effects of cytochrome P450 1A1 and uridine-diphosphate-glucuronosyltransferase 1A1 allelic polymorphisms on the risk of development and the prognosis of head and neck cancers. *Eur J Cancer Prev*;21 (6):560-8.
- [107] Bosma PJ, Chowdhury JR, Bakker C, Gantla S, de Boer A, Oostra BA, Lindhout D, Tytgat GN, Jansen PL, Oude Elferink RP, et al. The genetic basis of the reduced expression of bilirubin UDP-glucuronosyltransferase 1 in Gilbert's syndrome. *N Engl J Med* 1995;333 (18):1171-5.
- [108] Pan JW, Cook LS, Schwartz SM, Weis NS. Incidence of leukemia in Asian migrants to the United States and their descendants. *Cancer Causes Control* 2002;13 (9):791-5.

-
- [109] Brown JR. Inherited predisposition to chronic lymphocytic leukemia. *Expert Rev Hematol* 2008;1 (1):51-61.
- [110] Zhang L, Rothman N, Li G, Guo W, Yang W, Hubbard AE, Hayes RB, Yin S, Lu W, Smith MT. Aberrations in chromosomes associated with lymphoma and therapy-related leukemia in benzene-exposed workers. *Environ Mol Mutagen* 2007;48 (6):467-74.
- [111] Smith MT, Zhang L, Wang Y, Hayes RB, Li G, Wiemels J, Dosemeci M, Titenko-Holland N, Xi L, Kolachana P, Yin S, Rothman N. Increased translocations and aneusomy in chromosomes 8 and 21 among workers exposed to benzene. *Cancer Res* 1998;58 (10):2176-81.
- [112] Zhang L, Rothman N, Wang Y, Hayes RB, Yin S, Titenko-Holland N, Dosemeci M, Wang YZ, Kolachana P, Lu W, Xi L, Li GL, Smith MT. Benzene increases aneuploidy in the lymphocytes of exposed workers: a comparison of data obtained by fluorescence in situ hybridization in interphase and metaphase cells. *Environ Mol Mutagen* 1999;34 (4):260-8.
- [113] Morton LM, Wang SS, Devesa SS, Hartge P, Weisenburger DD, Linet MS. Lymphoma incidence patterns by WHO subtype in the United States, 1992-2001. *Blood* 2006;107 (1):265-76.
- [114] www.chem.uoa.gr/chemicals/chem_benzene.htm.
- [115] Grodstein F, Hennekens CH, Colditz GA, Hunter DJ, Stampfer MJ. A prospective study of permanent hair dye use and hematopoietic cancer. *J Natl Cancer Inst* 1994;86 (19):1466-70.
- [116] Thun MJ, Altekruse SF, Namboodiri MM, Calle EE, Myers DG, Heath CW, Jr. Hair dye use and risk of fatal cancers in U.S. women. *J Natl Cancer Inst* 1994;86 (3):210-5.
- [117] Altekruse SF, Henley SJ, Thun MJ. Deaths from hematopoietic and other cancers in relation to permanent hair dye use in a large prospective study (United States). *Cancer Causes Control* 1999;10 (6):617-25.
- [118] Zahm SH, Weisenburger DD, Babbitt PA, Saal RC, Vaught JB, Blair A. Use of hair coloring products and the risk of lymphoma, multiple myeloma, and chronic lymphocytic leukemia. *Am J Public Health* 1992;82 (7):990-7.
- [119] Markovic-Denic L, Jankovic S, Marinkovic J, Radovanovic Z. Brick mortar exposure and chronic lymphocytic leukemia. *Neoplasma* 1995;42 (2):79-81.
- [120] Benavente Y, Garcia N, Domingo-Domenech E, Alvaro T, Font R, Zhang Y, de Sanjose S. Regular use of hair dyes and risk of lymphoma in Spain. *Int J Epidemiol* 2005;34 (5):1118-22.
- [121] Miligi L, Costantini AS, Bolejack V, Veraldi A, Benvenuti A, Nanni O, Ramazzotti V, Tumino R, Stagnaro E, Rodella S, Fontana A, Vindigni C, Vineis P. Non-Hodgkin's lymphoma, leukemia, and exposures in agriculture: results from the Italian multicenter case-control study. *Am J Ind Med* 2003;44 (6):627-36.
- [122] Landgren O, Gridley G, Check D, Caporaso NE, Morris Brown L. Acquired immune-related and inflammatory conditions and subsequent chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol* 2007;139 (5):791-8.
- [123] Landgren O, Rapkin JS, Caporaso NE, Mellekjær L, Gridley G, Goldin LR, Engels EA. Respiratory tract infections and subsequent risk of chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2007;109 (5):2198-201.
- [124] Weiss HA, Darby SC, Fearn T, Doll R. Leukemia mortality after X-ray treatment for ankylosing spondylitis. *Radiat Res* 1995;142 (1):1-11.
- [125] Wick RR, Nekolla EA, Gossner W, Kellerer AM. Late effects in ankylosing spondylitis patients treated with 224Ra. *Radiat Res* 1999;152 (6 Suppl):S8-S11.
- [126] Inskip PD, Monson RR, Wagoner JK, Stovall M, Davis FG, Kleinerman RA, Boice JD, Jr. Leukemia following radiotherapy for uterine bleeding. *Radiat Res* 1990;122 (2):107-19.
- [127] Boice JD, Cohen SS, Mumma MT, Dupree Ellis E, Eckerman KF, Leggett RW, Boecker BB, Brill AB, Henderson BE. Mortality among radiation workers at Rocketdyne (Atomics International), 1948-1999. *Radiat Res* 2006;166 (1 Pt 1):98-115.
- [128] Rericha V, Kulich M, Rericha R, Shore DL, Sandler DP. Incidence of leukemia, lymphoma, and multiple myeloma in Czech uranium miners: a case-cohort study. *Environ Health Perspect* 2006;114 (6):818-22.
- [129] Lewis RJ, Gamble JF, Jorgensen G. Mortality among three refinery/petrochemical plant cohorts. I. 1970 to 1982 active/terminated workers. *J Occup Environ Med* 2000;42 (7):721-9.
- [130] Malone KE, Koepsell TD, Daling JR, Weiss NS, Morris PD, Taylor JW, Swanson GM, Lyon JL. Chronic lymphocytic leukemia in relation to chemical exposures. *Am J Epidemiol* 1989;130 (6):1152-8.
- [131] Raabe GK, Wong O. Leukemia mortality by cell type in petroleum workers with potential exposure to benzene. *Environ Health Perspect* 1996;104 Suppl 6:1381-92.

-
- [132] Waterhouse D, Carman WJ, Schottenfeld D, Gridley G, McLean S. Cancer incidence in the rural community of Tecumseh, Michigan: a pattern of increased lymphopoietic neoplasms. *Cancer* 1996;77 (4):763-70.
- [133] Blair A, White DW. Leukemia cell types and agricultural practices in Nebraska. *Arch Environ Health* 1985;40 (4):211-4.
- [134] Brown LM, Blair A, Gibson R, Everett GD, Cantor KP, Schuman LM, Burmeister LF, Van Lier SF, Dick F. Pesticide exposures and other agricultural risk factors for leukemia among men in Iowa and Minnesota. *Cancer Res* 1990;50 (20):6585-91.
- [135] Zheng T, Blair A, Zhang Y, Weisenburger DD, Zahm SH. Occupation and risk of non-Hodgkin's lymphoma and chronic lymphocytic leukemia. *J Occup Environ Med* 2002;44 (5):469-74.
- [136] Blair A, Zheng T, Linos A, Stewart PA, Zhang YW, Cantor KP. Occupation and leukemia: a population-based case-control study in Iowa and Minnesota. *Am J Ind Med* 2001;40 (1):3-14.
- [137] Pasqualetti P, Casale R, Colantonio D, Collacciani A. Occupational risk for hematological malignancies. *Am J Hematol* 1991;38 (2):147-9.
- [138] Ji J, Hemminki K. Socioeconomic/occupational risk factors for lymphoproliferative diseases in Sweden. *Ann Epidemiol* 2006;16 (5):370-6.
- [139] Costantini AS, Miligi L, Kriebel D, Ramazzotti V, Rodella S, Scarpi E, Stagnaro E, Tumino R, Fontana A, Masala G, Vigano C, Vindigni C, Crosignani P, Benvenuti A, Vineis P. A multicenter case-control study in Italy on hematology neoplasms and occupation. *Epidemiology* 2001;12 (1):78-87.
- [140] Seidler A, Mohner M, Berger J, Mester B, Deeg E, Elsner G, Nieters A, Becker N. Solvent exposure and malignant lymphoma: a population-based case-control study in Germany. *J Occup Med Toxicol* 2007;2:2.
- [141] <http://en.wikipedia.org/wiki/Benzo%28a%29pyrene>.
- [142] Garry VF, Danzl TJ, Tarone R, Griffith J, Cervenka J, Krueger L, Whorton EB, Jr., Nelson RL. Chromosome rearrangements in fumigant applicators: possible relationship to non-Hodgkin's lymphoma risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1992;1 (4):287-91.
- [143] Khalil AM. Chromosome aberrations in blood lymphocytes from petroleum refinery workers. *Arch Environ Contam Toxicol* 1995;28 (2):236-9.
- [144] Bolognesi C. Genotoxicity of pesticides: a review of human biomonitoring studies. *Mutat Res* 2003;543 (3):251-72.
- [145] Kim YJ, Cho YH, Paek D, Chung HW. Determination of chromosome aberrations in workers in a petroleum refining factory. *J Toxicol Environ Health A* 2004;67 (23-24):1915-22.
- [146] http://www.lib.teiher.gr/webnotes/steg/Methodoi_Antimetopisis_Fytoparasiton/kef5.pdf.
- [147] Roth VS. Rubber industry epidemiology. *Occup Med* 1999;14 (4):849-56.
- [148] Musak L, Soucek P, Vodickova L, Naccarati A, Halasova E, Polakova V, Slyskova J, Susova S, Buchancova J, Smerhovsky Z, Sedikova J, Klimentova G, Osina O, Hemminki K, Vodicka P. Chromosomal aberrations in tire plant workers and interaction with polymorphisms of biotransformation and DNA repair genes. *Mutat Res* 2008;641 (1-2):36-42.
- [149] Ng D, Toure O, Wei MH, Arthur DC, Abbasi F, Fontaine L, Marti GE, Fraumeni JF, Jr., Goldin LR, Caporaso N, Toro JR. Identification of a novel chromosome region, 13q21.33-q22.2, for susceptibility genes in familial chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2007;109 (3):916-25.
- [150] Aoun P, Zhou G, Chan WC, Page C, Neth K, Pickering D, Sanger W, Quinn-Laquer B, Watson P, Lynch JF, Lynch HT, Weisenburger DD. Familial B-cell chronic lymphocytic leukemia: analysis of cytogenetic abnormalities, immunophenotypic profiles, and immunoglobulin heavy chain gene usage. *Am J Clin Pathol* 2007;127 (1):31-8.

7. ΠΕΡΙΛΗΨΗ

7.1 ΠΕΡΙΛΗΨΗ ΣΤΑ ΕΛΛΗΝΙΚΑ

ΣΚΟΠΟΣ ΜΕΛΕΤΗΣ: Η Χρόνια Λεμφική Λευχαιμία (ΧΛΛ), η συνηθέστερη μορφή λευχαιμίας του δυτικού κόσμου, αποτελεί σήμερα αντικείμενο εντατικής μελέτης όσον αφορά στη διερεύνηση της βιολογίας της νόσου. Σκοπός της παρούσα διατριβής είναι: α) Η καρυοτυπική μελέτη των ασθενών με ΧΛΛ με την εύρεση του καταλληλότερου διεγέρτη που θα συμβάλλει στην ταυτοποίηση του συνόλου των χρωμοσωμικών αλλοιώσεων και της πρόγνυσή τους τα οποία παραμένουν άγνωστα εξαιτίας του περιορισμένου *in vitro* πολλαπλασιασμού των κυττάρων της ΧΛΛ β) Η ταυτοποίηση των υπομικροσκοπικών αλλοιώσεων της νόσου με μοριακή κυτταρογενετική (FISH) γ) Η ανάδειξη συγκεκριμένων γενοτοξικών παραγόντων που πιθανότατα σχετίζονται με τη νόσο Δ) Η διερεύνηση του πιθανού ρόλου στην προδιάθεση της νόσου του UGT1A1*28 πολυμορφισμού του *UGT1A1* γονιδίου, το οποίο συμμετέχει στην αποτοξικοποίηση ουσιών που έχουν συνδεθεί με τη ΧΛΛ.

ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ: Η καρυοτυπική ανάλυση πραγματοποιήθηκε σε αδιέγερτα αλλά και διεγερμένα με TPA και με το νέο συνδυασμό διεγερτών DSP30/IL-2, κύτταρα μυελού των οστών 237 ασθενών με ΧΛΛ. Σε 126 από τα παραπάνω δείγματα εφαρμόστηκε παράλληλα και η τεχνική FISH χρησιμοποιώντας τους ειδικούς για τη ΧΛΛ συνδυασμούς μοριακών ιχνηθετών LSI p53/LSI ATM και LSI D13S319/LSI 13q34/CEP12 Multi-Color Probe Sets. Η γονοτυπική ανάλυση του UGT1A1*28 πολυμορφισμού πραγματοποιήθηκε σε 109 ασθενείς και 108 υγιείς δότες με PCR πραγματικού χρόνου. Επιπλέον συμπληρώθηκαν επιδημιολογικά δελτία από 138 ασθενείς με ΧΛΛ και 142 άτομα του υγιούς πληθυσμού εξετάζοντας το οικογενειακό ιστορικό και την πιθανή τους έκθεση σε γενοτοξικούς παράγοντες.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ: Η μέση ηλικία των ασθενών ήταν τα 64.9 έτη ενώ το 53.2% αυτών ήταν <65 ετών. Η αναλογία ανδρών/γυναικών ήταν 1.63. Η καρυοτυπική ανάλυση ανέδειξε χρωμοσωμικές αλλοιώσεις στο 62,4% των ασθενών. Ο νέος συνδυασμός διεγερτών DSP-30/IL2 κρίθηκε ικανότερος για την ανίχνευση παθολογικού κλώνου σε σχέση με το TPA (OR=121,51, 95% CI= 16,62-888,51, $P=>0,0001$). Έτσι ανιχνεύτηκαν όλες οι ήδη γνωστές αλλοιώσεις της νόσου αλλά και αρκετές πιο σπάνιες. Συχνότερη χρωμοσωμική αλλοίωση αναδείχτηκε η τρισωμία 12 (+12) ακολουθούμενη από την έλλειψη *del(13q)*. Η FISH ανάλυση ανέδειξε στο 69,05% των ασθενών ανώμαλα πρότυπα υβριδισμού, ενώ συχνότερη αλλοίωση

αναδείχτηκε η del(13)(q14.3). Από τη γονοτυπική ανάλυση δεν προέκυψε σημαντική διαφορά στην κατανομή γονοτύπων του *UGT1A1* [TA₆/TA₆ (ομόζυγος για το φυσιολογικό αλληλόμορφο), TA₆/TA₇ (ετερόζυγος), TA₇/TA₇ (ομόζυγος για την εκτεταμένη διαμόρφωση του υποκινητή)] μεταξύ ασθενών και μαρτύρων. Αντιθέτως ο γονότυπος TA₇/TA₇ εμφανίστηκε σημαντικά αυξημένος στους ασθενείς με ανώμαλα πρότυπα υβριδισμού ($P=0.006$). Οι ασθενείς με +12 εμφάνισαν αυξημένη συχνότητα του γονοτύπου TA₇/TA₇ ($P=0.011$) ενώ εκείνοι με del(11q) αυξημένη συχνότητα του αλληλομόρφου TA₇ (OR=3.09, 95% CI= 1.19-8.08, $P=0.030$). Από τη σύγκριση των προγνωστικών ομάδων με βάση τα αποτελέσματα της FISH ο TA₇/TA₇ υπερείχε στους ασθενείς με ενδιάμεσης ($P=0.003$) και κακής ($P=0.016$) πρόγνωσης αλλοιώσεις, ενώ η συχνότητα του TA₇ στους ασθενείς με φτωχή πρόγνωση ήταν 3,6 φορές μεγαλύτερη από εκείνη των ασθενών με καλή ή ενδιάμεση πρόγνωση (OR=3.6, 95% CI= 1.3-10.4, $P=0.027$). Όσον αφορά στην εκτίμηση των παραγόντων κινδύνου της νόσου, αποκαλύφθηκε ότι οι ασθενείς είχαν συχνότερα συγγενείς α' βαθμού με ΧΛΛ ή άλλες κακοήθειες ($P<0,0001$) ή/και ήταν καπνιστές ($P=0,005$) σε σχέση με τους μάρτυρες. Επίσης, τα άτομα που είχαν εκδηλώσει πνευμονία ($P=0.016$) ή είχαν εκτεθεί συστηματικά σε πετρελαιοειδή ($P<0,0001$), μέταλλα ($P=0.024$), απορρυπαντικά (κυρίως χλωρίνη) ($P<0,0001$) και φυτοφάρμακα ($P<0,0001$) υπερείχαν σε σχέση με τους μάρτυρες διατρέχοντας πολλαπλάσιο κίνδυνο να εκδηλώσουν τη νόσο. Επιπλέον οι ασθενείς που είχαν εκτεθεί σε φυτοφάρμακα και καουτσούκ έφεραν συχνότερα τις ελλείψεις del(11q) ($P= 0,050$) και del(13q) ($P= 0,044$) αντίστοιχα, ενώ οι ασθενείς που είχαν πατέρα με ΧΛΛ ή άλλη κακοήθεια έφεραν συχνότερα τις έλλειψεις del(11q) ($P=0.000$), del(13q) ($P=0.034$) και +12 ($P=0.014$).

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ: Στην παρούσα διατριβή αν και η μέση ηλικία των ασθενών ήταν σύμφωνη με τη βιβλιογραφία, αναδείχτηκε η τάση της ΧΛΛ να εμφανίζεται συχνότερα και σε νεότερες ηλικίες και μάλιστα με επιθετικότερη μορφή. Ο νέος συνδυασμός διεγερτών DSP30/IL-2 αποδείχθηκε καταλληλότερος για την διέγερση των κυττάρων της ΧΛΛ σε σχέση με το TPA και έτσι η καρυοτυπική ανάλυση ανέδειξε ποικιλία χρωμοσωμικών αλλοιώσεων μεταξύ των οποίων υπήρξαν και κάποιες σπανιότερες και πρωτοπεριγραφόμενες. Συχνότερη καρυοτυπική αλλοίωση αναδείχτηκε η +12 και μετά η del(13q), ενώ στη FISH αναδείχτηκε η del(13)(q14.3) ακολουθούμενη από την τρισωμία 12. Η διαφορά αυτή αντανάκλα τις διαφορετικές δυνατότητες των δύο μεθόδων και επιβάλλει την παράλληλη εφαρμογή τους για τη

διερεύνηση της ΧΛΛ. Ο πολυμορφισμός UGT1A1*28 φάνηκε να αποτελεί έναν από τους πιθανούς προδιαθεσιακούς παράγοντες για τις περιπτώσεις της ΧΛΛ με +12 ή/και del(11)(q22). Επίσης η εκδήλωση της ΧΛΛ σχετίστηκε θετικά με το οικογενειακό ιστορικό των ασθενών, την έκθεση στα πετρελαιοειδή και τα φυτοφάρμακα/χημικά λιπάσματα. Το οικογενειακό ιστορικό των ασθενών φάνηκε να σχετίζεται με τις αλλοιώσεις del(11q), del(13q) και + 12, ενώ η έκθεση στα χημικά λιπάσματα/φυτοφάρμακα και το καουτσούκ με τις ελλείψεις del(11q) και del(13q) αντιστοίχως.

7.2 ΠΕΡΙΛΗΨΗ ΣΤΑ ΑΓΓΛΙΚΑ

AIM: The pathogenesis of Chronic lymphocytic leukemia (CLL) is currently an area of intense ongoing investigation. The aim of this thesis was a) The karyotypic study of CLL patients by finding the appropriate mitogen for CLL cells in order to contribute to the identification of all chromosomal aberrations and their prognosis which still remain unknown because of the limited in vitro activity of CLL cells. b) The identification of the most common submicroscopic deletions of the disease by using molecular cytogenetics (FISH). c) The identification of specific genotoxic agents probably associated with the disease. d) The investigation of UGT1A1*28 polymorphism of *UGT1A1* gene, which is involved in the detoxification of toxic substances which have been linked to CLL susceptibility.

METHODS: Karyotypic analysis was performed on unstimulated and stimulated with TPA and DSP30/IL-2 bone marrow cells, derived from 237 CLL patients. FISH studies were accomplished in 126 patients using the commercial CLL set probes LSI p53/LSI ATM και LSI D13S319/LSI 13q34/CEP12 Multi-Color Probe Sets. UGT1A1*28 polymorphism was investigated in 109 CLL patients and 108 matched healthy controls using Real Time PCR (RT-PCR) assay. A lifetime occupational history and other risk factor information were collected through in-person interviews of 138 CLL cases and 142 matched healthy controls.

RESULTS: The median age of patients was 64.9 years, while 53.2% of them were <65 years old. The sex ratio (males/females) was 1.63. The karyotype analysis revealed chromosomal aberrations in 62.4% of the patients. The new combination of mitogens DSP-30/IL2 presented a ~121.5-fold ability to detect the malignant clone compared to TPA (OR=121,51, 95% CI=16,62-888,51, P>0 ,0001). So, all the specific aberrations of CLL were detected but also some rare but not random. The most frequent karyotypic aberrations was trisomy 12 (+12) followed by del(13q). FISH analysis detected abnormal hybridization patterns in ~70% of the patients while the most frequent aberration was del(13)(q14.3). Genotypic analysis of UGT1A1*28 polymorphism showed no significant difference in the distribution of genotypes of *UGT1A1* gene [TA₆/TA₆ (normal homozygous), TA₆/TA₇ (heterozygous), TA₇/TA₇ (variant homozygous)] between cases and controls. On the contrary, the incidence of TA₇/TA₇ genotype was significantly elevated in patients with abnormal FISH patterns

($P=0.006$). In particular, the incidence of TA_7/TA_7 genotype was higher in patients carrying +12 ($P=0.011$) and those with $del(11q)$ had a higher frequency of TA_7 allele (OR=3.09, 95% CI=1.19-8.08, $P=0.030$). Patients' stratification into 3 prognostic groups according to FISH results indicated a statistically higher incidence of TA_7/TA_7 genotype in patients with intermediate ($P=0.003$) or poor prognosis ($P=0.016$), while the incidence of TA_7 allele was 3.6-fold increased in patients with poor prognosis (OR=3.14, 95% CI=1.34-7.39, $P=0.012$). Regarding the assessment of CLL risk factors, it was revealed that patients were smokers ($P = 0,005$) and had a CLL or other malignancy family history more often than controls ($P <0,0001$). Also, people who developed pneumonia ($P=0.016$) or had been exposed systematically to petroleum ($P<0,0001$), metals ($P=0.024$), pesticides/chemical fertilizers ($P<0,0001$) and chlorine ($P<0,0001$) were more often in patients' group than in controls having an elevated risk of developing the disease. Moreover $del(11q)$ and $del(13q)$ were more frequent in patients who were exposed to pesticides ($P= 0,050$) and rubber ($P= 0,044$) respectively, while patients who had a father suffering from CLL or other malignancies carried more often $del(11q)$ ($P=0.000$), $del(13q)$ ($P=0.034$) and +12 ($P=0.014$).

DISCUSSION: In this thesis, a trend of CLL to appear more often and more aggressively in younger ages was revealed. The new combination of mitogens DSP30/IL-2 was proved to better stimulate CLL cells compared to TPA and so karyotypic analysis revealed various chromosomal aberration including some rare but not random. The most frequent karyotypic aberration was +12 followed by $del(13q)$, while FISH results revealed the submicroscopic $del(13)(q14.3)$ as the commonest abnormality. This difference depicts the necessity of the parallel application of both methods in CLL investigation. Furthermore, UGT1A1*28 polymorphism might be one of the possible predisposing factors to certain forms of CLL particularly those presenting +12 and $del(11)(q22)$ abnormalities. The onset of CLL was linked to patients' family history, and systematic exposure to petroleum and pesticides/chemical fertilizers. Patients' family history was also linked to the occurrence of $del(11q)$, $del(13q)$ and + 12, while exposure to chemical fertilizers/pesticides and rubber was associated with $del(11q)$ and $del(13q)$, respectively. All the above may contribute to illuminate the complex biology of CLL which is reliant on the interplay of genetic, environmental and host factors.

8. ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ

8.1 ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ ΣΕ ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΑ ΠΕΡΙΟΔΙΚΑ

Αποτελέσματα της συγκεκριμένης διατριβής έχουν δημοσιευτεί σε 3 διεθνή επιστημονικά περιοδικά

- ♣ **Karakosta M**, Kalotychou V, Kostakis A, Pantelias G, Rombos I, Kouraklis G, Manola KN. UGT1A1*28 Polymorphism in Chronic Lymphocytic Leukemia: The First Investigation of the Polymorphism in Disease Susceptibility and Its Specific Cytogenetic Abnormalities. *Acta Haematol.* 2014, 132:59-67.
- ♣ **Karakosta M**, Tsakiridou A, Korantzis I, Manola KN. Deletion of 5q as a rare abnormality in chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Genet Cytogenet*, 2010 200:175-9.
- ♣ **Karakosta M**, Voulgarelis M, Vlachadami I, Manola KN. Translocation (6;13)(p21;q14.1) as a rare nonrandom cytogenetic abnormality in chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Genet Cytogenet.* 2010 Apr 1;198:66-70

8.2 ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΙΣ ΣΕ ΔΙΕΘΝΗ ΚΑΙ ΕΛΛΗΝΙΚΑ ΣΥΝΕΔΡΙΑ

Αποτελέσματα της συγκεκριμένης διατριβής έχουν παρουσιαστεί σε 13 διεθνή και ελληνικά συνέδρια

- ♣ **Karakosta M**, Diamantopoulou P, Kalomiraki M, Panagiotopoulou C, Nakopoulos P, Margariti IM, Pantelia D, Pantelias GE, Sambani C, Manola KN. Cytogenetic Profile Of 505 Patients With Chronic Lymphocytic Leukemia In Greece. Regional European Congress of Biomedical Laboratory Science & the 4th Greek Medical Laboratory Technologists Conference "Technical Advances and current practices" 5-7 December 2013, Athens, Greece, P (Molecular biology)-6, page 71.
- ♣ **M. Karakosta**, V. Kalotychoy, S. Zachaki, A. Daraki, A. Kostakis, G. Kouraklis, K.N. Manola. The potential role of UGT1A1*28 polymorphism in the pathogenesis of chronic lymphocytic leukemia. 17th congress of European Hematology Association, Amsterdam, Netherlands, June 14-17, 2012.
- ♣ **M. Karakosta**, P. Diamantopoulou, A. Daraki, M. Margariti, G.E. Pantelias, C. Sambani, K.N. Manola. "A conventional and molecular cytogenetic study in a large series of patients with chronic lymphocytic leukemia." 16th Congress of the European Hematology Association, June 09-12, 2011, London-United Kingdom. Haematologica 2011;Vol. 96: abstr. 1517, P599, June 2011.
- ♣ **Maria Karakosta**, Aggeliki Daraki, Marina Kalomoiraki, Domna Pantelia, Gabriel Pantelias, Constantina Sambani, Kalliopi Manola. "Cytogenetic findings in 505 Greek patients with chronic lymphocytic leukemia". 8th European Cytogenetics Conference, July 02-05 2011, Porto/Portugal. Chromosome Res (2011) 19 (Suppl 1):S136, abstr. 6P12, July 2011.
- ♣ **Maria Karakosta**, Christina Glytsou, Aggeliki Daraki, Marina Kalomiraki, Paraskevi Diamantopoulou, Konstantina Panagiotopoulou, Gabriel E. Pantelias, Constantina Sambani, Kalliopi N. Manola. A cytogenetic study in a large series of patients with chronic lymphocytic leukaemia. 15th Congress on Advances in Oncology and 13th International Symposium in Oncology Medicine, October 7-9, 2010, Loutraki-Greece.
- ♣ **M. Karakosta**, C. Glytsou, P. Diamantopoulou, A. Daraki, G.E. Pantelias, C. Sambani, K.N. Manola. Cytogenetic profile of 451 patients with chronic lymphocytic leukemia in greece. 15th Congress of the European Hematology Association, 10-13 June 2010, Barcelona – Spain, Haematologica 2010; Vol. 95: absr. 1738, P677, June 2010
- ♣ **M. Karakosta**, I. Korantzis, A. Tsakiridou, G.E. Pantelias, C. Sambani, K.N. Manola. Deletion of chromosome 5q as a rare but non random abnormality in chronic lymphocytic leukemia. 7th European Cytogenetic Conference,

Stockholm, Sweden 4-7 July 2009. Chromosome Research 2009; Vol. 17 (Supl): abstr7a.23-P, s125.

- ♣ K.N. Manola, **M. Karakosta**, M. Kalomiraki, P. Diamantopoulou, M. Margariti, D. Pantelia, G.E. Pantelias, C. Sambani. A cytogenetic study of 310 chronic lymphocytic leukemia (CLL) cases in Greece. 7th European Cytogenetic Conference, Stockholm, Sweden 4-7 July 2009. Chromosome Research 2009; Vol. 17 (Supl): abstr7a7-P, S116.
- ♣ K.N. Manola, **M. Karakosta**, A. Tsakiridou, I. Korantzis.. Deletion of chromosome 5q as a rare but non random abnormality in chronic lymphocytic leukemia. 14th Congress of the European Hematology Association, June 4-7, 2009, Berlin-Germany. Haematologica 2009; Vol. 94: abstr. 1232, P494, June 2009.
- ♣ K.N. Manola, **M. Karakosta**, C. Stavropoulou, V. Georgakakos, G.E. Pantelias, C. Sambani. A cytogenetic study of 310 chronic lymphocytic leukemia (CLL) cases in Greece. 14th Congress of the European Hematology Association, June 4-7, 2009, Berlin-Germany. Haematologica 2009; Vol. 94: abstr. 1226, P492, June 2009.
- ♣ K. Manola, C. Sambani, **M. Karakosta**, A. Symeonidis, P. Repousis, P. Zikos, P. Roussou, D. Margaritis, M. Vagia, A. Balta, E. Hatzimichael, I. Vlachadami, V. Komninaka, A. Galanopoulos. Prognostic significance of less frequent or rare chromosome abnormalities in Greek patients with myelodysplastic syndromes. 10th International Symposium on MDS, Patras, Greece, May 6-9, 2009. Leukemia Research May 2009, Vol 33, Suppl 1, Pages S45-S46. 10th International Symposium on MDS, Patras, Greece, May 6-9, 2009. Leukemia Research May 2009, Vol 33, Suppl 1, Pages S73-S74.
- ♣ **M. Καρακώστα**, Β. Καλότυχου, Α. Δαράκη, Α. Κωστάκης, Γ. Παντελιάς, Γ. Κουράκλης, Κ. Μανωλά. μελέτη του UGT1A1*28 πολυμορφισμού στην προδιάθεση της Χρόνιας Λεμφικής Λευχαιμίας και στο σχηματισμό των ειδικών κυτταρογενετικών αλλοιώσεων της νόσου. 23ο Πανελλήνιο Αιματολογικό Συνέδριο, Νοέμβριος 22-24, 2012, Θεσσαλονίκη
- ♣ **Καρακώστα Μ**, Βουλγαρέλης Μ, Βλαχαδάμη Ι, Μανωλά ΚΝ. Η χρωμοσωμική μετάθεση t(6;13)(p21;q14) ως πρωτοπεριγραφόμενη αλλοίωση στη χρόνια λεμφογενή λευχαιμία. 20ο Πανελλήνιο Αιματολογικό Συνέδριο, 4-7 Νοεμβρίου 2009, Κρήτη. Haema; Vol. 12, abstr. 230, P234, November 2009

9. ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

ΠΡΟΣΩΠΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ

Όνοματεπώνυμο:	Μαρία Καρακώστα
Ειδικότητα:	Βιολόγος
Ημερομηνία γέννησης:	20 Μαΐου 1983
Οικογενειακή κατάσταση:	Άγαμη
Διεύθυνση κατοικίας:	Αχαΐας 13 Ίλιον , Αθήνα , ΤΚ 13121
Τηλ. επικοινωνίας:	6949-733521, 210-5731189
E mail:	karakosta@ipta.demokritos.gr

ΚΥΡΙΕΣ ΣΠΟΥΔΕΣ

- 2008 – σήμερα Υποψήφια Διδάκτωρ της Ιατρικής Σχολής του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών
Τίτλος Διδακτορικής Διατριβής: «Διερεύνηση της Χρόνιας Λεμφικής Λευχαιμίας με μεθόδους Κλασσικής και Μοριακής Κυτταρογενετικής»
- 2008 – 2012 Μεταπτυχιακή Υπότροφος στο Εργαστήριο Υγειοφυσικής και Περιβαλλοντικής Υγιεινής του Ινστιτούτου Πυρηνικής Τεχνολογίας & Ακτινοπροστασίας, κατόπιν επιτυχών εξετάσεων στο διαγωνισμό που προκηρύχθηκε από το ΕΚΕΦΕ «Δημόκριτος» για την κάλυψη θέσεων υποτρόφων εσωτερικού
- 2007 Πτυχιούχος του τμήματος Βιολογίας του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών.
- 2001 Απόφοιτη Γενικού Ενιαίου Λυκείου με επίδοση «Άριστα»

ΕΞΕΙΔΙΚΕΥΣΗ – ΕΠΙΜΟΡΦΩΣΗ

- 2013 Εξωτερική Επιστημονική Συνεργάτιδα στο Εργαστήριο Υγειοφυσικής και Περιβαλλοντικής Υγείας, Ινστιτούτο Ραδιοϊσοτόπων & Ραδιοδιαγνωστικών Προϊόντων, ΕΚΕΦΕ «Δημόκριτος» για τις ανάγκες της Πράξης του Πανεπιστημίου Αθηνών «ΘΑΛΗΣ» με τίτλο: «Διερεύνηση μηχανισμών ανθεκτικότητας των καρκινικών βλαστικών κυττάρων από καρκίνο του μαστού σε γενοτοξικές βλάβες: εφαρμογή σε διάγνωση, εξατομικευμένη θεραπεία και πρόγνωση της εξέλιξης της νόσου»
- 2011 – σήμερα Εξουσιοδοτημένη αναλύτρια για τις διαπιστευμένες από το Εθνικό Σύστημα Διαπίστευσης (Ε.ΣΥ.Δ) Α.Ε. μεθόδους μοριακής κυτταρογενετικής που πραγματοποιούνται στο εργαστήριο κυτταρογενετικής του ΕΚΕΦΕ «Δημόκριτος» σύμφωνα με το πρότυπο Διαπίστευσης ΕΛΟΤ EN ISO 15189

- 2008 – σήμερα Εξειδίκευση στην Κλασσική και Μοριακή Κυτταρογενετική Ανάλυση περιφερικού αίματος και μυελού των οστών ασθενών με αιματολογικές κακοήθειες και ζευγαριών με προβλήματα υπογονιμότητας.
Εργαστήριο Υγαιοφυσικής και Περιβαλλοντικής Υγιεινής του ΙΠΤ-Α, ΕΚΕΦΕ «Δημόκριτος» .
- 2004 – σήμερα Εξειδίκευση σε μεθόδους της Μοριακής Βιολογίας και συγκεκριμένα στην ανάδειξη γενετικών πολυμορφισμών μέσω RFLPs και RT-PCR
Ερευνητικό εργαστήριο της Α' Παθολογικής Κλινικής της Ιατρικής Σχολής του ΕΚΠΑ.
- 2006 Παρακολούθηση τεχνικών και μεθόδων εξωσωματικής γονιμοποίησης.
Μονάδα Υποβοηθούμενης Αναπαραγωγής της Γενικής Μαιευτικής/ Γυναικολογικής Παιδιατρικής Κλινικής, ΜΗΤΕΡΑ, υπό την εποπτεία του κ. Giles Palmer, βιολόγος, διευθυντής του τμήματος.
- 2004 -2006 Εκπόνηση διπλωματικής εργασίας με τίτλο: «Ανίχνευση των μεταλλαγών G71R, P229Q και Y486D του UGT1 A1 γονιδίου σε ετερόζυγα και ομόζυγα άτομα για το σύνδρομο Gilbert's και συσχέτιση αυτών με τα επίπεδα έμμεσης χολερυθρίνης τους».
Ερευνητικό εργαστήριο της Α' Παθολογικής Κλινικής της Ιατρικής Σχολής του ΕΚΠΑ.

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗ ΕΜΠΕΙΡΙΑ

- Κυτταροκαλλιέργειες
- Πρωτογενείς καλλιέργειες λεμφοκυττάρων περιφερικού αίματος και μυελού των οστών και κυτταρικών σειρών
- Κυτταρογενετική
- Προετοιμασία κυτταρογενετικών παρασκευασμάτων
 - Τεχνικές χρώσεως και ζώνωσης G
 - Μικροσκοπική ανάλυση (ανάλυση χρωμοσωματικών αλλοιώσεων, καρυοτυπική ανάλυση)
 - Χρήση συστήματος αυτόματου αναλυτή και επεξεργασίας εικόνας καρυοτύπου μέσω του ειδικού λογισμικού Ikaros-karyotyping System, MetaSystems.
- Μοριακή
Κυτταρογενετική
(FISH)
- Προετοιμασία κυτταρογενετικών παρασκευασμάτων
 - Μικροσκοπική ανάλυση μεσοφασικών πυρήνων (iFish) και μεταφάσεων (mFish)
 - Αξιολόγηση αποτελεσμάτων.
 - Χρήση συστήματος επεξεργασίας εικόνας και απεικόνισης φθορισμού μέσω του ειδικού λογισμικού ISIS-FISH imaging System, MetaSystems).
 - Ανάδειξη πολυμορφισμών και μεταλλάξεων γονιδίων μέσω RFLPs (PCR, επώαση με περιοριστικές ενδονουκλεάσες)

Μοριακή Βιολογία

- Ανάδειξη SNPs (single nucleotide polymorphisms) με Real Time-PCR (RT-PCR)
- Ανάδειξη πολυμορφισμών με κάθετη ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης
- Απομόνωση DNA και RNA από βιολογικούς ιστούς
- Παρασκευή πηκτωμάτων αγαρόζης και πολυακρυλαμίδης

Ακτινοευαισθησία

- Εκτίμηση ακτινοευαισθησίας ατόμων του πληθυσμού με μεθοδολογίες πρόωρης χρωμοσωματικής συμπύκνωσης (Premature Chromosome Condensation, PCC) και της μεθόδου G2-χρωμοσωματικής ακτινοευαισθησίας (G2-assay)
- Έλεγχος της γενεοτοξικής δράσης χημικών παραγόντων μέσω της εφαρμογής G2-χρωμοσωματικής ακτινοευαισθησίας

ΥΠΟΤΡΟΦΙΕΣ

2008 Μεταπτυχιακή Υπότροφος για την εκπόνηση διδακτορικής διατριβής στο Εργαστήριο Υγειοφυσικής και Περιβαλλοντικής Υγιεινής του Ινστιτούτου Πυρηνικής Τεχνολογίας & Ακτινοπροστασίας, κατόπιν επιτυχών εξετάσεων σε ανοιχτό διαγωνισμό που προκηρύχθηκε από το ΕΚΕΦΕ «Δημόκριτος» για την κάλυψη θέσεων υποτρόφων εσωτερικού

ΣΥΜΜΕΤΟΧΗ ΣΕ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΑ

- 2013 Συμμετοχή στην Πράξη του Πανεπιστημίου Αθηνών με τίτλο: «Διερεύνηση μηχανισμών ανθεκτικότητας των καρκινικών βλαστικών κυττάρων από καρκίνο του μαστού σε γενεοτοξικές βλάβες: εφαρμογή σε διάγνωση, εξατομικευμένη θεραπεία και πρόγνωση της εξέλιξης της νόσου» με Επιστημονικό Υπεύθυνο τον Επ. Καθ. Δρ. Δ. Βλαχοδημητρόπουλο που εντάσσεται στην Κατηγορία Πράξεων «ΘΑΛΗΣ - Ενίσχυση της έρευνας και της καινοτομίας μέσω προγραμμάτων βασικής και εφαρμοσμένης έρευνας και της προσέλευσης ερευνητών υψηλού επιπέδου από το εξωτερικό», στο πλαίσιο του Άξονα Προτεραιότητας 11: «Ενίσχυση του ανθρώπινου κεφαλαίου για την προαγωγή της έρευνας και της καινοτομίας στις 3 περιφέρειες Σταδιακής Εξόδου» του Επιχειρησιακού Προγράμματος «Εκπαίδευση και Δια Βίου Μάθηση», κατόπιν ανοιχτής προκήρυξης.
- 2006 Πρακτική άσκηση στα πλαίσια του προγράμματος «Πρακτική Άσκηση Φοιτητών» του ΕΠΕΑΚ II, με σκοπό την εκμάθηση μεθοδολογιών μελέτης βιολογικών συστημάτων και κατανόηση της εργασίας που γίνεται στο ερευνητικό εργαστήριο της Α' Παθολογικής Κλινικής της Ιατρικής Σχολής του ΕΚΠΑ.
- 2006 Βεβαίωση παρακολούθησης σεμιναρίου 100 ωρών θεωρίας του προγράμματος «Κατάρτιση σε βασικές δεξιότητες χρήσης τεχνολογιών πληροφορίας και επικοινωνίας II με βάσεις δεδομένων Νο 27» στο πλαίσιο του Ε.Π. «Κοινωνία της Πληροφορίας»

ΓΝΩΣΗ Η/Υ

2006 Cambridge International Diploma in IT Skills:

- ♣ Word
- ♣ Access
- ♣ Internet

Άριστος χειρισμός Windows, Excell και Powerpoint

ΞΕΝΕΣ ΓΛΩΣΣΕΣ

Αγγλικά 2002: Certificate of Proficiency in English (University of Michigan)

1998: First Certificate in English (University of Cambridge)

Γαλλικά 1999: Delf 1 – Diplome d'études en langue Francaise – 1er degre

ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ ΣΕ ΔΙΕΘΝΗ ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΑ ΠΕΡΙΟΔΙΚΑ ΜΕ ΚΡΙΤΕΣ ΚΑΙ IMPACT FACTOR

- 1 **Maria Karakosta**, Vassiliki Kalotychou, Alkiviadis Kostakis, Gabriel Pantelias, Ioannis Rombos, Gregory Kouraklis, Kalliopi N. Manola. UGT1A1*28 polymorphism in Chronic Lymphocytic Leukemia: the first investigation of the polymorphism in disease susceptibility and its specific cytogenetic abnormalities. *Acta Haematologica* 2014; 132:59-67.
- 2 Kalotychou V, **Karakosta M**, Tzanetea R, Stamoulakatou A, Konstantopoulos K, Rombos Y. Contribution of G71R mutation to Gilbert's syndrome phenotype in a Greek patient: A case report. *World J Gastrointest Pharmacol Ther* 2011; 2:42-5.
- 3 Kalliopi N. Manola, Fotios Panitsas, Sophia Polychronopoulou, Ageliki Daraki, **Maria Karakosta**, Cryssa Stavropoulou, Georgia Avgerinou, Emmanuel Hatzipantelis, Gabriel Pantelias, Constantina Sambani, Maria Pagoni. Cytogenetic abnormalities and monosomal karyotypes in children and adolescents with acute myeloid leukemia: correlations with clinical characteristics and outcome. *Cancer Genet.* 2013;206:63-72
- 4 **Karakosta M**, Voulgarelis M, Vlachadami I, Manola KN. Traslocation t(6;13)(p21;q14) as a rare non random cytogenetic abnormality in Chronic Lymphocytic Leukemia. *Cancer Genetics and Cytogenetics* 2010;198:66-70.
- 5 **Karakosta M**, Tsakiridou A, Korantzis I, Manola KN. Deletion of 5q as a rare abnormality in chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Genetics and Cytogenetics* 2010;200:175-9.
- 6 Manola KN, **Karakosta M**, Sambani C, Terzoudi G, Pagoni M, Gatsa E, Papaioannou M. Isochromosome der(17)(q10)t(15;17) in acute promyelocytic leukemia resulting in an additional copy of RARA/PML fusion gene: Report of 4 cases and review of the literature. *Acta Haematologica* 2010; 123:162-70.

ΠΕΡΙΛΗΨΕΙΣ ΚΑΙ ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΙΣ ΣΕ ΔΙΕΘΝΗ ΣΥΝΕΔΡΙΑ (με κριτές)

- 1 **Karakosta M**, Diamantopoulou P, Kalomiraki M, Panagiotopoulou C, Nakopoulos P, Margariti IM, Pantelia D, Pantelias GE, Sambani C, Manola KN. Cytogenetic Profile Of 505 Patients With Chronic Lymphocytic Leukemia In Greece. Regional European Congress of Biomedical Laboratory Science & the 4th Greek Medical Laboratory Technologists Conference "Technical Advances and current practices" 5-7 December 2013, Athens, Greece, P (Molecular biology)-6, page 71.
- 2 Daraki A, Zachaki S, Koromila T, **Karakosta M**, Pantelias G, Aleporou V, Sambani C, Kollia P, Manola KN.. The G516T Polymorphism of Cytochrome P450 2B6 Gene in the Susceptibility of de novo Acute Myeloid Leukemia. 54th annual meeting of American Society of Hematology (ASH), Atlanta December 8-11, 2012.
- 3 **M. Karakosta**, V. Kalotychou, S. Zachaki, A. Daraki, A. Kostakis, G. Kouraklis, K.N. Manola. The potential role of UGT1A1*28 polymorphism in the pathogenesis of chronic lymphocytic leukemia. 17th congress of European Hematology Association, Amsterdam, Netherlands, June 14-17, 2012.
- 4 A. Daraki, S. Zachaki, T. Koromila, **M. Karakosta**, G. Pantelias, V. Aleporou, C. Sambani, P. Kollia, K.N. Manola. Association of CYP2B6 G516T polymorphism with the susceptibility of de novo Acute Myelogenous Leukemia. 17th congress of European Hematology Association, Amsterdam, Netherlands, June 14-17, 2012.
- 5 **M. Karakosta**, P. Diamantopoulou, A. Daraki, M. Margariti, G.E. Pantelias, C. Sambani, K.N. Manola. "A conventional and molecular cytogenetic study in a large series of patients with chronic lymphocytic leukemia." 16th Congress of the European Hematology Association, June 09-12, 2011, London-United Kingdom. Haematologica 2011;Vol. 96: abstr. 1517, P599, June 2011.
- 6 A. Daraki, M. Roumelioti, P. Diamantopoulou, **M. Karakosta**, G. Pantelias, C Sambani, K. Manola. "Cytogenetic findings in de novo acute myeloid leukemia : A study based on 553 patients in a single institution of Greece." 16th Congress of the European Hematology Association, June 09-12, 2011, London-United Kingdom. Haematologica 2011;Vol. 96: abstr. 1516, P598, June 2011.
- 7 **Maria Karakosta**, Aggeliki Daraki, Marina Kalomoiraki, Domna Pantelia, Gabriel Pantelias, Constantina Sambani, Kalliopi Manola. "Cytogenetic findings in 505 Greek patients with chronic lymphocytic leukemia". 8th European Cytogenetics Conference, July 02-05 2011, Porto/Portugal. Chromosome Res (2011) 19 (Suppl 1):S136, abstr. 6P12, July 2011.
- 8 Aggeliki Daraki, Marlen Roumelioti, Paraskevi Diamantopoulou, **Maria Karakosta**, Gabriel Pantelias, Constantina, Kalliopi Manola. "A cytogenetic study of 553 de novo acute myeloid leukemia patients in Greece." 8th European Cytogenetics Conference, July 02-05 2011, Porto/Portugal. Chromosome Res (2011) 19 (Suppl 1):S134, abstr. 6P9, July 2011.
- 9 **Maria Karakosta**, Christina Glytsou, Aggeliki Daraki, Marina Kalomiraki, Paraskevi Diamantopoulou, Konstantina Panagiotopoulou, Gabriel E. Pantelias, Constantina

-
- Sambani, Kalliopi N. Manola. A cytogenetic study in a large series of patients with chronic lymphocytic leukaemia. 15th Congress on Advances in Oncology and 13th International Symposium in Oncology Medicine, October 7-9, 2010, Loutraki-Greece.
- 10 **M. Karakosta**, C. Glytsou, P. Diamantopoulou, A. Daraki, G.E. Pantelias, C. Sambani, K.N. Manola. Cytogenetic profile of 451 patients with chronic lymphocytic leukemia in Greece. 15th Congress of the European Hematology Association, 10-13 June 2010, Barcelona – Spain, *Haematologica* 2010; Vol. 95: absr. 1738, P677, June 2010
- 11 K. N. Manola, A. Daraki, C. Sambani, M. Kalomiraki, **M. Karakosta**, M. Apostolopoulou, G. E. Pantelias. A cytogenetic study of 403 adult acute myeloid leukemia patients in Greece. 15th Congress of the European Hematology Association, 10-13 June 2010, Barcelona – Spain, *Haematologica* 2010; Vol. 95: absr. 1741, P678, June 2010
- 12 **M. Karakosta**, I. Korantzis, A. Tsakiridou, G.E. Pantelias, C. Sambani, K.N. Manola. Deletion of chromosome 5q as a rare but non random abnormality in chronic lymphocytic leukemia. 7th European Cytogenetic Conference, Stockholm, Sweden 4-7 July 2009. *Chromosome Research* 2009; Vol. 17 (Supl): abstr7a.23-P, s125.
- 13 K.N. Manola, **M. Karakosta**, M. Kalomiraki, P. Diamantopoulou, M. Margariti, D. Pantelia, G.E. Pantelias, C. Sambani. A cytogenetic study of 310 chronic lymphocytic leukemia (CLL) cases in Greece. 7th European Cytogenetic Conference, Stockholm, Sweden 4-7 July 2009. *Chromosome Research* 2009; Vol. 17 (Supl): abstr7a7-P, S116.
- 14 K.N. Manola, **M. Karakosta**, A. Tsakiridou, I. Korantzis.. Deletion of chromosome 5q as a rare but non random abnormality in chronic lymphocytic leukemia. 14th Congress of the European Hematology Association, June 4-7, 2009, Berlin-Germany. *Haematologica* 2009; Vol. 94: abstr. 1232, P494, June 2009.
- 15 K.N. Manola, **M. Karakosta**, C. Stavropoulou, V. Georgakakos, G.E. Pantelias, C. Sambani. A cytogenetic study of 310 chronic lymphocytic leukemia (CLL) cases in Greece. 14th Congress of the European Hematology Association, June 4-7, 2009, Berlin-Germany. *Haematologica* 2009; Vol. 94: abstr. 1226, P492, June 2009.
- 16 K. Manola, C. Sambani, **M. Karakosta**, A. Symeonidis, P. Repousis, P. Zikos, P. Roussou, D. Margaritis, M. Vagia, A. Balta, E. Hatzimichael, I. Vlachadami, V. Komninaka, A. Galanopoulos. Prognostic significance of less frequent or rare chromosome abnormalities in Greek patients with myelodysplastic syndromes. 10th International Symposium on MDS, Patras, Greece, May 6-9, 2009. *Leukemia Research* May 2009, Vol 33, Suppl 1, Pages S45-S46. 10th International Symposium on MDS, Patras, Greece, May 6-9, 2009. *Leukemia Research* May 2009, Vol 33, Suppl 1, Pages S73-S74.

ΠΕΡΙΛΗΨΕΙΣ ΚΑΙ ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΙΣ ΣΕ ΕΛΛΗΝΙΚΑ ΣΥΝΕΔΡΙΑ (με κριτές)

- 1 **M. Καρακώστα**, Β. Καλότυχου, Α. Δαράκη, Α. Κωστάκης, Γ. Παντελιάς, Γ. Κουράκλης, Κ. Μανωλά. μελέτη του UGT1A1*28 πολυμορφισμού στην προδιάθεση της Χρόνιας Λεμφικής Λευχαιμίας και στο σχηματισμό των ειδικών κυτταρογενετικών αλλοιώσεων της νόσου. 23ο Πανελλήνιο Αιματολογικό Συνέδριο, Νοέμβριος 22-24, 2012, Θεσσαλονίκη.
- 2 Α. Δαράκη, Σ. Ζαχάκη, **M. Καρακώστα**, Γ. Παντελιάς, Β. Αλεπόρου, Κ. Σαμπάνη, Π. Κόλλια, Κ.Ν. Μανωλά. “Συχνότητα κατανομής του πολυμορφισμού Gln172His του γονιδίου CYP2B6 σε ασθενείς με οξεία μυελογενή λευχαιμία”. 8ο Πανελλήνιο Συνέδριο Βιοεπιστημόνων, Πανελλήνια Ένωση Βιοεπιστημόνων, Πάτρα, 18-20 Οκτωβρίου, 2012.
- 3 Δαράκη Α, **Καρακώστα Μ**, Καλομοιράκη Μ, Μανωλά Κ. “Κυτταρογενετική Ανάλυση 154 Ασθενών με οξεία μυελογενή λευχαιμία”. 5ο Πανελλήνιο Συνέδριο της Πανελληνίας Ένωσης Βιοεπιστημών με θέμα «Περιβάλλον και Υγεία», Νοέμβριος 25-27, 2010, Αθήνα.
- 4 Κ.Ν. Μανωλά, Α. Δαράκη, **M. Καρακώστα**, Μ. Αποστολοπούλου, Π. Διαμαντοπούλου, Κ. Σαμπάνη, Γ. Ε. Παντελιάς. Κυτταρογενετική Ανάλυση 467 Ασθενών με οξεία μυελογενή λευχαιμία. 21ο Πανελλήνιο Αιματολογικό Συνέδριο, Νοέμβριος 10-12, 2010, Θεσσαλονίκη. Haema 2010; 1(3) Abst. 83 p91
- 5 Μανωλά ΚΝ, Σαμπάνη Κ, **Καρακώστα Μ**, Τερζούδη Γ, Καλομοιράκη Μ, Διαμαντοπούλου Π, Γεωργακάκος Β, Barszczewska Κ, Χατζή Β, Παντελιάς ΓΕ. Κυτταρογενετική ανάλυση 419 ασθενών με μυελοδυσπλαστικό σύνδρομο. 20ο Πανελλήνιο Αιματολογικό Συνέδριο, 4-7 Νοεμβρίου 2009, Κρήτη. Haema; Vol. 12, abstr. 180, P192, November 2009.
- 6 **Καρακώστα Μ**, Βουλγαρέλης Μ, Βλαχαδάμη Ι, Μανωλά ΚΝ. Η χρωμοσωμική μετάθεση t(6;13)(p21;q14) ως πρωτοπεριγραφόμενη αλλοίωση στη χρόνια λεμφογενή λευχαιμία. 20ο Πανελλήνιο Αιματολογικό Συνέδριο, 4-7 Νοεμβρίου 2009, Κρήτη. Haema; Vol. 12, abstr. 230, P234, November 2009.
- 7 Β. Καλότυχου, **M. Καρακώστα**, Α. Σταμουλακάτου, Γ. Πάγκαλης, Ι. Ρόμπος. Συμμετοχή της G71R μεταλλαγής του UGT1A1 γονιδίου στην εκδήλωση του συνδρόμου Gilbert. 17ο Πανελλήνιο Αιματολογικό Συνέδριο, 22 – 26 Νοεμβρίου 2006, Αθήνα

10. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

ΥΛΙΚΑ/ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ ΕΞΟΛΙΣΜΟΣ

1 ΣΥΣΚΕΥΕΣ - ΟΡΓΑΝΑ

1. Θάλαμος κάθετης νηματικής ροής στείρου αέρα βιολογικής ασφάλειας
2. Επωαστικός κλίβανος διοξειδίου του άνθρακα (37°C, 5% CO₂)
3. Ψυχόμενη φυγόκεντρος
4. Απαγωγός εστία
5. Ηλεκτρονικός ζυγός ακριβείας
6. Ξηρός κλίβανος αποστείρωσης
7. Μηχανικός Αναδευτήρας vortex
8. Ψυγειοκαταλύκτης
9. Μαγνητικός αναδευτήρας
10. Συσκευή θέρμανσης αντικειμενοφόρων πλακών
11. Απεσταγμένο Υδατόλουτρο (37°C και 72°C)
12. Ψηφιακό Πεχάμετρο
13. Χρονόμετρο
14. Μικροσκόπιο αντίθετης φάσης (phase contrast) για παρατήρηση παρασκευασμάτων σε διερχόμενο φωτισμό φωτεινού πεδίου
15. Οπτικό μικροσκόπιο με ικανότητα μεγέθυνσης 100x – 1000x
16. Μικροσκόπιο Φθορισμού προσπίπτοντος UV με φίλτρα φθορισμού
17. Η/Υ με λογισμικό πρόγραμμα ανάλυσης εικόνας καρυοτύπου, IKAROS.
18. Η/Υ με λογισμικό πρόγραμμα ISIS
19. LightCycler 1.5 Real-Time PCR System (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland)

2 ΣΚΕΥΗ – ΑΝΤΙΚΕΙΜΕΝΑ

1. Αποστειρωμένες φλάσκες καλλιέργειας των 25 cm².
2. Αποστειρωμένες γυάλινες πιπέτες μίας χρήσεως των 10, 5 και 2 ml.
3. Σωλήνες τύπου Erpenorf (1,5ml)
4. Δοκιμαστικοί σωλήνες από πολυστυρένιο (14ml)
5. Αυτόματες πιπέτες ρυθμιζόμενου όγκου (1-10μl, 2-20μl, 20-100μl, 50-200μl, 200-1000μl)
6. Ακρορύγχια πιπετών μιας χρήσης (0-200λ, yellow tips)
7. Ακρορύγχια πιπετών μιας χρήσης (200-500λ, blue tips)
8. Πιπέτες Pasteur μιας χρήσης
9. Αντικειμενοφόρες πλάκες
10. Καλυπτρίδες διαστάσεων 22x22mm και 24x50mm
11. Βαθμονομημένο θερμόμετρο
12. Ογκομετρικοί κύλινδροι
13. Κωνικές φιάλες
14. Δοκιμαστικοί σωλήνες
15. Capillaries tubes (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland)

3 ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ – ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ

1. Θρεπτικό υλικό McCoy's 5 A
2. L-γλουταμίνη (20mM)
3. Εμβρυϊκός ορός μόσχου
4. Διάλυμα αντιβιοτικών Πενικιλίνη/Στρεπτομυκίνη
5. Ανθρώπινη ανασυνδυασμένη σε E. Coli ιντερλευκίνη-2
6. Ανοσοδιεγερτικό CpG-ολιγονουκλεοτίδιο DSP30 σε συνδυασμό με ανθρώπινη ιντερλευκίνη-2
7. TPA (12-0-tetradodecanoyl-phorbol-13-acetate)
8. Διάλυμα κολσεμιδίου Colcemide (Demecolcine) 10μg/ml σε PBS, w/o Ca⁺⁺, Mg⁺⁺ (25ml)
9. Χλωριούχο κάλιο (KCl) σε σκόνη (MW=74,56g/mol)
10. Μεθανόλη (CH₄O, MW= 32,44g/mol)
11. Οξικό οξύ (CH₃COOH, MW= 60,05g/mol)
12. Ισοτονικό διάλυμα θρυψίνης σε PBS: Trypsin/EDTA 0,05%/0,002% in PBS w/o Ca⁺⁺, Mg⁺⁺
13. Διάλυμα χρώσης χρωμοσωμάτων Giemsa
14. Ρυθμιστικό Διάλυμα Sorensen (pH 6,8) σε ταμπλέτες
15. Υλικό επικόλλησης καλυπτρίδων (Entellan)
16. Συνθετικό κεδρέλαιο για οπτικό μικροσκόπιο
17. Ανιχνευτές πολλαπλών χρωμάτων Vysis (LSI probes) (φύλαξη σε θερμοκρασία -20°C προστατευμένοι από το φώς):
 - a. Σύνολο ανιχνευτών 1: Vysis LSI p53/LSI ATM Multi-Color Probe (500ng/μl p53/LSI p53/LSI ATM σε θειικό άλας δεξτράνης, φορμαμίδη, SSC, pH 7)
 - b. Σύνολο ανιχνευτών 2: Vysis LSI D13S319/LSI 13q34/CEP 12 Multi-Color Probe (625ng/μl σε θειικό άλας δεξτράνης, φορμαμίδη, SSC pH 7)
18. 20 x SSC (3M χλωριούχου νατρίου, 0,3M κιτρικού νατρίου, pH 5.3)
19. Φθοριόχρωμα αντίχρωσης DAPI Antifade ES, Cytocell(2,6-διαμίδινο-2-φαινυλινδόλη, 0,125μg/ml, φύλαξη στους -20°C - +8°C)
20. «Σαπούνη» Nonidet P450 NP-40 πυκνό και αραιό 10%.
21. 100% αιθανόλη (EtOH)
22. HCl 5N

-
23. Ρυθμιστικό διάλυμα pH 10.
 24. Απεσταγμένο νερό
 25. Συνθετικό κεδρέλαιο για μικροσκόπιο φθορισμού.
 26. QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen)
 27. Hybridization Probes (HybProbes) και εκκινητές [TIB MOLBIOL (Βερολίνο, Γερμανία)]
 28. Roche Diagnostics DNA master kit [TIB MOLBIOL (Βερολίνο, Γερμανία)]
 29. APS (ammonium persulfate) (MERK)
 30. SDS (sodium dodecyl sulfate) (USB)
 31. TEMED (N'-N'-N'-N'-tetramethylethylenediamine) (FERAK BERLIN)
 32. Αγαρόζη low EEO type I (GIBGO BRL)
 33. Αγαρόζη Nusieve GTG (FMC)
 34. Ακρυλαμίδα electroforesis grade (SIGMA)
 35. Βρωμιούχο αιθίδιο (SIGMA)
 36. Χρωστικές: κυανούν της ξυλόλης, κυανούν της βρωμοφαινόλης (MERK)
 37. TBE Buffer (Tris – Borate – EDTA) (SIGMA)
 38. Taq DNA πολυμεράση (Invitrogen)
 39. Μίγμα δεοξυριβονουκλεοτιδίων (dATP, dTTP dGTP, dCTP) (New England Biolabs)
 40. DNA Ladder 50 και 100 bp (GeneRuler)