

**Β' ΠΑΙΔΙΑΤΡΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ  
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΑΘΗΝΩΝ  
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ**

**ΔΙΕΥΘΥΝΤΡΙΑ: ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ Μ.ΤΣΟΛΙΑ**

**ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ  
ΚΛΙΝΙΚΗΣ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΗΣ  
ΚΑΙ  
ΟΓΚΟΛΟΓΙΚΟ ΤΜΗΜΑ ΝΟΣΟΚΟΜΕΙΟΥ ΠΑΙΔΩΝ "Π&Α  
ΚΥΡΙΑΚΟΥ"**



**ΤΙΤΛΟΣ**

**«ΑΝΑΛΥΣΗ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΚΑΙ ΜΕΛΕΤΗ ΑΠΟΠΤΩΤΙΚΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ  
ΣΤΗΝ ΠΑΙΔΙΚΗ ΛΕΥΧΑΙΜΙΑ»**

**ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

**ΛΑΜΠΡΙΝΗ ΣΤΑΜΑΤΗ**

**ΙΑΤΡΟΣ**

**ΑΘΗΝΑ 2016**



Ημερομηνία αίτησης: 04-02-2009

Ημερομηνία ορισμού τριμελούς επιτροπής: 24-02-2009

Τα μέλη της τριμελούς επιτροπής:

Δ. Καφετζής	Ομότιμος Καθηγητής
Δ. Γουργιώτης	Καθηγητής- Επιβλέπον μέλος
Α. Σκορίλας	Καθηγητής

Ημερομηνία ορισμού θέματος: 23-03-2009

Ημερομηνία κατάθεσης διδακτορικής διατριβής: 22-07-2016

Πρόεδρος Ιατρικής Σχολής : Καθ. Π. Σφηκάκης

Τα μέλη της επταμελούς εξεταστικής επιτροπής:

1	Δ. Καφετζής	Ομ. Καθηγητής
2	Δ. Γουργιώτης	Καθηγητής
3	Α. Σκορίλας	Καθηγητής
4	Μ. Τσολιά	Καθηγήτρια
5	Β. Παπαευαγγέλου	Καθηγήτρια
6	Μ. Μοσχόβη	Επικ. Καθηγήτρια
7	Λ. Κόσσυβα	Επικ. Καθηγήτρια

«Η έγκριση διδακτορικής διατριβής υπό της Ιατρικής Σχολής του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών δεν υποδηλώνει την αποδοχή των γνώμων του συγγραφέως» (Νόμος 5343/1932, άρθρο 202, παρ.2)



# Πρόλογος

Η Οξεία Λεμφοβλαστική λευχαιμία αντιπροσωπεύει το μεγαλύτερο ποσοστό λευχαιμιών της παιδικής ηλικίας. Παρά δυστυχώς τις προόδους στη διάγνωση και στη θεραπεία, υποτροπές της νόσου και θάνατοι ακόμα συμβαίνουν. Επομένως, η ταυτοποίηση νέων προγνωστικών δεικτών ικανών να προβλέψουν την απόκριση στη θεραπεία και την επιβίωση των ασθενών καθίσταται αναγκαία.

Στην παρούσα διδακτορική διατριβή επιχειρείται η μελέτη έκφρασης των γονιδίων *BCL2*, *BAX* και *BCL2L12* της *BCL2* οικογένειας αποπτωτικών γονιδίων, σε παιδιά με Οξεία Λεμφοβλαστική λευχαιμία και ο προσδιορισμός τους ως πιθανών προγνωστικών δεικτών. Η μελέτη εκπονήθηκε στο εργαστήριο Κλινικής Βιοχημείας και Μοριακής Διαγνωστικής της Β' Παιδιατρικής Κλινικής του Πανεπιστημίου Αθηνών, με υπεύθυνο τον Καθηγητή Ιατρικής Σχολής Δημήτριο Γουργιώτη.

Θα ήθελα καταρχήν ιδιαίτερα να ευχαριστήσω τον Καθηγητή και Δάσκαλό μου, επιβλέποντα της διατριβής κ. Δημήτριο Γουργιώτη, για την ανάθεση του σημαντικού αυτού έργου, τη δυνατότητα που μου έδωσε να μπω στον χώρο της έρευνας, την ενθάρρυνση και την αμέριστη συμπαράσταση που μου έδειξε καθ' όλη τη διάρκεια των χρόνων που διήρκεσε η μελέτη αυτή. Υπήρξε εκτός από επιστημονικός καθοδηγητής με υπομονή και ενδιαφέρον σε εργαστηριακό, ερευνητικό και συγγραφικό επίπεδο, επιπλέον ηθικός υποστηρικτής και εμπνευστής για την προσωπική και επαγγελματική μου πορεία.

Θερμά θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Ανδρέα Σκορίλα, Καθηγητή του Τμήματος Βιολογίας του Ε.Κ.Π.Α και μέλος της Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής, για την συνεχή υποστήριξη και καθοδήγησή του καθώς και τις σημαντικές παρατηρήσεις του, οι οποίες υπήρξαν καθοριστικές για την ολοκλήρωση της διατριβής τόσο σε εργαστηριακό όσο και συγγραφικό επίπεδο.

Επίσης, ευχαριστώ τον Ομότιμο Καθηγητή Δημήτριο Καφετζή, μέλος της Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής για την στήριξη και τις πολύτιμες συμβουλές του.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες οφείλω στη Διευθύντρια του Ογκολογικού Τμήματος του Νοσοκομείου Παίδων «Π&Α Κυριακού», κ. Ελένη Κοσμίδη υπό τη Διεύθυνση της οποίας ξεκίνησε η διατριβή, καθώς και τους διαδοχικούς Διευθυντές του Τμήματος κ. Μαρία Βαρβουτσή, κ. Μαργαρίτα Μπάκα και κ. Απόστολο Πουρτσίδα για την συνεργασία, την συλλογή του βιολογικού υλικού της μελέτης και την παραχώρηση των στοιχείων για τη δημιουργία της βάσης δεδομένων με τα κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά των ασθενών και τη μετέπειτα πορεία τους (follow up). Επίσης ευχαριστώ τους επιμελητές Παιδιάτρους του Τμήματος κ. Δημήτριο Δογάνη και κ. Μαρίνα Σερβιτζόγλου για την συνεργασία τους καθώς και το σύνολο του νοσηλευτικού προσωπικού για την συνεργασία και την συμβολή τους στη συλλογή του βιολογικού υλικού.

Επίσης, ευχαριστώ τη Διευθύντρια της Β'ΠΚΚ Καθηγήτρια κ. Μαρία Τσολιά υπό την Διεύθυνση της οποίας ήρθε εις πέρας η παρούσα μελέτη.

Ιδιαίτερα θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Δρ. Βιολόγο Μαργαρίτη Αυγέρη για την παραγωγική συνεργασία και την πολύτιμη βοήθειά του καθ' όλη τη διάρκεια της μελέτης. Την Υποψήφια Δρ. Βιολόγο Δέσποινα Πιατοπούλου για την συνεργασία, τις γνώσεις, την διάθεση και την υποστήριξή της καθώς και τον Δρ. Βιολόγο Αντώνιο Μαρμαρινό, για την ουσιαστική του συμβολή στην ολοκλήρωση της μελέτης. Επίσης ευχαριστώ τα μέλη του Εργαστηρίου Κλινικής Βιοχημείας και Μοριακής Διαγνωστικής της Β' Παιδιατρικής Κλινικής του Πανεπιστημίου Αθηνών, Βιολόγους Μαριέτα Ξαγοράρη και Μαρία Κωνσταντίνου για την σημαντική τους βοήθεια.

Τέλος, ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω στην οικογένειά μου για την αγάπη και την συμπαράστασή τους. Κυρίως όμως για την παιδεία και τα εφόδια, πνευματικά και ηθικά που μου έδωσαν. Όλα αυτά καθόρισαν και καθορίζουν τις επιλογές, την στάση και την επιστημονική και προσωπική μου υπόσταση.

## Ιπποκράτειος Ορκος

Ὄφνυμι Ἀπόλλωνα ἰητρὸν, καὶ Ἀσκληπιὸν, καὶ Ὑγίαν, καὶ Πανάκειαν, καὶ θεοὺς πάντας τε καὶ πάσας, ἴστορας ποιούμενος, ἐπιτελέα ποιήσῃν κατὰ δύναμιν καὶ κρίσιν ἐμὴν ὄρκον τόνδε καὶ συγγραφὴν τήνδε. Ἠγήσασθαι μὲν τὸν διδάξαντά με τὴν τέχνην ταύτην ἴσα γενέτησιν ἐμοῖσι, καὶ βίου κοινώσασθαι, καὶ χρεῶν χρηρίζοντι μετάδοσιν ποιήσασθαι, καὶ γένος τὸ ἐξ ωύτέου ἀδελφοῖς ἴσον ἐπικρινέειν ἄρῃσι, καὶ διδάξῃν τὴν τέχνην ταύτην, ἣν χρηρίζωσι μανθάνειν, ἄνευ μισθοῦ καὶ συγγραφῆς, παραγγελίης τε καὶ ἀκροήσιος καὶ τῆς λουπῆς ἀπάσης μαθήσιος μετάδοσιν ποιήσασθαι υἱοῖσί τε ἐμοῖσι, καὶ τοῖσι τοῦ ἐμῆ διδάξαντος, καὶ μαθηταῖσι συγγεγραμμένοισί τε καὶ ὑρκισμένοις νόμῳ ἰητρικῷ ἄλλῳ δὲ οὐδενί. Διαιτήμασί τε χρήσομαι ἐπ' ὠφελείῃ καμνόντων κατὰ δύναμιν καὶ κρίσιν ἐμὴν, ἐπὶ δηλήσει δὲ καὶ ἀδικίῃ εἴρξῃν. Οὐ δώσω δὲ οὐδὲ φάρμακον οὐδενὶ αἰτηθεὶς θανάσιμον, οὐδὲ ὑφηγήσομαι συμβουλίην τοιήνδε. Ὀμοίως δὲ οὐδὲ γυναικὶ πεσοδὸν φθόριον δώσω. Ἀγνῶς δὲ καὶ ὀσίως διατηρήσω βίον τὸν ἐμὸν καὶ τέχνην τὴν ἐμήν. Οὐ τεμέω δὲ οὐδὲ μὴν λιθιῶντας, ἐκχωρήσω δὲ ἐργάτησιν ἀνδράσι πρήξιος τῆσδε. Ἐξ οἰκίας δὲ ὀκόσας ἂν ἐσίω, ἐσελεύσομαι ἐπ' ὠφελείῃ καμνόντων, ἐκτὸς ἐὼν πάσης ἀδικίης ἐκουσίης καὶ φθορίας, τῆς τε ἄλλης καὶ ἀφροδισίων ἔργων ἐπὶ τε γυναικείων σωμάτων καὶ ἀνδρῶν, ἐλευθέρων τε καὶ δούλων. Ἄδ' ἂν ἐν θεραπείῃ ἦ ἴδω, ἦ ἀκούσω, ἦ καὶ ἄνευ θεραπηίης κατὰ βίον ἀνθρώπων, ἃ μὴ χρή ποτε ἐκλαλέεσθαι ἔξω, σιγήσομαι, ἄρῃτα ἠγεύμενος εἶναι τὰ τοιαῦτα. Ὄρκον μὲν οὖν μοι τόνδε ἐπιτελέα ποίοντι, καὶ μὴ συγχέοντι, εἴη ἐπαύρασθαι καὶ βίου καὶ τέχνης δοξαζομένῳ παρὰ πᾶσιν ἀνθρώποις ἐς τὸν αἰεὶ χρόνον. παραβαίνοντι δὲ καὶ ἐπιορκοῦντι, τάναντία τουτέων.

## Ιπποκράτειος Όρκος (Μετάφραση)

Ορκίζομαι στον Απόλλωνα τον γιατρό, και στον Ασκληπιό και στην Υγεία και στην Πανάκεια και όλους τους θεούς και όλες τις θεές μάρτυρες βάζω πως θα τηρήσω τον όρκο μου αυτόν και αυτό το συμβόλαιο, όσο θα διατηρώ τις δυνάμεις μου και την κρίση μου. Τον μεν διδάξαντά με την τέχνη αυτήν θα τιμώ όσο και τους δικούς μου γονείς και θα τον κάνω κοινωνό του δικού μου βίου και θα του οφείλω τα νενομισμένα. Τους δε γιους του θα θεωρώ ίσους προς αδερφούς μου και θα τους διδάξω την τέχνη αυτήν, αν νιώθουν την ανάγκη να τη μάθουν, χωρίς μισθό και χωρίς έγγραφο συμβόλαιο. Θα διδάξω τα προφορικά και γραπτά μαθήματα και όλη γενικά την υπόλοιπη εξάσκηση του επαγγέλματος μόνο στους δικούς μου γιους, στους γιους του διδασκάλου μου και σε μαθητές που με όρκο και σύμβολαιο, κατά τους άγραφους νόμους της ιατρικής, θα έχουν συνδεθεί μαζί μου. Σε κανέναν άλλον. Θα χρησιμοποιήσω τις θεραπευτικές δίαιτες μόνο προς όφελος των ασθενών, όσο μπορώ και όπως κρίνω ορθό, να αποφύγω δε κάθε βλάβη και αδικία. Δεν θα χορηγήσω κανένα θανατηφόρο φάρμακο, όποιος κι αν μου το ζητήσει, και δεν θα δώσω καμία τέτοια συμβουλή. Επίσης, δεν θα δώσω σε καμία γυναίκα φάρμακο εκτρωτικό. Αγνό και θείο θα διατηρήσω όλον μου τον βίο, καθώς και την τέχνη μου. Να μην ευνουχήσω δε κανέναν, όπως το ζητούν, αφήνοντας την εργασία αυτή για άλλους που ασχολούνται με τέτοιες πράξεις. Σε όσα σπίτια πηγαίνω, θα εισέρχομαι μόνο προς όφελος των ασθενών, μακριά από κάθε θεληματική αδικία και βλάβη. Και μακριά από αφροδίσιες πράξεις, επί γυναικείων σωμάτων και αντρικών, ελευθέρων ή δούλων. Όσα κατά τις θεραπείες (ή και πέραν της ασχολίας μου, στην καθημερινή ζωή των ανθρώπων) ακούσω ή δω, για τα οποία δεν πρέπει να λέγεται τίποτε, θα σιωπώ θεωρώντας τα ως εμπιστευτικά μυστικά. Όσο τον όρκο μου, λοιπόν, θα τηρώ και δεν θα τον παραβαίνω, είτε να έχω καλό όνομα και στη ζωή και στη τέχνη μου και να με εκτιμούν για πάντα όλοι οι άνθρωποι. Εάν δε παραβώ τον όρκο μου και επιορκήσω, να πάθω τα αντίθετα.



# Βιογραφικό Σημείωμα

**Όνοματεπώνυμο:** Σταμάτη Λαμπρινή

**Ημερομηνία γέννησης:** 27/09/1984

**Διεύθυνση κατοικίας:** Κύπρου 32 & Αχαΐας, Διώνη Πικερμίου

**Τηλέφωνο:** 6946886092

**E-mail:** [lamprini\\_stam@yahoo.gr](mailto:lamprini_stam@yahoo.gr)

## ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ

### - Διδακτορική Διατριβή

Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Εργαστήριο Κλινικής Βιοχημείας και Μοριακής Διαγνωστικής της Β΄ Παιδιατρικής Κλινικής της Ιατρικής Σχολής, Νοσοκομείο Παίδων «Π&Α Κυριακού» Θέμα: “Ανάλυση έκφρασης και μελέτη αποπτωτικών γονιδίων στην παιδική λευχαιμία”

(26/02/2009-2016).

### - Πτυχίο Ιατρικής

Ιατρική Σχολή- Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών (ΕΚΠΑ)- βαθμός πτυχίου: Λίαν Καλώς (7.56/10)

(23/09/2002- 28/7/2008).

### - Αποφοίτηση από το 1ο Ενιαίο Λύκειο Παλλήνης

Γενικός βαθμός 19,3/20

(06/2002).

## ΙΣΤΟΡΙΚΟ ΕΠΑΓΓΕΛΜΑΤΙΚΗΣ ΑΠΑΣΧΟΛΗΣΗΣ

### - Ειδικευόμενη Παιδιατρικής στην Παιδιατρική Κλινική του Γενικού Νοσοκομείου Παίδων Πεντέλης

(03/03/2015 έως σήμερα).

### - Ειδικευόμενη Παιδιατρικής στην Παιδιατρική Κλινική του Γενικού Νοσοκομείου Τρίπολης

(13/09/2012-14/06/2014).

### - Εκπλήρωση υπηρεσίας υπαίθρου στο ΠΙ Αγίας Σοφίας, Κέντρο Υγείας Ψαχνών

(16/09/2010-18/09/2012).

- **Επιστημονικός Συνεργάτης στο Εργαστήριο Κλινικής Βιοχημείας και Μοριακής Διαγνωστικής της Β΄ Παιδιατρικής Κλινικής της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Αθηνών, Νοσοκομείο Παιδών «Π&Α Κυριακού»**

(01/09/2008 – 16/09/2010).

#### **ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ**

- Lamprini Stamati, Margaritis Avgeris, Helen Kosmidis, Margarita Baka, Theodora Anastasiou, Despina Piatopoulou, Andreas Scorilas, Dimitrios Gourgiotis *Overexpression of BCL2 and BAX following BFM induction therapy predicts ch ALL patients' poor response to treatment and short term relapse* Journal of Cancer Research and Clinical Oncology 2015;141:2023-2036.
- Kossiva L, Soldatou A, Gourgiotis DI, Stamati L, Tsentidis C. *Serum hepcidin: indication of its role as an "acute phase" marker in febrile children.* Ital J Pediatr. 2013 Apr 25;39:25.
- Boutsikou T, Briana DD, Boutsikou M, Kafalidis G, Stamati L, Baka S, Hassiakos D, Gourgiotis D, Malamitsi-Puchner A. *Cord blood chemerin and obestatin levels in large for gestational age infants.* J Matern Fetal Neonatal Med. 2013 Jan;26(2):123-6.
- Despina D. Briana, Theodora Boutsikou, Stavroula Baka, Maria Boutsikou, Lamprini Stamati, Dimitrios Hassiakos, Dimitrios Gourgiotis, Ariadne Malamitsi-Puchner *Perinatal role of hepcidin and iron homeostasis in full-term intrauterine growth-restricted infants* European Journal of Haematology 2012;90:37-44.

#### **ΛΟΙΠΗ ΕΜΠΕΙΡΙΑ**

- **Εργαστηριακή εμπειρία**  
Τεχνικές αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR, Multiplex PCR, RT-PCR, quantitative Real Time PCR), ηλεκτροφορητικές τεχνικές όλων των τύπων, τεχνικές απομόνωσης, χαρακτηρισμού και ανάλυσης νουκλεϊκών οξέων (DNA-RNA) καθώς και τεχνικές ELISA, RIA και IRMA.

#### **ΛΟΙΠΕΣ ΓΝΩΣΕΙΣ**

- **Ξένες γλώσσες:** Αγγλικά (Άριστα), Γαλλικά (Πολύ καλά), Γερμανικά (Βασικό επίπεδο).
- **Γνώσεις Υπολογιστών:** Windows, Microsoft Office Suite

## ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΙΣ ΣΕ ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΑ ΣΥΝΕΔΡΙΑ

### ΔΙΕΘΝΗ ΣΥΝΕΔΡΙΑ

- Briana DD, Boutsikou T, Boutsikou M, Stamati L, Baka S, Hassiakos D, Gourgiotis D, Malamitsi –Puchner A *New insights in iron homeostasis in term intrauterine growth restricted infants at birth: the role of hepcidin* 3<sup>rd</sup> International Congress of the Union of the European Neonatal and Perinatal Societies. Porto, Portugal, November 14-17, 2012.
- Boutsikou T, Briana DD, Dendrinou A, Boutsikou M, Stamati L, Baka S, Hassiakos D, Gourgiotis D, Malamitsi-Puchner A *Cord blood chemerin and obestatin in large for gestational age infants*. 4<sup>th</sup> Congress of the European Academy of Pediatric Societies, Instabul, Turkey, October 5-9, 2012.
- Briana DD, Boutsikou T, Stamati L, Boutsikou M, Baka S, Hassiakos D, Gourgiotis D, Malamitsi-Puchner A *Cord blood hepcidin levels and association with iron parameters in term IUGR infants*. 20<sup>th</sup> European Workshop on Neonatology, Tallin, Estonia, June 27-30, 2012.
- Liosi S, Boutsikou T, BoutsikouM, Briana DD, Stamati L, Baka S, Hassiakos D, Gourgiotis D, Malamitsi-Puchner A. *Cord blood H-ficolin and L-ficolin concentrations in term pregnancies with normal and restricted fetal growth*. 52<sup>nd</sup> Annual Meeting of the European Society for Paediatric Research, Newcastle, United Kingdom, October 14-17, 2011.
- N.Palaiologou, A.Marmarinos, V-M. Vraila, S.Lamprini, D.Gourgiotis *Cross reactivity between honeybee and yellow jacket in children with hymenoptera allergy*. EAACI & GA2LEN Allergy School on Hymenoptera Venom Allergy, Ancona September 3rd- 6th 2009.
- Liosi S., Briana D., Baka S., Gourgiotis D., Boutsikou M., Stamati L., Hassiakos D., Malamitsi\_Puchne A. *Cord blood TGF\_1 concentrations in intrauterine growth restricted pregnancies at term* 4<sup>th</sup> European Congress of Paediatricians, Moscow, 3-6 July, 2009.

### ΕΛΛΗΝΙΚΑ ΣΥΝΕΔΡΙΑ

- Antoniou I., Kottarakou N., Mpakogeorgou H., Siambou A., Vouloumanou E., Stamati L., Davros I *Cold Autoimmune Haemolytic Anaemia after EBV infection* 51st Panhellenic Paediatric Conference, 21-23 of June Alexandroupolis 2013.
- Antoniou I., Vouloumanou E., Kottarakou N., Siambou A., Stamati L., Davros I *Ischemic stroke in a paediatric patient after head injury* 51st Panhellenic Paediatric Conference, 21-23 of June Alexandroupolis 2013.

- Antoniou I., Siambou A., Kottarakou N., Vouloumanou E., Stamati L., Davros I *Diagnosis of Juvenile Idiopathic Arthritis in a child after an injury* 51st Panhellenic Paediatric Conference, 21-23 of June Alexandroupolis 2013.
- Antoniou I., Siambou A., Kottarakou N., Stamati L., Vouloumanou E., Davros I *Vaccination Program in Children without insurance* 51st Panhellenic Paediatric Conference, 21-23 of June Alexandroupolis 2013.
- Antoniou I., Stamati L., Vouloumanou E., Kottarakou N., Siambou A., Davros I. *Henoch Schoenlein Purpura (HSP) in paediatric patients of a provincial General Hospital* 51st Panhellenic Paediatric Conference, 21-23 of June Alexandroupolis 2013.
- Briana D., Boutsikou T., Stamati L., Boutsikou M., Baka S., Hassiakos D., Gourgiotis D., Malamitsi-Puchner *New insights in iron homeostasis in term intrauterine growth restricted infants at birth* 4th Panhellenic Conference in Neonatology, Athens 11-13 May, 2012.
- Liosi S., Briana D., Gourgiotis D., Boutsikou M., Baka S., Stamati L., Hassiakos D., Malamitsi Puchner *Cord blood TGF-1 concentrations in full-term pregnancies with normal growth and intrauterine growth restriction*. 15th conference of Perinatal Medicine and Noanatology Vol.4 p.111 2009.



# Περιεχόμενα

<b>1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ</b> .....	<b>1</b>
1.1 Καρκίνος .....	1
1.1.1 Γενικά.....	1
1.1.2 Γενετική του καρκίνου.....	2
1.1.2.1 Πρωτοογκογονίδια και ογκογονίδια.....	4
1.1.2.2 Ογκοκατασταλτικά γονίδια.....	5
1.1.2.3 Αντιαποπτωτικά και αποπτωτικά γονίδια .....	6
1.1.3 Φαινότυπος του καρκίνου .....	7
1.1.4 Καρκινικοί δείκτες.....	9
1.1.5 Τύποι καρκίνου.....	11
1.2 ΑΙΜΑ-ΑΙΜΟΠΟΙΗΤΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ .....	12
1.2.1 Αίμα .....	12
1.2.2 Αιμοποιητικός ιστός- Αιμοποίηση.....	18
1.2.2.1 Εξέταση μυελού των οστών.....	22
1.3 ΛΕΥΧΑΙΜΙΑ ΣΤΗΝ ΠΑΙΔΙΚΗ ΗΛΙΚΙΑ .....	25
1.3.1 ΟΞΕΙΑ ΛΕΜΦΟΒΛΑΣΤΙΚΗ ΛΕΥΧΑΙΜΙΑ.....	26
1.3.1.1 Κλινική εικόνα- Εργαστηριακά ευρήματα της ΟΛΛ.....	27
1.3.1.2 Διαφορική Διάγνωση .....	28
1.3.1.3 Διάγνωση της ΟΛΛ.....	29
1.3.1.3.1 Μορφολογία βλαστών και κυτταροχημεία .....	29
1.3.1.3.2 Ανοσοφαινότυπος.....	31
1.3.1.3.3 Γενετική της ΟΛΛ.....	31
1.3.1.4 Ταξινόμηση της ΟΛΛ .....	34
1.3.1.5 Προγνωστικοί παράγοντες.....	36
1.3.1.6 Θεραπεία της ΟΛΛ .....	37
1.4 ΑΠΟΠΤΩΣΗ .....	41
1.4.1 Γενικά.....	41
1.4.2 Μηχανισμός της απόπτωσης .....	43

1.5 ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑ BCL2 .....	46
1.5.1 Γενικά.....	46
1.5.2 Ρόλος των μελών της BCL2 οικογένειας στην απόπτωση .....	49
1.5.3 BCL2 γονίδιο και γονιδιακό προϊόν.....	51
1.5.3.1 BCL2 γονίδιο και γονιδιακό προϊόν στην ΟΛΛ ενηλίκων.....	52
1.5.3.2 BCL2 γονίδιο και γονιδιακό προϊόν στην ΟΛΛ παιδιών .....	54
1.5.4 BAX γονίδιο και γονιδιακό προϊόν .....	57
1.5.4.1 BAX γονίδιο και γονιδιακό προϊόν στην ΟΛΛ.....	59
1.5.5 BCL2L12 γονίδιο και γονιδιακό προϊόν .....	61
1.5.5.1 BCL2L12 γονίδιο και γονιδιακό προϊόν στον καρκίνο .....	62
1.6 ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ.....	65
<b>2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....</b>	<b>67</b>
2.1 ΒΙΟΛΟΓΙΚΟ ΥΛΙΚΟ .....	67
2.2 ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ.....	69
2.3 ΟΡΓΑΝΑ .....	71
2.4 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ.....	71
2.4.1 Απομόνωση ολικού RNA .....	71
2.4.2 Ποσοτική και ποιοτική εκτίμηση εκχυλίσματος RNA.....	74
2.4.2.1 Φωτομέτρηση RNA .....	74
2.4.2.2 Ηλεκτροφόρηση RNA σε πήκτωμα αγαρόζης 1,5% (w/v) .....	76
2.4.3 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR).....	80
2.4.3.1 Αντίστροφη μεταγραφή.....	80
2.4.3.2 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (conventional PCR) .....	83
2.4.3.3 Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της PCR.....	91
2.4.4 Ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (quantitative real-time PCR, qRT-PCR).....	92
2.4.4.1 Εισαγωγή.....	92
2.4.4.2 Αρχή της μεθόδου qRT- PCR .....	93
2.4.4.3 Συστήματα ανίχνευσης στην αντίδραση qRT-PCR.....	94
2.4.4.4 Υπολογιστικές μέθοδοι της qRT-PCR .....	98

2.4.5 Στατιστική ανάλυση της έκφρασης των γονιδίων BCL2, BAX και BCL2L12 σε ασθενείς με ΟΛΛ και μάρτυρες .....	104
<b>3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....</b>	<b>106</b>
3.1 Φωτομετρικός προσδιορισμός και ποιοτική ανάλυση του ολικού RNA από κύτταρα μυελού των οστών .....	106
3.2 Ποιοτική ανάλυση του ολικού RNA σε πήκτωμα αγαρόζης .....	107
3.3 Έλεγχος της έκφρασης του γονιδίου GAPDH (αφυδρογονάσης της 3-φωσφορικής γλυκεραλδεϋδης) σε δείγματα μυελού των οστών μέσω της αντίδρασης PCR .....	108
3.4 Ανάλυση της έκφρασης των γονιδίων BCL2, BAX και BCL2L12 σε δείγματα μυελού των οστών ασθενών και μαρτύρων μέσω της αντίδρασης qReal-Time PCR .....	109
3.5 Ανάλυση της έκφρασης του mRNA των γονιδίων BCL2, BAX και BCL2L12 συγκριτικά ανάμεσα σε ασθενείς κατά τη διάγνωση και μάρτυρες .....	112
3.6 Ανάλυση της σχέσης μεταξύ των επιπέδων έκφρασης του mRNA των γονιδίων BCL2, BAX και BCL2L12 στη διάγνωση και των κλινικοπαθολογικών χαρακτηριστικών των ασθενών....	113
3.7 Μελέτη της προγνωστικής αξίας (απάντηση στην θεραπεία) της έκφρασης των υπό μελέτη γονιδίων BCL2, BAX και BCL2L12 στη διάγνωση της νόσου .....	116
3.8 Μελέτη της προγνωστικής αξίας των υπό μελέτη γονιδίων BCL2, BAX και BCL2L12 στην πρόβλεψη επιβίωσης των ασθενών με παιδική ΟΛΛ.....	120
3.9 Μελέτη της σχέσης της έκφρασης των υπό μελέτη γονιδίων BCL2, BAX και BCL2L12 μετά την έναρξη της θεραπείας και της επιβίωσης των ασθενών με ΟΛΛ.....	125
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ .....	132
5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ .....	142
6. ΠΕΡΙΛΗΨΗ .....	151
7. ABSTRACT .....	158



# Κατάλογος Εικόνων

<b>Εικόνα 1:</b> Η διαδικασία της καρκινογένεσης.....	4
<b>Εικόνα 2:</b> Νέες ιδιότητες των καρκινικών κυττάρων. ....	8
<b>Εικόνα 3:</b> Καρκινικοί δείκτες. ....	11
<b>Εικόνα 4:</b> Αλληλεπιδράσεις και δραστηριότητες των T και B λεμφοκυττάρων.....	17
<b>Εικόνα 5:</b> Διαδικασία Αιμοποίησης. ....	22
<b>Εικόνα 6:</b> Προδιαθεσικοί παράγοντες Οξείας Λεμφοβλαστικής Λευχαιμίας. ....	27
<b>Εικόνα 7:</b> Μορφολογικά χαρακτηριστικά τύπων κυτταρικού θανάτου. ....	43
<b>Εικόνα 8:</b> Τα δύο μονοπάτια του μηχανισμού της απόπτωσης. ....	46
<b>Εικόνα 9:</b> Σχηματική αναπαράσταση της δομής των μελών της BCL2 οικογένειας.....	48
<b>Εικόνα 10:</b> Σχηματική αναπαράσταση της μοριακής ρύθμισης του μηχανισμού απόπτωσης.....	50
<b>Εικόνα 11:</b> Γονίδιο BCL2. Εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 18 (περιοχή: 18q21.3).....	51
<b>Εικόνα 12:</b> Γονίδιο BAX. Εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 19 (περιοχή19q13.3-q13.4).....	58
<b>Εικόνα 13:</b> Γονίδιο BCL2L12. Εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 19 (περιοχή19q13.3-q13.4)..	61
<b>Εικόνα 14:</b> Πίνακας λόγων καθαρότητας και συγκεντρώσεων φωτομέτρησης και αντίστοιχο γράφημα καμπύλων απορρόφησης υπεριώδους ακτινοβολίας των δειγμάτων. ....	76
<b>Εικόνα 15:</b> Ηλεκτροφόρηση RNA σε πήκτωμα αγαρόζης 1,5% (w/v). Σύγκριση μεταξύ αποικοδομημένου και ακέραιου RNA.....	77
<b>Εικόνα 16:</b> Διαδικασία αντίστροφης μεταγραφής. ....	82
<b>Εικόνα 17:</b> Η διαδικασία της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (PCR).....	88
<b>Εικόνα 18:</b> Οι φάσεις της αντίδρασης της αλυσιδωτής πολυμεράσης. ....	88
<b>Εικόνα 19:</b> Η καμπύλη αντίδρασης της qRT-PCR (Quantitative Real-Time PCR). ....	94
<b>Εικόνα 20:</b> Αρχή λειτουργίας ιχνηθετών Taqman.....	96

<b>Εικόνα 21:</b> Ηλεκτροφορητική ανάλυση του ολικού RNA τεσσάρων δειγμάτων ασθενών με ΟΛΛ σε πήκτωμα αγαρόζης 1,5% (w/v).....	108
<b>Εικόνα 22:</b> Έκφραση του γονιδίου αναφοράς GAPDH σε δείγματα μυελού των οστών ασθενών με ΟΛΛ. ....	109
<b>Εικόνα 23:</b> Καμπύλες ενίσχυσης της ποσοτικής PCR σε πραγματικό χρόνο για το γονίδιο αναφοράς GAPDH και τα μελετώμενα γονίδια BCL2, BAX και BCL2L12 σε δείγμα ΜΟ ασθενών με ΟΛΛ. ....	110
<b>Εικόνα 24:</b> Αντιπροσωπευτική καμπύλη τήξης για τον διαχωρισμό ειδικών από τα μη ειδικά προϊόντα (διμερή εκκινητών) σε δείγμα ΜΟ παιδιού με ΟΛΛ κατά τη μελέτη των γονιδίων GAPDH, BCL2, BAX και BCL2L12. ....	111
<b>Εικόνα 25:</b> (Α). Box plots που παρουσιάζουν τα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων BCL2 και BAX καθώς και τους λόγους τους BCL2/BAX σε δείγματα Μυελού των οστών ασθενών με ΟΛΛ και μαρτύρων (Β). ROC καμπύλη της έκφρασης των γονιδίων BCL2 και BAX καθώς και του λόγου τους.....	115
<b>Εικόνα 26:</b> (Α). Box plots που παρουσιάζουν τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου BCL2L12 σε δείγματα Μυελού των οστών ασθενών με ΟΛΛ και μαρτύρων (Β). ROC καμπύλη της έκφρασης του γονιδίου BCL2L12 που δείχνει την διαφοροδιαγνωστική ικανότητα μεταξύ ασθενών και μαρτύρων.....	116
<b>Εικόνα 27:</b> (Α-С) Box plots που παρουσιάζουν την έκφραση των γονιδίων BCL2, BAX και του λόγου BCL2/BAX σε δείγματα Μυελού των οστών (ΜΟ) ασθενών με ΟΛΛ σε σχέση με την απάντηση στον Μ.Ο την 15η ημέρα (ποσοστό βλαστών) (Α), MRD την 33η ημέρα (Β) και την κατηγοριοποίηση των ασθενών βάσει κινδύνου (С).....	118
<b>Εικόνα 28:</b> (Α-С) Box plots που παρουσιάζουν την έκφραση του γονιδίου BCL2L12 σε δείγματα Μυελού των οστών (ΜΟ) ασθενών με ΟΛΛ σε σχέση με την απάντηση στον Μ.Ο την 15η ημέρα (ποσοστό βλαστών) (Α), MRD την 33η ημέρα (Β) και την κατηγοριοποίηση των ασθενών βάσει κινδύνου (С). ....	118
<b>Εικόνα 29:</b> Kaplan-Meier καμπύλες για την επιβίωση ελεύθερη νόσου (DFS) και την ειδική επιβίωση από τη νόσο (CSS) των ασθενών ως προς τα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων BCL2 και BAX στη διάγνωση. ....	122

<b>Εικόνα 30:</b> Kaplan-Meier καμπύλες για την επιβίωση ελεύθερη νόσου (DFS) και την ειδική επιβίωση από τη νόσο (CSS) των ασθενών ως προς τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου BCL2L12 στη διάγνωση. ....	123
<b>Εικόνα 31:</b> Kaplan-Meier καμπύλες για την επιβίωση ελεύθερη νόσου (DFS) και την ειδική επιβίωση από τη νόσο (CSS) των ασθενών ως προς τα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων BCL2, BAX και BCL2L12 την 33η ημέρα της θεραπείας με το πρωτόκολλο BFM. ....	127
<b>Εικόνα 32:</b> Ανάλυση επιβίωσης βάσει της έκφρασης των γονιδίων BCL2 και BAX την 33η ημέρα της θεραπείας με το πρωτόκολλο BFM. ....	130
<b>Εικόνα 33:</b> Ανάλυση επιβίωσης βάσει της έκφρασης των γονιδίων BCL2 και BAX την 33η ημέρα της θεραπείας με το πρωτόκολλο BFM σε ασθενείς με ευνοϊκούς προγνωστικούς δείκτες. ....	131

## Κατάλογος Πινάκων

Πίνακας 1: Προγνωστικοί παράγοντες ασθενών με Οξεία Λεμφοβλαστική λευχαιμία. .....	38
Πίνακας 2: Κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά ασθενών με ΟΛΛ.....	69
Πίνακας 3: Όγκοι και συγκεντρώσεις μίγματος ολικού RNA- DNase/RNase-free water και Oligo-dT.....	82
Πίνακας 4: Όγκοι και συγκεντρώσεις μίγματος αντίδρασης.....	83
Πίνακας 5: Αλληλουχία των εκκινήτων του γονιδίου GAPDH.....	89
Πίνακας 6: Ποσότητα και συγκέντρωση αντιδραστηρίων μίγματος συμβατικής PCR.	91
Πίνακας 7: Οι αλληλουχίες των εκκινήτων που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία για τα γονίδια GAPDH, BAX, BCL2 και BCL2L12. ....	102
Πίνακας 8: Οι όγκοι και οι συγκεντρώσεις του μίγματος της αντίδρασης qRT-PCR.	1033
Πίνακας 9: Λόγοι A260/280, A260/230 και συγκεντρώσεις 10 δειγμάτων Μυελού των Οστών (1-5 ασθενείς, 6-10 μάρτυρες).....	107
Πίνακας 10: Ανάλυση λογιστικής παλινδρόμησης για την διάκριση δειγμάτων Μυελού των Οστών ασθενών με ΟΛΛ από δείγματα μαρτύρων. ....	113
Πίνακας 11: Ανάλυση λογιστικής παλινδρόμησης για την πρόγνωση της απόκρισης στη θεραπεία με το πρωτόκολλο BFM σε ασθενείς με ΟΛΛ βάσει των επιπέδων έκφρασης BCL2, BAX και BCL2L12 στη διάγνωση. ....	120
Πίνακας 12: Ανάλυση παλινδρόμησης κατά Cox για την πρόγνωση της επιβίωσης ελεύθερης νόσου (DFS) και της ειδικής επιβίωσης για τη νόσο (CSS) των ασθενών με ΟΛΛ βάσει των επιπέδων έκφρασης των γονιδίων BCL2, BAX και BCL2L12 στη διάγνωση. .....	125
Πίνακας 13: Ανάλυση παλινδρόμησης κατά Cox για την πρόγνωση της επιβίωσης ελεύθερης νόσου (DFS) και της ειδικής επιβίωσης για τη νόσο (CSS) των ασθενών με ΟΛΛ βάσει των επιπέδων έκφρασης των γονιδίων BCL2, BAX και BCL2L12 την 33η ημέρα της θεραπείας με το πρωτόκολλο BFM.....	129

## **Κατάλογος Συντμήσεων**

<b>AAB</b>	απόλυτος αριθμός βλαστών
<b>AFP</b>	Alpha Fetoprotein
<b>AGS</b>	Gastric Adenocarcinoma
<b>ALL</b>	Acute Lymphoblastic Leukemia
<b>AML</b>	Acute Myeloid Leukemia
<b>AMV-RT</b>	Avian Myeloblastosis Virus- Reverse Transcriptase
<b>APAF-1</b>	Apoptotic Protease Activating Factor-1
<b>ATRA</b>	All-trans retinoic acid
<b>BFU-E</b>	Burst-Forming Unit
<b>BM</b>	Bone marrow response
<b>CAM</b>	Cells Adhension Molecules
<b>CBC</b>	Complete Blood Count
<b>CCG</b>	Children's Cancer Group
<b>CCR</b>	Complete Continuous Remission
<b>cDNA</b>	Complementary DNA
<b>CFU-E</b>	Colony-Forming Unit
<b>CLL</b>	Chronic Lymphocytic Leukemia
<b>CML</b>	Chronic Myeloid Leukemia
<b>COG</b>	Children's Oncology Group
<b>CR</b>	Complete Remission
<b>Ct</b>	Threshold Cycle
<b>DISC</b>	Death Inducing Signaling Complex
<b>DD</b>	Death Domain
<b>DED</b>	Death-Effector Domain
<b>DFS</b>	Disease Free Survival
<b>EFS</b>	Event free survival
<b>ENY</b>	Εγκεφαλονωτιαίο υγρό
<b>EDTA</b>	Ethylenediaminetetraacetic Acid
<b>FADD</b>	Fas-associated death domain protein
<b>FISH</b>	Fluorescence in situ Hybridization

<b>FRET</b>	Fluorescence Resonance Energy Transfer
<b>GAPDH</b>	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase
<b>GBM</b>	Glioblastoma
<b>GC</b>	Glucocorticoids
<b>G-CSF</b>	Granulocyte colony stimulating factor
<b>GM-CSF</b>	Granulocyte macrophage colony stimulating factor
<b>GO</b>	Gemtuzumab ozogamicin
<b>HSC</b>	Hematopoietic Stem Cell
<b>HPLC</b>	High-Pressure-Liquid Chromatography
<b>HR</b>	High Risk
<b>HSCT</b>	Hematopoietic Stem Cell Transplantation
<b>IAP</b>	Inhibitor of Apoptosis Family of Proteins
<b>ICE</b>	Interleukin-1 converting enzyme
<b>IRF3</b>	Interferon Regulatory Factor 3
<b>IT</b>	Intrathecally
<b>ΚΝΣ</b>	Κεντρικό Νευρικό Σύστημα
<b>MHC</b>	Major Histocompatibility Complex
<b>MMLV-RT</b>	Moloney Murine Leukaemia Virus- Reverse Transcriptase
<b>MMP</b>	Mitochondrial Membrane Potential
<b>ΜΟ</b>	Μυελός Οστών
<b>MPAL</b>	Mixed Phenotype Acute Leukemia
<b>MRD</b>	Minimal Residual Disease
<b>MR</b>	Medium Risk
<b>NK</b>	Natural Killer Cells
<b>NBC</b>	Nucleated differential cell count
<b>NCI</b>	National Cancer Institute
<b>ΟΛΛ</b>	Οξεία Λεμφοβλαστική Λευχαιμία
<b>ΟΜΛ</b>	Οξεία Μυελογενής Λευχαιμία
<b>PCR</b>	Polymerase Chain Reaction
<b>PDGF</b>	Platelet Derived Growth Factor
<b>PLT</b>	Platelets

<b>POG</b>	Pediatric Oncology Group
<b>PRD</b>	Prednisone
<b>RBC</b>	Red Blood Cells
<b>RRAS</b>	Ras-related protein R-Ras
<b>RSS</b>	RNA Storage Solution
<b>RT PCR</b>	Real –Time Polymerase Chain Reaction
<b>SR</b>	Standard Risk
<b>TC</b>	Trisodium Citrate
<b>Tm</b>	Melting Temperature
<b>TNF</b>	Tumor Necrosis Factor
<b>TPO</b>	Thrombopoietin
<b>XAF-1</b>	XIAP-associated factor-1
<b>XIAP</b>	X-linked inhibitor of apoptosis protein
<b>ΧΜΘ</b>	Χημειοθεραπεία
<b>ΧΛΛ</b>	Χρόνια Λεμφοβλαστική Λευχαιμία
<b>ΧΜΛ</b>	Χρόνια Μυελογενής Λευχαιμία
<b>WBC</b>	White Blood Cells

## **1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ**

Οι κακοήθειες της παιδικής ηλικίας αποτελούν μόλις το 2% του συνόλου των κακοηθειών όλων των ηλικιών. Συνιστούν ωστόσο στις ανεπτυγμένες χώρες την δεύτερη κυριότερη αιτία θανάτου παιδιών ηλικίας από ενός έως δεκατεσσάρων ετών μετά τα ατυχήματα. Εξ' αυτών η λευχαιμία κατέχει κυρίαρχη θέση, αποτελώντας το 41% όλων των κακοηθειών στα παιδιά και ακολουθείται από τον καρκίνο του εγκεφάλου, τα σαρκώματα των μαλακών μορίων, τους νεφρικούς όγκους (Wilms) και το non-Hodgkin λέμφωμα.

Τα τελευταία 25 χρόνια έχει συντελεστεί σημαντική πρόοδος στην αύξηση των ποσοστών επιβίωσης των παιδιών που πάσχουν από τέτοιου τύπου κακοήθειες. Συγκεκριμένα, το συνολικό ποσοστό πενταετούς επιβίωσης των παιδιών με καρκίνο έχει αυξηθεί από 58% που ήταν για τους ασθενείς που διεγνώσθησαν μεταξύ 1975-1977 και 80% που ήταν για τους ασθενείς που διεγνώσθησαν μεταξύ 1996-2004 σε πάνω από 85% στους ασθενείς στις μέρες μας. Όσον αφορά στη λευχαιμία της παιδικής ηλικίας, παρά τις προόδους στη διάγνωση και στη θεραπεία τις τελευταίες δεκαετίες, προκλήσεις ακόμη παραμένουν καθώς ακόμη και με τις σύγχρονες θεραπευτικές μεθόδους ένα στα πέντε παιδιά εμφανίζουν υποτροπή της νόσου και κακή πρόγνωση. Επιπλέον, η θνησιμότητα λόγω υποτροπής της ΟΛΛ παραμένει η σημαντικότερη αιτία θανάτου στα παιδιά με καρκίνο ενώ η εφαρμοζόμενη έως τώρα θεραπεία σχετίζεται με βραχυπρόθεσμες και μακροπρόθεσμες παρενέργειες. Καθίσταται λοιπόν αναγκαία η μελέτη, ταυτοποίηση και καθιέρωση νέων μοριακών δεικτών ικανών για έγκαιρη διάγνωση της νόσου, πρόβλεψη του θεραπευτικού αποτελέσματος της εφαρμοζόμενης αγωγής καθώς και την πρόγνωση της επιβίωσης.<sup>1,2,3,4,5,29</sup>

### **1.1 Καρκίνος**

#### **1.1.1 Γενικά**

Ως καρκίνος περιγράφεται μία ομάδα παθήσεων, η οποία χαρακτηρίζεται από ανεξέλεγκτη ανάπτυξη παθολογικών κυττάρων. Η επιζήμια δραστηριότητα των νεοπλασιών έγκειται στην καταστροφή φυσιολογικών οργάνων που γίνεται κατά συνέχεια ιστού, καθώς και με διασπορά σε απομακρυσμένα σημεία δια της αιματικής και της λεμφικής οδού ή μέσω των ορογόνων επιφανειών. Τα χαρακτηριστικά αυτά της



δήθησης και της μετάστασης διαχωρίζουν τους κακοήθεις από τους καλοήθεις όγκους οι οποίοι συνήθως περιβάλλονται από κάψα, παραμένουν εντοπισμένοι και χαρακτηρίζονται ως ανώτερης διαφοροποίησης χωρίς να προκαλούν συνήθως απειλητικά για τη ζωή προβλήματα. Δεν αποκλείεται ωστόσο σε ορισμένες περιπτώσεις η εξαλλαγή ενός καλοήθους όγκου σε κακοήθη.<sup>6,7</sup>

Το μεγαλύτερο ποσοστό (80%) των κακοήθων όγκων είναι επιθηλιακής προέλευσης (στερεοί όγκοι), το 10% προέρχεται από το λεμφικό ή τον αιμοποιητικό ιστό (λεμφώματα- λευχαιμίες) ενώ υπάρχει και ένα ποσοστό όγκων νευροενδοκρινούς προέλευσης. Ανάλογα με την ωριμότητα των κυττάρων, οι όγκοι διακρίνονται σε ανώτερης (grade I), μέσης (grade II), κατώτερης διαφοροποίησης (grade III) και σε αναπλαστικούς όγκους (grade IV). Στους ανώτερης διαφοροποίησης όγκους τα κύτταρα είναι πιο ώριμα, ενώ στους αναπλαστικούς όγκους η διαφοροποίηση έχει χαθεί και σημειώνεται ποικιλία στο μέγεθος και το σχήμα των κυττάρων και των πυρήνων τους.<sup>6</sup>

Ένας μεγάλος αριθμός παραγόντων μπορεί να προκαλέσει μια αλληλουχία γεγονότων που καταλήγουν στην εμφάνιση καρκίνου. Το τελικό κοινό αποτέλεσμα της δράσης αυτών των παραγόντων στα κύτταρα είναι η γενετική μετάλλαξη, που οδηγεί ένα ορθώς συμπεριφερόμενο κύτταρο του σώματος σε μη ανταπόκριση στους συνηθισμένους ελέγχους και τις ισορροπίες που διέπουν ένα φυσιολογικό σύνολο κυττάρων. Χημικές ουσίες, βιολογικοί παράγοντες όπως ιοί, διαιτητικοί παράγοντες αλλά και κληρονομικές παθήσεις διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην καρκινογένεση.<sup>6,7</sup>

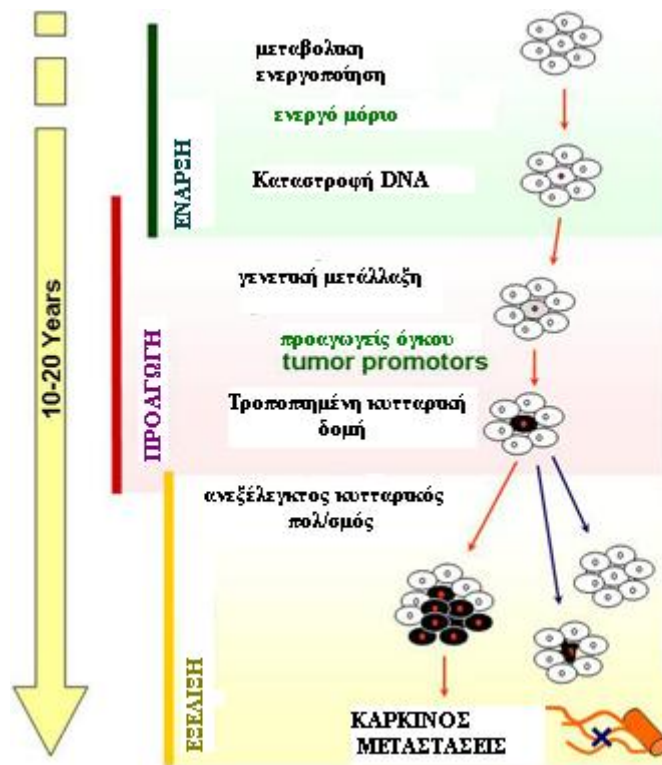
### **1.1.2 Γενετική του καρκίνου**

Όπως προαναφέρθηκε, το τελικό κοινό αποτέλεσμα στο οποίο συγκλίνουν όλες οι αιτίες καρκινογένεσης είναι η κυτταρική γενετική μετάλλαξη. Ένας μεγάλος αριθμός εργασιών μελέτης καρκινικών κυττάρων αποδεικνύει την ύπαρξη βλαβών σε πολλά τμήματα του γονιδιώματός τους, τόσο λόγω σημειακών μεταλλάξεων, όσο και εξαιτίας αλλοιώσεων σε ολόκληρα χρωμοσώματα ενισχύοντας έτσι την άποψη της ύπαρξης πολλαπλών μεταλλάξεων στη διαδικασία ανάπτυξης του καρκίνου.

Η διαδικασία της καρκινογένεσης θα μπορούσε σχηματικά να διαιρεθεί σε τρεις φάσεις: την έναρξη (initiation), την προαγωγή (promotion) και την εξέλιξή της

(progression). Η έναρξη της καρκινογένεσης αφορά σε μια μη αναστρέψιμη γενετική μεταλλαγή, συνήθως μετάλλαξη σε ένα και μόνο γονίδιο, η προαγωγή της σχετίζεται με αυξημένο πολλαπλασιασμό των αρχικών κυττάρων που υπέστησαν τη μετάλλαξη οδηγώντας έτσι στην αύξηση του πληθυσμού τους και τέλος η εξέλιξη χαρακτηρίζεται από τη συσσώρευση περισσότερων γενετικών μεταλλάξεων που οδηγούν στην απόκτηση του κακοήθους φαινοτύπου.

Αναλυτικότερα, στην αρχική φάση της καρκινογένεσης δύο γεγονότα οδηγούν στην εγκατάσταση μιας γενετικής μετάλλαξης, η μετατροπή χημικών παραγόντων σε καρκινογόνες ουσίες καθώς και οι διαταραχές στην επιδιόρθωση του DNA και στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Αρχικά η μετατροπή χημικών παραγόντων σε καρκινογόνες ουσίες προϋποθέτει τη μεταβολική ενεργοποίησή τους. Οι ουσίες αυτές έπειτα, ως ισχυρά ηλεκτρόφιλες συνδέονται στο DNA από όπου μπορούν να μετακινηθούν μόνο με τη δράση των επιδιορθωτικών μηχανισμών του. Η αποτυχία των μηχανισμών αυτών να αποτρέψουν τη δράση των καρκινογόνων ουσιών και ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός που ακολουθεί, οδηγούν σε μόνιμες πλέον μεταλλάξεις στο γονιδίωμα που είτε οδηγούν σε ενεργοποίηση των ογκογονιδίων ή σε απενεργοποίηση των ογκοκατασταλτικών γονιδίων. Οι τύποι των μεταλλάξεων που μπορούν να συμβούν είναι σημειακές μεταλλάξεις, απαλοιφές, προσθήκες, χρωμοσωμιακές μεταθέσεις ή ενισχύσεις. Παραδείγματα χημικών παραγόντων αποτελούν η αφλατοξίνη Β<sub>1</sub>, η διμεθυλνιτροζαμίνη και η βενζιδίνη και τα υπεύθυνα ένζυμα για την ενεργοποίησή τους ανήκουν στις ομάδες των μονοοξυγενασών, των δεϋδρογενασών, των εστερασών, των ρεδουκτασών και των οξειδασών. Στη δεύτερη φάση της καρκινογένεσης, χημικοί παράγοντες μη τοξικοί για το γονιδίωμα και διαφορετικοί από αυτούς που διαδραματίζουν ρόλο στην πρώτη φάση προκαλούν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό των κυττάρων που υπέστησαν μεταλλάξεις στην πρώτη φάση, οδηγώντας έτσι στον σχηματισμό μη διηθητικών όγκων. Δύο σημαντικά σημεία είναι ότι για τον σχηματισμό του όγκου απαιτείται επαναλαμβανόμενη έκθεση στον χημικό παράγοντα και ότι η δράση του προϋποθέτει την ύπαρξη μεταλλάξεων στο γονιδίωμα των κυττάρων από τη δράση ενός αρχικού τοξικού χημικού παράγοντα που συνδέεται στο DNA. Τέλος, κατά την τρίτη φάση της καρκινογένεσης, την εξέλιξη, συσσωρεύονται επιπρόσθετες μεταλλάξεις που είναι υπεύθυνες για την κακοήθεια και τη μετάσταση.



Εικόνα 1: Η διαδικασία της καρκινογένεσης. (Ανατύπωση από [piccadies.com](http://piccadies.com))

Οι διάφορες μορφές καρκίνου λοιπόν είναι προϊόντα μεταλλάξεων που αποδεσμεύουν το κύτταρο από τους συνήθεις μηχανισμούς ελέγχου του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και της κυτταρικής επιβίωσης. Οι μεταλλάξεις αυτές αφορούν σε τρεις μεγάλες κατηγορίες γονιδίων: τα ογκογονίδια, τα ογκοκατασταλτικά γονίδια και τα γονίδια που σχετίζονται με την απόπτωση.<sup>6,8,14</sup>

### 1.1.2.1 Πρωτοογκογονίδια και ογκογονίδια

Τα πρωτοογκογονίδια είναι γονίδια που έχουν διατηρηθεί κατά την εξελικτική διαδικασία και παίζουν σπουδαίο ρόλο στον φυσιολογικό πολλαπλασιασμό των κυττάρων. Μία μετάλλαξη σε ένα τέτοιο γονίδιο προκαλεί υπέρμετρη αύξηση της παραγωγής και της δράσης της αντίστοιχης πρωτεΐνης και οδηγεί σε υπέρμετρο κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Το μεταλλαγμένο αυτό γονίδιο ονομάζεται ογκογονίδιο. Οι πρωτεΐνες που κωδικοποιούνται από γνωστά πρωτοογκογονίδια και τα αντίστοιχα ογκογονίδια διακρίνονται σε επιφανειακές πρωτεΐνες της κυτταρικής μεμβράνης, κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες που συμμετέχουν στη μεταβίβαση σήματος και πυρηνικές πρωτεΐνες που δεσμεύουν το DNA και ρυθμίζουν την έκφραση ειδικών γονιδίων. Με την υπερέκφραση ή με την ενεργοποίησή τους μετά από μια μετάλλαξη οι

μεμβρανικές πρωτεΐνες που κωδικοποιούνται από ογκογονίδια είναι δυνατό να εμφανίσουν αυξημένη δραστηριότητα ή και δραστηριότητα (π.χ. μεταβίβαση σήματος) ανεξάρτητη από τη σύνδεση με τον συνδέτη τους. Οι κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες που συμμετέχουν στη μεταβίβαση σήματος μπορούν επίσης να ενεργοποιηθούν με τον ίδιο τρόπο. Παραδείγματα τέτοιων πρωτεϊνών αποτελούν οι αυξητικοί παράγοντες (EGF, TGFA), οι διαμεμβρανικοί υποδοχείς αυξητικών παραγόντων (EGFR ή ERBB1), οι κινάσες κυρίως της τυροσίνης (ERBB2, SRC, MOS), οι G πρωτεΐνες και οι πυρηνικές πρωτεΐνες (μεταγραφικοί παράγοντες, MYC, FOS) καθώς και ορμονικοί υποδοχείς.

Τα ογκογονίδια μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως προγνωστικοί δείκτες σε διάφορες μορφές καρκίνου. Συγκεκριμένα, η υπερέκφραση ενός ογκογονιδίου σχετίζεται με δυσμενή τις περισσότερες φορές πρόγνωση. Χαρακτηριστικό παράδειγμα ογκογονιδίων είναι η οικογένεια των *RAS* γονιδίων (*HRAS*, *KRAS*). Στις περισσότερες περιπτώσεις καρκινικών κυττάρων έχουν αναφερθεί μεταλλάξεις σε συγκεκριμένα κωδικόνια των πρωτοογκογονιδίων *RAS* που τα μετατρέπουν σε ογκογονίδια και σπανιότερα παρατηρείται υπερέκφρασή τους. Μεταλλάξεις σε γονίδια της οικογένειας *RAS* έχουν ανευρεθεί στο 30-50% των καρκίνων του πνεύμονα, στο 50% των καρκίνων του παχέος εντέρου και σε ποσοστό μεγαλύτερο του 90% στον καρκίνο του παγκρέατος. Επίσης σχετίζονται με το νευροβλάστωμα και την οξεία μυελογενή λευχαιμία. Μία άλλη χαρακτηριστική κατηγορία ογκογονιδίων είναι οι μεταγραφικοί παράγοντες *MYC* (*MYC*, *MYCN*, *MYCL1*). Στην περίπτωση των γονιδίων αυτών έχει αναφερθεί υπερέκφραση του γονιδίου τόσο ως αποτέλεσμα γονιδιακής επέκτασης (*MYCN* στους νευροενδοκρινείς όγκους/νευροβλάστωμα) όσο και ως αποτέλεσμα χρωμοσωμικής μετατόπισης (*MYC* στο λέμφωμα Burkitt-μετατόπιση περιοχής του χρωμοσώματος 8 στα χρωμόσωματα 2, 14 ή 22, που ευθύνονται για τη σύνθεση ανοσοσφαιρινών).<sup>6,9</sup>

### **1.1.2.2 Ογκοκατασταλτικά γονίδια**

Τα ογκοκατασταλτικά γονίδια είναι υπεύθυνα για την αναστολή της κυτταρικής ανάπτυξης μέσω του ελέγχου του κυτταρικού κύκλου στο τέλος της φάσης G1, ώστε το κύτταρο να περάσει στη επόμενη φάση S με όσο το δυνατόν λιγότερα λάθη στο διπλασιασμό του DNA. Επιπλέον, τα γονίδια αυτά ρυθμίζουν την απόπτωση επιδρώντας στα αντιαποπτωτικά γονίδια όπως το γονίδιο *BCL2*. Απώλεια της δράσης τους μπορεί να οδηγήσει στον ανεξέλεγκτο κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Σημαντικό χαρακτηριστικό

αυτών των γονιδίων είναι πως απαιτείται απώλεια της δράσης και των δύο αλληλόμορφων προκειμένου να χαθεί η λειτουργία τους, χαρακτηριστικό που τα διαφοροποιεί από τα πρωτοογκογονίδια. Παραδείγματα ογκοκατασταλτικών γονιδίων είναι το *p53*, το *RB1* (retinoblastoma), το *DDC* (deleted in colorectal carcinoma) και το *NF1* (neurofibromatosis).<sup>6</sup>

Το γονίδιο *p53* εδράζεται στο μικρό βραχίονα του χρωμοσώματος 17 (17p13.1) και είναι υπεύθυνο για τη σύνθεση μιας πυρηνικής φωσφολιποπρωτεΐνης 393 αμινοξέων, της *p53* πρωτεΐνης. Η λειτουργικότητα της *p53* πρωτεΐνης έγκειται στη σύνδεση της σε ορισμένες θέσεις του DNA και στην ενεργοποίηση της έκφρασης ορισμένων γονιδίων με τελικό στόχο την αναστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού. Μέσω της αναστολής του κυτταρικού κύκλου, της επιδιόρθωσης του DNA, της κυτταρικής γήρανσης, της διαφοροποίησης και της απόπτωσης, η πρωτεΐνη *p53*, είτε διευκολύνει την επιδιόρθωση και την επιβίωση κατεστραμμένων κυττάρων, είτε εξαλείφει σοβαρά κατεστραμμένα κύτταρα προκειμένου να προστατεύσει τον οργανισμό. Η σωστή ρύθμιση λοιπόν της ενεργοποίησης της *p53* αποτελεί σημαντικό παράγοντα πρόληψης της ογκογένεσης και διατήρησης της φυσιολογικής κυτταρικής ανάπτυξης. Η σημασία της στην ογκογένεση υπογραμμίζεται από το γεγονός ότι σε πάνω από το 50% όλων των καρκίνων έχουν βρεθεί μεταλλάξεις του γονιδίου *p53*. Οι μεταλλάξεις αυτές καθιστούν ανενεργή την πρωτεΐνη ή αποτρέπουν τον πολυμερισμό της και οδηγούν έτσι στην εξαλλαγή ενός κυττάρου σε καρκινικό. Το φαινόμενο αυτό έχει παρατηρηθεί σε καρκίνους του πνεύμονα, του παχέος εντέρου, του ήπατος, του οισοφάγου, των ωοθηκών και λιγότερο στον καρκίνο του μαστού. Οι περισσότερες μεταλλάξεις αφορούν στα αμινοξέα 248 και 273, σημεία στα οποία η *p53* ενώνεται με το DNA.<sup>6,10,11</sup>

### **1.1.2.3 Αντιαποπτωτικά και αποπτωτικά γονίδια**

Τα αντιαποπτωτικά γονίδια ευθύνονται για την ογκογένεση μέσω αποτροπής της απόπτωσης, μια μορφή προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου, ενώ τα αποπτωτικά γονίδια την προάγουν. Χαρακτηριστικοί εκπρόσωποι των αντιαποπτωτικών γονιδίων είναι τα γονίδια *BCL2*, *BCLX<sub>L</sub>* και *BCL2L1* τα οποία ανιχνεύθηκαν αρχικά σε λεμφώματα Β κυττάρων. Η ελαττωματική έκφραση ή υπερέκφραση αυτών των γονιδίων, ευθύνεται για τις ογκογονικές τους ιδιότητες. Η υπερέκφραση επομένως αυτών των γονιδίων μπορεί να αποτελέσει σημαντικό προγνωστικό δείκτη για αρκετές μορφές καρκίνου.

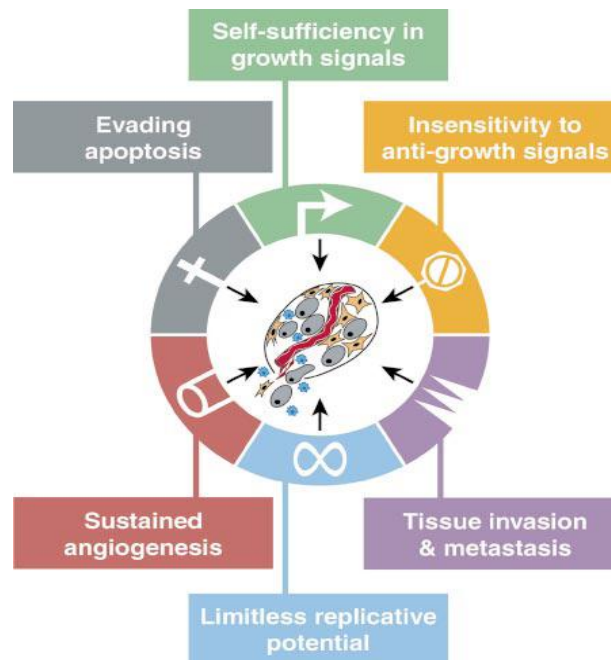
Χαρακτηριστικούς εκπροσώπους αποπτωτικών γονιδίων αποτελούν τα *BAX*, *BAK1*, *BCL2L11*(ή *BIM*) και *HRK*, τα οποία καθώς προάγουν την απόπτωση συμπεριλαμβάνονται στους ευνοϊκούς προγνωστικούς δείκτες αρκετών μορφών καρκίνου.<sup>6</sup>

### **1.1.3 Φαινότυπος του καρκίνου**

Μια κακοήθης νεοπλασία εμφανίζει διαφορετικά χαρακτηριστικά από τα φυσιολογικά κύτταρα του σώματος, γεγονός που επιβεβαιώνεται από τη σύγκριση φυσιολογικών και καρκινικών κυττάρων σε καλλιέργειες. Τα καρκινικά κύτταρα για να αναπτυχθούν δεν έχουν ανάγκη τους αυξητικούς παράγοντες όπως τα φυσιολογικά. Επιπλέον, τείνουν να αναπτύσσονται με ανοργάνωτο τρόπο και συχνά το ένα πάνω στο άλλο, σε αντίθεση με τα φυσιολογικά κύτταρα που παρουσιάζουν αναστολή εξ επαφής. Έχουν επίσης την ικανότητα να διαιρούνται απεριόριστα, αποκτώντας κυτταρική αθανασία, ενώ τέλος η αύξησή τους δεν εξαρτάται από την πρόσφυση σε επιφάνεια στήριξης. Έχουν τη δυνατότητα να αναπτυχθούν χωρίς να έρχονται σε επαφή με στερεά υποστρώματα (επιφάνεια τρυβλίων), σε αντίθεση με τα αντίστοιχα φυσιολογικά κύτταρα τα οποία είναι απλωμένα και καλά προσκολλημένα σε υπόστρωμα, αποκτώντας επίπεδο σχήμα, που είναι σημείο της φυσιολογικής τους κατάστασης.<sup>6,7</sup>

Τα αποτελέσματα από τη μελέτη των κυτταροκαλλιιεργειών των καρκινικών κυττάρων συνάδουν με το συμπέρασμα πολλών ερευνών ότι ο τεράστιος κατάλογος των τύπων των καρκινικών κυττάρων είναι το αποτέλεσμα έξι ουσιαστικών διαφοροποιήσεων της κυτταρικής φυσιολογίας που συλλογικά οδηγούν στην καρκινική ανάπτυξη. Οι διαφοροποιήσεις αυτές συνίστανται στην απόκτηση αυτονομίας των καρκινικών κυττάρων ως προς τους αυξητικούς παράγοντες, στην απώλεια ευαισθησίας σε σήματα αναστολής της αύξησης, στην αποφυγή του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου (απόπτωση), στην απεριόριστη δυνατότητα πολλαπλασιασμού, στην πρόκληση αγγειογένεσης και τέλος στη διήθηση ιστών και τη μετάσταση. Καθεμία από αυτές τις διαφοροποιήσεις της κυτταρικής φυσιολογίας αντανακλούν την επιτυχή παραβίαση ενός ισχυρού αντικαρκινικού αμυντικού μηχανισμού των κυττάρων και των ιστών. Οι έξι αυτές νέες ιδιότητες συναντώνται στους περισσότερους και πιθανότατα σε όλους τους τύπους των ανθρώπινων νεοπλασιών. Η πολυπλοκότητα βέβαια των

αμυντικών μηχανισμών έναντι αυτών των διαφοροποιήσεων εξηγεί ίσως την σχετικά σπάνια εμφάνιση του καρκίνου κατά τη διάρκεια της ζωής ενός ανθρώπου.



**Εικόνα 2:** Νέες ιδιότητες των καρκινικών κυττάρων. (Hanahan D., Weinberg R. *The hallmarks of cancer Review. Cell 2000;100:57-70*)

Οι στρατηγικές που έχει αποδειχθεί ότι ακολουθούνται για την απόκτηση της αυτονομίας ως προς τα αυξητικά ερεθίσματα είναι η τροποποίηση των εξωκυττάρων αυξητικών ερεθισμάτων, η τροποποίηση των διακυττάρων μεταφορέων των αυξητικών σημάτων και η τροποποίηση των ενδοκυττάρων μηχανισμών που είναι υπεύθυνοι για τη δράση των σημάτων αυτών. Αναλυτικότερα, πολλά καρκινικά κύτταρα αποκτούν την ιδιότητα να συνθέτουν μόνο τους αυξητικούς παράγοντες στους οποίους και ανταποκρίνονται, δημιουργώντας ένα κύκλωμα αποκαλούμενο "αυτοκρινή διέγερση". Παρατηρείται επίσης υπερέκφραση των επιφανειακών υποδοχέων των αυξητικών παραγόντων της κυτταρικής μεμβράνης τους, καθιστώντας τα έτσι υπερευαίσθητα σε σήματα που υπό φυσιολογικές συνθήκες δεν θα προκαλούσαν τον πολλαπλασιασμό τους, ενώ αποκτούν την ικανότητα να επιλέγουν μεταξύ των επιφανειακών υποδοχέων την έκφραση αυτών που μεταφέρουν προαυξητικά ερεθίσματα. Τέλος, ο πιο πολύπλοκος μηχανισμός απόκτησης της αυτονομίας αυτής είναι η τροποποίηση συστατικών που συμμετέχουν στο ενδοκυττάριο κύκλωμα που παραλαμβάνει και

επεξεργάζεται τα σήματα που προέρχονται από τους υποδοχείς αυξητικών παραγόντων της μεμβράνης των κυττάρων.

Ο στόχος των σημάτων αναστολής της αύξησης είναι η διατήρηση της ομοιόστασης των ιστών. Επιτυγχάνεται με τον εξαναγκασμό των κυττάρων σε έξοδο από τον κυτταρικό κύκλο στη φάση G<sub>0</sub>, από την οποία μπορούν να εξέλθουν μελλοντικά υπό την επίδραση των κατάλληλων σημάτων, και την είσοδό τους σε μετα-μιτωτικές φάσεις που συνήθως σχετίζονται με απόκτηση συγκεκριμένων ικανοτήτων διαφοροποίησης. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τον ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό των κυττάρων. Η απόκτηση του καρκινικού φαινότυπου ωστόσο δεν οφείλεται μόνο στους προαναφερόμενους παράγοντες αλλά και στη διαταραχή της ισορροπίας μεταξύ κυτταρικού πολλαπλασιασμού και κυτταρικής φθοράς, της οποίας κύρια αιτία αποτελεί η απόπτωση.

Η εξέλιξη νεοπλασιών σε αρχικά στάδια προϋποθέτει επίσης την απόκτηση της ικανότητας της αγγειογένεσης. Οι όγκοι ενεργοποιούν έναν μηχανισμό αγγειογένεσης αλλάζοντας την ισορροπία μεταξύ επαγωγέων και αναστολέων της. Πολλοί όγκοι εμφανίζουν αυξημένη έκφραση των VEGF και/ή των FGFs μορίων επαγωγέων της αγγειογένεσης και μειωμένη έκφραση των αναστολέων θρομβοσπονδίνη-1 ή β-ιντερφερόνη. Τέλος, αργά ή γρήγορα κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης των περισσότερων καρκινικών όγκων, καρκινικά κύτταρα αποκτούν την ικανότητα να διηθούν παρακείμενους ιστούς και έπειτα να μεταναστεύουν σε απομακρυσμένα σημεία όπου σχηματίζουν νέες αποικίες καρκινικών κυττάρων. Και στις δύο διαδικασίες σημαντικό ρόλο διαδραματίζουν μόρια προσκόλλησης (CAM- cells adhesion molecules) στα οποία περιλαμβάνονται τόσο μόρια υπεύθυνα για την προσκόλληση κυττάρων μεταξύ τους (cadherins) όσο και μόρια υπεύθυνα για την προσκόλληση κυττάρων με συστατικά της εξωκυττάριας ουσίας (integrins) καθώς και εξωκυττάρια πρωτεάσες.<sup>12</sup>

#### **1.1.4 Καρκινικοί δείκτες**

Οι καρκινικοί δείκτες είναι μόρια τα οποία παράγουν τα καρκινικά κύτταρα και ανιχνεύονται σε βιολογικά υγρά. Οι δείκτες αυτοί παρέχουν πληροφορίες σχετικά με τη διάγνωση και την πρόγνωση της νόσου καθώς και την παρακολούθηση της θεραπευτικής αγωγής.



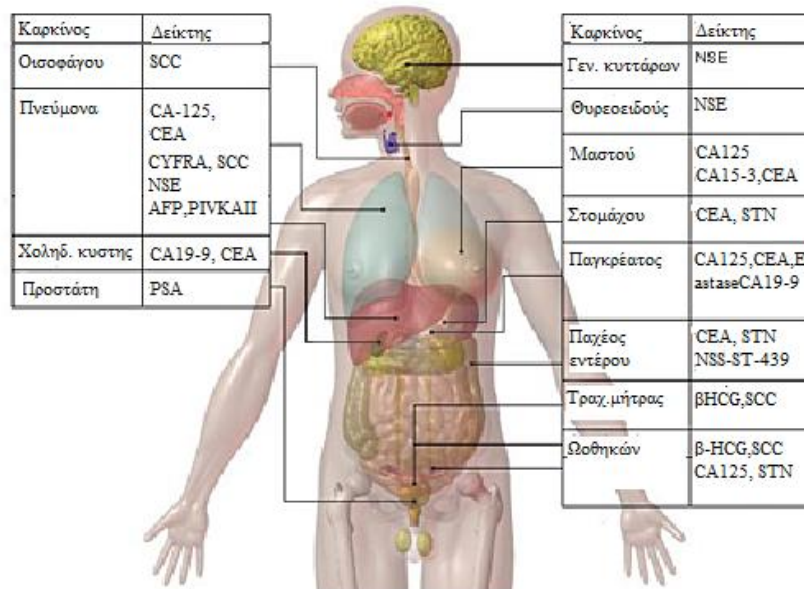
Συγκεκριμένα σημαντικές εφαρμογές των καρκινικών δεικτών αποτελούν: η έγκαιρη διάγνωση του καρκίνου σε αρχικά στάδια, η ικανότητα διαφορικής διάγνωσης από καλοήθεις όγκους ή άλλες ασθένειες ή ακόμη και η επιβεβαίωση της διάγνωσης, η εκτίμηση της βιοχημικής φύσης του όγκου και η κλινική σταδιοποίηση και ταξινόμησή του, η ικανότητα πρόγνωσης της νόσου, η παρακολούθηση και αξιολόγηση της θεραπείας, ο έλεγχος των μεταστάσεων πριν από την εμφάνιση των κλινικών συμπτωμάτων και τέλος η επιλογή τους ως αντιγόνων και η σύζευξη με ραδιοσημασμένα αντισώματα, με σκοπό τον εντοπισμό του όγκου ή την κατεύθυνση κυτταροστατικών ραδιοφαρμάκων πάνω στον όγκο. Ωστόσο, η χρήση των καρκινικών δεικτών για πρόωμη διάγνωση ενδεχομένως να παρουσιάζει χαμηλή ευαισθησία και χαμηλή ειδικότητα καθώς αφενός μεν η άνοδος των δεικτών σε ανιχνεύσιμα επίπεδα μπορεί να συμβεί όταν η ασθένεια έχει εξελιχθεί σε μεγάλο βαθμό και αφετέρου και άλλες ασθένειες εκτός από τις κακοήθειες μπορούν να αυξήσουν τα επίπεδα των δεικτών.

Μέχρι σήμερα δεν έχει βρεθεί ιδανικός καρκινικός δείκτης που να εμφανίζει συνδυαστικά τα εξής χαρακτηριστικά: υψηλή αναλυτική και διαγνωστική ευαισθησία και ειδικότητα, υψηλή διαγνωστική και προγνωστική αξία του θετικού αποτελέσματος, αντιστοιχία των μεταβολών στα βιολογικά υγρά με το μέγεθος του όγκου, το βαθμό κακοήθειας, την πορεία της νόσου και την ύπαρξη μεταστάσεων, ικανότητα διαφοροδιάγνωσης από άλλες παθολογικές καταστάσεις, σταθερότητα των επιπέδων του στα βιολογικά υγρά και τέλος φθινό και εύκολο προσδιορισμό στα υγρά και τους ιστούς με μια από τις ευρέως χρησιμοποιούμενες μεθόδους (π.χ. ELISA, RIA, PCR). Μελέτες ωστόσο για την υπερπήδηση αυτών των εμποδίων βρίσκονται σε εξέλιξη.

Οι κυριότεροι τύποι καρκινικών δεικτών που χρησιμοποιούνται στην κλινική πράξη είναι οι ογκοεμβρυϊκές πρωτεΐνες, οι ορμόνες, τα ένζυμα ορού, οι ανοσοσφαιρίνες, τα αντιγόνα που έχουν σχέση με τον όγκο (tumor associated), οι υποδοχείς ορμονών και τα ογκογονίδια και ογκοκατασταλτικά γονίδια. Οι συχνότεροι καρκινικοί δείκτες που χρησιμοποιούνται στην Παιδιατρική είναι η άλφα-φετοπρωτεΐνη (AFP) για το ήπαρ και όγκους του λεκιθικού ασκού, η ανθρώπινη χοριακή γοναδοτροπίνη σε όγκους των γεννητικών κυττάρων και οι κατεχολαμίνες στο νευροβλάστωμα.<sup>6,15,28</sup>

### 1.1.5 Τύποι καρκίνου

Ο συνηθέστερος τρόπος ταξινόμησης των καρκίνων βασίζεται στο όργανο το οποίο προσβάλλουν, από όπου και λαμβάνουν το όνομά τους.



**Εικόνα 3:** Καρκινικοί δείκτες. (Ανατύπωση από National Cancer website)

Διαχωρίζονται ωστόσο μεταξύ τους και βάσει της ιστοικής τους προέλευσης. Πιο αναλυτικά διακρίνονται:

α) στα καρκινώματα, που προέρχονται από επιθηλιακά κύτταρα τα οποία ανευρίσκονται στην εξωτερική στιβάδα του δέρματος και σε εσωτερικές κοιλότητες του σώματος. Πολλοί καρκίνοι του δέρματος ανήκουν στα καρκινώματα καθώς και οι περισσότεροι καρκίνοι του πνεύμονα, του μαστού, των ωοθηκών, του προστάτη, του στομάχου και του παχέος και λεπτού εντέρου. Καρκινώματα μπορούν επίσης να αναπτυχθούν σε αδένες οπότε και αποκαλούνται αδenoκαρκινώματα.

β) στα σαρκώματα, τα οποία δημιουργούνται σε συνδετικούς ιστούς (οστά, χόνδρους, λίπος, μύες). Στα σαρκώματα περιλαμβάνονται το οστεοσαρκώματα, το ραβδομυοσάρκωμα και το σάρκωμα Kaposi.

γ) στις λευχαιμίες και στα λεμφώματα, κακοήθειες του αιμοποιητικού συστήματος. Οι λευχαιμίες αποτελούν το συνηθέστερο τύπο καρκίνου στην παιδική ηλικία.<sup>16</sup>

## 1.2 ΑΙΜΑ-ΑΙΜΟΠΟΙΗΤΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ

### 1.2.1 Αίμα

Το αίμα είναι ένας ρευστός ιστός που κυκλοφορεί με τη βοήθεια της καρδιάς και των αγγείων σε όλους τους ιστούς του οργανισμού, όπου προσφέρει οξυγόνο και θρεπτικά συστατικά και παραλαμβάνει άχρηστα προϊόντα του μεταβολισμού και διοξείδιο του άνθρακα τα οποία και μεταφέρει στα όργανα απέκκρισης. Αποτελείται από έμμορφα στοιχεία που αποτελούν το 45% του όγκου του και από το πλάσμα. Η λειτουργική αποστολή του αίματος συντελείται μέσω του συνδυασμού των λειτουργιών τόσο των έμμορφων συστατικών του (μεταφορά οξυγόνου, άμυνα έναντι των λοιμώξεων, αιμόσταση), όσο και του πλάσματος (μεταφορά ύδατος, θρεπτικών ουσιών, αποβολή άχρηστων μεταβολικών ουσιών, διατήρηση της οξεοβασικής ισορροπίας, πήξη κλπ.).<sup>9</sup>

Αναλυτικότερα, το πλάσμα είναι το υγρό συστατικό του αίματος μέσα στο οποίο αιωρούνται τα ερυθρά αιμοσφαίρια, τα λευκά αιμοσφαίρια και τα αιμοπετάλια. Αποτελείται κυρίως από νερό (91%) αλλά και από πρωτεΐνες, ηλεκτρολύτες, γλυκόζη, αμινοξέα, ένζυμα, αντισώματα και ίχνη πολλών άλλων οργανικών και ανόργανων υλικών. Η κυριότερη πρωτεΐνη του πλάσματος είναι η αλβουμίνη η οποία παίζει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της ωσμωτικής πίεσης και στη μεταφορά διαφόρων συστατικών όπως οι ορμόνες και συγκεκριμένα φάρμακα. Άλλες πρωτεΐνες του πλάσματος είναι οι ανοσοσφαιρίνες που προστατεύουν τον οργανισμό από ιούς, βακτήρια, μύκητες και καρκινικά κύτταρα και οι παράγοντες πήξης όπως το ινωδογόνο που ρυθμίζουν την αιμόσταση. Τα έμμορφα συστατικά του αίματος είναι τα εξής :

**A. Τα ερυθρά αιμοσφαίρια (RBCs).** Αποτελούν τον πιο πολυάριθμο τύπο έμμορφων συστατικών. Έχουν διάμετρο περίπου 8μm και αμφίκυκλο σχήμα που παρέχει στα κύτταρα τη μέγιστη δυνατή επιφάνεια για αποτελεσματικότερη ανταλλαγή αερίων, οξυγόνου και διοξειδίου του άνθρακα μεταξύ αυτών και των ιστών. Η ανταλλαγή των αερίων πραγματοποιείται μέσω των μορίων της αιμοσφαιρίνης που περιέχονται στα ερυθροκύτταρα. Στο περιφερικό αίμα εκτός από τα ώριμα ερυθρά αιμοσφαίρια κυκλοφορούν και δικτυοερυθροκύτταρα (περίπου 1% όλων των ερυθροκυττάρων) τα οποία αποτελούν πρόδρομη μορφή των ώριμων, περιέχουν πυρήνα σε αντίθεση με την ώριμη μορφή, παράγονται στο μυελό των οστών και κυκλοφορούν στο αίμα μία με δύο ημέρες έως ότου ωριμάσουν. Το ώριμο αιμοσφαίριο παραμένει στην αιματική

κυκλοφορία 120 ημέρες κι έπειτα καταστρέφεται από το δικτυοενδοθηλιακό σύστημα του σπλήνα.

**Β. Τα λευκά αιμοσφαίρια (WBCs).** Είναι πολύ λιγότερα σε αριθμό από τα ερυθροκύτταρα. Μετά την απελευθέρωσή τους από το μυελό των οστών κυκλοφορούν στο αίμα για 12 ώρες και μετά τη μεταφορά τους στους ιστούς επιζούν 5 ημέρες αφού καταπολεμήσουν λοίμωξη ή καταστρέφονται ως αποτέλεσμα γήρανσης. Αποτελούν μέρος των μηχανισμών άμυνας του οργανισμού στους οποίους συμμετέχουν μέσω της χημειοταξίας και της φαγοκυττάρωσης των παθογόνων μικροοργανισμών. Διακρίνονται σε δύο κατηγορίες: τα κοκκιοκύτταρα και τα λεμφοειδή κύτταρα. Ο όρος κοκκιοκύτταρα οφείλεται στην ύπαρξη κοκκίων στο κυτταρόπλασμα των κυττάρων, τα οποία εμφανίζουν διαφορετική συγγένεια με χρωστικές ουδέτερες, όξινες ή βασικές βοηθώντας έτσι στον διαχωρισμό των κυττάρων σε ουδετερόφιλα, ηωσινόφιλα και βασεόφιλα αντίστοιχα. Τα λεμφοειδή κύτταρα από την άλλη διακρίνονται σε μονοκύτταρα και λεμφοκύτταρα. Αναλυτικότερα:

1. Ηωσινόφιλα: Καταλαμβάνουν το 1-4% των λευκοκυττάρων της αιματικής κυκλοφορίας. Πρόκειται για κύτταρα που παίζουν σημαντικό ρόλο στις αλλεργικές αντιδράσεις, στην απόκριση σε παρασιτικές λοιμώξεις και στην άμυνα έναντι συγκεκριμένων όγκων.

2. Βασεόφιλα: Συναντώνται σπανιότερα από τα ηωσινόφιλα καθώς σε φυσιολογικές συνθήκες καταλαμβάνουν μόλις το 0,5-1% των κυκλοφορούντων λευκοκυττάρων. Διαθέτουν υποδοχείς για την ανοσοσφαιρίνη IgE, η πρόσδεση της οποίας οδηγεί σε αποκοκκιοποίηση ενώ αλλεργικές ή αναφυλακτικές αντιδράσεις σχετίζονται με την απελευθέρωση ισταμίνης και ηπαρίνης.

3. Ουδετερόφιλα: Πρόκειται για τα πιο πολυάριθμα κύτταρα καθώς συνιστούν το 50-70% όλων των λευκοκυττάρων. Χαρακτηρίζονται από την παρουσία ενός κατατετημημένου πυρήνα και καστανορόδινων κοκκίων στο κυτταρόπλασμα. Παίζουν σημαντικό ρόλο στη φαγοκυττάρωση των βακτηρίων ωστόσο στερούνται της δυνατότητας ανανέωσης των λυσοσωμάτων που χρησιμοποιούν κι έτσι ο χρόνος ζωής τους είναι περιορισμένος.

4. Μονοκύτταρα: Αποτελούν την πρόδρομη μορφή των μακροφάγων. Τα κυκλοφορούντα μονοκύτταρα αποτελούν το 3-8% του συνολικού αριθμού των λευκοκυττάρων. Είναι μεγαλύτερα σε μέγεθος από όλα τα υπόλοιπα κύτταρα του αίματος με διάμετρο 15-20  $\mu\text{m}$  και διαθέτουν πλούσιο κυτταρόπλασμα με πολλά κενοτόπια, σχετικά λίγα κυτταροπλασματικά κοκκία καθώς και μεγάλο πυρήνα σχήματος πετάλου. Μετά την ωρίμανσή τους στο μυελό των οστών εισέρχονται στην κυκλοφορία του αίματος όπου παραμένουν για 24-36 ώρες και έπειτα μεταναστεύουν στους ιστούς όπου διαφοροποιούνται σε μακροφάγα. Τα μακροφάγα είναι μεγαλύτερα από τα μονοκύτταρα και αποτελούνται από έναν ωειδή πυρήνα και φαγοκυτταρικά κυστίδια. Όλοι μαζί οι τύποι των μακροφάγων κυττάρων συνιστούν το δικτυοενδοθηλιακό σύστημα (πχ κύτταρα Kupffer του ήπατος, οστεοκλάστες των οστών, κυψελιδικά μακροφάγα των πνευμόνων). Ρόλος των μακροφάγων είναι εκτός από τη φαγοκυττάρωση και την καταστροφή βακτηρίων και άλλων παθογόνων οργανισμών, η αντιγονοπαρουσίαση σε Β ή Τ λεμφοκύτταρα, η καταστροφή καρκινικών κυττάρων, η απομάκρυνση άχρηστων προϊόντων καθώς και η ρύθμιση του πολλαπλασιασμού των στρωματικών κυττάρων. Τα μακροφάγα εκκρίνουν μια σειρά από κυτταροκίνες, ένζυμα και αναστολείς ενζύμων με χαρακτηριστικότερα παραδείγματα τα TNF και IL-1.

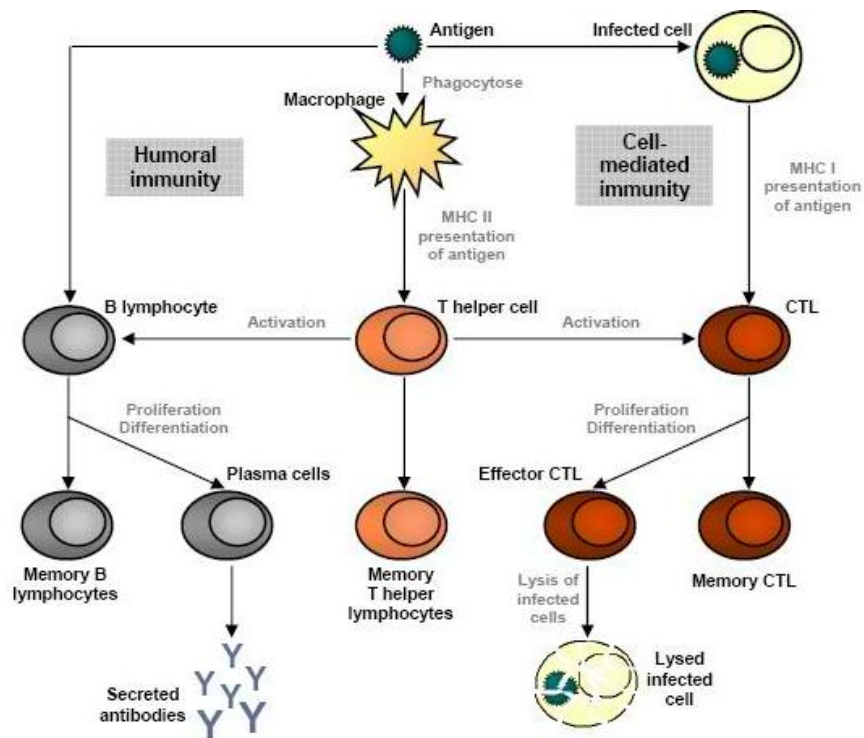
5. Λεμφοκύτταρα: Διακρίνονται στα Β και Τ λεμφοκύτταρα και στα κύτταρα φυσικούς φονείς (Natural Killer Cells).

**Β-λεμφοκύτταρα:** Αποτελούν το 10-15% των λεμφοκυττάρων του περιφερικού αίματος, το 10% των λεμφοκυττάρων των λεμφαδένων και το 50% των κυττάρων του σπλήνα. Κύρια λειτουργία τους είναι η παραγωγή των ανοσοφαιρινών. Τα αρχικά στάδια της διαφοροποίησης των Β-λεμφοκυττάρων πραγματοποιούνται στον μυελό των οστών από προγονικά κύτταρα και εξαρτώνται από την αλληλεπίδραση επιφανειακών μορίων και εκκριτικών προϊόντων των στρωματικών κυττάρων με τους αντίστοιχους υποδοχείς των προγονικών κυττάρων. Στην διαδικασία αυτή συμμετέχει μεγάλος αριθμός κυτοκινών και παραγόντων αύξησης (πχ. TNF, IL-1, IL-2, IL-6, IL-7, IL-10, IFN). Χαρακτηριστικό των Β-λεμφοκυττάρων είναι ότι έχουν δύο φάσεις ωρίμανσης, τη μία ανεξάρτητη από την παρουσία αντιγόνου και την άλλη αντιγονοεξαρτώμενη. Το πιο πρώιμο αναγνωρίσιμο Β-κύτταρο χαρακτηρίζεται από την παρουσία στο κυτταρόπλασμα του βαριάς αλλά όχι ελαφριάς αλυσίδας της IgM ανοσοσφαιρίνης αλλά

και από απουσία ανοσοσφαιρίνης στην κυτταρική του μεμβράνη. Εκφράζει στην επιφάνειά του τα μόρια CD19, HLA-DR, CD34, CD10 (CALLA) καθώς επίσης και το πυρηνικό ένζυμο τελική δεοξυνουκλεοτιδική τρανσφεράση (TdT). Το στάδιο αυτό διαφοροποίησης των B-κυττάρων συναντάται στον πιο συχνό τύπο της οξείας λεμφοβλαστικής λευχαιμίας. Καθώς το κύτταρο ωριμάζει χάνει τα μόρια CD34 και TdT και εκφράζει πλέον στην επιφάνειά του αρχικά την IgM ανοσοσφαιρίνη και αργότερα και την IgD, μια διαδικασία που λαμβάνει χώρα στον μυελό των οστών, στους λεμφαδένες και στον σπλήνα. Προκύπτει λοιπόν ένα ώριμο B-κύτταρο που δεν έχει έρθει σε επαφή με αντιγόνο και είναι το πιο συχνά απαντώμενο στους λεμφαδένες των ενηλίκων. Στο δεύτερο στάδιο ωρίμανσης των B-λεμφοκυττάρων, η έκθεσή τους στα αντιγόνα τα διαφοροποιεί περαιτέρω ώστε να τροποποιηθούν σε πλασματοκύτταρα που παράγουν ανοσοσφαιρίνες και σε B-λεμφοκύτταρα μνήμης που στην πλειονότητά τους εκφράζουν στην επιφάνειά τους ανοσοσφαιρίνες IgM και παραμένουν μακροχρόνια στο λεμφικό ιστό. Μια σημαντική υποκατηγορία B-κυττάρων που δεν κατατάσσεται εύκολα σε στάδιο της διαδικασίας ωρίμανσης, είναι τα CD5-θετικά B-λεμφοκύτταρα που εμφανίζονται άφθονα στο έμβρυο και αποτελούν το 20% των B-κυττάρων στον ενήλικα. Εκφράζουν τα μόρια CD19, CD20, sIgM και sIgD, σχετίζονται με την χρόνια λεμφοκυτταρική λευχαιμία και αν αυξηθεί ο αριθμός τους, με την εμφάνιση αυτοάνοσων νοσημάτων. Η αποτελεσματική ανοσολογική απόκριση στην παρουσία αντιγόνου επιτυγχάνεται με τη συνεργασία B και T λεμφοκυττάρων. Η αλληλουχία των γεγονότων που ακολουθείται συνίσταται στην ενδοκυττάρωση του αντιγόνου από τα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα (B-λεμφοκύτταρα, δενδριτικά κύτταρα και μακροφάγα) και την παρουσίασή του μέσω των αντιγόνων του μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας (MHC-Major Histocompatibility Complex ή HLA) στα T-λεμφοκύτταρα και σε δεύτερο στάδιο στην ενεργοποίηση των T-λεμφοκυττάρων που με τη σειρά τους προάγουν τον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση των B-λεμφοκυττάρων σε πλασματοκύτταρα ή κύτταρα μνήμης.

T-λεμφοκύτταρα: Τα T-λεμφοκύτταρα παράγονται στο μυελό των οστών και μεταναστεύουν στο θύμο αδένα κατά τη διάρκεια της εμβρυϊκής και της νεογνικής ζωής. Εκεί επέρχεται η ωρίμανση και η διαφοροποίησή τους σε ώριμα T-λεμφοκύτταρα τα οποία συναντώνται κυρίως στον περιφερικό λεμφικό ιστό και κυκλοφορούν στο αίμα

και στη λέμφο. Τα ώριμα T-λεμφοκύτταρα αποτελούν το 70-80% των λεμφοκυττάρων του περιφερικού αίματος, το 90% των κυττάρων του μείζονος θωρακικού πόρου και το 20-30% των κυττάρων των περιφερικών λεμφικών οργάνων. Οι λειτουργίες των T-λεμφοκυττάρων συνίστανται στη ρύθμιση της λειτουργίας των ίδιων όσο και των B-λεμφοκυττάρων και των μακροφάγων μέσω κυτταροκινών, στη δράση τους ως κυττάρων καταστροφής των αντιγόνων χωρίς τη συμμετοχή άλλων κυττάρων καθώς και στη συμμετοχή στην ωρίμανση των κυττάρων της ερυθράς σειράς. Κατά τη διαδικασία της διαφοροποίησης των T-λεμφοκυττάρων στην επιφάνειά τους εκφράζονται ειδικοί αντιγονικοί υποδοχείς που αναγνωρίζουν θραύσματα αντιγόνων τα οποία παρουσιάζονται μέσω των αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων σε στενή σχέση με τα αντιγόνα του μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας. Υπάρχουν δύο κύριες κατηγορίες T-λεμφοκυττάρων: τα CD4 θετικά λεμφοκύτταρα και τα CD8 θετικά T-λεμφοκύτταρα τα οποία είναι άμεσα κυτταροτοξικά. Τα CD4 θετικά λεμφοκύτταρα διακρίνονται στα φλεγμονώδη T<sub>H1</sub> λεμφοκύτταρα και στα T<sub>H2</sub> λεμφοκύτταρα βοηθούς. Τα πρώτα αναγνωρίζουν αντιγόνα πάνω σε MHC τάξης II αντιγόνα ιστοσυμβατότητας στην επιφάνεια των «επαγγελματικών» αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων (μακροφάγα και δενδριτικά κύτταρα) και διεγείρονται προκειμένου να παράγουν ποικίλες κυτταροκίνες. Μερικές από αυτές διεγείρουν το μακροφάγο, το οποίο παράγει πρωτεολυτικά ένζυμα και δραστικές μορφές οξυγόνου που λύουν το λοιμογόνο μικροοργανισμό. Επιπλέον τα T<sub>H1</sub> λεμφοκύτταρα παράγουν τις κυτταροκίνες IL-2 και IL-3 που τα διεγείρουν μέσω αυτοκρινούς και παρακρινούς μηχανισμού και συντηρούν τη φλεγμονώδη απόκριση. Τα T<sub>H2</sub> λεμφοκύτταρα βοηθοί αναγνωρίζουν αντιγόνα συνδεδεμένα σε αντιγόνα ιστοσυμβατότητας MHC τάξης II τα οποία παρουσιάζονται από τα B-λεμφοκύτταρα και παράγουν κυτταροκίνες που βοηθούν το αντίστοιχο B-λεμφοκύτταρο να εκπτυχθεί σε κλώνο και να παράγει πληθώρα ειδικών αντισωμάτων κατά του αντιγόνου. Τα CD8 θετικά T-λεμφοκύτταρα αναγνωρίζουν αντιγόνα συνδεδεμένα σε αντιγόνα ιστοσυμβατότητας τάξης I (MHC I). Το σύμπλεγμα MHC I/αντιγόνο αναγνωρίζεται από τον T-κυτταρικό υποδοχέα του CD8 θετικού T-λεμφοκυττάρου και το T-κύτταρο καταστρέφει το κύτταρο στόχο μέσω δύο μηχανισμών: την άμεση λύση του μέσω κυτταροτοξικών ουσιών είτε τη διέγερση της απόπτωσής του.



**Εικόνα 4:** Αλληλεπιδράσεις και δραστηριότητες των T και B λεμφοκυττάρων (MHC: μείζον σύμπλεγμα ιστοσυμβατότητας, CTL: κυτταροτοξικά CD8 T-λεμφοκύτταρα). (Ανατύπωση από: [www.mpi\\_magdeburg.mpg.de](http://www.mpi_magdeburg.mpg.de))

Κύτταρα Φυσικοί φονείς (NK κύτταρα): Πρόκειται για μεγάλου μεγέθους λεμφοκύτταρα με διακριτά κυτταροπλασματικά κοκκία που προέρχονται από το μυελό των οστών. Συναντώνται στον σπλήνα, στους λεμφαδένες και στο περιφερικό αίμα. Διαθέτουν κυτταροτοξικές ιδιότητες έναντι καρκινικών κυττάρων και κυττάρων προσβεβλημένων από ιούς, ωστόσο βάσει του φαινοτύπου τους δεν ανήκουν ούτε στα B ούτε στα T-λεμφοκύτταρα. Δεν διαθέτουν T-κυτταρικό υποδοχέα για την αναγνώριση του αντιγόνου και δεν αναγνωρίζουν το αντιγόνο που παρουσιάζεται μέσω των αντιγόνων ιστοσυμβατότητας. Δεν είναι γνωστό ποιες δομές αναγνωρίζουν στα κύτταρα στόχους, είναι όμως γνωστό ότι για την ενεργοποίησή τους δεν απαιτείται προηγουμένως επαφή με το αντιγόνο. Η διαδικασία καταστροφής των κυττάρων στόχων από τα κύτταρα φυσικούς φονείς περιλαμβάνει την έκκριση προσηματισμένων τοξινών υπό μορφή κοκκίων όπως οι πρωτεάσες σερίνης και οι πρωτεογλυκάνες. Συνθέτουν επίσης τον παράγοντα νέκρωσης όγκων (TNF) και την IFN- $\gamma$  και ενεργοποιούνται από την IFN- $\alpha$ , την IFN- $\gamma$ , τον TNF και την IL-2. Όταν τα κύτταρα στόχοι έχουν επενδυθεί από την ανοσοσφαιρίνη IgG που με το αντιγονοειδικό της τμήμα έχει αναγνωρίσει επ' αυτών αντιγόνο, λύνονται ευκολότερα από τα NK κύτταρα, καθώς αυτά



διαθέτουν υποδοχέα για το Fc τμήμα των ανοσοσφαιρινών (κυτταροτοξικότητα επαγόμενη μέσω αντισώματος).

**Γ. Τα αιμοπετάλια (PLT).** Είναι μικρού μεγέθους και ακανόνιστου δισκοειδούς σχήματος απύρρηνα κύτταρα προερχόμενα από τα μεγακαρυοκύτταρα του μυελού των οστών. Ο αριθμός τους κυμαίνεται από 150.000-450.000/μl και ο χρόνος ζωής τους είναι 7-10 ημέρες. Κύρια λειτουργία τους είναι η παροχή του κυτταρικού υποστρώματος για την αιμόσταση και την πήξη του αίματος. Ως προς τη δομή τους τα αιμοπετάλια στη μεμβράνη τους φέρουν διάφορες πρωτεΐνες υποδοχείς για την επαφή με διάφορες ουσίες (ενεργοποιητές, αναστολείς κ.α.) και φωσφολιπίδια τα οποία σχετίζονται με τη παραγωγή διαφόρων ουσιών, κυρίως προσταγλανδινών. Τα κυτταρόπλασμά τους περιέχει μικροϊνίδια ακτίνης τα οποία βοηθούν στην κινητικότητα του κυττάρου και κοκκία: τα λυσοσώματα και τα πυκνά κοκκία που παράγουν πλήθος ουσιών όπως διφωσφορική αδενοσίνη (ADP), αιμοπεταλιογενή αυξητικό παράγοντα (PDGF), παράγοντα von Willebrand, ινωδογόνο, θρομβοξάνη, θρομβοσπονδίνη κ.α.<sup>9,18,19</sup>

### **1.2.2 Αιμοποιητικός ιστός- Αιμοποίηση**

Αιμοποίηση ονομάζεται η διαδικασία παραγωγής των κυττάρων του αίματος από αρχέγονα πολυδύναμα αιμοποιητικά κύτταρα. Η εξέλιξη της καθορίζεται από την αλληλεπίδραση πληθώρας γονιδίων και περιλαμβάνει τη δράση πολλών κυτταροκινών και πρωτεϊνικών παραγόντων.

Κατά τη διάρκεια των πρώτων εβδομάδων της εμβρυϊκής ζωής (3<sup>η</sup> με 4<sup>η</sup> εβδομάδα), η δημιουργία των κυττάρων του αίματος πραγματοποιείται στο λεκιθικό ασκό (μεσοβλαστική περίοδος). Την 5<sup>η</sup> με 6<sup>η</sup> εβδομάδα, την αιμοποίηση αναλαμβάνει το ήπαρ (ηπατική περίοδος) με συνεπικουρικά όργανα τον σπλήνα, τους νεφρούς, τον θύμο αδένα και τον συνδετικό ιστό, ενώ από τον 4<sup>ο</sup> με 5<sup>ο</sup> μήνα ξεκινά η μυελική περίοδος της αιμοποίησης που ολοκληρώνεται τον 6<sup>ο</sup> μήνα της ενδομήτριας περιόδου. Κατά την βρεφική και παιδική ηλικία στην αιμοποίηση συμβάλλει ο μυελός όλων των οστών, ενώ κατά την ενήλικη ζωή η αιμοποίηση περιορίζεται στο μυελό συγκεκριμένων οστών όπως τα οστά της πυέλου, της σπονδυλικής στήλης, το μηριαίο οστό, το κρανίο, οι πλευρές και το στέρνο. Ωστόσο, ακόμη και σε αυτές τις περιοχές ένα ποσοστό της μυελικής κοιλότητας καταλαμβάνεται από λίπος. Σε περιόδους έντονου αιμοποιητικού stress (σοβαρή αιμολυτική αναιμία, μυελουϊπερπλαστικά σύνδρομα) στην παραγωγή

των κυττάρων του αίματος συμβάλλουν εκτός από το μυελό των οστών και ο σπλήνας, το ήπαρ και ο λιπώδης ιστός συμμετέχοντας έτσι στη λεγόμενη εξωμυελική αιμοποίηση.

Ο μυελός των οστών καταλαμβάνει τους χώρους μεταξύ των δοκίδων της σπογγώδους μοίρας των οστών. Μακροσκοπικά ανάλογα με την εμφάνισή του, έχουν περιγραφεί δύο τύποι: ο ερυθρός ή ενεργός μυελός των οστών, που το χρώμα του οφείλεται στην παρουσία πολλών ερυθροκυττάρων και των πρόδρομων μορφών τους και ο κίτρινος μυελός των οστών, πλούσιος σε λιποκύτταρα, που δεν παράγει κύτταρα του αίματος. Ο κίτρινος μυελός αποτελεί περίπου το 50% του μυελού των οστών στους ενήλικες και διατηρεί το αιμοποιητικό του δυναμικό ώστε σε παθολογικές καταστάσεις όπως η σοβαρή αιμορραγία, η υποξαιμία ή η υπερβολική κατανάλωση ερυθροκυττάρων, να μπορεί επαγωγικά να μετατραπεί σε ερυθρό μυελό των οστών. Ο ερυθρός μυελός των οστών αποτελείται από διακλαδιζόμενα τριχοειδικά κολποειδή και δικτυωτό υπόστρωμα. Οι διάμεσοι χώροι ανάμεσα στα κολποειδή καταλαμβάνονται από τις αιμοποιητικές χορδές, που περιέχουν αρχέγονα και πρόδρομα κύτταρα του αίματος, τα οποία βρίσκονται σε διάφορα στάδια διαφοροποίησης και ωρίμανσης. Το δικτυωτό υπόστρωμα, που είναι ένα πλέγμα στήριξης των αιμοποιητικών κυττάρων, αποτελείται από ένα τρισδιάστατο δίκτυο δικτυωτών κυττάρων με κυτταρολογικά χαρακτηριστικά παρόμοια με των ινοβλαστών και από ένα λεπτό πλέγμα δικτυωτών ινών. Επιπρόσθετα ο μυελός των οστών εκτός από την αιμοποιητική λειτουργία διαθέτει, όπως ο σπλήνας και το ήπαρ, ακίνητα μακροφάγα που απομακρύνουν από την κυκλοφορία τα γηρασμένα ή ελαττωματικά ερυθρά αιμοσφαίρια. Στα μακροφάγα αποθηκεύεται επίσης ο σίδηρος που προέρχεται από την αποδόμηση της αιμοσφαιρίνης. Τέλος ο μυελός των οστών συμμετέχει ενεργά στο ανοσοποιητικό σύστημα γιατί αποτελεί τη θέση ωρίμανσης των Β λεμφοκυττάρων. Η αιμάτωσή του μυελού των οστών πραγματοποιείται από τους μυελικούς κλάδους της τροφοφόρου αρτηρίας του οστού, η οποία αφού διαπεράσει το φλοιό διαμέσου ενός 'θρεπτικού καναλιού', διακλαδίζεται σε μια σειρά αγγείων που εφοδιάζουν με αίμα τόσο το φλοιό όσο και τον μυελικό ιστό. Η αγγείωση αυτή εμπλουτίζεται με μικρότερα αγγεία με προέλευση από το μυϊκό ιστό και το περιόστεο τα οποία διαπερνούν με παρόμοιο τρόπο το φλοιό. Το τριχοειδικό δίκτυο αποτελείται από κολποειδή με λεπτά τοιχώματα, που καταλήγουν σε έναν κεντρικό κόλπο, ο οποίος εκβάλλει στην εκφορητική φλέβα,

που εξέρχεται από το ίδιο θρεπτικό κανάλι. Η μετανάστευση των ώριμων κυττάρων από τον μυελό των οστών στην κυκλοφορία ρυθμίζεται από απελευθερωτικούς παράγοντες, που παράγονται ανάλογα με τις ανάγκες του οργανισμού. Έχουν περιγραφεί αρκετές τέτοιες ουσίες, όπως ο παράγοντας C3 του συμπληρώματος, διάφορες ορμόνες (γλυκοκορτικοειδή και ανδρογόνα) και μερικές βακτηριακές τοξίνες.<sup>120</sup>

Η ανάπτυξη και η διαφοροποίηση των αιμοποιητικών κυττάρων στο μυελό των οστών ρυθμίζεται από το μικροπεριβάλλον που δημιουργούν τα στρωματικά κύτταρα. Σε αυτά περιλαμβάνονται μακροφάγα, ινοβλάστες διαφόρων σταδίων διαφοροποίησης, ενδοθηλιακά κύτταρα και λιπώδη κύτταρα τα οποία προάγουν την ανάπτυξη των αιμοποιητικών και των αρχέγονων κυττάρων μέσω της παραγωγής αυξητικών παραγόντων: GM-CSF (Granulocyte macrophage colony stimulating factor), G-CSF (Granulocyte colony stimulating factor), ιντερλευκίνης-6 (IL-6) κ.α. Επίσης, ρυθμίζουν μέσω έκκρισης άλλων κυτταροκινών τη δράση των μορίων προσκόλλησης των αιμοποιητικών κυττάρων επιτρέποντάς τους είτε να παραμείνουν στο μυελό των οστών είτε να μεταναστεύσουν σε περιοχές που είναι απαραίτητα.

Όλα τα αιμοποιητικά κύτταρα του οργανισμού προέρχονται από πολυδύναμα αρχέγονα αιμοποιητικά κύτταρα (HSCs- Hemopoietic Stem Cells) τα οποία έχουν τόσο τη δυνατότητα πολλαπλασιασμού τους όσο και διαφοροποίησής τους σε άλλες αιμοποιητικές σειρές. Υπό φυσιολογικές συνθήκες η πλειοψηφία των αρχέγονων κυττάρων βρίσκεται στη φάση G<sub>0</sub> του κυτταρικού κύκλου και διαιρείται μόνο για να διατηρήσει σταθερά τα πληθυσμιακά επίπεδα των αρχέγονων κυττάρων ή ως απάντηση στις απαιτήσεις του οργανισμού για πρόδρομα κύτταρα (στοχαστικό μοντέλο αιμοποίησης). Στη δεύτερη περίπτωση δίνει γένεση σε «δεσμευμένα» κύτταρα που είναι υποχρεωμένα να διαφοροποιηθούν σε κύτταρα κάποιας κυτταρικής σειράς: της ερυθράς, της κοκκιώδους, της μονοκυτταρικής ή της μεγακαρυοκυτταρικής. Πιο συγκεκριμένα η πρώτη διαφοροποίηση των αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων αποφέρει λεμφικά αρχέγονα (προγονικά) κύτταρα τα οποία ωριμάζουν σε λεμφοκύτταρα καθώς και μυελοειδή αρχέγονα (προγονικά) κύτταρα που αποτελούν τους προγόνους όλων των άλλων τύπων κυττάρων αίματος.

Τα λεμφικά προγονικά κύτταρα που προέρχονται από το αρχέγονο αιμοποιητικό κύτταρο ωριμάζουν σε B και T λεμφοκύτταρα τόσο στο μυελό των οστών όσο και στο

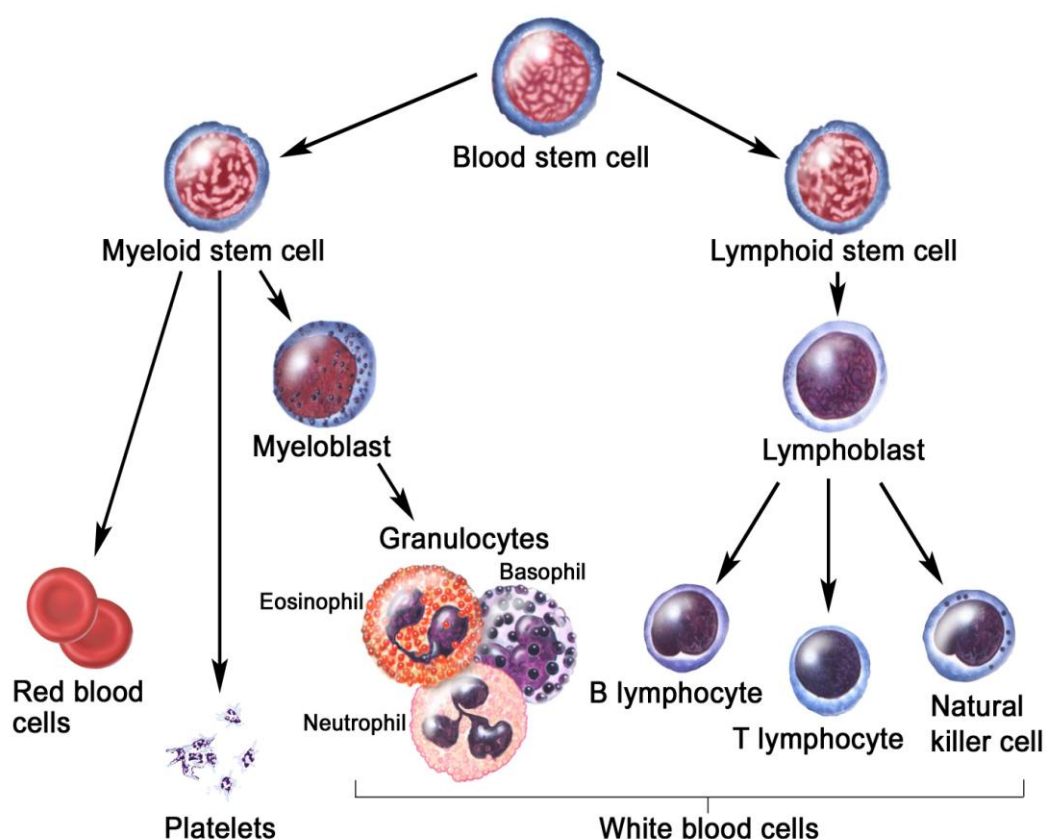
θύμο. Ενώ οι πολλαπλασιαζόμενοι απόγονοι των μυελοειδών κυττάρων διαφοροποιούνται ακολουθώντας ένα συγκεκριμένο αναπτυξιακό μονοπάτι καταλήγοντας σε έναν μόνο κυτταρικό τύπο: ερυθροκύτταρα, αιμοπετάλια, μονοκύτταρα ή πολυμορφοπύρρηνα κύτταρα. (Εικόνα 5)

Πιο αναλυτικά, όσον αφορά στη διαδικασία της μυελικής διαφοροποίησης, τα αρχικά στάδια περιλαμβάνουν το αρχέγονο πολυδύναμο αιμοποιητικό κύτταρο και το πρόδρομο μυελοειδές κύτταρο CFU-G (colony-forming-unit) που παράγεται υπό την επίδραση κυτταροκινών όπως ο G-CSF και στη συνέχεια διαφοροποιείται με τη σειρά σε μυελοβλάστες, προμυελοκύτταρα, μυελοκύτταρα και μεταμυελοκύτταρα. Τα κύτταρα αυτά φυσιολογικά δεν εμφανίζονται στο περιφερικό αίμα. Οι μυελοβλάστες είναι κύτταρα μεγάλου μεγέθους με μεγάλο πυρήνα και αρκετά πυρήνια χωρίς κοκκία στο κυτταρόπλασμα και αποτελούν το 5% των κυττάρων του μυελού των οστών. Η κυτταρική διαίρεσή τους οδηγεί στη δημιουργία των προμυελοκυττάρων, ελαφρώς μεγαλύτερων σε μέγεθος κυττάρων με κοκκία στο κυτταρόπλασμα, που με τη σειρά τους οδηγούν μέσω της διαίρεσής τους στη δημιουργία των μυελοκυττάρων που έχουν μικρότερα κοκκία. Στο στάδιο αυτό τα μυελοκύτταρα διαφοροποιούνται σε ουδετερόφιλα, ηωσινόφιλα και βασεόφιλα, τα οποία δε διαιρούνται περαιτέρω. Σύμφωνα με κυτταρογενετικές μελέτες ο απαιτούμενος χρόνος διαίρεσης και διαφοροποίησης ενός μυελοβλάστη σε κοκκιοκύτταρο είναι 6-12 ημέρες.

Τα στάδια της ερυθροποίησης περιλαμβάνουν το αρχέγονο πολυδύναμο αιμοποιητικό κύτταρο, τα πρόδρομα ερυθροειδή κύτταρα (BFU-E: burst-forming unit, CFU-E: colony-forming unit), τους προερυθροβλάστες, τους ερυθροβλάστες, τους νορμοβλάστες, και τα δικτυοερυθροκύτταρα. Οι νορμοβλάστες περιέχουν ακόμη πυρήνα και προοδευτικά μειώνονται σε μέγεθος καθώς αυξάνεται το φορτίο της αιμοσφαιρίνης ενώ τα δικτυοερυθροκύτταρα είναι ωριμότερα κύτταρα που δεν περιέχουν πυρήνα. Η ερυθροποιητική διαφοροποίηση ρυθμίζεται από συγκεκριμένες κυτταροκίνες (stem cell factor, IL-3, GM-CSF, ερυθροποιητίνη-EPO) εκ των οποίων η ερυθροποιητίνη είναι η κύρια κυτταροκίνη που προσαρμόζει την παραγωγή των ερυθροκυττάρων ανάλογα με τις ανάγκες του οργανισμού, προάγοντας τον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση των CFU-E και BFU-E. Τα χαμηλά επίπεδα αιμοσφαιρίνης και η ιστική υποξία προκαλούν αύξηση της παραγωγής της

ερυθροποιητίνης από τους νεφρούς που με τη σειρά της αυξάνει το ρυθμό της ερυθροποίησης.

Τα αιμοπετάλια τέλος προέρχονται από τα μεγακαρυοκύτταρα τα οποία είναι κύτταρα μεγάλου μεγέθους με μεγάλους πολυλοβώδεις πυρήνες, προέρχονται από τα πρόδρομα μεγακαρυοκύτταρα. Η ωρίμανση των μεγακαρυοκυττάρων πραγματοποιείται υπό την επίδραση της θρομβοποιητίνης (TPO), η οποία δρα σε συνδυασμό με άλλες κυτταροκίνες όπως οι IL-6 και IL-11.<sup>9,18,19</sup>



© 2007 Terese Winslow  
U.S. Govt. has certain rights

**Εικόνα 5:** Διαδικασία Αιμοποίησης. (<https://visualsonline.cancer.gov/details.cfm?imageid=7177>)

### 1.2.2.1 Εξέταση μυελού των οστών

Η εξέταση του μυελού των οστών συνεισφέρει σημαντικά στη διάγνωση και την αντιμετώπιση πολλών διαταραχών του αίματος και του μυελού των οστών. Η αναρρόφηση του μυελού των οστών (μυελόγραμμα) και η οστεομυελική βιοψία αποτελούν συμπληρωματικές μεθόδους. Τα αποτελέσματα των εξετάσεων αυτών σε συνδυασμό με τα αποτελέσματα άλλων εξετάσεων όπως ο ανοσοφαινότυπος, η

κυτταρογενετική ανάλυση και εξετάσεις του αιματολογικού, βιοχημικού και ανοσολογικού εργαστηρίου, συνεισφέρουν στη διάγνωση αιματολογικών νοσημάτων.

Οι ενδείξεις διενέργειας μυελογράμματος και οστεομυελικής βιοψίας ποικίλλουν και συνίστανται σε: μελέτη ανεξήγητης αναιμίας, ανώμαλων ερυθροκυτταρικών δεικτών, κυτταροπενίας ή κυττάρωσης, μελέτη ανώμαλων μορφών κυττάρων του περιφερικού αίματος που υποδηλώνουν διαταραχή στον μυελό των οστών, διάγνωση, σταδιοποίηση και παρακολούθηση (follow-up) αιματολογικών κακοηθειών (π.χ. οξείες και χρόνιες λευχαιμίες, μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα, χρόνιες μυελοϋπερπλαστικές παθήσεις, λεμφώματα, αμυλοείδωση, μαστοκυττάρωση), μελέτη σε υποψία μυελικής μετάστασης κακοηθειών, ανεξήγητες εστιακές βλάβες οστών σε ακτινολογική απεικόνιση, ανεξήγητη οργανομεγαλία, μικροβιολογική καλλιέργεια σε παρατεινόμενο εμπύρετο ή συγκεκριμένες λοιμώξεις όπως η φυματίωση, η λεισμανίαση και η ελονοσία, αξιολόγηση αποθηκών σιδήρου, μελέτη διαταραχών αποθήκευσης λιπιδίων/γλυκογόνου και αποκλεισμό αιματολογικών παθήσεων σε πιθανούς δότες για αλλογενή μεταμόσχευση αρχέγονων κυττάρων. Συνήθως προτείνεται η διενέργεια και των δύο εξετάσεων, ωστόσο σε μερικές περιπτώσεις η αναρρόφηση του μυελού των οστών μόνο είναι αρκετή.

Η διαδικασία της παρακέντησης και της οστεομυελικής βιοψίας ξεκινά αφού προηγουμένως έχει εξασφαλιστεί επαρκής νάρκωση και αναλγησία. Η προτιμότερη ανατομική θέση διενέργειας των εξετάσεων, αποτελεί η οπίσθια λαγόνια ακρολοφία. Σε κάποιες περιπτώσεις ωστόσο μπορούν επίσης να χρησιμοποιηθούν η πρόσθια λαγόνια ακρολοφία, το μέσο του οστού της κνήμης στα παιδιά ή το στέρνο, όπου όμως υπάρχει ο κίνδυνος πρόκλησης καρδιακού επιπωματισμού. Το υλικό επιστρώνεται σε πλακίδια (επίχρισμα μυελού) και αφού γίνουν ειδικές χρώσεις εξετάζεται στο μικροσκόπιο. Μέρος του υλικού προορίζεται για εξειδικευμένες εξετάσεις, όπως ο ανοσοφαινότυπος και η κυτταρογενετική.

Αναλυτικότερα, κατά τη διαδικασία της μυελικής αναρρόφησης, συλλέγονται δείγματα σε κατάλληλα σωληνάρια και στις απαιτούμενες ποσότητες, σύμφωνα με ξεχωριστές οδηγίες για την κάθε εξέταση που πρόκειται να πραγματοποιηθεί στο υλικό. Μετά την πρώτη λήψη, ακολουθεί συλλογή επιπρόσθετου υλικού με δεύτερη σύριγγα για τις εξετάσεις της κυτταρομετρίας ροής, της κυτταρογενετικής ανάλυσης, των

μοριακών γενετικών μελετών, της μικροβιολογίας, της ηλεκτρονικής μικροσκόπησης και της καλλιέργειας του μυελού των οστών. Τα στοιχεία που περιλαμβάνει το μυελόγραμμα είναι: ο αριθμός των κυττάρων του αίματος και συγκεκριμένα η συγκέντρωση της αιμοσφαιρίνης, ο ολικός αριθμός των λευκών αιμοσφαιρίων, ο αριθμός των επιμέρους κυττάρων (ουδετερόφιλα, ηωσινόφιλα, βασεόφιλα, μονοκύτταρα, λεμφοκύτταρα) και ο αριθμός των αιμοπεταλίων, ο προσδιορισμός της κυτταροβρίθειας του δείγματος, ο αριθμός των επιμέρους εμπύρηνων κυττάρων (Nucleated differential cell count-NBC), η σχέση M/E (μυελικής/ερυθράς) σειράς, η ωρίμανση της μυελικής και ερυθράς σειράς, της μεγακαρυοκυτταρικής σειράς, η παρουσία λεμφοκυττάρων, πλασματοκυττάρων, η παρουσία κυττάρων όπως οι βλάστες και οι αποθήκες σιδήρου. Στην αναφορά συμπεριλαμβάνονται επίσης τα αποτελέσματα των επιπρόσθετων αναλύσεων όπως η κυτταρογενετική, η PCR (Polymerase Chain Reaction), η FISH (fluorescence in situ hybridization) και αν είναι διαθέσιμα τα αποτελέσματα της κυτταρομετρίας ροής. Τέλος, περιλαμβάνεται το συμπέρασμα και εάν είναι σχετική με την πάθηση η ταξινόμηση κατά WHO.

Στην οστεομυελική βιοψία τη λήψη του δείγματος ακολουθεί στερεοποίηση, απασβεστοποίηση και τοποθέτησή του σε κερι παραφίνης ώστε να κατατμηθεί σε μικρότερα κομμάτια. Στη συνέχεια γίνεται χρώση αιματοξυλίνης-ηωσίνης ή και χρώση Giemsa και το δείγμα μικροσκοπείται. Αρχικά, με μικρή μεγέθυνση (x40-x100) αξιολογείται η καταλληλότητα του δείγματος, η κυτταροβρίθεια, η παρουσία εστιακών βλαβών, ο αριθμός των μεγακαρυοκυττάρων, η ύπαρξη και η εντόπιση σωρού κυττάρων, η αρχιτεκτονική του οστού και η οστεοκλαστική και οστεοβλαστική δραστηριότητα. Έπειτα, με μεγαλύτερη μεγέθυνση (x200-x400) αξιολογείται η αιμοποιητική δραστηριότητα (ερυθρά, μυελοειδής, μεγακαρυοκυτταρική σειρά, πλασματοκύτταρα και μακροφάγα). Ακόμη μεγαλύτερη μεγέθυνση χρησιμοποιείται για κυτταρολογικές λεπτομέρειες, όπως ενδοκυτταρικά κοκκία ή ραβδία Auer. Επιπλέον εξετάσεις που μπορούν να πραγματοποιηθούν, είναι εξετάσεις ανοσοϊστοχημείας για τον καθορισμό της κυτταρικής σειράς και του σταδίου διαφοροποίησης των φυσιολογικών και των ανώμαλων κυττάρων, για την ανίχνευση ελάχιστης υπολειπόμενης νόσου (MRD), για την αξιολόγηση της έκτασης της νόσου, για την ταξινόμηση της νόσου κ.α. Εάν ωστόσο ο φαινότυπος του ανώμαλου κυτταρικού

πληθυσμού είναι ήδη γνωστός από την αναρρόφηση του μυελού των οστών, τέτοιες εξετάσεις όπως π.χ. η κυτταρομετρία ροής δεν είναι απαραίτητες.<sup>120,121</sup>

### **1.3 ΛΕΥΧΑΙΜΙΑ ΣΤΗΝ ΠΑΙΔΙΚΗ ΗΛΙΚΙΑ**

Η λευχαιμία αποτελεί κακοήθεια του αιμοποιητικού συστήματος που οφείλεται σε βλάβη του γονιδιώματος συγκεκριμένων κυττάρων του αιμοποιητικού συστήματος, στη διαφοροποίηση και στον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο (απόπτωση). Αποτέλεσμα των διαταραχών αυτών είναι η δημιουργία μονοκλωνικού πληθυσμού και η απώλεια της φυσιολογικής λειτουργίας του μυελού των οστών με μοιραία έκβαση εάν αφεθεί χωρίς θεραπεία.

Οι λευχαιμίες διακρίνονται σε λεμφογενείς και μυελογενείς ανάλογα με την κυτταρική σειρά που επηρεάζεται καθώς και σε οξείες και χρόνιες. Η τελευταία αυτή διάκριση δεν αντιπροσωπεύει την ταχύτητα που η νόσος εξελίσσεται αλλά στηρίζεται κυρίως σε μορφολογικά κριτήρια. Έτσι, στη χρόνια λευχαιμία υπερισχύει ο τύπος του ώριμου κυττάρου ενώ στην οξεία το άωρο κύτταρο. Η χρόνια λευχαιμία αποτελεί νόσο που αφορά κυρίως στους ενήλικες ενώ η οξεία είναι κυρίως νόσος της παιδικής ηλικίας. Διακρίνονται τέσσερις τύποι λευχαιμίας: η Οξεία Λεμφοβλαστική Λευχαιμία (Acute Lymphoblastic Leukemia, ALL), η Χρόνια Λεμφοβλαστική Λευχαιμία (Chronic Lymphocytic Leukemia, CLL), η Οξεία Μυελογενής Λευχαιμία (Acute Myeloid Leukemia, AML) και η Χρόνια Μυελογενής Λευχαιμία (Chronic Myeloid Leukemia, CML). Ο συνδυασμός χαρακτηριστικών λεμφογενούς και μυελογενούς σειράς κατατάσσει τη νόσο στην κατηγορία της διφαινοτυπικής λευχαιμίας, ενώ παρατηρούνται και άλλοι τύποι.<sup>2</sup>

Ως προς τα επιδημιολογικά χαρακτηριστικά της νόσου σύμφωνα με τα αποτελέσματα αναφοράς βασισμένης σε συλλογή στοιχείων από παγκόσμιες βάσεις δεδομένων (Automated Childhood Cancer Information System- Eurocare κ.α) οι λευχαιμίες (συμπεριλαμβανομένων των μυελοϊπερπλαστικών και των μυελοδυσπλαστικών συνδρόμων) αφορούν στο 34,1% των κακοηθειών που απαντούν συχνότερα σε παιδιά κάτω των 15 ετών μαζί με τους όγκους εγκεφάλου (23%), και τα λεμφώματα (12%). Ως προς την ηλικιακή κατανομή των κακοήθων παθήσεων, στα βρέφη το ένα τρίτο αποτελούν τα νευροβλαστώματα, στα παιδιά ενός έως τεσσάρων ετών υπερισχύουν οι λευχαιμίες με ποσοστό 44,9%, ενώ στις ηλικιακές ομάδες πέντε



έως εννέα ετών και δέκα έως δεκατεσσάρων ετών πάνω από τα τρία τέταρτα όλων των κακοηθειών καταλαμβάνουν οι λευχαιμίες μαζί με τους όγκους του ΚΝΣ (Κεντρικό Νευρικό Σύστημα) και τα λεμφώματα. Η λευχαιμία εκδηλώνεται κυρίως ως οξεία λευχαιμία με την Οξεία Λεμφοβλαστική Λευχαιμία να αντιπροσωπεύει το μεγαλύτερο ποσοστό όλων των κακοήθων παθήσεων στα παιδιά (26,8%), ενώ η Οξεία Μυελοβλαστική Λευχαιμία αφορά σε μόλις 4,7%.<sup>26</sup>

### **1.3.1 ΟΞΕΙΑ ΛΕΜΦΟΒΛΑΣΤΙΚΗ ΛΕΥΧΑΙΜΙΑ**

Η Οξεία Λεμφοβλαστική Λευχαιμία (ΟΛΛ) είναι κακοήθεια του αιμοποιητικού συστήματος που οφείλεται σε εξαλλαγή και κλωνική αύξηση κυττάρων της λεμφικής σειράς. Τα κύτταρα αυτά έχουν χάσει τη δυνατότητα εξέλιξής τους σε ωριμότερες μορφές μένοντας καθηλωμένα σε συγκεκριμένο στάδιο διαφοροποίησης. Χαρακτηρίζεται από την παρουσία στο μυελό των οστών κακοήθων αιμοποιητικών κυττάρων (λεμφοβλαστών) σε πάνω από 25%. Τα κύτταρα αυτά στην πλειοψηφία τους προέρχονται από Β-προγονικά κύτταρα σε πρώιμα στάδια διαφοροποίησης και φέρουν στην επιφάνειά τους το αντιγόνο CALLA (CD10+) ή λιγότερο συχνά προέρχονται από Τ-κύτταρα και ώριμα Β-κύτταρα.

Η νόσος παρουσιάζεται συνήθως στις ηλικίες 2-10 ετών στο 85% των περιπτώσεων, με την ηλικιακή αιχμή να προσδιορίζεται στα 4 έτη ενώ έχει βρεθεί ότι εμφανίζεται ελαφρώς συχνότερα στα αγόρια σε σχέση με τα κορίτσια. Προδιαθεσικοί παράγοντες ανάπτυξης λευχαιμίας θεωρούνται το σύνδρομο Down, η αναιμία Fanconi, το σύνδρομο Bloom, το σύνδρομο Wiscott- Aldrich, η αταξία- τηλαγγειεκτασία καθώς και η έκθεση σε ιονίζουσα ακτινοβολία ή σε χημειοθεραπευτικά φάρμακα (ιδιαίτερα σε αναστολείς της τοποισομεράσης II). Επίσης αδέλφια ασθενούς με ΟΛΛ έχουν τέσσερις φορές μεγαλύτερη πιθανότητα να εμφανίσουν τη νόσο σε σχέση με το γενικό πληθυσμό και σε μονοωγενή δίδυμα αδέλφια που το ένα πάσχει από ΟΛΛ το άλλο έχει αυξημένο κίνδυνο κατά 25% να παρουσιάσει τη νόσο. Βάσει αυτών των συσχετίσεων πιθανολογείται η συμβολή γενετικών και περιβαλλοντικών παραγόντων στην εκδήλωση της νόσου.<sup>17,20,21,22</sup>

<b>ΓΕΝΕΤΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ</b>	<b>ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ</b>
Σύνδρομο Down	Ιονίζουσα ακτινοβολία
Αναμία Fanconi	Φάρμακα
Σύνδρομο Bloom	Αλκυλιωτικοί παράγοντες
Αναμία Diamond-Blackfan	Νιτροζουρία
Σύνδρομο Schwachman	Έκθεση σε βενζένιο
Σύνδρομο Klinefelter	
Σύνδρομο Turner	

**Εικόνα 6:** Προδιαθεσικοί παράγοντες Οξείας Λεμφοβλαστικής Λευχαιμίας.

### **1.3.1.1 Κλινική εικόνα- Εργαστηριακά ευρήματα της ΟΛΛ**

Τα συμπτώματα με τα οποία εμφανίζεται η ΟΛΛ είναι αποτέλεσμα αφενός της μειωμένης παραγωγής όλων των κυτταρικών σειρών του μυελού των οστών λόγω κατάληψής του από λευχαιμικά κύτταρα και αφετέρου της διήθησης εξωμυελικών ιστών από αυτά. Έτσι, τα συχνότερα κλινικά σημεία είναι η ωχρότητα, η αδυναμία, οι αυτόματες εκχυμώσεις και οι λοιμώξεις που οφείλονται στην αναιμία, τη θρομβοπενία και την λευκοπενία αντίστοιχα. Επίσης μπορεί να παρατηρηθούν οστικά άλγη που εντοπίζονται συνηθέστερα στην πύελο, στους άκρους πόδας και στα σπονδυλικά σώματα, ηπατομεγαλία και σπληνομεγαλία που αφορούν στο 60% των περιπτώσεων, λεμφαδενοπάθεια που εντοπίζεται στους τραχηλικούς, τους μασχαλιαίους και τους βουβωνικούς λεμφαδένες, εμφάνιση διαλείπουσας πυρετικής κίνησης ως αποτέλεσμα της έκκρισης κυτταροκινών στον οργανισμό, ετερόπλευρη ή αμφοτερόπλευρη διόγκωση των όρχεων ως αποτέλεσμα της διήθησής τους από λευχαιμικά κύτταρα, σύνδρομο της άνω κοίλης φλέβας εξαιτίας της πίεσης του αγγείου από διογκωμένους λεμφαδένες του μεσοθωρακίου και νευρικές παραλύσεις που οφείλονται στη διήθηση κρανιακών νεύρων από καρκινικά κύτταρα. Ωστόσο στα πρώτα στάδια της νόσου τα κυρίαρχα συμπτώματα που είναι μη ειδικά περιλαμβάνουν αδυναμία, ανορεξία, ευερεθιστότητα, οστικά άλγη, αρθραλγίες και χαμηλή πυρετική κίνηση. Συχνά οι ασθενείς παρουσιάζουν ιστορικό λοίμωξης του ανώτερου αναπνευστικού έναν με δύο μήνες πριν την εμφάνιση των συμπτωμάτων.

Στον εργαστηριακό έλεγχο της νόσου η πιο σημαντική αρχική εξέταση είναι η γενική αίματος (complete blood count-CBC), όπου στο 95% των ασθενών παρατηρείται μείωση σε τουλάχιστον έναν κυτταρικό τύπο (ουδετεροπενία, θρομβοπενία ή αναιμία). Ο αριθμός των λευκών αιμοσφαιρίων (WBC) στο 50% των ασθενών είναι μικρός ή μέσα στα φυσιολογικά όρια (10.000/L), με τον απόλυτο αριθμό των ουδετεροφίλων ωστόσο να μην υπερβαίνει τα 1000/L ενώ μεταξύ των φυσιολογικών λεμφοκυττάρων εμφανίζεται και ένα μικρό ποσοστό βλαστών. Στο 30% των ασθενών ο αριθμός των λευκών αιμοσφαιρίων κυμαίνεται από 10.000 έως 50.000/L ενώ στο υπόλοιπο 20% είναι πάνω από 50.000/L και σε ορισμένες περιπτώσεις ακόμη και πάνω από 300.000/L, οπότε οι βλάστες είναι άμεσα διακριτοί στο περιφερικό αίμα. Η πλειονότητα των ασθενών παρουσιάζει συνήθως αναιμία. Συγκεκριμένα στο 45% τα επίπεδα αιμοσφαιρίνης είναι κάτω από 7g/dl και στο υπόλοιπο 55% τα επίπεδα κυμαίνονται μεταξύ 7-11g/dl ενώ στο περιφερικό αίμα συναντώνται τα ερυθρά αιμοσφαίρια ως δακρυοκύτταρα. Ως προς τον αριθμό των αιμοπεταλίων τέλος, στο 75% των ασθενών ο αριθμός τους είναι κάτω από 100.000/mm<sup>3</sup>. Υπάρχει ωστόσο ένα πολύ μικρό ποσοστό ασθενών με ΟΛΛ (<1%) χωρίς διαταραχές στις κυτταρικές σειρές, στους οποίους το οστικό άλγος συνήθως οδηγεί στην εξέταση του μυελού των οστών.

Ο υπόλοιπος εργαστηριακός έλεγχος περιλαμβάνει ηλεκτρολύτες ορού, ασβέστιο, ουρία, κρεατινίνη, ουρικό οξύ, τρανσαμινάσες, αλκαλική φωσφατάση, χολερυθρίνη, έλεγχο ηπατίτιδας Α,Β,С, χρόνο προθρομβίνης, προϊόντα αποδόμησης ινωδογόνου, ανοσοσφαιρίνες, ιολογικό έλεγχο και ανάλυση ούρων. Συχνά το ουρικό οξύ και η γαλακτική αφυδρογονάση (LDH) είναι υψηλά κατά τη διάγνωση. Επιπλέον, η ακτινογραφία θώρακος ενδείκνυται για τη διάγνωση πιθανής διάτασης του μεσοθωρακίου, οφειλόμενης σε διήθηση λεμφαδένων ή λοίμωξης που μπορεί να συνυπάρχει. Το υπερηχογράφημα κοιλίας συνίσταται για την ανεύρεση πιθανής διόγκωσης των νεφρών, των όρχεων, υδρονέφρωσης κ.α., και η απλή ακτινογραφία μακρών οστών και σπονδυλικής στήλης εκτός των άλλων μπορεί να δείξει αφαλάτωση ή συμπίεση των σπονδυλικών σωμάτων.<sup>20,21,22</sup>

### **1.3.1.2 Διαφορική Διάγνωση**

Η διαφορική διάγνωση που βασίζεται στο ιστορικό και την φυσική εξέταση, περιλαμβάνει λοιμώξεις από τους ιούς Epstein-Barr (EBV) και κυτταρομεγαλοϊό (CMV),

που επίσης προκαλούν λεμφαδενοπάθεια, ηπατοσπληνομεγαλία, πυρετό και αναιμία. Επίσης περιλαμβάνει την αυτοάνοση θρομβοπενική πορφύρα που προκαλεί επιμένουσες πετέχειες και πορφύρα, την ερυθροβλαστοπενία, την αυτοάνοση αιμολυτική αναιμία και την απλαστική αναιμία που προκαλούν ωχρότητα και την νεανική ρευματοειδή αρθρίτιδα που προκαλεί πυρετό και αρθραλγίες με ή χωρίς ηπατοσπληνομεγαλία και λεμφαδενοπάθεια. Η ΟΛΛ πρέπει επίσης να διαχωριστεί από την ΟΜΛ και άλλες κακοήθειες όπως το νευροβλάστωμα, το ραβδομυοσάρκωμα και το σάρκωμα Ewing που χαρακτηρίζονται από διήθηση του μυελού από καρκινικά κύτταρα η οποία οδηγεί στην καταστολή της λειτουργίας του.<sup>21,22</sup>

### **1.3.1.3 Διάγνωση της ΟΛΛ**

Η διάγνωση της ΟΛΛ μπορεί να γίνει: 1) με την ανεύρεση βλαστών στο περιφερικό αίμα, 2) την ανεύρεση βλαστών στο μυελό των οστών και τον καθορισμό της μορφολογίας της βλάστης 3) την κυτταροχημική μελέτη των χαρακτηριστικών της βλάστης 4) τον ανοσοφαινότυπο όπου με την κυτταρομετρία ροής βοηθά στο διαχωρισμό Β-ΟΛΛ, Τ-ΟΛΛ ή ΟΜΛ και 5) την κυτταρογενετική μελέτη. Η οριστική διάγνωση της λευχαιμίας γίνεται με την εξέταση του μυελού των οστών. Η διάγνωση της λευχαιμίας του ΚΝΣ γίνεται όταν ανευρεθούν περισσότερα από 5 λεμφοκύτταρα/L στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό και βλάστες μετά την κυτταροφυγοκέντρωση.<sup>21,22,23</sup>

Αρχικά η διάγνωση και ταξινόμηση των οξέων λευχαιμιών βασίστηκε κυρίως στη μορφολογία των κυττάρων, με τη βοήθεια του ηλεκτρονικού μικροσκοπίου και των κυτταροχημικών τεχνικών. Αργότερα, η ανάπτυξη και χρήση ειδικών μονοκλωνικών αντισωμάτων για τον προσδιορισμό αντιγόνων επιφανείας και η πρόοδος στην κυτταρογενετική καθιέρωσαν επιπλέον ανοσολογικά και κυτταρογενετικά κριτήρια. Τα τελευταία χρόνια ωστόσο οι πρόοδοι στη μοριακή βιολογία και η έρευνα του γενετικού προφίλ της νόσου εισήγαγαν μια νέα προσέγγιση στον τρόπο διάγνωσης και ταξινόμησης της οξείας λευχαιμίας βασισμένη στις διαταραχές της γονιδιακής έκφρασης.<sup>20,24,25</sup>

#### **1.3.1.3.1 Μορφολογία βλαστών και κυτταροχημεία**

Το σύστημα ταξινόμησης της ΟΛΛ σε υποομάδες βάσει των μορφολογικών και κυτταροχημικών χαρακτηριστικών της βλάστης καθιερώθηκε το 1976 από μια επιτροπή

ειδικών από τη Γαλλία, την Αμερική και τη Μ. Βρετανία για αυτό και ονομάστηκε ταξινόμηση κατά FAB (**F**rench-**A**merican-**B**ritish).

Οι κυτταροχημικές αντιδράσεις που χρησιμοποιούνται για την διαφοροποίηση των τύπων λευχαιμίας είναι οι χρώσεις της Μυελοϋπεροξειδάσης (MPO), της μη ειδικής εστεράσης (NSE) και η Sudan Black (SBB) που χαρακτηρίζουν τα κύτταρα της μυελικής σειράς κατά κύριο λόγο καθώς και η PAS (Periodic Acid-Schiff reaction) και η TdT (Terminal deoxynucleotidyl transferase) που ανευρίσκονται θετικές στα κύτταρα της οξείας λεμφοβλαστικής λευχαιμίας.

Σύμφωνα με το σύστημα κατά FAB οι λεμφοβλάστες κατατάσσονται σε τρεις υποομάδες:

**ΟΛΛ L1:** Υπερισχύουν οι μικρού μεγέθους λεμφοβλάστες με μικρή ποσότητα κυτταρόπλασμα και δυσδιάκριτους πυρηνίσκους. Η μυελοπεροξειδάση είναι αρνητική και η TdT συνήθως θετική.

**ΟΛΛ L2:** Οι λεμφοβλάστες είναι μεγαλύτεροι, εμφανίζουν σημαντική ετερογένεια ως προς το μέγεθος και έχουν προέχοντες πυρηνίσκους και αφθονότερο κυτταρόπλασμα. Η μυελοπεροξειδάση είναι αρνητική και η TdT συνήθως θετική.

**ΟΛΛ L3** (Burkitt type): Τα κύτταρα είναι κυτταρομορφικά πανομοιότυπα με τα κύτταρα του λεμφώματος Burkitt. Στον τύπο αυτό παρατηρείται ομοιογενής πληθυσμός μεγάλων βλαστών. Τα κύτταρα έχουν μέτριο βασεόφιλο πρωτόπλασμα με κενोटόπια και ο πυρήνας είναι ομαλός με ένα ή περισσότερα πυρήνια. Οι βλάστες είναι αρνητικοί για μυελοπεροξειδάση και TdT και μπορεί να συνδέονται με χρωμοσωμικές ανωμαλίες όπως μεταθέσεις  $t(2;8)$ ,  $t(8;14)$ ,  $t(8;22)$ .

Περίπου 80%-85% των ασθενών έχουν λεμφοβλάστες του υποτύπου L1, λιγότεροι από 15% έχουν μορφολογία L2 και μόνο 1%-3% έχουν κύτταρα με μορφολογία L3. Η συνύπαρξη όμως L1 και L2 λεμφοβλαστών είναι δυνατή. Ως προς την προγνωστική αξία οι ασθενείς με μορφολογία L1 εμφανίζουν καλύτερη πρόγνωση σε σχέση με τους ασθενείς με L2, ενώ οι ασθενείς με L3 παρουσιάζουν τη χειρότερη πρόγνωση.<sup>20</sup>

### **1.3.1.3.2 Ανοσοφαινότυπος**

Ο ανοσοφαινότυπος είναι χρήσιμος για τον διαχωρισμό των Β και Τ λευχαιμικών κυττάρων και τη διάκριση των λευχαιμιών από άλλες αιμοποιητικές ή μη νεοπλασίες. Ο προσδιορισμός του ανοσοφαινοτύπου γίνεται με την ανεύρεση δεικτών στην επιφάνεια των κυττάρων, δηλαδή αντιγονικών υποδοχέων με τη βοήθεια της κυτταρομετρίας ροής. Πρόκειται για μια μέθοδο που επιτρέπει την ταυτόχρονη ανάλυση πολλών κυτταρικών παραμέτρων όπως την έκφραση δεικτών, τη μορφολογία του κυττάρου κ.α. με το πλεονέκτημα του ελέγχου πολύ μεγάλου αριθμού κυττάρων σε μικρό χρονικό διάστημα (περίπου 10.000 ή και περισσότερα κύτταρα ανά λεπτό).

Οι αντιγονικοί υποδοχείς κατατάσσονται σε ομάδες που ονομάζονται με τα αρχικά CD (Cluster differentiation). Οι δείκτες που χαρακτηρίζουν την Β κυτταρική σειρά είναι οι CD19, CD20 και CD22, την Τ κυτταρική σειρά οι CD2, CD4, CD5, CD7 και CD8 και τη μυελική σειρά οι CD13, CD14 και CD33. Υπάρχουν και δείκτες που δεν είναι χαρακτηριστικοί μίας σειράς, όπως οι CD10 (CALLA), CD34 και HLA-DR. Πιο συχνά στην παιδική λευχαιμία απαντάται το πρώιμο προ-Β κύτταρο (64%) που εκφράζει το CD19 και πιθανόν και το CD10 στην επιφάνειά του και ακολουθεί το προ-Β κύτταρο που εκφράζει τα CD10, CD19 και CD20 (14%). Στη λεμφική σειρά ανήκουν και το λίγο ωριμότερο προ-Β κύτταρο που εκτός από την έκφραση των CD19 και CD20 στην επιφάνειά του, εμφανίζει και κυτταροπλασματικές ανοσοσφαιρίνες, καθώς και το ώριμο Β-κύτταρο που μαζί αφορούν στο 2% των ασθενών. Το 15% των ασθενών εμφανίζουν ανοσοφαινότυπο Τ κυττάρου που εκφράζει πολλαπλούς συνδυασμούς των CD2, CD4, CD5, CD7 και CD8 δεικτών, ενώ 5% των ασθενών εμφανίζουν μικτό ανοσοφαινότυπο ή εκφράζουν δείκτες που δεν είναι ειδικοί κάποιας κυτταρικής σειράς.<sup>20,30</sup>

### **1.3.1.3.3 Γενετική της ΟΛΛ**

Σύμφωνα με πρόσφατα δεδομένα που στηρίζονται σε μοριακές μεθόδους, η διάγνωση της Οξείας Λεμφοβλαστικής Λευχαιμίας και άλλων καρκίνων της παιδικής ηλικίας μπορεί πλέον να βασίζεται στο «δακτυλικό αποτύπωμα» της νόσου που σχετίζεται με το γονιδιακό της προφίλ.

Η διαδικασία της κακοήθους εξαλλαγής στην ΟΛΛ της παιδικής ηλικίας είναι ιδιαίτερα πολύπλοκη. Για την έναρξη της διαδικασίας της λευχαιμογένεσης απαιτούνται τουλάχιστον δύο επιβλαβή γεγονότα από μία σημειακή μετάλλαξη έως θραύση της διπλής έλικας του DNA που οδηγούν σε ποικίλες χρωμοσωμικές μεταλλάξεις όπως μεταθέσεις, ελλείψεις, διπλασιασμούς και αναστροφές. Η κυριότερη από αυτές τις μεταλλάξεις του γονιδιώματος είναι οι χρωμοσωμικές μεταθέσεις. Στην ΟΛΛ των Β-προγονικών κυττάρων η χρωμοσωμική μετάθεση συνήθως οδηγεί στην συγχώνευση των κωδικών περιοχών δύο γονιδίων και το χιμαιρικό γονίδιο που προκύπτει κωδικοποιεί για μια χιμαιρική πρωτεΐνη που προσδίδει στο αιμοποιητικό κύτταρο δυναμικό λευχαιμογένεσης. Σε πολλές περιπτώσεις οι μεταλλάξεις αφορούν σε γονίδια ανοσοσφαιρινών στα Β κύτταρα και υποδοχείς των Τ κυττάρων στην Τ-ΟΛΛ. Πολλά από αυτά τα κύτταρα αποκτούν ιδιότητες αρχέγονων κυττάρων όπως την ικανότητα να πολλαπλασιάζονται συνεχώς χωρίς να διαφοροποιούνται. Μελέτες του περιφερικού αίματος νεογνών που παρουσίασαν λευχαιμία αποδεικνύουν ότι οι χρωμοσωμικές μεταθέσεις αποτελούν πρώιμα γεγονότα που οδηγούν στη λευχαιμογένεση με ένα σημαντικό ποσοστό να παρουσιάζεται ενδομήτρια. Ωστόσο μελέτες σε ομφάλιο λώρο δείχνουν ότι λιγότερο από το 1% των παιδιών με ανιχνεύσιμες μεταθέσεις αναπτύσσουν τη νόσο. Τα δευτερογενή γεγονότα που οδηγούν στην εκδήλωση της λευχαιμίας εμφανίζουν ετερογένεια και περιλαμβάνουν μεταλλάξεις που ενεργοποιούν μεταγραφικούς παράγοντες ή κινάσες ή μεταλλάξεις και ελλείψεις που απενεργοποιούν ογκοκατασταλτικά γονίδια.<sup>27</sup>

Οι πιο συχνές χρωμοσωμικές ανωμαλίες στην ΟΛΛ είναι οι : t(9;22)(q34;q11) ή *BCR-ABL*, t(1;19)(q23;p13) ή *E2A-PBX1*, t(12;21)(p13;q22) ή *TEL-AML1*, t(4;11)(q21;q23) ή *MLL-AF4*, καθώς επίσης ο υπερδιπλοειδισμός (51-65 χρωμοσώματα/κύτταρο) και ο υποδιπλοειδισμός (<44 χρωμοσώματα/κύτταρο). Έχει βρεθεί ότι αυτές οι χρωμοσωμικές ανωμαλίες έχουν προγνωστική αξία. Η πιο συχνή μετάθεση είναι η t(12;21)(p13;q22), που προκύπτει από την συγχώνευση του γονιδίου *TEL(ETV6)* του χρωμοσώματος 12 στο γονίδιο *AML1(RUNX1)* του χρωμοσώματος 21. Εμφανίζεται στο 25% των περιπτώσεων σε παιδιά 2-9 ετών συνήθως και σχετίζεται με καλή πρόγνωση και καλή απόκριση στη θεραπεία με ασπαραγινάση. Σε ένα 5-6% των περιπτώσεων εμφανίζεται η μετάθεση t(1;19)(q23;p13) ή *E2A-PBX1*, η οποία ενώ παλαιότερα με τη

χρήση αντιμεταβολιτών στη θεραπεία σχετιζόταν με κακή πρόγνωση, με τις σύγχρονες θεραπείες ισχύει ακριβώς το αντίθετο. Τα βρέφη με ΟΛΛ συχνά εμφανίζουν μεταθέσεις που περιλαμβάνουν το γονίδιο *MLL*(11q23) ή αλλιώς *HRX* ή *HTRX*. Αφορούν στο 6% των περιπτώσεων, παρουσιάζουν αυξημένο αριθμό λευκοκυττάρων στη διάγνωση και είναι πιθανότερο να εμφανίσουν συμμετοχή του ΚΝΣ και κακή απόκριση στην αρχική θεραπεία. Η μετάθεση t(9;22)(q34;q11) ή *BCR-ABL* ή χρωμόσωμα της Φιλαδέλφειας εμφανίζεται σε ένα 5% και σχετίζεται με κακή πρόγνωση. Το 50% των ασθενών με ΟΛΛ Τ κυτταρικής σειράς εμφανίζουν χρωμοσωμικές μεταθέσεις που επηρεάζουν τους Τ κυτταρικούς υποδοχείς και σχεδόν όλες οι περιπτώσεις Τ-ΟΛΛ μπορούν να κατηγοριοποιηθούν βάσει των ογκογονιδίων που εμπλέκονται: *LYL1* και *LMO2*, *HHOXX1*, *TAL1*, *HPX11L2* και *MLLT*. Επιπλέον έχει βρεθεί ότι στις δευτερογενείς μεταλλάξεις εμπλέκεται το γονίδιο *FLT3* που κωδικοποιεί για μια τυροσινική κινάση που ρυθμίζει τη φυσιολογική ανάπτυξη των αιμοποιητικών κυττάρων και το *NOTCH1* που ρυθμίζει τον Τ κυτταρικό θάνατο. Τέλος αρκετά συχνά εμφανίζεται υπερδιπλοειδισμός (30%) συνηθέστερα με τρισωμίες των χρωμοσωμάτων 4, 10 και 17, ο οποίος σχετίζεται με καλή πρόγνωση σε αντίθεση με τον υποδιπλοειδισμό.<sup>28</sup>

Πρόσφατες έρευνες έχουν αποκαλύψει καινούριες χρωμοσωμικές ανωμαλίες οι οποίες προς το παρόν μελετώνται σε ερευνητικό επίπεδο και δεν έχει διευκρινιστεί η προγνωστική τους αξία. Σε αυτές περιλαμβάνεται το χιμαιρικό γονίδιο *P2RY8-CRLF2* το οποίο προκύπτει από τη μετάθεση t(X;14)(p22q23) ή t(Y;14)(p11;q32) που εμπλέκει τα γονίδια *IGH@* και *CRLF2* στην ψευδοαυτοσωμική περιοχή (PAR1) των φυλετικών χρωμοσωμάτων και από μία έλλειψη στην ίδια περιοχή. Αποτέλεσμα της χρωμοσωμικής αυτής ανωμαλίας είναι η υπερέκφραση του *CRLF2* που κωδικοποιεί για έναν υποδοχέα κυτοκίνης και οδηγεί στην ενεργοποίηση του μονοπατιού *JAK-STAT* και σε πλεονέκτημα αύξησης. Η υπερέκφραση αυτή συναντάται σε 60% των παιδιών με ΟΛΛ και σύνδρομο Down και σε 10-15% των παιδιών με υψηλού κινδύνου *BCR-ABL* (-) ΟΛΛ. Επίσης περιλαμβάνεται η ενδοχρωμοσωμική ενίσχυση του χρωμοσώματος 21 (*iAMP21*) που αποκαλύφθηκε τυχαία σε ανάλυση ρουτίνας για την ανεύρεση του *ETV6-RUNX1* γονιδίου με τη μέθοδο FISH. Βρέθηκε ότι ασθενείς αρνητικοί για το *ETV6-RUNX1* χιμαιρικό γονίδιο εμφανίζουν εκτός από τα δύο φυσιολογικά αντίγραφα του *ETV6*, πάνω από δύο αντίγραφα του *RUNX1*, ένα στο φυσιολογικό χρωμόσωμα 21 και τα



υπόλοιπα στο άλλο. Μεταξύ των ασθενών η μορφολογία του μη φυσιολογικού χρωμοσώματος 21 διαφέρει, ωστόσο κοινό σημείο αποτελεί η ύπαρξη του *RUNX1* γονιδίου στην ενισχυμένη περιοχή. Επιπλέον έχουν ανευρεθεί ελλείψεις σε γονίδια που ρυθμίζουν την ανάπτυξη των Β κυττάρων όπως τα: *PAX5*, *TCF3*, *EBF1*, *LEF1*, *IKFZ1* (Ikaros) και *IKFZ3* και σε γονίδια που ρυθμίζουν τον κυτταρικό κύκλο: *CDKN2Q*, *CDKN1B* και *RB1*.<sup>25,31</sup>

#### 1.3.1.4 Ταξινόμηση της ΟΛΛ

Πρόσφατα, ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας (ΠΟΥ) σε συνεργασία με την Εταιρεία Αιματολογίας και την Ευρωπαϊκή Ένωση Αιματολογίας πρότειναν έναν νέο τρόπο ταξινόμησης της Οξείας Λευχαιμίας που βασίζεται πλέον στον συσχετισμό γενετικών, μορφολογικών, κυτταροχημικών, ανοσοφαινοτυπικών και κλινικών πληροφοριών. Σύμφωνα με τα νέα δεδομένα η ΟΛΛ συνεχίζει να διακρίνεται σε λευχαιμία Β και Τ κυττάρου, δεν περιλαμβάνει όμως πλέον διαχωρισμό σε υπότυπους βάσει της ωριμότητας των κυττάρων.

Οι οξείες λευχαιμίες διακρίνονται σε τρεις κατηγορίες: την Β-λεμφοβλαστική λευχαιμία/λέμφωμα, την Τ-λεμφοβλαστική λευχαιμία/λέμφωμα και την οξεία λευχαιμία διφορούμενης κυτταρικής σειράς. Καταργούνται δηλαδή η ονομασία προ-Β λευχαιμία και διφαινοτυπική λευχαιμία. Ως προς την Β-λεμφοβλαστική λευχαιμία/λέμφωμα, πολλές αναφορές αναδεικνύουν τη συσχέτιση συγκεκριμένων γενετικών ανωμαλιών με κλινικά, ανοσοφαινοτυπικά και προγνωστικά χαρακτηριστικά έτσι ώστε τελικά οι ανωμαλίες αυτές να προσδιορίζουν μια διακεκριμένη νοσολογική οντότητα. Εάν καμία από τις γενετικές ανωμαλίες που παρουσιάζονται στη νέα αυτή ταξινόμηση δεν εμφανίζεται, τότε η καταλληλότερη ονομασία είναι: Β-λεμφοβλαστική λευχαιμία/λέμφωμα μη προσδιοριζόμενη. Σημαντική είναι επίσης η παρατήρηση ότι το Burkitt λέμφωμα δεν πρέπει να κατατάσσεται ως Β-ΟΛΛ καθώς αποτελεί νεόπλασμα ώριμων κυττάρων. Από τους ασθενείς με Τ-λεμφοβλαστική λευχαιμία/λέμφωμα το 50%-60% παρουσιάζουν ανώμαλο καρυότυπο ωστόσο καμία από τις γενετικές ανωμαλίες δεν έχει συσχετιστεί με συγκεκριμένα βιολογικά χαρακτηριστικά κι έτσι δεν προτείνονται υποκατηγορίες βάσει των γενετικών ανωμαλιών. Τέλος υπάρχουν περιπτώσεις όπου ή δεν εκφράζονται αντιγόνα ειδικά κάποιας σειράς είτε οι βλάστες συνεκφράζουν αντιγόνα διαφορετικών κυτταρικών σειρών σε τέτοιο βαθμό που δεν

μπορεί να γίνει κατάταξη σε μία κυτταρική σειρά. Η πρώτη περίπτωση αναφέρεται πια ως Οξεία Αδιαφοροποίητη Λευχαιμία ενώ η δεύτερη ως Οξεία Λευχαιμία Μικτού φαινοτύπου (mixed phenotype acute leukemia-MPAL).<sup>24</sup>

Η νέα αυτή ταξινόμηση φαίνεται αναλυτικά παρακάτω:

#### **ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ ΟΛΛ ΚΑΤΑ ΤΟΝ ΠΟΥ (WHO)**

##### **B-λεμφοβλαστική λευχαιμία/λέμφωμα**

B-λεμφοβλαστική λευχαιμία/λέμφωμα μη προσδιοριζόμενη (NOS)

B-λεμφοβλαστική λευχαιμία/λέμφωμα, με επαναλαμβανόμενες γενετικές ανωμαλίες

B-λεμφοβλαστική λευχαιμία/λέμφωμα με t(9;22)(q34q11.2);*BCR-ABL1*

B-λεμφοβλαστική λευχαιμία/λέμφωμα με t(v;11q23);*KMT2A rearranged*

B-λεμφοβλαστική λευχαιμία/λέμφωμα με t(12;21)(p13q22) *TEL-AML1 (ETV6-RUNX1)*

B-λεμφοβλαστική λευχαιμία/λέμφωμα με υπερδιπλοειδία

B-λεμφοβλαστική λευχαιμία/λέμφωμα με υποδιπλοειδισμό

B-λεμφοβλαστική λευχαιμία/λέμφωμα με t(5;14)(q31;q32) *IL3-IGH*

B-λεμφοβλαστική λευχαιμία/λέμφωμα t(1;19)(q23;p13.3); *TCF3-PBX1*

B-λεμφοβλαστική λευχαιμία/λέμφωμα BCR/ABL 1 like (προσωρινή)

B-λεμφοβλαστική λευχαιμία/λέμφωμα με iAMP21 (προσωρινή)

##### **T-λεμφοβλαστική λευχαιμία/λέμφωμα**

##### **Οξεία Λευχαιμία Διφορούμενης κυτταρικής σειράς**

Οξεία αδιαφοροποίητη λευχαιμία

Μικτού φαινοτύπου οξεία λευχαιμία με t(9;22)(q34q11.2);*BCR-ABL1*

Μικτού φαινοτύπου οξεία λευχαιμία με t(v;11q23);*MLL*

Μικτού φαινοτύπου οξεία λευχαιμία, B-μυελοειδής, NOS (Not otherwise specified)

Μικτού φαινοτύπου οξεία λευχαιμία, T-μυελοειδής, NOS (Not otherwise specified)

Σύμφωνα με μια ακόμη πιο πρόσφατη μελέτη (Coustan-Smith et al., 2009) προσδιορίζεται ένας επιπλέον υπότυπος της T-ΟΛΛ βάσει συνδυασμού κυτταρομετρίας

ροής, προφίλ γονιδιακής έκφρασης και ανάλυσης μονονουκλεοτιδικών πολυμορφισμών (SNP). Ο υπότυπος αυτός που ονομάζεται πρώιμη προ-T ΟΛΛ (Early T-cell precursor ALL-ETP-ALL) εμφανίζει συγκεκριμένα ανοσοφαινοτυπικά χαρακτηριστικά δηλαδή ασθενή έκφραση του CD5, απουσία έκφρασης CD1a και CD8 και έκφραση δεικτών αρχέγονων και μυελικών κυττάρων και σχετίζεται με εξαιρετικά κακή απόκριση στην θεραπεία. Το γεγονός ότι διαγιγνώσκεται εύκολα με την κυτταρομετρία ροής τον καθιστά εύκολα χρησιμοποιούμενο στην κλινική πρακτική.<sup>25,32</sup>

### 1.3.1.5 Προγνωστικοί παράγοντες

Ο προσδιορισμός των προγνωστικών παραγόντων επιτρέπει την επιλογή της κατάλληλης θεραπείας (risk adjusted therapy) για κάθε ασθενή ανάλογα με την πιθανότητα μακροπρόθεσμης ύφεσης. Διακρίνονται σε τρεις κατηγορίες: τους κλινικούς προγνωστικούς παράγοντες (τα χαρακτηριστικά των ασθενών), τα χαρακτηριστικά των λευχαιμικών κυττάρων και την απόκριση στη θεραπεία. Στους κλινικούς προγνωστικούς παράγοντες περιλαμβάνονται η ηλικία και το φύλο των ασθενών. Είναι γνωστό ότι τα βρέφη, οι έφηβοι και τα αγόρια έχουν χειρότερη πρόγνωση. Στα χαρακτηριστικά των λευχαιμικών κυττάρων περιλαμβάνονται ο αριθμός των λευκών αιμοσφαιρίων στη διάγνωση (WBC count), η συμμετοχή του ΚΝΣ (CNS involvement), ο ανοσοφαινότυπος, η κυτταρογενετική και οι χρωμοσωμικές μεταθέσεις. Ως προς τις γονιδιακές διαταραχές έχει βρεθεί ότι η παρουσία του *MLL-AFF1* ή του *BCR-ABL1* γονιδίου σχετίζεται με δυσμενή πρόγνωση ενώ του *ETV6-RUNX1* χιμαιρικού γονιδίου με καλύτερη. Επίσης με καλύτερη πρόγνωση σχετίζεται και ο υπερδιπλοειδισμός, ιδιαίτερα οι τρισωμίες 4, 10, 17. Η απόκριση στη θεραπεία ελέγχεται με τον προσδιορισμό του αριθμού βλαστών στο περιφερικό αίμα την 8<sup>η</sup> ημέρα, (απόλυτος αριθμός βλαστών –AAB), τον προσδιορισμό του αριθμού των βλαστών στο μυελό των οστών την 15<sup>η</sup> και 33<sup>η</sup> ημέρα θεραπείας (Bone marrow response –BM) καθώς και τον προσδιορισμό της ελάχιστης υπολειπόμενης νόσου (Minimal Residual Disease-MRD) την 15<sup>η</sup>, 33<sup>η</sup> και 78<sup>η</sup> ημέρα θεραπείας. Η ελάχιστη υπολειπόμενη νόσος ελέγχεται είτε μέσω της κυτταρομετρίας ροής με ανεύρεση λευχαιμικών ανοσοφαινοτύπων ή μέσω μοριακών μεθόδων τους πρώτους μήνες της θεραπείας. Οι στόχοι της ανίχνευσης της MRD με την Real-Time PCR (Real – Time Polymerase Chain Reaction) είναι περιοχές αναδιάταξης γονιδίων

ανοσοσφαιρινών και υποδοχέων των T-κυττάρων, συνδυασμένων μεταγραφών, γονιδιακών μεταλλάξεων και υπερεκφραζόμενων mRNA.

Σύμφωνα με τα παραπάνω, στα περισσότερα θεραπευτικά πρωτόκολλα η νόσος κατατάσσεται σε χαμηλού (standard), ενδιάμεσου και υψηλού κινδύνου ΟΛΛ (risk group stratification). Το ανώτερο όριο ηλικίας προκειμένου να χαρακτηριστεί ένα παιδί χαμηλού κινδύνου για ορισμένα Αμερικανικά πρωτόκολλα (π.χ. NCI-National Cancer Institute) είναι τα 9 χρόνια, ενώ για ευρωπαϊκά πρωτόκολλα (π.χ. BFM-Berlin, Frankfurt, Münster) είναι τα 6 χρόνια. Τα βρέφη αντιμετωπίζονται με το Διεθνές πρωτόκολλο Internfant. Αντίστοιχα ο ανώτερος αριθμός λευκών αιμοσφαιρίων είναι  $50 \times 10^9/\text{lt}$  (NCI) και  $20 \times 10^9/\text{lt}$  (BFM). Η Αμερικανική Ομάδα COG (Children's Oncology Group) που προέκυψε από την συγχώνευση των ομάδων CCG (Children's Cancer Group) και POG (Pediatric Oncology Group) κατατάσσει την ΟΛΛ σε 4 ομάδες με βάση την ηλικία, τον αριθμό των λευκών αιμοσφαιρίων, την κυτταρογενετική, την απάντηση στον μυελό την ημέρα 24 και την υπολειπόμενη νόσο μετά τη θεραπεία εφόδου: χαμηλότερου κινδύνου (27% των παιδιών), χαμηλού κινδύνου (32%), υψηλού κινδύνου (37%), πολύ υψηλού κινδύνου (4%).<sup>25,32,34</sup>

Ο Πίνακας 1 περιλαμβάνει όλους τους προγνωστικούς παράγοντες που χρησιμοποιούνται για την κατάταξη νεοδιαγνωσμένων ασθενών αδρά σε υψηλού, μέσαιου ή χαμηλού κινδύνου για υποτροπή.<sup>29</sup>

### **1.3.1.6 Θεραπεία της ΟΛΛ**

Η θεραπεία που ακολουθείται διακρίνεται σε τρεις φάσεις: τη φάση εφόδου που στόχο έχει την εξάλειψη των λευχαιμικών κυττάρων από το μυελό των οστών και διαρκεί περίπου τέσσερις εβδομάδες, την φάση σταθεροποίησης ή θεραπεία του ΚΝΣ κατά την οποία επιχειρείται καταστροφή των λευχαιμικών κυττάρων που βρίσκονται στις μήνιγγες και αποτροπή απώτερης υποτροπής του ΚΝΣ και τη φάση συντήρησης που διαρκεί δύο με τρία χρόνια περίπου, ανάλογα με το πρωτόκολλο που χρησιμοποιείται. Κατά την πρώτη φάση τα φάρμακα που χρησιμοποιούνται είναι κορτικοστεροειδή (πρεδνιζόνη ή δεξαμεθαζόνη) per os, βινκριστίνη ενδοφλέβια, δαουνορουβικίνη και L-ασπαραγινάση μαζί με ενδορραχιαία μεθοτρεξάτη. Ύφεση επιτυγχάνεται στο 95% των

ασθενών (<5% βλάστες στο μυελό των οστών και αριθμός ουδετεροφίλων και αιμοπεταλίων στις φυσιολογικές τιμές μετά από 4-5 εβδομάδες θεραπείας). Στη δεύτερη φάση δίνονται επανειλημμένες δόσεις ενδορραχιαίας χημειοθεραπείας μαζί με

<b>Παράμετροι</b>	<b>Καλή πρόγνωση</b>	<b>Κακή πρόγνωση</b>
<b>Ηλικία</b>	1-9 ετών	<1 έτους ή >10 ετών
<b>WBC</b>	<50.000/μl	≥50.000/μl
<b>Φύλο</b>	Κορίτσια	Αγόρια
<b>ΚΝΣ</b>	μη συμμετοχή	Συμμετοχή
<b>Γενετική</b>	α. t(12;21) <i>TEL-AML1</i>	α.Υποδιπλοειδισμός(<44)
	β.Υπερδιπλοειδισμός (τρισωμία 4/10)	β. t(9;22) <i>BCR/ABL</i>
		γ. t(4;11) <i>MLL/AF4</i>
<b>Απάντηση στη θεραπεία</b>	α. <1000 βλάστες/ μl την 8 <sup>η</sup> ημέρα θεραπείας	α. >1000 βλάστες/ μl την 8 <sup>η</sup> ημέρα θεραπείας
	β. <5% βλάστες στον Μ.Ο 15 <sup>η</sup> και 33 <sup>η</sup> μέρα	β. 5%-25%/≥25% βλάστες Μ.Ο 15 <sup>η</sup> και 33 <sup>η</sup> μέρα
	γ. <0.1% MRD Μ.Ο 15 <sup>η</sup> , 33 <sup>η</sup> και 78 <sup>η</sup> ημέρα	γ. ≥0.1% MRD Μ.Ο 15 <sup>η</sup> , 33 <sup>η</sup> και 78 <sup>η</sup> ημέρα

**Πίνακας 1:** Προγνωστικοί παράγοντες ασθενών με Οξεία Λεμφοβλαστική λευχαιμία.

συστηματική χημειοθεραπεία μειώνοντας την πιθανότητα απώτερης υποτροπής στο ΚΝΣ σε λιγότερο από 5%. Τέλος η φάση συντήρησης περιλαμβάνει την καθημερινή χορήγηση μερκαπτοπουρίνης per os και την εβδομαδιαία χορήγηση μεθοτρεξάτης. Σε πολλά πρωτόκολλα συνεχίζεται η ενδορραχιαία χημειοθεραπεία για το ΚΝΣ. Επίσης προστίθενται συχνά σε αυτήν τη φάση δόσεις βινκριστίνης και κορτικοστεροειδών

ωστόσο η ωφέλεια τους διχάζει. Απαιτείται στενή παρακολούθηση των ασθενών με στόχο την πρόληψη αυξημένων ποσοστών κυτταροτοξικότητας και την έγκαιρη αντιμετώπιση των πιθανών επιπλοκών. Η διάρκεια της θεραπείας συνολικά κυμαίνεται μεταξύ 2,2 ετών για τα κορίτσια και 3,2 ετών για τα αγόρια. Υποτροπή παρατηρείται σε ποσοστό 15-20% των ασθενών και έχει τις σοβαρότερες επιπτώσεις κυρίως αν συμβεί κατά τη διάρκεια της θεραπείας ή αμέσως μετά την αποπεράτωσή της. Συχνότερες θέσεις υποτροπής εκτός από τον μυελό των οστών είναι το ΚΝΣ και οι όρχεις εξαιτίας της αδυναμίας διείσδυσης των χρησιμοποιούμενων χημειοθεραπευτικών φαρμάκων σε αυτές τις θέσεις.<sup>21,22,34</sup>

Η μεταμόσχευση μυελού των οστών ή μεταμόσχευση αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων (Hematopoietic Stem Cell Transplantation, HSCT) χρησιμοποιείται ως θεραπευτική μέθοδος στις περιπτώσεις όπου η χημειοθεραπεία δεν είναι αποτελεσματική. Οι HSCTs διακρίνονται σε αλλογενείς και αυτόλογες. Στις πρώτες ο δότης πρέπει να είναι γενετικώς HLA συμβατός (όπως κατά κανόνα είναι τα αδέρφια) ή ιστοσυμβατός δότης μη συγγενής με τον ασθενή (εύρεση του από Διεθνείς Τράπεζες Δοτών Μυελού των Οστών) ή να έχει ένα ή δύο αντιγόνα ιστοσυμβατότητας μη συμβατά (οπότε πρέπει να γίνει απομάκρυνση των T-κυττάρων του δότη, T-cell depletion). Τα αρχέγονα αιμοποιητικά κύτταρα λαμβάνονται από το μυελό των οστών, το περιφερικό αίμα ή τον ομφάλιο λώρο. Αν βρεθεί συμβατός δότης η αλλογενής μεταμόσχευση παρέχει την καλύτερη οδό προς μακρόχρονη ίαση. Ο μυελός του δότη μετά από κατάλληλη επεξεργασία και αφαίρεση των ερυθρών αιμοσφαιρίων και του πλάσματος χορηγείται ενδοφλέβια στον ασθενή που έχει συμπληρώσει τη χημειοθεραπεία του. Σε περίπτωση μη εύρεσης συμβατότητας επιχειρείται αυτόλογη μεταμόσχευση με εκκαθάριση του μυελού με χρήση anti-CD10 (CALLA) αντισωμάτων, οπότε και θανατώνονται όλα τα ΟΛΛ κύτταρα όπως έδειξαν in vitro μελέτες.

Τα περισσότερα παιδιά με ΟΛΛ θεραπεύονται πλέον χωρίς μεταμόσχευση χάρη στην εντατικοποίηση των χημειοθεραπευτικών μεθόδων, την κατηγοριοποίηση των ασθενών σε ομάδες κινδύνου (risk stratification) και την προσπάθεια εξατομίκευσης της θεραπείας. Έτσι, λίγα παιδιά ωφελούνται πια από τη μεταμόσχευση μετά την πρώτη πλήρη ύφεση (complete remission-CR). Ειδική κατηγορία αποτελούν τα βρέφη που σε πολλά πρωτόκολλα πια δεν θεωρούνται υποψήφια για μεταμόσχευση εξαιτίας της

κακής τους πρόγνωσης, γιατί η χρήση ακτινοβολίας που εγγυάται την αποτελεσματικότητα της μεταμόσχευσης εγείρει αμφιβολίες για τις μακροπρόθεσμες βλαπτικές συνέπειες σε τόσο μικρή ηλικία. Επιπλέον, το ποσοστό επιβίωσης βρεφών με διαταραχή στο γονίδιο *MLL* και ηλικία μικρότερη των 90 ημερών δεν φαίνεται να βελτιώνεται μετά τη μεταμόσχευση. Ακόμη και στα παιδιά που εμφανίζουν το χρωμόσωμα της Φιλαδέλφειας κι έχουν κακή πρόγνωση, η μεταμόσχευση μετά την πρώτη ύφεση που συνηθιζόταν σε παλιότερα πρωτόκολλα, τίθεται υπό συζήτηση μετά την εφαρμογή νέων θεραπευτικών μεθόδων όπως η χρήση αναστολέων τυροσινικής κινάσης (imatinib) που φαίνεται να βελτιώνουν την επιβίωση. Υποψήφιοι ασθενείς για μεταμόσχευση είναι αυτοί με Β-ΟΛΛ και υποτροπή πριν τους 36 μήνες και με Τ-ΟΛΛ και υποτροπή οποιαδήποτε χρονική στιγμή. Η καλύτερη αντιμετώπιση παιδιών με υποτροπή μετά τους 36 μήνες δεν είναι ξεκάθαρη καθώς ένα ποσοστό μπορεί να θεραπευτεί με χορήγηση χημειοθεραπείας ιδιαίτερα εάν η υποτροπή είναι καθυστερημένη.<sup>21,22,35,36</sup>

Κατά τις τελευταίες δύο δεκαετίες το ποσοστό επιβίωσης μετά από υποτροπή παραμένει επίμονα χαμηλό και δεν σχετίζεται με την περίοδο της αρχικής θεραπείας, το είδος των φαρμάκων πρώτης γραμμής και τη θεραπεία που εφαρμόστηκε. Περαιτέρω εντατικοποίηση της θεραπείας όχι μόνο παραμένει περιορισμένη εξαιτίας της τοξικότητας της, αλλά και η χρήση της δεν έχει επιφέρει σημαντικά αποτελέσματα. Έτσι γίνεται ολοένα και πιο επιτακτική η ανάγκη για ανεύρεση νέων θεραπευτικών παραγόντων ή στρατηγικών για τους ασθενείς που αποτυγχάνουν στα τρέχοντα θεραπευτικά πρωτόκολλα. Μια νέα θεραπευτική προσέγγιση που κερδίζει έδαφος είναι η στοχευμένη θεραπεία έναντι μεμονωμένων μορίων που συμμετέχουν στη διαδικασία της λευχαιμογένεσης. Παραδείγματα χημειοθεραπευτικών παραγόντων αποτελούν η ιματινίμη (imatinib), ένας αναστολέας τυροσινικής κινάσης που όπως προαναφέρθηκε χρησιμοποιείται στις περιπτώσεις *BCR-ABL1* θετικής ΟΛΛ και η ντασατινίμη (dasatinib) και νιλοτινίμη (nilotinib) που αναπτύχθηκαν για να χρησιμοποιηθούν σε περιπτώσεις ανθεκτικότητας στην ιματινίμη. Άλλοι νέοι παράγοντες είναι οι αναστολείς FLT3 (FMS-like tyrosine kinase receptor-3) που αποδεικνύονται αποτελεσματικοί στη βρεφική ΟΛΛ και στον υπερδιπλοειδισμό, τα μονοκλωνικά αντισώματα: rituximab (anti-CD20), aletuzumab (anti-CD52), inotuzumab (anti-CD22), και epratuzumab (anti-CD22), οι

ανασυνδυασμένες ανοσοτοξίνες και οι αναστολείς γαμμα-σεκρετάσης έναντι NOTCH στην T-ΟΛΛ. Μερικά από τα παραπάνω έχουν ήδη ενσωματωθεί στα εφαρμοζόμενα θεραπευτικά σχήματα ενώ άλλα παραμένουν ακόμα σε πρώιμα στάδια εξέλιξης.<sup>29,32,37</sup>

## **1.4 ΑΠΟΠΤΩΣΗ**

### **1.4.1 Γενικά**

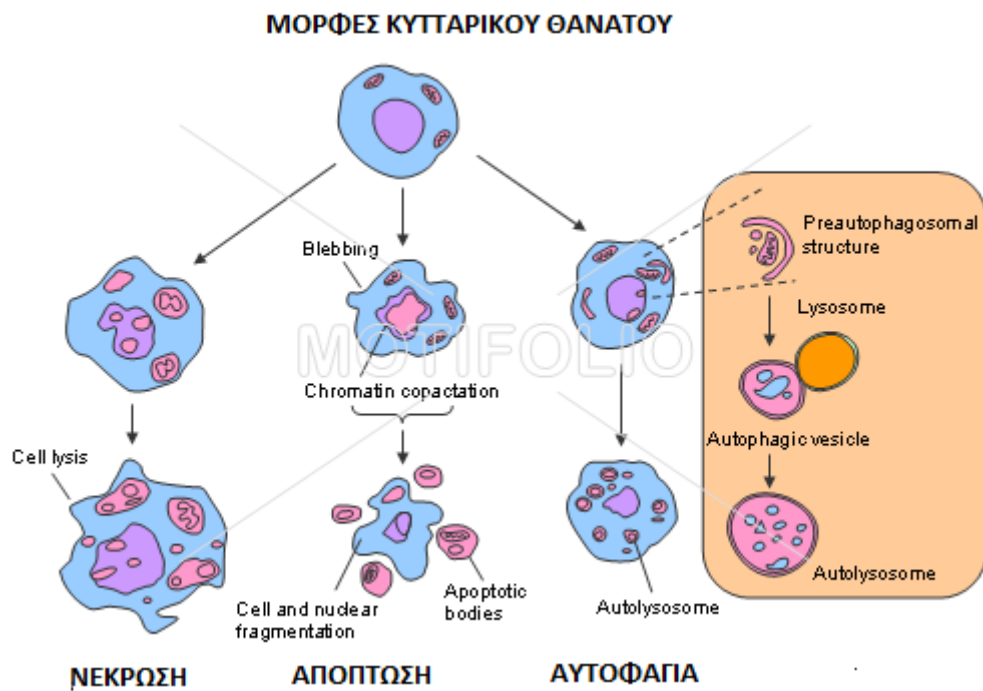
Η απόπτωση είναι μια μορφή κυτταρικού θανάτου που αφορά στην ενεργοποίηση ενός προϋπάρχοντος προγράμματος θανάτου κωδικοποιημένου στο γενετικό υλικό των κυττάρων. Πρώτη φορά περιγράφηκε από τον Kerr το 1971, ο οποίος από παρατηρήσεις στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο διαπίστωσε ότι οι πυρηνικές μάζες ήταν σωματίδια περιβαλλόμενα από μεμβράνη, που περιείχαν τμήματα συμπυκνωμένης χρωματίνης και κυτταροπλασματικά οργανίδια για αυτό και αρχικά αποκάλεσε το φαινόμενο «νέκρωση εκ συρρικνώσεως». Αργότερα, οι Kerr και Searle, εμπνεόμενοι από την Ιλιάδα ονόμασαν το φαινόμενο απόπτωση καθώς θύμιζε τα «φύλλα που ο άνεμος χαμάδις χέει». Οι περισσότερες γνώσεις για τον αποπτωτικό μηχανισμό προέρχονται από τη μελέτη του νηματοειδούς σκώληκα *Caenorhabditis elegans*, ενώ η μεγαλύτερη πρόοδος έχει συντελεστεί με την ταυτοποίηση των «γονιδίων θανάτου».

Ο τύπος αυτός κυτταρικού θανάτου απαντάται σε όλους τους πολυκύτταρους οργανισμούς και παίζει σημαντικό ρόλο σε φυσιολογικές διαδικασίες όπως η εμβρυϊκή ανάπτυξη και η μορφογένεση μέσω εξάλειψης των υπεράριθμων κυττάρων. Συμμετέχει επίσης στη διατήρηση της ομοιόστασης των ιστών μέσω της κυτταρικής διαίρεσης, ενώ εξαλείφει τα κατεστραμμένα κύτταρα λόγω γήρανσης, μόλυνσης από ιούς ή παράγοντες βλαβερούς για το DNA καθώς και αυτοαντιδρώντα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος. Οποιαδήποτε διαταραχή του μηχανισμού της απόπτωσης μπορεί να οδηγήσει σε πολλές παθολογικές καταστάσεις όπως το Σύνδρομο Επίκτητης Ανοσοανεπάρκειας (AIDS), οι νευροεκφυλιστικές παθήσεις, τα αυτοάνοσα νοσήματα και ο καρκίνος.

Οι βιοχημικές και μορφολογικές αλλαγές που χαρακτηρίζουν την απόπτωση περιλαμβάνουν την απώλεια σιαλικού οξέος, τη μεταφορά της φωσφατιδυλοσερίνης στην εξωτερική πλασματική μεμβράνη, την ταχεία δημιουργία μαλακής προσεκβολής της πλασματικής μεμβράνης (blebbing) χωρίς απώλεια της ακεραιότητάς της, τη διάλυση του πυρηνίσκου και του κυτταροσκελετού, την εκτεταμένη καταστροφή της



χρωματίνης, την κατάτμηση του DNA σε ολιγονουκλεοσωμάτια, τη συμπύκνωση του πυρήνα, την απώλεια της μιτοχονδριακής λειτουργίας και τη συρρίκνωση του κυττάρου. Στο τελικό στάδιο παρατηρείται η δημιουργία αποπτωτικών σωματιδίων τα οποία φαγοκυτταρώνονται από γειτονικά κύτταρα κι έτσι δεν προκαλείται φλεγμονώδης αντίδραση. Αυτός ο τύπος κυτταρικού θανάτου διαφέρει από άλλους τύπους κυτταρικού θανάτου όπως η νέκρωση και η αυτοφαγία. Η νέκρωση προκαλείται από απότομες κυτταρικές βλάβες όπως η ισχαιμία, η υπερθερμία, η υποθερμία, η υποξία, ο φυσικός ή χημικός τραυματισμός που οδηγούν σε ρήξη της κυτταρικής μεμβράνης, οίδημα του κυτταροπλάσματος και των μιτοχονδρίων, διαρροή κυτταροπλασματικού περιεχομένου και πλήρη λύση του κυττάρου τα οποία οδηγούν σε οξεία φλεγμονώδη αντίδραση. Σε αντίθεση με την απόπτωση, η νέκρωση δεν απαιτεί ενέργεια. Η αυτοφαγία χαρακτηρίζεται από τη δημιουργία αυτοφαγοσωμάτων που έχουν διπλή κυτταρική μεμβράνη και περιβάλλουν εκφυλισμένα κυτταρικά οργάνδια ή κυτταρόπλασμα. Σε αντίθεση με την απόπτωση χαρακτηρίζεται από έλλειψη συμπύκνωσης της χρωματίνης και εκτενή σχηματισμό κυστιδίων στο κυτταρόπλασμα. Μια άλλη διαφορά είναι ότι στη διαδικασία δεν συμμετέχουν φαγοσώματα. Πρόσφατα έχουν περιγραφεί και άλλοι τύποι κυτταρικού θανάτου, όπως η νεκρόπτωση και η πυρόπτωση που επίσης παρουσιάζουν μορφολογικές και βιοχημικές διαφορές με την απόπτωση. Η μορφή του κυτταρικού θανάτου εξαρτάται από την ένταση και τη διάρκεια των τραυματικών ερεθισμάτων καθώς και τα ενεργειακά αποθέματα του κυττάρου.<sup>38,39,40</sup>



**Εικόνα 7:** Μορφολογικά χαρακτηριστικά τύπων κυτταρικού θανάτου. (Ανατύπωση από <http://www.motifolio.com/5111406.html>)

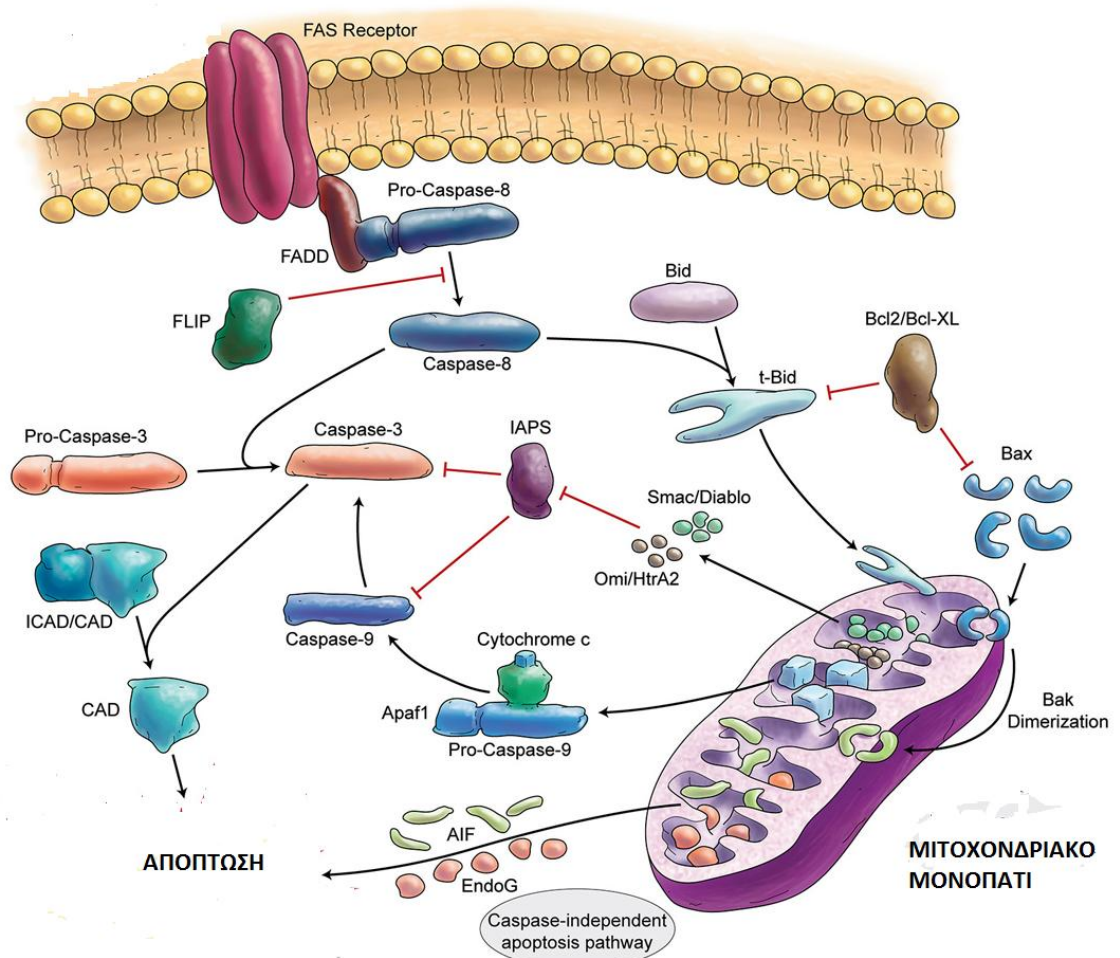
### 1.4.2 Μηχανισμός της απόπτωσης

Στο μηχανισμό της απόπτωσης κυρίαρχο ρόλο διαδραματίζει μια οικογένεια πρωτεϊνών που ονομάζονται κασπάσες. Πρόκειται για πρωτεάσες κυστεΐνης που διασπούν τα υποστρώματά τους σε περιοχές με καρβοξυτελικά κατάλοιπα ασπαρτικού (Caspases, cysteine aspartyl-specific proteases). Το πρώτο μέλος της οικογένειας των κασπασών που ταυτοποιήθηκε είναι η πρωτεΐνη ICE (Interleukin-1 converting enzyme) ή κασπάση-1. Μέχρι σήμερα έχουν ταυτοποιηθεί 14 κασπάσες θηλαστικών με διαφορετικούς ρόλους στη φλεγμονή και στην απόπτωση. Στην απόπτωση λειτουργούν ως εναρκτές (initiators) ή ως τελεστές (effectors) της διαδικασίας καταστροφής του κυττάρου ως απάντηση σε προαποπτωτικά σήματα. Ένα προαποπτωτικό σήμα δηλαδή οδηγεί σε ενεργοποίηση μιας κασπάσης-εναρκτή που με τη σειρά της ενεργοποιεί κασπάσες-τελεστές ώστε να προκληθεί τελικά καταστροφή του κυττάρου. Όπως και άλλες πρωτεάσες οι κασπάσες συντίθενται ως ανενεργά προένζυμα και διαθέτουν τρεις περιοχές: ένα αμινοτελικό άκρο, μια μεγάλη (MB≈20 kDA) και μια μικρή υπομονάδα (MB≈10 kDA). Η ενεργοποίησή τους ρυθμίζεται κυρίως από τις πρωτεΐνες της BCL2 οικογένειας.

Υπάρχουν δύο διακριτά κυτταρικά μονοπάτια που οδηγούν σε απόπτωση το μιτοχονδριακό και το σχετιζόμενο με υποδοχείς θανάτου. Το μιτοχονδριακό μονοπάτι ενεργοποιείται από ερεθίσματα που περιλαμβάνουν οξειδωτικό στρες, ακτινοβολία, ανεπάρκεια αυξητικών παραγόντων και κυτταροτοξικά φάρμακα. Το αποπτωτικό σήμα οδηγεί στην απελευθέρωση του κυτοχρώματος c από το μιτοχόνδριο. Στο κυτταρόπλασμα αυτό συνδέεται με το APAF-1 (Apoptotic Protease Activating Factor) έναν παράγοντα προσαρμοστή και την ανενεργή προκασπάση-9, δημιουργώντας έτσι ένα πολυπρωτεϊνικό σύμπλοκο που ονομάζεται αποπτόσωμα. Το αποπτόσωμα με τη σειρά του προκαλεί την ενεργοποίηση της κασπάσης 9 η οποία πυροδοτεί έναν καταρράκτη ενεργοποίησης κασπασών (κασπάσες 3,7) που οδηγούν τελικά στις μορφολογικές και βιοχημικές αλλαγές που σχετίζονται με την απόπτωση. Έχουν προταθεί δύο μηχανισμοί απελευθέρωσης του κυτοχρώματος c από το μιτοχόνδριο: α) η διαταραχή της ωσμωτικής ισορροπίας που οδηγεί σε οίδημα του μιτοχονδρίου και επακολούθως ρήξη της εξωτερικής μεμβράνης και β) η διάνοιξη διαύλων στην εξωτερική μεμβράνη χωρίς οίδημα του οργανιδίου. Είναι επίσης γνωστό ότι η διαδικασία ρυθμίζεται από τα μέλη της BCL2 οικογένειας πρωτεϊνών. Το δεύτερο μονοπάτι λειτουργεί ανεξάρτητα από τα μιτοχόνδρια. Συγκεκριμένα, εξωκυττάρια μόρια σύνδεσης ενεργοποιούν υποδοχείς κυτταρικού που βρίσκονται στην επιφάνεια των κυττάρων. Παραδείγματα υποδοχέων θανάτου είναι οι CD95 (Apo-1 ή Fas), TNF (Tumor necrosis factor), οι οποίοι περιλαμβάνουν μια κυτοσολική περιοχή θανάτου (death domain DD). Με την ενεργοποίησή τους προκαλούν τη σύνδεση των κασπασών 8 και 10 στο σύμπλοκο DISC (death inducing signaling complex) και τελικά την άμεση ενεργοποίηση κασπασών-εκτελεστών. Το σύμπλοκο DISC απαρτίζεται από τα μόρια κασπάση-8 FasL, Fas και FADD. Ένα παράδειγμα λειτουργίας του μονοπατιού αυτού είναι η ενεργοποίηση των T κυττάρων μέσω της σύνδεσης του FasL (Fas ligand) στον υποδοχέα Fas. Ο υποδοχέας ο οποίος και τριμερίζεται και στην περιοχή του DD συνδέονται μόρια πρωτεϊνών FADD (Fas-associated death domain protein), τα οποία με τη σειρά τους συνδέουν μέσω του τμήματος DED (death-effector domain) που περιλαμβάνουν την προκασπάση-8. Ένα τρίτο έλασσον μονοπάτι που οδηγεί σε απόπτωση περιλαμβάνει την ενεργοποίηση κασπασών από μία πρωτεάση της σερίνης (Granzyme B) που εισέρχεται στα κύτταρα μέσω της περφορίνης ή μέσω σύνδεσης στον υποδοχέα Fas. Η πρωτεάση αυτή συντίθεται στα κυτταροτοξικά T κύτταρα και τα

κύτταρα φυσικούς φονείς (NK) και η κύρια φυσιολογική της λειτουργία είναι η εξάλειψη μολυσμένων κυττάρων. Ο τρόπος δράσης της έγκειται στην διάσπαση κασπασών (2,3,6,7,8,9 και 10) καθώς και στη διάσπαση της προαποπτωτικής πρωτεΐνης BID. Ωστόσο η υπερέκφραση της αντιαποπτωτικής BCL2 αναστέλλει εξολοκλήρου τη δράση της.<sup>38,39,41,42,43,44</sup>

Η ρύθμιση της απόπτωσης πραγματοποιείται μέσω της δράσης των μελών τριών πρωτεϊνικών οικογενειών της BCL2, όπως προαναφέρθηκε, και της οικογένειας IAP (Inhibitor of Apoptosis Family of Proteins). Έως τώρα έχουν ταυτοποιηθεί επτά μέλη της οικογένειας IAP: XIAP (X-linked inhibitor of apoptosis protein), c-IAP1, c-IAP2, NAIP, survivin, livin και Ts-IAP. Όλα περιέχουν μία ή περισσότερες επαναληπτικές δομές BIR που αποτελούνται από 70-80 αμινοξέα και είναι απαραίτητες για την αντιαποπτωτική τους δράση.



**Εικόνα 8:** Τα δύο μονοπάτια του μηχανισμού της απόπτωσης. (Marzban et al. Cellular Commitment in the developing cerebellum, Front. Cell. Neurosci. 2015)

Σε αντίθεση με τα μέλη της οικογένειας BCL2 που ρυθμίζουν τη διαδικασία της απόπτωσης μέσω των μιτοχονδρίων, οι πρωτεΐνες IAP συνδέονται απευθείας στις κασπάσες 3,7 και 9 και τις αναστέλλουν. Ως αρνητικοί ρυθμιστές των πρωτεϊνών IAP έχουν ταυτοποιηθεί τρεις πρωτεΐνες: οι XIAP-associated factor-1 (XAF-1), Smac/DIABLO και Omi/HtrA2. Η XAF-1 εντοπίζεται στον πυρήνα και αλληλεπιδρά με την XIAP, ενώ οι Smac/DIABLO και Omi/HtrA2 εντοπίζονται στο μιτοχόνδριο και όπως το κυτόχρωμα c απελευθερώνονται ως απάντηση σε αποπτωτικό ερέθισμα. Έχει βρεθεί ότι η Smac/DIABLO συνδέεται με όλες τις πρωτεΐνες IAP ενώ η Omi/HtrA2 με τις XIAP, c-IAP1 και c-IAP2. Η υπερέκφραση λοιπόν μίας ή περισσότερων πρωτεϊνών IAP ή καταστολή των αρνητικών τους ρυθμιστών οδηγούν σε αναστολή της απόπτωσης.<sup>44</sup>

## **1.5 ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑ BCL2**

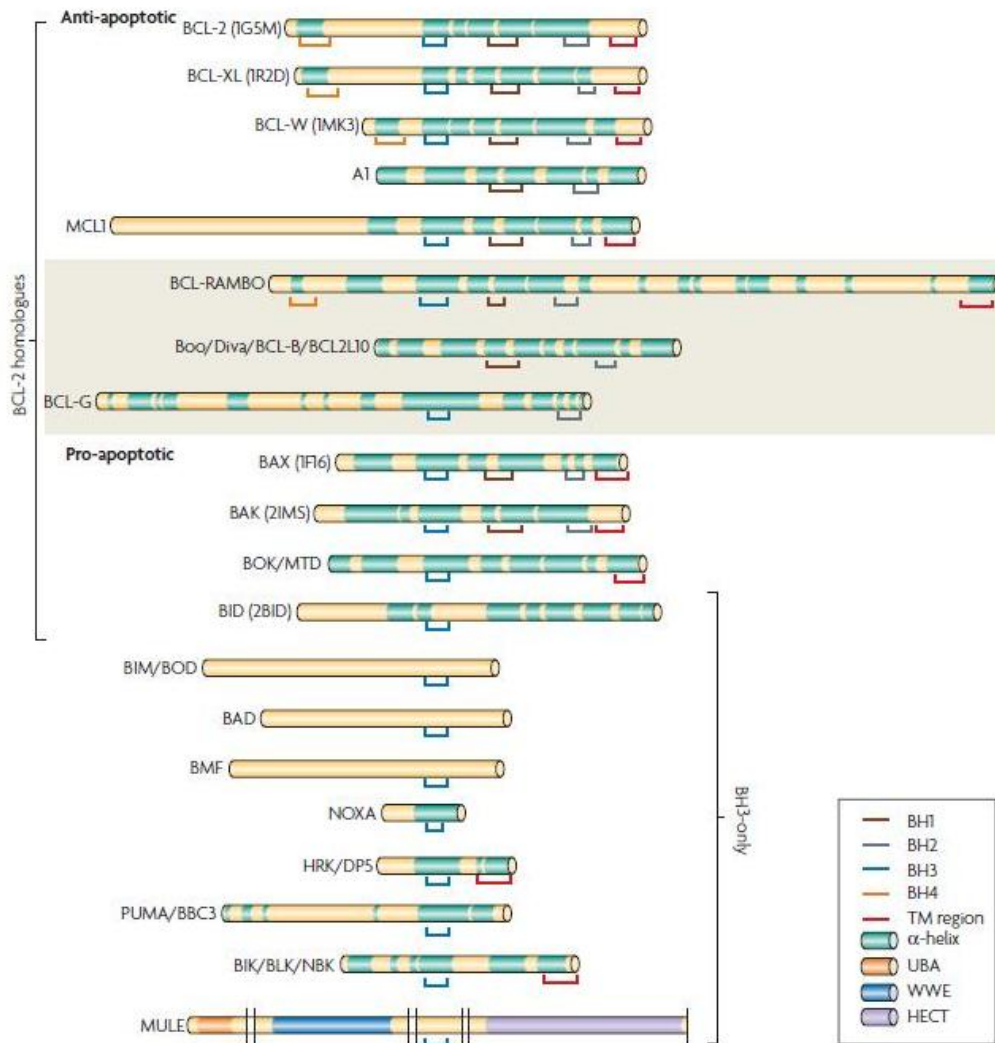
### **1.5.1 Γενικά**

Τα μέλη της οικογένειας των BCL2 πρωτεϊνών (B-cell CLL/lymphoma 2) διαδραματίζουν κεντρικό ρόλο στη διαδικασία της απόπτωσης μέσω προαγωγής ή αναστολής της. Η οικογένεια περιλαμβάνει περίπου 30 μέλη με κοινό δομικό χαρακτηριστικό την παρουσία των εξελικτικά συντηρημένων περιοχών BH μήκους περίπου 20 αμινοξέων. Βάσει των δομικών και λειτουργικών τους χαρακτηριστικών διακρίνονται στα αντιαποπτωτικά, στα προαποπτωτικά και στα BH3-only μέλη. Μια επιπλέον κατηγορία συνιστούν τα πρόσφατα ταυτοποιημένα μέλη που εμφανίζουν είτε προαποπτωτική είτε αντιαποπτωτική δράση.

Ως προς τη δομή τους τα μέλη της οικογένειας περιέχουν από μία έως τέσσερις BH περιοχές (BCL2-homology region- BH1, BH2, BH3, BH4) οι οποίες διαθέτουν δομή α-έλικας καθώς και μια υδρόφοβη καρβοξυτελική διαμεμβρανική περιοχή (TM domain) η οποία σχετίζεται με τη μεμβρανική τους εντόπιση. Χάρη σε αυτή τη δομή οι BCL2 πρωτεΐνες έχουν την ικανότητα σχηματισμού ετεροδιμερών, μέσω head-to-tail διαμορφώσεων, μεταξύ των ανταγωνιστικών μελών διαφορετικών ομάδων ή ομοδιμερών μεταξύ των μορίων της ίδιας πρωτεΐνης. Όπως φαίνεται από μελέτες

μεταλλαγών σε εκπροσώπους της BH3-only κατηγορίας πρωτεϊνών, η BH3 δομική περιοχή διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη δράση των BH3-only πρωτεϊνών καθώς η απουσία της ή η τροποποίηση συγκεκριμένων αμινοξέων αυτής, οδηγούν σε απώλεια της ενεργότητας των πρωτεϊνών.

Στην πρώτη κατηγορία των αντιαποπτωτικών πρωτεϊνών περιλαμβάνονται οι BCL2, BCL-XL, BCL-W και MCL-1 πρωτεΐνες. Οι πρωτεΐνες αυτές περιέχουν και τις τέσσερις συντηρημένες BH δομικές περιοχές BH1-4 και ένα υδροφοβικό καρβοξυτελικό τμήμα. Οι BH1-BH3 περιοχές σχηματίζουν μια υδροφοβική θηλειά την οποία σταθεροποιεί το αμινοτελικό άκρο της BH4 περιοχής. Το γεγονός ότι η BH4 περιοχή απουσιάζει από τα προαποπτωτικά μέλη υπογραμμίζει τη σημασία της στη αντιαποπτωτική δράση των αντιαποπτωτικών πρωτεϊνών. Η BH4 περιοχή της BCL2 αποτελείται από 26 αμινοξέα και παρουσιάζει αμφιπαθικό χαρακτήρα στη σύνδεση της με τη μεμβράνη. Η BCL2 πρωτεΐνη εντοπίζεται στη μεμβράνη των μιτοχονδρίων ενώ οι BCL-XL και BCL-W συνδέονται με τη μεμβράνη μετά από κυτταροτοξικό σήμα. Στην κατηγορία των προαποπτωτικών μελών περιλαμβάνονται οι BAX, BAK και BOK οι οποίες παρουσιάζουν ομοιότητες ως προς τις BH1-3 δομές όχι όμως και στην BH4.



**Εικόνα 9:** Σχηματική αναπαράσταση της δομής των μελών της BCL2 οικογένειας. (Yoyle et al. *The Bcl2 protein family: opposing activities that mediate cell death. Nature reviews Molecular cell Biology* 2008;9:47-59)

Η πρωτεΐνη BAX εντοπίζεται στο κυτοσόλιο ενώ η BAK στη μεμβράνη των μιτοχονδρίων. Ωστόσο και οι δύο συναντώνται και στο ενδοπλασματικό δίκτυο. Στις BH3-only πρωτεΐνες ανήκουν οι BID, BIM, BIK, BAD, BMF, HRK, DIVA, NOXA και PUMA, που εμφανίζουν δομική ομολογία μόνο ως προς την BH3 περιοχή και ενεργοποιούνται μέσω διαφόρων μηχανισμών όπως η μεταγραφική ρύθμιση, η πρωτεολυτική διάσπαση και η φωσφορυλίωση. Οι BIM και BMF ενεργοποιούνται μέσω φωσφορυλίωσης ενώ η BAD μέσω αποφωσφορυλίωσης. Οι BH3-only πρωτεΐνες δεν εντοπίζονται επί των μεμβρανών αλλά λειτουργούν ως συνδέτες με πρωτεΐνες 'αγκυροβολημένες' σε μεμβράνες. Στις πρόσφατα ταυτοποιημένες πρωτεΐνες τέλος ανήκουν οι BCL2L10 (BOO/DIVA), BCL2L12, BCL2L13 (BCL-RAMBO), BCL2L14 (BCL-G) και MAP-1.<sup>39,42,44</sup>

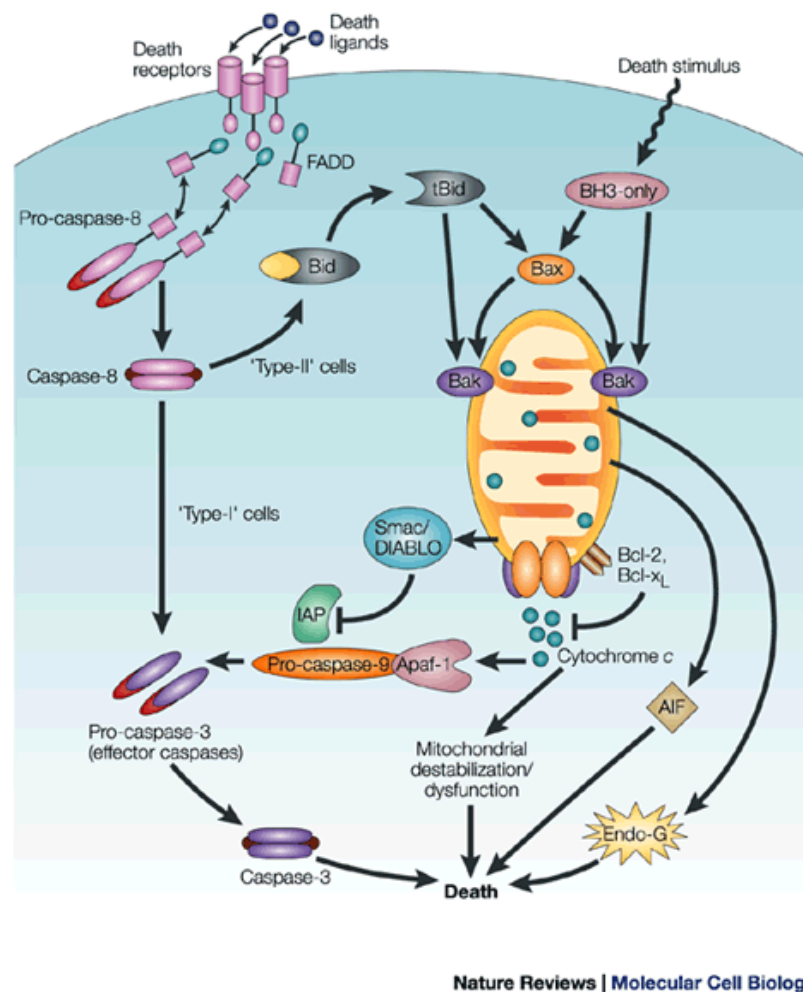
### 1.5.2 Ρόλος των μελών της BCL2 οικογένειας στην απόπτωση

Τα μέλη της BCL2 οικογένειας πρωτεϊνών διαδραματίζουν κυρίαρχο ρόλο στο ενδογενές μονοπάτι της απόπτωσης όπου εμπλέκονται τα μιτοχόνδρια. Τα προαποπτωτικά μέλη της οικογένειας προάγουν την έναρξη της απόπτωσης μέσω του σχηματισμού πόρων στην εξωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων και την απελευθέρωση του κυτοχρώματος c στο κυτταρόπλασμα. Συγκεκριμένα, ύστερα από έκθεση σε διάφορα αποπτωτικά ερεθίσματα ή stress, η πρωτεΐνη BAX μετατοπίζεται στα μιτοχόνδρια από το κυτταρόπλασμα όπου αλληλεπιδρά με μια πρωτεΐνη της εξωτερικής μεμβράνης. Προκαλεί έτσι απελευθέρωση του κυτοχρώματος c και της πρωτεΐνης SMAC/Diablo στο κυτταρόπλασμα ενεργοποιώντας τον καταρράκτη των κασπασών που οδηγεί στον αποπτωτικό κυτταρικό θάνατο. Επιπλέον, σχηματίζει ομο- και ετερο-διμερή με άλλα μέλη της οικογένειας BCL2, ρυθμίζοντας με αυτόν τον τρόπο την ισορροπία μεταξύ προ- και αντι-αποπτωτικού δυναμικού.<sup>47,48,49,50,77</sup> Οι πρωτεΐνες BAX και BAK επιπλέον συμμετέχουν στη διαδικασία της απόπτωσης μέσω της ρύθμισης των επιπέδων ασβεστίου στο ενδοπλασματικό δίκτυο. Η εντόπιση της BCL2 και στο ενδοπλασματικό δίκτυο ενισχύει την άποψη ότι ρυθμίζει αυτή τη δράση των πρωτεϊνών BAX και BAK.

Ο κύριος τρόπος επιτέλεσης της αντιαποπτωτικής δράσης της BCL2 πρωτεΐνης είναι η διατήρηση της ακεραιότητας της μιτοχονδριακής μεμβράνης με τη σύνδεση του υδροφοβικού καρβοξυτελικού της άκρου στην εξωτερική επιφάνεια της μεμβράνης. Η BCL2 επίσης αναστέλλει τον ολιγομερισμό των BAX/BAK που οδηγεί στην απελευθέρωση αποπτωτικών μορίων από το μιτοχόνδριο, συνδέεται με την BAX και άλλες προαποπτωτικές πρωτεΐνες και τις απενεργοποιεί, ρυθμίζει την ενεργοποίηση πολλών κασπασών που λειτουργούν ως εναρκτές της διαδικασίας της απόπτωσης, όπως η κασπάση-2 και αναστέλλει απευθείας την απελευθέρωση του κυτοχρώματος c παρεμποδίζοντας έτσι τη δράση του APAF-1 και της κασπάσης-9. Εκτός από την BCL2, και η BCL-XL αλληλεπιδρά με προαποπτωτικά μέλη όπως οι BAX και BAK μέσω της BH3 περιοχής τους. Είναι πιθανό ότι η αντιαποπτωτική δράση των BCL2 και BCL-XL μετατρέπεται σε προαποπτωτική όταν διασπώνται από κασπάσες μετά την έναρξη της διαδικασίας της απόπτωσης. Ο ρόλος της πρωτεΐνης MCL-1 είναι επίσης σημαντικός στη διαδικασία της απόπτωσης. Οποιαδήποτε διαταραχή στην ισορροπία μεταξύ



πρωτεϊνικής της σύνθεσης και διάσπασης της ήδη υπάρχουσας οδηγεί στην κυτταρική επιβίωση.



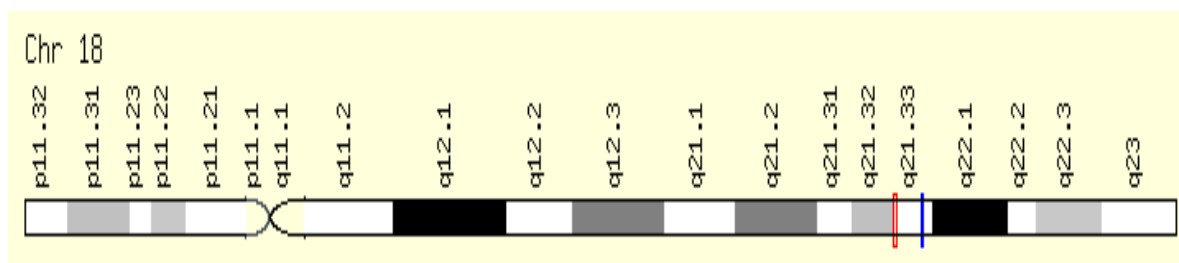
**Εικόνα 10:** Σχηματική αναπαράσταση της μοριακής ρύθμισης του μηχανισμού απόπτωσης. (Tilly et al. *Commuting the death sentence: how oocytes strive to survive. Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2001;2:838-848)

Τα μέλη της BH3-only οικογένειας πρωτεϊνών σύμφωνα με πρόσφατες έρευνες διακρίνονται σε δύο κατηγορίες: τους αγωνιστές θανάτου (death agonists) στους οποίους ανήκουν οι BID και BIM πρωτεΐνες και τους αγωνιστές επιβίωσης (survival agonists) που περιλαμβάνουν τις πρωτεΐνες BIK και BAD. Οι αγωνιστές θανάτου επάγουν την αύξηση της διαπερατότητας της μιτοχονδριακής μεμβράνης μέσω ενίσχυσης της δράσης των BAX και BAK πρωτεϊνών ενώ οι αγωνιστές επιβίωσης αντιτίθενται στη δράση αντιαποπτωτικών πρωτεϊνών όπως η BCL2. Πιο συγκεκριμένα ως προς τη BID πρωτεΐνη είναι γνωστό ότι μετά την πρωτεολυτική της διάσπαση από την κασπάση-8 προσδέεται στις BAX και BAK και προκαλεί την διαμεμβρανοποίηση και

τον ολιγομερισμό τους που έχει ως αποτέλεσμα το σχηματισμό διαύλων στη μιτοχονδριακή μεμβράνη.<sup>42,45</sup>

### 1.5.3 BCL2 γονίδιο και γονιδιακό προϊόν

Το γονίδιο *BCL2* εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 18 (περιοχή: 18q21.3) και είναι ένα πρωτοογκογονίδιο που ταυτοποιήθηκε πρώτη φορά εξαιτίας της συμμετοχής του στη χρωμοσωμική μετάθεση t(14;18) που απαντάται στα Β-λεμφώματα και λιγότερο συχνά στη Χρόνια Λεμφοβλαστική Λευχαιμία. Ρόλος του είναι η προαγωγή της ογκογένεσης μέσω αναστολής του κυτταρικού θανάτου παρά μέσω αύξησης της κυτταρικής διαίρεσης. Έχει παρατηρηθεί ότι η επίδραση του ρόλου του στον κυτταρικό κύκλο είναι ογκοκατασταλτική και συνίσταται σε είσοδο του κυττάρου στη Go/G1 φάση. Ωστόσο η επικράτηση της μιας ή της άλλης δράσης οφείλεται στη φυσιολογία και τον τύπο του κυττάρου.<sup>39,46</sup> Το γονίδιο *BCL2* εκφράζεται σε μεγάλο αριθμό εμβρυϊκών ιστών, όπως στους νεφρούς, ενώ στους ενήλικες εκφράζεται αποκλειστικά σε ταχέως πολλαπλασιαζόμενους και διαφοροποιούμενους ιστούς, όπως σε προ-B η ώριμα Β κύτταρα, στο θύμο αδένα (κυρίως στο μυελό), στον σπλήνα και στους λεμφαδένες.



**Εικόνα 11:** Γονίδιο *BCL2*. Εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 18 (περιοχή: 18q21.3). (Ανατύπωση από [www.genecards.org](http://www.genecards.org))

Η πρωτεΐνη για την οποία κωδικοποιεί έχει μέγεθος 26 KDa και αποτελείται από 239 αμινοξέα. Η τρισδιάστατη δομή της αποτελείται από οχτώ α-έλικες και μια υδροφοβική περιοχή στην επιφάνειά της, η οποία επιτρέπει την εντόπισή της στη εξωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη και σε μικρότερο βαθμό στον πυρηνικό φάκελο και στο ενδοπλασματικό δίκτυο.<sup>39,49</sup> Περιλαμβάνει και τις τέσσερις BH περιοχές (BH1, BH2, BH3 και BH4), εκ των οποίων οι BH1, BH2 και BH3 σχηματίζουν μια υδροφοβική 'σχισμή' μέσω της οποίας η πρωτεΐνη σχηματίζει ομο- και ετεροδιμερή με τα προαποπτωτικά μέλη της οικογένειας BCL2. Η ρύθμιση της αντιαποπτωτικής δράσης σε

επίπεδο γονιδίου γίνεται μέσω της IL-7 και της p53 που προκαλούν θετική ρύθμιση και σε επίπεδο πρωτεΐνης μέσω φωσφορυλίωσης σε κατάλοιπο σερίνης με δράση MAP κινασών ή CPP32 μονοπατιών.<sup>39</sup>

Υπερέκφραση του *BCL2* γονιδίου ανιχνεύεται μέσω ανοσοϊστοχημικών μεθόδων σε πληθώρα ανθρώπινων όγκων, όπως του προστάτη, του παχέος εντέρου, των πνευμόνων, του μαστού, του στομάχου, των νεφρών, του δέρματος, στο νευροβλάστωμα, στο μη-Hodgkin λέμφωμα και στην οξεία και χρόνια λευχαιμία. Σε κάποιους από αυτούς τους καρκίνους η θετική του ρύθμιση μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως προγνωστικός παράγοντας, όπως στον καρκίνο του μαστού, όπου σχετίζεται με καλή πρόγνωση. Ωστόσο, σε μεγάλο ποσοστό καρκίνων σχετίζεται με αντίσταση στη χημειοθεραπεία και την ακτινοβολία. Παραδείγματος χάρη, στην Οξεία Μυελογενή Λευχαιμία (ΟΜΛ) υψηλά επίπεδα της *BCL2* πρωτεΐνης υποδηλώνουν πτωχή ανταπόκριση στη χημειοθεραπεία και στα Β-λεμφώματα υπερέκφραση του *BCL2* σχετίζεται με κακή έκβαση της νόσου. Υψηλότερα επίπεδα έκφρασης του *BCL2* ανιχνεύονται στους υποτύπους M0 και M1 της ΟΜΛ, όπου παρατηρείται αντίσταση στη χημειοθεραπεία και πτωχή πρόγνωση, καθώς και μειωμένος αριθμός ασθενών με πλήρη ύφεση.<sup>40</sup>

### **1.5.3.1 BCL2 γονίδιο και γονιδιακό προϊόν στην ΟΛΛ ενηλίκων**

Πολλές έρευνες έχουν γίνει με σκοπό τη συσχέτιση της έκφρασης του γονιδίου *BCL2* και της πρωτεΐνης για την οποία κωδικοποιεί, με την παθογένεια και την απόκριση στη θεραπεία της Οξείας Λεμφοβλαστικής Λευχαιμίας των ενηλίκων.<sup>51</sup>

Σε μελέτη καταγράφεται υψηλή συχνότητα υπερέκφρασης του *BCL2* mRNA στις ΟΛΛ και ΟΜΛ που υποδηλώνει ότι διαταραχή της μεταγραφής του γονιδίου εμπλέκεται στη λευχαιμογένεση.<sup>51</sup> Από πολλές μελέτες επίσης καταγράφεται υψηλή έκφραση της *BCL2* πρωτεΐνης σε ασθενείς με ΟΛΛ. Συγκεκριμένα παρατηρούνται υψηλότερα επίπεδα σε ασθενείς σε σχέση με τους υγιείς μάρτυρες και υψηλότερα σε ασθενείς με υποτροπή σε σχέση με αυτούς που βρίσκονται σε ύφεση.<sup>52</sup> Υψηλότερα επίσης επίπεδα παρατηρούνται στη διάγνωση της νόσου σε σχέση με τα επίπεδα μετά τη θεραπεία, σε παιδιά και ενήλικες με Β και Τ κυτταρικής σειράς ΟΛΛ. Δεν παρατηρείται ωστόσο το ίδιο και στο Burkitt λέμφωμα.<sup>53</sup>

Υψηλότερα επίπεδα BCL2 πρωτεΐνης ανευρέθηκαν σε ανώριμα Β-κύτταρα ΟΛΛ σε σχέση με ώριμα Β-κύτταρα και έγινε συσχέτιση της μεγαλύτερης αυτής έκφρασης με παρατεταμένη επιβίωση σε *in vitro* καλλιέργειες.<sup>54</sup> Οι Gala et al. δεν κατέληξαν σε συσχέτιση της έκφρασης της BCL2 με το στάδιο διαφοροποίησης των βλαστών παρά μόνο στην Τ-ΟΛΛ των ενηλίκων και σε υποτροπή.<sup>53</sup> Το 2004 ωστόσο οι Menendez et al. κατέληξαν στο ότι η έκφραση του BCL2 γονιδίου στα νεοπλασματικά κύτταρα ασθενών με προ Β-ΟΛΛ, τυπική ΟΛΛ και άτυπη ΟΛΛ είναι 84%, 77% και 75% υψηλότερη αντίστοιχα υποδηλώνοντας ότι η έκφραση του γονιδίου σχετίζεται με το στάδιο ωρίμανσης των Β κυττάρων.<sup>55</sup>

Ως προς το ρόλο των αντιαποπτωτικών μελών της οικογένειας BCL2 στην αντίσταση των κυττάρων στη Χημειοθεραπεία έχει μελετηθεί η συσχέτιση της δράσης τους με τη θεραπεία με γλυκοκορτικοειδή και έχει βρεθεί ότι η υπερέκφρασή τους καθυστερεί τον κυτταρικό θάνατο που επάγουν τα γλυκοκορτικοειδή ενώ η ανεπάρκειά τους (*knock-down*) τον επιταχύνει.<sup>56</sup> Σε παλαιότερες έρευνες είχε βρεθεί ότι σε αυξημένη έκφραση της BCL2 η δράση των γλυκοκορτικοειδών ήταν αντι-πολλαπλασιαστική (*anti-proliferative*) και όχι αντιαποπτωτική ενώ σε χαμηλά επίπεδα της BCL2 αποπτωτική.<sup>57</sup> Οι Aref et al. καταλήγουν επίσης στο ότι ασθενείς που απαντούν στη χημειοθεραπεία εμφανίζουν χαμηλότερα επίπεδα έκφρασης της BCL2 σε σχέση με αυτούς που δεν αποκρίνονται. Στο ίδιο συμπέρασμα καταλήγει και μια προηγούμενη μελέτη με τη μέθοδο της ανοσοϊστοχημείας.<sup>52,58</sup> Παρότι όμως σύμφωνα με τους συγγραφείς (Aref et al.) μπορεί να προβλεφθεί βάσει των επιπέδων της πρωτεΐνης η απόκριση στη ΧΜΘ η BCL2 δεν έχει προγνωστική αξία.<sup>52</sup> Τα αποτελέσματα αυτά συμφωνούν και με την παλαιότερη μελέτη των Sahu et al. στο ότι δεν μπορεί να υπάρξει συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων έκφρασης της BCL2 και της ολικής επιβίωσης.<sup>59</sup>

Παλαιότερες έρευνες απέτυχαν να συσχετίσουν τα υψηλά επίπεδα της BCL2 πρωτεΐνης στα κύτταρα της ΟΛΛ με κλινικά και βιολογικά χαρακτηριστικά των ασθενών (WBC, ανοσοφαινότυπος, κυτταρογενετική).<sup>53,60</sup> Ωστόσο πιο πρόσφατα παρατηρήθηκε ότι η έκφραση των αποπτωτικών γονιδίων διαφέρει στους διάφορους υποτύπους της ΟΛΛ και σχετίζεται με την κυτταρική σειρά και τα κυτταρογενετικά χαρακτηριστικά. Οι CD10+ βλάστες στην Β-ΟΛΛ εμφανίζουν υψηλότερη έκφραση της BCL2 αλλά δεν παρατηρείται συσχέτιση μεταξύ έκφρασης της BAX και του λόγου BCL2/BAX με άλλα

προγνωστικά χαρακτηριστικά όπως η ηλικία, το φύλο, ο καρυότυπος ή ο αριθμός των λευκών κατά τη διάγνωση. Επίσης, χαμηλότερα επίπεδα της BCL2 παρατηρούνται σε ασθενείς άνω των 45 χρονών και σε ασθενείς με ανώμαλο καρυότυπο (χρωμόσωμα Φιλαδέλφειας ή άλλες μετατοπίσεις).<sup>50,61,62</sup>

### **1.5.3.2 BCL2 γονίδιο και γονιδιακό προϊόν στην ΟΛΛ παιδιών**

Σύμφωνα με τους Gala et al. η αυξημένη έκφραση της πρωτεΐνης BCL2 στα λευχαιμικά λεμφικά κύτταρα αποτελεί κανόνα στην ΟΛΛ παιδιών με μόνη εξαίρεση το λέμφωμα Burkitt όπου αυξημένα επίπεδα της πρωτεΐνης παρατηρούνται μόνο στην υποτροπή.<sup>53</sup> Μεταγενέστερες έρευνες καταλήγουν στο ίδιο συμπέρασμα ότι σε βλάστες περιφερικού αίματος ασθενών με ΟΛΛ τα επίπεδα της BCL2 σε σχέση με φυσιολογικούς βλάστες είναι υψηλότερα.<sup>63,64</sup> Οι Srinivas et al. σε μελέτη 32 παιδιών με ΟΛΛ, παρατηρούν έκφραση της BCL2 σε 22 ασθενείς ενώ δεν παρατηρούν έκφραση σε μάρτυρες.<sup>65</sup> Σύμφωνα με τους Schuler et al. η BCL2 πρωτεΐνη δεν παίζει κυρίαρχο ρόλο στην απόπτωση στην ΟΛΛ παιδιών καθώς έχει βρεθεί ποικίλη έκφραση των πρωτεϊνών BCL2 και BAX σε μελέτη κυτταρικών σειρών 22 παιδιών με ΟΛΛ και η έκφραση της BCL2 παρατηρείται μόνο σε απουσία της p53.<sup>66,67</sup>

Στην υποτροπή της ΟΛΛ βάσει αρκετών μελετών η έκφραση της BCL2 αυξάνεται.<sup>58,68,69</sup> Οι Wuchter et al. ωστόσο δεν παρατήρησαν διαφορά στην έκφραση της BCL2 σε ζεύγη δειγμάτων σε διάγνωση και υποτροπή με χρήση κυτταρομετρίας ροής όπως επίσης και οι Prokop et al. οι οποίοι επιπλέον ανευρίσκουν στη μελέτη τους μειωμένα επίπεδα της BAX στην υποτροπή από ότι στη διάγνωση.<sup>70,71</sup> Τα αντίθετα αυτά αποτελέσματα θέτουν υπό αμφισβήτηση τη σημασία της BCL2 στην υποτροπή και γεννούν ερωτήματα για κυρίαρχο ρόλο του λόγου BAX/BCL2.<sup>66</sup>

Η μελέτη της συσχέτισης της έκφρασης της BCL2 με κλινικά και βιολογικά χαρακτηριστικά των ασθενών οδηγεί σε αντικρουόμενα συμπεράσματα. Οι Coustan-Smith et. al δεν ανευρίσκουν συσχέτιση μεταξύ της έκφρασης BCL2 και του αριθμού λευκών αιμοσφαιρίων (WBC), της ηλικίας, του φύλου, της συμμετοχής του ΚΝΣ, του ποσοστού των κυττάρων στην S-φάση ή του ανοσοφαινοτύπου.<sup>61</sup> Με τα συμπεράσματα αυτά συμφωνούν οι Hogarth et al. σε μελέτη 47 παιδιών με ΟΛΛ καθώς επίσης και οι Findley et al.<sup>67,72</sup> Σε μελέτη 32 παιδιών με ΟΛΛ οι Srinivas et al. δεν ανευρίσκουν επίσης

σημαντική συσχέτιση μεταξύ BCL2/BAX πρωτεϊνικής έκφρασης και κλινικοβιολογικών χαρακτηριστικών των ασθενών εκτός της λεμφαδενοπάθειας.<sup>65</sup> Σε αντίθεση οι Uckun et al παρατηρούν συσχέτιση των υψηλών επιπέδων έκφρασης BCL2 με κλινικοεργαστηριακά χαρακτηριστικά που έχουν συνδεθεί με κακή πρόγνωση όπως ο αυξημένος αριθμός λευκών αιμοσφαιρίων, η οργανομεγαλία και η T-κυτταρική σειρά.<sup>73</sup> Έχει παρατηρηθεί επίσης, αντιστρόφως ανάλογη σχέση των BCL2 επιπέδων και του ποσοστού των κυττάρων στην S-φάση του κυτταρικού κύκλου σε κύτταρα του περιφερικού αίματος και σε βλάστες του μυελού των οστών. Σύμφωνα με τους συγγραφείς βέβαια, στα κύτταρα περιφερικού αίματος πιθανόν τα αποτελέσματα να επηρεάζονται από την ύπαρξη φυσιολογικών κυττάρων, στο μυελό των οστών, όμως το 80% τουλάχιστον είναι βλάστες.<sup>63</sup> Οι Narayan et al δεν ανευρίσκουν συσχέτιση μεταξύ έκφρασης BCL2, BAX και ηλικίας, φύλου και λεμφαδενοπάθειας, εκτός από περισσότερο αυξημένη έκφρασή τους σε σπληνομεγαλία <5 cm από ότι σε >5 cm. Παρατηρούν επίσης, σχέση αυξημένης έκφρασης BCL2 και αυξημένης αιμοσφαιρίνης, αυξημένου ποσοστού βλαστών στο μυελό των οστών (MO) και ανώριμου ανοσοφαινοτύπου και αντιστρόφως ανάλογη σχέση του λόγου BCL2/BAX με τον αριθμό των WBC.<sup>74</sup> Όσον αφορά στη σχέση της έκφρασης της BCL2 και του ανοσοφαινοτύπου συγκεκριμένα οι μελέτες επίσης δεν καταλήγουν σε κοινά συμπεράσματα. Οι Gala et al καθώς και οι Tsurusawa et al ανευρίσκουν υψηλά επίπεδα της πρωτεΐνης στους ασθενείς με ΟΛΛ ανεξαρτήτως ανοσοφαινοτύπου ή σταδίου ωρίμανσης.<sup>53,64</sup> Σε αρκετές όμως άλλες μελέτες παρατηρείται μειωμένη έκφραση της BCL2 στην T-ΟΛΛ γεγονός παράδοξο καθώς η πρωτεΐνη ως αντι-αποπτωτικό μέλος της BCL2 οικογένειας θα αναμενόταν να συνδέεται με κακούς προγνωστικούς παράγοντες όπως η T-ΟΛΛ.<sup>63,72,73,74,75</sup> Οι Hogarth et al. εκτός από τα μειωμένα επίπεδα της BCL2 που ανευρίσκουν στην T-κυτταρική σειρά σε σχέση με την B-κυτταρική σειρά παρατηρούν επίσης μείωση του λόγου BCL2/BAX στην T-ΟΛΛ.<sup>72</sup>

Πολλές μελέτες έχουν αναδείξει τη συσχέτιση της υψηλής έκφρασης της πρωτεΐνης BCL2 με κακή έκβαση της θεραπείας σε συγκεκριμένους τύπους καρκίνου όπως η Χρόνια Λεμφοβλαστική Λευχαιμία και η Οξεία Μυελογενής Λευχαιμία.<sup>72</sup> Στην πλειοψηφία τους οι μελέτες της έκφρασης της BCL2 στην παιδική ΟΛΛ δεν αναδεικνύουν συσχέτιση της υψηλής έκφρασης της πρωτεΐνης με χειρότερη πρόγνωση.

Συγκεκριμένα οι Coustan-Smith et.al συσχετίζουν τη χειρότερη πρόγνωση με χαμηλότερη έκφραση της BCL2 σε 52 ασθενείς, ενώ στη μελέτη των Gala et al δεν ανευρίσκεται συσχέτιση της BCL2 έκφρασης και της έκβασης της νόσου με τη χρήση της μεθόδου της ανοσοϊστοχημείας όπως επίσης και στη μελέτη των Salomons et al. 1999.<sup>53,61,63</sup> Οι Uckun et. al σε μελέτη 338 παιδιών με ΟΛΛ δεν καταλήγουν σε συσχέτιση των υψηλών επιπέδων της BCL2 με αργή πρώιμη ανταπόκριση (slow early response), αποτυχία πλήρους ύφεσης (complete remission-CR) ή επιβίωσης ελεύθερης νόσου (Event free survival-EFS).<sup>73</sup> Οι Hogarth et al. επιχειρούν από την άλλη τη συσχέτιση του λόγου BCL2/BAX με την κλινική έκβαση της νόσου, καθώς σε προηγούμενες μελέτες έχει βρεθεί συσχέτισή του με την αδυναμία επίτευξης πλήρους ύφεσης στην ΟΜΛ. Καταλήγουν ωστόσο στο ότι ο λόγος δεν μπορεί να προβλέψει την επιβίωση ελεύθερης νόσου. Η αυξημένη έκφραση όμως της BAX, φάνηκε να σχετίζεται με αυξημένο κίνδυνο υποτροπής και ως εκ τούτου προτείνεται για τη πρόβλεψη της υποτροπής. Ωστόσο, η αυξημένη έκφραση της BAX-α σε νεοδιαγνωσθείσες περιπτώσεις ΟΛΛ πιθανόν αποτελεί χαρακτηριστικό των βλαστών στη διάγνωση που δεν έχει σχέση με την εξέλιξη της νόσου, καθώς τα επίπεδά της μειώνονται στην υποτροπή.<sup>72</sup> Οι Wuchter et al. τέλος συμφωνούν με όλες τις προηγούμενες μελέτες στο ότι τα επίπεδα έκφρασης της BCL2 στην ΟΛΛ, σε αντίθεση με την ΟΜΛ, έχουν χαμηλή προγνωστική αξία.<sup>70</sup>

Όσον αφορά στη συσχέτιση των επιπέδων της BCL2 με την απόκριση σε συγκεκριμένα χημειοθεραπευτικά φάρμακα, αρκετές μελέτες συμφωνούν στο ότι υψηλά επίπεδα έκφρασης της BCL2 σε παιδιατρικούς ασθενείς με ΟΛΛ δεν σχετίζονται με αντίσταση στη χημειοθεραπεία.<sup>61,67</sup> Συγκεκριμένα, οι Coustan-Smith et. al σε in vitro μελέτη ανευρίσκουν ότι τα αυξημένα επίπεδα της BCL2 δεν σχετίζονται με αντίσταση στα χημειοθεραπευτικά φάρμακα βινκριστίνη, δεξαμεθαζόνη, δαουνορουβικίνη, 6-θειογουανίνη, κυταραβίνη και τενιποσίδη.<sup>61</sup> Επίσης, στη μελέτη των Casale et al. τα αποτελέσματα δεν αναδεικνύουν συσχέτιση μεταξύ των BCL2 επιπέδων έκφρασης και της απόκρισης στα γλυκοκορτικοειδή παρά μόνο ίσως με τα επίπεδα της BCL-XL.<sup>76</sup> Οι Salomons et al. 1997 προτείνουν το λόγο BAX-α/BCL2 ως σημαντικότερο από τα επίπεδα της BCL2 για την πρόβλεψη της επιβίωσης των λευχαιμικών κυττάρων μετά τη χημειοθεραπεία.<sup>75</sup> Παρομοίως οι Findley et al, θεωρούν ότι από μόνα τους τα επίπεδα

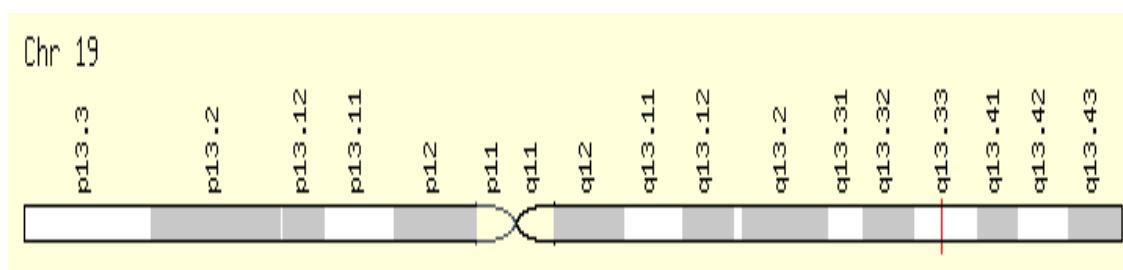
της BCL2 δεν είναι αρκετά να προστατεύσουν τα λευχαιμικά κύτταρα από την απόπτωση μετά τη θεραπευτική ακτινοβολία, αλλά ότι ο σχηματισμός των ετεροδιμερών BCL2-BAX επηρεάζει την αντιαποπτωτική δράση της BCL2. Αντιθέτως τα ετεροδιμερή BAX:BAX που σχηματίζονται όταν τα επίπεδα της BAX είναι υψηλότερα από της BCL2 συμβάλλουν στη έναρξη της απόπτωσης έτσι ώστε τα υψηλότερα επίπεδα της BAX τελικά να αυξάνουν την ευαισθησία στη απόπτωση. Συμπερασματικά δηλαδή υποστηρίζουν ότι σημασία για την ευαισθησία π.χ. μετά από ιονίζουσα ακτινοβολία δεν έχουν τα προ της θεραπείας επίπεδα των πρωτεϊνών της BCL2 οικογένειας αλλά η ικανότητα του κυττάρου να ρυθμίζει την έκφραση αυτών των πρωτεϊνών μετά από ένα αποπτωτικό ερέθισμα.<sup>67</sup> Οι Salomons et al. 1999 δεν ανευρίσκουν συσχέτιση μεταξύ των BCL2 επιπέδων ή του λόγου BAX/BCL2 και της in vitro αντίστασης στην πρεδνιζόνη (PRD), τη βινκριστίνη και την ασπαραγινάση σε μικρό αλλά αντιπροσωπευτικό αριθμό ασθενών, τονίζοντας όμως ότι πιθανώς η αντίσταση στη χημειοθεραπεία του μικρού αυτού του αριθμού ασθενών οφείλεται σε ανεξάρτητους μηχανισμούς.<sup>63</sup> Οι Wuchter et al. ανευρίσκουν παραδόξως ότι στα κύτταρα με καλή απόκριση στην αρχική θεραπεία με PRD η έκφραση της BCL2 είναι αυξημένη σε σχέση με τα κύτταρα με κακή απόκριση. Πιθανολογούν ωστόσο ότι δεν είναι τα επίπεδα της BCL2 που καθορίζουν την απόκριση στη θεραπεία αλλά τα επίπεδα των κυτταροκινών. Έχει βρεθεί ότι σε δείγματα T-ΟΛΛ η IL-7 οδηγεί σε υπερέκφραση της BCL2 και αναστολή του αποπτωτικού θανάτου. Είναι επίσης γνωστό ότι τα γλυκοκορτικοειδή ασκούν την αντιφλεγμονώδη δράση τους μέσω καταστολής της γονιδιακής έκφρασης των κυτταροκινών. Πιθανόν λοιπόν η μείωση της δράσης των κυτταροκινών να είναι υπεύθυνη για την καλύτερη απόκριση στη χημειοθεραπεία των κυτταρικών δειγμάτων ΟΛΛ με αυξημένα επίπεδα της BCL2.<sup>70</sup> Όσον αφορά στην υποτροπή οι Haarman et al. καταλήγουν στο ότι τα υψηλά επίπεδα BCL2 σχετίζονται με αυξημένη αντίσταση στην απόπτωση που προάγουν τα χημειοθεραπευτικά φάρμακα σε αντίθεση με τη διάγνωση.<sup>69</sup>

#### **1.5.4 BAX γονίδιο και γονιδιακό προϊόν**

Το γονίδιο BAX αποτελεί το πρώτο προαποπτωτικό γονίδιο της οικογένειας των BCL-2 γονιδίων που προσδιορίστηκε και εδράζεται στο χρωμόσωμα 19q13.3-q13.4.<sup>39,77</sup> Εκτός από το κλασικό μετάγραφο BAXα που αποτελεί προϊόν μεταγραφής ολόκληρου του



γονιδίου έχουν επίσης περιγραφεί τα προϊόντα εναλλακτικού ματίσματος BAXβ, BAXγ, BAXδ, BAXω, BAXε που παρουσιάζουν δομικές διαφορές μεταξύ τους καθώς και το BAXσ.<sup>39</sup>



**Εικόνα 12:** Γονίδιο BAX. Εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 19 (περιοχή 19q13.3-q13.4). (Ανατύπωση από [www.genecards.org](http://www.genecards.org))

Το γονίδιο BAX αποτελείται από 6 εξώνια και 5 παρεμβαλλόμενα εσώνια που κωδικοποιούν για την πρωτεΐνη BAXα 21 kDa. Η πρωτεΐνη BAXα εμφανίζει υψηλή ομολογία με την BCL2 καθώς περιλαμβάνει τις συντηρημένες περιοχές BH1, BH2 και BH3. Την προαποπτωτική της δράση επιτελεί σχηματίζοντας ετεροδιμερή τόσο με την BCL2 όσο και με άλλα μέλη της BCL2 οικογένειας. Το γεγονός βέβαια ότι η BAX-συνδέουσα πρωτεΐνη BIF-1 δεν παρουσιάζει τα χαρακτηριστικά των μελών της BCL2 οικογένειας υποδηλώνει ότι η BAX επιτελεί τον προαποπτωτικό της ρόλο και μέσω έμμεσων αλληλεπιδράσεων με τυροσινικές κινάσες. Για το σχηματισμό ομοδιμερών και ετεροδιμερών με τη BCL2 και την BCLXL σημαντικό ρόλο παίζει η BH3 περιοχή της πρωτεΐνης. Η υδροφοβική C-τελική περιοχή από την άλλη είναι σημαντική για τη στόχευση της πρωτεΐνης στη μεμβράνη του μιτοχονδρίου ενώ οι περιοχές BH1 και BH2 εμφανίζουν ομολογία με πρωτεΐνες που σχηματίζουν πόρους και συντελούν με αυτόν τον τρόπο στην απόπτωση.<sup>39</sup>

Μελέτες αποδεικνύουν ότι η BAX εντοπίζεται στο κυτοσόλιο όπου η N-τελική της έλικα-1 είναι κρυμμένη. Μετά την έκθεση σε ένα προαποπτωτικό ερέθισμα η BAX υπόκειται σε αλλαγή της μορφής της και έκθεση της N-τελικής έλικας πιθανόν και της BH3 περιοχής της. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τη σύνδεσή της στην εξωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη και το σχηματισμό ομο-ολιγομερών και ετερο-ολιγομερών με την BAK. Τελικά επιδρά στο δυναμικό της μιτοχονδριακής μεμβράνης (MMP-mitochondrial membrane potential) μέσω της δημιουργίας ομοδιμερών BAX. Σχηματίζει

ιοντικούς διαύλους και οδηγεί στην απελευθέρωση του κυτοχρώματος c και σε έναν καταρράκτη ενεργοποίησης κασπασών με τελικό στόχο την καταστροφή του κυττάρου. Ωστόσο υπάρχουν μελέτες που υποστηρίζουν ότι η BAX οδηγεί στην απόπτωση και μέσω μονοπατιών ανεξάρτητων των κασπασών .

Η έκφρασή της BAX έχει μελετηθεί και συσχετιστεί με την ανάπτυξη πολλών καρκινικών όγκων όπως του ορθοπρωκτικού καρκίνου, του γαστρικού καρκίνου, του οστεοσαρκώματος, του καρκίνου του μαστού κ.α.<sup>39</sup> Έχει επίσης μελετηθεί και συσχετιστεί με κακοήθειες του αιμοποιητικού.<sup>79</sup> Σε T κύτταρα της οξείας λεμφοβλαστικής λευχαιμίας έχουν εντοπιστεί μεταλλάξεις στο γονίδιο BAX.<sup>80</sup> Στην Οξεία Μυελογενή λευχαιμία αυξημένη αναλογία BCL-2/BAX συνεπάγεται δυσμενή κλινική πρόγνωση.<sup>81</sup> Το γονίδιο BAX θεωρείται ανεξάρτητος προγνωστικός παράγοντας στο λέμφωμα B-κυττάρων βοηθώντας έτσι στην αναγνώριση ασθενών που ανήκουν σε ομάδα υψηλού κινδύνου.<sup>82</sup> Σημαντικό χαρακτηριστικό των κυττάρων της χρόνιας μυελογενούς λευχαιμίας αποτελεί η αυξημένη έκφραση της BAX πρωτεΐνης που δεν σχετίζεται όμως με το κλινικό στάδιο της νόσου.<sup>83</sup> Η ογκοκατασταλτική δράση της BAX πρωτεΐνης χρησιμοποιείται πλέον για θεραπευτικούς σκοπούς. Πολλά χημειοθεραπευτικά φάρμακα αποσκοπούν στην αύξηση της έκφρασης του BAX προκειμένου να ανασταλεί η εξέλιξη του όγκου. Για παράδειγμα, όλοι οι χημειοθεραπευτικοί παράγοντες της ομάδας της ανθρακυκλίνης δρουν μέσω αύξησης της έκφρασης του BAX.<sup>84</sup> Η συνδυασμένη δράση All-trans retinoic acid (ATRA) και alpha-tocopherol succinate (alpha-TS) σε κύτταρα χρόνιας μυελογενούς λευχαιμίας οδηγεί σε υπερέκφραση της BAX και τελικά στον κυτταρικό θάνατο.<sup>85</sup> Επεξεργασία κυττάρων οξείας μυελογενούς λευχαιμίας με τον παράγοντα Gemtuzumab ozogamicin (GO) οδηγεί σε κυτταρικό θάνατο μέσω προαποπτωτικής ενεργοποίησης των BAX, BAK και της πρωτεϊνικής κινάσης p53 καθιστώντας τον έναν πολλά υποσχόμενο θεραπευτικό παράγοντα της ΟΜΛ.<sup>86</sup>

#### **1.5.4.1 BAX γονίδιο και γονιδιακό προϊόν στην ΟΛΛ**

Σε μελέτη σημειώνεται χαμηλή έκφραση του BAX mRNA στις ΟΛΛ και ΟΜΛ, υποδηλώνοντας ότι η διαφοροποίηση στη μεταγραφή αυτού του γονιδίου όπως και του BCL2 παίζει ρόλο στη λευχαιμογένεση.<sup>51</sup> Σε μελέτη βέβαια των επιπέδων των πρωτεϊνών

BAX και BCL2 μεταξύ παιδιατρικών ασθενών με ΟΛΛ παρατηρούνται ποικίλα επίπεδα έκφρασης.<sup>87</sup>

Η έρευνα για την αποκάλυψη μεταλλάξεων στο γονίδιο *BAX* στην ΟΛΛ οδηγεί σε αντικρουόμενα συμπεράσματα. Οι Salomons et al. 98 και οι Molenaar et al. 98 υποστηρίζουν ότι δεν παρατηρούνται μεταλλάξεις. Οι μεν πρώτοι μέσω DNA sequencing analysis καταλήγουν στο ότι οι μεταλλάξεις δεν παίζουν σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση των πρωτεϊνών για τις οποίες κωδικοποιούν, οι δε Molenaar et al. 98 παρατηρούν ότι μικροδορυφορική αστάθεια και πλαισιοτροποποιητικές μεταλλάξεις στο γονίδιο *BAX* (microsatellite instability and frameshift mutations) είναι ασυνήθεις στην ΟΛΛ in vivo.<sup>87,88</sup> Οι Meijerink et al. 98 επίσης παρατηρούν ότι το 21% των μελετώμενων κυτταρικών σειρών στην ΟΛΛ εμφανίζουν μεταλλάξεις στο γονίδιο *BAX*.<sup>89</sup>

Ως προς τη σχέση της έκφρασης της πρωτεΐνης *BAX* με την υποτροπή στην ΟΛΛ στα παιδιά, υψηλά επίπεδα έχουν συσχετιστεί παραδόξως με αυξημένο κίνδυνο υποτροπής.<sup>72</sup> Ωστόσο οι Prokop et al. σε άλλη μελέτη παρατηρούν μείωση της *BAX* και του λόγου *BAX/BCL2* στην υποτροπή σε σχέση με τη διάγνωση και υποστηρίζουν ότι η αυξημένη έκφραση της *BAX* στη διάγνωση είναι χαρακτηριστικό των λεμφοβλαστών στην αρχή της νόσου που δεν φαίνεται να σχετίζεται με την πορεία της αφού τα επίπεδα της πρωτεΐνης μειώνονται δραστικά στην υποτροπή.<sup>71</sup>

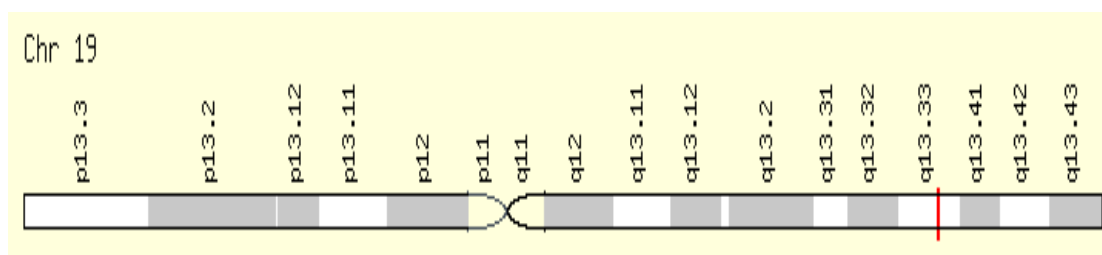
Οι Narayan et al. 2007 παρατηρούν ότι τα επίπεδα της *BAX* και του λόγου *BCL2 /BAX* είναι περισσότερο αυξημένα στην Β-ΟΛΛ απ ό τι στην χειρότερης πρόγνωσης Τ-ΟΛΛ στα παιδιά.<sup>74</sup> Το ίδιο υποστηρίζεται και σε παλαιότερη μελέτη για το λόγο *BCL2/BAX*.<sup>72</sup> Κλινικοβιολογικά χαρακτηριστικά της νόσου δεν φαίνεται να σχετίζονται με τα επίπεδα *BAX* ούτε και με το λόγο *BCL2/BAX* εκτός ίσως από τη λεμφαδενοπάθεια.<sup>63,65,74</sup>

Έχει μελετηθεί επίσης η σχέση της *BAX* έκφρασης με την απάντηση στη χημειοθεραπεία σε παιδιά με ΟΛΛ. Όπως έχει προαναφερθεί οι Salomons et al.99 υποστηρίζουν ότι δεν υπάρχει συσχέτιση της έκφρασης των μελών της *BCL2* οικογένειας και της απόκρισης στη θεραπεία.<sup>63</sup> Οι Findley et al. 97 επίσης υποστηρίζουν όπως έχει προαναφερθεί ότι η απόκριση των κυττάρων μετά την ακτινοβολία καθορίζεται από τη ρύθμιση των *BAX* και *BCL2* μετά την εφαρμογή της θεραπείας.<sup>67</sup> Οι Casale et al. 2003 δεν ανευρίσκουν επίσης συσχέτιση της έκφρασης των *BAX* και *BCL2* με την απόκριση στα γλυκοκορτικοειδή παρά μόνο με την έκφραση της *BCLXL*. Σε μεταγενέστερες όμως

μελέτες βρέθηκε ότι η δεξαμεθαζόνη αναστέλλει την έκφραση των αντιαποπτωτικών μελών της BCL2 οικογένειας BCL2 και BCLXL ενώ ενεργοποιεί τα προαποπτωτικά BAX και BAK που οδηγούν στην απελευθέρωση του κυτοχρώματος καθώς και ότι μετά την από του στόματος χορήγηση πρεδνιζόνης σε 43 παιδιά με ΟΛΛ ανευρίσκεται αυξημένη συσσώρευση BAX στον πυρήνα 12 ώρες μετά στους ασθενείς με καλή έκβαση.<sup>90,91</sup>

### 1.5.5 BCL2L12 γονίδιο και γονιδιακό προϊόν

Το γονίδιο *BCL2L12* εδράζεται στο χρωμόσωμα 19q13.3-13.4. Αποτελείται από επτά εξώνια και έξι παρεμβαλλόμενα εσώνια και καταλαμβάνει μια περιοχή 8.8 Kb. Στο ίδιο χρωμόσωμα βρίσκονται και γονίδια των οποίων το γονιδιακό προϊόν εμπλέκεται σε κακοήθειες, όπως το προαποπτωτικό μέλος της BCL2 οικογένειας *BAX* και τα γονίδια *IRF3* (interferon regulatory factor 3), *PRMT1/HRMT1L2* και *RRAS* (Ras-related protein R-Ras).<sup>39,92</sup>



**Εικόνα 13:** Γονίδιο *BCL2L12*. Εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 19 (περιοχή 19q13.3-q13.4). (Ανατύπωση από [www.genecards.org](http://www.genecards.org))

Η πρωτεΐνη BCL2L12 αποτελείται από 334 αμινοξέα, έχει μοριακό βάρος 36,8 KDa και ισοηλεκτρικό σημείο 9,48. Ανήκει στην BCL2 οικογένεια καθώς περιλαμβάνει τις περιοχές BH2 και BH3. Επιπλέον διαθέτει οκτώ μοτίβα PXXP και είναι πλούσια σε προλίνη καθώς περιέχει μια αμινοξική θέση PPPP και πέντε θέσεις PP. Οι περιοχές πλούσιες σε προλίνη έχει βρεθεί ότι αλληλεπιδρούν με την SH3 περιοχή (Src ομόλογη περιοχή 3) που εντοπίζεται σε πολλές τυροσινικές κινάσες και είναι υπεύθυνη για την ογκογονική τους δραστηριότητα. Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι πρόκειται για το πρώτο γονίδιο που κωδικοποιεί για πρωτεΐνη που περιλαμβάνει τόσο μια BH2 περιοχή όσο και μια περιοχή πλούσια σε προλίνη. Η συνύπαρξη και των δύο αυτών περιοχών, δείχνει ότι η πρωτεΐνη BCL2L12 εκτός από το ρόλο που διαδραματίζει στη ρύθμιση της απόπτωσης, συμμετέχει και σε πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις με πρωτεΐνες που περιέχουν συγκεκριμένες δομικές περιοχές.

Εκτός από το κλασικό μετάγραφο, έχουν επίσης ταυτοποιηθεί κι άλλες ισομορφές, αποτέλεσμα εναλλακτικού ματίσματος του γονιδίου.<sup>93</sup> Η BCL2L12 εκφράζεται κυρίως στο μαστό, στο θύμο αδένα, στον προστάτη, στο εμβρυικό ήπαρ, στο παχύ έντερο, στον πλακούντα, στο πάγκρεας, στο λεπτό έντερο, στο νωτιαίο μυελό, στον νεφρό και στο μυελό των οστών.<sup>92</sup>

Ο ρόλος της πρωτεΐνης BCL2L12 στην απόπτωση παραμένει αδιευκρίνιστος. Μελέτες έχουν δείξει ότι η προαποπτωτική ή η αντιαποπτωτική της δράση εξαρτάται από το κυτταρικό περιβάλλον στο οποίο θα βρεθεί.<sup>39</sup> Έχει διατυπωθεί ωστόσο και η άποψη ότι η διαφορετική δομή των διαφόρων ισομορφών είναι υπεύθυνη για την εμφάνιση προ ή αντι-αποπτωτικού ρόλου. Κάποιες από τις ισομορφές περιλαμβάνουν μόνο την BH3 περιοχή (BH3- only) οπότε ασκούν προαποπτωτική δράση σε αντίθεση με την συνολικού μήκους ισομορφή που είναι πιθανότερο να ασκεί αντιαποπτωτική δράση.<sup>94,95,100-118</sup> Σε αντίθεση με τα άλλα αντιαποπτωτικά μέλη της BCL2 οικογένειας, η BCL2L12 δεν επηρεάζει την απελευθέρωση του κυτοχρώματος c ή την ενεργοποίηση της κασπάσης 9 από το αποπτόσωμα, αλλά ασκεί τον αντιαποπτωτικό του ρόλο μέσω αλληλεπίδρασης πρωτεϊνών μεταξύ τους. Στο κυτταρόπλασμα, η BCL2L12 αναστέλλει τις κασπάσες 3 και 7 μέσω δύο μηχανισμών. Αφενός μεν αλληλεπιδρά άμεσα με την προ-κασπάση 7 αναστέλλοντας έτσι την ενεργοποίησή της, αφετέρου προάγει την mRNA έκφραση του γονιδίου CRYAB, το προϊόν του οποίου (crystalline alpha b) εξουδετερώνει την κασπάση 3. Επιπλέον, η BCL2L12 στον πυρήνα δημιουργεί σύμπλεγμα με την πρωτεΐνη p53 αναστέλλοντας με αυτόν τον τρόπο την σύνδεσή της με προαγωγείς γονιδίων σχετικών με την απόπτωση.<sup>94,114,116,117</sup>

#### **1.5.5.1 BCL2L12 γονίδιο και γονιδιακό προϊόν στον καρκίνο**

Μελέτη της έκφρασης του γονιδίου *BCL2L12* έχει γίνει σε αρκετούς τύπους νεοπλασιών όπως ο καρκίνος του μαστού, ο καρκίνος του παχέος εντέρου, ο γαστρικός καρκίνος, ο καρκίνος ρινοφάρυγγα, το πολύμορφο γλοιοβλάστωμα, η Χρόνια Λεμφοκυτταρική λευχαιμία και η Οξεία Μυελογενής λευχαιμία.

Στον καρκίνο του μαστού το γονίδιο *BCL2L12* μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως ανεξάρτητος ευνοϊκός προγνωστικός παράγοντας. Συγκεκριμένα, ασθενείς που εκφράζουν το *BCL2L12* έχουν πέντε φορές μικρότερη πιθανότητα να υποτροπιάσουν ή

να καταλήξουν σε σχέση με αυτούς που δεν εκφράζουν το γονίδιο. Η έκφραση του γονιδίου *BCL2L12* δηλαδή σχετίζεται με μεγαλύτερο διάστημα επιβίωσης ελεύθερης νόσου (DFS) και μεγαλύτερο διάστημα ολικής επιβίωσης (OS) ενώ η ενισχυμένη έκφραση του *BCL2L12* σχετίζεται με λιγότερο επιθετικές μορφές της νόσου.<sup>96</sup> Παρόμοια συμπεράσματα προκύπτουν και από μεταγενέστερη μελέτη, όπου η έκφραση του γονιδίου *BCL2L12* εντοπίζεται κυρίως σε ασθενείς με χαμηλά στάδια νόσου (I,II) και όσοι εκφράζουν τα γονίδια *BCL2L12* και *BCL2* έχουν τέσσερις φορές μικρότερη πιθανότητα να υποτροπιάσουν ή να καταλήξουν σε σχέση με αυτούς που δεν τα εκφράζουν.<sup>97,98</sup> Επιπλέον τα γονίδια *BCL2L12* και *BCL2* μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως προγνωστικοί παράγοντες απόκρισης στη χημειοθεραπεία, όπως προκύπτει από μελέτη επεξεργασίας της κυτταρικής σειράς MCF-7 του καρκίνου του μαστού με τα χημειοθεραπευτικά φάρμακα ετοποσίδη και ταξόλη. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, η ετοποσίδη προκαλεί μείωση της έκφρασης του *BCL2L12-A* και της κασπάσης -9 και αύξηση της έκφρασης του γονιδίου *BAX*, ενώ η ταξόλη προκαλεί μείωση της έκφρασης όλων των μελετώμενων γονιδίων (*BCL2L12*, *BCL2*, *BAX*, *CASPASE-9*, *FAS*).<sup>99</sup> Στον καρκίνο του παχέος εντέρου τόσο το *BCL2L12* όσο και το *BCL2L12-A* υπερεκφράζονται στους καρκινικούς ιστούς σε σχέση με τους υγιείς και επιπλέον ανευρίσκεται συσχέτιση μεταξύ του *BCL2L12-A* και του σταδίου της νόσου κατά Dukes.<sup>100</sup> Σύμφωνα με άλλη μελέτη ωστόσο φαίνεται ότι υψηλή έκφραση του γονιδίου σχετίζεται με μικρότερους (< ή =5 cm) και καλά διαφοροποιημένους όγκους καθώς και με όγκους πρώιμου σταδίου. Επιπλέον, οι ασθενείς που εκφράζουν το γονίδιο, εμφανίζουν μεγαλύτερο διάστημα επιβίωσης ελεύθερο νόσου (DFS) και μεγαλύτερη ολική επιβίωση (OS).<sup>101</sup> Η έκφραση του *BCL2L12* έχει μελετηθεί και στην κυτταρική σειρά HL-60 της οξείας προμυελοκυτταρικής λευχαιμίας μέσω της RT-PCR μετά από επίδραση διαφόρων χημειοθεραπευτικών παραγόντων. Τα αποτελέσματα αποκαλύπτουν σημαντικές αλλαγές στα επίπεδα mRNA που εξαρτώνται από το αποπτωτικό μονοπάτι που επάγει κάθε χημειοθεραπευτικός παράγοντας.<sup>39</sup> Συγκεκριμένα, μετά την έκθεση σε δοξορουβικίνη, σισπλατίνη και καρβοπλατίνη τα επίπεδα mRNA του *BCL2L12* αυξάνονται ενώ μετά την έκθεση σε ετοποσίδη, τοποτεκάνη, βινκριστίνη ή ταξόλη μειώνονται.<sup>102-106</sup> Στη Χρόνια Λεμφοκυτταρική Λευχαιμία, παρατηρείται αυξημένη mRNA έκφραση του *BCL2L12* στους ασθενείς σε σχέση με τους μάρτυρες και έχει βρεθεί ότι η έκφραση του *BCL2L12* μπορεί να προβλέψει την ύπαρξη της νόσου. Επιπλέον τα

αυξημένα επίπεδα mRNA του γονιδίου σχετίζονται με προχωρημένο κλινικό στάδιο της νόσου και χαμηλή ολική επιβίωση (OS) των ασθενών.<sup>107</sup> Σε άλλη μελέτη επίσης, διαπιστώνεται ότι βάσει της έκφρασης του *BCL2L12* μπορούν να διαχωριστούν οι ασθενείς από τους μάρτυρες στην Χρόνια Λεμφοκυτταρική Λευχαιμία (ΧΛΛ).<sup>108</sup> Από μελέτες σε ασθενείς ενήλικους με Οξεία Μυελογενή Λευχαιμία προκύπτει ότι οι αυτοί που εκφράζουν αυξημένα επίπεδα του γονιδίου είναι πιθανότερο να υποτροπιάσουν ή να πεθάνουν.<sup>109</sup> Επίσης, έχει βρεθεί ότι σε πρωτοδιαγνωσθέντες ασθενείς με ΟΜΛ τα επίπεδα του γονιδίου είναι χαμηλά και σε αυτούς που έχουν χαμηλά επίπεδα έκφρασης του *BCL2L12* παρατηρείται ελαττωμένος χρόνος ολικής επιβίωσης (OS).<sup>110</sup> Στον καρκίνο του στομάχου το *BCL2L12* προτείνεται ως ένας ανεξάρτητος ευνοϊκός προγνωστικός παράγοντας για την πρόβλεψη της επιβίωσης ελεύθερης νόσου (DFS) και της ολικής επιβίωσης (OS). Θα μπορούσε επίσης να χρησιμοποιηθεί για το διαχωρισμό των επιθετικών και των λιγότερο επιθετικών μορφών της νόσου καθώς όπως και στον καρκίνο του μαστού η αυξημένη έκφραση του γονιδίου σχετίζεται με λιγότερο επιθετικές μορφές της νόσου.<sup>111</sup> Σε άλλες μελέτες, μετά από επίδραση χημειοθεραπευτικών παραγόντων σε κύτταρα γαστρικού αδενοκαρκινώματος AGS (σισπλατίνη, ετοποσίδη και ταξόλη) και στην κυτταρική σειρά SGC7901 (συνδυασμός δοκοσαεξανοικού οξέος-DHA και 5-φλουουρακίλη-5-FU) παρατηρείται ήπια μείωση της έκφρασης του *BCL2L12* και μείωση της έκφρασης του *BCL2L12-A* αντίστοιχα όπως και του αντιαποπτωτικού γονιδίου *BCL2*.<sup>112,113</sup> Στο πολύμορφο γλοιοβλάστωμα (GBM-glioblastoma), μια επιθετική μορφή καρκίνου του εγκεφάλου, το γονίδιο *BCL2L12* έχει βρεθεί ότι έχει αντιαποπτωτικό και προ-νεκρωτικό ρόλο. Τόσο η *BCL2L12* όσο και η *BCL2L12-A* υπερεκφράζονται στο GBM. Στο κυτταρόπλασμα η *BCL2L12* αλληλεπιδρά με τις κασπάσες 3 και 7 και αναστέλλει την ενεργοποίησή τους οδηγώντας το κύτταρο στη νέκρωση και όχι στην απόπτωση, ενώ στον πυρήνα δημιουργεί σύμπλεγμα με την ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη p53 αναστέλλοντας με συγκεκριμένους μηχανισμούς τη δράση της.<sup>114-118</sup> Τέλος στον καρκίνο ρινοφάρυγγα, προτείνεται η έκφραση mRNA του γονιδίου ως καινούριος καρκινικός δείκτης για την πρόβλεψη πρώιμης υποτροπής και συγκεκριμένα ως δυσμενής ανεξάρτητος προγνωστικός παράγοντας καθώς οι ασθενείς με έκφραση του γονιδίου παρατηρήθηκε ότι παρουσιάζουν μικρότερο διάστημα επιβίωσης ελεύθερης νόσου (DFS). Επιπλέον, υψηλότερα επίπεδα *BCL2L12* βρέθηκαν σε

αδιαφοροποίητους όγκους και παρατηρήθηκε θετική συσχέτιση της έκφρασης του γονιδίου με μακρινές μεταστάσεις.<sup>119</sup>

## 1.6 ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ

Η λευχαιμία αντιπροσωπεύει το μεγαλύτερο ποσοστό των πιο συχνά διαγνωσθέντων κακοήθων παθήσεων στα παιδιά παγκοσμίως καθώς αφορά στο 1/3 αυτών, ενώ η Οξεία Λεμφοβλαστική λευχαιμία αντιπροσωπεύει το 77% των λευχαιμιών της παιδικής ηλικίας.<sup>1,2</sup> Παρά τις προόδους στη διάγνωση και στη θεραπεία και την σημαντική βελτίωση των ποσοστών επιβίωσης των ασθενών, ένα στα πέντε παιδιά εμφανίζει υποτροπή της νόσου ενώ θάνατοι ακόμα συμβαίνουν με ένα σημαντικό ποσοστό αυτών της τάξης του 36% να αφορά ασθενείς με ευνοϊκούς προγνωστικούς παράγοντες. Επιπλέον, οι εφαρμοζόμενες θεραπείες σχετίζονται με βραχυπρόθεσμες και μακροπρόθεσμες παρενέργειες.<sup>3,4</sup> Καθίσταται λοιπόν αναγκαία η μελέτη νέων μοριακών δεικτών.

Σκοπός της παρούσας διδακτορικής διατριβής είναι η μελέτη της έκφρασης των γονιδίων *BCL2*, *BAX* και *BCL2L12* σε επίπεδο mRNA σε παιδιά με Οξεία Λεμφοβλαστική Λευχαιμία. Τα γονίδια αυτά ανήκουν στην *BCL2* οικογένεια γονιδίων, τα μέλη της οποίας έχει βρεθεί ότι διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην παθοφυσιολογία του καρκίνου μέσω επίδρασης στο μηχανισμό της απόπτωσης. Απώτερος στόχος της μελέτης είναι η ανάδειξη των γονιδίων αυτών ως νέων μοριακών δεικτών ικανών για έγκαιρη διάγνωση της νόσου, πρόβλεψη του θεραπευτικού αποτελέσματος της εφαρμοζόμενης αγωγής και πρόβλεψη της επιβίωσης των ασθενών.

Για την εκπόνηση της εργασίας συλλέχθηκαν δείγματα μυελού των οστών σε συνεργασία με το Ογκολογικό Τμήμα του Νοσοκομείου Παιδών «Π & Α Κυριακού». Τα δείγματα αφορούν σε ασθενείς στη φάση της διάγνωσης και στην 33<sup>η</sup> ημέρα της θεραπείας καθώς και σε υγιή ως προς την υπό μελέτη ασθένεια παιδιά τα οποία αποτελούν τους μάρτυρες. Κατασκευάστηκε παράλληλα λεπτομερής βάση δεδομένων με τα κλινικοπαθολογικά στοιχεία του κάθε ασθενή. Ως προς την πειραματική διαδικασία, απομονώθηκε ολικό RNA με τη μέθοδο 'single-step' φαινόλης και ισοθειοκυανικής γουανιδίνης, έγινε αντίστροφη μεταγραφή για την παραγωγή cDNA, αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction-PCR) για το γονίδιο αναφοράς *GAPDH* (Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase) ώστε τελικά να



επιλεγούν τα δείγματα για την αλυσιδωτή αντίδραση ποσοτική PCR πραγματικού χρόνου (qReal Time PCR) που έγινε για τα μελετώμενα γονίδια *BCL2*, *BAX*, *BCL2L12* και το γονίδιο αναφοράς *GAPDH* με χρήση της τεχνικής SYBR Green.

## 2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

### 2.1 ΒΙΟΛΟΓΙΚΟ ΥΛΙΚΟ

Για την παρούσα διδακτορική διατριβή χρησιμοποιήθηκαν δείγματα μυελού των οστών (ΜΟ) παιδιών με Οξεία Λεμφοβλαστική Λευχαιμία και παιδιών υγιών ως προς τη μελετώμενη νόσο ή οποιαδήποτε άλλη αιματολογική κακοήθεια. Συγκεκριμένα, στη μελέτη συμπεριλήφθηκαν δείγματα 82 ασθενών διαγνωσθέντων με ΟΛΛ (72 ασθενείς με Β-ΟΛΛ και 10 ασθενείς με Τ-ΟΛΛ) ηλικίας από 15 μηνών έως 15 ετών, στη φάση της διάγνωσης. Όλοι οι ασθενείς έλαβαν θεραπεία σύμφωνα με το πρωτόκολλο ALLIC-BFM (Berlin-Frankfurt-Münster) από τον Σεπτέμβριο του 2006 έως τον Απρίλιο του 2012. Συμπεριλήφθηκαν ακόμη δείγματα ΜΟ από 56 από τους ασθενείς την 33<sup>η</sup> ημέρα μετά την έναρξη της θεραπείας, καθώς και από 63 μάρτυρες. Η εργασία εγκρίθηκε από την επιτροπή Ηθικής και Δεοντολογίας του Νοσοκομείου Παιδών «Π & Α Κυριακού» και εκπονήθηκε σύμφωνα με τις διεθνείς οδηγίες της διακήρυξης του Ελσίνκι του 2008. Η συλλογή των δειγμάτων έγινε σε συνεργασία με το Ογκολογικό Τμήμα του Νοσοκομείου Παιδών «Π & Α Κυριακού» και τη Διευθύντρια του Ογκολογικού τμήματος κ. Κοσμίδη Ελένη.

Τα σωληνάρια στα οποία συλλέχθηκε το δείγμα περιείχαν αντιπηκτικό trisodium citrate (TC, κιτρικό νάτριο). Το κιτρικό νάτριο προτιμάται ως αντιπηκτικό έναντι τόσο της ηπαρίνης όσο και του EDTA (Ethylenediaminetetraacetic acid) καθώς η μεν ηπαρίνη αναστέλλει τη διαδικασία της PCR ενώ το EDTA σχηματίζει χηλικά σύμπλοκα με το  $Mg^{2+}$ , μειώνοντας τη συγκέντρωση του διαθέσιμου  $Mg^{2+}$ , το οποίο είναι απαραίτητο για την απόδοση της PCR.<sup>122,123</sup> Μετά την παραλαβή τους από το νοσοκομείο τα δείγματα αποθηκεύτηκαν σε βαθιά κατάψυξη (-75°C) έως τη στιγμή της επεξεργασίας τους. Παράλληλα, κατασκευάστηκε βάση δεδομένων για όλους τους ασθενείς με πλήρες ιατρικό ιστορικό. Συγκεκριμένα για κάθε ασθενή συμπεριλήφθηκαν το φύλο, η ηλικία, ο αριθμός των λευκών αιμοσφαιρίων (WBC count) στη διάγνωση, ο ανοσοφαινότυπος, η κυτταρογενετική, η απόκριση στην θεραπεία εφόδου (απόλυτος αριθμός βλαστών-AAB την 8<sup>η</sup> ημέρα μετά την έναρξη της θεραπείας, ποσοστό βλαστών στον μυελό των οστών την 15<sup>η</sup> ημέρα), η ελάχιστη υπολειπόμενη νόσος (Minimal Residual Disease-MRD), η τυχόν υποτροπή, ο βαθμός κινδύνου, η επιβίωση και η αιτία θανάτου για τους ασθενείς που κατέληξαν. Τα στοιχεία αυτά φαίνονται στον παρακάτω πίνακα:

<b>Χαρακτηριστικά</b>	<b>N</b>	<b>%</b>
<b>Φύλο</b>		
Αγόρια	50	60.98
Κορίτσια	32	39.02
<b>Ηλικία</b>		
1 – 10 ετών	59	71.95
≥10 ετών	23	28.05
<b>Αριθμός Λευκών Αιμοσφαιρίων (WBC)</b>		
<50,000 cells/μl	68	82.93
≥50,000 cells/μl	14	17.07
<b>Ανοσοφαινότυπος</b>		
Πρώιμη Β-ΟΛΛ	72	87.80
CD10+	67	81.70
CD10-	5	6.10
T-ΟΛΛ	10	12.20
<b>Κυτταρογενετική</b>		
Υπερδιπλοειδισμός (51-65)	16	19.51
Άλλο	66	80.49
<b>TEL-AML1/t(12;21)(p13;q22)</b>		
Αρνητικό	60	73.17
Θετικό	22	26.83
<b>Απόκριση στον Μυελό των Οστών/Ημέρα 15</b>		
M1 (βλάστες <5%)	70	85.37
M2 (βλάστες 5-25%)	10	12.20
M3 (βλάστες ≥25%)	2	2.44
<b>MRD/Ημέρα 33</b>		
≤0,1%	45	54.88
>0,1%	6	7.32
Άγνωστο	31	37.80
<b>Αριθμός βλαστών/Ημέρα 7</b>		
Καλή (<1000 βλάστες)	79	96.34
Κακή ≥1000 βλάστες)	3	3.66
<b>Ομάδες Κινδύνου<sup>b</sup></b>		
Χαμηλού κινδύνου (SR)	14	17.07
Ενδιάμεσου κινδύνου (MR)	60	73.17
Υψηλού κινδύνου (HR)	8	9.76
<b>Έκβαση ασθενών</b>		
CCR <sup>a</sup>	62	75.61

Υποτροπή Τοξικότητα πρωτόκολλο	στο	BFM	15	18.29
			5	6.10

<sup>a</sup> CCR: complete continuous remission (πλήρης συνεχιζόμενη ύφεση)

<sup>b</sup> Ομάδες κινδύνου: **SR (Standard Risk)** όλα τα παρακάτω: 1-6 ετών, WBC < 20,000 cells/μl, αριθμός βλαστών ημέρα 7 (AAB) < 1000, όχι t(4;11) ή t(9;22), χρωμοσώματα ≥ 45, MRD < 0,1%, M1 ημέρα 15 **HR (High Risk)** ένα από τα παρακάτω: AAB > 1000, t(4;11), t(9;22), χρωμοσώματα < 45, MRD ≥ 10%, M2-M3 **MR (Medium Risk)** χωρίς τα χαρακτηριστικά των 2 άλλων ομάδων.

**Πίνακας 2:** Κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά ασθενών με ΟΛΛ.

Στους ασθενείς που συμπεριλήφθηκαν στη μελέτη εφαρμόστηκε το θεραπευτικό πρωτόκολλο BFM (Berlin-Frankfurt-Münster) της Γερμανικής ομάδας μελέτης και θεραπείας της ΟΛΛ. Συγκεκριμένα χρησιμοποιήθηκαν τα πρωτόκολλα BFM95 και BFM/ALLIC2009, τα οποία παρουσιάζουν μικρές διαφορές μεταξύ τους ως προς την χορηγούμενη αγωγή. Ο βασικός κορμός του πρωτοκόλλου συνίσταται στη θεραπεία εφόδου, στη φάση σταθεροποίησης, στην προφυλακτική θεραπεία του ΚΝΣ και στις φάσεις επανεφόδου, επανασταθεροποίησης και συντήρησης. Η συνολική διάρκεια θεραπείας είναι 24 μήνες. Οι ασθενείς μελετήθηκαν κατά τη διάγνωση και την 33<sup>η</sup> ημέρα μετά την έναρξη της θεραπείας. Η αγωγή που έλαβαν κατά τη φάση εφόδου αμέσως μετά τη διάγνωση της νόσου περιελάμβανε τα εξής: χορήγηση πρεδνιζόνης (prednisone-PDN) 60 mg/m<sup>2</sup>/per day PO (per os-από το στόμα) τις πρώτες 28 ημέρες, βινκριστίνη (vincristine) 1,5 mg/m<sup>2</sup>/per dose IV (intravenous-ενδοφλέβια) τις ημέρες 8,15,22,29, δαουνορουβικίνη (daunorubicin) 30 mg/m<sup>2</sup>/per dose PI (intravenous infusion- ενδοφλέβια έγχυση) τις ημέρες 8,15,22,29, L-ασπαραγινάση (L-asparaginase) 5000 IU/ m<sup>2</sup>/per dose PI τις ημέρες 12,15,18,21,24,27,30,33 και μεθοτρεξάτη (methotrexate) 12 mg/dose IT (intrathecally- ενδορραχιαίως) τις ημέρες 1,12,33.

## 2.2 ANTIΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

- DNase/RNase-free water
- TRI Reagent BD (Molecular Research Center Cat. No TB126)
- Χλωροφόρμιο (Scharlau, Cat. No CL 0218)
- Ισοπροπανόλη (Scharlau, Cat. No AL 0323)
- Αιθανόλη 100% (Scharlau ET0016)

- RSS (RNA Storage Solution) (Ambion, Cat. No 7001)
- Tris (Hydroxymethyl-aminomethane) pro analysi (Merck, Cat. No 1.08382.0500)
- EDTA (Scharlau, Cat. No Ac 0965)
- Boric Acid (Scharlau, Cat. No AC 0577)
- 100bp DNA Ladder Quick Load (BioLabs, Cat. No 467G, 50U/ml)
- UltraPure Agarose 1000 (Invitrogen, Cat. No 10975-035)
- Ethidium Bromide Solution (EtBr, Research Organics, Cat. NoRES 3016 E-A101X)
- RNA loading dye 2x (Fermentas, store at +4°C):
  - 95% formamide
  - 0.025% SDS (Sodium Dodecyl Sulfate)
  - 0.025% bromophenol blue
  - 0.025% xylene cyanol FF
  - 0.025% Ethidium Bromide
  - 0.5mM EDTA
- DNA loading dye 6x (Fermentas, store at +4°C):
  - 10mM Tris-HCl (pH 7.6)
  - 0.03% bromophenol blue
  - 0.03% xylene cyanol FF
  - 60% glycerol
  - 60 mM EDTA
- M-MLV Reverse Transcriptase/buffer 10x (Invitrogen 28025013)
- oligo-dT Adaptor primer (100pmol/μl)
- RNase inhibitor (Invitrogen 10777019)
- Taq DNA polymerase (Kapa Biosystems)
- MgCl<sub>2</sub> (Kapa Biosystems)

- dNTP's: dATP, dCTP, dGTP, dTTP Set (100mM each) (Invitrogen, 10mM)
- PRIMERS: HPLC-purified, 200 nmol, VBC, (Lab supplies)
- MicroAmp Optical 96 well Reaction Plate (Axygen, PCR-96M2-HS-C)
- Optical Adhesive Films (Greiner-Ampiseal 676040)
- Kapa SYBR Green PCR Master Mix 2x (Kapa Biosystems)

## 2.3 ΟΡΓΑΝΑ

- Πιπέτες Gilson της Pipetman
- Φυγόκεντροι:
  - CR1000 της Jouan (διάμετρος=16cm)
  - BR4i Jouan: κεφαλή AB2.14 (radius: 84mm, max speed=14000rpm, max RCF=18407xg, temperature: -9 to +40oC, capacity: 24x1.5ml)
  - Costar, model:10 (για spin down)
- Φωτόμετρο NanoDrop 1000 της Thermo scientific
- Θερμοκυκλοποιητές:
  - PCR: Genius (Techne)
  - ABI 7500 Real – time PCR System (Applied Biosystems)
- Συσκευή ηλεκτροφόρησης-μοντέλο: HU13 (SCIE-PLAS)
- Τροφοδοτικό: LKB BROMMA

## 2.4 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

### 2.4.1 Απομόνωση ολικού RNA

Η απομόνωση ολικού RNA από τα δείγματα μυελού των οστών αποτελεί το πρώτο στάδιο επεξεργασίας των δειγμάτων. Πρόκειται για μια διαδικασία κατά την οποία επιχειρείται απομόνωση υψηλής ποιότητας RNA από κύτταρα ιστών προκειμένου να ακολουθήσουν μοριακές τεχνικές όπως η RT-PCR, η ανάλυση Northern κ.α. Η διαδικασία στηρίζεται στη χρήση ενός μονοφασικού διαλύματος που συνδυάζει τα αντιδραστήρια φαινόλη και ισοθιοκυανική γουανιδίνη (TRI Reagent), μια μέθοδος που προτάθηκε

από τους Chomczynski P, Sacchi N το 1987.<sup>124</sup> Το διάλυμα αυτό έχει την ιδιότητα να προστατεύει το RNA από τις ριβονουκλεάσες (RNases). Η απομόνωση ακέραιου και υψηλής καθαρότητας RNA ωστόσο προϋποθέτει εκτός από τη χρήση του συγκεκριμένου διαλύματος, την συλλογή του δείγματος βάσει οδηγιών για τον κάθε ιστό, την σωστή αποθήκευσή του πριν την επεξεργασία και την εξασφάλιση των κατάλληλων συνθηκών κατά τη διενέργεια της πειραματικής διαδικασίας. Συγκεκριμένα για τον μυελό των οστών, η συλλογή όπως προαναφέρθηκε πρέπει να γίνεται σε σωληνάρια που περιέχουν αντιπηκτικό trisodium citrate (TC, κιτρικό νάτριο) και η αποθήκευση να γίνεται άμεσα στους  $-75^{\circ}\text{C}$ , ώστε να αποφεύγεται αποικοδόμηση του RNA.<sup>125</sup> Όσον αφορά στην πειραματική διαδικασία, είναι απαραίτητο να εξασφαλίζονται συνθήκες αποστείρωσης, με τη χρήση γαντιών, μάσκας, αποστειρωμένων υλικών και την απολύμανση με διάλυμα αιθανόλης 70% και όχι με απόλυτη αιθανόλη καθώς έχει αποδειχθεί ότι η παρουσία νερού επιταχύνει την αποικοδόμηση των πρωτεϊνών.<sup>126</sup> Επίσης για την αποφυγή αποικοδόμησης του RNA η διαδικασία πραγματοποιείται σε πάγο.

Τα στάδια της μεθόδου απομόνωσης του RNA είναι τα εξής: Με τη χρήση του αντιδραστηρίου TRI BD Reagent της MRC προκαλείται λύση των κυττάρων ενώ διατηρείται ακέραιο το RNA. Ακολούθως με την προσθήκη χλωροφορμίου και φυγοκέντρηση, το διάλυμα διαχωρίζεται σε τρεις φάσεις, την ανώτερη υδατική στην οποία παραμένει το RNA, την κατώτερη οργανική που περιλαμβάνει τις πρωτεΐνες και τα λιπίδια και μια ενδιάμεση φάση στην οποία βρίσκεται το DNA. Στη συνέχεια με τη χρήση ισοπροπανόλης προκαλείται καθίζηση του RNA από την υδατική φάση. Η ισοπροπανόλη έχει την ιδιότητα να κατακρημνίζει το RNA καθώς μειώνει τη διηλεκτρική σταθερά ( $\epsilon$ ) του διαλύματος και αυξάνει τις ελκτικές δυνάμεις Coulomb μεταξύ κατιόντων και σακχαροφωσφορικού σκελετού. Έπειτα από τη δημιουργία του ιζήματος (pellet) ακολουθεί πλύση του με διάλυμα αιθανόλης. Τέλος, το RNA επαναδιαλύεται σε διάλυμα κιτρικού νατρίου (RNA Storage Solution-RSS, 1mM με pH 6.4), προκειμένου να αποθηκευτεί και να χρησιμοποιηθεί σε περαιτέρω διαδικασίες.

Το αναλυτικό πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε στην παρούσα εργασία είναι το εξής: Αρχικά μεταφέρονται 250-330  $\mu\text{l}$  μυελού των οστών σε σωληνάρια των 2ml αφού προηγουμένως έχει γίνει επαρκής ανάδευση ώστε η κατανομή των κυττάρων να είναι

ομοιόμορφη. Ακολούθως προστίθεται ποσότητα του αντιδραστηρίου TRI BD Reagent της MRC κατάλληλη ώστε να διατηρείται ο λόγος όγκος δείγματος/όγκος αντιδραστηρίου ίσος με 1:3. Μεγαλύτερη ποσότητα δείγματος οδηγεί σε επιμόλυνση με DNA ενώ μικρότερη ποσότητα οδηγεί σε μειωμένη συγκέντρωση RNA. Έτσι για 250-330 μl μυελού των οστών προστίθενται 750-990 μl TRI BD Reagent. Η επιλογή της ποσότητας δείγματος γίνεται βάσει της διαθέσιμης ποσότητας αλλά και βάσει της κυτταροβρίθειας του μυελού των οστών, στοιχείο που συνήθως παρέχεται από το μυελόγραμμα. Αφού γίνει ομογενοποίηση με ανάδευση περίπου για ένα λεπτό για τη λύση των κυττάρων, το διάλυμα παραμένει 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου προκειμένου να αποδιαταχθούν πλήρως τα νουκλεοπρωτεϊνικά σύμπλοκα. Στη συνέχεια προστίθεται χλωροφόρμιο, 200μl για 750μl TRI BD Reagent, και γίνεται έντονη ανάδευση με το χέρι για 15 δευτερόλεπτα. Τα διάλυμα αφού παραμείνει σε θερμοκρασία δωματίου για 2-5 λεπτά, φυγοκεντρείται στα 12000g για 15 λεπτά στους 4 °C. Είναι σημαντικό η φυγοκέντρηση να πραγματοποιείται στη θερμοκρασία αυτή καθώς σε μεγαλύτερες θερμοκρασίες είναι πιθανό ποσότητα DNA να παραμείνει στην υδατική φάση. Μετά τη φυγοκέντρηση το διάλυμα διαχωρίζεται στην κατώτερη καφέ φάση της φαινόλης-χλωροφορμίου, την ενδιάμεση και την ανώτερη υδατική και διαυγή φάση, όπου βρίσκεται το RNA. Η ποσότητα της ανώτερης φάσης, αντιστοιχεί στο 60% του όγκου του TRI BD Reagent που χρησιμοποιήθηκε. Ακολουθεί η μεταφορά της ανώτερης υδατικής φάσης (συνήθως περίπου 500μl) σε νέο σωληνάριο των 1,5 ml ενώ οι υπόλοιπες φάσεις αποθηκεύονται στους -75°C για μελλοντική απομόνωση DNA ή πρωτεϊνών. Η καθίζηση του RNA επιτυγχάνεται με προσθήκη ίσης ποσότητας με την υδατική φάση ισοπροπανόλης. Το διάλυμα επωάζεται σε θερμοκρασία δωματίου για 5-10 λεπτά και φυγοκεντρείται σε 12000g για 8 λεπτά στους 4-25 °C. Το RNA που καθιζάνει έχει τη μορφή λευκού ιζήματος στον πάτο του σωληναρίου. Μετά τη φυγοκέντρηση η υπερκείμενη ποσότητα απομακρύνεται και προστίθεται αιθανόλη 75% σε ποσότητα 1ml για 750μl TRI BD Reagent. Γίνεται ανάδευση και το διάλυμα φυγοκεντρείται σε 7500g για 5 λεπτά στους 4-25 °C. Η διαδικασία της πλύσης μπορεί να επαναληφθεί. Η αιθανόλη έπειτα απομακρύνεται και το ίζημα αφήνεται να στεγνώσει στον αέρα (air-dry) για 5-10 λεπτά, προσέχοντας να μην στεγνώσει τελείως αφού κάτι τέτοιο θα μειώσει σημαντικά τη διαλυτότητά του. Ανάλογα με το μέγεθος του ιζήματος προστίθενται η αντίστοιχη ποσότητα RSS (RNA Storage Solution) το οποίο έχει προηγουμένως ξεπαγώσει και



τοποθετηθεί στο υδατόλουτρο στους 55°C και με χρήση πιπέτας (ανααρροφώντας και απορρίπτοντας διαδοχικά, με ήπιες κινήσεις) επαναδιαλύεται το RNA. Τέλος, το επαναδιαλυμένο RNA επωάζεται στους 55°C για 15min.

## **2.4.2 Ποσοτική και ποιοτική εκτίμηση εκχυλίσματος RNA**

### **2.4.2.1 Φωτομέτρηση RNA**

Η ποσοτική και ποιοτική εκτίμηση του RNA που απομονώνεται γίνεται με τη βοήθεια ενός φασματοφωτόμετρου με πηγή ακτινοβολίας στην υπεριώδη περιοχή. Η φασματοφωτομετρία στηρίζεται στο γεγονός ότι η απορρόφηση της υπεριώδους ακτινοβολίας σε ένα δείγμα είναι ενδεικτική της συγκέντρωσης των νουκλεϊκών οξέων που περιέχει. Το γεγονός μάλιστα ότι το μέγιστο απορρόφησης των νουκλεϊκών οξέων διαφέρει από το μέγιστο απορρόφησης των άλλων συστατικών του δείγματος όπως των πρωτεϊνών ή υπολειμμάτων αντιδραστηρίων δίνει τη δυνατότητα προσδιορισμού της καθαρότητας του δείγματος.

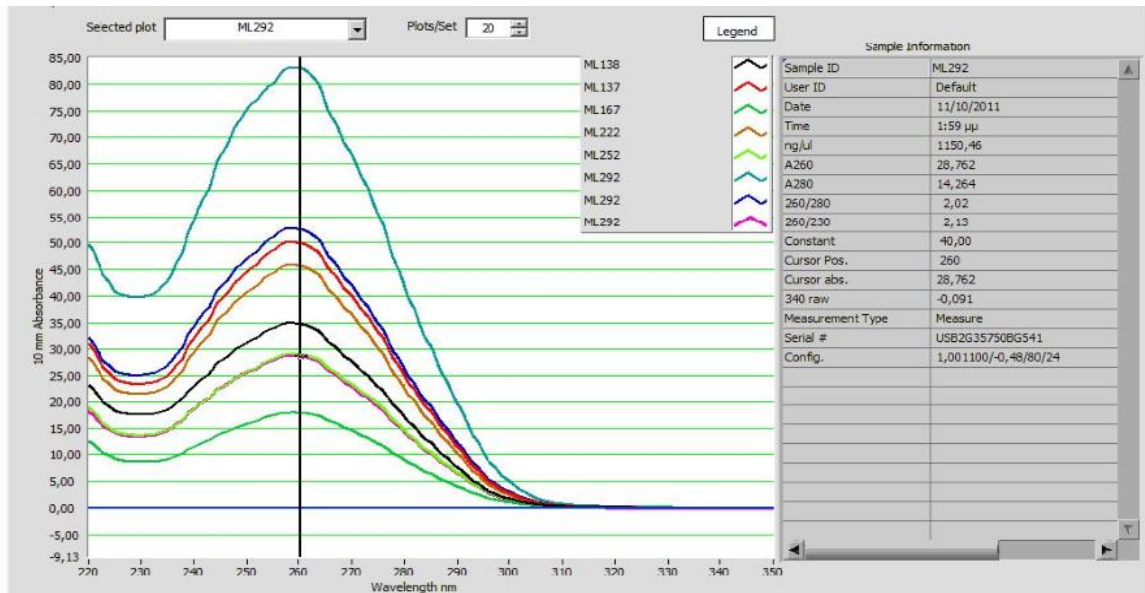
Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης βάσει του μεγίστου της απορρόφησης των νουκλεϊκών οξέων στηρίζεται στον νόμο Beer-Lambert, σύμφωνα με τον οποίο  $A = \epsilon bc$  mol/L, όπου A: η τιμή της απορρόφησης σε ορισμένο μήκος κύματος,  $\epsilon$ : η μοριακή απορροφητικότητα ( $\epsilon_{RNA} = 0.025 M^{-1} \times cm^{-1}$ ), b: το μήκος της διαδρομής που διανύθηκε μέσα στο διάλυμα (σε cm) και c: η συγκέντρωση του μετρούμενου δείγματος. Το μέγιστο απορρόφησης των νουκλεϊκών οξέων προσδιορίζεται σε μήκος κύματος 260nm, το οποίο αποτελεί τον μέσο όρο απορρόφησης του κάθε νουκλεοτιδίου μεμονωμένα, καθώς το εύρος απορρόφησης των νουκλεοτιδίων κυμαίνεται από 256 έως 281nm. Για το RNA απορρόφηση στα 260 nm ίση με τη μονάδα αντιστοιχεί σε συγκέντρωση 40  $\mu g/ml$  κι έτσι η εξίσωση που χρησιμοποιείται είναι η εξής:  $40 \times A_{260}$  του δείγματος = συγκέντρωση του RNA ( $\mu g/ml$ ).

Η καθαρότητα του δείγματος ελέγχεται με τον προσδιορισμό των λόγων απορρόφησης του δείγματος στα 260 nm προς την απορρόφηση στα 280 nm ( $A_{260}/A_{280}$ ) και απορρόφησης στα 260 nm προς την απορρόφηση στα 230 nm ( $A_{260}/A_{230}$ ). Στα μήκη κύματος 280 nm και 230 nm απορροφούν οι πρωτεΐνες (αρωματικά αμινοξέα, όπως η τρυπτοφάνη και η τυροσίνη και σε μικρότερο βαθμό η φαινυλαλανίνη και οι δισουλφιδικοί δεσμοί) και οι πολυσακχαρίτες αντίστοιχα. Ο λόγος

A260/A280 περίπου ίσος με 2 είναι ενδεικτικός καθαρού RNA και περίπου ίσος με 1,8 ενδεικτικός καθαρού DNA. Ο πραγματικός λόγος βέβαια καθορίζεται από τη σύνθεση των νουκλεοτιδίων. Οι λόγοι A260/A280 για κάθε νουκλεοτίδιο ξεχωριστά είναι: γουανίνη: 1.15, αδενίνη: 4.50, κυτοσίνη: 1.51, ουρακίλη: 4.00, θυμίνη: 1.47. Η υψηλότερη τιμή του λόγου για το RNA οφείλεται στην παρουσία ουρακίλης σε σχέση με τη θυμίνη που περιέχει το DNA. Λόγος A260/A280 χαμηλότερος από 2 μπορεί να οφείλεται σε πολύ μικρή συγκέντρωση νουκλεϊκού οξέος ή σε υπολείμματα φαινόλης ή άλλου αντιδραστηρίου της πειραματικής διαδικασίας και πρωτεΐνες, ενώ υψηλότερος λόγος δεν είναι ενδεικτικός κάποιας συγκεκριμένης αιτίας. Ο λόγος A260/A230 στο καθαρό RNA είναι συνήθως υψηλότερος από τον λόγο A260/A230 και κυμαίνεται μεταξύ 2-2.2. Χαμηλότερος λόγος είναι ενδεικτικός υπολείμματος φαινόλης ή γουανιδίνης στο δείγμα, ενώ υψηλότερος λόγος μπορεί να οφείλεται σε χρήση ακατάλληλου διαλύματος για την τυφλή μέτρηση.

Το φασματοφωτόμετρο που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία είναι το NanoDrop 1000 της Thermo scientific. Πρόκειται για ένα εξελιγμένης τεχνολογίας φασματοφωτόμετρο που συνδυάζει τις ιδιότητες της επιφανειακής τάσης και την τεχνολογία οπτικών ινών προκειμένου οι κυψελίδες και τα τριχοειδή να μην είναι πλέον απαραίτητα για τη μέτρηση των δειγμάτων. Επιπλέον πλεονεκτήματα αποτελούν η μέτρηση απορρόφησης σε μικρότερο μήκος διαδρομής μέσα στο δείγμα και η παροχή αποτελεσμάτων για μεγάλο εύρος μετρήσεων της συγκέντρωσης χωρίς την ανάγκη αραιώσεων, η χρήση πολύ μικρής ποσότητας δείγματος για τη μέτρηση (~2μl), η εμφάνιση των αποτελεσμάτων απορρόφησης με μορφή καμπύλης και η εμφάνιση σε πίνακα των υπολογισμένων συγκεντρώσεων και λόγων καθαρότητας για κάθε δείγμα όπως φαίνεται στα παρακάτω παραδείγματα.<sup>127-129</sup>

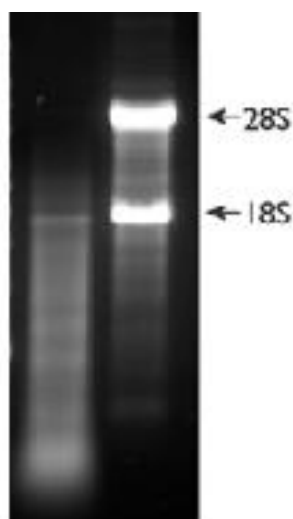
Sample ID	User ID	Date	Time	ng/ul	A260	A280	260/280	260/230	Constant	Cursor Pos.	Cursor abs.	340 raw
ML138	Default	11/10/20:1	1:35 μμ	1388,18	34,704	17,134	2,03	1,99	40,00	260	34,704	0,504
ML137	Default	11/10/20:1	1:38 μμ	1996,51	49,913	25,117	1,99	2,13	40,00	260	49,913	0,369
ML167	Default	11/10/20:1	1:42 μμ	712,31	17,808	8,979	1,98	2,08	40,00	260	17,808	-0,377
ML222	Default	11/10/20:1	1:46 μμ	1825,86	45,646	22,632	2,02	2,12	40,00	260	45,646	0,247



**Εικόνα 14:** Πίνακας λόγων καθαρότητας και συγκεντρώσεων φωτομέτρησης και αντίστοιχο γράφημα καμπύλων απορρόφησης υπεριώδους ακτινοβολίας των δειγμάτων.

#### 2.4.2.2 Ηλεκτροφόρηση RNA σε πήκτωμα αγαρόζης 1,5% (w/v)

Μία επιπλέον παράμετρος που πρέπει να προσδιοριστεί προκειμένου ένα δείγμα εκχυλίσματος RNA να θεωρηθεί υψηλής ποιότητας, εκτός από την ποσότητα και την καθαρότητα, είναι και η ακεραιότητά του. Η ακεραιότητα του RNA ελέγχεται με ηλεκτροφόρησή του σε πήκτωμα αγαρόζης. Τα μόρια RNA είναι αρνητικά φορτισμένα χάρη στις φωσφορικές τους ομάδες και με την εφαρμογή ηλεκτρικού πεδίου κινούνται προς την άνοδο (θετικός πόλος). Η αγαρόζη που χρησιμοποιείται στο πήκτωμα έχει την ιδιότητα να δημιουργεί ένα πλέγμα μέσα στο οποίο τα μόρια κινούνται δυσκολότερα ή ευκολότερα ανάλογα με το μέγεθός τους. Έτσι, το μέγεθος του μορίου καθορίζει και την πορεία του μέσα στο πήκτωμα με τα μεγαλύτερα μόρια να κινούνται πιο αργά από τα μικρά. Θα πρέπει ωστόσο να τονιστεί ότι επειδή το mRNA, η ακεραιότητα του οποίου εξετάζεται, αποτελεί πολύ μικρό ποσοστό του ολικού RNA των κυττάρων (4%), στην εικόνα της ηλεκτροφόρησης ενδεικτική της κατάστασης του mRNA αποτελεί η μετανάστευση στο πήκτωμα του rRNA (18S, 28S) που αποτελούν το 90% του RNA. Ριβονουκλεϊκό οξύ καλής ποιότητας εμφανίζει σε παρατήρηση του πηκτώματος με πηγή ακτινοβολίας στο υπεριώδες (UV), εικόνα δύο ζωνών rRNA: 28S και 18S μεγέθους 4712b και 1950b αντίστοιχα με την ένταση της πρώτης να είναι διπλάσια της δεύτερης όπως φαίνεται στην Εικόνα 14.



**Εικόνα 15:** Ηλεκτροφόρηση RNA σε πήκτωμα αγαρόζης 1,5% (w/v). Σύγκριση μεταξύ αποικοδομημένου (στην αριστερή πλευρά) και ακέραιου RNA (στη δεξιά πλευρά του πηκτώματος).

Ο ρυθμός μετακίνησης των μορίων RNA στο πήκτωμα αγαρόζης εξαρτάται από το μοριακό βάρος των μορίων, την συγκέντρωση της αγαρόζης, την ύπαρξη δευτεροταγών δομών στο μόριο, την ηλεκτρική τάση που εφαρμόζεται, τη σύνθεση του ρυθμιστικού διαλύματος ηλεκτροφόρησης και την παρουσία παρεμβαλλόμενων χρωστικών. Συγκεκριμένα, ο ρυθμός μετακίνησης ενός μορίου είναι αντιστρόφως ανάλογος του δεκαδικού λογαρίθμου ( $\log_{10}$ ) του αριθμού των ζευγών βάσεων. Η μετακίνησή του δε μέσω πηκτωμάτων διαφορετικής συγκέντρωσης αγαρόζης με διαφορετικό ρυθμό δίνεται από τη σχέση  $\log m = \log m_0 - KrT$ , όπου  $m$ : η ηλεκτροφορητική κινητικότητα του μορίου,  $m_0$ : η ελεύθερη ηλεκτροφορητική κινητικότητά του,  $Kr$ : ο συντελεστής καθυστέρησης και  $T$ : η συγκέντρωση του πηκτώματος. Για συγκέντρωση αγαρόζης 1,5% οι σχηματιζόμενοι πόροι επιτρέπουν τη διέλευση μορίων μεγέθους 200-3000bp με στόχο τον τελικό διαχωρισμό τους. Τα μόρια RNA επίσης, που διατηρούν τις δευτεροταγείς τους δομές μεταναστεύουν με διαφορετικό ρυθμό από τα πλήρως αποδιαταγμένα μόρια του ίδιου μοριακού βάρους. Γι' αυτό ένα ιδιαίτερο χαρακτηριστικό της ηλεκτροφόρησης RNA είναι η χρήση αποδιατακτικού παράγοντα. Συνήθως χρησιμοποιείται το φορμαμίδιο, ως συστατικό της χρωστικής, ένα παράγωγο του φορμικού (μυρμηγκικού) οξέος το οποίο δρα σαν σταθεροποιητικό του RNA απομακρύνοντας από αυτό ιόντα και διατηρώντας το έτσι σε μονόκλινη κατάσταση (denatured form). Όσον αφορά στην εφαρμοζόμενη τάση, σε χαμηλή τάση ο ρυθμός

μετανάστευσης είναι ανάλογος της τάσης όσο όμως αυξάνονται τα Volts η κινητικότητα των μεγάλου μεγέθους μορίων διαφοροποιείται και η σχέση γίνεται αντιστρόφως ανάλογη. Η βέλτιστη εφαρμοζόμενη τάση είναι 5V/cm. Η επιλογή του ηλεκτροφορητικού διαλύματος γίνεται βάσει της αγωγιμότητας. Εάν στο διάλυμα δεν περιέχονται καθόλου ιόντα, το RNA μετακινείται πολύ αργά ή και καθόλου ενώ αν χρησιμοποιηθεί πολύ πυκνό διάλυμα (10x), η ηλεκτρική αγωγιμότητα είναι πολύ μεγάλη, το κύκλωμα παράγει μεγάλο ποσό θερμότητας και το πήκτωμα λιώνει. Συνήθως χρησιμοποιούνται δύο τύποι διαλυμάτων το TAE και το TBE. Αποτελούνται από τα αντιδραστήρια Tris (Tris-Hydroxymethyl-aminomethane), EDTA και ακετικό ή βορικό οξύ αντίστοιχα. Τέλος, η παρεμβαλλόμενη χρωστική βρωμιούχο αιθίδιο μειώνει την ηλεκτροφορητική κινητικότητα του γραμμικού RNA κατά περίπου 15%.

Η χρωστική που χρησιμοποιείται είναι η 2X RNA Loading Dye η οποία περιέχει τις χρωστικές μπλε της βρωμοφαινόλης (bromophenol blue) και ξυλένιο (xylene cyanol FF), που δίνουν τη δυνατότητα παρατήρησης με γυμνό οφθαλμό της πορείας των μορίων κατά τη διαδικασία της ηλεκτροφόρησης, καθώς και τη χρωστική βρωμιούχο αιθίδιο, χάρη στην οποία οι ζώνες που δημιουργούν τα ηλεκτροφορούμενα μόρια είναι ορατά υπό τη λάμπα υπεριώδους ακτινοβολίας στο τέλος της ηλεκτροφόρησης. Στο πήκτωμα αγαρόζης η χρωστική μπλέ της βρωμοφαινόλης μετακινείται ελαφρώς γρηγορότερα από το 5S rRNA, ενώ το ξυλένιο μεταναστεύει ελαφρώς βραδύτερα από το 18S rRNA. Το βρωμιούχο αιθίδιο έχει την ιδιότητα να παρεμβάλλεται ανάμεσα στα νουκλεοτίδια και συγκεκριμένα στη μεγάλη αύλακα του DNA ή RNA για αυτό και φθορίζει υπό UV ακτινοβολία. Επιπλέον, συνίσταται η προσθήκη βρωμιούχου αιθιδίου στο ρυθμιστικό διάλυμα της ηλεκτροφόρησης. Εκτός από τις τρεις αυτές χρωστικές στο διάλυμα 2X RNA Loading Dye περιέχεται ο αποδιατακτικός παράγοντας φορμαμίδιο όπως προαναφέρθηκε, EDTA και γλυκερόλη. Το EDTA δεσμεύει τα δισθενή μεταλλοϊόντα και αναστέλλει τις νουκλεάσες που εξαρτώνται από αυτά, ενώ η γλυκερόλη που περιέχεται στη χρωστική επιτρέπει στο δείγμα να μένει μέσα στα πηγαδάκια, λόγω του μεγάλου μοριακού της βάρους.<sup>130-132</sup>

### **Παρασκευή του πηκτώματος 1,5% w/v αγαρόζης**

Αρχικά γίνεται η παρασκευή του ρυθμιστικού διαλύματος της ηλεκτροφόρησης. Χρησιμοποιείται το TBE το οποίο σε αντίθεση με το TAE προτιμάται για μικρότερου

μεγέθους RNA μόρια. Παρασκευάζεται και αποθηκεύεται ως διάλυμα 10x και για τις ανάγκες της ηλεκτροφόρησης αραιώνεται ώστε να έχει τελική συγκέντρωση 1x. Αναμιγνύονται τα αντιδραστήρια Tris (Tris-Hydroxymethyl-aminomethane), EDTA και βορικό οξύ σε ποσότητες 107.8g, 7.3g και 55.03g αντίστοιχα και διαλύονται σε 1L απιονισμένου νερού. Το τελικό pH του διαλύματος ρυθμίζεται στο 8.0 με σταδιακή προσθήκη HCL 12N. Η αραιώση 1:10 γίνεται με προσθήκη 720 ml απιονισμένου νερού σε 80 ml διαλύματος TBE 10x και από αυτό το διάλυμα στη συνέχεια χρησιμοποιούνται 100 ml στα οποία προστίθεται 1,5 g αγαρόζης. Κατά την προσθήκη της αγαρόζης στο διάλυμα TBE 1x πραγματοποιείται ταυτόχρονη ήπια, κυκλική ανάδευση με το χέρι, ώστε να διαλυθεί επαρκώς η αγαρόζη. Η ανάδευση με το χέρι συνεχίζεται για 5 λεπτά ακόμη και έπειτα το ποτήρι ζέσεως τοποθετείται στο φούρνο μικροκυμάτων για 2 λεπτά στα 440W. Αφού αναδευτεί 2-3 λεπτά ακόμη αφήνεται σε θερμοκρασία δωματίου να κρυώσει (να αποκτήσει θερμοκρασία 50-60°C) για περίπου 20 λεπτά. Παράλληλα, προετοιμάζεται η συσκευή ηλεκτροφόρησης με την τοποθέτηση και στερέωση με κολλητική ταινία των ειδικών λάστιχων και την τοποθέτηση σε προθερμασμένο στους 55°C κλίβανο ώστε να έχει περίπου την ίδια θερμοκρασία με το πήκτωμα. Έτσι, αποφεύγεται η γρήγορη πήξη του κατώτερου στρώματος του πηκτώματος από την επαφή με πολύ χαμηλότερης θερμοκρασίας συσκευή. Η τοποθέτηση του υγρού ακόμη πηκτώματος στη συσκευή γίνεται αφού προηγουμένως προστεθούν σε αυτό 10μl βρωμιούχου αιθιδίου. Τέλος στην συσκευή με το πήκτωμα τοποθετούνται οι χτένες στις ειδικές υποδοχές για το σχηματισμό των πηγαδιών. Μετά από περίπου 45min, αφαιρούνται οι χτένες από το πήκτωμα, η βάση τοποθετείται στη συσκευή ηλεκτροφόρησης και πληρώνεται με διάλυμα TBE0.5x μέχρι να καλυφθεί το πήκτωμα. Το διάλυμα TBE0.5x, παρασκευάζεται με ανάμιξη 400ml διαλύματος TBE1x με ίσο όγκο d.H<sub>2</sub>O.

#### **Προετοιμασία και φόρτωση των δειγμάτων στα πηγάδια του πηκτώματος αγαρόζης**

Αρχικά υπολογίζεται ο όγκος κάθε δείγματος που αντιστοιχεί σε 1μg RNA και στον όγκο αυτό προστίθενται 2μl RNA loading dye 2x και όγκος διαλύματος TBE 1x ώστε ο συνολικός όγκος να είναι 10μl για κάθε πηγάδι. Αφού αναμιχθούν επαρκώς τα συστατικά μέσα σε κάθε eppendorf, φορτώνονται στις αντίστοιχες θέσεις του

πηκτώματος. Ο αρνητικός πόλος (κάθοδος) τοποθετείται κοντά στα πηγαδάκια και ο θετικός πόλος (άνοδος) στην αντιδιαμετρική θέση και εφαρμόζεται ρεύμα τάσης 90 Volts για 45 λεπτά. Μετά το πέρας των 45 λεπτών το πήκτωμα μεταφέρεται στην τράπεζα UV και με χρήση προστατευτικής μάσκας για τα μάτια, παρατηρείται κάτω από το υπεριώδες φως. Λαμβάνονται φωτογραφίες με ψηφιακή φωτογραφική μηχανή (flash off).

### **2.4.3 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR)**

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) αποτελεί μια *in vitro* απλή, ταχεία, επιλεκτική και εξαιρετικά ευαίσθητη μέθοδο πολλαπλασιασμού του γενετικού υλικού ενός οργανισμού, η οποία πραγματοποιείται με τη βοήθεια ενζύμου. Η μέθοδος ανακοινώθηκε στην επιστημονική κοινότητα για πρώτη φορά το 1985 και πλέον αποτελεί σημαντικό ερευνητικό και διαγνωστικό εργαλείο. Οι εφαρμογές της συνίστανται σε ανάλυση μεταλλάξεων ή πολυμορφισμών γονιδίων σε μοριακό επίπεδο, όπου είναι απαραίτητες αρκετά μεγάλες ποσότητες του DNA, ανίχνευση και τυποποίηση εξωγενούς γενετικού υλικού παθογόνων οργανισμών όπως μικροβίων και ιών ή ανίχνευση της έκφρασης ενδογενούς γενετικού υλικού, που σχετίζεται με παθολογικές ή μη καταστάσεις. Η αντίστροφη μεταγραφή αποτελεί απαραίτητο βήμα προκειμένου το mRNA να εντοπιστεί και να μεταγραφεί, έτσι ώστε ως Cdna (complementary DNA) να αποτελέσει εκμαγείο για την αντίδραση της PCR και να πολλαπλασιαστεί. Με τη βοήθεια της αντίστροφης μεταγραφής δίνεται επιπλέον η δυνατότητα μελέτης RNA ιών όπως ο ιός της ανθρώπινης ανοσοανεπάρκειας (HIV) και ο ιός της ηπατίτιδας C (HCV) και συμβάλλει στην προετοιμασία των δειγμάτων για μετέπειτα μελέτη κι άλλων τεχνικών όπως Real-Time PCR, HPLC (high-pressure-liquid chromatography) και microarray analysis.

#### **2.4.3.1 Αντίστροφη μεταγραφή**

Η αντίστροφη μεταγραφή είναι μία μέθοδος που χρησιμοποιείται για τη δημιουργία cDNA βιβλιοθηκών μέσω αντιγραφής πολύ μικρών ποσοτήτων mRNA. Η αντίδραση βασίζεται στη δράση ενός ιικού ενζύμου, της αντίστροφης μεταγραφάσης. Συγκεκριμένα, αφού στα μόρια RNA υβριδοποιηθούν οι κατάλληλοι εκκινητές, η αντίστροφη μεταγραφάση προσθέτει στην καινούρια αλυσίδα τα συμπληρωματικά δεοξυριβονουκλεοτίδια. Τα πιο συχνά χρησιμοποιούμενα ένζυμα είναι η AMV-RT (avian

myeloblastosis virus- reverse transcriptase) και η MMLV-RT (Moloney murine leukaemia virus- reverse transcriptase). Η AMV έχει ισχυρότερη μεταγραφική δραστηριότητα σε σχέση με την MMLV και διατηρεί τη δράση της μέχρι τους 55°C. Επιπλέον η δράση της δεν εμποδίζεται από τις δευτεροταγείς δομές του RNA. Από την άλλη, η MMLV έχει σημαντικά χαμηλότερη ενεργότητα RNase H, με αποτέλεσμα να μην αποικοδομείται το RNA μόριο των υβριδίων RNA:Cdna, γι αυτό και προτιμάται για την αντίστροφη μεταγραφή μεγάλων τμημάτων mRNA. Και τα δύο ένζυμα ωστόσο δεν διαθέτουν δράση 3'-5' εξωνουκλεάσης γι' αυτό και δεν αποφεύγονται λάθη. Οι εκκινητές που μπορούν να χρησιμοποιηθούν είναι είτε oligo-dT, που έχει την ιδιότητα να προσδέεται στην poly-A ουρά των ευκαρυωτικών μορίων mRNA την οποία αποκτούν όλα με πολυαδενυλίωση κατά την ωρίμανσή τους, ή τυχαίες αλληλουχίες εξανουκλεοτιδίων (random hexamers) ή ειδικοί εκκινητές για κάποιο γονίδιο (gene-specific primers). Η επιλογή των gene-specific primers έχει το πλεονέκτημα της μείωσης του υβριδισμού σε ανεπιθύμητες περιοχές συμπεριλαμβανομένου του γενωμικού DNA, ενώ η χρήση των άλλων τύπων εκκινητών αυξάνει την απόδοση της αντίδρασης καθώς περισσότερα μόρια mRNA μπορούν να αναλυθούν από ένα μικρής ποσότητας δείγμα.

Για την πραγματοποίηση της αντίδρασης απαιτείται επιπλέον η παρουσία κατάλληλης συγκέντρωσης μίγματος τριφωσφορικών δεοξυριβονουκλεοτιδίων (dNTP's), αναστολέα των RNασών (RNase Inhibitor), ρυθμιστικού διαλύματος που παρέχει στο ένζυμο το κατάλληλο περιβάλλον για την άριστη δράση του, και DNase/RNase-free water.<sup>133-135</sup>





**Εικόνα 16:** Διαδικασία αντίστροφης μεταγραφής. (Ο oligo-dT εκκινητής προσδένεται στην poly-A ουρά του 3' άκρου του mRNA και η αντίστροφη μεταγραφή αντιγράφει το mRNA για να παραχθεί το cDNA). (Ανατύπωση από <http://universe-review.ca/R11-16-DNAsequencing.html>)

Το πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε στην παρούσα εργασία είναι το εξής:

Αρχικά, υπολογίζεται ο όγκος του εκχυλίσματος RNA που αντιστοιχεί σε 1μg RNA. Ο όγκος αυτός αφαιρείται από 14μl ώστε να υπολογιστεί η ποσότητα του DNase/RNase-free water που θα προστεθεί σε κάθε erpendorf των δειγμάτων. Προστίθεται λοιπόν ο κατάλληλος όγκος DNase/RNase-free water, ο oligodT primer (1μl σε κάθε δείγμα) και έπειτα το RNA. Οι συγκεντρώσεις και οι όγκοι των αντιδραστηρίων βρίσκονται στον παρακάτω πίνακα:

Αντιδραστήριο	Όγκος (μl)	Τελική συγκέντρωση
DNase/RNase-free water	$15.0 - (1.0 + V_{RNA})$	
Oligo-dT (100 pmol/μL)	1.0	6.67Mμ
Ολικό RNA	$V_{RNA}$	1.0 μg ολικού RNA
Ολικός όγκος	15.0	

**Πίνακας 3:** Όγκοι και συγκεντρώσεις μίγματος ολικού RNA- DNase/RNase-free water και Oligo-dT.

Τα δείγματα τοποθετούνται στο θερμοκυκλοποιητή σε πρόγραμμα 70°C για 5min και 4°C για μερικά δευτερόλεπτα ώστε να αποδιαταχθούν οι δίκλωνες δομές που έχει σχηματίσει το RNA και να προσδεθεί ο oligo-dT. Παράλληλα παρασκευάζεται το μείγμα της αντίδρασης βάσει των συγκεντρώσεων που αναφέρονται στον πίνακα 2. Ο

υπολογισμός της ποσότητας του κάθε αντιδραστήριου γίνεται βάσει του αριθμού των δειγμάτων που συμπεριλαμβάνονται στην αντίδραση και σε αυτόν προστίθεται μικρή ποσότητα που αντιστοιχεί σε πιθανές απώλειες του όγκου του μείγματος κατά τον χειρισμό του και ένα επιπλέον δείγμα που αντιστοιχεί στον θετικό μάρτυρα (PC) της αντίδρασης. Ο θετικός μάρτυρας είναι εκχύλισμα RNA άριστης ποιότητας το οποίο έχει δώσει θετικό αποτέλεσμα σε προηγούμενες αντιδράσεις (συγκεκριμένα χρησιμοποιήθηκε RNA από την κυτταρική σειρά HL-60- Human Promyelocytic Leukemia cells). Η χρήση του γίνεται για να επιβεβαιωθεί ότι εξασφαλίζονται οι κατάλληλες συνθήκες κατά τη διάρκεια της αντίδρασης και ότι τα αντιδραστήρια είναι καλής ποιότητας.

Αντιδραστήριο	Όγκος (μl)	Τελική συγκέντρωση
DNase/RNase-free water	1.8	-
dNTP's	1.0	0.5Mm
10xRT Buffer	2.0	1x
RNase Inhibitor (40U/μl)	0.1	0.2U/μl
MMLV Reverse Transcriptase (200 U/μl)	0.1	1 U/μl
Ολικός όγκος	5.0	

**Πίνακας 4:** Όγκοι και συγκεντρώσεις μείγματος αντίδρασης.

Ύστερα από επαρκή ανάδευση, διαμοιράζονται 5μl του μείγματος σε κάθε δείγμα. Ακολούθως, τα δείγματα τοποθετούνται στο θερμοκυκλοποιητή. Αρχικά στους 37 °C για 55min έπειτα στους 70 °C για 15min και τέλος στους 4 °C για περαιτέρω. Η θερμοκρασία 37 °C κρίνεται ως η όψιμη θερμοκρασία δράσης της αντίστροφης μεταγραφάσης MMLV, ενώ η θερμοκρασία 70 °C απαιτείται για την αδρανοποίηση του ενζύμου. Τέλος, τα cDNAs αποθηκεύονται στους -20 °C.

#### **2.4.3.2 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (conventional PCR)**

##### **Αρχή της μεθόδου**

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης είναι μία επαναλαμβανόμενη, αμφίδρομη, in vitro αντίδραση που επιτρέπει τον πολλαπλασιασμό μιας προεπιλεγμένης αλληλουχίας

DNA σε πολλά αντίγραφα σε σύντομο χρονικό διάστημα. Αυτό επιτυγχάνεται μέσω επιμήκυνσης της αλληλουχίας που δημιουργείται από την πρόσδεση ειδικών εκκινητών σε συγκεκριμένη περιοχή του νουκλεϊκού οξέος. Αποτελεί μια νέα τεχνική της μοριακής βιολογίας που εφαρμόζεται εκτενώς τόσο στο χώρο της μοριακής βιολογίας όσο και της ιατρικής. Εφευρέτης της μεθόδου αυτής είναι ο Kerry Mullis, ο οποίος την ανακοίνωσε το 1984 και τιμήθηκε γι' αυτήν με βραβείο Νόμπελ Χημείας το 1993.

Για την αντίδραση απαιτείται η παρουσία δύο ολιγονουκλεοτιδικών εκκινητών, των τεσσάρων ειδών δεοξυφωσφονουκλεοτιδίων (dNTPs), ιόντων μαγνησίου, σε περίσσεια σε σχέση με τα dNTPs που προστέθηκαν, και μιας θερμοσταθερής DNA πολυμεράσης που θα πραγματοποιήσει τη σύνθεση του DNA. Μία συνηθισμένη τεχνική που αυξάνει την απόδοση και την ειδικότητα της αντίδρασης είναι η τεχνική θερμής έναρξης (hot start), όπου μία αρχική θέρμανση στους 92°C οδηγεί στην DNA σύνθεση μόνο από εκκινητές με ακριβή υβριδοποίηση.

Η αντίδραση περιλαμβάνει τα εξής τρία στάδια: την αποδιάταξη του δίκλωνου DNA, την υβριδοποίηση των εκκινητών στην επιθυμητή αλληλουχία και την επιμήκυνση με τη βοήθεια του ενζύμου της πολυμεράσης. Η αποδιάταξη του δίκλωνου μορίου επιτυγχάνεται με αύξηση της θερμοκρασίας στους 92-96°C ώστε να σπάσουν οι δεσμοί υδρογόνου μεταξύ των δύο αλυσίδων. Ο χρόνος που χρειάζεται εξαρτάται από τη σύνθεση των βάσεων του DNA, τον θερμοκυκλοποιητή και τον όγκο της αντίδρασης. Μετά την αποδιάταξη, οι εκκινητές πρέπει να υβριδοποιηθούν στις συμπληρωματικές αλληλουχίες των άκρων των δύο αλυσίδων του DNA. Η θερμοκρασία που απαιτείται για αυτό το στάδιο ποικίλλει από 37 °C έως 65 °C και εξαρτάται από την ομολογία των εκκινητών με την αλληλουχία στόχο καθώς και από τη σύνθεση των βάσεων των ολιγονουκλεοτιδίων. Οι εκκινητές πρέπει να βρίσκονται σε περίσσεια συγκέντρωσης και να είναι μικρότερου μήκους σε σχέση με το DNA, ώστε ο υβριδισμός τους να ξεπερνά σε ρυθμό την επανένωση των συμπληρωματικών αλυσίδων. Το τρίτο στάδιο τέλος της επιμήκυνσης πραγματοποιείται συνήθως στους 72 °C και ο χρόνος εξαρτάται από το μήκος του προϊόντος της αντίδρασης.

### **Ειδικότητα, απόδοση και πιστότητα της PCR**

Η ειδικότητα, απόδοση και πιστότητα της αντίδρασης αφορούν ιδανικά στην ενίσχυση μόνο της αλληλουχίας στόχου, στην απόδοση των περισσότερων προϊόντων

με τους λιγότερους κύκλους και στην ύπαρξη αμελητέου αριθμού λαθών κατά τη δράση της πολυμεράσης αντίστοιχα. Οι τρεις αυτές παράμετροι επηρεάζονται από πληθώρα παραγόντων:

- Η ποιότητα και η συγκέντρωση των αλληλουχιών στόχων του DNA επηρεάζουν άμεσα την αποτελεσματικότητα της αντίδρασης. Για μια τυπική PCR προτείνεται πρότυπο DNA με  $10^4$  έως  $10^8$  μόρια, ενώ απαραίτητα είναι η καθαρότητα και η ακεραιότητα του DNA.
- Ο κατάλληλος σχεδιασμός των εκκινητών και η χρήση τους στην κατάλληλη συγκέντρωση παίζουν ρόλο στην απόδοση και την ειδικότητα της αντίδρασης. Οι κανόνες που πρέπει να ακολουθούνται στον σχεδιασμό τους είναι οι εξής: α) Το ιδανικό μήκος είναι 18-28 βάσεις. Μικρότερου μήκους εκκινητές είναι λιγότερο ειδικοί αλλά προσφέρουν μεγαλύτερη αποδοτικότητα, ενώ μεγαλύτεροι σε μήκος βελτιώνουν την ειδικότητα εις βάρος της απόδοσης. β) Οι θερμοκρασίες τήξης ( $T_m$ - Melting Temperature) των εκκινητών, του πρόσθιου εκκινητή (που υβριδίζεται στον κλώνο 3'→5') και του ανάστροφου (που υβριδίζεται στον κλώνο 5'→3') πρέπει να διαφέρουν μεταξύ τους από 2 °C έως 5 °C. Ως θερμοκρασία τήξης ορίζεται η θερμοκρασία αποχωρισμού των εκκινητών από την αλληλουχία στόχο. γ) Πρέπει να αποφευχθούν συμπληρωματικές αλληλουχίες μεταξύ των δύο εκκινητών αλλά και στον καθένα ξεχωριστά. Έτσι μειώνεται η δημιουργία διμερών εκκινητών που ανταγωνίζονται την ενίσχυση του επιθυμητού προϊόντος και των δευτεροταγών δομών σε αυτούς. δ) Η θερμοκρασία τήξης  $T_m$  των εκκινητών πρέπει να είναι μεγαλύτερη από 50°C ώστε η απόδοση και η πιστότητα της αντίδρασης να είναι ικανοποιητικές, με προτεινόμενες θερμοκρασίες τους 62 °C και 70 °C ε) Η περιεκτικότητα σε GC πρέπει να είναι 40-60%, καθώς έτσι διασφαλίζεται υψηλότερη  $T_m$  και ειδικότητα της αντίδρασης. στ) Η συγκέντρωση των εκκινητών πρέπει να είναι ίδια μεταξύ 0,05 και 0,5 μM.
- Η συγκέντρωση του μαγνησίου είναι σημαντική για την επιτυχία της PCR καθώς επηρεάζει τη δράση της DNA πολυμεράσης και τον υβριδισμό των εκκινητών και αυξάνει την  $T_m$  του δίκλωνου μορίου του DNA. Η περίσσεια μαγνησίου οδηγεί σε συσσώρευση μη ειδικών προϊόντων ενώ η μικρότερη ποσότητα μειώνει την

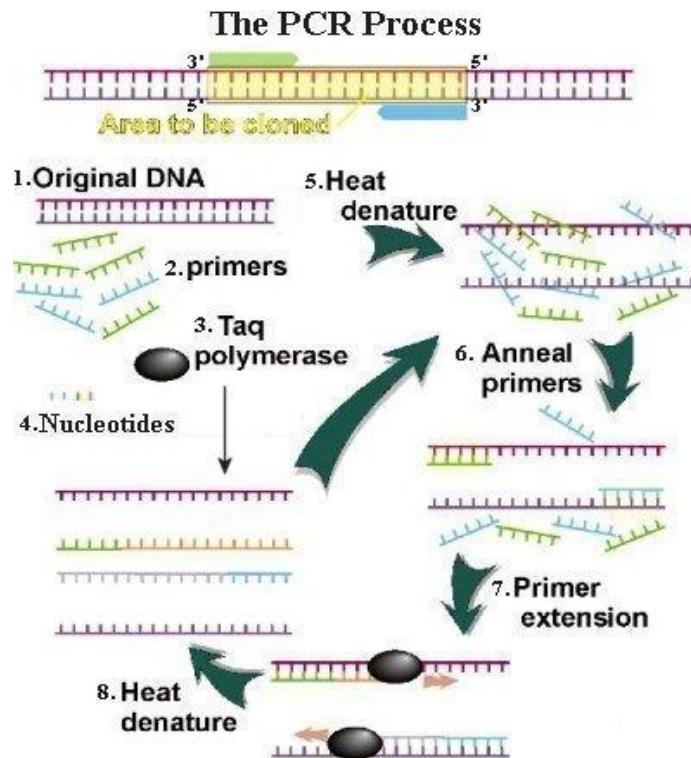
απόδοση της αντίδρασης. Η συγκέντρωση πρέπει να κυμαίνεται μεταξύ 0,5-5 mM και να υπερέχει αυτής των dNTPs κατά 0,5-2,5 mM.

- Η συγκέντρωση των dNTPs πρέπει να κυμαίνεται από 20 μέχρι 200  $\mu$ M για κάθε δεοξυριβονουκλεοτίδιο.
- Το κλασικό ρυθμιστικό διάλυμα που χρησιμοποιείται για την Taq DNA πολυμεράση περιέχει 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl (pH 8,3 σε θερμοκρασία δωματίου) και 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>. Αν και το διάλυμα αυτό χρησιμοποιείται επιτυχώς σε πολλών ειδών αντιδράσεις, το ιδανικό ρυθμιστικό διάλυμα για κάθε PCR εξαρτάται από την αλληλουχία στόχο, την αλληλουχία των εκκινήτων και τη συγκέντρωση συστατικών της αντίδρασης (π.χ. dNTPs και εκκινήτων)
- Το πιο συχνά χρησιμοποιούμενο ένζυμο στην PCR αντίδραση είναι η Taq DNA polymerase χάρη στην θερμοανθεκτικότητά της. Η πολυμεράση αυτή έχει απομονωθεί από το gram (-) βακτήριο *Thermus Aquaticus*. Η βέλτιστη θερμοκρασία λειτουργίας της είναι οι 75 °C με 80 °C και ο χρόνος ημίσειας ζωής της είναι 40 λεπτά στους 95 °C, χρόνος αρκετός ώστε να παραμείνει ενεργή για πάνω από 30 κύκλους. Η αύξηση της συγκέντρωσης του ενζύμου μπορεί να αυξήσει την αποτελεσματικότητα της αντίδρασης, μειώνει όμως την ειδικότητα. Ένα άλλο χαρακτηριστικό της Taq DNA polymerase είναι η έλλειψη ενεργότητας 3'→5' εξωνουκλεάσης.
- Μια σημαντική παράμετρος της αντίδρασης είναι ο τελικός όγκος της, ο οποίος πρέπει να κυμαίνεται μεταξύ 20-100 $\mu$ l. Μεγαλύτεροι όγκοι δεν επιτρέπουν αποτελεσματική εναλλαγή θερμοκρασιών στο δείγμα, ενώ μικρότεροι όγκοι σχετίζονται με χαμηλή απόδοση.
- Οι τρεις αυτές παράμετροι, η ειδικότητα, η απόδοση και η πιστότητα της αντίδρασης τέλος επηρεάζονται από τον αριθμό των κύκλων της αντίδρασης και τη θερμοκρασία και διάρκεια κάθε σταδίου. Πολύ μικρός αριθμός κύκλων έχει ως αποτέλεσμα μικρή απόδοση της αντίδρασης. Από την άλλη ο μέγιστος αριθμός κύκλων περιορίζεται από την φάση plateau της αντίδρασης και τον συνδυασμό της θερμικής απενεργοποίησης της πολυμεράσης μετά το στάδιο της αποδιάταξης, τη μείωση της αποτελεσματικότητας της αποδιάταξης και την

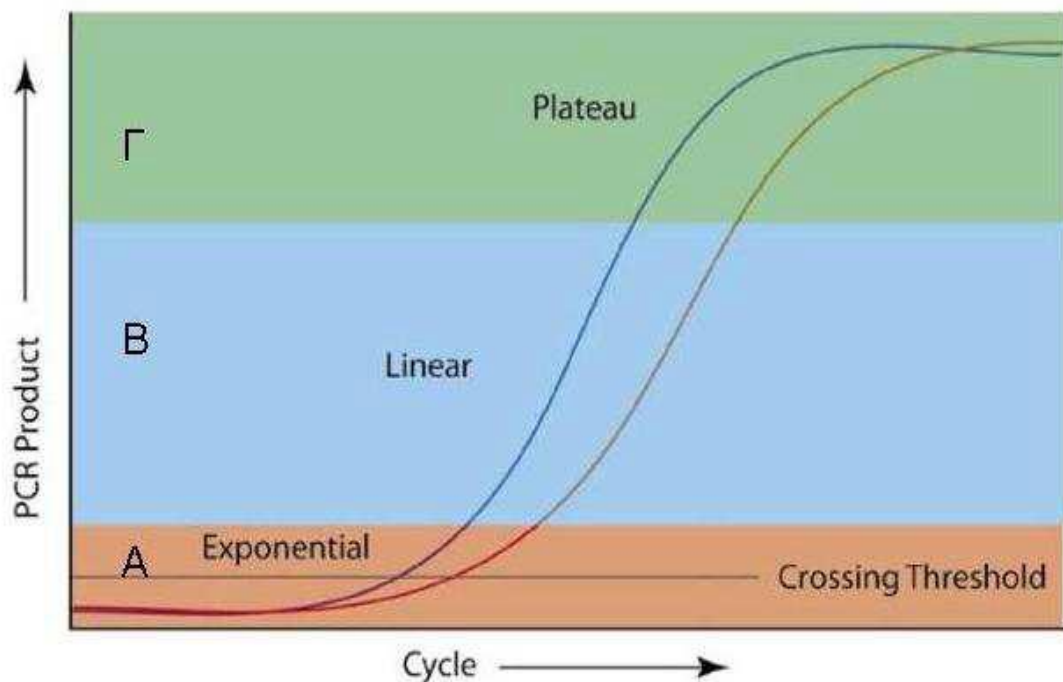
μείωση της αποτελεσματικής υβριδοποίησης των εκκινητών. Οι περισσότερες αντιδράσεις πραγματοποιούνται μεταξύ 20 και 40 κύκλων.

Αναλυτικότερα, το πρώτο στάδιο αποδιάταξης πραγματοποιείται στους 90 °C με 98 °C για περίπου 2-5 λεπτά. Στην πραγματικότητα ο χρόνος που χρειάζεται για την αποδιάταξη του DNA είναι μόλις λίγα δευτερόλεπτα στην κατάλληλη για την αλληλουχία θερμοκρασία, ωστόσο χρησιμοποιούνται υψηλότερες θερμοκρασίες και μεγαλύτερη διάρκεια επώασης σε ορισμένες περιπτώσεις όπως τα μόρια με μεγάλη συγκέντρωση GC. Από την άλλη, αν και η υψηλότερη θερμοκρασία και η μεγαλύτερη διάρκεια επώασης οδηγούν σε ασφαλέστερη αποδιάταξη, μπορεί να προκαλέσουν αποπουρίνωση του DNA που τελικά μειώνει την αποτελεσματικότητα της αντίδρασης. Η θερμοκρασία του σταδίου υβριδισμού των εκκινητών εξαρτάται από το είδος των βάσεων, την αλληλουχία των νουκλεοτιδίων και το μήκος και τη συγκέντρωση των εκκινητών. Η συνήθης θερμοκρασία υβριδισμού είναι 5 °C χαμηλότερη από την υπολογισμένη  $T_m$  των εκκινητών μεταξύ 55 °C και 70 °C. Η αύξηση της θερμοκρασίας υβριδοποίησης αυξάνει την ειδικότητα της αντίδρασης. Ως προς τη διάρκεια του υβριδισμού για μια τυπική συγκέντρωση 200μM εκκινητών απαιτούνται λίγα δευτερόλεπτα, όμως για ασφαλέστερο υβριδισμό συστήνονται 30 sec με 1 min. Για το στάδιο της επιμήκυνσης η βέλτιστη θερμοκρασία για τη δράση της Taq polymerase είναι οι 72 °C στην οποία αναμένεται επιμήκυνση 3500 νουκλεοτιδίων ανά λεπτό. Ένα επιπλέον στάδιο 5-10 λεπτών στους 72 °C συστήνεται για να εξασφαλιστεί πλήρης επιμήκυνση.<sup>136,137</sup>

Η διαδικασία της PCR χωρίζεται σε τρεις φάσεις: την εκθετική (exponential) φάση κατά την οποία έχει αρχίσει ο πολλαπλασιασμός της προεπιλεγμένης αλληλουχίας DNA και η αποτελεσματικότητα της αντίδρασης είναι τέτοια ώστε σε κάθε κύκλο η αλληλουχία να διπλασιάζεται, τη γραμμική (linear) φάση, στην οποία παρατηρείται μειωμένη παραγωγή αντιγράφων της αλληλουχίας λόγω μείωσης της ενεργότητας των αντιδραστηρίων και τέλος τη φάση Plateau όπου η αντίδραση έχει τερματιστεί εξαιτίας της εξάντλησης των αντιδραστηρίων.



**Εικόνα 17:** Η διαδικασία της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (PCR). (Heather D. VanGuilder, Kent E. Vrana, and Willard M. Freeman *Twenty-five years of quantitative PCR for gene expression analysis BioTechniques 25th Anniversary, April 2008;44 (5): 619–626*)



**Εικόνα 18:** Οι φάσεις της αντίδρασης της αλυσιδωτής πολυμεράσης. Διακρίνονται η εκθετική, η γραμμική φάση και η φάση plateau. (Ανατύπωση από [http://www.scielo.org.co/scielo.php?pid=S165795342011000200016&script=sci\\_arttext&lng=pt](http://www.scielo.org.co/scielo.php?pid=S165795342011000200016&script=sci_arttext&lng=pt))

Η χρήση ενός γονιδίου αναφοράς, ως προς το οποίο κανονικοποιείται η έκφραση των υπό μελέτη γονιδίων στις ποσοτικές μεθόδους είναι απαραίτητη προκειμένου να αποφευχθούν λάθη λόγω διαφορετικών χαρακτηριστικών των δειγμάτων, όπως παραδείγματος χάριν του αρχικού τους όγκου. Το βασικό κριτήριο επιλογής του γονιδίου αναφοράς είναι η σταθερή και όχι η ρυθμιζόμενη έκφρασή του μεταξύ των διαφορετικών τύπων κυττάρων καθώς και κυττάρων παθολογικής προέλευσης. Μερικά από αυτά που χρησιμοποιούνται είναι το *GAPDH* (glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase), η β-ακτίνη, το rRNA, η ιστόνη H3 και η κυκλοφυλλίνη. Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε ως κανονικοποιητής το γονίδιο *GAPDH*, το οποίο συμμετέχει στη διαδικασία της γλυκόλυσης και καταλύει τη μετατροπή δύο μορίων 3-φωσφορικής γλυκεραλδεΐδης σε δύο μόρια 1,3-διφωσφογλυκερικού οξέος με την αναγωγή δύο μορίων NAD<sup>+</sup> σε NADH.<sup>138</sup>

Η αλληλουχία των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκε είναι η ακόλουθη:

<i>GAPDH</i> εκκινητές	Αλληλουχία	T <sub>m</sub> (°C)	Μήκος (nt)	GC %	M.B. (g/mol)
Πρόσθιος (F)	5'-CCA CAT CGC TCA GAC ACC AT-3'	5 8,1	20	5 5,0	599 1,0
Ανάστροφος (R)	5'- TGA CAA GCT TCC CGT TCT CA-3'	5 8,0	20	5 0,0	602 8,0
Μέγεθος προϊόντος	240 bp				

**Πίνακας 5:** Αλληλουχία των εκκινητών του γονιδίου *GAPDH*.

Το πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε στην παρούσα εργασία είναι το εξής: Αρχικά παρασκευάζεται το μείγμα των αντιδραστηρίων βάσει των υπολογισμένων όγκων και συγκεντρώσεων. Εκτός από τα δείγματα προς μελέτη, συνυπολογίζονται ένας θετικός μάρτυρας (PC) και ένας αρνητικός μάρτυρας. Ο θετικός μάρτυρας, ο οποίος είναι cDNA από την κυτταρική σειρά HL-60 (Human Promyelocytic Leukemia cells) το οποίο έχει



παραχθεί από την προηγούμενη αντίδραση αντίστροφης μεταγραφής, χρησιμεύει ώστε να επιβεβαιωθεί ότι εξασφαλίζονται οι κατάλληλες συνθήκες κατά τη διάρκεια της αντίδρασης και ότι τα αντιδραστήρια είναι καλής ποιότητας. Ο αρνητικός μάρτυρας χρησιμοποιείται για τον έλεγχο τυχόν επιμόλυνσης των δειγμάτων λόγω πειραματικών συνθηκών ή λόγω των αντιδραστηρίων που χρησιμοποιούνται. Τα αντιδραστήρια πριν την προσθήκη τους στο μείγμα, αναδεύονται επαρκώς, ενώ στο διάλυμα του MgCl<sub>2</sub> γίνεται και ανάδευση με vortex. Αφού προετοιμαστεί το μείγμα της αντίδρασης, μεταφέρεται 1μl cDNA κάθε δείγματος στο αντίστοιχο σωληνάριο για PCR και σε αυτό προστίθενται 49μl από το μείγμα. Στο σωληνάριο του αρνητικού μάρτυρα προστίθενται μόνο 49μl από το μείγμα. Ακολουθώντας, τα δείγματα τοποθετούνται στο θερμοκυκλοποιητή, όπου ακολουθείται το εξής πρόγραμμα: αρχικά, εφαρμόζεται θερμοκρασία 95 °C για 2min (denaturation), ώστε να αποδιαταχθούν τα υβρίδια mRNA:cDNA με τη διάσπαση των δεσμών υδρογόνου και να καταστραφούν τυχόν δευτεροταγείς δομές που έχουν σχηματιστεί. Η θερμοκρασία διατηρείται στους 95 °C για 30sec ακόμα και στη συνέχεια κατέρχεται στους 60 °C για 30sec, ώστε να υβριδοποιηθούν οι εκκινητές στο 3' άκρο του μονόκλωνου DNA-εκμαγείου (annealing). Έπειτα, η θερμοκρασία ανέρχεται στους 72 °C για 1min, όπου γίνεται η σύνθεση της συμπληρωματικής αλυσίδας του DNA από τη θερμοανθεκτική DNA πολυμεράση (elongation). Στην πορεία, η θερμοκρασία ανέρχεται και πάλι στους 95 °C για 30sec, ώστε τα μικρά τμήματα δίκλωνου DNA που δημιουργήθηκαν να αποχωριστούν και να αποτελέσουν εκμαγεία για τον επόμενο κύκλο σύνθεσης DNA (denaturation). Η εναλλαγή της ακολουθίας των θερμοκρασιών επαναλαμβάνεται για 40 κύκλους. Μετά το πέρας των 40 κύκλων η θερμοκρασία παραμένει στους 72 °C για 5min, ώστε να εξασφαλιστεί ο χρόνος για την επέκταση όλων των προϊόντων από τη θερμοανθεκτική DNA πολυμεράση. Τέλος, η θερμοκρασία μειώνεται στους 4 °C, ώστε να σταματήσει η αντίδραση από το ένζυμο και τα προϊόντα της αντίδρασης να αποθηκευτούν προσωρινά μέχρι να μεταφερθούν στους -20 °C.

	Αντιδραστήρια	Ποσότητα ανά δείγμα (μl)	Τελική Συγκέντρωση
1	RNase free dH <sub>2</sub> O	40,25	--

2	10x PCR buffer <i>(Hytest LTD)</i>	5,0	1x
3	dNTPs <i>(Invitrogen 10 mM)</i>	1,0	0,2 Mm
4	MgCl <sub>2</sub> <i>(Kapa Biosystems)</i>	1,5	0,3 Mm
5	F primer	0,5	1 Mm
6	R primer	0,5	1 Mm
7	Taq DNA polymerase <i>(Kapa Biosystems)</i>	0,25	0,025U/μl
	Ολικός όγκος	49.0	

**Πίνακας 6:** Ποσότητες και συγκέντρωση αντιδραστηρίων μίγματος συμβατικής PCR.

#### 2.4.3.3 Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της PCR

Η ανίχνευση των προϊόντων της PCR επιτυγχάνεται με ηλεκτροφόρηση τους σε πήκτωμα αγαρόζης 1,5% (w/v). Η αρχή της μεθόδου και η προετοιμασία του πηκτώματος αγαρόζης έχουν περιγραφεί παραπάνω στην περιγραφή ηλεκτροφόρησης του RNA. Στην ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της PCR χρησιμοποιείται η χρωστική DNA loading dye 6x, η οποία περιέχει τις χρωστικές μπλε της βρωμοφαινόλης και κυανό του ξυλενίου (xylene cyanol FF) καθώς και EDTA που δεσμεύει τα δισθενή μεταλλοϊόντα και αναστέλλει τις νουκλεάσες που εξαρτώνται από αυτά καθώς και γλυκερόλη.

Απαραίτητη είναι επίσης η χρήση ενός δείκτη (marker) για την ταυτοποίηση του μεγέθους των εμφανιζόμενων ζωνών των ηλεκτροφορούμενων δειγμάτων. Γι' αυτό χρησιμοποιείται 1 Kb Plus DNA Ladder που αποτελείται από μόρια DNA διαφορετικών μεγεθών κυμαινόμενων από 0,5-12 kbp.

Η προετοιμασία των δειγμάτων περιλαμβάνει την προσθήκη σε σωληνάριο 2μl DNA loading dye 6x και 15μl από κάθε δείγμα. Στο eppendorf του marker προστίθενται 2μl DNA loading dye 6x, 8μl DNase/RNase-free water και 2μl 1kb Plus Ladder, ενώ στο σωληνάριο του NC προστίθενται 2μl DNA loading dye 6x και 15μl DNase/RNase-free water. Ως PC της αντίδρασης χρησιμοποιείται cDNA από την κυτταρική σειρά HL-60, το οποίο έχει προέλθει από την ίδια αντίδραση PCR με τα δείγματα που ηλεκτροφορούνται. Αφού τοποθετηθούν τα δείγματα στα πηγαδάκια του πηκτώματος, εφαρμόζεται σε αυτό ηλεκτρικό ρεύμα τάσης 110Volts για 45min. Μετά το πέρας του χρόνου ηλεκτροφόρησης μεταφέρεται το πήκτωμα πάνω σε τράπεζα υπεριώδους ακτινοβολίας (UV) και με χρήση προστατευτικής μάσκας, παρατηρείται κάτω από το υπεριώδες φως και φωτογραφίζεται με ψηφιακή φωτογραφική μηχανή (flash off). Για τη Real-Time PCR επιλέγονται τα δείγματα που εμφανίζουν ζώνη μεγέθους 240 bp, η οποία αντιστοιχεί στο γονίδιο *GAPDH*.

#### **2.4.4 Ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (quantitative real-time PCR, qRT-PCR)**

##### **2.4.4.1 Εισαγωγή**

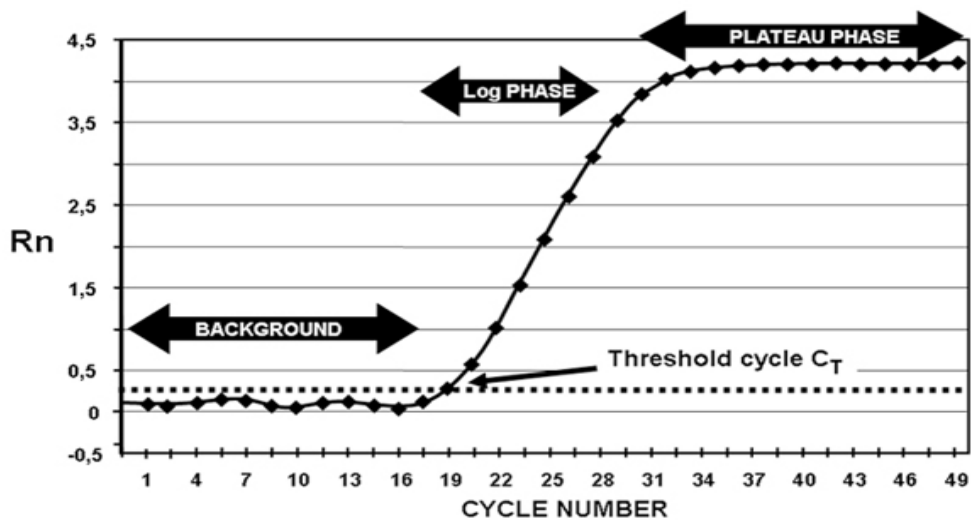
Η ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (quantitative Real-Time PCR) αποτελεί μια καινοτόμο μέθοδο ποσοτικοποίησης των νουκλεϊκών οξέων, κατά την οποία σε αντίθεση με την συμβατική PCR πραγματοποιείται η καταγραφή της συσσώρευσης των παραγόμενων νουκλεϊκών οξέων με τη βοήθεια φθορισμού στο τέλος κάθε κύκλου της αντίδρασης και όχι συνολικά στο τέλος αυτής. Πρόκειται για μέθοδο που υπερέχει έναντι της συμβατικής PCR, καθώς χαρακτηρίζεται από μεγαλύτερη ειδικότητα, ευαισθησία και επαναληψιμότητα, μικρότερη πιθανότητα επιμολύνσεων των δειγμάτων αφού δεν απαιτούνται όπως στη συμβατική PCR πρόσθετοι χειρισμοί μετά το πέρας της αντίδρασης και δυνατότητα ταυτόχρονης πραγματοποίησης πολλών αντιδράσεων σε μικρό χρονικό διάστημα. Επιπλέον,

συγκριτικά με τη συμβατική PCR, η τεχνική της Real-time PCR προσφέρει ένα μεγαλύτερο δυναμικό εύρος μετρήσεων, το οποίο ανέρχεται στα  $10^7$ x, ενώ η συμβατική PCR προσφέρει εύρος 1000x. Μεγαλύτερο δυναμικό εύρος σημαίνει ότι μπορεί να μελετηθεί ένα μεγαλύτερο εύρος αναλογιών στόχου:κανονικοποιητή με την ίδια ευαισθησία και ειδικότητα και με μεγαλύτερη ακρίβεια.<sup>139-141</sup>

#### **2.4.4.2 Αρχή της μεθόδου qRT- PCR**

Η αρχή μεθόδου της Real-time PCR βασίζεται στη χρήση φθορίζοντων μορίων τα οποία προσδενόμενα στο προϊόν της αντίδρασης εκπέμπουν φθορισμό ανάλογο της ποσότητας του σχηματιζόμενου προϊόντος. Όσο υψηλότερος είναι ο αριθμός των αρχικών αντιγράφων του νουκλεϊκού οξέος-στόχου τόσο συντομότερα παρατηρείται σημαντική αύξηση του σήματος φθορισμού.

Η αντίδραση της PCR πραγματικού χρόνου διακρίνεται σε τρεις επιμέρους φάσεις. Η πρώτη φάση που ορίζεται ως φάση “υποβάθρου” ή φάση “θορύβου” (background phase), αφορά στους πρώτους κύκλους της αντίδρασης όπου το σήμα εκπομπής φθορισμού από τα προϊόντα της αντίδρασης είναι πολύ ασθενές ώστε να μην υπερβαίνει το σήμα υποβάθρου του συστήματος. Στην “εκθετική” ή “λογαριθμική” φάση (exponential growth phase) τη δεύτερη φάση της αντίδρασης, η αυξανόμενη παραγωγή και συσσώρευση του προϊόντος έχει ως αποτέλεσμα το σήμα φθορισμού να ξεπεράσει κάποια στιγμή αυτό του υποβάθρου. Ο κύκλος της αντίδρασης στον οποίο το σήμα φθορισμού γίνεται για πρώτη φορά μεγαλύτερο από το σήμα υποβάθρου είναι ανάλογος της αρχικής ποσότητας της αλληλουχίας-στόχου που υπάρχει στο υπό εξέταση δείγμα και ονομάζεται κύκλος κατωφλίου Ct (threshold cycle). Ο κύκλος κατωφλίου αντιστοιχεί σε εκείνο τον αριθμό κύκλων της αντίδρασης όπου η ένταση του φθορισμού ισοδυναμεί με το δεκαπλάσιο της τυπικής απόκλισης του στοιχειώδους ανιχνεύσιμου σήματος. Μετά την εκθετική φάση ακολουθεί η γραμμική φάση ή φάση plateau όπου η απόδοση της αντίδρασης μειώνεται καθώς επίσης και τα επίπεδα φθορισμού. Η εισαγωγή στη φάση αυτή οφείλεται στη σημαντική μείωση κάποιου συστατικού της αντίδρασης όπως οι εκκινητές, τα dNTPs ή το μόριο αναφοράς (reporter) ή στον κορεσμό της καταλυτικής δράσης των μορίων της πολυμεράσης.



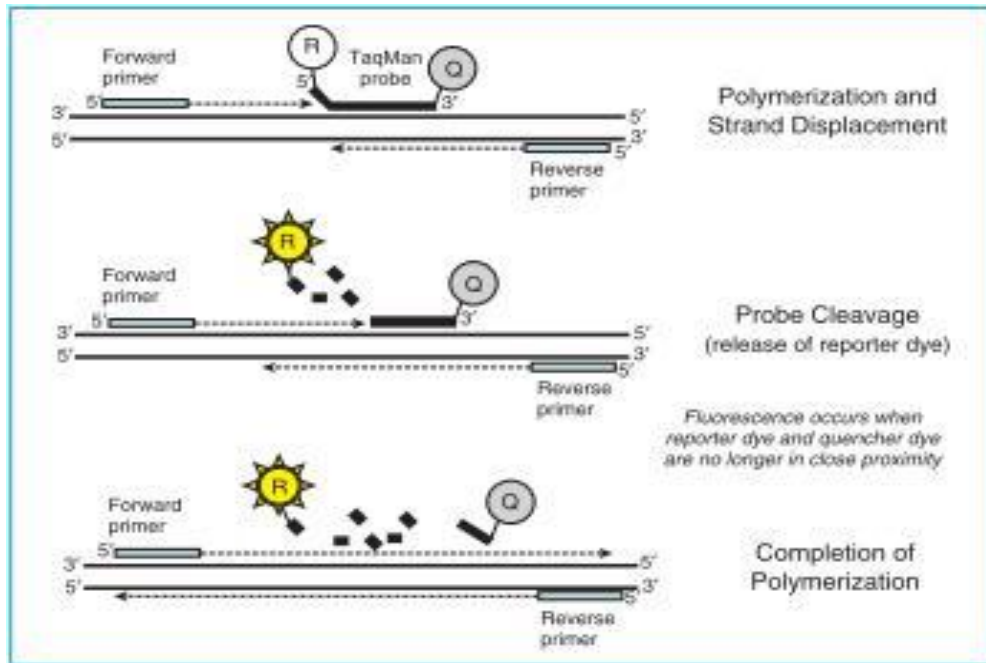
**Εικόνα 19:** Η καμπύλη αντίδρασης της qRT-PCR (Quantitative Real-Time PCR). Στον κάθετο άξονα Rn: ο εκπεμπόμενος φθορισμός και στον οριζόντιο άξονα οι κύκλοι της αντίδρασης. (Arismendy et al. Real-Time PCR. Application in dengue studies Colomb Med. 2011;42:243-58)

Ο διαχωρισμός των καμπυλών κάθε δείγματος γίνεται στη λογαριθμική φάση λόγω της διαφοράς στην αρχική συγκέντρωση της αλληλουχίας-στόχου μεταξύ των διαφόρων δειγμάτων. Έτσι, όσο περισσότερα μόρια της αλληλουχίας-στόχου περιέχει ένα δείγμα τόσο λιγότεροι κύκλοι χρειάζονται για να ανιχνευθεί σήμα εκπομπής φθορισμού που να υπερβαίνει το σήμα του υποβάθρου.<sup>140,142</sup>

#### 2.4.4.3 Συστήματα ανίχνευσης στην αντίδραση qRT-PCR

Η παρακολούθηση της εξέλιξης της αντίδρασης PCR σε πραγματικό χρόνο γίνεται με τη βοήθεια συστημάτων ανίχνευσης που βασίζονται στον φθορισμό και διακρίνονται σε δύο κατηγορίες: τους ειδικούς και τους μη ειδικούς ανιχνευτές. Στην πρώτη κατηγορία ανήκουν οι ιχνηθέτες υδρόλυσης (Taqman probes), οι 'μοριακοί φάροι' (molecular beacons) και οι ιχνηθέτες υβριδισμού που στηρίζονται στη μεταφορά ενέργειας μέσω του φαινομένου συντονισμού με φθορισμό (Fluorescence Resonance Energy Transfer - FRET), ενώ στη δεύτερη χρωστικές όπως η SYBR-Green που προσδένονται μη ειδικά στο δίκλωνο DNA και ποσοτικοποιούν τα προϊόντα της αντίδρασης, συμπεριλαμβανομένων και των μη ειδικών προϊόντων και των διμερών εκκινητών. Οι χρωστικές αυτές δεν προϋποθέτουν την ύπαρξη κάποιας ειδικής αλληλουχίας και φθορίζουν όταν ενσωματώνονται στο δίκλωνο DNA.

Οι ιχνηθέτες Taqman είναι ολιγονουκλεοτίδια με μήκος μεγαλύτερο από των εκκινητών και φέρουν μια φθορίζουσα χρωστική αναφοράς συνήθως στο 5' άκρο και μια χρωστική αποσβέστη στο 3' άκρο. Σύμφωνα με το φαινόμενο FRET όταν ακτινοβοληθεί η φθορίζουσα χρωστική μεταφέρεται ενέργεια στο μόριο της χρωστικής αποσβέστη που βρίσκεται σε κοντινή απόσταση και δεν παρατηρείται φθορισμός. Βασική προϋπόθεση για να λειτουργήσει το φαινόμενο FRET είναι να υπάρχει μέγιστη επικάλυψη μεταξύ του φάσματος εκπομπής του μορίου-δότη και του φάσματος απορρόφησης του μορίου-δέκτη. Κατά το φαινόμενο FRET, η ενέργεια μεταφέρεται από το διεγερμένο μόριο-δότη σε ένα μόριο-δέκτη που βρίσκεται σε θεμελιώδη κατάσταση μέσω αλληλεπίδρασης διπόλου-διπόλου. Επιπλέον, η απόσταση μεταξύ του μορίου-δότη και του μορίου-δέκτη πρέπει να βρίσκεται μέσα στο εύρος της ακτίνας Förster. Η απόσταση δότη-δέκτη (R) περιγράφεται από την εξίσωση:  $R=R_0[(1/E_T)-1]^{1/6}$ , όπου  $R_0$ : η ακτίνα Förster σε nm στην οποία η απόδοση της μεταφοράς ενέργειας αγγίζει το 50% και  $E_T$ : η απόδοση της μεταφοράς ενέργειας. Έτσι, η εγγύτητα της χρωστικής αναφοράς και της χρωστικής αποσβέστη αποτρέπει την εκπομπή φθορισμού όσο ο ιχνηθέτης παραμένει ανέπαφος. Για να παραχθεί σήμα φθορισμού από τους ιχνηθέτες Taqman δύο γεγονότα πρέπει να συμβούν. Ο ιχνηθέτης πρέπει να συνδεθεί σε ένα συμπληρωματικό μόριο DNA στους 60 °C και σε αυτή τη θερμοκρασία η Taq polymerase μέσω της ενεργότητας της 5' νουκλεάσης να διαχωρίσει τις δύο χρωστικές κόβοντας στο 5' άκρο του ιχνηθέτη.



**Εικόνα 20:** Αρχή λειτουργίας ιχνηθετών Taqman (Lutfalla G, Uze G, *Performing quantitative reverse-transcribed polymerase chain reaction experiments, Methods in Enzymology, vol410, 2006*)

Με αυτόν τον τρόπο γίνεται διακοπή της δράσης του φαινομένου FRET και η χρωστική αναφοράς αρχίζει να εκπέμπει φθορισμό, ο οποίος αυξάνεται σε κάθε κύκλο αναλογικά με το ρυθμό κοπής του ιχνηθέτη, καθώς τα προϊόντα της αντίδρασης PCR συσσωρεύονται. Οι μοριακοί φάροι (molecular beacons) είναι ανιχνευτές που αποτελούνται από μικρά τμήματα ολιγονουκλεοτιδίων, τα οποία εκπέμπουν φθορισμό όταν συνδεθούν με την αλληλουχία-στόχο RNA ή DNA. Οι μοριακοί φάροι φέρουν και αυτοί χρωστική αναφοράς και χρωστική αποσβέστη σε κάθε άκρο τους. Όμως καθώς το ένα άκρο του μορίου αποτελείται από λίγες βάσεις συμπληρωματικές με τις αντίστοιχες βάσεις του άλλου άκρου, σχηματίζεται μια δομή “φουρκέτας” (hairpin structure) χάρη στην οποία εκδηλώνεται το φαινόμενο FRET. Όσο δηλαδή το μόριο είναι αναδιπλωμένο οι δυο χρωστικές βρίσκονται κοντά μεταξύ τους κι έτσι η εκπεμπόμενη ακτινοβολία από τη χρωστική-αναφοράς απορροφάται από τη χρωστική-αποσβέστη και δεν ανιχνεύεται φθορισμός. Όταν ο μοριακός φάρος υβριδίζεται στο μόριο στόχο κατά το στάδιο της υβριδοποίησης, η χρωστική αναφοράς αποχωρίζεται από τη χρωστική αποσβέστη και παράγεται φθορισμός.

Στην κατηγορία των μη ειδικών ανιχνευτών ανήκουν χρωστικές που προσδένονται μη ειδικά στο δίκλωνο DNA και ποσοτικοποιούν τα προϊόντα της αντίδρασης, συμπεριλαμβανομένων των μη ειδικών προϊόντων και των διμερών εκκινητών. Οι χρωστικές αυτές δεν προϋποθέτουν την ύπαρξη κάποιας ειδικής αλληλουχίας και φθορίζουν όταν ενσωματώνονται στο δίκλωνο DNA. Παραδείγματα τέτοιων χρωστικών είναι η SYBR-Green I, η οποία προσδένεται στη μικρή αύλακα του dsDNA και κατατάσσεται στις ασύμμετρες κυανίνες και το βρωμιούχο αιθίδιο που χρησιμοποιήθηκε στα πρώτα πειράματα της Real-Time PCR και φθορίζει όταν παρεμβάλλεται μεταξύ των βάσεων του dsDNA. Το γεγονός όμως ότι το τελευταίο επηρεάζει τη δράση της πολυμεράσης το καθιστά ακατάλληλο και προτιμάται η SYBR-Green I. Οι ασύμμετρες κυανίνες είναι μόρια αποτελούμενα από δύο αρωματικούς δακτυλίους που φέρουν άζωτο, το ένα εκ των οποίων είναι θετικά φορτισμένο, ενωμένους με μια γέφυρα μεθινίου. Η χρωστική αυτή δεν φθορίζει όταν βρίσκεται ελεύθερη σε διάλυμα, λόγω δονήσεων που δεσμεύουν και τους δύο αρωματικούς δακτυλίους και μετατρέπουν την ενέργεια διέγερσης των ηλεκτρονίων σε θερμότητα που διαχέεται στο διάλυμα. Όταν όμως προσδεθεί στο δίκλωνο μόριο η χρωστική φθορίζει έντονα και η περιστροφή γύρω από το δεσμό μεθινίου αποτρέπεται. Λόγω όμως της έλλειψης ειδικότητάς της η δημιουργία διμερών εκκινητών θα πρέπει να ελέγχεται με πραγματοποίηση καμπυλών τήξης μετά το τέλος της PCR.

Η πραγματοποίηση καμπυλών τήξης (dissociation curve analysis ή melting curve analysis), είναι ένας τρόπος διαχωρισμού των ειδικών από τα μη ειδικά προϊόντα χάρη στις διαφορετικές θερμοκρασίες τήξης ( $T_m$ ) που τα χαρακτηρίζουν. Ως θερμοκρασία τήξης ορίζεται η θερμοκρασία εκείνη στην οποία το 50% των μορίων μίας αλληλουχίας νουκλεοτιδίων εμφανίζεται ως μονή έλικα δηλαδή η διπλή έλικα έχει αποδιαταχθεί. Κατά την πραγματοποίηση μιας καμπύλης τήξης η θερμοκρασία αυξάνεται σταδιακά και ο φθορισμός υπολογίζεται συναρτήσει της θερμοκρασίας. Ο φθορισμός των προϊόντων μειώνεται σταδιακά με την αύξηση της θερμοκρασίας, καθώς αυτή προκαλεί την αύξηση της θερμικής κίνησης των δεσμευμένων μορίων της χρωστικής. Όταν η θερμοκρασία ανέβει τόσο ώστε να φτάσει την τιμή της θερμοκρασίας τήξης του κάθε μορίου προκαλείται αποδιάταξη των δίκλωνων προϊόντων. Τότε τα μόρια της χρωστικής αποδεσμεύονται και απελευθερώνονται στο διάλυμα, με συνέπεια ο φθορισμός να



υφίσταται απότομη μείωση. Δεδομένου ότι τα μη ειδικά προϊόντα της αντίδρασης και τα διμερή των εκκινητών έχουν διαφορετικό μήκος από την επιθυμητή αλληλουχία, αυτά μπορούν εύκολα να διακριθούν από την αλληλουχία-στόχο με την καμπύλη τήξης καθώς εμφανίζουν διαφορετική θερμοκρασία τήξης.<sup>141,142</sup>

#### 2.4.4.4 Υπολογιστικές μέθοδοι της qRT-PCR

Βασική προϋπόθεση για την πραγματοποίηση των υπολογισμών σε μια αντίδραση qRT-PCR είναι η χρήση μιας παθητικής χρωστικής αναφοράς η οποία παρέχει ένα εσωτερικό σήμα φθορισμού που δε μεταβάλλεται κατά τη διάρκεια της αντίδρασης. Με τη βοήθεια της χρωστικής αυτής επιτυγχάνεται η κανονικοποίηση του σήματος φθορισμού, διακυμάνσεις του οποίου μπορεί να υπάρχουν λόγω διαφορών στη συγκέντρωση της SYBR-Green I στα δείγματα, λόγω διαφορών στην ποσότητα του φωτός που φτάνει σε κάθε δείγμα, καθώς και λόγω των οπτικών ιδιοτήτων του υλικού μέσα στο οποίο τοποθετούνται τα δείγματα. Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε η χρωστική ROX, συστατικό του SYBR Green PCR Master Mix, η οποία έχει μέγιστο απορρόφησης στα 575nm και μέγιστο εκπομπής στα 605nm. Στο τέλος κάθε κύκλου της αντίδρασης προσδιορίζεται η ένταση του εκπεμπόμενου φθορισμού, τόσο της χρωστικής SYBR Green I, όσο και της χρωστικής ROX, ώστε να ακολουθήσει η κανονικοποίηση του σήματος, μέσω υπολογισμού του λόγου  $R_n$ . Ο λόγος αυτός ορίζεται ως η ένταση του εκπεμπόμενου φθορισμού της χρωστικής αναφοράς προς την ένταση του εκπεμπόμενου φθορισμού της παθητικής χρωστικής. Με τη βοήθεια κατάλληλου λογισμικού, ο λόγος  $R_n$  απεικονίζεται γραφικά ως προς τους κύκλους της αντίδρασης, με αποτέλεσμα το σχηματισμό της καμπύλης της αντίδρασης (Amplification plot).<sup>143</sup>

Υπάρχουν δύο μέθοδοι ποσοτικού προσδιορισμού των προϊόντων της qRT-PCR: ο απόλυτος και ο σχετικός ποσοτικός προσδιορισμός. Στην περίπτωση του απόλυτου προσδιορισμού (absolute quantification), η συγκέντρωση της αλληλουχίας στόχου εκφράζεται ως απόλυτη τιμή και καθορίζεται με τη βοήθεια καμπύλης βαθμονόμησης, η οποία κατασκευάζεται με τη χρήση προτύπων δειγμάτων γνωστής συγκέντρωσης. Ενώ στην περίπτωση της σχετικής ποσοτικοποίησης (relative quantification) προσδιορίζεται η μεταβολή της ποσότητας της αλληλουχίας-στόχου ενός δείγματος ως προς την ποσότητα μιας αλληλουχίας-αναφοράς του ίδιου δείγματος. Πιο συγκεκριμένα, στην απόλυτη ποσοτικοποίηση χρησιμοποιούνται πρότυπα δείγματα για την κατασκευή της

καμπύλης βαθμονόμησης τα οποία περιέχουν γνωστό αριθμό αντιγράφων της αλληλουχίας-στόχου. Η απόδοση της ενίσχυσης της αλληλουχίας-στόχου, τόσο των άγνωστων δειγμάτων όσο και των προτύπων, θα πρέπει να είναι η ίδια και δίνεται από τον τύπο:  $E = 10^{-1/\kappa\lambda\iota\sigma\eta} - 1$ . Στην μέθοδο του σχετικού προσδιορισμού, η οποία χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία, για το ίδιο δείγμα προσδιορίζεται η ποσότητα της αλληλουχίας στόχου σε σχέση με την ποσότητα ενός γονιδίου αναφοράς (housekeeping gene) ως προς το οποίο κανονικοποιείται η έκφραση της αλληλουχίας στόχου. Συγκεκριμένα, η συγκέντρωση της αλληλουχίας στόχου σε κάθε δείγμα διαιρείται με τη συγκέντρωση του γονιδίου αναφοράς στο ίδιο δείγμα, ώστε να διορθωθούν οι διαφορές στην ποιότητα και ποσότητα των νουκλεϊκών οξέων στα δείγματα.<sup>141</sup> Στην μέθοδο αυτή είναι επίσης σημαντική η χρησιμοποίηση ενός βαθμονομητή, ενός δείγματος δηλαδή που παίζει τον ρόλο του θετικού μάρτυρα της αντίδρασης (Positive Control, PC). Ως βαθμονομητής επιλέγεται ένα δείγμα που χαρακτηρίζεται από σταθερά ισχυρή έκφραση των γονιδίων μελέτης και αναφοράς. Στην παρούσα μελέτη ως βαθμονομητής χρησιμοποιήθηκε δείγμα της καρκινικής σειράς HL-60. Στη μέθοδο του σχετικού προσδιορισμού χρησιμοποιείται το μοντέλο  $2^{-\Delta\Delta CT}$  το οποίο στηρίζεται σε μια σειρά υπολογισμών και παραδοχών που αναλύονται παρακάτω. Σύμφωνα με το μοντέλο αυτό υπολογίζεται η μεταβολή της έκφρασης των κανονικοποιημένων ως προς το γονίδιο αναφοράς γονιδίων, σε σχέση με τον βαθμονομητή.

Η εξίσωση που περιγράφει την εκθετική ενίσχυση του προϊόντος στην PCR είναι η εξής:

$$X_n = X_0 \times (1 + E_x)^n$$

όπου:

- $X_n$ : ο αριθμός των μορίων στόχων κατά τον κύκλο  $n$  της αντίδρασης
- $X_0$ : ο αρχικός αριθμός των μορίων στόχων
- $E_x$ : η απόδοση της ενίσχυσης του στόχου
- $n$ : ο αριθμός των κύκλων της αντίδρασης

Αν στην παραπάνω σχέση αντικατασταθεί το  $n$  με τον κύκλο κατωφλίου  $C_T$  τότε η σχέση γίνεται:

$$X_T = X_0 \times (1 + E_X)^{CT,X} = K_X$$

όπου

- $X_T$ : ο αριθμός των μορίων στόχων στο κατώφλι
- $C_{T,X}$ : ο κύκλος κατωφλίου του στόχου
- $K_X$ : σταθερά.

Μια παρόμοια εξίσωση για το γονίδιο αναφοράς είναι η:

$$R_T = R_0 \times (1 + E_R)^{CT,R} = K_R.$$

Ο λόγος  $X_T$  προς  $R_T$  δίνει τη σχέση:

$$X_T/R_T = X_0 \times (1 + E_X)^{CT,X} / R_0 \times (1 + E_R)^{CT,R} = K_X/K_R = K.$$

Υποθέτοντας ότι η απόδοση της αντίδρασης για το γονίδιο στόχο είναι ίδια με αυτή για το γονίδιο αναφοράς τότε  $E_X = E_R = E$  και άρα:  $X_0/R_0 \times (1 + E)^{CT,X-CT,R} = K$  ή αλλιώς

$$X_N \times (1 + E)^{\Delta CT} = K$$

όπου  $X_N$  ισούται με την κανονικοποιημένη ποσότητα του στόχου και  $\Delta CT$  ισούται με τη διαφορά στους κύκλους κατωφλίου του γονιδίου στόχου και του γονιδίου αναφοράς ( $CT, X-CT, R$ ). Λύνοντας ως προς  $X_N$  η εξίσωση γίνεται:

$$X_N = K \times (1 + E)^{-\Delta CT}$$

Το τελικό βήμα είναι να υπολογιστεί ο λόγος  $X_N$  κάθε δείγματος ( $q$ ) ως προς τον αντίστοιχο λόγο  $X_N$  του βαθμονομητή ( $cb$ ):

$$X_{N,q}/X_{N,cb} = K \times (1 + E)^{-\Delta CT,q} / K \times (1 + E)^{-\Delta CT,cb} = (1 + E)^{-\Delta \Delta CT}$$

Όταν οι συνθήκες της αντίδρασης έχουν ρυθμιστεί κατάλληλα, η απόδοση προσεγγίζει το 1. Έτσι, η ποσότητα του γονιδίου στόχου, κανονικοποιημένου ως προς ένα εσωτερικό γονίδιο αναφοράς και σε σχέση με ένα βαθμονομητή δίνεται από τη σχέση:  $2^{-\Delta \Delta CT}$ , όπου  $\Delta \Delta CT = \Delta CT_{\text{δείγματος}} - \Delta CT_{\text{βαθμονομητή}}$  με

$$\Delta CT_{\text{δείγματος}} = Ct_{\text{δείγματος, γονιδίου-στόχου}} - Ct_{\text{δείγματος, γονιδίου-αναφοράς}}$$

$$\Delta CT_{\text{βαθμονομητή}} = Ct_{\text{βαθμονομητή, γονιδίου-στόχου}} - Ct_{\text{βαθμονομητή, γονιδίου-αναφοράς}}$$

Για τη διεξαγωγή των πειραμάτων Real-time PCR χρησιμοποιήθηκε το ένζυμο AmpliTaq Gold DNA Polymerase, μια ανασυνδυασμένη θερμοσταθερή DNA πολυμεράση μεγέθους 94kDa που κωδικοποιείται από μια τροποποιημένη μορφή του

γονιδίου της DNA πολυμεράσης του οργανισμού *Thermus aquaticus* το οποίο έχει εισαχθεί σε βακτηριακό δέκτη *Escherichia coli*. Η AmpliTaq Gold DNA Polymerase, LD παρέχεται αρχικά σε αδρανή μορφή και η ενεργοποίησή της απαιτεί ένα βήμα θέρμανσης, με θερμοκρασία αρκετά μεγαλύτερη από την θερμοκρασία υβριδισμού των εκκινητών. Συγκεκριμένα χρειάζεται θέρμανση του μείγματος της αντίδρασης στους 95°C για 1-10 min, ώστε να απελευθερωθεί ο χημικός τροποποιητής που είναι δεσμευμένος στο ένζυμο και το διατηρεί σε ανενεργή κατάσταση. Αυτή η τεχνική γνωστή ως hot start PCR συμβάλλει στην αύξηση της ευαισθησίας και της απόδοσης της αντίδρασης και στην μείωση της ενίσχυσης μη ειδικών προϊόντων.

Οι αλληλουχίες των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία φαίνονται στον πίνακα 6.

Για το *GAPDH* γονίδιο αναφοράς:

<i>GAPDH</i> εκκινητές	Αλληλουχία	T <sub>m</sub> (°C)	Μήκος (nt)	GC %	M.B. (g/mol)
Πρόσθιος (F)	5'-ATG GGG AAG GTG AAG GTC G-3'	5 8,4	19	5 7,9	599 8,9
Ανάστροφος (R)	5'-GGG TCA TTG ATG GCA ACA ATA TC-3'	5 9,1	23	4 3,5	708 8,6
Μέγεθος προϊόντος	107 bp				

Για το *BAX* γονίδιο:

<i>BAX</i> εκκινητές	Αλληλουχία	T <sub>m</sub> (°C)	Μήκος (nt)	GC %	M.B. (g/mol)
Πρόσθιος (F)	5'-CCG AGA GGT CTT TTT CCG AG -3'	5 3,0	20	5 5,0	612 4,0
Ανάστροφος (R)	5'- GTG CAC AGG GCC TTG AGC-3'	5 3,7	18	6 6,7	554 1,0
Μέγεθος προϊόντος	117 bp				

Για το *BCL2* γονίδιο:

<i>BCL2</i> εκκινητές	Αλληλουχία	T <sub>m</sub> (°C)	Μήκος (nt)	GC %	M.B. (g/mol)
Πρόσθιος (F)	5'-TCG CCC TGT GGA TGA CTG A -3'	5 4,5	19	5 7,9	582 0,0
Ανάστροφος (R)	5'- CAG AGA CAG CCA GGA GAA ATCA-3'	5 9,8	21	5 2,4	603 5,0
Μέγεθος προϊόντος	134 bp				

Για το *BCL2L12* γονίδιο:

<i>BCL2L1</i> 2 εκκινητές	Αλληλουχία	T <sub>m</sub> (°C)	Μήκος (nt)	GC %	M.B. (g/mol)
Πρόσθιος (F)	5'-CCC TCG GCC TTG CTG TCT - 3'	5 9,1	18	6 6,7	535 4,5
Ανάστροφος (R)	5'-TCC GCA GTA TGG CTT CCT TCT -3'	5 9,8	21	5 2,4	603 5,0
Μέγεθος προϊόντος	182 bp				

**Πίνακας 7:** Οι αλληλουχίες των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία για τα γονίδια *GAPDH*, *BAX*, *BCL2* και *BCL2L12*.

Η πειραματική διαδικασία περιλαμβάνει την παρασκευή τεσσάρων διαφορετικών μειγμάτων, καθένα από τα οποία αντιστοιχεί σε διαφορετικό από τα τέσσερα γονίδια μελέτης (*GAPDH*, *BAX*, *BCL2*, *BCL2L12*). Ανάλογα με το γονίδιο μελέτης προστίθενται και οι αντίστοιχοι εκκινητές. Καθώς κάθε δείγμα «φορτώνεται» δύο φορές στην πλάκα, ο όγκος για κάθε συστατικό του μείγματος υπολογίζεται επί 2,2 (αφού θα μπει σε δύο σειρές για κάθε δείγμα + 0,2 για τις απώλειες κατά τη μεταφορά- waste). Για 12 δείγματα (11 που μελετώνται + 1 ο βαθμονομητής) υπολογίζεται το μείγμα επί 14 (τους ήδη πολλαπλασιασμένους όγκους ανά δείγμα). Οι συγκεντρώσεις και οι όγκοι των συστατικών του μείγματος υπολογίζονται βάσει του πίνακα 7.

<b>α/α</b>	<b>ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ</b>	<b>1x (μl)</b>	<b>2,2x =(A) (μl)</b>	<b>(A)x14 (μl)</b>
1	DNase/RNase free dH <sub>2</sub> O	2,60	5,72	80,08
2	SYBR Green PCR Master Mix 2x	5,00	11,00	154,00
3	F primer (forward)	1,00	2,20	30,80
4	R primer (reverse)	1,00	2,20	30,80
5	cDNA	0,40	0,88	
6	<i>Ολικός όγκος</i>	<i>10,00</i>	<i>22,00</i>	<i>295,68</i>

**Πίνακας 8:** Οι όγκοι και οι συγκεντρώσεις του μίγματος της αντίδρασης qRT-PCR.

Έπειτα διαμοιράζονται περίπου 21,1 μl του μίγματος σε erpendorf των δειγμάτων και στη συνέχεια προστίθενται 0,88 μl του αντίστοιχου cDNA. Το μείγμα της αντίδρασης αναδεύεται και τα δείγματα τοποθετούνται στην ειδική πλάκα. Σε κάθε πηγάδι φορτώνονται 10 μl δείγματος. Η κάθε στήλη της πλάκας αντιστοιχεί σε έναν κωδικό δείγματος, ενώ κάθε μελετώμενο γονίδιο αντιπροσωπεύεται σε δύο οριζόντιες γραμμές.

Οι πειραματικές συνθήκες περιλαμβάνουν αρχικά άνοδο της θερμοκρασίας στους 95 °C για 10 min, ώστε να ενεργοποιηθεί το ένζυμο AmpliTaq Gold DNA Polymerase, Kara Biosystems. Στη συνέχεια, η θερμοκρασία παραμένει στους 95 °C για 15 sec ακόμη προκειμένου να αποδιαταχθούν τα δίκλινα μόρια του DNA εκμαγείου με διάσπαση των δεσμών υδρογόνου μεταξύ των συμπληρωματικών βάσεων. Ακολούθως, κάθοδος της θερμοκρασίας στους 60 °C για 1min έχει σαν αποτέλεσμα την υβριδοποίηση των εκκινητών στις αλυσίδες του DNA εκμαγείου και την επέκτασή τους κατά τη σύνθεση των νέων κλώνων από την DNA πολυμεράση. Η διαδικασία μετά το στάδιο της ενεργοποίησης του ενζύμου επαναλαμβάνεται για 40 κύκλους μετά το πέρας των οποίων πραγματοποιούνται καμπύλες τήξης για διάκριση των ειδικών προϊόντων της αντίδρασης από τα μη ειδικά και τα διμερή εκκινητών.

#### **2.4.5 Στατιστική ανάλυση της έκφρασης των γονιδίων *BCL2*, *BAX* και *BCL2L12* σε ασθενείς με ΟΛΛ και μάρτυρες**

Για την στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα IBM SPSS v.17 software (IBM Corporation, Armonk, NY, USA). Για την ανάλυση της έκφρασης των γονιδίων *BCL2*, *BAX* και *BCL2L12*, καθώς και του λόγου *BCL2/BAX*, συγκριτικά μεταξύ υγιών και μαρτύρων χρησιμοποιήθηκε η μη-παραμετρική μέθοδος Mann-Whitney *U* test, ενώ η εκτίμηση της διαφοροδιαγνωστικής τους αξίας για την διάκριση των ασθενών από την ομάδα των υγιών μαρτύρων χρησιμοποιήθηκαν ανάλυση λογιστικής παλινδρόμησης (logistic regression analysis) και η ανάλυση κατά ROC (ROC curve analysis). Οι μη-παραμετρικές δοκιμασίες Mann-Whitney *U* test και Kruskal-Wallis test χρησιμοποιήθηκαν για την συσχέτιση της έκφρασης των υπό μελέτη γονιδίων και του λόγου *BCL2/BAX* με τα κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά των ασθενών, όπως την ηλικία, το φύλο, τον ανοσοφαινότυπο, τον αριθμό λευκών αιμοσφαιρίων στη διάγνωση (WBC), την κυτταρογενετική ανάλυση, την απάντηση στον μυελό των οστών και την ελάχιστη υπολειπόμενη νόσο (Minimal Residual Disease/MRD).

Για την εκτίμηση της προγνωστικής αξίας των υπό μελέτη γονιδίων για τους παιδιατρικούς ασθενείς με ΟΛΛ, χρησιμοποιήθηκαν κατά περίπτωση ανάλυση καμπυλών επιβίωσης Kaplan-Meier, ανάλυση παλινδρόμησης κατά Cox (Cox regression analysis) και ανάλυση λογιστικής παλινδρόμησης. Με την χρήση του αλγόριθμου X-tile ορίστηκαν ως βέλτιστη διακριτή τιμή (cut-off value) το 25<sup>ο</sup>, το 62<sup>ο</sup> και το 50<sup>ο</sup> εκατοστημόριο των επιπέδων έκφρασης των *BCL2*, *BAX* και *BCL2L12* αντίστοιχα, για τα δείγματα των ασθενών στη διάγνωση. Στα δείγματα των ασθενών της 33<sup>ης</sup> ημέρας μετά την έναρξη της θεραπείας, ως βέλτιστη διακριτή τιμή (cut-off value) για τον χαρακτηρισμό της έκφρασης των γονιδίων ως «αυξημένη» (overexpressed) σε σχέση με την διάγνωση, χαρακτηρίστηκε η κατά 10% αύξηση της έκφρασής τους την 33η ημέρα της θεραπείας. Από τους 82 ασθενείς, 5 εξαιρέθηκαν της μελέτης εξαιτίας της τοξικότητας που εμφάνισαν στην χημειοθεραπευτική αγωγή.

Μοντέλα μονο- και πολυ-μεταβλητής ανάλυσης λογιστικής παλινδρόμησης χρησιμοποιήθηκαν για τον έλεγχο της ικανότητας της έκφρασης των γονιδίων να προβλέψουν την απόκριση των ασθενών στο πρωτόκολλο BFM, και πιο συγκεκριμένα στην πρόβλεψη >5% ποσοστού βλαστών στον μυελό των οστών κατά την 15<sup>η</sup> ημέρα

αγωγής καθώς και θετικής MRD (>0.1%) την 33<sup>η</sup> ημέρα αγωγής. Τέλος, η συσχέτιση των επιπέδων έκφρασης των γονιδίων με την επιβίωση των ασθενών, και συγκεκριμένα με την επιβίωση ελεύθερη νόσου (Disease-Free Survival/DFS) και την ειδική επιβίωση από την νόσο (Cancer-Specific Survival/CSS) διενεργήθηκε μέσω της δημιουργίας των καμπυλών επιβίωσης Kaplan-Meier, χρησιμοποιώντας τη δοκιμασία log-rank για τον έλεγχο της στατιστικής σημαντικότητας, καθώς και μοντέλα μονο- και πολύ-μεταβλητής ανάλυσης παλινδρόμησης κατά Cox. Ως επιβίωση ελεύθερη νόσου (Disease-Free Survival/DFS) ορίζεται το χρονικό διάστημα επιβίωσης ενός ασθενούς χωρίς την εμφάνιση υποτροπής της νόσου, ενώ ως ειδική επιβίωση από την νόσο (Cancer-Specific Survival/CSS) ορίζεται το χρονικό διάστημα επιβίωσης ενός ασθενούς από τη διάγνωση μέχρι πιθανό θάνατο που οφείλεται αποκλειστικά και μόνο στην νόσο και όχι σε άλλους παράγοντες όπως π.χ η τοξικότητα στην θεραπεία.



### **3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ**

#### **3.1 Φωτομετρικός προσδιορισμός και ποιοτική ανάλυση του ολικού RNA από κύτταρα μυελού των οστών**

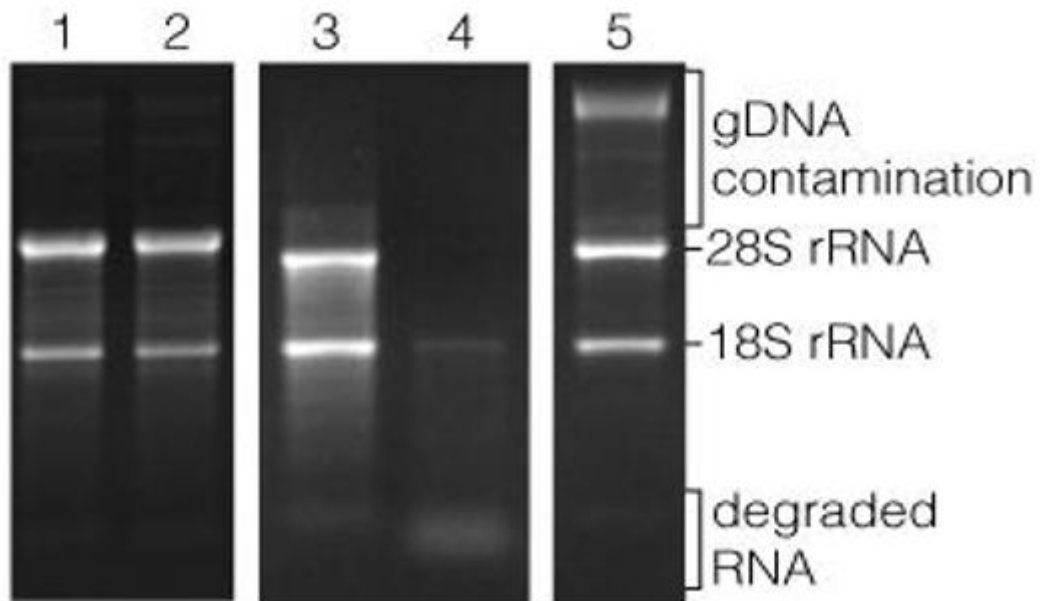
Η απομόνωση του ολικού RNA πραγματοποιήθηκε με την μέθοδο της ισοθειοκυανικής γουανιδίνης. Στη συνέχεια μέσω της φασματοφωτομετρίας προσδιορίστηκε η καθαρότητα του ολικού RNA και υπολογίστηκε η συγκέντρωσή του στο δείγμα. Συγκεκριμένα, έγινε μέτρηση των οπτικών απορροφήσεων στα 260nm, στα 280nm και στα 230nm και καθορισμός του λόγου τους A260/A280 και A260/A230. Στην παρούσα εργασία συμπεριλήφθηκαν δείγματα με λόγους: A260/A280 περίπου ίσο με 2 και A260/A230 ίσο με 2 έως 2,2, που είναι ενδεικτικοί καθαρότητας του RNA. Στον πίνακα 8 δίνονται ενδεικτικά οι τιμές 10 δειγμάτων ασθενών και μαρτύρων.

Δείγμα	A260/A280	A260/A230	C <sub>RNA</sub> (μg/μl)
1	1,99	2,17	0,409
2	2,01	2,20	0,328
3	2,02	2,21	0,933
4	1,99	2,11	0,505
5	1,98	2,20	0,953
6	2,02	2,14	0,639
7	2,04	2,20	0,646
8	2,00	2,24	0,643
9	1,99	2,17	0,437
10	1,98	2,18	0,972

**Πίνακας 9:** Λόγοι A260/280, A260/230 και συγκεντρώσεις 10 δειγμάτων Μυελού των Οστών (1-5 ασθενείς, 6-10 μάρτυρες).

### 3.2 Ποιοτική ανάλυση του ολικού RNA σε πήκτωμα αγαρόζης

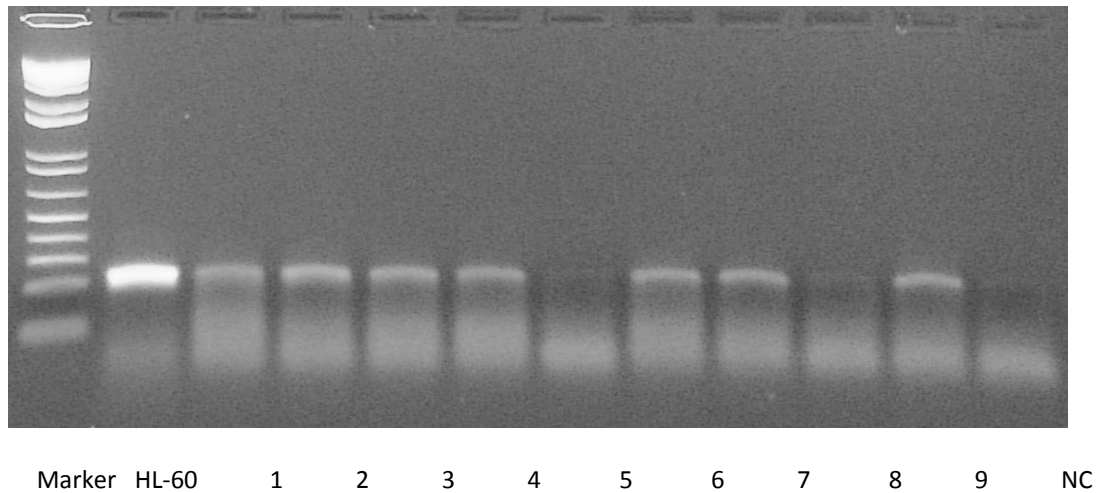
Η ακεραιότητα του RNA ελέγχεται με ηλεκτροφόρησή του σε πήκτωμα αγαρόζης 1,5% (w/v). Καλής ποιότητας ριβονουκλεϊκό οξύ εμφανίζει σε παρατήρηση του πηκτώματος εικόνα δύο ζωνών rRNA: 28S και 18S, με την ένταση της πρώτης να είναι διπλάσια της δεύτερης. Σε περίπτωση που το RNA έχει αποικοδομηθεί, στην παρατήρηση του πηκτώματος υπό υπεριώδη ακτινοβολία εμφανίζονται κατακερματισμένα τμήματα χαμηλού μοριακού βάρους. Για περαιτέρω επεξεργασία προς την σύνθεση συμπληρωματικού DNA (cDNA) επιλέχθηκαν τα δείγματα με εικόνα στο πήκτωμα όπως φαίνεται στην Εικόνα 21.



**Εικόνα 21:** Ηλεκτροφορητική ανάλυση του ολικού RNA τεσσάρων δειγμάτων ασθενών με ΟΛΛ σε πήκτωμα αγαρόζης 1,5% (w/v). Σύγκριση μεταξύ ακέραιου RNA (διαδρομές 1 και 2) και αποικοδομημένου RNA (διαδρομές 3 και 4). Στο ακέραιο RNA διακρίνονται οι δύο ζώνες 28S και 18S.

### 3.3 Έλεγχος της έκφρασης του γονιδίου *GAPDH* (αφυδρογονάσης της 3-φωσφορικής γλυκεραλδεΐδης) σε δείγματα μυελού των οστών μέσω της αντίδρασης PCR

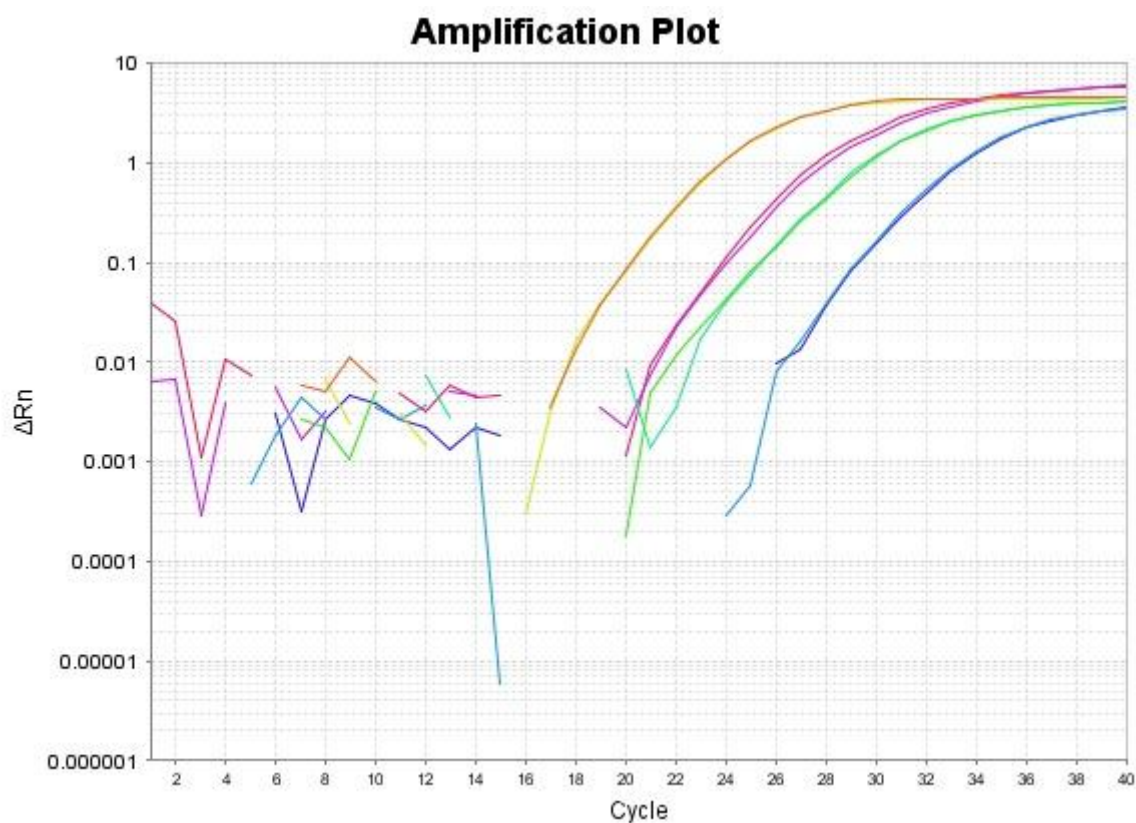
Μετά την ποσοτική και ποιοτική ανάλυση του απομονωμένου ολικού RNA, ακολούθησε η αντίδραση αντίστροφης μεταγραφής για την σύνθεση συμπληρωματικού DNA (cDNA) το οποίο αποτέλεσε το υπόστρωμα της αντίδρασης της συμβατικής PCR για τον έλεγχο της έκφρασης mRNA του γονιδίου *GAPDH* (αφυδρογονάσης της 3-φωσφορικής γλυκεραλδεΐδης). Ο έλεγχος της έκφρασης του γονιδίου *GAPDH* γίνεται για την επιβεβαίωση της επιτυχούς αντίδρασης της αντίστροφης μεταγραφής και της καλής ποιότητας του απομονωμένου RNA καθώς το γονίδιο *GAPDH* είναι ένα διαδεδομένο γονίδιο αναφοράς με σταθερά επίπεδα έκφρασης. Το προϊόν της αντίδρασης PCR για το γονίδιο *GAPDH* ηλεκτροφορήθηκε σε πήκτωμα αγαρόζης 1,5% (w/v). Εκτός από τα δείγματα προς μελέτη συνοπολογίζονται ένας θετικός μάρτυρας, ο οποίος είναι cDNA από την κυτταρική σειρά HL-60 (Human Promyelocytic Leukemia cells) και δις απεσταγμένο H<sub>2</sub>O (dd H<sub>2</sub>O) ως αρνητικός μάρτυρας. Επιλέγονται τα δείγματα που εμφανίζουν ζώνη μεγέθους 240bp όπως φαίνεται στην Εικόνα 22.



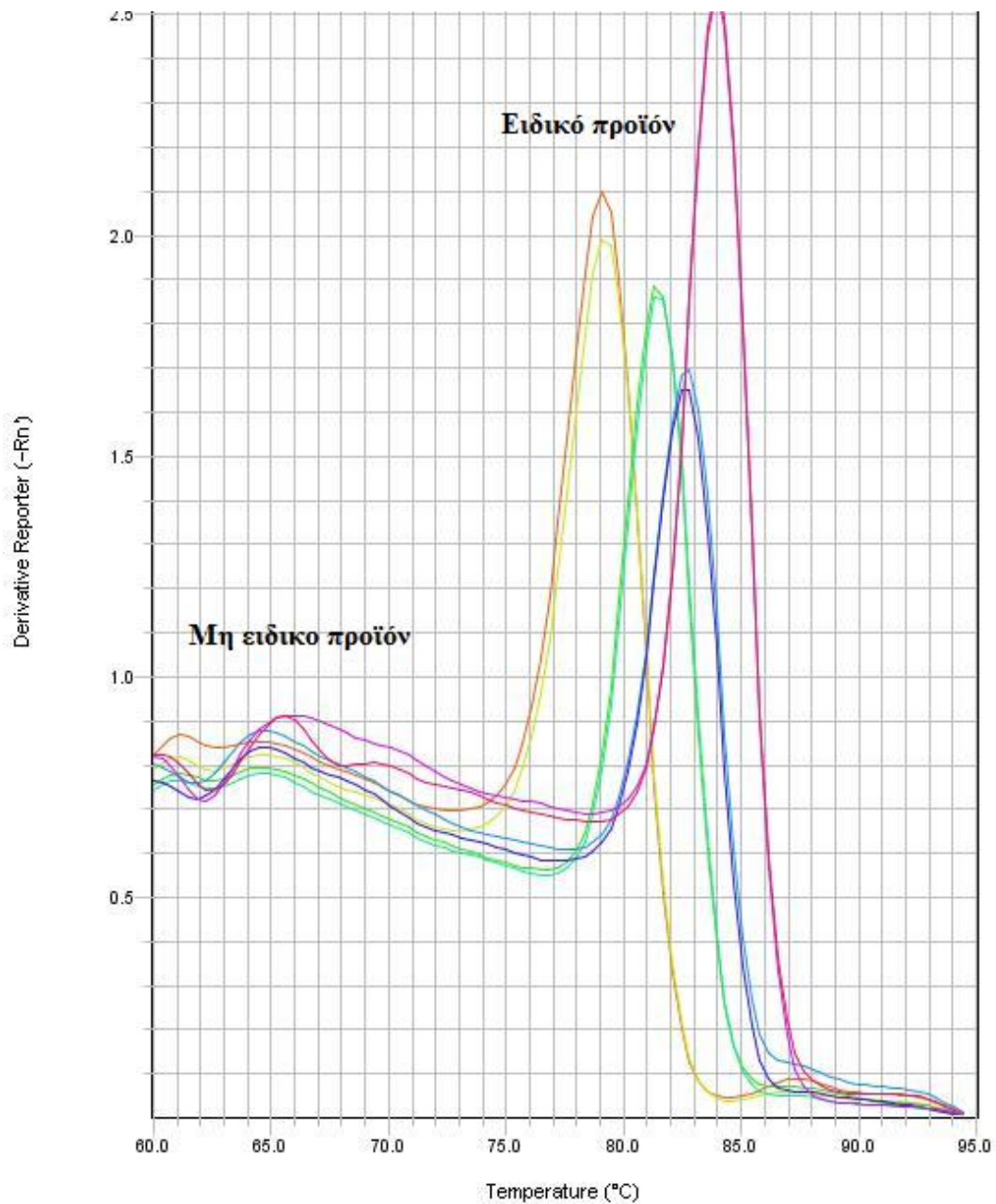
**Εικόνα 22:** Έκφραση του γονιδίου αναφοράς *GAPDH* σε δείγματα μυελού των οστών ασθενών με ΟΛΛ.

### 3.4 Ανάλυση της έκφρασης των γονιδίων *BCL2*, *BAX* και *BCL2L12* σε δείγματα μυελού των οστών ασθενών και μαρτύρων μέσω της αντίδρασης qReal-Time PCR

Η έκφραση των γονιδίων *BCL2*, *BAX* και *BCL2L12* μελετήθηκε σε δείγματα ασθενών με ΟΛΛ και μαρτύρων μέσω της ποσοτικής PCR σε πραγματικό χρόνο (qReal-Time PCR). Πιο συγκεκριμένα, η ποσοτική ανάλυση των γονιδίων πραγματοποιήθηκε με την χρήση της χρωστικής SYBR-Green I στον θερμικό κυκλοποιητή 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems). Ως γονίδιο αναφοράς χρησιμοποιήθηκε και πάλι το γονίδιο *GAPDH*, ως προς το οποίο κανονικοποιείται η έκφραση των γονιδίων-στόχων σε κάθε δείγμα και ως βαθμονομητής χρησιμοποιήθηκε η κυτταρική σειρά HL-60 (Human Promyelocytic Leukemia cells). Μετά το τέλος της αντίδρασης πραγματοποιήθηκαν καμπύλες τήξης (dissociation curve analysis ή melting curve analysis), προκειμένου να διαχωριστούν τα ειδικά από τα μη ειδικά προϊόντα της αντίδρασης χάρη στις διαφορετικές θερμοκρασίες τήξης ( $T_m$ ) που τα χαρακτηρίζουν. Η ποσοτική εκτίμηση των επιπέδων έκφρασης των γονιδίων που μελετώνται πραγματοποιήθηκε με την μέθοδο σχετικού προσδιορισμού  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ . Με την μέθοδο αυτή είναι δυνατή η σύγκριση των επιπέδων έκφρασης των γονιδίων μεταξύ των δειγμάτων καθώς το μέγεθος  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  εκφράζει την ποσότητα του γονιδίου-στόχου κανονικοποιημένη πρώτα ως προς το γονίδιο αναφοράς και έπειτα ως προς τον βαθμονομητή. Παρακάτω στις Εικόνες 23 και 24 παρατίθενται αντιπροσωπευτικές καμπύλες ενίσχυσης και καμπύλες τήξης για το γονίδιο αναφοράς *GAPDH* και τα μελετώμενα γονίδια.



**Εικόνα 23:** Καμπύλες ενίσχυσης της ποσοτικής PCR σε πραγματικό χρόνο για το γονίδιο αναφοράς GAPDH και τα μελετώμενα γονίδια BCL2, BAX και BCL2L12 σε δείγμα Μ.Ο ασθενών με ΟΛΛ. Η καμπύλη με το πορτοκαλί χρώμα αντιστοιχεί στο γονίδιο GAPDH, με το μωβ στο γονίδιο BCL2, με πράσινο στο BAX και μπλε στο BCL2L12.



**Εικόνα 24:** Αντιπροσωπευτική καμπύλη τήξης για τον διαχωρισμό ειδικών από τα μη ειδικά προϊόντα (διμερή εκκινητών) σε δείγμα Μ.Ο παιδιού με ΟΛΛ κατά τη μελέτη των γονιδίων *GAPDH*, *BCL2*, *BAX* και *BCL2L12*.

Ο έλεγχος των mRNA επιπέδων των γονιδίων *BCL2*, *BAX* και *BCL2L12*, με την ποσοτική PCR πραγματικού χρόνου, πραγματοποιήθηκε σε δείγματα 82 ασθενών με ΟΛΛ κατά τη διάγνωση, 56 ασθενών την 33<sup>η</sup> ημέρα της θεραπείας με το πρωτόκολλο BFM (Berlin-Frankfurt-Münster) και 63 μαρτύρων. Έπειτα από τον έλεγχο της έκφρασης του γονιδίου αναφοράς *GAPDH*, την ανάλυση καμπύλης τήξης και τη συλλογή των

κλινικοπαθολογικών δεδομένων, πραγματοποιήθηκε η βιοστατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων.

### **3.5 Ανάλυση της έκφρασης του mRNA των γονιδίων *BCL2*, *BAX* και *BCL2L12* συγκριτικά ανάμεσα σε ασθενείς κατά τη διάγνωση και μάρτυρες**

Από την μελέτη της έκφρασης του *BCL2* προκύπτει ότι το γονίδιο σε επίπεδο mRNA εμφανίζει στατιστικώς σημαντικά αυξημένη έκφραση ( $p < 0,001$ ) στον Μυελό των Οστών ασθενών με ΟΛΛ σε σχέση με τους μάρτυρες όπως φαίνεται στην Εικόνα 25A (μέση τιμή ασθενών: 0,721 RQ units, διάμεσος τιμή: 0,364 RQ units, μέση τιμή μαρτύρων: 0,283 RQ units, διάμεσος τιμή: 0,146 RQ units). Η αξιολόγηση της διαφοροδιαγνωστικής αξίας της έκφρασης των γονιδίων πραγματοποιήθηκε μέσω ανάλυσης καμπυλών ευαισθησίας-ειδικότητας ROC, αλλά και ανάλυσης λογιστικής παλινδρόμησης (logistic regression) τόσο σε μονομεταβλητό όσο και σε πολυμεταβλητό επίπεδο. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της ανάλυσης της πολυμεταβλητής λογιστικής παλινδρόμησης (OR: 3,618; 95% CI: 1,693-7,735;  $p = 0,001$ ; Πίνακας 10) και της καμπύλης ROC (AUC: 0,701, 95%CI: 0,615-0,786;  $p < 0,001$ ; Εικόνα 25B) η αυξημένη έκφραση του *BCL2* παρουσιάζει διαφοροδιαγνωστική ικανότητα καθώς μπορεί να διακρίνει τους υγιείς από τους κακοήθεις ιστούς ανεξάρτητα από τους διαγνωστικούς δείκτες της ηλικίας και του φύλου των ασθενών. Παρομοίως, οι ασθενείς με ΟΛΛ παρουσίασαν αυξημένα επίπεδα mRNA του *BAX* σε σχέση με τους μάρτυρες (μέση τιμή ασθενών: 7,47 RQ units, διάμεσος τιμή: 5,66 RQ units, μέση τιμή μαρτύρων: 5,25 RQ units, διάμεσος τιμή: 4,45 RQ units) αν και η αύξηση δεν ήταν στατιστικώς σημαντική ( $p = 0,060$ ; Εικόνα 25A). Επιπλέον μελετήθηκε ο λόγος *BCL2/BAX* προκειμένου να διαπιστωθεί η συσχέτιση μεταξύ προ- και αντι-αποπτωτικού δυναμικού. Διαπιστώθηκε ότι ο λόγος είναι σημαντικά υψηλότερος σε ασθενείς με ΟΛΛ σε σχέση με τους μάρτυρες ( $p = 0,001$ ; Εικόνα 25A) και επιπλέον ικανός να διαχωρίσει τους καρκινικούς από τους υγιείς ιστούς ανεξάρτητα της ηλικίας και του φύλου των ασθενών όπως φαίνεται από την ανάλυση της πολυμεταβλητής λογιστικής παλινδρόμησης (OR: 3,622; 95%CI: 1,441-9,108;  $p = 0,006$ ; Πίνακας 10) και της ανάλυσης της καμπύλης ROC (AUC: 0,665; 95%CI: 0,577-0,753;  $p = 0,001$ ; Εικόνα 25B). Τα αποτελέσματα αυτά υπογραμμίζουν την αυξημένη έκφραση του *BCL2* και την υπεροχή του αντι-αποπτωτικού δυναμικού στους ασθενείς

με ΟΛΛ. Όσον αφορά στο γονίδιο *BCL2L12*, ( $p=0,030$ ) από την στατιστική μελέτη προέκυψε ότι το γονίδιο σε επίπεδο mRNA εμφανίζει αυξημένη έκφραση στον Μυελό των Οστών ασθενών με ΟΛΛ σε σχέση με τους μάρτυρες όπως φαίνεται στην Εικόνα 26. Η αξιολόγηση της διαφοροδιαγνωστικής αξίας της έκφρασης των γονιδίων πραγματοποιήθηκε μέσω ανάλυσης καμπυλών ευαισθησίας-ειδικότητας ROC, αλλά και ανάλυσης λογιστικής παλινδρόμησης (logistic regression) τόσο σε μονομεταβλητό όσο και σε πολυμεταβλητό επίπεδο χωρίς ωστόσο να αναδείξει στατιστικώς σημαντικά αποτελέσματα (Πίνακας 10 και Εικόνα 26).

Μεταβλητή	<u>Μονομεταβλητή ανάλυση</u>			<u>Πολυμεταβλητή ανάλυση</u>		
	OR <sup>b</sup>	95%CI <sup>c</sup>	<i>p</i> -value <sup>d</sup>	OR <sup>b</sup>	95%CI <sup>c</sup>	<i>p</i> -value <sup>d</sup>
<b>Log<sub>10</sub>BCL2</b>	3,871	1,889-7,929	<0,001	3,618	1,693-7,735	0,001
<b>Log<sub>10</sub>BAX</b>	2,598	0,954-7,077	0,062	2,683	0,908-7,943	0,074
<b>Log<sub>10</sub> [BCL2/BAX]</b>	3,870	1,650-9,077	0,002	3,622	1,441-9,108	0,006
<b>Log<sub>10</sub>BCL2L12</b>	3,358	1,158-9,738	0,026	2,756	0,884-8,598	0,081

<sup>a</sup>Η πολυμεταβλητή ανάλυση έγινε ως προς την ηλικία και το φύλο των ασθενών

<sup>b</sup>OR: Odds Ratio

<sup>c</sup>CI: Confidence Interval

<sup>d</sup>Test for trend

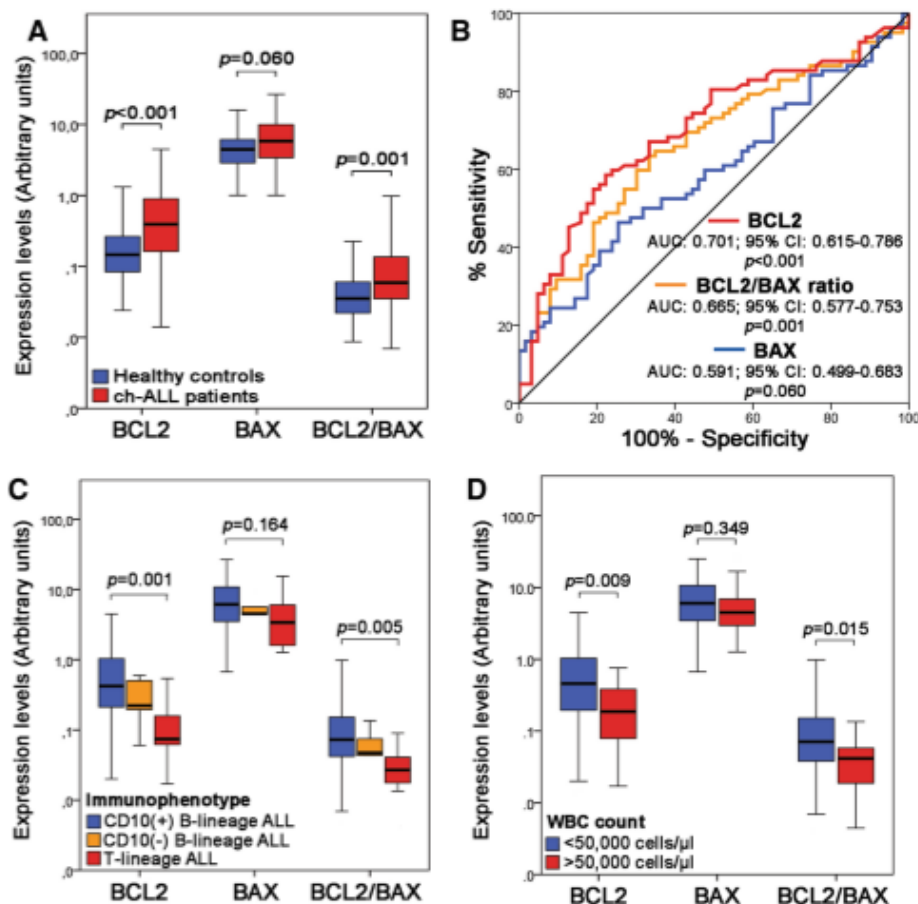
**Πίνακας 10:** Ανάλυση λογιστικής παλινδρόμησης για την διάκριση δειγμάτων Μυελού των Οστών ασθενών με ΟΛΛ από δείγματα μαρτύρων.

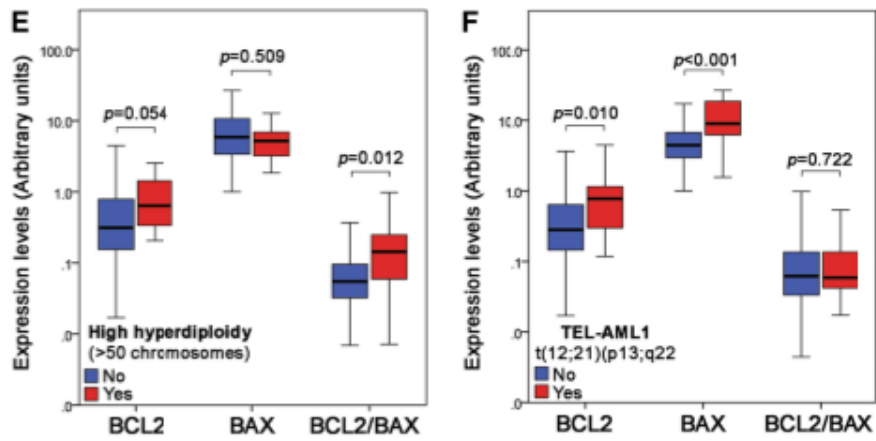
### 3.6 Ανάλυση της σχέσης μεταξύ των επιπέδων έκφρασης του mRNA των γονιδίων *BCL2*, *BAX* και *BCL2L12* στη διάγνωση και των κλινικοπαθολογικών χαρακτηριστικών των ασθενών

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της μελέτης τα αυξημένα επίπεδα του *BCL2* και η αύξηση του λόγου *BCL2/BAX* σχετίζονται ισχυρά με κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά των ασθενών που θεωρούνται θετικής προγνωστικής αξίας. Συγκεκριμένα, αυξημένα επίπεδα έκφρασης του *BCL2* παρατηρήθηκαν στους ασθενείς με CD10(+) Β-ΟΛΛ σε σχέση με αυτούς που φέρουν CD10(-) ή πάσχουν από ΟΛΛ Τ-τύπου ( $p=0,001$ ; Εικόνα 25C). Επιπλέον, στατιστικώς σημαντική ήταν η αύξηση του λόγου *BCL2/BAX* που

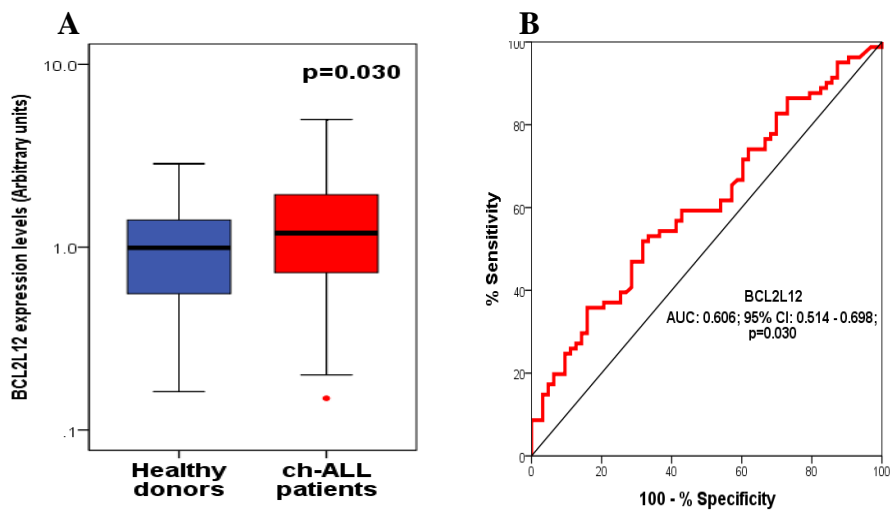


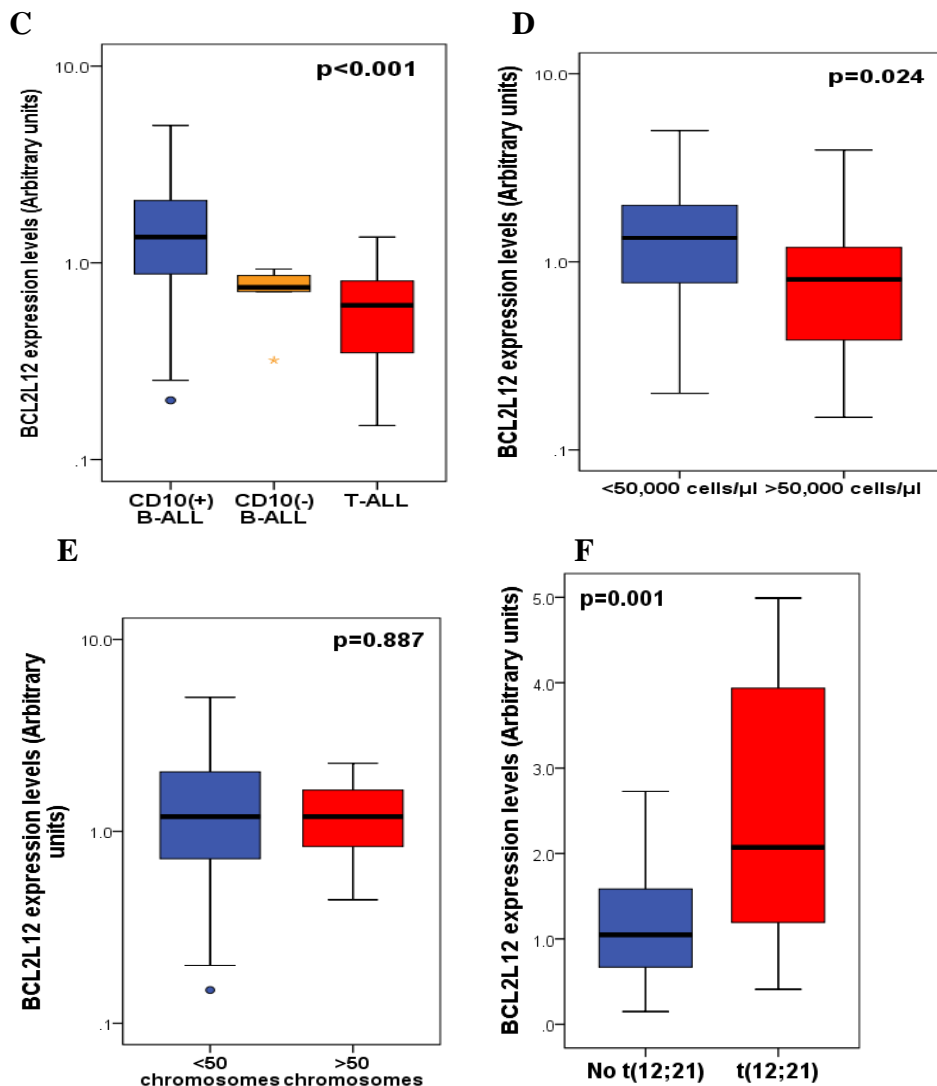
βρέθηκε στους ασθενείς με Β-ΟΛΛ και CD10(+) ανοσοφαινότυπο σε σχέση με τους ασθενείς με Τ-ΟΛΛ ( $p=0,005$ ; Εικόνα 25C), δείχνοντας την υπεροχή του αντιαποπτωτικού δυναμικού σε αυτές τις ομάδες. Επίσης, αυξημένα επίπεδα του *BCL2* ( $p=0,009$ ) και του λόγου *BCL2/BAX* ( $p=0,015$ ) παρατηρήθηκαν σε ασθενείς με αριθμό λευκών αιμοσφαιρίων στη διάγνωση  $<50,000$  cells/ $\mu$ l (Εικόνα 25D). Τέλος, αυξημένα επίπεδα του *BCL2* ( $p=0,054$ ) και του λόγου *BCL2/BAX* ( $p=0,012$ ) εμφάνισαν οι ασθενείς με υψηλό υπερδιπλοειδισμό (51-65 χρωμοσώματα) (Εικόνα 25F) ενώ αυτοί με την TEL-AML1 αναδιάταξη/t(12;21)(p13;q22) παρουσίασαν στατιστικώς σημαντικά αυξημένη έκφραση τόσο του *BCL2* ( $p=0,010$ ) όσο και του *BAX* ( $p<0,001$ ) (Εικόνα 25F). Για το γονίδιο *BCL2L12* αυξημένα επίπεδα βρέθηκαν στους ασθενείς που φέρουν CD10(+) ανοσοφαινότυπο σε σχέση με αυτούς που φέρουν CD10(-) ή πάσχουν από ΟΛΛ Τ-τύπου ( $p<0,01$ ; Εικόνα 26C) και στους ασθενείς με την TEL-AML1 αναδιάταξη/t(12;21)(p13;q22) ( $p=0,001$ ; Εικόνα 26E) σε στατιστικά σημαντικό βαθμό. Επίσης, παρατηρήθηκε αύξηση των επιπέδων έκφρασης του γονιδίου στους ασθενείς με αριθμό λευκών αιμοσφαιρίων στη διάγνωση  $<50,000$  cells/ $\mu$ l ( $p=0,024$ ; Εικόνα 26D).





**Εικόνα 25:** (Α). Box plots που παρουσιάζουν τα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων *BCL2* και *BAX* καθώς και τους λόγους τους *BCL2/BAX* σε δείγματα Μυελού των οστών ασθενών με ΟΑΛ και μαρτύρων (Β). ROC καμπύλη της έκφρασης των γονιδίων *BCL2* και *BAX* καθώς και του λόγου τους.





**Εικόνα 26:** (Α). Βοx plots που παρουσιάζουν τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου *BCL2L12* σε δείγματα Μυελού των οστών ασθενών με ΟΑΛ και μαρτύρων (Β). ROC καμπύλη της έκφρασης του γονιδίου *BCL2L12* που δείχνει την διαφοροδιαγνωστική ικανότητα μεταξύ ασθενών και μαρτύρων.

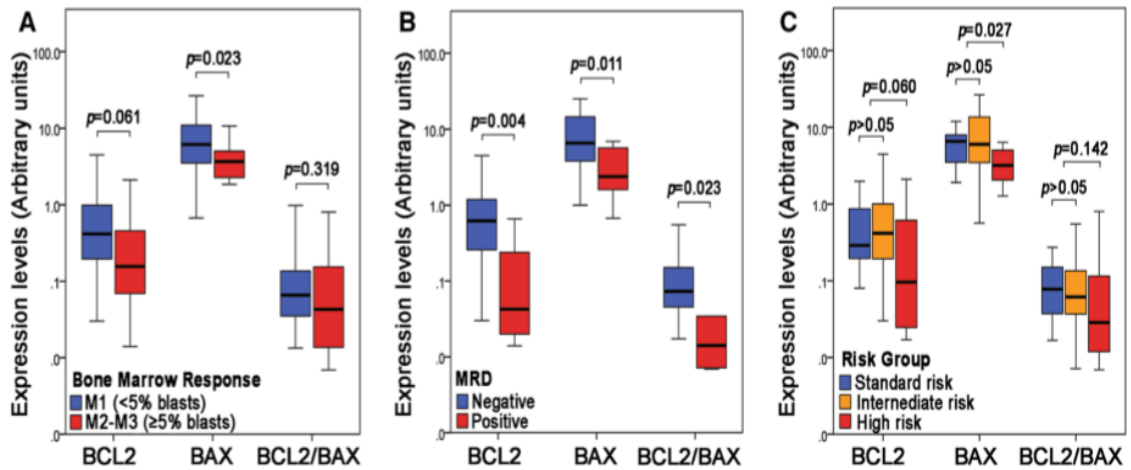
### 3.7 Μελέτη της προγνωστικής αξίας (απάντηση στην θεραπεία) της έκφρασης των υπό μελέτη γονιδίων *BCL2*, *BAX* και *BCL2L12* στη διάγνωση της νόσου

Τα αποτελέσματα της μελέτης φανερώνουν ότι τα mRNA επίπεδα έκφρασης των γονιδίων *BCL2*, *BAX* και *BCL2L12* στο μυελό των οστών των ασθενών κατά τη διάγνωση της νόσου, μπορούν να αποτελέσουν δείκτη πρόβλεψης της απάντησης στη θεραπεία με το πρωτόκολλο BFM. Συγκεκριμένα, μελετήθηκε η συσχέτιση των επιπέδων έκφρασης των γονιδίων με δείκτες απάντησης στη θεραπεία (απάντηση στον Μυελό των Οστών-αριθμός βλαστών και ελάχιστη υπολειπόμενη νόσος-MRD). Χαμηλότερα

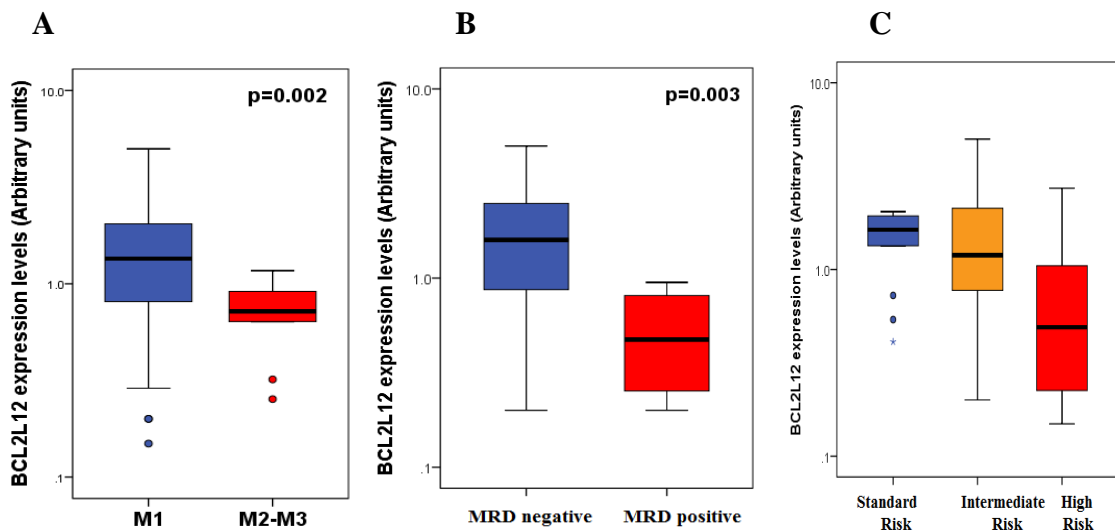
mRNA επίπεδα έκφρασης των *BCL2*, *BAX*, *BCL2L12* καθώς και μικρότερος λόγος *BCL2/BAX* παρατηρούνται στους M2-M3 ασθενείς την 15<sup>η</sup> ημέρα, στους ασθενείς με θετική MRD την 33<sup>η</sup> ημέρα και στην ομάδα ασθενών υψηλού-κινδύνου (Εικ. 27 και 28).

Η ανάλυση λογιστικής παλινδρόμησης (Πίνακας 11) επιβεβαίωσε τον αυξημένο κίνδυνο κακής ανταπόκρισης στο BFM πρωτόκολλο. Πιο συγκεκριμένα, αυξημένος κίνδυνος παρουσίας  $\geq 5\%$  ποσοστού βλαστών την ημέρα 15 (M2-M3) παρατηρείται στους ασθενείς με χαμηλά επίπεδα έκφρασης των *BCL2* (OR: 6,767; 95% CI: 1,835-24,96,  $p=0,004$ ), *BAX* (OR: 8,744; 95% CI: 1,070-71,45  $p=0,043$ ) και *BCL2L12* (OR: 0,167; 95% CI: 0,042-0,674  $p=0,012$ ) κατά την διάγνωση (Εικ. 27A και 28A). Αντίστοιχα, αυξημένος κίνδυνος θετικής MRD παρατηρείται επίσης στις ομάδες ασθενών με χαμηλά επίπεδα έκφρασης των υπό μελέτη γονιδίων: *BCL2* (OR: 13,00; 95% CI: 1,939-87,14  $p=0,008$ ), *BAX* (OR: 5,227; 95% CI: 0,565-48,38  $p=0,145$ ) και *BCL2L12* (OR: 0,025; 95% CI: 0,001-0,639  $p=0,026$ ) στη διάγνωση (Εικ. 27B, 28B). Τέλος, αυξημένος κίνδυνος M2-M3 μυελού των οστών και θετικής MRD σημειώθηκε στην ομάδα ασθενών με χαμηλό λόγο *BCL2/BAX*.

Για την περαιτέρω αξιολόγηση της προγνωστικής αξίας των γονιδίων μελετήθηκε και η έκφρασή τους συνδυαστικά. Όπως φαίνεται από τα μοντέλα της μονομεταβλητής λογιστικής παλινδρόμησης (Πίνακας 11), οι ασθενείς με χαμηλά επίπεδα έκφρασης και των δύο γονιδίων *BAX* και *BCL2* στη διάγνωση παρουσιάζουν αυξημένο κίνδυνο M2-M3 απάντησης (OR: 8,400; 95% CI: 2,225-31,72;  $p=0,002$ ) ή θετικής MRD (OR: 16,00; 95% CI: 2,310-110,8;  $p=0,005$ ). Μοντέλα πολυμεταβλητής λογιστικής παλινδρόμησης, για την πρόβλεψη M2-M3 απάντησης των ασθενών (OR: 13,84; 95% CI: 2,120-90,32;  $p=0,006$ ) και θετικής MRD (OR: 14,10; 95% CI: 1,129-176,0;  $p=0,040$ ) έδειξαν την ανεξάρτητη, από την ηλικία, το φύλο των ασθενών, τον WBC, την B- ή T-ΟΛΛ, την παρουσία  $t(12;21)(p13;q22)/TEL-AML1$  αναδιάταξης ή υψηλού υπερδιπλοειδισμού, προγνωστική αξία της ταυτόχρονης χαμηλής έκφρασης των *BCL2* και *BAX* για τους ασθενείς στους οποίους χορηγείται το πρωτόκολλο BFM.



**Εικόνα 27:** (A-C) Box plots που παρουσιάζουν την έκφραση των γονιδίων *BCL2*, *BAX* και του λόγου *BCL2/BAX* σε δείγματα Μυελού των οστών (Μ.Ο) ασθενών με ΟΛΛ σε σχέση με την απάντηση στον Μ.Ο την 15η ημέρα (ποσοστό βλαστών) (A), MRD την 33η ημέρα (B) και την κατηγοριοποίηση των ασθενών βάσει κινδύνου (C).



**Εικόνα 28:** (A-C) Box plots που παρουσιάζουν την έκφραση του γονιδίου *BCL2L12* σε δείγματα Μυελού των οστών (Μ.Ο) ασθενών με ΟΛΛ σε σχέση με την απάντηση στον Μ.Ο την 15η ημέρα (ποσοστό βλαστών) (A), MRD την 33η ημέρα (B) και την κατηγοριοποίηση των ασθενών βάσει κινδύνου (C).

	<i>Μονομεταβλητή ανάλυση</i>					
	M2-M3(≥5% βλάστες) Απάντηση στον MO (Ημέρα 15)			θετική MRD (Ημέρα 33)		
Μεταβλητή	OR <sup>a</sup>	95% CI <sup>b</sup>	p-value <sup>c</sup>	OR <sup>a</sup>	95% CI <sup>b</sup>	p-value <sup>c</sup>
<b>BCL2</b>						
Υψηλή έκφραση	1,00			1,00		
Χαμηλή έκφραση	6,767	1,835-24,96	0,004	13,00	1,939-87,14	0,008
<b>BAX</b>						
Υψηλή έκφραση	1,00			1,00		
Χαμηλή έκφραση	8,744	1,070-71,45	0,043	5,227	0,565-48,38	0,145
<b>BCL2LI2</b>						
Υψηλή έκφραση	1,0					
Χαμηλή έκφραση	0,167	0,042-0,674	0,012	0,025	0,001-0,639	0,026
<b>BCL2 και BAX</b>						
Χαμηλή έκφραση						
Όχι						
Ναι	8,400	2,225-31,72	0,002	16,00	2,310-110,8	0,005
<b>Ανοσοφαινότυπος</b>						
B-ΟΛΛ	1,00			1,00		
T-ΟΛΛ	1,550	0,287-8,378	0,611	10,75	1,177-98,15	0,035
<b>WBC</b>	0,967	0,187-4,986	0,968	7,000	0,890-55,05	0,064
<b>TEL-AML1/ t(12;21)(p13;q22)</b>	<0,001		0,998	<0,001		0,998
<b>Υπερδιπλοειδισμός (&gt;50 χρωμοσώματα)</b>	2,417	0,625-9,337	0,201	2,312	0,359-14,88	0,377
<b>Ηλικία</b>						
1-10 ετών						
≥10 ετών	2,063	0,581-7,323	0,262	1,545	0,248-9,619	0,641
<b>Φύλο</b>						
Κορίτσια	1,00			1,00		
Αγόρια	1,333	0,366-4,853	0,663	0,667	0,121-3,678	0,642
	<i>Πολυμεταβλητή ανάλυση<sup>d</sup></i>					
	M2-M3(≥5%βλάστες) Απάντηση στον MO (Ημέρα 15)			θετική MRD (Ημέρα 33)		
Μεταβλητή	OR <sup>a</sup>	95% CI <sup>b</sup>	p-value <sup>c</sup>	OR <sup>a</sup>	95% CI <sup>b</sup>	p-value <sup>c</sup>
<b>BCL2</b>						
Υψηλή έκφραση	1,00			1,00		
Χαμηλή έκφραση	14,10	2,087-95,33	0,007	12,87	0,921-179,9	0,058
<b>BAX</b>						
Υψηλή έκφραση	1,00			1,00		
Χαμηλή έκφραση	5,367	0,594-48,50	0,135	9,281	0,301-286,7	0,203
<b>BCL2LI2</b>						
Υψηλή έκφραση						

Χαμηλή έκφραση	0,079	0,011-0,543	0,010	0,001	<0,001-0,967	0,049
<b><i>BCL2 και BAX</i></b> <b>χαμηλή έκφραση</b>						
Όχι						
Ναι	13,84	2,120-90,32	0,006	14,10	1,129-176,0	0,040

<sup>a</sup> OR: Odds ratio

<sup>b</sup> CI: 95% Confidence intervals

<sup>c</sup> Test for trend

<sup>d</sup> Η πολυμεταβλητή ανάλυση έγινε ως προς τον ανασοφαινότυπο, τον αριθμό λευκών αιμοσφαιρίων WBC στη διάγνωση, την αναδιάταξη TEL/AML-1, υψηλό υπερδιπλοειδισμό, ηλικία και φύλο ασθενών

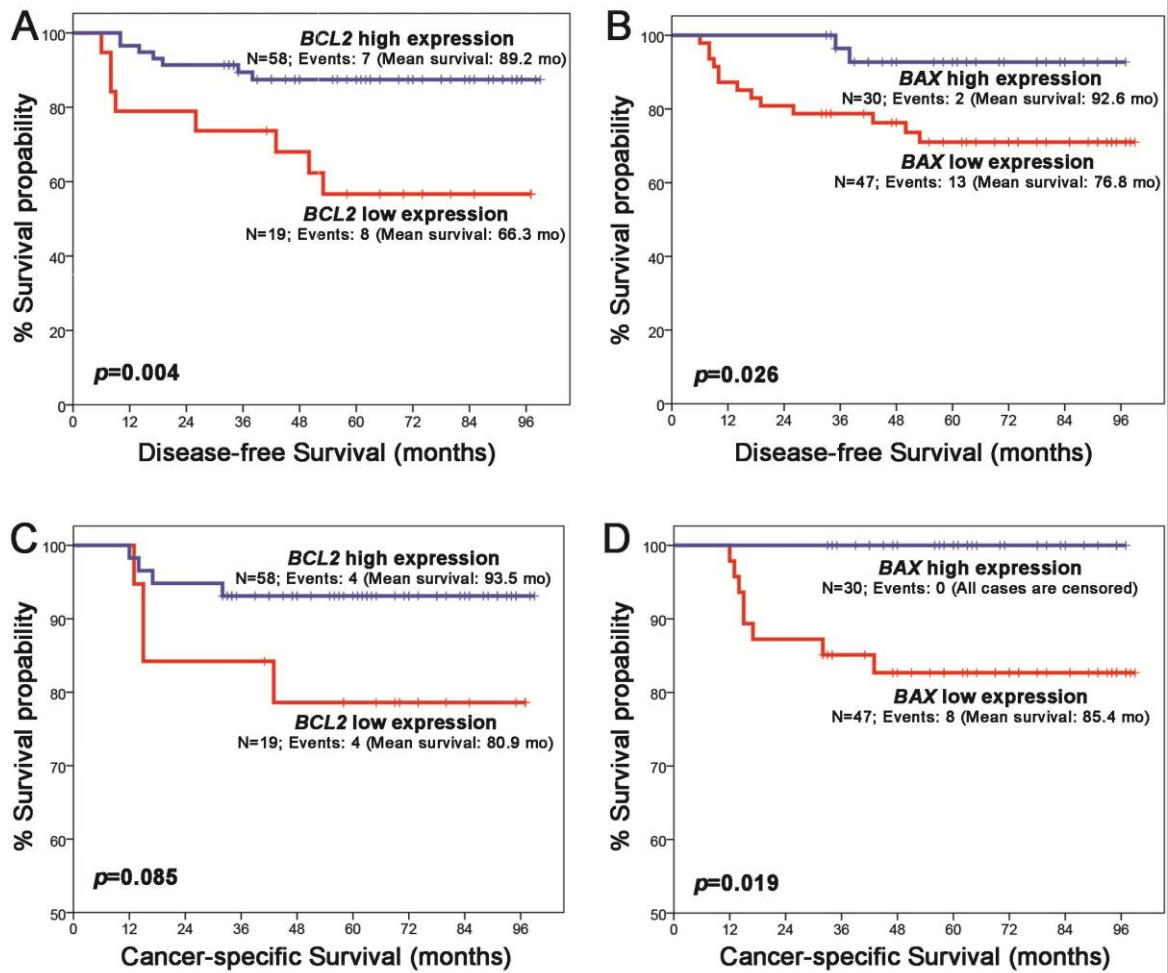
**Πίνακας 11:** Ανάλυση λογιστικής παλινδρόμησης για την πρόγνωση της απόκρισης στη θεραπεία με το πρωτόκολλο BFM σε ασθενείς με ΟΛΛ βάσει των επιπέδων έκφρασης *BCL2*, *BAX* και *BCL2L12* στη διάγνωση.

### 3.8 Μελέτη της προγνωστικής αξίας των υπό μελέτη γονιδίων *BCL2*, *BAX* και *BCL2L12* στην πρόβλεψη επιβίωσης των ασθενών με παιδική ΟΛΛ

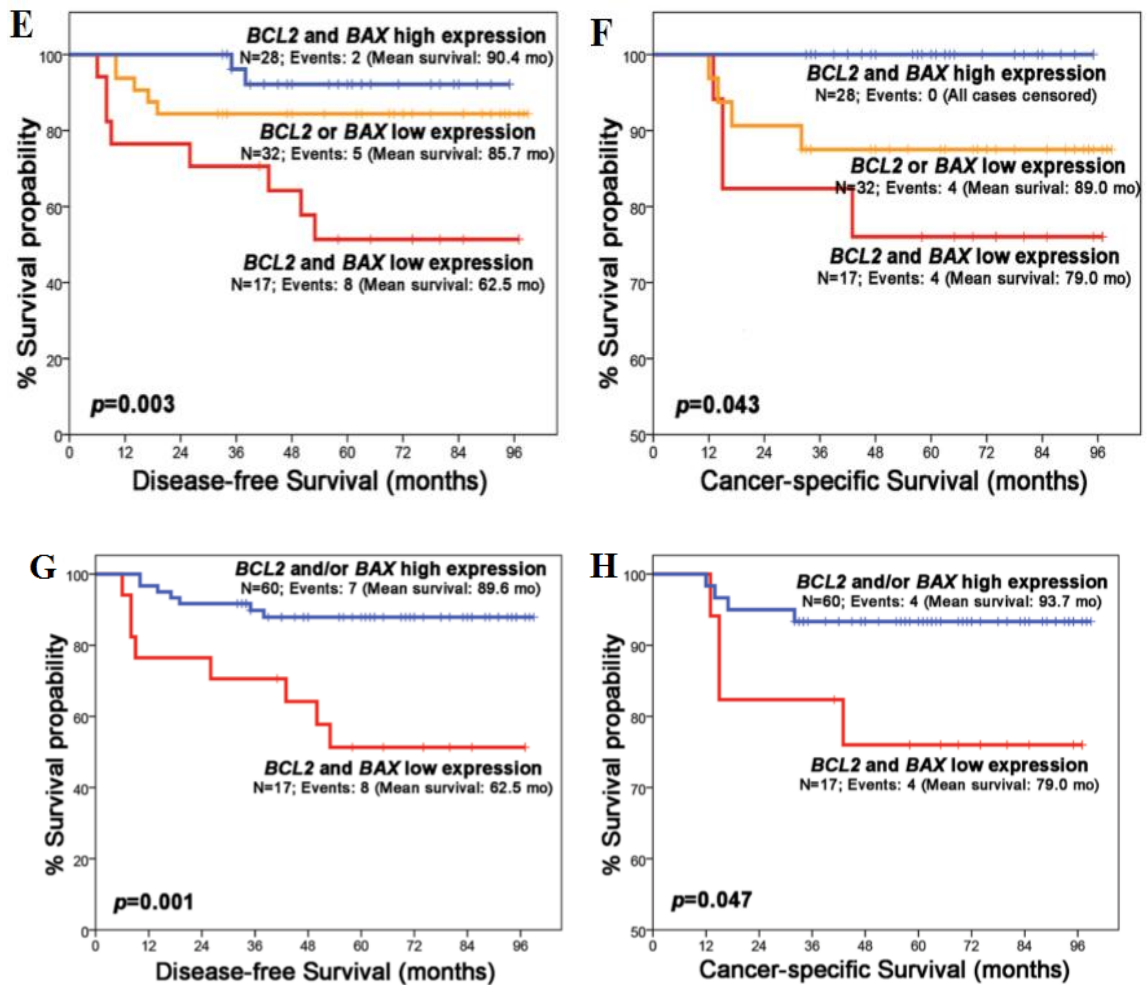
Περαιτέρω μελετήθηκε η σημασία των επιπέδων έκφρασης των γονιδίων *BCL2*, *BAX* και *BCL2L12* στη φάση της διάγνωσης της νόσου, για την επιβίωση των ασθενών. Ασθενείς με υψηλά επίπεδα έκφρασης των γονιδίων κατά την διάγνωση της νόσου βρέθηκε να επωφελούνται περισσότερο από την εφαρμοζόμενη θεραπεία με το πρωτόκολλο BFM, ενώ αυτοί με μειωμένα επίπεδα των γονιδίων διατρέχουν υψηλότερο κίνδυνο αντίστασης στη θεραπεία και πρώιμης υποτροπής.

Με την βοήθεια των καμπυλών επιβίωσης Kaplan-Meier (Εικ. 29 και 30) διαπιστώνεται ότι ασθενείς με χαμηλά επίπεδα έκφρασης των *BCL2* ( $p=0,004$ ), *BAX* ( $p=0,026$ ) και *BCL2L12* ( $p=0,038$ ) εμφανίζουν μειωμένο χρόνο επιβίωσης ελεύθερης νόσου (Disease-free survival-DFS). Παράλληλα, χειρότερη ειδική επιβίωση από την νόσο (cancer-specific survival -CSS) παρατηρήθηκε επίσης στην ομάδα ασθενών με μειωμένα επίπεδα έκφρασης των υπό μελέτη *BCL2* ( $p=0,085$ ) και *BAX* ( $p=0,019$ ). Η ταυτόχρονη μελέτη των γονιδίων *BCL2* και *BAX* επιβεβαίωσε την δυσμενή προγνωστική τους αξία για την νόσο. Πιο συγκεκριμένα, ασθενείς με ταυτόχρονη υποέκφραση και των δυο γονιδίων στη διάγνωση παρουσιάζουν σημαντικά χειρότερη επιβίωση ελεύθερης νόσου (Disease-free survival-DFS) ( $p=0,003$ ) και ειδική επιβίωση από την νόσο (cancer-specific survival -CSS) ( $p=0,043$ ) σε σχέση με τους ασθενείς με υπερέκφραση των γονιδίων ή υποέκφραση μόνο του ενός εξ αυτών.

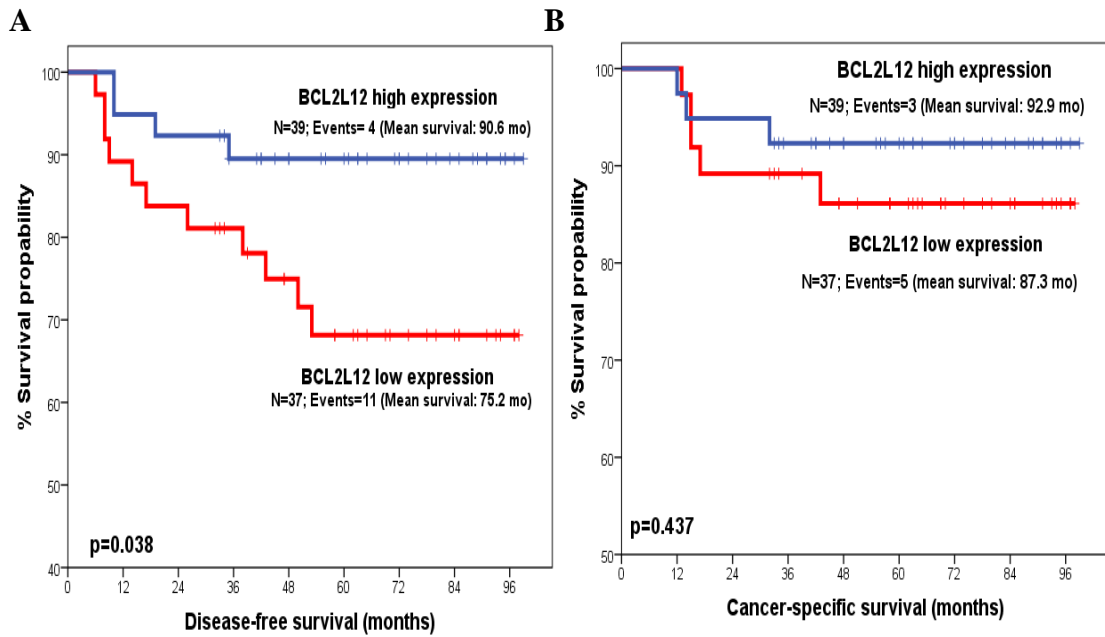
Η ανάλυση παλινδρόμησης κατά Cox (Πίνακας 12) ανέδειξε την δυσμενή εξέλιξη των ασθενών με μειωμένα επίπεδα έκφρασης των υπό μελέτη γονιδίων. Αναλυτικότερα, αυξημένος κίνδυνος υποτροπής της νόσου διαπιστώθηκε στους ασθενείς με υποέκφραση τόσο του *BCL2* (HR: 3,903; 95% CI:1,414-10,77  $p=0,009$ ), του *BAX* (HR: 4,640; 95% CI:1,046-20,57  $p=0,043$ ) και του *BCL2L12* (HR: 3,149; 95% CI:1,002-9,890  $p=0,059$ ), καθώς και από την ταυτόχρονη ανάλυση των *BCL2* και *BAX* (HR: 4,700 95% CI:1,703-12,97  $p=0,003$ ). Επίσης διαπιστώθηκε αυξημένος κίνδυνος θανάτου στους ασθενείς με υποέκφραση τόσο του *BCL2* (HR: 3,159; 95% CI:0,789-12,64  $p=0,104$ ), του *BAX* (HR: 46,99; 95% CI:0,137-16,110  $p=0,196$ ) και του *BCL2L12* (HR: 0,418; 95% CI:0,418-7,322  $p=0,444$ ), καθώς και από την ταυτόχρονη ανάλυση των *BCL2* και *BAX* (HR: 3,704 95% CI:0,926-14,82  $p=0,064$ ).







**Εικόνα 29:** Kaplan-Meier καμπύλες για την επιβίωση ελεύθερη νόσου (DFS) και την ειδική επιβίωση από τη νόσο (CSS) των ασθενών ως προς τα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων BCL2 και BAX στη διάγνωση. Οι τιμές  $p$  υπολογίστηκαν με τις δοκιμασίες Mann-Whitney U test και log-rank.



**Εικόνα 30:** Kaplan-Meier καμπύλες για την επιβίωση ελεύθερη νόσου (DFS) και την ειδική επιβίωση από τη νόσο (CSS) των ασθενών ως προς τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου BCL2L12 στη διάγνωση. Οι τιμές  $p$  υπολογίστηκαν με τις δοκιμασίες Mann-Whitney U test και log-rank.

	<i>Μονομεταβλητή ανάλυση</i>					
	Επιβίωση ελεύθερη νόσου (DFS)			Ειδική επιβίωση από τη νόσο (CSS)		
Μεταβλητή	HR <sup>a</sup>	95% CI <sup>b</sup>	p-value <sup>c</sup>	HR <sup>a</sup>	95% CI <sup>b</sup>	p-value <sup>c</sup>
<b>BCL2</b>						
Υψηλή έκφραση	1.00			1.00		
Χαμηλή έκφραση	3.903	1.414-10.77	0.009	3.159	0.789-12.64	0.104
<b>BAX</b>						
Υψηλή έκφραση	1.00			1.00		
Χαμηλή έκφραση	4.640	1.046-20.57	0.043	46.99	0.137-16.110	0.196
<b>BCL2L12</b>						
Υψηλή έκφραση	1.00			1.00		
Χαμηλή έκφραση	3.149	1.002-9.890	0.050	1.750	0.418-7.322	0.444
<b>BCL2 και BAX χαμηλή έκφραση</b>						
Όχι	1.00			1.00		
Ναι	4.700	1.703-12.97	0.003	3.704	0.926-14.82	0.064
<b>Ανοσοφαινότυπος</b>						
B-ΟΛΛ	1.00			1.00		
T-ΟΛΛ	1.547	0.821-2.914	0.177	2.314	1.129-4.743	0.022
<b>WBC</b>						
<50,000 cells/μl	1.00			1.00		
≥50,000 cells/μl	1.259	0.355-4.464	0.722	2.958	0.706-12.39	0.138
<b>TEL-AML1/ t(12;21)(p13;q22)</b>	0.158	0.021-1.203	0.075	0.028	<0.01-16.51	0.273
<b>Υπερδιπλοειδισμός (&gt;50 χρωμοσώματα)</b>	1.168	0.329-4.144	0.810	1.541	0.311-7.635	0.597
<b>Ηλικία</b>						
1-10 ετών	1.00					
≥10 ετών	4.146	1.501-11.45	0.006	10.61	2.139-52.63	0.004
<b>Φύλο</b>						
Κορίτσια	1.00			1.00		
Αγόρια	1.290	0.441-3.775	0.642	1.086	0.259-4.544	0.910
<b>Ποσοστό βλαστών ΜΟ</b>						
<5% (M1)	1.00					
>5% (M2-M3)	2.461	1.465-4.134	0.001	2.082	1.016-4.267	0.045
<b>MRD</b>						
Αρνητική	1.00			1.00		
Θετική	4.856	1.211-19.50	0.026	4.491	0.259-23.99	0.430
<b>Ομάδα κινδύνου</b>						
Χαμηλού, ενδιάμεσου	1.00			1.00		
Υψηλού κινδύνου	1.958	1.103-3.473	0.022	1.855	0.833-4.133	0.131
	<i>Πολυμεταβλητή ανάλυση<sup>d</sup></i>					
	<b>Επιβίωση</b>			<b>Ειδική επιβίωση από τη νόσο (CSS)</b>		

Μεταβλητή	ελεύθερη νόσου (DFS)			HR <sup>a</sup>	95% CI <sup>b</sup>	p-value <sup>c</sup>
	HR <sup>a</sup>	95% CI <sup>b</sup>	p-value <sup>c</sup>			
<b>BCL2</b>						
Υψηλή έκφραση	1.00			1.00		
Χαμηλή έκφραση	1.350	0.307-5.941	0.691	0.535	0.044-6.513	0.624
<b>BAX</b>						
Υψηλή έκφραση	1.00			1.00		
Χαμηλή έκφραση	1.805	0.308-10.57	0.513	1.085	0.093-12.70	0.948
<b>BCL2L12</b>						
Υψηλή έκφραση	1.00			1.00		
Χαμηλή έκφραση	0.934	0.212-4.112	0.928	0.100	0.008-1.315	0.080
<b>BCL2 και BAX χαμηλή έκφραση</b>						
Όχι	1.00			1.00		
Ναι	1.565	0.371-6.600	0.542	0.675	0.071-6.441	0.733

<sup>a</sup> Hazard Ratio

<sup>b</sup> 95% Confidence Intervals

<sup>c</sup> Test for trend

<sup>d</sup> Η πολυμεταβλητή ανάλυση έγινε ως προς τον ανοσοφαινότυπο, τον αριθμό λευκών αιμοσφαιρίων WBC στη διάγνωση, την αναδιάταξη TEL/AML-1, υψηλό υπερδιπλοειδισμό, ηλικία και φύλο ασθενών, ποσοστό βλαστών στο M.O, MRD, ομάδα κινδύνου

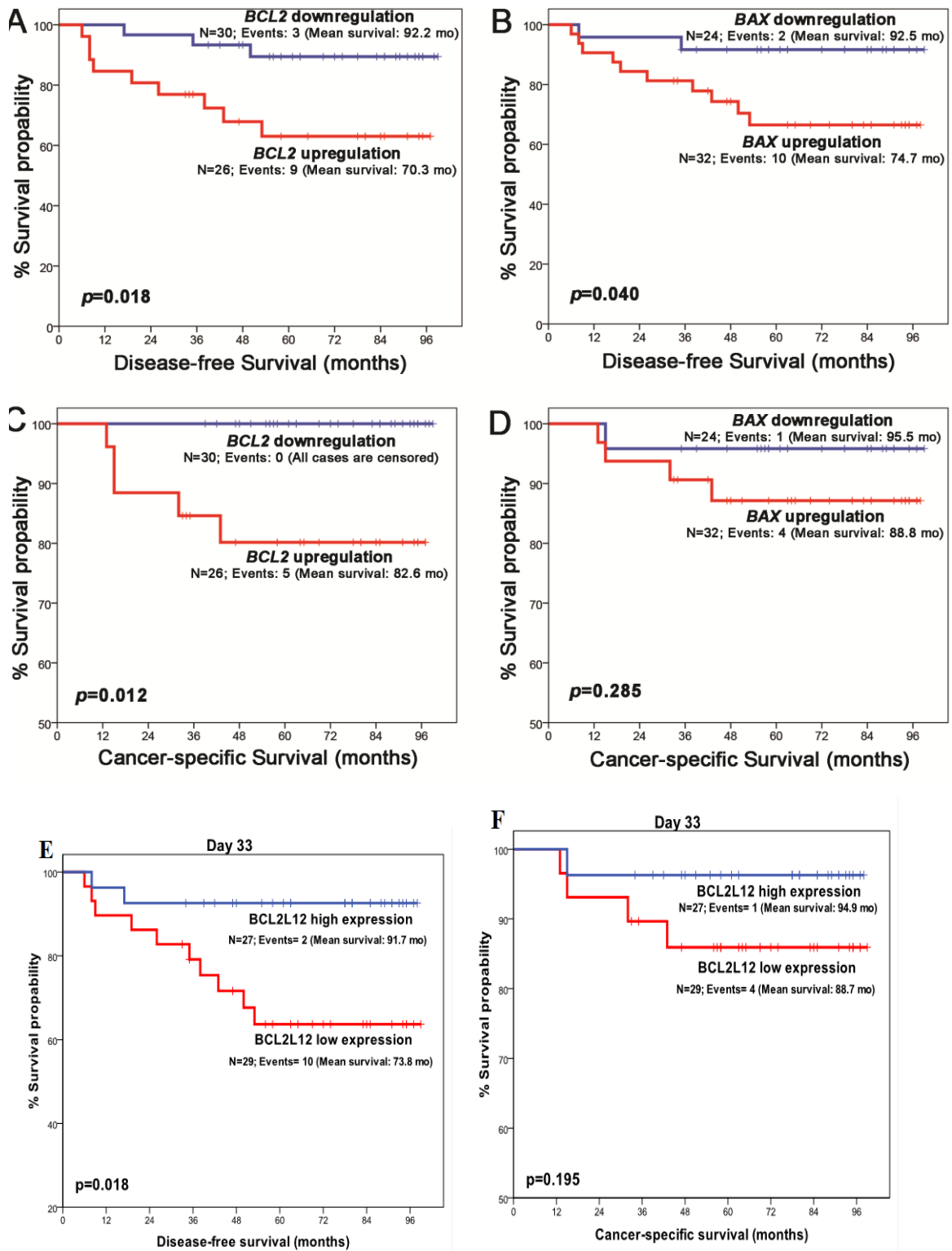
**Πίνακας 12:** Ανάλυση παλινδρόμησης κατά Cox για την πρόγνωση της επιβίωσης ελεύθερης νόσου (DFS) και της ειδικής επιβίωσης για τη νόσο (CSS) των ασθενών με ΟΛΛ βάσει των επιπέδων έκφρασης των γονιδίων *BCL2*, *BAX* και *BCL2L12* στη διάγνωση.

### 3.9 Μελέτη της σχέσης της έκφρασης των υπό μελέτη γονιδίων *BCL2*, *BAX* και *BCL2L12* μετά την έναρξη της θεραπείας και της επιβίωσης των ασθενών με ΟΛΛ

Η έκφραση των γονιδίων *BCL2*, *BAX* και *BCL2L12* αξιολογήθηκε περαιτέρω την 33<sup>η</sup> ημέρα μετά την έναρξη της θεραπείας με το πρωτόκολλο BFM. Βρέθηκε ότι τα αυξημένα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων *BCL2* και *BAX* σε επίπεδο mRNA την 33<sup>η</sup> ημέρα σε σχέση με τη διάγνωση συσχετίζονται με μικρότερους χρόνους επιβίωσης. Πιο συγκεκριμένα, οι ασθενείς με αυξημένα επίπεδα *BCL2* (p=0,018) ή *BAX* (p=0,040) την 33<sup>η</sup> ημέρα θεραπείας σε σχέση με τη διάγνωση εμφανίζουν μικρότερο χρόνο επιβίωσης ελεύθερης νόσου- DFS (Εικόνα 31). Στην περίπτωση του *BCL2* η αυξημένη έκφραση την 33<sup>η</sup> ημέρα βρέθηκε ότι σχετίζεται και με μικρότερο χρόνο ειδικής επιβίωσης από την νόσο –CSS (p=0,012), ενώ η συσχέτιση αυτή για το *BAX* δεν βρέθηκε στατιστικώς

σημαντική ( $p=0.285$ ) (Εικόνα 31). Αντίθετα, οι ασθενείς με αυξημένα επίπεδα *BCL2L12* την 33<sup>η</sup> ημέρα θεραπείας σε σχέση με τη διάγνωση εμφανίζουν μεγαλύτερο χρόνο επιβίωσης ελεύθερης νόσου- DFS ( $p=0.018$ ) και μεγαλύτερο χρόνο ειδικής επιβίωσης από την νόσο -CSS ( $p=0.195$ ) (Εικόνα 31). Η ανάλυση παλινδρόμησης κατά Cox (Πίνακας 13) ανέδειξε την δυσμενή εξέλιξη των ασθενών με αυξημένα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων *BCL2* και *BAX*. Αναλυτικότερα, αυξημένος κίνδυνος υποτροπής της νόσου διαπιστώθηκε στους ασθενείς με υπερέκφραση τόσο του *BCL2* (HR: 4,270; 95% CI:1,153-15,81  $p=0,030$ ) όσο και του *BAX* (HR: 4,295; 95% CI:0,940-19,63  $p=0,060$ ). Αντίθετα αυξημένος κίνδυνος υποτροπής της νόσου διαπιστώθηκε στους ασθενείς με υποέκφραση του *BCL2L12* (HR: 5,144; 95% CI:1,126-23,49  $p=0,035$ ). Επίσης διαπιστώθηκε αυξημένος κίνδυνος θανάτου στους ασθενείς με υπερέκφραση τόσο του *BCL2* (HR: 84,78; 95% CI:0,058-122971  $p=0,232$ ) και του *BAX* (HR: 3,098; 95% CI:0,346-27719  $p=0,312$ ), όσο και σε αυτούς που εμφάνισαν ταυτόχρονη υπερέκφραση των γονιδίων *BCL2* και *BAX* (HR: 9,198; 95% CI:1,027-92,37  $p=0,047$ ). Αντίθετα, αυξημένος κίνδυνος θανάτου διαπιστώθηκε σε χαμηλή έκφραση του *BCL2L12* (HR: 3,825; 95% CI:0,427-34,22  $p=0,230$ ).

Σύμφωνα με τις καμπύλες επιβίωσης Kaplan-Meier, οι ασθενείς μπορούν να κατηγοριοποιηθούν βάσει της ταυτόχρονης έκφρασης των γονιδίων *BCL2* και *BAX* ανάλογα με τον κίνδυνο πρώιμης υποτροπής ( $p=0,008$ ) ή θανάτου ( $p=0,047$ ). Συγκεκριμένα, οι ασθενείς με αυξημένη έκφραση και των δύο γονιδίων μετά την έναρξη της θεραπείας εμφανίζουν μικρότερο χρόνο επιβίωσης ελεύθερης νόσου DFS ( $p=0,002$ ) και ειδικής επιβίωσης από την νόσο CSS ( $p=0,015$ ) (Εικόνα 32). Επιπλέον, η μονομεταβλητή ανάλυση παλινδρόμησης κατά Cox (Πίνακας 13) επιβεβαίωσε τον αυξημένο κίνδυνο που εμφανίζουν οι ασθενείς με υπερέκφραση και των δύο γονιδίων για υποτροπή (HR: 5,325; 95% CI: 1,598-17,75;  $p=0,006$ ). Συμπερασματικά, οι ασθενείς που έχουν αυξημένα επίπεδα και των δύο γονιδίων *BCL2* και *BAX* την 33<sup>η</sup> ημέρα της θεραπείας με το πρωτόκολλο BFM σε σχέση με τη διάγνωση, εμφανίζουν σημαντικά υψηλότερο κίνδυνο πρώιμης υποτροπής, ενώ οι ασθενείς με μειωμένα επίπεδα των γονιδίων *BCL2* και *BAX* έχουν χειρότερη πρόγνωση επιβίωσης.



**Εικόνα 31:** Kaplan-Meier καμπύλες για την επιβίωση ελεύθερη νόσου (DFS) και την ειδική επιβίωση από τη νόσο (CSS) των ασθενών ως προς τα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων BCL2, BAX και BCL2L12 την 33η ημέρα της θεραπείας με το πρωτόκολλο BFM.

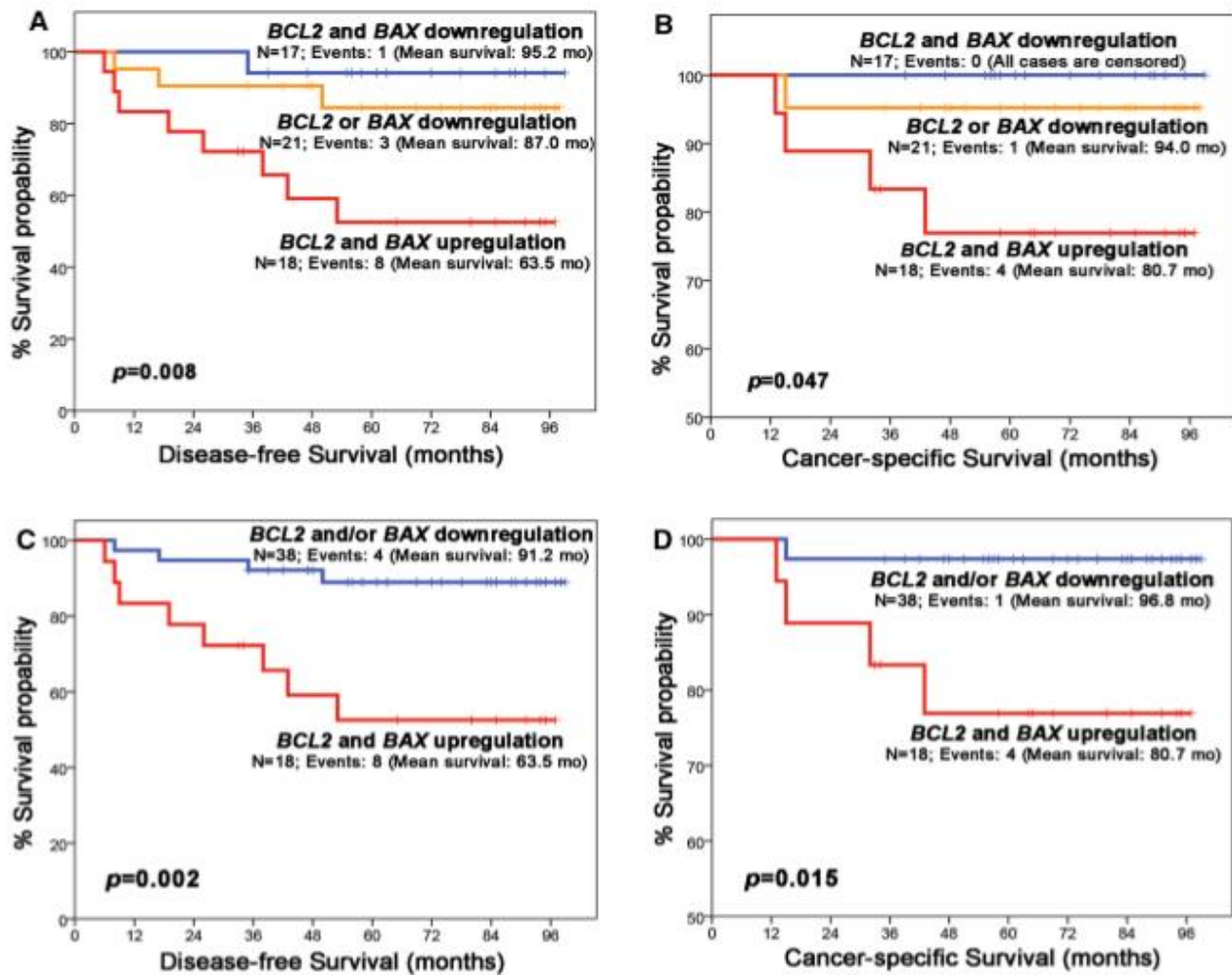
Μονομεταβλητή ανάλυση

Μεταβλητή	Επιβίωση ελεύθερη νόσου (DFS)			Ειδική επιβίωση από τη νόσο (CSS)		
	HR <sup>a</sup>	95% CI <sup>b</sup>	p-value <sup>c</sup>	HR <sup>a</sup>	95% CI <sup>b</sup>	p-value <sup>c</sup>
<b>BCL2</b>						
Χαμηλή έκφραση	1,00			1,00		
Υψηλή έκφραση	4,270	1,153-15,81	0,030	84,78	0,058-122971	0,232
<b>BAX</b>						
Χαμηλή έκφραση	1,00			1,00		
Υψηλή έκφραση	4,295	0,940-19,63	0,060	3,098	0,346-27719	0,312
<b>BCL2L12</b>						
Υψηλή έκφραση	1,00			1,00		
Χαμηλή έκφραση	5,144	1,126-23,49	0,035	3,825	0,427-34,22	0,230
<b>BCL2 και BAX</b> υψηλή έκφραση						
Όχι	1,00			1,00		
Ναι	5,325	1,598-17,75	0,006	9,198	1,027-82,37	0,047
<b>Ανοσοφαινότυπος</b>						
B-ΟΛΛ	1,00			1,00		
T-ΟΛΛ	1,547	0,821-2,914	0,177	5,355	1,275-22,50	0,022
<b>WBC</b>						
<50,000 cells/μl	1,00			1,00		
≥50,000 cells/μl	1,259	0,355-4,464	0,722	2,958	0,706-12,39	0,138
<b>TEL-AML1/ t(12;21)(p13;q22)</b>	0,158	0,021-1,203	0,075	0,028	<0,01-16,51	0,273
<b>Υπερδιπλοειδισμός</b> (>50 χρωμοσώματα)	1,168	0,329-4,144	0,810	1,541	0,311-7,635	0,597
<b>Ηλικία</b>						
1-10 ετών	1,00			1,00		
≥10 ετών	4,146	1,501-11,45	0,006	10,61	2,139-52,63	0,004
<b>Φύλο</b>						
Κορίτσια	1,00			1,00		
Αγόρια	1,290	0,441-3,775	0,642	1,086	0,259-4,544	0,910
<b>Ποσοστόβλαστών MO</b>						
<5% (M1)	1,00					
>5% (M2-M3)	2,461	1,465-4,134	0,001	2,082	1,016-4,267	0,045
<b>MRD</b>						
Αρνητική	1,00			1,00		
Θετική	4,856	1,211-19,48	0,026	4,491	0,259-23,99	0,430

Μεταβλητή	Πολυμεταβλητή ανάλυση <sup>d</sup>					
	Επιβίωση ελεύθερη νόσου (DFS)			Ειδική επιβίωση από τη νόσο (CSS)		
	HR <sup>a</sup>	95% CI <sup>b</sup>	p-value <sup>c</sup>	HR <sup>a</sup>	95% CI <sup>b</sup>	p-value <sup>c</sup>
<b>BCL2</b>						
Χαμηλή έκφραση	1,00			1,00		
Υψηλή έκφραση	2,547	0,587-11,05	0,212	3,614	0,459-28,47	0,222
<b>BAX</b>						
Χαμηλή έκφραση	1,00			1,00		
Υψηλή έκφραση	3,572	0,737-17,31	0,114	2,879	0,782-10,60	0,112
<b>BCL2L12</b>						
Υψηλή έκφραση	1,00			1,00		
Χαμηλή έκφραση	3,695	0,599-19,8	0,166	11,155	0,231-539,4	0,223
<b>BCL2 και BAX υψηλή έκφραση</b>						
Όχι	1,00			1,00		
Ναι	3,695	1,033-13,22	0,044	9,778	0,346-276,6	0,181

**Πίνακας 13:** Ανάλυση παλινδρόμησης κατά Cox για την πρόγνωση της επιβίωσης ελεύθερης νόσου (DFS) και της ειδικής επιβίωσης για τη νόσο (CSS) των ασθενών με ΟΛΛ βάσει των επιπέδων έκφρασης των γονιδίων BCL2, BAX και BCL2L12 την 33η ημέρα της θεραπείας με το πρωτόκολλο BFM.

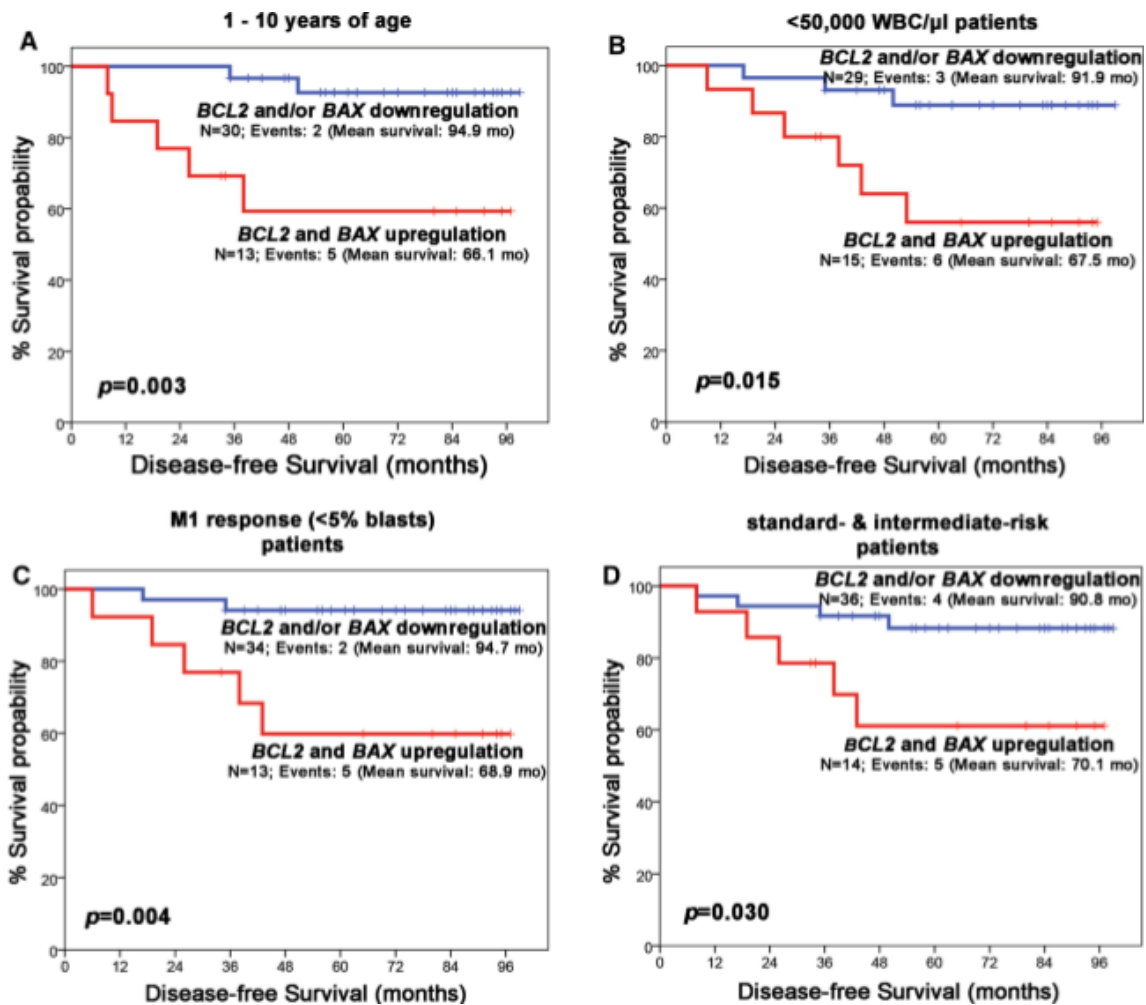




**Εικόνα 32:** Ανάλυση επιβίωσης βάσει της έκφρασης των γονιδίων *BCL2* και *BAX* την 33η ημέρα της θεραπείας με το πρωτόκολλο BFM.

Περαιτέρω μελετήθηκε η σημασία των αυξημένων επιπέδων έκφρασης των γονιδίων για την πρόγνωση επιβίωσης, μετά την έναρξη της θεραπείας με το πρωτόκολλο BFM σε ασθενείς με ευνοϊκούς προγνωστικούς δείκτες. Βρέθηκε ότι οι ασθενείς ηλικίας 1-10 ετών ( $p=0,003$ ; Εικόνα 33A) ή οι ασθενείς με αριθμό λευκών αιμοσφαιρίων στη διάγνωση  $<50,000$  cells/ $\mu$ l ( $p=0,015$ ; Εικόνα 33B) στους οποίους η έκφραση των γονιδίων *BCL2* και *BAX* την 33<sup>η</sup> ημέρα ήταν αυξημένη σε σχέση με τη διάγνωση, εμφάνισαν μικρότερο χρόνο επιβίωσης ελεύθερης νόσου-DFS. Αυξημένο κίνδυνο πρώιμης υποτροπής εμφάνισαν επίσης οι ασθενείς με απάντηση στον Μ.Ο την 15<sup>η</sup> ημέρα M1( $<5\%$  βλάστες) ( $p=0,004$ ; Εικόνα 33C) και οι ασθενείς που ανήκαν στις ομάδες χαμηλού και μέσου κινδύνου ( $p=0,030$ ; Εικόνα 33D) με αυξημένα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων την 33<sup>η</sup> ημέρα της θεραπείας. Συμπερασματικά, η αυξημένη έκφραση των

γονιδίων *BCL2* και *BAX* μετά την έναρξη της θεραπείας με το πρωτόκολλο BFM αυξάνει τον κίνδυνο υποτροπής της νόσου σε ασθενείς με θετικούς προγνωστικούς παράγοντες.



Εικόνα 33: Ανάλυση επιβίωσης βάσει της έκφρασης των γονιδίων *BCL2* και *BAX* την 33η ημέρα της θεραπείας με το πρωτόκολλο BFM σε ασθενείς με ευνοϊκούς προγνωστικούς δείκτες.

#### 4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η λευχαιμία αποτελεί τον πιο συχνό τύπο καρκίνου σε παιδιά ηλικίας 0-15 ετών, ενώ η Οξεία λεμφοβλαστική λευχαιμία (ΟΛΛ) το 77% όλων των τύπων λευχαιμίας του παιδιατρικού πληθυσμού.<sup>1,2</sup> Η ετήσια συχνότητα είναι 4/100.000 παιδιά με συχνότερη ηλικία εμφάνισης μεταξύ 2 και 5 ετών. Ως προς τα ποσοστά επιβίωσης της νόσου τα τελευταία 20 χρόνια έχει συντελεστεί σημαντική αύξηση σε >80%. Παρότι ωστόσο τα ποσοστά επιβίωσης έχουν βελτιωθεί χάρη σε νέες θεραπευτικές προσεγγίσεις, ένα στα πέντε παιδιά συνεχίζει να εμφανίζει υποτροπή της νόσου και κακή πρόγνωση ενώ παρατηρούνται ακόμα τοξικότητα σχετιζόμενη με την θεραπεία και θάνατοι ένα ποσοστό των οποίων (36%) συμβαίνει ακόμη και σε ασθενείς με ευνοϊκούς προγνωστικούς δείκτες.<sup>3,4,5</sup>

Η ΟΛΛ είναι μια βιολογικά ετερογενής ομάδα. Χαρακτηρίζεται από την παρουσία στο μυελό των οστών κακοήθων αιμοποιητικών κυττάρων σε πάνω από 25% που στην πλειοψηφία τους προέρχονται από Β-προγονικά κύτταρα σε πρώιμα στάδια διαφοροποίησης ή λιγότερο συχνά από Τ-κύτταρα και ώριμα Β-κύτταρα, καθιστώντας αναγκαίο τον διαχωρισμό σε υποομάδες όπως είναι η Τ-ΟΛΛ, η πρώιμη προ-Β, η προ-Β και σπανιότερα η ώριμη Β-ΟΛΛ. Η αυξημένη επίπτωση της νόσου σε παιδιά με καρυοτυπικές ανωμαλίες και κληρονομικές χρωμοσωμικές ανωμαλίες, η μεγαλύτερη πιθανότητα νόσησης σε αδέρφια πασχόντων καθώς και η συσχέτιση με έκθεση σε ιονίζουσα ακτινοβολία ή σε χημειοθεραπευτικά φάρμακα επιβεβαιώνουν την σημασία των γενετικών και περιβαλλοντικών παραγόντων στην ανάπτυξη της νόσου.<sup>21,22,23</sup>

Παρά την ετερογένεια που χαρακτηρίζει τη νόσο έχουν καθοριστεί προγνωστικοί παράγοντες που βοηθούν στην επιλογή της κατάλληλης θεραπείας για τον ασθενή και την πρόβλεψη του θεραπευτικού αποτελέσματος. Διακρίνονται σε τρεις κατηγορίες: τα χαρακτηριστικά του ασθενούς (ηλικία, φύλο), τα χαρακτηριστικά των λευκοκυττάρων (αριθμός λευκών αιμοσφαιρίων στη διάγνωση- WBC count, συμμετοχή Κεντρικού Νευρικού Συστήματος-ΚΝΣ, ανοσοφαινότυπος, κυτταρογενετική, χρωμοσωμικές μεταθέσεις) και την απάντηση στη θεραπεία (απόλυτος αριθμός βλαστών στο περιφερικό αίμα την 8<sup>η</sup> ημέρα, απάντηση στο μυελό οστών την 15<sup>η</sup> και 33<sup>η</sup> ημέρα, ελάχιστη υπολειπόμενη νόσος –MRD τις ημέρες 15,33 και 78). Καλύτερη πρόγνωση εμφανίζουν οι ασθενείς ηλικίας μεταξύ 1-10 ετών, τα κορίτσια, οι ασθενείς με μειωμένο

λευχαιμικό φορτίο (WBC<50,000 cells/μl), υπερδιπλοειδισμό (51-65 χρωμοσώματα), με αναδιάταξη t(12;21)(p13;q22)/TEL-AML1, χαμηλό αριθμό βλαστών στο περιφερικό αίμα, χαμηλό ποσοστό βλαστών στο Μ.Ο και τη μη παρουσία ελάχιστης υπολειπόμενης νόσου. Σύμφωνα με τα παραπάνω στα περισσότερα θεραπευτικά πρωτόκολλα οι ασθενείς κατατάσσονται σε χαμηλού, ενδιάμεσου και υψηλού κινδύνου.<sup>5,29</sup> Ωστόσο, η χρήση αυτών των προγνωστικών παραγόντων σε συνδυασμό με την εφαρμογή νέων θεραπευτικών μεθόδων δεν αποτρέπει την εμφάνιση υποτροπών ή θανάτων που όπως προαναφέρθηκε συνεχίζουν να εμφανίζονται σε ένα ποσοστό ασθενών. Επομένως, η ταυτοποίηση καινοτόμων θεραπευτικών προσεγγίσεων αλλά και νέων προγνωστικών δεικτών ικανών να προβλέψουν την απόκριση στη θεραπεία και την επιβίωση των ασθενών καθίσταται αναγκαία.

Σημαντικό ρόλο στην παθογένεση της λευχαιμίας και στην απάντηση στη θεραπεία, παίζει η απορρύθμιση των γονιδίων που σχετίζονται με την απόπτωση που έχει σαν αποτέλεσμα την αποτροπή του αποπτωτικού κυτταρικού θανάτου.<sup>51,54</sup> Στην προαγωγή της απόπτωσης στηρίζονται πολλά από τα χρησιμοποιούμενα χημειοθεραπευτικά φάρμακα. Η υποτροπή λοιπόν της νόσου και ο μικρός χρόνος επιβίωσης ασθενών, παρά τη χορήγηση της κατάλληλης θεραπείας, πιθανώς οφείλονται στην αποτυχία των χημειοθεραπευτικών φαρμάκων να προάγουν την απόπτωση.<sup>145</sup> Τα θεραπευτικά πρωτόκολλα που χρησιμοποιούνται, ένα εκ των οποίων είναι και το πρωτόκολλο της Γερμανικής ομάδας μελέτης και θεραπείας της λευχαιμίας BFM (Berlin-Frankfurt-Münster), περιλαμβάνουν φάρμακα που στηρίζουν την κυτταροτοξική τους δράση στην προαγωγή των προαποπτωτικών γονιδίων και την καταστολή των αντιαποπτωτικών γονιδίων της ομάδας BCL2.<sup>56,146,147,148</sup>

Το γονίδιο *BCL2* (B-cell CLL/Lymphoma 2) είναι ένα πρωτο-ογκογονίδιο που εδράζεται στην χρωμοσωμική περιοχή 18q21.3 και κωδικοποιεί για την πρωτεΐνη BCL-2, η οποία εμφανίζει ισχυρή αντιαποπτωτική δράση μέσω της προστασίας της ακεραιότητας της μιτοχονδριακής μεμβράνης και της παρεμπόδισης της απελευθέρωσης του κυτοχρώματος c.<sup>39,42,46</sup> Το γονίδιο *BAX* (BCL2-associated X protein) που εδράζεται στην χρωμοσωμική περιοχή 19q13.3-q13.4 κωδικοποιεί για την πρωτεΐνη BAX, το πρώτο προαποπτωτικό μέλος της οικογένειας BCL2.<sup>39,77</sup> Μετά το αποπτωτικό ερέθισμα, η πρωτεΐνη BAX μεταφέρεται στα μιτοχόνδρια και προάγει την απελευθέρωση του

κυτοχρώματος c και της πρωτεΐνης SMAC/Diablo στο κυτταρόπλασμα ενεργοποιώντας έτσι τον καταρράκτη των κασπασών που οδηγεί στον αποπτωτικό κυτταρικό θάνατο. Επιπλέον, σχηματίζει ομο- και ετερο-διμερή με άλλα μέλη της οικογένειας BCL2, ρυθμίζοντας με αυτόν τον τρόπο την ισορροπία μεταξύ προ- και αντι-αποπτωτικού δυναμικού.<sup>47,48,49,50,78</sup> Το γονίδιο *BCL2L12* εδράζεται στο χρωμόσωμα 19q13.3-13.4 και κωδικοποιεί για την πρωτεΐνη BCL2L12. Εκτός από το κλασικό μετάγραφο, έχουν επίσης ταυτοποιηθεί κι άλλες ισομορφές, αποτέλεσμα εναλλακτικού ματίσματος του γονιδίου.<sup>93</sup> Ο ρόλος της πρωτεΐνης BCL2L12 στην απόπτωση παραμένει αδιευκρίνιστος. Μελέτες έχουν δείξει ότι η προαποπτωτική ή η αντιαποπτωτική της δράση εξαρτάται από το κυτταρικό περιβάλλον στο οποίο θα βρεθεί.<sup>39</sup> Έχει διατυπωθεί ωστόσο και η άποψη ότι η διαφορετική δομή των διαφόρων ισομορφών είναι υπεύθυνη για την εμφάνιση προ ή αντι-αποπτωτικού ρόλου. Κάποιες από τις ισομορφές περιλαμβάνουν μόνο την BH3 περιοχή (BH3- only) οπότε ασκούν προαποπτωτική δράση σε αντίθεση με την συνολικού μήκους ισομορφή που είναι πιθανότερο να ασκεί αντιαποπτωτική δράση.<sup>94,95,100-118</sup> Στο κυτταρόπλασμα, το BCL2L12 αναστέλλει τις κασπάσες 3 και 7 μέσω δύο μηχανισμών. Αφενός μεν αλληλεπιδρά άμεσα με την προ-κασπάση 7 αναστέλλοντας έτσι την ενεργοποίησή της, αφετέρου προάγει την mRNA έκφραση του γονιδίου CRYAB, το προϊόν του οποίου (crystalline alpha b) εξουδετερώνει την κασπάση 3. Επιπλέον, η BCL2L12 στον πυρήνα δημιουργεί σύμπλεγμα με την πρωτεΐνη p53 αναστέλλοντας με αυτόν τον τρόπο την σύνδεσή της με προαγωγείς γονιδίων σχετικών με την απόπτωση.<sup>94,114,116,117</sup>

Σκοπός της παρούσας διδακτορικής διατριβής ήταν η μελέτη της έκφρασης των γονιδίων *BCL2*, *BAX* και *BCL2L12* σε παιδιά με ΟΛΛ και η κλινική τους αξιολόγηση για την πρόγνωση της απάντησης στη θεραπεία και του χρόνου επιβίωσης των ασθενών.

Συλλέχθηκαν δείγματα Μυελού των οστών από 82 παιδιά που διαγνώστηκαν με ΟΛΛ (72 με Β-ΟΛΛ και 10 με Τ-ΟΛΛ) ηλικίας μεταξύ 15 μηνών και 15 ετών στη φάση της διάγνωσης. Επίσης, συλλέχθηκαν δείγματα Μυελού των οστών σε 56 από τους ασθενείς την 33<sup>η</sup> ημέρα της θεραπείας καθώς και από 63 παιδιά που δεν έπασχαν από ΟΛΛ ή άλλη αιματολογική κακοήθεια προκειμένου να χρησιμοποιηθούν ως μάρτυρες στη μελέτη Η συλλογή έγινε σε συνεργασία με το Ογκολογικό Τμήμα του Νοσοκομείου Παίδων «Π & Α Κυριακού». Η θεραπεία των ασθενών έλαβε χώρα μεταξύ του

Σεπτεμβρίου του 2006 και του Απριλίου του 2012, με το πρωτόκολλο Berlin-Frankfurt-Münster (BFM).

Η πειραματική διαδικασία που ακολουθήθηκε ήταν η εξής: από τα δείγματα Μ.Ο απομονώθηκε ολικό RNA, του οποίου η ποσότητα και η ποιότητα αξιολογήθηκαν καταρχήν με φωτομέτρηση στα 260 nm και 280 nm, καθώς και με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης. Έπειτα το RNA χρησιμοποιήθηκε ως εκμαγείο για την σύνθεση cDNA με τη βοήθεια της MMLV αντίστροφης μεταγραφάσης και ακολούθησε ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου με τη χρήση της χρωστικής SYBR Green. Σχετική ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων έγινε με τη μέθοδο  $2^{-\Delta\Delta CT}$  χρησιμοποιώντας το γονίδιο *GAPDH* ως γονίδιο αναφοράς και την κυτταρική σειρά HL60 ως βαθμονομητή. Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων που ακολούθησε έγινε με το στατιστικό πρόγραμμα SPSS.

Η ανάλυση της έκφρασης του mRNA των γονιδίων *BCL2* και *BAX* συγκριτικά ανάμεσα σε ασθενείς κατά τη διάγνωση και μάρτυρες έδειξε ότι η έκφραση του *BCL2* και του λόγου *BCL2/BAX* ήταν σημαντικά αυξημένη στα δείγματα ασθενών σε σχέση με τα δείγματα των μαρτύρων. Αυξημένη παρατηρήθηκε να είναι και η έκφραση των γονιδίων *BAX* και *BCL2L12*, όχι ωστόσο σε στατιστικά σημαντικό βαθμό. Η λογιστική παλινδρόμηση και η ανάλυση ROC έδειξαν την διαφοροδιαγνωστική σημασία της έκφρασής τους για τον διαχωρισμό μεταξύ ασθενών και μαρτύρων. Επιπλέον, από την ανάλυση της σχέσης μεταξύ των επιπέδων έκφρασης του mRNA των γονιδίων στη διάγνωση και των κλινικοπαθολογικών χαρακτηριστικών των ασθενών προέκυψε ότι η αυξημένη έκφραση του *BCL2* και του λόγου *BCL2/BAX* καθώς και του *BCL2L12* σχετίζονται με ευνοϊκούς προγνωστικούς δείκτες. Συγκεκριμένα, αυξημένα επίπεδα *BCL2* και του λόγου *BCL2/BAX* παρατηρούνται σε ασθενείς με CD10+ B-ΟΛΛ, με αριθμό λευκών αιμοσφαιρίων στη διάγνωση <50,000/μl και σε αυτούς με υψηλό υπερδιπλοειδισμό (51-65 χρωμοσώματα). Επίσης, αυξημένη έκφραση και των δύο γονιδίων *BCL2* και *BAX* ταυτόχρονα, παρατηρείται σε ασθενείς με την TEL-AML1/t(12;21)(p13;q22) αναδιάταξη, ενώ αυξημένη έκφραση του *BCL2L12* παρατηρείται σε ασθενείς με CD10+ B-ΟΛΛ, με αριθμό λευκών αιμοσφαιρίων στη διάγνωση <50,000/μl και σε ασθενείς με την TEL-AML1/t(12;21)(p13;q22) αναδιάταξη. Τα αποτελέσματα αυτά υποστηρίζουν το αυξημένο αντιαποπτωτικό δυναμικό των

κακοήθων κυττάρων στην παιδική ΟΛΛ όπως έχει αναφερθεί και σε προηγούμενες μελέτες.<sup>54,61,63,64,73</sup> Συγκεκριμένα, σύμφωνα με τους Gala et al. η αυξημένη έκφραση της πρωτεΐνης BCL2 στα λευχαιμικά λεμφικά κύτταρα αποτελεί κανόνα στην ΟΛΛ παιδιών με μόνη εξαίρεση το λέμφωμα Burkitt.<sup>53</sup> Μεταγενέστερες έρευνες καταλήγουν στο ίδιο συμπέρασμα όσον αφορά σε βλάστες περιφερικού αίματος ασθενών, με ΟΛΛ ότι τα επίπεδα της BCL2 σε σχέση με φυσιολογικούς βλάστες είναι υψηλότερα.<sup>63,64</sup> Ως προς την συσχέτιση της έκφρασης των BAX και BCL2 με τα κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά των ασθενών πολλές από τις μελέτες δεν κατέληξαν σε κάποιο συμπέρασμα. Ωστόσο στη μελέτη των Uckun et al φάνηκε ότι μη ευνοϊκοί προγνωστικοί δείκτες όπως αυξημένος αριθμός λευκών, οργανομεγαλία και T-ΟΛΛ σχετίζονται με χαμηλά επίπεδα BCL2 έκφρασης, αποτελέσματα που συμφωνούν με αυτά της παρούσας μελέτης.<sup>73</sup>

Από τη μελέτη της προγνωστικής αξίας της έκφρασης των υπό μελέτη γονιδίων στη διάγνωση της νόσου, βρέθηκε ότι η αυξημένη έκφραση των BCL2, BAX και BCL2L12 σχετίζεται με καλή απόκριση στην θεραπεία με το πρωτόκολλο BFM, καθώς παρατηρήθηκε σε ασθενείς με απάντηση M1 (<5% βλαστών) στο Μ.Ο την 15<sup>η</sup> ημέρα της θεραπείας και σε αυτούς με αρνητική MRD την 33<sup>η</sup> ημέρα. Βρέθηκε επίσης ότι τα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων BCL2 και BAX μπορούν να αποτελέσουν δείκτη αντίστασης στη θεραπεία, καθώς χαμηλά επίπεδα και των δύο γονιδίων ταυτόχρονα στη διάγνωση, σχετίζονται με στατιστικά σημαντικό κίνδυνο για M2-M3 (≥5% βλάστες) απάντηση στο Μ.Ο και θετική MRD, αποτέλεσμα ανεξάρτητο από την ηλικία, το φύλο των ασθενών, τον αριθμό των λευκών αιμοσφαιρίων στη διάγνωση, την Β- ή Τ-ΟΛΛ, την παρουσία της αναδιάταξης t(12;21)(p13;q22)/TELAML1 και τον υψηλό υπερδιπλοειδισμό. Επιπλέον, από τη μελέτη της σχέσης της έκφρασης των υπό μελέτη γονιδίων στη διάγνωση και της επιβίωσης των ασθενών με ΟΛΛ, προέκυψε ότι ασθενείς με χαμηλά επίπεδα των γονιδίων στη διάγνωση φάνηκε ότι εμφανίζουν μικρότερο χρόνο επιβίωσης ελεύθερης νόσου (DFS) και ειδικής επιβίωσης από την νόσο (CSS). Τα αποτελέσματα αυτά συμφωνούν με αυτά προηγούμενων μελετών που υποστηρίζουν ότι αυξημένη έκφραση του BCL2 σχετίζεται με καλή απάντηση στη θεραπεία.<sup>70,73,75</sup> Συγκεκριμένα, σε αντίθεση με πολλές μελέτες που έχουν αναδείξει τη συσχέτιση της υψηλής έκφρασης της πρωτεΐνης BCL2 με κακή έκβαση της θεραπείας σε

συγκεκριμένους τύπους καρκίνου όπως η Χρόνια Λεμφοβλαστική Λευχαιμία και η Οξεία Μυελογενής Λευχαιμία,<sup>72</sup> οι μελέτες της έκφρασης της *BCL2* στην παιδική ΟΛΛ δεν αναδεικνύουν συσχέτιση της υψηλής έκφρασης της πρωτεΐνης με χειρότερη πρόγνωση. Οι Gala et al. βρήκαν ότι αυξημένα επίπεδα *BCL2* δεν σχετίζονται με κακή πρόγνωση,<sup>53</sup> ενώ σε άλλη μελέτη χαμηλός λόγος *BAX/BCL2* στη διάγνωση σχετίζεται με καλύτερη πρόγνωση.<sup>74</sup> Οι Coustan-Smith et.al συσχετίζουν τη χειρότερη πρόγνωση με χαμηλότερη έκφραση της *BCL2* σε 52 ασθενείς,<sup>61</sup> ενώ οι Uckun et. al σε μελέτη 338 παιδιών με ΟΛΛ δεν καταλήγουν σε συσχέτιση των υψηλών επιπέδων της *BCL2* σε λευχαιμικά κύτταρα με αργή πρώιμη ανταπόκριση (slow early response), αποτυχία πλήρους ύφεσης (complete remission-CR) ή επιβίωσης ελεύθερης νόσου (Event free survival-EFS)<sup>73</sup>. Αντίστοιχες μελέτες της έκφρασης του *BCL2L12* στην ΟΛΛ των παιδιών δεν υπάρχουν. Ωστόσο, μελέτη του γονιδίου σε άλλους τύπους καρκίνου όπως του μαστού, του παχέος εντέρου, της οξείας Μυελογενούς λευχαιμίας και του στομάχου σε ενήλικες, ανέδειξε ευνοϊκή προγνωστική αξία του γονιδίου καθώς αυξημένη έκφραση φαίνεται να σχετίζεται με αυξημένο χρόνο επιβίωσης ελεύθερης νόσου (DFS) και ολικής επιβίωσης (OS).<sup>96,97,98,101,110,111</sup>

Από τη μελέτη της σχέσης της έκφρασης των υπό μελέτη γονιδίων μετά την έναρξη της θεραπείας και της επιβίωσης των ασθενών με ΟΛΛ, προέκυψε ότι η μείωση των επιπέδων έκφρασης των γονιδίων *BCL2* και *BAX* την 33η ημέρα της θεραπείας με το πρωτόκολλο BFM σχετίζεται με αυξημένο χρόνο επιβίωσης ελεύθερης νόσου (DFS) και ειδικής για την νόσο επιβίωση (CSS). Αντιθέτως, τα αυξημένα επίπεδα των γονιδίων την 33<sup>η</sup> ημέρα σε σχέση με τη διάγνωση βρέθηκε ότι θα μπορούσαν να προβλέψουν υποτροπή της νόσου και συσχετίστηκαν με μικρότερους χρόνους επιβίωσης των ασθενών. Ο αυξημένος κίνδυνος πρώιμης υποτροπής σε αυτούς τους ασθενείς φάνηκε να είναι ανεξάρτητος από ήδη χρησιμοποιούμενους κλινικούς προγνωστικούς δείκτες, όπως το φύλο και η ηλικία των ασθενών, η απάντηση στον Μ.Ο, ο αριθμός των λευκών αιμοσφαιρίων στη διάγνωση, ο Β ή Τ-τύπος, η παρουσία t(12;21)(p13;q22)/TEL-AML1 αναδιάταξης ή ο υψηλός υπερδιπλοειδισμός και η κατηγοριοποίηση των ασθενών σε ομάδες βάσει κινδύνου. Το αποτέλεσμα αυτό επιβεβαιώθηκε επιπλέον από την αξιολόγηση της σημασίας των επιπέδων έκφρασης των γονιδίων *BCL2* και *BAX* σε ασθενείς με ευνοϊκούς προγνωστικούς δείκτες. Συγκεκριμένα, οι ασθενείς μεταξύ 1-10



ετών, οι ασθενείς με αριθμό λευκών αιμοσφαιρίων <50,000 /μl στη διάγνωση, με απάντηση M1 στον M.O ή οι ασθενείς χαμηλού και μέσου κινδύνου που παρουσίασαν αυξημένα επίπεδα έκφρασης και των δύο γονιδίων ταυτόχρονα την 33<sup>η</sup> ημέρα θεραπείας εμφάνισαν μικρότερη επιβίωση.

Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης, θα μπορούσαν να εξηγηθούν από το γεγονός ότι τα χημειοθεραπευτικά φάρμακα που περιλαμβάνονται στο θεραπευτικό πρωτόκολλο BFM που χρησιμοποιείται στους ασθενείς της μελέτης, δρουν μέσω προαγωγής της απόπτωσης των καρκινικών κυττάρων μέσω διαφόρων μηχανισμών.

Αρκετές προγενέστερες μελέτες περιγράφουν τον τρόπο δράσης των γλυκοκορτικοειδών (GC- Glucocorticoids) στην καταστροφή των καρκινικών κυττάρων μέσω του μιτοχονδριακού μονοπατιού της απόπτωσης.<sup>56,76,149,150,151,152,153</sup> Συγκεκριμένα, τα GC επάγουν τη χημειοθεραπευτική τους δράση μέσω σύνδεσής τους με τον υποδοχέα τους (GR- Receptor) στο κυτταρόπλασμα των κυττάρων, ο οποίος στη συνέχεια μεταφέρεται στον πυρήνα όπου ρυθμίζει την γονιδιακή έκφραση είτε συνδεδεμένος απευθείας στο DNA ή συνδεδεμένος με άλλους μεταγραφικούς παράγοντες.<sup>154</sup> Έχει περιγραφεί ακόμα ένα μονοπάτι δράσης των GC απευθείας στα μιτοχόνδρια παραλείποντας την σύνδεση με τον υποδοχέα τους.<sup>149</sup> Ένας μεγάλος αριθμός γονιδίων έχει βρεθεί ότι ρυθμίζεται από τα GC σε πειραματικά μοντέλα μελέτης της απόπτωσης που επάγεται από τα GC, ωστόσο δεν υπάρχει ομοφωνία ως προς τον προσδιορισμό των γονιδίων αυτών που εμπλέκονται στον κυτταρικό θάνατο. Βάσει πολλών μελετών η δράση των GC σε καρκινικά κύτταρα σχετίζεται με αλλαγή στην έκφραση πολλών μελών της οικογένειας BCL2, προαποπτωτικών και αντιαποπτωτικών. Συγκεκριμένα, έχει παρατηρηθεί αύξηση της έκφρασης της προαποπτωτικής πρωτεΐνης Bim σε μοντέλα μελέτης της απόπτωσης που επάγεται από τα GC,<sup>155</sup> ενώ σε παιδιά με ΟΛΛ έχει παρατηρηθεί καταστολή της έκφρασης των BCL2 και Bcl-XL με την δράση των GC.<sup>76</sup> Πιθανώς τα προ- και αντι-αποπτωτικά μέλη της οικογένειας BCL2 εμπλέκονται στην κυτταροτοξική δράση των GC ως άμεσοι στόχοι του φαρμάκου.<sup>56</sup> Η μεγαλύτερη λοιπόν ωφέλεια των ασθενών της μελέτης με αυξημένα επίπεδα του BCL2, από τη δράση των GC πιθανώς οφείλεται στην ύπαρξη επαρκούς «υποστρώματος» για την δράση του φαρμάκου. Ωστόσο έχουν περιγραφεί και άλλα μονοπάτια μέσω των οποίων ασκούν την κυτταροτοξική τους δράση τα GC που

εμπλέκουν τα μέλη της BCL2 οικογένειας. Αυτά τα μονοπάτια περιλαμβάνουν επίδραση των φαρμάκων σε miRNA και στον μηχανισμό της αυτοφαγίας. Συγκεκριμένα, στην μελέτη τους οι Reiner et al. υποστηρίζουν ότι τα GC σε ασθενείς με ΟΛΛ προάγουν την απόπτωση μέσω συγκεκριμένων miRNAs. Τα miRNAs είναι μικρά μόρια RNA μήκους 21-23 νουκλεοτιδίων που ρυθμίζουν την γονιδιακή έκφραση μέσω πρόσδεσης τους σε ειδικές μη κωδικές περιοχές των mRNA στόχων (περιοχή 3'UTR). Βάσει των αποτελεσμάτων της μελέτης τα GC μέσω του υποδοχέα τους ο οποίος μεταφέρεται στον πυρήνα μετά την σύνδεση, επάγουν μεταξύ άλλων την μεταγραφή των miR-15/16. Βάσει της μελέτης των Cimmino et al. η έκφραση των miR 15a, 16-1 συνδέεται αντιστρόφως ανάλογα με την BCL2 έκφραση σε ασθενείς με ΧΛΛ καθώς σε μεταγραφικό επίπεδο καταστέλλουν την έκφραση του BCL2 και άρα την αντιαποπτωτική του δράση. Πρόκειται για έναν ακόμη μηχανισμό που ίσως εξηγεί το ότι οι ασθενείς με αυξημένα επίπεδα του BCL2 επωφελούνται από την θεραπεία με GC που ασκούν την αποπτωτική τους δράση μέσω επίδρασης των miRNAs στην έκφραση του BCL2.<sup>151,156</sup> Ένας ακόμη μηχανισμός δράσης των GC που εμπλέκει την έκφραση του BCL2 προτείνεται από τους Swerdlow et al. Συγκεκριμένα, βάσει των αποτελεσμάτων της μελέτης, τα GC και συγκεκριμένα η δεξαμεθαζόνη σε κύτταρα της T-λεμφοκυτταρικής σειράς WEN17.2 ποντικών, που παρουσιάζουν αυξημένα επίπεδα BCL2 έκφρασης, προάγει την αυτοφαγία. Η αυτοφαγία είναι ακόμα μια μορφή γενετικά προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου, με διαφορετικό μηχανισμό από την απόπτωση. Πιθανός μηχανισμός προαγωγής της αυτοφαγίας θεωρείται η αποσύνδεση του BCL2 από το Beclin-1, ένα από τα κυρίαρχα γονίδια που προάγει την αυτοφαγία. Το BCL2 λοιπόν σε υπερέκφραση με τη δράση των GC, μπορεί μεν να αναστέλλει την απόπτωση, προάγει όμως την αυτοφαγία, τον κυτταρικό δηλαδή θάνατο των καρκινικών κυττάρων. Άρα τα κύτταρα με αυξημένα επίπεδα έκφρασης του BCL2 είναι πιο «καλοί» στόχοι των GC για την προαγωγή αυτής της μορφής θανάτου.<sup>152</sup> Τέλος, έχει διατυπωθεί η υπόθεση ότι τα GC εμμέσως μειώνουν τα επίπεδα του BCL2 μέσω της δράσης τους στις κυτταροκίνες. Συγκεκριμένα, είναι γνωστό ότι τα GC οφείλουν την αντιφλεγμονώδη δράση τους στην καταστολή της δράσης των κυτταροκινών. Καθώς όμως έχει παρατηρηθεί ότι σε Τ-ΟΛΛ δείγματα η 'συν-επώαση' με ιντερλευκίνη-7 οδηγεί σε αύξηση των επιπέδων έκφρασης του BCL2 θα μπορούσε να συναχθεί το συμπέρασμα ότι η μείωση των επιπέδων

έκφρασης του BCL2 μετά την δράση των GC οφείλεται εμμέσως στην μειωμένη έκφραση των κυτταροκινών.<sup>157</sup>

Η Μεθοτρεξάτη επίσης έχει βρεθεί ότι προκαλεί μείωση της έκφρασης του BCL2 σε επίπεδο mRNA σε HL-60 κύτταρα λευχαιμικής σειράς.<sup>104</sup>

Όσον αφορά στην βινκριστίνη, ένα ακόμα χημειοθεραπευτικό φάρμακο που χορηγείται βάσει του πρωτοκόλλου BFM, έχει βρεθεί ότι και αυτή ασκεί την αποπτωτική της δράση μέσω επίδρασης σε μέλη της BCL2 οικογένειας όπως το BCL2. Από τους Srinivastava et al. περιγράφεται ότι η βινκριστίνη μέσω της πρωτεϊνικής κινάσης α (PKA) προκαλεί υπερφωσφορλίωση σε συγκεκριμένες περιοχές του BCL2 σε μελέτη κυττάρων MCF-7 και MPA MB-231. Η υπερφωσφορλίωση αυτή έχει σαν αποτέλεσμα την καταστολή της δράσης του BCL2 καθώς και την αδυναμία σχηματισμού ετεροδιμερών BCL2:BAX με την πρωτεΐνη BAX. Έτσι η BAX είναι ελεύθερη να εκτελέσει την προαποπτωτική της δράση. Επομένως, και η βινκριστίνη είναι πιθανό ότι επάγει σε μεγαλύτερο βαθμό την κυτταροτοξική της δράση σε κύτταρα με αυξημένα επίπεδα έκφρασης του BCL2 καθώς ο μηχανισμός δράσης της περιλαμβάνει όπως και των GC και το μόριο BCL2.<sup>147</sup>

Όσον αφορά στο γονίδιο *BCL2L12* αντιθέτως, τα αυξημένα επίπεδα έκφρασης την 33η ημέρα της θεραπείας με το πρωτόκολλο BFM σχετίζονται με μεγαλύτερο χρόνο επιβίωσης ελεύθερης νόσου (DFS) και ειδικής για την νόσο επιβίωση (CSS). Πιθανώς τα χημειοθεραπευτικά φάρμακα επιδρούν στην έκφραση του γονιδίου που αναλαμβάνει στον συγκεκριμένο τύπο κακοήθειας προαποπτωτικό ρόλο αν και σε μελέτες στη λευχαιμική σειρά HL-60 βρέθηκε ότι η βινκριστίνη μειώνει την έκφραση του *BCL2L12* σε επίπεδο mRNA όπως και του *BCL2* ενώ η μεθοτρεξάτη δεν προκαλεί καμία μεταβολή της έκφρασής τους.<sup>104,106</sup> Δεν έχουν ωστόσο περιγραφεί συγκεκριμένοι μηχανισμοί δράσης των χημειοθεραπευτικών φαρμάκων που να περιλαμβάνουν το *BCL2L12* σε ασθενείς με λευχαιμία. Πιθανώς, όπως έχει διατυπωθεί σε προγενέστερες μελέτες η προαποπτωτική ή η αντιαποπτωτική δράση του *BCL2L12* εξαρτάται από το κυτταρικό περιβάλλον στο οποίο θα βρεθεί.<sup>39</sup> Έχει διατυπωθεί ωστόσο και η άποψη ότι η διαφορετική δομή των διαφόρων ισομορφών είναι υπεύθυνη για την εμφάνιση προ ή αντι-αποπτωτικού ρόλου. Κάποιες από τις ισομορφές περιλαμβάνουν μόνο την BH3 περιοχή (BH3- only) οπότε ασκούν προαποπτωτική δράση σε αντίθεση με την συνολικού μήκους ισομορφή

που είναι πιθανότερο να ασκεί αντιαποπτωτική δράση.<sup>94,95,100-118</sup> Πιθανώς μένει να ταυτοποιηθούν κι άλλες ισομορφές του γονιδίου που εμπλέκονται στα μονοπάτια της απόπτωσης στην Λευχαιμία.

Συμπερασματικά, από την παρούσα μελέτη προκύπτει ότι αυξημένα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου *BCL2*, του λόγου *BCL2/BAX* και του *BCL2L12* παρατηρούνται σε ασθενείς με ΟΛΛ σε σχέση με τους μάρτυρες, γεγονός που δείχνει την υπεροχή του αντιαποπτωτικού δυναμικού στην ΟΛΛ. Τα αυξημένα αυτά επίπεδα συσχετίστηκαν και με ευνοϊκούς προγνωστικούς δείκτες όπως ο ανοσοφαινότυπος CD10(+) B-ΟΛΛ, ο χαμηλός αριθμός λευκών αιμοσφαιρίων στη διάγνωση, η αναδιάταξη TELAML-1 και ο υψηλός υπερδιπλοειδισμός. Από την ανάλυση της προγνωστικής αξίας των γονιδίων, προέκυψε ότι οι ασθενείς με χαμηλά επίπεδα έκφρασης των γονιδίων στη διάγνωση εμφάνισαν κακή απόκριση στη θεραπεία με το BFM πρωτόκολλο, όπως αποδεικνύουν τα αποτελέσματα για το ποσοστό των βλαστών στο Μ.Ο και την MRD.

Οι ασθενείς αυτοί επιπλέον εμφάνισαν σημαντικότερο κίνδυνο υποτροπής και θανάτου και επομένως μικρότερους χρόνους επιβίωσης ελεύθερης νόσου (DFS) και ειδικής για την νόσο επιβίωσης (CSS) σε σχέση με τους ασθενείς που είχαν υψηλότερα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων *BCL2*, *BAX* και *BCL2L12* στη διάγνωση. Από την ανάλυση της κλινικής σημασίας των επιπέδων έκφρασης των γονιδίων *BCL2* και *BAX* την 33<sup>η</sup> ημέρα της θεραπείας, προέκυψε ότι η αυξημένη τους έκφραση την 33<sup>η</sup> ημέρα σε σχέση με την διάγνωση συσχετίζεται με μικρότερη επιβίωση των ασθενών ενώ βρέθηκε ότι μπορεί να προβλέψει την πρώιμη υποτροπή της νόσου ακόμη και σε ασθενείς με ευνοϊκούς προγνωστικούς παράγοντες. Όσον αφορά στο γονίδιο *BCL2L12* αντιθέτως, τα αυξημένα επίπεδα έκφρασης την 33η ημέρα της θεραπείας με το πρωτόκολλο BFM σχετίζονται με μικρότερο χρόνο επιβίωσης ελεύθερης νόσου (DFS) και ειδικής για την νόσο επιβίωση (CSS).

## 5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Siegel R., Naishadham D., Jemal A. Cancer statistics, 2015. *CA Cancer J Clin.* 2015;65:5-29.
2. Pui CH., Evans WE. Treatment of acute lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med.* 2006;354:166-78.
3. Hunger SP., Lu X., Devidas M. et al. Improved survival for children and adolescents with acute lymphoblastic leukemia between 1990 and 2005: a report from the children's oncology group. *J Clin Oncol.* 2012;30:1663-9.
4. Shah A., Coleman MP. Increasing incidence of childhood leukaemia: a controversy reexamined. *Br J Cancer.* 2007;97:1009-12.
5. Hargrave DR., Hann II., Richards SM., et al. Progressive reduction in treatment-related deaths in Medical Research Council childhood lymphoblastic leukaemia trials from 1980 to 1997 (UKALL VIII, X and XI). *Br J Haematol.* 2001;112:293-9.
6. Σκορίλας Α., Αρχές Κλινικής Βιοχημείας και Μοριακής Διαγνωστικής. Αθήνα 2008.
7. Andreoli, Thomas E. Cecil βασική παθολογία / Andreoli · επιμέλεια Χ. Μουτσόπουλος. - 5η έκδ. - Αθήνα : Ιατρικές Εκδόσεις Λίτσας, 2003.
8. Alberts B., Bray D., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P. Βασικές αρχές Κυτταρικής Βιολογίας-Εισαγωγή στη Μοριακή Βιολογία του κυττάρου. Ιατρικές Εκδόσεις Π.Χ Πασχαλίδης. 2000.
9. Mcphee S., Μουτσόπουλος Χ. Παθολογική Φυσιολογία 2<sup>η</sup> έκδ. - Ιατρικές εκδόσεις Λίτσας, 2000.
10. Brooks C.L., Gu W. Ubiquitination, phosphorylation and acetylation: the molecular basis for p53 regulation. *Cur. Op. Cell Biol.* 2003;15:164-171.
11. Hofseth L.J., Hussain S.P., Harris C.C p53: 25 years after its discovery. *Trends Pharmacol. Sci.* 2004;25:177-181.
12. Hanahan D., Weinberg R. The hallmarks of cancer Review. *Cell* 2000;100:57-70.
13. Stein J., Hutton J., Kohler P., O'Rourke R., Reynolds H., Samuels M., Sande M. Stein Παθολογία 4<sup>η</sup> έκδ - Ιατρικές εκδόσεις Π.Χ Πασχαλίδης, 2000.
14. Martinez J., Parker M.T., Fultz K., Ignatenco N., Gerner E., Burger's Medicinal Chemistry and Drug Discovery. John Wiley & Sons. 2003;5:2-5.
15. Perkins G., Slater E., Sanders G., Richard J., Serum tumor markers, *Am Fam Physician Editor.* 2003;68:1075-82.
16. Silverstein A, Silverstein V., Silverstein L. *Cancer Twenty First Century Books*, 2006;23-24.
17. Lissauer T., Graham R., Foster C., Coren M. *Paediatrics* Ιατρικές εκδόσεις Πασχαλίδης, 2008.
18. Hillman R., Ault K., Rinder H., *Hematology in Clinical Practice.* Mc Graw Hill. 2005.
19. Munker R., Hiller E., Glass J, Paquette R. *Modern Hematology Biology and Clinical Management* Humana Press Inc. 2nd edition. 2007.
20. Τζωρτζάτου-Σταθοπούλου Φ., *Παιδιατρική Ογκολογία.* Ιατρικές εκδόσεις Π.Χ. Πασχαλίδης. Αθήνα, 1997.
21. Hay W., Levin M., Sondheimer J., Deterding R. *Current Pediatric Diagnosis & Treatment in Pediatrics* McGraw-Hill Companies. 18<sup>th</sup> Edition, 2006.
22. Behrman R., Kliegman R., Jenson H. *Nelson Textbook of Pediatrics*, W B Saunders, 17th edition, 2003.
23. Βασιλάτου-Κοσμίδη Ε., *Κακοήθη νοσήματα στο παιδί, Ογκολογικό τμήμα Νοσοκομείου Παίδων 'Αγλαΐα Κυριακού'.* Αθήνα, 2006.

24. Arber DA., Orazi A., Hasserjian r. et al. The 2016 revision of the World Health Organisation (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes *Blood*. 2016;20:2391-405
25. Izraeli S. Application of genomics for risk stratification of childhood acute lymphoblastic leukaemia: from bench to bedside? *British Journal of Hematology*. 2010;151:119-131.
26. Howlader N., Noone AM., Krap cho M. et al. SEER Cancer Statistics Review 1975-2010
27. Szczepanski T., Harrison C., Dongen J. Genetic aberrations in paediatric acute leukaemias and implications for management of patients. *Lancet Oncol*. 2010;11:880-89.
28. Doros L., Watson T., Angiolillo A. *Biochemical and Molecular Basis of pediatric diseases* AAC Press. 2010;4:383-407.
29. Carroll W., Raetz E. *Clinical and Laboratory Biology of Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia*. *The Journal of Pediatrics*. 2012;160:10-18.
30. Steinherz P. Acute Lymphoblastic Leukemia in children *Encyclopedia of cancer*. 2002;1:11-18.
31. Harrison C., Haas O., Harbott J., Biondi A., Stranulla M., Trka J., Izraeli S. Detection of prognostically relevant genetic abnormalities in childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukaemia: recommendations from the Biology and Diagnosis Committee of the International Berlin-Frankfurt-Munster study group. *British Journal of Hematology*. 2010;151:132-142.
32. Pui C. Recent Research Advances in Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia. *Journal of the Formosan Medical Association*. 2010;109(11):777-787.
33. Schultz K., Pullen J., Sather H., Shuster J. Risk and response based classification of childhood B-precursor acute lymphoblastic leukemia: a combined analysis of prognostic markers from the Pediatric Oncology Group (POG) and Children's Cancer Group(CCG). *Blood*. 2007;109:926-935.
34. Κοσμίδη Ε. Τι μας επιφυλάσσει στο μέλλον η οξεία λεμφοβλαστική λευχαιμία στα παιδιά; Ιατρικά χρονικά Βορειοδυτικής Ελλάδος. 2010;6:15-18.
35. Τράπαλη Μ, Αρχέγονα κύτταρα (βλαστικά κύτταρα, stem cells): ρόλος τους, τρόποι παραγωγής τους και μελλοντικές προοπτικές στην αντιμετώπιση του καρκίνου. *Ελληνική Εταιρεία Κλινικής Χημείας-Κλινικής Βιοχημείας*. τεύχος 51, 2009.
36. Davies S., Mehta P. Pediatric Acute Lymphoblastic Leukemia: Is there still a role for transplant? *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2010;2010:363.
37. Πολυχρονοπούλου Σ. Οξεία Λεμφοβλαστική Λευχαιμία παιδιών και εφήβων: Πρόγνωση και θεραπευτικές προσεγγίσεις. 1<sup>ο</sup> Πανελλήνιο συνέδριο παιδιατρικής αιματολογίας-ογκολογίας. Αθήνα, 2010.
38. Tait S., Ichim G., Green d. Die another way-non apoptotic mechanism of cell death. *Journal of cell science*. 2014;127:2135-2144
39. Scorilas A., Thomadaki H. BCL2 family of apoptosis-related genes: Functions and Clinical Implications in Cancer. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*. 2006;43(1):1-67.
40. Kroeme, G., Galluzzi L., Vandenabeele P., Abrams J., Alnemri ES., Baehrecke EH., Blagosklonny MV., El-Deiry WS., Golstein P., Green DR., Hengartner M., Knight RA., Kumar S., Lipton SA. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death. *Cell Death Differ*. 2009;16(1):3-11.
41. Lawen A. Apoptosis an introduction. *BioEssays*. 2003;25:888-896.

42. Tzifi F., Economopoulou C., Gourgiotis D., Ardavanis A., Papageorgiou S., Scorilas A. The Role of BCL2 Family of Apoptosis regulator Proteins in Acute and Chronic Leukemias *Advances in Hematology*. 2011;2012:1-15.
43. Bruin E., Medema J. Apoptosis and non-apoptotic deaths in cancer development and treatment response. *Cancer Treatment Reviews*. 2008;34:737-749.
44. Zhang A., Wu Y., Lai H., Yew D. Apoptosis –A brief Review *Neuroembryology*. 2004-05;3:47-59.
45. Petros A., Olejniczak E., Fesik S. Structural biology of the Bcl-2 family of proteins. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2004;1644(2-3):83–94.
46. Zinkel S., Gross A., Yang E. BCL2 family in DNA damage and cell cycle control *Cell Death and Differentiation*. 2006;13(8):1351–1359.
47. Chandra D., Choy G., Daniel PT., Tang DG. Bax-dependent regulation of Bak by voltage-dependent anion channel 2. *J Biol Chem*. 2005;280:19051-61.
48. Deng Y., Lin Y., Wu X. TRAIL-induced apoptosis requires Bax-dependent mitochondrial release of Smac/DIABLO. *Genes Dev*. 2002;16:33-45.
49. Zhang Z., Lapolla SM., Annis MG., et al. Bcl-2 homodimerization involves two distinct binding surfaces, a topographic arrangement that provides an effective mechanism for Bcl-2 to capture activated Bax. *J Biol Chem* 2004;279:43920-8.
50. Lalier L., Cartron PF., Juin P., et al. Bax activation and mitochondrial insertion during apoptosis. *Apoptosis*. 2007;12:887.
51. Wojcik I., Szybka M., Golanska E. et al. Abnormalities of the P53, MDM2, BCL2 and BAX genes in acute leukemias. *Neoplasma*. 2005;52(4):318–324.
52. Aref S., Salama O., Al-Tonbary Y., Mansour A. Assessment of bcl-2 expression as modulator of fas mediated apoptosis in acute leukemia. *Hematology*. 2004;9:113-121.
53. Gala JL, Vermeylen C., Cornu G., Ferrant A., Michaux JL., Philippe M. High expression of bcl-2 is the rule in acute lymphoblastic leukemia, except in Burkitt subtype at presentation, and is not correlated with the prognosis. *Ann Hematol*. 1994;69:17-24.
54. Campana D., Coustan-Smith E., Manabe A., et al. Prolonged survival of B-lineage acute lymphoblastic leukemia cells is accompanied by overexpression of bcl-2 protein. *Blood*. 1993;81(4):1025–1031.
55. Menendez P., Vargas A., Bueno C. et al. Quantitative analysis of bcl-2 expression in normal and leukemic human B-cell differentiation. *Leukemia*. 2004;18(3):491–498.
56. Ploner C., Rainer J., Niederegger H., Eduardoff M., Villunger A., Geley S., Kofler R. The BCL2 rheostat in glucocorticoid-induced apoptosis. *Leukemia*. 2008;22:370-377.
57. Tissing W., Meijerink J., Den Boer M., Pieters R. Determinants of glucocorticoid sensitivity and resistance in acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*. 2003; 17:17–25.
58. Maungf Z., Macleanm R., Reid M., Pearsons A., Proctorp J., Hamiltona J. The relationship between bcl-2 expression and response to chemotherapy in acute leukaemia. *British Journal of Haematology*. 1994;88:105-109.
59. Sahu G., Das B. Prognostic significance of p53 and Bcl-2 in acute lymphoblastic leukemia. *Oncology Reports*. 2002;9(6):1391–1398.
60. Campos L., Sabido O., Sebban C., et al. Expression of BCL-2 proto-oncogene in adult acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*. 1996;10(3):434–438.
61. Coustan-Smith E., Kitanaka A., Pui C., et al. Clinical relevance of BCL-2 overexpression in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 1996;87(3):1140–1146.

62. Del Principe M., Del Poeta G., Maurillo L., et al. P-glycoprotein and BCL-2 levels predict outcome in adult acute lymphoblastic leukaemia. *British Journal of Haematology*. 2003;121(5):730–738.
63. Salomons GS., Smets LA., Verwijs-Janssen M., Hart A., Haarman EG., Kaspers G., Van Wering ER., Van Der Does-Van Den Berg A., Kamps WA. Bcl-2 family members in childhood acute lymphoblastic leukemia: relationships with features at presentation, in vitro and in vivo drug response and long-term clinical outcome. *Leukemia*. 1999;13:1574–1580.
64. Tsurusawa M., Saeki KO., Katano N., Fujimoto T. BCL-2 expression and prognosis in childhood acute leukemia. *Pediatric Hematology and Oncology*. 1998;15:143-155.
65. Srinivas G., Kusumakumary á M. Krishnan Nair K. Ramachandra Panicker á M. Radhakrishna Pillai Mutant p53 protein, Bcl-2/Bax ratios and apoptosis in paediatric acute lymphoblastic leukaemia. *Cancer Res Clin Oncol*. 2000;126:62-67.
66. Schuler D., Szende B. Apoptosis in acute leukemia. *Leukemia Research*. 2004;28:661-666.
67. Findley H., Gu L., Yeager A., Zhou M. Expression and Regulation of Bcl-2, Bcl-xl, and Bax Correlate with p53 Status and Sensitivity to Apoptosis in Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia. *Blood*. 1997;89:2986-2993.
68. Volm M., Zintl F., Sauerbrey A., Koomägi R. Proliferation and apoptosis in newly diagnosed and relapsed childhood acute lymphoblastic leukemia. *Anticancer Research*. 1999;19(5B):4327-31.
69. Haarman EG., Kaspers GJ., Pieters R., Zantwijk CH., Broekema GJ., Hählen K., Veerman AJ. BCL-2 expression in childhood leukemia versus spontaneous apoptosis, drug induced apoptosis, and in vitro drug resistance. *Adv Exp Med Biol*. 1999;457:325-33.
70. Wuchter C., Karawajew L., Ruppert V., Schrappe M., Harbott J., Ratei R., Doerken B. Constitutive expression levels of CD95 and Bcl-2 as well as CD95 function and spontaneous apoptosis in vitro do not predict the response to induction chemotherapy and relapse rate in childhood acute lymphoblastic leukaemia. *British Journal of Haematology*. 2000;110:154-160.
71. Prokop A., Wieder T., Sturm I., Ebmann F., Seeger K., Wuchter C., Ludwig W-D, Henze D., Dorken B., Daniel PT. Relapse in childhood acute lymphoblastic leukemia is associated with a decrease of the Bax/Bcl-2 ratio and loss of spontaneous caspase-3 processing in vivo. *Leukemia*. 2000;14:1606–1613.
72. Hogarth L., Hall A. Increased BAX Expression Is Associated With an Increased Risk of Relapse in Childhood Acute Lymphocytic Leukemia. *Blood*. 1999;93:2671-2678.
73. Uckun F., Yang Z., Sather H., Steinherz P., Nachman J., Bostrom B., Crotty L., Sarquis M., Ek O., Zeren T., Tubergen D., Reaman G., Gaynon P. Cellular Expression of Antiapoptotic BCL-2 Oncoprotein in Newly Diagnosed Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia: A Children's Cancer Group Study. *Blood*. 1997;89:3769-3777.
74. Narayan S., Chandra J., Sharma M., Naithani R., Sharma S. Expression of apoptosis regulators Bcl-2 and Bax in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Hematology*. 2007; 12(1):39–43.
75. Salomons G., Brady H., Verwijs-Janssen M., Van Der Berg J., Hart A., Van Der Berg H., Behrendt H., Hlen K., Smets L. The Baxa:Bcl-2 ratio modulates the response to dexamethasone in leukemic cells and is highly variable in childhood acute. *Int. J. Cancer*. 1996;71:959–965.
76. Casale F., Addeo R., Dangelo V., Indolfi P., Poggi V., Morgera C., Crisci S., Di Tullio M.T. Determination of the in vivo effects of prednisone on Bcl-2 family protein expression in



- childhood acute lymphoblastic leukemia. *International Journal of Oncology*. 2003;22:123-128.
77. Oltvai, Z. N., Milliman, C. L., Korsmeyer, S. J. Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell*. 1993;74:609–619
  78. Nai Yang Fu, Sunil K. Sukumaran, Sze Yen Kerk, Victor C. Yu. Bax $\beta$ : A Constitutively Active Human Bax Isoform that Is under Tight Regulatory Control by the Proteasomal Degradation Mechanism. *Molecular Cell*. 2009;33:145-146.
  79. Meijerink JP., Mensink EJ., Wang K., Sedlak TW., Sloetjes AW., de Witte T., Waksman G., Korsmeyer SJ. Hematopoietic malignancies demonstrate loss-of-function mutations of BAX. *Blood*. 1998;91:2991–2997.
  80. Inoue K., Kohno T., Takakura S., Hayashi Y., Mizoguchi H., Yokota J. Frequent microsatellite instability and BAX mutations in T cell acute lymphoblastic leukemia cell lines. *Leukemia Research*. 2000;24:255–262.
  81. Dabrowska M., Pietruczuk M., Kostecka I., Suchowierska M., Kloczko J., Nasilowska B., Bany-Laszewicz U., Marianska B. The rate of apoptosis and expression of Bcl-2 and Bax in leukocytes of acute myeloblastic leukemia patients. *Neoplasma*. 2003;50(5):339-44.
  82. Sohn SK., Jung JT., Kim DH., Kim JG., Kwak EK., Park T., Shin DG., Sohn KR., Lee KB. Prognostic significance of bcl-2, bax, and p53 expression in diffuse large B-cell lymphoma. *Am J Hematol*. 2003;73(2):101-7.
  83. Strnad M., Brajuskovic G., Strelac N., Todoric-Zivanovic B., Stamatovic D., Tatomirovic Z., Magic Z. Expression of programmed cell death proteins in patients with chronic myeloid leukemia. *J Buon*, 2008;13(3):403-8.
  84. Lu Y., Yagi T. Apoptosis of human tumor cells by chemotherapeutic anthracyclines is enhanced by Bax overexpression. *J Radiat Res*. 1999;40:263–272.
  85. Khanduja KL., Kumar S., Varma N., Varma SC., Avti PK., Pathak CM. Enhancement in alpha-tocopherol succinate-induced apoptosis by all-trans-retinoic acid in primary leukemic cells: role of antioxidant defense, Bax and c-myc. *Mol Cell Biochem*. 2008;319(1-2):133-9.
  86. Haag P., Viktorsson K., Lindberg ML., Kanter L., Lewensohn R., Stenke L. Deficient activation of Bak and Bax confers resistance to gemtuzumab ozogamicin-induced apoptotic cell death in AML. *Exp Hematol*. 2009 ;37(6):755-66.
  87. Salomons GS., Buitenhuis CK., Martínez Muñoz C., Verwijs-Jassen M., Behrendt H., Zsiros J., Smets LA. Mutational analysis of Bax and Bcl-2 in childhood acute lymphoblastic leukaemia. *J Cancer*. 1998 Jun 19;79(3):273-7.
  88. Molenaar JJ., Gérard B., Chambon-Pautas C., Cavé H., Duval M., Vilmer E., Grandchamp B. Microsatellite instability and frameshift mutations in BAX and transforming growth factor-beta RII genes are very uncommon in acute lymphoblastic leukemia in vivo but not in cell lines. *Blood*. 1998;92(1):230-3.
  89. Jules P., Meijerink P., Ewald J.B.M., Mensink , Wang K., Sedlak T., Annet W., Slöetjes, Witte T., Waksman G. Hematopoietic Malignancies Demonstrate Loss-of-Function Mutations of BAX. *Blood*. 1998;91:2991-2997.
  90. Laane E., Panaretakis T., Pokrovskaja K., Buentke E., Corcoran M., Söderhäll S., Heyman M., Mazur J., Zhivotovsky B., Porwit A., Grandér D. Dexamethasone-induced apoptosis in acute lymphoblastic leukemia involves differential regulation of Bcl-2 family members. *Haematol*. 2007;92(11):1460-1469.

91. Uraśiński T., Uraśińska E., Grabarek J, Fydryk J. Good early treatment response in childhood acute lymphoblastic leukemia is associated with Bax nuclear accumulation and PARP cleavage. *Med Sci Monit.* 2009;15(6):294-301.
92. Scorilas A., Kyriakopoulou L., Yousef G.M., Ashworth L.K., Kwamie A., Diamandis E.P. Molecular cloning, physical mapping, and expression analysis of a novel gene, *BCL2L12*, encoding a proline-rich protein with a highly conserved BH2 domain of the Bcl-2 family. *Genomics.* 2001;72:217-221.
93. Adamopoulos P., Kontos C., Tsiakanikas P., Scorilas A. Identification of novel alternative splice variants of the *BCL2L12* gene in human cancer cells using next generation sequencing methodology. *Cancer Letters.* 2016;373:119-129.
94. Stegh A., Chin I., Louis D., Depinho R. What drives intense apoptosis resistance and propensity for necrosis in glioblastoma? Arole for *BCL2L12* as a multifunctional cell death regulator. *Cell Cycle* 2011;10:33-38.
95. Hong Y., Yang J., Chi Y., Wang W., Wu W., Yun X., Kong X., Gu J. *BCL2L12A* localizes to the cell nucleus and induces growth inhibition through G2/M arrest in CHO cells. *Mol Cell Biochem.* 2010;333:323-330.
96. Talieri M., Diamandis E., Katsaros N., Gourgiotis D., Scorilas A. Expression of *BCL2L12*, a new member of apoptosis-related genes, in breast tumors. *Thromb Haemost.* 2003;89:1081-8.
97. Thomadaki H., Ardavanis A., Talieri M., Kletsas D., Scorilas A. Prognostic significance of *BCL2L12*, a new member of the *BCL2* family of apoptosis-related genes, in breast cancer. *FEBS Journal.* 2005;272(s1), Abstract number: A4-066P
98. Thomadaki H., Talieri M., Scorilas A. Prognostic value of the apoptosis related genes *BCL2* and *BCL2L12* in breast cancer. *Cancer Letters.* 2007;247:48-55.
99. Thomadaki H., Talieri M., Scorilas A. Treatment of MCF-7 cells with taxol and etoposide induces distinct alterations in the expression of apoptosis-related genes *BCL2*, *BCL2L12*, *BAX*, *CASPASE-9* and *FAS*. *Biol Chem.* 2006;387(8):1081-6.
100. Mathioudaki K., Scorilas A., Papadokostopoulou A., Xynopoulos D., Arnogianaki N., Agnanti N., Talieri M. Expression analysis of *BCL2L12*, a new member of apoptosis-related genes, in colon cancer. *Biol Chem.* 2004;385(9):779-83
101. Kontos C., Papadopoulos IN., Scorilas A. Quantitative expression analysis and prognostic significance of the novel apoptosis-related gene *BCL2L12* in colon cancer. *Biol Chem.* 2008;389(12):1467-75.
102. Floros K., Thomadaki H., Lallas G., Katsaros N., Talieri M., Scorilas A. Cisplatin-Induced Apoptosis in HL-60 Human Promyelotic Leukemia Cells. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 2003;1010:153-158.
103. Floros KV., Thomadaki H., Katsaros N., Talieri M., Scorilas A. mRNA expression analysis of a variety of apoptosis-related genes, including the novel gene of the *BCL2*-family, *BCL2L12*, in HL-60 leukemia cells after treatment with carboplatin and doxorubicin. *Biol Chem.* 2004;385(11):1099-103.
104. Floros K., Talieri M., Scorilas A. Topotecan and methotrexate alter expression of the apoptosis-related genes *BCL2*, *FAS* and *BCL2L12* in leukemic HL-60 cells. *Biol Chem.* 2006 Dec;387(12):1629-33.
105. Floros K., Thomadaki H., Florou D., Talieri M., Scorilas A. Alterations in mRNA Expression of Apoptosis-Related Genes *BCL2*, *BAX*, *FAS*, *Caspase-3* and the novel Member *BCL2L12* after

- treatment of Human Leukemic Cell Line HL-60 with the Antineoplastic Agent Etoposide. *Ann. N.Y. Sci.* 2006;1090:89-97.
106. Thomadaki H., Floros K., Scorilas A. Molecular response of HL-60 cells to mitotic inhibitors vincristine and taxol visualized with apoptosis-related gene expressions, including the new member BCL2L12. *Ann N Y Acad Sci.* 2009;1171:276-83.
  107. Papageorgiou S., Kontos C., Pappa V., Thomadaki H., Kotsioti F., Dervenoulas J., Papageorgiou E., Economopoulos T., Scorilas A. The Novel Member of the BCL2 Gene Family, BCL2L12, Is Substantially Elevated in Chronic Lymphocytic Leukemia Patients, Supporting Its Value As a Significant Biomarker. *The Oncologist.* 2011;16(9):1280-1291.
  108. Karan-Djurasevic T., Palibrk V., Zukic B., Spasovski V., Glumac I., Colovic M., Colovic N., Jurisic V., Scorilas A., Expression of Bcl2L12 in chronic lymphocytic leukemia patients: association with clinical and molecular prognostic markers. *Med Oncol.* 2013;30:405.
  109. Thomadaki H., Floros K., Pavlovic S., Tomic N., Gourgiotis D., Colovic M., Scorilas A. Overexpression of the novel member of the BCL2 gene family, BCL2L12, is associated with the disease outcome in patients with acute myeloid leukemia. *Clin Biochem.* 2012;45(16-17):1362-7.
  110. Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi. Expression of BCL2L12 gene in de novo acute myeloid leukemia and its clinical implications. 2013;30(5):544-8.
  111. Florou D, Papadopoulos IN, Scorilas A. Molecular analysis and prognostic impact of the novel apoptotic gene BCL2L12 in gastric cancer. *Biochem Biophys Res Commun.* 2010;391(1):214-8.
  112. Korbakis D, Scorilas A. Quantitative expression analysis of the apoptosis-related genes BCL2, BAX and BCL2L12 in gastric adenocarcinoma cells following treatment with the anticancer drugs cisplatin, etoposide and taxol. *Tumour Biol.* 2012 ;33(3):865-75.
  113. Zhuo Z., Zhang L., Mu Q., Lou Y., Gong Z., Shi Y., Ouyang G., Zhang Y. The effect of combination treatment with docosahexaenoic acid and 5-fluorouracil on the mRNA expression of apoptosis-related genes, including the novel gene BCL2L12, in gastric cancer cells. *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* 2009;45(1-2):69-74.
  114. Stegh AH., Kim H., Bachoo RM., Forloney KL., Zhang J., Schulze H., Park K., Hannon GJ., Yuan J., Louis DN., DePinho RA., Chin L. Bcl2L12 inhibits post-mitochondrial apoptosis signaling in glioblastoma. *Genes Dev.* 2007;21(1):98-111.
  115. Stegh AH., Kesari S., Mahoney JE., Jenq HT., Forloney KL., Protopopov A., Louis DN., Chin L., DePinho RA. Bcl2L12-mediated inhibition of effector caspase-3 and caspase-7 via distinct mechanisms in glioblastoma. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008;105(31):10703-8.
  116. Stegh A., Brennan C., Mahone J., Forloney K., Jenq H., Luciano J., Protopopov A., Chin L., DePinh R. Glioma oncoprotein Bcl2L12 inhibits the p53 tumor suppressor. *Genes & Dev.* 2010;24:2194-2204.
  117. Stegh AH., DePinho RA. Beyond effector caspase inhibition: Bcl2L12 neutralizes p53 signaling in glioblastoma. *Cell Cycle.* 2011;10(1):33-8.
  118. Chou CH., Chou AK., Lin CC., Chen WJ., Wei CC., Yang MC., Hsu CM., Lung FW., Loh JK., Howng SL., Hong YR. GSK3 $\beta$  regulates Bcl2L12 and Bcl2L12A anti-apoptosis signaling in glioblastoma and is inhibited by LiCl. *Cell Cycle.* 2012;11(3):532-42.
  119. Fendri A., Kontos C., Khabir A., Mokdad-Gargouri R., Scorilas A. BCL2L12 Is a Novel Biomarker for the Prediction of Short-Term Relapse in Nasopharyngeal Carcinoma. *Mol Med.* 2011;17(3-4):163–171

120. ΔΕΠ Σύνοψη μαθημάτων Ιστολογίας Ι, ΕΚΠΑ Ιατρική Σχολή Ιατρικές εκδόσεις Πασχαλίδης. Αθήνα 2003 σ.70-71.
121. Lee SH., Erber WN., Porwit A., Tomonaga M., Peterson LC. International Council for Standardization In Hematology ICSH guidelines for the standardization of bone marrow specimens and reports. *Int J Lab Hematol.* 2008;30(5):349-64.
122. Beutler E., Gelbart T., Kuhl W. Interference of heparin with the polymerase chain reaction. *Biotechniques.* 1990;9(2):166.
123. Jung R., Lubcke C., Wagener C., Neumaier M. Reversal of RT-PCR inhibition observed in heparinized clinical specimens. *Biotechniques.* 1997;23:24-28.
124. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem.* 1987;162(1):156-9.
125. Langebrake C., Günther K., Lauber J., Reinhardt D. Preanalytical mRNA stabilization of whole bone marrow samples. *Clin Chem.* 2007;53(4):587-93.
126. Ali Y., Dolan MJ., Fendler EJ., Larson EL. Alcohols. In: Block SS, ed. *Disinfection, sterilization, and preservation.* Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2001:229-54.
127. Desjardins P., Conklin D. NanoDrop microvolume quantitation of nucleic acids. *J Vis Exp.* 2010;22(45).
128. Heptinstall J., Rapley R. *The nucleic acid Protocols Handbook.* R. Rapley Editor, Humana Press Inc Totowa NJ. p.57-60.
129. T042-Technical Bulletin Nanodrop Spectrophotometers, ThermoScientific.
130. Φραγκούλης Ε. Μαθήματα Βιοχημείας, ιατρικές εκδόσεις Λίτσας, Β' έκδοση, 2005.
131. Jones P. *Gel electrophoresis-Nucleic acids-Essential Techniques,* Series Editor Rickwood D. Wiley, 1999.
132. Sambrook J., Fritsch EF., Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual.* Second Edition. 1989
133. Joe O'Connell. *Methods in Molecular Biology RT-PCR Protocols.* Humana Press. 2002;193:3-9.
134. *Molecular Cloning: A laboratory manual, In vitro amplification of DNA by PCR*
135. Bustin S. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *Journal of Molecular Endocrinology.* 2000;25:169–193.
136. Grunewald H. *Methods in Molecular Biology: Optimization of Polymerase Chain Reactions.* Humana Press. 2<sup>nd</sup> edition Vol.226
137. Eirlich H. *PCR Technology Principles and Applications for DNA Amplification.* W.H Freeman and Company. 1992
138. Bustin S. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *Journal of Molecular Endocrinology.* 2000;25:169–193.
139. Higuchi R., Fockler C., Dollinger G., Watson R. Kinetic PCR Analysis: Real-Time Monitoring of DNA Amplification Reactions. *Biotechnology.* 1993;11:1026-1030
140. Freeman W., Walker S., Vrana E. Quantitative RT PCR: Pitfalls and Potential. *Biotechniques.* 1999;26:112-125.
141. Espy M. J., Uhl J. R., Sloan M., Puckwalter S. P., Jones M. F., Vetter E. A. et al. Real-Time PCR in Clinical Microbiology: Applications for Routine Laboratory testing *Clinical Microbiology Review* 2006;19(1):165-256

142. Kubista M., Andrade JM., Bengtsson M., Forootan A., Jonak J., Lind K., Sindelka, R., Sjoback, R., Sjogreen, B., Strombom, L., Stahlberg, A. and Zoric, N. The real-time polymerase chain reaction. *Mol Aspects Med.* 2006;27:95-125.
143. Huggett J., Dheda K., Bustin S., Zumla A. Real-Time RT-PCR normalisation; strategies and considerations. *Genes Immun.* 2005;6:279-284.
144. Valasek MA., Repa JJ. The power of Real-Time PCR. *Adv Physiol Educ.* 2005;29:151-159.
145. Hickman JA. Apoptosis and chemotherapy resistance. *Eur J Cancer.* 1996;32A:921-6.
146. Pui CH., Mullighan CG., Evans WE., Relling MV. Pediatric acute lymphoblastic leukemia: where are we going and how do we get there? *Blood.* 2012;120:1165-74.
147. Srivastava RK., Srivastava AR., Korsmeyer SJ. et al. Involvement of microtubules in the regulation of Bcl2 phosphorylation and apoptosis through cyclic AMP-dependent protein kinase. *Mol Cell Biol.* 1998;18:3509-17.
148. Kang MH., Kang YH., Szymanska B. et al. Activity of vincristine, L-ASP, and dexamethasone against acute lymphoblastic leukemia is enhanced by the BH3- mimetic ABT-737 in vitro and in vivo. *Blood.* 2007;110:2057-66.
149. Sionov RV., Cohen O., Kfir S., Zilberman Y. & Yefenof E. a Role of mitochondrial glucocorticoid receptor in glucocorticoid-induced apoptosis. *Journal of Experimental Medicine* 2006;203:189–201.
150. Rogatsky I., Hittelman AB., Pearce D., Garabedian MJ. Distinct glucocorticoid receptor transcriptional regulatory surfaces mediate the cytotoxic and cytostatic effects of glucocorticoids. *Mol Cell Biol.* 1999;19:5036-49.
151. Rainer J., Ploner C., Jesacher S. et al. Glucocorticoid-regulated microRNAs and mirtrons in acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia.* 2009;23:746-52.
152. Swerdlow S., McColl K., Rong Y. et al. Apoptosis inhibition by Bcl-2 gives way to autophagy in glucocorticoid-treated lymphocytes. *Autophagy.* 2008;4:612-20.
153. Tissing WJE., Meijerink JPP., den Boer ML., Pieters R. Molecular determinants of glucocorticoid sensitivity and resistance in acute lymphoblastic leukemia *Leukemia* 2003;17:17–25
154. Laudet V., Gronemeyer H. *The Nuclear Receptor Facts Book.* Academic Press: London 2002:354–376
155. Zhang L., Insel PA. The pro-apoptotic protein Bim is a convergence point for cAMP/protein kinase A- and glucocorticoid-promoted apoptosis of lymphoid cells. *J Biol Chem.* 2004;279:20858-65.
156. Cimmino A., Calin GA., Fabbri M et al. miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2. *Proc Natl Acad Sci.* 2005;102:13944-9.
157. Karawajew L., Ruppert V., Wuchter C., KoÈsser A., Schrappe M., DoÈrken, B. & Ludwig, W.D. Inhibition of in vitro spontaneous apoptosis by Il-7 correlates with Bcl-2 up-regulation, cortical/mature immunophenotype, and better early cytoreduction of childhood T-cell acute lymphoblastic leukaemia. *Blood.* 2000;96(1):297-306.

## «Ανάλυση έκφρασης και μελέτη αποπτωτικών γονιδίων στην παιδική λευχαιμία»

Σταμάτη Λαμπρινή

Διδακτορική Διατριβή

Ιατρική Σχολή, ΕΚΠΑ

### 6. ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η λευχαιμία αποτελεί τον συχνότερο τύπο καρκίνου σε παιδιά ηλικίας 0-15 ετών, ενώ η Οξεία Λεμφοβλαστική λευχαιμία (ΟΛΛ) το 77% όλων των τύπων λευχαιμίας του παιδιατρικού πληθυσμού. Η ετήσια συχνότητα είναι 4/100.000 παιδιά με συχνότερη ηλικία εμφάνισης μεταξύ 2 και 5 ετών. Ως προς την επιβίωση από τη νόσο, τα τελευταία 20 χρόνια έχει συντελεστεί σημαντική αύξηση του ποσοστού επιβίωσης σε >80%. Παρά ωστόσο την σημαντική αυτή βελτίωση στα ποσοστά επιβίωσης χάρη σε νέες θεραπευτικές προσεγγίσεις (Risk-adjusted therapy), παρατηρούνται ακόμα θάνατοι, ένα ποσοστό των οποίων (36%) συμβαίνει ακόμη και σε ασθενείς με ευνοϊκούς προγνωστικούς δείκτες.

Οι νέες θεραπευτικές προσεγγίσεις βασίζονται στον προσδιορισμό παραγόντων κινδύνου για τον κάθε ασθενή (Risk-adjusted therapy), προκειμένου να εντοπιστούν εκείνοι οι ασθενείς που χρήζουν χορήγησης πιο εντατικής θεραπείας. Οι προγνωστικοί αυτοί παράγοντες διακρίνονται σε τρεις κατηγορίες. Στην πρώτη περιλαμβάνονται χαρακτηριστικά των ασθενών (ηλικία, φύλο), στη δεύτερη χαρακτηριστικά των λευχαιμικών κυττάρων (αριθμός λευκών αιμοσφαιρίων στη διάγνωση/συμμετοχή Κεντρικού Νευρικού Συστήματος/χρωμοσωμικές μεταθέσεις) και στην τρίτη κατηγορία περιλαμβάνεται η απάντηση στη θεραπεία εφόδου (Απόλυτος αριθμός βλαστών την 8η ημέρα στο περιφερικό αίμα/απάντηση στο Μυελό των Οστών την 15η και 33η ημέρα/Ελάχιστη Υπολειπόμενη Νόσος τις ημέρες 15,33,78). Ωστόσο παρά την εφαρμογή των νέων αυτών θεραπευτικών προσεγγίσεων, ένα στα πέντε παιδιά συνεχίζει να εμφανίζει υποτροπή της νόσου ακόμη και παρουσία ευνοϊκών προγνωστικών δεικτών στη διάγνωση, ενώ παρατηρούνται ακόμα θάνατοι και παρενέργειες σχετιζόμενες με την θεραπεία όπως η τοξικότητα σε αυτήν. Καθίσταται λοιπόν αναγκαία η μελέτη, ταυτοποίηση και καθιέρωση νέων μοριακών δεικτών ικανών για έγκαιρη διάγνωση της νόσου, πρόβλεψη του θεραπευτικού αποτελέσματος της εφαρμοζόμενης αγωγής και πρόγνωση της επιβίωσης των ασθενών.

Σημαντικό ρόλο στην παθογένεση της λευχαιμίας, παίζει η απορρύθμιση των γονιδίων που σχετίζονται με την απόπτωση, η οποία έχει σαν αποτέλεσμα την αποτροπή του αποπτωτικού κυτταρικού θανάτου. Πολλά από τα χρησιμοποιούμενα χημειοθεραπευτικά φάρμακα στηρίζουν τη δράση τους στην προαγωγή της απόπτωσης. Συγκεκριμένα, τα θεραπευτικά πρωτόκολλα που χρησιμοποιούνται στην ΟΛΛ (BFM-ALL, COG-North America's ALL Protocols, UKALL-United Kingdom's), περιλαμβάνουν φάρμακα που στηρίζουν την κυτταροτοξική τους δράση στην προαγωγή των προαποπτωτικών γονιδίων και την καταστολή των αντιαποπτωτικών γονιδίων της οικογένειας BCL2, μέλη της οποίας είναι τα γονίδια BCL2, BAX και BCL2L12. Η υποτροπή λοιπόν της νόσου και ο μικρός χρόνος επιβίωσης ασθενών, παρά τη χορήγηση της κατάλληλης θεραπείας, πιθανώς οφείλονται στην αποτυχία των χημειοθεραπευτικών φαρμάκων να προάγουν την απόπτωση

Αναλυτικά, το γονίδιο BCL2 (B-cell CLL/lymphoma 2) είναι ένα πρωτο-ογκογονίδιο που εδράζεται στην χρωμοσωμική περιοχή 18q21.3 και κωδικοποιεί για την πρωτεΐνη BCL2, η οποία εμφανίζει ισχυρή αντιαποπτωτική δράση μέσω της προστασίας της ακεραιότητας της μιτοχονδριακής μεμβράνης και της παρεμπόδισης της απελευθέρωσης του κυτοχρώματος c.

Το γονίδιο BAX (BCL2-associated X protein) που εδράζεται στην χρωμοσωμική περιοχή 19q13.3-q13.4 κωδικοποιεί για την πρωτεΐνη BAX, το πρώτο προαποπτωτικό μέλος της οικογένειας BCL2. Μετά το αποπτωτικό ερέθισμα, η πρωτεΐνη BAX μεταφέρεται στα μιτοχόνδρια και προάγει την απελευθέρωση του κυτοχρώματος c και της πρωτεΐνης SMAC/Diablo στο κυτταρόπλασμα ενεργοποιώντας έτσι τον καταρράκτη των κασπασών που οδηγεί στον αποπτωτικό κυτταρικό θάνατο. Επιπλέον, σχηματίζει ομο- και ετερο-διμερή με άλλα μέλη της οικογένειας BCL2, ρυθμίζοντας με αυτόν τον τρόπο την ισορροπία μεταξύ προ- και αντι-αποπτωτικού δυναμικού.

Το γονίδιο BCL2L12 εδράζεται στο χρωμόσωμα 19q13.3-13.4 και κωδικοποιεί για την πρωτεΐνη BCL2L12. Εκτός από το κλασικό μετάγραφο, έχουν επίσης ταυτοποιηθεί κι άλλες ισομορφές, αποτέλεσμα εναλλακτικού ματίσματος του γονιδίου. Ο ρόλος της πρωτεΐνης BCL2L12 στην απόπτωση παραμένει αδιευκρίνιστος. Μελέτες έχουν δείξει ότι η προαποπτωτική ή η αντιαποπτωτική της δράση εξαρτάται από το κυτταρικό περιβάλλον στο οποίο θα βρεθεί. Έχει διατυπωθεί ωστόσο και η άποψη ότι η διαφορετική δομή των διαφόρων ισομορφών είναι υπεύθυνη για την εμφάνιση προ ή αντι-αποπτωτικού ρόλου. Κάποιες από τις ισομορφές περιλαμβάνουν μόνο την BH3 περιοχή (BH3- only) οπότε

ασκούν προαποπτωτική δράση σε αντίθεση με την συνολικού μήκους ισομορφή που είναι πιθανότερο να ασκεί αντιαποπτωτική δράση.

Στην παρούσα διδακτορική διατριβή πραγματοποιείται μελέτη της έκφρασης και αξιολόγηση της κλινικής αξίας των γονιδίων BCL2, BAX και BCL2L12 σε επίπεδο mRNA σε Μυελό των Οστών παιδιών με ΟΛΛ. Βασικός στόχος της διατριβής είναι η ανάπτυξη και βελτιστοποίηση μοριακών μεθοδολογιών προσδιορισμού των επιπέδων έκφρασης των υπό μελέτη γονιδίων και η ταυτοποίηση νέων μοριακών δεικτών για την πρόγνωση της πορείας της νόσου, την πρόβλεψη της ανταπόκρισής των ασθενών στην εφαρμοζόμενη θεραπεία και της πρόγνωσης της επιβίωσής τους.

Κατά την εκπόνηση της διατριβής, συλλέχθηκαν και επεξεργάστηκαν δείγματα Μυελού των οστών από 82 παιδιά που διαγνώστηκαν με ΟΛΛ (72 με Β-ΟΛΛ και 10 με Τ-ΟΛΛ) ηλικίας μεταξύ 15 μηνών και 15 ετών στη φάση της διάγνωσης. Επίσης, συλλέχθηκαν δείγματα Μυελού των οστών σε 56 από τους ασθενείς την 33η ημέρα της θεραπείας καθώς και από 63 παιδιά που δεν έπασχαν από ΟΛΛ ή άλλη αιματολογική κακοήθεια προκειμένου να χρησιμοποιηθούν ως μάρτυρες στη μελέτη. Η συλλογή έγινε σε συνεργασία με το Ογκολογικό Τμήμα του Νοσοκομείου Παίδων «Π & Α Κυριακού» και η θεραπεία των ασθενών έλαβε χώρα μεταξύ του Σεπτεμβρίου του 2006 και του Απριλίου του 2012, με το πρωτόκολλο Berlin-Frankfurt-Münster (BFM). Αναλυτικά, μετά από σειρά πειραματικών διαδικασιών και βελτιστοποίησης των πρωτοκόλλων, αρχικά από τα δείγματα Μυελού των Οστών (ΜΟ) απομονώθηκε ολικό RNA, του οποίου η ποσότητα και η ποιότητα αξιολογήθηκαν με φωτομέτρηση στα 260 nm και 280 nm, καθώς και με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης. Έπειτα το RNA χρησιμοποιήθηκε ως εκμαγείο για την σύνθεση cDNA με τη βοήθεια της MMLV αντίστροφης μεταγραφάσης και ακολούθησε ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (qReal-Time PCR) με τη χρήση της χρωστικής SYBR Green, αφού προηγήθηκε ανάπτυξη του πρωτοκόλλου και σχεδιασμός εκκινήτων των γονιδίων. Σχετική ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων έγινε με τη μέθοδο 2- $\Delta\Delta$ CT χρησιμοποιώντας το γονίδιο GAPDH ως γονίδιο αναφοράς και την κυτταρική σειρά HL60 ως βαθμονομητή. Τέλος, με την βοήθεια λεπτομερούς βάσης καταγραφής του ιστορικού, των κλινικοπαθολογικών δεδομένων και της μετέπειτα πορείας των ασθενών (follow-up), ακολούθησε εκτενής βιοστατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων για την αξιολόγηση της διαφοροδιαγνωστικής και προγνωστικής αξίας των υπό μελέτη γονιδίων στην ΟΛΛ της παιδικής ηλικίας.



Από την μελέτη της έκφρασης του BCL2 προέκυψε ότι το γονίδιο σε επίπεδο mRNA εμφάνισε στατιστικώς σημαντικά αυξημένη έκφραση ( $p < 0,001$ ) στον Μυελό των Οστών ασθενών με ΟΛΛ σε σχέση με τους μάρτυρες καθώς και ανεξάρτητη διαφοροδιαγνωστική αξία για τα παιδιά με ΟΛΛ, όπως προέκυψε από την ανάλυση καμπύλης ROC (AUC: 0,701, 95%CI: 0,615-0,786;  $p < 0,001$ ) και την πολυμεταβλητή ανάλυση λογιστικής παλινδρόμησης (OR: 3,618; 95% CI: 1,693-7,735;  $p = 0,001$ ). Παρομοίως, οι ασθενείς με ΟΛΛ παρουσίασαν αυξημένα επίπεδα mRNA του BAX σε σχέση με τους μάρτυρες ( $p = 0,060$ ). Ο λόγος BCL2/BAX διαπιστώθηκε σημαντικά υψηλότερος σε ασθενείς με ΟΛΛ σε σχέση με τους μάρτυρες ( $p = 0,001$ ) ενώ αναδείχθηκε η ανεξάρτητη διαφοροδιαγνωστική του ικανότητα (πολυμεταβλητή λογιστικής παλινδρόμησης Cox, OR: 3,622; 95%CI: 1,441-9,108;  $p = 0,006$  και ανάλυση καμπύλης ROC AUC: 0,665; 95%CI: 0,577-0,753;  $p = 0,001$ ). Όσον αφορά στο γονίδιο BCL2L12, από την στατιστική μελέτη προέκυψε ότι το γονίδιο σε επίπεδο mRNA ( $p = 0,030$ ) εμφανίζει αυξημένη έκφραση στον ΜΟ ασθενών με ΟΛΛ σε σχέση με τους μάρτυρες. Η αξιολόγηση της διαφοροδιαγνωστικής αξίας της έκφρασης του γονιδίου πραγματοποιήθηκε μέσω ανάλυσης καμπυλών ευαισθησίας-ειδικότητας ROC, αλλά και ανάλυσης λογιστικής παλινδρόμησης τόσο σε μονομεταβλητό όσο και σε πολυμεταβλητό επίπεδο χωρίς ωστόσο να αναδείξει στατιστικώς σημαντικά αποτελέσματα.

Επίσης, βρέθηκε ότι τα αυξημένα επίπεδα του BCL2 και η αύξηση του λόγου BCL2/BAX σχετίζονται ισχυρά με κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά των ασθενών που θεωρούνται θετικής προγνωστικής αξίας, όπως ο ανοσοφαινότυπος CD10(+) ( $p = 0,001$ ,  $p = 0,005$  για αυξημένα επίπεδα BCL2 και BCL2/BAX αντίστοιχα), ο αριθμός λευκών αιμοσφαιρίων στη διάγνωση  $< 50,000$  cells/ $\mu$ l ( $p = 0,009$ ,  $p = 0,015$  αντίστοιχα), ο υψηλός υπερδιπλοειδισμός (51-65 χρωμοσώματα) ( $p = 0,054$ ,  $p = 0,012$  αντίστοιχα) και η TEL-AML1 αναδιάταξη/t(12;21)(p13;q22) (αυξημένη έκφραση του BCL2,  $p = 0,010$ ). Επιπλέον, η TEL-AML1 αναδιάταξη/t(12;21)(p13;q22) σχετίστηκε και με αυξημένη έκφραση του BAX ( $p < 0,001$ ). Για το γονίδιο BCL2L12 αυξημένα επίπεδα βρέθηκαν στους ασθενείς με CD10(+) ανοσοφαινότυπο ( $p < 0,01$ ), στους ασθενείς με την TEL-AML1 αναδιάταξη/t(12;21)(p13;q22) ( $p = 0,001$ ) και σε αυτούς με αριθμό λευκών αιμοσφαιρίων στη διάγνωση  $< 50,000$  cells/ $\mu$ l ( $p = 0,024$ ).

Ως προς την προγνωστική αξία της έκφρασης των γονιδίων βάσει της απάντησης στη θεραπεία, βρέθηκε ότι χαμηλότερα mRNA επίπεδα έκφρασης βάσει λογιστικής παλινδρόμησης παρατηρούνται στους M2-M3 ασθενείς την 15η ημέρα (ποσοστό

βλαστών στο M.O  $\geq 5\%$ ): BCL2 (OR:6,767; 95%CI:1,835-24,96,  $p=0,004$ ), BAX (OR:8,744; 95%CI:1,070-71,45  $p=0,043$ ) και BCL2L12 (OR: 0,167; 95% CI: 0,042-0,674  $p=0,012$ ). Αυξημένος κίνδυνος θετικής MRD (33η ημέρα) παρατηρήθηκε επίσης στις ομάδες ασθενών με χαμηλά επίπεδα έκφρασης των υπό μελέτη γονιδίων: BCL2 (OR: 13,00; 95% CI: 1,939-87,14  $p=0,008$ ), BAX (OR: 5,227; 95% CI:0,565-48,38  $p=0,145$ ) και BCL2L12 (OR: 0,025; 95% CI:0,001-0,639  $p=0,026$ ) στη διάγνωση, ενώ αυξημένος κίνδυνος M2-M3 μυελού των οστών και θετικής MRD σημειώθηκε στην ομάδα ασθενών με χαμηλό λόγο BCL2/BAX. Οι ασθενείς με χαμηλά επίπεδα έκφρασης και των δύο γονιδίων ταυτόχρονα στη διάγνωση παρουσίασαν αυξημένο κίνδυνο M2-M3 απάντησης (OR: 8,400; 95% CI: 2,225-31,72;  $p=0,002$ ) ή θετικής MRD (OR: 16,00; 95% CI: 2,310-110,8;  $p=0,005$ ). Επιπλέον, μοντέλα πολυμεταβλητής λογιστικής παλινδρόμησης, για την πρόβλεψη M2-M3 απάντησης των ασθενών (OR: 13,84; 95% CI: 2,120-90,32;  $p=0,006$ ) και θετικής MRD (OR: 14,10; 95% CI: 1,129-176,0;  $p=0,040$ ) έδειξαν την ανεξάρτητη προγνωστική αξία της ταυτόχρονης χαμηλής έκφρασης των BCL2 και BAX για τους ασθενείς στους οποίους χορηγείται θεραπεία με το πρωτόκολλο BFM, και την ανεξάρτητη προγνωστική αξία της χαμηλής έκφρασης BCL2.

Ως προς την πρόβλεψη επιβίωσης των ασθενών, από την ανάλυση επιβίωσης Kaplan-Meier διαπιστώθηκε ότι ασθενείς με χαμηλά επίπεδα έκφρασης των BCL2 ( $p=0,004$ ), BAX ( $p=0,026$ ) και BCL2L12 ( $p=0,038$ ) εμφανίζουν μικρότερο χρόνο επιβίωσης ελεύθερης νόσου (Disease-free survival-DFS), ενώ μικρότερη ειδική επιβίωση από την νόσο (cancer-specific survival -CSS) παρατηρήθηκε στους ασθενείς με μειωμένα επίπεδα έκφρασης των BCL2 ( $p=0,085$ ) και BAX ( $p=0,019$ ). Επιπλέον, ασθενείς με ταυτόχρονη υποέκφραση και των δυο γονιδίων στη διάγνωση παρουσίασαν σημαντικά μικρότερη DFS ( $p=0,003$ ) και CSS ( $p=0,043$ ) σε σχέση με τους ασθενείς με υπερέκφραση των γονιδίων ή υποέκφραση μόνο του ενός εξ αυτών. Αυξημένος κίνδυνος υποτροπής της νόσου διαπιστώθηκε με ανάλυση παλινδρόμησης κατά Cox, στους ασθενείς με υποέκφραση του BCL2 (HR: 3,903; 95% CI:1,414-10,77  $p=0,009$ ), του BAX (HR: 4,640; 95% CI:1,046-20,57  $p=0,043$ ) και του BCL2L12 (HR: 3,149; 95% CI:1,002-9,890  $p=0,059$ ), καθώς και από την ταυτόχρονη υποέκφραση των BCL2 και BAX (HR: 4,700 95% CI:1,703-12,97  $p=0,003$ ). Επίσης διαπιστώθηκε αυξημένος κίνδυνος θανάτου στους ασθενείς με υποέκφραση του BCL2 (HR: 3,159; 95% CI:0,789-12,64  $p=0,104$ ), του BAX (HR: 46,99; 95% CI:0,137-16,110  $p=0,196$ ) και του BCL2L12 (HR: 0,418; 95%

CI:0,418-7,322  $p=0,444$ ), καθώς και από την ταυτόχρονη υποέκφραση των BCL2 και BAX (HR: 3,704 95% CI:0,926-14,82  $p=0,064$ ).

Μελετήθηκε περαιτέρω η σχέση της έκφρασης των γονιδίων μετά την έναρξη της θεραπείας και της επιβίωσης των ασθενών. Οι ασθενείς με αυξημένα επίπεδα BCL2 ( $p=0,018$ ) ή BAX ( $p=0,040$ ) την 33η ημέρα θεραπείας σε σχέση με τη διάγνωση εμφάνισαν μικρότερο DFS, ενώ με αυξημένα επίπεδα BCL2 εμφάνισαν μικρότερο CSS ( $p=0,012$ ). Αντίθετα, οι ασθενείς με αυξημένα επίπεδα BCL2L12 εμφάνισαν μεγαλύτερο DFS ( $p=0,018$ ) και μεγαλύτερο CSS ( $p=0,195$ ). Επιπλέον, αυξημένος κίνδυνος υποτροπής της νόσου διαπιστώθηκε στους ασθενείς με υπερέκφραση τόσο του BCL2 (HR: 4,270; 95% CI:1,153-15,81  $p=0,030$ ) όσο και του BAX (HR: 4,295; 95% CI:0,940-19,63  $p=0,060$ ) σύμφωνα με την Cox ανάλυση, ενώ αντίθετα αυξημένος κίνδυνος υποτροπής της νόσου διαπιστώθηκε στους ασθενείς με υποέκφραση του BCL2L12 (HR: 5,144; 95% CI:1,126-23,49  $p=0,035$ ). Επίσης διαπιστώθηκε αυξημένος κίνδυνος θανάτου στους ασθενείς με υπερέκφραση τόσο του BCL2 (HR: 84,78; 95% CI:0,058-122971  $p=0,232$ ) και του BAX (HR: 3,098; 95% CI:0,346-27719  $p=0,312$ ), όσο και σε αυτούς που εμφάνισαν ταυτόχρονη υπερέκφραση των γονιδίων BCL2 και BAX (HR: 9,198; 95% CI:1,027-92,37  $p=0,047$ ) την 33η ημέρα. Αντίθετα, αυξημένος κίνδυνος θανάτου διαπιστώθηκε σε χαμηλή έκφραση του BCL2L12 (HR: 3,825; 95% CI:0,427-34,22  $p=0,230$ ). Οι ασθενείς τέλος, με αυξημένη έκφραση και των δύο γονιδίων μετά την έναρξη της θεραπείας εμφάνισαν μικρότερο χρόνο DFS ( $p=0,002$ ) και CSS ( $p=0,015$ ), καθώς και αυξημένο κίνδυνο υποτροπής (μονομεταβλητή ανάλυση παλινδρόμησης κατά Cox, HR: 5,325; 95% CI: 1,598-17,75;  $p=0,006$ ).

Περαιτέρω μελετήθηκε η σημασία των αυξημένων επιπέδων έκφρασης των γονιδίων BCL2 και BAX για την πρόγνωση επιβίωσης, μετά την έναρξη της θεραπείας με το πρωτόκολλο BFM σε ασθενείς με ευνοϊκούς προγνωστικούς δείκτες. Βρέθηκε ότι οι ασθενείς ηλικίας 1-10 ετών ( $p=0,003$ ) ή οι ασθενείς με αριθμό λευκών αιμοσφαιρίων στη διάγνωση  $<50,000$  cells/ $\mu$ l ( $p=0,015$ ) στους οποίους η έκφραση των γονιδίων BCL2 και BAX την 33η ημέρα ήταν αυξημένη σε σχέση με τη διάγνωση, εμφάνισαν μικρότερο DFS. Αυξημένο κίνδυνο πρώιμης υποτροπής εμφάνισαν επίσης οι ασθενείς με απάντηση στον M.O την 15η ημέρα M1( $<5\%$  βλάστες) ( $p=0,004$ ) και οι ασθενείς που ανήκαν στις ομάδες χαμηλού και μέσου κινδύνου ( $p=0,030$ ) με αυξημένα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων την 33η ημέρα της θεραπείας.

Συμπερασματικά, στην παρούσα διατριβή αναπτύχθηκαν και βελτιστοποιήθηκαν νέες μεθοδολογίες προσδιορισμού των υπό μελέτη γονιδίων σε παιδιά με ΟΛΛ. Συλλέχθηκαν και επεξεργάστηκαν δείγματα Μ.Ο από 82 παιδιά με ΟΛΛ στη διάγνωση και από 56 από αυτά την 33η ημέρα της θεραπείας. Επίσης, δημιουργήθηκε λεπτομερής βάση των κλινικοπαθολογικών δεδομένων και της πορείας (follow-up) των ασθενών έπειτα από την εφαρμογή της θεραπείας. Η βιοστατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων ανέδειξε την ισχυρή κλινική αξία των υπό μελέτη βιομορίων, για την διαφορική διάγνωση και πρόγνωση της ΟΛΛ στα παιδιά.

## «Study of apoptotic genes' expression in children diagnosed with Acute Lymphoblastic Leukemia»

Stamati Lamprini

Ph.D. Thesis

Medical School, University of Athens

### 7. ABSTRACT

Leukemia is the most frequently diagnosed cancer in children worldwide, responsible for one-third of all childhood malignancies, while childhood acute lymphoblastic leukemia (ch-ALL) represents 77 % of all pediatric leukemias. Although disease survival rates have been significantly improved due to novel therapeutic approaches, ALL-related deaths still occur, with a noticeable percentage of 36 % of them concerning patients with favorable prognostic features.

Risk-adjusted therapy is based on several prognostic features which are used to identify candidate patients for more intensive treatment. Prognostic factors related to this approach are classified into three major subgroups: patients' features (age, gender), leukemic cell characteristics (white blood cells/WBC count, central nervous system/CNS involvement, immunophenotype, cytogenetics, chromosomal translocations) and response to induction therapy (peripheral blast count on day 8, bone marrow/BM response on days 15 and 33, minimal residual disease/MRD on days 15, 33 and 78). However, 20 % of the children still relapse even when favorable features exist at the onset of the disease. Additionally, treatment-related toxicity and mortality have not yet been satisfactorily prevented. Therefore, the identification of novel therapeutic approaches and disease prognostic markers, able to designate patients' response to therapy and survival outcome, is of first clinical research priority.

Desensitization of apoptotic cell death due to deregulated expression of several apoptosis-related genes has been proven to hold a crucial role in the multifactorial leukemia pathogenesis and response to chemotherapy. The failure of cytotoxic drugs to promote the apoptosis of leukemic cells is shown to be responsible for both disease recurrence and patients' poor survival despite active treatment. Currently ongoing clinical trials, including numerous protocols (BFM-ALL, COG-North America's ALL Protocols, UKALL-United Kingdom's), rely on chemotherapeutic agents which exert their cytotoxic

effects through induction of pro-apoptotic and/or suppression of anti-apoptotic members of the Bcl-2 family.

BCL2 (B cell CLL/lymphoma 2) is a well characterized proto-oncogene located on chromosome 18q21.3, which encodes for the apoptosis regulator BCL-2, the founding member of BCL-2 apoptosis family, possessing a strong anti-apoptotic activity, throughout the protection of mitochondrial membrane integrity and the blockage of cytochrome c release.

BAX (BCL2-associated X protein) gene, located in 19q13.3–q13.4 chromosomal region, encodes for the apoptosis regulator BAX, which is the first identified pro-apoptotic member of the BCL-2 family. Following apoptotic stimuli, BAX translocates to mitochondria inducing the release of cytochrome c and Smac/DIABLO into the cytosol, leading to the initiation of the caspase cascade and ultimately apoptotic cell death. Furthermore, BAX forms homo- or hetero-dimers with other members of the BCL-2 family, regulating the balance between pro- and anti-apoptotic activities of BCL-2 family.

BCL2L12 gene, located in 19q13.3–q13.4 chromosomal region, encodes for the “classical” BCL2L12 protein isoform and other distinct transcripts, as a result of alternative splicing. The role of BCL2L12 in apoptosis remains elusive. It has been suggested that its’ pro or anti-apoptotic role in different human tissues is cell-dependent or that the different structure of isoforms may explain the discrepancy. Some BCL2L12 protein isoforms are BH3-only and could therefore have though a proapoptotic behavior, while the full-length isoform is most likely to play an antiapoptotic role.

The aim of this study is the expression analysis of BCL2, BAX and BCL2L12 levels profile in children-ALL and the evaluation of their clinical efficacy. More precisely, the main objectives of the Ph.D. Thesis are the development and optimization of molecular methodologies for the accurate and sensitive quantification of BCL2, BAX and BCL2L12 and the identification of novel disease prognostic markers for the differential diagnosis of ALL, as well as for the prediction of patients’ response to treatment and survival outcome.

Bone marrow (BM) specimens from 82 children diagnosed with ALL (72 B-lineage ALL and 10 T-lineage ALL), aging from 15 months to 15 years, were obtained at diagnosis, from the “P&A Kyriakou” Children’s Hospital. All patients were treated between September 2006 and April 2012, according to the ALL Berlin–Frankfurt–Munster (BFM)

treatment protocol. On day 33 following the induction of chemotherapy, BM specimens were also obtained from 56 patients of our cohort. Additionally, BM specimens from 63 children not suffering from any hematologic or other type of malignancy were also included in the study, representing our control group.

In detail, after developing and optimizing methodologies and protocols, total RNA was isolated from BM specimens. Its' quality and concentration were evaluated spectrophotometrically, while its' integrity was evaluated by agarose gel electrophoresis. Using 1  $\mu$ g of total RNA as template, first strand cDNA synthesis was performed, using MMLV reverse transcriptase. A SYBR Green-based qPCR (qReal-Time PCR) assay was developed, after gene-specific primers were designed, for the quantification of the genes. The expression analysis was carried out using the comparative CT,  $2^{-\Delta\Delta CT}$  relative quantification method. Finally, biostatistical analysis of the results of the study, using a database of patients' history, clinicopathological features and follow-up data, was performed for the assessment of the clinical value of the tested genes in the differential diagnosis and prognosis of children-ALL.

BCL2 ( $p < 0.001$ ) was found to be significantly overexpressed in BM specimens of ch-ALL patients compared to the control cohort. Regarding its' clinical significance for ch-ALL, multivariate logistic regression (OR 3.618; 95 % CI 1.693–7.735;  $p = 0.001$ ; Table 2) and ROC curve analysis (AUC 0.701, 95 % CI 0.615–0.786,  $p < 0.001$ ) highlighted the ability of BCL2 overexpression to discriminate malignant from normal BM specimens. Increased BAX expression was also detected in ch-ALL patients compared to controls ( $p = 0.060$ ). A significantly higher BCL2/BAX ratio has been found in BM specimens from ch-ALL patients compared to healthy children ( $p = 0.001$ ). This upregulated BCL2/BAX ratio was further illustrated to enhance the differential diagnosis of BM specimens from ALL children, as indicated by multivariate logistic regression models (OR 3.622; 95 % CI 1.441–9.108;  $p = 0.006$ ) and ROC curve analysis (AUC 0.665; 95 % CI 0.577–0.753;  $p = 0.001$ ). Higher BCL2L12 expression ( $p=0.030$ ) was also found in BM specimens from ch-ALL patients compared to healthy children and its' differential diagnostic potential was highlighted by ROC curve and multivariate logistic regression analysis, but these results were not statistically significant.

Higher BCL2 and BCL2/BAX expression was correlated with favorable prognostic features such as CD10(+) B-lineage ALL ( $p=0.001$ ,  $p=0.005$  BCL2 and BCL2/BAX respectively,) WBC count  $<50.000$  cells/ $\mu$ l ( $p=0.009$ ,  $p=0.015$  respectively), high

hyperdiploidy (>50 chromosomes) ( $p=0.054$ ,  $p=0.012$  respectively) and TEL-AML1 rearrangements/t(12;21)(p13;q22) (high BCL2 expression,  $p=0.010$ ). Furthermore, BAX ( $p < 0.001$ ) expression levels were also found to be significantly higher in TEL-AML1 rearrangements/t(12;21)(p13;q22). Finally, higher BCL2L12 levels were correlated with CD10(+) B-lineage ALL ( $p<0,01$ ), TEL-AML1 rearrangements/t(12;21)(p13;q22) ( $p=0.001$ ) and WBC count  $<50,000$  cells/ $\mu$ l ( $p=0.024$ ).

Concerning the prognostic significance of genes' expression based on treatment response, reduced BCL2 (OR:6.767; 95%CI:1.835-24.96,  $p=0.004$ ), BAX (OR:8.744; 95%CI:1.070-71.45  $p=0.043$ ) and BCL2L12 (OR: 0.167; 95% CI: 0.042-0.674  $p=0.012$ ) mRNA levels were found in patients with  $\geq 5$  % blasts on day 15 (M2-M3) as highlighted by logistic regression analysis. Reduced BCL2 (OR: 13.00; 95% CI: 1.939-87.14  $p=0.008$ ), BAX (OR: 5.227; 95% CI:0.565-48.38  $p=0.145$ ) and BCL2L12 (OR: 0.025; 95% CI:0.001-0.639  $p=0.026$ ) expression in diagnosis was also correlated with increased risk of positive MRD (day 33), while increased risk for M2-M3 and detectable MRD was found in ch-ALL patients with lower BCL2/BAX ratio. As highlighted by univariate logistic regression models, ch-ALL patients with lower expression levels of both genes at diagnosis displayed a significantly higher risk of M2–M3 response (OR: 8.400; 95% CI: 2.225-31.72;  $p=0.002$ ) or detectable MRD (OR: 16.00; 95% CI: 2.310-110.8;  $p=0.005$ ). Finally, the independent prognostic significance of both reduced BCL2 and BAX expression, for the treatment response was indicated by multivariate logistic regression analysis, adjusted to the prediction of M2–M3 response (OR 13.84; 95 % CI 2.120–90.32;  $p = 0.006$ ) or positive MRD (OR 14.10; 95 % CI 1.129–176.0; $p = 0.040$ ).

The significance of genes' expression for the survival outcome of patients was further evaluated. Kaplan–Meier curves revealed that lower BCL2 ( $p=0.004$ ), BAX ( $p=0.026$ ) and BCL2L12 ( $p=0.038$ ) expression levels at diagnosis were correlated with significantly shorter Disease Free Survival (DFS) interval, while shorter Cancer Specific Survival (CSS) interval was also found in patients with lower BCL2 ( $p=0.085$ ) and BAX ( $p=0.019$ ) levels at diagnosis. Ch-ALL patients with reduced expression of both BCL2 and BAX at the time of diagnosis suffered from significantly shorter DFS ( $p=0.003$ ) and CSS ( $p=0.043$ ) compared to patients with higher expression levels. Additionally, Cox regression analysis highlighted that ch-ALL patients expressing lower levels of BCL2 (HR: 3.903; 95% CI:1.414-10.77  $p=0.009$ ), BAX (HR: 4.640; 95% CI:1.046-20.57  $p=0.043$ ) BCL2L12 (HR: 3.149; 95% CI:1.002-9.890  $p=0.059$ ), and those with reduced



expression of both BCL2 and BAX (HR: 4.700 95% CI:1.703-12.97 p=0.003) at the onset of the disease, were at stronger risk of disease relapse. Moreover, increased risk of death was found in patients with lower BCL2 (HR: 3.159; 95% CI:0.789-12.64 p=0.104), BAX (HR: 46.99; 95% CI:0.137-16.110 p=0.196) and BCL2L12 (HR: 0.418; 95% CI:0.418-7.322 p=0.444) expression levels at diagnosis and in patients with reduced expression of both BCL2 and BAX (HR: 3.704 95% CI:0.926-14.82 p=0.064).

The expression of BCL2 and BAX was further evaluated in BM specimens obtained on day 33 following induction of BFM protocol. Patients with increased BCL2 (p = 0.018) or BAX (p= 0.040) expression on day 33 were suffering from significantly shorter DFS expectancy, while those with increased BCL2 (p=0.012) showed shorter CSS. On the contrary, ch-ALL patients with higher BCL2L12 levels showed prolonged DFS (p=0.018) and CSS (p=0.195) expectancy. Increased risk of relapse was observed in patients with increased expression of BCL2 (HR: 4.270; 95% CI:1.153-15.81 p=0.030) and BAX (HR: 4.295; 95% CI:0.940-19.63 p=0.060), while increased risk of relapse was seen in patients with reduced levels of BCL2L12 (HR: 5.144; 95% CI:1.126-23.49 p=0.035). Additionally, increased risk of death was correlated with higher expression of BCL2 (HR: 84.78; 95% CI:0.058-122971 p=0.232), BAX (HR: 3.098; 95% CI:0.346-27719 p=0.312) and both increased expression of BCL2 and BAX (HR: 9.198; 95% CI:1.027-92.37 p=0.047) on day 33. Increased risk of death was seen in patients with low expression of BCL2L12 (HR: 3.825; 95% CI:0.427-34.22 p=0.230). Patients with increased expression of both genes showed shorter DFS (p=0.002) and CSS (p=0.015) and increased risk of death (Cox regression analysis, HR: 5.325; 95% CI: 1.598-17.75; p=0.006).

Finally, clinical significance of high BCL2 and BAX levels for disease prognosis was evaluated in patients with favorable markers. As indicated, a shorter DFS expectancy was seen in patients 1–10 years old (p = 0.003) and in patients with < 50.000 WBC/ $\mu$ l (p = 0.015) who displayed increased BCL2 and BAX transcription on day 33. In the same approach, the upregulation of BCL2 and BAX expression was able to indicate the higher risk of short-term relapse of ch-ALL patients with M1 response (<5 % blasts) on day 15 (p = 0.004) as well as for the “standard-and intermediate-risk” patients’ cohort (p = 0.030).

In conclusion, in the present Ph.D. Thesis, novel molecular methodologies were developed and optimized for the evaluation of genes that were studied in children with ALL. 82 BM specimens of patients at diagnosis and 56 of patients on day 33 of treatment

were processed and included in the study. A detailed database of patients' history, clinicopathological features and follow-up data was constructed. The statistical analysis of the total number of tissue specimens highlighted the significant clinical value of the tested biomarkers for the differential diagnosis and accurate prognosis of ALL in children.