



ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ

**Β' ΠΡΟΠΑΙΔΕΥΤΙΚΗ ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΑΘΗΝΩΝ**

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΟ ΓΕΝΙΚΟ ΝΟΣΟΚΟΜΕΙΟ «ΑΤΤΙΚΟΝ»

ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ: ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΓΕΩΡΓΙΟΣ ΔΗΜΗΤΡΙΑΔΗΣ

**ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΜΕΣΟΥ ΜΗΚΟΥΣ ΤΕΛΟΜΕΡΙΔΙΩΝ
ΚΑΙ ΔΡΑΣΤΗΡΙΟΤΗΤΑ ΤΗΣ ΤΕΛΟΜΕΡΑΣΗΣ
ΣΤΑ ΚΥΤΤΑΡΑ ΠΕΡΙΦΕΡΙΚΟΥ ΑΙΜΑΤΟΣ ΑΣΘΕΝΩΝ
ΜΕ Β-ΧΡΟΝΙΑ ΛΕΜΦΙΚΗ ΛΕΥΧΑΙΜΙΑ**

**ΑΡΕΤΗ ΔΑΜ. ΤΣΙΛΙΚΑ
ΙΑΤΡΟΣ ΒΙΟΠΑΘΟΛΟΓΟΣ**

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΑΘΗΝΑ, ΔΕΚΕΜΒΡΙΟΣ 2018



Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή:

- Κωνσταντόπουλος Κωνσταντίνος, Καθηγητής Ιατρικής Σχολής, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών
- Μελέτης Ιωάννης, Καθηγητής Ιατρικής Σχολής, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών
- Δερβενούλας Ιωάννης, Καθηγητής Ιατρικής Σχολής, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών

Επταμελής Εξεταστική Επιτροπή:

- Κωνσταντόπουλος Κωνσταντίνος, Καθηγητής Ιατρικής Σχολής, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών
- Μελέτης Ιωάννης, Καθηγητής Ιατρικής Σχολής, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών
- Δερβενούλας Ιωάννης, Καθηγητής Ιατρικής Σχολής, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών
- Παππά Βασιλική, αναπληρώτρια Καθηγήτρια Ιατρικής Σχολής, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών
- Τσιριγώτης Παναγιώτης, αναπληρωτής Καθηγητής Ιατρικής Σχολής, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών
- Κοντοπίδου Φλώρα, αναπληρώτρια Καθηγήτρια Ιατρικής Σχολής, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών
- Βασιλακόπουλος Θεόδωρος, αναπληρωτής Καθηγητής Ιατρικής Σχολής, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών

**Η έγκριση Διδακτορικής Διατριβής από την Ιατρική σχολή του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνώμων του συγγραφέα.
Οργανισμός του Πανεπιστημίου Αθηνών, άρθρο 202, παρ.2, Νόμος 5343/32**

ΣΤΟΥΣ ΓΟΝΕΙΣ ΜΟΥ
με ευγνωμοσύνη

ΣΤΑ ΠΑΙΔΙΑ ΜΟΥ
Αργυρώ
Γεωργία

ΣΤΑ ΑΔΕΛΦΙΑ ΜΟΥ
Κωνσταντίνο
Αναστάσιο

ΣΤΟΥΣ ΔΑΣΚΑΛΟΥΣ ΜΟΥ

ΑΡΕΤΗ ΔΑΜ. ΤΣΙΛΙΚΑ
ΙΑΤΡΟΣ ΒΙΟΠΑΘΟΛΟΓΟΣ

ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

Γεννήθηκα στην Αθήνα το έτος **1971**.

Περάτωσα Δημοτικό και Γυμνάσιο στην **Ελληνογαλλική Σχολή Μοναχών Ουρσουλινών**.

Συνέχισα το Λύκειο στο **Αρσάκειο Ψυχικού**, απ' όπου απεφοίτησα το 1989 με βαθμό **ΑΡΙΣΤΑ**.

Το ίδιο έτος, μετά από εξετάσεις, άρχισα σπουδές στην Ιατρική Σχολή του Πανεπιστημίου (**Semmelweis University of Medicin**) της Βουδαπέστης (Ουγγαρία) στο Αγγλόφωνο τμήμα.

Το **1991** έλαβα μέρος στις εξετάσεις για μετεγγραφή φοιτητών σε Ελληνικά Πανεπιστήμια από αντίστοιχα του εξωτερικού και πέτυχα την εγγραφή μου στην Ιατρική Σχολή του Πανεπιστημίου Αθηνών με τον βαθμό **Άριστα**, κατείχα δε την πρώτη θέση στη σειρά κατάταξης των επιτυχόντων.

Το **1992**, ως φοιτήτρια του τρίτου έτους της Ιατρικής στο Πανεπιστήμιο Αθηνών, συμμετείχα με άλλους συναδέλφους μου σε έρευνα υπό την καθοδήγηση του Καθηγητού κ. **Ι. Στ. Παπαδόπουλου**, με θέμα:

«Υποδομή αντιμετώπισης **ανοσοκατασταλαμένων** και αρρώστων με **AIDS**, σε 37 Νοσοκομεία της Αττικής. **Θάλαμοι – Προσωπικό – Υλικό – μέτρα Προφύλαξης**»

Η εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο της Πειραματικής Φαρμακολογίας του Πανεπιστημίου Αθηνών και παρουσιάστηκε στο **19^ο Π.Ι.Σ., το Μάιο του 1993**.

Έλαβα το Πτυχίο της Ιατρικής του Πανεπιστημίου Αθηνών τον Ιούλιο του **1995**, με βαθμό **ΛΙΑΝ ΚΑΛΩΣ**.

Ξένες γλώσσες: Αγγλικά και Γαλλικά ικανοποιητικά.

Hobby: ασχολήθηκα αρκετά με το πιάνο.

Οικογενειακή Κατάσταση: Είμαι μητέρα δύο παιδιών ηλικίας 18 και 16 ετών.

Προϋπηρεσία μετά τη λήψη του πτυχίου

Από **30.10.95** έως **31.12.96** υπηρέτησα στο Περιφερειακό Ιατρείο Μεγάλου Χωριού Ευρυτανίας, πραγματοποιώντας έτσι την υποχρεωτική υπηρεσία υπαίθρου.

Στο χρονικό διάστημα αυτό προσέφερα υπηρεσία εκ περιτροπής και στο Γενικό Νομαρχιακό Νοσοκομείο Καρπενησίου, με τα καθήκοντα του γενικού εφημερεύοντος κατά τις απογευματινές και νυχτερινές ώρες, καθώς και στα τακτικά ή έκτακτα εξωτερικά ιατρεία.

Κατά το ίδιο χρονικό διάστημα δίδαξα και εξέτασα τους σπουδαστές της διετούς φοίτησης Μέσης Τεχνικής Επαγγελματικής Νοσηλευτικής Σχολής του Γ.Ν.Ν. Καρπενησίου στα μαθήματα: Παθολογία, Φυσιολογία, Φυματιολογία.

Από **03.01.1997** έως **17.03.2003** εργάστηκα στο Περιφερειακό Γενικό Νοσοκομείο Αθηνών «Ευαγγελισμός» ως ειδικευόμενη Ιατρός στη Βιοπαθολογία, ως εξής:

Από **03.01.1997** έως **02.01.1998** ασκήθηκα ως ειδικευόμενη στην Παθολογία στην Ε΄ Παθολογική κλινική, συμμετείχα στις εφημερίες και στο εκπαιδευτικό πρόγραμμα της κλινικής (μαθήματα παθολογίας, βιβλιογραφική ενημέρωση, συζήτηση περιστατικών).

Από **03.01.1998** έως **02.01.1999** παρακολούθησα τις εργασίες του Αιματολογικού τμήματος και συγκεκριμένα των υποτμημάτων γενικών – ειδικών εξετάσεων, πηκτικολογικού ελέγχου, αιμολυτικού ελέγχου – ηλεκτροφορήσεων αιμοσφαιρίνης, καθώς και τις εργασίες του παρακείμενου Σταθμού Αιμοδοσίας. Επίσης συμμετείχα στα εβδομαδιαία θεωρητικά μαθήματα και τις συναντήσεις βιβλιογραφικής ενημέρωσης.

Από **03.01.1999** μέχρι **02.07.1999** εργάστηκα στο τμήμα Ανοσολογίας – Ιστοσυμβατότητας και ειδικότερα ασκήθηκα στα υποτμήματα Ανοσοχημείας, Αυτοανοσίας, Ανοσοκυτταρολογίας και Ιστοσυμβατότητας, αναλαμβάνοντας υπεύθυνη εργασία, τόσο στην εκμάθηση τεχνικών όσο και στην αξιολόγηση αποτελεσμάτων. Επίσης συμμετείχα στο εκπαιδευτικό πρόγραμμα (μαθήματα ανοσολογίας, βιβλιογραφική ενημέρωση, συζήτηση περιστατικών) καθώς και στις εφημερίες του τμήματος.

Από **03.07.1999** μέχρι **03.11.2001** εκπαιδευτήκα σε όλα τα τμήματα του Μικροβιολογικού εργαστηρίου (Βακτηριολογικό – Ορολογικό – Ελέγχου φυματιώσεως και μυκητιάσεων - Αναερόβιων λοιμώξεων – Ελέγχου νοσοκομειακών λοιμώξεων και Παρασκευαστήριο). Επίσης εκπαιδευτήκα στο τακτικό Εξωτερικό Ιατρείο του νοσοκομείου σε αιμοληψίες και λήψεις διαφόρων κλινικών δειγμάτων, παρακολούθησα τα μετεκπαιδευτικά μαθήματα, τη βιβλιογραφική ενημέρωση και συμμετείχα στις εφημερίες του τμήματος.

Από **04.11.2001** μέχρι **17.03.2003** παρακολούθησα τις εργασίες του Βιοχημικού τμήματος και ειδικότερα στα τμήματα αυτόματης ανάλυσης ρουτίνας, επειγόντων, νεφελομετρίας, καρκινικών δεικτών, επιπέδων φαρμάκων, αναλύσεων ούρων, τόσο σε καθημερινή βάση όσο και σε εφημερία. Παρακολούθησα επί ένα μήνα στο Ορμονολογικό εργαστήριο. Παρακολούθησα επίσης τα πρακτικά και τα θεωρητικά μαθήματα του τμήματος και συμμετείχα στις εφημερίες.

Το Σεπτέμβριο του **2003**, μετά από εξετάσεις, απέκτησα τον τίτλο ειδικότητας της **Ιατρικής Βιοπαθολογίας**.

Από τον Μάρτιο του **2004** ιδιωτεύω στο Χαλάνδρι, έχοντας οργανώσει ένα πλήρως εξοπλισμένο εργαστήριο, με τα πιο σύγχρονα μηχανήματα και μεθόδους ανάλυσης των βιολογικών υγρών.

Ερευνητικό έργο

Από τον Απρίλιο **1997** εργάστηκα στο Εργαστήριο της Β΄ Προπαιδευτικής Παθολογικής Κλινικής του Πανεπιστημίου Αθηνών (Μονάδα Ερεύνης) στη μελέτη «προσδιορισμού του μέσου μήκους τελομεριδίων και τη δραστηριότητα της τελομεράσης σε Β-χρόνια λεμφική λευχαιμία», θέμα το οποίο αποτελεί το αντικείμενο της διδακτορικής μου διατριβής.

Παράλληλα μελέτησα την απόπτωση και το bcl-2, με κυτταρομετρία ροής, στους ίδιους ασθενείς, στο Εργαστήριο Ανοσοκυτταρολογίας του ΠΓΝΑ «Ο ΕΥΑΓΓΕΛΙΣΜΟΣ» θέμα το οποίο επίσης περιλαμβάνεται στη διδακτορική μου διατριβή.

Διπλώματα

Είμαι κάτοχος PROFICIENCY της Αγγλικής γλώσσας και SORBONNE 2 της Γαλλικής.

Ανακοινώσεις σε ελληνικά συνέδρια

1. Γ. Γραμματικάκης, Χ. Ευτυχιάδης, Β. Κεχαγιά, Κλ. Μαυραγάνη, Σ. Μπαρτζιώκης, Β. Πουλάκη, Μ. Σταμούλη, **Α. Τσιλίκια**, Ν. Ταπεινός, Β. Τρομπέτας, Ε. Χαλκιά (Φοιτητές/τριες Ιατρικής) και Ι. Στ. Παπαδόπουλος: «Υποδομή αντιμετώπισης ανοσοκατασταλμένων και αρρώστων με AIDS σε 37 Νοσοκομεία της Αττικής: θάλαμοι – προσωπικό – υλικό – μέτρα προφύλαξης» – **19^ο Πανελλήνιο Ιατρικό Συνέδριο, Αθήνα, Μάιος 1993**.
2. **Α. Τσιλίκια**, Β. Παππά, Γ. Χαλεβελάκης, Τ. Τάφας, Θ. Οικονομόπουλος, Ε. Παπαγεωργίου, Π. Τσιριγώτης, Γ. Μπόλλας, Ι. Δερβενούλας, Μ. Παππά, Σ. Ράπτης: «Προσδιορισμός μέσου μήκους τελομεριδίων κυττάρων περιφερικού αίματος σε Β-χρόνια λεμφική λευχαιμία» - **8^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Κλινικής Ογκολογίας, Αθήνα, 1-3 Απριλίου 1999**.

3. Β. Παππά, **Α. Τσιλίκα**, Θ. Οικονομόπουλος, Τ. Τάφας, Ε. Ψαρρά, Φ. Κοντσιώτη, Ι. Δερβενούλας, Ε. Παπαγεωργίου, Χ. Παπαστεριάδη, Γ. Χαλεβελάκης, Σ. Ράπτης – «Μέσο μήκος τελομεριδίων και δραστηριότητα τελομεράσης στα κύτταρα περιφερικού αίματος ασθενών με Β-χρόνια λεμφική λευχαιμία». **Βραβευθείσα** προφορική ανακοίνωση στο **9^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Κλινικής Ογκολογίας – Λευκωσία, 15-17 Απριλίου 2000.**
4. Ε. Πλατσούκα, Ε. Μπελεσιώτου, Α. Αναστασοπούλου, **Α. Τσιλίκα**, Α. Λάζου, Ο. Πανιάρα: «Βακτηριαίμιες στην τρίτη ηλικία σε τριτοβάθμιο Νοσοκομείο» - **7^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Γεροντολογίας και Γηριατρικής, Αθήνα, Ιανουάριος 2002.**
5. Α. Λάζου, Ε. Μπελεσιώτου, Ε. Πλατσούκα, **Α. Τσιλίκα**, Α. Αναστασοπούλου, Ε. Σατήρη, Ο. Πανιάρα: «Ενδοκαρδίτιδες σε τριτοβάθμιο Νοσοκομείο» - **20^ο Εθνικό Συνέδριο Μικροβιολογίας, Αθήνα, Μάρτιος 2002.**
6. Ε. Μπελεσιώτου, Α. Λάζου, Ε. Πλατσούκα, Κ. Λαδιάς, **Α. Τσιλίκα**, Κ. Πίτσιου, Ο. Πανιάρα: «Καταγραφή Salmonella spp στο αίμα» - **20^ο Εθνικό Συνέδριο Μικροβιολογίας, Αθήνα, Μάρτιος 2002.**

Ανακοινώσεις σε διεθνή συνέδρια

1. **A. Tsilika**, V. Pappa, G. Chalevelakis, T. Tafas, T. Economopoulos, E. Papageorgiou, P. Tsirigotis, J. Dervenoulas, M. Pappa, S. Raptis: “Telomere length in peripheral blood cells from patients with B-cells chronic lymphocytic leukemia (B-CLL)” – **European Haematology Association Congress Barcelona, Spain, June 9-13, 1999.**
2. **A. Tsilika**, V. Pappa, T. Tafas, G. Chalevelakis, F. Kontsioti, E. Psara, T. Economopoulos, E. Papageorgiou, J. Dervenoulas, V. Kapsimali, M. Pappa, S. Raptis: “Mean telomere length and telomerase activity of peripheral blood cells from patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia (B-CLL)” – **American Society of Haematology 41st Annual Meeting, December 3-7, 1999, New Orleans, LA. Blood, 94,10, supplement 1, Nov 15, 1999.**

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1. ΠΡΟΛΟΓΟΣ	_____	1
2. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	_____	3
Πρώτη Ενότητα: Χρόνια Λεμφοκυτταρική Λευχαιμία	_____	5
Κεφάλαιο I: Ιστορική αναδρομή - Αιτιολογία - Επιδημιολογία	_____	7
Κεφάλαιο II: Βιολογία Χρόνιας Λεμφοκυτταρικής Λευχαιμίας	_____	11
Κεφάλαιο III: Βλάβες του Γενετικού Υλικού	_____	31
Κεφάλαιο IV: Κλινική εικόνα - Εργαστηριακά Ευρήματα, Ιστολογικά Ευρήματα	_____	43
Κεφάλαιο V: Ανοσοανεπάρκεια - Μονοκλωνική Γαμμαπάθεια - Αυτοάνοσες Εκδηλώσεις	_____	49
Κεφάλαιο VI: Διαγνωστικά Κριτήρια - Κυτταρομορφολογικά Ευρήματα - Ανοσοφαινοτυπικά Ευρήματα - Σύστημα Βαθμολόγησης	_____	53
Κεφάλαιο VII: Διαφορική Διάγνωση - Σταδιοποίηση	_____	61
Κεφάλαιο VIII: Μονοκλωνική Λεμφοκυττάρωση Αγνώστου Σημασίας - Smoldering Χρόνια Λεμφοκυτταρική Λευχαιμία - Μεταμόρφωση της Νόσου - Άλλες Κακοήθειες - Αυτόματος Υφεση	_____	69
Κεφάλαιο IX: Προγνωστικοί Παράγοντες - Θεραπεία	_____	75
Δεύτερη Ενότητα:	_____	85
I. Κυτταρικός Κύκλος	_____	87
II. Τελομεράση - Τελομερίδια	_____	106
3. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	_____	113
Σκοπός της Μελέτης	_____	115
Ένθετο	_____	117
Υλικό της Μελέτης	_____	119
Οι Παράμετροι που Μελετήθηκαν είναι οι Ακόλουθες	_____	120
Πίνακας Α	_____	121
Μεθοδολογία	_____	126
Στατιστική Ανάλυση Αποτελεσμάτων	_____	153
Συζήτηση	_____	171
Περίληψη	_____	183
Summary	_____	185
4. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	_____	187

1. ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η Β-Χρόνια Λεμφοκυτταρική Λευχαιμία (Χ.Λ.Λ.) είναι νεοπλασματικό νόσημα του λεμφικού ιστού, το οποίο προσβάλλει άτομα μέσης και μεγάλης ηλικίας. Εντατικές έρευνες τα τελευταία 25 χρόνια έχουν αναδείξει την ετερογένεια της νόσου, τόσο σε κλινικό όσο και σε μοριακό επίπεδο. Οι σημαντικές εξελίξεις στον τομέα της μοριακής Βιολογίας είχαν σαν αποτέλεσμα την αντίστοιχη πρόοδο στην κατανόηση της παθογένειας της ΧΛΛ. Οι σύγχρονες ερευνητικές προσπάθειες στοχεύουν στην αποκωδικοποίηση των μοριακών μηχανισμών που οδηγούν στη λευχαιμική εξαλλαγή, με την προσδοκία να δώσουν γένεση σε νέες και πιο αποτελεσματικές θεραπευτικές προσεγγίσεις.

Σκοπός της παρούσης εργασίας είναι ο προσδιορισμός του μέσου μήκους τελομεριδίων και η δραστηριότητα της τελομεράσης στα κύτταρα περιφερικού αίματος ασθενών με Χ.Λ.Λ.

Η μελέτη εκπονήθηκε στο Εργαστήριο της Μοριακής Βιολογίας της μονάδας Έρευνας της Β΄ Προπαιδευτικής Παθολογικής Κλινικής του Πανεπιστημίου Αθηνών του νοσοκομείου Ευαγγελισμός, υπό την διεύθυνση του αείμνηστο Καθηγητή Σωτηρίου Ράπη και την εποπτεία της Αναπληρώτριας Καθηγήτριας Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Αθηνών, κας Βασιλικής Παππά.

Ευχαριστίες οφείλω στον αείμνηστο Καθηγητή Σωτήριο Ράπη για τη δυνατότητα που μου παρείχε, αλλά και για το ενδιαφέρον με το οποίο με περιέβαλε σε όλη τη διάρκεια της εξέλιξης της διδακτορικής μου διατριβής.

Επίσης αισθάνομαι την ανάγκη να ευχαριστήσω ιδιαίτερος τον αναπληρωτή καθηγητή κ. Γεώργιο Χαλεβελάκη, που με παρότρυνε και με ενθάρρυνε σε αυτό το εγχείρημα.

Η κυρία Βασιλική Παππά, Αιματολόγος Αναπληρώτρια Καθηγήτρια της Β΄ Προπαιδευτικής Παθολογικής Κλινικής του Πανεπιστημίου Αθηνών, μου υπέδειξε το θέμα και ήταν η

επιβλέπουσα της διατριβής μου σε όλα τα στάδια. Με περίσσεια υπομονή με βοήθησε να εξοικειωθώ στο χώρο της έρευνας και της Μοριακής Βιολογίας. Με συμβούλευε στα πρώτα μου βήματα, παρακολούθησε από την αρχή μέχρι το τέλος την πορεία και πρόοδο της μελέτης. Στάθηκε δίπλα μου, αφιερώνοντας πολύ χρόνο και παρέχοντάς μου απλόχερα γνώσεις και εμπειρία. Με έμαθε πολλά, με καθοδήγησε στη συμμετοχή μου με ανακοινώσεις ή άρθρα σε ελληνικά και διεθνή συνέδρια και περιοδικά. Ευχαριστώ θερμά την κυρία Βασιλική Παππά, χωρίς την πολύτιμη αρωγή της η παρούσα διατριβή δεν θα είχε ολοκληρωθεί. Της είμαι ευγνώμων για τη συνεχή της συμπαράσταση.

Άπειρες ευχαριστίες οφείλω στην κυρία Χρύσα Παπαστεριάδη, Βιοπαθολόγο Διευθύντρια του ανοσολογικού τμήματος του Νοσοκομείου Ευαγγελισμού, στην κυρία Βιολέττα Κασιμάλη, Βιοπαθολόγο, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Αθηνών, στην κυρία Φρίντα Κοντσιώτη, Βιοχημικό, για την προθυμία με την οποία προσέφεραν την ουσιαστική βοήθειά τους στη δική μου προσπάθεια.

Ευχαριστώ το προσωπικό της μονάδας έρευνας και του ανοσολογικού τμήματος του Νοσοκομείου, για την όποια βοήθεια μου παρείχαν.

Σας ευχαριστώ πραγματικά όλους και ήταν τιμή μου που συνεργάστηκα μαζί σας.

Τέλος, οφείλω ιδιαίτερη ευγνωμοσύνη στους γονείς μου και την οικογένειά μου, που πάντα με προέτρεπαν να θέτω υψηλούς στόχους και με στηρίζουν με αμέριστη αγάπη και κατανόηση.

2. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΠΡΩΤΗ ΕΝΟΤΗΤΑ

B - ΧΡΟΝΙΑ ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΛΕΥΧΑΙΜΙΑ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ Ι

ΙΣΤΟΡΙΚΗ ΑΝΑΔΡΟΜΗ - ΑΙΤΙΟΛΟΓΙΑ - ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η Β-χρόνια λεμφοκυτταρική λευχαιμία (Β-ΧΛΛ) (στη συνέχεια θα αναφέρεται ως ΧΛΛ) είναι νεοπλασματικό νόσημα του λεμφικού ιστού. Η νόσος χαρακτηρίζεται από την παρουσία και την συνεχή ανάπτυξη ενός κλώνου από μικρά-ώριμα λεμφοκύτταρα. Στην συντριπτική πλειοψηφία των περιπτώσεων τα λευχαιμικά κύτταρα είναι **Β-λεμφοκύτταρα** (>95%). Στα αρχικά στάδια της νόσου τα νεοπλασματικά κύτταρα αποικίζουν τον μυελό και το περιφερικό αίμα, ενώ σε πιο προχωρημένα στάδια ο νεοπλασματικός ιστός διηθεί τους λεμφαδένες, το ήπαρ και τον σπλήνα. Το τελικό στάδιο χαρακτηρίζεται από πολύ μεγάλη αύξηση του φορτίου της νόσου και συνοδεύεται από μυελική ανεπάρκεια, καθώς και από σημαντική έκπτωση της ανοσιακής ικανότητας του πάσχοντος³³⁹.

ΙΣΤΟΡΙΚΗ ΑΝΑΔΡΟΜΗ

Ο όρος λευχαιμία εισήχθη για πρώτη φορά το 1845 από τον Virchow⁽²⁶²⁾ και χρησιμοποιήθηκε για να περιγράψει κακοήθη αιματολογικά νοσήματα, που χαρακτηρίζονταν από την άθροιση των νεοπλασματικών κυττάρων στο περιφερικό αίμα των ασθενών⁽²⁶³⁾.

Η διάκριση ανάμεσα σε μυελικές και λεμφικές λευχαιμίες κατέστη δυνατή το 1903 από τους Turk et al, με την εισαγωγή των κυτταρικών χρώσεων και την ανάπτυξη της ικανότητας της χρήσης του οπτικού μικροσκοπίου⁽²⁵⁸⁾.

Η επίσημη περιγραφή της Χρόνιας Λεμφοκυτταρικής Λευχαιμίας, σαν μία ξεχωριστή κλινική οντότητα όπως είναι γνωστή σήμερα, έγινε το 1924 από τους Minot και Isaacs. Οι ίδιοι ερευνητές εφάρμοσαν για πρώτη φορά την ακτινοβολία σαν θεραπευτική μέθοδο σε ασθενείς με ΧΛΛ⁽¹⁷¹⁾.

Η πρώτη σημαντική επιτυχία στην θεραπευτική αντιμετώπιση της νόσου κατέστη εφικτή με την εισαγωγή της χημειοθεραπείας με την φαρμακευτική ουσία χλωραμβουκίλη, το 1955, από τους Galton et al⁽⁹⁰⁾.

Στην δεκαετία του 1970 έγινε δυνατή η κλινική σταδιοποίηση της νόσου. Αναπτύχθηκαν δύο ξεχωριστά σταδιοποιητικά συστήματα, με σημαντικές όμως ομοιότητες μεταξύ τους,

αυτά των Rai (1975) και Binet (1977). Τα δύο αυτά συστήματα εξακολουθούν να χρησιμοποιούνται από τους κλινικούς ιατρούς, ακόμα και σήμερα^(16, 217).

Τις επόμενες δεκαετίες 1980-2000, σαν αποτέλεσμα των τεχνολογικών εξελίξεων αλλά και της ανάπτυξης επιστημών, όπως η βιοχημεία, η μοριακή βιολογία κλπ, έγινε δυνατή η μελέτη της βιολογίας της νόσου. Η προσπάθεια αυτή συνεχίζεται μέχρι και σήμερα και σημαντικές εξελίξεις, όσον αφορά την κατανόηση των παθογενετικών μηχανισμών του νοσήματος, έγιναν πραγματικότητα. Επίσης, στο ανωτέρω χρονικό διάστημα, νέες θεραπευτικές δυνατότητες εμφανίστηκαν στο προσκήνιο (ανάλογα πουργινών, μονοκλωνικά αντισώματα, μεταμόσχευση αιμοποιητικών κυττάρων, κλπ).

Παρά τις αναφερθείσες σημαντικές εξελίξεις είναι σαφές ότι η επιστημονική κοινότητα έχει ακόμα να διανύσει μεγάλη απόσταση μέχρι την οριστική λύση του αινίγματος της ΧΛΛ. Η ουσιαστική αποσαφήνιση της μοριακής βιολογίας της νόσου αναμένεται να δώσει γένεση σε νέες και πιο ορθολογικές θεραπευτικές προσεγγίσεις.

ΑΙΤΙΟΛΟΓΙΑ

Η αιτιολογία της ΧΛΛ είναι ουσιαστικά άγνωστη. Είναι, ίσως, η μοναδική λευχαιμία ενηλίκων που δεν συσχετίζεται με έκθεση σε ιονίζουσα ακτινοβολία. Από επιδημιολογικές μελέτες σε πληθυσμούς που εκτέθηκαν σε ακτινοβολία, όπως στην περίπτωση των πόλεων Χιροσίμα και Ναγκαασάκι της Ιαπωνίας, δεν διαπιστώθηκε αυξημένη επίπτωση της νόσου⁽⁷⁴⁾.

Επίσης δεν υπάρχει σαφής επιδημιολογική συσχέτιση με έκθεση σε συγκεκριμένους χημικούς παράγοντες, όπως π.χ. το βενζόλιο⁽⁴⁾. Έχουν περιστασιακά ανακοινωθεί επιδημιολογικές μελέτες που εμφανίζουν συσχέτιση του νοσήματος με ορισμένες επαγγελματικές ομάδες: όπως π.χ. εργαζόμενοι σε βιομηχανίες ελαστικών⁽⁵³⁾, πετρελαίου⁽¹⁵⁾, αγρότες⁽¹⁷⁾ κλπ. Σε όλες, όμως, αυτές τις μελέτες η στατιστική συσχέτιση ήταν ασθενής και, επιπλέον, τα συμπεράσματά τους δεν επιβεβαιώθηκαν από μεταγενέστερες επιδημιολογικές έρευνες.

Σχετικά πρόσφατες εργασίες καταδεικνύουν στατιστική συσχέτιση μεταξύ χρήσης καπνού και ανάπτυξης, τόσο μυελικών όσο και λεμφικών λευχαιμιών⁽⁹¹⁾.

Σε αντίθεση με άλλες μορφές λευχαιμίας ενηλίκων φαίνεται ότι υπάρχει κάποιας μορφής κληρονομική προδιάθεση στην εμφάνιση ΧΛΛ. Η ανωτέρω υπόθεση επιβεβαιώνεται από το γεγονός ότι συγγενείς πρώτου βαθμού ασθενών με ΧΛΛ παρουσιάζουν αυξημένη πιθανότητα εμφάνισης της νόσου⁽²⁸¹⁾. Επίσης, ιδιαίτερα αυξημένη πιθανότητα νόσου εμφανί-

ζεται και σε μονοωογενείς διδύμους όταν, βέβαια, ο ένας εκ των δύο έχει ήδη νοσήσει⁽⁴⁵⁾. Επίσης, στην βιβλιογραφία αναφέρονται και αρκετές περιπτώσεις οικογενών μορφών του νοσήματος. Οικογενείς μορφές χαρακτηρίζονται οι περιπτώσεις εκείνες κατά τις οποίες περισσότερα των δύο προσβεβλημένων ατόμων εμφανίζονται εντός του ιδίου οικογενειακού δένδρου⁽¹⁰⁰⁾. Οι ασθενείς αυτοί βρέθηκε ότι συνήθως παρουσιάζουν ίδιους απλότυπους HLA, ταυτόσημες κυτταρογενετικές βλάβες, καθώς και ομοιόμορφη κλινική πορεία⁽¹⁴⁹⁾. Σε όσες οικογένειες μελετήθηκαν μέχρι σήμερα δεν έχουν βρεθεί γενετικές βλάβες ή διαταραχές γονιδίων που να ερμηνεύουν ή να συσχετίζονται με την εμφάνιση της νόσου. Στις αναφερόμενες οικογενείς μορφές παρατηρείται το φαινόμενο της «προσμονής» (anticipation). Το φαινόμενο χαρακτηρίζεται από την τάση να εμφανίζεται η νόσος στις επόμενες γενεές σε όλο και πιο μικρότερες ηλικίες⁽²⁷⁵⁾.

Εάν υπάρχουν γονίδια που να προδιαθέτουν στην εμφάνιση ΧΛΛ, τότε αυτά δεν θα πρέπει να αφορούν το σύστημα των HLA, αφού δεν έχει διαπιστωθεί αυξημένη επίπτωση συγκεκριμένων HLA αντιγόνων μεταξύ των ασθενών με ΧΛΛ⁽¹⁵⁰⁾.

Επίσης, θα πρέπει να τονισθεί ότι μέχρι σήμερα δεν έχει διπιστωθεί επιδημιολογική ή αιτιοπαθογενετική συσχέτιση της νόσου με κάποιον εκ των γνωστών ιών.

ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ

Η ΧΛΛ είναι κυρίως νόσος ατόμων μεγάλης ηλικίας. Η μέση ηλικία εμφάνισης της νόσου είναι τα 65 έτη. Μόνον το 10% επί του συνόλου των ασθενών νοσοούν πριν την ηλικία των 50 ετών, ενώ μόνο στο 1% του συνόλου η νόσος πρωτοεμφανίζεται πριν την ηλικία των 40 ετών. Πρακτικώς, η νόσος είναι άγνωστη επί των παιδιών και των εφήβων.

Η ΧΛΛ εμφανίζει προτίμηση για το ανδρικό φύλο και η οποία αυξάνει από 5:3 σε 5:1 με την σταδιακή αύξηση της ηλικίας^(56, 151).

Εχει διατυπωθεί το ερώτημα αν η ΧΛΛ, η οποία εμφανίζεται επί σχετικά νεαρών ηλικιακών ομάδων, έχει διαφορετική βιολογική συμπεριφορά από την αντίστοιχη νόσο των μεγαλύτερων ηλικιών. Παρά το γεγονός ότι αρχικές μελέτες εμφάνιζαν αυξημένη συχνότητα συνδρόμου Richter σε νέους ασθενείς και, επομένως, υπαινισσόταν επιθετικότερη κλινική συμπεριφορά της νόσου, σήμερα φαίνεται πιθανότερο ότι δεν υπάρχουν ουσιώδεις διαφορές όσον αφορά την κλινική πορεία της ΧΛΛ, μεταξύ των δύο ηλικιακών ομάδων. Το γεγονός ότι νέοι ασθενείς παρουσιάζουν αυξημένη πιθανότητα να καταλήξουν από αιτία σχετιζόμενη με την ίδια τη νόσο, θα πρέπει μάλλον να αποδοθεί στο νεαρό της ηλικίας τους^(48, 163, 176).

Η συχνότητα της ΧΛΛ διαφέρει σημαντικά μεταξύ διαφορετικών χωρών και φυλετικών ομάδων. Είναι νόσος που αφορά κυρίως τους Καυκάσιους πληθυσμούς. Αντίθετα, η νόσος είναι σπάνια σε Ασιατικούς πληθυσμούς⁽⁷⁵⁾.

Η υψηλότερη συχνότητα του νοσήματος αναφέρεται στην Αυστραλία και τον Καναδά. Η ετήσια επίπτωση στον πληθυσμό των ΗΠΑ είναι 50 νέες περιπτώσεις ανά 100.000 άτομα άνω των 65 ετών. Υπολογίζεται ότι κάθε έτος εμφανίζονται 7.000 νέες περιπτώσεις, ενώ 4.500 εκ των ετήσιων θανάτων αποδίδονται στην ΧΛΛ. Από επιδημιολογικές έρευνες στην ίδια χώρα φαίνεται ότι η νόσος εμφανίζει ιδιαίτερα υψηλή συχνότητα μεταξύ ατόμων λευκής και μαύρης φυλής ενώ, αντίθετα, η συχνότητα είναι πολύ μικρότερη σε άτομα Ισπανικής καταγωγής. Εξαιρετικού ενδιαφέροντος είναι, επίσης, το γεγονός ότι η νόσος είναι σπάνια μεταξύ ατόμων Ασιατικής καταγωγής που διαβιούν από μακρού στις ΗΠΑ, υποδηλώνοντας έτσι την συμμετοχή γενετικών παρά περιβαλλοντικών παραγόντων στην πρόκληση της νόσου⁽⁷⁵⁾.

Η αναφερόμενη σταδιακή αύξηση της εμφάνισης της ΧΛΛ την τελευταία 50ετία οφείλεται μάλλον στην αυξημένη παροχή ιατρικών υπηρεσιών και, κατά συνέπεια, πιο πρόωμη διάγνωση παρά σε ουσιαστική αύξηση της συχνότητας της νόσου.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΙΙ

ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΤΗΣ ΧΡΟΝΙΑΣ ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΛΕΥΧΑΙΜΙΑΣ

ΠΡΟΕΛΕΥΣΗ ΤΟΥ ΛΕΥΧΑΙΜΙΚΟΥ ΚΥΤΤΑΡΟΥ

Η ακριβής προέλευση, καθώς και το επίπεδο διαφοροποίησης του Β-λεμφοκυττάρου, του οποίου η εκτροπή οδηγεί στην γένεση της ΧΛΛ, δεν είναι επακριβώς καθορισμένη. Παρακάτω παρατίθενται στοιχεία που αφορούν την προσπάθεια ταυτοποίησης του νεοπλασματικού κυττάρου.

Το λευχαιμικό λεμφοκύτταρο της ΧΛΛ παρουσιάζει τα ακόλουθα χαρακτηριστικά:

1. Στην συντριπτική πλειοψηφία των περιπτώσεων εκφράζει στην επιφάνειά του το αντιγόνο CD5. Ακόμα και στις λίγες εκείνες περιπτώσεις που δεν διαπιστώνεται έκφραση του CD5 στην επιφάνεια του κυττάρου, υπάρχει πάντοτε mRNA του CD5 στο κυτταρόπλασμα⁽³²⁾. Όπως ήταν γνωστό μέχρι σήμερα, η έκφραση του CD5 χωρίζει τα Β-κύτταρα σε δύο υποκατηγορίες: στα Β1 κύτταρα (CD5+) και στα Β2 κύτταρα (CD5-). Σήμερα πλέον είναι αποδεκτό ότι η έκφραση του CD5 μόνον δεν αρκεί για τον διαχωρισμό των Β-κυττάρων, αφού είναι γνωστό ότι και τα Β2 κύτταρα είναι δυνατό, με την δράση διάφορων ερεθισμάτων, να εκφράσουν στην επιφάνειά τους το αντιγόνο CD5^(120, 273).
2. Το λευχαιμικό κύτταρο εκφράζει στην επιφάνειά του πολύ μικρή ποσότητα ανοσοσφαιρίνης, η οποία είναι συνήθως τάξεως IgM±IgD. Σε πολύ σπάνιες περιπτώσεις είναι δυνατόν η ανοσοσφαιρίνη επιφανείας να είναι τάξης IgG ή IgA. Τόσο μικρή ποσότητα ανοσοσφαιρίνης επιφανείας, υπό φυσιολογικές συνθήκες, παρατηρείται μόνο σε Β-κύτταρα που έχουν καταστεί ανεργικά μέσω της διαδικασίας της ανοσοανοχής⁽³⁰⁾.
3. Στις περισσότερες εκ των μελετηθεισών περιπτώσεων, η μονοκλωνική ανοσοσφαιρίνη της επιφανείας του λευχαιμικού κυττάρου παρουσιάζει δραστηριότητα αυτοαντισώματος και συχνά συμπεριφέρεται σαν ρευματοειδής παράγοντας. Η αντισωματική ειδικότητα είναι χαμηλής συγγένειας έναντι μιας ποικιλίας αυτόλογων αντιγόνων. Επίσης, η μονοκλωνική ανοσοσφαιρίνη παρουσιάζει αντισωματική ειδικότητα έναντι πολυσακχαριδικών και λιποσακχαριδικών αντιγόνων βακτηριακής προέλευσης. Αντίστοιχα φαινοτυπικά γνωρίσματα χαρακτηρίζουν την κατηγορία των Β1-κυττάρων^(30, 71, 273).

4. Το λευχαιμικό κύτταρο εκφράζει στην επιφάνειά του αντιγόνα μυελομονοκυτταρικής προέλευσης (CD11/CD18). Αντίστοιχοι δείκτες εκφράζονται υπό φυσιολογικές συνθήκες μόνον επί της επιφανείας των Β1-κυττάρων^(178, 273).
5. Έχει διαπιστωθεί, από πειραματικά δεδομένα, ότι κατά την αναδιάταξη των γόνων των βαρέων αλύσεων του λευχαιμικού κυττάρου χρησιμοποιείται περιορισμένος αριθμός τμημάτων των V-γονιδίων (skewed usage). Πολύ συχνά, στις αναδιατάξεις περιλαμβάνεται το τμήμα V1-69 (51p1), το οποίο προσδίδει στην προκύπτουσα ανοσοσφαιρίνη ιδιότητα ρευματοειδούς παράγοντα^(19, 71).

Τα ανωτέρω φαινοτυπικά γνωρίσματα αποτελούν, κατά κάποιον τρόπο, την ταυτότητα του λευχαιμικού κυττάρου της ΧΛΛ, αφού δεν παρατηρούνται σε καμία εκ των υπολοίπων κακοηθειών του λεμφικού συστήματος. Αντίστοιχα χαρακτηριστικά παρατηρούνται υπό φυσιολογικές συνθήκες σε Β1-τάξης CD5+ λεμφοκύτταρα, που εδράζουν επί της ζώνης του μανδύα των δευτερογενών λεμφοζιδίων (mantle zone)⁽³⁰⁾.

Από τον συνδυασμό των προηγούμενων παρατηρήσεων, προκύπτει το συμπέρασμα ότι το φυσιολογικό αντίστοιχο του λευχαιμικού κυττάρου της ΧΛΛ ανήκει σε έναν υποπληθυσμό ανεργικών, αυτοαντιδραστικών CD5+ Β-λεμφοκυττάρων της ζώνης του μανδύα.

ΧΡΟΝΙΑ ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΑΝΑΙΜΙΑ. ΕΝΑ Ή ΔΥΟ ΝΟΣΗΜΑΤΑ;

Η ανίχνευση για την ύπαρξη μεταλλάξεων στους γόνους των V-τμημάτων των ανοσοσφαιρινών σε ασθενείς με ΧΛΛ, είχε σαν αποτέλεσμα την δημιουργία νέων ερωτημάτων και περιέπλεξε ακόμα περισσότερο την προηγούμενη θεωρία για την προέλευση του λευχαιμικού κυττάρου.

Τα αντιδρώντα σε διαλυτά πρωτεϊνικά αντιγόνα Β-λεμφοκύτταρα, μέσω της συμμετοχής των CD4+ T-helper κυττάρων, σχηματίζουν τα βλαστικά κέντρα (germinal centers) των δευτερογενών λεμφοζιδίων. Κατά την διαδικασία αυτή, τα αντιδρώντα Β-κύτταρα υφίστανται σωματικές μεταλλάξεις στους γόνους των V-τμημάτων των ανοσοσφαιρινών. Οι μεταλλάξεις αυτές έχουν σαν συνέπεια την μεταβολή της αντισωματικής ειδικότητας. Τα βλαστικά κέντρα χαρακτηρίζονται επίσης από την άφθονη παρουσία ειδικής κατηγορίας δένδριτικών κυττάρων, των Follicular Dendritic Cells (FDC). Τα FDC παρουσιάζουν στην επιφάνειά τους το υπεύθυνο για την ανοσιακή απάντηση αντιγόνο, υπό την μορφή ανοσοσυμπλεγμάτων. Η ουσιαστική λειτουργία των FDC είναι η παρουσίαση του αντιγόνου στους παραγόμενους Β-λεμφοκυτταρικούς κλώνους. Όσα εκ των Β-κυττάρων, που έχουν υποστεί σωματικές μεταλλάξεις και που κατά τυχαίο τρόπο οδηγούν σε παραγωγή αντι-

σώματος με μεγαλύτερη ειδικότητα προς το υπεύθυνο αντιγόνο, επιβιώνουν. Αντίθετα, Β-κυτταρικοί κλώνοι που παράγουν ανοσοσφαιρίνη χαμηλής συγγένειας προς το υπεύθυνο αντιγόνο, οδηγούνται σε απόπτωση. Μέσα από την διαδικασία της δημιουργίας των βλαστικών κέντρων, το ανοσολογικό σύστημα καθιστά την ανοσιακή απάντηση αποτελεσματικότερη, μέσω της παραγωγής αντισωμάτων υψηλής συγγένειας προς το αντιγόνο.

Το ανωτέρω φαινόμενο ονομάζεται αγγλιστί “affinity maturation”. Τα προκύπτοντα μέσα από την διαδικασία αυτή Β-λεμφοκύτταρα έχουν την δυνατότητα διαφοροποίησης προς δύο κατευθύνσεις: **1)** Διαφοροποίηση προς μνημονικά κύτταρα (memory cells) και **2)** Διαφοροποίηση προς μακράς επιβίωσης πλασματοκύτταρα⁽¹⁾.

Η ανίχνευση, επομένως, σωματικών μεταλλάξεων των V-γόνων των ανοσοσφαιρινών (VH-mutated cells), υποδηλώνει εμμέσως ότι ο υπό μελέτη Β-λεμφοκυτταρικός πληθυσμός αποτελείται από κύτταρα τα οποία έχουν έρθει ήδη σε επαφή με αντιγόνο (experienced cells) και τα οποία έχουν ήδη διέλθει μέσα από την διαδικασία δημιουργίας βλαστικών κέντρων (post-germinal). Αντίθετα, η απουσία σωματικών μεταλλάξεων (VH-unmutated cells), υποδηλώνει δύο διαφορετικές καταστάσεις: **α)** τα υπό μελέτη κύτταρα είναι παρθένα (naive) δεν έχουν έρθει, δηλαδή, σε επαφή με αντιγόνο ή **β)** τα υπό μελέτη κύτταρα έχουν έρθει σε επαφή με αντιγόνο (experienced cells) αλλά είναι γενετικώς προορισμένα να δώσουν γένεση σε θυμοανεξάρτητες ανοσιακές απαντήσεις (T-independent) και, επομένως, δεν έχουν διέλθει μέσα από την δημιουργία βλαστικών κέντρων⁽¹⁵⁵⁾.

Μελέτες για την ανίχνευση σωματικών μεταλλάξεων (VH-mutation) σε ασθενείς με ΧΛΛ έδωσαν ενδιαφέροντα αποτελέσματα. Από τις δημοσιευμένες εργασίες προκύπτει ότι στις μισές περίπου των περιπτώσεων με ΧΛΛ ανιχνεύονται μεταλλάξεις των VH-τμημάτων των γόνων των ανοσοσφαιρινών. Οι παρατηρήσεις αυτές οδηγούν αναγκαστικά στο συμπέρασμα ότι υπάρχουν δύο υποκατηγορίες ΧΛΛ^(46, 104).

1. Στην πρώτη κατηγορία (VH-mutated), η λευχαιμική εκτροπή έχει επισυμβεί σε CD5+ Β-κύτταρο μεταλεμφοζιδιακής προέλευσης (post-germinal origin)
2. Στην δεύτερη κατηγορία (VH-unmutated), η λευχαιμική εκτροπή αφορά σε CD5+ Β-κύτταρο προλεμφοζιδιακής προέλευσης (pre-germinal origin).

Η προηγούμενη θεώρηση, της ύπαρξης δηλαδή δύο υποκατηγοριών ΧΛΛ, ανάλογα με την ύπαρξη ή όχι σωματικών μεταλλάξεων των V-τμημάτων των γόνων των ανοσοσφαιρινών, καθίσταται ιδιαίτερος ισχυρή από τις παρακάτω παρατηρήσεις:

1. Οι δύο υποκατηγορίες διαφέρουν μεταξύ τους, τόσο όσον αφορά τα κλινικά χαρακτηριστικά και την επιβίωση αλλά και στις υπάρχουσες κυτταρογενετικές βλάβες. Συγκε-

κριμένα, οι VH-mutated περιπτώσεις παρουσιάζουν καλοήγη κλινική πορεία, με αργή εξέλιξη και μακρά επιβίωση. Αντίθετα, οι VH-unmutated παρουσιάζουν ταχεία πρόοδο νόσου και στατιστικά μικρότερη επιβίωση. Επιπλέον, στις VH-mutated περιπτώσεις επιπολάζουν οι ευνοϊκής πρόγνωσης κυτταρογενετικές ανωμαλίες, σε αντίθεση με την άλλη υποκατηγορία ασθενών. Η παρουσία των σωματικών μεταλλάξεων διατηρεί την προγνωστική της αξία, τόσο για περιπτώσεις ασθενών με νόσο πρώιμων σταδίων αλλά και για ασθενείς με προχωρημένη νόσο^(105, 137, 193).

2. Η παρουσία των σωματικών μεταλλάξεων αποτελεί πρωταρχικό γεγονός, το οποίο προηγείται της λευχαιμικής εκτροπής. Μέχρι στιγμής δεν έχει ανακοινωθεί περίπτωση ασθενούς στον οποίο να εμφανίστηκαν ή, αντίθετα, να εξαφανίστηκαν οι μεταλλάξεις κατά την διαδρομή της νόσου.

ΤΟ ΦΑΙΝΟΜΕΝΟ ΤΗΣ ΑΠΟΠΤΩΣΗΣ ΚΑΙ Η ΧΡΟΝΙΑ ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΛΕΥΧΑΙΜΙΑ

Τα λευχαιμικά κύτταρα ασθενών με ΧΛΛ παρουσιάζουν πολύ χαμηλό ρυθμό πολλαπλασιασμού. Θετικότητα στον δείκτη κυτταρικού πολλαπλασιασμού Κί67 παρατηρείται μόνο σε ποσοστό 1%-2% επί του συνόλου των κυττάρων. Ανάλογα ποσοστά παρατηρούνται και επί των φυσιολογικών λεμφοκυττάρων του περιφερικού αίματος. Το αναφερόμενο ποσοστό είναι στην πραγματικότητα ακόμα μικρότερο, αν αναλογιστούμε ότι η θετικότητα για τον δείκτη Κί67 δεν αφορά μόνο τα λευχαιμικά κύτταρα αλλά και φυσιολογικά Τ-λεμφοκύτταρα, που βρίσκονται στον μυελό και στο περιφερικό αίμα ασθενών με ΧΛΛ⁽³⁴⁾. Είναι, λοιπόν, προφανές ότι η σταδιακή άθροιση των λευχαιμικών κυττάρων δεν είναι προϊόν αυξημένου ρυθμού πολλαπλασιασμού αλλά είναι, κυρίως, αποτέλεσμα της μακράς επιβίωσης των, που οφείλεται στην αναστολή της φυσιολογικής διαδικασίας της αποπτώσεως⁽³¹⁾.

Η βιολογική διαδικασία της απόπτωσης μελετάται επισταμένα σε περιπτώσεις ασθενών με ΧΛΛ αφού, όπως είναι προφανές, διαδραματίζει γενεσιουργό ρόλο στην παθογένεια του εν λόγω νοσήματος. Η οικογένεια των μορίων Bcl-2 αποτελείται από πρωτεΐνες, των οποίων η κύρια δράση είναι η ρύθμιση της απόπτωσης⁽²⁷⁴⁾. Τα αποτελέσματα των μελετών σχετικά με την οικογένεια των μορίων Bcl-2 σε ασθενείς με ΧΛΛ συνοψίζονται περιληπτικά παρακάτω:

1. Η πρωτεΐνη Bcl-2, η οποία αποτελεί τον πλέον γνωστό αναστολέα της απόπτωσης, υπερεκφράζεται στα λευχαιμικά κύτταρα^(109, 238).

2. Η πρωτεΐνη Bax, της οποίας ο ρόλος είναι αυτός της επαγωγής του φαινομένου της απόπτωσης, επίσης έχει διαπιστωθεί ότι υπερεκφράζεται στα λευχαιμικά κύτταρα^(109, 238).
3. Η πρωτεΐνη Bcl-XL, η οποία αποτελεί συμπαράγοντα της πρωτεΐνης Bcl-2, επίσης υπερεκφράζεται στα λευχαιμικά κύτταρα^(109, 238).
4. Η πρωτεΐνη Bcl-XS, η κύρια δράση της οποίας είναι η αναστολή της λειτουργίας της πρωτεΐνης Bcl-2, εδράζεται σε πολύ χαμηλά ποσοστά επί των λευχαιμικών κυττάρων⁽⁹⁷⁾.

Λαμβάνοντας υπόψη τα πειραματικά δεδομένα σχετικά με τις πρωτεΐνες της ομάδας Bcl-2, διαπιστώνουμε ότι η συνολική έκφραση των ανωτέρω πρωτεϊνών ευνοεί τελικά την αναστολή της απόπτωσης^(31, 97).

Δεν είναι, μέχρι σήμερα, γνωστός ο μηχανισμός ο οποίος ευθύνεται για την υπερέκφραση της πρωτεΐνης Bcl2 επί των λευχαιμικών κυττάρων ασθενών με ΧΛΛ. Η αντιμετάθεση t(14, 18) που παρατηρείται στην πλειοψηφία των οζωδών λεμφωμάτων και η οποία ευθύνεται για την υπερέκφραση της Bcl-2 στο συγκεκριμένο νόσημα, δεν έχει παρατηρηθεί σε περιπτώσεις ασθενών με ΧΛΛ⁽⁶²⁾.

Τα τελευταία χρόνια έχει βρεθεί ότι τα κύτταρα της ΧΛΛ δεν προέρχονται από άωρα ανοσολογικά ανεπαρκή Β λεμφοκύτταρα, που συμπεριφέρονται ως αδρανή κύτταρα τα οποία διαιρούνται ελάχιστα, πεθαίνουν σπάνια και έτσι, παθητικά, συσσωρεύονται σε αριθμό, επηρεάζοντας την εμφάνιση και εξέλιξη της νόσου.

Φαίνεται τώρα ότι τα κύτταρα της ΧΛΛ προκύπτουν από ώριμα ανοσολογικά επαρκή Β λεμφοκύτταρα με αντιγονική δράση, και ότι τα λευχαιμικά κύτταρα των περισσότερων ασθενών κυκλοφορούν σε προσδιορισμένα ποσοστά, υποδηλώνοντας ότι δεν είναι δυνατή η ύπαρξη μιας γενετικής ανωμαλίας στην απόπτωση, χωρίς την παρουσία παραγόντων του μικροπεριβάλλοντος.

Με αυτά τα ευρήματα εκτιμάται ότι η ΧΛΛ είναι δυναμική, μη παθητική αθροιστική νόσος^(282, 283) (HEMATOLOGY 2003: *The American Society of Hematology*)

ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ ΜΕΤΑΞΥ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΚΑΙ ΛΕΥΧΑΙΜΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

Ενώ, όπως ήδη αναφέρθηκε, τα νεοπλασματικά κύτταρα της ΧΛΛ παρουσιάζουν αντίσταση στην δράση του φαινομένου της απόπτωσης *in vivo*, αντιθέτως, τα ίδια κύτταρα καθί-

στανται εξαιρετικά ευαίσθητα στην δράση του ίδιου φαινομένου, όταν βρεθούν σε *in vitro* συνθήκες. Το γεγονός αυτό είναι τεραστίου ενδιαφέροντος και, εμμέσως, υποδηλώνει ότι η αναστολή της απόπτωσης δεν αποτελεί αυτόνομη ιδιότητα του λευχαιμικού κυττάρου αλλά, πιθανό, οφείλεται στην συνελικουρική δράση κυττάρων του μικροπεριβάλλοντος και των εξ αυτών παραγόμενων κυτοκινών⁽⁹⁴⁾.

Πεδίο εκτεταμένης έρευνας αποτελεί η μελέτη τριών κατηγοριών κυττάρων του μικροπεριβάλλοντος των λευχαιμικών κυττάρων:

1. Ο μυελός των οστών αποτελεί, ίσως, το πιο ευνοϊκό περιβάλλον για την ανάπτυξη και επιβίωση των κυττάρων της ΧΛΛ. Σημαντικό ρόλο φαίνεται ότι διαδραματίζουν τα στρωματικά κύτταρα του μυελού. Σε *in vitro* συνθήκες έχει διαπιστωθεί ότι τα λευχαιμικά κύτταρα έρχονται σε στενή κυτταρική επαφή (cell to cell contact) με τα στρωματικά κύτταρα, μέσω της έκφρασης μορίων προσκόλλησης. Συγκεκριμένα, η κυτταρική επαφή επιτελείται με την έκφραση β1, β2 ιντεγκρινών (integrins) επί της επιφανείας των κυττάρων^(139, 195). Η σύνδεση των λευχαιμικών κυττάρων με τα κύτταρα του στρώματος είναι απαραίτητη για την αναστολή της απόπτωσης και αυτό αποδεικνύεται από το γεγονός ότι αν διαχωριστούν οι κυτταρικοί πληθυσμοί μέσω της παρεμβολής μεμβρανών με πολύ μικρούς πόρους, τότε επέρχεται επιτάχυνση του φαινομένου της απόπτωσης. Η κυτταρική επαφή με τα στρωματικά κύτταρα αυξάνει την επιβίωση των λευχαιμικών κυττάρων *in vitro* και, ίσως, κατά τον τρόπο αυτό δύναται να ερμηνευθεί το πλεονέκτημα επιβίωσης, που προσδίδει στα λευχαιμικά κύτταρα ο μυελός των οστών *in vivo*⁽⁴³⁹⁾.
2. Στα πρώιμα στάδια της νόσου, όταν ακόμα η διήθηση μυελού είναι οζώδους τύπου, παρατηρείται σημαντική παρουσία Follicular Dendritic Cells (FDC) κυττάρων στον μυελό. Τα FDC, υπό κανονικές συνθήκες, απουσιάζουν από την μυελική κοιλότητα. Έχει διαπιστωθεί από πειραματικά δεδομένα ότι υφίσταται κυτταρική επαφή μεταξύ των FDC και των λευχαιμικών κυττάρων. Είναι πιθανό, στα αρχικά στάδια της νόσου, η αλληλεπίδραση των FDC και των λευχαιμικών κυττάρων να παρέχει στα τελευταία ικανότητα επιβίωσης, συμμετέχοντας έτσι στην παθογένεση της ΧΛΛ⁽⁴⁰⁾.
3. Πειραματικά δεδομένα καταδεικνύουν την αλληλεπίδραση μεταξύ λευχαιμικών κυττάρων και των T-λεμφοκυττάρων. Αποτέλεσμα της σχέσης αυτής, όπως θα καταγραφεί στις επόμενες παραγράφους, είναι η επιβίωση και ανάπτυξη των κυττάρων της νόσου αλλά και η καταστολή της ανοσιακής απάντησης.
4. Πρόσφατα, επίσης, έχει διαπιστωθεί στο περιφερικό αίμα ασθενών με ΧΛΛ η ύπαρξη κυτταρικού πληθυσμού με βοηθητική δράση επί των λευχαιμικών κυττάρων. Πιο συ-

γκεκριμένα, όταν μονοπύρηννα κύτταρα από το περιφερικό αίμα ασθενών με ΧΛΛ τεθούν σε συνθήκες *in vitro* καλλιέργειας μακράς διάρκειας, τότε κάποιος κυτταρικός υποπληθυσμός διαφοροποιείται σε κύτταρα που προσκολλώνται επί της πλαστικής επιφάνειας των καλλιεργητικών ασκών. Τα κύτταρα αυτά παρουσιάζουν μορφολογία ινοβλάστης και διαθέτουν ανοσοφαινοτυπικά χαρακτηριστικά στρωματικών μυελικών κυττάρων, όπως π.χ. έκφραση βιμεντίνης. Επίσης τα κύτταρα αυτά, τα οποία για περιγραφικούς λόγους ονομάζονται “nurse-like”, παράγουν την πρωτεΐνη SDF-1 (stromal-derived factor-1). Η πρωτεΐνη SDF-1 εκκρίνεται φυσιολογικά από τα κύτταρα στρώματος του μυελού και διαθέτει λειτουργική δράση χυμοκίνης. Τα λευχαιμικά κύτταρα προσκολλώνται επί των “nurse-like” κυττάρων και αυτή η αλληλεπίδραση τα προφυλάσσει από την διαδικασία της απόπτωσης. Το ενδιαφέρον είναι ότι η αντίσταση στην απόπτωση αίρεται κατόπιν της προσθήκης αντισωμάτων έναντι του παράγοντα SDF-1. Είναι, λοιπόν, εξαιρετικά πιθανό η παρατηρούμενη αντίσταση στην απόπτωση να οφείλεται στην δράση του παράγοντα SDF-1, που εκκρίνεται από τα “nurse-like” κύτταρα^(27, 28). Παρ’ ότι η κλινική σημασία της ανωτέρω παρατήρησης είναι άγνωστη επί του παρόντος, καθίσταται σαφής η ουσιώδης συμμετοχή των κυττάρων του μικροπεριβάλλοντος στην παθογένεση της ΧΛΛ.

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΑ ΔΕΔΟΜΕΝΑ

Ο κυτταρικός «διάλογος» μεταξύ των λευχαιμικών κυττάρων και των προαναφερθέντων κυττάρων του μικροπεριβάλλοντος επιτελείται μέσω «κυτταρικής επαφής» (cell to cell contact), έκκρισης κυτταροκινών, έκκρισης χυμοκινών και έκφρασης μορίων προσκόλλησης. Η «κυτταρική επαφή» επιτρέπει την ανταλλαγή μηνυμάτων μεταξύ των κυττάρων, μέσω της αλληλεπίδρασης πρωτεϊνικών μορίων, που εκφράζονται επί της επιφανείας των κυττάρων και διαθέτουν ρόλο συνδέτη-υποδοχέα (ligand-receptor). Η σύνδεση του υποδοχέα με τον αντίστοιχο συνδέτη ενεργοποιεί ενδοκυττάρια μεταβολικά μονοπάτια μεταγωγής του σήματος (signal transduction pathways), με τελικό αποτέλεσμα την τροποποίηση της κυτταρικής λειτουργίας προς διάφορες κατευθύνσεις, π.χ. επαγωγή-αναστολή απόπτωσης, πολλαπλασιασμός, έκκριση κυτοκινών, διαφοροποίηση, κλπ.

Οι εκκρινόμενες κυτοκίνες δρουν με αυτοκρινή ή παρακρινή τρόπο, συνδέονται με τον αντίστοιχο κυτταρικό υποδοχέα και μεταβάλλουν την κυτταρική λειτουργία επίσης μέσω της ενεργοποίησης δευτερογενών «ενδοκυττάρων μεταβολικών δρόμων».

Η έκκριση χυμοκινών και η έκφραση μορίων προσκόλλησης είναι υπεύθυνη για την κυκλοφορία και την επιλεκτική συγκέντρωση των λευχαιμικών κυττάρων επί συγκεκριμένων ανατομικών θέσεων.

Επειδή, όπως είναι αντιληπτό, ο όγκος των πληροφοριών σχετικά με το πραγματευόμενο θέμα είναι τεράστιος, που ξεπερνά τους σκοπούς της συγγραφής του παρόντος, επιλέχθηκε να γίνει η περιγραφή ορισμένων μόνον εκ των πειραματικών δεδομένων.

A) ΤΑ Τ-ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΑ ΣΤΗ ΝΟΣΟ

Τα Τ-λεμφοκύτταρα διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην παθογένεια της ΧΛΛ. Παρακάτω παρατίθενται σχετικές παρατηρήσεις που αφορούν τον Τ-κυτταρικό πληθυσμό σε ασθενείς με ΧΛΛ:

1. Ο απόλυτος αριθμός των Τ-λεμφοκυττάρων είναι αυξημένος στο περιφερικό αίμα από τα πρόδρομα στάδια της νόσου. Η αύξηση αυτή αφορά τόσο τα CD4 όσο και τα CD8 κύτταρα. Η αύξηση μάλιστα των CD8 υπερτερεί, με αποτέλεσμα να εμφανίζεται αναστροφή του λόγου CD4:CD8^(10, 214, 241).
2. Την ύπαρξη σημαντικής αλληλεπίδρασης μεταξύ των λευχαιμικών κυττάρων και των φυσιολογικών Τ-λεμφοκυττάρων υποδηλώνει το γεγονός της άφθονης παρουσίας Τ-helper κυττάρων, τόσο στον διηθημένο μυελό όσο και στους προσβεβλημένους λεμφαδένες^(93, 207).
3. Με την πρόοδο της νόσου παρατηρείται υπεροχή των CD45RO, DR+ κυττάρων σε σχέση με τα CD45RA, DR- κύτταρα. Αυτή η παρατήρηση υποδηλώνει ότι η πλειοψηφία των Τ-κυττάρων είναι ώριμα ενεργοποιημένα κύτταρα (activated, mature)^(78, 209).
4. Εκτός των ανωτέρω ποσοτικών διαταραχών εμφανίζονται και λειτουργικές διαταραχές, όπως: μειωμένη ικανότητα απάντησης σε μιτογόνα, μειωμένη Τ-κυτταροτοξική (T-CTL) και Τ-βοηθητική (T-helper) απάντηση σε ξένα αντιγόνα, μειωμένη μεικτή λεμφοκυτταρική αντίδραση (MLR) σε αλλοαντιγόνα. Οι ανωτέρω λειτουργικές διαταραχές συμβαδίζουν με την ανοσοανεπάρκεια που παρουσιάζουν οι ασθενείς με ΧΛΛ^(138, 142, 215).
5. Επί των Τ-κυττάρων παρατηρείται ελαττωμένη έκφραση του CD28 και της TCRζ αλυσίδας. Το μόριο CD28 συμμετέχει στην διέγερση του Τ-κυττάρου μέσω της σύνδεσης με τους υποδοχείς CD80 και CD86, που εκφράζονται στην επιφάνεια των αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων (APC). Η αλυσίδα TCRζ αποτελεί τμήμα του υποδοχέα TCR του Τ-λεμφοκυττάρου η παρουσία της είναι απαραίτητη για την ενδοκυττάρια μεταβί-

βαση του σήματος. Τα ανωτέρω ευρήματα είναι συμβατά με την ελαττωμένη ικανότητα απάντησης των T-κυττάρων σε αντιγονικά ερεθίσματα⁽²²⁹⁾.

6. Η πλειοψηφία των CD4 κυττάρων παρουσιάζουν φαινοτυπικά ευρήματα συμβατά με T-helper 2 κύτταρα. Η σημασία αυτής της παρατήρησης θα περιγραφεί στις επόμενες παραγράφους^(50, 182).

B) Ο ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ ΙΝΤΕΡΛΕΥΚΙΝΗΣ-2

Η ιντερλευκίνη 2 (IL-2) είναι μία εκ των κυττοκινών που η σχέση τους με την παθογένεια της νόσου έχουν μελετηθεί εκτεταμένα. Η IL-2 ασκεί ποικιλία βιολογικών δράσεων, όπως: είναι απαραίτητη για τον πολλαπλασιασμό των T και B κυττάρων, ενεργοποιεί τα μακροφάγα των ιστών και ενισχύει την κυτταρολυτική δράση των T και NK κυττάρων⁽²²⁶⁾. Παρακάτω παρατίθενται ορισμένες εκ των παρατηρήσεων που αφορούν την σχέση της IL-2 με την παθογένεια της ΧΛΛ³³⁹.

1. Ο υποδοχέας της IL-2 (IL-2R) εκφράζεται επί της επιφανείας των λευχαιμικών κυττάρων⁽⁴⁹⁾.
2. Η λειτουργική επάρκεια του υποδοχέα IL-2R καθίσταται εμφανής από πειραματικές παρατηρήσεις, που αποδεικνύουν την ικανότητα του υποδοχέα να προσλαμβάνει την εξωγενώς χορηγούμενη IL-2⁽⁸²⁾.
3. Στον ορό ασθενών με ΧΛΛ παρατηρούνται αυξημένα επίπεδα διαλυτού υποδοχέα IL-2R. Πηγή έκκρισης του διαλυτού IL-2R αποτελούν τα λευχαιμικά κύτταρα⁽²⁴⁰⁾.
4. Σε ασθενείς με ΧΛΛ η πρόσληψη της IL-2, τόσο από τα λευχαιμικά κύτταρα όσο και από τον διαλυτό υποδοχέα IL-2R, έχει σαν αποτέλεσμα την μειωμένη λειτουργική διαθεσιμότητα της IL-2^(81, 232).
5. Η μειωμένη λειτουργική διαθεσιμότητα της IL-2 ευνοεί την μεταστροφή σε T-helper2 ανοσιακή απάντηση. Η σημασία της παρατήρησης θα περιγραφεί πιο διεξοδικά σε επόμενες παραγράφους.

Φαίνεται ότι ο ρόλος της IL-2 στην παθογένεια της ΧΛΛ είναι διπλός. Αφ' ενός αποτελεί παράγοντα που πιθανό να δρα ευεργετικά επί του λευχαιμικού κλώνου⁽¹⁴¹⁾ και αφ' ετέρου η μειωμένη διαθεσιμότητά της να ερμηνεύει εν μέρει την λειτουργική μειονεξία των T και των κυττάρων φυσικών φονέων (NK). Πράγματι, η εξωγενής χορήγηση IL-2 βελτιώνει την κυτταροτοξική δράση των ανωτέρω κυττάρων σε ασθενείς με ΧΛΛ⁽⁵⁾.

Γ) Ο ΡΟΛΟΣ ΤΟΥ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑ ΝΕΚΡΩΣΗΣ ΤΩΝ ΟΓΚΩΝ

Ο παράγοντας νέκρωσης των όγκων α (TNFα) είναι κυτταροκίνη με ευρύ φάσμα βιολογικών δραστηριοτήτων. Συμμετέχει στην πρόκληση της φλεγμονώδους διαδικασίας, ασκεί ανοσορυθμιστική δράση και, επίσης, αποτελεί παράγοντα που δρα ανασταλτικά επί της αύξησης των κακοήθων νεοπλασιών. Επιπλέον, ο TNFα αποτελεί αυξητικό παράγοντα για διάφορους κυτταρικούς πληθυσμούς, όπως T και B λεμφοκύτταρα, ινοβλάστες, κλπ. Ο TNFα παράγεται κυρίως από τα μακροφάγα των ιστών αλλά επίσης από διεγερμένα T και B λεμφοκύτταρα⁽²³⁾. Παρακάτω παρατίθενται ορισμένα εκ των πειραματικών δεδομένων που αφορούν τον TNFα.

1. Τα λευχαιμικά κύτταρα ασθενών με ΧΛΛ παράγουν TNFα. Αυτό αποδεικνύεται, εκτός των άλλων, και από την παρουσία mRNA του TNFα εντός του κυτταροπλάσματος⁽⁸³⁾.
2. Στον ορό ασθενών με ΧΛΛ διαπιστώνονται αυξημένα επίπεδα του TNFα. Πηγή του εν λόγω μορίου αποτελούν πιθανό τα λευχαιμικά κύτταρα. Η αύξηση αυτή ερμηνεύει, εν μέρει, την αναιμία των ασθενών αλλά και την δυνατότητα διόρθωσής της με την εξωγενή χορήγηση ερυθροποιητίνης⁽³⁾.
3. Αρκετές μελέτες καταδεικνύουν την ύπαρξη του υποδοχέα του TNFα επί της επιφανείας των λευχαιμικών κυττάρων. Η παρατήρηση αυτή δεν είναι ομόφωνα αποδεκτή από όλους τους ερευνητές^(57, 264).

Ο ρόλος του TNFα στην παθογένεια της ΧΛΛ είναι εξαιρετικά ασαφής. Πάντως, εάν αποδειχθεί οριστικά η έκφραση του υποδοχέα του TNFα επί των λευχαιμικών κυττάρων, τότε είναι πιθανό η αυτοκρινής δράση του TNFα επί του λευχαιμικού κλώνου να συμμετέχει στην ανάπτυξη της νόσου.

Δ) Ο ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ ΙΝΤΕΡΛΕΥΚΙΝΗΣ 8

Η ιντερλευκίνη 8 (IL-8) ανήκει στις χυμοκίνες και ασκεί ισχυρή προσελκυστική δράση, κυρίως επί των ουδετερόφιλων και των T-λεμφοκυττάρων. Παράγεται από αιμοποιητικά κύτταρα, κατόπιν της ελαγωγικής δράσης άλλων κυτταροκινών, όπως π.χ. TNFα και IL-1. Παράγεται κυρίως από μακροφάγα και ενεργοποιημένα T-λεμφοκύτταρα⁽⁴⁵⁶⁾. Φυσιολογικά B-λεμφοκύτταρα δεν παράγουν IL-8. Παρακάτω παρατίθενται ορισμένες εκ των παρατηρήσεων που αφορούν την σχέση της IL-8 με την παθογένεια της ΧΛΛ.

1. Τα λευχαιμικά κύτταρα παράγουν και εκκρίνουν IL-8. Επίσης, τα ίδια κύτταρα εκφράζουν στην επιφάνειά τους τον υποδοχέα της IL-8. Το γεγονός αυτό καθιστά πιθανή την ύπαρξη αυτοκρινούς δράσεως της IL-8 επί του λευχαιμικού κλώνου⁽⁸⁴⁾.

2. Σε in-vitro συνθήκες η προσθήκη εξωγενούς IL-8 προσδίδει στα λευχαιμικά κύτταρα αυξημένη ικανότητα επιβίωσης. Η δράση αυτή εμφανίζεται παράλληλα με την αύξηση της έκφρασης της αντιαποπτωτικής πρωτεΐνης Bcl-2⁽⁸⁵⁾.
3. Σε in-vitro συνθήκες η καταστολή της δράσης της ενδογενούς IL-8 με την προσθήκη αντί-IL-8 αντισωμάτων επάγει την διαδικασία της απόπτωσης επί των λευχαιμικών κυττάρων⁽⁸⁵⁾.
4. Σε ασθενείς με ΧΛΛ παρατηρείται σημαντική αύξηση των επιπέδων της IL-8 στον ορό σε σύγκριση με υγιή άτομα⁽¹⁷⁵⁾.
5. Έχει διαπιστωθεί ότι υπάρχει στατιστική συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων της IL-8 στον ορό των ασθενών και της πιθανότητας εμφάνισης προόδου της νόσου⁽¹⁷⁵⁾.

E) Ο ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ ΙΝΤΕΡΛΕΥΚΙΝΗΣ 4

Η ιντερλευκίνη-4 (IL-4) αποτελεί μία εκ των κυτταροκινών, με σπουδαία βιολογική δράση επί της διαφοροποίησης των T και B λεμφοκυττάρων. Η IL-4 παράγεται από ενεργοποιημένα CD4 T-κύτταρα τύπου 2 (T-helper2) μαζί με τις κυτταροκίνες IL-5, IL-6 και IL-10. Αντίθετα, τα CD4 T-κύτταρα τύπου 1 (T-helper1) παράγουν τις κυτταροκίνες IL-2 και IFN γ . Επιπλέον, η IL-4 επάγει την διαφοροποίηση των T-κυττάρων προς την κατεύθυνση T-helper2. Η IL-4 συμμετέχει στην γένεση των αλλεργικών αντιδράσεων, επάγοντας την μεταστροφή στην τάξη των παραγόμενων ανοσοσφαιρινών (από IgM σε IgE) ⁽²⁾. Παρακάτω παρατίθενται πειραματικά δεδομένα που αφορούν την σχέση της IL-4 με την παθογένεια της ΧΛΛ.

1. Σε ασθενείς με ΧΛΛ έχει διαπιστωθεί η παρουσία σημαντικά αυξημένων επιπέδων IL-4 στον ορό, σε σχέση με υγιείς μάρτυρες. Πηγή των αυξημένων επιπέδων IL-4 υποστηρίζεται ότι είναι φυσιολογικά λεμφοκύτταρα με φαινότυπο T-helper2. Όπως περιγράφηκε σε προηγούμενη παράγραφο, σε ασθενείς με ΧΛΛ η πλειοψηφία των CD4 T-κυττάρων έχει φαινότυπο T-helper2^(50, 182).
2. Τα λευχαιμικά κύτταρα δεν παράγουν IL-4, όμως έχει διαπιστωθεί ότι εκφράζουν στην επιφάνειά τους τον αντίστοιχο υποδοχέα για την IL-4. Το γεγονός αυτό καθιστά πιθανή την ύπαρξη παρακρινούς δράσεως της IL-4 επί των λευχαιμικών κυττάρων⁽²⁷⁹⁾.
3. Σε συνθήκες in-vitro η εξωγενής προσθήκη IL-4 έχει διαπιστωθεί ότι αυξάνει την ικανότητα επιβίωσης των λευχαιμικών κυττάρων. Η δράση αυτή εμφανίζεται παράλληλα με την αύξηση της έκφρασης της πρωτεΐνης Bcl-2⁽⁴⁷⁾.

4. Σε συνθήκες in-vitro η εξωγενής προσθήκη IL-4 έχει διαπιστωθεί ότι αναστέλλει την αποπτωτική δράση της γλωραμβουκίλης επί των λευχαιμικών κυττάρων⁽¹⁶⁸⁾.

ΣΤ) Ο ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ ΙΝΤΕΡΛΕΥΚΙΝΗΣ 10

Η ιντερλευκίνη 10 (IL-10) είναι από τους κύριους μεσολαβητές της T-helper2 απάντησης. Παράγεται όπως και η IL-4 από διεγερμένα CD4 T-κύτταρα με φαινότυπο T-helper2. Η κύρια δράση της IL-10 είναι η αναστολή της T-helper1 απάντησης και, αντίθετα, η επαγωγή της T-helper2 ανοσιακής απάντησης⁽¹³⁶⁾. Πειραματικά δεδομένα που αφορούν την δράση της IL-10 στην παθογένεια της ΧΛΛ παρατίθενται κατωτέρω.

1. Τα λευχαιμικά κύτταρα παράγουν IL-10. Το γεγονός αυτό αποδεικνύεται από την παρουσία mRNA της IL-10 εντός του πρωτοπλάσματος των λευχαιμικών κυττάρων⁽²⁴⁴⁾.
2. Επιπλέον, έχει διαπιστωθεί ότι τα λευχαιμικά κύτταρα εκφράζουν στην επιφάνειά τους τον αντίστοιχο υποδοχέα για την IL-10⁽¹¹⁶⁾.
3. Τα πειραματικά δεδομένα που αφορούν τα επίπεδα της IL-10 στον ορό των ασθενών είναι αλληλοσυγκρουόμενα^(67, 135).
4. Επίσης, τα πειραματικά δεδομένα που αφορούν την δράση της IL-10 επί της ικανότητας των λευχαιμικών κυττάρων για επιβίωση είναι αλληλοσυγκρουόμενα^(79, 146).
5. Όπως ήδη ειπώθηκε, η IL-10 ευνοεί τις T-helper2 απαντήσεις. Είναι πιθανό η αυξημένη παραγωγή IL-10 από τα λευχαιμικά κύτταρα να ευθύνεται για την μεταστροφή σε τύπου T-helper2 ανοσιακή απάντηση που παρατηρείται σε ασθενείς με ΧΛΛ⁽⁵⁰⁾.
6. Όπως είναι γνωστό, η IL-10 προκαλεί ελάττωση της έκφρασης των MHC II και B7 μορίων επί της επιφάνειας των δενδριτικών κυττάρων. Είναι πιθανό η IL-10, μέσω της μείωσης της αντιγονοπαρουσιαστικής ικανότητας των δενδριτικών κυττάρων, να ευθύνεται μερικώς για την μειωμένη ανοσιακή ικανότητα των ασθενών με ΧΛΛ.

Ζ) Ο ΡΟΛΟΣ ΤΟΥ ΑΝΤΙΓΟΝΟΥ CD30

Το πρωτεϊνικό μόριο CD30 έχει λειτουργία υποδοχέως, εκφράζεται επί της επιφάνειας μεγάλης ποικιλίας κυττάρων και ανήκει στην οικογένεια των υποδοχέων TNF/NGF (nerve growth factor). Το αντιγόνο CD30 διαπιστώθηκε αρχικά επί της επιφάνειας των Reed-Sternberg κυττάρων. Επιπλέον, έχει διαπιστωθεί ότι T-κύτταρα, που διαφοροποιούνται προς την κατεύθυνση T-helper2, εκφράζουν επί της επιφάνειας τους υψηλά ποσά CD30⁽⁵¹⁾. Πειραματικά δεδομένα που αφορούν το CD30 περιγράφονται στη συνέχεια.

1. Ενεργοποιημένα Τ-κύτταρα σε ασθενείς με ΧΛΛ διαφοροποιούνται προς την κατεύθυνση Τ-helper2, με αποτέλεσμα να εκφράζουν στην επιφάνειά τους υψηλά ποσά CD30. Τα κύτταρα αυτά παράγουν IL-4 και ευθύνονται επίσης για τα υψηλά επίπεδα διαλυτού CD30, που παρατηρείται στον ορό των ασθενών⁽⁵⁰⁾.
2. Τα λευχαιμικά κύτταρα έχει διαπιστωθεί ότι εκφράζουν στην επιφάνειά τους τον αντίστοιχο συνδέτη του CD30 (CD30 Ligand) ^(92, 256).

Έχει διατυπωθεί η εξής υπόθεση αναφορικά με τον ρόλο του CD30. Τα λευχαιμικά κύτταρα έρχονται σε συνθήκες στενής κυτταρικής επαφής (cell to cell contact) με τα άφθονα σε παρουσία Τ-helper2 κύτταρα, με αποτέλεσμα την σύνδεση του υποδοχέα CD30 με τον συνδέτη CD30L. Σαν αποτέλεσμα της ανωτέρω αλληλεπίδρασης, τα Τ-κύτταρα παράγουν, μεταξύ των άλλων, και IL-4. Η IL-4 δρα με παρακρινή τρόπο επί των λευχαιμικών κυττάρων και, μέσω της αύξησης της έκφρασης της πρωτεΐνης Bcl2, επέρχεται αναστολή της απόπτωσης.

H) Ο ΡΟΛΟΣ ΤΟΥ ΑΝΤΙΓΟΝΟΥ CD40

Το πρωτεϊνικό μόριο CD40 ασκεί λειτουργία υποδοχέως και ανήκει στην ευρύτερη οικογένεια των υποδοχέων TNFα. Ο υποδοχέας CD40 εκφράζεται επί της επιφανείας σχεδόν όλων των Β-λεμφοκυττάρων, καθώς και επί των μακροφάγων και ενδοθηλιακών κυττάρων. Ο συνδέτης του CD40 (CD154) εκφράζεται επί της επιφανείας των διεγερμένων CD4 Τ-λεμφοκυττάρων. Ειδικά έναντι «αντιγόνου» δραστικά CD4 κύτταρα έρχονται σε στενή κυτταρική επαφή με τα αντίστοιχα ειδικά Β-κύτταρα στις θυμοεξαρτώμενες περιοχές των λεμφαδένων ή του σπλήνα. Στις συνθήκες αυτές επέρχεται σύνδεση του υποδοχέα TCR του Τ-κυττάρου με μόρια (MHC II+αντιγονικός επίτοπος) επί της επιφανείας του Β-κυττάρου. Η σύνδεση αυτή αποτελεί το κύριο διεγερτικό σήμα. Επιπλέον, επέρχεται σύνδεση του υποδοχέα CD40 με τον αντίστοιχο συνδέτη CD154. Η δεύτερη αυτή σύνδεση αποτελεί δευτερεύον συνδιεγερτικό σήμα (costimulatory signal), απαραίτητο για την οριστική ενεργοποίηση του Β-κυττάρου^(143, 153). Αποτέλεσμα αυτής της αλληλεπίδρασης είναι η δημιουργία των βλαστικών κέντρων των δευτερογενών λεμφοζιδίων, η λειτουργία των οποίων έχει ήδη περιγραφεί σε προηγούμενες παραγράφους. Δεδομένα που αφορούν τον ρόλο του CD40 στην παθογένεια της ΧΛΛ, παρατίθενται κατωτέρω.

1. Τα λευχαιμικά κύτταρα, όπως όλα τα Β-κύτταρα, εκφράζουν στην επιφάνειά τους τον υποδοχέα CD40.

2. Ενώ τα φυσιολογικά T-λεμφοκύτταρα, μετά ενεργοποίηση, εκφράζουν επί της επιφανείας τους τον συνδέτη CD154, αντίθετα τα T-λεμφοκύτταρα ασθενών με ΧΛΛ, αδυνατούν να εκφράσουν το CD154. Οι λόγοι αυτής της αδυναμίας δεν είναι σαφείς⁽³³⁾.
3. Ισως μία εξήγηση είναι η εξής: Σε συνθήκες in-vitro η παρουσία λευχαιμικών κυττάρων έχει διαπιστωθεί ότι επιφέρει αναστολή στην έκφραση του συνδέτη CD154 επί της επιφανείας φυσιολογικών T-λεμφοκυττάρων. Επίσης, έχει παρατηρηθεί ότι η αναστολή έκφρασης του CD154 αίρεται κατόπιν προσθήκης αντι-CD40 αντισωμάτων.
4. Η μη έκφραση του CD154 έχει σαν αποτέλεσμα την αδυναμία των T-κυττάρων να προσφέρουν «βοήθεια» στα B-λεμφοκύτταρα έτσι, ώστε να ολοκληρωθεί η ανοσιακή απάντηση των τελευταίων. Η παρατήρηση αυτή αποτελεί πιθανή εξήγηση για την παρατηρούμενη καταστολή της χυμικής ανοσίας σε ασθενείς με ΧΛΛ.
5. Νεώτερα δεδομένα αποδεικνύουν ότι ορισμένα, τουλάχιστον, εκ των λευχαιμικών κυττάρων εκφράζουν και τον συνδέτη CD154⁽²³⁷⁾. Η λειτουργικότητα, μάλιστα, του CD154 αποδεικνύεται από την ικανότητα των λευχαιμικών κυττάρων να επάγουν in-vitro την σύνθεση ανοσοσφαιρίνης IgG από φυσιολογικά B-λεμφοκύτταρα. Η παρατήρηση αυτή δύναται να οδηγήσει στην ακόλουθη υπόθεση. Είναι πιθανό, η αλληλεπίδραση των λευχαιμικών κυττάρων με φυσιολογικά αυτοαντιδραστικά B-κύτταρα να ευθύνεται για την παραγωγή αυτοαντισωμάτων που παρατηρείται σε ασθενείς με ΧΛΛ.
6. Επίσης, η συνέκφραση επί των λευχαιμικών κυττάρων, τόσο του υποδοχέα CD40 όσο και του αντίστοιχου συνδέτη CD154, δύναται να έχει σαν αποτέλεσμα την αλληλεπίδραση μεταξύ τους. Είναι πιθανό, η σύνδεση CD40-CD154 μέσω της έκκρισης κυτταροκινών να οδηγεί στην παρατηρούμενη αναστολή της απόπτωσης των λευχαιμικών κυττάρων⁽⁹⁸⁾.
7. Η ανωτέρω υπόθεση ενισχύεται από την παρατήρηση ότι σε συνθήκες in-vitro η εξωγενής προσθήκη διαλυτού συνδέτη s-CD154 αυξάνει την ικανότητα επιβίωσης των λευχαιμικών κυττάρων. Η αυξημένη αντίσταση των λευχαιμικών κυττάρων στην απόπτωση συνοδεύεται από την έκφραση του ισχυρού αντιαποπτωτικού παράγοντα “survivin”⁽⁹⁸⁾.

Η μεγάλη σημασία του ρόλου του CD40 στην παθογένεια της ΧΛΛ διαφαίνεται από το γεγονός ότι πειραματικές προσπάθειες γονιδιακής θεραπείας, που στοχεύουν στην αλληλεπίδραση CD40-CD154, βρίσκονται ήδη σε εξέλιξη. Η βασική υπόθεση στηρίζεται στην διαμόλυνση λευχαιμικών κυττάρων με αδενοϊούς, οι οποίοι έχουν ενσωματώσει στο γονιδίωμά τους το γονίδιο το οποίο κωδικοποιεί την πρωτεΐνη CD154. Οι τροποποιημένοι αδενοϊοί λειτουργούν κατά τον τρόπο αυτό σαν «όχημα» (vector) για την εισαγωγή του συ-

γκεκριμένου γόνου στα λευχαιμικά κύτταρα. Με τον τρόπο αυτό επιτυγχάνεται η σταθερή και μακράς διάρκειας έκφραση του CD154 επί της επιφανείας των λευχαιμικών κυττάρων. Η επανεισαγωγή των διαμολυσμένων κυττάρων εντός του οργανισμού του ασθενούς δύναται να επιφέρει τα κάτωθι θεωρητικά αποτελέσματα. Τα CD154+ λευχαιμικά κύτταρα δύνανται, μέσω της σύνδεσης του συνδέτη CD154 μετά του υποδοχέως CD40, να ενεργοποιήσουν παρακείμενα λευχαιμικά κύτταρα. Η ενεργοποίηση έχει σαν αποτέλεσμα την επαγωγή της έκφρασης άλλων μορίων, όπως μορίων προσκόλλησης αλλά και συνδιεγερτικών μορίων, όπως CD80(B71), CD86(B72).

Τελικό αποτέλεσμα είναι η μετατροπή ενός μεγάλου αριθμού λευχαιμικών κυττάρων σε ιδιαίτερος δραστικά αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα (APC) ⁽¹²³⁾. Υπό τις συνθήκες αυτές είναι πιθανό ειδικά «λευχαιμικά» αντιγόνα να παρουσιάζονται στα Τ-λεμφοκύτταρα του ασθενούς και έτσι να προκληθεί ειδική αντιλευχαιμική κυτταροτοξική απάντηση. Η όλη διαδικασία βρίσκεται σε φάση 1 και τα πρώτα αποτελέσματα δύνανται να χαρακτηρισθούν ενθαρρυντικά, αφού ορισμένοι εκ των ασθενών παρουσίασαν σημαντική υποχώρηση στο μέγεθος των λεμφαδενικών διογκώσεων και στον αριθμό των κυκλοφορούντων λευχαιμικών κυττάρων⁽¹³³⁾.

Θ) Ο ΡΟΛΟΣ ΤΟΥ FAS

Το μόριο FAS ή CD95 είναι διαμεμβρανική γλυκοπρωτεΐνη με λειτουργική δραστηριότητα υποδοχέως και ανήκει στην οικογένεια των υποδοχέων TNF/NGF. Η σύνδεση του υποδοχέα FAS με τον αντίστοιχο συνδέτη FASL (FAS Ligand) έχει σαν αποτέλεσμα την ενεργοποίηση της διαδικασίας της απόπτωσης και τον κυτταρικό θάνατο. Η πρωτεΐνη FAS εκφράζεται επί της επιφανείας πολλών, τόσο φυσιολογικών όσο και νεοπλασματικών αιμοποιητικών κυττάρων. Ο βασικός ρόλος της λειτουργίας του FAS είναι η ομοιοστασία των κυτταρικών διαμερισμάτων του λεμφοαιμοποιητικού ιστού^(222, 251). Πειραματικά δεδομένα, που αφορούν τον ρόλο του FAS στην παθογένεια της ΧΛΛ, παρατίθενται κατωτέρω.

1. Τα λευχαιμικά κύτταρα εκφράζουν καθόλου ή μόλις ελάχιστη ποσότητα του FAS επί της επιφανείας τους⁽¹¹⁸⁾.
2. Σε συνθήκες in-vitro, με την εξωγενή προσθήκη των κυτταροκινών IL-2, IFNα και IFNγ, τα λευχαιμικά κύτταρα επιτυγχάνουν σημαντική έκφραση της πρωτεΐνης FAS επί της επιφανείας τους⁽¹⁹²⁾.
3. Τα λευχαιμικά κύτταρα παρουσιάζουν ιδιαίτερη αντίσταση στην απόπτωση που επιτελείται μέσω του FAS. Λευχαιμικά κύτταρα που έχουν in-vitro διεγερθεί και εκφράζουν

το FAS δεν υφίστανται την διαδικασία της απόπτωσης μετά την προσθήκη αντι-FAS αντισωμάτων, όπως συμβαίνει με τα φυσιολογικά κύτταρα⁽²⁶⁵⁾.

4. Έχει διατυπωθεί η υπόθεση ότι η in-vivo αντίσταση στην δράση του FAS, που παρουσιάζουν τα λευχαιμικά κύτταρα, δυνατό να οφείλεται σε προστατευτική δράση που ασκείται από την πλούσια παρουσία T-λεμφοκυττάρων με φαινότυπο T-helper2. Η υπόθεση αυτή ενισχύεται από τα παρακάτω πειραματικά δεδομένα.
5. Σε συνθήκες in-vitro η εξωγενής προσθήκη κυτταροκινών τύπου 1, όπως IL-12 και IFN α , επάγει την έκφραση του FAS επί της επιφανείας των λευχαιμικών κυττάρων. Επιπλέον, η παρουσία αυτολόγων T-λεμφοκυττάρων με έκφραση FASL δύναται να επιφέρει τον κυτταρικό θάνατο των λευχαιμικών κυττάρων⁽²⁶⁹⁾.
6. Εάν στο προηγούμενο πείραμα προστεθεί εξωγενώς και κυτταροκίνη τύπου 2, όπως η IL-4, τότε αίρεται η ευαισθησία των λευχαιμικών κυττάρων στην κυτταροκτόνο δράση των FASL+ αυτολόγων T-λεμφοκυττάρων⁽²⁶⁹⁾.

Είναι σαφές ότι η σχέση των λευχαιμικών κυττάρων με τα κύτταρα του μικροπεριβάλλοντος διαδραματίζει θεμελιώδη ρόλο στην παθογένεια της νόσου. Η αποσαφήνιση των ανωτέρω αλληλεπιδράσεων αναμένεται να δώσει γένεση σε νέες και πιο ορθολογικές θεραπευτικές προσεγγίσεις.

ΑΓΓΕΙΟΓΕΝΕΣΗ ΚΑΙ ΧΡΟΝΙΑ ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΛΕΥΧΑΙΜΙΑ

Η ανάπτυξη των συμπαγών όγκων είναι άμεσα εξαρτημένη από την δημιουργία νέων αγγείων έτσι, ώστε να εξασφαλιστεί η παροχή των απαραίτητων θρεπτικών συστατικών για την μεταβολική στήριξη των νεοπλασματικών κυττάρων. Τα τελευταία χρόνια το φαινόμενο της αγγειογένεσης και η συμμετοχή του στην ανάπτυξη και εξάπλωση των κακοηθειών αποτελούν αντικείμενο εκτεταμένης μελέτης. Ήταν, επομένως, φυσικό οι ερευνητικές προσπάθειες για την κατανόηση της παθογένειας της ΧΛΛ να στραφούν και προς την κατεύθυνση αυτή. Πληθώρα πειραματικών δεδομένων αποδεικνύουν την παρουσία μεγάλου αριθμού νεόπλαστων αγγείων στον διηθημένο μυελό, αλλά και σε προσβεβλημένους λεμφαδένες ασθενών με ΧΛΛ⁽⁴³¹⁾. Ο βαθμός αύξησης της νεοαγγείωσης παρουσιάζει θετική συσχέτιση με την έκταση της νόσου (ασθενείς με προχωρημένα στάδια κατά Rai τείνουν να παρουσιάζουν εντονότερη νεοαγγείωση σε σχέση με ασθενείς πρώιμων σταδίων). Το γεγονός αυτό υποδηλώνει ότι η ανάπτυξη των λευχαιμικών κυττάρων είναι άμεσα εξαρτώμενη από την δημιουργία νέων αγγείων έτσι, ώστε να καλυφθούν οι μεταβολικές απαιτήσεις τους. Η ανάπτυξη της νεοαγγείωσης πιθανότατα οφείλεται στην έκκριση αγ-

γιογενετικών παραγόντων από τα λευχαιμικά κύτταρα. Πράγματι, έχει πλέον αποδειχθεί ότι τα λευχαιμικά κύτταρα διαθέτουν την ικανότητα παραγωγής του αυξητικού παράγοντα του ενδοθηλίου των αγγείων VEGF (vascular endothelial growth factor) ⁽²⁷⁾. Ο VEGF διαθέτει ισχυρή αγγειογενετική δράση και η παραγωγή του από τα λευχαιμικά κύτταρα αυξάνει ιδιαίτερα σε συνθήκες υποξίας. Ο μυελός των οστών αποτελεί ένα ιδιαίτερος υποξικό περιβάλλον και η σταδιακή αύξηση της διήθησης από τον λευχαιμικό ιστό επιτείνει την υποξία⁽¹²⁴⁾.

Στις συνθήκες αυτές, τα λευχαιμικά κύτταρα παράγουν μεγάλα ποσά VEGF, με αποτέλεσμα την δημιουργία νέων αγγείων και την αύξηση της αιματικής παροχής, επιτρέποντας έτσι την επιβίωση και την περαιτέρω ανάπτυξη των λευχαιμικών κυττάρων.

Έχει επίσης διαπιστωθεί ότι τα λευχαιμικά κύτταρα, εκτός της παραγωγής VEGF, εκφράζουν στην επιφάνειά τους και τους αντίστοιχους μεμβρανικούς υποδοχείς VEGFR-1 και VEGFR-2⁽¹²⁵⁾. Σε συνθήκες in-vitro έχει αποδειχθεί ότι η εξωγενής προσθήκη VEGF αυξάνει την ικανότητα επιβίωσης των λευχαιμικών κυττάρων. Αυτό το γεγονός υποδηλώνει ότι ο VEGF δυνατό να δρα αυτοκρινώς επί των λευχαιμικών κυττάρων και να τους προσδίδει in-vivo την δυνατότητα αντίστασης στην απόπτωση. Θα πρέπει να τονισθεί ότι ο VEGF, αν και ο περισσότερο μελετημένος, δεν αποτελεί τον μοναδικό αγγειογενετικό παράγοντα που εκκρίνεται από τα λευχαιμικά κύτταρα. Από τα παραπάνω καθίσταται προφανές ότι η κατανόηση των μηχανισμών της αγγειογένεσης είναι πιθανό να οδηγήσει στο μέλλον σε πιο αποτελεσματικές θεραπείες. Ήδη έχουν διατυπωθεί ιδέες που αναμένεται να εφαρμοσθούν σε κλινικά πρωτόκολλα φάσης-1, όπως π.χ. η αναστολή της δράσης του VEGF μέσω της χορήγησης μονοκλωνικών αντισωμάτων αντι-VEGF ή αντι-VEGFR⁽¹²⁵⁾.

ΜΟΡΙΑ ΠΡΟΣΚΟΛΛΗΣΗΣ

Τα μόρια προσκόλλησης (adhesion molecules) είναι ομάδα πρωτεϊνικών μορίων, των οποίων η λειτουργία εξυπηρετεί την κυκλοφορία και εγκατάσταση των αιμοποιητικών κυττάρων σε διάφορους ιστούς. Τα μόρια προσκόλλησης διακρίνονται σε διάφορες υποομάδες, όπως:

1. Immunoglobulin supergene family: μόρια με δομή προσομοιάζουσα αυτήν των ανοσοσφαιρινών, τα οποία εκφράζονται στην επιφάνεια ενδοθηλιακών κυττάρων. Στην κατηγορία αυτή ανήκουν οι: ICAM-1, ICAM-2, VCAM-2 κλπ.
2. Ιντεγκρίνες (Integrins): πρωτεΐνες που εκφράζονται επί της επιφανείας κυττάρων και αποτελούνται από δύο αλυσίδες, α και β. Οι integrins διακρίνονται στις κατηγορίες β1,

β2, β3 και συνδέονται με μόρια της κατηγορίας Immunoglobulin supergene family, καθώς και με στοιχεία της εξωκυτταρίου θεμέλιας ουσίας, όπως κολλαγόνο, φιβρονεκτίνη κλπ.

3. Selectins: πρωτεΐνες που εκφράζονται επί της επιφανείας κυττάρων και διακρίνονται στις κατηγορίες L, E, P.
4. Υποδοχείς των Selectins: είναι μόρια υδατανθρακικής σύστασης και εκφράζονται επί της επιφανείας των ενδοθηλιακών κυττάρων των αγγείων.
5. Χυμοκίνες: η ομάδα αυτή αποτελείται από 25 περίπου κυττοκίνες, όπως η IL-8, RANTES κλπ. Οι ουσίες αυτές εκκρίνονται από μεγάλη ποικιλία κυττάρων και ασκούν δράση χημειοτακτικών παραγόντων. Αντίστοιχοι υποδοχείς χυμοκινών εκφράζονται επί της επιφανείας των αιμοποιητικών κυττάρων.
6. Homing receptors: πρωτεϊνικά μόρια, που εκφράζονται επί της επιφανείας αιμοποιητικών κυττάρων και συνδέονται με αντίστοιχους υποδοχείς, με σκοπό την εγκατάσταση των κυττάρων επί διάφορων ιστών⁽²²⁷⁾.

Η μελέτη των μορίων προσκόλλησης σε ασθενείς με ΧΑΛ αποτελεί αντικείμενο εκτεταμένων ερευνών, με σκοπό την αναγνώριση παραμέτρων που συσχετίζονται με την κλινική εικόνα και την εξέλιξη της νόσου. Δυστυχώς, τα αποτελέσματα των μέχρι τώρα προσπαθειών είναι σε αρκετές περιπτώσεις αντικρουόμενα και δεν δύνανται να καταλήξουν σε ασφαλή συμπεράσματα. Κατωτέρω παρατίθενται ορισμένα εκ των πλέον ισχυρών δεδομένων:

1. Σχεδόν σε όλες τις περιπτώσεις τα λευχαιμικά κύτταρα παρουσιάζουν μέτρια έκφραση του υποδοχέα προσκόλλησης CD44 (συνδέεται με υαλουρονικό οξύ) και της σλεκτινής CD62L⁽⁶⁴⁾.
2. Η έντονη έκφραση του CD44 χαρακτηρίζει περιπτώσεις με προχωρημένο στάδιο νόσου και μειωμένη ολική επιβίωση⁽⁶⁸⁾.
3. Η έκφραση του μορίου CD54(ICAM-1) παρατηρείται επίσης σε περιστατικά με προχωρημένο στάδιο νόσου και δυσμενή πρόγνωση⁽⁶⁴⁾.
4. Η έντονη έκφραση του μορίου CD36 (υποδοχέας της θρομβοσπονδίνης) χαρακτηρίζει επίσης περιστατικά με μεγάλο φορτίο νόσου και διάχυτο πρότυπο διήθησης του μυελού των οστών⁽²³⁴⁾.
5. Η έντονη έκφραση των CD11c, CD11a και CD18 χαρακτηρίζει περιπτώσεις με προεξάρχουσα την σπληνική διόγκωση⁽⁷⁾.

Η περαιτέρω μελέτη των μορίων προσκόλλησης αναμένεται να συμβάλει στην **1)** διαφορική διάγνωση της ΧΛΛ από άλλα λεμφοϋπερπλαστικά νοσήματα **2)** στην κατανόηση των μηχανισμών εξάπλωσης της νόσου **3)** στην εκτίμηση της πρόγνωσης των ασθενών και **4)** στην ανάπτυξη νέων θεραπευτικών μεθόδων.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΙΙΙ

ΒΛΑΒΕΣ ΤΟΥ ΓΕΝΕΤΙΚΟΥ ΥΛΙΚΟΥ ΣΤΗΝ ΧΡΟΝΙΑ ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΛΕΥΧΑΙΜΙΑ

Η μελέτη των διαταραχών του γενετικού υλικού επί περιπτώσεων ασθενών με ΧΛΛ απέκτησε τα τελευταία χρόνια ξεχωριστό ενδιαφέρον, λόγω της τεχνολογικής εξέλιξης και της ανάπτυξης νέων, πιο αποτελεσματικών εργαστηριακών μεθόδων³³⁹.

ΚΛΑΣΙΚΕΣ ΚΥΤΤΑΡΟΓΕΝΕΤΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ

Οι αρχικές προσπάθειες για την ανίχνευση χρωμοσωματικών διαταραχών στηρίχθηκαν στις κλασικές κυτταρογενετικές τεχνικές. Μειονεκτήματα των ανωτέρω τεχνικών είναι: **1)** η ανάγκη για παρουσία ικανού αριθμού μεταφάσεων καλής ποιότητας και **2)** η αδυναμία αναγνώρισης διαταραχών που αφορούν σχετικά μικρές περιοχές του γενετικού υλικού. Στην περίπτωση της ΧΛΛ, όπως έχει ήδη προαναφερθεί, η πλειοψηφία των λευχαιμικών κυττάρων βρίσκεται σε φάση G₀ και ένα ελάχιστο ποσοστό των κυττάρων βρίσκονται σε φάση διαίρεσης. Έτσι, οι πρώτες προσπάθειες κυτταρογενετικής μελέτης της ΧΛΛ απέτυχαν εξαιτίας της μη ύπαρξης μεταφάσεων⁽¹⁷²⁾.

Τα πρώτα εμπόδια ξεπεράσθηκαν με την εισαγωγή ειδικών μιτογόνων των Β-λεμφοκυττάρων, όπως π.χ. ΤΡΑ, pokeweed mitogen, anti-CD40 αντισώματα, λιποπολυσακχαρίδη, αυξητικός παράγοντας των Β-κυττάρων κλπ. Όλοι οι ανωτέρω παράγοντες, όταν προστεθούν σε βραχείες λεμφοκυτταρικές καλλιέργειες, παρουσιάζουν την ιδιότητα να διεγείρουν τα Β-κύτταρα προς διαίρεση, με αποτέλεσμα να καθίσταται εφικτή η παρουσία ικανού αριθμού μεταφάσεων⁽¹¹⁵⁾.

Με την χρησιμοποίηση των ειδικών μιτογόνων έγινε δυνατό να ανιχνευθούν κλωνικές χρωμοσωματικές διαταραχές σε 40% με 50% επί του συνόλου των περιπτώσεων. Παρά την αναμφισβήτητη βελτίωση της τεχνικής, σημαντικός αριθμός ασθενών παρουσίαζε μόνο φυσιολογικές μεταφάσεις. Με την εφαρμογή ανοσοφαινοτυπικών τεχνικών διαπιστώθηκε ότι η πλειοψηφία των φυσιολογικών μεταφάσεων αφορούσε Τ-λεμφοκύτταρα, παρά την χρησιμοποίηση των ειδικών Β-μιτογόνων⁽⁹⁾.

ΦΘΟΡΙΖΩΝ IN-SITU ΥΒΡΙΔΙΣΜΟΣ

Σημαντική πρόοδος στον τομέα επετεύχθη με την εισαγωγή της εργαστηριακής μεθόδου του φθορίζοντος in-situ υβριδισμού (FISH). Η μέθοδος στηρίζεται στην ύπαρξη ειδικών προκατασκευασμένων νουκλεοτιδικών αλληλουχιών, συμπληρωματικών με συγκεκριμένες χρωμοσωματικές περιοχές (probes). Οι probes είναι εκ των προτέρων σημασμένοι με φθορίζουσες χρωστικές έτσι, ώστε να δίδουν ορισμένο χρώμα όταν ειδωθούν με μικροσκόπιο ανοσοφθορισμού. Το γενετικό υλικό των υπό μελέτη κυττάρων υβριδίζεται με από πριν επιλεγμένους probes, οι οποίοι έχουν συνδεθεί με διαφορετικά φλουοροχρώματα. Με την μέθοδο FISH είναι δυνατό να αναγνωρισθούν, τόσο αριθμητικές όσο και δομικές χρωμοσωματικές ανωμαλίες^(147, 148).

Σημαντικά πλεονεκτήματα της μεθόδου είναι: **1)** για την εφαρμογή της τεχνικής δεν απαιτείται η παρουσία μεταφάσεων, αφού ο υβριδισμός των probes επιτελείται και επί κυτταρικών πυρήνων, που βρίσκονται σε μεσόφαση. Σαν αποτέλεσμα της δυνατότητας αυτής η τεχνική FISH αποτελεί την πλέον προσφιλή μέθοδο μελέτης της ΧΛΛ και **2)** η τεχνική FISH δύναται να ανιχνεύσει διαταραχές που αφορούν πολύ μικρά τμήματα του γενετικού υλικού έκτασης ολίγων kb, σε αντίθεση με τις κλασικές κυτταρογενετικές μεθόδους, που ανιχνεύουν βλάβες μεγέθους αρκετών Mb.

Μειονεκτήματα της τεχνικής FISH είναι: **1)** αδυναμία ανίχνευσης ταυτόχρονα πολλών βλαβών, αφού ο αριθμός των διαθέσιμων φλουοροχρωμάτων είναι περιορισμένος, **2)** η δυνατότητα ανίχνευσης μόνο των βλαβών που έχουν εκ των προτέρων πιθανολογηθεί έτσι, ώστε να γίνει επιλογή των κατάλληλων probes και **3)** η μέθοδος είναι πολύπλοκη και δαπανηρή έτσι, ώστε δύναται να εφαρμοσθεί από περιορισμένο αριθμό εργαστηρίων.

Με την εφαρμογή της FISH γενετικές βλάβες ανιχνεύονται περίπου στο 80% των περιπτώσεων ασθενών με ΧΛΛ. Οι πιο συχνές χρωμοσωματικές διαταραχές που ανιχνεύονται σε ασθενείς με ΧΛΛ είναι: ελλείμματα στο 13q, ελλείμματα στο 11q, τρισωμία 12, ελλείμματα στο 6q, ελλείμματα στο 17p, αναδιατάξεις του 14q, κλπ. Στις παρακάτω παραγράφους θα γίνει πιο αναλυτική περιγραφή των συχνότερων γενετικών διαταραχών που παρατηρούνται σε ασθενείς με ΧΛΛ.

ΕΛΛΕΙΜΜΑΤΑ ΣΤΟ 13q14

Ελλείμμα στο μακρό σκέλος του χρωμοσώματος 13 έχει διαπιστωθεί στο 10% περίπου των περιπτώσεων ΧΛΛ, με τις συμβατικές κυτταρογενετικές τεχνικές⁽²¹¹⁾. Με την τεχνική FISH έχει βρεθεί ότι ελλείμματα στην περιοχή 13q14 αποτελούν την πιο συχνή κυτταρογενετική ανωμαλία που απαντάται στο 50% περίπου των ασθενών με ΧΛΛ⁽⁹⁾. Η παρουσία ελλειμμάτων του γενετικού υλικού θέτει πάντοτε στους ερευνητές την υποψία ότι στην

περιοχή του ελλείμματος πιθανό να εδράζεται κάποιο εκ των ογκοκατασταλτικών γονιδίων, η απουσία του οποίου να συμμετέχει στην πρόκληση της νεοπλασματικής διαταραχής. Βέβαια, στις περιπτώσεις αυτές πάντοτε αναζητούνται μεταλλάξεις που αδρανοποιούν το έτερο αλληλίο έτσι, ώστε να παρατηρείται πλήρης έλλειψη της έκφρασης του υπεύθυνου ογκοκατασταλτικού γονιδίου.

Στην συγκεκριμένη περίπτωση αρχικά θεωρήθηκε πιθανό ότι το υπεύθυνο γονίδιο είναι το γονίδιο του ρετινοβλαστώματος (Rb), που και αυτό εντοπίζεται στην εν λόγω περιοχή. Η αδρανοποίηση και των δύο αλληλίων του Rb, είτε μέσω μεταλλάξεων είτε μέσω ελλειμμάτων, είναι υπεύθυνη για την γένεση του ρετινοβλαστώματος⁽²⁶⁷⁾. Επιπλέον, η διαλληλική αδρανοποίηση του Rb συμμετέχει και στην πρόκληση ποικίλων άλλων νεοπλασιών. Νεώτερα, όμως, πειραματικά δεδομένα απέκλεισαν την ορθότητα της ανωτέρω υπόθεσης. **1)** Σε ασθενείς με ΧΛΛ και ελλείμματα στο 13q14 αναζητήθηκαν μεταλλάξεις του Rb του έτερου αλληλίου μέσω της εφαρμογής ευαίσθητων τεχνικών, όπως π.χ. SSCP. Σε καμία περίπτωση δεν διαπιστώθηκαν μεταλλάξεις που να αφορούν το έτερο αλληλίο⁽¹⁵²⁾. **2)** Μεταγενέστερες προσπάθειες για την αποκωδικοποίηση της ελάσσονος περιοχής που είναι κοινή για όλη την ποικιλία των ελλειμμάτων, απέδειξαν ότι το γονίδιο Rb βρίσκεται εκτός της περιοχής αυτής⁽²⁶⁾.

Εκτεταμένες ερευνητικές προσπάθειες δεν έχουν μέχρι σήμερα καταφέρει να αναδείξουν το υπεύθυνο ογκοκατασταλτικό γονίδιο της περιοχής 13q14. Διάφορες εξηγήσεις έχουν δοθεί:

1. Τα ελλείμματα στην περιοχή 13q14 δεν διαδραματίζουν αποφασιστικό ρόλο στην παθογένεση της ΧΛΛ, αλλά αποτελούν επιφανόμενα.
2. Είναι πιθανό στην εν λόγω περιοχή να εντοπίζονται περισσότερα από 1 υπεύθυνα γονίδια.
3. Το υπεύθυνο γονίδιο του ετέρου αλληλίου δυνατό να είναι δομικώς επαρκές, αλλά να μην εκφράζεται λόγω ύπαρξης άλλων διαταραχών, π.χ. μεθυλίωση.
4. Είναι δυνατόν η μερική αδυναμία έκφρασης κάποιου ογκοκατασταλτικού γονιδίου να επαρκεί για την πρόκληση της νεοπλασίας έτσι, ώστε να μην απαιτείται η διαλληλική αδρανοποίησή του.

ΚΛΙΝΙΚΗ ΣΗΜΑΣΙΑ ΤΟΥ ΕΛΛΕΙΜΜΑΤΟΣ 13q14

Ασθενείς που παρουσιάζουν ελλείμματα στο 13q14 έχουν ευνοϊκή πρόγνωση σε σχέση με ασθενείς που παρουσιάζουν άλλες κυτταρογενετικές διαταραχές^(114, 115).

Η συγκεκριμένη ανωμαλία χαρακτηρίζει τους ασθενείς με τυπική ΧΛΛ, αφού σχεδόν ποτέ δεν έχει παρατηρηθεί σε ασθενείς με άτυπη ΧΛΛ. Επίσης, η ανωτέρω διαταραχή παρατηρείται μόνο σε ασθενείς με τον V-mutated τύπο της ΧΛΛ.

ΕΛΛΕΙΜΜΑΤΑ ΣΤΟ 11q22-q23

Ελλείμμα στο μακρό σκέλος του χρωμοσώματος 11, αποτελεί την δεύτερη πιο συχνά παρατηρούμενη κυτταρογενετική διαταραχή επί ασθενών με ΧΛΛ. Η ανωτέρω ανωμαλία διαπιστώνεται με την εφαρμογή των κλασικών κυτταρογενετικών μεθόδων, σε λιγότερο από 10% των περιπτώσεων. Αντίθετα, με την διενέργεια της τεχνικής FISH, έλλειμμα στο 11q22-q23 ανιχνεύεται στο 20% περίπου των περιστατικών με ΧΛΛ^(73, 185). Και στην περίπτωση αυτή αναζητήθηκε το υπεύθυνο ογκοκατασταλτικό γονίδιο που εδράζεται στην περιοχή του ελλείμματος. Στην κοινή σε όλη την ποικιλία των ελλειμμάτων περιοχή εντοπίστηκε πλειάδα γονιδίων. Εξ αυτών, το περισσότερο ενδιαφέρον έχει μέχρι σήμερα εστιασθεί στην μελέτη του γονιδίου ATM της κληρονομικής νόσου «Αταξία-Τηλεαγγειεκτασία»⁽²⁷⁷⁾.

ΑΝΩΜΑΛΙΕΣ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ ΤΗΣ «ΑΤΑΞΙΑΣ-ΤΗΛΕΑΓΓΕΙΕΚΤΑΣΙΑΣ»

Η νόσος «αταξία-τηλεαγγειεκτασία» είναι κληρονομικό νόσημα, που μεταδίδεται με τον αυτοσωματικό υπολειπόμενο χαρακτήρα. Η νόσος χαρακτηρίζεται από την πρόωμη εμφάνιση παρεγκεφαλιδικής βλάβης, με αποτέλεσμα αταξικές κινητικές εκδηλώσεις, διαταραχές των οφθαλμικών κινήσεων, δερματικές τηλεαγγειεκτασίες, ανοσοανεπάρκεια ποικίλου βαθμού, αυξημένη ευαισθησία στην δράση της ιονίζουσας ακτινοβολίας και αυξημένη προδιάθεση για την ανάπτυξη νεοπλασιών του λεμφικού ιδιαίτερα συστήματος. Το υπεύθυνο γονίδιο ATM (ataxia-telangiectasia mutated) έχει εντοπισθεί στο μακρό σκέλος του χρωμοσώματος 11 και κωδικοποιεί για την πρωτεΐνη ATM. Το φάσμα των λειτουργικών δραστηριοτήτων της πρωτεΐνης ATM δεν έχει πλήρως εξακριβωθεί αλλά η βασική της λειτουργία σχετίζεται πιθανό με την επιδιόρθωση του DNA. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η εμπλοκή της ATM στην λειτουργία της πρωτεΐνης p53. Συγκεκριμένα, η πρωτεΐνη ATM διαθέτει δράση κινάσης και φωσφορυλιώνει σε θέση σερίνης την p53, με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση της τελευταίας. Έτσι, η μη έκφραση της ATM, εκτός των άλλων, συνεπάγεται και την λειτουργική ανεπάρκεια της p53. Οι ετεροζυγώτες για την ύπαρξη μεταλλάξεων του γονιδίου ATM αποτελούν το 0.5% με 1% επί του συνόλου του πληθυσμού και παρουσιάζουν αυξημένη πιθανότητα νόσησης από καρκίνωμα του μαστού και ίσως και από άλλα νεοπλάσματα⁽²⁴⁵⁾.

Η συμμετοχή του γονιδίου ATM, εκτός των πλαισίων της αναφερόμενης κληρονομικής νόσου στην πρόκληση νεοπλασματικών νοσημάτων, αποτελεί αντικείμενο εκτεταμένων μελετών. Σωματικές μεταλλάξεις και ελλείμματα που αφορούν αμφότερα τα αλληλία του ATM έχουν διαπιστωθεί σε πολύ μεγάλο αριθμό ασθενών με T-προλεμφοκυτταρική λευχαιμία (T-PLL) ⁽²⁵⁰⁾. Τα πειραματικά και επιδημιολογικά δεδομένα που συσχετίζουν τις διαταραχές του ATM με την παθογένεια της ΧΛΛ περιγράφονται κατωτέρω:

1. Από μελέτη σημαντικού αριθμού ασθενών με ΧΛΛ έχει διαπιστωθεί ότι 5% των περιπτώσεων είναι ετεροζυγώτες για μεταλλάξεις του ATM. Εάν τα αποτελέσματα αυτά επιβεβαιωθούν σε μεγαλύτερο αριθμό ασθενών τότε θα μπορεί με βεβαιότητα να διατυπωθεί η άποψη ότι οι ετεροζυγώτες για το ATM παρουσιάζουν αυξημένο κίνδυνο νόσησης από ΧΛΛ. Στην περίπτωση αυτή η συμμετοχή του ATM στην παθογένεση της ΧΛΛ καθίσταται προφανής⁽²⁵⁾.
2. Ασθενείς με ΧΛΛ και ελλείμματα στο 11q22-q23 μελετήθηκαν για την παρουσία μεταλλάξεων στο γονίδιο ATM του έτερου αλληλίου. Σε σημαντικό αριθμό περιπτώσεων (περίπου 20%) διαπιστώθηκε η παρουσία σωματικών μεταλλάξεων στο ATM του έτερου αλληλίου, με αποτέλεσμα την πλήρη κατάργηση της έκφρασης της πρωτεΐνης ATM⁽²³⁶⁾.
3. Σε ασθενείς με ΧΛΛ και ελλείμματα στο 11q22-q23 μελετήθηκε με ανοσοϊστοχημεία η έκφραση της πρωτεΐνης ATM στο κυτταρόπλασμα των λευχαιμικών κυττάρων. Σε σημαντικό αριθμό περιπτώσεων διαπιστώθηκε πλήρης απουσία της έκφρασης της ATM⁽²⁴⁶⁾.
4. Τα ανωτέρω δεδομένα υποδηλώνουν ότι το φυσιολογικό γονίδιο ATM έχει δράση ογκοκατασταλτικού γονιδίου και η διαταραχή του οποίου συμμετέχει στην παθογένεια της νόσου σε κάποια, τουλάχιστον, υποομάδα ασθενών με ΧΛΛ.

ΚΛΙΝΙΚΗ ΣΗΜΑΣΙΑ ΤΩΝ ΕΛΛΕΙΜΜΑΤΩΝ 11q22-q23

Ασθενείς με ΧΛΛ και ελλείμματα στο μακρό σκέλος του χρωμοσώματος 11 παρουσιάζουν ιδιότυπη κλινική συμπεριφορά^(73, 185).

1. Συνήθως πρόκειται για ασθενείς με μέση ηλικία έναρξης νόσου, μικρότερης του συνηθισμένου⁽⁶³⁾.
2. Οι ασθενείς αυτοί συνήθως διαγιγνώσκονται σε προχωρημένα στάδια νόσου⁽⁷¹⁾.

3. Παρουσιάζουν εκτεταμένη λεμφαδενοπάθεια, με αδένες μεγάλης διαμέτρου, ενώ ιδιαίτερα συχνή είναι η παρουσία διογκωμένων ενδοκοιλιακών και λεμφαδένων μεσοθωρακίου⁽⁶³⁾.
4. Εμφανίζουν ταχεία πρόοδο νόσου και κατόπιν επιτυχούς θεραπείας το διάστημα χωρίς πρόοδο νόσου είναι, συνήθως, βραχείας διάρκειας⁽⁶³⁾.
5. Η προγνωστική σημασία του ελλείμματος στο 11q είναι άμεσα εξαρτώμενη από την ηλικία των ασθενών. Πιο συγκεκριμένα, ασθενείς ηλικίας <55 ετών έχουν σημαντικά μικρότερη ολική επιβίωση. Αντίθετα, ασθενείς >55 ετών, με ελλείμματα στο 11q, δεν παρουσιάζουν μικρότερη επιβίωση σε σχέση με ασθενείς χωρίς αντίστοιχα ελλείμματα. Δεν είναι γνωστός ο λόγος για την διαφορετική προγνωστική σημασία της συγκεκριμένης γενετικής βλάβης σε ασθενείς διαφορετικών ηλικιακών ομάδων⁽⁶³⁾.

Η σημασία της ανίχνευσης, επομένως, ελλειμμάτων στο 11q σε νεαρό ασθενή είναι προφανής. Στους ασθενείς αυτούς θα πρέπει να προσφέρεται η δυνατότητα πιο επιθετικών θεραπευτικών μεθόδων, όπως αλλογενής μεταμόσχευση αιμοποιητικών κυττάρων κλπ.

ΤΡΙΣΩΜΙΑ 12

Η τρισωμία 12 είναι από τις πρώτες κυτταρογενετικές διαταραχές που διαπιστώθηκαν σε ασθενείς με ΧΛΛ. Είναι η τρίτη σε συχνότητα ανίχνευσης χρωμοσωματική βλάβη. Με την εφαρμογή τεχνικής FISH διαπιστώνεται στο 15% με 20% περίπου του συνόλου των ασθενών με ΧΛΛ⁽⁷²⁾. Σε αρκετές περιπτώσεις ανιχνεύεται στα πλαίσια σύνθετων χρωμοσωματικών διαταραχών. Έχουν μέχρι σήμερα ανακοινωθεί και αρκετές περιπτώσεις με μερική τρισωμία του χρωμοσώματος 12. Από την μελέτη αυτών των περιστατικών έχει διαπιστωθεί ότι η κριτική περιοχή που ανευρίσκεται μόνιμα διπλασιασμένη επί όλων των περιπτώσεων αφορά τις ζώνες 12q13-q21.2. Είναι πιθανό ότι στην ανωτέρω περιοχή εδράζεται κάποιο ογκογονίδιο, η διαταραχή του οποίου να συμμετέχει στην παθογένεια της νόσου. Αρκετά εν δυνάμει ογκογονίδια εντοπίστηκαν στην περιοχή 12q13-q21.2 όπως τα γονίδια που κωδικοποιούν για τις κινάσες 2 και 4 εξαρτώμενες των κυκλινών, το γονίδιο που κωδικοποιεί για την ιντερφερόνη-γ καθώς και το γονίδιο MDM-2 (murine double-minute 2)⁽¹⁶⁹⁾. Από αυτά το ενδιαφέρον εστιάσθηκε στο γονίδιο MDM-2, το οποίο παράγει πρωτεΐνες οι οποίες αναστέλλουν την λειτουργία της πρωτεΐνης p53. Η λειτουργική δράση των πρωτεϊνών MDM-2 καθιστά προφανές το ενδιαφέρον των ερευνητών για την περαιτέρω μελέτη της.

Πράγματι, διαπιστώθηκε ότι υπερέκφραση του γονιδίου MDM-2 ανιχνεύεται σε μεγάλο ποσοστό ασθενών με ΧΛΛ, χωρίς όμως οι περιπτώσεις αυτές να συνοδεύονται από διπλασιασμό του γονιδίου. Η κλινική σημασία της ανωτέρω παρατήρησης είναι άγνωστη και αποτελεί αντικείμενο μελλοντικών ερευνών⁽¹⁰¹⁾.

ΚΛΙΝΙΚΗ ΣΗΜΑΣΙΑ ΤΗΣ ΤΡΙΣΩΜΙΑΣ 12

Η κλινική σημασία της ανίχνευσης της τρισωμίας 12 καθίσταται προφανής από το γεγονός ότι κατά κανόνα παρατηρείται σε μία παραλλαγή της ΧΛΛ, την αποκαλούμενη άτυπη ΧΛΛ. Η άτυπη ΧΛΛ χαρακτηρίζεται από την παρουσία στο περιφερικό αίμα λεμφοκυττάρων με ιδιάζοντα μορφολογικά ευρήματα. Η παραλλαγή της νόσου περιγράφεται πιο αναλυτικά σε επόμενες παραγράφους. Οι κλινικές παρατηρήσεις που αφορούν την τρισωμία 12 συνοψίζονται κατωτέρω:

1. Η ανίχνευση της τρισωμίας 12 είναι αρκετά σπάνια σε περιπτώσεις με τυπική ΧΛΛ (λιγότερο από 10% επί του συνόλου των περιστατικών)⁽¹⁵⁸⁾.
2. Αντίθετα, η ανίχνευση της τρισωμίας 12 είναι εξαιρετικά συνήθης σε ασθενείς με άτυπη ΧΛΛ (περίπου στο 50% επί του συνόλου των περιπτώσεων)⁽¹⁵⁸⁾.
3. Η ανίχνευση της τρισωμίας 12 συνήθως συνοδεύεται και από την παρουσία άτυπων ανοσοφαινοτυπικών ευρημάτων (έκφραση του δείκτη FMC7 και ισχυρή έκφραση της ανοσοσφαιρίνης επιφανείας sIg)⁽²¹⁶⁾.
4. Η ανίχνευση της τρισωμίας 12 συνήθως ανιχνεύεται σε ασθενείς με προχωρημένα στάδια νόσου⁽¹⁵⁸⁾.
5. Η ανίχνευση της τρισωμίας 12 δεν συνοδεύεται από μείωση της ευαισθησίας των λευχαιμικών κυττάρων στην χορήγηση αναλόγων των πουρινών.
6. Η παρουσία της τρισωμίας 12 αποτελεί ανεξάρτητο δείκτη, με δυσμενή προγνωστική σημασία. Ασθενείς με τρισωμία 12 έχουν την τάση να παρουσιάζουν μικρότερα διαστήματα χωρίς πρόοδο νόσου και μικρότερη ολική επιβίωση⁽¹⁵⁸⁾.

ΕΛΛΕΙΜΜΑΤΑ ΣΤΟ 6q

Ελλείμματα στο μακρό σκέλος του χρωμοσώματος 6 ανιχνεύονται σε 6% με 9% περίπου επί του συνόλου των περιπτώσεων ασθενών με ΧΛΛ. Σε σημαντικό αριθμό περιπτώσεων ελλείμματα στο 6q διαπιστώνονται στα πλαίσια σύνθετων χρωμοσωματικών διαταραχών. Μελέτες με την χρήση της τεχνικής FISH έχουν δείξει ότι πιο συχνά τα ελλείμματα αφο-

ρούν την ζώνη 6q21⁽⁷²⁾. Είναι ενδιαφέρον ότι η ανωτέρω διαταραχή ανιχνεύεται αρκετά πιο συχνά σε ασθενείς με μικρό λεμφοκυτταρικό λέμφωμα, νόσημα που αποτελεί το λεμφοματικό αντίστοιχο της ΧΛΛ⁽¹⁹⁰⁾. Μέχρι σήμερα δεν έχει βρεθεί ογκοκατασταλτικό γονίδιο που να εντοπίζεται στην περιοχή του ελλείμματος και η διαταραχή του οποίου να συσχετίζεται με την παθογένεια της ΧΛΛ. Η ανίχνευση της ανωτέρω χρωμοσωματικής διαταραχής, όταν αυτή διαπιστώνεται σαν μεμονωμένο εύρημα, δεν διαθέτει προγνωστική σημασία⁽²⁴⁹⁾.

ΕΛΛΕΙΜΜΑΤΑ ΣΤΟ 17p13

Ελλείμματα στο βραχύ σκέλος του χρωμοσώματος 17 έχουν αναδειχθεί με συμβατικές κυτταρογενετικές τεχνικές στο 4% περίπου των ασθενών με ΧΛΛ. Με την εφαρμογή της τεχνικής FISH μονοαλληλικά ελλείμματα του 17p έχουν ανιχνευθεί στο 10% περίπου του συνόλου των ασθενών με ΧΛΛ⁽⁷²⁾. Στην περιοχή 17p εντοπίζεται το γονίδιο p53, η σημασία του οποίου στην παθογένεια των νεοπλασιών είναι γνωστή και μελετημένη σε μεγάλη έκταση.

Η ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ ΤΗΣ p53

Το γονίδιο p53 κωδικοποιεί για την παραγωγή της πρωτεΐνης p53, η οποία διαδραματίζει κεντρικό ρόλο στην ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου και στην ικανότητα του κυττάρου να επιδιορθώνει βλάβες του γενετικού του υλικού. Η πρωτεΐνη p53 παράγεται όταν εμφανισθούν βλάβες στο γενετικό υλικό του κυττάρου, που προκλήθηκαν είτε τυχαία είτε κατόπιν της επιδράσεως παραγόντων, όπως ιονίζουσα ακτινοβολία ή χημειοθεραπευτικοί παράγοντες. Η παραγόμενη πρωτεΐνη p53 αθροίζεται στον πυρήνα του κυττάρου και επηρεάζει την μεταγραφή γονιδίων, όπως του αναστολέα των κυκλινοεξαρτώμενων κινασών p21, του Bcl-2, του Bax, κλπ⁽²¹⁰⁾. Η παραγωγή της πρωτεΐνης p21 έχει σαν αποτέλεσμα την αναστολή στην εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου, δίνοντας έτσι στο κύτταρο το χρονικό περιθώριο να επιτύχει την επιδιόρθωση της βλάβης. Επί αδυναμίας επιδιόρθωσης της βλάβης η αναστολή του Bcl-2 και η επαγωγή του Bax οδηγούν το κύτταρο σε απόπτωση, εμποδίζοντας έτσι την μεταβίβαση της γενετικής βλάβης. Όπως ήδη ειπώθηκε σε προηγούμενες παραγράφους, η p53 ενεργοποιείται μέσω φωσφορυλιώσεως από την ATM, ενώ η λειτουργία της p53 αναστέλλεται μέσω της δράσης των πρωτεϊνών MDM-2. Από τα ανωτέρω καθίσταται σαφές ότι η μη λειτουργία της p53 σχετίζεται με τα κάτωθι:

1. Αδυναμία του κυττάρου να αποπέσει, κατόπιν εμφάνισης γενετικής βλάβης, με αποτέλεσμα την αντίσταση στην δράση χημειοθεραπευτικών παραγόντων.
2. Αδυναμία επιδιόρθωσης των γενετικών βλαβών, με αποτέλεσμα την περαιτέρω αποσταθεροποίηση του γενετικού υλικού και την εξέλιξη της νεοπλασίας.

ΔΙΑΤΑΡΑΧΕΣ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ p53 ΣΤΗΝ ΧΡΟΝΙΑ ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΛΕΥΧΑΙΜΙΑ

Εκτός από τα ελλείμματα στην ζώνη 17p13, διαταραχές της πρωτεΐνης p53 δύναται να προκύψουν και μέσω μεταλλάξεων του αντίστοιχου γονιδίου. Σε ασθενείς με ΧΛΛ έχει γίνει αναζήτηση μεταλλάξεων του p53 μέσω της διενέργειας μοριακών τεχνικών. Συγκεκριμένα, με την εφαρμογή SSCP (single strand conformation polymorphisms), έχει διαπιστωθεί η παρουσία σημειακών μεταλλάξεων του p53 στο 10% με 15% του συνόλου των ασθενών με ΧΛΛ⁽⁸⁹⁾. Επιπλέον, ασθενείς με γνωστά ελλείμματα της ζώνης 17p13 μελετήθηκαν με SSCP για την ανίχνευση μεταλλάξεων του p53 του έτερου αλληλίου. Σε πολύ μεγάλο ποσοστό των μελετηθέντων ασθενών διαπιστώθηκε η ύπαρξη σημειακών μεταλλάξεων επί του ετέρου αλληλίου, με αποτέλεσμα την πλήρη κατάργηση της δραστηριότητας του p53⁽⁸⁸⁾. Τα αποτελέσματα αυτά είναι συμβατά με την ουσιώδη συμμετοχή των διαταραχών του ογκοκατασταλτικού γονιδίου p53 στην εξέλιξη της νόσου. Οι διαταραχές του p53 δύναται να μελετηθούν και με ανοσοϊστοχημεία ή κυτταρομετρία ροής. Όπως είναι γνωστό, η φυσιολογική πρωτεΐνη p53 δεν ανιχνεύεται στον πυρήνα των κυττάρων, εξαιτίας του πολύ μικρού χρόνου ημίσειας ζωής της. Η πλειοψηφία των σημειακών μεταλλάξεων έχουν σαν αποτέλεσμα την παραγωγή πρωτεΐνης με μακρό χρόνο ημίσειας ζωής. Στις περιπτώσεις αυτές παρατηρείται το παράδοξο να ανιχνεύεται η p53 με ανοσοϊστοχημεία ή κυτταρομετρία ροής ενώ, ταυτόχρονα, η πρωτεΐνη είναι λειτουργικά άδρανης. Η ανίχνευση, επομένως, της πρωτεΐνης p53 με τις ανωτέρω μεθόδους υποδηλώνει έμμεσα την λειτουργική ανεπάρκειά της⁽⁴³⁾. Αντίστοιχες μελέτες σε ασθενείς με ΧΛΛ έχουν αποδείξει ότι η p53 εκφράζεται στο 10% περίπου των περιπτώσεων, εύρημα που είναι σύμφωνο με τα αποτελέσματα των μελετών με SSCP.

ΚΛΙΝΙΚΗ ΣΗΜΑΣΙΑ ΤΩΝ ΔΙΑΤΑΡΑΧΩΝ ΤΟΥ p53

Η κλινική σημασία της ανίχνευσης διαταραχών του p53, ανεξάρτητα της χρησιμοποιούμενης μεθόδου (FISH, SSCP, ανοσοϊστοχημεία, κυτταρομετρία ροής) συνοψίζεται στα κάτωθι:

1. Οι διαταραχές της p53 συσχετίζονται με αυξημένη πιθανότητα αντίστασης στην θεραπεία, συμπεριλαμβανομένων και των ανάλογων των πουρινών⁽⁶¹⁾.
2. Παρατηρούνται πιο συχνά σε ασθενείς με μακρά διαδρομή της νόσου⁽⁶¹⁾.
3. Παρατηρούνται συχνά σε ασθενείς με εκτροπή της νόσου (προλεμφοκυτταρική εκτροπή, σύνδρομο Richter) ⁽¹⁴⁴⁾.
4. Αποτελούν ανεξάρτητο δείκτη εξαιρετικά δυσμενούς πρόγνωσης (Ασθενείς με διαταραχές του p53 παρουσιάζουν σημαντικά μικρότερη επιβίωση) ⁽⁶¹⁾.

ΔΙΑΤΑΡΑΧΕΣ ΤΗΣ ΖΩΝΗΣ 14q32

Οι διαταραχές στην ζώνη 14q32 κατά κανόνα οφείλονται σε αναδιατάξεις. Μία εκ των συνηθών αναδιατάξεων που αφορούν την εν λόγω ζώνη είναι η t(11;14)(q13;q32). Στην αντιμετάθεση αυτή το γονίδιο Bcl-1, που κωδικοποιεί για την κυκλίνη D1, μεταφέρεται στο χρωμόσωμα 14 και βρίσκεται υπό την επίδραση των προαγωγέων του γόνου IgH, με αποτέλεσμα την υπερέκφραση της κυκλίνης D1. Σήμερα, είναι γνωστό ότι η συγκεκριμένη αντιμετάθεση αποτελεί χαρακτηριστικό γνώρισμα του λεμφώματος από κύτταρα του μανδύα MCL (mantle-cell lymphoma) ⁽²⁰⁾. Θεωρείται πιθανό ότι οι αρχικώς περιγραφείσες περιπτώσεις ασθενών με ΧΛΛ με την αντιμετάθεση t(11,14) στην πραγματικότητα αφορούσαν περιστατικά με MCL. Η υπόθεση αυτή επιβεβαιώθηκε από πρόσφατη εργασία κατά την οποία ανιχνεύθηκε, με την τεχνική Southern, η ύπαρξη αναδιατάξεων του γονιδίου Bcl-1 σε ασθενείς με ΧΛΛ. Σε καμία περίπτωση δεν διαπιστώθηκε αναδιάταξη του Bcl-1⁽²⁰⁾.

Η αντιμετάθεση t(14;18)(q32;) που αποτελεί χαρακτηριστικό εύρημα των οζωδών λεμφωμάτων σε πολύ σπάνιες περιπτώσεις έχει ανιχνευθεί σε ασθενείς με επιβεβαιωμένη ΧΛΛ. Μάλιστα, οι σπάνιες αυτές περιπτώσεις συνήθως αφορούν ασθενείς με άτυπη ΧΛΛ. Επομένως, η αιτία της παρατηρούμενης υπερέκφρασης της πρωτεΐνης Bcl-2 επί των λευχαιμικών κυττάρων θα πρέπει να αναζητηθεί σε άλλες γενετικές διαταραχές⁽⁶⁶⁾.

Πρόσφατα, μία άλλη αντιμετάθεση της ζώνης 14q32 διαπιστώθηκε σε ασθενείς με λεμφοϋπερπλαστικά νοσήματα. Η αντιμετάθεση t(14;19)(q32;q13) έχει σαν αποτέλεσμα το γονίδιο Bcl-3 να φέρεται υπό την επίδραση των προαγωγέων του γονιδίου IgH, με αποτέλεσμα την υπερέκφραση του τελευταίου. Το γονίδιο Bcl-3 κωδικοποιεί για την παραγωγή πρωτεΐνης που διαθέτει δράση ενεργοποιητή μεταγραφικού παράγοντα. Η αντιμετάθεση t(14;19) έχει ανιχνευθεί σε πολύ σπάνιες περιπτώσεις ασθενών με ΧΛΛ και η κλινική της σημασία δεν είναι γνωστή⁽¹⁶⁴⁾.

ΑΛΛΕΣ ΓΕΝΕΤΙΚΕΣ ΔΙΑΤΑΡΑΧΕΣ

Σε πολύ σπάνιες περιπτώσεις ασθενών με ΧΛΛ έχουν ανιχνευθεί τρισωμία της ζώνης 3q, τρισωμία της ζώνης 8q και έλλειμμα του βραχέως σκέλους του χρωμοσώματος 9. Η κλινική σημασία των προηγούμενων διαταραχών δεν είναι γνωστή. Επίσης, σημαντικός αριθμός ασθενών με ΧΛΛ παρουσιάζουν σύνθετες χρωμοσωματικές διαταραχές. Συνήθως πρόκειται για ασθενείς με μακρά διαδρομή της νόσου. Η συγκεκριμένη διαταραχή αποτελεί ανεξάρτητο δείκτη δυσμενούς πρόγνωσης⁽⁷²⁾.

ΧΡΗΣΙΜΕΣ ΠΑΡΑΤΗΡΗΣΕΙΣ

1. Οι αναφερόμενες στις προηγούμενες παραγράφους γενετικές διαταραχές ανιχνεύονται με μεγαλύτερη συχνότητα σε ασθενείς που παρουσιάζουν πρόοδο νόσου. Επιπλέον, έχει διαπιστωθεί με την εφαρμογή της τεχνικής FISH, ότι στην πλειοψηφία των περιπτώσεων οι ανωτέρω γενετικές διαταραχές δεν ανιχνεύονται στο σύνολο των λευχαιμικών κυττάρων κάθε ασθενούς. Οι παρατηρήσεις αυτές υποδηλώνουν ότι οι συγκεκριμένες χρωμοσωματικές βλάβες δεν είναι τα πρωταρχικά αίτια της νεοπλασματικής εκτροπής, αλλά πιθανό αποτελούν δευτερογενή φαινόμενα, που σχετίζονται με την εξέλιξη της νόσου⁽¹²⁵⁾.
2. Οι γενετικές διαταραχές αποτελούν χρήσιμους προγνωστικούς παράγοντες. Από μελέτη με μεγάλο αριθμό ασθενών προκύπτουν τα κάτωθι: Ασθενείς με έλλειμμα στο 13q παρουσιάζουν την πιο μακρά επιβίωση, με μέση διάρκεια 132 μήνες. Αντίθετα, ασθενείς με έλλειμμα στο 17p παρουσιάζουν την πιο σύντομη επιβίωση, με μέση διάρκεια 32 μήνες. Οι υπόλοιποι ασθενείς παρουσιάζουν διάρκεια επιβίωσης που κυμαίνεται ενδιάμεσως των δύο ανωτέρω⁽¹²⁵⁾.
3. Γενετικές βλάβες με δυσμενή πρόγνωση ανιχνεύονται ακόμα και σε ασθενείς με πρώιμα στάδια νόσου. Η σπουδαιότητα της τεχνικής FISH καθίσταται προφανής, αφού η εφαρμογή της σε νεοδιαγνωσθέντες ασθενείς δύναται να προκαθορίσει την μελλοντική θεραπευτική στρατηγική⁽¹²⁵⁾.
4. Ασθενείς με τον VH-mutated υπότυπο της ΧΛΛ εμφανίζουν πολύ συχνά την βλάβη 13q- ενώ η ανίχνευση της βλάβης 12q+ είναι εξαιρετικά σπάνιο γεγονός. Το αντίθετο ακριβώς συμβαίνει σε ασθενείς με τον VH-unmutated υπότυπο της ΧΛΛ. Οι υπόλοι-

πες γενετικές διαταραχές ανιχνεύονται επί των δύο υπότυπων της νόσου, με την ίδια συχνότητα⁽¹²⁵⁾.

ΜΙΚΡΟΣΥΣΤΟΙΧΙΕΣ ΓΟΝΙΔΙΩΝ “GENE ARRAYS”

Με την σύγχρονη τεχνική των γονιδιακών μικροσυστοιχιών “Gene Arrays” δίδεται η δυνατότητα να μελετηθεί σε σύντομο χρονικό διάστημα η έκφραση τεράστιου αριθμού γονιδίων επί διάφορων νεοπλασματικών πληθυσμών. Η συγκεκριμένη τεχνική αποτελεί ίσως την μεγαλύτερη τεχνολογική εξέλιξη στον τομέα της μοριακής βιολογίας και αναμένεται στο μέλλον να προσφέρει χρήσιμες υπηρεσίες στην προσπάθεια να κατανοηθεί η φύση της νεοπλασματικής εξαλλαγής. Λόγω της πολύ πρόσφατης εισαγωγής της τεχνικής των “Gene Arrays” και της δυνατότητας εφαρμογής της μόνο από πλέον εξειδικευμένα εργαστήρια, οι μελέτες που αφορούν ασθενείς με ΧΛΛ είναι μέχρι στιγμής ελάχιστες. Αν και είναι πολύ νωρίς για να εξαχθούν ασφαλή συμπεράσματα, μερικές ενδιαφέρουσες παρατηρήσεις περιγράφονται κατωτέρω^(134, 228):

1. Το profile της γονιδιακής έκφρασης των λευχαιμικών κυττάρων διακρίνεται από το αντίστοιχο profile φυσιολογικών Β-λεμφοκυττάρων του περιφερικού αίματος. Πιο αναλυτικά, οι δύο κυτταρικοί πληθυσμοί διαπιστώθηκε ότι διαφέρουν στην έκφραση 80 περίπου γονιδίων από το σύνολο των 20.000 που μελετήθηκαν. Είναι πιθανό ορισμένα εξ αυτών των γονιδίων να διαδραματίζουν πρωταρχικό ρόλο στη νεοπλασματική εξαλλαγή. Η οριστική τυποποίησή τους και η μελέτη των πρωτεϊνών που αυτά τα γονίδια παράγουν, αναμένεται με εξαιρετικό ενδιαφέρον. Ήδη δύο από τα γονίδια αυτά που κωδικοποιούν για τις πρωτεΐνες TGFBR3 και Fibromodulin, αποτελούν αντικείμενο μελέτης.
2. Οι δύο υπότυποι της ΧΛΛ (VH-mutated και VH-unmutated) διαπιστώθηκε ότι διαφέρουν μεταξύ τους όσον αφορά την έκφραση πολύ περιορισμένου αριθμού γονιδίων (περίπου 30). Πιο αναλυτικά, στον VH-unmutated υπότυπο διαπιστώθηκε ότι εκφράζονται γονίδια που υπό φυσιολογικές συνθήκες εκφράζονται σε Β-λεμφοκύτταρα, που έχουν δεχθεί σήματα ενεργοποίησης μέσω του υποδοχέα BCR.
3. Δεν έχει διαπιστωθεί μέχρι στιγμής διαφορά στο profile της γονιδιακής έκφρασης μεταξύ ασθενών με διαφορετικά στάδια της νόσου.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ IV

ΚΛΙΝΙΚΗ ΕΙΚΟΝΑ - ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΑ ΕΥΡΗΜΑΤΑ - ΙΣΤΟΛΟΓΙΚΑ ΕΥΡΗΜΑΤΑ

ΚΛΙΝΙΚΗ ΕΙΚΟΝΑ

Η φυσική πορεία της ΧΛΛ χαρακτηρίζεται από την σταδιακή άθροιση του λευχαιμικού κλώνου στον μυελό των οστών, στο περιφερικό αίμα και στα λεμφικά όργανα. Επομένως, και τα κλινικά ευρήματα επί των ασθενών προσδιορίζονται από την προοδευτική ανάπτυξη γενικευμένης λεμφαδενοπάθειας, ηπατοσπληνικής διόγκωσης, μυελικής ανεπάρκειας και λεμφοκυτταρώσεως στο περιφερικό αίμα.

Μεγάλο ποσοστό ασθενών (40%-50%) δεν παρουσιάζουν παθολογικά κλινικά ευρήματα κατά την διάγνωση^(106, 196). Το γεγονός αυτό οφείλεται στην σημαντική βελτίωση των παρεχόμενων υπηρεσιών υγείας, με αποτέλεσμα η διάγνωση να τίθεται συνήθως σε πολύ αρχικά στάδια, με την αφορμή τυχαίας ανεύρεσης λεμφοκυττάρωσης στο περιφερικό αίμα, στα πλαίσια ελέγχων ρουτίνας.

Τα συνηθέστερα κλινικά ευρήματα είναι η λεμφαδενοπάθεια και η ηπατοσπληνική διόγκωση^(132, 192).

Η λεμφαδενοπάθεια αποτελεί το συχνότερο κλινικό εύρημα και διαπιστώνεται στο 50% περίπου των ασθενών κατά τον χρόνο της διάγνωσης. Η προσβολή των λεμφαδένων δύναται να είναι εντοπισμένη κατά τα αρχικά στάδια της νόσου. Στην πλειοψηφία όμως των περιπτώσεων, με την πρόοδο της νόσου, αναπτύσσεται συμμετρική γενικευμένη λεμφαδενοπάθεια. Οι διογκωμένοι λεμφαδένες είναι συνήθως μικρού-μέσου μεγέθους (<2cm), ελαστικοί, υπόσκληροι, ανώδυνοι, ευκίνητοι και ευχερώς διαχωριζόμενοι. Με την πρόοδο της νόσου και ιδίως επί περιπτώσεων ανθεκτικών στην χορηγούμενη θεραπεία, το μέγεθος των λεμφαδενικών διογκώσεων βαθμιαία αυξάνεται και δυνατόν να σχηματιστούν ευμεγέθη block λεμφαδένων, συμφυομένων μεταξύ των^(126, 132). Επίσης, με την εφαρμογή απεικονιστικών ακτινολογικών τεχνικών, συχνά διαπιστώνεται η ύπαρξη διογκωμένων ενδοκοιλιακών και μεσοθωρακικών λεμφαδένων. Εξαιρετικά σπάνια, οι διογκωμένοι λεμφαδένες προκαλούν προβλήματα από την πίεση σε παρακείμενες ανατομικές δομές. Θα πρέπει να τονισθεί ότι η ταχεία αύξηση του μεγέθους των λεμφαδενικών διογκώσεων σε μία ανατομική περιοχή με συνοδά πιεστικά φαινόμενα θα πρέπει να εγείρει την υποψία εκτροπής σε σύνδρομο Richter⁽²²⁵⁾.

Σπληνομεγαλία διαπιστώνεται στο 25% περίπου των ασθενών κατά τον χρόνο της διάγνωσης. Ο σπλήνας είναι ανώδυνος, ελαστικός, δύναται όμως στην διαδρομή της νόσου να αποκτήσει μεγάλες διαστάσεις και να καταλάβει σχεδόν ολόκληρο το αριστερό ήμισυ της κοιλίας. Επί σημαντικού βαθμού σπληνομεγαλίας, ο ασθενής δυνατό να αιτιάται για αίσθημα «βάρους» στο αριστερό υποχόνδριο και δυσπεπτικά ενοχλήματα^(117, 132). Σπληνομεγαλία σημαντικού βαθμού, απουσία λεμφαδενοπάθειας, είναι σχετικά ασυνήθης εκδήλωση της ΧΛΛ, αν και έχουν περιγραφεί και αμιγώς σπληνικές μορφές της νόσου⁽⁵⁸⁾.

Ηπατομεγαλία είναι το λιγότερο σύνηθες εύρημα και, εάν διαπιστωθεί, είναι μικρού βαθμού, χωρίς κατά κανόνα να συνοδεύεται από διαταραχές της ηπατικής βιοχημείας⁽¹⁰⁶⁾.

Εξωλεμφαδενικές εντοπίσεις της νόσου είναι σπάνιες σε ασθενείς με ΧΛΛ.

Συχνότερα προσβαλλόμενες περιοχές είναι ο δακτύλιος του Waldayer, το δέρμα και ο υπεζωκότας. Η προσβολή του δακτυλίου του Waldayer αφορά συχνότερα τους αμυγδαλικούς ιστούς και εκφράζεται κλινικά με διόγκωση των αναφερομένων ανατομικών δομών, ενώ δεν είναι σπάνια και η παρουσία διήθησης επί μακροσκοπικώς υγιών ιστών⁽⁶⁾. Η προσβολή του δέρματος εκφράζεται κλινικά με την παρουσία γενικευμένου κηλιδοβλατιδώδους εξανθήματος, πλακών ή και ογκόμορφων εξεργασιών^(18, 36). Η προσβολή του υπεζωκότος εμφανίζεται με την παρουσία εξιδρωματικής υπεζωκοτικής συλλογής. Εξωλεμφαδενικές εντοπίσεις σε άλλα συστήματα, όπως πεπτικό, νεφροί, πνευμονικό παρέγχυμα, οστά, κεντρικό νευρικό, είναι εξαιρετικά σπάνιες και η εμφάνισή τους σχεδόν πάντοτε επισυμβαίνει στα πλαίσια εκτροπής σε σύνδρομο Richter^(96, 225, 239).

Οι ασθενείς συνηθέστερα αιτιώνται για καταβολή, αδυναμία, εύκολη κόπωση και γενικά για συμπτώματα που σχετίζονται με τον βαθμό της αναιμίας. Β-συμπτώματα, όπως πυρετός, απώλεια βάρους και νυκτερινές εφιδρώσεις είναι εξαιρετικά σπάνιες εκδηλώσεις σε ασθενείς πρώιμων σταδίων και εμφανίζονται μόνο στο 3% περίπου εξ αυτών. Η συχνότητα της παρουσίας Β-συμπτωματολογίας αυξάνει με την πρόοδο της νόσου. Η παρουσία πυρετού δεν θα πρέπει εύκολα να αποδίδεται στην βασική νόσο, ιδίως εάν δεν έχει προηγηθεί ενδελεχής έρευνα για τον αποκλεισμό υποκείμενης λοίμωξης^(106, 126, 132, 207). Επίσης, θα πρέπει να τονισθεί ότι η παρουσία Β-συμπτωμάτων θα πρέπει να εγείρει και την υποψία εκτροπής σε σύνδρομο Richter⁽⁹⁶⁾.

Η κλινική εικόνα των ασθενών επιπλέκεται συχνά από λοιμώξεις, η συχνότητα των οποίων αυξάνει στην διαδρομή της νόσου⁽¹⁰⁶⁾.

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΑ ΕΥΡΗΜΑΤΑ

Αύξηση του αριθμού των λευκών αιμοσφαιρίων, με παρουσία απολύτου λεμφοκυτταρώσεως, εξ ορισμού παρατηρείται επί όλων των ασθενών με ΧΛΛ από τον χρόνο της διάγνωσης. Ο αριθμός των λευκών ποικίλει και δυνατό να κυμαίνεται από 10.000/μλ έως και >200.000/μλ. Κατά τον χρόνο της διάγνωσης, στο 70% περίπου των ασθενών, ο αριθμός των λευκών αιμοσφαιρίων δεν ξεπερνά τις 50.000/μλ, στην διαδρομή όμως της νόσου παρατηρείται βαθμιαία αύξηση σε υψηλά επίπεδα^(59, 207). Το σύνδρομο της υπερλευκοκυτταρώσεως είναι εξαιρετικά σπάνιο σε ασθενείς με ΧΛΛ, ακόμα και σε επίπεδα λευκών >200.000/μλ.

Οι απόλυτοι αριθμοί των ουδετερόφιλων και μονοκυττάρων είναι φυσιολογικοί στα αρχικά στάδια της νόσου, τείνουν όμως να μειώνονται με την πρόοδο της νόσου, σαν αποτέλεσμα της διήθησης του μυελού των οστών.

Αναιμία με τιμές Hb<11gr/dl εμφανίζεται στο 10%-20% περίπου των ασθενών κατά τον χρόνο της διάγνωσης, στην εξέλιξη όμως της νόσου θα παρουσιασθεί επί όλων των ασθενών⁽¹⁹⁶⁾. Η αιτιολογία της αναιμίας είναι πολυπαραγοντική και δύναται να αποδοθεί:

1. Σε κεντρική μείωση της παραγωγής των ερυθρών αιμοσφαιρίων, λόγω της διήθησης του μυελού των οστών.
2. Σε φαινόμενο υπερσπληνισμού, σαν αποτέλεσμα της αύξησης του μεγέθους του σπληνός⁽⁵²⁾.
3. Σε αυξημένη καταστροφή των ερυθρών στην περιφέρεια (αιμόλυση), εξαιτίας της ανάπτυξης αυτοάνοσου μηχανισμού⁽¹⁶²⁾.
4. Η παρατηρούμενη αναιμία δυνατό να έχει χαρακτηριστικά αναιμίας χρόνιου νοσήματος (συσχέτιση με τα υψηλά επίπεδα TNF που παρατηρούνται στον ορό των ασθενών)⁽¹⁶⁵⁾.

Θρομβοπενία με τιμές αιμοπεταλίων <100.000/μλ είναι σπάνιο εύρημα στην έναρξη της νόσου και εμφανίζεται στο 10%-15% περίπου των ασθενών. Η αιτιολογία της θρομβοπενίας, όπως και της αναιμίας, είναι πολυπαραγοντική και δύναται να αποδοθεί στις παρακάτω αιτίες:

1. Στην κεντρική μείωση της παραγωγής αιμοπεταλίων, εξαιτίας της διήθησης του μυελού των οστών.
2. Σε σπληνικό εγκλωβισμό (υπερσπληνισμός) στον διογκωμένο σπλήνα⁽⁵²⁾.

3. Σε αυξημένη καταστροφή των αιμοπεταλίων στην περιφέρεια, λόγω ανάπτυξης ανοσοποιητικού μηχανισμού.

Ο βιοχημικός έλεγχος δεν αναδεικνύει ευρήματα που να χαρακτηρίζουν την ΧΛΛ. Ορισμένοι εκ των ασθενών δύναται να παρουσιάσουν αυξημένη LDH, β2-ικροσφαιρίνη και οι δύο αυτοί δείκτες διαθέτουν προγνωστική αξία. Αύξηση του ουρικού οξέος δυνατό να παρατηρηθεί σε ασθενείς με πολύ μεγάλο φορτίο νόσου και ιδίως μετά από επιτυχή αντινεοπλασματική αγωγή. Σπάνια έχει περιγραφεί υπερασβεστιαμία σε ασθενείς με προχωρημένα στάδια νόσου. Η αιτιολογία της υπερασβεστιαμίας αποδίδεται στην παραγωγή ουσιών, με δράση παραθορμόνης (parathormone-like) ή με δράση παράγοντα που ενεργοποιεί τους οστεοκλάστες (osteoclast-activating factor), από τον λευχαιμικό κλώνο. Οι ασθενείς με υπερασβεστιαμία παρουσιάζουν πτωχή πρόγνωση⁽²⁴²⁾.

Ο απεικονιστικός ακτινολογικός έλεγχος με CT-scans είναι χρήσιμος για την σταδιοποίηση και παρακολούθηση των ασθενών, αφού δύναται να αναδείξει την παρουσία διογκωμένων ενδοκοιλιακών και μεσοθωρακικών λεμφαδένων σε ασθενείς χωρίς περιφερική λεμφαδενοπάθεια. Επίσης, χαρακτηριστικά αναφέρεται ότι επί ηπατοσπληνικής διογκώσεως η ακτινομορφολογία των εν λόγω οργάνων είναι ομοιογενής, χωρίς την παρουσία απεικονιστικών ελλειμμάτων.

ΙΣΤΟΛΟΓΙΚΑ ΕΥΡΗΜΑΤΑ

Η ιστολογική μελέτη σε ασθενείς με ΧΛΛ αφορά κατά σειρά συχνότητας τον μυελό των οστών, λεμφαδένες, τον σπλήνα, το ήπαρ. Τα ιστολογικά ευρήματα περιγράφονται κατωτέρω:

1. **Λεμφαδένας:** Η ιστολογική μελέτη λεμφαδένα δεν αποτελεί πρακτική ρουτίνας για την διάγνωση της ΧΛΛ. Η βιοψία λεμφαδένα είναι πολύ χρήσιμη σε περιπτώσεις όπου η διάγνωση δεν είναι ασφαλής με τα υπόλοιπα μέσα ή όταν υπάρχει υποψία εκτροπής σε σύνδρομο Richter^(154, 266).

Ιστολογικά παρατηρείται πλήρης κατάργηση της αρχιτεκτονικής δομής του λεμφαδένα. Ο λεμφαδένας είναι διηθημένος από λεμφικά κύτταρα μικρού μεγέθους, με στρογγυλό πυρήνα, συμπαγή δομή χρωματίνης, απουσία πυρηνίων και ελάχιστο πρωτόπλασμα. Μεταξύ των μικρών κυττάρων διαπιστώνεται η παρουσία μεγαλύτερων κυττάρων με αραιοχρωματικό πυρήνα, πολλαπλά πυρήνια και ελαφρώς περισσότερο πρωτόπλασμα. Τα κύτταρα αυτά ονομάζονται παραανοσοβλάστες (paraimmunoblasts) και διατάσσονται σε αθροίσεις, δίνοντας έτσι την εντύπωση ψευδοζώδους προτύπου ανάπτυ-

ξης. Οι αθροίσεις αυτές αποτελούν κέντρα με υψηλή μιτωτική δραστηριότητα και περιγράφονται σαν κέντρα πολλαπλασιασμού (proliferation centers). Ανοσοφαινοτυπικά, τόσο τα μικρά όσο και τα μεγάλα κύτταρα, εκφράζουν χαρακτηριστικά Β-λεμφοκυττάρων. Συνήθως δεν παρατηρείται αξιόλογη λεμφοπλασματοκυτταρική διαφοροποίηση.

Η ιστολογική εικόνα που περιγράφεται ανωτέρω αφορά τόσο την ΧΛΛ όσο και το μικρό λεμφοκυτταρικό λέμφωμα (small lymphocytic lymphoma). Θα πρέπει να τονισθεί ότι τα δύο νοσήματα δεν δύναται να διακριθούν σε ιστολογικό επίπεδο και, για τον σκοπό αυτό, απαραίτητη είναι η αιματολογική εικόνα του περιφερικού αίματος⁽¹¹⁰⁾.

2. **Μυελός των οστών:** Η οστεομυελική βιοψία είναι απαραίτητο να εκτελείται σε κάθε ασθενή με ΧΛΛ, τόσο για την διαγνωστική όσο και για την προγνωστική της αξία. Επίσης, η βιοψία μυελού είναι ιδιαίτερος χρήσιμη και στις περιπτώσεις που αναζητείται η ερμηνεία των κυτταροπενιών (διήθηση, υπερσπληνισμός).

Όπως και στην περίπτωση του λεμφαδένα, παρατηρείται ποικίλου βαθμού διήθηση από μικρά ώριμα λεμφοκύτταρα. Η παρουσία των κέντρων πολλαπλασιασμού είναι λιγότερο εμφανής στον μυελό των οστών, σε σχέση με τον λεμφαδένα. Ο βαθμός της παρουσίας των κέντρων πολλαπλασιασμού δεν συσχετίζεται με την παρουσία προλεμφοκυττάρων στο περιφερικό αίμα.

Τέσσερα πρότυπα διήθησης του μυελού αναγνωρίζονται σε ιστολογικό επίπεδο^(204, 205, 230):

- Οζώδους τύπου διήθηση (nodular). Ανευρίσκεται με συχνότητα 5%. Χαρακτηρίζεται από την παρουσία διηθημάτων που λαμβάνουν οζώδη διαμόρφωση μεταξύ των υγιών αιμοποιητικών στοιχείων.
- Διάμεσου τύπου διήθηση (interstitial). Ανευρίσκεται με συχνότητα 35%. Τα λευχαιμικά λεμφοκύτταρα διατάσσονται μεταξύ των αιμοποιητικών μυελικών στοιχείων, τα οποία είναι ευχερώς αναγνωρίσιμα.
- Μικτό πρότυπο διήθησης (nodular and interstitial). Ανευρίσκεται με συχνότητα 25%. Αποτελεί συνδυασμό των δύο ανωτέρω προτύπων διήθησης του μυελού των οστών.
- Διάχυτο πρότυπο διήθησης (diffuse). Ανευρίσκεται με συχνότητα 35%. Παρατηρείται πλήρης κατάληψη των μυελικών κοιλοτήτων από τον λευχαιμικό κλώνο, με πλήρη εξάλειψη του αιμοποιητικού μυελού αλλά και του λίπους.

Το πρότυπο διήθησης του μυελού αποτελεί ανεξάρτητο παράγοντα, με ισχυρή προγνωστική αξία. Έχει αποδειχθεί ότι η παρουσία διάχυτου προτύπου διήθησης συσχετίζεται στατιστικά με μειωμένη ολική επιβίωση, σε σύγκριση με τα υπόλοιπα πρότυπα διήθησης^(161, 198, 204, 205, 230, 276).

Το οζώδες πρότυπο διήθησης παρατηρείται σπάνια κατά τον χρόνο της διάγνωσης σε ασθενείς με ΧΛΛ. Ανευρίσκεται όμως συχνά μετά από επιτυχή θεραπευτική αντιμετώπιση, με ανάλογα πουρινών και ιδίως fludarabine⁽¹⁶⁰⁾.

Θα πρέπει να τονισθεί ότι στην περίπτωση οζωδών διηθημάτων σχεδόν ουδέποτε παρατηρείται παραδοκιδώδης εντόπιση. Επί ανευρέσεως παραδοκιδωδών εντοπίσεων θα πρέπει να οδηγηθούμε σε κατεύθυνση άλλου Non-Hodgkin λεμφώματος και δη follicular⁽¹⁶⁰⁾.

3. **Σπλήνας:** Σπληνεκτομή ουδέποτε επιτελείται, για διαγνωστικούς λόγους, σε ασθενείς με ΧΛΛ. Θεραπευτικά εκτελείται σπληνεκτομή στις κάτωθι περιπτώσεις:

- Σε περιπτώσεις είτε αυτοανόσου αιμολυτικής αναιμίας είτε αυτοανόσου θρομβοπενικής πορφύρας, οι οποίες παρουσιάζουν ανθεκτικότητα στην χορήγηση κορτικοστεροειδών.
- Σε περιπτώσεις μαζικής σπληνομεγαλίας, η οποία δεν ανταποκρίνεται στην αντινεοπλασματική αγωγή και προκαλεί έντονα πιεστικά φαινόμενα από τις παρακείμενες ανατομικές δομές.
- Σε περιπτώσεις σπληνομεγαλίας και κυτταροπενιών, οι οποίες έχουν αποδοθεί σε υπερσπληνισμό.

Ιστολογικά παρατηρείται διήθηση του λευκού πολφού, κυρίως από μικρά ώριμα λεμφοκύτταρα. Σε εκτεταμένες σπληνομεγαλίες δυνατό να παρατηρηθεί και διήθηση του ερυθρού πολφού. Επί διηθήσεως του ερυθρού πολφού παρατηρούνται συχνά έκδηλα φαινόμενα υπερσπληνισμού⁽¹⁴⁰⁾.

4. **Ήπαρ:** Βιοψία ήπατος σπανιότατα απαιτείται σε ασθενείς με ΧΛΛ. Ιστολογικά παρατηρείται διήθηση, που αφορά σχεδόν αποκλειστικά τα πυλαία διαστήματα. Αντιθέτως, πολύ σπάνια η διήθηση επεκτείνεται στα ηπατικά κολποειδή.

5. **Εξωλεμφαδενικές εστίες:** Βιοψία άλλων οργάνων ή ιστών απαιτείται μόνο επί κλινικών ευρημάτων που θέτουν την υποψία εκτροπής σε σύνδρομο Richter.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ V

ΑΝΟΣΟΑΝΕΠΑΡΚΕΙΑ - ΜΟΝΟΚΛΩΝΙΚΗ ΓΑΜΜΑΠΑΘΕΙΑ - ΑΥΤΟΑΝΟΣΕΣ ΕΚΔΗΛΩΣΕΙΣ

ΑΝΟΣΟΑΝΕΠΑΡΚΕΙΑ

Στην ΧΛΛ παρατηρείται γενικευμένη έκπτωση της ανοσιακής ικανότητας των ασθενών, που αφορά τόσο το σκέλος της κυτταρικής ανοσίας όσο και το σκέλος της χυμικής ανοσίας. Σαν αποτέλεσμα της καταστολής του ανοσοποιητικού συστήματος, η κλινική πορεία επιπλέκεται πολύ συχνά από λοιμώξεις, οι οποίες αποτελούν και την κύρια αιτία θανάτου των ασθενών αυτών. Οι λοιμώξεις είναι κυρίως μικροβιακής αιτιολογίας, όμως με την εξέλιξη της νόσου αλλά και σαν αποτέλεσμα των χορηγούμενων θεραπειών οι ασθενείς δύναται να παρουσιάσουν και ευκαιριακές λοιμώξεις από πρωτόζωα (πνευμονοκύστη *carini*), ιούς, μύκητες κλπ.

Χαρακτηριστικό εργαστηριακό εύρημα του νοσήματος αποτελεί η υπογαμμασφαιριναιμία που απαντάται σε σημαντικό ποσοστό των ασθενών με ΧΛΛ⁽²⁶¹⁾. Και οι τρεις κύριες τάξεις των ανοσοσφαιρινών (IgG, IgM, IgA) μειώνονται, όμως η ελάττωση της IgA εμφανίζεται πρώιμα, από τα αρχικά στάδια της νόσου. Η υπογαμμασφαιριναιμία αναπτύσσεται πιο συχνά σε ασθενείς με προχωρημένα στάδια νόσου, καθώς και σε ασθενείς που έχουν λάβει κυτταροτοξική θεραπεία. Σε ασθενείς με ήδη εγκατεστημένη υπογαμμασφαιριναιμία παρουσιάζεται η τάση να επιδεινώνεται η υπογαμμασφαιριναιμία με την πρόοδο της νόσου⁽²³¹⁾.

Η υπογαμμασφαιριναιμία δεν διορθώνεται μετά από επιτυχή θεραπευτική αγωγή, ακόμα και σε ασθενείς με πλήρη ύφεση της νόσου⁽²⁶¹⁾. Υπάρχει στατιστική συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων των γάμα-σφαιρινών και της πιθανότητας εμφάνισης λοίμωξης σε ασθενείς με ΧΛΛ⁽²³¹⁾.

Υπεργαμμασφαιριναιμία διάχυτου τύπου απαντάται σε μικρό ποσοστό ασθενών (περίπου 15%) στην έναρξη της νόσου. Η κλινική σημασία της παρατήρησης είναι άγνωστη, εκτός του ότι οι ασθενείς αυτοί σπανίως παρουσιάζουν χαμηλά επίπεδα γάμα-σφαιρινών στην διαδρομή της νόσου⁽²⁶¹⁾.

Ανεξαρτήτως των επιπέδων των γάμα-σφαιρινών, η πλειοψηφία των ασθενών συνήθως δεν αναπτύσσουν μετά από προφυλακτικούς εμβολιασμούς προστατευτικούς τίτλους αντισωμάτων⁽⁹⁹⁾.

ΜΟΝΟΚΛΩΝΙΚΗ ΓΑΜΜΑΠΑΘΕΙΑ

Μικρές μονοκλωνικές ζώνες διαπιστώνονται κατά την ηλεκτροφόρηση λευκωμάτων ορού στο 5%-10% περίπου των ασθενών με ΧΛΛ. Η μονοκλωνική πρωτεΐνη του ορού είναι προϊόν του νεοπλασματικού κλώνου και, επομένως, είναι πάντοτε ταυτόσημη με την ανοσοσφαιρίνη επιφανείας των λευχαιμικών κυττάρων. Το μονοκλωνικό κλάσμα είναι σχεδόν πάντοτε IgM τάξης και η ποσότητά του δεν ξεπερνά το 1gr/dl^(186, 202).

Με την εφαρμογή πιο ευαίσθητων τεχνικών, όπως με την διενέργεια υψηλής διαχωριστικής ικανότητας ηλεκτροφόρησης-ανοσοκαθήλωσης σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης (high resolution polyacrylamide gel electrophoresis-immunofixation), μικρές μονοκλωνικές ζώνες ανευρίσκονται στο 50% περίπου των ασθενών⁽¹²⁾.

ΑΥΤΟΑΝΟΣΕΣ ΕΚΔΗΛΩΣΕΙΣ

Αυτοάνοσες εκδηλώσεις εμφανίζονται συχνά σε ασθενείς με ΧΛΛ. Ενδιαφέρον είναι οτι τα αυτοάνοσα σύνδρομα αφορούν σχεδόν αποκλειστικά το αιμοποιητικό σύστημα. Ερευνες για την ανίχνευση αυτοαντισωμάτων σε ασθενείς απέδειξαν οτι τα παρατηρούμενα αυτοαντισώματα στρέφονται έναντι αντιγονικών δομών του αιμοποιητικού ιστού⁽¹⁰⁷⁾.

Οι συχνότερες αυτοάνοσες εκδηλώσεις περιγράφονται κατωτέρω:

1. **Αυτοάνοση αιμολυτική αναιμία.** Αυτοαντισώματα έναντι των ερυθρών (θετική άμεση αντίδραση Coombs) παρατηρούνται στο 20% περίπου των ασθενών στην πορεία της νόσου, όμως αιμολυτική αναιμία εμφανίζεται μόνο στο 10% περίπου του συνόλου των ασθενών. Η πιθανότητα εμφάνισης αυτοανόσου αιμολυτικής αναιμίας αυξάνει με την πρόοδο της νόσου^(162, 248). Επίσης, για λόγους που δεν είναι επαρκώς εξακριβωμένοι, η θεραπεία με ανάλογα πουρινών, όπως fludarabine, αυξάνει σημαντικά την πιθανότητα ανάπτυξης αιμολυτικής αναιμίας^(29, 224).

Στο 85% περίπου των περιπτώσεων τα αυτοαντισώματα είναι «θερμού» τύπου και ανήκουν στην IgG τάξη των ανοσοσφαιρινών. Τα αυτοαντισώματα είναι πολυκλωνικά, επομένως δεν αποτελούν προϊόν του λευχαιμικού κλώνου και εμφανίζουν ειδικότητα έναντι αντιγονικών επιτόπων του συστήματος Rhesus.

Στο 10% των περιπτώσεων αναπτύσσεται αυτοάνοση αιμολυτική αναιμία ψυχρού τύπου. Στις περιπτώσεις αυτές τα αυτοαντισώματα είναι IgM τάξης και η αιμόλυση είναι συνήθως ανθεκτική στην θεραπεία με κορτικοστεροειδή.

Σε μικρό ποσοστό περιπτώσεων (περίπου 5%) παρατηρείται αυτοάνοση αιμολυτική αναιμία μικρού τύπου (θερμά και ψυχρά αντισώματα).

Θα πρέπει να τονισθεί ότι η αυτοάνοση αιμολυτική αναιμία δυνατό να προηγείται της εμφάνισης της ΧΛΛ.

2. **Αυτοάνοση θρομβοπενική πορφύρα.** Σε ποσοστό περίπου 5% επί του συνόλου των ασθενών με ΧΛΛ εμφανίζεται αυτοάνοση θρομβοπενική πορφύρα (ΑΘΠ) ⁽¹⁰⁶⁾. Η θρομβοπενία δύναται να αναπτυχθεί σε οποιαδήποτε χρονική φάση της νόσου. Η πρόγνωση και η θεραπεία της ΑΘΠ είναι ταυτόσημη με αυτήν της ΑΘΠ που εμφανίζεται επί υγιών ατόμων.
3. **Αμιγής απλασία της ερυθράς σειράς.** Τα αυτοαντισώματα είναι δυνατό να κατευθύνονται έναντι των προγεννητόρων (progenitors) της ερυθράς σειράς. Οι περιπτώσεις αυτές εκδηλώνονται σαν αμιγής απλασία της ερυθράς σειράς. Η συχνότητα του συνδρόμου είναι 1%-2% ^(11, 106).
4. **Αυτοάνοση ουδετεροπενία.** Εμφανίζεται στο 1% περίπου του συνόλου των ασθενών ^(106, 247).

Άλλες αυτοάνοσες εκδηλώσεις, εκτός των προαναφερθέντων, δεν εμφανίζονται επί ασθενών με ΧΛΛ με συχνότητα μεγαλύτερη από αυτήν που παρατηρούνται στον γενικό πληθυσμό ⁽¹⁰⁶⁾.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ VI

ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΑ ΚΡΙΤΗΡΙΑ - ΚΥΤΤΑΡΟΜΟΡΦΟΛΟΓΙΚΑ ΕΥΡΗΜΑΤΑ - ΑΝΟΣΟΦΑΙΝΟΤΥΠΙΚΑ ΕΥΡΗΜΑΤΑ - ΣΥΣΤΗΜΑ ΒΑΘΜΟΛΟΓΗΣΗΣ

ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΑ ΚΡΙΤΗΡΙΑ

Συνεργαζόμενες διεθνείς ερευνητικές ομάδες θέσπισαν διαγνωστικά κριτήρια για την ασφαλή διάγνωση της ΧΛΛ. Αρχικά, η προσπάθεια αυτή επιτελέστηκε από την International Workshop on CLL (IWCLL) το 1988.

Τα διαγνωστικά κριτήρια που καθορίστηκαν από την IWCLL περιγράφονται παρακάτω⁽¹¹²⁾:

1. Εμμένουσα απόλυτος λεμφοκυττάρωση στο περιφερικό αίμα. Η μορφολογία των λεμφοκυττάρων πρέπει να είναι αυτή των μικρών ωρίμων λεμφοκυττάρων.
2. Διήθηση του μυελού από μικρά ώριμα λεμφοκύτταρα σε ποσοστό μεγαλύτερο του 30%.
3. Τα λεμφοκύτταρα πρέπει να έχουν φαινότυπο Β-κυττάρων, με ασθενή έκφραση ανοσοσφαιρίνης επιφανείας, έκφραση του CD5 και να σχηματίζουν ροζέτες με ερυθροκύτταρα ποντικού.

Εάν ο απόλυτος αριθμός των λεμφοκυττάρων του περιφερικού αίματος είναι $>10 \times 10^3/\mu\text{l}$ τότε, για την ασφαλή διάγνωση, απαιτείται και η εκπλήρωση είτε του 2^{ου} είτε του 3^{ου} κριτηρίου.

Η επιβεβαίωση της μονοκλωνικότητας του λεμφοκυτταρικού πληθυσμού δεν θεωρείται απαραίτητη από τους συγγραφείς, εάν και ενδεχομένως να είναι χρήσιμη σε κάποιες περιπτώσεις.

Λίγα χρόνια αργότερα, το Εθνικό Ιδρυμα για τον Καρκίνο των ΗΠΑ (NCI) θέσπισε ελαφρώς διαφορετικά κριτήρια για την διάγνωση της ΧΛΛ⁽³⁸⁾.

Τα διαγνωστικά κριτήρια που προσδιορίστηκαν από το NCI περιγράφονται κατωτέρω:

1. Απόλυτος λεμφοκυττάρωση στο περιφερικό αίμα $\geq 5 \times 10^3/\mu\text{l}$. Τα κύτταρα πρέπει να έχουν την μορφολογία του μικρού ώριμου λεμφοκυττάρου και η λεμφοκυττάρωση πρέπει να είναι εμμένουσα, τουλάχιστον για χρονικό διάστημα μεγαλύτερο των 4 εβδομάδων.

2. Διήθηση του μυελού από μικρά ώριμα λεμφοκύτταρα σε ποσοστό $\geq 30\%$. Ο μυελός πρέπει να έχει κυτταροβρίθεια φυσιολογική ή και αυξημένη.
3. Ανοσοφαινοτυπική απόδειξη της ύπαρξης μονοκλωνικού Β-λεμφοκυτταρικού πληθυσμού (περιορισμός ελαφρών αλύσεων) με ασθενή έκφραση ανοσοσφαιρίνης επιφανείας και ταυτόχρονη έκφραση του δείκτη CD5.

Για την ασφαλή διάγνωση απαιτείται η εκπλήρωση και των τριών κριτηρίων.

ΚΥΤΤΑΡΟΜΟΡΦΟΛΟΓΙΚΑ ΕΥΡΗΜΑΤΑ

Η μορφολογική μελέτη των λευχαιμικών λεμφοκυττάρων με το κοινό οπτικό μικροσκόπιο είναι αποφασιστικής σημασίας για την διάγνωση της ΧΛΛ, αλλά και για την διαφορική διαγνωστική από άλλα λεμφοϋπερπλαστικά νοσήματα. Επίσης, η διάκριση της «τυπικής» ΧΛΛ από τις άτυπες μορφές της νόσου στηρίζεται αποκλειστικά στην μελέτη της μορφολογίας των κυττάρων. Η καλύτερη δυνατή εκτίμηση της μορφολογίας επιτελείται με την μικροσκόπηση επιχρισμάτων περιφερικού αίματος.

Σε σχέση με την μορφολογία των λευχαιμικών κυττάρων είναι δυνατό να γίνει διάκριση της ΧΛΛ σε δύο υποομάδες:

1. **ΤΥΠΙΚΗ ΧΛΛ.** Αποτελεί περίπου το 85% επί του συνόλου των περιπτώσεων. Στην τυπική μορφή της ΧΛΛ η συντριπτική πλειοψηφία (>90%) των λευχαιμικών λεμφοκυττάρων έχουν την ακόλουθη μορφολογία⁽¹⁴⁾: πρόκειται για κύτταρα μικρού μεγέθους. Η περίμετρος του κυττάρου είναι ομαλή και η διάμετρος του είναι 1-1.5 φορές μεγαλύτερη από την διάμετρο του ερυθρού. Το κυτταρόπλασμα είναι ελάχιστο και μόλις διακριτό, ο πυρήνας είναι στρογγυλός, χωρίς εντομές. Η δομή της πυρηνικής χρωματίνης είναι συμπυκνωμένη και αποτελείται από περιοχές πολύ πυκνές, που εναλλάσσονται με πιο αραιές περιοχές (clumped). Πυρήνια δεν διακρίνονται. Μεταξύ των μικρών λεμφοκυττάρων δύναται να παρατηρηθούν και μεγαλύτερα κύτταρα, με μορφολογικά χαρακτηριστικά προλεμφοκυττάρου. Εξ ορισμού στην τυπική ΧΛΛ το ποσοστό των προλεμφοκυττάρων ή άλλων άτυπων κυττάρων είναι πάντοτε μικρότερο του 10%.

Επίσης, χαρακτηριστικό εύρημα στα επιχρίσματα περιφερικού αίματος ασθενών με ΧΛΛ είναι η παρουσία των λεγόμενων πυρηνικών σκιών (smudge or basket cells).

Το φαινόμενο (Gumprecht phenomenon) αυτό είναι artifact και οφείλεται στην καταστροφή των κυττάρων κατά την επίστρωση, λόγω αστάθειας της κυτταρικής μεμβρά-

νης⁽¹⁵⁸⁾. Η παρουσία των πυρηνικών σκιών παρατηρείται σχεδόν αποκλειστικά επί περιπτώσεων ΧΛΛ και αποτελεί χρήσιμη παρατήρηση που συμβάλλει στην διάγνωση.

2. **ΑΤΥΠΗ ΧΛΛ.** Η μορφή αυτή απαντάται περίπου στο 15% επί του συνόλου των περιπτώσεων και δύναται να διακριθεί σε δύο υποομάδες^(13, 158, 167).
 - **ΧΛΛ με αυξημένα προλεμφοκύτταρα (ΧΛΛ/ΠΛ).** Στην μορφή αυτή παρατηρούνται τα κλασικά μικρά ώριμα λεμφοκύτταρα της τυπικής μορφής της ΧΛΛ, με την διαφορά, όμως, ότι παρατηρούνται σε ποσοστό >10% και κύτταρα με χαρακτηριστικά προλεμφοκυττάρου^(13, 158, 167).

Τα προλεμφοκύτταρα είναι κύτταρα μέσου μεγέθους, με διάμετρο δύο φορές μεγαλύτερη από την διάμετρο του ερυθρού αιμοσφαιρίου. Χαρακτηρίζονται από την παρουσία μέτριας ποσότητας κυτταροπλάσματος. Ο πυρήνας έχει στρογγυλό περίγραμμα, με συμπυκνωμένη (condensed) δομή χρωματίνης και ένα ευδιάκριτο πυρήνιο. Επίσης, περιστασιακά μεταξύ των προλεμφοκυττάρων είναι δυνατό να διακριθούν και κύτταρα με μορφολογικά χαρακτηριστικά ανοσοβλάστης. Το ποσοστό των προλεμφοκυττάρων είναι συνήθως μικρότερο από 55%. Ποσοστό >55% απαντάται συνήθως μόνο στην de novo προλεμφοκυτταρική λευχαιμία.

Η νόσος δύναται εξ αρχής να εμφανισθεί με την μορφολογία ΧΛΛ/ΠΛ ή δύναται να αποτελεί εκτροπή προηγουμένως τυπικής ΧΛΛ. Η ΧΛΛ/ΠΛ έχει κλινικά χαρακτηριστικά που προσομοιάζουν στην προλεμφοκυτταρική λευχαιμία, όπως πολύ αυξημένο αριθμό λευκών και σημαντικού βαθμού σπληνομεγαλία.

- **«Άτυπη» ΧΛΛ.** Στην υποομάδα αυτή της άτυπης ΧΛΛ ανήκουν οι περιπτώσεις με ποσοστό μεγαλύτερο από 15% «άτυπων» κυττάρων, τα οποία όμως δεν έχουν χαρακτηριστικά προλεμφοκυττάρου. Τα «άτυπα» κύτταρα έχουν μορφολογία λεμφοπλασματοκυττάρου (μετρίου μεγέθους βασεόφιλο πρωτόπλασμα) είτε πρόκειται για λεμφοκύτταρα με πυρηνική εντομή (cleaved cells) ⁽¹⁵⁸⁾.

Στην υποομάδα αυτή τα κλινικά χαρακτηριστικά είναι παρόμοια με αυτά της τυπικής ΧΛΛ, η πρόγνωση όμως είναι δυσμενέστερη.

Η διάκριση μεταξύ της τυπικής και των άτυπων μορφών ΧΛΛ παρουσιάζει το μειονέκτημα ότι στηρίζεται αποκλειστικά σε μορφολογικά κριτήρια, με αποτέλεσμα να στερείται, σύμφωνα με ορισμένους ερευνητές, αντικειμενικότητας και επαναληψιμότητας.

Αντιθέτως, οι ερευνητές που υιοθετούν την ανωτέρω διάκριση υποστηρίζουν ότι οι μορφολογικές διαφορές είναι σαφείς και ευκρινείς, γεγονός που προσδίδει αντικειμενικό χαρακτήρα στον διαχωρισμό μεταξύ των μορφών. Επιπλέον, υπάρχουν σημαντικά εργαστη-

ριακά και κλινικά δεδομένα, τα οποία ενισχύουν σε μεγάλο βαθμό την αξία της αναγνώρισης τυπικών και άτυπων μορφών νόσου. Τα δεδομένα αυτά περιγράφονται κατωτέρω:

- Ελλείμματα στο 13q14 σαν μεμονωμένες γενετικές βλάβες εξαιρετικά σπάνια ανευρίσκονται σε ασθενείς με άτυπη μορφή ΧΛΛ. Αντίθετα, επί ασθενών με άτυπη ΧΛΛ σε ποσοστό 50% περίπου ανιχνεύεται τρισωμία 12⁽²⁷⁰⁾.
- Άτυπη μορφολογία έχει επίσης παρατηρηθεί σε σπάνιες περιπτώσεις ΧΛΛ με την αντιμετάθεση t(14, 19) και ενεργοποίηση του ογκογονιδίου Bcl-3⁽¹⁷⁰⁾. Ομοίως, άτυπη μορφολογία έχει παρατηρηθεί και στις ελάχιστες περιπτώσεις ΧΛΛ με την αντιμετάθεση t(14, 18).
- Στις τυπικές μορφές της ΧΛΛ, κατά κανόνα, διαπιστώνεται η παρουσία σωματικών μεταλλάξεων στις μεταβλητές περιοχές των γόνων των βαρέων αλύσεων των ανοσοσφαιρινών (VH-mutated). Αντίθετα, στην πλειοψηφία των περιπτώσεων των άτυπων μορφών δεν ανιχνεύονται οι ανάλογες μεταλλάξεις (VH-unmutated) ⁽¹⁰⁴⁾.
- Από μελέτες με μεγάλο αριθμό περιπτώσεων έχει διαπιστωθεί ότι η παρουσία άτυπης μορφολογίας αποτελεί ανεξάρτητο δυσμενή προγνωστικό παράγοντα. Ασθενείς με άτυπες μορφές παρουσιάζουν συχνά πρόοδο νόσου, αντίσταση στην θεραπεία και σημαντικά μικρότερη ολική επιβίωση σε σχέση με ασθενείς με την τυπική ΧΛΛ⁽¹⁹⁴⁾.

Άλλες διαφορές είναι η θετικότητα στον δείκτη CD38, οι μεταλλάξεις του p53 κλπ. Οι χαρακτηριστικές διαφορές φαίνονται και στον Πίνακα 1.

ΑΝΟΣΟΦΑΙΝΟΤΥΠΙΚΑ ΕΥΡΗΜΑΤΑ

Η συμβολή της ανοσοφαινοτυπικής μελέτης στην διάγνωση της ΧΛΛ είναι τεράστια. Η πλέον προσφιλή μέθοδος είναι η κυτταρομετρία ροής. Συγκεκριμένα, η ανοσοφαινοτυπική μελέτη συμβάλλει:

1. Στην ασφαλή επιβεβαίωση της διάγνωσης.
2. Στην διαφορική διάγνωση από άλλα λεμφοϋπερπλαστικά νοσήματα.
3. Στην διαφορική διάγνωση από πολυκλωνικές λεμφοκυτταρώσεις.
4. Στην εκτίμηση της ελάχιστης υπολειμματικής νόσου (Minimal Residual Disease), ιδίως μετά από σύγχρονες θεραπευτικές μεθόδους, όπως αυτόλογη ή αλλογενή μεταμόσχευση αιμοποιητικών κυττάρων.

Τα λευχαιμικά λεμφοκύτταρα εκφράζουν τους κάτωθι δείκτες:

1. **Ανοσοσφαιρίνη επιφανείας (sIg)**: Η sIg είναι συνήθως τάξης IgM±IgD στο 90% των περιπτώσεων. Πολύ σπάνια η sIg είναι άλλης τάξης όπως IgG ή IgA ή μόνο IgD. Χαρακτηριστικά, η ένταση της έκφρασης της sIg είναι πολύ ασθενής και το εύρημα αυτό έχει ισχυρή διαγνωστική αξία, αφού εξυπηρετεί την διαφορική διάγνωση από άλλα λεμφοϋπερπλαστικά νοσήματα⁽¹⁶⁰⁾.
2. **Εκφράζουν τον δείκτη CD5**: Ο δείκτης CD5 αποτελεί panT-cell δείκτη, απαντάται όμως και σε υποπληθυσμούς B-λεμφοκυττάρων⁽¹⁶⁰⁾. Αποτελεί χαρακτηριστικό εύρημα στην ΧΛΛ, αν και εκφράζεται και επί άλλων λεμφωμάτων, όπως στο λέμφωμα από κύτταρα του μανδύα (mantle) και σε ορισμένα εκ των υψηλής κακοήθειας λεμφωμάτων από διάχυτα μεγάλα B-κύτταρα (diffuse large B-cell).
3. **Εκφράζουν τον δείκτη CD23**: Το αντιγόνο CD23 είναι διαμεμβρανική πρωτεΐνη και ασκεί διπλή δράση. **ι)** λειτουργεί σαν υποδοχέας για την ανοσοσφαιρίνη IgE και **ii)** είναι μόριο προσκόλλησης και λειτουργεί σαν υποδοχέας για τον συνδέτη CD21. Η πρωτεόλυση του CD23 έχει σαν αποτέλεσμα την απελευθέρωση διαλυτού sCD23 στην κυκλοφορία του αίματος. Ασθενείς με ΧΛΛ παρουσιάζουν αυξημένα επίπεδα sCD23 και έχει διαπιστωθεί στατιστικά αρνητική συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων του sCD23 και της ολικής επιβίωσης⁽²³⁵⁾. Η ανίχνευση του δείκτη CD23 συμβάλλει στην διαφορική διάγνωση από το λέμφωμα του μανδύα, το οποίο είναι CD5+ και CD23- ⁽¹⁶⁰⁾.
4. **Δεν εκφράζουν τον δείκτη FMC7**: Στην πλειοψηφία των περιπτώσεων ΧΛΛ ο δείκτης FMC7 δεν εκφράζεται επί των λευχαιμικών κυττάρων. Οι λίγες περιπτώσεις ασθενών με ΧΛΛ και θετικότητα στον δείκτη FMC7 συνήθως συνδυάζονται με άτυπη μορφολογία και τρισωμία 12. Η μη ανίχνευση του FMC7 συμβάλλει στην ΔΔ από άλλα λεμφοϋπερπλαστικά νοσήματα^(157, 160).
5. **Μηδενική ή ελάχιστη έκφραση των δεικτών CD22 και CD79b**: Τα αντιγόνα CD22 και CD79b είναι panB-cell δείκτες και αποτελούν διαμεμβρανικές πρωτεΐνες του συμπλέγματος του υποδοχέα του B-κυττάρου (B-cell receptor complex). Οι δύο δείκτες συμβάλλουν αποφασιστικά στην ΔΔ της ΧΛΛ, αφού παρουσιάζουν μέτρια προς ισχυρή έκφραση επί όλων των άλλων λεμφοϋπερπλαστικών νοσημάτων^(160, 280).
6. **Εκφράζουν τον δείκτη CD19**: Ο δείκτης CD19 είναι panB-cell δείκτης και εκφράζεται επί όλων των περιπτώσεων ΧΛΛ. Είναι χρήσιμος για την επιβεβαίωση της B-λεμφοκυτταρικής προέλευσης.
7. **Ασθενής έκφραση του δείκτη CD20**: Ο δείκτης CD20 είναι panB-cell δείκτης και συνήθως στις περιπτώσεις με ΧΛΛ εμφανίζει ασθενή έκφραση. Είναι χρήσιμος για την επιβεβαίωση της B-κυτταρικής προέλευσης^(35, 60).

Η έκφραση ή όχι των προηγούμενων ανοσολογικών δεικτών αποτελεί σταθερό εύρημα σε ασθενείς με ΧΛΛ και για τον λόγο αυτό χρησιμοποιούνται στην διάγνωση και στην ΔΔ της ΧΛΛ από άλλα λεμφοϋπερπλαστικά νοσήματα.

Εκτός των ανωτέρω δεικτών, σε αρκετές περιπτώσεις δυνατό να εκφράζονται και άλλοι δείκτες, ορισμένοι εκ των οποίων περιγράφονται παρακάτω:

- Σε ορισμένες περιπτώσεις τα λευχαιμικά κύτταρα εκφράζουν τον δείκτη CD40 καθώς και τον αντίστοιχο συνδέτη CD154.
- Σε ορισμένες περιπτώσεις τα λευχαιμικά κύτταρα εκφράζουν τον υποδοχέα CD27 καθώς και τον αντίστοιχο συνδέτη CD70.
- Τα λευχαιμικά κύτταρα δυνατό να εκφράζουν τα μόρια προσκόλλησης CD44, CD62L, CD18, CD36 κλπ.
- Τα λευχαιμικά κύτταρα δυνατό να εκφράζουν τα μυελομονοκυτταρικά αντιγόνα CD14, CD13, CD11b, CD11c κλπ.
- Τα λευχαιμικά κύτταρα δυνατό να εκφράζουν τον δείκτη CD38. Ο δείκτης CD38 αναγνωρίζει μία διαμεμβρανική πρωτεΐνη, της οποίας η ακριβής λειτουργία είναι άγνωστη. Ο δείκτης CD38 εκφράζεται σε μεγάλη ποικιλία αιμοποιητικών κυττάρων, όπως αρχέγονα κύτταρα, θυμοκύτταρα, ενεργοποιημένα T-κύτταρα και B-κύτταρα σε τελικά στάδια διαφοροποίησης (πλασματοκύτταρα) κλπ.

Αρχικές μελέτες απέδειξαν ότι ο δείκτης CD38 εκφράζεται σε περιπτώσεις ΧΛΛ, στις οποίες δεν ανιχνεύονται μεταλλάξεις των VH-τμημάτων (VH-unmutated) και, αντίθετα, ο CD38 δεν εκφράζεται σε VH-mutated περιπτώσεις. Έτσι, διατυπώθηκε η υπόθεση ότι η ανίχνευση του δείκτη CD38 ισοδυναμεί με την ανίχνευση σωματικών μεταλλάξεων στα VH-τμήματα ⁽⁴⁶⁾. Μεταγενέστερες, όμως, μελέτες απέδειξαν ότι η ανωτέρω υπόθεση ήταν εσφαλμένη και ότι η έκφραση του CD38 δεν είναι σταθερό εύρημα, αφού δύναται να μεταβληθεί στην πορεία της νόσου ⁽¹⁰⁵⁾.

ΣΥΣΤΗΜΑ ΒΑΘΜΟΛΟΓΗΣΗΣ (SCORING SYSTEM)

Για την ασφαλέστερη διάγνωση της ΧΛΛ αλλά και για την ΔΔ από τα υπόλοιπα λεμφοϋπερπλαστικά νοσήματα έχει δημιουργηθεί ένα σύστημα βαθμολόγησης (scoring system) ⁽⁴⁵⁹⁾. Χρησιμοποιείται set 5 ή 6 δεικτών: CD5, sIg, CD23, FMC7, CD22 και CD79b. Εφόσον η έκφραση του δείκτη είναι τυπική για την ΧΛΛ, τότε βαθμολογείται με score 1, στην αντίθετη περίπτωση βαθμολογείται με score 0. Η χαρακτηριστική για τον κάθε δείκτη

έκφραση φαίνεται στον Πίνακα 2. Με τον τρόπο αυτό η τελική βαθμολογία κυμαίνεται από 0 μέχρι 5. Στις περισσότερες περιπτώσεις ΧΛΛ, το score είναι 4 ή 5 και σπανίως 3. Αντίθετα, στα υπόλοιπα λεμφοϋπερπλαστικά νοσήματα το score είναι 0, 1 ή 2.

Ετσι, είναι αντιληπτό ότι όταν έχουμε score 4 ή 5 δυνάμεθα με ασφάλεια να θέσουμε την διάγνωση της ΧΛΛ. Σε περιπτώσεις με $\text{score} \leq 3$ και με άτυπη μορφολογία ΧΛΛ, χρήσιμη είναι η εφαρμογή της τεχνικής FISH για την ανάδειξη τρισωμίας 12.

Οπως έχει ήδη περιγραφεί, η ανίχνευση της τρισωμίας 12 κατευθύνει στην διάγνωση της «άτυπης» ΧΛΛ. Το scoring system περιγράφεται στον Πίνακα 1. Η εφαρμογή του scoring system σε μεγάλο αριθμό ασθενών με τυπική ΧΛΛ, άτυπη ΧΛΛ και άλλα B-λεμφοϋπερπλαστικά νοσήματα, περιγράφεται συνοπτικά στον Πίνακα 2⁽⁴⁵⁹⁾.

ΣΥΣΤΗΜΑ ΒΑΘΜΟΛΟΓΗΣΗΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΔΙΑΓΝΩΣΗ ΤΗΣ ΧΛΛ

ΔΕΙΚΤΗΣ	ΒΑΘΜΟΛΟΓΗΣΗ	
	1	0
SIg	Ασθενής έκφραση	Μέτρια-Ισχυρή έκφραση
CD5	ΝΑΙ	ΟΧΙ
CD23	ΝΑΙ	ΟΧΙ
FMC7	ΟΧΙ	ΝΑΙ
CD22/CD79b	Ασθενής έκφραση	Μέτρια-Ισχυρή έκφραση

ΠΙΝΑΚΑΣ 1

ΒΑΘΜΟΛΟΓΙΑ	Τυπική ΧΛΛ (n=301)	Ατυπή ΧΛΛ (n=44)	Άλλα B-NHL (n=260)
4-5	90%	71%	0.3%
3	8%	18%	3%
2	2%	9%	19%
0-1	0.3%	2%	77%

ΠΙΝΑΚΑΣ 2

ΚΕΦΑΛΑΙΟ VII

ΔΙΑΦΟΡΙΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ - ΣΤΑΔΙΟΠΟΙΗΣΗ

ΔΙΑΦΟΡΙΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ

Η διαφορική διάγνωση της ΧΛΛ θα πρέπει να γίνει από πολυκλωνικές λεμφοκυτταρώσεις, όπως αυτές που εμφανίζονται στα πλαίσια κυρίως ιογενών λοιμώξεων αλλά και από άλλα Non-Hodgkin λεμφώματα, που παρουσιάζουν λευχαιμική εικόνα από το περιφερικό αίμα.

Α) ΔΙΑΦΟΡΙΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ ΑΠΟ ΠΟΛΥΚΛΩΝΙΚΕΣ ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΩΣΕΙΣ

Πολυκλωνικές λεμφοκυτταρώσεις εμφανίζονται στα πλαίσια λοιμώξεων, κυρίως ιογενούς προέλευσης. Χαρακτηριστικά αναφέρονται ο ιός της λοιμώδους μονοπυρηνώσεως (EBV), ο κυτταρομεγαλοϊός (CMV), οι ιοί των ηπατίτιδων, οι αδενοϊοί, ο ιός της λοιμώδους λεμφοκυτταρώσεως, ο ιός της ερυθράς κλπ. Επίσης λεμφοκυττάρωση δυνατό να παρουσιασθεί και στα πλαίσια μικροβιακών λοιμώξεων, όπως στην λοίμωξη από βρουκέλα, στον κοκίτη, στην σύφιλη, στην φυματίωση κλπ. Λεμφοκυττάρωση επίσης δυνατό να εμφανισθεί στην λοίμωξη από τοξόπλασμα, καθώς και στην διαδρομή αυτοανόσων νοσημάτων, όπως π.χ. στις θυρεοειδίτιδες.

Οι ανωτέρω λεμφοκυτταρώσεις έχουν παροδικό χαρακτήρα, η διαφορική διάγνωση από την ΧΛΛ δεν παρουσιάζει προβλήματα και στηρίζεται στην διαφορετική κλινική εικόνα. Επίσης, η μορφολογία των λεμφοκυττάρων του περιφερικού αίματος είναι αυτή των διεγερμένων λεμφοκυττάρων. Με την ανοσοφαινοτυπική μελέτη επίσης στις ανωτέρω περιπτώσεις διαπιστώνουμε ότι τα λεμφοκύτταρα του περιφερικού αίματος είναι T-κυτταρικής προέλευσης⁽¹⁰⁶⁾.

Ιδιαίτερη μνεία θα γίνει για μία σπάνια σχετική οντότητα, το σύνδρομο της πολυκλωνικής B-λεμφοκυττάρωσης (ΠΒΛ). Το σύνδρομο ΠΒΛ εμφανίζεται συνήθως σε γυναίκες καπνίστριες μέσης ηλικίας. Ο αριθμός των λευκών στο περιφερικό αίμα δύναται να φθάσει και σε επίπεδα μέχρι $30 \times 10^3/\mu\text{l}$. Τα λεμφοκύτταρα είναι μέσου μεγέθους και έχουν διλοβο πυρήνα ή πυρήνα με εντομή. Από τον υπόλοιπο εργαστηριακό έλεγχο διαπιστώνεται πολυκλωνική αύξηση της IgM. Με την ανοσοφαινοτυπική μελέτη διαπιστώνεται ο πολυκλωνικός χαρακτήρας των λεμφοκυττάρων. Οι ασθενείς έχουν συνήθως το αντιγόνο HLA-DR7 και η κλινική πορεία του συνδρόμου είναι καλοήθης^(181, 219).

B) ΔΙΑΦΟΡΙΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ ΑΠΟ ΑΛΛΑ ΛΕΜΦΟΪΠΕΡΠΛΑΣΤΙΚΑ ΝΟΣΗΜΑΤΑ

Δυσκολίες δύνανται να προκύψουν στην διαφορική διάγνωση της ΧΛΛ από τα υπόλοιπα λεμφοϋπερπλαστικά νοσήματα Β-κυτταρικής προέλευσης. Τα σύγχρονα συστήματα ταξινόμησης (REAL, WHO) έχουν συμβάλει αποφασιστικά στην αποσαφήνιση και διάκριση των Β-NHL χαμηλής κακοήθειας. Τα νοσήματα αυτά προέρχονται από την νεοπλασματική εξαλλαγή του ώριμου λεμφοκυττάρου και είναι δυνατό, για λόγους κυρίως περιγραφικούς, να τα διακρίνουμε σε τρεις ομάδες, σε σχέση με την κλινική τους εικόνα: **i)** πρωτοπαθείς λευχαιμίες, η νόσος αφορά πάντοτε το περιφερικό αίμα **ii)** λευχαιμία/λέμφωμα, η νόσος αφορά τους λεμφαδένες αλλά πολύ συχνά υπάρχει συμμετοχή του περιφερικού αίματος και **iii)** αμιγή λεμφώματα, η συμμετοχή του περιφερικού αίματος είναι πολύ σπάνια.

Τα νοσήματα από τα οποία είναι απαραίτητο να διακρίνουμε την ΧΛΛ αναφέρονται κατωτέρω^(110, 160, 183, 197, 270):

▪ ΠΡΩΤΟΠΑΘΕΙΣ ΛΕΥΧΑΙΜΙΕΣ

1. Παραλλαγές της Β-Χρόνιας λεμφοκυτταρικής λευχαιμίας (Ατυπες μορφές ΧΛΛ).
2. Β-Προλεμφοκυτταρική λευχαιμία (Β-ΠΛΛ).
3. Λευχαιμία εκ Τριχωτών Λεμφοκυττάρων (ΛΤΛ).
4. Παραλλαγή της Λευχαιμίας εκ Τριχωτών Λεμφοκυττάρων (ΛΤΛ-Π).
5. Πλασματοκυτταρική Λευχαιμία (ΠΛ).

▪ ΛΕΥΧΑΙΜΙΕΣ/ΛΕΜΦΩΜΑΤΑ

Σπληνικό Λέμφωμα της Οριακής Ζώνης, με ή χωρίς Λαχνωτά Λεμφοκύτταρα (ΣΛΛΛ)

1. Λέμφωμα από κύτταρα του Μανδύα (ΛΜ)
2. Οζώδες Λέμφωμα (ΟΛ)
3. Ανοσοκύττωμα ή Λεμφοπλασματοκυτταρικό Λέμφωμα (ΛΠΛ)
4. Διάχυτο από μεγάλα Β-λεμφοκύτταρα Λέμφωμα (ΔΒΛ)

Η ΔΔ της ΧΛΛ από τα ανωτέρω νοσήματα στηρίζεται κατ' αρχήν στην κλινική εικόνα και στην προσεκτική μελέτη της μορφολογίας των επιχρισμάτων. Με την προσθήκη της ανο-

σοφαινοτυπικής μελέτης τίθεται με ασφάλεια η διάγνωση στην πλειοψηφία των περιπτώσεων. Σε περιπτώσεις όπου η διάγνωση είναι αμφίβολη, η βιοψία λεμφαδένος, η κυτταρογενετική μελέτη (FISH), η μοριακή μελέτη, είναι δυνατό να απαιτηθούν για την οριστική διάγνωση.

Οι μορφολογικές και ανοσοφαινοτυπικές διαφορές των ανωτέρω νοσημάτων φαίνονται στους Πίνακες 3 και 4.

ΣΤΑΔΙΟΠΟΙΗΣΗ³³⁹

Δύο διαφορετικά κλινικά συστήματα σταδιοποίησης έχουν αναπτυχθεί στο παρελθόν. Το σταδιοποιητικό σύστημα των Rai et al και το σταδιοποιητικό σύστημα των Binet et al. Τα δύο συστήματα έχουν μικρές διαφορές μεταξύ τους και είναι εξαιρετικά χρήσιμα για την εκτίμηση της πρόγνωσης και την επιλογή έναρξης θεραπευτικής αντιμετώπισης.

Και τα δύο συστήματα χρησιμοποιούνται από τους κλινικούς ιατρούς σήμερα. Το σύστημα Binet χρησιμοποιείται κυρίως στην Ευρώπη, ενώ το σύστημα Rai είναι πιο δημοφιλές στις ΗΠΑ.

A) ΣΤΑΔΙΟΠΟΙΗΤΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ RAI

Στο σύστημα Rai για την σταδιοποίηση εκτιμάται η παρουσία των ακόλουθων κλινικοεργαστηριακών παραμέτρων: λεμφοκυττάρωση στο περιφερικό αίμα, λεμφαδενοπάθεια, σπληνομεγαλία ή ηπατομεγαλία, αναιμία ($Hb < 11 \text{ gr/dl}$), θρομβοπενία ($PLT < 100 \times 10^3 / \mu\text{l}$). Με βάση την παρουσία ή όχι των ανωτέρω παραμέτρων διακρίνονται 5 στάδια νόσου⁽²¹⁷⁾.

ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΩΝ Β-ΛΕΜΦΟΪΠΕΡΙΠΛΑΣΤΙΚΩΝ

ΝΟΣΟΣ	ΜΕΓΕΘΟΣ ΚΥΤΤΑΡΟΥ	ΠΥΡΗΝΑΣ	ΧΡΩΜΑΤΙΝΗ	ΠΡΩΤΟΠΛΑΣΜΑ
ΧΛΛ	Μικρό	Στρογγυλός	Συμπυκνωμένη σε αθροίσεις	Ελάχιστο
ΧΛΛ Ατυπη	Μικρό -Μεσαίο	Στρογγυλός ή με εντομή	Συμπυκνωμένη	Ελάχιστο-Μέτριο ή Βασεόφιλο
ΛΠΛ	Μικρό -Μεσαίο	Στρογγυλός	Συμπυκνωμένη	Μέτριο και Βασεόφιλο
Β-ΠΛΛ	Μεσαίο	Στρογγυλός με πυρήνιο	Συμπυκνωμένη	Μέτριο
ΛΤΛ	Μεσαίο	Στρογγυλός ή με εντομή	Ελαφρώς αραιοχρωματική	Αφθονο - τριχοειδείς προσεκβολές
ΛΤΛ-Π	Μεσαίο	Στρογγυλός με πυρήνιο	Συμπυκνωμένη	Αφθονο - τριχοειδείς προσεκβολές
ΣΛΛΛ	Μικρό -Μεσαίο	Στρογγυλός	Συμπυκνωμένη	Μέτριο - προσεκβολές στους 2 πόλους
ΟΛ	Μικρό	Με εντομή	Συμπυκνωμένη	Ελάχιστο
ΛΜ	Μεσαίο	Με εντομή	Ελαφρώς αραιοχρωματική	Μέτριο
ΔΒΛ	Μεγάλο	Με πυρήνιο	Αραιοχρωματική	Μέτριο - Αφθονο

ΠΙΝΑΚΑΣ 3: Οι επεξηγήσεις των συντμήσεων των νόσων έχουν δοθεί στο κείμενο

- **ΣΤΑΔΙΟ 0:** Χαρακτηρίζεται από την παρουσία μόνο λεμφοκυτταρώσεως στο περιφερικό αίμα (Λεμφοκύτταρα $>10 \times 10^3/\mu\text{l}$). Η μέση επιβίωση των ασθενών της ομάδας αυτής ξεπερνά τα 12 έτη.
- **ΣΤΑΔΙΟ 1:** Χαρακτηρίζεται από την παρουσία μόνο λεμφοκυτταρώσεως και λεμφαδενοπάθειας. Η μέση επιβίωση των ασθενών είναι 8.5 έτη.
- **ΣΤΑΔΙΟ 2:** Χαρακτηρίζεται από την παρουσία λεμφοκυτταρώσεως και σπληνομεγαλίας ή ηπατομεγαλίας. Λεμφαδενοπάθεια δυνατό να υφίσταται ή όχι. Η μέση επιβίωση των ασθενών είναι 6 έτη.
- **ΣΤΑΔΙΟ 3:** Χαρακτηρίζεται από την παρουσία λεμφοκυτταρώσεως και αναιμίας ($\text{Hb} < 11 \text{gr/dl}$). Σπληνομεγαλία και λεμφαδενοπάθεια δυνατό να υφίστανται ή όχι. Η μέση επιβίωση των ασθενών είναι 2 έτη.
- **ΣΤΑΔΙΟ 4:** Χαρακτηρίζεται από την παρουσία λεμφοκυτταρώσεως και θρομβοπενίας ($\text{PLT} < 100 \times 10^3/\mu\text{l}$). Αναιμία, σπληνομεγαλία, λεμφαδενοπάθεια, δυνατό να υφίστανται ή όχι. Η μέση επιβίωση των ασθενών είναι 1.5 έτη.

Σε αναθεώρηση του σταδιοποιητικού συστήματος προτάθηκε η σύμπτυξη των σταδίων, με σκοπό την καλύτερη λειτουργικότητα. Έτσι, οι ασθενείς σταδίου 0 αποτελούν την ομάδα χαμηλού κινδύνου, οι ασθενείς σταδίων 1 και 2 αποτελούν την ομάδα ενδιάμεσου κινδύνου και οι ασθενείς σταδίων 3 και 4 αποτελούν την ομάδα υψηλού κινδύνου.

Ανοσοφαινοτυπικά χαρακτηριστικά των Β-λεμφοϋπερπλαστικών

ΝΟΣΟΣ	SIg	CD5	CD23	FMC7	CD22	CD79b
ΧΛΛ	Ασθενής	++	++	-/+	Ασθενής/-	Ασθενής/-
ΧΛΛ Ατυπη	Ασθενής	++	++	-/+	Ασθενής/-	Ασθενής/-
Β-ΠΛΠ	Ισχυρή	-/+	-	++	+	++
ΛΠΛ	Ισχυρή και CIg	-/+	-	-/+	+	++
ΛΤΛ	Ισχυρή	-	-	++	++	+
ΛΤΛ-Π	Ισχυρή	-	-	++	++	+
ΠΛ	Μόνο CIg	-	-	-	-	-
ΣΛΛΛ	Ισχυρή	-/+	-/+	++	++	++
ΟΛ	Ισχυρή	-/+	-/+	++	++	++
ΛΜ	Ισχυρή	++	-	++	++	++
ΔΒΛ	Ισχυρή	-/+	-/+	++	++	++

ΠΙΝΑΚΑΣ 4: Οι επεξηγήσεις των συντμήσεων των νόσων έχουν δοθεί στο κείμενο

(-): θετικό σε <10% των περιπτώσεων, (-/+): θετικό σε 10%-25% των περιπτώσεων,

(+): θετικό σε 25%-75% των περιπτώσεων, (++): θετικό σε >75% των περιπτώσεων.

Β) ΣΤΑΔΙΟΠΟΙΗΤΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ BINET

Στο σύστημα Binet για την σταδιοποίηση εκτιμάται η παρουσία των ακόλουθων κλινικο-εργαστηριακών παραμέτρων: Αναιμία (Hb<10gr/dl), θρομβοπενία (PLT<100x10³/μl), λεμφαδενοπάθεια, σπληνομεγαλία, ηπατομεγαλία. Με σκοπό την ακριβέστερη εκτίμηση του φορτίου της νόσου, οι ανατομικά προσβεβλημένες περιοχές διακρίνονται στις ακόλουθες 5 ομάδες: Τραχηλική λεμφαδενοπάθεια, μασχαλιαία λεμφαδενοπάθεια, βουβωνική λεμφαδενοπάθεια (ανεξαρτήτως ετεροπλεύρου ή αμφοτεροπλεύρου διογκώσεως), σπληνομεγαλία, ηπατομεγαλία. Με βάση την παρουσία ή όχι των ανωτέρω παραμέτρων διακρίνονται τρία στάδια νόσου⁽¹⁶⁾.

- **ΣΤΑΔΙΟ A:** Χαρακτηρίζεται από την απουσία αναιμίας ή θρομβοπενίας. Οι ανατομικά προσβεβλημένες ομάδες είναι λιγότερες από 3. Η μέση επιβίωση των ασθενών ξεπερνά τα 10 έτη.
- **ΣΤΑΔΙΟ B:** Χαρακτηρίζεται από την απουσία αναιμίας ή θρομβοπενίας. Οι ανατομικά προσβεβλημένες ομάδες είναι 3 ή περισσότερες των 3. Η μέση επιβίωση των ασθενών είναι 7 έτη.
- **ΣΤΑΔΙΟ C:** Χαρακτηρίζεται από την παρουσία είτε αναιμίας είτε θρομβοπενίας, ανεξάρτητα του αριθμού των ανατομικά προσβεβλημένων ομάδων. Η μέση επιβίωση των ασθενών είναι 2 έτη.

ΧΡΗΣΙΜΕΣ ΠΑΡΑΤΗΡΗΣΕΙΣ

Τα σταδιοποιητικά συστήματα που περιγράφηκαν ανωτέρω στηρίζονται σε κλινικές παρατηρήσεις. Η εκτίμηση της λεμφαδενοπάθειας και οργανομεγαλίας είναι κλινική. Δεν γίνεται χρήση απεικονιστικών μεθόδων, όπως π.χ. CT-scan, με αποτέλεσμα να μη γίνεται εκτίμηση της παρουσίας ενδοκοιλιακής λεμφαδενοπάθειας.

Στην αρχική περιγραφή των σταδιοποιητικών συστημάτων δεν γινόταν αιτιολογική προσέγγιση της αναιμίας και θρομβοπενίας. Σήμερα θεωρείται σωστό και εφαρμόζεται από τους κλινικούς, το ότι οι κυτταροπενίες θα πρέπει να συσχετίζονται άμεσα με την βασική νόσο, ώστε να διατηρούν την ισχύ τους σαν κριτήρια σταδιοποίησης. Αναιμία ή θρομβοπενία, οφειλόμενες σε αυτοάνοσο μηχανισμό δεν λαμβάνονται υπόψη σαν κριτήρια.

Τα τρία στάδια της σταδιοποίησης Binet, ουσιαστικά συσχετίζονται με τις ομάδες χαμηλού, ενδιάμεσου και υψηλού κινδύνου της αναθεωρημένης σταδιοποίησης Rai.

Τα τελευταία χρόνια παρουσιάζεται η τάση οι ασθενείς να διαγιγνώσκονται σε πρωιμότερα στάδια. Το γεγονός θα πρέπει να αποδοθεί στην βελτίωση των παρεχόμενων υπηρεσιών υγείας.

Κατά τον χρόνο της διάγνωσης περίπου 25% των ασθενών έχουν νόσο πρώιμων σταδίων (Rai 0, Binet A), 50% των ασθενών έχουν νόσο ενδιάμεσων σταδίων (Rai 1 ή 2, Binet B) και 25% των ασθενών έχουν νόσο προχωρημένων σταδίων (Rai 3 ή 4, Binet C).

Νεώτερα συστήματα σταδιοποίησης, όπως το συνδυασμένο Rai και Binet σύστημα από την IWCLL, καθώς και το σύστημα εκτίμησης του ολικού φορτίου νόσου δεν έτυχαν καθολικής αποδοχής.

Επίσης υπάρχουν δεδομένα που μας οδηγούν στην αναγνώριση υποομάδων ασθενών σε εργαστηριακό επίπεδο, που έχουν αποδειχθεί πολύτιμα βοηθήματα στα συστήματα σταδιοποίησης των Rai και Binet.

Η κατάσταση γονιδιακής μετάλλαξης IgV αποτελεί σήμερα τον ακριβέστερο διευκρινιστή των κλινικών αποτελεσμάτων σε αρκετές μελέτες.

Οι ασθενείς με λίγες μεταλλάξεις προσβάλλονται από τη νόσο τουλάχιστον 3 φορές γρηγορότερα από τους ασθενείς με σημαντικές μεταλλάξεις του γονιδίου IgV (μέση επιβίωση <8 έτη έναντι ≥ 24 ετών). ^(284 - 292) (HEMATOLOGY 2003: The American Society of Hematology).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ VIII

ΜΟΝΟΚΛΩΝΙΚΗ ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΩΣΗ ΑΓΝΩΣΤΟΥ ΣΗΜΑΣΙΑΣ - SMOLDERING ΧΡΟΝΙΑ ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΛΕΥΧΑΙΜΙΑ - ΜΕΤΑΜΟΡΦΩΣΗ ΤΗΣ ΝΟΣΟΥ - ΑΛΛΕΣ ΚΑΚΟΗΘΕΙΕΣ - ΑΥΤΟΜΑΤΟΣ ΥΦΕΣΗ

ΜΟΝΟΚΛΩΝΙΚΗ ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΩΣΗ ΑΓΝΩΣΤΟΥ ΣΗΜΑΣΙΑΣ

Με την χρήση ευαίσθητων τεχνικών, όπως π.χ. με την χρήση της κυτταρομετρίας ροής, έχει διαπιστωθεί η παρουσία στο περιφερικό αίμα υγιών ατόμων, μονοκλωνικού πληθυσμού Β-λεμφοκυττάρων με ανοσοφαινοτυπικά χαρακτηριστικά παρόμοια με αυτά της Β-ΧΛΛ.

Σε πρόσφατη εργασία στο Leeds, οι Rawstron et al μελέτησαν μεγάλο αριθμό υγιών ατόμων με την χρήση της κυτταρομετρίας ροής⁽²¹⁸⁾. Οι ερευνητές, χρησιμοποιώντας set μονοκλωνικών αντισωμάτων (CD5, CD19, CD20, CD79b) αναζήτησαν στο περιφερικό αίμα την παρουσία Β-λεμφοκυττάρων με ανοσοφαινοτυπικά γνωρίσματα της ΧΛΛ.

Τα αποτελέσματα ήταν εντυπωσιακά, αφού η παρουσία Β-κυττάρων με profile ΧΛΛ (B-cells CLL-like) διαπιστώθηκε στο 3% του συνόλου των υγιών μαρτύρων. Η συχνότητα ανεύρεσης CLL-like κυττάρων παρουσίαζε αύξηση με την αύξηση της ηλικίας.

Η μονοκλωνικότητα των ανωτέρω λεμφοκυτταρικών πληθυσμών επιβεβαιώθηκε με την χρήση μοριακών τεχνικών (Immunoglobulin heavy chain genes rearrangements).

Η κλινική σημασία της ανωτέρω παρατήρησης δεν είναι επί του παρόντος γνωστή. Για τον σκοπό αυτό θα χρειασθεί να γίνει παρακολούθηση των ατόμων αυτών για μεγάλο χρονικό διάστημα έτσι, ώστε να διαπιστωθεί ποιο ποσοστό εξ αυτών και σε πόσο χρονικό διάστημα θα αναπτύξουν ΧΛΛ.

Από την ανωτέρω παρατήρηση και εφόσον επιβεβαιωθεί και από άλλα εργαστήρια, είναι πιθανό ότι υφίσταται η οντότητα της Μονοκλωνικής Λεμφοκυτταρώσεως Αγνώστου Σημασίας (ΜΛΑΣ) κατ' αναλογία της μονοκλωνικής γαμμαπάθειας αγνώστου σημασίας.

Ο όρος ΜΛΑΣ έχει χρησιμοποιηθεί και στο παρελθόν από ερευνητές για την περιγραφή περιπτώσεων ΧΛΛ πρώιμων σταδίων, οι οποίες δεν παρουσίασαν πρόοδο νόσου μετά από παρακολούθηση μέχρι και 20 ετών^(108, 130). Οι περιπτώσεις αυτές, βέβαια, θα μπορούσαν να ταξινομηθούν και σαν smoldering ΧΛΛ ενώ, αντίθετα, οι περιπτώσεις των Rawstron et al αφορούσαν άτομα με φυσιολογικές αιματολογικές παραμέτρους.

Με σκοπό την αποφυγή συγχύσεων με την χρησιμοποιούμενη ορολογία, θεωρείται σκόπιμο ότι ο όρος ΜΛΑΣ θα πρέπει να διαφυλαχθεί για περιπτώσεις οι οποίες δεν δύνανται να ταξινομηθούν σαν ΧΛΛ, με βάση τα προτεινόμενα διαγνωστικά κριτήρια (NCI, IWCLL).

ΠΡΟΟΔΟΣ ΝΟΣΟΥ - ΚΑΛΟΗΘΗΣ (SMOLDERING) ΧΛΛ

Η φυσική πορεία της ΧΛΛ χαρακτηρίζεται από την σταδιακή άθροιση των λευχαιμικών λεμφοκυττάρων και την επακόλουθο πρόοδο της νόσου, μετά από την πάροδο χρονικού διαστήματος που ποικίλει ευρέως μεταξύ των ασθενών. Ο όρος πρόοδος της νόσου χρησιμοποιείται για την περιγραφή της μετάβασης σε υψηλότερα στάδια νόσου, όπως αυτά έχουν θεσπισθεί από τα συστήματα των Rai και Binet.

Η σταδιοποίηση των ασθενών με τα διαθέσιμα συστήματα, αν και συμβάλλει στην ομαδοποίηση σε ομάδες με διαφορετική πρόγνωση δεν μας προσφέρει την ακριβή πρόγνωση για τον κάθε συγκεκριμένο ασθενή. Είναι δυνατό, ασθενής αρχικού σταδίου να παρουσιάσει σύντομα μετά την διάγνωση πρόοδο νόσου και, αντίθετα, ασθενής που διαγιγνώσκεται σε προχωρημένο στάδιο να παρουσιάσει σταθερή νόσο για μεγάλο χρονικό διάστημα. Το γεγονός ότι η ΧΛΛ είναι νόσημα με τεράστιο εύρος, όσον αφορά την κλινική πορεία και την ολική επιβίωση, δημιούργησε την ανάγκη να αναζητηθούν ομάδες ασθενών στους οποίους η πρόγνωση θα μπορούσε να εκτιμηθεί με μεγαλύτερη ακρίβεια.

Μεταξύ των ασθενών πρώιμων στάδιων δύνανται να διακριθεί μία υποομάδα, η οποία περιγράφεται με τον όρο «καλοήθης-έρπουσα» ή smoldering ΧΛΛ. Ασθενείς με smoldering ΧΛΛ έχουν πολύ μικρή πιθανότητα να παρουσιάσουν πρόοδο νόσου και η επιβίωσή τους είναι παρόμοια με την επιβίωση υγιών ατόμων ίδιας ηλικίας και ίδιου φύλου.

Διάφορες ερευνητικές ομάδες αναζήτησαν τα κριτήρια για την περιγραφή της smoldering ΧΛΛ. Σύμφωνα με τους Montserrat et al χρησιμοποιούνται τα κάτωθι κριτήρια⁽¹⁷⁷⁾:

- Στάδιο A κατά Binet.
- Μη-διάχυτο πρότυπο διήθησης στην οστεομελική βιοψία.
- Αιμοσφαιρίνη $\geq 13\text{gr/dl}$.
- Απόλυτος αριθμός λεμφοκυττάρων $\leq 30 \times 10^3/\mu\text{l}$.
- Χρόνος διπλασιασμού των λεμφοκυττάρων > 12 μήνες.

Η Γαλλική συνεργατική ομάδα, από ανάλυση μεγάλου αριθμού περιπτώσεων, ανέδειξε τα κάτωθι σχεδόν παρόμοια κριτήρια για την περιγραφή της smoldering ΧΛΛ⁽⁸⁷⁾:

- Στάδιο A κατά Binet.
- Αιμοσφαιρίνη $> 12\text{gr/dl}$.

- Απόλυτος αριθμός λεμφοκυττάρων $<30 \times 10^3/\mu\text{l}$.
- Διήθηση μυελού $<80\%$ (απλή αναρρόφηση μυελού).
- <2 προσβεβλημένες ανατομικές ομάδες.

Ασθενείς με smoldering ΧΛΛ παρουσιάζουν πιθανότητα 13% να παρουσιάσουν πρόοδο νόσου σε χρονικό διάστημα 5 ετών και έχουν πιθανότητα 80% 10ετούς επιβίωσης. Οι πιθανότητες για τους υπόλοιπους ασθενείς με στάδιο A κατά Binet είναι 43% και 57% αντίστοιχα.

ΜΕΤΑΜΟΡΦΩΣΗ - ΕΚΤΡΟΠΗ ΤΗΣ ΝΟΣΟΥ

Οι ασθενείς με ΧΛΛ είναι δυνατό στην διαδρομή της νόσου να παρουσιάσουν εκτροπή σε νόσημα με επιθετικότερη βιολογική συμπεριφορά και κλινική πορεία.

A) ΠΡΟΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΕΚΤΡΟΠΗ

Χαρακτηρίζεται από αύξηση των προλεμφοκυττάρων στο περιφερικό αίμα, σε επίπεδα άνω του 11%. Η προλεμφοκυτταρική εκτροπή δυνατό να επισυμβεί σε οποιαδήποτε φάση της νόσου. Η διάγνωση γίνεται αποκλειστικά με την προσεκτική μελέτη της μορφολογίας του περιφερικού αίματος. Οι ασθενείς συνήθως παρουσιάζουν κλινικά ευρήματα που μιμούνται την αμιγώς προλεμφοκυτταρική λευχαιμία, όπως σημαντικού βαθμού σπληνομεγαλία και αύξηση των λεμφοκυττάρων του περιφερικού αίματος σε πολύ υψηλά επίπεδα. Η προλεμφοκυτταρική εκτροπή χαρακτηρίζεται συνήθως από αντίσταση στην θεραπεία και πτωχή πρόγνωση^(167, 270).

B) ΕΚΤΡΟΠΗ ΣΕ ΛΕΜΦΩΜΑ ΥΨΗΛΗΣ ΚΑΚΟΗΘΕΙΑΣ

Ποσοστό 5%-10% ασθενών με ΧΛΛ παρουσιάζουν εκτροπή σε λέμφωμα υψηλής κακοήθειας. Η ιστολογική εικόνα είναι αυτή του διάχυτου από μεγάλα Β-κύτταρα λεμφώματος ή, συνηθέστερα, του ανοσοβλαστικού λεμφώματος, για τον λόγο αυτό χρησιμοποιείται στην βιβλιογραφία ο όρος ανοσοβλαστική εκτροπή. Στις περιπτώσεις όπου η εκτροπή συνοδεύεται και από την παρουσία Β-συμπτωματολογίας έχει χρησιμοποιηθεί ο όρος σύνδρομο Richter. Οι δύο όροι χρησιμοποιούνται από τους περισσότερους συγγραφείς σαν συνώνυμα, αφού στην ουσία υποδηλώνουν την ίδια οντότητα^(96, 225).

Η κλινική εικόνα είναι αυτή που συνοδεύει τα λεμφώματα υψηλής κακοήθειας. Κλινικο-εργαστηριακά ευρήματα που πρέπει να θέτουν την υποψία της εκτροπής είναι: **1)** Ρα-

γδαία επιδείνωση της κλινικής εικόνας και εμφάνιση Β-συμπτωματολογίας, **2)** Ταχεία αύξηση του μεγέθους των λεμφαδενικών διογκώσεων σε μία ανατομική περιοχή, **3)** Παρουσία εξωλεμφαδενικής εστίας, **4)** Αύξηση της LDH, **5)** Μη ερηνεύσιμη μείωση του απόλυτου αριθμού των λεμφοκυττάρων του περιφερικού αίματος.

Με αφορμή την εμφάνιση των ανωτέρω ευρημάτων θα πρέπει να ακολουθεί ενδελεχής έλεγχος για την διάγνωση πιθανής εκτροπής σε σύνδρομο Richter. Η διάγνωση θα τεθεί με βιοψία λεμφαδένα ή εξωλεμφαδενικής εστίας. Επίσης, η οστεομυελική βιοψία δυνατό να θέσει την διάγνωση επί διήθησης του μυελού από την συνιστώσα υψηλής κακοήθειας. Το Gallium-scanning είναι χρήσιμο για την διάγνωση, επειδή συνήθως παρατηρείται πρόσληψη σε λεμφαδένες που συμμετέχουν στην εκτροπή ενώ, αντιθέτως, δεν παρατηρείται πρόσληψη σε λεμφαδένες προσβεβλημένους από ΧΛΛ⁽²⁰⁸⁾.

Η εκτροπή σε σύνδρομο Richter δυνατό να επισυμβεί σε οιαδήποτε φάση κατά την διαδρομή της νόσου. Η προηγούμενη θεραπεία με ανάλογα πουργινών δεν μειώνει την πιθανότητα εκτροπής, ακόμα και σε περιπτώσεις όπου επετεύχθη πλήρης ύφεση^(96, 223).

Ασθενείς με εκτροπή σε σύνδρομο Richter παρουσιάζουν συνήθως αντίσταση στην θεραπεία και η μέση επιβίωσή τους δεν ξεπερνά τους 6 μήνες. Η θεραπεία του συνδρόμου είναι αυτή των λεμφωμάτων υψηλής κακοήθειας.

Μελέτες με μοριακές τεχνικές έχουν αποδείξει ότι στο 60% τουλάχιστον των περιπτώσεων εκτροπής ο κλώνος υψηλής κακοήθειας αποτελεί εξαλλαγή του αρχικού κλώνου της ΧΛΛ^(184, 255, 260).

Γ) ΕΚΤΡΟΠΗ ΣΕ ΑΛΛΕΣ ΑΙΜΑΤΟΛΟΓΙΚΕΣ ΚΑΚΟΗΘΕΙΕΣ

Ασθενείς με ΧΛΛ είναι δυνατό να παρουσιάσουν στην διαδρομή της νόσου πολλαπλό μύελωμα ή νόσο του Hdgkin^(24, 121, 259, 278). Η συχνότητα εμφάνισης νόσου του Hodgkin είναι 0.3%, ενώ αυτή του πολλαπλού μυελώματος είναι 0.1%. Σε ορισμένες περιπτώσεις έχει διαπιστωθεί με ευαίσθητες τεχνικές ότι πρόκειται για εξαλλαγή του αρχικού κλώνου της ΧΛΛ. Η πρόγνωση είναι συνήθως πτωχή. Σε πολύ σπάνιες περιπτώσεις έχει, επίσης, ανακοινωθεί η εμφάνιση οξείας λεμφοβλαστικής λευχαιμίας, σε έδαφος ΧΛΛ.

Δ) ΑΛΛΕΣ ΚΑΚΟΗΘΕΙΕΣ ΣΕ ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ ΧΛΛ

Ασθενείς με ΧΛΛ παρουσιάζουν αυξημένη πιθανότητα να νοσήσουν και από άλλες κακοήθειες.

Μυελικές Κακοήθειες

Δευτεροπαθή μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα (ΜΔΣ) και οξεία μυελογενή λευχαιμία (ΟΜΛ) εμφανίζονται με αυξημένη συχνότητα σε ασθενείς με ΧΛΛ^(14, 44, 180). Τα νοσήματα αυτά αποδίδονται στην προηγούμενη λήψη χημειοθεραπευτικών και δη αλκυλιούντων παραγόντων, όπως χλωραμβουκίλη. Επίσης τα ανάλογα πουρινών, αντίθετα με ό,τι πιστευόταν στο παρελθόν, είναι αίτιο ανάπτυξης δευτεροπαθών ΜΔΣ και ΟΜΛ. Η πρόγνωση αυτών των νοσημάτων είναι εξαιρετικά πτωχή.

Συμπαγείς Ογκοί

Επίσης ασθενείς με ΧΛΛ παρουσιάζουν αυξημένη συχνότητα εμφάνισης μη αιματολογικών κακοηθειών. Έχει ανακοινωθεί αυξημένη επίπτωση επιθηλιακών νεοπλασμάτων δέρματος, καρκίνου του πεπτικού και βρογχογενούς καρκίνου^(39, 87, 254). Η αιτιολογική συσχέτιση με την ΧΛΛ δεν είναι σαφής. Πιθανό η αυξημένη συσχέτιση να οφείλεται:

1) Στην προηγούμενη λήψη αλκυλιούντων παραγόντων **2)** Στην ανοσοκαταστολή που οφείλεται στην βασική νόσο **3)** Στην ανοσοκαταστολή που οφείλεται στην χορήγηση των αναλόγων των πουρινών.

Η συσχέτιση της ανοσοκαταστολής με την πιθανότητα ανάπτυξης νεοπλασίας αποδίδεται στην παρατήρηση ότι ασθενείς με μακρά χορήγηση ανοσοκατασταλτικών, όπως π.χ. ασθενείς με μεταμόσχευση οργάνων παρουσιάζουν αυξημένη επίπτωση νεοπλασματικών νοσημάτων.

ΑΥΤΟΜΑΤΟΣ ΥΦΕΣΗ

Αυτόματος ύφεση πολύ σπάνια δυνατό να εμφανισθεί σε ασθενή με ΧΛΛ. Μέχρι σήμερα πολύ λίγες περιπτώσεις έχουν ανακοινωθεί στην διεθνή βιβλιογραφία⁽²²¹⁾.

Οι περιπτώσεις αυτές αφορούσαν συνήθως ασθενείς πρώιμων σταδίων και συνοδεύονταν στη συνέχεια από μακρά επιβίωση. Συχνά, της αυτόματης ύφεσης προηγήθηκε λοίμωξη ή εμβολιασμός⁽²⁷²⁾. Θεωρήθηκε πιθανό οι αυτόματες υφέσεις να ήταν αποτέλεσμα «ανοσολογικών μηχανισμών» που κινητοποιήθηκαν σαν αποτέλεσμα της λοίμωξης.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΙΧ

ΠΡΟΓΝΩΣΤΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ - ΘΕΡΑΠΕΙΑ

ΠΡΟΓΝΩΣΤΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ

Η ΧΛΛ αποτελεί νόσο με πολύ μεγάλο εύρος κλινικής συμπεριφοράς. Από την στιγμή της διάγνωσης η επιβίωση δυνατό να μη ξεπερνά τους ολίγους μήνες σε ορισμένους εκ των ασθενών προχωρημένων σταδίων ενώ, αντίθετα, δυνατό να είναι μεγαλύτερη των 10 ετών, προκειμένου για ασθενείς πρώιμων σταδίων. Όπως έχει ήδη περιγραφεί, η ανάπτυξη των σταδιοποιητικών συστημάτων Rai και Binet διακρίνει τους ασθενείς σε ομάδες με διαφορετική πρόγνωση. Δυστυχώς, οι υπάρχουσες σταδιοποιήσεις δεν δύναται να προσδιορίσουν την πρόγνωση των ασθενών που ανήκουν σε όμοια στάδια. Ιδιαίτερα οι ασθενείς πρώιμων σταδίων παρουσιάζουν μεγάλο εύρος κλινικής συμπεριφοράς και παρουσιάζουν ολική επιβίωση που κυμαίνεται από 4 μέχρι 20 έτη. Το γεγονός αυτό δημιούργησε την ανάγκη να αναζητηθούν παράμετροι μέσω των οποίων θα ήταν δυνατό να προσδιορίζεται η πρόγνωση ενός εκάστου εκ των ασθενών.

Οι προγνωστικοί παράγοντες, οι οποίοι έχουν μελετηθεί προκειμένου περί ασθενών με ΧΛΛ, περιγράφονται κατωτέρω³³⁹:

- **Στάδιο νόσου κατά Rai και Binet.** Έχει ήδη περιγραφεί σε προηγούμενες παραγράφους. Διακρίνονται ομάδες ασθενών πρώιμων, ενδιάμεσων και προχωρημένων σταδίων, με αντίστοιχη μέση ολική επιβίωση, που αφορά την κάθε ομάδα ξεχωριστά.
- **Χρόνος διπλασιασμού των λεμφοκυττάρων⁽¹⁷⁶⁾.** Οι ασθενείς πρώιμων σταδίων παρακολουθούνται χωρίς να υποβάλλονται σε θεραπεία. Η εκτίμηση των αιματολογικών παραμέτρων γίνεται συνήθως ανά τρίμηνα διαστήματα. Είναι δυνατό έτσι να προσδιορισθεί το χρονικό διάστημα που απαιτείται προκειμένου να διπλασιασθεί ο αριθμός των λεμφοκυττάρων του περιφερικού αίματος. Έχει διαπιστωθεί ότι ο χρόνος αυτός αποτελεί εξαιρετικό δείκτη εκτίμησης του βαθμού επιθετικότητας της νόσου. Ασθενείς με χρόνο διπλασιασμού των λεμφοκυττάρων >12 μήνες παρουσιάζουν σημαντικά μεγαλύτερη επιβίωση από ασθενείς με αντίστοιχο χρόνο <12 μήνες. Ο χρόνος διπλασιασμού των λεμφοκυττάρων διατηρεί τη προγνωστική του αξία και στις πολυπαραγοντικές αναλύσεις που λαμβάνουν υπόψη τους και άλλες προγνωστικές παραμέτρους.

- **Πρότυπο διήθησης μυελού των οστών.** Από ιστολογικές μελέτες μεγάλου αριθμού οστεομυελικών βιοψιών σε ασθενείς με ΧΛΛ έχει διαπιστωθεί ότι υπάρχουν 4 πιθανά πρότυπα μυελικής διήθησης (οζώδες, διάμεσο, μικτό, διάχυτο), τα οποία έχουν ήδη περιγραφεί σε προηγούμενες παραγράφους. Έχει αποδειχθεί ότι ασθενείς με οζώδες και διάμεσο πρότυπο διήθησης μυελού παρουσιάζουν μεγαλύτερη επιβίωση και μεγαλύτερο διάστημα ελεύθερο θεραπείας σε σχέση με ασθενείς με διάχυτο πρότυπο διήθησης. Η προγνωστική σημασία του προτύπου διήθησης του μυελού είναι ανεξάρτητη του σταδίου νόσου.
- **Κυτταρογενετικά ευρήματα.** Τα ευρήματα από την κυτταρογενετική μελέτη σε ασθενείς με ΧΛΛ, όπως και η προγνωστική τους σημασία, έχει ήδη περιγραφεί σε προηγούμενες παραγράφους. Συνολικά αναφέρεται ότι η καλύτερη πρόγνωση συνοδεύει τον φυσιολογικό καρύοτυπο και τα ελλείμματα 13q. Αντίθετα, ασθενείς με σύνθετες χρωμοσωμικές ανωμαλίες, καθώς και ασθενείς με διαταραχές στο 11q και 17p παρουσιάζουν εξαιρετικά πτωχή πρόγνωση. Ασθενείς με τρισωμία 12 παρουσιάζουν ενδιάμεση πρόγνωση. Η προγνωστική σημασία των κυτταρογενετικών ευρημάτων είναι ανεξάρτητη των υπολοίπων προγνωστικών παραμέτρων.
- **VH-mutational status.** Η ύπαρξη ή όχι μεταλλάξεων των V-γόνων των βαρέων αλυσέων των ανοσοσφαιρινών διακρίνει δύο υπότυπους ΧΛΛ, την VH-mutated ΧΛΛ και την VH-unmutated ΧΛΛ. Όπως έχει ήδη περιγραφεί, ασθενείς με VH-mutated υπότυπο παρουσιάζουν σημαντικά καλύτερη πρόγνωση σε σχέση με ασθενείς με τον VH-unmutated υπότυπο. Η προγνωστική σημασία του VH-mutational status δεν είναι ανεξάρτητη όλων των υπόλοιπων προγνωστικών παραμέτρων, αφού έχει διαπιστωθεί συσχέτιση των δύο υποτύπων με συγκεκριμένες κυτταρογενετικές διαταραχές. Όμως, και ο υπότυπος VH-mutated παρουσιάζει ετερογένεια, όσον αφορά την προγνωστική του αξία. Πρόσφατα δεδομένα δείχνουν ότι ασθενείς με VH-mutated υπότυπο και αναδιάταξη των γονιδιακών τμημάτων VH3-21 και JH6 παρουσιάζουν πτωχή πρόγνωση ανάλογη των ασθενών με VH-unmutated υπότυπο⁽²⁵³⁾.
- **Επίπεδα στον ορό του ενζύμου κινάση της θυμιδίνης (TK)** ^(102, 103). Ασθενείς με επίπεδα TK στον ορό μεγαλύτερα των 7.0 U/L παρουσιάζουν σημαντικά βραχύ χρονικό διάστημα ελεύθερο προόδου της νόσου σε σχέση με ασθενείς με μικρότερα επίπεδα.
- **Επίπεδα στον ορό του διαλυτού CD23** ^(220, 235). Ασθενείς με αυξημένα επίπεδα στον ορό του διαλυτού CD23 παρουσιάζουν ταχεία πρόοδο νόσου. Η προγνωστική

σημασία των επιπέδων του CD23 είναι ιδιαίτερα σημαντική, προκειμένου περί ασθενών με ενδιάμεσα στάδια ΧΛΛ.

- **Επίπεδα στον ορό της β2-μικροσφαιρίνης**^(127, 174). Ασθενείς με επίπεδα στον ορό β2-μικροσφαιρίνης μεγαλύτερα των 4.0mg/L παρουσιάζουν ταχύτερη πρόοδο νόσου σε σχέση με ασθενείς με μικρότερα επίπεδα.
- **Άτυπη ΧΛΛ**. Ασθενείς με μορφολογικά ευρήματα συμβατά με την διάγνωση της άτυπης μορφής της νόσου (π.χ. ασθενείς με αύξηση των προλεμφοκυττάρων στο περιφερικό αίμα ή με παρουσία λεμφοκυττάρων με εντομή) έχει διαπιστωθεί από κλινικές παρατηρήσεις ότι παρουσιάζουν πτωχότερη πρόγνωση σε σχέση με ασθενείς με την τυπική μορφή της ΧΛΛ. Δεν είναι απολύτως εξακριβωμένο εάν η προγνωστική σημασία της ανωτέρω παρατήρησης διατηρεί ανεξάρτητη αξία σε πολυπαραγοντικές αναλύσεις.
- **Άτυπα ανοσοφαινοτυπικά ευρήματα**. Ασθενείς με άτυπα ανοσοφαινοτυπικά ευρήματα, όπως π.χ. θετικότητα στον δείκτη FMC7, παρουσιάζουν πτωχότερη πρόγνωση σε σχέση με ασθενείς με τυπικό ανοσοφαινότυπο. Δεν είναι επίσης απολύτως αποσαφηνισμένο εάν η προγνωστική σημασία της παραμέτρου διατηρεί την στατιστική της σημαντικότητα σε πολυπαραγοντικές αναλύσεις.
- **Εκφραση μορίων προσκόλλησης**. Κλινικές μελέτες που διερευνούν την έκφραση μορίων προσκόλλησης σε ασθενείς με ΧΛΛ, έχουν αναζητήσει την προγνωστική σημασία της παρουσίας συγκεκριμένων μορίων. Τα κλινικά δεδομένα έχουν ήδη περιγραφεί σε προηγούμενα κεφάλαια, δυστυχώς όμως παρουσιάζουν αντιφατικά αποτελέσματα και αποτελούν αντικείμενο συνεχιζόμενης έρευνας.

Η αναζήτηση προγνωστικών παραμέτρων μέσω των οποίων θα είναι δυνατή η εκτίμηση της πρόγνωσης για κάθε ανεξάρτητο ασθενή αποτελεί επιτακτική ανάγκη, ιδιαίτερα για τους μικρής ηλικίας πάσχοντες, οι οποίοι είναι επιλέξιμοι για επιθετικότερες θεραπευτικές μεθόδους. Θα ήταν επιθυμητό η επιστημονική κοινότητα να καταλήξει στην δημιουργία ενός ομόφωνα αποδεκτού προγνωστικού συστήματος βαθμολόγησης, ανάλογο του IPI-index, που αφορά τα NHL υψηλού βαθμού κακοήθειας. Για τον σκοπό αυτό απαιτείται η διενέργεια πολυκεντρικών προοπτικών μελετών, που θα περιλαμβάνουν μεγάλο αριθμό ασθενών και οι οποίες θα διερευνήσουν, μέσω πολυπαραγοντικής ανάλυσης, όλες τις γνωστές μέχρι σήμερα προγνωστικές παραμέτρους.

ΘΕΡΑΠΕΙΑ ΤΗΣ ΧΛΛ

Η ΧΛΛ παρουσιάζει μακρόχρονη φυσική πορεία και μεγάλο εύρος βιολογικής συμπεριφοράς. Με βάση τα ανωτέρω και εξαιτίας του ότι οι υπάρχουσες θεραπευτικές μέθοδοι αδυνατούν να επιφέρουν την οριστική ίαση της νόσου, ερώτημα αποφασιστικής σημασίας, που απασχολεί του κλινικούς, είναι ο χρόνος έναρξης θεραπείας. Δεδομένα από πολλές κλινικές μελέτες και μία σχετικά πρόσφατη μεταανάλυση που αφορούσε 2048 ασθενείς, έδειξαν ότι η πρόωμη έναρξη θεραπείας σε ασυμπτωματικούς ασθενείς δεν συνοδεύεται με αύξηση στην ολική επιβίωση⁽⁴¹⁾.

ΕΝΑΡΞΗ ΘΕΡΑΠΕΙΑΣ - ΠΟΤΕ;

Το National Cancer Institute (NCI) θέσπισε τα ακόλουθα κριτήρια για την έναρξη θεραπείας σε ασθενείς με ΧΛΛ⁽³⁸⁾:

1. Παρουσία συστηματικής συμπτωματολογίας (απώλεια βάρους, πυρετός, εφιδρώσεις, εύκολη κόπωση) που αποδίδονται στη νόσο μετά ολοκληρωμένο κλινικοεργαστηριακό έλεγχο.
2. Αναιμία (Hb <10gr/dl) ή θρομβοπενία (ΑΜΠ <100.000/μl), που οφείλονται σε διήθηση του μυελού από τη νόσο (όχι αυτοάνοσης ή άλλης αιτιολογίας).
3. Μαζική ή συμπτωματική σπληνομεγαλία (σπλην >6cm κάτωθεν του πλευρικού τόξου).
4. Ογκώδης ή συμπτωματική λεμφαδενοπάθεια (μέγιστη διάμετρος >10cm).
5. Αυτοάνοση αιμολυτική αναιμία ή/και αυτοάνοση θρομβοπενία ανθεκτική στην θεραπεία με κορτικοστεροειδή.
6. Προοδευτική αύξηση του αριθμού των λεμφοκυττάρων >50% σε διάστημα δύο μηνών ή υπολογιζόμενος χρόνος διπλασιασμού <6 μήνες.

Άλλα κριτήρια που έχουν προταθεί σαν ενδείξεις έναρξης θεραπείας στην ΧΛΛ, χωρίς να υπάρχει γενική ομοφωνία, είναι: **1)** αύξηση των προλεμφοκυττάρων στο περιφερικό αίμα >10%, και **2)** απόλυτος αριθμός λεμφοκυττάρων >300.000/μl.

ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΑ ΣΧΗΜΑΤΑ

Η θεραπευτική προσπάθεια στην ΧΛΛ στοχεύει κυρίως στην ανακούφιση των συμπτωμάτων του ασθενούς και στην βελτίωση της ποιότητας ζωής και δευτερευόντως στην αύξηση

της ολικής επιβίωσης. Τα δεδομένα από τις μέχρι σήμερα θεραπευτικές προσπάθειες περιγράφονται κατωτέρω:

1) Αλκυλιούντες παράγοντες (± κορτικοστεροειδή)

Οι αλκυλιωτικοί παράγοντες είναι αποτελεσματικοί στην θεραπεία της ΧΛΛ και η χλωραμβουκίλη είναι ο συχνότερα χρησιμοποιούμενος⁽¹²⁹⁾. Ενώ η θεραπεία με χλωραμβουκίλη έχει σαν αποτέλεσμα ύφεση της νόσου σε σημαντικό ποσοστό ασθενών, η πιθανότητα επίτευξης πλήρους ύφεσης είναι εξαιρετικά μικρή (<10%). Παρά την κλινική αποτελεσματικότητα των αλκυλιούντων παραγόντων, δεν υπάρχουν προοπτικές τυχαιοποιημένες μελέτες, που να πιστοποιούν την αύξηση στην ολική επιβίωση των ασθενών.

Η χλωραμβουκίλη δύναται να συνδυασθεί και με κορτικοστεροειδή, παρά το γεγονός ότι τρεις τυχαιοποιημένες μελέτες δεν ανέδειξαν πλεονέκτημα επιβίωσης με την προσθήκη των στεροειδών. Τα κορτικοστεροειδή σαν μονοθεραπεία έχουν πολύ χαμηλό ποσοστό απάντησης και προδιαθέτουν σε ευκαιριακές λοιμώξεις, επιβαρύνοντας την ήδη υπάρχουσα ανασοκαταστολή. Πέραν των σαφών θεραπευτικών ενδείξεων των κορτικοστεροειδών σε περιπτώσεις αυτοάνοσων επιπλοκών της νόσου, υπάρχουν λίγα μόνο δεδομένα που δικαιολογούν την χρησιμοποίησή τους σε συνδυασμό με αλκυλιούντες παράγοντες σαν αρχική θεραπεία.

Μολονότι έχουν χρησιμοποιηθεί πολλά θεραπευτικά σχήματα που περιλαμβάνουν την χλωραμβουκίλη, η άριστη δοσολογία και ο ιδανικός τρόπος χορήγησης δεν έχουν διαπιστωθεί. Η συνεχής καθημερινή χορήγηση 15mg χλωραμβουκίλης μέχρι την επίτευξη πλήρους ύφεσης ή την εμφάνιση τοξικότητας, ίσως να αποδειχθεί το πλέον αποτελεσματικό σχήμα. Η διαλείπουσα χορήγηση 10-15 ημέρες κάθε μήνα είναι αρκετά αποτελεσματικός και ο πιο δημοφιλής τρόπος θεραπείας στον Ελληνικό χώρο.

2) Συνδυασμένη χημειοθεραπεία (χωρίς ανάλογα πουρινών)

Πολλαπλοί χημειοθεραπευτικοί συνδυασμοί, όπως CHOP (κυκλοφωσφαμίδη, δοξουρουμπικίνη, βινκριστίνη, πρεδνιζόνη), mini-CHOP, CAP (κυκλοφωσφαμίδη, δοξουρουμπικίνη, πρεδνιζόνη) έχουν χρησιμοποιηθεί σε ασθενείς με ΧΛΛ, σε σύγκριση με μονοθεραπεία με αλκυλιούντες παράγοντες. Μεταάνάλυση των κλινικών δεδομένων κατέδειξε ότι οι ασθενείς που έλαβαν συνδυασμένη χημειοθεραπεία παρουσίασαν μεγαλύτερα ποσοστά απάντησης σε σχέση με τους ασθενείς που έλαβαν μονοθεραπεία με αλκυλιούντες παράγοντες, χωρίς όμως αυτό να μεταφράζεται σε αύξηση της ολικής επιβίωσης⁽¹²⁹⁾. Η συν-

δυσασμένη χημειοθεραπεία χρησιμοποιείται σαν δεύτερη ή τρίτη γραμμή θεραπείας, καθώς και σε περιπτώσεις εκτροπής σε λέμφωμα υψηλής κακοήθειας.

3) Ανάλογα πουρινών και συνδυασμοί με άλλα χημειοθεραπευτικά

Η εισαγωγή των αναλόγων των πουρινών (φλουνταραμπίνη, κλαδριβίνη, πεντοστατίνη) από τα μέσα της δεκαετίας 1980 είχε σαν αποτέλεσμα την εφαρμογή τους στην θεραπευτική αντιμετώπιση της ΧΛΛ^(8, 129). Η φλουνταραμπίνη (Fludara) είναι ο πλέον μελετημένος παράγοντας στην θεραπεία της ΧΛΛ. Τρεις μεγάλες τυχαιοποιημένες μελέτες συγκρίναν την αποτελεσματικότητα της fludara σαν πρώτη θεραπεία σε ασθενείς με ΧΛΛ σε σχέση με άλλες θεραπευτικές εφαρμογές, όπως μονοθεραπεία με αλκυλιούντες παράγοντες^(76, 77, 188). Οι μελέτες αυτές έδειξαν ότι η θεραπεία με fludara είχε σαν αποτέλεσμα μεγαλύτερα ποσοστά απάντησης και ιδιαιτέρως πλήρων υφέσεων, χωρίς όμως αυτό να μεταφράζεται σε αύξηση της ολικής επιβίωσης των ασθενών. Η μυελοκαταστολή και οι λοιμώξεις ήταν αυξημένες σε ασθενείς που έλαβαν fludara. Η χορήγηση της fludara δυνατό να προκαλέσει αυτοάνοση αιμολυτική αναιμία (AAA) και θα πρέπει να αποφεύγεται σε ασθενείς με προϋπάρχουσα AAA. Η εμπειρία από την χρήση άλλων αναλόγων των πουρινών (κλαδριβίνη, πεντοστατίνη) στην θεραπεία της ΧΛΛ είναι λιγότερο εκτενής. Τα υπάρχοντα κλινικά δεδομένα συνηγορούν υπέρ του ότι η αποτελεσματικότητά τους είναι αντίστοιχη με αυτήν της fludara.

Πειραματικά δεδομένα δείχνουν συνεργική δράση των αλκυλιούντων παραγόντων με τα ανάλογα πουρινών, καθώς φαίνεται ότι οι βλάβες του DNA, που προκαλούνται από τους πρώτους, δεν δύναται να επιδιορθωθούν, λόγω της παρεμβολής της δράσης των δεύτερων παραγόντων. Ο συνδυασμός της κυκλοφωσφαμίδης με την fludara είναι ο πλέον μελετημένος. Τρεις πρόσφατες μελέτες φάσης II σε πρωτοθεραπευόμενους ασθενείς με ΧΛΛ έδειξαν ενθαρρυντικά αποτελέσματα, ενώ ήδη βρίσκονται σε εξέλιξη μελέτες φάσης III, που διερευνούν το ίδιο ερώτημα. Απομένει, φυσικά, να αποδειχθεί αν η θεραπεία με τον ανωτέρω συνδυασμό προκαλεί αύξηση στην ολική επιβίωση.

Εχουν χρησιμοποιηθεί επίσης σε μελέτες φάσεις I και II, συνδυασμοί αλκυλιωτικών παραγόντων (κυκλοφωσφαμίδη, χλωραμβουκίλη) με άλλα ανάλογα πουρινών, όπως κλαδριβίνη, πεντοστατίνη. Από την μελέτη των κλινικών δεδομένων δεν διαπιστώθηκε οι συνδυασμοί αυτοί να υπερέχουν των συνδυασμών της fludara και, επιπλέον, επιπλέκονται από σημαντική μυελοτοξικότητα και αυξημένη πιθανότητα λοιμώξεων.

Πρόσφατες εργασίες εστιάζονται στην διερεύνηση της αποτελεσματικότητας της συγχορήγησης μονοκλωνικού αντι-CD20 αντισώματος, με τον συνδυασμό αλκυλιούντων παραγόντων και fludara⁽²⁶⁸⁾.

4) Μονοκλωνικά αντισώματα - Ιντερφερόνη

Το αντι-CD20 μονοκλωνικό αντίσωμα (rituximab), χρησιμοποιούμενο στο δοσολογικό σχήμα των NHL, έχει μικρή δραστηριότητα σε ασθενείς με ΧΛΛ. Είναι πιθανό, η έλλειψη αποτελεσματικότητας να οφείλεται στο γεγονός ότι το αντιγόνο CD20 υποεκφράζεται στα λευχαιμικά κύτταρα της ΧΛΛ. Κλινικά δεδομένα από δύο πρόσφατες μελέτες φάσης II δείχνουν ότι η αύξηση της δόσης και της συχνότητας χορήγησης συνοδεύεται από αύξηση της αποτελεσματικότητας, χωρίς σημαντική τοξικότητα⁽¹⁸⁹⁾.

Μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα έχει προσφέρει η χορήγηση του μονοκλωνικού αντισώματος αντι-CD52 (Campath) ^(80, 199, 200). Το αντιγόνο CD52 εκφράζεται στο 95% των ώριμων Β και Τ-λεμφοκυττάρων και τα λευχαιμικά κύτταρα της ΧΛΛ αποτελούν ιδεατό στόχο, αφού εκφράζουν το εν λόγω αντιγόνο. Το μονοκλωνικό αντίσωμα αντι-CD20 έχει εγκριθεί για την θεραπεία των ανθεκτικών στην fludara περιπτώσεων ΧΛΛ. Η θεραπεία με Campath επιπλέκεται από σημαντική τοξικότητα, λόγω της σημαντικής ανοσοκαταστολής που προκαλεί. Χορήγηση ιντερφερόνης έχει δοκιμασθεί και παρουσιάζει μικρή αποτελεσματικότητα^(22, 201).

5) Μεταμόσχευση προγονικών αιμοποιητικών κυττάρων

Η εφαρμογή αυτόλογης (ΑΥΤΟ) ή αλλογενούς (ΑΛΛΟ) μεταμόσχευσης προγονικών αιμοποιητικών κυττάρων (ΜΑΚ) στην θεραπευτική αντιμετώπιση της ΧΛΛ έχει αυξηθεί σημαντικά στην διάρκεια των τελευταίων ετών⁽⁶⁵⁾.

Η αλλογενής μεταμόσχευση μπορεί δυνητικά να οδηγήσει σε οριστική ίαση ασθενείς με ΧΛΛ. Μετά ΑΛΛΟ-ΜΑΚ η πιθανότητα υποτροπής είναι πολύ μικρότερη σε σχέση με όλες τις υπόλοιπες θεραπευτικές μεθόδους. Δυστυχώς η ΑΛΛΟ-ΜΑΚ απαιτεί την ύπαρξη ιστοσυμβατού δότη και συνοδεύεται από σημαντική νοσηρότητα και θνητότητα, με αποτέλεσμα η μέθοδος να δύναται να εφαρμοσθεί σε σημαντικά περιορισμένο ποσοστό ασθενών με ΧΛΛ. Η πενταετής επιβίωση μετά ΑΛΛΟ-ΜΑΚ δεν ξεπερνά το 50%. Γίνεται, επομένως, αντιληπτό ότι οι κίνδυνοι της μεθόδου ξεπερνούν τα ενδεχόμενα οφέλη από την εφαρμογή της σε ασθενείς μεγάλης ηλικίας και με σημαντικό προσδόκιμο επιβίωσης.

Η εφαρμογή την τελευταία πενταετία ΑΛΛΟ-ΜΑΚ μετά από μη-μυελοκαταστροφικά σχήματα προετοιμασίας (mini-ΑΛΛΟ) αποτέλεσε σημαντική πρόοδο στον τομέα των μεταμοσχεύσεων. Η mini-ΑΛΛΟ παρουσιάζει σημαντικά λιγότερη τοξικότητα σε σχέση με την κλασική ΑΛΛΟ, ενώ διατηρεί την ευεργετική δράση του μοσχεύματος έναντι της νόσου (GVL) και το γεγονός αυτό καθιστά ιδιαίτερα προσφιλή την εφαρμογή της σε ασθενείς οι οποίοι, λόγω της ηλικίας τους, δεν ήταν επιλέξιμοι στο παρελθόν για θεραπεία με κλασική ΑΛΛΟ. Επειδή, όμως, η ανωτέρω μέθοδος δεν είναι εντελώς ελεύθερη επιπλοκών (δύναται να επιπλακεί με σημαντικού βαθμού GVHD), θα πρέπει να εφαρμόζεται σε επιλεγμένους ασθενείς, με πτωχή πρόγνωση έτσι, ώστε τα αναμενόμενα οφέλη να υπερτερούν των κινδύνων.

Η ΑΥΤΟ-ΜΑΚ συνοδεύεται από εξαιρετικά χαμηλή τοξικότητα σε σχέση με την ΑΛΛΟ-ΜΑΚ, χωρίς όμως να παρουσιάζει την ανοσολογική δράση του μοσχεύματος (GVL). Θεραπευτικός στόχος της ΑΥΤΟ-ΜΑΚ δεν είναι η ριζική ίαση της νόσου αλλά η κατά το δυνατό μεγαλύτερη μείωση του φορτίου νόσου και η παράταση της ολικής επιβίωσης. Η θνητότητα της μεθόδου είναι μικρότερη από 5%, δυστυχώς όμως η πιθανότητα υποτροπής είναι σημαντική και ξεπερνά το 50% σε διάστημα 4 ετών. Η ολική επιβίωση στα 5 έτη είναι 60% και είναι συγκρίσιμη με αυτήν που παρατηρείται μετά από ΑΛΛΟ-ΜΑΚ.

Επί του παρόντος, τόσο η ΑΛΛΟ όσο και ΑΥΤΟ-ΜΑΚ θεωρούνται πειραματικές θεραπευτικές μέθοδοι και θα πρέπει να εφαρμόζονται στα πλαίσια ελεγχόμενων κλινικών μελετών.

6) Υποστηρικτική θεραπεία

Οι λοιμώξεις παραμένουν η κύρια επιπλοκή και η σημαντικότερη αιτία θανάτου σε ασθενείς με ΧΛΛ. Η εκ του νοσήματος ανοσοανεπάρκεια, έκφραση της οποίας είναι και η παρατηρούμενη υπογαμμασφαιριναιμία, αποτελεί τον κύριο προδιαθεσικό παράγοντα για την ανάπτυξη λοιμώξεων. Τα υποστηρικτικά μέτρα για την αποφυγή λοιμώξεων περιλαμβάνουν την προφυλακτική χορήγηση αντιβιοτικών για την αποφυγή συγκεκριμένων λοιμώξεων (π.χ. *pneumocystis carinii*), την χορήγηση αυξητικών παραγόντων των λευκών (ιδίως σε περιπτώσεις λευκοπενίας μετά χημειοθεραπεία), καθώς και την χορήγηση ενδοφλεβίου γ-σφαιρίνης (IVIgG).

Από κλινικές μελέτες χορήγησης IVIgG σε ασθενείς με ΧΛΛ συνάγονται τα κάτωθι⁽⁴²⁾:

1. Η χορήγηση IVIgG συνοδεύεται από μείωση μόνο των μέτριας βαρύτητας βακτηριδιακών λοιμώξεων.

2. Η χορήγηση IVIgG δεν συνοδεύεται από παράταση της ολικής επιβίωσης των ασθενών.
3. Η χορήγηση IVIgG δεν μειώνει αλλά αντίθετα αυξάνει το συνολικό κόστος της θεραπείας, χωρίς αυτό να αντισταθμίζεται από την κλινική αποτελεσματικότητα (not cost-effective).
4. Η χορήγηση IVIgG έχει θέση μόνο για επιλεγμένους ασθενείς, με πολλαπλές υποτροπιάζουσες λοιμώξεις και σημαντική υπογαμμασφαιριναιμία.

Η πλειοψηφία των ασθενών παρουσιάζουν σημαντικού βαθμού αναιμία σε κάποια φάση της νόσου. Η διήθηση του μυελού αποτελεί την κύρια αιτία της αναιμίας σε ασθενείς με ΧΛΛ. Αν αποκλεισθούν άλλα αίτια αναιμίας, όπως απώλεια αίματος, αυτοάνοση αιμολυτική αναιμία, τότε δύναται να χορηγηθεί ανθρώπινη ανασυνδυασμένη ερυθροποιητίνη, με ευνοϊκά αποτελέσματα. Η χορήγηση ερυθροποιητίνης αυξάνει τα επίπεδα της αιμοσφαιρίνης, με αποτέλεσμα την βελτίωση της ποιότητας της ζωής των ασθενών αλλά και την καθυστέρηση στην έναρξη της κυτταροστατικής θεραπείας^(203, 206). Προοπτικές τυχαioποιημένες μελέτες είναι απαραίτητο να διενεργηθούν, προκειμένου να βεβαιωθεί αν η χορήγηση ερυθροποιητίνης συνοδεύεται από παράταση της ολικής επιβίωσης.

ΔΕΥΤΕΡΗ ΕΝΟΤΗΤΑ

I. ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΣ ΚΥΚΛΟΣ

II. ΤΕΛΟΜΕΡΑΣΗ - ΤΕΛΟΜΕΡΙΔΙΑ

I. ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΣ ΚΥΚΛΟΣ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

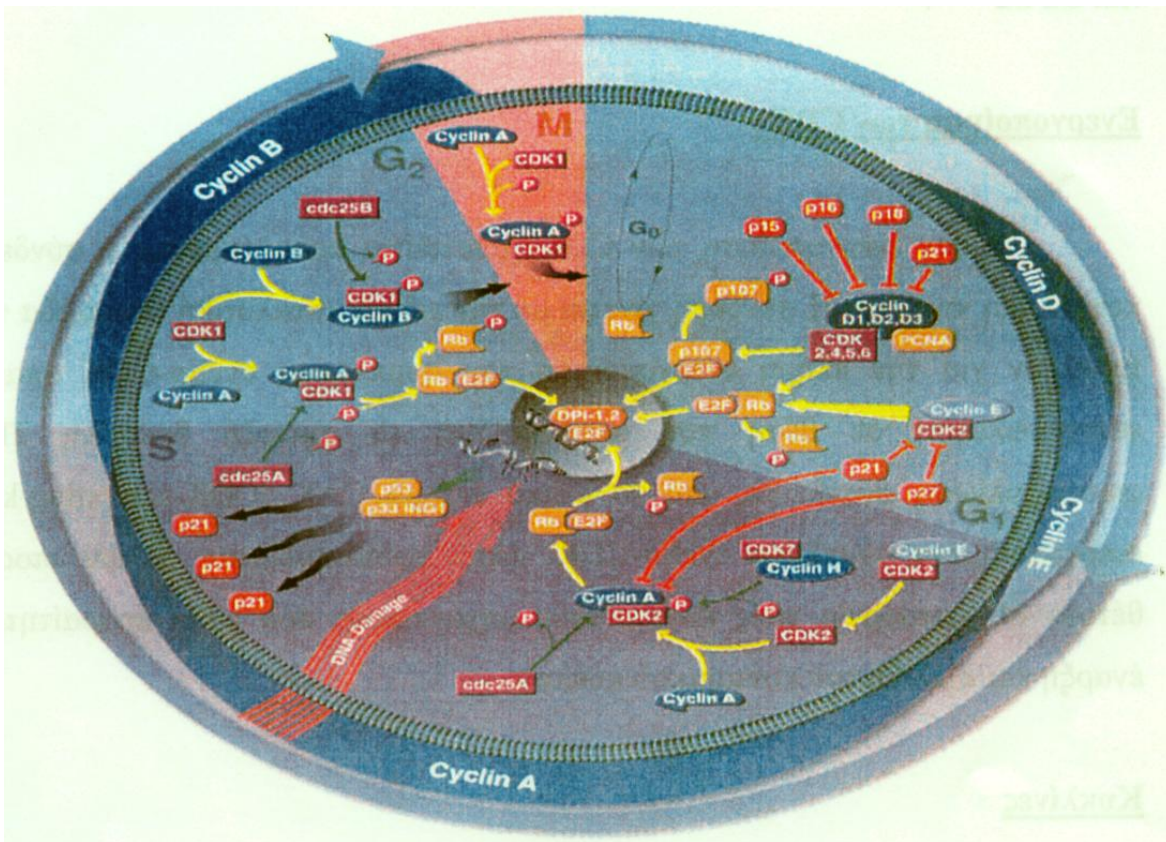
Το κύτταρο, προκειμένου να αντεπεξέλθει τόσο στις εσωτερικές απαιτήσεις του ίδιου του οργανισμού στον οποίο ανήκει όσο και στο εξωτερικό περιβάλλον το οποίο επιδρά πάνω του, διαθέτει αρκετούς μηχανισμούς. Μπορεί να παραμείνει όπως είναι σε φάση ηρεμίας ή να διαφοροποιηθεί ή να υποστεί κυτταρική διαίρεση ή, τέλος, να ακολουθήσει τον δρόμο της ηθελημένης αυτοκαταστροφής (προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος). Εάν το κύτταρο αποφασίσει να διαιρεθεί, τότε θα πρέπει να επανδρωθεί από μία ομάδα ενζύμων και ρυθμιστικών πρωτεϊνών, το σύνολο των οποίων αποτελεί τον μηχανισμό του κυτταρικού κύκλου.

Ο κυτταρικός κύκλος αποτελείται από 4 φάσεις, εκ των οποίων οι δύο είναι κατ' εξοχήν λειτουργικές (S, M) και οι άλλες δύο προπαρασκευαστικές (G_1 , G_2) (Εικόνα 1). Στην φάση S γίνεται ο διπλασιασμός του DNA ενώ ο ακριβής διαχωρισμός του διπλασιασμένου DNA και η ισότιμη κατανομή του στα δύο θυγατρικά κύτταρα ολοκληρώνεται στην φάση M. Κατά την διάρκεια της φάσης G_1 γίνεται η προετοιμασία του βιοχημικού δυναμικού του κυττάρου, έτσι, ώστε να καταστεί δυνατή η πραγματοποίηση της φάσης S. Αντίστοιχα, στην φάση G_2 διεκπεραιώνεται η προετοιμασία για την διεξαγωγή της φάσης M.

Τα θυγατρικά κύτταρα που προκύπτουν με την ολοκλήρωση της φάσης M του κυτταρικού κύκλου έχουν τις ακόλουθες δυνατότητες: **1)** Επανείσοδο στον κυτταρικό κύκλο, δηλαδή στην φάση G_1 , **2)** Οριστική έξοδο από τον κύκλο και τελική διαφοροποίηση, **3)** Παραμονή σε φάση ηρεμίας G_0 .

Η χρονική αλληλουχία των γεγονότων που διαδραματίζονται κατά την διεξαγωγή του κυτταρικού κύκλου είναι αυστηρά προκαθορισμένη και βρίσκεται κάτω από την επιτήρηση ρυθμιστικών μηχανισμών ⁽¹²²⁾.

Εικόνα 1: Κυτταρικός Κύκλος



ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΟΥ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΥ ΚΥΚΛΟΥ

Κινάσες Εξαρτώμενες των Κυκλινών (Cyclin-Dependent-Kinases) CDKs

Τα πρωτεϊνικά μόρια CDKs είναι ενδοκυττάρια ένζυμα με δραστηριότητα κινάσης και ασκούν καθοριστικό ρόλο στην ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου. Από μελέτες σε ανθρώπινα κύτταρα μέχρι σήμερα έχουν απομονωθεί 7 μόρια με δραστηριότητα CDKs. Το 1^ο μέλος της ομάδας που απομονώθηκε, το CDK1, ονομάζεται και CDC2⁽¹⁷⁹⁾.

Ενεργοποίηση των CDKs

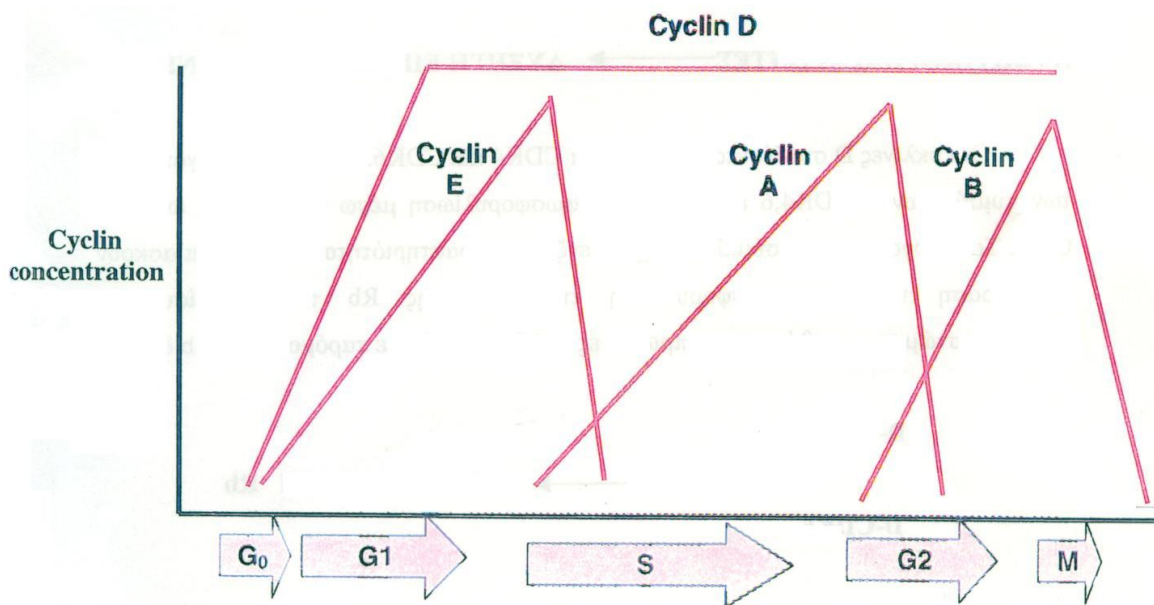
Για την ενεργοποίηση των CDKs απαιτείται προηγουμένως η σύνδεση με την κατάλληλη κυκλίνη. Η σύνδεση γίνεται με την ειδική καταλυτική υποομάδα των CDKs. Επιπλέον, για την πλήρη ενεργοποίηση του συμπλόκου cyclin-CDK, απαιτείται και φωσφορυλίωση σε θέση που περιλαμβάνει το αμινοξύ θρεονίνη Thr-160. Η φωσφορυλίωση επιτελείται από το ειδικό ένζυμο CAK (CDK-activating-kinase). Τα ενεργοποιημένα σύμπλοκα cyclin-CDK, μέσω φωσφορυλίωσης άλλων υποστρωμάτων, θέτουν σε λειτουργία τους κυτταρικούς μηχανισμούς που είναι απαραίτητοι για την έναρξη και εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου.

Κυκλίνες

Πρωτεϊνικά μόρια που συμμετέχουν στην ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου μέσω σύνδεσης και ενεργοποίησης των κατάλληλων CDKs. Στα ανθρώπινα κύτταρα υπάρχουν αρκετές ομάδες κυκλινών (A,B,D και E), οι οποίες ασκούν δράση σε διάφορα σημεία του κυτταρικού κύκλου. Τα επίπεδα των διάφορων κυκλινών κυμαίνονται ανάλογα με την φάση εξέλιξης του κυτταρικού κύκλου (Εικόνα 2)⁽²⁹³⁾.

Διάφορες αιματολογικές κακοήθειες συνοδεύονται από παθολογική έκφραση ορισμένων κυκλινών, π.χ. έχει βρεθεί ότι στο λέμφωμα μανδύα η αντιμετάθεση t (11;14) οδηγεί σε υπερέκφραση της **κυκλίνης D₁**, η οποία δρα στη φάση G₁ του κυτταρικού κύκλου.

Εικόνα 2: Επίπεδα κυκλινών ανάλογα με την φάση εξέλιξης του κυτταρικού κύκλου



Αναστολείς των Κυκλινο-Εξαρτώμενων Κινασών

Πρωτεϊνικά μόρια τα οποία αναστέλλουν τα μόρια CDK με στοιχειομετρική ένωση προκαλώντας αναστολή του κυτταρικού κύκλου, κυρίως στη φάση G₁, περιλαμβάνουν την οικογένεια των αναστολέων INK4 (p16^{INK4a}, p15^{INK4b}, p18^{INK4c} και p19^{INK4d}) και την ομάδα cip/kip (p27, p21 και p57). Πρόσφατα έχουν χαρακτηρισθεί ως ογκοκατασταλτικά γονίδια, καθώς η έλλειψή τους σε ποντίκια οδηγεί σε ταχύτατη κυτταρική αύξηση και υψηλό ποσοστό εμφάνισης αυτόματης καρκινογένεσης. Ο τρόπος με τον οποίο οι πρωτεΐνες αυτές αναστέλλουν την δράση των κυκλινοεξαρτώμενων κινασών αναπτύσσεται σε επόμενη παράγραφο.

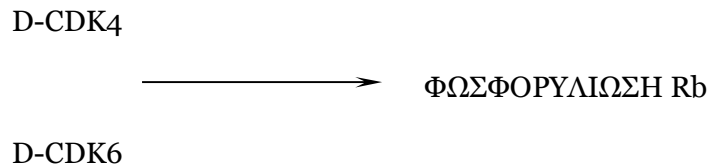
ΦΑΣΗ G₁ ΤΟΥ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΥ ΚΥΚΛΟΥ

Για την έναρξη και εξέλιξη της φάσης G₁ είναι απαραίτητη η διέγερση του κυττάρου με την δράση αυξητικών παραγόντων. Αποτέλεσμα της δράσης αυτής είναι η αύξηση της σύνθεσης των κυκλινών της ομάδας D. Κατά κάποιον τρόπο οι κυκλίνες D λειτουργούν

σαν αισθητήρες για την ύπαρξη μηνυμάτων αυξητικών παραγόντων. Στην ομάδα D ανήκουν 3 κυκλίνες D₁, D₂, D₃, με διαφορετική ιστική έκφραση.

ΑΥΞΗΤΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ \longrightarrow **ΑΥΞΗΣΗ ΕΠΙΠΕΔΩΝ ΚΥΚΛΙΝΗΣ D**

Οι κυκλίνες D συνδέονται με τα μόρια CDK4 και CDK6. Η πλήρης ενεργοποίηση των συμπλόκων D-CDK4,6 επιτελείται με φωσφορυλίωση μέσω του ειδικού ενζύμου CAK. Τα ενεργοποιημένα σύμπλοκα έχουν ενζυμική δραστηριότητα κινάσης και ασκούν την δράση τους με φωσφορυλίωση της πρωτεΐνης Rb του γονιδίου του ρετινοβλαστώματος, καθώς και τις πρωτεΐνες p107 και p130, με παρόμοια του Rb δράση.



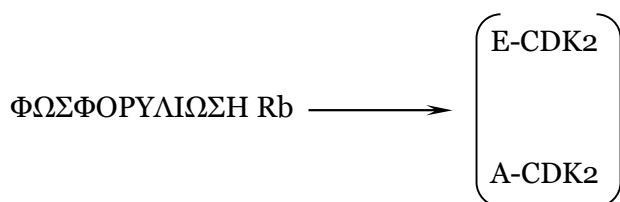
ΟΔΟΣ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ ΤΟΥ ΡΕΤΙΝΟΒΛΑΣΤΩΜΑΤΟΣ, RB

Η πρωτεΐνη Rb, προϊόν του γονιδίου του ρετινοβλαστώματος, δρα ρυθμιστικά στην έκφραση γονιδίων, τα προϊόντα των οποίων είναι απαραίτητα για την μετάβαση του κυττάρου στην φάση S. Η δράση αυτή του Rb επιτελείται μέσω ομάδας πρωτεϊνών που περιγράφονται με τον συμβολισμό E2Fs. Οι πρωτεΐνες E2Fs έχουν δράση μεταγραφικών παραγόντων. Στην ενεργό (υποφωσφορυλιωμένη) μορφή του, το Rb σχηματίζει σύμπλοκα με τις πρωτεΐνες E2Fs, αναστέλλοντας κατά τον τρόπο αυτό την δράση τους. Φωσφορυλίωση του μορίου του Rb απελευθερώνει τα μόρια E2Fs, τα οποία δύνανται πλέον να ασκήσουν την δράση τους σαν μεταγραφικοί παράγοντες και να ευοδώσουν την έκφραση των γονιδίων στόχων του Rb (Σχήμα 1) ⁽²⁹³⁾.



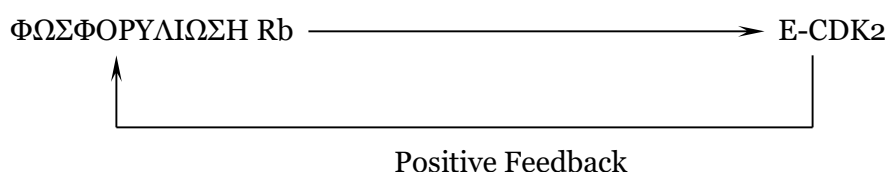
ΓΟΝΙΔΙΑ ΣΤΟΧΟΙ ΤΟΥ Rb

Τα γονίδια που ενεργοποιούνται με την φωσφορυλίωση του Rb κωδικοποιούν για πρωτεΐνες που είναι απαραίτητες για τον διπλασιασμό του DNA, όπως η διυδροφυλλική αναγωγή (DHFR), η DNA-πολυμεράση α, η κινάση της θυμιδίνης, κλπ. Επίσης, μέσω της φωσφορυλίωσης του Rb επάγεται η σύνθεση των κυκλινών E και A, οι οποίες είναι απαραίτητες για την μετάβαση και την διεκπεραίωση της φάσης S. Οι κυκλίνες E και A συνδέονται με το αντίστοιχο μόριο CDK2. Τα ενεργοποιημένα σύμπλοκα A-CDK2 και E-CDK2 έχουν δραστηριότητα κινάσης και φωσφορυλιώνουν υποστρώματα στόχους, με τελικό αποτέλεσμα την κινητοποίηση του μηχανισμού διπλασιασμού του DNA.



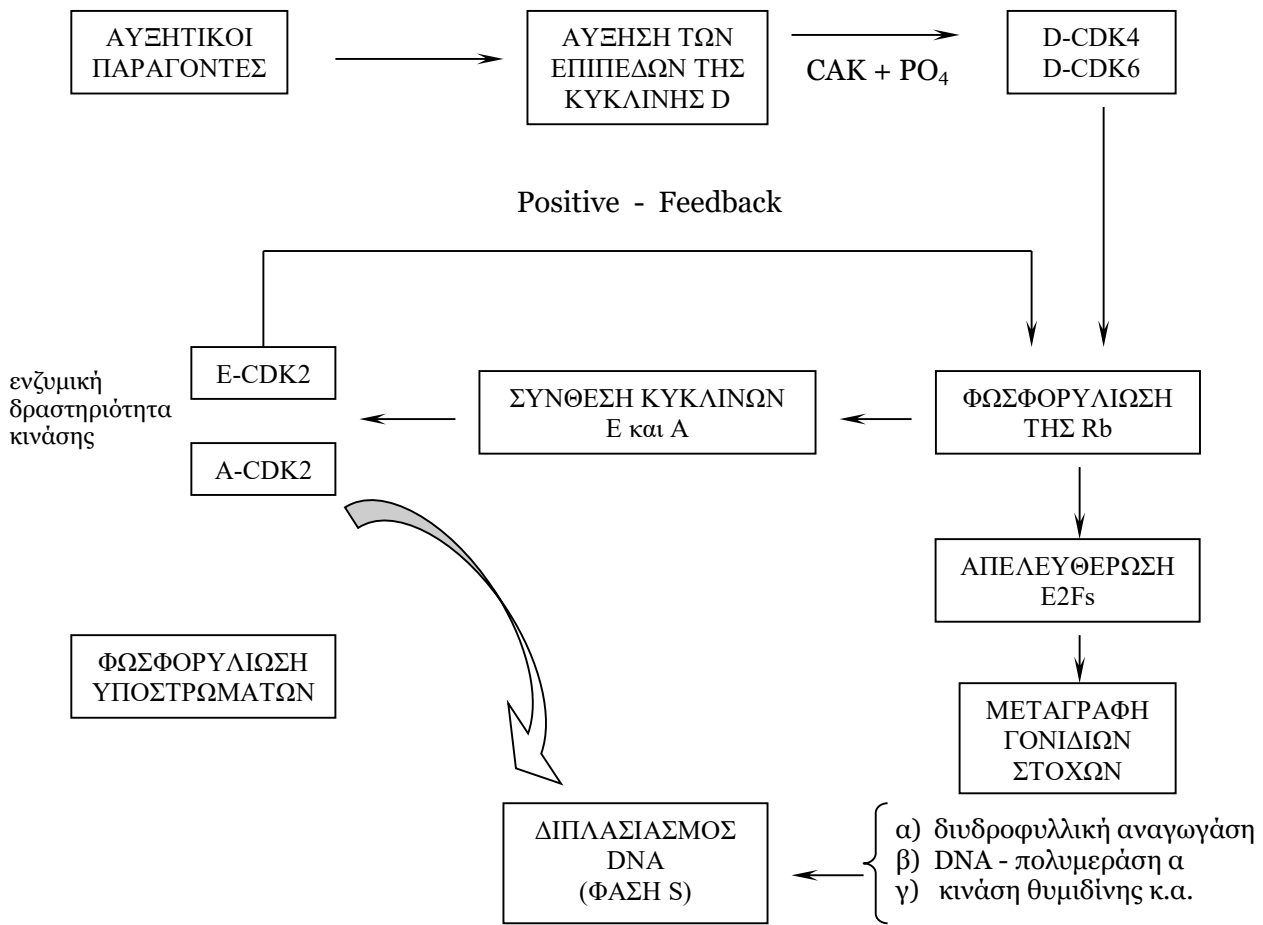
Περιοριστικό Σημείο (Restriction Point)

Όπως περιγράφηκε προηγουμένως, το πρωταρχικό γεγονός που δίδει κίνηση στον κυτταρικό κύκλο είναι η αύξηση των επιπέδων της κυκλίνης D, που επιτυγχάνεται με την δράση αυξητικών παραγόντων πάνω στο κύτταρο. Η κυκλίνη D, μέσω της ενεργοποίησης των αντίστοιχων CDK4 και CDK6, δίδει γένεση στην φωσφορυλίωση της πρωτεΐνης Rb. Είναι προφανές ότι η μέχρι τώρα εξέλιξη του φαινομένου βρίσκεται υπό την επίδραση της εξωκυτταρικής προέλευσης αυξητικών παραγόντων. Η πρωτεΐνη Rb, στην ανενεργό, φωσφορυλιωμένη μορφή της, απελευθερώνει την έκφραση των γονιδίων στόχων της. Μεταξύ άλλων προκαλείται η αύξηση της έκφρασης του γονιδίου της κυκλίνης E και η γένεση του συμπλόκου E-CDK2. Το ενεργοποιημένο σύμπλοκο E-CDK2 διαθέτει αφ' ενός ενζυμική δραστηριότητα κινάσης φωσφορυλιώνοντας υποστρώματα στόχους, με αποτέλεσμα την μετάβαση και διεκπεραίωση της φάσης S, και αφ' ετέρου, μέσω μηχανισμού θετικής ανατροφοδότησης (positive feedback), προκαλεί περαιτέρω φωσφορυλίωση της πρωτεΐνης του Rb.



Από αυτό το χρονικό σημείο και μετά, μέσω του μηχανισμού θετικής ανατροφοδότησης, παράγονται υψηλά επίπεδα, τόσο φωσφορυλιωμένου Rb όσο και ενεργοποιημένου συμπλόκου E-CDK2. Το χρονικό αυτό σημείο ονομάζεται περιοριστικό σημείο (restriction point) και από εδώ και στο εξής η διατήρηση του Rb στην φωσφορυλιωμένη μορφή του δεν εξαρτάται πλέον από την κυκλίνη D. Ο κυτταρικός κύκλος εξελίσσεται με τρόπο περισσότερο ανεξάρτητο από την ύπαρξη εξωκυττάρων διεγερτικών ερεθισμάτων. Στο σχήμα 1 απεικονίζονται τα διάφορα στάδια εξέλιξης της φάσης G1 του κυτταρικού κύκλου.

Σχήμα 1: G1 φάση του κυτταρικού κύκλου



ΦΑΣΗ S ΤΟΥ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΥ ΚΥΚΛΟΥ

Από τη στιγμή που το κύτταρο εισέρχεται στην φάση S έχει να επιτελέσει το κολοσσιαίο έργο της αντιγραφής των 3×10^9 βάσεων του ανθρωπίνου γονιδιώματος σε χρονικό διάστημα μόλις ολίγων ωρών. Τα ένζυμα που κατασκευάζουν τα αντίγραφα του DNA ονομάζονται DNA-πολυμεράσες. Στα ευκαρυωτικά κύτταρα έχουν απομονωθεί πέντε διαφορετικές πολυμεράσες (α, β, γ, δ και ε). Οι DNA-πολυμεράσες (α, δ ίσως και ε) επιτελούν την επιμήκυνση του DNA. Η DNA-πολυμεράση β δρα στην επιδιόρθωση του DNA, ενώ DNA-πολυμεράση γ βρίσκεται στα μιτοχόνδρια και αντιγράφει το DNA αυτού του οργανιδίου. Η διαδικασία αντιγραφής του DNA πρέπει να επιτελείται με απόλυτη πιστότητα. Η συχνότητα λανθασμένης εισαγωγής νουκλεοτιδίου είναι ένα λάθος ανά 10^5 - 10^6 νουκλεοτίδια. Αυτό θα είχε σαν αποτέλεσμα, μετά την ολοκλήρωση της αντιγραφής και την κυτταρική διαίρεση, τα θυγατρικά να περιέχουν περίπου 1.000-10.000 μεταλλάξεις, γεγονός με καταστροφικές συνέπειες. Τα ευκαρυωτικά κύτταρα διαθέτουν μηχανισμούς ελέγχου και επιδιόρθωσης του γονιδιώματος. Η γονιδιακή επιδιόρθωση επιτελείται με την ενζυμική δράση εξωνουκλεασών, και έχει σαν αποτέλεσμα την δραστική μείωση των λαθών που προκύπτουν κατά την διάρκεια της αντιγραφής αλλά και του κυτταρικού κύκλου συνολικά. Ανεπάρκεια των μηχανισμών επιδιόρθωσης του DNA έχει σαν αποτέλεσμα την προδιάθεση για ανάπτυξη νεοπλασιών.

Για την πιστή ολοκλήρωση της αντιγραφής μέσα στο χρονικό διάστημα των ολίγων ωρών είναι απαραίτητη η έναρξη της αντιγραφής από πολλές θέσεις ταυτόχρονα. Η διαδικασία της αντιγραφής περιλαμβάνει διακριτά στάδια έναρξης, επιμήκυνσης και λήξης. Στο στάδιο της έναρξης έχουμε αναγνώριση μιας συγκεκριμένης αλληλουχίας έναρξης του DNA (origin) από ένα σύμπλεγμα πρωτεϊνών, το οποίο ονομάζεται σύμπλεγμα αναγνώρισης του σημείου έναρξης ORC (origin-recognition-complexes).

Είναι προφανές ότι διάφορα γεγονότα πρέπει να συμβούν στην περιοχή της έναρξης. Πριν ξεκινήσει η σύνθεση του DNA οι μητρικές αλυσίδες πρέπει να ξετυλιχθούν και να διατηρηθούν για κάποιο διάστημα σε μονόκλωνη μορφή, ώστε να γίνει η έναρξη της αντιγραφής. Η επιμήκυνση συντελείται με την συμμετοχή ενός άλλου συμπλέγματος πρωτεϊνών, το οποίο ονομάζεται αντιγραφόσωμα (replisome). Καθώς το σύμπλεγμα κινείται κατά μήκος του DNA στην διχάλα αντιγραφής, ξετυλίγονται οι μητρικές αλυσίδες και συντίθενται οι θυγατρικές. Στην διαδικασία αντιγραφής του γονιδιώματος συμμετέχει πλειάδα πρωτεϊνών, όπως: PCNA (proliferation-cell-nuclear-antigen), RPA (replication-protein-A), DNA-polymerase, DNA-primase, RNase, κλπ.

Οι μηχανισμοί με τους οποίους το κύτταρο ελέγχει την έναρξη και την εξέλιξη της φάσης S δεν έχουν αποσαφηνισθεί πλήρως. Κυρίαρχο ρόλο διαδραματίζει η κυκλίνη A, η έκφραση της οποίας επάγεται με την φωσφορυλίωση της πρωτεΐνης Rb.

Όπως διακρίνουμε στην Εικόνα 2, τα επίπεδα της κυκλίνης A παραμένουν αυξημένα καθ' όλη την διάρκεια της φάσης S. Η κυκλίνη A συνδέεται με την αντίστοιχη εξαρτώμενη κινάση CDK2. Το ενεργοποιημένο σύμπλοκο A-CDK2 διαθέτει ενζυμική δραστηριότητα κινάσης και ασκεί την λειτουργία του μέσω φωσφορυλίωσης υποστρωμάτων στόχων, η φύση των οποίων δεν είναι απολύτως εξακριβωμένη.



ΑΝΤΙΓΡΑΦΗ ΤΟΥ DNA - ΔΡΑΣΗ ΤΟΥ ΕΝΖΥΜΟΥ ΤΗΣ ΤΕΛΟΜΕΡΑΣΗΣ ⁽²⁷¹⁾

Το μοντέλο Watson και Crick προέβλεπε ότι η αντιγραφή πρέπει να είναι ημισυντηρητική. Ο ημισυντηρητικός διπλασιασμός του DNA σημαίνει ότι το θυγατρικό μόριο περιέχει μία μητρική και μία νέα αλυσίδα. Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, για την αντιγραφή του DNA απαιτείται προηγουμένως η αναδιάταξη των δύο συμπληρωματικών ελίκων. Η DNA πολυμεράση επιτελεί την διαδικασία της αντιγραφής μόνο κατά την διεύθυνση 5' - 3' και απαιτεί σαν αρχικό εκκινητή μόριο RNA (RNA primer). Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα η σύνθεση του DNA να είναι ασύμμετρη: η μία αλυσίδα, η συμπληρωματική της 3' - 5' μητρικής αλυσίδας (οδηγός κλώνος) συντίθεται συνεχώς ενώ η άλλη, η συμπληρωματική της 5' - 3' μητρικής αλυσίδας (συνοδός κλώνος) συντίθεται κομματιαστά, με την εισαγωγή παρεμβαλλομένων τμημάτων RNA, τα οποία ονομάζονται τμήματα okazaki. Μετά την ολοκλήρωση της αντιγραφής επέρχεται απομάκρυνση των τμημάτων okazaki και των RNA εκκινητών. Τα κενά που δημιουργήθηκαν με την απώλεια των μορίων okazaki δύνανται να συμπληρωθούν με την δραστηριότητα της DNA πολυμεράσης, αφού υπάρχει τμήμα εκκίνησης προς την διεύθυνση 5' - 3'. Από την άλλη μεριά, στο 5' άκρο και των δύο νέων αλυσίδων, παραμένει ένα έλλειμμα που προέρχεται από την αφαίρεση του RNA εκκινητού και το οποίο δεν μπορεί να αντικατασταθεί με DNA, επειδή δεν υπάρχει τμήμα εκκίνησης προς την διεύθυνση 5' - 3'. Το γεγονός αυτό έχει σαν συνέπεια την απώλεια μικρού τμήματος DNA από τα χρωμοσωμικά άκρα **τελομερίδια** (τελομερή) μετά από κάθε κυτταρική διαίρεση.

Είναι εύλογο ότι, μετά από αρκετούς κύκλους, η απώλεια γενετικού υλικού θα είναι σημαντικής έκτασης, γεγονός που θα καθιστά αδύνατη την περαιτέρω κυτταρική διαίρεση. Πρόσφατα ανακαλύφθηκε ένα ένζυμο, η **τελομεράση**, η δράση της οποίας αποκαθιστά το πρόβλημα που προκύπτει στο τέλος της αντιγραφής. Ο τρόπος που δρα η τελομεράση είναι να επιμηκύνει τα 3' άκρα των μητρικών αλυσίδων του DNA που χρησιμοποιούνται ως καλούπι, δημιουργώντας έτσι ένα μακρύτερο καλούπι για τα καινούργια 5' άκρα. Οι απλές επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες που προσθέτει η τελομεράση καθορίζονται **όχι από το DNA αλλά από ένα RNA**, που αποτελεί τμήμα της τελομεράσης. Η τελομεράση είναι, επομένως, μία **ριβονουκλεοπρωτεΐνη** και η δράση της είναι αυτή μιας εξειδικευμένης αντιστροφής μεταγραφάσης. Κύτταρα που διαθέτουν επαρκή λειτουργικότητα τελομεράσης δύνανται να υφίστανται απεριόριστο αριθμό διαιρέσεων, εφόσον **δεν προκαλείται** βράχυνση των τελομερών. Στα σωματικά κύτταρα επέρχεται σταδιακά μείωση της λειτουργικότητας της τελομεράσης, με αποτέλεσμα τα κύτταρα να έχουν περιορισμένη δυνατότητα κυτταρικών διαιρέσεων. Η σταδιακή απώλεια τελομεράσης επεξηγεί το φαινόμενο της γήρανσης των σωματικών κυττάρων.

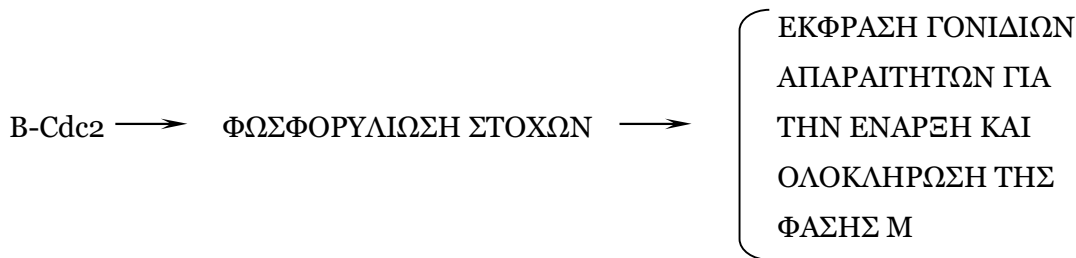
Αντιθέτως, τα νεοπλασματικά κύτταρα αποκτούν δυνατότητα απεριόριστου αριθμού κυτταρικών διαιρέσεων (αθανατοποιούνται) μέσω της απρόσκοπτης έκφρασης της τελομεράσης. Η δραστηριότητα του συγκεκριμένου ενζύμου αποτελεί κομβικό σημείο στην γένεση των νεοπλασιών και πιθανόν στο μέλλον η αναστολή αυτού του ενζύμου να αποτελέσει θεραπευτικό στόχο.

ΦΑΣΗ G₂ ΤΟΥ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΥ ΚΥΚΛΟΥ

Μετά την ολοκλήρωση του διπλασιασμού του DNA και πριν από την έναρξη της μίτωσης μεσολαβεί η φάση G₂, κατά την οποία το κύτταρο προετοιμάζει τους μοριακούς και βιοχημικούς μηχανισμούς που είναι απαραίτητοι για την κυτταρική διαίρεση. Η εξέλιξη της φάσης G₂ βρίσκεται υπό τον ρυθμιστικό έλεγχο της κυκλίνης B. Η σύνθεση της κυκλίνης B αρχίζει με την ολοκλήρωση της φάσης S και τα επίπεδά της παραμένουν αυξημένα σε όλη την διάρκεια της φάσης G₂ και M (Εικόνα 2).

Η κυκλίνη B συνδέεται με την πρωτεΐνη Cdc2. Το σύμπλοκο B-Cdc2 ενεργοποιείται με φωσφορυλίωση σε θέση που περιλαμβάνει το αμινοξύ θρεονίνη Thr161 ⁽²⁷¹⁾.

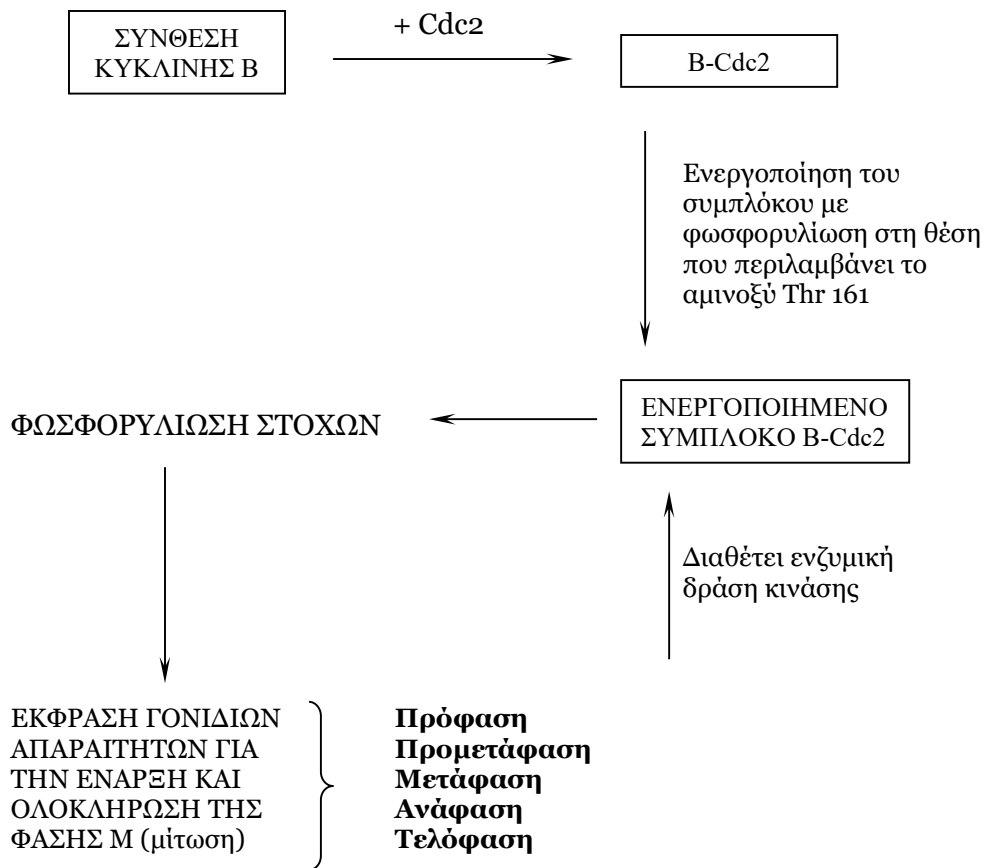
Το ενεργοποιημένο σύμπλοκο B-Cdc2 διαθέτει ενζυμική δραστηριότητα κινάσης και ασκεί την λειτουργία του με την φωσφορυλίωση υποστρωμάτων στόχων, η φύση των οποίων δεν είναι πλήρως εξακριβωμένη.



ΦΑΣΗ Μ ΤΟΥ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΥ ΚΥΚΛΟΥ

Κατά την διάρκεια της φάσης αυτής επιτελείται η διαδικασία της μίτωσης, που έχει σαν στόχο τον διαχωρισμό του διπλασιασμένου DNA και την ισομερή κατανομή του στα δύο θυγατρικά κύτταρα. Μετά την ολοκλήρωση του διπλασιασμού του DNA επιτελείται και ο διπλασιασμός του κεντροσώματος (centrosome). Τα δύο κεντροσώματα μεταναστεύουν στους δύο αντίθετους πόλους του πυρήνα πριν την έναρξη της μίτωσης, με σκοπό την δημιουργία της μιτωτικής ατράκτου (mitotic spindle). Κατά την διάρκεια της πρόφασης και της προμετάφασης σχηματίζονται μικροσωληνίδια, που συνδέουν τα κεντροσώματα με τους κινητόχωρους (δομές στην περιοχή των κεντρομεριδίων) των θυγατρικών χρωματίδων. Κατά την διάρκεια της μετάφασης, τα χρωματοσώματα διατάσσονται στο κέντρο της μιτωτικής ατράκτου. Η μετακίνηση των θυγατρικών χρωματοσωμάτων προς τους αντίθετους πόλους της μιτωτικής ατράκτου χαρακτηρίζει την φάση της ανάφασης. Στην συνέχεια, η μιτωτική άτρακτος αποσυντίθεται και δύο καινούργιοι πυρήνες σχηματίζονται (τελόφαση). Ακολουθεί η διαίρεση του κυτταροπλάσματος και η γένεση των δύο θυγατρικών κυττάρων. Στο Σχήμα 2 απεικονίζεται σχηματικά η εξέλιξη των φάσεων G2 και M του κυτταρικού κύκλου.

Σχήμα 2: Φάση G2 και M του κυτταρικού κύκλου



ΑΝΑΣΤΟΛΕΙΣ ΤΩΝ ΚΥΚΛΙΝΟ-ΕΞΑΡΤΩΜΕΝΩΝ ΚΙΝΑΣΩΝ CKIs (Cyclin-Dependent-Kinases-Inhibitors)

Η λειτουργικότητα των κυκλινοεξαρτώμενων κινασών υφίσταται και αρνητική ρύθμιση, μέσω δράσης αναστολέων. Οι αναστολείς αυτοί χαρακτηρίζονται με τον συμβολισμό CKIs. Υπάρχουν δύο οικογένειες πρωτεϊνών με την ιδιότητα του αναστολέα των CDKs ⁽¹¹¹⁾.

1. Η ομάδα Cip/Kip περιλαμβάνει τις πρωτεΐνες p27, p21 και p57. Η ομάδα αυτή συνδέεται και δρα ανασταλτικά, κυρίως στα ενεργοποιημένα σύμπλοκα A-CDK2 και E-CDK2. Η δυνατότητα αναστολής στα σύμπλοκα D-CDK4,6 είναι σημαντικά περιορισμένη. Η δραστηριότητα των αναστολέων αυτής της ομάδας έχει σαν αποτέλεσμα την αδυναμία μετάβασης του κυττάρου από την φάση G1 στη φάση S1, καθώς και την αδυναμία της ολοκλήρωσης της φάσης S.

Ο αναστολέας p27 επάγεται με την δράση ανασταλτικών μηνυμάτων που προέρχονται από κυτταρική επαφή (cell to cell contact), όπως επίσης και με την δράση του μετατρεπτικού αυξητικού παράγοντα β, TGF-β (Transforming growth factor-β) ⁽⁵⁹⁾. Στα ηρεμούντα κύτταρα (φάση G₀) τα επίπεδα της πρωτεΐνης p27 παραμένουν σε υψηλά επίπεδα. Με την είσοδο του κυττάρου στην φάση G₁ παρατηρείται μεγάλη συσσώρευση συμπλόκων D-CDK4,6 τα οποία δεσμεύουν την περίσσεια της πρωτεΐνης p27. Η σύνδεση της p27 με την κυκλίνη D δεν επηρεάζει την ενζυμική δραστηριότητα των συμπλόκων D-CDK4,6 αλλά, αντίθετα, απενεργοποιεί την πρωτεΐνη p27. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα την ελεύθερη έκφραση και δράση των E-CDK2, A-CDK2 και την απρόσκοπτη εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου. Όταν στερήσουμε από το κύτταρο την εξωγενή δράση αυξητικών παραγόντων τα σύμπλοκα της κυκλίνης D αποδομούνται, η πρωτεΐνη p27 αποδεσμεύεται, τα ενεργοποιημένα σύμπλοκα E-CDK2, A-CDK2 αναστέλλονται και ο κυτταρικός κύκλος διακόπτεται.

Στην ομάδα αυτή των αναστολέων ανήκει και η πρωτεΐνη p21, ερέθισμα για την έκφραση της οποίας αποτελεί η παρουσία βλάβης στο γενετικό υλικό ⁽³⁰⁾. Όπως θα περιγραφεί στις επόμενες παραγράφους, βασικός επαγωγέας της p21 είναι η ενεργοποίηση της οδού της πρωτεΐνης p53. Λιγότερο μελετημένη είναι η δράση της πρωτεΐνης p57, του 3^{ου} μέλους της ομάδας Cip/Kip. Πιστεύεται ότι η p57 σχετίζεται με την αναστολή του κυτταρικού κύκλου σε τελικώς διαφοροποιημένα κύτταρα.

2. Η ομάδα των INK4 πρωτεϊνών ονομάζονται έτσι από την ικανότητά τους να αναστέλλουν την CDK4 (inhibit cdk4) ⁽²⁵⁷⁾. Οι πρωτεΐνες INK4 συνδέονται με τα σύμπλοκα D-

CDK4,6 και καταργούν την ενζυμική τους ικανότητα. Επιπλέον, προκαλούν αποδέσμευση των πρωτεϊνών Cip/Kip από την κυκλίνη D, αναστέλλοντας με τον τρόπο αυτό και την δραστηριότητα των κυκλινών E και A. Θα πρέπει να τονιστεί ότι η ικανότητα των πρωτεϊνών INK4 να αναστέλλουν την εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου εξαρτάται αποκλειστικά από την παρουσία λειτουργικής πρωτεΐνης Rb. Μέχρι σήμερα έχουν απομονωθεί 4 πρωτεΐνες που ανήκουν στην ομάδα INK4, οι p16, p15, p18, p19.

Λίγα είναι γνωστά για τα ερεθίσματα που επάγουν την έκφραση των πρωτεϊνών INK4, πιστεύεται ότι ορισμένες εξ αυτών, όπως η p15, επάγονται με την δράση του TGF-β.

ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑ Cip/Kip ΑΝΑΣΤΟΛΗ ΤΩΝ E-CDK2, A-CDK2	ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑ INK4 ΑΝΑΣΤΟΛΗ ΤΩΝ D-CDK4, D-CDK6
p21, p27, p57	p15, p16, p18, p19

ΣΗΜΕΙΑ ΕΛΕΓΧΟΥ ΤΟΥ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΥ ΚΥΚΛΟΥ (Cell Cycle Checkpoints)

Τα γεγονότα που διαδραματίζονται κατά την εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου βρίσκονται υπό την ρυθμιστική επιτήρηση μηχανισμών ελέγχου. Με την εποπτεία των μηχανισμών αυτών εξασφαλίζεται αφενός η χρονική διαδοχή των φάσεων του κύκλου και αφετέρου ότι η μετάβαση σε κάθε φάση ακολουθεί μετά την άρτια ολοκλήρωση της προηγούμενης. Για παράδειγμα, η μετάβαση στην μίτωση επιτελείται αφού προηγηθεί ο ακριβής διπλασιασμός του γενετικού υλικού (φάση S). Οι μηχανισμοί ελέγχου που επιτηρούν την ακριβή αλληλουχία των γεγονότων ονομάζονται σημεία ελέγχου του κυτταρικού κύκλου (cell-cycle checkpoints) ⁽⁶⁹⁾.

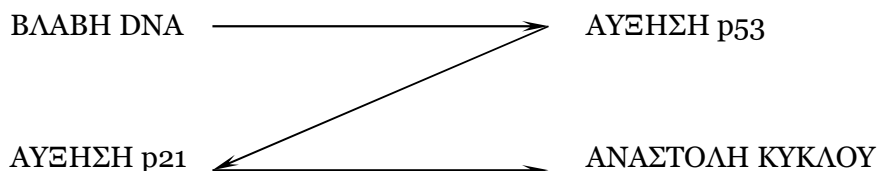
Διάφορα εξωκυττάρια και ενδοκυττάρια ερεθίσματα επιδρούν επί των σημείων ελέγχου (checkpoints) και είναι δυνατό να προκαλέσουν αναστολή στην εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου. Στέρηση θρεπτικών υλικών, ακραίες μεταβολές θερμοκρασίας, έλλειψη νουκλεοτιδίων, βλάβη του DNA, αποτελούν γεγονότα που δύνανται να αναστείλουν την περαιτέρω εξέλιξη του κύκλου. Το σπουδαιότερο και περισσότερο μελετημένο ερέθισμα που επιδρά επί των σημείων ελέγχου είναι η παρουσία βλαβών στο γενετικό υλικό. Η ιονίζουσα ακτινοβολία, η υπερϊώδης ακτινοβολία, διάφορα φάρμακα και τοξικές ουσίες, έχουν την δυνατότητα πρόκλησης βλαβών στο DNA. Το κύτταρο, μέσω της λειτουργίας πολύπλοκων βιο-

χημικών μηχανισμών, ανιχνεύει τις γενετικές βλάβες και αναστέλλει την μετάβαση στην επόμενη φάση του κυτταρικού κύκλου. Δίδεται έτσι η χρονική δυνατότητα να τεθούν σε λειτουργία οι μηχανισμοί επιδιόρθωσης του DNA. Εφόσον αποκατασταθεί η γενετική βλάβη αίρεται η αναστολή και το κύτταρο μεταβαίνει στην επόμενη φάση. Επί αποτυχίας των επιδιορθωτικών μηχανισμών, ενεργοποιούνται μηχανισμοί που οδηγούν σε απόπτωση. Με την ομαλή λειτουργία των μηχανισμών που επιδρούν επί των σημείων ελέγχου εξασφαλίζεται η πρόληψη της μεταβίβασης των γενετικών βλαβών που προκαλούνται κατά την διάρκεια της ζωής του κυττάρου. Αντιθέτως, αστοχία των ανωτέρω έχει σαν αποτέλεσμα αστάθεια του γενετικού υλικού, μεταβίβαση των μεταλλάξεων και προδιάθεση για νεοπλασματική εξαλλαγή.

ΣΗΜΕΙΟ ΕΛΕΓΧΟΥ ΦΑΣΗΣ G₁ (G₁ CHECKPOINT)

Η πρωτεΐνη p53, το προϊόν του αντίστοιχου ογκοκατασταλτικού γονιδίου, αποτελεί τον κυριότερο παράγοντα των μηχανισμών που προκαλούν αναστολή του κυτταρικού κύκλου στην φάση G₁. Το ερέθισμα που αυξάνει την έκφραση της p53 είναι η βλάβη του DNA ⁽¹⁴⁵⁾. Η p53, υπό φυσιολογικές συνθήκες, εκφράζεται σε όλα τα κύτταρα σε πολύ μικρές συγκεντρώσεις. Η πρωτεΐνη MDM2 αποτελεί τον σπουδαιότερο αναστολέα της p53. Οι δύο πρωτεΐνες συνδέονται, με τελικό αποτέλεσμα την ταχεία αποδόμηση της p53. Η μεταβολή στην έκφραση της p53 επέρχεται σε μετα-μεταγραφικό επίπεδο, με μεταβολές στην δραστηριότητα του μορίου μέσω φωσφορυλίωσης ή μεταβολή του ρυθμού αποδόμησης. Η πρωτεΐνη p53 λειτουργεί σαν μεταγραφικός παράγοντας, επηρεάζοντας έτσι την έκφραση μιας πλειάδας γονιδίων-στόχων. Ο βασικός μηχανισμός, με τον οποίο η πρωτεΐνη p53 αναστέλλει την εξέλιξη του κύκλου στην φάση G₁, είναι η έκφραση της πρωτεΐνης p21.

Η p21 έχει περιγραφεί σε προηγούμενες παραγράφους και λειτουργεί ως αναστολέας των κυκλινοεξαρτώμενων κινασών E-CDK2 και A-CDK2, οι οποίες είναι απαραίτητες για την ολοκλήρωση της φάσης G₁ και την μετάβαση στην φάση S.

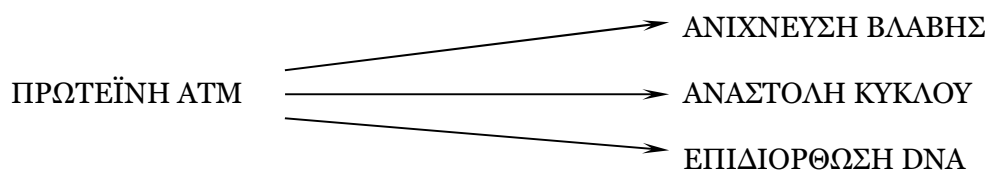


Θα πρέπει να τονισθεί ότι η πρωτεΐνη p21 δεν αποτελεί τον μοναδικό τρόπο με τον οποίο επέρχεται αναστολή στην φάση G₁, σαν αποτέλεσμα της παρουσίας γενετικής βλάβης. Καλλιέργειες ινοβλαστών από ποντίκια, με ομόζυγο έλλειμμα στο p21, εξακολουθούν να παρουσιάζουν αναστολή του κυτταρικού κύκλου μετά από ακτινοβόληση. Επιπλέον, τα συγκεκριμένα ποντίκια δεν παρουσιάζουν αυξημένη πιθανότητα ανάπτυξης νεοπλασιών. Από το γεγονός αυτό αποδεικνύεται η ύπαρξη και άλλων p53-εξαρτώμενων μηχανισμών ελέγχου της φάσης G₁ ⁽¹⁸⁷⁾.

ΣΗΜΕΙΟ ΕΛΕΓΧΟΥ ΦΑΣΗΣ S (S CHECKPOINT)

Οι μηχανισμοί αναστολής της φάσης S μετά την ανίχνευση γενετικών βλαβών στα κύτταρα θηλαστικών δεν είναι πλήρως εξακριβωμένοι. Σε κύτταρα ζυμομυκήτων έχει απομονωθεί σημαντικός αριθμός γονιδίων, όπως *mec1*, *mec2*, *hus1*-, τα προϊόντα των οποίων συμμετέχουν στους μηχανισμούς ελέγχου της φάσης S. Μέχρι πριν μερικά χρόνια δεν είχαν βρεθεί σε κύτταρα θηλαστικών αντίστοιχα γονίδια. Πρόσφατα απομονώθηκε και χαρτογραφήθηκε το γονίδιο ATM, η ομόζυγος αδρανοποίηση του οποίου δίδει γένεση στο νόσημα Αταξία - Τηλεαγγειεκτασία. Το γονίδιο ATM έχει μεγάλη ομολογία νουκλεοτιδικών αλληλουχιών με το γονίδιο *mec1*. Επίσης, από πειράματα σε καλλιέργειες κυττάρων ασθενών με AT, φαίνεται ότι υπάρχει ελλειμματική δραστηριότητα των μηχανισμών ελέγχου του κυτταρικού κύκλου. Η πρωτεΐνη ATM, προϊόν του αντίστοιχου γονιδίου, διαθέτει ενζυμική δραστηριότητα κινάσης και ενεργοποιεί μέσω φωσφορυλίωσης μία πλειάδα υποστρωμάτων στόχων, μεταξύ αυτών και την p53. Με την διενέργεια εξειδικευμένων πειραμάτων έχει διαπιστωθεί η παρουσία μεγάλης συγκέντρωσης της πρωτεΐνης ATM, σε περιοχές του γενετικού υλικού με βλάβη του DNA.

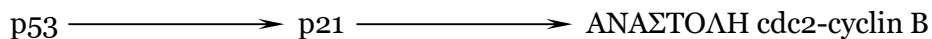
Φαίνεται, επομένως, ότι η πρωτεΐνη ATM λειτουργεί αφενός ως αισθητήρας για την ανίχνευση γενετικής βλάβης και αφετέρου ως επαγωγέας των μηχανισμών αναστολής του κύκλου και επιδιόρθωσης του DNA.



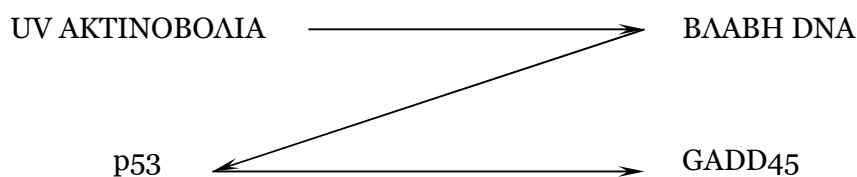
Επίσης, η πρωτεΐνη p53 συμμετέχει με διάφορους τρόπους στον έλεγχο της φάσης S. Έτσι: **1)** συνδέεται με την πρωτεΐνη RPA (replication protein A) και αναστέλλει την δράση της. Η RPA είναι απαραίτητη για την αντιγραφή του DNA, **2)** αναστέλλει την μεταγραφή της PCNA (proliferation cell nuclear antigen), σημαντικής βοηθητικής υποομάδας της πολυμεράσης δ, αναστέλλοντας έτσι τον διπλασιασμό του DNA και **3)** αναστέλλει την μεταγραφή της κυκλίνης A, η οποία, όπως έχει περιγραφεί στις προηγούμενες παραγράφους, είναι απαραίτητη για την έναρξη και ολοκλήρωση της φάσης S.

ΣΗΜΕΙΟ ΕΛΕΓΧΟΥ ΦΑΣΗΣ G₂ (G₂ CHECKPOINT)

Η αναστολή της εξέλιξης του κυτταρικού κύκλου στην φάση G₂, σαν αποτέλεσμα της παρουσίας βλάβης του γενετικού υλικού, είναι φαινόμενο που παρατηρείται συχνά σε κύτταρα θηλαστικών. Το σημείο ελέγχου της φάσης G₂ είναι πολύ περισσότερο μελετημένο σε κύτταρα ζυμομυκήτων και έχει απομονωθεί σημαντικός αριθμός γονιδίων, τα οποία είναι υπεύθυνα για την εκδήλωση του φαινομένου. Μεταλλάξεις στα εν λόγω γονίδια έχουν σαν αποτέλεσμα γενετική αστάθεια, καθώς και αυξημένη ευαισθησία στην επίδραση της ακτινοβολίας. Πολύ λιγότερα είναι γνωστά για το αντίστοιχο σημείο ελέγχου στα ανθρώπινα κύτταρα. Πειραματικά δεδομένα συνηγορούν υπέρ της συμμετοχής των πρωτεϊνών ATM και p53 στον έλεγχο της φάσης G₂. Δραστικά μόρια τα οποία επάγονται από την p53 και αναστέλλουν την εξέλιξη του κύκλου είναι τα: p21, 14-3-3 sigma, GADD45⁽²¹²⁾.



Η πρωτεΐνη 14-3-3 sigma είναι αναστολέας της φωσφατάσης cdc25C, η οποία με την σειρά της είναι υπεύθυνη για την ενεργοποίηση της κινάσης cdc2. Εξάλλου, από μελέτες σε ινοβλάστες ποντικού αλλά και ανθρώπου, διαπιστώθηκε ότι η έκφραση της GADD45 επάγεται από βλάβες του DNA που προκαλούνται από υπεριώδη ακτινοβολία, είναι p53 εξαρτώμενη και έχει σαν αποτέλεσμα την αναστολή του κύκλου.



ΣΗΜΕΙΟ ΕΛΕΓΧΟΥ ΦΑΣΗΣ M (M CHECKPOINT)

Διαταραχή της λειτουργίας της μιτωτικής ατράκτου κατά την διάρκεια της μίτωσης έχει σαν αποτέλεσμα την αναστολή της εξέλιξης του κυτταρικού κύκλου. Οι γνώσεις μας για τα γονίδια και τους μηχανισμούς με τους οποίους επιτελείται ο έλεγχος του γενετικού υλικού στην φάση της μίτωσης είναι ανεπαρκείς. Μη ικανοποιητικός έλεγχος του φαινομένου έχει σαν αποτέλεσμα την εμφάνιση ανευπλοειδικών κυττάρων. Επειδή χρωμοσωμιακές διαταραχές του τύπου της ανευπλοειδίας είναι συχνότερες στα νεοπλασματικά κύτταρα, είναι πιθανό οτι μεταλλάξεις των γονιδίων που εποπτεύουν του ελέγχου της φάσης M να έχουν σαν αποτέλεσμα την νεοπλασματική εξαλλαγή.

Πειραματικά δεδομένα συνηγορούν υπέρ της συμμετοχής της πρωτεΐνης p53 και στην ρύθμιση του ελέγχου της φάσης M ⁽¹⁶⁶⁾. Επώαση ινοβλαστών από p53-/- ποντικό με φάρμακα που διαταράσσουν την επαρκή λειτουργία της μιτωτικής ατράκτου, έχει σαν αποτέλεσμα την εμφάνιση πολυπλοειδικών κυττάρων. Αντιθέτως, επώαση ινοβλαστών από p53+/+ ποντικό με τα ίδια φάρμακα έχει σαν αποτέλεσμα την αναστολή της μίτωσης. Οι μηχανισμοί με τους οποίους η πρωτεΐνη p53 ασκεί τον ρυθμιστικό της έλεγχο στην φάση M δεν είναι γνωστοί.

II. ΤΕΛΟΜΕΡΑΣΗ - ΤΕΛΟΜΕΡΙΔΙΑ

Για την καλύτερη κατανόηση της αλληλεπίδρασης του μήκους τελομερών και τελομεράσης στη διαφοροποίηση και γήρανση των ανθρώπινων λευκοκυττάρων πρέπει να αναφερθούμε με συντομία στην καταγωγή και εξέλιξη των λευκοκυττάρων.

Περίληψη: Τα λευκοκύτταρα προέρχονται από αρχέγονα αιμοποιητικά κύτταρα του μυελού των οστών και διαφοροποιούνται σε πολλαπλούς τύπους ώριμων κυττάρων, τα οποία περιλαμβάνουν κύτταρα μυελοειδούς γενεαλογίας (κοκκιοκύτταρα, μονοκύτταρα, σιτευτικά) και κύτταρα λεμφοειδούς γενεαλογίας (T και B λεμφοκύτταρα).

Η ευδιάκριτη διαδρομή της διαφοροποίησής τους και οι μοναδικοί τους ρόλοι στην ανοσοαπάντηση παρέχουν ένα μοντέλο συγκριτικής ανάλυσης βιολογικών παραμέτρων, όπως είναι το μήκος του **τελομερούς** και η δραστηριότητα της τελομεράσης σε διαφορετικούς τύπους λευκοκυττάρων. Η ηλικία έχει επίσης συσχετισθεί με την μείωση των ανοσολογικών λειτουργιών, καθώς και με την μείωση του μήκους των τελομερών σε όλους τους τύπους λευκοκυττάρων.

Στην παρούσα αναφορά θα προσπαθήσουμε να συνοψίσουμε τις πρόσφατες προόδους στην μελέτη του μήκους του τελομεριδίου και την έκφραση της τελομεράσης στους διάφορους τύπους κυττάρων μυελοειδούς και λεμφοειδούς σειράς, με ιδιαίτερη επικέντρωση σε ό,τι αφορά τα T και B λεμφοκύτταρα (J. Leukoc. Biol., Τεύχος 70, σελ. 861-867, 2001):

Τα λευκοκύτταρα αποτελούνται από διαφορετικούς τύπους κυττάρων, τα οποία προέρχονται από τα αρχέγονα αιμοποιητικά κύτταρα μυελού των οστών και κυκλοφορούν στο αίμα και τους ιστούς, εκτελώντας συγγενείς και προσαρμοστικές ανοσολογικές λειτουργίες.

Με βάση τα γνωστά προγονικά κύτταρα, τα λευκοκύτταρα μπορούν να διαχωριστούν κυρίως σε **μυελοειδούς** και **λεμφοειδούς** γενεαλογίας.

Το **προγονικό μυελοειδές** κύτταρο δίνει **κοκκιοκύτταρα** (ουδετερόφιλα, ιωσινόφιλα, βασεόφιλα) μονοκύτταρα/μακροφάγα και σιτευτικά κύτταρα, τα οποία χρησιμοποιούνται ευρέως στην συγγενή ανοσοαπάντηση.

Το **προγονικό λεμφοειδές** κύτταρο δίνει T (CD⁴⁺ και CD⁸⁺) και B λεμφοκύτταρα, καθώς και (NK) κύτταρα, τα οποία είναι κυρίως υπεύθυνα για την προσαρμοστική ανοσοαπάντηση.

Κάθε τύπος λευκοκυττάρου ακολουθεί μία διακριτή διαδικασία διαφοροποίησης και ωρίμανσης.

Τα μυελοειδή προγονικά κύτταρα διαφοροποιούνται στον μυελό των οστών, προκειμένου να γίνουν κοκκιοκύτταρα, μονοκύτταρα και σιτευτικά και έπειτα μετακινούνται στο περιφερικό αίμα, με σχετικά μικρή διάρκεια ζωής (κυμαινόμενη από ώρες έως ημέρες) ⁽²⁹³⁾.

Τα λεμφοειδή προγονικά κύτταρα διαφοροποιούνται επίσης στον μυελό των οστών. Ωστόσο, μόνο τα Β λεμφοκύτταρα ωριμάζουν στον μυελό των οστών ⁽²⁹⁴⁾ ενώ τα Τ λεμφοκύτταρα ωριμάζουν στον θύμο αδένα ⁽²⁹⁵⁾. Τα ώριμα, τα παρθένα Β και Τ λεμφοκύτταρα έχουν πολύ μεγαλύτερη διάρκεια ζωής από τα ώριμα κύτταρα μυελοειδούς προέλευσης ⁽²⁹⁶⁾.

Τα ώριμα λευκοκύτταρα κυκλοφορούν στο αίμα και παρουσιάζουν χαρακτηριστικά υποδείγματα ανάπτυξης, μετανάστευσης και κυτταρικής λειτουργίας.

Τα ώριμα λευκοκύτταρα μυελοειδούς προέλευσης είναι τελικά διαφοροποιημένα κύτταρα και δεν υποβάλλονται σε περαιτέρω διαίρεση.

Ωστόσο, τα ώριμα **λεμφοκύτταρα** διατηρούν την ικανότητα γρήγορου πολλαπλασιασμού και διαφοροποίησης, παράγοντας ένα μεγάλο αριθμό κυττάρων με αντιγονική διέγερση.

Ορισμένα ενεργοποιημένα λεμφοκύτταρα γίνονται κύτταρα μνήμης με μεγάλη διάρκεια ζωής, τα οποία έχουν την ικανότητα περαιτέρω εκτεταμένης κυτταρικής διαίρεσης κατόπιν συνάντησης συγκεκριμένου αντιγόνου.

Ετσι, η εξάρτηση από την ικανότητα κυτταρικής αναπαραγωγής αποτελεί μία από τις βασικές διαφορές στη λειτουργία των κυττάρων μυελοειδούς και λεμφοειδούς προέλευσης.

Η διάρκεια ζωής των κυττάρων μπορεί να ρυθμιστεί από πολλούς παράγοντες. Πρόσφατα, τα **τελομερή** και η **τελομεράση** έχουν¹ εμπλακεί για τους ρόλους τους στη ρύθμιση της διάρκειας ζωής και αναπαραγωγής.

Τα **τελομερή** είναι ειδικές δομές, οι οποίες βρίσκονται στο τέλος των ευκαρυωτικών χρωμοσωμάτων, τα οποία αποτελούνται από μία σειρά εξιμερών αλληλουχιών DNA (TTAGGG)_n και σχετιζόμενων πρωτεϊνών.

Η περιορισμένη ικανότητα της πολυμεράσης DNA να επαναλάβει πλήρως το ακραίο 3' τέλος των χρωμοσωμάτων οδηγεί σε απώλεια επαναλήψεων τελομερών και έχουν παρατηρηθεί στα ανθρώπινα σωματικά κύτταρα με κυτταρική διαίρεση ^(297, 298).

¹ όπως έχει ήδη αναφερθεί στον κυτταρικό κύκλο, φάση S

Έχει επίσης προταθεί ότι τα τελομερή μπορούν να αλλάξουν από μία φυσιολογική «σφραγισμένη» κατάσταση σε μία μη φυσιολογική, «μη σφραγισμένη» κατάσταση ⁽²⁹⁹⁾. Ο αριθμός των μη σφραγισμένων τελών τελομερών αυξάνει σε κύτταρα με εξαιρετικά βραχέα τελομερή, τα οποία μπορούν να μεταδώσουν σήμα στα κύτταρα να εισέλθουν στην διακοπή ή την γήρανση του κυτταρικού κύκλου. Έτσι, το μήκος τελομερούς καθώς και οι καταστάσεις του χρησιμοποιούνται ως βιολογικοί ρυθμιστές που υπογραμμίζουν το περιορισμένο δυναμικό διαίρεσης ανθρωπίνων κυττάρων.

Η **τελομεράση** είναι ένα ριβονουκλεοτιδικό πρωτεϊνικό ένζυμο, το οποίο μπορεί να συνθέσει τελομερή και να αντισταθμίσει την απώλεια των τελομερών, που σχετίζεται με την κυτταρική διαίρεση. Αν και δεν έχουν προσδιορισθεί όλα τα στοιχεία του ολοενζύμου της τελομεράσης, τα βασικά στοιχεία της τελομεράσης αποτελούνται από την αντίστροφη μεταγραφή της τελομεράσης ^(300, 301) και τη μήτρα του RNA της τελομεράσης ⁽³⁰²⁾. Η έκφραση της τελομεράσης ρυθμίζεται σημαντικά κατά την διάρκεια της ανάπτυξης και διαφοροποίησης μέσω συγκεκριμένων ιστών.

Πολλοί ιστοί εκφράζουν τελομεράση μόνο κατά την διάρκεια της ανάπτυξης και διαφοροποίησης, αλλά χάνουν την έκφραση σε τελικά διαφοροποιημένα ή ώριμα κύτταρα. Ωστόσο, τα βλαστικά κύτταρα και ορισμένα αρχέγονα κύτταρα διατηρούν την έκφραση της τελομεράσης. Το φαινόμενο αυτό έχει αποδοθεί στο γεγονός ότι τα περισσότερα τελικά διαφοροποιημένα κύτταρα δεν απαιτούν ουσιαστικές κυτταρικές διαιρέσεις για την λειτουργία τους και στο ότι η μη ρυθμιζόμενη τελομεράση μπορεί να ευκολύνει τον μετασχηματισμό των φυσιολογικών κυττάρων.

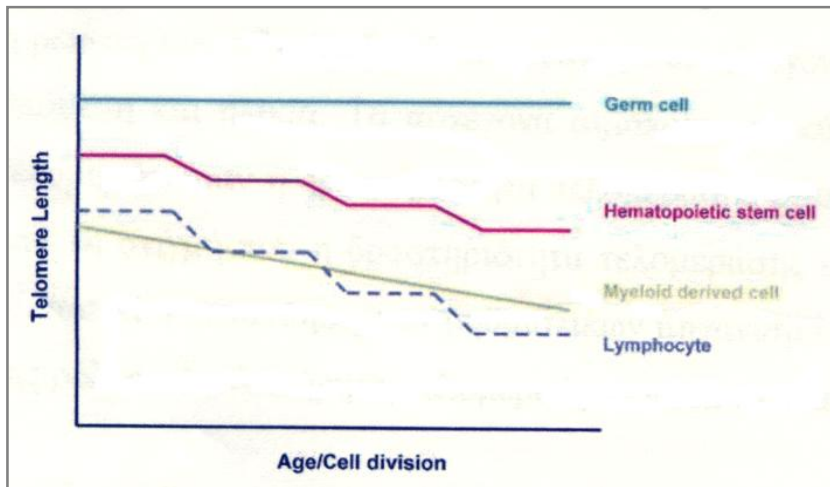
Σύμφωνα με πρόσφατες έρευνες, η τελομεράση εκφράζεται σε αρχέγονα κύτταρα ^(303, 304) σε κύτταρα που θυμίζουν αρχέγονα (όπως τα βασικοκύτταρα στην στοιβάδα του δέρματος και τα ενδοθηλιακά κύτταρα του εντέρου) ^(305, 306) καθώς και τα λεμφοκύτταρα ^(307, 308). Συνεχίζουν να υπάρχουν αντικρουόμενες απόψεις σχετικά με τον τρόπο με τον οποίο ρυθμίζεται το μήκος των τελομερών σε κύτταρα τα οποία εκφράζουν τελομεράση και εάν η έκφραση τελομεράσης παρατείνει την διάρκεια ζωής αναπαραγωγής αυτών των κυττάρων.

Επίσης η ηλικία που σχετίζεται με την μείωση της συνολικής κυτταρικής λειτουργίας, έχει καταδειχθεί σε συγγενείς και προσαρμοστικές ανοσοαπαιτήσεις ^(309, 310). Επειδή η λειτουργία του ανοσολογικού συστήματος εξαρτάται σημαντικά από την ικανότητα εκτεταμένης κυτταρικής διαίρεσης και κλωνικής επέκτασης των λεμφοκυττάρων, είναι ενδιαφέρον να κατανοήσουμε εάν οι διαδικασίες που σχετίζονται με την ηλικία έχουν ως αποτέλεσμα την απώλεια της αναπαραγωγικής ικανότητας των λεμφοκυττάρων.

Τα βλαστικά κύτταρα έχουν την δυνατότητα να διατηρούν ή ακόμα και να επιμηκύνουν το μήκος των τελομερών μέσω της έκφρασης της τελομεράσης ^(311, 312). Τα αρχέγονα αιμοποιητικά κύτταρα, καθώς και οι πρόδρομοί τους, εμφανίζουν σημαντική ομοιότητα με τα βλαστικά κύτταρα. Η διατήρηση του πολλαπλασιασμού των αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων απαιτείται για την αιμοποίηση καθ' όλη την διάρκεια της ζωής. Είναι, επομένως, πολύ σημαντικό να κατανοήσουμε εάν παρόμοιοι προστατευτικοί μηχανισμοί λειτουργούν στα αρχέγονα αιμοποιητικά κύτταρα, όπως στα βλαστικά. Ο Vaziri κ.α. ⁽³¹³⁾ περιέγραψαν και ανέλυσαν το μήκος τελομερούς στα αρχέγονα αιμοποιητικά κύτταρα (CD34, CD38⁺).

Βρέθηκε ότι τα τελομερή είναι βραχύτερα στα αρχέγονα κύτταρα, κεκαθαμένα από ώριμο μυελό των οστών απ' ό,τι από το εμβρυικό ήπαρ ή το αίμα του ομφάλιου λώρου (CB) και ότι στους νεαρούς δωρητές τα αρχέγονα κύτταρα του μυελού των οστών έχουν μακρύτερα τελομερή απ' ό,τι στους ηλικιωμένους δωρητές. Ο Engelhardt και άλλοι ⁽³¹⁴⁾ βρήκαν επίσης ότι το μέσο μήκος τελομερών των κυττάρων CD34⁺ ήταν 10.4kb στο CB, 7.6kb στον μυελό των οστών (BM) και 7.4kb στο περιφερικό αίμα.

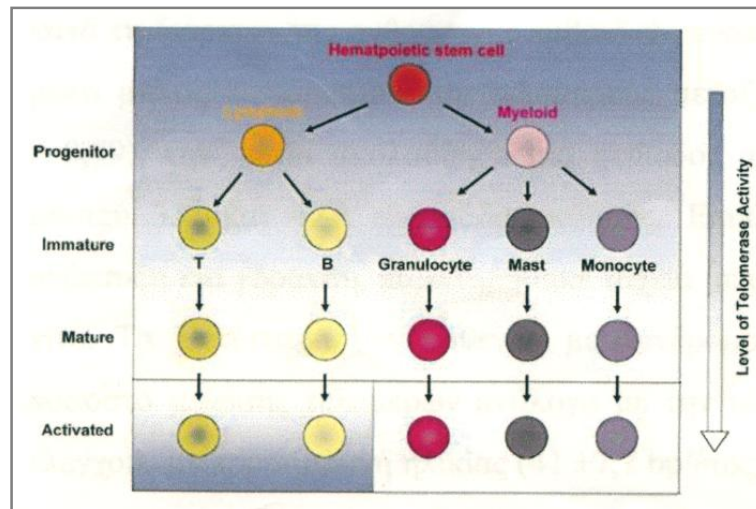
Υπάρχουν αρκετά στοιχεία που προέρχονται από συγκριτική ανάλυση του μήκους τελομερών λευκοκυττάρων μεταξύ δωρητή και λήπτη μετά από την μεταμόσχευση μυελού των οστών (BMT) με αρχέγονα αιμοποιητικά κύτταρα ⁽³¹⁵⁻³²²⁾. Για να ανασυσταθούν τα αιμοποιητικά συστήματα των ληπτών, τα αρχέγονα αιμοποιητικά κύτταρα των δωρητών πρέπει να υποβληθούν σε εκτεταμένες κυτταρικές διαιρέσεις, προκειμένου να παραχθεί ένας επαρκής αριθμός κυττάρων. Ο Notaro κ.α. ⁽³¹⁵⁾ σύγκριναν το μήκος τελομερούς των κοκκιοκυττάρων στους δωρητές και λήπτες 11 ζευγών BMT και παρατήρησαν μείωση του μήκους τελομερούς στους λήπτες. Ο Wynn κ.α. ^(316, 317) σύγκριναν το μήκος τελομερούς των λευκοκυττάρων, ουδετερόφιλων και T κυττάρων σε 28 περιπτώσεις BMT και παρατήρησαν επίσης μείωση του μήκους τελομερούς στους λήπτες. Αν και διαφορετικοί τύποι λευκοκυττάρων εξετάστηκαν σε διαφορετικές μελέτες, παρατηρήθηκαν διάφοροι βαθμοί σμίκρυνσης τελομερούς σε όλες τις μελέτες. Σε συνδυασμό, τα αποτελέσματα αυτά υποδεικνύουν ότι, σε αντίθεση με τα βλαστικά κύτταρα, το μήκος του τελομερούς των αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων μειώνεται με την κυτταρική διαίρεση και την ηλικία (Σχήμα 1).



Σχήμα 1

Η σμίκρυνση τελομερούς προς την ηλικία στα κύτταρα αιμοποιητικής προέλευσης και στα βλαστικά κύτταρα. Σε αντίθεση με το σταθερό μήκος τελομερούς των βλαστικών κυττάρων (πράσινη γραμμή) σε σχέση με την ηλικία, όλα τα κύτταρα αιμοποιητικής προέλευσης εμφανίζουν σμίκρυνση τελομερούς καθώς γερνούν. Τα αρχέγονα αιμοποιητικά κύτταρα (ενιαία κόκκινη γραμμή) έχουν μακρύτερα τελομερή από τα κύτταρα λεμφοειδούς (διακεκομμένη κίτρινη γραμμή) και μυελοειδούς γενεαλογίας (ενιαία μπλε γραμμή). Η διαφορά του μήκους τελομερούς που παρουσιάζεται στους τέσσερις αυτούς τύπους κυττάρων αντιστοιχεί στην απώλεια τελομερών κατά την διάρκεια διαφοροποίησης. Η μορφολογία της απώλειας τελομερούς στα αρχέγονα αιμοποιητικά κύτταρα και τα λεμφοκύτταρα σε σχέση με την ηλικία είναι παρόμοια: η μείωση ή αύξηση μήκους τελομερούς σε σχέση με την ηλικία προσδιορίζεται από τα επίπεδα της δραστηριότητας της τελομεράσης στα κύτταρα αυτά. Τα μυελοειδή κύτταρα (κοκκιοκύτταρα) εμφανίζουν μία συνεχή μείωση μήκους του τελομερούς, η οποία μπορεί να αντανακλά την απώλεια τελομερών στα μυελοειδή προγονικά κύτταρα.

Παρ' όλη την σμίκρυνση τελομερούς με την ηλικία και τις κυτταρικές διαιρέσεις, τα αρχέγονα αιμοποιητικά κύτταρα φαίνεται ότι εκφράζουν τελομεράση με ρυθμιζόμενο τρόπο. Ο Morrison κ.α. ⁽³⁰³⁾ προσδιόρισαν την δραστηριότητα της τελομεράσης σε αρχέγονα αιμοποιητικά κύτταρα μυελού των οστών σε διάφορα στάδια διαφοροποίησης και βρήκαν ότι η συχνότητα των κυττάρων που εκφράζουν τελομεράση σε κάθε πληθυσμό είναι ανάλογη με την συχνότητα των κυττάρων που θεωρούνταν ότι είχαν δυναμικό αυτοανανέωσης (Σχήμα 2).



Σχήμα 2

Η έκφραση της τελομεράσης κατά την διάρκεια της διαφοροποίησης των κυττάρων αιμοποιητικής προέλευσης. Η έκφραση της τελομεράσης ρυθμίζεται σημαντικά κατά την διάρκεια της ανάπτυξης των αιμοποιητικών κυττάρων. Η τελομεράση εκφράζεται κατά την διάρκεια ανάπτυξης λεμφοειδών και μυελοειδών κυττάρων αλλά μειορρυθμίζεται σε ώριμα, λεμφοειδή και μυελοειδή κύτταρα σε ηρεμία. Σε αντίθεση με τα ώριμα κύτταρα μυελοειδούς προέλευσης, τα οποία δεν εκφράζουν τελομεράση μετά από την ενεργοποίηση, τα ώριμα λεμφοκύτταρα έχουν την ικανότητα να εκφράσουν τελομεράση μετά από αντιγονική διέγερση.

Η μείωση του μήκους του τελομερούς έχει παρατηρηθεί στο περιφερικό αίμα T και B λεμφοκυττάρων με ηλικία *in vivo* και με κυτταρική διαίρεση *in vitro* ^(323, 324). Την ίδια χρονική στιγμή ανιχνεύθηκε τελομεράση στα λεμφοκύτταρα κατά την διάρκεια ανάπτυξης διαφοροποίησης και ενεργοποίησης ⁽³²⁵⁾. Αν και δεν έχει διευκρινισθεί η ακριβής λειτουργική σχέση μεταξύ της ρύθμισης του μήκους του τελομερούς και της έκφρασης της τελομεράσης στα λεμφοκύτταρα, έχουν γίνει κάποιες προσπάθειες κατανόησης του τρόπου ρύθμισης της τελομεράσης και του ρόλου που αυτή έχει στην διατήρηση του τελομερούς και την διάρκεια ζωής αναπαραγωγής σε T και B λεμφοκύτταρα. Για τα φονικά κύτταρα (NK) δεν υπάρχουν μελέτες που να αφορούν το μήκος τελομερούς και την έκφραση της τελομεράσης στα κύτταρα αυτά.

Από φυσιολογική άποψη δεν φαίνεται πιθανό τα ώριμα κοκκιοκύτταρα, τα οποία έχουν πολύ μικρή διάρκεια ζωής και δεν υποβάλλονται σε επακόλουθες κυτταρικές διαιρέσεις, να χρειάζονται τελομεράση για την λειτουργία τους. Ωστόσο, σύμφωνα με τα αποτελέσματα εργασιών ^(326-329, 330) η δραστηριότητα της τελομεράσης και η τελική διαφοροποίηση συνδέονται απευθείας και έτσι παρουσιάζουν ένα χρήσιμο μοντέλο μελέτης της ρύθμισης της δραστηριότητας της τελομεράσης στα μυελοειδή κύτταρα.

Συμπερασματικά, τα λευκοκύτταρα λεμφοειδών και μυελοειδών γενεαλογιών εμφανίζουν παρόμοια και άλλα διακριτά χαρακτηριστικά στην ρύθμιση του μήκους τελομερούς και της δραστηριότητας της τελομεράσης. Η μείωση τελομερούς εμφανίζεται καθώς αυξάνεται η ηλικία και η τελομεράση εκφράζεται σημαντικά κατά την διάρκεια της ανάπτυξης αλλά μειορρυθμίζεται μετά την ωρίμανση των κυττάρων από λεμφοειδείς και μυελοειδείς γενεαλογίες. Τα κύτταρα μυελοειδούς γενεαλογίας είναι γενικά βραχύβια και δεν εκφράζουν τελομεράση μετά από την ωρίμανση. Ωστόσο, τα λεμφοκύτταρα και ειδικά τα λεμφοκύτταρα μνήμης είναι μακρόβια και εκφράζουν τελομεράση κατόπιν αντιγονικής ενεργοποίησης.

Έτσι, η τελομεράση μπορεί να παίξει σημαντικό ρόλο, όχι μόνο στα προγονικά κύτταρα των λεμφοειδών και μυελοειδών γενεαλογιών αλλά επίσης και των ώριμων λεμφοκυττάρων. Περαιτέρω μελέτες θα είναι απαραίτητες προς κατανόηση του ακριβή ρόλου της τελομεράσης και της ρύθμισης του μήκους τελομερούς στα προγονικά κύτταρα, καθώς και στα ώριμα κύτταρα λεμφοειδούς και μυελοειδούς γενεαλογίας.

3. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Σκοπός της παρούσης εργασίας είναι ο προσδιορισμός του μέσου μήκους τελομεριδίων και η δραστηριότητα της τελομεράσης στα κύτταρα περιφερικού αίματος ασθενών με Β – Χρόνια Λεμφοκυτταρική Λευχαιμία (Χ.Λ.Λ.).

Τα **τελομερίδια** (τελομερή) είναι ειδικές δομές που βρίσκονται στο τέλος των ευκαρυωτικών χρωματοσωμάτων, τα οποία αποτελούνται από μία σειρά αλληλουχιών DNA καθώς και άλλων σχετιζομένων πρωτεϊνών.

Σε κάθε κυτταρική διαίρεση επέρχεται απώλεια μικρού τμήματος DNA από τα χρωματοσωμικά άκρα, που είναι τα ίδια τα τελομερίδια. Έτσι είναι εύλογο, μετά από αρκετές κυτταρικές διαιρέσεις η απώλεια γενετικού υλικού να είναι σημαντικής έκτασης, γεγονός που θα καθιστά αδύνατη την περαιτέρω κυτταρική διαίρεση. Αυτό ακριβώς συμβαίνει στα σωματικά κύτταρα.

Η **τελομεράση** είναι μία ριβονουκλεοπρωτεΐνη που συντελεί στη διατήρηση του μήκους των τελομεριδίων, που σημαίνει ότι το κύτταρο έχει απεριόριστη δυνατότητα κυτταρικών διαιρέσεων, όπως ισχύει στις νεοπλασίες.

Η δραστηριότητα του συγκεκριμένου ενζύμου (τελομεράση) και η αναστολή της δράσεως αυτού ίσως αποτελέσει θεραπευτικό στόχο στο μέλλον, με την προσθήκη επιπλέον γνώσεων πάνω σ' αυτόν τον τομέα

Το ερευνητικό μέρος της εργασίας εκπονήθηκε στη Μονάδα Έρευνας της Β΄ Προπαιδευτικής Παθολογικής Κλινικής του Πανεπιστημίου Αθηνών υπό την εποπτεία του καθηγητή και Διευθυντή της Β΄ Προπαιδευτικής Παθολογικής Κλινικής του Πανεπιστημίου Αθηνών Κου Σωτηρίου Ράπτη, στο Νοσοκομείο Ευαγγελισμός.

Κόσμος

Η διαλεύκανση μιας υπόθεσης «ζωής ή θανάτου» κέρδισε το Νόμπελ Ιατρικής 2009. Η Elizabeth H. Blackburn, ο συνεργάτης της Jack W. Szostak και η πρώην μαθήτριά της Carol W. Greider θα μοιραστούν το 1 εκατομμύριο ευρώ του βραβείου, για την ανακάλυψη τους «πώς τα χρωμοσώματα προστατεύονται με τα τελομερή και το ένζυμο τελομεράση».

Τα ευρήματα των τριών όχι μόνο έχουν φωτίσει τα ερευνητικά πεδία της γήρανσης, του καρκίνου και των βλαστικών κυττάρων, αλλά έχουν ανοίξει δρόμους για θεραπευτικές ασθενειών οι οποίες προκύπτουν από τη δυσλειτουργία των τελομερών και της τελομεράσης. Όταν ένα κύτταρο ετοιμάζεται να διαιρεθεί, είναι υψίστης σημασίας το DNA να μοιραστεί εξίσου στα δύο θυγατρικά κύτταρα. Έτσι, το DNA που είναι διάχυτο «πακετάρεται» σε χαρακτηριστικές δομές που ονομάζονται χρωμοσώματα. Τα άκρα των χρωμοσωμάτων ονομάζονται τελομερή και βρίσκονται στα χρωμοσώματα όλων των φυτών και των ζώων.

Γνωρίζουμε επίσης ότι κάθε φορά που ένα κύτταρο διαιρείται, χάνεται ένα μέρος των τε-

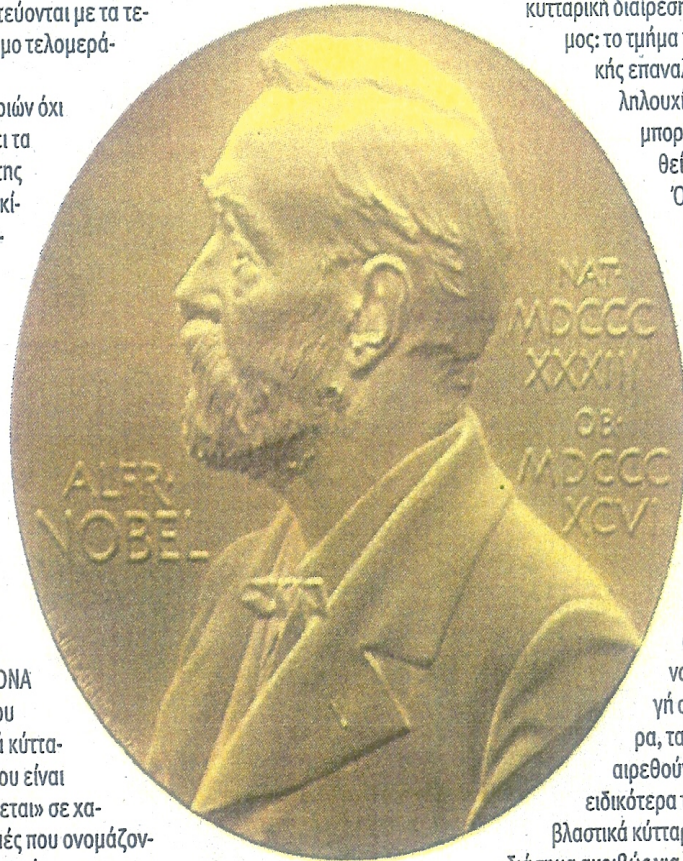
λομερών του. Τα τελομερή, δηλαδή, κονταίνουν σε κάθε διαίρεση. Όταν το μήκος τους φτάσει σε ένα ορισμένο σημείο, τότε τα κύτταρα οδηγούνται στο θάνατο. Για το λόγο αυτό τα τελομερή θεωρούνται «τα ρολόγια που μετρούν το χρόνο που απομένει σε κάθε κύτταρο».

Η σμίκρυνση όμως των τελομερών σε κάθε κυτταρική διαίρεση δεν είναι μονόδρομος: το τμήμα της χαρακτηριστικής επαναλαμβανόμενης αλληλουχίας που χάνεται, μπορεί να επαναπροστεθεί.

Όπως ανακάλυψε η μία εκ των βραβευθέντων Carol W. Greider, η διατήρηση του μήκους των τελομερών επιτυγχάνεται χάρη στη δράση ενός ενζύμου, της τελομεράσης.

Χάρη στις εργασίες της Greider γνωρίζουμε πλέον ότι η τελομεράση είναι παρούσα και ενεργή σε εκείνα τα κύτταρα, τα οποία πρέπει να διαιρεθούν πολλές φορές, και ειδικότερα τα καρκινικά και τα βλαστικά κύτταρα. Τα πρώτα είναι

διάσημα ακριβώς για την ικανότητά τους να διαιρούνται επ' άπειρον και έτσι να δημιουργούν καρκινικούς όγκους. Τα δεύτερα αποτελούν την παρακαταθήκη κυττάρων από την οποία πραγματοποιείται η ανανέωση των ιστών και των οργάνων μας.



ΥΛΙΚΟ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Το υλικό της έρευνας απετέλεσαν 63 ασθενείς, ηλικίας από 38 έως 89 ετών (διάμεση ηλικία 66 έτη) με ΧΛΛ και υγιείς (controls).

Η διάγνωση των ασθενών έγινε με βάση τα κριτήρια της IWCLL (International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia).

Τα κλινικά χαρακτηριστικά των ασθενών φαίνονται στον πίνακα Α.

Οι ασθενείς και οι μάρτυρες συμμετείχαν στη μελέτη μετά την υπογραφή εντύπου συγκατάθεσης.

Οι παράμετροι που μελετήθηκαν είναι οι ακόλουθες:

1. Μήκος **τελομεριδίων**. Έγινε με τη μέθοδο μοριακής Βιολογίας – αποτύπωση κατά Southern.
2. Δραστηριότητα της **τελομεράσης**. Έγινε με τη μέθοδο PCR (Polymerase Chain Reaction).
3. **Bcl-2**: Είναι μία πρωτεΐνη που αναστέλλει την απόπτωση των κυττάρων και υπερεκφράζεται στα λευχαιμικά κύτταρα. Ο υπολογισμός της έγινε με τη μέθοδο της κυτταρομετρίας ροής
4. Πρώιμη απόπτωση: Μέθοδος annexin. Επίσης με τη μέθοδο της κυτταρομετρίας ροής.
5. Όψιμη απόπτωση: Μέθοδος PI (Propidium Iodine) και εδώ με τη μέθοδο κυτταρομετρίας ροής

Πίνακας Α

Κλινικά χαρακτηριστικά ασθενών που μελετήθηκαν

1. Φύλο Άνδρες: 34
 Γυναίκες: 29

2. Ηλικία:

	<i>διάμεση</i>	<i>ελάχιστη</i>	<i>μέγιστη</i>
<i>Ηλικία</i>	66	38	89

*διάμεση, ελάχιστη, μέγιστη = λέξεις που δηλούν μέγεθος,
αξία, τιμή της μεταβλητής*

3. Σταδιοποίηση των ασθενών κατά RAI R

Στο σύστημα Rai για την σταδιοποίηση εκτιμάται η παρουσία των ακόλουθων κλινικοεργαστηριακών παραμέτρων:

- Λεμφοκυττάρωση στο περιφερικό αίμα
- Λεμφαδενοπάθεια (αυχενική, μασχαλιαία, βουβωνική)
- Σπληνομεγαλία ή/και ηπατομεγαλία
- Αναιμία (Hb < 11 Gr / dl)
- Θρομβοπενία (PLT < 100 x 10³ / μl)

Σύστημα R		
στάδιο	ασθενείς	ποσοστό %
0	7	11,86
1	11	18,64
2	11	18,64
3	10	16,95
4	20	33,90

Οι ασθενείς του σταδίου 0 αποτελούν την ομάδα χαμηλού κινδύνου, οι ασθενείς των σταδίων 1 και 2 αποτελούν την ομάδα ενδιάμεσου κινδύνου και οι ασθενείς των σταδίων 3 και 4 αποτελούν την ομάδα υψηλού κινδύνου.

4. Σταδιοποίηση των ασθενών κατά Binet B

Στο σύστημα Binet για την σταδιοποίηση εκτιμάται η παρουσία των ακόλουθων κλινικο-εργαστηριακών παραμέτρων:

- Αναιμία (Hb < 10 gr / dl)
- Θρομβοπενία (PLT < 100 x 10³ / μl)
- Λεμφαδενοπάθεια
- Σπληνομεγαλία
- Ηπατομεγαλία

Με σκοπό την ακριβέστερη εκτίμηση του φορτίου της νόσου, οι ανατομικά προσβεβλημένες περιοχές διακρίνονται στις ακόλουθες 5 ομάδες:

- Τραχηλική λεμφαδενοπάθεια
- Μασχαλιαία λεμφαδενοπάθεια
- Βουβωνική λεμφαδενοπάθεια
- Σπληνομεγαλία
- Ηπατομεγαλία

Σύστημα B		
στάδιο	ασθενείς	ποσοστό %
A	18	30,51
B	15	25,42
C	26	44,07

Οι ασθενείς του σταδίου A έχουν μέση επιβίωση 10 έτη, οι ασθενείς του σταδίου B έχουν μέση επιβίωση 7 έτη και οι ασθενείς του σταδίου C έχουν μέση επιβίωση 2 έτη.

5. **LDH:**

LDH		
	ασθενείς	ποσοστό %
Φυσιολογική	42	82
Παθολογική	9	18

6. **Ηπατική Βιοχημεία:**

Ηπατική Βιοχημεία		
	ασθενείς	ποσοστό %
Φυσιολογική	36	68
Παθολογική	17	32

7. **B-συμπτωματολογία:**

B-συμπτωματολογία		
	ασθενείς	ποσοστό %
Ναι	8	12,7
Όχι	49	77,8
Άγνωστο	6	9,5

8. Αιματοκρίτης:

	<i>διάμεση</i>	<i>ελάχιστη</i>	<i>μέγιστη</i>
ΗΙ	36	14	49

9. Λευκά Αιμοσφαίρια:

	<i>διάμεση</i>	<i>ελάχιστη</i>	<i>μέγιστη</i>
WBC	4900	2000	300000

10. Αιμοπετάλια:

	<i>διάμεση</i>	<i>ελάχιστη</i>	<i>μέγιστη</i>
PTL	5000	7000	300000

11. Θεραπεία:

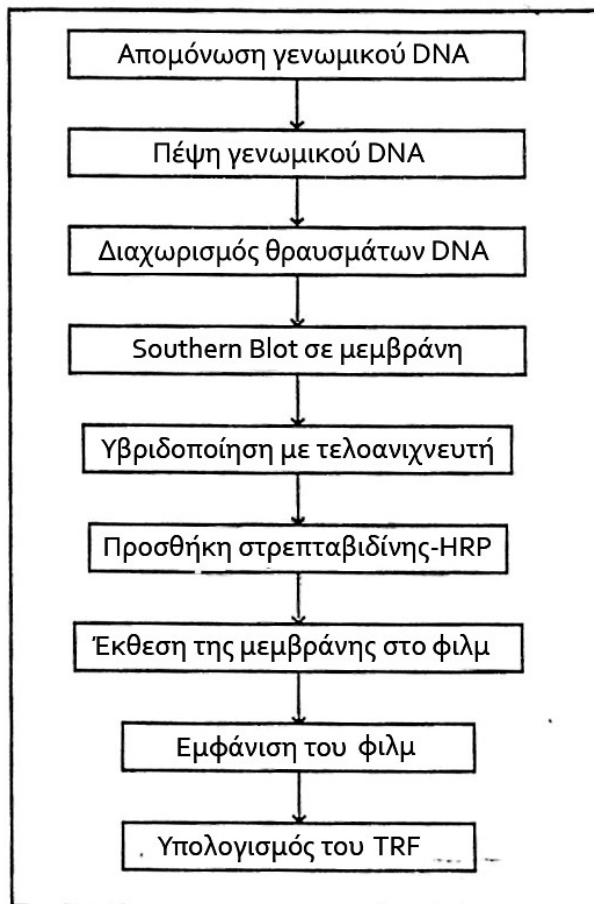
<i>Θεραπεία</i>		
	<i>ασθενείς</i>	<i>ποσοστό %</i>
Ναι	25	46,29
Όχι	29	53,70

ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

TELOQUANT KIT

α. Προσδιορισμός μήκους τελομερών -Αποτύπωση κατά Southern –

Η μέτρηση του τελομερικού μήκους επιτελούνταν παραδοσιακά μέσω Southern blotting. Η μέθοδος που χρησιμοποιήσαμε (Teloquant kit, PharMingen) καθιστά δυνατό τον προσδιορισμό του μήκους των τελομερών, χρησιμοποιώντας ένα ευαίσθητο, μη ραδιενεργό, σύστημα ανίχνευσης χημειοφωταύγειας (εικ. 1). Γενικά, ένας κυτταρικός πληθυσμός για τον οποίο μια μέτρηση του μήκους τελομερών παρουσιάζει ενδιαφέρον, πρέπει να απομονώνεται και να καθαρίζεται το γενωμικό DNA. Το DNA αυτό στη συνέχεια υποβάλλεται σε πέψη με ένα ένζυμο περιορισμού συχνής κοπής, το οποίο δεν έχει κάποια ακολουθία στόχο μέσα στη τελομερική επανάληψη. Δεδομένου ότι τα ανθρώπινα τελομερή αποτελούνται από ακριβείς επαναλήψεις του εξαμερούς, TTAGGG, οποιοδήποτε ένζυμο με μια ακολουθία αναγνώρισης που δεν βρίσκεται μέσα στην επανάληψη ή έναν συνδυασμό επαναλαμβανόμενων εξαμερών είναι επαρκές. Το γενομικό DNA θα κοπεί σε μικρά θραύσματα με εξαίρεση τα τελομερή και τις υποτελομερικές περιοχές (DNA δίπλα στο τελομερές) που θα αφεθούν άθικτες και τα οποία μαζί συνιστούν το τελικό θραύσμα περιορισμού (TRF). Η υπολειμματική ποσότητα γενομικό DNA, η οποία προσαρτάται στα θραύσματα τελομερών, θα εξαρτάται από την απόσταση μεταξύ του τελομερούς και της πιο κοντινής θέσης περιορισμού μέσα στην παρακείμενη χρωμοσωμική ακολουθία. Με τη χρησιμοποίηση πολλαπλών, συχνών κοπών διασφαλίζεται ότι το έξτρα γενομικό DNA είναι ελάχιστο σε σύγκριση με το μήκος τελομερούς (εικ. 2). Το διασπασμένο DNA διαχωρίζεται σε γέλη αгарόζης υψηλής διακριτικής ικανότητας και μεταφέρεται σε μεμβράνη για ανάλυση Southern blot. Εναλλακτικά, το διαχωρισμένο DNA μέσα στη γέλη μπορεί να σημειωθεί χρησιμοποιώντας έναν ραδιενεργό ανιχνευτή. Η Southern blot μπορεί στη συνέχεια να υβριδοποιηθεί με έναν ανιχνευτή ειδικό για τις τελομερικές επαναλήψεις. Ένας τέτοιος ανιχνευτής αποτελείται κανονικά από μια σειρά επαναλήψεων εξαμερών. Η ανίχνευση της θέσης του υβριδοποιημένου ανιχνευτή στη μεμβράνη ολοκληρώνεται χρησιμοποιώντας ραδιενέργεια ή ένα σύστημα ανίχνευσης χημειοφωταύγειας. Το μέσο μήκος TRF μπορεί έπειτα να υπολογιστεί από τη θέση του σήματος που ανιχνεύεται σε σχέση με τη θέση των προτύπων γνωστού μεγέθους.



Εικόνα 1. Το πειραματικό σχήμα που χρησιμοποιεί τον προσδιορισμό μήκους τελομερούς.

Διαδικασίες

Η μονάδα προσδιορισμού μήκους τελομερών της PharMingen παρέχει δυνατότητα ευελιξίας ως προς τη σήμανση του ανιχνευτή διερεύνησης είτε με ^{32}P είτε με τη χρήση μεθόδου χημειοφωταύγειας..

Απομόνωση γενωμικού DNA

Το γενομικό DNA απομονώνεται με βάση τις κλασσικές μεθόδους εκχύλισης με φαινόλη χλωροφόρμιο

Διάσπαση γενωμικού DNA

Υποβάλλουμε σε πέψη το γενωμικό DNA χρησιμοποιώντας μίγμα ενζύμων RsaI/HinI σε τελική συγκέντρωση 1X ρυθμιστικού αντίδρασης ενζύμων. Υποβάλλουμε σε πέψη για 12 hr στους 37°C χρησιμοποιώντας 4U της δεξαμενής ενζύμων ανά μg DNA. Πρέπει να χρησιμοποιούνται τουλάχιστον 2,5 μg /δείγμα.

Διαχωρίζουμε το TRF σε γέλη αγαρόζης

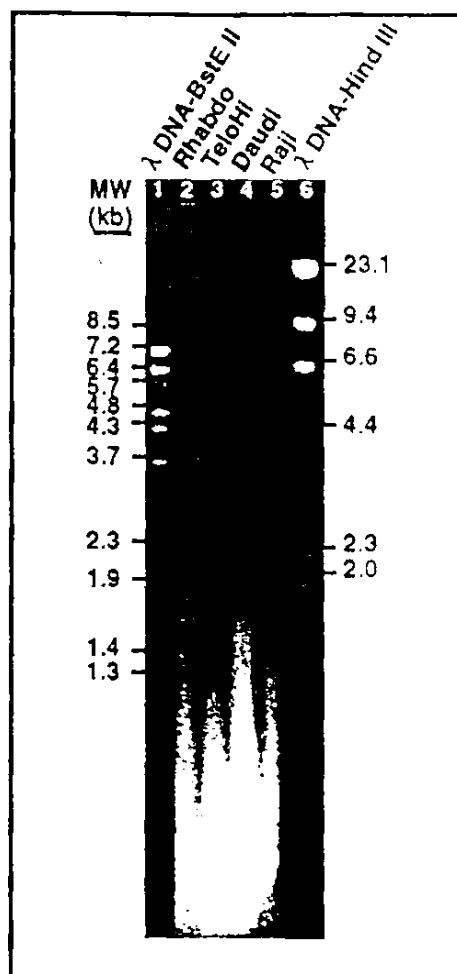
1. Προσθέτουμε με επίχυση γέλη αγαρόζης 0,6% χρησιμοποιώντας ρυθμιστικό διάλυμα 1X TAE.
2. Φορτώνουμε τουλάχιστον 2,5 μg γενωμικού DNA που έχει υποβληθεί σε πέψη/λωρίδα.
3. Φορτώνουμε 10 μl βιοτινυλιωμένου δείκτη/λωρίδα δείκτη. Θερμαίνουμε στους 60°C για 3 min πριν τη φόρτωση.
4. Εάν επιθυμούμε, φορτώνουμε 2,5 μg υποβληθέντος σε πέψη με μάρτυρα TeloHI (Αρ. εξαρτήματος 4530KC) ή μέχρι 7,5 μg υποβληθέντος σε πέψη με μάρτυρα TeloLOW (Αρ. εξαρτήματος 4529KC) DNA. Παρέχεται αρκετό υλικό για 5 λωρίδες δειγμάτων κάθε μία με TeloHI και TeloLOW.
5. Λειτουργούμε τη γέλη στα 5 V/cm για 2-3 hr ή για καλύτερο διαχωρισμό των μεγάλων μηκών τελομερούς, λειτουργούμε 1 V/cm κατά τη διάρκεια της νύκτας για διαχωρισμό των μεγάλων θραυσμάτων.

Southern Transfer Blot πάνω σε νάilon μεμβράνη χρησιμοποιώντας αλκαλικό ρυθμιστικό διάλυμα

1. Μουλιάζουμε τη γέλη σε 0,25 M HCl για 15 min με ανάδευση. Επαναλαμβάνουμε.
2. Ξεπλένουμε με dH₂O.
3. Μουλιάζουμε τη γέλη σε 0,4 N NaOH για 15 min με ανάδευση. Επαναλαμβάνουμε.
4. Χρησιμοποιώντας 0,4 N NaOH ως ρυθμιστικό διάλυμα μεταφοράς, προετοιμάζουμε μια μεταφορά Southern σε μια φορτισμένη θετικά νάilon μεμβράνη (όπως η Amersham Hybond-N⁺). Μεταφέρουμε σε ΘΔ για 2-3 hr.
5. **Σημείωση:** Η χρήση αλκαλικών ρυθμιστικών διαλυμάτων μεταφοράς με φορτισμένη θετικά νάilon μεμβράνη προκαλεί την άμεση ομοιοπολική προσάρτηση του DNA. Αυτό καταργεί την ανάγκη για ένα βήμα ακινητοποίησης μετά τη μεταφορά.
6. Ξεπλένουμε τη μεμβράνη σε 2X SSC. Στεγνώνουμε το φίλτρο με αέρα.

Υβριδοποίηση

1. Προ-υβριδοποίηση: Μουλιάζουμε το φίλτρο σε 2X SSC, βεβαιωνόμαστε ότι το φίλτρο έχει υγρανθεί ομοιόμορφα. Μεταφέρουμε το φίλτρο μέσα σε ρυθμιστικό υβριδοποίησης (αρ. εξαρτήματος 4533KC) (το πακέτο παράγει 200 ml όταν ανασυσταθεί σε dH₂O) και αναδεύουμε στους 65°C, 1 hr.
2. Υβριδοποίηση: Προσθέτουμε βιοτινυλιωμένο ανιχνευτή τελομερούς (αρ. εξαρτήματος 4527KC) στο ρυθμιστικό διάλυμα υβριδοποίησης, αναδεύουμε στους 65°C κατά τη διάρκεια της νύκτας. Η τελική συγκέντρωση του ανιχνευτή μπορεί να κυμαίνεται στα 1-10 ng/ml. Σφραγίζουμε ερμητικά τη σακούλα ή το κουτί για να αποτρέψουμε την εξάτμιση.



Εικόνα 2. Δείγματα DNA που έχουν υποβληθεί σε πέψη με *HinfI/RsaI*. Φωτογραφία DNA (που έχει υποβληθεί σε πέψη με *HinfI/RsaI*) χρωματισμένου με βρωμιούχο αιθίδιο που αποτυπώθηκε σε γέλη αγαρόζης 0,6% με δείκτες μοριακού μεγέθους. Λωρίδα 1: δείκτης βιοτινυλιωμένου λ DNA/BstEII (αρ. εξαρτήματος 4523KC). Λωρίδα 2: κύτταρα ραβδομυοσάρκωματος (Rhabdo). Λωρίδα 3: TeloHi DNA (αρ. εξαρτήματος 4530KC). Λωρίδα 4: κύτταρα Daudi. Λωρίδα 5: κύτταρα Raji. Λωρίδα 6: δείκτης βιοτινυλιωμένου λ DNA/HindIII (αρ. εξαρτήματος 4524KC).

Πλύση

1. Πλένουμε το φίλτρο σε 2X SSC/0,1% SDS σε ΘΔ για 5 min. Επαναλαμβάνουμε.
2. Πλένουμε το φίλτρο σε προθερμασμένο 0,2X SSC/0,1% SDS στους 42°C για 15 min. Επαναλαμβάνουμε.

Ανίχνευση χημειοφωταύγειας

Αποφεύγουμε το αζίδιο νατρίου σε κάποια διαλύματα που έρχονται σε επαφή με HRP καθώς υπάρχει το ενδεχόμενο αυτό να αδρανοποιεί την HRP.

1. Αποκλείουμε το φίλτρο με ρυθμιστικό διάλυμα αποκλεισμού που έχει ανασυσταθεί (το πακέτο παράγει 200 ml όταν ανασυσταθεί σε dH₂O) και αναδεύουμε σε ΘΔ για 1 hr. Οι σημαντικά μεγαλύτεροι χρόνοι μπορεί να μειώσουν το σήμα, ενώ οι σημαντικά μικρότεροι χρόνοι μπορεί να αυξήσουν το υπόβαθρο.
2. Αναδεύουμε το φίλτρο σε ΘΔ για 1 hr σε διάλυμα εργασίας στρεπταβιδίνης-HRP (αρ. εξαρτήματος 4531KC, ≤25 ng/ml) αραιωμένο στο ρυθμιστικό αποκλεισμού.
3. Χρησιμοποιώντας 0,1% Tween®-20 σε PBS, πλένουμε το φίλτρο 4 x 10 min.
4. Προετοιμάζουμε το διάλυμα εργασίας υποστρώματος ανίχνευσης με ανάμιξη ίσων όγκων του σταθερού υπεροξειδίου NA και λουμινόλης/Enhance NA.
5. Μεταφέρουμε το φίλτρο στο ρυθμιστικό εργασίας υποστρώματος (ή για εξοικονόμηση διαλύματος υποστρώματος, το υγρό μπορεί να ριφθεί ως σταγόνες πάνω από την επιφάνεια της μεμβράνης), αναδεύουμε (ή επωάζουμε) σε ΘΔ για 5 min.
6. Θέτουμε το φίλτρο μεταξύ δύο κομματιών πλαστικού περικαλύμματος ή πλαστικών προστατευτικών φύλλων και αφαιρούμε τυχόν παγιδευμένες φυσαλίδες αέρα.
7. Τοποθετούμε την καλυμμένη μεμβράνη σε κασέτα φιλμ ακτίνων X και εκθέτουμε το blot σε φιλμ για 30 sec, 2 min ή περισσότερο, έως ότου κατά την εμφάνιση να ληφθεί ένα σαφές σήμα με χαμηλό υπόβαθρο.

Υπολογισμός του μέσου μήκους TRF

Μια εκτίμηση του μήκους TRF μπορεί να ληφθεί συγκρίνοντας οπτικά το μέγεθος της κηλίδας σήματος με τους δείκτες μοριακού βάρους. Για ένα πιο ποσοτικό μέτρο, εκτιμάται το μήκος τελομερών για κάθε δείγμα, υπολογίζοντας το μέσο μήκος TRF. Το μήκος TRF δεν είναι ακριβώς το ίδιο πράγμα με το μήκος τελομερών, το μήκος της τερματικής περιοχής TTAGGG. Το TRF περιλαμβάνει και το τελομερές και τις παρακείμενες υποτελομερικές περιοχές. Η ανάλυση μήκους TRF μπορεί να χρησιμοποιηθεί για υπολογισμό του μέσου μήκους της τερματικής περιοχής TTAGGG ή του μέσου μήκους τελομερών, με μέτρηση και του ρυθμού μείωσης του μέσου μήκους TRF και της έντασης τελομερικού σήματος ως συνάρτηση διπλασιασμού του πληθυσμού.^{2,11} Η ανάλυση του μήκους TRF μπορεί να πραγματοποιηθεί σε μια πυκνομετρική σάρωση του αυτοραδιογραφήματος.

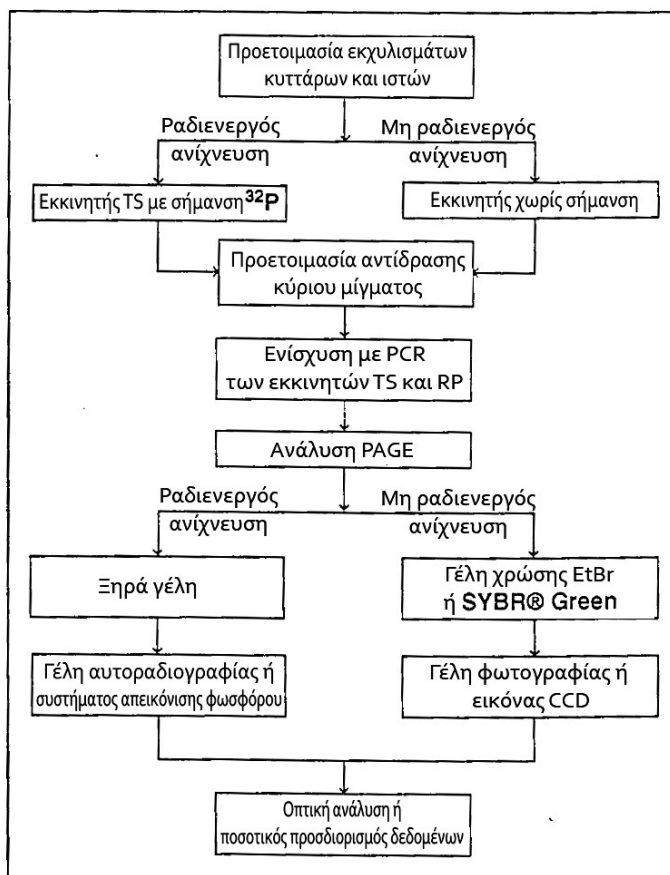
Το μέσο μήκος TRF για κάθε δείγμα υπολογίζεται με την ενσωμάτωση της έντασης σήματος πάνω από το υπόβαθρο, σε όλη την έκταση της κατανομής TRF ως συνάρτηση του μήκους TRF, χρησιμοποιώντας τον τύπο:

$$L = \frac{\sum(OD_i * L_i)}{\sum(OD_i)} \quad \text{Εξ. 1.1.}$$

όπου το OD_i και το L_i είναι η ένταση σήματος και το μήκος TRF αντίστοιχα στη θέση i στην απεικόνιση γέλης. Ο τύπος αυτός δίνει ίσο βάρος σε όλα τα TRF για ένα δεδομένο δείγμα. Γενικά, τα μεγαλύτερου μήκους TRF μέσα σε έναν πληθυσμό δεν έχουν απαραίτητως επαναλήψεις TTAGGG μεγαλύτερου μήκους. Σε πολλές περιπτώσεις, αυτά έχουν απλά μεγαλύτερου μήκους υποτελομερικές εκτάσεις DNA χωρίς TTAGGG.

β. Προσδιορισμός TRAP – δραστικότητα τελομεράσης

Η δραστικότητα της τελομεράσης συνδέεται συγκεκριμένα με τα αθάνατα κύτταρα, συμπεριλαμβανομένων των καρκινικών κυττάρων. Έχει αναπτυχθεί ένας ιδιαίτερα ευαίσθητος προσδιορισμός *in vitro* που είναι γνωστός ως το πρωτόκολλο ενίσχυσης τελομερικής επανάληψης (TRAP), για την ανίχνευση της δραστικότητας της τελομεράσης στα κύτταρα και τους ιστούς (εικ. 3). Στον προσδιορισμό TRAP τα βιώσιμα ή πρόσφατα παγωμένα κύτταρα/ιστοί (με την ενζυμικά δραστική τελομεράση) υποβάλλονται σε λύση και προσδιορίζεται η δραστικότητα τελομεράσης στο κυτταρικό εκχύλισμα μέσω της ικανότητάς της να συνθέσει τελομερικές επαναλήψεις πάνω σε υπόστρωμα ολιγονουκλεοτιδίων *in vitro*, κατά την προσθήκη των κατάλληλων ρυθμιστικών συνθηκών και dNTPs. Η τελομεράση από το κυτταρικό εκχύλισμα προσθέτει τελομερικές επαναλήψεις πάνω σε ένα υπόστρωμα ολιγονουκλεοτιδίων και τα εκτεταμένα προϊόντα που προκύπτουν στη συνέχεια ενισχύονται με την αντίδραση αλυσίδας πολυμεράσης (PCR). Τα προϊόντα PCR στη συνέχεια είτε απεικονίζονται οπτικά χρησιμοποιώντας ιδιαίτερα ευαίσθητα φθοριοχρώματα DNA όπως το SYBR® Green, είτε απεικονίζονται με αυτοραδιογραφία μετά τη χρήση εκκινητή που φέρει ραδιοσήμανση. Ο αριθμός και η ένταση των τελομερικών επαναλήψεων χρησιμοποιούνται ως μέτρο της δραστικότητας τελομεράσης στα κύτταρα/ιστούς που εξετάζονται.



Εικόνα 3. Το πειραματικό σχήμα που χρησιμοποιεί ραδιενεργό και μη ραδιενεργό ανίχνευση στον προσδιορισμό TRAP.

Διαδικασίες

Ο προσδιορισμός TRAP παρέχει την ευελιξία αμφότερων των μεθόδων, μιας μη ραδιενεργού και μιας ραδιενεργού, για μέτρηση της δραστηριότητας τελομεράσης. Ο προσδιορισμός TRAP μετρά τη δραστηριότητα της τελομεράσης και όχι απλά τα συστατικά του σύμπλοκου τελομεράσης, επομένως, αυτό απαιτεί κυτταρικούς ιστούς που είναι είτε βιώσιμοι είτε έχουν υποβληθεί σε επεξεργασία έτσι ώστε να διατηρείται η ενζυμική δραστηριότητα. Ο προσδιορισμός TRAP είναι εξαιρετικά ευαίσθητος και μπορεί να ανιχνεύσει τη δραστηριότητα πολύ χαμηλών επιπέδων του ενζύμου τελομεράση. Απαιτούνται προφυλακτικά μέτρα και ειδική εργαστηριακή οργάνωση για τον προσδιορισμό, ειδικά για την PCR. Ακολουθούν τα πρωτόκολλα που χρειάζεται να υλοποιηθούν για να υπολογιστεί ποσοτικά η δραστηριότητα της τελομεράσης, χρησιμοποιώντας τον προσδιορισμό TRAP.

Προετοιμασία εκχυλίσματος τελομεράσης από κύτταρα και ιστό

Η δραστηριότητα τελομεράσης είναι ανιχνεύσιμη μόνο σε εκχυλίσματα από βιώσιμα ή πρόσφατα καταψυγμένα κύτταρα/ιστούς. Επομένως για επαρκή αποθήκευση, συνιστούμε τα κύτταρα/ιστοί ή τα εκχυλίσματα τελομεράσης να αποθηκεύονται σε θερμοκρασίες $\leq -80^{\circ}\text{C}$. Η δραστηριότητα τελομεράσης σε καταψυγμένα κύτταρα/ιστούς είναι σταθερή για τουλάχιστον 1 έτος.

Σημείωση: Ο όγκος 1X CHAPS που χρησιμοποιείται για λύση κύτταρων/ιστού εξαρτάται από τον αριθμό κυττάρων και το βάρος ιστού ανά πείραμα. Συνιστάται ιδιαίτέρως να προσδιορίζεται μια αρίθμηση κυττάρων ή το βάρος του ιστού πριν την έναρξη του πειράματος.

- ★ Συγκομίζουμε κύτταρα/ιστούς και πλένουμε με PBS. Επαναλαμβάνουμε. Αποθηκεύουμε στους -80°C μέχρι τη χρήση ή προχωρούμε αμέσως στο βήμα 2.
- ★ Επαναιωρούμε κύτταρα/ιστούς σε ρυθμιστικό λύσης CHAPS.

Κύτταρα: Προσθέτουμε 200 μl 1X CHAPS ανά 1×10^5 κύτταρα. Η εκχύλιση είναι αποδοτικότερη από τα συσσωματώματα μικρότερων κυττάρων και τα εναιωρήματα μεμονωμένων κυττάρων.

Σημείωση: Είναι σημαντικό να διατηρηθεί η θερμοκρασία του δείγματος $< 0^{\circ}\text{C}$ με πάγο. Αυτό θα αποτρέψει μια αύξηση στη θερμοκρασία που μπορεί να υποβαθμίσει τη δραστηριότητα του εκχυλίσματος τελομεράσης.

- ★ Επωάζουμε το προϊόν ομογενοποίησης σε πάγο για 30 min.
- ★ Υποβάλλουμε σε περιδίνηση το δείγμα σε έναν φυγοκεντρητή που ψύχεται στα 12.000 x g για 30 min.
- ★ Κατανέμουμε κλασματικά το υπερκείμενο σε μικρούς όγκους των περίπου 20 μl ανά σωλήνα. Χρησιμοποιούμε ένα δείγμα για να προσδιορίσουμε τη συγκέντρωση πρωτεΐνης. Η συγκέντρωση ενδέχεται να μεταβάλλεται στο διάστημα 1-10 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. Ψύχουμε ταχύως τα υπόλοιπα κλάσματα σε ξηρό πάγο. Αποθηκεύουμε το εκχύλισμα στους -80°C .

Σημείωση: Η συχνή ψύξη-απόψυξη ενός εκχυλίσματος κυττάρων θα οδηγήσει σε απώλεια της ενζυμικής δραστηριότητας. Μην ψύχετε-αποψύχετε το εκχύλισμα περισσότερες από 1-2 φορές. Υπ' αυτές τις συνθήκες η δραστηριότητα τελομεράσης των εκχυλισμάτων θα είναι σταθερή για τουλάχιστον 6 μήνες. Κανονικά χρησιμοποιούνται 1-2 μl του εκχυλίσματος αυτού ανά προσδιορισμό TRAP.

Προσδιορισμός της συγκέντρωσης πρωτεΐνης εκχυλίσματος

Η συγκέντρωση πρωτεΐνης μπορεί να προσδιοριστεί ακολουθώντας πρότυπα πρωτοκόλλα ή μέσω της χρήσης κάποιου από τα διάφορα διαθέσιμα εμπορικά kit. Η PharMingen συνιστά την εξής διαδικασία:

1. Χρησιμοποιώντας δύο αποθεματικά διαλύματα 0,1 mg/ml και 1 mg/ml BSA, προετοιμάζουμε διάφορες συγκεντρώσεις των προτύπων BSA με ρυθμιστικό λύσης ως το αραιωτικό (πίνακας 3). Για κάθε πρότυπο, προετοιμάζουμε έναν συνολικό όγκο 50 μl.

Πρότυπες αραιώσεις BSA				
Δείγμα	BSA (μg) Τελικό Amt	BSA Τυπ.-Ογκ. Απόθεμα 0,1 mg/ml	BSA Τυπ.-Ογκ. Απόθεμα 1,0 mg/ml	Ρυθμιστικό λύσης Ογκ.
1	0	0	0	50 μl
2	1	10 μl	0	40 μl
3	2	20 μl	0	30 μl
4	5	50 μl	0	0
5	5	0	5 μl	45 μl
6	10	0	10 μl	40 μl
7	15	0	15 μl	35 μl
8	20	0	20 μl	30 μl

Πίνακας 3. Προετοιμασία προτύπων BSA.

2. Προσθέτουμε 1 ml αντιδραστηρίου προσδιορισμού πρωτεΐνης Coomassie σε κάθε πρότυπο και κυτταρικό εκχύλισμα που έχει παρασκευαστεί. Χρησιμοποιούμε 50 μl από κάθε εκχύλισμα κυττάρων.
3. Αναμιγνύουμε τα δείγματα και τους επιτρέπουμε να σταθούν σε ΘΔ για 5 min.
4. Μετράμε την τιμή OD₅₉₅ nm του προτύπου και του εκχυλίσματος κυττάρων χρησιμοποιώντας το δείγμα 1 ως τυφλό.
5. Απεικονίζουμε γραφικά μια πρότυπη καμπύλη χρησιμοποιώντας τα δεδομένα OD₅₉₅ για τα διάφορα πρότυπα δείγματα και χρησιμοποιούμε την καμπύλη αυτή, προκειμένου να προσδιορίσουμε τη συγκέντρωση πρωτεΐνης του εκχυλίσματος δοκιμής κυττάρων/ιστού.

Ενίσχυση PCR

Για να ανιχνευτεί η δραστικότητα τελομεράσης, το δείγμα που περιέχει τελομεράση προσθέτει τελομερικές επαναλήψεις πάνω στο άκρο 3' του συνθετικού εκκινητή TS (κύριο μίγμα, πίνακας 4). Σε ένα δεύτερο βήμα τα εκτεταμένα προϊόντα τελομεράσης ενισχύονται με PCR χρησιμοποιώντας τους εκκινητές TS και RP (εικ. 4). Η δραστικότητα τελομεράσης μπορεί να προσδιοριστεί χρησιμοποιώντας είτε μη ραδιενεργό είτε ραδιενεργό προσέγγιση (εικ. 5).

Μη ραδιενεργός προσέγγιση: Ανίχνευση φθοριοχρώματος

1. Τα ακόλουθα συστατικά συνδυάζονται σε έναν σωληνάριο PCR για έναν προσδιορισμό:

Ρυθμιστικό διάλυμα 10X TRAP (Εξάρτημα #4541KC)	5 μl
Εκκινητής TS (0,1 μg/ul) (Εξάρτημα #4542KC)	1 μl
Μίγμα εκκινητών (Εξάρτημα #4543KC)	1 μl
50X dNTPs (Εξάρτημα #4545KC)	1 μl
Ταq DNA Πολυμεράση	0,5 μl
Επεξεργασμένο με DEPC H ₂ O (Εξάρτημα #4546KC)	39,5 μl
Εκχύλισμα τελομεράσης (δείγμα για δοκιμή)	2 μl
Σύνολο	50 μl

Για να μειωθεί ο αριθμός κλασματικών κατανομών ανά προσδιορισμό, συνιστούμε την παρασκευή ενός κύριου μίγματος (πίνακας 4). Ο κατάλληλος όγκος του κύριου μίγματος για προετοιμασία ενός μεταβλητού αριθμού προσδιορισμών βασίζεται σε πολλαπλά των όγκων συστατικών που συνδυάζονται για έναν προσδιορισμό. Αναμιγνύουμε αρκετό κύριο μίγμα για να ολοκληρωθεί ο αριθμός των προσδιορισμών (πίνακας 4). Το κύριο μίγμα είναι δραστικό για κατά προσέγγιση 24 hr.

Προετοιμασία κύριου μίγματος: Μη ραδιενεργός προσέγγιση			
Αντιδραστήριο	1 Προσδιορισμός	5 Προσδιορισμοί	10 Προσδιορισμοί
Ρυθμιστικό διάλυμα 10X TRAP	5 μl	25 μl	50 μl
Εκκινητής TS (0,1 μg/μl)	1 μl	5 μl	10 μl
Μίγμα εκκινητών	1 μl	5 μl	10 μl
50X dNTPs	1 μl	5 μl	10 μl
Ταq DNA Πολυμεράση	0,5 μl	2,5 μl	5 μl
Επεξεργασμένο με DEPC H ₂ O	39,5 μl	197,5 μl	395 μl
Σύνολο	48 μl	240 μl	480 μl

Πίνακας 4. Προετοιμασία του κύριου μίγματος για πολλαπλούς προσδιορισμούς χρησιμοποιώντας τη μη ραδιενεργό προσέγγιση.

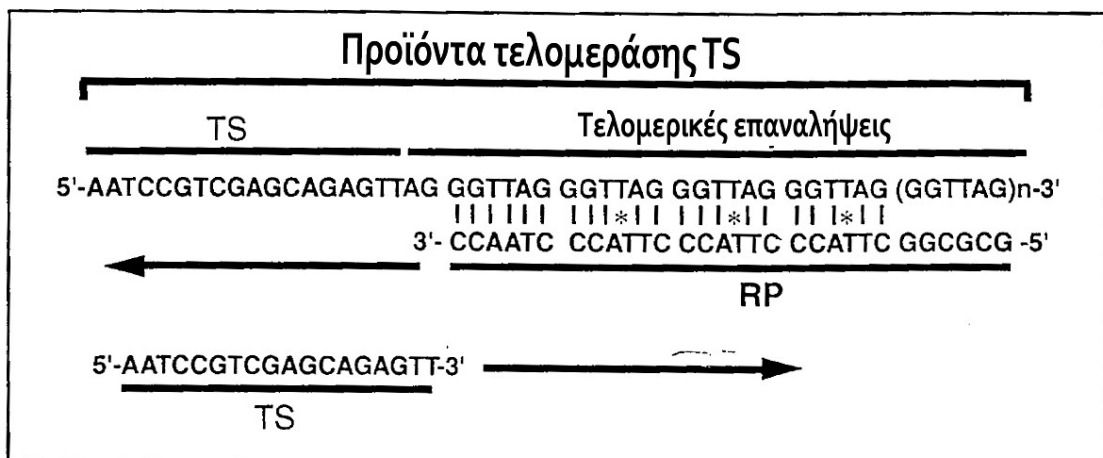
- 2.** Κατανέμουμε κλασματικά 48 μl κύριου μίγματος ανά σωλήνα PCR.
- 3.** Προσθέτουμε 2 μl δειγμάτων εκχυλίσματος προς εξέταση ή κατάλληλου μάρτυρα ανά σωλήνα.
- 4.** Δημιουργούμε στιβάδα με -200 μl ορυκτού ελαίου. Υποβάλλουμε σε περιδίνηση για σύντομο χρόνο.

5. Χρησιμοποιούμε τις ακόλουθες συνθήκες ως οδηγία για το πρόγραμμα κυκλικής λειτουργίας: 30°C/10-30 min για έναν κύκλο, στη συνέχεια 94°C/30 sec και 60°C/30 sec για 25-30 κύκλους.

Σημείωση: Λόγω της μεταβλητότητας μεταξύ των συσκευών με κύκλους θερμικής λειτουργίας, η PharMingen συνιστά τη βελτιστοποίηση της θερμοκρασίας ανόπτησης. Η συνιστώμενη κλίμακα είναι 50°C-60°C.

6. Προσθέτουμε 5 μl της χρωστικής φόρτωσης DNA σε κάθε σωλήνα.
7. Προετοιμάζουμε μια 10-12 cm κατακόρυφη μη μετουσιωτική 12,5-15% PAGE (χωρίς ουρία) σε 0,5X TBE για διαχωρισμό των προϊόντων PCR.
8. Φορτώνουμε δείγματα σε γέλη και λειτουργούμε στα 500V για -1 hr ή μέχρις ότου το μπλε βρωμοφαινόλης να στραγγίξει εκτός της γέλης. Μετακινούμε σε διαφορετική θέση, δηλαδή, τομέα ανάλυσης.
9. Στιγματίζουμε με χρώση τη γέλη για επαναλήψεις τελομερών με αραιώση 1/10000 της SYBR® Green (σε 0,5X TBE) για 30 min. Χρησιμοποιούμε πηγή UV με φωτογραφικό φίλτρο χρώσης γέλης SYBR® Green. Ο εσωτερικός μάρτυρας TSNT θα εμφανιστεί ως ζώνη 36 bp. Το πλέον μικρό προϊόν τελομεράσης θα είναι μια ζώνη 50 bp.

Σημείωση: Η χρήση βρωμιούχου αιτιδίου ως χρωστική DNA για την οπτική απεικόνιση υλικού δεν θα είναι τόσο ευαίσθητη όσο η SYBR® Green.



Εικόνα 4. Ενίσχυση PCR των προϊόντων επέκτασης τελομεράσης. Η τελομεράση συνθέτει τελομερικές επαναλήψεις πάνω στο μη τελομερικό νουκλεοτίδιο TS (5' AATCCGTCGAGCAGAGTT 3'). Τα προϊόντα τελομεράσης ενισχύονται μέσω PCR με τον κατάντη εκκινητή RP (5' CCGCGG (CTTACC)₃ CTAACC 3') και τον ανάντη εκκινητή TS (5' AATCC GTCGA GCAGA GTT 3'). Παρουσιάζονται η σύνθεση DNA (βέλη) και η βέλτιστη ανόπτηση του εκκινητή RP. Οι αστερίσκοι (*) υποδηλώνουν σκόπιμους κακούς συνδυασμούς στην RP οι οποίοι μειώνουν την αλληλεπίδραση εκκινητή με εκκινητή.

Ραδιενεργός προσέγγιση:

Ραδιοσήμανση με ^{32}P του εκκινητή TS.

1. Αναμιγνύουμε τα ακόλουθα αντιδραστήρια σε μικροφυγοκεντρικό σωλήνα (ανά 10 αντιδράσεις):

^{32}P] γ-ATP (3000 ci/mmol, 10 mCi/ml)	2,5 μl
Εκκινητής TS (0,1 μg/μl)	10 μl
10X Ρυθμιστικό κινάσης (=OPA ρυθμιστικό, δείτε ανωτέρω)	1,5 μl
T4 πολυνουκλεοτιδική κινάση (10 U/ml)	1,5 μl
Σύνολο	15.5 μl

2. Επωάζουμε για 20 min στους 37°C, στη συνέχεια 5 min στους 95°C. Ο εκκινητής TS που φέρει σήμανση ^{32}P] γ-ATP είναι τώρα έτοιμος για χρήση στην προετοιμασία του κύριου μίγματος. Χρησιμοποιούμε 1,5 μl ανά αντίδραση.
3. Προετοιμάζουμε ένα κύριο μίγμα για τη ραδιενεργό προσέγγιση (πίνακας 5).

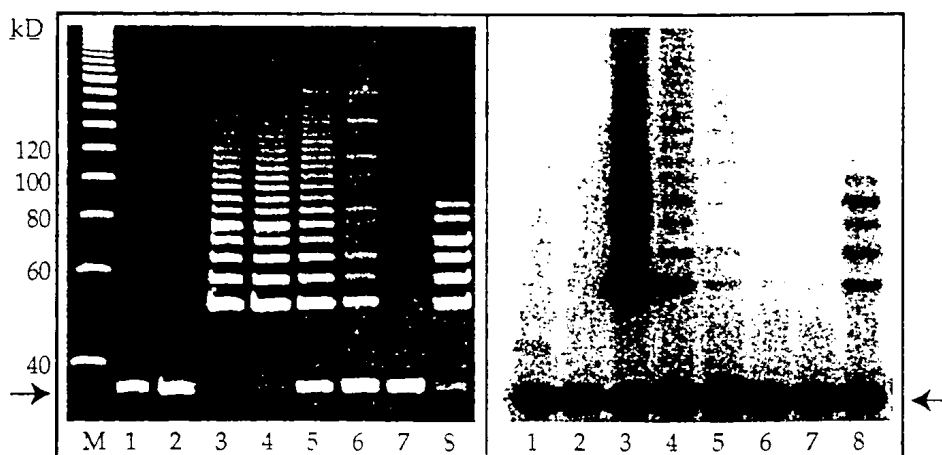
Προετοιμασία κύριου μίγματος: Ραδιενεργός προσέγγιση			
Αντιδραστήριο	1 Προσδιορισμός	5 Προσδιορισμοί	10 Προσδιορισμοί
10X Ρυθμιστικό διάλυμα TRAP	5 μl	25 μl	50 μl
Εκκινητής TS που φέρει σήμανση ^{32}P] γ-ATP	1.5 μl	7.5 μl	15 μl
Μίγμα εκκινητών	1 μl	5 μl	10 μl
50X dNTPs	1 μl	5 μl	10 μl
Taq DNA πολυμεράση	0.5 μl	2.5 μl	5 μl
Επεξεργασμένο με DEPC H ₂ O	39 μl	195 μl	390 μl
Σύνολο	48 μl]	240 μl	480 μl

Πίνακας 5. Προετοιμασία του κύριου μίγματος για πολλαπλούς προσδιορισμούς χρησιμοποιώντας τη ραδιενεργό προσέγγιση.

4. Συνεχίζουμε με τα βήματα 2-8 της μη-ραδιενεργού προσέγγισης και στη συνέχεια υποβάλουμε τη γέλη σε ξήρανση και απεικονίζουμε οπτικά με αυτοραδιογραφία ή σύστημα απεικόνισης φωσφόρου (phosphorimaging).

Ποσοτικός προσδιορισμός δραστικότητας τελομεράσης

Το επίπεδο τελομεράσης σε ένα δεδομένο δείγμα καθορίζεται με σύγκριση του σήματος από τη λωρίδα δείγματος με τα σήματα που αποκτούνται χρησιμοποιώντας γνωστές ποσότητες προτύπου ποσοτικού προσδιορισμού (εικ. 5). Το πρότυπο ποσοτικού προσδιορισμού R8 ολιγονουκλεοτιδίων που χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό TRAP περιέχει την ίδια ακολουθία όπως ένα προϊόν τελομεράσης TS με 8 τελομερικές επαναλήψεις. Με αυτό το πρότυπο παρατηρείται ένα χαρακτηριστικό σχήμα 6 ζωνών που αντιστοιχεί στο πρώτο έως το έκτο προϊόν TRAP.



Εικόνα 5. Αποτελέσματα τυπικού προσδιορισμού TRAP. Η δραστικότητα τελομεράσης καταδεικνύεται από τον αριθμό και την ένταση των τελομερικών επαναλήψεων ανά αντίδραση. Σειριακά αραιωμένα εκχυλίσματα θετικών σε τελομεράση κυττάρων 293 (αρ. Εξαρτήματος 4539ΚC) προσδιορίστηκαν χρησιμοποιώντας τη μονάδα προσδιορισμού TRAP του κιτ TeloQuant™ (αρ. καταλόγου 45227Κ). Τα εκχυλίσματα επωάστηκαν στους 33°C για 10 min και ενισχύθηκαν με PCR στους 94°C/30 sec, 59°C/30 sec για 30 κύκλους, 8Α) χρώση SYBR® Green (302 nm UV) ή 8Β) απεικόνιση φωσφόρου (phosphorimaging) των δειγμάτων που φέρουν ραδιοσήμανση. Λωρίδα Μ: σκάλα 20 bp, Λωρίδα 1: ρυθμιστικός μάρτυρας χωρίς εκχύλισμα κυττάρων/ιστών, Λωρίδα 2: Αδρανοποιημένος με θερμότητα, θετικός σε τελομεράση, μάρτυρας εκχυλίσματος κυττάρων, Λωρίδα 3: εκχύλισμα από 20.000 κύτταρα 293, Λωρίδα 4: εκχύλισμα από 2.000 κύτταρα 293, Λωρίδα 5: εκχύλισμα από 200 κύτταρα 293, Λωρίδα 6: εκχύλισμα από 20 κύτταρα 293, Λωρίδα 7: εκχύλισμα από 2 κύτταρα 293, Λωρίδα 8: Πρότυπο ποσοτικού προσδιορισμού R8. Όλες οι λωρίδες περιέχουν τη ζώνη 36 bp εσωτερικού μάρτυρα (βέλη).

Για τον ποσοτικό προσδιορισμό, το συνολικό προϊόν που παράγεται (TPG), ένα μέτρο της δραστικότητας τελομεράσης, μπορεί να προσδιοριστεί όπως παρατίθεται λεπτομερώς κατωτέρω για τη ραδιενεργό μέθοδο. Αυτή είναι η πιο αξιόπιστη μέθοδος για τον ποσοτικό προσδιορισμό της δραστικότητας τελομεράσης στο εκχύλισμα. Εντούτοις για την πλειονότητα των περιπτώσεων, η χρήση ιδιαίτερα ευαίσθητων χρωστικών ουσιών φθορισμού DNA όπως η SYBR® Green εξυπηρετεί στο να γίνονται ποιοτικές συγκρίσεις μεταξύ των διαφορετικών εκχυλισμάτων κυττάρων/ιστών ή μεταξύ διαφορετικών πειραματικών επεξεργασιών. Η χρήση των χρωστικών ουσιών φθορισμού DNA καθιστά απαραίτητη τη χρήση μεθόδων και εξοπλισμού για τη λήψη εικόνων και τον ποσοτικό προσδιορισμό των τελομερικών επαναλήψεων.

Η ζώνη εσωτερικού μάρτυρα TSNT είναι η πλέον μικρή ζώνη με μοριακό μέγεθος 36 bp και θα είναι παρούσα σε κάθε λωρίδα συμπεριλαμβανομένου του ρυθμιστικού αρνητικού μάρτυρα, του μάρτυρα θερμικά επεξεργασμένου δείγματος και των δειγμάτων εξέτασης. Η επόμενη πλέον μικρή ζώνη TRAP θα είναι 50 bp και όλες οι επόμενες ζώνες στη συνέχεια θα είναι σε αυξητικές βαθμίδες των 6 bp (56, 62 και 68 bp, κτλ.). Εάν ακολουθηθεί η ραδιενεργός προσέγγιση, η ποσότητα δραστηριότητας τελομεράσης από μια δεδομένη αντίδραση μπορεί να προσδιοριστεί από τον ακόλουθο τύπο:

$$TPG = \frac{([T-DT]/[TSNT])}{([R8-B]/[R8TSNT])} \times 100 \quad \text{Εξ. 1.2.}$$

T = Ραδιενεργός αρίθμηση από τις ζώνες τελομερών επαναλήψεων του δείγματος εξέτασης.

DT = Ραδιενεργές αριθμήσεις από τον θερμικά αδρανοποιημένο, ειδικό κυττάρων/ιστών αρνητικό μάρτυρα.

TSNT = Ραδιενεργές αριθμήσεις από τον εσωτερικό μάρτυρα TSNT (0,01 amol) της αντίδρασης T.

R8 = Ραδιενεργός αρίθμηση από το 0,1 amol πρότυπο R8.

B = Ραδιενεργός αρίθμηση από την αντίδραση ρυθμιστικού μάρτυρα.

R8TSNT = Ραδιενεργός αρίθμηση από TSNT (0,01 amol) του προτύπου R8.

Η ραδιενέργεια σε κάθε ζώνη μετρείται χρησιμοποιώντας εξοπλισμό ανάλυσης του τύπου συστήματος απεικόνισης φωσφόρου (phosphorimage).

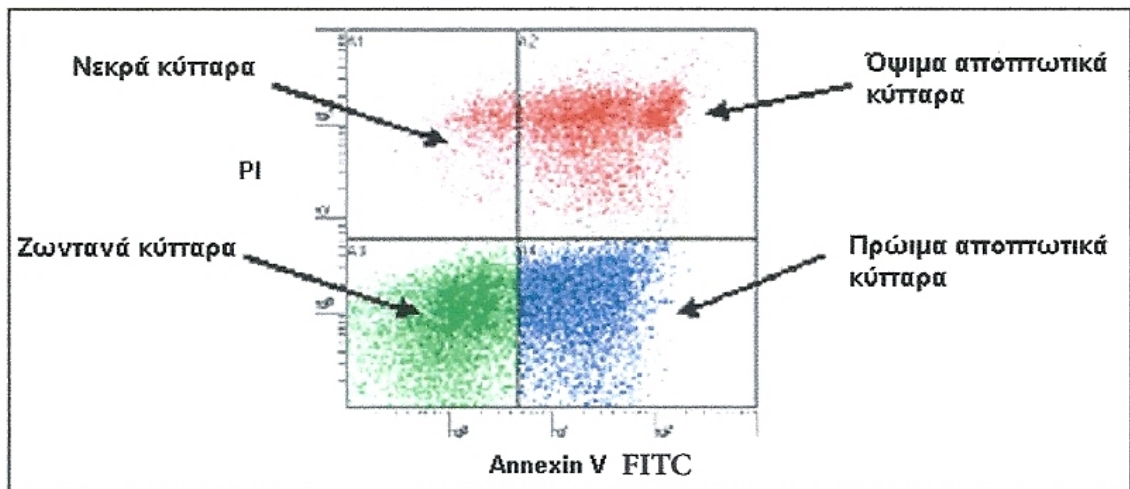
Η ραδιενεργός αρίθμηση για τον εσωτερικό μάρτυρα TSNT και η συνολική αρίθμηση για τα προϊόντα TRAP τελομεράσης για μια δεδομένη αντίδραση μετριοούνται ανεξάρτητα. Το υπόβαθρο που λαμβάνεται μετρώντας τις αριθμήσεις από τις λωρίδες αρνητικού μάρτυρα που έχει αδρανοποιηθεί θερμικά και αρνητικού μάρτυρα εκχυλίσματος, αφαιρείται στη συνέχεια από την αρίθμηση προϊόντων TRAP τελομεράσης. Η ρυθμισμένη αυτή τιμή για το προϊόν TRAP τελομεράσης διαιρείται με τις ραδιενεργές αριθμήσεις από το αντίστοιχο του προϊόν TRAP TSNT. Αυτή η επανευθυγραμμισμένη τιμή στη συνέχεια τυποποιείται για τις διαφορές στην αποδοτικότητα της PCR (που μπορεί να εμφανιστούν μεταξύ των ενισχύσεων PCR) για να δοθεί μια νέα τιμή. Η νέα τιμή διαιρείται στη συνέχεια με τη ραδιενέργεια του επανευθυγραμμισμένου προτύπου R8 μάρτυρα. Ο τελικός ποσοτικός προσδιορισμός εκφράζεται ως TPG. Μία μονάδα TPG ορίζεται ως 0,001 amol ή 600 μόρια εκκινητών TS που εκτείνονται από την τελομεράση παρούσα στο εκχύλισμα με τουλάχιστον 3 τελομερικές επαναλήψεις. Όταν εκτελείται σωστά, ο προσδιορισμός είναι γραμμικός από 0,001 amol (1 TPG) έως 1 amol (1000 TPG) του R8, ο οποίος είναι συγκρίσιμος με τη δραστηριότητα τελομεράσης από περίπου 1 έως 1000 αθάνατα κύτταρα σε επώαση 30 min στους 30°C.

γ. Μελέτη της Κυτταρικής Απόπτωσης

Η απόπτωση ή ο προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος είναι ένα πρόγραμμα κυτταρικής «αυτοκτονίας», με τη βοήθεια του οποίου οι πολυκύτταροι οργανισμοί εξαλείφουν τα γηρασμένα, κατεστραμμένα ή μολυσμένα κύτταρα. Ο θεμελιώδης ρόλος της απόπτωσης στη φυσιολογική ανάπτυξη, την ομοιοστάση των ιστών και την άμυνα έναντι παθογόνων μικροοργανισμών είναι εμφανής. Οποιαδήποτε διαταραχή της ισορροπίας μεταξύ του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου μπορεί να οδηγήσει στον καρκίνο, σε αυτοάνοσα και σε εκφυλιστικά νοσήματα.

Υπάρχουν ασθένειες που σχετίζονται με μειωμένη απόπτωση, όπως οι νεοπλασίες, οι αυτοάνοσες διαταραχές κ.ά. και ασθένειες που σχετίζονται με αυξημένη απόπτωση, όπως το AIDS, νευροεκφυλιστικές διαταραχές κ.ά. Ο μηχανισμός απόπτωσης είναι εξαιρετικά πολύπλοκος και δεν έχει διεκρινιστεί πλήρως. Ελέγχεται από ένα σύνολο γονιδίων που κωδικοποιούν πρωτεΐνες της πλασματικής μεμβράνης (FAS, TNFR, κ. ά.) αλλά και ενδοκυττάριας (Bcl-2, C-myc, P53, κ. ά.). Οι πρωτεΐνες αυτές, εάν υπάρχουν αντισώματα συνδεδεμένα με την αντίστοιχη φθορίζουσα ουσία (FITC ή PE) δυναμικά μπορεί να προσδιοριστούν ποσοτικά με την κυτταρομετρία ροής και κατά προτίμηση με KP ποσοτικού φθορισμού. Με αυτόν τον τρόπο εκτιμάται ο αριθμός των μορίων πρωτεΐνης-αντιγόνου ανά κύτταρο, με αποτέλεσμα να χαρακτηρίζεται η υπερέκφραση ή η υποέκφραση ορισμένων αντιγόνων απόπτωσης σε πληθυσμούς ή υποπληθυσμούς κυττάρων που σχετίζονται με την φυσιολογική ή παθολογική κατάστασή τους.

Ο προσδιορισμός με κυτταρομετρία ροής των αρχικών σταδίων της απόπτωσης γίνεται με τη μέθοδο της αννεξίνης V (Σχήμα 1), ενώ αυτός των τελικών σταδίων με προσδιορισμό του υποπλοειδικού πληθυσμού στη DNA ανάλυση, με κυτταρομετρία ροής, η οποία αναλύθηκε προηγουμένως. Κύρια μόρια που χρησιμοποιούνται στη μελέτη της απόπτωσης με KP είναι, το PI, η 7-AAD, το Bcl-2, τα μόρια FAS-FASL, η αννεξίνη V και οι κασπάσες.



Σχήμα 1: Προσδιορισμός πρώιμων αποπτωτικών, όψιμων αποπτωτικών και νεκρών κυττάρων με τον συνδυασμό Annexin V και PI, με κυτταρομετρία ροής.

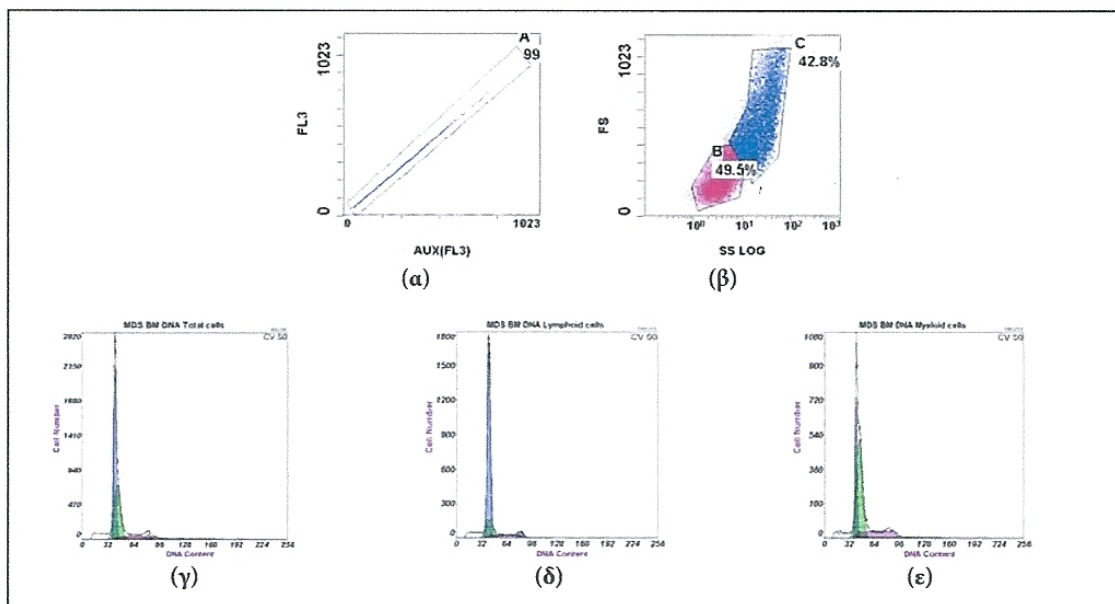
Παρουσίαση S Φάσης Κυτταρικού Κύκλου και Απόπτωσης με τη μέθοδο PI

Για την ανάλυση των αποτελεσμάτων της μεθόδου PI χρησιμοποιούνται κυρίως 5 δια-

γράμματα (Σχήμα 2) εκ των οποίων το 2(1) αποτελεί το στικτόγραμμα στο οποίο παρουσιάζεται ο λόγος του ολοκληρωμένου σήματος φθορισμού προς το ύψος του σήματος φθορισμού κάθε κυττάρου. Όταν τα κύτταρα αποτελούν μονήρη κυτταρικό πληθυσμό οι δυο παράμετροι έχουν γραμμική συσχέτιση μεταξύ τους (διαγώνιος διαγράμματος) κάτι το οποίο δεν εμφανίζουν στα συσσωματώματα κυττάρων που για το λόγο αυτό βρίσκονται εκτός διαγώνιου και δεν περιλαμβάνονται στη μέτρηση.

Το 2(2) παρουσιάζει την κατανομή των κυττάρων λεμφικής [(μικρά κύτταρα) (ροζ χρώμα)] και μυελικής [(μεγάλα κύτταρα)(μπλε χρώμα)] σειράς σύμφωνα με την πρόσθια σκέδαση φωτός (FS) και το λογάριθμο της πλάγιας σκέδασης φωτός (SSLog), το 2(3) διάγραμμα παρουσιάζει τα αποτελέσματα φάσεων του κυτταρικού κύκλου και απόπτωσης του συνόλου των λευκοκυττάρων του δείγματος ενώ το 2(4) και 2(5) των κυττάρων λεμφικής και μυελικής σειράς, αντίστοιχα.

Επισημαίνεται ότι μέσω του μαθηματικού προγράμματος MultiCycle της Phoenix Flow System, Inc. είναι εφικτή η ανάλυση και επεξεργασία της μέτρησης και κατ' επέκταση η λήψη των τιμών S φάσης κυτταρικού κύκλου και Δείκτη DNA καθώς και η επιβεβαίωση παρουσίας ανευπλοειδίας των υπό μελέτη κυττάρων. Αντίθετα το ποσοστό απόπτωσης των υπό μελέτη κυττάρων λαμβάνεται απ' ευθείας κατά τη μέτρηση του δείγματος στον κυτταρομετρητή ροής, αν και μπορεί να χρησιμοποιηθεί και το λογισμικό MultiCycle



Σχήμα 2: Παρουσίαση αποτελεσμάτων ανάλυσης DNA κυττάρων BM ασθενούς με Μυελοδυσπλαστικό Σύνδρομο (MDS) με τη μέθοδο του PI με κυτταρομετρία ροής

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Πίνακας 1: Προσδιορισμός μέσου μήκους τελομεριδίων στους ασθενείς

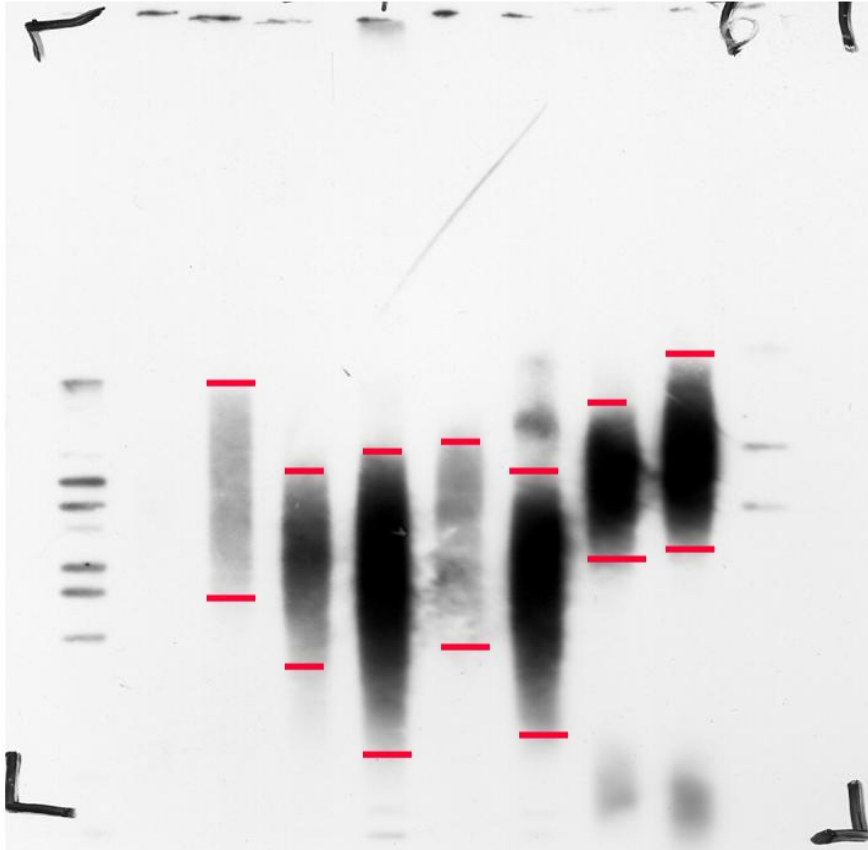
TRF = ΜΕΣΟ ΜΗΚΟΣ ΤΕΛΟΜΕΡΙΔΙΩΝ

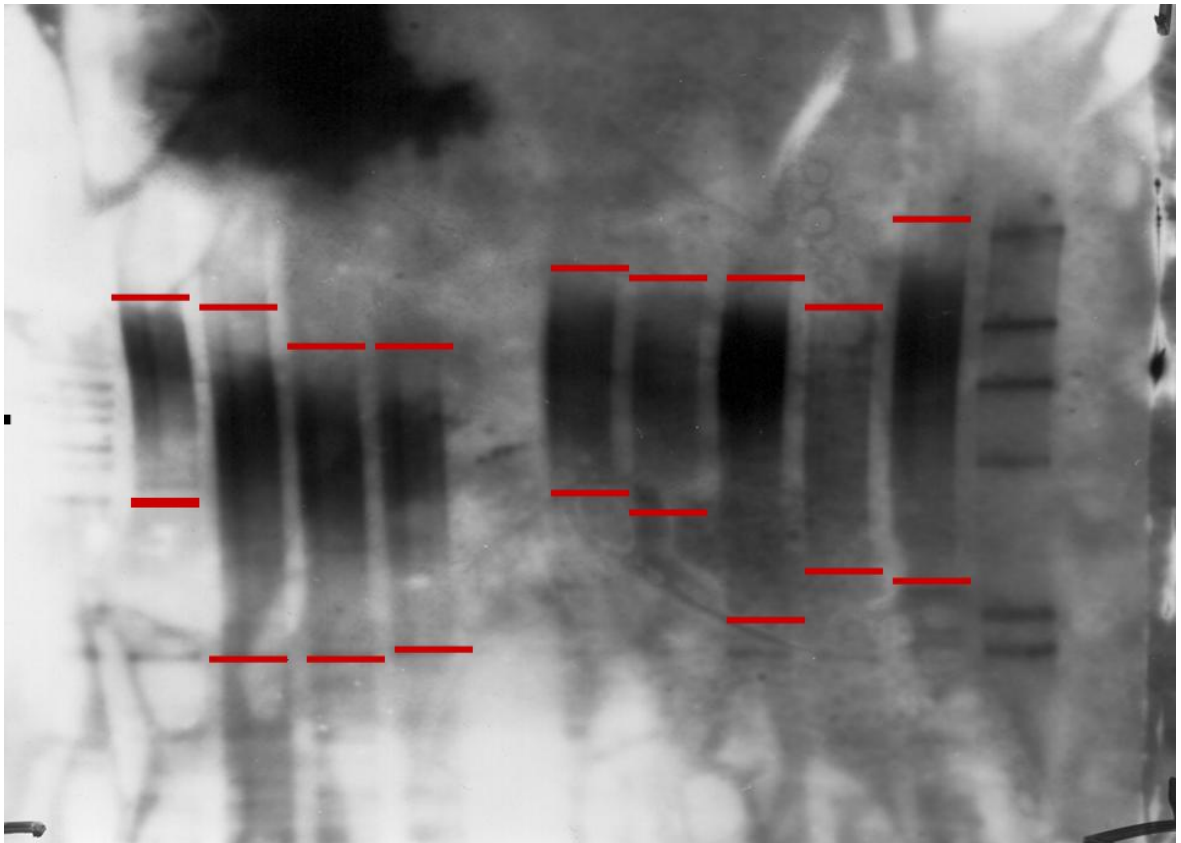
α/α ασθενών	TRF
1	7,782
2	3,722
3	8,833
4	2,889
5	8,147
6	7,658
7	2,578
8	6,957
9	11,33
10	7,688
11	5,932
12	7,293
13	0,659
14	17,432
15	5,230
16	3,815
17	5,555
18	8,585
19	4,023
20	14,386
21	5,554
22	8,894
23	5,875
24	6,055
25	5,351
26	9,021
27	5,306
28	5,845
29	5,350
30	5,769
31	
32	6,111

α/α ασθενών	TRF
33	2,423
34	8,148
35	3,824
36	5,576
37	6,655
38	5,746
39	3,654
40	6,577
41	3,342
42	7,541
43	10,371
44	6,872
45	5,555
46	3,497
47	7,763
48	2,092
49	8,359
50	5,803
51	3,690
52	8,471
53	6,542
54	1,434
55	1,977
56	4,758
57	2,693
58	
59	2,887
60	
61	
62	
63	

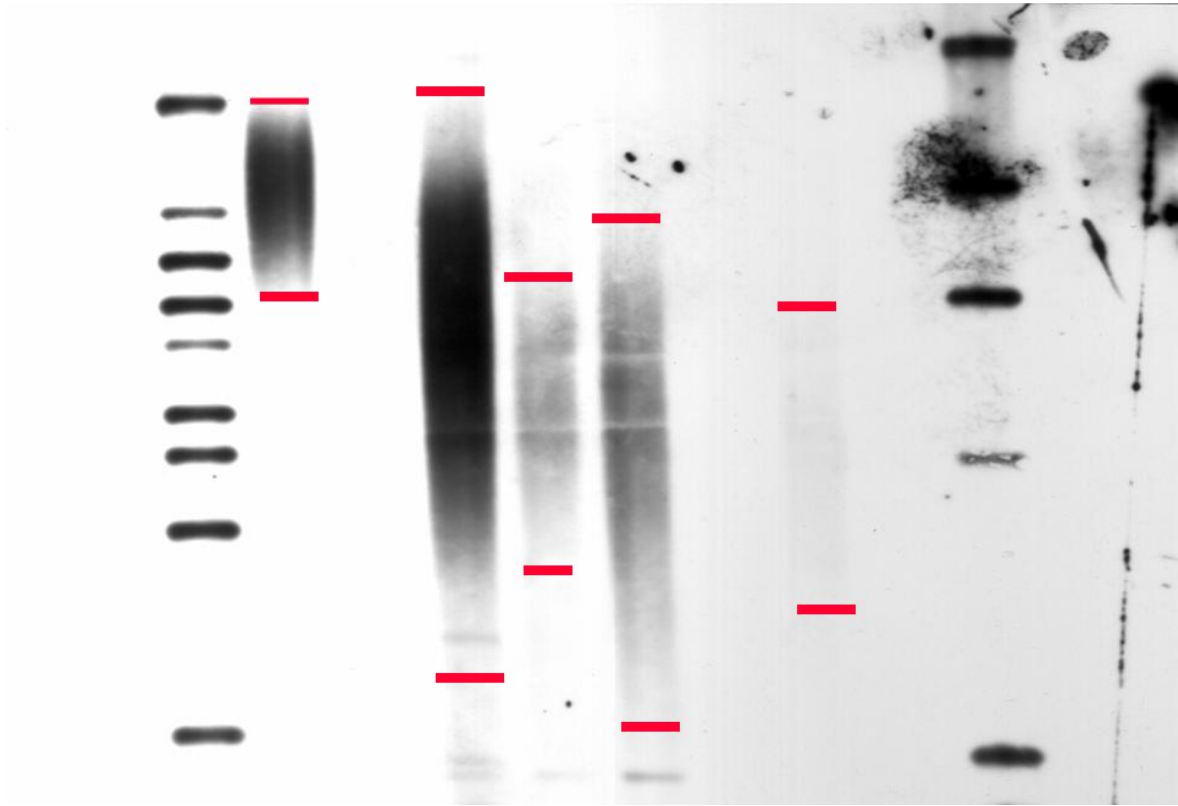
Στις εικόνες I και II και III φαίνονται ενδεικτικά παραδείγματα από τον προσδιορισμό του TRF στην ομάδα των ασθενών

ΕΙΚΟΝΑ Ι: ΕΝΔΕΙΚΤΙΚΑ FILMS





EIKONA II: ENAEIKTIKA FILMS



ΕΙΚΟΝΑ ΙΙΙ: ΕΝΔΕΙΚΤΙΚΑ FILMS

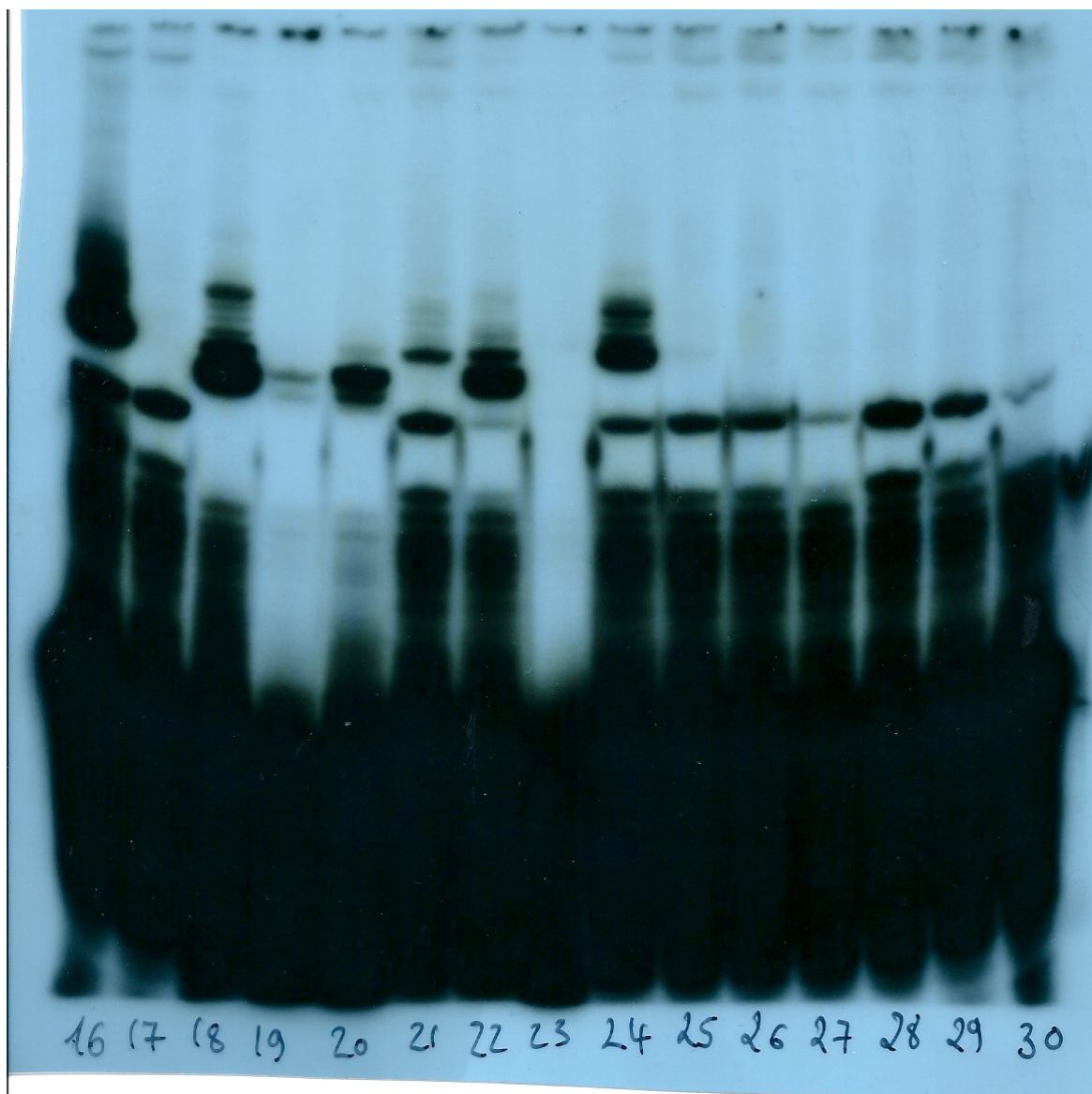
ΠΙΝΑΚΑΣ 2: ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΕΛΟΜΕΡΑΣΗΣ ΣΤΗΝ ΟΜΑΔΑ ΤΩΝ ΑΣΘΕΝΩΝ

α/α ασθενών	δραστηριότητα τελομεράσης
1	
2	
3	
4	
5	
6	222.85
7	
8	196.94
9	
10	
11	
12	
13	
14	
15	
16	
17	
18	4.7
19	12.5
20	
21	54.7
22	32.2
23	20.3
24	
25	16.1
26	435.4
27	37.2
28	
29	
30	
31	66.8
32	147.5

α/α ασθενών	δραστηριότητα τελομεράσης
33	12.3
34	
35	37.9
36	20.4
37	4.5
38	3
39	139.4
40	9.5
41	23.9
42	80.4
43	
44	
45	10.5
46	20.9
47	211.47
48	18.57
49	626.86
50	571.31
51	896.37
52	220.7
53	166.82
54	63.23
55	68.23
56	78.38
57	23.876
58	224.52
59	97.54
60	824.03
61	52.79
62	622.25
63	103.27

ΕΙΚΟΝΑ IV: ΕΝΔΕΙΚΤΙΚΑ ΠΑΡΑΔΕΙΓΜΑΤΑ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΤΕΛΟΜΕΡΑΣΗΣ ΣΤΗΝ ΟΜΑΔΑ

ΤΩΝ ΑΣΘΕΝΩΝ



ΠΙΝΑΚΑΣ 3: ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ bcl2 ΠΡΩΤΕΙΝΗΣ ΚΑΙ ΑΠΟΠΤΩΣΗΣ ΜΕ ΚΤΥΤΑΡΟΜΕΤΡΙΑ ΡΟΗΣ

ΣΤΟΥΣ ΑΣΘΕΝΕΙΣ

α/α ασθενών	bcl 2	όγκιση απόπτωση	πρόιμη απόπτωση
1			
2			
3			
4			
5			
6		14.2	
7			
8	35027		2.16
9			
10			
11			
12			
13			
14			
15			
16			
17			
18	63439	1.5	1.2
19	51024	4.04	0.16
20	35481	0.14	2.41
21	52271		
22	73817	0.4	5.5
23	42464	4.5	1.5
24	22632	2.3	0.4
25	50317	6	3.14
26	34906	3.5	2.9
27	82308	4.5	1.6
28			
29	24396	5.2	4
30		2.1	6.6
31			
32			

α/α ασθενών	bcl 2	όγκιση απόπτωση	πρόιμη απόπτωση
33	71931	3.4	5
34	34617	2.5	0.6
35	96653	1.7	9.23
36	42888	4.2	7.8
37	62307	1.6	2.7
38	69139	0.9	4.5
39	106120	1.6	4.87
40			
41			
42			
43			
44			
45			
46	66402	1.9	
47	52943	5.97	1.44
48			
49	41656	0.64	
50	42194	10	0.02
51	22558	9.66	11.2
52			
53	47436	8.06	
54			
55	48185		
56	31226		0.17
57			
58	78369	5.22	0.02
59	35481	2.41	0.14
60			
61			1.04
62			
63			

ΠΙΝΑΚΑΣ 4

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΑΝΑΛΥΣΗΣ TRF ΚΑΙ ΤΕΛΟΜΕΡΑΣΗΣ ΣΤΟΥΣ ΥΓΙΕΙΣ ΜΑΡΤΥΡΕΣ

α/α	Κωδικός		TRF	Τελομεράση
1	101		7,181	1,52
2	102		7,988	24,78
3	103		7,533	3,89
4	104		6,792	9,14
5	105		5,631	4,053
6	106		6,572	2,244
7	107		5,603	0,38
8	108		7,924	78,15
9	109		9,265	47,06
10	110		7,651	35,23
11	111		8,029	213,8
12	112		8,444	210,4
13	113		7,573	
14	114		7,818	
15	115		7,462	
16	116		8,336	
17	117		9,381	
18	118		9,045	
19	119		8,695	
20	120			
21	121			
22	122			

ΠΙΝΑΚΑΣ 5

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΒCL-2 ΚΑΙ ΑΠΟΠΤΩΣΗΣ ΣΤΟΥΣ ΥΓΙΕΙΣ

ΜΑΡΤΥΤΕΣ

α/α	Κωδικός	Bcl-2	πρόιμη	Όγκμη
1	101			
2	102			
3	103			
4	104			
5	105			
6	106			
7	107			
8	108			
9	109			
10	110			
11	111			
12	112			
13	113	5472	9,23	4,21
14	114	41372	8,87	1,59
15	115	38743	11,2	
16	116	20526	9,23	4,5
17	117	33342	8,43	2,83
18	118	17957	8,82	1,18
19	119	19523	5,72	5,87
20	120		9,54	3,24
21	121	14715	12,5	14,1
22	122	10135	9,27	3,13

ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

ΠΡΩΤΗ ΕΝΟΤΗΤΑ

1. Προσδιορισμός μέσου μήκους τελομεριδίων **TRF** ασθενών και μαρτύρων.

Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων φαίνεται στον Πίνακα: 1.1

	<i>Διάμεση</i>	<i>ελάχιστη</i>	<i>Μέγιστη</i>
	<i>TRF</i>	<i>TRF</i>	<i>TRF</i>
<i>μάρτυρες</i>	7,82	5,60	9,38
<i>ασθενείς</i>	5,85	0,66	17,43

Πίνακας 1.1

Υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά $P = 0,0014$, που σημαίνει ότι το μέσο μήκος τελομεριδίων των ασθενών είναι σαφώς μικρότερο έναντι αυτού των μαρτύρων.

2. Προσδιορισμός **τελομεράσης** ασθενών και μαρτύρων

Στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων – Πίνακας 1.2:

	<i>διάμεση τελομεράση</i>	<i>ελάχιστη τελομεράση</i>	<i>μέγιστη τελομεράση</i>
<i>ασθενείς / μάρτυρες</i>			
<i>μάρτυρες</i>	16,96	0,38	213,80
<i>ασθενείς</i>	97,54	1,18	1115,69

Πίνακας 1.2

Υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά $P = 0,0041$, που σημαίνει ότι η δραστηριότητα της τελομεράσης είναι εντονότερη στα κύτταρα των ασθενών με ΧΛΛ έναντι των υγιών μαρτύρων.

3. Στατιστική συσχέτιση του μέσου μήκους τελομεριδίων **TRF** με τα στάδια της νόσου κατά Rai (**R**) και Binet (**B**) – Πίνακας 1.3:

	<i>Διάμεση</i>	<i>ελάχιστη</i>	<i>μέγιστη</i>	
	<i>TRF</i>	<i>TRF</i>	<i>TRF</i>	<i>P</i>
<i>R</i> στάδια 0,1,2 έναντι 3 & 4				
0, 1, 2	5,86	2,42	17,43	0,2381
3, 4	5,91	0,66	9,02	
<i>B</i> στάδια A έναντι B & C				
A	5,75	2,69	17,43	0,4073
B & C	5,93	0,66	14,39	

Πίνακας 1.3

Δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά του TRF στα διάφορα στάδια της νόσου,

4. Συσχέτιση **TRF** ασθενών που υπεβλήθησαν ή όχι σε ειδική **θεραπευτική** αγωγή – Πίνακας 1.4:

	<i>διάμεση</i>	<i>ελάχιστη</i>	<i>μέγιστη</i>
	<i>TRF</i>	<i>TRF</i>	<i>TRF</i>
<i>θεραπεία</i>			
<i>ΟΧΙ</i>	5,85	1,43	17,43
<i>ΝΑΙ</i>	5,85	0,66	8,47

Πίνακας 1.4

Δεν διαπιστούται στατιστικά σημαντική διαφορά ($P = 0,4336$) που σημαίνει ότι στους «θεραπευθέντες» ασθενείς παρά την προσωρινή ύφεση της νόσου το μέσο μήκος τελομεριδίων στα κύτταρα του περιφερικού αίματος παραμένει ηυξημένο.

5. Στατιστική συσχέτιση **TRF** ασθενών με φυσιολογική ή παθολογική **LDH** (γαλακτική δενδρογενάση) – Πίνακας 1.5:

	<i>διάμεση</i>	<i>ελάχιστη</i>	<i>μέγιστη</i>
	<i>TRF</i>	<i>TRF</i>	<i>TRF</i>
<i>LDH</i>			
<i>φυσιολογική</i>	5,57	0,66	14,39
<i>παθολογική</i>	5,79	2,09	7,76

Πίνακας 1.5

Δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά $P = 0,9669$.

6. Στατιστική συσχέτιση **TRF** με ηπατική Βιοχημεία – Πίνακας 1.6:

	<i>διάμεση</i>	<i>ελάχιστη</i>	<i>μέγιστη</i>
	<i>TRF</i>	<i>TRF</i>	<i>TRF</i>
<i>Ηπατική βιοχημεία</i>			
<i>φυσιολογική</i>	5,81	1,98	14,39
<i>παθολογική</i>	5,23	0,66	8,83

Πίνακας 1.6

Δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά, $P = 0,1858$, που σημαίνει ότι το μήκος των τελομεριδίων δεν διαφέρει στους ασθενείς με φυσιολογική ή παθολογική ηπατική βιοχημεία.

7. Στατιστική συσχέτιση του **TRF** με το φύλο των ασθενών – Πίνακας 1.7:

	<i>διάμεση</i>	<i>ελάχιστη</i>	<i>μέγιστη</i>
	<i>TRF</i>	<i>TRF</i>	<i>TRF</i>
<i>φύλο</i>			
<i>άνδρες</i>	5,58	1,98	17,43
<i>γυναίκες</i>	6,08	0,66	10,37

Πίνακας 1.7

Δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των δύο φύλων, $P = 0,5216$.

Στατιστική συσχέτιση **TRF** και **αιματοκρίτου** των ασθενών :

Δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική συσχέτιση, $P = 0,1191$, ενώ ο συντελεστής συσχέτισης του Pearson είναι 0,21070.

8. Στατιστική συσχέτιση **TRF** με **αιμοπετάλια** .Πίνακας 1.8

	<i>διάμεση</i>	<i>ελάχιστη</i>	<i>μέγιστη</i>	
	<i>TRF</i>	<i>TRF</i>	<i>TRF</i>	<i>P</i>
				0,7844
<i>PLT ≥ 150.000</i>	5,75	0,66	17,43	
<i>PLT < 150.000</i>	6,06	2,09	9,02	

Πίνακας 1.8

Δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική συσχέτιση μεταξύ TRF και PLT, $P = 0,7844$

Στατιστική συσχέτιση TRF και τελομεράσης στους μελετηθέντες ασθενείς.

Διαπιστώνται στατιστικά σημαντική συσχέτιση, $P=0,0149$, που συνεπάγεται ότι το μέσο μήκος τελομεριδίων είναι ευθέως ανάλογο με τη δραστηριότητα της τελομεράσης.

TRF και bcl-2

Δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική συσχέτιση $P = 0,2376$.

TRF και όψιμη απόπτωση.

Δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική συσχέτιση $P = 0,2735$.

TRF και πρόιμη απόπτωση.

Δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική συσχέτιση $P = 0,2825$.

9. **Συγκεντρωτικά** τα αποτελέσματα είναι: - Πίνακας 1.9:

μεταβλητή	συντελεστής συσχέτισης	P	N
τελομεράση	0,39711	0,0149	37
Bcl – 2	- 0,23070	0,2376	28
όψιμη απόπτωση	- 0,22298	0,2735	26
πρόιμη απόπτωση	- 0,22864	0,2825	24

Πίνακας 1.9

Εκτός από την **τελομεράση**, σε καμία από τις υπόλοιπες μεταβλητές δεν έχουμε στατιστικά σημαντική συσχέτιση. Βέβαια, είναι σημαντικό το μέγεθος του δείγματος σε κάθε περίπτωση, αφού εκτός της τελομεράσης όπου έχουμε 37 ασθενείς σε όλες τις υπόλοιπες μεταβλητές η ανάλυση βασίστηκε σε κάτω από 28 παρατηρήσεις. Ίσως μεγαλύτερο δείγμα ασθενών να δώσει διαφορετικά αποτελέσματα.

10. Στατιστική ανάλυση **μαρτύρων και ασθενών** ως προς τις μεταβλητές **Bcl-2, Όψιμη, Πρόιμη Απόπτωση** – Πίνακας 1.10:

	Ασθενείς	Μάρτυρες	P
BCL2	48185,00	19523,00	0,0002
όψιμη απόπτωση	3,4000000	9,2300000	0,0003
πρόιμη απόπτωση	2,2850000	3,2400000	0,1928

Πίνακας 1.10

Στατιστικά σημαντική διαφορά **υπάρχει** για τις μεταβλητές **BCL-2** και **όψιμη απόπτωση**, όπου $P = 0,0002$ και $0,0003$ αντίστοιχα, ενώ για την μεταβλητή **πρόιμη απόπτωση** δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά, αφού $P = 0,1928$.

ΔΕΥΤΕΡΗ ΕΝΟΤΗΤΑ

Στατιστική συσχέτιση όψιμης απόπτωσης με τα κλινικοεργαστηριακά ευρήματα που μελετήθηκαν στους ασθενείς πάσχοντες από Χ.Λ.Λ.

1. Όψιμη απόπτωση και στάδια Rai (R) και Binet (B) (βλ. 1^η ενότητα – σταδιοποίηση)
– Πίνακας 2.1:

	διάμεση	ελάχιστη	μέγιστη	
	όψιμη α- πόπτωση	όψιμη α- πόπτωση	όψιμη α- πόπτωση	P
R στάδια 0, I, II έναντι III και IV				
0, I, II	2,55	0,14	10,00	0,3692
III και IV	3,50	0,64	14,20	
B στάδια A έναντι B και C				
A	2,90	0,40	6,00	0,4256
B και C	3,40	0,14	14,20	

Πίνακας 2.1

Δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά για τις ομάδες κατά Rai και Binet που μελετήθηκαν, P = 0,3692 και 0,4256 αντίστοιχα.

2. Όψιμη απόπτωση και ασθενών με ή χωρίς ειδική θεραπεία – Πίνακας 2.2:

	Διάμεση	ελάχιστη	μέγιστη
	όψιμη απόπτωση	όψιμη απόπτωση	όψιμη απόπτωση
θεραπεία			
ΟΧΙ	2,70	0,14	9,66
ΝΑΙ	2,46	0,64	14,20

Πίνακας 2.2

Δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά όσον αφορά την όψιμη απόπτωση στους ασθενείς που πήραν ή δεν πήραν θεραπεία.

P = 0,0611 του ελέγχου Kruskal-Wallis ενώ του Van der Waerden είναι P = 0,1627.

3. Όψιμη απόπτωση και LDH – Πίνακας 2.3:

	διάμεση	ελάχιστη	μέγιστη
	όψιμη απόπτωση	όψιμη απόπτωση	όψιμη απόπτωση
LDH			
φυσιολογική	3,45	0,14	14,20
παθολογική	4,04	1,70	10,00

Πίνακας 2.3

Δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά όσον αφορά την όψιμη απόπτωση και στις ομάδες ασθενών με φυσιολογική ή παθολογική LDH. $P = 0,6702$.

4. Όψιμη απόπτωση και Ηπατική Βιοχημεία – Πίνακας 2.4:

	διάμεση	ελάχιστη	μέγιστη
	όψιμη απόπτωση	όψιμη απόπτωση	όψιμη απόπτωση
Ηπατική βιοχημεία			
φυσιολογική	2,95	0,14	9,66
παθολογική	5,97	1,90	14,20

Πίνακας 2.4

Δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά αφού σύμφωνα με τον έλεγχο Krustal – Wallis $P = 0,1173$ ενώ σύμφωνα με τον έλεγχο Van der Waerden $P = 0,0753$. Δύσκολο να βγει συμπέρασμα.

5. Όψιμη απόπτωση και φύλο των ασθενών (άρρεν, θήλυ) – Πίνακας 2.5:

	Διάμεση	ελάχιστη	μέγιστη
	Όψιμη απόπτωση	Όψιμη απόπτωση	Όψιμη απόπτωση
φύλο			
άρρεν	3,72	0,14	14,20
θήλυ	2,50	0,40	6,00

Πίνακας 2.5

Δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ ανδρών και γυναικών με Χ.Λ.Λ. όσον αφορά την όψιμη απόπτωση, $P = 0,7244$

6. **Όψιμη απόπτωση και Β-συμπτώματα** (όπως πυρετός, καταβολή δυνάμεων, απίσχναση, ανορεξία, άλγη κ.α.) – Πίνακας 2.6:

	<i>διάμεση</i>	<i>ελάχιστη</i>	<i>μέγιστη</i>
	<i>Όψιμη απόπτωση</i>	<i>Όψιμη απόπτωση</i>	<i>Όψιμη απόπτωση</i>
<i>Β-συμπτώματα Ναι έναντι Όχι</i>			
<i>όχι</i>	3,45	0,14	14,20
<i>ναι</i>	2,41	1,70	10,00

Πίνακας 2.6

Δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ ασθενών με Β-συμπτώματα ή «όχι» όσον αφορά την όψιμη απόπτωση, $P = 5866$.

7. **Όψιμη απόπτωση έναντι αιματοκρίτη**

Δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική συσχέτιση διότι $P = 0,1846$ ενώ ο συντελεστής συσχέτισης του Spearman είναι $-0,26862$.

8. **Όψιμη απόπτωση και αιμοπετάλια** – Πίνακας 2.7:

	<i>διάμεση</i>	<i>ελάχιστη</i>	<i>μέγιστη</i>	
	<i>Όψιμη απόπτωση</i>	<i>Όψιμη απόπτωση</i>	<i>Όψιμη απόπτωση</i>	<i>P</i>
				0,4343
<i>PLT ≥ 150.000</i>	1,70	0,14	10,00	
<i>PLT < 150.000</i>	2,46	2,10	14,20	

Πίνακας 2.7

Δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά για τα αιμοπετάλια και την όψιμη απόπτωση διότι $P = 0,4343$

ΤΡΙΤΗ ΕΝΟΤΗΤΑ

Στατιστική συσχέτιση της **πρώιμης** απόπτωσης με όλα τα κλινικοεργαστηριακά ευρήματα που μελετήθηκαν στους ασθενείς πάσχοντες από Χ.Λ.Λ.

3. Πρώιμη απόπτωση και στάδια Rai (R) και Binet (B) – Πίνακας 3.1:

	<i>διάμεση</i>	<i>ελάχιστη</i>	<i>μέγιστη</i>	
	<i>πρώιμη απόπτωση</i>	<i>πρώιμη απόπτωση</i>	<i>πρώιμη απόπτωση</i>	<i>P</i>
<i>R στάδια 0, I, II έναντι III & IV</i>				
<i>0, I, II</i>	3,14	0,02	11,20	0,1390
<i>III & IV</i>	1,44	0,14	6.60	
<i>B στάδια A έναντι B και C</i>				
<i>A</i>	3,14	0,02	7.80	0,7059
<i>B & C</i>	2,16	0,02	11.20	

Πίνακας 3.1

Δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά για τις ομάδες Rai και Binet που μελετήθηκαν $P = 0,1390$ και $0,7059$ αντίστοιχα.

4. Πρώιμη απόπτωση και ασθενών με ή χωρίς ειδική **θεραπεία** – Πίνακας 3.2:

	<i>διάμεση</i>	<i>ελάχιστη</i>	<i>μέγιστη</i>
	<i>πρώιμη απόπτωση</i>	<i>πρώιμη απόπτωση</i>	<i>πρώιμη απόπτωση</i>
<i>θεραπεία</i>			
<i>Όχι</i>	3,02	0,17	11,20
<i>Ναι</i>	2,43	0,14	9,23

Πίνακας 3.2

Δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά σε ό,τι αφορά την πρώιμη απόπτωση μεταξύ ασθενών που έλαβαν ή όχι ειδική θεραπεία, $P = 0,4905$.

Πρώιμη απόπτωση και LDH. Η LDH μελετάται ξεχωριστά αφού αποτελεί δείκτη ιδιαίτερης βαρύτητας της νόσου ΧΛΛ – Πίνακας 3.3

	<i>Διάμεση</i>	<i>ελάχιστη</i>	<i>μέγιστη</i>
	<i>πρώιμη από- πτωση</i>	<i>πρώιμη από- πτωση</i>	<i>πρώιμη από- πτωση</i>
LDH			
<i>φυσιολογική</i>	2,29	0,14	11,20
<i>παθολογική</i>	1,44	0,02	9,23

Πίνακας 3.3

Δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά όσον αφορά την πρώιμη απόπτωση μεταξύ ασθενών με φυσιολογική ή παθολογική LDH, P = 0,9406.

5. **Πρώιμη απόπτωση και ηπατική βιοχημεία** – Πίνακας 3.4:

	<i>διάμεση</i>	<i>ελάχιστη</i>	<i>μέγιστη</i>
	<i>πρώιμη από- πτωση</i>	<i>πρώιμη από- πτωση</i>	<i>πρώιμη από- πτωση</i>
Ηπατική βιοχημεία			
<i>φυσιολογική</i>	2,80	0,16	11,20
<i>παθολογική</i>	0,79	0,02	2,16

Πίνακας 3.4

Υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά αφού με τον έλεγχο Kruskas – Wallis P = 0,0440 ενώ σύμφωνα με τον έλεγχο Van der Waerden P = 0,0308.

6. **Πρώιμη απόπτωση και φύλο** (άρρεν – θήλυ) – Πίνακας 3.5:

	<i>διάμεση</i>	<i>ελάχιστη</i>	<i>μέγιστη</i>
	<i>πρώιμη από- πτωση</i>	<i>πρώιμη από- πτωση</i>	<i>πρώιμη από- πτωση</i>
φύλο			
<i>άρρεν</i>	2,41	0,02	11,20
<i>θήλυ</i>	2,16	0,02	9,23

Πίνακας 3.5

Δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των δύο φύλων όσον αφορά την πρόιμη απόπτωση, $P = 0,5974$.

7. **Πρόιμη απόπτωση και Β-συμπτώματα** (γενικά κλινικά συμπτώματα) – Πίνακας 3.6:

	<i>διάμεση</i>	<i>ελάχιστη</i>	<i>μέγιστη</i>
	<i>πρόιμη απόπτωση</i>	<i>πρόιμη απόπτωση</i>	<i>πρόιμη απόπτωση</i>
<i>B-συμπτώματα Ναι έναντι Όχι</i>			
<i>Όχι</i>	2,90	0,16	11,20
<i>Ναι</i>	0,27	0,02	9,23

Πίνακας 3.6

Υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά, $P = 0,0305$ και δείχνει ότι οι ασθενείς με Β-συμπτώματα εμφανίζουν σε μικρότερο βαθμό πρόιμη απόπτωση, εν αντιθέσει με τους ασθενείς που δεν έχουν Β-συμπτώματα.

8. **Πρόιμη απόπτωση και αιματοκρίτης**

Δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά, $P = 0,1763$ ενώ ο συντελεστής συσχέτισης του Spearman είναι 0,27358.

9. **Πρόιμη απόπτωση και αιμοπετάλια** – Πίνακας 3.7:

	<i>διάμεση</i>	<i>ελάχιστη</i>	<i>μέγιστη</i>	
	<i>πρόιμη απόπτωση</i>	<i>πρόιμη απόπτωση</i>	<i>πρόιμη απόπτωση</i>	<i>P</i>
				0,1693
<i>PLT ≥ 150.000</i>	4,25	0,02	11,20	
<i>PLT < 150.000</i>	0,50	0,14	6,60	

Πίνακας 3.7

Δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά για την πρόιμη απόπτωση και για τα αιμοπετάλια διότι $P = 0,1693$.

ΤΕΤΑΡΤΗ ΕΝΟΤΗΤΑ

Στατιστική συσχέτιση της μεταβλητής **BCL 2** με όλα τα κλινικοεργαστηριακά ευρήματα που μελετήθηκαν στους ασθενείς με Χ.Λ.Λ.

1. **BCL 2** και στάδια της νόσου κατά Rai (**R**) και Binet (**B**) – Πίνακας 4.1:

	<i>διάμεση</i>	<i>ελάχιστη</i>	<i>μέγιστη</i>	
	<i>BCL 2</i>	<i>BCL 2</i>	<i>BCL 2</i>	<i>P</i>
<i>R</i> στάδια 0, I, II έναντι III & IV				
0, I, II	62307,00	22558,00	106120,00	0,1111
III & IV	44546,00	22632,00	82308,00	
<i>B</i> στάδια A έναντι B & C				
A	63439,00	31226,00	106120,00	0,1089
B & C	44815,00	22558,00	96653,00	

Πίνακας 4.1

Δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά για τις ομάδες κατά Rai και Binet που μελετήθηκαν, $P = 0,1111$ και $0,1089$ αντίστοιχα.

2. **BCL 2** και ασθενών με ή χωρίς ειδική **θεραπεία** – Πίνακας 4.2:

	<i>διάμεση</i>	<i>ελάχιστη</i>	<i>μέγιστη</i>
	<i>BCL 2</i>	<i>BCL 2</i>	<i>BCL 2</i>
<i>θεραπεία</i>			
Όχι	49251,00	22558,00	82308,00
Ναι	45162,00	22632,00	106120,00

Πίνακας 4.2

Υπάρχει μία οριακή στατιστικά σημαντική διαφορά, αφού κατά τον έλεγχο Kruskal – Wallis $P = 0,0528$, ενώ του Van der Waerden $P = 0,0436$. Σε κάθε περίπτωση, είναι οριακή η τιμή του P .

3. **BCL 2** και **LDH** – Πίνακας 4.3:

	<i>διάμεση</i>	<i>ελάχιστη</i>	<i>μέγιστη</i>
	<i>BCL 2</i>	<i>BCL 2</i>	<i>BCL 2</i>
LDH			
<i>φυσιολογική</i>	42888,00	22558,00	106120,00
<i>παθολογική</i>	52943,00	42194,00	96653,00

Πίνακας 4.3

Δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά, P = 0,2751.

4. **BCL 2** και ηπατική βιοχημεία – Πίνακας 4.4:

	<i>διάμεση</i>	<i>ελάχιστη</i>	<i>μέγιστη</i>
	<i>BCL 2</i>	<i>BCL 2</i>	<i>BCL 2</i>
Ηπατική βιοχημεία			
<i>φυσιολογική</i>	49251,00	22558,00	106120,00
<i>παθολογική</i>	42194,00	35027,00	66402,00

Πίνακας 4.4

Δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά P = 08651.

5. **BCL 2** και φύλο (άρρεν, θήλυ) – Πίνακας 4.5:

	<i>διάμεση</i>	<i>ελάχιστη</i>	<i>μέγιστη</i>
	<i>BCL 2</i>	<i>BCL 2</i>	<i>BCL 2</i>
Φύλο			
<i>Άρρεν</i>	49604,50	22558,00	106120,00
<i>Θήλυ</i>	42464,00	22632,00	96653,00

Πίνακας 4.5

Δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των δύο φύλων, P = 0,2087.

6. **BCL 2 και B-συμπτώματα** – Πίνακας 4.6:

	<i>διάμεση</i>	<i>ελάχιστη</i>	<i>μέγιστη</i>
	<i>BCL 2</i>	<i>BCL 2</i>	<i>BCL 2</i>
<i>B-συμπτώματα Ναι έναντι Όχι</i>			
<i>Όχι</i>	47810,50	22558,00	106120,00
<i>Ναι</i>	42194,00	22632,00	96653,00

Πίνακας 4.6

Δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά, $P = 0,9254$.

7. **BCL 2 και αιματοκρίτης (Ht)**

Δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική συσχέτιση, $P = 0,1168$ ενώ ο συντελεστής συσχέτισης του Pearson είναι 0,30320.

8. **BCL 2 με αιμοπετάλια (PLT)** – Πίνακας 4.7:

	<i>διάμεση</i>	<i>ελάχιστη</i>	<i>μέγιστη</i>	
	<i>BCL 2</i>	<i>BCL 2</i>	<i>BCL 2</i>	<i>P</i>
				0,0118
<i>PLT ≥ 150.000</i>	52816,50	22558,00	106120,00	
<i>PLT < 150.000</i>	34617,00	22632,00	35481,00	

Πίνακας 4.7

Υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά για τα αιμοπετάλια (PLT) όπου το $P = 0,0118$.

ΠΕΜΠΤΗ ΕΝΟΤΗΤΑ

Στατιστική συσχέτιση της μεταβλητής **δραστηριότητα της τελομεράσης** με όλα τα κλινικοεργαστηριακά ευρήματα που μελετήθηκαν στους ασθενείς με Χ.Λ.Λ.

1. Τελομεράση και στάδια της νόσου κατά Rai (**R**) και Binet (**B**) – Πίνακας 5.1:

	<i>διάμεση</i>	<i>ελάχιστη</i>	<i>μέγιστη</i>	
	<i>τελομεράση</i>	<i>τελομεράση</i>	<i>τελομεράση</i>	<i>P</i>
<i>R</i> στάδια 0, I, II έναντι III, IV				
0, I, II	58,28	9,50	896,37	0,1866
III & IV	147,06	1,18	1115,69	
<i>B</i> στάδια A έναντι B, C				
A	54,86	9,50	249,76	0,1527
B & C	122,08	1,18	1115,69	

Πίνακας 5.1

Δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των σταδίων της νόσου, τόσο κατά Rai όσο και κατά Binet, αφού $P = 0,1866$ και $0,1527$ αντίστοιχα.

2. Τελομεράση και ομάδα ασθενών που υπεβλήθησαν ή όχι σε **θεραπεία** – Πίνακας 5.2:

	<i>διάμεση</i>	<i>ελάχιστη</i>	<i>μέγιστη</i>
	<i>τελομεράση</i>	<i>τελομεράση</i>	<i>τελομεράση</i>
<i>θεραπεία</i>			
Όχι	53,00	1,18	896,37
Ναι	166,82	29,78	1115,69

Πίνακας 5.2

Οι ασθενείς που ελάμβαναν θεραπεία και άρα είχαν πλέον προχωρημένη νόσο είχαν σημαντικά αυξημένη δραστηριότητα τελομεράσης $P=0,0003$

3. Τελομεράση και ένζυμο LDH – Πίνακας 5.3:

	<i>διάμεση</i>	<i>ελάχιστη</i>	<i>μέγιστη</i>
	<i>τελομεράση</i>	<i>τελομεράση</i>	<i>τελομεράση</i>
<i>LDH</i>			
<i>φυσιολογική</i>	66,80	1,18	1115,69
<i>παθολογική</i>	100,15	18,57	571,31

Πίνακας 5.3

Δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά, P = 0,8955

4. Τελομεράση και ηπατική βιοχημεία – Πίνακας 5.4:

	<i>διάμεση</i>	<i>ελάχιστη</i>	<i>μέγιστη</i>
	<i>τελομεράση</i>	<i>τελομεράση</i>	<i>τελομεράση</i>
<i>Ηπατική βιοχημεία</i>			
<i>φυσιολογική</i>	58,34	1,18	1115,69
<i>παθολογική</i>	122,52	15,92	571,31

Πίνακας 5.4

Δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά, P = 0,3926.

5. Τελομεράση και φύλο – Πίνακας 5.5:

	<i>διάμεση</i>	<i>ελάχιστη</i>	<i>μέγιστη</i>
	<i>τελομεράση</i>	<i>τελομεράση</i>	<i>τελομεράση</i>
<i>φύλο</i>			
<i>άρρεν</i>	103,27	1,18	896,37
<i>θήλυ</i>	72,59	9,50	1115,69

Πίνακας 5.5

Δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά, P = 0,9185,

6. Τελομεράση και Β-συμπτώματα (γενικά συμπτώματα) – Πίνακας 5.6:

	<i>διάμεση</i>	<i>ελάχιστη</i>	<i>μέγιστη</i>
	<i>τελομεράση</i>	<i>τελομεράση</i>	<i>τελομεράση</i>
<i>Β-συμπτώματα: Ναι, Όχι</i>			
<i>Όχι</i>	78,38	1,18	1115,69
<i>Ναι</i>	97,54	37,90	571,31

Πίνακας 5.6

Δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά, $P = 0,7315$.

7. Τελομεράση και ΗΤ

Δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική συσχέτιση, $P = 0,9683$ ενώ ο συντελεστής συσχέτισης του Pearson είναι 0,00640.

8. Τελομεράση και αιμοπετάλια – Πίνακας 5.7:

	<i>διάμεση</i>	<i>ελάχιστη</i>	<i>μέγιστη</i>	
	<i>τελομεράση</i>	<i>τελομεράση</i>	<i>τελομεράση</i>	<i>P</i>
				0,0397
<i>PLT ≥ 150.000</i>	63,23	9,50	896,37	
<i>PLT < 150.000</i>	147,50	18,57	1115,69	

Πίνακας 5.7

Στατιστικά σημαντική διαφορά **υπάρχει** για τα αιμοπετάλια **PLT** αλλά το $P = 0,0397$ είναι οριακό και δεν επιτρέπει να καταγράψουμε ασφαλή συμπεράσματα.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η διαλεύκανση μιας υπόθεσης «ζωής ή θανάτου» κέρδισε το ΝΟΜΠΕΛ Ιατρικής 2009. Η Elizabeth H. Blackburn, ο συνεργάτης της Jack W. Szostak και η πρώην μαθήτριά της Carol W. Greider, θα μοιραστούν το ένα εκατομμύριο Euro του βραβείου (ένθετο σελ. 117), για την ανακάλυψή τους αυτή, «πώς τα χρωμοσώματα προστατεύονται με τα τελομερίδια και το ένζυμο τελομεράση».

Τα ευρήματα των τριών επιστημόνων όχι μόνο έχουν φωτίσει τα ερευνητικά πεδία της γήρανσης, του καρκίνου και των στελεχιαίων πολυδύναμων κυττάρων, αλλά έχουν ανοίξει δρόμους για θεραπείες ασθενειών, οι οποίες προκύπτουν από τη δυσλειτουργία των τελομεριδίων και της τελομεράσης. Όταν ένα κύτταρο ετοιμάζεται να διαιρεθεί, είναι υψίστης σημασίας το DNA να μοιρασθεί εξ ίσου στα δύο θυγατρικά κύτταρα. Έτσι, το DNA που είναι διάχυτο, «πακετάρεται» σε χαρακτηριστικές δομές, που ονομάζονται χρωμοσώματα. Τα άκρα των χρωμοσωμάτων ονομάζονται τελομερίδια και βρίσκονται στα χρωμοσώματα όλων των φυτών και των ζώων.

Γνωρίζουμε επίσης ότι κάθε φορά που ένα κύτταρο διαιρείται, χάνεται ένα μέρος των τελομεριδίων του. Τα τελομερίδια, δηλαδή, γίνονται βραχύτερα σε κάθε διαίρεση. Όταν το μήκος τους φθάσει σε ένα ορισμένο σημείο, που πλέον δεν έχει περιθώριο περαιτέρω βράχυνσης, τότε τα κύτταρα οδηγούνται στον λεγόμενο κυτταρικό θάνατο. Για το λόγο αυτό τα τελομερίδια θεωρούνται «τα ρολόγια που μετρούν το χρόνο που απομένει σε κάθε κύτταρο».

Η σμίκρυνση, όμως, των τελομεριδίων σε κάθε κυτταρική διαίρεση δεν είναι πάντοτε μονόδρομος. Το τμήμα της χαρακτηριστικής επαναλαμβανόμενης αλληλουχίας που χάνεται μπορεί να επαναπροσθεθεί. Όπως ανακάλυψε η μία εκ των βραβευθέντων, Carol W. Greider, η διατήρηση του μήκους των τελομερών επιτυγχάνεται χάρη στη δράση ενός ενζύμου, της τελομεράσης.

Χάρη στις εργασίες της Greider αναγνωρίζουμε πλέον ότι η τελομεράση είναι παρούσα και ενεργεί στα κύτταρα εκείνα τα οποία πρέπει να διαιρεθούν πολλές φορές, και ειδικότερα τα καρκινικά και τα στελεχιαία πολυδύναμα κύτταρα. Τα πρώτα είναι διάσημα ακριβώς για την ικανότητά τους να διαιρούνται «επ' άπειρον» και έτσι να δημιουργούν τους καρκινικούς όγκους. Τα δεύτερα, δηλαδή τα στελεχιαία πολυδύναμα κύτταρα, αποτελούν

παρακαταθήκη κυττάρων από την οποία πραγματοποιείται η ανανέωση των ιστών και των οργάνων μας. Στα σωματικά κύτταρα επέρχεται σταδιακή μείωση της λειτουργικότητας της τελομεράσης και άρα περιορισμένη δυνατότητα περαιτέρω κυτταρικών διαιρέσεων, έτσι οδηγούνται στη γήρανση και τον θάνατο. Αντιθέτως, τα νεοπλασματικά κύτταρα αποκτούν δυνατότητα απεριόριστου αριθμού κυτταρικών διαιρέσεων, μέσω της διαρκούς λειτουργίας της τελομεράσης. Η δραστηριότητα του συγκεκριμένου ενζύμου αποτελεί κομβικό σημείο στη γένεση των νεοπλασιών και πιθανόν στο μέλλον η αναστολή της δράσης αυτού του ενζύμου να αποτελέσει θεραπευτικό στόχο.

Ο τρόπος κατά τον οποίο η σχέση τελομεράση – τελομερίδιο σχετίζεται με τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων ή το θάνατο αυτών, έχει σε μεγάλο βαθμό μελετηθεί και επαρκώς διαλευκανθεί από πολλές ερευνητικές ομάδες. Τα τελομερίδια προστατεύουν τα άκρα των χρωμοσωμάτων και μικραίνουν σε κάθε κυτταρικό κύκλο. Όμως υπάρχει μεγάλη διακύμανση όσον αφορά το μήκος τους (από 5 ως 15 kbp) ακόμα και στα φυσιολογικά άτομα. Διακύμανση επίσης του μήκους παρατηρείται και στα διάφορα όργανα και ιστούς (Samassekou et al 2010)³³⁹. Ο ρυθμός αναπαραγωγής των κυττάρων, το κυτταρικό περιβάλλον, καθώς και παράγοντες διαφοροποίησης (γενετικοί, περιβαλλοντικοί) είναι στοιχεία που επηρεάζουν την ετερογένεια των τελομεριδίων. Η κατανόηση του δυναμικού των τελομεριδίων στο φυσιολογικό πληθυσμό θα διαλευκάνει και το ρόλο τους στην παθογένεια των νοσημάτων.

Εξάλλου, η ομοιοστασία ενός πολυκύτταρου οργανισμού διατηρείται σε ισορροπία με τον αυστηρό έλεγχο δύο αντιρροπιστικών μηχανισμών: του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και του κυτταρικού θανάτου (Wyllie et al, 1980)³⁸⁴. Παρά το γεγονός ότι πολυάριθμοι ερευνητές έχουν μελετήσει το φαινόμενο του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, τα δεδομένα για τον κυτταρικό θάνατο είναι κάπως συγκεχυμένα, ακόμη και σήμερα, ωστόσο με αρκετά θετικές προσεγγίσεις.

Ο προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος, μέσω του οποίου ελέγχεται ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός του οργανισμού, ονομάζεται απόπτωση (Ormerod MG, 1998)³⁸⁵. Τα τελευταία χρόνια η διαταραχή του φυσικού μηχανισμού της απόπτωσης έχει συσχετιστεί με την παθογένεια πολλών νοσημάτων, όπως επί παραδείγματι των συμπαγών όγκων, των λευχαιμιών και των μυελοδυσπλαστικών συνδρόμων (Kay-Oliver K., 1999)³⁸⁶.

Έτσι, στην παρούσα εργασία, στόχος μας ήταν να αναδειχθεί αν και σε πιο βαθμό το μέσο μήκος των τελομεριδίων και η δραστηριότητα της τελομεράσης συμβάλλουν στην παθογένεια της Β-ΧΛΛ η οποία ως γνωστόν χαρακτηρίζεται από αυξημένη επιβίωση των λευχαιμικών κυττάρων αποδιδόμενη σε αναστολή της απόπτωσης στο μικροπεριβάλλον της νεοπλασίας. Σύμφωνα με τα αποτελέσματά μας:

1. Το μέσο μήκος τελομεριδίων (TRF) των ασθενών με Β-ΧΛΛ είναι σαφώς μικρότερο έναντι αυτού των υγιών μαρτύρων (P=0,0014).

Η εργασία μας έγινε σε κύτταρα του περιφερικού αίματος και συμφωνεί με άλλες αναλογίες που υπάρχουν στη βιβλιογραφία (297, 298, 313, 314, 315, 316, 317, 318, 319, 320, 321, 323, 324, 330, 339).

Ένα ερώτημα που απασχολεί είναι η συσχέτιση αυτού του ευρήματος με την πρόγνωση.

Επισημαίνεται ότι υπάρχει μεγάλη ετερογένεια της νόσου Β-ΧΛΛ.

Σε κάποιους ασθενείς η νόσος εξελίσσεται ραγδαία και καταλήγουν σε λίγους μήνες μετά τη διάγνωση ενώ άλλοι επιβιώνουν για αρκετά χρόνια, με ή χωρίς θεραπεία. Το μήκος των τελομεριδίων και η δραστηριότητα της τελομεράσης θα μπορούσαν να συσχετισθούν με την πρόγνωση της νόσου. Σύμφωνα με ορισμένες μελέτες, ασθενείς με μικρά τελομερίδια (μικρότερα του μέσου όρου) φαίνεται να έχουν χειρότερη πρόγνωση (Göran Roos et al)³³⁶ σε αντίθεση με τους ασθενείς με μεγαλύτερα τελομερίδια.

Ατυχώς, τη χρονική περίοδο εκπόνησης της διατριβής δεν υπήρχαν στη διάθεσή μας προγνωστικοί δείκτες που με βάση τα νεότερα δεδομένα είναι σημαντικοί, όπως μεταλλάξεις του γονιδίου των ανοσοσφαιρινών, ή η έκφραση των δεικτών CD38 και ZAP-70 που σε νεότερες μελέτες συσχετίζονται με τη δραστηριότητα της τελομεράσης και το μήκος των τελομεριδίων (TRF). Παρά ταύτα, δεν βρέθηκαν σημαντικές συσχετίσεις με τα κλινικά στάδια Rai και Binet.

Στη Β-ΧΛΛ. Τα μικρά τελομερίδια συνδέονται με μικρό χρόνο επιβίωσης και κακή πρόγνωση (333, 334, 336, 337, 338, 340, 341, 343,344, 349). Τα μικρά τελομερίδια σχετίζονται με γενετική αστάθεια και χρωμοσωμικές ανωμαλίες (π.χ. del 13q, del 11q κλπ.), κάτι πολύ σύνηθες στη Β-ΧΛΛ σε ποσοστό 80% των περιπτώσεων.

Το σωματικό κύτταρο με κάθε διαίρεση οδηγεί σε μείωση του μέσου μήκους των τελομεριδίων, το οποίο όταν φθάσει σε ένα κρίσιμο σημείο το κύτταρο πεθαίνει. Αν αυτό το κρίσιμο σημείο ξεπεραστεί (π.χ. με αδρανοποίηση P53 + Rb1) το κύτταρο συνεχίζει να διαι-

ρείται μέχρι να φθάσει σ' ένα δεύτερο κρίσιμο σημείο αναπαραγωγής, τη λεγόμενη «κρίση» (crisis) (Thet Thet Lin et al 2010)³⁴¹. Αυτή η κατάσταση (crisis) είναι συνδεδεμένη με πολλές γενετικές ανωμαλίες, χρωμοσωμιακή αστάθεια, μεγάλη τάση για απόπτωση και κακοήθη εξαλλαγή.

Ο Pawel Grabowski 2011³³⁸ (σελ. 40) μελέτησε τη σχέση του μεγέθους των τελομεριδίων στη Β-ΧΛΛ με τους υψηλούς παράγοντες κινδύνου της νόσου, όπως τα στάδια Β, C κατά Binet, το CD38, το ZAP 70, τα μη μεταλλαγμένα IGHV γονίδια και τις χρωμοσωμικές ανωμαλίες. Κατέληξε ότι υπάρχουν μεγάλες διαφορές στα μήκη των τελομεριδίων στις διάφορες περιπτώσεις, κάτι που χρήζει μεγαλύτερης προσοχής και ανάλυσης.

Ασθενείς στο στάδιο Binet A έχουν μεγαλύτερα τελομερίδια απ' ό,τι στο στάδιο Binet B, C. Στην ίδια μελέτη η ΧΛΛ πλέον διακρίνεται σε δύο μεγάλες ομάδες με βάση την ύπαρξη ή όχι μετάλλαξης στο γονίδιο IGHV (variable regions of immunoglobulin heavy-chain gene), με καλύτερη πρόγνωση της ομάδας με μετάλλαξη IGHV και μεγαλύτερα τελομερίδια, ενώ η ομάδα χωρίς μετάλλαξη IGHV έχει μικρότερα τελομερίδια και χειρότερη πρόγνωση^(337, 338, 354, 355, 356, 358, 376).

Μια άλλη εργασία, (Ladetto M. et al 2004)³⁴⁰ έδειξε ότι το μέγεθος των τελομεριδίων στη ΧΛΛ έχει σχέση με το αν τα νεοπλασματικά κύτταρα προέρχονται από τα βλαστικά κέντρα ή όχι. Όπως όμως έδειξε το 2011 ο Pawel Grabowski (διδακτορική διατριβή) η κυτταρική προέλευση δεν είναι εύκολο να προσδιοριστεί ξεκάθαρα σ' όλες τις περιπτώσεις ΧΛΛ.

Κατά την καρκινογένεση το μήκος των τελομεριδίων συνεχώς μειώνεται, μέχρι τη στιγμή που η τελομεράση θα επιτρέψει την απροσδιόριστη – αυξημένη αναπαραγωγή των τελομεριδίων. Αυτή η καθυστερημένη ενεργοποίηση της τελομεράσης είναι καθοριστική για τον καρκίνο. Έτσι εξηγείται γιατί σε κάποιους ασθενείς με ΧΛΛ τα τελομερίδια είναι μικρά σε σχέση με την υψηλή δραστηριότητα της τελομεράσης.

Οι Thet Thet Lin et al 2010³⁴¹ απομόνωσαν το μικρότερο τελομερίδιο που βρέθηκε ποτέ σε ανθρώπινο ιστό, σε άτομα με ΧΛΛ, πράγμα που ενισχύει την άποψη ότι υπάρχει σημαντική κυτταρική διαίρεση στη ΧΛΛ. Η συχνότητα των μικρών τελομεριδίων αυξάνει με την εξέλιξη της νόσου, όμως βρέθηκαν μικρά τελομερίδια και σε ασθενείς στα πρώιμα στάδια, πράγμα που μπορεί να προβλέψει την πρόγνωση της νόσου.

Οι Adeline Angereau et al 2011³⁴² μελέτησαν υγιείς μάρτυρες και ασθενείς σταδίου Binet A (δηλαδή αρχικού σταδίου) και βρήκαν δυσλειτουργία των τελομεριδίων στα αρχικά στάδια της νόσου, με μικρά τελομερίδια που συνδέονται με καταστολή των γονιδίων της πρωτεΐνης Shelterin (η πρωτεΐνη Shelterin προστατεύει τα τελομερίδια). Αυτό μας δείχνει ότι ακόμα τα αίτια και οι συνέπειες της μείωσης των τελομεριδίων είναι προς διερεύνηση, διαδικασία που θεωρείται ακόμη πιο σημαντική για την πρόγνωση απ' ό,τι οι μεταλλάξεις του γονιδίου IGHV ή η ύπαρξη τελομεράσης, αφού και η απουσία τελομεράσης μπορεί να οδηγήσει σε καρκινογένεση, (Marco Ladetto 2010³⁶²).

2. Η δραστηριότητα της τελομεράσης στους ασθενείς είναι μεγαλύτερη σε σχέση με τους υγιείς μάρτυρες (P = 0,0041).

Το εύρημα αυτό συμφωνεί με τη διεθνή βιβλιογραφία (Stewart S.A. et al 2000³⁵⁰, Ohvas-hiki I.H., Sanhida G. et al 2002³⁵¹, Deville I., Hillion I. et al 2009³⁵²).

Το 1998 οι Oliver E. Bechter et al³⁴³ βρήκαν ότι ασθενείς με ΧΛΛ και μικρά τελομερίδια (< 6kb) έχουν μεγάλη έκφραση τελομεράσης, ενώ παρόμοιοι ασθενείς με μεγαλύτερα τελομερίδια (> 6kb) έχουν χαμηλή δραστηριότητα του ενζύμου. Στην πρώτη περίπτωση έχουμε και βραχύτερη επιβίωση, όπως δείχνουν πολλές εργασίες (Grabowski P. et al 2005³⁵³, Ricca I., Rocci A. et al 2007³⁵⁴, Roos G., Krober A. et al 2008³⁵⁵, Hultdin M., Rosenquist R. et al³⁵⁶, Tchirkov A. et al 2004³⁵⁷, Terrin L., Trentine L. et al³⁵⁸, Enrica Rampazzo et al 2012³⁴⁴).

Οι Christofer M. et al 1995³⁴⁵ απέδειξαν ότι στα αρχικά στάδια της ΧΛΛ η δραστηριότητα της τελομεράσης ήταν μικρότερη από τη δραστηριότητα της τελομεράσης στους μάρτυρες, ενώ στα προχωρημένα στάδια της νόσου ήταν μεγαλύτερη από αυτήν των μαρτύρων. Η μελέτη αφορούσε κύτταρα περιφερικού αίματος. Όσο προχωρά η νόσος το μικρό μήκος των τελομεριδίων δεν είναι ανάλογο της μεγάλης δραστηριότητας της τελομεράσης. Αυτό, σύμφωνα με τους συγγραφείς, εξηγείται από το γεγονός ότι τα κύτταρα της ΧΛΛ στα αρχικά στάδια (I, II Rai) στερούνται κάποιου μηχανισμού διατήρησης του μήκους των τελομεριδίων (7, 9 kbp) και η τελομεράση ενεργοποιείται αργά όταν πλέον η νόσος έχει προχωρήσει στάδια (III, IV Rai) δηλαδή τη στιγμή που το κρίσιμο (κρίση – crisis) χάσιμο των τελομεριδίων, πιέζει για την επιβίωση των κυττάρων.

Η ΧΛΛ αρχικά χαρακτηρίζεται από μια αργή συσσώρευση ώριμων Β-λεμφοκυττάρων, των οποίων η αριθμός διπλασιάζεται ακόμα και σε πέντε χρόνια. Η νόσος γίνεται σταδιακά επιθετική και σπάνια μπορεί να εκτραπεί (σύνδρομο Richter).

Οι Dominique Broccoli et al 1995³⁴⁶ μελέτησαν την τελομεράση υγιών και ασθενών με ΧΛΛ στον μυελό και στο περιφερικό αίμα. Τα αποτελέσματα στο περιφερικό αίμα ήταν παρόμοια με τις προαναφερθείσες εργασίες, όπως και με τη δική μας, ενώ για τον μυελό κατέληξαν ότι δεν βρήκαν μεγαλύτερη δραστηριότητα τελομεράσης στη ΧΛΛ σε σχέση με τους μάρτυρες.

Στο ίδιο συμπέρασμα για τον μυελό κατέληξαν το 2004 οι Verstovsek S. et al³³⁴.

Οι Livio Trentin et al 1999³⁴⁷ μελέτησαν τη δραστηριότητα της τελομεράσης στο περιφερικό αίμα σε ασθενείς με ΧΛΛ και σε υγιείς μάρτυρες. Τα αποτελέσματά τους συμφωνούν με αυτά της δικής μας εργασίας.

3. Μέσο μήκος τελομεριδίων (TRF) και δραστηριότητα της τελομεράσης.

Διαπιστώσαμε στους μελετηθέντες ασθενείς και μάρτυρες ότι το TRF είναι ευθέως ανάλογο με την δραστηριότητα της τελομεράσης ($P = 0,0149$). Αυτό ισχύει στα φυσιολογικά κύτταρα, όπως αναφέρεται στη βιβλιογραφία (Dominique Broccoli et al 1995³⁴⁶, Christopher M. Counter et al 1995³⁴⁵, Yasumoto S. et al 1996³⁴⁸). Υπάρχει γενικά αρκετή ετερογένεια στη βιβλιογραφία σχετικά με τη συσχέτιση αυτή η οποία μπορεί να οφείλεται σε διαφορετικές μεθοδολογίες, διαφορετικό υλικό μελέτης (μυελός ή περιφερικό αίμα) και διαφορετικούς πληθυσμούς ασθενών.

Όσον αφορά ασθενείς με ΧΛΛ, οι O.E. Bechter, Weisterer G. et al 1998³⁴⁹ απέδειξαν ότι ασθενείς με τελομερίδια $< 6\text{kb}$ είχαν υψηλή δραστηριότητα τελομεράσης, ενώ ασθενείς με τελομερίδια $> 6\text{kb}$ είχαν χαμηλή δραστηριότητα τελομεράσης.

Ασθενείς στο στάδιο Binet A είχαν μεγαλύτερα τελομερίδια και μικρότερη δραστηριότητα τελομεράσης απ' ό,τι ασθενείς σταδίου Binet B, C, όπου είχαν μικρότερα τελομερίδια και μεγαλύτερη δραστηριότητα τελομεράσης. Μικρά τελομερίδια και υψηλή δραστηριότητα τελομεράσης συνδέονται με χαμηλή επιβίωση. Ωστόσο, η δραστηριότητα της τελομεράσης στη συγκεκριμένη εργασία θεωρείται ο σημαντικότερος προγνωστικός παράγων της Β-ΧΛΛ. Άρα, εδώ βλέπουμε ότι στη ΧΛΛ δεν είναι πάντοτε ευθέως ανάλογα η δραστη-

ριότητα της τελομεράσης και το μήκος των τελομεριδίων. Στο ίδιο συμπέρασμα κατέληξαν και οι Christofer M. et al 1995³⁴⁵ που μελέτησαν κύτταρα περιφερικού αίματος.

Οι Thet Lin et al 2010³⁴¹ απέδειξαν ότι δεν υπάρχει σημαντική συσχέτιση μεταξύ τελομεράσης και μήκους τελομεριδίων, γιατί παρ' ό,τι υπάρχει στα κύτταρα της Β-ΧΛΛ δραστηριότητα της τελομεράσης είναι όμως χαμηλή και δεν προφυλάσσει επαρκώς το ρυθμό μείωσης του μήκους των τελομεριδίων, απλά μπορεί να επιβραδύνει το ρυθμό της.

Έτσι η τελομεράση δεν μπορεί να συνδεθεί με προγνωστικούς παράγοντες, σε αντίθεση με τα τελομερίδια, που η δυναμική τους μπορεί να αποτελέσει χρήσιμο δείκτη πρόγνωσης.

Παρόλα αυτά δεν μπορούμε να χρησιμοποιήσουμε το TRF για να υπολογίσουμε τον ρυθμό των κυτταρικών διαιρέσεων στους ασθενείς με ΧΛΛ. Αυτό επιβεβαιώνεται από το γεγονός ότι ασθενείς με σταθερό αριθμό λεμφοκυττάρων παρουσιάζουν μεγάλο αριθμό κυτταρικών διαιρέσεων, που αντισταθμίζεται με τον μεγάλο αριθμό κυτταρικών θανάτων και κατά συνέπεια με μεγάλο ρυθμό μείωσης των τελομεριδίων.

Οι ίδιοι συγγραφείς απέδειξαν ότι αυτό μπορεί να συμβεί και στα αρχικά στάδια της νόσου, υπογραμμίζοντας έτσι τη μεγάλη ετερογένεια της νόσου.

Οι Rarendra N. Damle et al 2004³⁵⁹ συνδύασαν για πρώτη φορά το συνδυασμό μήκους τελομεριδίων και δραστηριότητας τελομεράσης με τις μεταλλάξεις του γονιδίου της μεταβλητής περιοχής της βαριάς αλυσίδας των ανοσοσφαιρινών (IVGH). Τα λευχαιμικά κύτταρα συσσωρεύονται με διαφορετικούς ρυθμούς και το μικρό μήκος των τελομεριδίων στους ασθενείς σε σχέση με τους μάρτυρες δείχνει τη μακρά ιστορία του πολλαπλασιασμού τους. Όμως τα λευχαιμικά κύτταρα ατόμων με μετάλλαξη στο IVGH γονίδιο διαφέρουν στο μήκος των τελομεριδίων και την δραστηριότητα της τελομεράσης.

Έτσι, ασθενείς με μικρά τελομερίδια και μεγάλη δραστηριότητα τελομεράσης δεν παρουσιάζουν μεταλλάξεις στο IVGH γονίδιο και έχουν χειρότερη πρόγνωση, σε αντίθεση με τους ασθενείς που έχουν μεταλλάξεις και καλύτερη πρόγνωση. Οι συγγραφείς καταλήγουν στο συμπέρασμα ότι η ΧΛΛ δεν είναι απλά μια νόσος που χαρακτηρίζεται από συσσώρευση λεμφοκυττάρων που διαιρούνται αργά, αλλά πιθανώς είναι νόσος των Β-λεμφοκυττάρων, με εκτενή πολλαπλασιαστική ιστορία.

Οι Eurica Rampazzo et al 2012³⁴⁴ επίσης μελέτησαν το προφίλ «μήκος τελομεριδίων / δραστηριότητα της τελομεράσης» σε σχέση με τις μεταλλάξεις του γονιδίου IGVH και κατέληξαν στα ίδια συμπεράσματα με τους προηγούμενους³⁵⁹.

Επίσης μελέτησαν και περιπτώσεις με άλλες μεταλλάξεις (11q, 17q, ελλείμματα, τρισωμία 12) και βρήκαν ότι ασθενείς με Β-ΧΛΛ και αυτές τις χρωμοσωμικές ανωμαλίες έχουν μικρότερα τελομερίδια, αυξημένη δραστηριότητα της τελομεράσης και χειρότερη πρόγνωση.

Οι Delphine Poncet et al 2008³⁶⁰ για πρώτη φορά απέδειξαν ότι το μήκος των τελομεριδίων και η δραστηριότητα της τελομεράσης στους ασθενείς με ΧΛΛ επηρεάζεται και από άλλες πρωτεΐνες που συνθέτουν το σύμπλεγμα της τελομεράσης (hTERT, Shelterin Proteins) ή ρυθμίζουν τα γονίδια των τελομεριδίων (Hestia, mre11, rad50).

Τη σχέση τελομεριδίων – τελομεράσης – μεταλλάξεων IGVH μελέτησαν επίσης οι Ludger S. et al 2011³⁶¹ και κατέληξαν επίσης στο ίδιο συμπέρασμα, ότι δηλαδή μικρά τελομερίδια χωρίς μεταλλάξεις IGHV γονιδίων συναντώνται σε ασθενείς με κακή πρόγνωση. Οι ασθενείς με μεταλλάξεις IGHV είχαν μεγαλύτερα τελομερίδια και καλύτερη πρόγνωση. Οι συγγραφείς θεωρούν ότι η συσχέτιση επιπέδου μεταλλάξεων με το μήκος τελομεριδίων στη ΧΛΛ ίσως αντικατοπτρίζει το αρχικό μήκος των τελομεριδίων, με το οποίο ξεκίνησε η νόσος (Β-κύτταρα προ ή μετά το βλαστικό κέντρο). Πάντως, συμφωνούν ότι το μήκος των τελομεριδίων είναι σημαντικός προγνωστικός παράγων για τη ΧΛΛ.

4. Η σχέση μήκους τελομεριδίων και πρωτεΐνης BCL-2.

Τα δικά μας πειράματα δεν απέδειξαν ότι υπάρχει συσχέτιση των δύο παραμέτρων. Υψηλά επίπεδα BCL-2 πρωτεΐνης προστατεύει τα κύτταρα από την απόπτωση, αναστέλλοντας τη διέγερση των κασπασίων. Άρα η καρκινογένεση με την αύξηση της BCL-2 γίνεται μέσω αναστολής του κυτταρικού θανάτου και όχι μέσω ηυξημένου ρυθμού πολλαπλασιασμού.

Στη ΧΛΛ η υπερέκφραση της bcl2 σχετίζεται με υπομεθλίωση του υποκινητή της bcl2, που οδηγεί σε αυξημένη μεταγραφή του bcl2 γονιδίου και αυξημένη έκφραση bcl2 πρωτεΐνης³⁸⁷.

Οι Mahitos Mandal & Rakesh Kumar 1997³⁶³ απέδειξαν ότι υπάρχει συσχέτιση της BCL-2 και τελομεράσης στον καρκίνο γενικά, όχι συγκεκριμένα στη ΧΛΛ. Δεν υπάρχουν στη βιβλιογραφία μελέτες που να συγκρίνουν το μήκος των τελομεριδίων με την πρωτεΐνη BCL-2, όπως το επιχείρησα στην εργασία μου. Οι περισσότερες μελέτες επικεντρώνονται

στην ιδέα κατά πόσο η αναστολή της BCl-2 μπορεί να αποτελέσει θεραπευτικό στόχο στη Β-ΧΛΛ (Schimmer A.D. et al 2003³⁶⁴, Chaya Venkat, Targeting Bcl-2³⁶⁵, date Nov 2, 2005, Campas C et al 2006³⁶⁶, Crabotar et al 2008³⁶⁷, Andrea G.S. et al 2010³⁶⁸, Royalinska M. et al 2012³⁶⁹).

5. Μήκος τελομεριδίων και απόπτωση.

Στην εργασία μας δεν διαπιστώθηκε συσχέτιση του μήκους των τελομεριδίων με τον βαθμό της απόπτωσης. Αυτό υποδηλώνει ότι η αναστολή της απόπτωσης δεν σχετίζεται με τη δραστηριότητα της τελομεράσης, αλλά με αντιαποπτωτικά σήματα που προέρχονται από το μικροπεριβάλλον του μυελού. Με το συμπέρασμα αυτό συμφωνούν και οι Lagneaux L. et al 1999³⁷⁰, όπου απέδειξαν ότι η επαφή με τα κύτταρα του μυελού μειώνει την απόπτωση των κυττάρων στη Β-ΧΛΛ και ευοδώνει την έκφραση της BCl-2.

Η σύνδεση των Β-ΧΛΛ κυττάρων με τα κύτταρα του μυελού απαιτεί ταυτόχρονη δράση των B₁ και B₂ ιντεγκρινών. Οι συγγραφείς καταλήγουν ότι η αλληλεπίδραση των Β-ΧΛΛ κυττάρων με άλλα κύτταρα είναι σημαντική για την επιβίωσή τους και αντιπροσωπεύει έναν σημαντικό μηχανισμό συσσώρευσης νεοπλασματικών κυττάρων στη Β-ΧΛΛ. Επίσης, στο ίδιο συμπέρασμα κατέληξαν και οι Yair Herishanu et al 2011³⁷¹. Το μικροπεριβάλλον των λεμφαδένων ευνοεί την εξέλιξη της ΧΛΛ με το να διεγείρει τον υποδοχέα των Β-κυττάρων. Επίσης οι Alex Paterson et al 2012³⁷² έδειξαν ότι αντιγονικά ερεθίσματα σε συνδυασμό με αντιαποπτωτικά μηνύματα του μυελού ευνοούν τη φωσφορυλίωση του ενζύμου BIM (αποπτωτικό μόριο συνδεδεμένο με την BCl-2).

6. Η μεταβλητή BCl-2 σε σχέση με την απόπτωση σε ασθενείς και μάρτυρες.

Τα αποτελέσματα αποδεικνύουν ότι στη ΧΛΛ έχουμε αναστολή της απόπτωσης που οφείλεται ακριβώς στην ηυξημένη έκφραση της BCl-2. Είναι δε σύμφωνο αυτό με τα βιβλιογραφικά δεδομένα, αφού είναι γνωστό ότι στη ΧΛΛ υπάρχει αυξημένη έκφραση BCl-2 πρωτεΐνης^{363, 364, 365, 366, 367, 368, 369}.

7. Τα στάδια Rai και Binet σε σχέση με την BCl-2.

Δεν βρέθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση των σταδίων Rai και Binet με την BCl-2. Στο ίδιο συμπέρασμα καταλήγουν και οι Shinichi Kitada et al 1998³⁷³.

8. Σχέση BCl-2 ασθενών με ή χωρίς θεραπεία.

Στην εργασία μας οι ασθενείς που δεν ελάμβαναν θεραπεία και άρα είχαν ηπιότερη νόσο, είχαν σαφώς μεγαλύτερη bcl-2 έναντι των θεραπευθέντων, υποδηλώνοντας είτε ότι η αναστολή της απόπτωσης μέσω της αυξημένης έκφρασης bcl-2 αποτελεί μηχανισμό που δραματίζει σημαντικό ρόλο στα αρχικά στάδια, είτε ότι η θεραπεία έχει ως αποτέλεσμα την αναστολή της έκφρασης της bcl-2. Είναι δε σε απόλυτη συμφωνία με τη βιβλιογραφία (364, 365, 366, 367, 368, 369).

9. Συσχέτιση τελομεράσης και σταδίων κατά Rai και Binet.

Δεν βρέθηκε στη δική μας εργασία στατιστικώς σημαντική διαφορά στην έκφραση της τελομεράσης στα αρχικά και προχωρημένα στάδια της νόσου. Δεν συμφωνούν με την άποψη αυτή οι Oliver E. Bechter et al 1998³⁴³, που υποστηρίζουν ότι στο στάδιο Binet A η δραστηριότητα της τελομεράσης είναι μικρότερη σε σχέση με αυτήν στα στάδια B, C.

Αυτό ίσως να οφείλεται στο μεγαλύτερο αριθμό περιστατικών που είχαν στη διάθεσή τους. Οι Pawel Grabowski et al 2005³⁵³ απέδειξαν ότι το μήκος των τελομεριδίων είναι προγνωστικός παράγοντας στα στάδια Binet A και B, C. Όμως οι Thet Thet Lin et al 2010³⁴¹ ισχυρίζονται ότι οι ασθενείς σταδίου A και C έχουν παρόμοιο μεγάλο μήκος τελομεριδίων έναντι αυτών του σταδίου B, που έχουν ενδιάμεσο μήκος τελομεριδίων. Ενδεχομένως αυτό, όπως υποστηρίζουν οι ερευνητές, συμβαίνει επειδή συμβάλλουν και άλλοι προγνωστικοί παράγοντες, που παίζουν ρόλο, όπως Zap-70, VH gene μετάλλαξη και CD38, παράμετροι που στην δική μας μελέτη δεν έχουν περιληφθεί.

10. Τελομεράση και ομάδες ασθενών που υποβλήθηκαν ή όχι σε θεραπευτική αγωγή.

Στα πειράματά μας βρέθηκε αυξημένη δραστηριότητα της τελομεράσης στους ασθενείς που λόγω της βαρύτητας έλαβαν θεραπεία.

Στη βιβλιογραφία βρίσκουμε εργασίες που καταλήγουν ότι η τελομεράση είναι σημαντικός προγνωστικός παράγοντας της νόσου και συνεπώς η θεραπεία θα μπορούσε να στοχεύει στην αναστολή της δράσης της τελομεράσης.

Οι Oliver E Bechter 1998³⁴³ απέδειξαν ότι η τελομεράση είναι ο κύριος προγνωστικός παράγων για την επιβίωση στη ΧΛΛ. Οι Ludger S. et al 2011³⁶¹ έδειξαν ότι οι αναστολείς της τελομεράσης θα μπορούσαν να αποτελούν θεραπευτικό στόχο.

Οι Thet Thet Lin 2010³⁴¹ απέδειξαν ότι δεν υπάρχει συσχέτιση μεταξύ μήκους τελομεριδίων σε ασθενείς που πήραν θεραπεία και σε ασθενείς χωρίς θεραπεία. Όμως, οι ίδιοι βρήκαν σημαντική συσχέτιση του μήκους των τελομεριδίων με άλλους προγνωστικούς παράγοντες, όπως πρωτεΐνη Zap-70, τη μετάλλαξη IGVH και το μόριο CD38. Αυτούς τους προγνωστικούς παράγοντες τη χρονική περίοδο εκπόνησης της διατριβής δεν είχαμε στη διάθεσή μας και με βάση τα νεότερα δεδομένα είναι σημαντικοί.

Όσον αφορά την παρουσία μεταλλάξεων στο IGVH γονίδιο εμφανίζεται σε ασθενείς με αυξημένα επίπεδα τελομεράσης, μικρά τελομερίδια και κακή πρόγνωση. Με αυτό συμφωνούν πολλοί ερευνητές³⁵⁹ (Dawle R.N. et al 2004³⁷⁴, Hultdin M. et al 2003³⁵⁶, Ricca I., Ruccia et al 2007³⁷⁵, Rajendra N. Damle 2012³⁷⁶, Pawel Grabowski 2005³³⁷, Yuri Vasconcelos et al 2003³⁷⁷).

Συμπερασματικά, η εργασία αυτή ανέδειξε ότι τα τελομερίδια ασθενών με Β-ΧΛΛ είναι μικρότερα και η δραστηριότητα της τελομεράσης είναι μεγαλύτερη σε σχέση με τους υγιείς μάρτυρες. Δε συσχετίζονται οι παράμετροι αυτές με τα κλινικά στάδια κατά Rai και Binet. Παρά ταύτα, μεταγενέστερες μελέτες που ακολούθησαν ανέδειξαν τη σημαντική συσχέτιση των βραχέων τελομεριδίων και της υψηλής τελομεράσης με γνωστούς προγνωστικούς παράγοντες της νόσου, όπως είναι η αυξημένη CD38, ο αυξημένος παράγων Zap70 και η έλλειψη μεταλλάξεων του γονιδίου IGHV^(377, 378, 379, 380, 381, 382), που σχετίζονται με πτωχή πρόγνωση. Οι παράμετροι αυτές δεν περιελήφθησαν στην εργασία γιατί δεν ήταν γνωστός ο προγνωστικός τους ρόλος. Παρά ταύτα, η εργασία μας ήταν η πρώτη στη βιβλιογραφία, η οποία ανέδειξε τη συμμετοχή των τελομεριδίων και της τελομεράσης στην παθογένεια της νόσου.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η σταδιακή αύξηση των λευχαιμικών κυττάρων στη Β-ΧΛΛ δεν είναι προϊόν αυξημένου ρυθμού πολλαπλασιασμού, αλλά είναι κυρίως αποτέλεσμα της μακράς επιβίωσης αυτών, που οφείλεται στην αναστολή της φυσιολογικής διαδικασίας της απόπτωσης ή, όπως λέγεται, Προγραμματισμένος Κυτταρικός Θάνατος (ΠΚΘ).

Η αναστολή της απόπτωσης δεν αποτελεί αυτόνομη ιδιότητα του λευχαιμικού κυττάρου, αλλά πιθανό να οφείλεται και στην συνεπικουρική δράση κυττάρων του μικροπεριβάλλοντος και των εξ αυτών παραγομένων κυτοκινών. Κυρίως, όμως, η απόπτωση (Π.Κ.Θ.) ρυθμίζεται από παράγοντες γνωστούς και αρκετά μελετημένους από διάφορες ερευνητικές ομάδες, όπως:

α. Η οικογένεια των μορίων Bcl-2 αποτελείται από πρωτεΐνες των οποίων η κύρια λειτουργία τους είναι η ρύθμιση της απόπτωσης και μάλιστα με έντονη αντι-αποπτωτική δράση.

Στην έρευνά μας διαπιστώθηκε σημαντικά μεγαλύτερη έκφραση bcl2 και μικρότερη όψιμη απόπτωση στους ασθενείς με Β-ΧΛΛ σε σχέση με τους υγιείς μάρτυρες $p=0.0002$ και $p=0.0003$ αντίστοιχα ενώ για την πρόιμη απόπτωση δεν βρέθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά $p = 0.1298$.

β. Πρόσφατα τα τελομερίδια και η τελομεράση, η οποία υπερ-εκφράζεται στα λευχαιμικά κύτταρα, έχουν εμπλακεί για τους ρόλους τους στη ρύθμιση της διάρκειας ζωής, της αναπαραγωγής και του Προγραμματισμένου Κυτταρικού Θανάτου. Η τελομεράση αποκαθιστά το μήκος των τελομεριδίων που χάνεται σε κάθε κυτταρική διαίρεση και έτσι τα κύτταρα αποκτούν απεριόριστη ικανότητα κυτταρικών διαιρέσεων, όπως συμβαίνει στις νεοπλασίες, που είναι και η Β-ΧΛΛ.

Στη δική μας εργασία το μέσο μήκος τελομεριδίων ασθενών πασχόντων από Β-ΧΛΛ ήταν σημαντικά μικρότερο σε σχέση με τους υγιείς μάρτυρες ($P=0.0014$).

Η δραστηριότητα της τελομεράσης ήταν σημαντικά μεγαλύτερη στους ασθενείς σε σχέση με τους μάρτυρες ($P=0.0041$).

Στους πάσχοντες από Β-ΧΛΛ η λειτουργία της τελομεράσης είναι εντονότατη, για να διατηρείται έτσι το μήκος των τελομεριδίων, που χάνεται σε κάθε κυτταρική διαίρεση, το κύτταρο να μην οδηγείται στο θάνατο, ώστε να αυξάνεται ο αριθμός των λευχαιμικών κυττάρων. Δεν διαπιστώθηκε συσχέτιση μεταξύ μήκους τελομεριδίων και τελομεράσης με τα στάδια της νόσου κατά Rai και Binet και μεταξύ του βαθμού απόπτωσης και δραστηριότητας τελομεράσης υποδηλώνοντας ότι άλλοι μηχανισμοί πιθανότατα προερχόμενοι από το μικροπεριβάλλον του νεοπλάσματος ευθύνονται για την αναστολή της απόπτωσης *in vivo*.

★ ★ ★

SUMMARY

The gradual growth of leukemic cells in B- CLL is not a result of increased proliferation rate , but it is mainly a result of extended survival due to inhibition of the normal process of apoptosis or in other words Programmed Cell Death (PCD) .

The inhibition of apoptosis is not an independent property of the leukemic cell, but is mostly associated with the support by the adjacent cells and the cytokines produced by them. The apoptotic process has been studied by several research groups:

A. The family of Bcl-2 molecules consisting of proteins whose primary function is the regulation of apoptosis and with strong anti- apoptotic activity .

In our work we found a statistically significant increase of bcl2 value and decrease late apoptosis in patients with B-CLL compared to healthy controls, ($p = 0.0002$ and $p=0.0003$ respectively), while for early apoptosis no significant difference was found ($p = 0.1298$).

B. Recently the telomere and telomerase , which is overexpressed in the leukemic cells, are found to be involved in lifespan regulation, proliferation and programmed cell death. Telomerase restores the telomeres length which is lost at each cell division, so the cells acquire unlimited capacity to cell divisions, as in tumors, which is the case of B- CLL.

In our work the average telomere length was Significantly lower in patients with B-CLL compared to normal controls ($P = 0.0014$) .

The activity of telomerase was significantly higher in patients with B-CLL versus normal controls ($P = 0.0041$) .

In patients with B-CLL, the function of telomerase is elevated, in order to maintain the length of telomeres - which would be lost in each cell division – so that the cell can survive and escape apoptotic signals. No relation was found between the mean telomere length and telomerase activity and Rai or Binet stage of the disease. Moreover no relation was found between telomerase activity and apoptotic rate suggesting that other mechanisms in vivo probably derived from the microenvironment are responsible for the antiapoptotic process in this disease.

4. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Abbas, A.K., Lichtman, A.H., Pober, J.S., B-cell Activation and Antibody Production in Cellular and Molecular Immunology, *Saunders*, 2000; p182
2. Abbas, A.K., Lichtman, A.H., Pober J.S., Cytokines in Cellular and Molecular Immunology, *Saunders*, 2000; p235
3. Adami, F., Guarini, A., Pini, M., Serum Levels of Tumor-necrosis Factor-alpha in patients with B-cell Chronic Lymphocytic Leukemia, *Eur J. Cancer*, 1994; 30: 1259
4. Aksoy, M., Benzene Hematotoxicity. Benzene Carcinogenicity, *CRC Press*, 1988; p59
5. Alvarez de Mon, M., Casas, J., Laguna, R., et al, Lymphokine Induction of NK-like Cytotoxicity in T-cells from B-CLL, *Blood*, 1986; 67: 228
6. Angelopoulou, M.K., Siakantaris, M.P., Kourtis, I., et al, Tonsillar Involvement in Rai O B-chronic Lymphocytic Leukemia B-CLL) patients. A Histologic, Immunophenotypic and Adhesion Molecule Study, *Blood*, 1995; 89: 828a
7. Angelopoulou, M.K., Kontopidou, F.N., Pangalis, G.A., Adhesion Molecules in B-chronic Lymphoproliferative Disorders, *Semin Hematol*, 1999; 36: 178
8. Angelopoulou, M.K., Poziopoulos, C., Boussiotis, V.A., et al, Fludarabine Monophosphate in Refractory B-chronic Lymphocytic Leukemia: Maintenance may be Significant to sustain Response, *Leuk Lymphoma*, 1996; 21:321
9. Autio, K., Elonen, E., Teerenhovi, L., et al, Cytogenetic and Immunologic characterization of Mitotic Cells in Chronic Lymphocytic Leukemia, *Eur J. Haematol*, 1986; 39: 289
10. Bartik, M.M., Welker, D., Kay, N.E., Impairments in Immune Cell Function in B-cell Chronic Lymphocytic Leukemia, *Semin Oncol*, 1998; 25: 27
11. Battle, M., Ribera J.M., Plensa, E., et al, Successful Response to Rituximab in a patient with Pure Red Cell Aplasia complicating Chronic Lymphocytic Leukemia, *Br J Haematol*, 2002; 118: 1192
12. Beaume, A., Brizard, A., Dreyfus, B., et al, High Incidence of Serum Monoclonal Igs detected by a Sensitive Immunoblotting Technique in B-cell Lymphocytic Leukemia, *Blood*, 1994; 84 : 1216
13. Bennett, J.M., Catovsky, D., Daniel, M.T., et al, The French-American-British (FAB) Cooperative Group. Proposals for the Classification of Chronic mature) B and T Lymphoid Leukemias, *J Clin Pathol*, 1989; 42: 567
14. Bennett, J.M., Moloney, W.C., Greene, M.H., et al, Acute Myeloid Leukemia and other Myelopathic Disorders following Treatment with Alkylating Agents, *Hematol Pathol*, 1987; 1: 99
15. Bertazzi, P.A., Zocchetti, C., Pesatori, A.C., et al, Ten-year Mortality Study of the Population involved in the Seveso Incident in 1976, *Am J Epidemiol*, 1989; 129: 1187

16. Binet, J.L., Leporier, M., Dighiero, G., Carron, D., et al, A Clinical Staging System for Chronic Lymphocytic Leukemia, *Cancer*, 1977; 40 : 855
17. Blair, A., Malaker, H., Cantor, K.P., et al, Cancer among Farmers. A Review, *Scand J Work Environ Health*, 1985; 11: 397
18. Bonvalet, D., Foldes, C., Civatte, J., Cutaneous Manifestations in Chronic Lymphocytic Leukemia, *J Dermatol Surg Oncol*, 1984; 10 : 278
19. Borche, L., Lim, A., Binet, J.L., et al, Evidence that Chronic Lymphocytic Leukemia B Lymphocytes are frequently committed to Production of Natural Autoantibodies, *Blood*, 1990; 76: 5625
20. Bosch, F., Jares, P., Campo, E., et al, PRAD-1/Cyclin D1 Gene Overexpression in Chronic Lymphoproliferative Disorders: a highly Specific Marker of Mantle Cell Lymphoma, *Blood*, 1994; 84: 2726
21. Boulaire, J., Fotedar, A., Fotedar, R., The Functions of the CDK-cyclin Kinase Inhibitor p21, *Pathol Biol*, 2000; 48: 190-202
22. Boussiotis, V.A., Pangalis, G.A., Interferon Alfa-2b Therapy in untreated Early Stage, B-chronic Lymphocytic Leukemia patients: One-year Follow-up, *Br J Haematol*, 1991; 79 suppl 1): 30
23. Brenner, M.K., Tumor Necrosis Factor, *Br J Haematol*, 1988; 69: 149
24. Bronet, J.C., Fernand, J.P., Lourent, G., et al, The Association of Chronic Lymphocytic Leukemia and Multiple Myeloma : A Study of Eleven Patients, *Br J Haematol*, 1985; 59 : 55
25. Bullrich, F., Rasio, D., Kitada, S., et al, ATM Mutations in B-cell Chronic Lymphocytic Leukemia, *Cancer Res*, 1999; 59: 24
26. Bullrich, F., Veronese, M.L., Kitada, S., et al, Minimal Region of Loss at 13q14 in B-cell Chronic Lymphocytic Leukemia, *Blood*, 1996; 88: 3109
27. Burger, J.A., Burger, M., Kipps, T.J., Chronic Lymphocytic Leukemia B cells express Functional CXCR4 Chemokine Receptors that mediate Spontaneous Migration beneath Bone Marrow Stromal Cells, *Blood*, 1999; 94: 3658
28. Burger, J.A., Tsukada, N., Burger, M., et al, Blood derived Nurse-like Cells protect Chronic Lymphocytic Leukemia B-cells from Spontaneous Apoptosis through Stromal Cell-derived Factor-1, *Blood*, 2000; 96: 2655
29. Byrd, J.C., Weiss, R.B., Kweeder, S.L., et al, Fludarabine Therapy for Lymphoid Malignancies is associated with Hemolytic Anemia, *Proc Am Soc Clin Oncol*, 1994; 13: 304
30. Caligaris-Cappio F., B-chronic Lymphocytic Leukemia: a Malignancy of Anti-self B-cells, *Blood*, 1996; 87: 2615
31. Caligaris-Cappio, F., Hamblin, T.J., B-cell Chronic Lymphocytic Leukemia: a Bird of a Different Feather, *J Clin Oncol*, 1999; 17: 339

32. Caligaris-Cappio, F., Janossy, G., Surface Markers in Chronic Lymphoid Leukemias of B-cell Type, *Semin Hematol*, 1985; 22: 1
33. Cantwell, M., Hua, T., Pappas, J., et al, Acquired CD40-ligand Deficiency in Chronic Lymphocytic Leukemia, *Nature Med*, 1997; 3: 984
34. Carbone, I., Matutes, E., Catovsky, D., Monoclonal Antibody Ki-67 identifies B and T Cells in Cycle in Chronic Lymphocytic Leukemia: Correlation with Disease Activity, *Leukemia*, 1992; 6: 902
35. Catovsky, D., Immunophenotypic Analysis of Chronic Lymphoid Leukemias, *Rev Clin Exp Hematol*, 1997; 1: 3
36. Cerroni, L., Zenahlik, P., Hofler, G., et al, Specific Cutaneous Infiltrates of B-cell Chronic Lymphocytic Leukemia: A Clinicopathological and Prognostic Study of 42 patients, *Am J Sur Pathol*, 1996; 20: 1000
37. Chen, H., Treweeke, A.T., West, D.C., et al, In vitro and in vivo Production of Vascular Endothelial Growth Factor by Chronic Lymphocytic Leukemia Cells, *Blood*, 2000; 96: 3181
38. Cheson, B.D., Bennett, J.M., Grever, M., et al, National Cancer Institute-sponsored working Group Guidelines for Chronic Lymphocytic Leukemia: Revised Guidelines for Diagnosis and Treatment, *Blood*, 1996; 87: 4990
39. Cheson, B.D., Vena, D.A., Barret, J., et al, Second Malignancies as a Consequence of Nucleoside Analog Therapy for Chronic Lymphoid Leukemias, *J Clin Oncol*, 1999; 17 : 2454
40. Chilosi, M., Pizzolo, G., Caligaris-Cappio, F., et al, Immunohistochemical Demonstration of Follicular Dendritic Cells in Bone Marrow Involvement of B-chronic Lymphocytic Leukemia, *Cancer*, 1985; 56: 328
41. CLL Trialists Collaborative Group, Chemotherapeutic Options in Chronic Lymphocytic Leukemia: a Metaanalysis of the Randomized Trials, *J Natl Cancer Inst*, 1999; 91: 861
42. Cooperative Group for the Study of Immunoglobulin in Chronic Lymphocytic Leukemia. Intravenous Immunoglobulin for the Prevention of Infection in Chronic Lymphocytic Leukemia, *N Engl J Med*, 1988; 319: 902
43. Cordone, I., Masi, S., Mauro, F.R., et al, p53 Expression in B-cell Chronic Lymphocytic Leukemia: a Marker of Disease Progression and Poor Prognosis, *Blood*, 1998; 91: 4342
44. Coso, D., Costello, R., Cohen-Valensi, R., et al, Acute Myeloid Leukemia and Myelodysplasia in patients with Chronic Lymphocytic Leukemia receiving Fludarabine as Initial Therapy, *Ann Oncol*, 1999; 10: 362
45. Cuttner, J., Increased Incidence of Hematologic Malignancies in first-degree Relatives of patients with Chronic Lymphocytic Leukemia, *Cancer Invest*, 1992; 10: 103

46. Damle, R.N., Wasil, T., Fais, F., et al, Immunoglobulin V Gene Mutation Status and CD38 Expression as Novel Prognostic Indicators in Chronic Lymphocytic Leukemia, *Blood*, 1999; 94 : 1840
47. Dancescu, M., Rubio-Trujillo, M., Biron, G., et al, Interleukin 4 protects Chronic Lymphocytic Leukemic B-cells from death by Apoptosis and Upregulates Bcl-2 Expression, *J Exp Med*, 1992; 176: 1319
48. De Lima, M., O' Brien, S., Lerner, S., Keating, M.J., Chronic Lymphocytic Leukemia in the young patient, *Semin Oncol*, 1998; 25 : 107
49. De Toter, D., Francia di Celle, P., Cignetti, A., et al, The IL-2 Receptor Complex : Expression and Function on Normal and Leukemic B-cells, *Leukemia*, 1995; 9: 142
50. De Toter, D., Reato, G., Mauro, F., et al, IL-4 Production and Increased CD30 Expression by a Unique CD8+T-cell Subset in B-cell Chronic Lymphocytic Leukemia, *Br J Haematol*, 1995; 104: 589
51. Del Prete, G., De Carli, M., Almerigogna, F., et al, Preferential Expression of CD30 by Human CD4 T-cells producing Th-2 type cytokines, *FASEB J*, 1995; 9 : 81
52. Delper, J.R., Houvenaeghel, G., Gastant, J.A., et al, Splenectomy for Hypersplenism in Chronic Lymphocytic Leukemia and Malignant non-Hodgkin's Lymphoma, *Br J Surg*, 1990; 7: 443
53. Delzell, E., Monson, R.R., Mortality among Rubber Workers. VII. Aerospace Workers, *Am J Ind Med*, 1984; 6: 265
54. Desdouets, C., Brechot, C., p27, A Pleiotropic Regulator of Cellular Phenotype and a Target for Cell Cycle Dysregulation in Cancer, *Pathol Biol*, 2000; 48: 203-210
55. Diccianni, M.B., Batova, A., Yu, J., et al, Shortened Survival after Relapse in T-cell Acute Lymphoblastic Leukemia patients with p16/p15 Deletions, *Leukemia Res*, 1997; 21: 549
56. Diehl, L.F., Karnell, L.H., Menck, H.R., The American College of Surgeons Commission on Cancer and the American Cancer Society. The National Cancer Data Base Report on Age, Gender, Treatment and outcomes of patients with Chronic Lymphocytic Leukemia, *Cancer*, 1999; 86: 2684
57. Digel, W., Schoniger, W., Stefanic, M., et al, Receptors for Tumor Necrosis Factor on Neoplastic B-cells from Chronic Lymphocytic Leukemia are expressed in vitro but not in vivo, *Blood*, 1990; 76: 1607
58. Dighiero, G., Charron, D., Debre, P., et al, Identification of a Pure Splenic Form of Chronic Lymphocytic Leukemia, *Br J Haematol*, 1979; 41: 169
59. Dighiero, G., Travade, P., Chevret, S., et al, B-cell Chronic Lymphocytic Leukemia : Present Status and Future Directions, *Blood*, 1991; 78 : 1901
60. DiGiuseppe, J.A., Borowitz, M.J., Clinical Utility of Flow Cytometry in the Chronic Lymphoid Leukemias, *Semin Oncol*, 1998; 25: 6

61. Dohner, H., Fischer, K., Bentz, M., et al, p53 Gene Deletion predicts Poor Survival and Non-response to Therapy with Purine Analogs in Chronic B-cell Leukemias, *Blood*, 1995; 85: 1580
62. Dohner, H., Stilgenbauer, S., Doner K., et al, Chromosome Aberrations in B-cell Chronic Lymphocytic Leukemia: Reassessment based on Molecular Genetic Analysis, *J Mol Med*, 1999; 77: 266
63. Dohner, H., Stilgenbauer, S., James, M.R., et al, 11q Deletions identify a New Subset of B-cell Chronic Lymphocytic Leukemia characterized by Extensive Nodal Involvement and Inferior Prognosis, *Blood*, 1997; 89: 2516
64. Domingo, A., Gonzalez-Barca, E., Castellsaque, X., et al, Expression of Adhesion Molecules in 113 Patients with B-cell Chronic Lymphocytic Leukemia: relationship with Clinico-prognostic Features, *Leuk Res*, 1997; 21: 67
65. Dreger, P., Montserrat, E., Autologous and Allogeneic Stem Cell Transplantation for Chronic Lymphocytic Leukemia, *Leukemia*, 2002; 16: 985
66. Dyer, M.J.S., Zani, V.J., Lu W.Z., et al, Bcl-2 Translocations in Leukemias of Mature B-cells, *Blood*, 1994; 83: 3682
67. Egle, A., Marschitz, I., Posch, B., et al, IL-10 Serum Levels in B-cell Chronic Lymphocytic Leukemia, *Br J Haematol*, 1996; 94 : 211
68. Eistere, W., Hile, W., Stauder, R., et al, An Aggressive Subtype of B-cell is characterized by Strong CD44 Expression and Lack of CD11c, *Br J Haematol*, 1996; 93: 661
69. Elledge, S.J., Cell Cycle Checkpoints: Preventing an Identity Crisis, *Science*, 1996; 274: 1664-1671
70. Euno, A., Catovsky, D., O' Brien, M., et al, Prolymphocytoid Transformation of Chronic Lymphocytic Leukemia, *Br J Haematol*, 1979; 41: 9
71. Fais, F., Ghiotto, F., Hashimoto, S., et al, Chronic Lymphocytic Leukemia B-cells express Restricted sets of Mutated and Unmutated Antigen Receptors, *J Clin Invest*, 1998; 102: 1515
72. Fegan, C., Molecular Abnormalities in B-cell Chronic Lymphocytic Leukemia, *Clin Lab Haematol*, 2001; 23: 139
73. Fegan, C., Robinson, H., Thompson, P., et al, Karyotypic Evolution in CLL. Identification of a New Subgroup of patients with Deletions of 11q and Advanced Disease or Progressive Disease, *Leukemia*, 1995; 9: 2003
74. Finch, S.C., Finch, C.A., Summary of the Studies at ABCC-RERF concerning the late Hematologic Effects of Atomic Bomb Exposure in Hiroshima and Nagasaki, *Radiation Effects Research Foundation*, 1988; 5
75. Finch, S.C., Linet, M.S., Chronic Leukemias, *Baillieres Clin Haematol*, 1992; 5: 27

76. Flinn, I.W., et al, Fludarabine and Cyclophosphamide achieves high Complete Response Rate in Patients with previously untreated Chronic Lymphocytic Leukemia: ECOG 1997, *Blood*, 2001; 98: 663a
77. Flinn, I.W., et al, Fludarabine and Cyclophosphamide with Filgrastim Support in Patients with previously untreated Indolent Lymphoid Malignancies, *Blood*, 2000; 96: 71
78. Florova, E.A., Richards, S.J., Jones, R.A., et al, Immunophenotypic and DNA Genotypic Analysis of T-cell and NK-cell Subpopulations in patients with B-cell Chronic Lymphocytic Leukemia, *Leuk Lymphoma*, 1995; 16: 307
79. Fluckiger, A.C., Durand, I., Banchereau, J., Interleukin-10 induces Apoptotic Cell Death of B-chronic Lymphocytic Leukemia Cells, *J Exp Med*, 1994; 179: 91
80. Flynn, J.M., et al, Campath-1H Monoclonal Antibody Therapy, *Curr Opin Oncol*, 2000; 12: 574
81. Foa R., Fierro, M.T., Giovarelli, M., et al, Immunoregulatory T-cell Defects in B-cell Chronic Lymphocytic Leukemia: Cause or Consequence of the Disease? The Contributory Role of a Decreased Availability of Interleukin 2, *Blood Cells*, 1987; 12: 399
82. Foa, R., Giovarelli, M., Jemma, C., et al, Interleukin 2 and Interferon- γ Production by T-lymphocytes from patients with B-chronic Lymphocytic Leukemia: Evidence that normally released IL-2 is absorbed by the Neoplastic B-cell Proliferation, *Blood*, 1985; 66: 614
83. Foa, R., Massaia, M., Cardona, S., Production of Tumor Necrosis Factor-alpha by B-cell Chronic Lymphocytic Leukemia Cells: a possible Regulatory Role of TNF in the Progression of the Disease, *Blood*, 1990; 76: 393
84. Francia di Celle, P., Carbone, A., Marchis, D., et al, Cytokine Gene Expression in B-cell Chronic Lymphocytic Leukemia : Evidence of Constitutive Interleukin-8 mRNA Expression and Secretion of Biologically Active IL-8 Protein, *Blood*, 1994; 84 : 220
85. Francia di Cell, P., Mariani, S., Riera, L., et al, Interleukin-8 induces the Accumulation of B-cell Chronic Lymphocytic Leukemia Cells by prolonging Survival in an Autocrine Fashion, *Blood*, 1996; 87 : 4382
86. Franklin, D.S., Godfren, V.L., Lee, H., et al, CDK-inhibitors p18^{INK4c} and p27^{Kip1} Mediate two Separate Pathways to collaboratively suppress Pituitary Tumorigenesis, *Genes Dev*, 1998; 12: 2899
87. French Cooperative Group on Chronic Lymphocytic Leukemia, Effects of Chlorambucil and Therapeutic Decision in Initial Forms of Chronic Lymphocytic Leukemia stage A): Results of a Randomised Trial on 612 Patients, *Blood*, 1990; 75: 1414
88. Gaidano, G., Ballerini, P., Cong, J.Z., et al, p53 Mutations in Human Lymphoid Malignancies: Association with Burkitt Lymphoma and Chronic Lymphocytic Leukemia, *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991; 88: 5413

89. Gaidano, G., Newcomb, E.W., Gong, J.Z., et al, Analysis of Alterations of Oncogenes and Tumor Suppressor Genes in Chronic Lymphocytic Leukemia, *Am J Pathol*, 1994; 144: 1312
90. Galton, D.A.G., Israels, L.G., Nabarro, J.D.N., Till, M., Clinical Trials of p-DI-2chloroethylamino)-phenbutyric Acid in Malignant Lymphoma, *British Medical Journal*, 1955; 2: 1172
91. Garfinkel, L., Boffetta, P., Association between Smoking and Leukemia in two American Cancer Society Prospective Studies, *Cancer*, 1990; 65: 2356
92. Gattei, V., Degan, M., Gloghini, A., et al, CD30 Ligand is frequently expressed in Human Hematopoietic Malignancies of Myeloid and Lymphoid Origin, *Blood*, 1997; 89: 2048
93. Germone, A., Iolascon, A., Pietrafesa, A., et al, p16 Gene Analysis in multiple Myeloma, *Leukemia*, 1996; 10: 1401
94. Ghia, P., Caligaris-Cappio, F., The Indispensable Role of Microenvironment in the Natural History of Low-grade B-cell Neoplasms, *Adv Cancer Res*, 2000; 79: 157
95. Ghia, P., Granziero, L., Chilosi, M., et al, Chronic B-cell Malignancies and Bone Marrow Microenvironment, *Semin Cancer Biol*, 2002; 12: 149
96. Giles, F.J., O' Brien, S., Keating, M.J., Chronic Lymphocytic Leukemia in Richter's Transformation, *Semin Oncol*, 1998; 25: 117
97. Gottardi, D., De Alfarano, A., Leo, A.M., et al, In Leukemic CD5+B-cells the Expression of Bcl-2 Gene Family is shifted towards Protection from Apoptosis, *Br J Haematol*, 1996; 94: 612
98. Granziero, L., Ghia, P., Circosta, D., et al, Survivin is expressed on CD40-stimulation and interfaces Proliferation and Apoptosis in B-cell Chronic Lymphocytic Leukemia, *Blood*, 2001; 97: 2777
99. Gribabis, D.A., Panayiotidis, P., Boussiotis, V.A., et al, Influenza Virus Vaccine in B-cell Chronic Lymphocytic Leukemia Patients, *Acta Haematol*, 1994; 91: 115
100. Gunz, F.W., Gunz, J.P., Veale, A.M.O., et al, Familial Leukemia: a Study of 909 Families, *Scand J Haematol*, 1975; 15: 117
101. Haidar, M.A., El-Hajj, H., Bueso-Ramos, C.E., et al, Expression Profile of MDM-2 Proteins in Chronic Lymphocytic Leukemia and their Clinical Relevance, *Am J Hematol*, 1997; 54: 189
102. Hallek, M., Langenmayer, I., Nerl, C., et al, Elevated Serum Thymidine Kinase Levels identify a Subgroup at high Risk of Disease-progression in Early, non-smoldering Chronic Lymphocytic Leukemia, *Blood*, 1999; 93: 1732
103. Hallek, M., Wanders, L., Ostwald, M., et al, Serum β 2-microglobulin and Serum Thymidine Kinase are independent Predictors of Progression-free Survival in Chronic Lymphocytic Leukemia and Immunocytoma, *Leuk Lymphoma*, 1996; 22: 439

104. Hamblin, T.J., Davis, Z., Gardiner, A., et al, Unmutated Ig VH) Genes are associated with a more Aggressive Form of Chronic Lymphocytic Leukemia, *Blood*, 1999;94: 1848
105. Hamblin, T.J., Orchard, J.A., Ibbotson, R.E., et al, CD38 Expression and Immunoglobulin Variable Region Mutations are independent Prognostic Variables in Chronic Lymphocytic Leukemia, but CD38 Expression may vary during the Course of the Disease, *Blood*, 2002; 99: 1023
106. Hamblin, T.J., Oscier, D.G., Chronic Lymphocytic Leukemias. In Whittaker, J.A., Holmes, J.A., *Leukemia and Related Disorders, 3rd edition, Oxford: Blackwell Science*, 1998; 105
107. Hamblin, T.J., Oscier, D.J., Young, B.J., et al, Autoimmunity in Chronic Lymphocytic Leukemia, *J Clin Pathol*, 1986; 39: 713
108. Han, T., Ozer, M., Gavigan, M., et al, Benign Monoclonal B-cell Lymphocytosis—a Benign Variant of B-cell: Clinical, Immunologic, Phenotypic and cytogenetic Studies in 10 patients, *Blood*, 1984; 64: 244
109. Hanada, M., Delia, D., Aiello, A., et al, Bcl-2 Gene Hypomethylation and High Level Expression in B-cell Chronic Lymphocytic Leukemia, *Blood*, 1993; 82: 1820
110. Harris, N.L., Jaffe, E.S., Stein, H., et al, A revised European-American Classification of Lymphoid Neoplasms: A Proposal from the International Lymphoma Study Group, *Blood*, 1994; 84: 1361
111. Hunter, T., Pines, J., Cyclins and Cancer: Cyclin D and CDK Inhibitors come of Age, *Cell*, 1994; 79: 573-582
112. International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia, Chronic Lymphocytic Leukemia: Recommendations for Diagnosis, Staging and Response Criteria, *Ann Intern Med*, 1989; 110: 236
113. Issa, J.P.J., Baylin, S.B., Herman, J.G., DNA Methylation Changes in Hematological Malignancies: Biologic and Clinical Implications, *Leukemia*, 1997; 11 suppl. 1): S7-S11
114. Juliusson, G., Oscier, D.G., Fitchett, M., et al, Prognostic Subgroups in B-cell Chronic Lymphocytic Leukemia defined by specific Chromosomal Abnormalities, *N Engl J Med*, 1990; 323: 720
115. Juliusson, G., Oscier, D., Gahrton, G., For the International Working Party on Chromosomes in CLL IWCCLL). Cytogenetic Findings and Survival in B-cell Chronic Lymphocytic Leukemia. Second IWCCLL compilation of data on 662 patients, *Leuk Lymphoma*, 1991; 5: 21
116. Jurlandez, J., Lai, C.F., Tan, J., et al, Characterization of Interleukin-10 Receptor Expression on B-cell Chronic Lymphocyte Leukemia Cells, *Blood*, 1997; 89 : 4146
117. Kalil, N., Cheson, B.D., Chronic Lymphocytic Leukemia, *Oncologist*, 1999; 4: 352

118. Kamihira, S., Yamada, Y., Hirakata, Y., et al, Quantitative characterization and Potential Function of Membrane Fas/APO-1 (CD95) Receptors on Leukemic Cells from Chronic B and T Lymphoid Leukemias, *Br J Haematol*, 1997; 99: 858
119. Kamijo, T., Bodner, S., Van de Kamp, E., et al, Tumor Spectrum in ARF-deficient Mice, *Cancer Res*, 1999; 59: 2217
120. Kantor, A.B., The Development and Repertoire of B-1 cells (CD5 B-cells). *Immunology Today*, 1991; 12: 389
121. Kanzler, H., Kuppers, R., Helmes, S., et al, Hodgkin and Reed-Sternberg-like cells in B-cell Chronic Lymphocytic Leukemia represent the Outgrowth of Single Germinal-center B-cell-derived Clones: Potential Precursors of Hodgkin and Reed-Sternberg Cells in Hodgkin Disease, *Blood*, 2000; 95: 1023
122. Kastan, M., Molecular Biology of Cancer, *Cancer, Lippincott-Raven* 1997;
123. Kato, K., Cantwell, M.J., Sharma, S., et al, Gene Transfer of CD40-ligand induces Autologous Immune Recognition of Chronic Lymphocytic Leukemia B-cells, *J Clin Invest*, 1998; 101: 1133
124. Kay, N.E., Bone, N.D., Tschumper, R.C., et al, B-CLL cells are Capable of Synthesis and Secretion of both pro and Anti-angiogenic Molecules, *Leukemia*, 2002; 16: 911
125. Kay, N.E., Jlinek, D.F., Dewald, G.W., Progression Events in B-chronic Lymphocytic Leukemia, *In Educational Book of ASH*, 2002; p197
126. Keating, M.J., Chronic Lymphocytic Leukemia, *Semin Oncol*, 1999; 26: 5 suppl 1): 107
127. Keating, M.J., Lerner, S., Kantarjian, H., et al, The Serum β 2-microglobulin Level is more powerful than Stage in Predicting Response and Survival in Chronic Lymphocytic Leukemia, *Blood*, 1995; 86 Suppl 1): 606a
128. Kees, U., Burton, P.R., Lu, C., et al, Homozygous Deletion of the p16/MTS1 Gene in Pediatric Acute Lymphoblastic Leukemia is associated with Unfavourable Clinical Outcome, *Blood*, 1997; 89: 4161
129. Kimby, E., Brandt, L, Nygren, P., et al, A Systematic Overview of Chemotherapy Effects in B-cell Chronic Lymphocytic Leukemia, *Acta Oncol*, 2001; 40: 224
130. Kimby, E., Mellstedt, H., Bjorkholm, M., et al, Clonal Cell Surface Structures related to Differentiation, Activation and homing in B-cell Chronic Lymphocytic Leukemia and Monoclonal Lymphocytosis of undetermined Significance, *Eur J Haematol*, 1989; 43: 452
131. Kini, A., Kay, N., Peterson, L, Increased Bone Marrow Angiogenesis in B-cell Chronic Lymphocytic Leukemia, *Leukemia*, 2000; 14: 1414
132. Kipps, T.J., Chronic Lymphocytic Leukemia, *Curr Opin Hematol*, 2000; 7: 223
133. Kipps, T.J., Wierda, W.G., Woods, S.J., et al, Gene Therapy for CLL. Proceedings of the VIII International Workshop in CLL, *Paris*, 1999; p24

134. Klein, U., Tu, Y., Stolovitzky, G.A., et al, Gene Expression Profiling of B-cell Chronic Lymphocytic Leukemia reveals a Homogenous Phenotype related to Memory B-cells, *J Exp Med*, 2001; 194: 1625
135. Knouf, W., U., Ehlers, B., Bisson, S., et al, Serum Levels of Interleukin-10 in B-cell chronic Lymphocytic Leukemia, *Blood*, 1995; 86 : 4382
136. Kotenko, S.V., The Family of IL-10 related Cytokines and their Receptors: related, but to what Extent?, *Cytokine Growth Factor Rev*, 2002; 13: 223
137. Krober, A., Seiler, T., Benner, A., et al, VH Mutation status, CD38 Expression Level, Genomic Aberrations and Survival in Chronic Lymphocytic Leukemia, *Blood*, 2002; 100: 1410
138. Kunicka, J.E., Platsoukas, C.D., Defective helper Function of Purified T4 Cells and Excessive Suppressor Activity of Purified T8 Cells in patients with B-cell Chronic Lymphocytic Leukemia. T4 Suppressor Effector Cells are present in certain patients, *Blood*, 1998; 71: 1551
139. Lagneaux, L., Delforge, A., Bron, D., et al, Chronic Lymphocytic Leukemic B-cells but not Normal B-cells are rescued from Apoptosis by contact with Normal Bone Marrow Stromal Cells, *Blood*, 1998; 91: 2387
140. Lampert, I.A., Thompson, I., The Spleen in Chronic Lymphocytic Leukemia and related Disorders. In Polliack, A., Catovsky, D., Eds; Chronic Lymphocytic Leukemia, *Harwood Academic*, 1988; p193
141. Lantz, O., Grillot-Courvalin, C., Schmitt, C., et al, Interleukin 2-induced Proliferation of Leukemic Human B-cells, *J Exp Med*, 1985; 161: 1225
142. Lauria, F., Foa, R., Mantovani, B., T-cell Functional Abnormality in B-chronic Lymphocytic Leukemia : Evidence of a Defect of the T-helper Function, *Br J Haematol*, 1983; 54 : 277
143. Lederman, S., Yellin, M.J., Cleary, A.M., et al, T-BAM/CD40-L on helper T Lymphocytes Augments Lymphokine-induced B-cell Ig Isotype switch Recombination and Rescues B-cells from Programmed Cell Death, *J Immunology*, 1994; 152: 2163
144. Lens, D., Dyer, M.J., Garcia-Marco, J.A., et al, p53 Abnormalities in CLL are associated with Excess of Prolymphocytes and Poor Prognosis, *Br J Haematol*, 1997; 99: 848
145. Levine, A.J., p53, the Cellular Gatekeeper for Growth and Division, *Cell*, 1997; 88: 323-331
146. Levy, Y., Bronet, J.C., Interleukin-10 prevents Spontaneous Death of Germinal Center B-cells by Induction of the Bcl-2 Protein, *J Clin Invest*, 1994; 93: 424
147. Lichter, P., Bentz, M., Joos, S., Detection of Chromosomal Aberrations by means of Molecular Cytogenetics: painting of Chromosomes and Chromosomal Subregions and Comparative Genomic Hybridization, *Meth Enzym*, 1995; 254: 334

148. Lichter, P., Ward, D.C., Is non-isotopic in situ Hybridization finally coming of Age?, *Nature*, 1990; 345: 93
149. Linet, M.S., The Leukemias: Epidemiologic Aspects, *New York: Oxford University Press*, 1985; p14
150. Linet, M.S., Bias, W.B., Dorgan, J.F., et al, HLA-antigens in Chronic Lymphocytic Leukemia, *Tissue Antigens*, 1988a; 31: 71
151. Linet, M.S., Blattner, W.A., The Epidemiology of Chronic Lymphocytic Leukemia. In Polliack, A., Catovsky, D., Eds): Chronic Lymphocytic Leukemia, *Harwood Academic Publishers*, 1988; p11
152. Liu, Y., Szekely, L., Grander, D., et al, Chronic Lymphocytic Leukemia Cells with Allelic Deletions at 13q14 commonly have one Intact RB1 Gene: Evidence for Role of an Adjacent Lucus, *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993; 90: 8697
153. Liu, Y.J., Joshua, D.E., Williams, G.T., et al, Mechanism of Antigen-driven Selection in Germinal Centers, *Nature*, 1989; 342: 929
154. Lymphocytic Lymphomas. In Histopathology of Non-Hodgkin's Lymphomas by Lennert, K., Feller, A.C. Eds; *Springer Verlag*, 1992; p53
155. MacLennan, I.C., Germinal Centers, *Annu Rev Immunol*, 1994; 12: 117
156. Matsushima, K., Oppenheim, J.J., Interleukin-8 MCAF: Novel Inflammation Cytokines inducible by IL-1 and TNF, *Cytokine*, 1989; 1: 2
157. Matutes, E., Halsey, J., Morilla, R., et al, Prognostic Significance of Membrane Antigens and Morphology in Chronic Lymphocytic Leukemia, *Blood*, 1999; 94: 535a
158. Matutes, E., Oscier, D., Garcia-Marco, J., et al, Trisomy 12 defines a Group of CLL with A typical Morphology : Correlation between Cytogenetic, Clinical and Laboratory Feature in 544 Patients, *Br J Haematol*, 1996; 92 : 382
159. Matutes, E., Owusu-Ankomah, K., Morilla, R., et al, The Immunological Profile of B-cell Disorders and Proposal of a scoring System for the Diagnosis of CLL, *Leukemia*, 1994; 8: 1640
160. Matutes, E., Polliack, A., Morphological and Immunophenotypic Features of Chronic Lymphocytic Leukemia, *Rev Clin Exp Hematol*, 2000; 41: 22
161. Mauro, F.R., De Rossi, G., Burgio, V.L., et al, Prognostic Value of Bone Marrow Histology in Chronic Lymphocytic Leukemia. A Study of 335 Untreated Cases from a single Institution, *Haematologica*, 1994; 79: 334
162. Mauro, F.R., Foa, R., Cerreti, R., et al, Autoimmune Hemolytic Anemia in Chronic Lymphocytic Leukemia : Clinical, Therapeutic and Prognostic Features, *Blood*, 2000; 95 : 2786
163. Mauro, F.R., Foa, R., Giannarelli, D., et al, Clinical Characteristics and Outcome of Young Chronic Lymphocytic Leukemia patients: a Single Institution Study of 204 Cases, *Blood*, 1999; 94: 448

164. Mckeithan, T.W., Takimoto, G.S., Ohno, H., et al, Bcl-3 Rearrangements and t(14;19) in Chronic Lymphocytic Leukemia and other B-cell Malignancies: a Molecular and Cytogenetic Study, *Genes Chrom Cancer*, 1997; 20: 64
165. Means, R.T., Krantz, S.B., Progress in understanding the Pathogenesis of the Anemia of Chronic Disease, *Blood*, 1992; 80: 1639
166. Meek, D.W., The Role of p53 in the Response to Mitogenic Spindle Damage, *Patho Biol*, 2000; 48: 246-254
167. Melo, J.V., Catovsky, D., Galton, D.A.G., The Relationship between Chronic Lymphocytic Leukemia and Prolymphocytic Leukemia. Clinical and Laboratory Features of 300 patients and Classification of an Intermediate Group, *Br J Haematol*, 1986; 63: 377
168. Mentz, F., Mossalayi, M.D., Quaz, F., et al, Theophylline synergizes with Chlorambucil in inducing Apoptosis of B-chronic Lymphocytic Leukemia Cells, *Blood*, 1996; 88: 2172
169. Merup, M., Juliusson, G., Wu, X., et al, Amplification of Multiple Regions of Chromosome 12, including 12q13-15 in Chronic Lymphocytic Leukemia, *Eur J Haematol*, 1997; 58: 174
170. Michaux, L, Dierlamm, J., Wlodarska, I., et al, t(14,19)/BCL3 Rearrangements in Lymphoproliferative Disorders : a Review of 23 Cases, *Cancer Genet Cytogenet*, 1997; 94 : 36
171. Minot, G.R., Isaacs, R., Lymphatic Leukemia, Age Incidence, Duration and Benefit derived from Irradiation, *Boston Med Sur*, 1924; 191: 1
172. Mitelman, F., Levan, G., Clustering of Aberrations to Specific Chromosomes in Human Neoplasma, *Hereditas*, 1978; 89: 207
173. Molica, S., Brugiattelli, M., Callea, V., et al, Comparison of Younger versus Older B-cell Chronic Lymphocytic Leukemia patients for Clinical Presentation and Prognosis: a Retrospective Study of 53 cases, *Eur J Haematol*, 1994; 52: 216
174. Molica, S., Levato, D., Cascavilla, N., et al, Clinico-prognostic Implications of simultaneous increased serum Levels of Soluble CD23 and Beta2-microglobulin in B-cell Chronic Lymphocytic Leukemia, *Eur J Haematol*, 1999; 62: 117
175. Molica, S., Vielli, G., Levato, D., et al, Clinicobiological Implications of increased serum Levels of Interleukin-8 in B-cell Chronic Lymphocytic Leukemia, *Haematologica*, 1999; 84 : 208
176. Montserrat, E., Sanchez-Bisono, J., Vinolas, N., et al, Lymphocyte doubling Time in Chronic Lymphocytic Leukemia : Analysis of its Prognostic Significance, *Br J Haematol*, 1986; 62 : 567
177. Montserrat, E., Vinolas, N., Reverter, J.C., et al, Natural History of Chronic Lymphocytic Leukemia: on the Progression and Prognosis of Early Clinical Stages, *Nouv Rev Fr' d Hematol*, 1988; 30: 359

178. Morabito, F., Prasthofer, E.F., Dunlap, et al, Expression of Myelomonocytic Antigens on Chronic Lymphocytic Leukemia B-cells correlates with their Ability to Produce Inteleukin-1, *Blood*, 1987; 70: 1750
179. Morgan, D., Principles of CDK Regulation, *Nature*, 1995; 374: 131-134
180. Morrison, V.A., Rai, K.R., Peterson, B.L., et al, Therapy related Myeloid Leukemias are observed in patients with Chronic Lymphocytic Leukemia after Treatment with Fludarabine and Chlorambucil: Results of an Intergroup Study, Cancer and Leukemia Group B9011, *J Clin Oncol*, 2002; 20: 3878
181. Mossafa, H., Malaure, H., Maynadie, M., et al, Persistent Polyclonal B-lymphocytosis with binucleated Lymphocytes : a Study of 25 cases, *Br J Haematol*, 1999; 104 : 486
182. Mu, X., Kay, N.E., Gosland, M.P., et al, Analysis of Blood T-cell Cytokine Expression in B-chronic Lymphocytic Leukemia: evidence for Increased Levels of Cytoplasmic IL-4 in resting and activated CD8 Cells, *Br J Haematol*, 1997; 96: 733
183. Muller-Hermelink, H.K., Catovsky, D., Montserrat, E., et al, Chronic Lymphocytic Leukemia/ Small Lymphocytic Lymphoma. In WHO. Pathology and Genetics. Tumor of Haematopoietic and Lymphoid Tissues, by Jaffe, E.S., Harris, N.L., Stein, H., Vardiman, J.W. Eds; *LARC*, 2001; p127
184. Nakamine, H., Masih, A.S., Sanger, W.G., et al, Richter's Syndrome with Different Immunoglobulin Light Chain Types. Molecular and Cytogenetic Features indicate a common Clonal Origin, *Am J Clin Pathol*, 1992; 97: 656
185. Neilson, J.R., Auer, R., White, D., et al, Deletions at 11a identify a Subset of patients with Typical CLL who show Consistent Disease Progression and reduced Survival, *Leukemia*, 1997; 11: 1929
186. Noel, P., Kyle, R.A., Monoclonal Proteins in Chronic Lymphocytic Leukemia, *Am J Clin Pathol*, 1987; 87: 385
187. North, S., Hainaut, P., p53 and Cell Cycle Control: a Finger in every Pie, *Pathol Biol*, 2000; 48: 255-270
188. O' Brien, S.M., et al, Results of the Fludarabine and Cyclophosphamide Combination Regimen in Chronic Lymphocytic Leukemia, *J Clin Oncol*, 2001; 19: 1414
189. O' Brien, S.M., et al, Rituximab Dose Escalation Trial in Chronic Lymphocytic Leukemia, *J Clin Oncol*, 2001; 19: 2165
190. Offit, K., Lonie, D.C., Parsa, W.Z., et al, Clinical and Morphological Features of B-cell small Lymphocytic Lymphoma with del6q21q23, *Blood*, 1994; 83: 2611
191. Ohnishi, H., Hanada, R., Horibe, K., et al, Homozygous Deletions of p16/MTS1 and p15/MTS2 Genes are frequent in t(1,19)-negative, but not in t(1,19)-positive B Precursor Acute Lymphoblastic Leukemia in Childhood, *Leukemia*, 1996; 10: 1104
192. Orsini, E., Guarini, A., Foa, R., Assecory Cells, Cytokine Loops and Cell-to-Cell Interactions in Chronic Lymphocytic Leukemia, *Rev Clin Exp Hematol*, 2000; 4: 73

193. Oscier, D.G., Gardiner, A.C., Mould, S.J., et al, Multivariate Analysis of Prognostic Factors in CLL: Clinical Stage, VH Gene Mutational Status and Loss or Mutation of p53 Gene are independent Prognostic Factors, *Blood*, 2002; 100: 1177
194. Oscier, D., Matutes, E., Copplestone, A., et al, A Typical Morphology: an adverse Prognostic Factor for Disease Progression in Stage A CLL Independent of Trisomy 12, *Br J Haematol*, 1997; 98: 934
195. Panayiotidis, P., Jones, D., Ganeshaguru, K., et al, Human Bone Marrow Stromal Cells prevent Apoptosis and support the Survival of Chronic Lymphocytic Leukemia Cells in vitro, *Br J Haematol*, 1996; 92 : 97
196. Pangalis, G.A., Angelopoulou, M.K., Vassilakopoulos, T.P., et al, B-chronic Lymphocytic Leukemia, small Lymphocytic Lymphoma and Lymphoplasmacytic Lymphoma, including Waldenstrom's Macroglobulinemia: a Clinical, Morphologic and Biologic Spectrum of similar Disorders, *Semin Hematol*, 1999; 36: 104
197. Pangalis, G.A., Boussiotis, V.A., Kittas, C., Malignant Disorders of small Lymphocytes ; Small Lymphocytic Lymphoma, Lymphoplasmacytic Lymphoma and Chronic Lymphocytic Leukemia : their Clinical and Laboratory Relationship, *Am J Clin Pathol*, 1993; 99 : 402
198. Pangalis, G.A., Boussiotis, V.A., Kittas, C., B-chronic Lymphocytic Leukemia. Disease Progression in 150 untreated Stage A and B patients as predicted by Bone Marrow Pattern, *Nouv Rev Fr Hematol*, 1988; 30: 373
199. Pangalis, G.A., Dimopoulou, M.N., Angelopoulou, M.K., et al, Campath-1H anti-CD52) Monoclonal Antibody Therapy in Lymphoproliferative Disorders, *Med Oncol*, 2001; 18: 99
200. Pangalis, G.A., Dimopoulou, M.N., Angelopoulou, M.K., et al, Campath-1H in B-chronic Lymphocytic Leukemia: Report on a patient Treated Thrice in a 3 year Period, *Med Oncol*, 2000; 17: 70
201. Pangalis, G.A., Griva, E., Recombinant Alfa-2b-interferon Therapy in Untreated Stages A and B Chronic Lymphocytic Leukemia. A Preliminary Report, *Cancer*, 1988; 61: 869
202. Pangalis, G.A., Moutsopoulos, H.M., Papadopoulos, N.M., et al, Monoclonal and Oligoclonal Immunoglobulins in the serum of patients with B-chronic Lymphocytic Leukemia, *Acta Haematol*, 1988; 80: 23
203. Pangalis, G.A., Poziopoulos, C., Angelopoulou, M.K., et al, Effective Treatment of Disease-related Anemia in B-chronic Lymphocytic Leukemia patients with Recombinant Human Erythropoietin, *Br J Haematol*, 1995; 89: 627
204. Pangalis, G.A., Roussou, P.A., Kittas, Ch., et al, B-chronic Lymphocytic Leukemia. Prognostic Implication of Bone Marrow Histology in 120 patients. Experience from a single Hematology Unit, *Cancer*, 1987; 59: 767
205. Pangalis, G.A., Roussou, P.A., Kittas, C., et al, Patterns of Bone Marrow Involvement in Chronic Lymphocytic Leukemia and small Lymphocytic well differen-

- tiated) non-Hodgkin's Lymphoma. Its Clinical Significance in Relation to their Differential Diagnosis and Prognosis, *Cancer*, 1984; 54: 702
206. Pangalis, G.A., Siakantaris, M.P., Angelopoulou, M.K., et al, Downstaging Rai Stage III B-chronic Lymphocytic Leukemia patients with the Administration of Recombinant Human Erythropoietin, *Haematologica*, 2002; 87: 500
207. Pangalis, G.A., Vassilakopoulos, T.P., Dimopoulou, M.N., et al, B-chronic Lymphocytic Leukemia: Practical Aspects, *Hematol Oncol*, 2002; 20: 103
208. Partyka, S., O' Brien, S., Podoloff, D., et al, The Usefulness of High Dose 7-10mCi) Gallium ⁶⁷Ga) scanning to Diagnose Richter's Transformation, *Leuk Lymphoma*, 1999; 36: 151
209. Peller, S., Kaufman, S., Decreased CD45RA T-cells in B-cell Chronic Lymphatic Leukemia patients: Correlation with Disease Stage, *Blood*, 1991; 78: 1569
210. Peller, S., Rotter, V., TP53 in Hematological Cancer: Low Incidence of Mutations with significant Clinical Relevance, *Hum Mutat*, 2003; 21: 277
211. Peterson, L.C., Lindquist, L.L., Church, S., et al, Frequent Clonal Abnormalities of Chromosome Band 13q14 in B-cell Chronic Lymphocytic Leukemia: multiple Clones, Subclones and non-clonal Alterations in 82 Midwestern patients, *Genes Chromosom Cancer*, 1992; 4: 273
212. Piette, J., Munoz, P., Implication of G2 Checkpoint in the Maintenance of Genome Integrity, *Patho Biol*, 2000; 48: 174-181
213. Pizzolo, G., Chilosi, M., Ambrosetti, A., et al, Immunohistologic Study of Bone Marrow Involvement in B-chronic Lymphocytic Leukemia, *Blood*, 1983; 62: 1289
214. Platsoukas, C.D., Galinski, S., Kempin, S., et al, Abnormal T-lymphocyte Subpopulations in patients with B-cell Chronic Lymphocytic Leukemia. An Analysis by Monoclonal Antibodies, *J Immunol*, 1982; 129: 2305
215. Prieto, A., Garcia-Suarez, J., Reyes, E., et al, Diminished DNA Synthesis in T-cells from B-chronic Lymphocytic Leukemia after Phytohemagglutinin, Anti-CD3 and Phorbol Myristate Acetate Mitogenic Signals, *Exp Hematol*, 1993; 21: 1563
216. Que, T.H., Garcia-Marco, J., Ellis, J., et al, Trisomy 12 in Chronic Lymphocytic Leukemia detected by Fluorescence in situ Hybridization : Analysis by Stage, Immunophenotype and Morphology, *Blood*, 1993; 82 : 571
217. Rai, K.R., Sawitsky, A., Cronkite, E.R., Chanana, A.D., et al, Clinical Staging of Chronic Lymphocytic Leukemia, *Blood*, 1975; 46: 219
218. Rawstron, A.C., Green, M.J., Kuzmiccki, A., et al, Monoclonal B-lymphocytes with the Characteristics of "indolent" Chronic Lymphocytic Leukemia are present in 3.5% of adults with Normal Blood Counts, *Blood*, 2002; 100: 635
219. Reimer, P., Weissinger, F., Tony, H.P., et al, Persistent Polyclonal B-cell Lymphocytosis: an Important Differential Diagnosis of B-cell Chronic Lymphocytic Leukemia, *Ann Hematol*, 2000; 79: 327

220. Reinisch, W., Willheim, M., Hilgarth, M., et al, Soluble CD23 reliably reflects Disease Activity in B-cell Chronic Lymphocytic Leukemia, *J Clin Oncol*, 1994; 12: 2146
221. Ribera, J.M., Vinolas, N., Urbano-Ispizua, A., et al, "Spontaneous" Complete Remissions in Chronic Lymphocytic Leukemia: Report of three Cases and Review of the Literature, *Blood Cells*, 1987; 12: 471
222. Rieux-Lancat, F., Le Deist, F., Hibroz, C., et al, Mutations in Fas associated with Human Lymphoproliferative Syndrome and Autoimmunity, *Science*, 1995; 268 : 1347
223. Robak, T., The Role of Nucleoside Analogues in the Treatment of Chronic Lymphocytic Leukemia-lessons learned from Prospective Randomized Trials, *Leuk Lymphoma*, 2002; 43: 537
224. Tobak, T., Blasinska-Morawiek, M., Krykowski, E., et al, Autoimmune Haemolytic Anemia in patients with Chronic Lymphocytic Leukemia treated with 2-chlorodeoxyadenosine cladribine; *Eur J Haematol*, 1997; 58: 109
225. Robertson, L.E., Pugh, W., O' Brien, S., et al, Richter's Syndrome: a Report of 39 patients, *J Clin Oncol*, 1993; 11: 1985
226. Roitt, I., Brostoff, J., Male, D., Cell-mediated Immune Reactions in Immunology, *Mosby*, 1998; p121
227. Roitt, I., Brostoff, J., Male, D., Cell Migration and Inflammation in Immunology, *Mosby*, 1998; p62
228. Rosenwald, A., Alizadeh, A.A., Widhopf, G., et al, Relation of Gene Expression Phenotype to Immunoglobulin Mutation Genotype in B-cell Chronic Lymphocytic Leukemia, *J Exp Med*, 2001; 194: 1639
229. Rossi, E., Matutes, E., Morilla, R., et al, Zeta Chain and CD28 are poorly expressed on T-lymphocytes from Chronic Lymphocytic Leukemia, *Leukemia*, 1996; 10 : 494
230. Rozman, C., Montserrat, E., Rodriguez-Fernandez, J.M., et al, Bone Marrow Histologic Pattern: the best Single Prognostic Parameter in Chronic Lymphocytic Leukemia. A Multivariate Survival Analysis of 329 Cases, *Blood*, 1984; 64: 642
231. Rozman, C., Montserrat, E., Vinolas, N., Serum Immunoglobulins in B-chronic Lymphocytic Leukemia. Natural History and Prognostic Significance, *Cancer*, 1988; 61: 279
232. Rubin, L.A., Jay, G., Nelson, D.L., The Released Interleukin 2 Receptor binds Interleukin 2 efficiently, *J Immunol*, 1986; 137: 3841
233. Rubnitz, J.E., Belm, F.G., Pui, C.H., et, Genetic Studies of Childhood acute Lymphoblastic Leukemia with Emphasis on p16, MLL and ETV6 Gene Abnormalities: Results of St Jude Total Therapy Study XII, *Leukemia*, 1997; 11: 1201
234. Rutella, S., Rumi, C., Puggioni, P., et al, Expression of Thrombospondin Receptor CD36) in B-cell Chronic Lymphocytic Leukemia as an Indicator of Tumor Cell Dissemination, *Haematologica*, 1999; 84 : 419

235. Saffarti, M., Chevret, S., Chastang, C., et al, Prognostic Importance of Serum Soluble CD23 Level in Chronic Lymphocytic Leukemia, *Blood*, 1998; 91 : 2689
236. Schaffner, C., Stilgenbauer, S., Rappold, G., et al, Somatic ATM Mutations indicate a Pathogenic Role of ATM in B-cell Chronic Lymphocytic Leukemia, *Blood*, 1999; 94: 748
237. Schattner E.J., Mascarenhas, J., Reyfman, I., Chronic Lymphocytic Leukemia B-cells can express CD40-ligand and demonstrate T-cell Type Costimulatory Capacity, *Blood*, 1998; 91: 2689
238. Schena, M., Larsson, L.G., Gottardi, D., et al, Growth and Differentiation-associated Expression of Bcl-2 in B-chronic Lymphocytic Leukemia Cells, *Blood*, 1992; 79: 2981
239. Scully, R.E., Mark, E.J., McNeely, W.F., et al, Case Records of the Massachusetts General Hospital, *N Engl J Med*, 1988; 319: 1268
240. Semenzato, G., Foa, R., Agostini, C., et al, High Serum Levels of Soluble Interleukin 2 Receptor in patients with B-chronic Lymphocytic Leukemia, *Blood*, 1987; 70: 396
241. Semenzato, G., Pezzutto, A., Foa, R., et al, T-lymphocytes in B-cell Chronic Lymphocytic Leukemia: Characterization by Monoclonal Antibodies and Correlation with Fc Receptors, *Clin Immunol Immunopathol*, 1983; 26: 155
242. Seymour, J.F., Khouri, I.F., Champlin, R., et al, Refractory Chronic Lymphocytic Leukemia Complicated by Hypercalcemia treated with Allogeneic Bone Marrow Transplantation : Case Report and Review, *Am J Clin Oncol*, 1994; 17 : 360
243. Sherr, C.J., Cancer Cell Cycles, *Science*, 1996; 274: 1672-1677
244. Sjoberg, J., Aguilar-Santelises, M., Sjogren, A.M., et al, Interleukin-10 mRNA Expression in B-cell Chronic Lymphocytic Leukemia inversely correlates with Progression of Disease, *Br J Haematol*, 1996; 92: 393
245. Stankovic, T., Kidd, A.M.J., Sutcliffe, A., et al, ATM Mutations and Phenotypes in Ataxia-Telangiectasia Families in the British Isles: Expression of Mutant ATM and the Risk of Leukemia, Lymphoma and Breast Cancer, *Am J Hum Genet*, 1998; 62: 334
246. Starostik, P., Manshour, T., O'Brien, S., et al, Deficiency of the ATM Protein defines an Aggressive Subgroup of B-cell Chronic Lymphocytic Leukemia, *Cancer Res*, 1998; 58: 4552
247. Stern, S.C., Shah, S., Costello, C., Probable Autoimmune Neutropenia induced by Fludarabine Treatment for Chronic Lymphocytic Leukemia, *Br J Haematol*, 1999; 106: 836
248. Sthoeger, Z.M., Sthoeger, D., Shtalrid, M., et al, Mechanism of Autoimmune Hemolytic Anemia in Chronic Lymphocytic Leukemia, *Am J Hematol*, 1993; 43: 259

249. Stilgenbauer, S., Bullinger, L., Benner, A., et al, Incidence and Clinical Significance of 6q Deletions in B-cell Chronic Lymphocytic Leukemia, *Leukemia*, 1999; 13: 1331
250. Stilgenbauer, S., Schaffner, C., Litzler, A., et al, Biallelic Mutations in the ATM Gene in T-Prolymphocytic Leukemia, *Nat Med*, 1997; 3: 1155
251. Suda, T., Takahashi, T., Goldstein, P., et al, Molecular Cloning and Expression of the Fas-ligand: a Novel Member of the Tumor Necrosis Factor Family, *Cell*, 1993; 75: 1169
252. Takeuchi, S., Bartram, C.R., Seriu, T., et al, Analysis of a Family of Cyclin-dependent Kinase Inhibitors: p15/MTS2/INK4B, p16/MTS1/INK4A and p18 Genes in acute Lymphoblastic Leukemia of Childhood, *Blood*, 1995; 86: 755
253. Tobin, G., Thunberg, U., Johnson, A., et al, Somatically mutated IgVH3-21 Genes characterize a new Subset of Chronic Lymphocytic Leukemia, *Blood*, 2002; 99: 2262
254. Travis, L.B., Curtis, R.E., Hankey, B.F., et al, Second Cancers in patients with Chronic Lymphocytic Leukemia, *J Natl Cancer Inst*, 1992; 84: 1422
255. Traweek, S.T., Liu, J., Johnson, R.M., et al, High Grade Transformation of Chronic Lymphocytic Leukemia and Low-grade non-Hodgkin Lymphoma. Genotypic Confirmation of Clonal Identity, *Am J Clin Pathol*, 1993; 100: 519
256. Trentin, L., Zambello, R., Sancetta, R., et al, B-lymphocytes from patients with Chronic Lymphoproliferative Disorders and Equipped with Different Costimulatory Molecules, *Cancer Res*, 1997; 57: 4940
257. Tsihlias, J., Kapusta, L., Slingerland, J., The Prognostic Significance of Altered Cyclin Dependent Kinase Inhibitors in Human Cancer, *Ann Rev Med*, 1999; 50: 401-423
258. Turk, W., System der Lymphomatosen, *Wien Klin Wochenschr*, 1995; 16: 1073
259. Van den Berg, A., Maggio, E., Rust, R., et al, Clonal Relation in a Case of CLL, ALCL and Hodgkin Composite Lymphoma, *Blood*, 2002; 100: 1425
260. Van Dongen, J.J.M., Hooijkaas, H., Michiels, J.J., et al, Richter's Syndrome with Different Immunoglobulin Light Chains and Different Heavy Chain Gene Rearrangements, *Blood*, 1984; 64: 571
261. Vassilakopoulos, T.P., Angelopoulou, M.K., Gribaris, D.A., et al, Immunoglobulin Disorders at Diagnosis and Course of B-chronic Lymphocytic Leukemia B-CLL patients, *Br J Haematol*, 1996; (93suppl 2): 117
262. Virchow, R., *Weisses Blut und Milztumoren Medicinische Zeitung*, 1846; 15: 157
263. Virchow, R., Weisses Blut leukämie; *Virchow Archives of Pathology and Anatomy*, 1847; 1: 563
264. Waage, A., Espevik, T., TNF Receptors in Chronic Lymphocytic Leukemia, *Leuk Lymphoma*, 1994; 13: 41

265. Wang, D., Freeman, G.J., Levine, H., et al, Role of the CD40 and CD95 Antigens in the Apoptosis of Human B-cell Malignancies, *Br J Haematol*, 1997; 97: 409
266. Warnke, R.A., Morphologic, Immunologic and Genetic Features of B-cell CLL/SLL and Immunocytoma. In Human Lymphoma: Clinical Implications of the Real Classification by Mason DY, Harris NL Eds; *Springer Verlag*, 2001
267. Weinberg, R.A., The Retinoblastoma Protein and Cell Cycle Control, *Cell*, 1995; 81: 323
268. Wierda, W., et al, Combined Fludarabine, Cyclophosphamide and Rituximab achieves a high complete Remission Rate as Initial Treatment for Chronic Lymphocytic Leukemia, *Blood*, 2001; 98: 3210a
269. Williams, J.F., Petrus, M.J., Wright, J.A., et al, Fas-mediated Lysis of Chronic Lymphocytic Leukemia Cells: Role of Type I versus Type II Cytokines and Autologous FasL-expressing T-cells, *Br J Haematol*, 1999; 107: 99
270. Woessner, S., Sale, F., Perez-Losada, A., et al, Trisomy 12 is a rare Cytogenetic finding in Typical Chronic Lymphocytic Leukemia, *Leuk Res*, 1996; 20: 369
271. Wynford-Thomas, D., Replicative Senescence: Mechanisms and Implications for Human Cancer, *Pathol Biol*, 2000; 48: 301-307
272. Yettra, M., Remission of Chronic Lymphocytic Leukemia after Small-pox Vaccination, *Arch Intern Med*, 1979; 139: 603
273. Youinou, P., Jamin, C., Lydyard, P.M., CD5 Expression in Human B-cell Populations, *Immunology Today*, 1999; 20: 312
274. Young, E., Korsmeyer, S.J., Molecular Thanatopsis: a Discourse on the Bcl-2 Gene Family and Cell Death, *Blood*, 1996; 88: 386
275. Yuille, M.R., Matutes, E., Marossy, A., et al, Familial Chronic Lymphocytic Leukemia : a Survey and Review of Published Studies, *Br J Haematol*, 2000; 109: 794
276. Zengin, N., Kars, A., Sungur, A., et al, The Significance of the Bone Marrow Biopsy Pattern in Chronic Lymphocytic Leukemia: a Prognostic Dilemma, *Am J Hematol*, 1999; 62: 149
277. Zhu, Y., Monni, O., El-Rifai, W., et al, Discontinuous Deletions at 11q23 in B-cell Chronic Lymphocytic Leukemia, *Leukemia*, 1999; 13: 708
278. Zinzani, P.L., Tani, M., Stefoni, V., et al, From Chronic Lymphocytic Leukemia to Hodgkin's Disease: a Case of Prognostically Favourable Transformation, *Leuk Res*, 2002; 26: 775
279. Zola, H., Flego, L., Weedon, H., Expression of IL-4 Receptor on Human T and B Lymphocytes, *Cell Immunol*, 1993; 150: 149
280. Zomas, A.P., Matutes, E., Morilla, R., et al, Expression of the Immunoglobulin associated Protein B29 in B-cell Disorders with the Monoclonal Antibody SN8CD79b; *Leukemia*, 1996; 10: 1966

281. Zuelzer, W.W., Cox, D.E., Genetic Aspects of Leukemia, *Semin Hematol*, 1969; 6: 4
282. Dameshek, W., Chronic Lymphocytic Leukemia - an accumulative disease of immunologically Incompetent Lymphocytes, *Blood*, 1967; 29: 566-584
283. Chiorazzi, N., Ferrarini, M., B Cell Chronic Lymphocytic Leukemia: Lessons learned from Studies of the B Cell Antigen Receptor, *Ann Rev Immunol*, 2003; 21: 841-894
284. Rai, K.R., Sawitsky, A., Cronkite, E.P., Chanana, A.D., Levy, R.N., Pasternack, B.S., Clinical staging of Chronic Lymphocytic Leukemia, *Blood*, 1975; 46: 219-234
285. Binet, J.L., Auquirt, S., Fihhirto, H., ry sl, a New Prognostic Classification of Chronic Lymphocytic Leukemia derived from a Multivariate Survival Analysis, *Cancer*, 1981; 48: 198-206)
286. Hamblin, T.J., Davis, Z., Gardiner, A., Oscier, D.G., Stevenson, F.K., Unmutated Ig VH Genes are associated with a more Aggressive Form of Chronic Lymphocytic Leukemia, *Blood*, 1999; 94: 1848-1854
287. Krober, A., Seiler, T., Benner, A., et al, VH Mutation Status, CD38 Expression Level, Genomic Aberrations and Survival in Chronic Lymphocytic Leukemia, *Blood*, 2002; 100: 1410-1416
288. Damle, R.N., Wasil, T., Fais, F., et al, Ig V Gene Mutation status and CD38 Expression as novel prognostic Indicators in Chronic Lymphocytic Leukemia, *Blood*, 1999; 94 : 1840-1847
289. Lin, K., Sherrington, P.D., Dennis, M., Matrai, Z., Cawley, J.C., Pettitt, A.R., Relationship between p53 Dysfunction, CD38 Expression and IgVH) Mutation in Chronic Lymphocytic Leukemia, *Blood*, 2002; 100: 1404-1409
290. Maloum, K., Davi, F., Merle-Beral, H., et al, Expression of Unmutated VH Genes is a detrimental prognostic Factor in Chronic Lymphocytic Leukemia, *Blood*, 2000; 96: 377-379
291. Hamblin, T.J., Orchard, J.A., Ibbotson, R.E., et al, CD38 Expression and Immunoglobulin variable region Mutations are independent Prognostic variables in Chronic Lymphocytic Leukemia, but CD38 expression may vary during the course of the disease, *Blood*, 2002; 99: 1023-1029
292. Oscier, D.G., Gardiner, A.C., Mould, S.J., et al, Multivariate analysis of Prognostic Factors in CLL : Clinical Stage, IGVH Gene mutational status and Loss or Mutation of the p53 Gene are independent Prognostic Factors, *Blood*, 2002; 100: 1177-1184
293. Sherr C.J., The Pezcoller Lecture: Cancer Cell Cycles Revisited. *Cancer Research*, 2000; 60: 3689-3695
294. Melchers, F., Rolink, A. (1999) B-lymphocyte development and biology. In *Fundamental Immunology* (W. E Paul, ed.), Philadelphia, *Lippincott-Raven*, 183-224

295. Benoist, C., Mathis, D (1999) T-lymphocyte Differentiation and Biology. In *Fundamental Immunology* (W. E Paul, ed.), Philadelphia, *Lippincott-Raven*, 367-410
296. Sprent, J., Surh, C.D. (2001) Generation and Maintenance of Memory T cells. *Curr. Opin. Immunology* 13: 248-254
297. Harley, C.B. (1997) Human Ageing and Telomeres, *Ciba Found. Symp.*, 211: 129-139
298. Greider, C.W., Blackburn, E.H. (1996) Telomeres, Telomerase and Cancer, *Sci. Am.*, 274: 92-97
299. Blackburn, E.H. (2000) Telomere States and Cell Fates, *Nature*, 408: 53-56
300. Nakamura, T.M., Morin, G.B., Chapman, K.B., Weinrich, S.L., Andrews, W.H., Lingner, J., Harley, C.B., Cech, T.R. (1997) Telomerase Catalytic Subunit Homologs from Fission Yeast and Human, *Science*, 277: 955-959
301. Meyerson, M., Counter, C.M., Eaton, E.N., Ellisen, L.W., Steiner, P., Caddle, S.D., Ziaugra, L., Beijersbergen, R.L., Davidoff, M.J., Liu, Q., Bacchetti, S., Haber, D.A., Weinberg, R.A. (1997) hEST2, the Putative Human Telomerase Catalytic Subunit Gene, is up-regulated in Tumor Cells and during Immortalization, *Cell*, 90: 785-795
302. Feng, J., Funk, W.D., Wang, S.S., Weinrich, S.L., Avilion, A.A., Chiu, C.P., Adams, R.R., Chang, E., Allsopp, R.C., Yu, J. (1995) The RNA Component of Human Telomerase, *Science*, 269: 1236-1241
303. Morrison, S.J., Prowse, K.R., Ho, P., Weissman, I.L. (1996) Telomerase Activity in Hematopoietic Cells is associated with self-renewal Potential, *Immunity*, 5: 207-216
304. Chiu, C.P., Dragowska, W., Kim, N.W., Vaziri, H., Yui, J., Thomas, T.E., Harley, C.B., Lansdorp, P.M. (1996) Differential Expression of Telomerase Activity in Hematopoietic Progenitors from Adult Human Bone Marrow, *Stem Cells*, 14: 239-248
305. Taylor, R.S., Ramirez, R.D., Ogoshi, M., Chaffins, M., Piatyszek, M.A., Shay, J.W. (1996) Detection of Telomerase Activity in Malignant and Nonmalignant Skin Conditions, *J. Investig. Dermatol.*, 106: 759-765
306. Ramirez, R.D., Wright, W.E., Shay, J.W., Taylor, R.S. (1997) Telomerase Activity concentrates in the mitotically Active Segments of Human Hair Follicles, *J. Investig. Dermatol.*, 108: 113-117
307. Broccoli, D., Young, J.W., de Lange, T. (1995) Telomerase Activity in Normal and Malignant Hematopoietic Cells, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 92: 9082-9086
308. Hiyama, K., Hirai, Y., Kyoizumi, S., Akiyama, M., Hiyama, E., Piatyszek, M. A., Shay, J. W., Ishioka, S., Yamakido, M. (1995) Activation of Telomerase in Human Lymphocytes and Hematopoietic Progenitor Cells, *J. Immunol.*, 155: 3711-3715
309. Miller, R.A. (1996) The Aging Immune System: Primer and Prospectus, *Science*, 273: 70-74

310. Butcher, S., Chahel, H., Lord, J.M. (2000) Ageing and the Neutrophil: no Appetite for killing?, *Immunology*, 100: 411-416
311. Allsopp, R.C., Vaziri, H., Patterson, C., Goldstein, S., Younglai, E.V., Futcher, A., Greider, C., Harley, C.B. (1992) Telomere Length predicts replicative Capacity of Human Fibroblasts, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 89: 10114-10118
312. Wright, W.E., Piatyszek, M.A., Rainey, W.E., Byrd, W., Shay, J.W. (1996) Telomerase Activity in Normal and Malignant Hematopoietic Cells, *Dev. Genet.*, 18: 173-179
313. Vaziri, H., Dragowska, W., Allsopp, R.C., Thomas, T.E., Harley, C.B., Lansdorp, P.M. (1994) Evidence for a mitotic Clock in Human Hemato-poietic Stem Cells: Loss of Telomeric DNA with Age, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 91: 9857-9860
314. Engelhardt, M., Kumar, R., Albanell, J., Pettengell, R., Han, W., Moore, M.A. (1997) Telomerase Regulation, Cell Cycle and Telomere Stability in Primitive Hematopoietic Cells, *Blood*, 90: 182-193
315. Notaro, R., Cimmino, A., Tabarini, D., Rotoli, B., Luzzatto, L. (1997) In Vivo Telomere Dynamics of Human Hematopoietic Stem Cells, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 94: 13782-13785
316. Wynn, R.F., Cross, M.A., Hatton, C., Will, A. M., Lashford, L.S., Dexter, T.M., Testa, N.G. (1998) Accelerated Telomere Shortening in Young Recipients of Allogeneic Bone-marrow Transplants, *Lancet*, 351: 178-181
317. Wynn, R., Thornley, I., Freedman, M., Saunders, E.F. (1999) Telomere Shortening in Leucocyte Subsets of Long-term Survivors of Allogeneic Bone Marrow Transplantation, *Br. J. Haematol.*, 105: 997-1001
318. Lee, J., Kook, H., Chung, I., Kim, H., Park, M., Kim, C., Nah, J., Hwang, T. (1999) Telomere Length Changes in patients undergoing Hematopoietic Stem Cell Transplantation, *Bone Marrow Transplant*, 24: 411-415
319. Rufer, N., Brummendorf, T.H., Chapuis, B., Helg, C., Lansdorp, P.M., Roosnek, E. (2001) Accelerated Telomere shortening in Hematological Lineages is limited to the first year following Stem Cell Transplantation, *Blood*, 97: 575-577
320. Mathioudakis, G., Storb, R., McSweeney, P.A., Torok-Storb, B., Lansdorp, P.M., Brummendorf, T.H., Gass, M.J., Bryant, E.M., Storek, J., Flowers, M.E., Gooley, T., Nash, R.A. (2000) Polyclonal Hematopoiesis with variable Telomere Shortening in Human Long-term Allogeneic Marrow Graft Recipients, *Blood*, 96: 3991-3994
321. Akiyama, M., Asai, O., Kuraishi, Y., Urashima, M., Hoshi, Y., Sakamaki, H., Yabe, H., Furukawa, T., Yamada, O., Mizoguchi, H., Yamada, H. (2000) Shortening of Telomeres in Recipients of both Autologous and Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation, *Bone Marrow Transplant.*, 25: 441-447
322. Brummendorf, T.H., Rufer, N., Baerlocher, G.M., Roosnek, E., Lansdorp, P.M. (2001) Limited Telomere Shortening in Hematopoietic Stem Cells after Transplantation, *Ann. N.Y. Acad. Science*, 938: 1-7

323. Weng, N.P., Levine, B.L., June, C.H., Hodes, R.J. (1995) Human Naive and Memory T Lymphocytes differ in Telomeric Length and Replicative Potential, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 92: 11091-11094
324. Son, N.H., Murray, S., Yanovski, J., Hodes, R.J., Weng, N. (2000) Lineage-specific Telomere shortening and unaltered Capacity for Telomerase Expression in Human T and B Lymphocytes with Age, *J. Immunol.*, 165: 1191-1196
325. Weng, N., Levine, B.L., June, C.H., Hodes, R.J. (1996) Regulated Expression of Telomerase Activity in Human T Lymphocyte Development and Activation, *J. Exp. Med.*, 183: 2471-2479
326. Xu, D., Gruber, A., Peterson, C., Pisa, P. (1996) Suppression of Telomerase Activity in HL60 Cells after treatment with differentiating Agents, *Leukemia*, 10: 1354-1357
327. Bestilny, L.J., Brown, C.B., Miura, Y., Robertson, L.D., Riabowol, K.T. (1996) Selective Inhibition of Telomerase Activity during Terminal Differentiation of Immortal Cell Lines, *Cancer Res.*, 56: 3796-3802
328. Savovsky, E., Yoshida, K., Ohtomo, T., Yamaguchi, Y., Akamatsu, K., Yamazaki, T., Yoshida, S., Tsuchiya, M. (1996) Down-regulation of Telomerase Activity is an Early Event in the differentiation of HL60 Cells, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 226: 329-334
329. Holt, S.E., Wright, W.E., Shay, J.W. (1996) Regulation of Telomerase Activity in Immortal Cell Lines, *Mol. Cell. Biol.*, 16: 2932-2939
330. Sharma, H.W., Maltese, J.Y., Zhu, X., Kaiser, H.E., Narayanan, R. (1996) Telomeres, Telomerase and Cancer: is the magic bullet real?, *Anticancer Res.*, 16: 511-515
331. Castedo M. et al, *Journal Immunology* (1996) Sequential Acquisition of Mitochondrial and Plasma Membrane Alterations during Early Lymphocyte Apoptosis, *Journal Immunology*, 157: 512-521
332. Koupman G., Rentelingsperger CPM, Kuijten GAM, Keehnen RMJ, Pals ST and Van Oers MHJ (1994) Annexin V for Flow Cytometric Deletion of Phosphatidylserine expression of B-Cells Undergoing Apoptosis, *Blood*; 84: 1415-1420
333. Ludger Sellman et al (2011) Telomeres and Prognosis in Patients with Chronic Lymphocytic Leukemia, *Int. Journal of Hematology*, 93: 74-82
334. Verstovsek S. et al (2004) Telomerase Activity is not a Prognostic Factor in Chronic Lymphocytic Leukemia: *Leukemia Research* 28: 707-711
335. Τσιριγώτης Παναγιώτης (2004) *Διδακτορική Διατριβή*, σ. 6
336. Göran Roos, Alexander Kröber, Pawel Grabowski et al (2008) Short Telomeres are Associated with Genetic Complexity, High-risk Genomic Aberrations and Short Survival in Chronic LL, *Blood* 111: 2246-2252
337. Pawel Grabowski, Magnus Hultdin et al (2005) Telomere Length as a Prognostic Parameter in Chronic Lymphocytic Leukemia with Special Reference to VH Gene Mutation Status: *Blood*, Vol. 105, No. 12: 4807-4812

338. Powel Grabowski (2011) Telomere Length as Prognostic Parameter in Chronic Lymphocytic Leukemia, *Διδακτορική Διατριβή Πανεπιστήμιο Σουηδίας*
339. Samassekov O., Gadji M., Drain R., Yan J. (2010) Sizing the Ends: Normal Length of Human Telomeres, *Anal. of Anatomy – Anatomischer Anzeiger*, 192: 284-291
340. Ladetto M., Compagno M., Ricca I. et al (2004) Telomere Length Correlates with Histopathogenesis according to the Germinal Center in Mature B-Cell Lymphoproliferative Disorders, *Blood* 103, No. 12: 4644-4649
341. Thet Lin, Boitelo T., Letsolo, Rhianuon E., Jones, Tan Rowson et al (2010) Telomere Dysfunction and Fusion during the Progression of Chronic Lymphocytic Leukemia: Evidence for a Telomere Crisis, *Blood* Vol. 116, No. 11: 1899-1907
342. Adeline Angereau, Claire T'kint de Roodenbeke, Thomas Simonet et al (2011) Telomeric Damage in Early Stage of Chronic Lymphocytic Leukemia correlates with Shelterin Dysregulation, *Blood*, Vol. 118 No. 5: 1316-1322
343. Oliver E. Bechter, Wolfgang Eisterer, Georg Pall, Wolfgang Hibe, Thomas Kühr and Josef Thaler (1998) Telomere Length and Telomerase Activity Predict Survival in Patients with B-cell CLL, *Cancer Res*, 58: 4918
344. Enrica Rampazzo, Laura Bonaldi, Livio Trentin, Carlo Visco, Sonia Keppel et al (2012) Telomere Length and Telomerase Levels define Subgroups of B-cell CLL with Different Biological Characteristics and Clinical Outcomes, *Haematologica* Vol. 97, No. 1: 56-63
345. Christofer M. Counter, Jyothi Gupta, Calvin B., Harley et al (1995) Telomerase Activity in Normal Leukocytes and in Hematologic Malignancies, *Blood* Vol. 85, No. 9, pp: 2315-2320
346. Dominique Broccoli, James W. et al (1995) Telomerase Activity in Normal and Malignant Hematopoietic Cells, *Cell Biology, Proc. Natl. Acad. SCI USA*, Vol. 92, pp: 9082-9086
347. Livio Trentin, Gianna Ballon, Lucia Ometto et al (1999) Telomere Activity in Chronic Lymphoproliferative Disorders of B-Cell Lineage, *British Journal of Haematology*, Vol. 106, p. 662
348. Yasumoto S., Kunimura C., Kikuchik et al (1996) Telomerase Activity in Normal Human Epithelial Cells, *Oncogene*; 13(2): 433-9
349. Bechter O.E., Eisterer W., Pall G., Hilb W. et al (1998) Telomere Length and Telomerase Activity Predict Survival in Patients with B-Cell CLL, *Cancer Research* Vol. 58, pp. 4918-4922
350. Stewart S.A., Weinhera R.A. (2000) Telomerase and Human Tumorigenesis, *Semin, Cancer Biol.* 10(6): 399-406
351. Ohvashiki I.H., Sachida G., Tauchi T., Ohvashiki K. (2002) Telomeres and Telomerase in Hematologic Neoplasia, *Oncogene* 21(4): 680-7
352. Deville I., Hillion I., Segal – Rendirdilan F. (2009) Telomerase Regulation in Hematological Cancers: a Matter of Stemness? *Biochim Biophys Acta* 1792(4): 229-39

353. Grabowski P., Hultdin M., Karlsson K. et al (2005) Telomere Length as a Prognostic Parameter in CLL with Special Reference to VH Gene Mutation Status, *Blood*; 105: 4807-4812
354. Ricca I., Rolli A., Orandi D et al (2007) Telomere Length identifies two Different Prognostic Subgroups among VH-unmutated B-cell CLL Patients, *Leukemia* 21: 697-705
355. Roos G., Krober A., Grabowski P. et al (2008) Short Telomeres are associated with Genetic Complexity, High-risk Genomic Aberrations and Short Survival in CLL, *Blood* 111: 2246-2252
356. Hultdin M., Rosengnist R., Thunberg U. et al (2003) Association Between Telomere Length and VH Gene Mutation Status in CLL: Clinical and Biological Implication, *B. J. Cancer*; 88(4): 593-8
357. Tchirkon A., Chaletax C., Magnall et al (2004) INTERT Expression and Prognosis in B-CLL, *Annals of Oncology*; 15: 1476-1480
358. Terrin L., Trentin L., Degan M. et al (2007) Telomerase Expression in B-Cell CLL predicts Survival and delineates Subgroups of Patients with the same IgVH Mutation Status and Different Outcome, *Leukemia*; 21: 965-972
359. Rajendra N. Damle, Franak M. Batliwalla, Fabio Chiotto, Angelo Valetto et al (2004) Telomere Length and Telomerase Affinity define Distinctive Replicative Features of the B-CLL Subgroups defined by Immunoglobulin V Gene Mutations, *Blood*; Vol. 103, No. 2: 375-382
360. Delphine Poncet, Aurélie Belleville, Claire t' kint de Roodenbeke et al (2008) Changes in the Expression of Telomere Maintenance Genes suggest Global Telomere Dysfunction in B-CLL, *Blood*; Vol 111, No. 4: 2388-2391
361. Ludger S. et al (2011) Telomere and Prognosis in Patients with CLL, Vol. 93, Issue 1, pp. 74-82
362. Marco Ladetto (2010) Telomere Disrupts, CLL Progresses, *Blood*; Vol. 116, No. 11: 1821-1822
363. Mahitos Mandal, Rakesh Kumar (1997) BCL-2 modulates Telomerase Activity, *Journal of Biological Chemistry* 272: 14183-14187
364. Schimmer A.D., Munk – Pedersen I., Minden M.D., Reed J.C. (2003) BCL-2 and Apoptosis in CLL, *Curr Treat Options Oncol*; 4(3): 211-8
365. Chaya Venket, Targeting BCL-2, CLL Topics: BCL-2 as Target for CLL Therapy – Genasense, AT-101 and GX 15-070
366. Campas C., Cosialls A.M., Barragan M. et al (2006) BCL-2 Inhibitors induce Apoptosis in CLL Cells, *Exp. Hematol*; 34(12): 1663-9
367. Lessen P., Guillaume, Czabotar, Peter E., Colman, Peter M. (2008) BCL-2 Family antagonists for Cancer Therapy, *Nature Reviews Drug Discovery*

368. Andrea G.S. Buggins, Chris J. Pepper (2010) The Role of BCL-2 Family Proteins in CLL, *Leukemia Research*; pp. 837-842
369. Rogalinska M., Kilianska Z.M., (2012) Targeting BCL-2 in CLL, *Curr Med. Chem*; 19(30): 5109-15
370. Lagneaux L., Deflorge A., De Bunyn C., et al (1999) Adhesion to Bone Marrow Stroma inhibits Apoptosis of CLL Cells, *Leuk Lymphoma*; 35(5-6) : 445-53
371. Yair Herishanu, Patricia Perez-Galan et al (2011) The Lymph Node Microenvironment promotes B-CLL Receptor Signaling, NF-KB Activation and Tumor Proliferation in CLL, *Blood*; Vol. 117, No. 2: 563-574
372. Alex Paterson, C. Jan Mockridge, Jemimah E. et al (2012) Mechanisms and Clinical Significance of BIM Phosphorylation in CLL, *Blood* February 16, 2012 Vol 119, No. 7: 1726-1736
373. Shinichi Kitada, Janet Andersen, Sophie Akar et al (1998) Expression of Apoptosis regulating Proteins in CLL: Correlations with in Vitro and in Vivo Chemoresponses, *Blood*; Vol. 91, No. 9: 3379-3389
374. Damle R.N., Batiwalla F.M., Ghotto F. et al (2004) Telomere Length and Telomerase Activity delineate Distinctive Replicative Features of the B-CLL Subgroups defined by Immunoglobulin V-gene Mutations, *Blood* 103(2): 375-82
375. Ricca J., Rocci A., Drandi D., Francese R. et al (2007) Telomere Length Identifies Two Different Prognostic Subgroups among VH – Unmutated B-Cell CLL Patients, *Leukemia*; 21(4): 697-705
376. Rajendra N. Damle, Solar Temburni, Taraneh Banapour et al (2012) T-Cell Independent, B-Cell Receptor – Mediated Induction of Telomerase Activity differs among IGHV Mutation – based Subgroups of CLL Patients, *Blood* Vol. 120, No. 12: 2438-2449
377. Yuri Vasconcelos, Frederic Davi, Vincent Levy et al (2003) Binet's Staging System and VR Genes are Independent but Complementary Prognostic Indicators in CLL, *Journal of Clinical Oncology* Vol. 21, Issue 21 (Nov): 3928-3932
378. Rachel I. Savgent, Fiona E. Craig et al (2009) Comparison of BCL-2 CD38 and ZAP-70 Expression in CLL, *Intl J. Exp. Pathol.* 2: 574-582
379. Rajendra N. Damle, Sonal Tembumi, Carlo Calissano et al (2007) CD38 Expression labels an Activated Subset within CLL Clones enriched in Proliferating B-Cells, *Blood* Vol. 110, Issue 9, Publisher: *American Society of Hematology*, pp. 3352-3359
380. Fabio Malavasi, Silvia Deaglio et al (2011) CD38 and CLL, a Decade Later, *Blood*; Vol. 118, No. 13: 3470-3478
381. Monika Engelhardt, Karen Mackenzie, Pamela Drullinsky et al (2000) Telomerase Activity and Telomere Length in Acute and Chronic Leukemia Pre – and Post – ex vivo Culture, *Cancer Research*; 60: 610-617
382. Nihal S. El-Kinary, Hawaida M. Sharaf, Manal Abd EZ – Hamid (2012) Prognostic Significance of del 17P, ZAP-70 and CD38 as Independent Indicators for B-

CLL: Correlation to Response to Treatment and Disease Outcome, *The Egyptian Journal of Medicap Human Genetics* 13: 173-181

383. Papageorgiou S.G., Kontos C.K. Pappa Basiliki et al (2011) The Novel Member of the BCL-2 Gene Family, BCL-2 L12 is Substantially Elevated in CLL Patients supporting its Value as a Significant Biomarket, *Oncologist*; 16(9): 1280-1291
384. Wyllie A.H., Kerr J.E., Currie A.R. (1980) Cell Death: the Significance of Apoptosis, *Intl Rev. Cytol*; 68: 251-306
385. Ormerod M.G. (1998) The Study of Apoptotic Cells by Flow Cytometry, *Leukemia*; 12(7): 1013-25
386. Kay-Oliver Kliche, Klaus Höffken (1999) The Role of Apoptosis in Hematologic Malignancies and Modulation of Apoptosis as a New Therapeutic Approach, *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*; Vol. 125, Issue 3-4, pp. 226-231
387. Fei Zhong, Michel Harr Geert Bultynck et al (2011) Induction of Ca^{+2} – Driven Apoptosis in Chronic Lymphocytic Leukemia Cells by Peptide – Mediated Disruption of Bcl-2-IP₃ Receptor Interaction, *Blood*, March 2011, Vol. 117, No.10: 2924-2934

* * *