



ΕΘΝΙΚΟ & ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
«ΚΛΙΝΙΚΗ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑ-ΜΟΡΙΑΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΗ»

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

**ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΗΣ ΚΛΙΝΙΚΗΣ ΣΗΜΑΣΙΑΣ miRNA ΣΕ ΜΟΝΟΠΥΡΗΝΑ
ΚΥΤΤΑΡΑ ΑΙΜΑΤΟΣ ΑΣΘΕΝΩΝ ΜΕ ΧΡΟΝΙΑ ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΙΚΗ
ΛΕΥΧΑΙΜΙΑ**

ΑΡΙΣΤΕΙΔΗΣ ΜΙΧΑΗΛ
ΧΗΜΙΚΟΣ

ΑΘΗΝΑ 2019



ΕΘΝΙΚΟ & ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
«ΚΛΙΝΙΚΗ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑ-ΜΟΡΙΑΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΗ»

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

**ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΗΣ ΚΛΙΝΙΚΗΣ ΣΗΜΑΣΙΑΣ miRNA ΣΕ ΜΟΝΟΠΥΡΗΝΑ
ΚΥΤΤΑΡΑ ΑΙΜΑΤΟΣ ΑΣΘΕΝΩΝ ΜΕ ΧΡΟΝΙΑ ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΙΚΗ
ΛΕΥΧΑΙΜΙΑ**

ΑΡΙΣΤΕΙΔΗΣ ΜΙΧΑΗΛ
ΧΗΜΙΚΟΣ

ΑΘΗΝΑ 2019



ΕΘΝΙΚΟ & ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

ΤΟΜΕΑΣ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

**ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΗΣ ΚΛΙΝΙΚΗΣ ΣΗΜΑΣΙΑΣ miRNA ΣΕ ΜΟΝΟΠΥΡΗΝΑ
ΚΥΤΤΑΡΑ ΑΙΜΑΤΟΣ ΑΣΘΕΝΩΝ ΜΕ ΧΡΟΝΙΑ ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΙΚΗ
ΛΕΥΧΑΙΜΙΑ**

**ΑΡΙΣΤΕΙΔΗΣ ΜΙΧΑΗΛ
ΧΗΜΙΚΟΣ**

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΜΕΛΟΣ ΔΕΠ: Σίδερης Διαμάντης, Αναπληρωτής Καθηγητής, Τμήμα Βιολογίας, Εθνικό Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

- Σίδερης Διαμάντης, Αναπληρωτής Καθηγητής, Τμήμα Βιολογίας, Εθνικό Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών
- Σκορίλας Ανδρέας, Καθηγητής, Τμήμα Βιολογίας, Εθνικό Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών
- Κοντός Χρήστος, Επίκουρος Καθηγητής, Τμήμα Βιολογίας, Εθνικό Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών

ΑΘΗΝΑ 2019

Πρόλογος

Η παρούσα διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκε στα πλαίσια του Διατμηματικού Προγράμματος Μεταπτυχιακών Σπουδών με τίτλο «Κλινική Βιοχημεία-Μοριακή Διαγνωστική». Εκπονήθηκε στην Ερευνητική Μονάδα ΙΙΙ του τομέα Βιοχημείας και Μοριακής Βιολογίας του τμήματος Βιολογίας του Εθνικού Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών, υπό την επίβλεψη του Αναπληρωτή Καθηγητή κυρίου Σίδηρη Διαμάντη. Μέρος της πειραματικής διαδικασίας πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας της Αιματολογικής Μονάδας της Β' Προπαιδευτικής Παθολογικής Κλινικής στο Πανεπιστημιακό Γενικό Νοσοκομείο «Αττικόν», με τη συνεργασία και τις οδηγίες του Επιμελητή Ιατρού Αιματολόγου κυρίου Παπαγεωργίου Σωτηρίου και της μεταδιδάκτορα κυρίας Φρίντας Κοντσιώτη.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον επιβλέποντα της διπλωματικής μου εργασίας, Αναπληρωτή καθηγητή κ. Σίδηρη Διαμάντη, για την καθοδήγηση και βοήθεια του σε όλη τη διάρκεια της συγκεκριμένης διπλωματικής εργασίας. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιμελητή Ιατρό Αιματολόγο κ. Παπαγεωργίου για τη καλή συνεργασία και τη βοήθειά του όπως και τη συνεργάτη του κ. Φρίντα Κοντσιώτη, στα πλαίσια της συλλογής και μέρους της επεξεργασίας των δειγμάτων ασθενών με Χρόνια Λεμφοκυτταρική Λευχαιμία, στο Πανεπιστημιακό Γενικό Νοσοκομείο «Αττικόν».

Ευχαριστώ, ακόμη, τον καθηγητή κ. Σκορίλα Ανδρέα και τον επίκουρο καθηγητή κ. Κοντό Χρήστο, ως μέλη της τριμελούς εξεταστικής επιτροπής στη διπλωματική μου εργασία.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον υποψήφιο διδάκτορα του τομέα Βιοχημείας και Μοριακής Βιολογίας του τμήματος Βιολογίας κ. Μάριο Διαμαντόπουλο, για την σημαντική συμβολή και βοήθεια που μου προσέφερε σε όλη τη διάρκεια της εκπόνησης της παρούσας εργασίας.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω, επίσης, τα υπόλοιπα μέλη της ερευνητικής μονάδας ΙΙΙ του κ. Σίδηρη, τις Λερούνη Αικατερίνη, Στυλιανουδάκη Ιωάννα, Αναγνώστου Ευαγγελία και Τατούλη Μαρία, για το υπέροχο κλίμα και την εξαιρετική συνεργασία στα πλαίσια του εργαστηρίου, όπως και την υποψήφια διδάκτορα κ. Κοκκινοπούλου Ιωάννα και την Δρ. Κραββαρίτη Ελευθερία, για τη συνολική βοήθεια στο χώρο του εργαστηρίου. Ευχαριστώ, ακόμη, όλα τα μέλη του τομέα Βιοχημείας και Μοριακής Βιολογίας του τμήματος Βιολογίας για την αρμονική συνεργασία.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την οικογένεια μου και το φιλικό μου περιβάλλον για τη στήριξη τους.

Περιεχόμενα

1.	ΕΙΣΑΓΩΓΗ	1
1.1.	ΓΕΝΙΚΑ ΓΙΑ ΤΙΣ ΛΕΥΧΑΙΜΙΕΣ	1
1.1.1.	Ορισμός και βασικές πληροφορίες για τη Λευχαιμία	1
1.1.2.	Αιμοποίηση, Φυσιολογικά και Λευχαιμικά Κύτταρα του Αίματος	2
1.1.3.	Ταξινόμηση των κυριότερων μορφών Λευχαιμίας	5
1.2.	ΧΡΟΝΙΑ ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΛΕΥΧΑΙΜΙΑ	9
1.2.1.	Βασικές πληροφορίες για τη Χρόνια Λεμφοκυτταρική Λευχαιμία	9
1.2.2.	Μηχανισμοί και Παθοφυσιολογία της νόσου	13
1.2.3.	Διάγνωση	17
1.2.4.	Πρόγνωση	19
1.2.5.	Θεραπευτική αντιμετώπιση της νόσου	24
1.3.	MicroRNA ΚΑΙ ΧΡΟΝΙΑ ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΛΕΥΧΑΙΜΙΑ	30
1.3.1.	Ορισμός και Βιογένεση των microRNAs	30
1.3.2.	Βασικές λειτουργίες των microRNAs και ρόλος τους στην παθοφυσιολογία ασθενειών όπως ο Καρκίνος	36
1.3.3.	Τα microRNAs στη Χρόνια Λεμφοκυτταρική Λευχαιμία	40
1.3.4.	Τα microRNA-451a, microRNA-486-5p και microRNA-582-5p στη Χρόνια Λεμφοκυτταρική Λευχαιμία	45
1.3.4.1.	MicroRNA-451a	45
1.3.4.2.	MicroRNA-486-5p	46
1.3.4.3.	MicroRNA-582-5p	47
1.4.	ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ	48
2.	ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	50

2.1. ΥΛΙΚΑ	50
2.1.1. Χημικά Αντιδραστήρια	50
2.1.2. Μοριακά Αντιδραστήρια - Ένζυμα	50
2.1.3. Εκκινητές	51
2.1.4. Κυτταρικές Σειρές	52
2.2. ΜΕΘΟΔΟΙ	52
2.2.1. Συλλογή και επεξεργασία δειγμάτων περιφερικού αίματος ασθενών με Β-Χρόνια Λεμφοκυτταρική Λευχαιμία	52
2.2.2. Απομόνωση ολικού RNA	54
2.2.3. Φασματοφωτομετρικός Προσδιορισμός της συγκέντρωσης και έλεγχος της καθαρότητας του απομονωμένου Ολικού RNA	55
2.2.4. Σχεδιασμός Εκκινητών για τα microRNA 451a, 486-5p, 582-5p και 95-3p	56
2.2.5. Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (PCR)	57
2.2.5.1. PCR Αντίστροφης Μεταγραφής με στάδιο Πολυαδενυλίωσης (PAP RT-PCR)	60
2.2.5.2. Ποσοτική PCR Πραγματικού Χρόνου(Real-Time qPCR)	63
2.2.6. Στατιστική Ανάλυση	67
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	68
3.1. ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΣ ΜΟΝΟΠΥΡΗΝΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΠΕΡΙΦΕΡΙΚΟΥ ΑΙΜΑΤΟΣ - ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΟΛΙΚΟΥ RNA	68
3.2. ΦΑΣΜΑΤΟΦΩΤΟΜΕΤΡΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ ΚΑΙ ΕΛΕΓΧΟΣ ΤΗΣ ΚΑΘΑΡΟΤΗΤΑΣ ΤΟΥ ΑΠΟΜΟΝΩΜΕΝΟΥ ΟΛΙΚΟΥ RNA	68
3.3. ΕΛΕΓΧΟΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΩΝ microRNA-451a, microRNA-486-5p, microRNA-582-5p ΚΑΙ microRNA-95-3p ΜΕ REAL-TIME Q-PCR	69
3.4. ΠΟΣΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΩΝ microRNA-451a, microRNA-486-5p ΚΑΙ microRNA-582-5p ΣΕ ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ ΧΡΟΝΙΑ ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΛΕΥΧΑΙΜΙΑ	72

3.5.	ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ	75
3.5.1.	Σύγκριση των επιπέδων έκφρασης των microRNA-451a, microRNA-486-5p και microRNA-582-5p μεταξύ ασθενών με ΧΛΛ και υγιών ατόμων	76
3.5.2.	Καμπύλες ROC για τα microRNA-451a, microRNA-486-5p και microRNA-582-5p	79
3.5.3.	Σύγκριση των επιπέδων έκφρασης των microRNA-451a, microRNA-486-5p και microRNA-582-5p στους ασθενείς με ΧΛΛ, με τα κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά τους	81
3.5.4.	Ανάλυση ολικής επιβίωσης (OS) των ασθενών με ΧΛΛ για τα microRNA-451a, microRNA-486-5p και microRNA-582-5p	86
3.5.4.1.	Ενδεικτικές καμπύλες επιβίωσης Kaplan-Meier, για διαδεδομένους δείκτες πρόγνωσης της ΧΛΛ	86
3.5.4.2.	Καμπύλες ολικής επιβίωσης Kaplan-Meier για τα microRNA-451a, microRNA-486-5p και microRNA-582-5p	88
4.	ΣΥΖΗΤΗΣΗ - ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	91
5.	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	97

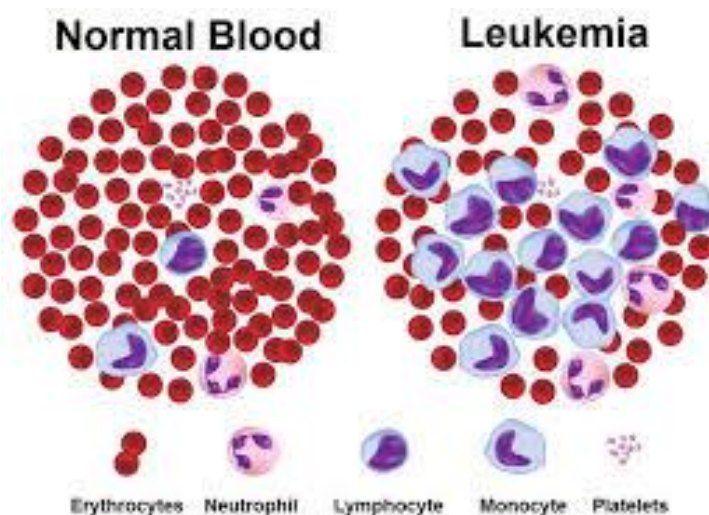
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1. ΓΕΝΙΚΑ ΓΙΑ ΤΙΣ ΛΕΥΧΑΙΜΙΕΣ

1.1.1. Ορισμός και βασικές πληροφορίες για τη Λευχαιμία

Οι λευχαιμίες είναι μια ετερογενής ομάδα αιματολογικών νεοπλασιών που χαρακτηρίζονται από αυξημένο αριθμό λευκών αιμοσφαιρίων (Σχήμα 1.1.), συγκεκριμένα λεμφοκυττάρων, στον μυελό των οστών, στο περιφερικό αίμα ή και στα δύο.

Τα κυρίαρχα εμφανιζόμενα κύτταρα μπορεί να είναι ώριμα, όπως στη χρόνια λεμφοκυτταρική λευχαιμία (ΧΛΛ), ή πρόδρομα κύτταρα όπως στις οξείες λευχαιμίες, ή συνδυασμός των παραπάνω όπως στη χρόνια μυελογενή λευχαιμία (ΧΜΛ). [1]



Σχήμα 1.1. Η λευχαιμία είναι μια ετερογενής ομάδα αιματολογικών νεοπλασιών που χαρακτηρίζεται από αυξημένο αριθμό λευκών αιμοσφαιρίων

Στους εφήβους και τους νεαρούς ενήλικες, οι οξείες λευχαιμίες είναι οι πιο διαδεδομένες, με τη χρόνια μυελογενή λευχαιμία να εμφανίζεται σπάνια. Οι παράγοντες που σχετίζονται με περισσότερες επιθετικές μορφές της ασθένειας τείνουν να αυξάνονται σε συχνότητα αναλογικά με την αύξηση της ηλικίας, ενώ η ανεκτικότητα σε στρατηγικές θεραπείας μειώνεται.[1]

Οι λευχαιμίες μπορεί να εμφανιστούν σε όλες τις ηλικίες, από τα νεογέννητα μέχρι πολύ μεγάλες ηλικίες, αλλά η κάθε μορφή λευχαιμίας εμφανίζεται σε διαφορετικές ηλικίες. Η οξεία λεμφοβλαστική λευχαιμία (ΟΛΛ) εμφανίζεται κυρίως σε πολύ νεαρές ηλικίες και σπάνια σε ενήλικες, ενώ η οξεία μυελογενής λευχαιμία (ΟΜΛ) εμφανίζεται λιγότερο σε σχέση με την οξεία λεμφοβλαστική λευχαιμία στην παιδική ηλικία και περισσότερο σε ενήλικες. Η χρόνια μυελογενής λευχαιμία (ΧΜΛ) είναι πολύ σπάνια σε νεαρά παιδιά, και η

χρόνια λεμφοκυτταρική λευχαιμία (ΧΛΛ), η πιο κοινή μορφή λευχαιμίας στο Δυτικό κόσμο, εμφανίζεται σχεδόν αποκλειστικά σε ενήλικες άνω των 40 ετών, με μέση ηλικία διάγνωσης μεγαλύτερη των 70 ετών. [1]Ακόμη, οι άντρες σε μεγαλύτερο ποσοστό διαγιγνώσκονται και πεθαίνουν από λευχαιμία σε σχέση με τις γυναίκες.

Συμπτώματα: Πιθανά συμπτώματα που δηλώνουν εμφάνιση λευχαιμίας, κυρίως σε μικρές ηλικίες, μπορεί να είναι:

- χλωμό δέρμα,
- πυρετός
- διογκωμένος σπλήνας ή συκώτι, [2]
- η εύκολη αιμορραγία και δημιουργία μώλωπα,
- απώλεια βάρους,
- συχνή αδυναμία,
- σοβαρές μολύνσεις
- απώλεια όρεξης
- ρινορραγία
- πόνος στα οστά. [3]

Αίτια: Οι ακριβείς λόγοι για τους οποίους προκύπτουν οι διάφορες μορφές λευχαιμίας, δεν είναι ακόμη γνωστοί από τους επιστήμονες. Παρόλα αυτά, εκτιμάται ότι ένας συνδυασμός γενετικών και περιβαλλοντικών παραγόντων παίζουν, πιθανόν, ρόλο στην εμφάνιση λευχαιμίας.[4]

Υπάρχουν ορισμένοι **παράγοντες κινδύνου**(Risk Factors), οι οποίοι μπορεί να αυξάνουν την πιθανότητα εμφάνισης λευχαιμίας. Αυτοί περιλαμβάνουν:

- Κάπνισμα
- ιονίζουσα ακτινοβολία
- ορισμένες χημικές ουσίες (όπως το βενζόλιο)
- πιθανότητα να έχει προηγηθεί χημειοθεραπεία (λόγω κάποιας άλλης μορφής καρκίνου)
- γενετικές διαταραχές (όπως το σύνδρομο Down) [4]
- Άτομα με οικογενειακό ιστορικό λευχαιμίας βρίσκονται επίσης σε μεγαλύτερο κίνδυνο να εμφανίσουν λευχαιμία

1.1.2. Αιμοποίηση, Φυσιολογικά και Λευχαιμικά Κύτταρα του Αίματος

Για να γίνει καλύτερα κατανοητή η παθογένεση της λευχαιμίας, και πως μπορεί να επηρεάσει τα κύτταρα του αίματος, θα ήταν χρήσιμο να γνωρίζει κανείς τα στάδια διαφοροποίησης των φυσιολογικών αιμοποιητικών κυττάρων. [5] Τα μυελοειδή και λεμφοειδή προγονικά κύτταρα προέρχονται από τα πολυδύναμα βλαστοκύτταρα και γεννούν μυελοειδή και λεμφοειδή κύτταρα, αντίστοιχα. Τα πρώτα αναγνωρίσιμα πρόδρομα κύτταρα μυελού των οστών είναι οι προμονοβλάστες που διαφοροποιούνται σε ερυθροκύτταρα, μυελοβλάστες, μονοβλάστες, μεγακαρυοκύτταρα και λεμφοβλάστες που

διαφοροποιούνται σε ουδετερόφιλα, μονοκύτταρα, αιμοπετάλια και λεμφοκύτταρα αντίστοιχα.

- **Φυσιολογικά Κύτταρα του Αίματος:**

Όλα τα κύτταρα του αίματος προέρχονται από τα βλαστικά κύτταρα του αίματος. Παρότι ορισμένα βλαστικά κύτταρα του αίματος βρίσκονται στο αίμα, τα περισσότερα βρίσκονται στο μυελό των οστών. Τα αιμοποιητικά βλαστοκύτταρα παράγουν τρία είδη κυττάρων του αίματος:

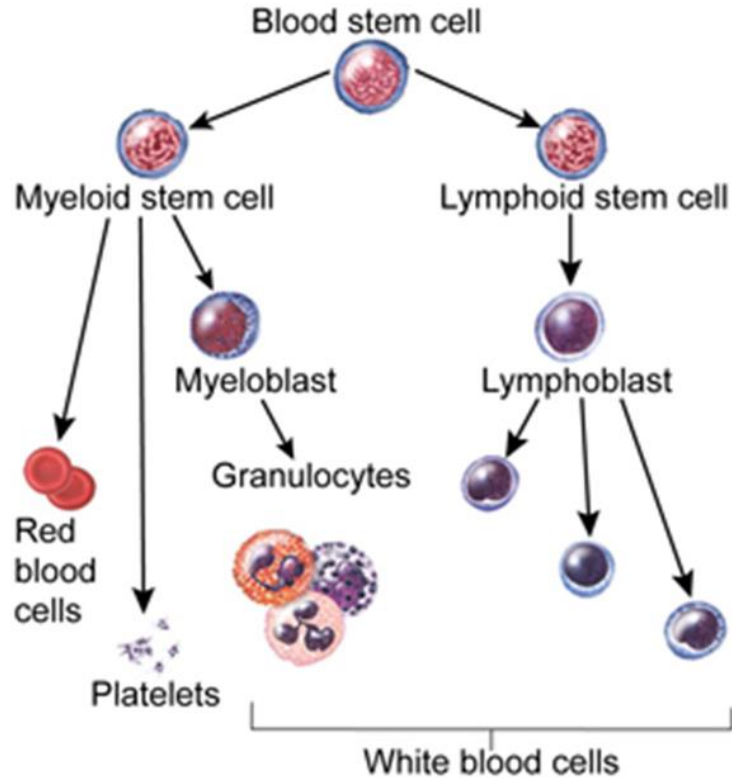
- Ερυθρά Αιμοσφαίρια: Τα ερυθρά αιμοσφαίρια μεταφέρουν και «κουβαλούν» οξυγόνο σε ολόκληρο το σώμα.
- Αιμοπετάλια (Platelets): Τα αιμοπετάλια σχηματίζουν θρόμβους στο αίμα, ώστε να καθυστερήσουν ή να σταματήσουν την αιμορραγία.
- Λευκά Αιμοσφαίρια: Τα λευκά αιμοσφαίρια βοηθούν στην αντιμετώπιση μολύνσεων.

Καθώς τα κύτταρα του αίματος γερνούν ή εάν υποστούν βλάβη, οδηγούνται σε κυτταρικό θάνατο και τα βλαστοκύτταρα του αίματος παράγουν νέα[5].

- **Φυσιολογικά Μυελοειδή και Λεμφοειδή κύτταρα:**

Όλα τα κύτταρα του αίματος παράγονται από τα βλαστοκύτταρα του αίματος, όπως αναφέρθηκε. Υπάρχουν δύο πιθανές διαδρομές. Ένα βλαστικό κύτταρο του αίματος μπορεί να παράγει τόσο μυελοειδή βλαστικά κύτταρα όσο και λεμφοειδή βλαστικά κύτταρα(Σχήμα 1.2.):

- Μυελοειδή κύτταρα: Ένα μυελοειδές βλαστικό κύτταρο μπορεί να παράγει ερυθρά αιμοσφαίρια και αιμοπετάλια. Επιπλέον, είναι πιθανό να παράγει μυελοβλάστες(βλάστης ονομάζεται ένας τύπος μη ώριμων κυττάρων). Οι μυελοβλάστες μπορούν να παράγουν πολλούς τύπους λευκών αιμοσφαιρίων, γνωστά ως κοκκιοκύτταρα.
- Λεμφοειδή κύτταρα: Ένα λεμφοειδές βλαστικό κύτταρο μπορεί να παράγει λεμφοβλάστες, οι οποίοι μπορούν να παράγουν πολλούς τύπους λευκών αιμοσφαιρίων, διαφορετικών από τα κοκκιοκύτταρα[5].



Σχήμα 1.2. Όλα τα αιμοσφαίρια παράγονται με βλαστικά κύτταρα αίματος. Το μυελοειδές μονοπάτι οδηγεί σε ερυθρά αιμοσφαίρια, αιμοπετάλια και λευκά αιμοσφαίρια και το λεμφοειδές μονοπάτι οδηγεί σε διαφορετικούς τύπους αιμοσφαιρίων.

- **Λευχαιμικά κύτταρα:**

Η λευχαιμία μπορεί να θεωρηθεί ως ένας νεοσχηματισμένος, μη φυσιολογικός αιμοποιητικός ιστός που ξεκινά από λίγα λευχαιμικά βλαστοκύτταρα, τα οποία υποβάλλονται σε μια παρεκκλίνουσα και κακώς ρυθμιζόμενη διαδικασία, ανάλογη με εκείνη των φυσιολογικών αιμοποιητικών βλαστοκυττάρων[6].

Από πολλές απόψεις, ένα λευχαιμικό κύτταρο μοιάζει με ένα βλαστικό κύτταρο. Τα βλαστοκύτταρα ορίζονται ως κλωνογόνα κύτταρα, ικανά τόσο για αυτοανανέωση όσο και για διαφοροποίηση σε πολλές κυτταρικές σειρές. Τα κύτταρα του αιμοποιητικού συστήματος παράγονται συνεχώς από αιμοποιητικά ή αιμοποιητικά βλαστοκύτταρα [7-10]. [6]

Τα λευχαιμικά βλαστοκύτταρα, αρχίζουν να παράγονται από το μυελό των οστών. Στη συνέχεια, διαιρούνται για να παράγουν αντίγραφα των ίδιων. Τα αντίγραφα διαιρούνται ξανά και ξανά, παράγοντας όλο και περισσότερα λευχαιμικά κύτταρα [5].

Σε αντίθεση με τα φυσιολογικά κύτταρα του αίματος, τα λευχαιμικά κύτταρα δεν υφίστανται κυτταρικό θάνατο. Για αυτό το λόγο, συσσωρεύονται σε μεγάλο βαθμό, ξεπερνώντας σε αριθμό τα φυσιολογικά κύτταρα του αίματος και αναστέλλοντας την παραγωγή και λειτουργία τους. Τα χαμηλά επίπεδα φυσιολογικών κυττάρων του αίματος, εμποδίζουν την πρόσληψη οξυγόνου στους ιστούς, τον έλεγχο αιμορραγιών και την

καταπολέμηση των λοιμώξεων. Επιπλέον, τα συγκεκριμένα κύτταρα εξαπλώνονται και σε άλλα όργανα, όπως οι λεμφαδένες, ο σπλήνας και ο εγκέφαλος[5].

Τα στοιχεία που προκύπτουν από τη βιολογία των βλαστικών κυττάρων προσφέρουν νέες γνώσεις για τη βιολογία του καρκίνου, δίνοντας έμφαση στη σχέση μεταξύ βλαστικών κυττάρων και κυττάρων όγκου και επισημαίνοντας ότι οι όγκοι μπορεί να περιέχουν μερικά καρκινικά βλαστικά κύτταρα, σπάνια κύτταρα με απεριόριστο δυναμικό πολλαπλασιασμού που οδηγούν στον σχηματισμό και ανάπτυξη όγκων [11]. Και οι δύο τύποι κυττάρων έχουν εκτεταμένο δυναμικό πολλαπλασιασμού και την ικανότητα να δημιουργούν νέους αιμοποιητικούς ιστούς, φυσιολογικούς στην πρώτη περίπτωση και μη φυσιολογικούς στη δεύτερη. Τόσο οι φυσιολογικοί όσο και οι λευχαιμικοί ιστοί αποτελούνται από ένα συνδυασμό ετερογενών κυττάρων, με διαφορετικά φαινοτυπικά χαρακτηριστικά και πολλαπλασιαστικά δυναμικά[6].

Ο μηχανισμός της Αιμοποίησης, δηλαδή ο σχηματισμός διαφόρων τύπων κυττάρων του αίματος, όπως αναφέρθηκε παραπάνω, είναι απαραίτητος για την ανάπτυξη και επιβίωση ενός φυσιολογικού ατόμου. Στους ανθρώπους, η αιμοποίηση ξεκινά στον αμνιακό σάκο κατά τη διάρκεια της εμβρυογένεσης και μεταβαίνει προσωρινά στο ήπαρ πριν τελικά προκύψει η οριστική αιματοποίηση στον μυελό των οστών και στον θύμο αδέν, συνεχίζοντας καθ' όλη τη διάρκεια ζωής του ενήλικα [12] [13].

Οι ανωμαλίες στο φυσιολογικό αναπτυξιακό πρόγραμμα για τον σχηματισμό αιμοποιητικών κυττάρων έχουν ως αποτέλεσμα τη δημιουργία αιματολογικών παθήσεων, συμπεριλαμβανομένης της λευχαιμίας[12]. Η μελέτη, λοιπόν, της αιμοποίησης και η κατανόηση των κυτταρικών και μοριακών ελέγχων της φυσιολογικής ανάπτυξης των κυττάρων του αίματος, μπορεί να βοηθήσει τους επιστήμονες και κλινικούς, στην καλύτερη κατανόηση των διαδικασιών πίσω από τις διαταραχές του αίματος και την απάντηση σε ερωτήσεις σχετικά με την προέλευση και τη θεραπεία αυτών των ασθενειών[12, 13].

Ακόμη, η αναγνώριση και ο καθαρισμός των λευχαιμικών βλαστικών κυττάρων θεωρείται πως μπορεί να αποτελέσει ένα ισχυρό διαγνωστικό, προγνωστικό και θεραπευτικό εργαλείο στην κλινική πράξη[6]. Τα αιμοποιητικά βλαστικά κύτταρα, μπορούν να χρησιμεύσουν ως μοντέλο, για την κατανόηση των βλαστικών κυττάρων των ιστών και να γίνει πιο καλά αντιληπτός ο ρόλος τους στη γήρανση και την ογκογένεση [13] [12].

1.1.3. Ταξινόμηση των κυριότερων μορφών Λευχαιμίας

Κλινικά και παθολογικά, η λευχαιμία διακρίνεται σε μία ποικιλία μεγάλων ομάδων. Ανάλογα με τον **κυτταρικό τύπο** που εμπλέκεται και με την **κλινική πορεία**, οι διάφορες μορφές λευχαιμίας ταξινομούνται ως εξής:

- **Οξεία**

Τα ανώριμα λευκά αιμοσφαίρια, γνωστά ως βλάστες, αναπτύσσονται ραγδαία. Η συσσώρευση των κυττάρων αυτών στο μυελό των οστών, δεν του επιτρέπει την παραγωγή υγιών λευκών αιμοσφαιρίων. Αυτό μπορεί να προκαλέσει σοβαρά συμπτώματα άμεσα. Τα καρκινικά αυτά κύτταρα, στην πορεία, περνούν στην κυκλοφορία του αίματος, και στη συνέχεια σε άλλα όργανα.

➤ **Οξεία Λεμφοβλαστική Λευχαιμία (ΟΛΛ):**

Η οξεία λεμφοβλαστική λευχαιμία είναι μία μορφή καρκίνου της λεμφοειδούς γραμμής των κυττάρων του αίματος, η οποία χαρακτηρίζεται από την ανάπτυξη μεγάλου αριθμού μη ώριμων λεμφοκυττάρων[14]. Τα συμπτώματα μπορεί να περιλαμβάνουν αίσθημα κόπωσης, ανοιχτό χρώμα δέρματος, πυρετό, εύκολη αιμορραγία ή μώλωπες, μεγεθυμένους λεμφαδένες ή πόνο στα οστά[14]. Ως οξεία λευχαιμία, η ΟΛΛ εξελίσσεται ταχέως και συνήθως οδηγεί σε θάνατο εντός εβδομάδων ή μηνών, εάν δεν χορηγηθεί θεραπεία.

Στις περισσότερες περιπτώσεις, η αιτία είναι άγνωστη[15]. Οι γενετικοί παράγοντες κινδύνου μπορεί να περιλαμβάνουν σύνδρομο Down, σύνδρομο Li-Fraumeni ή νευροϊνωμάτωση τύπου 1[14]. Οι περιβαλλοντικοί παράγοντες κινδύνου μπορεί να περιλαμβάνουν σημαντική έκθεση σε ακτινοβολία ή προηγούμενη χημειοθεραπεία. Ο πιθανός μηχανισμός πρόκλησης της νόσου περιλαμβάνει πολλαπλές γενετικές μεταλλάξεις που έχουν ως αποτέλεσμα ταχεία κυτταρική διαίρεση [15]. Τα μη ώριμα λεμφοκύτταρα στον μυελό των οστών παρεμβαίνουν και εμποδίζουν την παραγωγή νέων ερυθρών αιμοσφαιρίων, λευκών αιμοσφαιρίων και αιμοπεταλίων[14]. Η διάγνωση πραγματοποιείται συνήθως με εξετάσεις αίματος και εξέταση μυελού των οστών.

Η ΟΛΛ τυπικά αντιμετωπίζεται αρχικά με χημειοθεραπεία με στόχο την επίτευξη ύφεσης [15]. Αυτό ακολουθείται από περαιτέρω χημειοθεραπεία συνήθως για αρκετά χρόνια. Πρόσθετες θεραπείες μπορεί να περιλαμβάνουν ενδορραχιαία χημειοθεραπεία ή ακτινοθεραπεία, εάν εξαπλωθεί στον εγκέφαλο. Η μεταμόσχευση βλαστικών κυττάρων μπορεί να χρησιμοποιηθεί εάν η ασθένεια επανεμφανιστεί μετά από την κλασική θεραπεία. Επιπρόσθετες θεραπείες όπως η ανοσοθεραπεία μελετώνται[15].

Περίπου 876.000 άτομα νόσησαν από ΟΛΛ παγκοσμίως το 2015, με αποτέλεσμα περίπου 111.000 θανάτους [16]. Εμφανίζεται συχνότερα στα παιδιά, ιδιαίτερα σε άτομα ηλικίας μεταξύ δύο και πέντε ετών[17]. Στις Ηνωμένες Πολιτείες είναι η πιο συνηθισμένη αιτία καρκίνου και θανάτου από καρκίνο στα παιδιά[15]. Η ΟΛΛ αποτελεί την πρώτη μορφή καρκίνου που θεραπεύεται. Η επιβίωση των παιδιών αυξήθηκε από το 10% στη δεκαετία του 1960 στο 90% το 2015[15]. Τα ποσοστά επιβίωσης παραμένουν χαμηλότερα για τα μωρά (50%)[18] και τους ενήλικες (35%)[19].

Οι υπότυποι της ΟΛΛ, κατά τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (WHO), είναι:

- Β-Λεμφοβλαστική Λευχαιμία/Λέμφωμα
- Τ-Λεμφοβλαστική Λευχαιμία/Λέμφωμα

- Οξείες Λευχαιμίες με ασαφή καταγωγή

➤ Οξεία Μυελογενής Λευχαιμία (ΟΜΛ):

Η ΟΜΛ είναι μία μορφή λευχαιμίας, που προκύπτει από την κλωνική επέκταση των μυελοειδών βλαστών στο περιφερικό αίμα, στο μυελό των οστών ή σε άλλους ιστούς. Χαρακτηρίζεται από ραγδαία αύξηση μη φυσιολογικών κυττάρων που παράγονται στο μυελό των οστών και το αίμα και επεμβαίνουν στα φυσιολογικά κύτταρα του αίματος[20]. Πρόκειται για μια ετερογενή ασθένεια κλινικά, μορφολογικά και γενετικά και μπορεί να περιλαμβάνει μία ή όλες τις μυελοειδείς γενεές[21].

Σε παγκόσμιο επίπεδο, η ετήσια συχνότητα εμφάνισης είναι περίπου 2,5-3 περιπτώσεις ανά 100.000 κατοίκους ετησίως και τα υψηλότερα ποσοστά εμφάνισης παρατηρούνται στην Αυστραλία, τη Δυτική Ευρώπη και τις ΗΠΑ. Η μέση ηλικία ασθενούς στη διάγνωση είναι 65 έτη, ενώ στις περισσότερες χώρες παρατηρείται ελαφρά αυξημένη εμφάνιση στους άνδρες. Σε παιδιά ηλικίας <15 ετών, η ΟΜΛ αποτελεί το 15-20% όλων των περιπτώσεων οξείας λευχαιμίας, με μέγιστη συχνότητα εμφάνισης στα πρώτα 3-4 χρόνια ζωής[21].

Τα συμπτώματα μπορεί να περιλαμβάνουν αίσθημα κόπωσης, δυσκολία στην αναπνοή, εύκολη δημιουργία μώλωπα, αιμορραγία και αυξημένο κίνδυνο μόλυνσης[20]. Περιστασιακά, η εξάπλωση μπορεί να εμφανιστεί στον εγκέφαλο, το δέρμα ή τα ούλα. Ως οξεία λευχαιμία, η ΟΜΛ εξελίσσεται ταχέως και είναι συνήθως θανατηφόρος εντός εβδομάδων ή μηνών εάν δεν χορηγηθεί θεραπεία[21].

Οι παράγοντες κινδύνου περιλαμβάνουν το κάπνισμα, προηγούμενη χημειοθεραπεία ή ακτινοθεραπεία, μυελοδυσπλαστικό σύνδρομο και την έκθεση στο βενζόλιο. Ο πιθανός μηχανισμός περιλαμβάνει την αντικατάσταση του φυσιολογικού μυελού των οστών με κύτταρα λευχαιμίας, με αποτέλεσμα την πτώση των ερυθρών αιμοσφαιρίων, των αιμοπεταλίων και των φυσιολογικών λευκών αιμοσφαιρίων[20]. Η διάγνωση γενικά βασίζεται στην αναρρόφηση μυελού των οστών και ειδικές εξετάσεις αίματος [22]. Η ΟΜΛ έχει διάφορους υποτύπους για τους οποίους οι θεραπείες και τα αποτελέσματα μπορεί να διαφέρουν[20].

Η ΟΜΛ τυπικά αρχικά αντιμετωπίζεται με χημειοθεραπεία, με σκοπό την πρόκληση ύφεσης. Οι ειδικές γενετικές μεταλλάξεις που υπάρχουν στα καρκινικά κύτταρα, καθοδηγούν την επιλογή της κατάλληλης θεραπείας, όπως και την πιθανότητα θετικής ή αρνητικής πορείας της νόσου[22].

Οι υπότυποι της ΟΜΛ, σύμφωνα με το Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας, είναι[23]:

- Οξεία Μυελοειδής Λευχαιμία με επαναλαμβανόμενες γενετικές ανωμαλίες
- Οξεία Μυελοειδής Λευχαιμία με αλλαγές σχετικές με Μυελοϋπερπλασία.
- Μυελοειδή νεοπλάσματα που σχετίζονται με τη θεραπεία:
- Μυελοειδές σάρκωμα
- Μυελοειδείς πολλαπλασιασμούς που σχετίζονται με το σύνδρομο Down.
- Νεόπλασμα βλαστικού πλασματοκυτταρικού δενδριτικού κυττάρου
- Οξεία Μυελογενής Λευχαιμία μη κατηγοριοποιημένη διαφορετικά

- **Χρόνια**

Τα ώριμα μη φυσιολογικά λευκά αιμοσφαίρια αναπτύσσονται σε πιο γρήγορο βαθμό σε σχέση με τα φυσιολογικά κύτταρα, αλλά πιο αργά σε σχέση με τις οξείες λευχαιμίες, και τα συμπτώματα είναι πιθανό να μην εμφανιστούν για χρόνια.

- **Χρόνια Λεμφοκυτταρική Λευχαιμία (ΧΛΛ):**

Η Χρόνια Λεμφοκυτταρική Λευχαιμία, είναι μία νεοπλασία, στην οποία μικρά ώριμα Β λεμφοκύτταρα παράγονται από το μυελό των οστών, σε μεγαλύτερο βαθμό, από το φυσιολογικό, με αποτέλεσμα να συσσωρεύονται και να μην επιτρέπουν την ανάπτυξη των φυσιολογικών Β κυττάρων. Στα αρχικά στάδια της ασθένειας δεν υπάρχουν συμπτώματα, ενώ στην πορεία διόγκωση λεμφαδένων, κούραση και πυρετός είναι πιθανό να συμβούν. Η διόγκωση του σπλήνα είναι μία πιθανή συνέπεια, επίσης. Τυπικά, η πορεία της ασθένειας επιδεινώνεται.[24, 25]

Η χρόνια λεμφοκυτταρική λευχαιμία θα αναλυθεί περαιτέρω στην επόμενη ενότητα.

- **Χρόνια Μυελογενής Λευχαιμία (ΧΜΛ):**

Η Χρόνια Μυελογενής Λευχαιμία παραμένει το πρότυπο για την αναγνώριση και την ταξινόμηση των μυελοειδών νεοπλασμάτων. Αυτή η λευχαιμία αναγνωρίζεται από τα κλινικά και μορφολογικά χαρακτηριστικά της και η φυσική εξέλιξή της χαρακτηρίζεται από αύξηση των βλαστών μυελοειδούς, λεμφοειδούς ή μικτού μυελοειδούς-λεμφοειδούς ανοσοποιητικού τύπου[21].

Συγκεκριμένα, η Χρόνια Μυελοειδής Λευχαιμία (ΧΜΛ), ορίζεται ως ένα μυελο-πολλαπλασιαστικό νεόπλασμα στο οποίο τα κοκκιοκύτταρα είναι το κύριο συστατικό που πολλαπλασιάζεται παθολογικά. Εμφανίζεται σε αιμοποιητικά βλαστικά κύτταρα και χαρακτηρίζεται από τη χρωμοσωμική μετατόπιση t (9, 22) (q34.1, q11.2), η οποία έχει ως αποτέλεσμα το σχηματισμό του χρωμοσώματος Philadelphia (Ph) που περιέχει το γονίδιο σύντηξης BCR-ABL1, το οποίο έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή μίας μη φυσιολογικής κινάσης τυροσίνης πρωτεΐνης με αυξημένη ενζυματική δραστηριότητα. Αυτή η ογκοπρωτεΐνη επαρκεί για να προκαλέσει την ασθένεια και είναι επίσης ένας στόχος για τη θεραπεία αναστολέων πρωτεϊνικής κινάσης τυροσίνης, η οποία έχει παρατείνει τη ζωή των χιλιάδων ασθενών με αυτή τη μοιραία θανατηφόρα ασθένεια. Στη ΧΜΛ, το BCR-ABL1 βρίσκεται σε όλες τις μυελοειδείς γενεές και σε ορισμένα λεμφοειδή και ενδοθηλιακά κύτταρα.

Οι προδιαθεσικοί παράγοντες για τη ΧΜΛ είναι σε μεγάλο βαθμό άγνωστοι. Η οξεία έκθεση στην ακτινοβολία έχει θεωρηθεί ότι εμπλέκεται στην εμφάνιση της νόσου. Υπάρχει, ακόμη, ελαφρά κληρονομική προδιάθεση[21].

Σε παγκόσμια κλίμακα, η ΧΜΛ έχει ετήσια επίπτωση 1-2 περιστατικών ανά 100.000 κατοίκους, με ελαφρά αυξημένη εμφάνιση στους άντρες. Η ετήσια επίπτωση αυξάνεται με την ηλικία από <0,1 περιπτώσεις ανά 100 000 παιδιά σε > 2,5 περιπτώσεις ανά 100 000 ηλικιωμένους.

Οι περισσότερες περιπτώσεις ΧΜΛ μπορούν να διαγνωσθούν με βάση τα ευρήματα περιφερικού αίματος σε συνδυασμό με ανίχνευση του χρωμοσώματος Ph και / ή του BCR-ABL1 με κυτταρογενετικές και μοριακές γενετικές τεχνικές. Ωστόσο, η αναρρόφηση του μυελού των οστών είναι απαραίτητη για να εξασφαλιστεί επαρκές υλικό για έναν πλήρη καρύοτυπο και για μορφολογική αξιολόγηση, ώστε να επιβεβαιωθεί η φάση στην οποία βρίσκεται η νόσος. Η βιοψία του μυελού των οστών δεν απαιτείται για τη διάγνωση της ΧΜΛ στις περισσότερες περιπτώσεις, αλλά θα πρέπει να γίνεται εάν τα ευρήματα στο περιφερικό αίμα είναι άτυπα, δεν δίνουν δηλαδή κλασικά ευρήματα για διάγνωση της ΧΜΛ[21].

Η Χρόνια Μυελογενής Λευχαιμία, διακρίνεται σε τρία στάδια, με βάση τα κλινικά χαρακτηριστικά και τα εργαστηριακά ευρήματα. Ελλείψει παρέμβασης, η ΧΜΛ ξεκινάει συνήθως στη χρόνια φάση(chronic phase) και κατά τη διάρκεια αρκετών ετών προχωρά σε μια επιταχυνόμενη φάση(accelerated phase) και τελικά σε μια κρίση έκρηξης(blast crisis)[26].

1.2. ΧΡΟΝΙΑ ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΛΕΥΧΑΙΜΙΑ

1.2.1. Βασικές πληροφορίες για τη Χρόνια Λεμφοκυτταρική Λευχαιμία

Όπως αναφέρθηκε και στην προηγούμενη ενότητα, η Χρόνια Λεμφοκυτταρική Λευχαιμία, είναι μία νεοπλασία, στην οποία ώριμα Β λεμφοκύτταρα παράγονται από το μυελό των οστών, σε μεγαλύτερο βαθμό, από το φυσιολογικό, με αποτέλεσμα να συσσωρεύονται και να μην επιτρέπουν την ανάπτυξη των φυσιολογικών Β κυττάρων.

Συγκεκριμένα, σύμφωνα με την ταξινόμηση του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας (World Health Organization (WHO)), η Χρόνια Λεμφοκυτταρική Λευχαιμία (ΧΛΛ) καθορίζεται ως μία λεμφοπολλαπλασιαστική διαταραχή, που συντίθεται από μονομορφικά μικρά κυκλικά Β λεμφοκύτταρα, που υπάρχουν στο περιφερικό αίμα, το μυελό των οστών και τα λεμφοειδή όργανα. Τα συγκεκριμένα CD19 θετικά κύτταρα χαρακτηρίζονται από ένα παράξενο ανοσοφαινοτυπικό προφίλ, εκφράζοντας CD5 και CD23, ταυτόχρονα με χαμηλή έκφραση CD20. [27] Πρέπει να υπάρχει ένας αριθμός μονοκλωνικών Β-λεμφοκυττάρων περισσότερων από $5 \times 10^9/L$, με χαρακτηριστική μορφολογία και φαινότυπο της νόσου ΧΛΛ στο περιφερικό αίμα[21].

- **Εντοπισμός:**

Η ΧΛΛ σχετίζεται με το αίμα, το μυελό των οστών και τους δευτερογενείς λεμφοειδείς ιστούς όπως ο σπλήνας, οι λεμφαδένες και ο δακτύλιος Waldeyer. Η εμπλοκή με μέρη όπως π.χ. του δέρματος, του γαστρεντερικού σωλήνα ή του ΚΝΣ, συμβαίνει σε ένα μικρό υποσύνολο περιπτώσεων[21].

- **Υπότυποι της ΧΛΛ:**

Οι λιγότερο συχνές, μη λευχαιμικές περιπτώσεις, όπου ο εμπλοκή λεμφαδένων είναι δεσπόζουσα, και με καταγεγραμμένη, επίσης, οζώδη, σπληνική ή άλλη εξωμυελική συμμετοχή, με απουσία κυτταροπενίας και λιγότερα από $5 \cdot 10^9/L$ Β-λεμφοκύτταρα στο περιφερικό αίμα, κατατάσσονται ως Μικρά Λεμφοκυτταρικά Λεμφώματα (Small Lymphocytic Lymphomas - SLL)[28, 29]. Αυτή η κατάσταση αντιπροσωπεύει μία διαφορετική κλινική εκδήλωση της ίδιας νόσου και ακολουθεί τις ίδιες κατευθυντήριες γραμμές διαχείρισης με την ΧΛΛ. Η SLL διαγιγνώσκεται στο 10-20% των περιπτώσεων και μέχρι και το 20% εξελίσσεται σε ΧΛΛ. Οι περιπτώσεις με Β-λεμφοκύτταρα λιγότερα από $5 \cdot 10^9/L$, με το τυπικό ανοσοφαινοτυπικό προφίλ της ΧΛΛ, αλλά χωρίς άλλα συμπτώματα λεμφοπλασσιαστικών διαταραχών, όπως λεμφαδενοπάθεια, οργανομεγαλία ή άλλη εξωγενής ασθένεια θα πρέπει να ταξινομούνται ως Μονοκλωνική Β-Λεμφοκυτταρική Λεμφοκυττάρωση τύπου ΧΛΛ (CLL-like MBL) .[29] [27] [21]

- **Αιτιολογία:**

Οι υποδοχείς των Β-κυττάρων της ΧΛΛ, επιδεικνύουν ιδιαίτερα ειδική «χρήση» του γονιδίου IGHV ή ακόμη και πολύ παρόμοιες θέσεις πρόσδεσης αντιγόνου, που κωδικοποιούνται από γονίδια βαριάς και ελαφριάς αλυσίδας (αποκαλούμενα στερεότυπα), και έτσι διαφέρουν από τους υποδοχείς των φυσιολογικών Β λεμφοκυττάρων, που χαρακτηρίζονται από πολύ ευρύτερη ποικιλομορφία. Αυτά τα ευρήματα υποστηρίζουν την ιδέα ενός περιορισμένου συνόλου (αυτο-)αντιγονικών στοιχείων, τα οποία προάγουν τη διαίρεση των προδρόμων κυττάρων και την κλωνική εξέλιξη [21, 30].

- **Παράγοντες κινδύνου:**

Έχουν πραγματοποιηθεί πολλές επιδημιολογικές μελέτες που στοχεύουν στον εντοπισμό των παραγόντων κινδύνου για την εμφάνιση της ΧΛΛ (αλλά και της SLL), αλλά μέχρι τώρα δεν έχει εντοπιστεί κάποια συγκεκριμένη αιτία που να οδηγεί σε ανάπτυξη της ΧΛΛ. Έχει διαπιστωθεί ότι η γενετική προδιάθεση παίζει ρόλο στην ανάπτυξη της νόσου, κάτι που έχει υποστηριχθεί από διάφορα στοιχεία. [31] [32]

Ο ισχυρότερος και πλέον σταθερός παράγοντας κινδύνου για την εμφάνιση ΧΛΛ, αποτελεί το οικογενειακό ιστορικό αιματολογικών κακοηθειών (ΧΛΛ και / ή λεμφώματα non-Hodgkin, NHL). Οι συγγενείς των ασθενών με ΧΛΛ έχουν 2 έως 8 φορές αυξημένη πιθανότητα για κίνδυνο ανάπτυξης ΧΛΛ και 2 φορές για εμφάνιση NHL σε σύγκριση με τον γενικό πληθυσμό[31, 32]. Έχει αναφερθεί ότι έως και σε 10% των κρουσμάτων ΧΛΛ, υπήρχαν δύο ή περισσότερα άτομα που έπασχαν από ΧΛΛ στην ίδια οικογένεια, οδηγώντας στον καθορισμό της πάθησης της "οικογενούς" ΧΛΛ, η οποία έχει το ίδιο κλινικό και βιολογικό προφίλ με αυτό των σποραδικών περιπτώσεων. Η ασθένεια είναι σπανιότερη στον Ανατολικό κόσμο (Κίνα, Κορέα και Ιαπωνία), και αυτή η ιδιότητα φαίνεται να διατηρείται στους μετανάστες και τους απογόνους τους, ενώ η ύπαρξη συγγενών με Ρωσική, Εβραϊκή ή Εβραϊκή Ανατολικής Ευρώπης αυξάνει επίσης τον κίνδυνο εμφάνισης της νόσου.

Η ΧΛΛ μπορεί να προκαλείται από πολλαπλές γενετικές μεταλλάξεις, οι οποίες μπορούν να κληρονομηθούν, και επιγενετικές αλλαγές. Μελέτες σύνδεσης και, πιο πρόσφατα, μελέτες συσχέτισης με το γονιδίωμα, έχουν αναγνωρίσει πολυμορφισμούς ενός νουκλεοτιδίου (Single Nucleotide Polymorphisms - SNPs), σε περίπου 30 τύπους "ευαισθησίας", όπου εντοπίζονται πολλά υποψήφια γονίδια που εμπλέκονται στη βιολογία των Β-κυττάρων και στην αποπτωτική οδό. Η αλλοιωμένη έκφρασή των γονιδίων αυτών λόγω των SNPs, μπορεί να σχετίζεται με την ανάπτυξη της νόσου. [33, 34] [35]

Διαφορετικές μελέτες έχουν προτείνει μια σύνδεση μεταξύ της διάγνωσης ΧΛΛ και επαγγελματικών αλλά και παραγόντων που σχετίζονται με τον τρόπο ζωής, με ανθρώπους που ζουν ή εργάζονται σε ένα αγρόκτημα να βρίσκονται σε υψηλότερο κίνδυνο ανάπτυξης ΧΛΛ, ενώ αντίθετα η έκθεση στον ήλιο παρέχει έναν προστατευτικό ρόλο[31].

Περιβαλλοντικοί παράγοντες όπως η έκθεση σε ορισμένες χημικές ουσίες, όπως το ζιζανιοκτόνο Agent Orange, το οποίο χρησιμοποιήθηκε κατά τη διάρκεια του πολέμου και προκάλεσε διάφορα ιατρικά προβλήματα, συμπεριλαμβανομένης της ΧΛΛ, αλλά και εντομοκτόνα, μπορεί να θεωρηθεί επίσης παράγοντας κινδύνου. Αντίθετα, ελάχιστα στοιχεία δείχνουν ότι η ιονίζουσα ακτινοβολία μπορεί να αυξήσει τον κίνδυνο εμφάνισης ΧΛΛ[35].

Μια συσχέτιση μεταξύ μόλυνσης από ηπατίτιδα C (HCV) και ανάπτυξης ΧΛΛ έχει επίσης αναφερθεί, αν και όχι ΧΛΛ-ειδική, καθώς η HCV λοίμωξη συνδέεται με μια ευρεία ποικιλία λεμφοπλασματοκυτταρικών διαταραχών [36].

Τέλος, άλλοι παράγοντες κινδύνου, σχετιζόμενοι με τη ΧΛΛ, είναι:

Φύλο: Η ΧΛΛ είναι ελαφρώς πιο κοινή σε άνδρες από ό, τι σε γυναίκες, για άγνωστους λόγους.

Ηλικία: Η ΧΛΛ εμφανίζεται κυρίως σε άτομα ηλικίας 70 ετών ή μεγαλύτερα. Η μέση ηλικία της διάγνωσης είναι 72 έτη.

Ένας δεύτερος καρκίνος: Μόλις κάποιος διαγνωστεί με ΧΛΛ, υπάρχει αυξημένος κίνδυνος για την ανάπτυξη ενός δεύτερου τύπου καρκίνου.

- **Συμπτώματα:**

Στα πρώτα στάδια της νόσου, αρκετοί ασθενείς δεν εμφανίζουν πρόωρα συμπτώματα και δεν απαιτείται θεραπεία. Σε προχωρημένα στάδια, ωστόσο, υπάρχει αυξημένος κίνδυνος σχετικά με την ποιότητα ζωής των ασθενών, αλλά και με την πιθανότητα θανάτου, και απαιτείται, πιθανώς, θεραπευτική παρέμβαση[37]. Συχνά συμπτώματα στη χρόνια λεμφοκυτταρική λευχαιμία είναι:

- Πρησμένοι λεμφαδένες
- Αιμορραγία της μύτης
- Εύκολη πρόκληση αιμορραγίας
- Κόπωση
- Απώλεια όρεξης
- Πυρετός
- Σοβαρές λοιμώξεις
- Διευρυμένος σπλήνας ή ήπαρ
- Νυχτερινές εφιδρώσεις
- Ανεξήγητη απώλεια βάρους
- Πόνος στα οστά
- Αναιμία

- **Επιδημιολογία:**

Η ΧΛΛ είναι η πιο συχνή λευχαιμία σε ενήλικα άτομα στις δυτικές χώρες. Το ετήσιο ποσοστό επίπτωσης (incidence) ανέρχεται περίπου σε 5 περιπτώσεις ανά 100.000 κατοίκους και αυξάνεται δραματικά με την ηλικία, σε περισσότερες από 20 περιπτώσεις ανά 100.000 άτομα ηλικίας άνω των 70 ετών.

Το Εθνικό πρόγραμμα Επιτήρησης, Επιδημιολογίας και Τελικών Αποτελεσμάτων του Εθνικού Ινστιτούτου Καρκίνου των ΗΠΑ (National Cancer Institute) εκτιμά ότι ο αριθμός των νέων περιπτώσεων ΧΛΛ, είναι 6,3 ανά 100.000 άνδρες και 3,3 ανά 100.000 γυναίκες. Περίπου 15.720 νέες περιπτώσεις ΧΛΛ στις ΗΠΑ και 12.000 στην ΕΕ, αναμενόταν να εμφανιστούν το έτος 2014. Ακόμη, υπολογίζεται ότι η συγκεκριμένη νόσος αντιπροσωπεύει περίπου 19.000 από όλους τους νέους καρκίνους που διαπιστώθηκαν στις Ηνωμένες Πολιτείες το 2016[35].

Περισσότερο από το 70% των ασθενών ΧΛΛ, είναι ηλικίας άνω των 65 ετών στη διάγνωση. Η μέση ηλικία ασθενούς στη διάγνωση ΧΛΛ είναι περίπου 70 έτη, αλλά η ΧΛΛ μπορεί να εμφανιστεί και σε νεότερες ενήλικες. Τις τελευταίες δεκαετίες, μάλιστα, διαγιγνώσκεται συχνότερα σε άτομα που βρίσκονται σε νεανική ηλικία, με σχεδόν το 15% των ασθενών ηλικίας 55 ετών ή νεότερων.

Υπάρχει μια προδιάθεση σχετικά με το φύλο στη νόσο, καθώς οι άντρες εμφανίζουν συχνότερα ΧΛΛ σε σχέση με τις γυναίκες, με αναλογία ανδρών προς γυναίκες 1,5-2:1. Ακόμη, η ΧΛΛ (και SLL) αντιπροσωπεύει το 7% των λεμφωμάτων non-Hodgkin[35].

Η ασθένεια είναι σπάνια στις ασιατικές χώρες, με τη χαμηλή αυτή επίπτωση να διατηρείται στους μεταναστευτικούς πληθυσμούς [38].

1.2.2. Μηχανισμοί και Παθοφυσιολογία της νόσου

Στην νόσο της ΧΛΛ έχει βρεθεί ότι εμφανίζονται ορισμένες γενετικές μεταβολές. Αυτές μπορεί να περιλαμβάνουν χρωμοσωμικές αλλοιώσεις, μεταλλάξεις (SNPs σε συγκεκριμένους τόπους), μεταβολές στην έκφραση των microRNAs και επιγενετικές τροποποιήσεις.

- **Χρωμοσωμικές αλλοιώσεις:**

Περίπου το 80% των ασθενών με ΧΛΛ φέρουν τουλάχιστον μία από τις τέσσερις κοινές χρωμοσωμικές αλλοιώσεις: μια διαγραφή στο χρωμόσωμα 13 (del(13q)), στο χρωμόσωμα 11q (del(11q)) ή μια διαγραφή στο χρωμόσωμα 17p (del(17p)) και τρισωμία 12. Η διαγραφή del(13q) είναι η πιο συνηθισμένη χρωμοσωμική αλλοίωση, εμφανής σε περισσότερο από το 50% των ασθενών, και σχετίζεται με ευνοϊκή πρόγνωση. Μέσα σε αυτήν την διαγραμμένη περιοχή βρίσκεται το σύμπλεγμα DLEU2-mir-15-16, το οποίο ρυθμίζει την έκφραση πρωτεϊνών, οι οποίες μπορούν να αναστείλουν την απόπτωση ή εμπλέκονται στην πρόοδο του κυτταρικού κύκλου. Η διαγραφή del(17p) εμφανίζεται στο 7% των ασθενών και σχετίζεται με την απώλεια του ογκοκατασταλτικού γονιδίου TP53, ενώ η διαγραφή del(11q) εμφανίζεται στο 18% των ασθενών και συχνά συνδέεται με αλλοιώσεις του ATM(το οποίο κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη που εμπλέκεται στην επιδιόρθωση του DNA).

Κάθε μία από αυτές τις χρωμοσωμικές αλλοιώσεις συνδέεται με αρνητική κλινική έκβαση, αν και αυτό έχει βελτιωθεί τα τελευταία χρόνια. Η τρισωμία 12 βρίσκεται στο 16% των ασθενών με ΧΛΛ και σχετίζεται με μια ενδιάμεση πρόγνωση. Σε αντίθεση με τα νεοπλασματικά Β-κύτταρα στο Λέμφωμα Κυττάρων Μανδύα (Mantle Cell Lymphoma), τα Β-κύτταρα της ΧΛΛ δεν εμφανίζουν τη μετατόπιση t(11; 14) (q13; q32) ή άλλες γενετικές αλλοιώσεις που ενισχύουν την έκφραση του CCND1, το οποίο κωδικοποιεί την κυκλίνη D1, που δρα ως ρυθμιστής του κυτταρικού κύκλου[35].

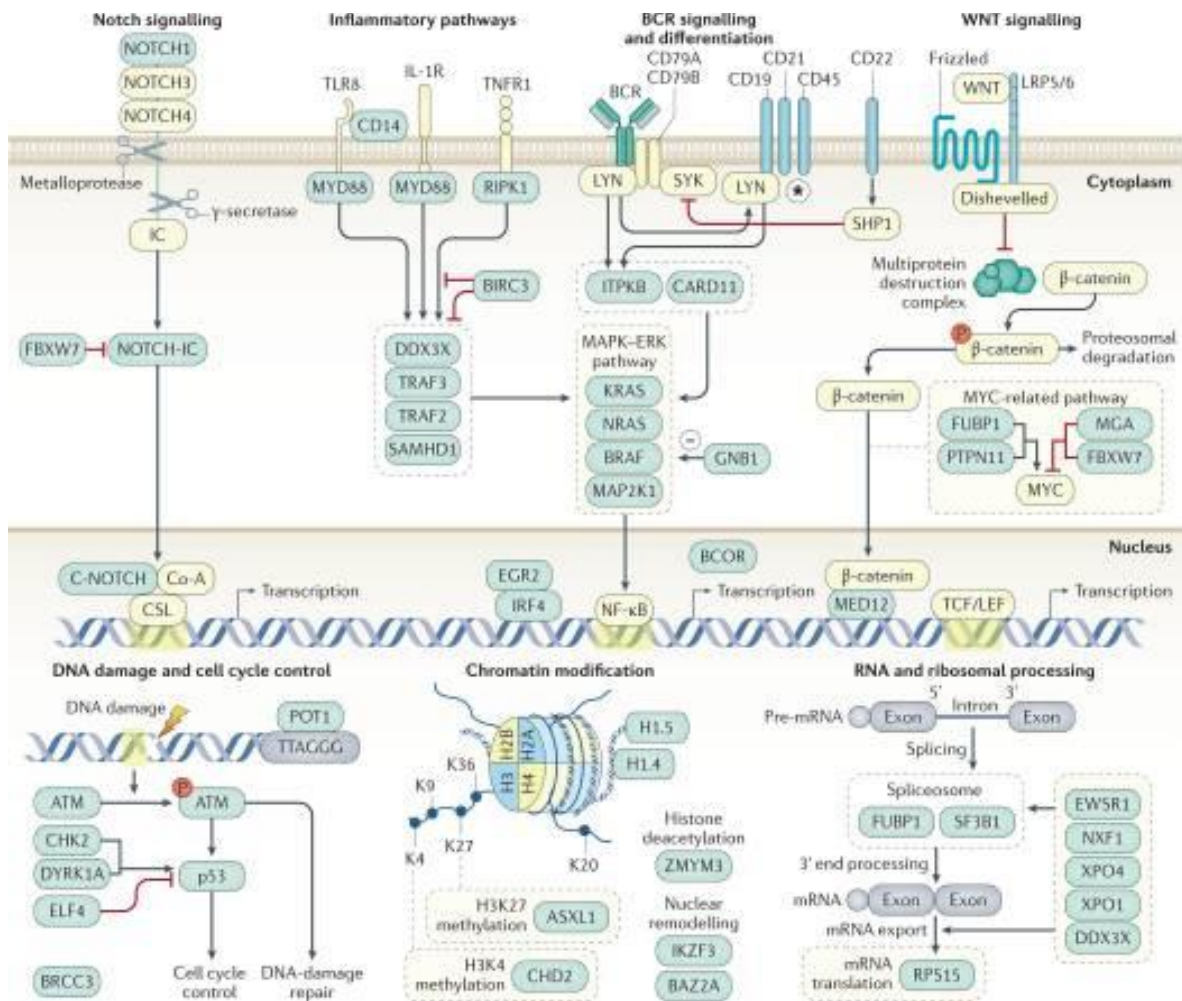
- **Σωματικές μεταλλάξεις:**

Η έλευση της μαζικής παράλληλης αλληλούχησης και η εφαρμογή του whole-exome sequencing στην ΧΛΛ, έχουν βοηθήσει ώστε να κατανοήσουμε καλύτερα την γενετική ετερογένεια της ΧΛΛ, και έχουν αποδείξει ότι η ΧΛΛ διαθέτει υψηλό βαθμό γενετικής ποικιλομορφίας(Σχήμα 1.3.). Από αυτές τις μελέτες, έχουν παρατηρηθεί επανειλημμένες σωματικές μεταλλάξεις, σε γονίδια που έχουν ρόλο σχετικό με:

- τη βλάβη του DNA (για παράδειγμα, τα TP53 και ATM),
- την επεξεργασία του mRNA (για παράδειγμα, τα SF3B1 και XPO1),

- την τροποποίηση της χρωματίνης (για παράδειγμα τα HIST1H1E, CHD2 και ZMYM3),
- τη σηματοδότηση του WNT,
- τη σηματοδότηση του Notch (για παράδειγμα, το NOTCH1) και
- διάφορες φλεγμονώδεις οδούς (για παράδειγμα το MYD88).

Άλλες μεταλλάξεις, όπως αυτές που απαντώνται στα γονίδια EGR2 ή BRAF, μπορούν να επηρεάσουν τη σηματοδότηση και τη μεταγραφή που σχετίζεται με τα Β-κύτταρα(Σχήμα 1.3.)[35].



Σχήμα 1.3. Η ΧΛΛ χαρακτηρίζεται από γενετική ετερογένεια, και υψηλό βαθμό γενετικής ποικιλομορφίας. Πλήθος σωματικών μεταλλάξεων έχει βρεθεί ότι σχετίζεται με την παθοφυσιολογία της ΧΛΛ, σε γονίδια όπως τα NOTCH1, TP53, WNT, ATM και ZMYM3.[35]

Η αποσιώπηση των μεταλλαγμένων γονιδίων του μονοπατιού WNT στα πρωτεύοντα κύτταρα της ΧΛΛ, έχει βρεθεί ότι έχει ως αποτέλεσμα μειωμένη βιωσιμότητα των κυττάρων. Οι μεταλλάξεις στο POT1, που παίζει ρόλο στην προστασία των τελομερών, εμποδίζουν τη πρόσδεση της πρωτεΐνης 1 για την προστασία των τελομερών στο τελομερικό DNA, με αποτέλεσμα πολυάριθμες χρωμοσωμικές ανωμαλίες, πέρα από την ανάπτυξη μη φυσιολογικών τελομερών. Οι μεταλλάξεις στο γονίδιο SF3B1, έχει βρεθεί ότι σχετίζονται με τη μη φυσιολογική συρραφή του RNA και αλλοιωμένη απόκριση σε βλάβες του DNA.

Το γονίδιο SAMHD1 κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη που εμπλέκεται στη ρύθμιση των ενδοκυτταρικών δεοξυνουκλεοτιδικών δεξαμενών, οι οποίες στρατολογούνται στη θέση της βλάβης του DNA και εμπλέκονται πιθανώς στην απόκριση σε θραύσματα της διπλής έλικας του DNA.

Μέσα από συγκεκριμένες μελέτες, έχουν ανακαλυφθεί νέα υποψήφια γονίδια που μεταβάλλονται στη ΧΛΛ. Επιπλέον, έχουν προσδιοριστεί σωματικές μεταλλάξεις στα γονίδια MGA και RPTN11, τα οποία κωδικοποιούν τους ρυθμιστές των MYC, IKZF3, ο οποίος κωδικοποιεί ένα βασικό μεταγραφικό παράγοντα και το RPS15, το οποίο κωδικοποιεί την 40S ριβοσωματική πρωτεΐνη S15 και μεταλλάσσεται επανειλημμένα σε περίπου 20% των ασθενών που υποτροπιάζουν μετά από συνδυαστική χημειοθεραπεία. Άλλες επαναλαμβανόμενες σωματικές μεταλλάξεις περιλαμβάνουν εκείνες στην 3' αμετάφραστη περιοχή του NOTCH1 και ένα ενισχυτή PAX5, που αυξάνει την έκφραση αυτών των παραγόντων μεταγραφής που σχετίζονται με τα Β-κύτταρα. Οι ασθενείς με μεταλλάξεις στην 3' αμετάφραστη περιοχή του NOTCH1 έχουν μικρότερο χρόνο από τη διάγνωση έως τη θεραπεία και τη δυσμενή συνολική επιβίωση, παρόμοια με αυτή των ασθενών με μη συνώνυμες μεταλλάξεις, οι οποίες μεταβάλλουν την αλληλουχία αμινοξέων του NOTCH1[35].

Η αλληλούχιση νέας γενιάς (Next-generation sequencing) έχει αποκαλύψει ετερογένεια στο εσωτερικό του όγκου, στη ΧΛΛ. Ορισμένες σωματικές μεταλλάξεις, όπως εκείνες στο MYD88, ή χρωμοσωμικές ανωμαλίες, όπως η τρισωμία 12 ή η διαγραφή del(13q), βρίσκονται κατά βάση σε όλα τα κύτταρα ΧΛΛ, οποιουδήποτε ασθενούς, δίνοντας την ένδειξη ότι αυτές οι γενετικές αλλαγές προέκυψαν νωρίς στην εξέλιξη της λευχαιμίας. Άλλες μεταλλάξεις, όπως εκείνες που έχουν βρεθεί στα SF3B1 ή NOTCH1, ή χρωμοσωμικές ανωμαλίες, όπως η διαγραφή del(17p), τυπικά βρίσκονται μόνο σε ένα μέρος των λευχαιμικών κυττάρων, αντιπροσωπεύοντας, έτσι, υποκλωνικά γεγονότα, τα οποία προκύπτουν ύστερα από την ανάπτυξη της ΧΛΛ. Οι υποκλωνικές κατευθυνόμενες μεταλαξιγεννήσεις σχετίζονται με πιο επιθετική εμφάνιση της ασθένειας, κυρίως όταν δυο ή περισσότερες βρίσκεται να συνυπάρχουν σε ένα πληθυσμό λευχαιμικών κυττάρων. Επιπρόσθετα, μελέτες έχουν δείξει ότι μεγάλες κλωνικές αλλαγές μπορούν να προκύψουν ύστερα από χημειοθεραπεία, που οφείλεται σε αύξηση των διαστάσεων των κυττάρων της ΧΛΛ, τα οποία έχουν μετάλλαξη TP53 ή del(17p), παρέχοντας την ένδειξη ότι τέτοιες γενετικές αλλαγές παρέχουν ισχυρό πλεονέκτημα φυσικής κατάστασης κατά τη θεραπεία. Αντίθετα, μία μελέτη για τα κύτταρα της ΧΛΛ από ασθενείς που τους έχει χορηγηθεί ως θεραπεία το φάρμακο ibriutinib(αναστολέας της κινάσης τυροσίνης του Bruton), αποκάλυψε μεταλλάξεις σχετιζόμενες με αντίσταση σε φάρμακα, οι οποίες διέφεραν σε σχέση με εκείνες που είχαν παρατηρηθεί στα κύτταρα ΧΛΛ ασθενών με κλασσική χημειοθεραπεία[35].

- **Τροποποιήσεις των microRNAs:**

Η ΧΛΛ ήταν η πρώτη ανθρώπινη ασθένεια που βρέθηκε να σχετίζεται με αλλοιώσεις σε microRNAs. Συγκεκριμένα, τα mir-15a και mir-16-1 διαγράφονται, μεταβάλλονται ή

υποεκφράζονται σε ποσοστό περίπου 60% των ασθενών με ΧΛΛ, και είναι δυσλειτουργικά σε ορισμένες περιπτώσεις οικογενούς ΧΛΛ. Και τα δύο miR-15a και miR-16-1 στοχεύουν τα γονίδια BCL2 και MCL1, τα οποία κωδικοποιούν αντι-αποπτωτικές πρωτεΐνες της οικογένειας BCL-2. Η μειωμένη έκφραση ή η απώλεια αυτών των microRNAs μπορεί να ενισχύσει την έκφραση αυτών των γονιδίων-στόχων. Η προσοχή έχει επικεντρωθεί επίσης σε microRNAs που δεν ρυθμίζονται ή που εκφράζονται διαφορετικά σε υποομάδες με διακριτά κλινικά και/ή βιολογικά χαρακτηριστικά. Για παράδειγμα, τα miR-29a / b, miR-29c, miR-34b, miR-181b και miR-3676 στοχεύουν την 3' αμετάφραστη περιοχή του TCL1A. Η απώλεια ή η μειωμένη έκφραση όλων ή ορισμένων από αυτά τα microRNAs μπορεί να οδηγήσει σε αυξημένη έκφραση του TCL1A, η οποία, όταν εκφράζεται στοιχειωδώς σε ώριμα Β-λεμφοκύτταρα, προάγει την ανάπτυξη της ΧΛΛ, σε διαγονιδιακούς ποντικούς. Αντιθέτως, η αυξημένη έκφραση του miR-155 σχετίζεται με αυξημένη σηματοδότηση του BCR, πολλαπλασιασμό Β-κυττάρων και λεμφογενετική εγκεφαλοπάθεια[39, 40].

Οι λειτουργίες των microRNA και η σχέση τους με τη Χρόνια Λεμφοκυτταρική Λευχαιμία, θα αναλυθούν περισσότερο στην επόμενη ενότητα.

- **Επιγενετικές τροποποιήσεις:**

Το επιγονιδίωμα της ΧΛΛ, παρουσιάζει παγκόσμια υπομεθυλίωση σε συνδυασμό με τοπική υπερμεθυλίωση, όπως έχει παρατηρηθεί και σε άλλες μορφές καρκίνου. Πράγματι, η λεπτομερής καταγραφή του προφίλ μεθυλίωσης έχει αποδείξει ότι υπάρχει σημαντική ετερογένεια μεθυλίωσης εντός του όγκου[41]. Η αύξηση της ετερογένειας στη μεθυλίωση συσχετίζεται έντονα με την αυξημένη γενετική πολυπλοκότητα λόγω της απόκτησης υποκλωνικών μεταλλάξεων, συνδέοντας έτσι τη γονιδιωματική και την εξέλιξη στη έρευνα σχετικά με τη μεθυλίωση στη ΧΛΛ[42]. Πράγματι, τοπικά διαταραγμένη μεθυλίωση στη ΧΛΛ μπορεί να ενισχύσει την εξελικτική ικανότητα προσαρμογής των κυττάρων ΧΛΛ αυξάνοντας τον «θόρυβο» του γονιδιώματος, παρέχοντας έτσι αυξημένες ευκαιρίες για σωματικές μεταλλάξεις εντός του λευχαιμικού κλώνου.

Τα μοναδικά χαρακτηριστικά της μεθυλίωσης, δίνουν τη δυνατότητα για ταξινόμηση της ΧΛΛ σε ξεκάθαρες κλινικές υποομάδες. Δεδομένου ότι αυτά τα μοτίβα μεθυλίωσης αποτελούν ένα κληρονομικό χαρακτηριστικό, έχουν χρησιμοποιηθεί για να «ανιχνεύσουν» τον τύπο του φυσιολογικού Β-κυττάρου από το οποίο προέρχονται τα κύτταρα ΧΛΛ. Αυτές οι μελέτες αποκάλυψαν ότι τα κύτταρα ΧΛΛ διαφορετικών ασθενών προέρχονται από μια συνεχή κατάσταση ωρίμανσης των Β-κυττάρων, τα οποία δεν περιορίζονται σε διακριτά στάδια ωρίμανσης. Παρόλα αυτά, τα κύτταρα ΧΛΛ, που χρησιμοποιούν μη μεταλλαγμένο γονίδιο IGHV έναντι μεταλλαγμένων γονιδίων IGHV γενικά έχουν διακριτά πρότυπα μεθυλίωσης. Η ποικιλομορφία των πιθανών κυττάρων προέλευσης των κυττάρων της ΧΛΛ, υπογραμμίζει τη βιολογική και φαινοτυπική ετερογένεια αυτής της ασθένειας. Αυτά τα ευρήματα υποδεικνύουν επίσης ότι ο επιγενετικός προγραμματισμός, που εξαρτάται από τους παράγοντες μεταγραφής, έχει έναν πιθανώς σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη της ΧΛΛ.

- **Σηματοδότηση του Β-κυτταρικού υποδοχέα (BCR):**

Ο Β-κυτταρικός υποδοχέας έχει βρεθεί πως σχετίζεται με την παθογένεια της ΧΛΛ. Αποτελείται από ένα διαμεμβρανικό μόριο ανοσοσφαιρίνης (IgA, IgD, IgE, IgG ή IgM) που δεσμεύεται με ένα συνδέτη και το ετεροδιμερές Igα (ή CD79A) και Igβ (ή CD79B). Τα κύτταρα της ΧΛΛ τυπικά συν-εκφράζουν IgD και IgM, αν και σε χαμηλά επίπεδα σε σύγκριση με τα φυσιολογικά Β-κύτταρα. Τα μόρια CD79A και CD79B περιέχουν μοτίβα ενεργοποίησης βασισμένα σε ανοσοϋποδοχέα τυροσίνης, τα οποία μπορούν να φωσφορυλιωθούν μετά την διασταυρούμενη σύνδεση της επιφανειακής ανοσοσφαιρίνης, ενεργοποιώντας έτσι τη σηματοδότηση της BCR. Μία λειτουργική BCR απαιτείται για την επιβίωση των ώριμων Β-κυττάρων και διατηρείται στις περισσότερες ώριμες κακοήθειες των Β-κυττάρων, συμπεριλαμβανομένης της ΧΛΛ. Στην ΧΛΛ, στοιχεία δείχνουν ότι η επιφανειακή ανοσοσφαιρίνη των Β-κυττάρων προσδένεται με αυτοαντιγόνο, πράγμα που οδηγεί στη σηματοδότηση της BCR. Η σημασία αυτής της αλληλεπίδρασης υπογραμμίζεται από την κλινική επιτυχία των αναστολέων κινάσης που εμποδίζουν την σηματοδότηση BCR, αν και οι επιδράσεις σε άλλους υποδοχείς μπορεί επίσης να παίζουν ρόλο[43].

Όπως και οι περισσότεροι καρκίνοι, η ΧΛΛ είναι ετερογενής και το αποτέλεσμα της σηματοδότησης της BCR κυμαίνεται, μεταξύ ενισχυμένης ενεργοποίησης των Β-κυττάρων έως την ανεργία των Β-κυττάρων. Η σηματοδότηση BCR που οδηγεί στην ανεργία είναι λιγότερο καλά καθορισμένη, αλλά φαίνεται να περιλαμβάνει εξαναγκασμένη ενεργοποίηση ανασταλτικών μορίων με μόνο μερική ενεργοποίηση των οδών που τυπικά σχετίζονται με την ενεργοποίηση των Β-κυττάρων. Ένα σημαντικό μόριο που μπορεί να εμπλέκεται είναι η φωσφατάση λιποειδούς ινοσιτόλης SHIP1. Η SHIP1 ενεργοποιείται από την κινάση τυροσίνης-πρωτεΐνης LYN και μπορεί να περιορίσει την ενεργοποίηση των Β-κυττάρων, αντισταθμίζοντας τη δραστηριότητα της 3-κινάσης φωσφοϊνοσιτιδής (PI3K) ταυτόχρονα στους υποδοχείς και στις απομακρυσμένες μη συνδεδεμένες BCRs, καθιστώντας τους, έτσι, μη ευαίσθητους στη διέγερση[35, 44].

1.2.3. Διάγνωση

- **Γενική εξέταση αίματος - Κλινική εικόνα:**

Οι περισσότερες περιπτώσεις ασθενών με ΧΛΛ στις δυτικές χώρες διαγιγνώσκονται με βάση την γενική ανάλυση αίματος, σε ασυμπτωματικά άτομα[21]. Η ασθένεια εντοπίζεται, συγκεκριμένα, εξαιτίας του αυξημένου αριθμού των λεμφοκυττάρων στις εξετάσεις αίματος[27]. Λιγότερο συχνά, λεμφαδενοπάθεια, σπληνομεγαλία, αναιμία ή θρομβοπενία είναι πιθανό να οδηγήσουν σε διάγνωση της ΧΛΛ.

Σε μερικές περιπτώσεις, η διάγνωση επιτυγχάνεται μετά από ιατρική εξέταση για άλλες εκδηλώσεις της ΧΛΛ ή SLL, όπως η αυτοάνοση κυτταροπενία (π.χ. αυτοάνοση αιμολυτική αναιμία, ανοσολογική θρομβοκυτταροπενία ή ερυθροβλαστοπενία) ή μια λοίμωξη, συχνότερα πνευμονική.

Μια μικρή παραπρωτεΐνη, συνήθως τύπου IgM, μπορεί να παρατηρηθεί στο περίπου 10% των ασθενών. Η συχνότητα της υπογαμμασφαιριναιμίας είναι περίπου 30% στη διάγνωση και αυξάνεται με την πάροδο του χρόνου, έως και 60% μεταξύ των ασθενών με προχωρημένη νόσο. Η καθαρή απλασία των ερυθροκυττάρων (PRCA) και η αυτοάνοση ουδετεροπενία είναι πολύ σπάνιες ενδείξεις σχετιζόμενες με τη νόσο (<1% και 0,2% των περιπτώσεων, αντίστοιχα)[45].

Η εξωμυελική συμμετοχή (π.χ. του δέρματος, του γαστρεντερικού σωλήνα, των νεφρών ή του κεντρικού νευρικού συστήματος) εμφανίζεται σε μικρό ποσοστό ασθενών. Τέλος, οι ασθενείς με ΧΛΛ είναι πιθανό να παρουσιάσουν σοβαρές αλλεργικές αντιδράσεις σε τσιμπήματα εντόμων[21].

- **Βιοψία Λεμφαδένων:**

Η διάγνωση της ΧΛΛ, όπως αναφέρθηκε, δεν απαιτεί βιοψία λεμφαδένων ή μυελού των οστών, εφόσον ο ανοσοφαινότυπος που πραγματοποιείται στο περιφερικό αίμα είναι επαρκής για επιβεβαίωση της διάγνωσης.

Εάν για κλινικούς λόγους πραγματοποιείται βιοψία λεμφαδένων (SLL, διαφορική διάγνωση), η συμμετοχή κόμβων εξ αιτίας της ΧΛΛ παρουσιάζει ένα ψευδομορφολογικό μοντέλο, όπου οι ανοικτές περιοχές με φυσιολογικές αποστάσεις (που ονομάζονται "κέντρα πολλαπλασιασμού"), που αποτελούνται από μεγαλύτερα κύτταρα, διαιρούνται από μικρότερα και σκουρότερα κύτταρα[27].

- **Ανοσοφαινότυπος:**

Ο ανοσοφαινότυπος του περιφερικού αίματος απαιτείται για να επιβεβαιωθεί η διάγνωση της Χρόνιας Λεμφοκυτταρικής Λευχαιμίας, σε οποιαδήποτε περίπτωση άγνωστης λεμφοκυττάρωσης. Πρώτα απ' όλα, θα πρέπει να χρησιμοποιηθεί Κυτταρομετρία Ροής για να εκτιμηθεί η κλωνικότητα της επέκτασης των Β-κυττάρων, δείχνοντας τις ενδείξεις περιορισμού της ελαφριάς αλυσίδας (δηλαδή είτε kappa ή lambda τυπικά σε χαμηλά επίπεδα έκφρασης).

Τα κύτταρα της Χρόνιας Λεμφοκυτταρικής Λευχαιμίας εκφράζουν Β-κυτταρικούς δείκτες, όπως το CD19, μαζί με χαμηλά επίπεδα CD20, και είναι θετικά για CD5 και CD23. Η χρήση αυτών των δεικτών είναι απαραίτητη για τη διαφορική διάγνωση από άλλες λεμφοπολλαπλασιαστικές διαταραχές των Β-κυττάρων, ιδίως για να αποκλειστεί η διάγνωση Λεμφώματος Μανδύα (Mantle Cell Lymphoma, MCL), που είναι θετική για το CD5 αλλά όχι για το CD23.

Πρόσφατα, το CD200 έχει επίσης αποδειχθεί ότι χρησιμεύει στη διαφορική διάγνωση μεταξύ ΧΛΛ και άλλων λεμφοπολλαπλασιαστικών διαταραχών (συγκεκριμένα MCL), που εκφράζεται διαρκώς σε περιπτώσεις ΧΛΛ και απουσιάζει από τους ασθενείς με MCL. Τα κύτταρα Χρόνιας Λεμφοκυτταρικής Λευχαιμίας είναι συνήθως αρνητικά για το FMC7 και εκφράζουν χαμηλά επίπεδα επιφανειακών ανοσοσφαιρινών (στις περισσότερες περιπτώσεις IgM και / ή IgD, σπάνια IgG ή IgA)

- **Διαγνωστικά κριτήρια IWCLL 2008:**

Σύμφωνα με το Διεθνές Σεμινάριο για τη Χρόνια Λεμφοκυτταρική Λευχαιμία (IWCLL) του 2008, επικαιροποιώντας τις κατευθυντήριες γραμμές του 1996, η διάγνωση για τη ΧΛΛ απαιτεί τα ακόλουθα κριτήρια:

1. η παρουσία τουλάχιστον $5 \times 10^9 / L$ Β-λεμφοκυττάρων στο περιφερικό αίμα

2. ένα ιδιόμορφο ανοσοφαινοτυπικό προφίλ όπως ανιχνεύεται με κυτταρομετρία ροής, που δείχνει: έναν κλωνικό περιορισμό ελαφριάς αλυσίδας (είτε kappa ή lambda), CD5 έκφραση, CD23 έκφραση, χαμηλά επίπεδα CD20, CD79b και έκφρασης ανοσοσφαιρίνης επιφανείας[28].

1.2.4. Πρόγνωση

Η κλινική κατάσταση των νεοδιαγνωσθέντων με ΧΛΛ εμφανίζει μεγάλη ετερογένεια. Ορισμένοι ασθενείς μπορεί να μην εμφανίζουν συμπτώματα και να είναι πλήρως δραστήριοι και ενεργοί για χρόνια, ενώ άλλοι εμφανίζουν ραγδαία συμπτώματα και αναπτύσσουν ασθένεια υψηλού κινδύνου, απαιτώντας άμεση θεραπεία. Οι περισσότεροι, ωστόσο, εμφανίζουν κλινική εικόνα μεταξύ των δύο αυτών άκρων.

Οι προγνωστικοί παράγοντες μπορούν να βοηθήσουν να γίνει διαχωρισμός των ασθενών που απαιτούν θεραπεία σύντομα μετά τη διάγνωση, και περιλαμβάνουν συγκεκριμένα κλινικά στοιχεία, αλλά και γενετικά, μοριακά και βιοχημικά χαρακτηριστικά των κυττάρων της ΧΛΛ[35].

- **Κλινική Σταδιοποίηση της Νόσου:**

Τα συστήματα σταδιοποίησης τα οποία αυτή τη στιγμή εφαρμόζονται για τον προσδιορισμό της βαρύτητας της νόσου, αλλά και ως ένδειξη για την επιλογή της κατάλληλης θεραπείας, των ασθενών ΧΛΛ, είναι δύο: Τα συστήματα Rai (Rai et al., 1975) και Binet (Binet et al., 1981) (Πίνακας 1.1.). Τα δύο αυτά συστήματα έχουν πολλά πλεονεκτήματα, καθώς είναι εύκολο να προσδιοριστούν, βασισμένα αποκλειστικά στην μέτρηση των ολικών αιμοσφαιρίων (CBC) και τη φυσική ανίχνευση και έχουν αποδειχθεί ισχυροί προγνωστικοί δείκτες. Με βάση αυτά γίνεται η επιλογή της κατάλληλης θεραπείας, συνήθως. Τα αρχικά στάδια, συνεπάγονται, συνήθως, μεγαλύτερη ολική επιβίωση.

- Σύστημα σταδιοποίησης Rai: Η αρχική ταξινόμηση που προτάθηκε το 1975 διαφοροποιεί 5 ομάδες βασιζόμενες σε προοδευτικά χαμηλότερη ολική επιβίωση. Το σύστημα αργότερα αναθεωρήθηκε και οι κατηγορίες κινδύνου προσαρμόστηκαν αντίστοιχα.

- Σύστημα σταδιοποίησης Binet: Ορίζει 3 διαφορετικές κατηγορίες κινδύνου με βάση τον αριθμό των λεμφοειδών θέσεων που εμπλέκονται (τραχηλικοί, μασχαλιαίοι και τραχηνοί κόμβοι, ηπατομεγαλία, σπληνομεγαλία) και την τιμή των CBC.

Πίνακας 1.1. Τα συστήματα σταδιοποίησης για τη ΧΛΛ, Rai και Binet

SYSTEM AND STAGE	RISK	MANIFESTATIONS	PERCENT OF PATIENTS	MEDIAN SURVIVAL years	RECOMMENDED TREATMENT
Rai staging system					
0	Low	Lymphocytosis	31	>10	Watch and wait
I	Intermediate	Lymphadenopathy	35	9	Treat only with progression†
II	Intermediate	Splenomegaly, lymphadenopathy, or both	26	7	Treat only with progression†
III	High	Anemia, organomegaly, or both	6	5	Treatment indicated in most cases
IV	High	One or more of the following: anemia, thrombocytopenia, and organomegaly	2	5	Treatment indicated in most cases
Binet staging system					
A	Low	Lymphocytosis, <3 lymphoid areas enlarged‡	63§	>10	Watch and wait
B	Intermediate	≥3 Lymphoid areas enlarged‡	30	7	Treatment indicated in most cases
C	High	Anemia, thrombocytopenia, or both	7	5	Treatment indicated in most cases

*Lymphocytosis is present in all stages of the disease.

†Progression is defined by weight loss, fatigue, fever, massive organomegaly, and a rapidly increasing lymphocyte count.

‡Enlarged lymphoid areas may include the cervical, axillary, and inguinal lymph nodes; the spleen or liver may also be enlarged.

§Stage A includes all patients with Rai stage 0 disease, two thirds of patients with Rai stage I disease, and one third of those with Rai stage II disease.

- **Γενετικοί Προγνωστικοί Παράγοντες:**

- **Μοριακή Κυτταρογενετική:**

Η παραδοσιακή κυτταρογενετική ανάλυση μετάφασης με χρωμοσωμική ταινία εμφάνισε περιορισμένη χρησιμότητα στη ΧΛΛ, λόγω της χαμηλής in vitro μιτωτικής δραστηριότητας των λευχαιμικών κυττάρων[46].

Χρησιμοποιώντας τον φθορίζων in situ υβριδισμό (FISH) ενδιάμεσης φάσης, οι κυτταρογενετικές αλλοιώσεις μπορούν να εντοπιστούν σε περισσότερο από το 80% όλων των περιπτώσεων ΧΛΛ. Οι πιο συνηθισμένες διαγραφές βρίσκονται στον μακρύ βραχίονα του χρωμοσώματος 13 (del(13q14.1)). Επιπλέον, συχνές χρωμοσωμικές ανωμαλίες περιλαμβάνουν την τρισωμία του χρωμοσώματος 12, διαγραφές στον μακρύ βραχίονα των χρωμοσωμάτων 11 (del(11q)) ή 6 (del(6q)), ή στο βραχίονα του χρωμοσώματος 17 (del(17p)), όπως αναφέρθηκε και στην ενότητα 1.2.2. Όταν διεγείρονται in vitro, τα κύτταρα της ΧΛΛ είναι πιθανό να εμφανίζουν ανιχνεύσιμες χρωμοσωμικές μετατοπίσεις, οι οποίες έχουν πιθανή προγνωστική σημασία. Ορισμένες μετατοπίσεις μπορούν να βοηθήσουν στη διάκριση της ΧΛΛ από άλλες λεμφοπλαστικές ασθένειες (π.χ., t(11, 14), η οποία γενικά εμφανίζεται στο λέμφωμα μανδύα).

Στοιχεία από κλινικές δοκιμές δείχνουν ότι η ανίχνευση ορισμένων χρωμοσωμικών διαγραφών έχει προγνωστική σημασία. Οι ασθενείς που τα κύτταρα λευχαιμίας τους εμφανίζουν την διαγραφή del(17p), έχουν δυσμενή πρόγνωση, ενώ ακόμη παρουσιάζουν σχετική ανθεκτικότητα σε πρότυπα θεραπευτικά σχήματα χημειοθεραπείας, όπως είναι τα αλκυλιωτικά φάρμακα και / ή τα ανάλογα πουρινών. Σε μελέτες σχετικά με τις χρωμοσωμικές ανωμαλίες που ανιχνεύθηκαν με FISH, οι ασθενείς των οποίων τα κύτταρα ΧΛΛ εμφάνιζαν τις χρωμοσωμικές ανωμαλίες del(11q) ή del(17p), παρουσίαζαν

δυσμενέστερη κατάληξη σε σύγκριση με ασθενείς με φυσιολογικό καρυότυπο ή del(13q) ως μοναδική γενετική ανωμαλία. Η συχνότητα εμφάνισης δυσμενών χρωμοσωμικών παρεκκλίσεων, όπως η del(17p), αυξάνει σε πιο προχωρημένα στάδια της ΧΛΛ, υπερβαίνοντας το 20% σε περιπτώσεις υποτροπής. Η παρουσία ενός σύνθετου καρυότυπου προσδίδει μια κακή πρόγνωση στην ΧΛΛ ακόμη και όταν αντιμετωπίζεται με νέες θεραπείες όπως το ibrutinib.

Από την άλλη πλευρά, ασθενείς όπου τα κύτταρα λευχαιμίας έχουν τη del(17p), μπορεί να ανταποκρίνονται στη θεραπεία με alemtuzumab, είτε μεμονωμένα είτε σε συνδυασμό με άλλους παράγοντες κατά της λευχαιμίας. Η ανίχνευση αυτών των κυτταρογενετικών ανωμαλιών έχει προφανή προγνωστική αξία, και μπορεί να επηρεάσει τις θεραπευτικές αποφάσεις για τον κάθε ασθενή. Επιπρόσθετες γενετικές αλλοιώσεις, είναι πιθανό να αποκτηθούν, στην πορεία της νόσου. Συνεπώς, συνίσταται η επανάληψη των αναλύσεων FISH, πριν από μία μεταγενέστερη, δεύτερη ή τρίτη σειρά θεραπείας.

Θεωρείται ότι η ανάλυση του καρυότυπου πρέπει να χρησιμοποιείται ευρύτερα κατά τη διάρκεια της εξέτασης της ΧΛΛ, είτε κατά την αρχική διάγνωση είτε σε μεταγενέστερα στάδια της νόσου, για την καλύτερη στρατηγική των σχεδίων θεραπείας. Ωστόσο, είναι σημαντικό να υπογραμμιστεί ότι η παρουσία του del(17p) ή άλλων ανεπιθύμητων μεταλλάξεων δεν μπορεί να θεωρηθεί ένδειξη για την έναρξη θεραπείας σε ασθενείς με ΧΛΛ. Η ανάπτυξη της κλινικής συμπτωματολογίας εξακολουθεί να είναι η μόνη ένδειξη για την έναρξη της θεραπείας[46].

- **Μοριακοί Προγνωστικοί Παράγοντες:**

- **Κατάσταση μετάλλαξης IGHV:**

Η κατάσταση μετάλλαξης IGHV έχει αναγνωριστεί ως ένας πολύ σημαντικός προγνωστικός δείκτης στη ΧΛΛ. Μεταλλάξεις του γονιδίου VH μπορούν να αναγνωριστούν, με σύγκριση των αλληλουχιών DNA των B-κυττάρων της ΧΛΛ με τα ομόλογα της γενετικής γραμμής τους. Διαφορές μεγαλύτερες από 2% αντιστοιχούν σε μεταλλαγμένη κατάσταση IGHV, δείκτη καλής πρόγνωσης για τη νόσο[47].

Έχει βρεθεί, επίσης, ότι οι μεταλλάξεις IGHV συσχετίζονται με πολλές από τις προαναφερθείσες γενετικές ανωμαλίες. Για παράδειγμα, η μη μεταλλαγμένη IGHV στη ΧΛΛ είναι περισσότερο πιθανόν να σχετίζεται με del(17p) ή del(11q), ενώ οι περιπτώσεις ΧΛΛ με μεταλλαγμένο IGVH, είναι πιο πιθανό να εμφανίζουν επίσης del(13q). Σε αντίθεση με τις προαναφερθείσες γενετικές ανωμαλίες, ιδιαίτερα το del(17p), όπου η επίπτωση μπορεί να μεταβληθεί με την πάροδο του χρόνου, η κατάσταση μετάλλαξης IGHV είναι σταθερή κατά τη διάρκεια της πορείας της νόσου. Επίσης, η μη μεταλλαγμένη IGHV σε ασθενείς με ΧΛΛ, αποτελεί προδιαθεσικό παράγοντα για την ανάπτυξη γονιδιωματικών εκτροπών μέσω καρυοτυπικής αστάθειας.

Οι Stilgenbauer et al. έδειξαν ότι η κλωνική εξέλιξη εμφανίστηκε επιλεκτικά σε περιπτώσεις ΧΛΛ με μη μεταλλαγμένο IGHV. Στη μελέτη τους, το 117% των περιπτώσεων

ΧΛΛ με μη μεταλλαγμένο IGHV, ανέπτυξε κλωνική εξέλιξη. Το ένα τρίτο αυτών των περιπτώσεων απέκτησε del(17p). Η εκτιμώμενη μέση επιβίωση μετά την εμφάνιση της κλωνικής εξέλιξης ήταν μικρότερη από 2 χρόνια[46].

- **Έκφραση CD38:**

Η CD38 είναι μια διαμεμβρανική γλυκοπρωτεΐνη 42 kilodalton, η οποία εκφράζεται σε διάφορα αιμοποιητικά κύτταρα, συμπεριλαμβανομένων των φυσιολογικών Β-κυττάρων. Το βέλτιστο όριο cutoff, για τον καθορισμό της υπερέκφρασης της CD38 εξακολουθεί να είναι αμφιλεγόμενο. Παρόλα αυτά, η μεγάλη πλειοψηφία των μελετών το καθορίζει έως 20-30%. Η υπερέκφραση του CD38 έχει συσχετιστεί με προχωρημένο στάδιο της νόσου, δυσμενή καρύοτυπο, σύντομο χρονικό διάστημα από τη χορήγηση της πρώτης θεραπείας και κατώτερη ελεύθερη εξέλιξης επιβίωση (PFS) και ολική επιβίωση (OS).

Σε μελέτες έχει παρατηρηθεί ότι οι ασθενείς ΧΛΛ με μη μεταλλαγμένο IGHV είναι περισσότερο πιθανόν να έχουν υψηλή έκφραση του CD38($\geq 30\%$). Η έκφραση του CD38 μπορεί να ποικίλει κατά τη διάρκεια της νόσου στο 6% με 24% των περιπτώσεων, καθώς η ικανότητα πολλαπλασιασμού ορισμένων κλώνων της ΧΛΛ μπορεί να αυξάνεται[46].

- **Γονίδιο ZAP-70:**

Υπερέκφραση ZAP-70: Η πρωτεΐνη που σχετίζεται με την αλυσίδα Ζήτα (Zeta-chain) ή το ZAP-70, είναι μία κινάση τυροσίνης που σχετίζεται με τον υποδοχέα T-κυττάρων, 70 kilodalton, η οποία είναι απαραίτητη για το μονοπάτι σηματοδότησης των Β-κυττάρων της ΧΛΛ. Παρότι απουσιάζει από τα φυσιολογικά Β-κύτταρα, φαίνεται ότι η αφύσικη της έκφραση στα Β-κύτταρα της ΧΛΛ, είναι σταθερή και συνεχής κατά τη διάρκεια της νόσου, και η παρουσία της έχει αποδειχθεί ότι χρησιμεύει στην αντίστροφη πρόβλεψη του PFS και του OS, κατά την αρχική διάγνωση. Η υπερέκφραση του ZAP-70, προβλέπει τη χρονική διάρκεια μέχρι την απαίτηση λήψης θεραπείας, σε ασθενείς με πρόωμη ασυμπτωματική νόσο.

Η τυποποίηση της ανάλυσης έκφρασης του ZAP-70, ήταν ιδιαίτερα δύσκολη στην καθημερινή φροντίδα των ασθενών με ΧΛΛ, και γενικά δεν συνιστάται, σε σχέση με τη μετάλλαξη IGHV και την ανάλυση FISH.

Μεθυλίωση ZAP-70: Η μεθυλίωση ενός απλού δινουκλεοτιδίου CpG 223 bp μετά την μεταγραφή (CpG + 223) στο εξόνιο 1 του ZAP-70, φαίνεται να συσχετίζεται με έλλειψη της έκφρασης του ZAP-70 και με βελτιωμένη PFS και OS σε ασθενείς με ΧΛΛ. Η υψηλή μεθυλίωση, που ορίζεται ως ποσοστό πάνω από 20%, συσχετίστηκε με μεγαλύτερη χρονική περίοδο έως την πρώτη θεραπεία και με βελτιωμένο OS σε ασθενείς με ΧΛΛ. Η χρήση της μεθυλίωσης ZAP-70 ως προγνωστικός παράγοντας, δεν χρησιμοποιείται ευρέως[46].

- **B2-μικροσφαιρίνη και αυξημένη δραστηριότητα κινάσης θυμιδίνης:**

Έχει δειχθεί ότι αυξημένη β2-μικροσφαιρίνη και αυξημένη δραστηριότητα κινάσης θυμιδίνης, συμβάλουν στην πρόβλεψη δυσμενών αποτελεσμάτων σε ασθενείς με ΧΛΛ. Σε έρευνες έχει αποδειχθεί ότι η β2-μικροσφαιρίνη είναι ένας ανεξάρτητος προγνωστικός παράγοντας σύντομης επιβίωσης. Αυξημένα επίπεδα β2-μικροσφαιρίνης περιλαμβάνονται σήμερα σε διάφορα προγνωστικά μοντέλα για τη ΧΛΛ. Όσον αφορά τη δραστηριότητα της κινάσης θυμιδίνης, η χρήση της είναι περιορισμένη στην τρέχουσα κλινική πράξη, πιθανόν λόγω του εντοπισμού νέων και ίσως ισχυρότερων προγνωστικών παραγόντων[46].

• **Έλευση του NGS και σωματικές μεταλλάξεις στη ΧΛΛ:**

Η έλευση του Next Generation Sequencing, αποκάλυψε μία πληθώρα σωματικών μεταλλάξεων, οι οποίες μπορούν να χρησιμεύσουν στην πρόγνωση της νόσου σε ασθενείς με ΧΛΛ. Αυτή η συνεχώς αυξανόμενη γνώση έχει προσφέρει βαθύτερη κατανόηση των παθογόνων μηχανισμών που σχετίζονται με την ανάπτυξη και πορεία της ΧΛΛ. Πολλές από τις μεταλλάξεις οι οποίες σχετίζονται με τη ΧΛΛ, αναφέρονται στην ενότητα 1.2.2. Το NOTCH1 έχει βρεθεί ότι είναι ένα συχνά μεταλλαγμένο γονίδιο στη ΧΛΛ, όπως επίσης και τα SF3B1, TP53, MYD88, BIRC3 και ATM, μεταξύ άλλων. Σύμφωνα με ορισμένες μελέτες, η μετάλλαξη στο γονίδιο BIRC3, σχετιζόταν με μη μεταλλαγμένα γονίδια IGHV, τη διαγραφή Del(11q), και τρισωμία 12. Από την άλλη πλευρά, μεταλλάξεις στο MYD88 έχουν βρεθεί αποκλειστικά σε ασθενείς ΧΛΛ με μεταλλαγμένα γονίδια IGHV.

Καθώς η τεχνολογία του NGS γίνεται συνεχώς πιο οικονομικά εφικτή και εφαρμόσιμη, αναμένεται ότι πληροφορίες σχετικά με σωματικές μεταλλάξεις σχετιζόμενες με τη νόσο της ΧΛΛ, σε συνδυασμό με άλλους προγνωστικούς δείκτες, θα εφαρμοστούν σε συνδυαστικά προγνωστικά μοντέλα, τα οποία θα χρησιμοποιούνται στην καθημερινή κλινική πράξη[46].

• **Συνδυασμός κλινικών, μοριακών και γενετικών μεταβλητών:**

Πρόσφατα, σχεδιάστηκε το CLL-international prognostic index (CLL-IPI) που συνδυάζει κλινικές, ανοσολογικές, ορολογικές, μοριακές και γενετικές πληροφορίες, ώστε να προφέρει καλύτερη πρόβλεψη σε ασθενείς με ΧΛΛ.

Σε μελέτες ασθενών με ΧΛΛ, συνδυάστηκαν πέντε ανεξάρτητοι προγνωστικοί παράγοντες: η κατάσταση TP53 (όχι χρωμοσομικές ανωμαλίες/ del17p ή μετάλλαξη TP53/ και τα δύο), η κατάσταση μετάλλαξης IGHV, η συγκέντρωση β2-μικροσφαιρίνης ορού ($\leq 3 \cdot 5$ mg/L $> 3 \cdot 5$ mg/L), το κλινικό στάδιο (Binet A ή Rai 0/ Binet B–C ή Rai I–IV), και η ηλικία του ασθενούς (≤ 65 / > 65 έτη). Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η παρουσία της del(17p) και/ή μη φυσιολογικού TP53, εμφανίστηκε να είναι η μεταβλητή με την περισσότερο δυσμενή επιρροή στην ολική επιβίωση των ασθενών με ΧΛΛ.

Συνολικά, το CLL-IPI ταξινόμησε τους ασθενείς ΧΛΛ σε τέσσερις ομάδες κινδύνου με προβλεπόμενη ολική επιβίωση 5 χρόνων: Χαμηλού, Ενδιάμεσου, Υψηλού, και Πολύ Υψηλού κινδύνου ασθένεια[46].

1.2.5. Θεραπευτική αντιμετώπιση της νόσου

Οι ενδείξεις για την έναρξη θεραπείας στους ασθενείς με ΧΛΛ, περιλαμβάνουν έντονη αναιμία ή θρομβοκυταρροπενία σχετιζόμενη με τη νόσο (ασθενείς με κλινικό στάδιο Rai III ή IV ή κλινικό στάδιο Binet βαθμού C), συμπτωματική λεμφαδενοπάθεια ή/και συμπτώματα που σχετίζονται με ενεργή νόσο, κόπωση, ακούσια απώλεια βάρους ή πυρετός χωρίς ενδείξεις λοίμωξης.

Ωστόσο, όταν η επιλογή θεραπείας βασίζεται μόνο στα ανωτέρω συμπτώματα, ο γιατρός θα πρέπει να εξετάσει και άλλες ιατρικές καταστάσεις, όπως ο υποθυρεοειδισμός, ο υπερθυρεοειδισμός, η υπογλυκαιμία, η χρόνια φλεγμονή, οι περιστασιακές μολύνσεις ή οι διαταραχές ύπνου, συμπεριλαμβανομένης της άπνοιας κατά τον ύπνο.

Δεν υπάρχει απολύτως καθορισμένος αριθμός λεμφοκυττάρων, σύμφωνα με τον οποίο να αποφασίζεται η έναρξη θεραπείας. Αντ' αυτού, οι ασθενείς που είναι ασυμπτωματικοί σε αρχικό στάδιο ή ενδιάμεσο στάδιο της ασθένειας (όπως το στάδιο Rai I ή II ή το στάδιο Binet A ή B) δεν συνιστώνται για θεραπεία, εκτός εάν έχουν συμπτωματική ασθένεια ή στοιχεία για κακή εξέλιξη της νόσου.

Ενδείξεις για κακή εξέλιξη της νόσου μπορούν να αποτελέσουν ο χρόνος διπλασιασμού των λεμφοκυττάρων σε λιγότερο από ένα έτος, προοδευτική ψηλαφητή λεμφαδενοπάθεια και/ή προοδευτική ψηλαφητή σπληνομεγαλία σε διαδοχικές εξετάσεις.

Ελλείψει ενδείξεων για θεραπεία, οι ασθενείς εξετάζονται για ψηλαφητή λεμφαδενοπάθεια και σπληνομεγαλία και υποβάλλονται σε εξετάσεις αίματος ανά διαστήματα 3-12 μηνών, η συχνότητα των οποίων εξαρτάται από την εξέλιξη της νόσου.

Τέλος, οι ασθενείς θα πρέπει να προειδοποιούνται να αναζητούν άμεση ιατρική φροντίδα σε περίπτωση συμπτωμάτων λοίμωξης. Λόγω της επίκτητης ανοσολογικής ανεπάρκειας που συνδέεται με τη ΧΛΛ, το όριο για την εκτίμηση χρήσης αντιμικροβιακής θεραπείας θα πρέπει να είναι χαμηλό. Παρόλα αυτά, η ανάπτυξη συχνών ή σοβαρών λοιμώξεων δεν αποτελεί ένδειξη για έναρξη θεραπείας ειδικής για τη ΧΛΛ.

Για τους ασθενείς που χρειάζονται θεραπεία, η παρουσία της διαγραφής del(17p) ή της μετάλλαξης στο γονίδιο TP53 είναι τα πιο σημαντικά χαρακτηριστικά που επί του παρόντος κατευθύνουν την επιλογή της θεραπείας.

Στη συνέχεια, η προχωρημένη ηλικία του ασθενούς, άνω των 65 ετών, η παρουσία ιατρικής συννοσηρότητας και οι στόχοι της θεραπείας, έχουν ουσιαστική σημασία για την επιλογή της θεραπείας. Όλο και περισσότερο, η κατάσταση μετάλλαξης IGHV θεωρείται ως μία σημαντική παράμετρος για τον προσδιορισμό του τύπου της θεραπείας. Για παράδειγμα, τα θεραπευτικά σχήματα που είναι βασισμένα σε χημειοθεραπεία, προορίζονται για ασθενείς ΧΛΛ, με μεταλλαγμένο IGHV. Αντίθετα, το κλινικό στάδιο Rai

ή Binet του ασθενούς που χρειάζεται θεραπεία, δεν επηρεάζει απαραίτητα την επιλογή της θεραπείας[35].

- **Επιλογή κατάλληλης Θεραπείας:**

Ομαδοποιώντας τα παραπάνω στοιχεία, η επιλογή θεραπείας απαιτεί μία προσεκτική αξιολόγηση ορισμένων διαφορετικών παραγόντων, συμπεριλαμβανομένων των εξής:

- Η φυσική κατάσταση του ασθενούς, που βασίζεται σε εμπειριστατωμένη γηριατρική αξιολόγηση (η επιβάρυνση συννοσηρότητας και η κατάσταση απόδοσης, μαζί με τη λειτουργική και ψυχική κατάσταση),

- Το γενετικό προφίλ (η παρουσία ή απουσία συγκεκριμένων μεταλλάξεων, που ανιχνεύεται με FISH),

- Η κατάσταση της ασθένειας (θεραπεία πρώτης γραμμής/ θεραπεία 2^{ης}, 3^{ης} κ.λ.π. γραμμής/ αδυναμία διάρκειας της τελευταίας θεραπείας)[27].

- **Συστημικές Θεραπείες:**

Η θεραπεία ασθενών με ΧΛΛ μπορεί να περιλαμβάνει χημειοθεραπεία, συνδυασμό χημειοθεραπείας και ανοσοθεραπείας ή φάρμακα που στοχεύουν στα μονοπάτια σηματοδότησης που προάγουν την ανάπτυξη και/ ή την επιβίωση των κυττάρων της ΧΛΛ (για παράδειγμα, το μονοπάτι σηματοδότησης των BCR και BCL-2).

- **Χημειοθεραπεία:**

Η χημειοθεραπεία αποτέλεσε το επίκεντρο των θεραπειών για τα τελευταία 50 χρόνια. Τα ανάλογα πουρινών (συνήθως η φλουδαραβίνη, αλλά και η πεντοστατίνη ή η κλαντριβίνη) και οι αλκυλιωτικοί παράγοντες (συμπεριλαμβανομένης της χλωραμβουκίλης, της κυκλοφωσφαμίδης ή της βενδαμουστίνης), χρησιμοποιούνται στη θεραπεία της ΧΛΛ. Τα θεραπευτικά σχήματα που είναι βασισμένα σε χημειοθεραπεία μπορούν να προκαλέσουν μυελοκαταστολή, αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης λοιμώξεων και, σε μικρό υποσύνολο ασθενών, μεταθεραπευτική μυελοδυσπλασία ή δευτερογενείς καρκίνους, όπως οξεία μυελογενή λευχαιμία.

- **Χημειοανοσοθεραπεία:**

Κλινικές δοκιμές φάσης III, επικύρωσαν το όφελος των μονοκλωνικών αντισωμάτων αντι-CD20, όπως το rituximab, το obinutuzumab ή το ofatumumab, σε συνδυασμό με χημειοθεραπεία για τη θεραπεία ασθενών με ΧΛΛ.

Συγκεκριμένα, πραγματοποιήθηκαν τρεις κλινικές δοκιμές φάσης III, στις οποίες οι ασθενείς έλαβαν χημειοθεραπεία σε συνδυασμό με κάποιο από τα παραπάνω αντι-CD20 μονοκλωνικά αντισώματα, και εμφάνισαν, σε κάθε περίπτωση, μεγαλύτερα ποσοστά

ανταπόκρισης και μεγαλύτερη μέση επιβίωση ελεύθερη εξέλιξης στη νόσο (PFS), σε σχέση με ασθενείς που έλαβαν μόνο κλασσική χημειοθεραπεία.

Ως συνέπεια αυτών των τριών δοκιμών, ο Αμερικανικός Οργανισμός Φαρμάκων (FDA) ενέκρινε τη χρήση rituximab, obinutuzumab ή ofatumumab σε συνδυασμό με χημειοθεραπεία, για τη θεραπεία πρώτης γραμμής των ασθενών με ΧΛΛ. Ο FDA ενέκρινε επίσης τη χρήση του φαρμάκου ofatumumab, ως μεμονωμένου παράγοντα για τη θεραπεία ασθενών με υποτροπιάζουσα ή ανθεκτική νόσο, με βάση δεδομένα από μια μελέτη φάσης II.

Το Bendamustine χρησιμοποιείται συνήθως με rituximab και έχει καλά ποσοστά ανταπόκρισης σε ασθενείς χωρίς προηγούμενη θεραπεία, χωρίς τη διαγραφή del(17p). Έχει επίσης χρησιμοποιηθεί σε συνδυασμό με obinutuzumab, και έδειξε εξαιρετικά ενθαρρυντικά αποτελέσματα.

Μερικοί ασθενείς παρουσιάζουν παρατεταμένη PFS μετά από θεραπεία με fludarabine, cyclophosphamide and rituximab, ιδιαίτερα εκείνοι με μεταλλαγμένο IGHV που δεν έχουν τις διαγραφές del(17p) ή del(11q), οι οποίες σχετίζονται με χημειοθεραπεία ή σχετικά σύντομη PFS, αντίστοιχα. Τα μακροπρόθεσμα δεδομένα παρακολούθησης των αποτελεσμάτων των ασθενών μετά από τη θεραπεία με αυτό το σχήμα δείχνουν ότι οι ασθενείς με μεταλλαγμένο IGHV θα μπορούσαν να επιτύχουν μακροπρόθεσμο όφελος επιβίωσης (και πιθανή «θεραπεία») με χημειοανοσοθεραπεία.

- **Αναστολείς της σηματοδότησης του BCR:**

Έχουν αξιολογηθεί τρεις κύριες κατηγορίες φαρμάκων που μπορούν να αναστείλουν τη σηματοδότηση του BCR σε ασθενείς με ΧΛΛ:

- αναστολείς BTK,
- αναστολείς PI3K και
- αναστολείς κινάσης τυροσίνης σπλήνα (SYK).

Τα κύτταρα ΧΛΛ με μη μεταλλαγμένο IGHV φαίνεται να είναι πιο ευαίσθητα στους αναστολείς της σηματοδότησης του BCR από τα κύτταρα ΧΛΛ με μεταλλαγμένο IGHV, αλλά το εάν αναστολείς όπως το ibrutinib, είναι πιο αποτελεσματικοί σε ασθενείς με ΧΛΛ με μη μεταλλαγμένο IGHV, παραμένει να επικυρωθεί σε κλινικές δοκιμές.

Το Ibrutinib(αναστολέας BTK) έχει εγκριθεί στις Ηνωμένες Πολιτείες και την Ευρώπη για χρήση ως αρχική θεραπεία, καθώς και σε ασθενείς με υποτροπιάζουσα ή υψηλού κινδύνου νόσο. Επιπλέον, με τη συνεχή θεραπεία, οι ασθενείς που έλαβαν Ibrutinib είχαν σημαντικά μεγαλύτερη διάμεση PFS και συνολική επιβίωση από ότι οι ασθενείς που υποβλήθηκαν σε θεραπεία για 8 μήνες με το ofatumumab. Οι ανεπιθύμητες ενέργειες του ibrutinib περιλαμβάνουν κόπωση, διάρροια, αιμορραγία, εκχυμώσεις, εξάνθημα, αρθραλγία, μυαλγία, αυξημένη αρτηριακή πίεση και κοιλιακή μαρμαρυγή.

Οι αναστολείς της PI3K περιλαμβάνουν τα: idelalisib, duvelisib (επίσης γνωστό ως IPI-145), TGR-1022 και ACP-319 (επίσης γνωστό ως AMG-319). Τα τελευταία τρία φάρμακα αξιολογούνται σε κλινικές δοκιμές, ενώ το idelalisib εγκρίθηκε στις Ηνωμένες Πολιτείες και την Ευρώπη για τη θεραπεία ασθενών με υποτροπιάζουσα ΧΛΛ. Οι ασθενείς

που έλαβαν θεραπεία με rituximab και idelalisib είχαν σημαντικά υψηλότερα ποσοστά ανταπόκρισης και σημαντικά μεγαλύτερη διάμεση PFS και συνολική επιβίωση από τους ασθενείς που έλαβαν θεραπεία με rituximab και εικονικό φάρμακο, ενώ το φάρμακο είχε ιδιαίτερα καλά αποτελέσματα σε ασθενείς με τις μεταλλάξεις del(17p) και/ή TP53. Όπως και με το ibrutinib, οι ασθενείς που ξεκινούν τη θεραπεία με idelalisib μπορούν να παρουσιάσουν μια ταχεία μείωση της λεμφαδενοπάθειας που σχετίζεται με τη λεμφοκυττάρωση. Το γεγονός αυτό δεν πρέπει να θεωρείται ως ένδειξη εξέλιξης της νόσου. Οι ανεπιθύμητες ενέργειες του idelalisib περιλαμβάνουν τρανσαμινίτιδα (συνήθως κατά τους πρώτους μήνες θεραπείας), πνευμονίτιδα και κολίτιδα. Η τελευταία εμφανίζεται συνήθως πάνω από 6 μήνες μετά την έναρξη της θεραπείας με αυτό το φάρμακο και είναι συχνά αρκετά σοβαρή για να απαιτήσει την διακοπή της θεραπείας.

Οι ασθενείς που υποβάλλονται σε θεραπεία με idelalisib και rituximab θα πρέπει να εξετάζονται για ταυτόχρονη θεραπεία με προφυλακτική χαμηλή δόση acyclovir, για την προστασία από την επανενεργοποίηση του ιού varicella zoster, η οποία προκαλεί ευλογιά και έρπητα ζωστήρα. Οι ασθενείς πρέπει επίσης να λαμβάνουν προφυλακτικά αντιβιοτικά για να μετριάσουν τον κίνδυνο εμφάνισης ευκαιριακής λοίμωξης, όπως αυτή που προκαλείται από το *Pneumocystis jirovecii*. Τέλος, όπως και σε κάθε ασθενή που λαμβάνει θεραπεία με αντι-CD20 μονοκλωνικά αντισώματα, οι ασθενείς θα πρέπει να εξετάζονται για ενεργό μόλυνση με τον ιό της ηπατίτιδας Β πριν από την έναρξη της θεραπείας και να παρακολουθούνται περιοδικά για την επανενεργοποίηση του κυτταρομεγαλοϊού, ειδικά εάν να αναπτύσσουν ανεξήγητα συμπτώματα μόλυνσης.

Οι κλινικές δοκιμές φάσης I/II του fostamatinib, ενός από του στόματος αναστολέα του SYK, προκάλεσαν μείωση της λεμφαδενοπάθειας με ταυτόχρονη λεμφοκυττάρωση, μία βελτίωση στις σχετιζόμενες με τη νόσο κυτταροπενίες και ανακούφιση των συμπτωμάτων που σχετίζονται με τη νόσο, στους περισσότερους από τους ασθενείς με ΧΛΛ, που έλαβαν θεραπεία. Ωστόσο, η τοξικότητα του φαρμάκου, που περιορίζει τη δόση της θεραπείας με fesamatinib, περιλαμβάνει ουδετεροπενία, θρομβοπενία και διάρροια. Άλλοι αναστολείς του SYK, όπως το entospletinib, αξιολογούνται σε προκλινικές και κλινικές μελέτες.

- **Αναστολείς του BCL-2:**

Το Venetoclax είναι ένα μικρό μόριο που λειτουργεί ως μιμητικό της δράσης του BH3 για την αναστολή του BCL-2. Αυτό το φάρμακο είναι πολύ ισχυρό στην πρόκληση απόπτωσης σε κύτταρα ΧΛΛ, πιθανώς μειώνοντας την ικανότητα του BCL-2 να απομονώσει το προ-αποπτωτικό μόριο BCL-2-μεσολαβητή του κυτταρικού θανάτου (BCL-2-interacting mediator of cell death-BIM, επίσης γνωστός ως BCL2L1). Ως εκ τούτου, το venetoclax είναι αποτελεσματικό σε ασθενείς με υποτροπιάζουσα ή/και ανθεκτική στη θεραπεία νόσο ή σε ασθενείς με υποτροπιάζουσα νόσο και del(17p). Πράγματι, το συνολικό ποσοστό ανταπόκρισης για ασθενείς με υποτροπιάζουσα νόσο και del(17p) ήταν 79%, με το 8% να επιτυγχάνουν πλήρη ανταπόκριση. Επιπλέον, το εκτιμώμενο 12μηνο PFS ήταν 72% και η συνολική επιβίωση ήταν 87%. Ο FDA έχει εγκρίνει τη χρήση του venetoclax για ασθενείς με υποτροπιάζουσα νόσο και del(17p).

Οι τρέχουσες μελέτες έχουν δείξει ότι το venetoclax μπορεί να συνδυαστεί με ασφάλεια με rituximab ή obinutuzumab. Η τοξικότητα του venetoclax περιλαμβάνει γαστρεντερικές διαταραχές, ουδετεροπενία και σύνδρομο λύσης του όγκου, η οποία χαρακτηρίζεται από υπερκαλιαιμία, υπερ-ουρικαιμία και/ή αζωταιμία. Το σύνδρομο λύσης όγκου προκύπτει από την ταχεία καταστροφή των καρκινικών κυττάρων και την απελευθέρωση του κυτταρικού τους περιεχομένου στο αίμα. Συμβαίνει συνήθως όταν ξεκινά η θεραπεία με το venetoclax ή όταν αυξάνεται η δοσολογία. Έτσι, οι ασθενείς ξεκινούν το venetoclax με χαμηλή ημερήσια δόση, η οποία κλιμακώνεται κάθε εβδομάδα για 5 εβδομάδες για να μετριαστεί ο κίνδυνος ανάπτυξης συνδρόμου λύσης όγκου.

- **Αξιολόγηση της απόκρισης:**

Ιστορικά, ως ευνοϊκή ανταπόκριση στη θεραπεία, έχει οριστεί η μερική ύφεση ή πλήρης ύφεση. Η μερική υποχώρηση απαιτεί μείωση κατά 50% του όγκου (για παράδειγμα, λεμφαδενοπάθεια και σπληνομεγαλία), 50% μείωση της λεμφοκυττάρωσης και αριθμός αιμοπεταλίων μεγαλύτερος από 100.000 κύτταρα ανά μl (ή βελτίωση 50% έναντι της αρχικής τιμής) ή επίπεδα αιμοσφαιρίνης πάνω από 11 g ανά dl (ή 50% βελτίωση έναντι της αρχικής τιμής) χωρίς να απαιτούνται μεταγγίσεις ή εξωγενείς αυξητικοί παράγοντες. Η πλήρης ύφεση απαιτεί την ομαλοποίηση των αιμοπεταλίων, την επίλυση της λεμφαδενοπάθειας και της σπληνομεγαλίας και την κανονική λειτουργία του μυελού.

Λόγω του διαφορετικού μοτίβου ανταπόκρισης που παρατηρήθηκε με τους αναστολείς του BCR, έχει περιγραφεί μια νέα κατηγορία απόκρισης, η μερική απόκριση με λεμφοκυττάρωση. Η μερική απόκριση με λεμφοκυττάρωση ορίζεται ως μεγαλύτερη από 50% μείωση της λεμφαδενοπάθειας και της σπληνομεγαλίας, με λεμφοκυττάρωση. Συχνά οι αριθμοί των λεμφοκυττάρων στο αίμα είναι ίσοι ή μεγαλύτεροι από αυτούς που παρατηρήθηκαν πριν από τη χορήγηση της θεραπείας.

- **Ελάχιστη Υπολειμματική Νόσος (MRD):**

Σε κλινικές δοκιμές, γίνεται όλο και πιο συνηθισμένη η αξιολόγηση για με $\geq 0,01\%$ των κυττάρων της ΧΛΛ, μεταξύ του συνολικού πληθυσμού των μονοπύρηνων κυττάρων στο αίμα ή τον μυελό. Η MRD μπορεί να μετρηθεί με κυτταρομετρία ροής ή με PCR και αλληλούχιση επόμενης γενιάς (NGS), των αναδιατάξεων γονιδίων μεταβλητής περιοχής κλωνικής ανοσοσφαιρίνης.

Στις περισσότερες κλινικές δοκιμές για ασθενείς με ΧΛΛ, ιδιαίτερα εκείνες που διεξήχθησαν στην Ευρώπη, η αξιολόγηση της MRD πραγματοποιήθηκε με κυτταρομετρία ροής στα μονοπύρηννα κύτταρα, από το μυελό των οστών (προτιμώμενη, πιο ευαίσθητη μέθοδος) ή από το περιφερικό αίμα, 6 μήνες μετά τη έναρξη χορήγησης της θεραπείας, με μονοκλωνικό αντίσωμα αντι-CD20.

- **Υποτροπιάζουσα ασθένεια:**

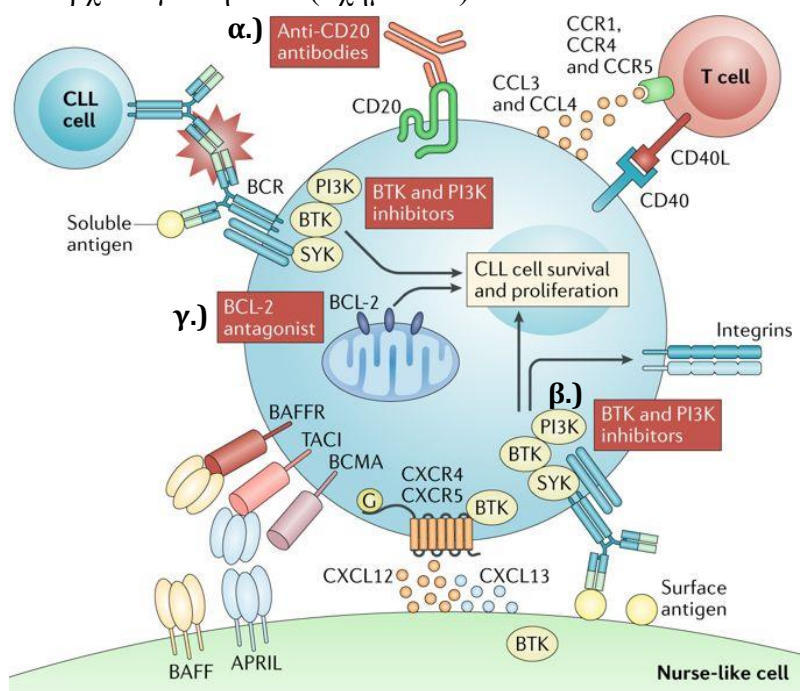
Επί του παρόντος, οι περισσότεροι ασθενείς με υποτροπιάζουσα ή ανθεκτική νόσο, λαμβάνουν χημειοανοσοθεραπεία. Τα τυπικά σχήματα διάσωσης περιλαμβάνουν αναστολείς BCR ή αναστολείς BCL-2, ιδιαίτερα σε περιπτώσεις όπου εμφανίζεται del(17p). Για ασθενείς που έλαβαν θεραπεία πρώτης γραμμής αναστολείς BTK, οι επιλογές θεραπείας περιλαμβάνουν χημειοανοσοθεραπεία (φλουδαραβίνη, κυκλοφωσφαμίδη και ριτουξιμάμπη ή bendamustine με αντί-CD20 μονοκλωνικό αντίσωμα), αναστολέα PI3K και αντί-CD20 μονοκλωνικό αντίσωμα, υψηλή δόση μεθυλπρεδνιζολόνης και αντί-CD20 μονοκλωνικό αντίσωμα.

Η επιλογή θεραπείας εξαρτάται από τα επιμέρους χαρακτηριστικά του ασθενούς και την πρόθεση της θεραπείας. Η αντοχή του Ibrutinib είναι ένας δυσμενής προγνωστικός παράγοντας για την κλινική έκβαση, ιδίως για ασθενείς που είχαν προηγουμένως εκτεθεί σε χημειοανοσοθεραπεία.

Εάν ασθενής που έχει υποβληθεί σε προηγούμενη θεραπεία, αναπτύξει del(17p) ή μεταλλαγμένο TP53, οι θεραπευτικές επιλογές περιλαμβάνουν τα ibrutinib, venetoclax ή idelalisib και ένα αντί-CD20 μονοκλωνικό αντίσωμα.

Η θεραπεία συντήρησης με μονοκλωνικό αντίσωμα αντι-CD20 μετά από χημειοανοσοθεραπεία έχει δείξει ότι παρατείνει τη PFS, αλλά όχι τη συνολική επιβίωση και συσχετίστηκε με σημαντικά υψηλότερη συχνότητα ουδετεροπενίας και κίνδυνο για λοιμώξεις[35, 48-50].

Παρακάτω, παρατίθεται σχήμα που δίνει μία απεικόνιση των στόχων των διαφόρων θεραπειών που υπάρχουν για τη ΧΛΛ(Σχήμα 1.4.).



Σχήμα 1.4. Οι διάφορες επιλογές θεραπείας για τη ΧΛΛ, και οι στόχοι τους. α.) Αντι-CD20 μονοκλωνικά αντισώματα, β.) Αναστολείς BTK και PI3K, γ.) Ανταγωνιστές-Αναστολείς BCL-2

1.3. MicroRNA ΚΑΙ ΧΡΟΝΙΑ ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΛΕΥΧΑΙΜΙΑ

1.3.1. Ορισμός και Βιογένεση των microRNAs

Τα microRNAs (miRNAs) είναι μικρά (20-24 nt) εξαιρετικά διατηρημένα μη κωδικά μόρια RNA (non-coding RNAs), που εμπλέκονται στη μετα-μεταγραφική ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης σε πολυκύτταρους οργανισμούς, επηρεάζοντας τόσο τη σταθερότητα όσο και τη μετάφραση των mRNAs. Τα microRNAs (miRNA), που ανακαλύφθηκαν αρχικά στο *Caenorhabditis elegans*, βρίσκονται στους περισσότερους ευκαρυωτικούς οργανισμούς, συμπεριλαμβανομένων των ανθρώπων [51-53]. Προβλέπεται ότι τα miRNAs αντιπροσωπεύουν το 1- 5% του ανθρώπινου γονιδιώματος και ρυθμίζουν τουλάχιστον το 30% των γονιδίων που κωδικοποιούν πρωτεΐνες [54, 55]. Μέχρι σήμερα έχουν εντοπιστεί 940 διαφορετικά μόρια miRNAs στο ανθρώπινο γονιδίωμα [56-58].

Τα microRNAs μεταγράφονται από την RNA πολυμεράση II, σαν μέρος των επικαλυμμένων και πολυαδενυλιωμένων πρωταρχικών μεταγραφών (pri-miRNAs), τα οποία μπορούν να είτε να κωδικοποιούν πρωτεΐνες ή όχι. Το πρωτεύον μετάγραφο, διασπάται από το ένζυμο Droscha ribonuclease III, ώστε να παραχθεί ένα πρόδρομο microRNA (pre-microRNA) μήκους περίπου 70 βάσεων, το οποίο περαιτέρω διασπάται από την κυτταροπλασματική ριβονουκλεάση Dicer για να δημιουργήσει το ώριμο microRNA και το antisense miRNA (miRNA*) (Σχήμα 1.5.) [58].

Το ώριμο miRNA ενσωματώνεται σε ένα σύμπλοκο, που ονομάζεται σύμπλοκο RISC (σύμπλοκο αποσιώπησης που προκαλείται από RNA/ RNA-induced silencing complex). Οι ρυθμιστικές λειτουργίες των microRNAs επιτυγχάνονται μέσω αυτού. Το microRNA συναρμολογείται στο σύμπλοκο RISC, ενεργοποιώντας το, με στόχο του το αγγελιοφόρο (messenger) RNA (mRNA), που καθορίζεται, κάθε φορά, από το microRNA. Έχουν προταθεί διάφορα μοντέλα “συναρμολόγησης” του συμπλέγματος RISC, και η έρευνα συνεχίζει να διερευνά τους μηχανισμούς της ενεργοποίησης του RISC. Ο βαθμός και η φύση της συμπληρωματικότητας μεταξύ του microRNA και του στόχου, προσδιορίζουν τον μηχανισμό αποσιώπησης των γονιδίων, δηλαδή τη μεταφραστική αναστολή ή αποσταθεροποίηση του mRNA στόχου, την εξαρτώμενη από τον slicer αποικοδόμηση του mRNA (slicer-dependent) ή την ανεξάρτητη του slicer αναστολή της μετάφρασης (slicer-independent) [58].

Πρόσφατα στοιχεία δείχνουν ότι τα σώματα-P είναι απαραίτητα για τη αποσιώπηση του γονιδίου με τη μεσολάβηση των microRNAs και ότι η συναρμολόγηση του RISC και η αποσιώπηση, πραγματοποιείται κυρίως εντός των σωμάτων-P. Τα σώματα-P είναι δυναμικές μικρές κυτταροπλασματικές σφαιροειδείς περιοχές πρωτεϊνών [59-61]. Τα σώματα-P περιέχουν mRNA μαζί με μια ποικιλία ενζύμων και παραγόντων που απαιτούνται για διεργασίες όπως απομάκρυνση mRNA, νετριενυλίωση, αποικοδόμηση του mRNA και μεταφραστική καταστολή [62].

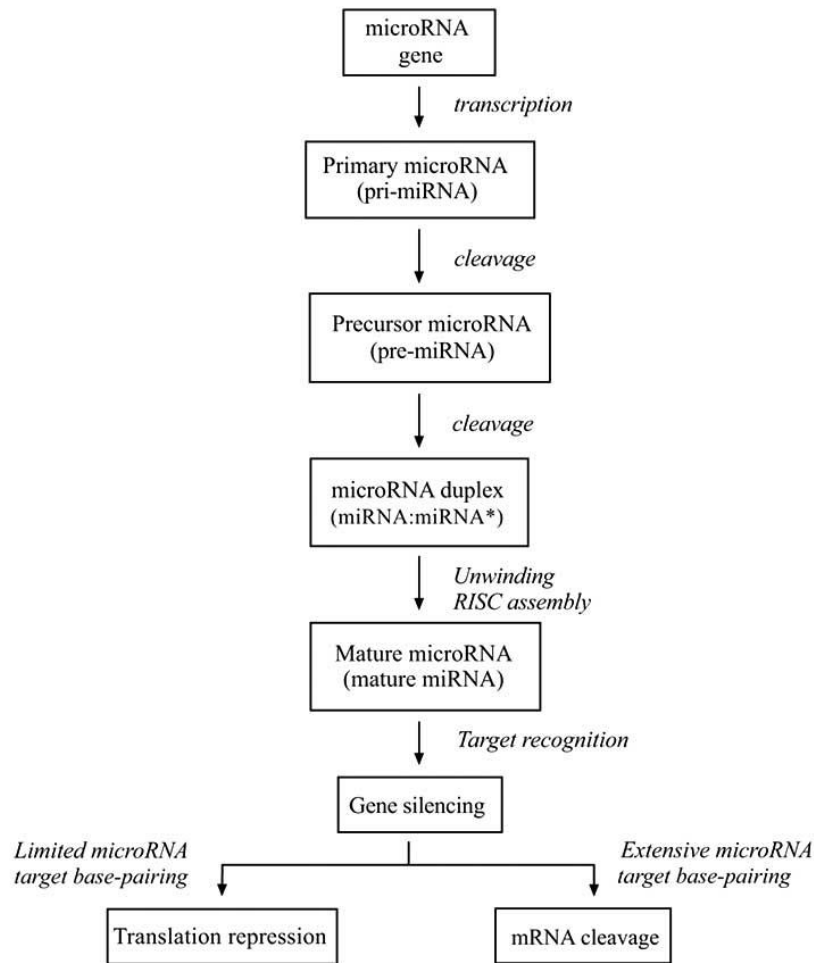
Το μοντέλο των σωμάτων-P, περιγράφει την ταξινόμηση και τη μετακίνηση των microRNA, μεταξύ των εξειδικευμένων διαμερισμάτων των σωμάτων-P, τα οποία

φιλοξενούν ένζυμα που απαιτούνται για την slicer-dependent και slicer-independent αποσιώπηση, αντιμετωπίζοντας, έτσι, την αναστρεψιμότητα αυτών των μηχανισμών. Η λεπτομερής γνώση των μονοπατιών των microRNAs είναι απαραίτητη για την κατανόηση του φυσιολογικού τους ρόλου και των συνεπειών που σχετίζονται με τη δυσλειτουργία και την απορρύθμιση[58].

Υπάρχει μια γενική κατανόηση της λειτουργίας των miRNAs, αλλά οι μηχανιστικές λεπτομέρειες της βιογένεσης των miRNAs και της αποσιώπησης των γονιδίων-στόχων είναι ακόμα ασαφείς. Αυτό το νέο και συναρπαστικό πεδίο της μοριακής βιολογίας συνεχίζει να εξελίσσεται, έχοντας σημαντικές επιπτώσεις στην ιατρική. Αν και η βιολογική λειτουργία των αναγνωρισμένων miRNAs μπορεί να είναι άγνωστη, η εξέταση των προφίλ έκφρασης αυτών των μορίων, μπορεί παρέχει πληροφορίες σχετικά με τη ρύθμιση και τη λειτουργία τους. Τέτοιες παρατηρήσεις έδειξαν ότι τα προφίλ έκφρασης των miRNAs μεταβάλλονται σε συγκεκριμένους όγκους, υποδηλώνοντας ότι τα miRNAs μπορεί να εμπλέκονται στην ανάπτυξη και τη διάγνωση του καρκίνου και άλλων ασθενειών [58, 63-66].

Η συμβατική οδός βιογένεσης των microRNAs στον άνθρωπο, αποτελείται από δύο γεγονότα διάσπασης, ένα πυρηνικό και ένα κυτταροπλασματικό, που διεξάγονται από δύο ριβονουκλεάσες III, τις Drosha και Dicer[67]. Όπως αναφέρθηκε, το γονίδιο του miRNA μεταγράφεται για να παράγει ένα πρωτογενές miRNA (pri-miRNA) το οποίο μετατρέπεται σε ένα πρόδρομο miRNA (pre-miRNA) και στη συνέχεια στη διπλέτα miRNA-miRNA*, που τελικά απελευθερώνει το ώριμο miRNA[68, 69]. Η προέλευση και το μέγεθος των miRNAs, φαίνεται να καθορίζουν ποια θα είναι η πυρηνική οδός, με την οποία θα προχωρήσει το miRNA. Ο πρώτος καθοριστής είναι η προέλευση του miRNA, που μπορεί να είναι είτε διαγονιδιακή είτε κωδικονίων-εσωνίων. Ο τρόπος με τον οποίο ταξινομούνται οι πρόδρομες μορφές των microRNAs, στην κάθε οδό, είναι ασαφής, αλλά φαίνεται να καθορίζεται από τη θέση προέλευσης του microRNA, την αλληλουχία και τη θερμοδυναμική σταθερότητά του.

Υπάρχουν και εναλλακτικές οδοί βιογένεσης που διαφέρουν στον αριθμό των γεγονότων διάσπασης και των υπεύθυνων ενζύμων[70].



Σχήμα 1.5. Ωρίμανση και λειτουργία των MicroRNA

- **Τα microRNAs στο Γονιδίωμα:**

Υπάρχουν πολλές κατηγορίες μικρών ενδογενών μορίων RNA, όπως είναι το μικρό μεταφορικό RNA (tRNA), το ριβοσωμικό RNA (rRNA), το μικρό πυρηνικό RNA (snRNA), το μικρό παρεμβαλλόμενο RNA (siRNA) και το microRNA. Τα MiRNAs και siRNA δεν ξεχωρίζουν βιοχημικά και λειτουργικά. Και τα δύο είναι μήκους 19-20 νουκλεοτιδίων (nt) και συναρμολογούνται σε RISC για να σιωπήσουν την έκφραση συγκεκριμένων γονιδίων[71]. Επομένως, τα μόρια αυτά διακρίνονται με βάση την προέλευσή τους.

Τα microRNAs προέρχονται από την περιοχή διπλής έλικας μήκους 60-70 βάσεων, μίας πρόδρομης δομής φουρκέτας RNA, ενώ τα siRNA παράγεται από μακρύ δίκλωνο RNA (dsRNA)[71-73]. Τα πρόδρομα miRNAs βρίσκονται συνήθως σε συστάδες μέσω πολλών διαφορετικών περιοχών του γονιδιώματος, συχνότερα εντός διαγονιδιακών περιοχών και εσωνίων γονιδίων που κωδικοποιούν πρωτεΐνες. Ιστορικά αυτές οι περιοχές αναφέρονταν ως "junk DNA"(σκουπίδια του DNA) επειδή η λειτουργία τους ήταν άγνωστη, κάτι που πλέον έχει καταρριφθεί σαν σκέψη. Σπανιότερα, τα πρόδρομα microRNAs βρίσκονται στα

εξόνια των μεταγραφών[74]. Οι μεταγραφικές μονάδες των microRNAs και η ρύθμισή τους ποικίλουν ανάλογα με τους γονιδιακούς τους τύπους.

Η πλειονότητα των miRNAs μεταγράφεται από την RNA πολυμεράση II. Ωστόσο, τα miRNA μπορεί επίσης να μεταγράφονται και από μία RNA πολυμεράση III, η οποία συνθέτει ειδικά μικρά μη-πρωτεϊνικά κωδικά RNAs, που συνδέονται με τη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου και την ανάπτυξη[75, 76]. Η σύνθεση του miRNA από την πολυμεράση II και την πολυμεράση III υποδηλώνει ότι το miRNA αποτελεί ένα θεμελιώδες ρυθμιστικό στοιχείο που παράγεται από διάφορους τύπους εντός του ανθρώπινου γονιδιώματος, οι οποίοι εμπλέκονται στον έλεγχο της γονιδιακής έκφρασης απαραίτητης για την κανονική κυτταρική λειτουργία.

Τα πρωτογενή μετάγραφα των miRNAs που παράγονται από την πολυμεράση II, υποτίθεται ότι ρυθμίζονται παρόμοια με τα μετάγραφα που κωδικοποιούν πρωτεΐνες. Η έκφραση των microRNAs μπορεί να ελεγχθεί με μεταγραφικούς παράγοντες και ενδεχομένως με άλλα miRNAs σαν απόκριση σε μια ποικιλία ενδογενών και εξωγενών ερεθισμάτων.

Η ρύθμιση των πολλαπλών σταδίων επεξεργασίας στη βιογένεση των miRNAs μπορεί επίσης να επηρεάσει την έκφραση. Πρωτεΐνες όπως οι HnRNPA1, SMAD1 και SMAD5, έχει δειχθεί ότι αλληλοεπιδρούν με πρόδρομα miRNAs και ρυθμίζουν την επακόλουθη επεξεργασία τους σε ώριμο miRNA. Οι ρυθμιστικές πρωτεΐνες μπορεί επίσης να δεσμεύσουν τα ώριμα miRNAs για να κατευθύνουν την αποικοδόμησή τους, εμποδίζοντας, έτσι, την έκφρασή τους. Το Lin28 είναι ένα παράδειγμα τέτοιας ρυθμιστικής πρωτεΐνης, δεσμεύει το miRNA let-7 και στοχεύει στην αποικοδόμησή του. Υπολογίζεται ότι το 10% της έκφρασης των miRNAs ελέγχεται μέσω της μεθυλίωσης του DNA. Πρόσθετα στοιχεία υποστηρίζουν τη ρύθμιση του miRNA, ως απόκριση σε κατάσταση υποξίας, ορμονικών ή διαιτητικών αλλαγών.

- **Βιογένεση των microRNAs - Πυρηνικό Μέρος:**

- **Διαγονιδιακά microRNAs:**

Τα διαγονιδιακά miRNAs μεταγράφονται από την πολυμεράση II ή III, παράγοντας ένα pri-miRNA, μια μεγάλη δομή φουρκέτας με μονόκλωνες επεκτάσεις RNA και στα δύο άκρα. Μόνο εκείνα τα pri-miRNAs με το κατάλληλο μήκος στελέχους, ένας μεγάλο εύκαμπτο τερματικό βρόχο (≥ 10 bp) και τη δυνατότητα παραγωγής μονόκλωνων προεξοχών RNA, θα υποστούν αποτελεσματική επεξεργασία και θα ωριμάσουν σε λειτουργικό miRNA[69].

Η διαδικασία ωρίμανσης ξεκινά με την πυρηνική διάσπαση του pri-miRNA από ένα πρωτεϊνικό σύμπλεγμα γνωστό ως "Μικροεπεξεργαστής", το οποίο αποτελείται από την ενδονουκλεάση RNase III Drosha και το διπλής έλικας γονίδιο 8 της κρίσιμης περιοχής του συνδρόμου DiGeorge της πρωτεΐνης σύνδεσης RNA (DGCR8)[67]. Πρόσφατα στοιχεία δείχνουν ότι η μοναδική διασταυρούμενη ρύθμιση μεταξύ Drosha και DGCR8 είναι

σημαντική για τον έλεγχο της βιογένεσης των microRNA. Σε αυτή τη διασταυρούμενη ρύθμιση, το DGCR8 σταθεροποιεί τη Drosha μέσω της αλληλεπίδρασης πρωτεΐνης-πρωτεΐνης και βοηθά στον έλεγχο των επιπέδων της πρωτεΐνης Drosha[77]. Αντίθετα, η Drosha στο πλαίσιο του μικροεπεξεργαστή ρυθμίζει αρνητικά το mRNA του DGCR8 μεταγραφικά, διαχωρίζοντας μια φουρκέτα 88 nt που βρίσκεται στην 5' αμετάφραστη περιοχή (UTR), η οποία αποσταθεροποιεί το μετάγραφο.

Επιπλέον, πρωτεΐνες που σχετίζονται με το μικροεπεξεργαστή απαιτούνται για την επεξεργασία συγκεκριμένων pre-miRNAs. Ένα τέτοιο παράδειγμα είναι το miR-18a, που απαιτεί τον πρωτεϊνικό παράγοντα hnRNPA1. Το πιο πρόσφατο μοντέλο επεξεργασίας υποδεικνύει ότι το DGCR8 αναγνωρίζει το pri-miRNA στη σύνδεση ssRNA-dsRNA και κατευθύνει τη Drosha σε ένα συγκεκριμένο σημείο διάσπασης περίπου 11 ζευγών βάσεων, όπου η Drosha κόβει για να απελευθερώσει ένα πρόδρομο miRNA φουρκέτας (pre-miRNA) περίπου 60-70bp. Το pre-miRNA περιέχει το ώριμο miRNA στον 5' ή 3' βραχίονα, όπως ορίζεται από την περικοπή από τη Drosha.

- **MicroRNAs που κωδικοποιούνται - MicroRNAs εσώνιων:**

Αντίθετα, τα miRNAs που βρίσκονται μέσα σε ένα εσώνιο ενός γονιδίου που κωδικοποιεί πρωτεΐνη, μεταγράφονται από την πολυμεράση II, ως μέρος του pre-mRNA. Τα μέχρι τώρα στοιχεία υποστηρίζουν δύο πιθανές διεργασίες αποκοπής του miRNA, οι οποίες μπορεί να συμβαίνουν ταυτόχρονα ή ανεξάρτητα. Η αρχική έρευνα κατέληξε στο συμπέρασμα ότι τα εσώνια αποκόπτονται από το pre-miRNA. Δεν είναι ξεκάθαρο κατά πόσον η διαδικασία συναρμολόγησης απελευθερώνει pre-miRNA, που προχωρεί στην πυρηνική εξαγωγή για ωρίμανση μέσα στο κυτταρόπλασμα, ή εάν ένα pri-miRNA απελευθερώνεται, αποκτώντας μια δευτερεύουσα δομή φουρκέτας, και συνεχίζοντας την διαδικασία, όπως το διαγονιδιακό pri-miRNA που πρόκειται να υποβληθεί σε επεξεργασία με το σύμπλεγμα του μικροεπεξεργαστή.

Μια πρόσθετη υποθετική πυρηνική οδός είναι πιθανή, σχετική με τα μικρά (~ 50-200 nt) εσώνια που περιέχουν miRNA, τα οποία έχουν δομή που επιτρέπει το σχηματισμό φουρκέτας. Η εναλλακτική υπόθεση, είναι ότι η αποκοπή των pre-miRNA, δεν αποτελεί απαραίτητη προϋπόθεση για την διαδικασία του pri-miRNA[58].

- **Πυρηνική Εξαγωγή των microRNAs:**

Η μετέπειτα επεξεργασία των pre-miRNAs, λαμβάνει χώρα στο κυτταρόπλασμα. Τα pre-miRNAs συναρμολογούνται σε ένα σύμπλεγμα, μαζί με τον παράγοντα νουκλεοκυτταροπλασματικής μεταφοράς Exportin-5 και RanGTP, ο οποίος αποτρέπει την αποικοδόμηση στον πυρήνα και διευκολύνει τη μετατόπιση στο κυτταρόπλασμα. Το μονοπάτι εξαγωγής από τον πυρήνα Exportin-5/RanGTP, μπορεί να στηρίζει την υπόθεση ότι τα διαγονιδιακά miRNAs μεταγράφονται από την RNA πολυμεράση II ή III που παράγει ένα πρωτεύον μόριο miRNA (pri-miRNA), το οποίο μετατρέπεται σε ένα πρόδρομο miRNA (pre-miRNA) από το σύμπλεγμα μικροεπεξεργαστή, που αποτελείται από τα DGCR8 και

Drosha. Τα pre-miRNAs εξάγονται στο κυτταρόπλασμα σε ένα νουκλεοκυτταροπλασματικό μεταφορέα που περιέχει Exportin 5 και Ran-GTP. Τα miRNAs εντός των εσωνίων μεταγράφονται ως μέρος του προδρόμου miRNA (pre-miRNA) από την RNA πολυμεράση II. Η αλληλουχία miRNA αποκόπτεται από το pre-miRNA από συστατικά των συγκολλητικών σωμάτων ή από τον μικροεπεξεργαστή για την απελευθέρωση ενός pre-miRNA που εξάγεται. Εναλλακτικά, απελευθερώνεται ένα πρωτογενές miRNA (pri-miRNA) το οποίο υφίσταται διάσπαση στο σύμπλεγμα μικροεπεξεργαστή, για τη δημιουργία του pre-miRNA.

- **Βιογένεση microRNA - Κυτταροπλασματικό Μέρος:**

Το κυτταροπλασματικό συστατικό της ωρίμανσης των miRNAs είναι η πολυμεράση III Dicer. Οι άνθρωποι έχουν μόνο μία ισομορφή του Dicer, η οποία λειτουργεί και στα δύο μονοπάτια των siRNAs και miRNAs. Η Dicer είναι μια πρωτεΐνη με πολλά τμήματα, που βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα και/ή στο αδρό ενδοπλασματικό δίκτυο. Η Dicer τυπικά διασπά το dsRNA με έναν τρόπο ανεξάρτητο του ATP, έχει όμως προταθεί ότι μπορεί να απαιτείται ATP για την ανακύκλωση ενζύμων που βοηθούν στη απελευθέρωση του προϊόντος και/ή των μεταβολές της διαμόρφωσης πρωτεϊνών.

Στο κυτταρόπλασμα, τα pre-miRNAs, ωριμάζουν σε μία διπλέτα miRNAs, με δύο εναλλακτικούς τρόπους. Ο άμεσος τρόπος (Single Cleavage Pre-miRNA Processing), αποτελείται από ένα βήμα αποκοπής που πραγματοποιείται από τη Dicer, και σχετίζεται με τα γονίδια TRBP και PACT. Σε αντίθεση, το έμμεσο μονοπάτι (Double Cleavage Pre-miRNA Processing) περιλαμβάνει δύο βήματα αποκοπής, στα οποία συμμετέχουν τα Dicer, Ago2 και TRBP.

- **Συναρμολόγηση του RISC:**

Το δίκλωνο microRNA είναι ένα μόριο, που αποτελείται από το ώριμο miRNA (κλώνος-οδηγός) και τον κλώνο “επιβάτη”, όπως συνηθίζεται να συμβολίζεται miRNA-miRNA* [78]. Στην πορεία, το miRNA-miRNA* διασπάται, και ο κλώνος που αποτελεί το ώριμο miRNA εισέρχεται στο σύμπλοκο RISC, ώστε να λειτουργήσει ως οδηγός, κατευθύνοντας της αποσιώπηση των mRNA-στόχων. Η συναρμολόγηση και ενεργοποίηση του RISC έχει κυρίως μελετηθεί στη *Drosophila*. Έχει προταθεί η αποδιάταξη των δύο κλώνων του miRNA-miRNA* με μία διαδικασία εξαρτώμενη από ATP, το οποίο επιτρέπει στο ώριμο miRNA να προσδεθεί στο Ago2 τμήμα του συμπλόκου RISC, οδηγώντας έτσι στην ενεργοποίησή του [79].

1.3.2. Βασικές λειτουργίες των microRNAs και ρόλος τους στην παθοφυσιολογία ασθενειών όπως ο Καρκίνος

- Λειτουργίες των miRNAs:

Τα microRNAs δρουν ως ρυθμιστές γονιδίων (gene regulators), οι λειτουργίες των οποίων διαμεσολαβούνται από την **αναστολή της μετάφρασης** ή την **αποικοδόμηση του mRNA**, μέσω δέσμευσης miRNAs σε θέσεις στόχους στις 3'-αμετάφραστες περιοχές πρωτεϊνικών μεταγραφών. Οι πρώτες μελέτες των microRNAs και της παρεμβολής RNA (RNA interference), έδειξαν ότι ο βαθμός συμπληρωματικότητας αλληλουχίας μεταξύ του microRNA και του mRNA-στόχου καθορίζει εάν το mRNA στόχος αποικοδομείται ή αναστέλλεται η μετάφρασή του σε πρωτεΐνη.

Σύμφωνα με αυτό το μοντέλο, η απόλυτη συμπληρωματικότητα αλληλουχίας οδηγεί σε ενδονουκλεολυτική διάσπαση και αποικοδόμηση του mRNA, ενώ η λιγότερο απόλυτη συμπληρωματικότητα, οδηγεί σε αναστολή της μετάφρασης. Αυτό το μοντέλο υποστηρίζεται από την παρατήρηση, ότι τα περισσότερα microRNAs των φυτών έχουν σχεδόν τέλεια συμπληρωματικότητα αλληλουχίας με τα mRNAs στόχους τους και διαμεσολαβούν στην διάσπαση του mRNA, ενώ τα microRNAs των ζώων στερούνται μια τόσο τέλεια ή σχεδόν τέλεια συμπληρωματικότητα αλληλουχίας, και μεσολαβούν στην καταστολή της μετάφρασης, όπως υποδεικνύεται από το lin-4. Τα microRNAs μπορεί να αναστείλουν τη μετάφραση σε ένα βήμα μετά τον τερματισμό, παρεμβάλλοντας με την επιμήκυνση της μετάφρασης.

Αν και η διάσπαση του mRNA με τη μεσολάβηση miRNA απαιτεί γενικά μόνο μία θέση σύνδεσης του mRNA, ο αριθμός των θέσεων δέσμευσης του miRNA στο mRNA στόχο, μπορεί να επηρεάσει την αποτελεσματικότητα της καταστολής της μετάφρασης. Πολλοί αλγόριθμοι έχουν δημιουργηθεί για την πρόβλεψη των στόχων των microRNAs των θηλαστικών. Συχνά προβλέπονται πολλοί στόχοι, πολλοί από τους οποίους ενδέχεται να είναι ψευδώς θετικοί.

Επειδή το μερικό ζευγάρισμα βάσεων μεταξύ ενός microRNA και ενός πιθανού στόχου μπορούν να επηρεάσουν την πρωτεΐνη αλλά όχι τα επίπεδα mRNA, ήταν δύσκολο να γίνει πειραματική επιβεβαίωση των στόχων των microRNAs στα ζώα, στη μεγάλη πλειοψηφία τους. Παρόλα αυτά, σε αυτές τις περιπτώσεις στις οποίες το επίπεδο των mRNAs που αποτελούν στόχο επηρεάζεται από τα microRNAs, απευθείας ανάλυση των επιπέδων mRNA μπορεί να βοηθήσει στην πρόβλεψη των στόχων των microRNAs.

Η αναγνώριση των στόχων των microRNAs είναι απαραίτητη για την κατανόηση των λειτουργιών τους. Είναι πιθανό πολλά microRNAs να έχουν περισσότερους από έναν στόχους. [80]Ως εκ τούτου, τα microRNAs πιθανώς να ρυθμίζουν χιλιάδες ανθρώπινα γονίδια, πολλά από τα οποία εμπλέκονται στη μεταγραφική ρύθμιση ή άλλες βασικές κυτταρικές λειτουργίες, όπως είναι ο έλεγχος του κυτταρικού κύκλου. Η φαινομενικά απεριόριστη δυναμική των microRNAs στη ρύθμιση της έκφρασης πολλαπλών κυτταρικών γονιδίων, μας προϋδεάζει για τον σημαντικό ρόλο που έχουν σε διαφορετικές βιολογικές διαδικασίες.

Μελέτες σε ζωικά μοντέλα έχουν αποκαλύψει σημαντικές λειτουργίες των microRNAs στον έλεγχο της ανάπτυξης. Πολλά microRNAs φαίνεται να παρουσιάζουν παροδική ή ειδική ως προς κάποιο ιστό-έκφραση, προτείνοντας ότι παίζουν κάποιο σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη οργάνων και ιστών, και τη λειτουργία και τη συντήρηση. Στο *C. elegans*, τα lin-4 και lin-7 ελέγχουν το χρόνο ανάπτυξης των προνυμφών, και το lsy-6 είναι σημαντικό για τη νευρωνική διαμόρφωση. Στη *Drosophila*, το microRNA bantam ρυθμίζει την ανάπτυξη, προστατεύοντας τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, και αναστέλλοντας την απόπτωση μέσω ελέγχου της ρύθμισης του προαποπτωτικού γονιδίου hid. Στα θηλαστικά, τα microRNA έχει φανεί να ρυθμίζουν την μοίρα των κυττάρων, συμπεριλαμβανομένης της διαφοροποίησης των κυτταρικών γενεών σε έναν αριθμό τύπων ιστών. Για παράδειγμα, το miR-181 έχει αποδειχθεί ότι ρυθμίζει τη διαφοροποίηση των αιμοποιητικών κυτταρικών γενεών. Το miR-223 ρυθμίζει την ανθρώπινη κοκκιοποίηση, μέσω ενός ρυθμιστικού μονοπατιού το οποίο περιλαμβάνει τους μεταγραφικούς παράγοντες NFI-A και CCAAT. Τα miR-1 και miR-133 προωθούν την μυογένεση και τον πολλαπλασιασμό των μυοβλαστών. Τα ειδικά για τον εγκέφαλο miR-124a και miR-9 επηρεάζουν την νευρωνική διαφοροποίηση στα καλλιέργειες που προέρχονται από εμβρυικά βλαστικά κύτταρα. Επιπλέον, τα microRNA 15, 16 και 21 εμπλέκονται με την απόπτωση. Εξ αιτίας του σημαντικού ρόλου των microRNA σε τόσο μεγάλη ποικιλία βιολογικών λειτουργιών, οι ανωμαλίες στην έκφραση των microRNAs είναι πιθανό να συνεισφέρουν σημαντικά σε πολλές παθολογικές διαδικασίες, όπως είναι η ανάπτυξη του καρκίνου[81].

- **Τα MicroRNAs στον καρκίνο:**

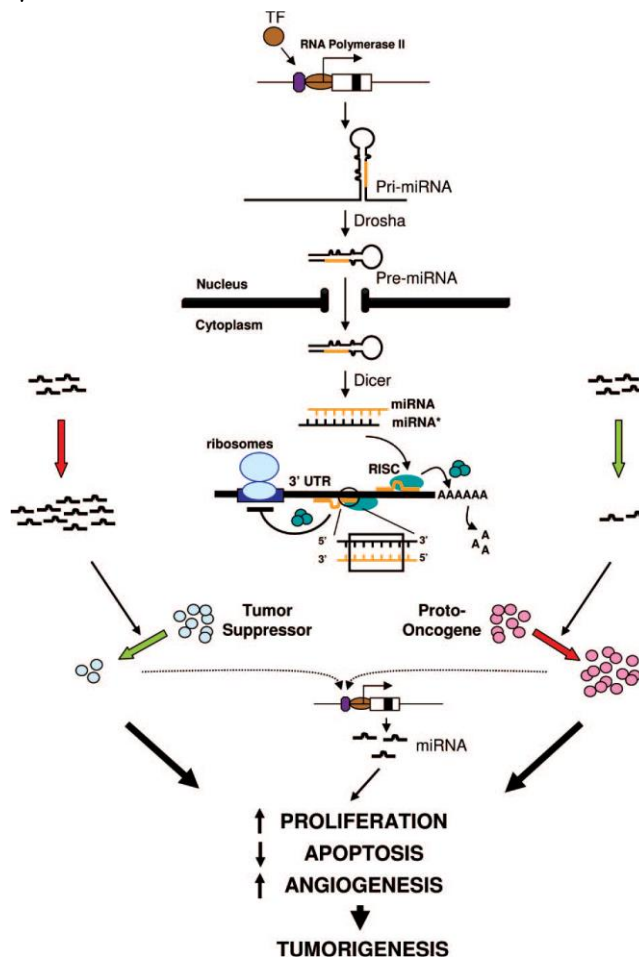
Ο καρκίνος είναι μια διαδικασία πολλαπλών σταδίων στην οποία τα φυσιολογικά κύτταρα παρουσιάζουν γενετικές αλλαγές που εξελίσσονται μέσω μιας σειράς προκακοήθων καταστάσεων (εκκίνηση) σε διηθητικό καρκίνο (εξέλιξη) που μπορεί να εξαπλωθεί σε όλο το σώμα (μετάσταση). Ο προκύπτων μετασχηματισμένος κυτταρικός φαινότυπος έχει αρκετά διαφορετικά χαρακτηριστικά, τα οποία επιτρέπουν στα κύτταρα να πολλαπλασιάζονται υπερβολικά με αυτόνομο τρόπο. Τα καρκινικά κύτταρα είναι ικανά να πολλαπλασιάζονται ανεξάρτητα από τα σήματα ανάπτυξης, να μην ανταποκρίνονται στα σήματα ανασταλτικής ανάπτυξης, να αποφεύγουν προγραμματισμένες οδούς κυτταρικού θανάτου (απόπτωσης), να ξεπερνούν τα όρια εγγενούς κυτταρικής αντιγραφής, να επάγουν, να διατηρούν την αγγειογένεση και να σχηματίζουν νέες αποικίες ασυνεχείς με τον πρωτογενή όγκο.

Η δυσλειτουργία των γονιδίων που εμπλέκονται στον πολλαπλασιασμό, τη διαφοροποίηση και / ή την απόπτωση των κυττάρων σχετίζεται με την έναρξη και πρόοδο του καρκίνου. Τα γονίδια που συνδέονται με την ανάπτυξη του καρκίνου χαρακτηρίζονται ως ογκογονίδια και καταστολείς όγκων. Τα προϊόντα των ογκογονιδίων μπορούν να κατηγοριοποιηθούν σε έξι ομάδες με βάση τη λειτουργία τους. Μπορεί να είναι παράγοντες μεταγραφής, αυξητικοί παράγοντες, υποδοχείς αυξητικών παραγόντων, αναμορφωτές χρωματίνης, ρυθμιστές απόπτωσης ή μεταλλάκτες σημάτων. Η υπερέκφραση αυτών των γονιδιακών προϊόντων παρέχει επιλεκτικά πλεονεκτήματα ανάπτυξης που μπορούν να

οδηγήσουν στην ανάπτυξη του όγκου. Τα ογκογονίδια μπορούν να ενεργοποιηθούν με γενετικές τροποποιήσεις που ενισχύουν το γονίδιο, αλλάζουν τους προαγωγούς / ενισχυτές για να αυξήσουν τη γονιδιακή έκφραση ή να μεταβάλουν τη δομή της πρωτεΐνης σε μια μόνιμη ενεργή κατάσταση. Αντιστρόφως, τα γονιδιακά προϊόντα καταστολής όγκου έχουν ρυθμιστικούς ρόλους σε βιολογικές διεργασίες. Η απώλεια ή η μείωση της λειτουργίας των καταστολέων όγκων έχει ως αποτέλεσμα δυσλειτουργία που σχετίζεται με τον καρκίνο.

Πρόσφατα, ο ορισμός των **ογκογονιδίων** και των **ογκοκατασταλτικών γονιδίων**, έχει επεκταθεί από τα κλασικά γονίδια που κωδικοποιούν την πρωτεΐνη, συμπεριλαμβάνοντας τα miRNAs (Σχήμα 1.6.). Η δυσλειτουργία των προφίλ έκφρασης των miRNAs έχει καταδειχθεί στους περισσότερους εξεταζόμενους όγκους. Ωστόσο, η ειδική ταξινόμηση των miRNAs ως ογκογόνων ή ογκοκατασταλτικών γονιδίων μπορεί να είναι δύσκολη λόγω των περίπλοκων μορφών έκφρασης τους.

Τα μοτίβα έκφρασης των miRNAs διαφέρουν για συγκεκριμένους ιστούς και καταστάσεις διαφοροποίησης, γεγονός που δημιουργεί δυσκολίες στην ταξινόμηση. Δεν είναι πάντοτε σαφές εάν αλλαγμένα πρότυπα miRNAs, αποτελούν την άμεση αιτία του καρκίνου ή την έμμεση επίδραση αλλαγών στον κυτταρικό φαινότυπο. Επιπρόσθετα, ένα miRNA μπορεί να ρυθμίζει πολλαπλούς στόχους. Αυτό σε συνδυασμό με την ειδική για τον ιστό έκφραση θα μπορούσε να εμπλέξει ένα απλό miRNA ως καταστολέα όγκου σε ένα πλαίσιο και ένα ογκογονίδιο σε ένα άλλο.



Σχήμα 1.6. Τα microRNAs δρουν ως ογκογονίδια και ογκοκατασταλτικά γονίδια [81]

- **Τα microRNAs ως Ογκοκατασταλτικά Γονίδια και Ογκογονίδια:**

Τα Let-7 miRNAs (let-7s) ήταν από τα πρώτα miRNAs που ανακαλύφθηκαν στο *Caenorhabditis elegans*. Τα Let-7s είναι εξαιρετικά διατηρημένα μεταξύ των ασπόνδυλων και των σπονδυλωτών, συμπεριλαμβανομένων των ανθρώπων που έχουν δώδεκα let-7 γονίδια που κωδικοποιούν εννέα miRNAs. Αρκετά let-7 γονίδια έχουν χαρτογραφηθεί σε περιοχές εντός του ανθρώπινου γονιδιώματος που συχνά μεταβάλλονται ή διαγράφονται σε διάφορους καρκίνους. Αυτή η ανακάλυψη μαζί με πολλές άλλες μελέτες έχουν εμπλέξει το let-7 ως καταστολέα όγκων. Δύο σαφώς καθορισμένοι στόχοι του Let-7 είναι τα γνωστά ογκογονίδια Ras και η ομάδα AT-hook 2 με υψηλή κινητικότητα (HMGA2). Το Ras είναι μια GTPase που μεταφέρει το σήμα από τους υποδοχείς της κυτταρικής επιφάνειας σε μία λειτουργική ενδοκυτταρική οδό, η οποία επηρεάζει τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων, την ανάπτυξη, την οργάνωση του κυτταροσκελετού, τις κυτταρικές κινήσεις και την επιβίωση. Τα ενεργά Ras μεταλλάγματα (H-Ras, K-Ras και N-Ras), βρίσκονται σε μια ποικιλία ανθρώπινων καρκίνων, συμπεριλαμβανομένου του παγκρέατος, του παχέος εντέρου, του θυρεοειδούς και του πνεύμονα. Το Let-7s ρυθμίζει την έκφραση των Ras, K-Ras και N-Ras, μέσω δέσμευσης στην 3'UTR που αναστέλλει τη μετάφραση. Λειτουργώντας ως καταστολέας όγκου, το let-7 μεσολαβεί στην καταστολή του Ras και στις κυτταρικές διεργασίες που αυτό ρυθμίζει.

Το HMG2A είναι ένας μεταγραφικός παράγοντας μη-ιστόνης που μεταβάλλει τη διαμόρφωση του DNA, οδηγώντας στην άμεση μεταγραφική ενεργοποίηση μιας ποικιλίας γονιδίων που επηρεάζουν την κυτταρική ανάπτυξη, τη διαφοροποίηση, τον πολλαπλασιασμό και την επιβίωση. Το HMG2A είναι μη ανιχνεύσιμο σε φυσιολογικούς ιστούς στους ενήλικες, αλλά εκφράζεται σε μεγάλο βαθμό σε εμβρυϊκούς ιστούς, ιστούς καρκίνου του πνεύμονα και λειομώματα μήτρας. Μελέτες αποκαλύπτουν ότι τα let-7 ρυθμίζουν το HMG2A, αποσταθεροποιώντας το mRNA του μέσω δέσμευσης της 3'UTR. Αυτή η ρύθμιση μπορεί να εξηγήσει το σχέδιο έκφρασης του HMG2A, καθώς το let-7 παρουσιάζει ένα σχήμα αμοιβαίας έκφρασης σε σύγκριση με το HMG2A στον εμβρυϊκό και ώριμο ιστό. Η απώλεια του ελέγχου του let-7 HMG2A προωθεί την κυτταρική ανάπτυξη και τον πολλαπλασιασμό.

Η οικογένεια mi-7 της οικογένειας let-7 ρυθμίζει πολυάριθμα γονίδια, χωρίς όλα από αυτά να ορίζονται σαφώς ως HMG2A και Ras. Πρόσφατα δεδομένα δείχνουν ότι τα let-7s παίζουν πολύ μεγαλύτερο ρόλο στον έλεγχο του κυτταρικού πολλαπλασιασμού από ό, τι αρχικά θεωρούνταν, καθώς έχει αποδειχθεί ότι αναστέλλουν λειτουργικά πολυάριθμους ρυθμιστές του κυτταρικού κύκλου, συμπεριλαμβανομένων των c-myc, CDC25A, CDK6 και της κυκλίνης D2[58].

- **Τα microRNAs στην ταξινόμηση και πρόγνωση του καρκίνου:**

Πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι τα microRNAs εμπλέκονται σε μία περίπλοκη αλληλεπίδραση με τη σηματοδότηση του BCR και τα ερεθίσματα του μικροπεριβάλλοντος. Πράγματι, η σηματοδότηση BCR και η παραγωγή ανοσοσφαιρίνης μπορεί να ρυθμιστεί από

microRNAs ενώ η έκφραση ορισμένων microRNAs μπορεί να μεταβληθεί μέσω διέγερση από το BCR.

Η ενεργοποίηση του BCR μπορεί να οδηγήσει σε μειωμένα επίπεδα miR-29c, miR-150, miR-181b ή miR-223 και χαμηλή έκφραση αυτών των microRNAs παρατηρήθηκε σε ασθενείς με μικρότερη επιβίωση ή/και χρόνο σε θεραπεία. Το miR-155 είναι αντίθετα ρυθμισμένο ως απόκριση στην σύνδεση του BCR και φαίνεται να παίζει ρόλο κατά τη ανάπτυξη των B- και T-κυττάρων.

Φαίνεται, λοιπόν, ότι τα microRNAs μπορεί να αποτελέσουν ένα χρήσιμο συμπλήρωμα στην ταξινόμηση των όγκων, που διαφορετικά δεν μπορούν να διαγνωστούν με ακρίβεια από τη μορφολογία και τον ανοσοφαινότυπο. Χρησιμοποιώντας μεθόδους προφίλ έκφρασης των miRNAs, κατέστη δυνατό να ταξινομηθούν σωστά 12 από τα 17 κακώς διαφοροποιημένα καρκινώματα. Αντιθέτως, μία μέθοδος βασισμένη σε mRNAs, ταξινόμησε σωστά μόνο ένα από αυτά.

Υπάρχουν αναδυόμενα στοιχεία ότι τα miRNAs μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την πρόγνωση του καρκίνου. Επειδή η μειωμένη έκφραση του let-7, όπως αναφέρθηκε, και η υψηλή έκφραση του miR-155 στον ανθρώπινο καρκίνο του πνεύμονα έχουν συσχετιστεί με κακή επιβίωση, αυτά τα miRNAs μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την ταυτοποίηση των ασθενών αυτών, σε κατηγορία με πιο έντονη παρακολούθηση και συμπληρωματική θεραπεία[81].

1.3.3. Τα microRNAs στη Χρόνια Λεμφοκυτταρική Λευχαιμία

Οι αιμοποιητικές κακοήθειες, όπως η ΧΛΛ, παρουσιάζουν κακή διάγνωση λόγω της έλλειψης ενδείξεων στα αρχικά στάδια. Η έγκαιρη διάγνωση της ΧΛΛ θα μπορούσε να συμβάλει στην καλύτερη κατανόηση των μονοπατιών που εμπλέκονται στην παθογένεση της ΧΛΛ[82].

Τα microRNAs ρυθμίζουν την έκφραση γονιδίων, μία ιδιότητα που μας επιτρέπει τον ακριβή έλεγχο πολλών διαδικασιών των κυττάρων. Εμπλέκονται σε διάφορες κυτταρικές διεργασίες, όπως η μεθυλίωση του DNA, η κυτταρική ανάπτυξη και πολλαπλασιασμός, ο μεταβολισμός, η διαφοροποίηση και η απόπτωση[82]. Η απορρύθμισή τους μπορεί να επηρεάσει τις διαδρομές στον κυτταρικό κύκλο και τον πολλαπλασιασμό, και να μεταβάλει τα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων που εμπλέκονται στην ανάπτυξη/πρόοδο των όγκων[83]. Συγκεκριμένα, η απορρύθμισή τους συμβαίνει σε πολλούς τύπους καρκίνων του ανθρώπου όπως ο καρκίνος του μαστού, ο γαστρικός, του οισοφάγου, της ουροδόχου κύστεως, του θυρεοειδούς, και διάφοροι αιματολογικοί.

Η απορρύθμιση των microRNAs μπορεί να προέρχεται από χρωμοσωμικές αλλοιώσεις, επιγενετικές διαμορφώσεις, επιλογή αλληλόμορφων, παρεκκλίνουσα πρόδρομη επεξεργασία, ή αλληλεπίδραση με άλλα γονίδια. Δεδομένων αυτών των αποτελεσμάτων, υπογραμμίζεται ότι τα microRNAs έχουν βαθύ αντίκτυπο στη ανάπτυξη και πρόοδο της ΧΛΛ.

Στην ΧΛΛ, τα microRNAs μπορούν να λειτουργήσουν ως **ογκογονίδια** ή **ογκοκατασταλτικά γονίδια**. Επιπλέον, πολλαπλές ενδείξεις έχουν δείξει ότι η έκφραση

ενός συνόλου miRNAs σχετίζεται με την ανταπόκριση στη θεραπεία σε ασθενείς με ΧΛΛ. Ως εκ τούτου, αυτά τα μόρια θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ως διαγνωστικοί και θεραπευτικοί βιοδείκτες για την εμφάνιση ή εξέλιξη της ΧΛΛ στους ασθενείς με ΧΛΛ[82, 83].

- **Τα microRNAs στην αιμοποίηση:**

Η ρύθμιση ποικιλίας γονιδίων και μορίων που εμπλέκονται σε μονοπάτια των αιμοποιητικών κυττάρων, θα μπορούσε να διαδραματίσει κρίσιμους ρόλους σε αιμοποιητικές κακοήθειες, συμπεριλαμβανομένης της ΧΛΛ.

Η οικογένεια HOX είναι μία από τις κύριες κατηγορίες γονιδίων που θα μπορούσαν να ρυθμίσουν τα αιμοποιητικά βλαστοκύτταρα. Αυτή η οικογένεια γονιδίων έχει βρεθεί ότι καταστέλλεται από τα miR-196b και miR-10 οδηγώντας στην προώθηση της διαφοροποίησης των αιμοποιητικών βλαστικών κυττάρων.

Έχει δειχθεί ότι διάφορα miRNAs, συμπεριλαμβανομένων των miR-10a/b, miR-106, miR-126, miR-146, miR-150, miR-181a, miR-221, miR-222 και miR-223 εκφράζονται σε διαφορετικά στάδια αιμοποίησης. Η πρώτη έρευνα συσχέτισης των miRNAs και της αιμοποίησης δημοσιεύθηκε το 2004 από τους Chen et al, οι οποίοι διαπίστωσαν ότι η έκφραση των miR-181, miR-223 και miR-142 σχετίζεται με τα αιμοποιητικά κύτταρα.

Μελέτες έδειξαν ότι ο υποδοχέας c-Kit είναι ένας στόχος για τα miR-221 και miR-222. Αρκετές μελέτες έδειξαν, επίσης, ότι οι υποδοχείς c-Kit έχουν εμπλακεί με διάφορες αιμοποιητικές κακοήθειες όπως η ΟΜΛ, η ΧΜΛ και η ΧΛΛ.

Επιπλέον, το NFI-A είναι ένα από τα κύρια γονίδια-στόχους για το miR-223 που παίζει σημαντικό ρόλο στις αιμοποιητικές κακοήθειες[84].

Η υπεροικογένεια TNF/TNFR είναι γνωστή ως μία από τις σημαντικότερες κατηγορίες γονιδίων που εμπλέκονται σε μονοπάτια σηματοδότησης που υπάρχουν στα αιμοποιητικά κύτταρα. Έχει βρεθεί ότι αρκετά miRNAs είναι πιθανό να στοχεύουν την υπεροικογένεια TNF / TNFR στη ΧΛΛ.

Τα miR-15a, miR-223, miR-29a και miR181a στη ΧΛΛ, στοχεύουν γονίδια όπως τα BCL2, DDX3X, BCL6, IL10RA και FBXW7. Ως εκ τούτου, η απορρύθμισή τους θα μπορούσε να προκαλέσει επιδείνωση της ΧΛΛ[85].

- **Τα microRNAs ως διαγνωστικοί και θεραπευτικοί βιοδείκτες στη ΧΛΛ:**

Η ΧΛΛ είναι ο πρώτος ανθρώπινος όγκος για τον οποίο προτάθηκε ένα παγκόσμιο προφίλ miRNA με πιθανή κλινική χρησιμότητα. Τα miR-15/16, miR-34b/c, miR-29, miR-181b, miR-17/92, miR-150, miR-21, miR-181 και miR-192 και τα μέλη της οικογένειας miR-155, τα περισσότερα απορρυθμισμένα microRNAs στη ΧΛΛ, βρέθηκαν να ρυθμίζουν σημαντικά γονίδια που εμπλέκονται στην παθογένεση της ΧΛΛ, συμβάλλοντας στην αποσαφήνιση των μοριακών βημάτων της έναρξης και προόδου της νόσου.

Η διαγραφή του 13q14.3 οδηγεί σε μείωση της ρύθμισης του miR-15 και του miR-16 σε ασθενείς με ΧΛΛ. Μερικές μελέτες έδειξαν ότι αυτά τα miRNAs έχουν επίδραση στην παθογένεση της ΧΛΛ μέσω ρύθμισης του αντι-αποπτωτικού παράγοντα BCL2. Συγκεκριμένα, η διαγραφή ή η υποέκφραση των miR-15 και miR-16 είναι ικανές να αναστέλλουν την απόπτωση, στοχεύοντας τα Bcl2 και Mcl1. Έχει αποδειχθεί ότι τα Bcl2 και Mcl1 ως μέλη της οικογένειας BCL-2 συνδέονται με χημειο-αντίσταση.

Τα μέλη της οικογένειας miR-34 εμπλέκονται σε ένα ρυθμιζόμενο κύκλωμα ανατροφοδότησης σχετικό με το p53 και το miR-15a/16-1 στη ΧΛΛ με διαγραφή 13q, υποδεικνύοντας αμφίδρομη αλληλεπίδραση μεταξύ microRNAs και γονιδίων. Εξάλλου, η αποκατάσταση της έκφρασης του miR-15a/16-1, επηρεάζει έμμεσα και την έκφραση της οικογένειας miR-34 με ρύθμιση της έκφρασης του p53.

Επιπλέον, η μελέτη των miR-17/92 και miR-155 μπορεί να παρέχει χρήσιμες γνώσεις σχετικά με το σχεδιασμό φαρμάκων, τους μηχανισμούς αντίστασης, και τις μικροπεριβαλλοντικές απαντήσεις[85].

Το miR-17/92 είναι ένα άλλο miRNA που έχει κρίσιμους ρόλους στα κύτταρα της ΧΛΛ. Πολλαπλές γραμμές αποδεικτικών στοιχείων αποκάλυψαν ότι η απορρύθμιση του συμπλέγματος miR-17/92 θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί ως δυνητικός βιοδείκτης διάγνωσης. Αυτά τα miRNAs υπερεκφράζονται σε διάφορους λεμφοειδείς καρκίνους όπως η ΧΛΛ. Πρόσφατα, βρέθηκε ότι η περιοχή που κωδικοποιεί το miR-17/92 ενισχύεται σε διάφορους καρκίνους, ειδικά σε λεμφοειδείς καρκίνους. Η ρετροϊκή έκφραση αυτού του miRNA επηρεάζει διάφορους στόχους όπως το PTEN και το c-Myc σε μοντέλο ποντικού. Το αποτέλεσμα αυτό δείχνει ότι το miR-17/92 είναι σε θέση να καταστείλει την έκφραση των PTEN και Bim σε κύτταρα λεμφώματος. Το PTEN είναι γνωστό ως καταστολέας όγκων που έχει ζωτικούς ρόλους στη λειτουργία των κυττάρων. Ως εκ τούτου, η αναστολή της έκφρασης των PTEN και Bim από το miR-17/92 θα μπορούσε να συμβάλει στην πρόοδο του λεμφώματος.

Έχει διαπιστωθεί ότι σε επιθετικές μορφές της ΧΛΛ, το miR-29 υπερεκφράζεται όταν συγκρίνεται με μια ομάδα ελέγχου. Το miR-29 δρα ως ογκογονίδιο στην ΧΛΛ. Έχει βρεθεί ότι η έκφραση του miR-29 και του miR-181 θα μπορούσε να συσχετιστεί αντίστροφα με την έκφραση του TCL1 στους ασθενείς με ΧΛΛ. Το TCL1 είναι γνωστό ως ογκογονίδιο στη ΧΛΛ, το οποίο έχει κρίσιμους ρόλους στην αρχή των παθογενετικών περιστατικών, που εμφανίζονται σε επιθετική ΧΛΛ. Το TCL1 δρα ως ενεργοποιητής για την AKT και είναι σε θέση να αναστέλλει τις DNA μεθυλοτρανσφεράσες Dnmt3A και Dnmt3B. Αυτά τα γεγονότα οδηγούν στη μείωση της μεθυλίωσης του DNA στη ΧΛΛ. Τα ευρήματα αυτά υποδηλώνουν ότι το miR-29 και το miR-181 θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ως πιθανοί υποψήφιοι δείκτες για διάγνωση ασθενών με ΧΛΛ. Επιπλέον, έχει αποδειχθεί ότι η λειτουργία του miR-29c και του miR-223 θα μπορούσε να συσχετιστεί με τα επίπεδα των ZAP70 (+) και IGHV.

Χρωμοσωμικές ανωμαλίες όπως οι διαγραφές, αποτελούν κάποιους από τους κύριους δείκτες που υπάρχουν στη ΧΛΛ. Αρκετές μελέτες έχουν δείξει ότι ίσως οι περιοχές που κωδικοποιούν ορισμένα miRNAs σε διαφορετικά χρωμοσώματα, διαγράφονται. Έχουν πραγματοποιηθεί μελέτες, στις οποίες έχει αξιολογηθεί το προφίλ έκφρασης μιας ποικιλίας

miRNAs σε ασθενείς με ΧΛΛ, που εμφάνιζαν τρισωμίας 12, διαγραφή 11q, διαγραφή 13q, διαγραφή 17p και κανονικό καρυότυπο. Έδειξαν ότι η απορρύθμιση ποικιλίας miRNAs όπως τα miR-15a, miR-21, miR-34a, miR-155 miR-181b, miR-223, miR-29c, miR-29b και miR-181 θα μπορούσε να συσχετιστεί με την ανάπτυξη της ΧΛΛ με τη διαγραφή 17p(δυσλειτουργία του TP53). Διαπιστώθηκε, ακόμη, ότι το miR-181a υπερεκφράστηκε στην τρισωμία 12. Επιπλέον, άλλες απαλοιφές όπως οι 13q και 11q θα μπορούσαν να συνδεθούν με την έκφραση κάποιων miRNAs όπως τα miR-15a / miR-16-1, miR-34b / miR-34c και miR-34a.

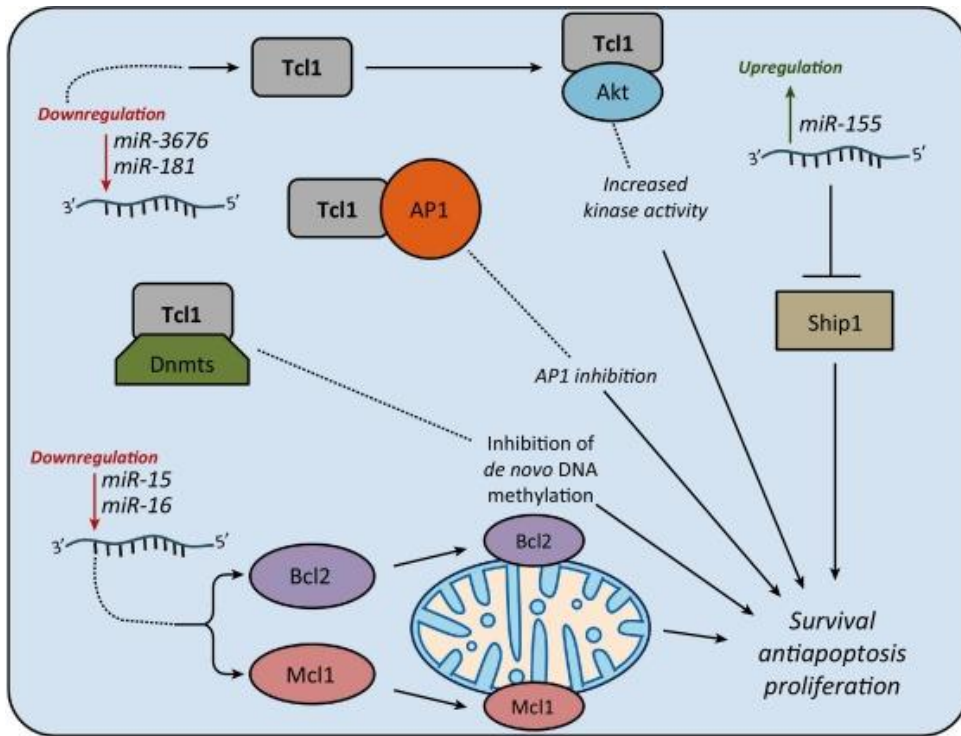
Οι επιθετικές μορφές της ΧΛΛ παρουσιάζουν ένα διαφορετικό προφίλ microRNA. Ο υψηλότερος κίνδυνος θνησιμότητας σχετίζεται με υψηλά επίπεδα των miR-21 και miR-155, σε σύγκριση με ασθενείς με χαμηλή έκφραση στα συγκεκριμένα microRNAs[20], ενώ τα επίπεδα miR-181b μειώνονται κατά τη διάρκεια της εξέλιξης της ΧΛΛ, χρησιμεύοντας ως βιοδείκτης που μπορεί να προβλέψει την εξέλιξη της ασθένειας και το χρόνο σε θεραπεία[82, 83].

Η μείωση της ρύθμισης του miR-181b στην επιθετική ΧΛΛ συμβάλλει, όπως και το miR-29, στην υπερέκφραση του TCL1. Επιπλέον, η μελέτη των miR-181b και miR-17/92 μπορεί να παρέχει χρήσιμες γνώσεις σχετικά με το σχεδιασμό φαρμάκων, την απελευθέρωση, τους μηχανισμούς αντίστασης και τις μικροπεριβαλλοντικές αποκρίσεις[86].

Τα miR-148a, miR-222 και miR-21 παρουσιάζουν υψηλότερη έκφραση σε ασθενείς που δεν ανταποκρίνονται στο φάρμακο φλουδαραβίνη, ενώ σε ασθενείς ανθεκτικούς στη θεραπεία παρατηρήθηκαν χαμηλότερα επίπεδα miR-34a. Τέλος, κατά την ενεργοποίηση του BCR παρατηρήθηκε αυξήθηκε στην έκφραση του miR-155, που παίζει ρόλο κατά την ανάπτυξη των T- και B-κυττάρων ενώ η έκφραση των miR-150, και miR-223 βρέθηκε μειωμένη σε ασθενείς με βραχύτερη επιβίωση και /ή χρόνο στη θεραπεία.

Τέλος, υπάρχει η πεποίθηση ότι τα εξωσώματα, τα οποία περιέχουν miRNAs, θα μπορούσαν να έχουν κρίσιμους ρόλους στην επιβίωση και την εξέλιξη των κυττάρων ΧΛΛ. Τα εξωσώματα είναι γνωστά ως νανο-φορείς τα οποία φέρουν διάφορα μόρια όπως πρωτεΐνες, mRNAs και miRNAs.

Στο Σχήμα 1.7. που ακολουθεί, δίνονται σχηματικά ορισμένα microRNAs που σχετίζονται με τη ΧΛΛ, τα γονίδια-στόχοι τους και ο ρόλος που έχει βρεθεί ότι έχουν.



Σχήμα 1.7. Ορισμένα *microRNAs* που σχετίζονται με τη ΧΛΛ, τα γονίδια-στόχοι τους και ο ρόλος που διαδραματίζουν (*miR-155-Ship1*, *miR-15* και *miR-16-BCL2* και *MCL1*, *miR-181-TCL1*).

- **Τα *microRNAs* σε άλλα λεμφώματα Β-κυττάρων:**

Τα επίπεδα έκφρασης του *miR-155* έχει βρεθεί ότι ήταν αυξημένα στο μεγάλο λέμφωμα των Β-κυττάρων. Η υψηλή έκφραση του *miR-155* παρατηρήθηκε, επίσης, και στο λέμφωμα Hodgkins και στο πρωτεύον Β-λέμφωμα. Η διευκρίνιση του ακριβούς μηχανισμού του τρόπου με τον οποίο το *miR-155* συμβάλλει στην λεμφογένεση απαιτεί τον προσδιορισμό των βιολογικών στόχων του. Με ενδιαφέρον, οι μεταβολές στην έκφραση του *miR-155* δεν είναι απολύτως ειδική για τους λεμφοειδείς όγκους. Η απορρύθμιση του έχει, επίσης, εμφανιστεί και σε συμπαγείς όγκους[81].

Το Σχήμα 1.8. που ακολουθεί, παρουσιάζει τα *microRNAs* που έχει βρεθεί ότι σχετίζονται με την διαδικασία της αιμοποίησης και άρα πιθανώς τη ΧΛΛ και άλλα λεμφώματα Β-κυττάρων.

Το miR-451a από εξωσώματα του ορού, έχει βρεθεί, επιπλέον, ότι εμφανίζει υπερέκφραση σε καρκίνο του παγκρέατος και IPMN, και ότι ίσως να μπορεί αν λειτουργήσει ως διαγνωστικός και προγνωστικός δείκτης σε αυτές τις μορφές καρκίνου. Μελέτες έχουν δείξει ότι υποεκφράζεται, επίσης, στο μη μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα[90].

Ως πιθανό ογκοκατασταλτικό microRNA, στοχεύει τα μονοπάτια πολλαπλασιασμού στο γαστρικό και τον καρκίνο του κόλον. Συγκεκριμένα, υποεκφράζεται στους συγκεκριμένους καρκίνους, και αυτή η αλλαγή σχετίζεται με μείωση της ολικής επιβίωσης.

Το miR-451a βρίσκεται άφθονο στα εξωκυτταρικά κυστίδια του ανθρώπινου ορού του αίματος, και η παρουσία του σε αυτά, επηρεάζει την ανοσολογική απόκριση των μακροφάγων και δενδριτικών κυττάρων σε αδρανοποιημένα εμβόλια εναντίον της γρίπης[91].

Τα πιθανά γονίδια-στόχοι του miR-451a είναι:

- Το MIF. Το miR-451a μπορεί να απορρυθμίζει το MIF, μέσω της μείωσης της σταθερότητας του mRNA. Επιπλέον, η υπερέκφραση του miR-451a σε καρκινικές κυτταρικές σειρές, παρουσίασε αναστολή της κυτταρικής ανάπτυξης και αύξησε την απόκριση στην ακτινοβολία. Επομένως, φαίνεται ότι το MIF είναι ένας άμεσος στόχος του miR-451a και υπάρχει μία αντίστροφα σημαντική συσχέτιση μεταξύ της έκφρασης αυτών των δύο σε γαστρικό καρκίνο.

- Ρυθμίζει την έκφραση του γονιδίου που σχετίζεται με αντίσταση σε φάρμακα (multidrug resistance 1-mdr1), ενός κρίσιμου παράγοντα για την αντίσταση σε φάρμακα[92].

- Υπάρχουν αναφορές ότι καταστέλλει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, στοχεύοντας το γονίδιο ATF2 και την πρωτεΐνη RAB14.

- Έχει βρεθεί, ακόμη, ότι ρυθμίζει την πρωτεΐνη μεταφορέα-φαρμάκων Π-γλυκοπρωτεΐνη, πιθανώς ενισχύοντας την αντίσταση στο χημειοθεραπευτικό φάρμακο Paclitaxel[93].

Το miR-451, έχει βρεθεί να υποεκφράζεται στη Χρόνια Λεμφοκυτταρική Λευχαιμία, σύμφωνα με μελέτες στις οποίες έχουν χρησιμοποιηθεί δεδομένα μικροσυστοιχιών και εργαλεία βιοπληροφορικής[94].

1.3.4.2. MicroRNA-486-5p

> Ωριμη αλληλουχία hsa-miR-486-5p: UCCUGUACUGAGCUGCCCCGAG

Το miR-486 είναι ένα ερυθροποιητικό microRNA, εκφράζεται, δηλαδή, πρωταρχικά στα ερυθροειδή κύτταρα. Βρίσκεται στο τελευταίο εσώνιο του γονιδίου ANK1, το οποίο κωδικοποιεί την ankyrin-1, το πρωτότυπο μέλος μίας οικογένειας πρωτεϊνών, οι οποίες συνδέουν μεμβρανικές πρωτεΐνες στον κυτταροσκελετό σπεκτρίνης-ακτίνης. Το ANK1 ανακαλύφθηκε πρώτα στα ερυθροκύτταρα και υφίσταται μετάλλαξη στην κληρονομική σφαιροκυττάρωση και είναι ένας γνωστός στόχος του GATA1. Υπάρχει η υπόθεση, λοιπόν, ότι τα GATA1 και GATA1S μπορεί να ρυθμίζουν την έκφραση του miR-486[95].

Το miR-486-5p έχει σημαντικό ρόλο στην αιμοποίηση και την ερυθροειδή διαφοροποίηση. Οι επιπτώσεις του miR-486-5p στην ανάπτυξη και επιβίωση των αιμοποιητικών κυττάρων, μεσολαβούν, τουλάχιστον εν μέρει, από τη ρύθμιση της σηματοδότησης της PI3K/AKT στα αιμοποιητικά κύτταρα, η οποία έχει βρεθεί προηγουμένως ότι είναι σημαντική για την ερυθροειδή διαφοροποίηση και τη μείωση των επιπέδων έκφρασης των PTEN και FoxO1.

Το miR-486-5p έχει αναφερθεί, επίσης, ότι έχει ογκοκατασταλτικές ιδιότητες αλλά μπορεί να δράσει και ως ογκογονίδιο, συμμετέχοντας στην ανάπτυξη και εξέλιξη των όγκων[96, 97]. Μη φυσιολογική έκφραση του miR-486-5p έχει αναφερθεί ότι σχετίζεται με διάφορες μορφές καρκίνου, όπως το υπατοκυτταρικό καρκίνωμα (HCC), καρκίνος του πνεύμονα, καρκίνος στο στήθος, οισοφαγικό καρκίνωμα πλακώδους κυττάρου (ESCC) και παγκρεατικός καρκίνος (PC)[97].

Συγκεκριμένα, η υποέκφραση του miR-486 ευνοεί την ανάπτυξη του οστεοσαρκώματος και του καρκίνου του πνεύμονα και η απώλειά του σχετίζεται με την εξέλιξη του γαστρικού καρκίνου. Λειτουργεί σαν αναστολέας του στο μη μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα, ρυθμίζοντας τη μετάσταση, στοχεύοντας το γονίδιο ARHGAP5. Ακόμη, οδηγεί σε υποέκφραση του PIM-1, στα καρκινικά κύτταρα του μαστού, και καταστέλλει την κυτταρική ανάπτυξη του υπατοκυτταρικού καρκινώματος, στοχεύοντας το PIK3R1[97].

Από την άλλη μεριά, το miR-486-5p υπερεκφράζεται στον παγκρεατικό και το διεισδυτικό και μεταστατικό παγκρεατικό αδενοκαρκίνωμα, τη χρόνια μυελογενή λευχαιμία και τα γλοιώματα, ενώ βελτιώνει την επιβίωση στο Λέμφωμα των T-κυττάρων. Όλο και περισσότερες δημοσιεύσεις υπάρχουν, στις οποίες προτείνεται ότι το miR-486-5p μπορεί να χρησιμεύσει ως βιοδείκτης ανίχνευσης και πρόγνωσης στον καρκίνο.

Επιπλέον, το miR-486-3p έχει βρεθεί ότι ρυθμίζει την εμβρυική αιμοσφαιρίνη, καταστέλλοντας το γονίδιο BCL11A στα εμβρυικά ερυθροειδή κύτταρα, παρόλο που δεν επηρεάζει την ανάπτυξη και επιβίωσή τους, ενώ η απώλεια του έχει φανεί ότι εμπλέκεται με τη μυϊκή δυστροφία.

Το miR-486-5p έχει να βρεθεί να υποεκφράζεται στη Χρόνια Λεμφοκυτταρική Λευχαιμία, σύμφωνα με μελέτες στις οποίες έχουν χρησιμοποιηθεί δεδομένα μικροσυστοιχιών και εργαλεία βιοπληροφορικής[94].

1.3.4.3. MicroRNA-582-5p

> Ωριμη ακολουθία hsa-miR-582-5p: UUACAGUUGUUCAACCAGUUACU

Το microRNA-582-5p είναι ένα ογκοκατασταλτικό microRNA, το οποίο έχει βρεθεί υπερεκφρασμένο σε μία μεγάλη ποικιλία όγκων, όπως είναι ο κωλοορθικός καρκίνος, το μη μικροκυτταρικό καρκίνωμα του πνεύμονα, ο καρκίνος του προστάτη και ο καρκίνος της ουροδόχου κύστεως. Η υπερέκφραση του miR-582-5p συνεισφέρει στην αύξηση του πολλαπλασιασμού των κυττάρων του καρκίνου του προστάτη, την μείωση του στον καρκίνο

της ουροδόχου κύστης και την επέμβαση μέσω της καταστολής της έκφρασης γονιδίων στόχων.

Το miR-582-5p έχει βρεθεί να υποεκφράζεται στον διεισδυτικό καρκίνο της ουροδόχου κύστης, που σχετίζεται με απώλεια ενός τμήματος από το χρωμόσωμα 5q12. Νέο μονοπάτι που σχετίζεται με το miR-582-5p και γονίδια σχετιζόμενα με τον καρκίνο, έχει την δυνατότητα να γίνει ένας σημαντικός στόχος για θεραπευτική αντιμετώπιση του διεισδυτικού καρκίνου της ουροδόχου κύστεως.

Έχει βρεθεί ότι εμπλέκεται, ακόμη, στη μετάσταση στα οστά του καρκίνου του παγκρέατος, με πιθανή θεραπευτική αξία στην αντιμετώπιση της συγκεκριμένης μετάστασης. Το miR-582-5p αναστέλλει τη μετάσταση στα οστά του καρκίνου του παγκρέατος, μέσω απενεργοποίησης της σηματοδότησης του υποδοχέα του αυξητικού παράγοντα TGF-b(TGFBRI)[98], στοχεύοντας γονίδια που σχετίζονται με τη σηματοδότηση του TGF-b, όπως είναι τα SMAD2, SMAD4, ο υποδοχέας TGF-b I (TGFBRI), και TGFBRII.

Το NOTCH1 είναι, επίσης, ένας στόχος του miR-582-5p και, συγκεκριμένα, υπάρχει μία αντίστροφη συσχέτιση μεταξύ της έκφρασης των miR-582-5p και NOTCH1 σε ιστούς μη-μικροκυτταρικού καρκίνου του πνεύμονα.

Το miR-582-5p εμπλέκεται και στον γαστρικό καρκίνο και το ενδομητριάκο καρκίνωμα, εμποδίζοντας την κυτταρική ανάπτυξη, με στόχο το γονίδιο AKT3[99]. Έχει, όμως, και αντι-αποπτωτική λειτουργία, βοηθώντας την επιβίωση των βλαστικών κυττάρων στο ανθρώπινο γλυοβλάστωμα αναστέλλοντας τις κασπάσες 3 και 9 και το BIM. Η υπερέκφραση του miR-582-5p βοηθάει στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό των κυττάρων του καρκίνου του προστάτη. Ακόμη, υπερεκφράζεται στον κολοορθικό καρκίνο, και στοχεύει την 3' αμετάφραστη περιοχή του γονιδίου adenomatous polyposis coli (APC) απευθείας, επάγοντας τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και ίσως να βοηθήσει στην αναγνώριση νέων στόχων για αντικαρκινική θεραπεία[100, 101].

Το miR-582-5p έχει να βρεθεί να υπερεκφράζεται στη Χρόνια Λεμφοκυτταρική Λευχαιμία, σύμφωνα με μελέτες στις οποίες έχουν χρησιμοποιηθεί δεδομένα μικροσυστοιχιών και εργαλεία βιοπληροφορικής. Φαίνεται, ακόμη, να στοχεύει τα υποεκφρασμένα γονίδια ETS2 και ARAP2. Λίγες αναφορές υπάρχουν σχετικά με το ρόλο των ETS2 και ARAP2 στον καρκίνο. Ορισμένες μελέτες έδειξαν ότι η έκφραση του ETS2 μπορεί να σχετίζεται με εξέλιξη της Χρόνιας Μυελογενούς Λευχαιμίας[94].

Σε συγκεκριμένη μελέτη, το miR-582-5p ήταν το σημαντικότερα υπερεκφρασμένο miRNA για την ΧΛΛ, σε σχέση με τα υπόλοιπα που είχαν μελετηθεί[94].

1.4. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, η χρόνια λεμφοκυτταρική λευχαιμία είναι μία κακοήθης διαταραχή που χαρακτηρίζεται από τον ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό και τη συσσώρευση των Β λεμφοκυττάρων στο περιφερικό αίμα, το μυελό των οστών, τους δευτερεύοντες λεμφοειδείς ιστούς και το σπλήνα [25, 94]. Οι βιοδείκτες που να

συνεισφέρουν στη βελτίωση της έγκαιρης διάγνωσης και θεραπείας έχουν γίνει ο βασικός στόχος της έρευνας για τη νόσο της ΧΛΛ.

Είναι γνωστό ότι τα microRNAs (miRNAs / miRs) είναι ενδογενή μη κωδικά μικρά μόρια RNA που έχουν αρκετούς σημαντικούς ρυθμιστικούς ρόλους στα κύτταρα. Καθώς τα miRNAs μπορούν να συμμετέχουν σε πολύπλοκες βιολογικές λειτουργίες στο σώμα, μπορούν να επηρεάσουν μια ποικιλία βιολογικών διεργασιών και μονοπατιών. Με την προϋπόθεση ότι κάθε miRNA ρυθμίζει δυνητικά έναν μεγάλο αριθμό στόχων, η κατανόηση της λειτουργίας των miRNAs στην ογκογένεση μπορεί να δώσει πληροφορίες για τα βασικά ερωτήματα που ακόμη υπάρχουν στην έρευνα για τον καρκίνο.

Με βάση τα παραπάνω, θεωρήθηκε χρήσιμη, στα πλαίσια της παρούσας διπλωματικής εργασίας, η μελέτη μορίων, και συγκεκριμένα microRNAs, τα οποία θα είχαν πιθανή κλινική σημασία ως βιοδείκτες που θα συνεισφέρουν στην έγκαιρη διάγνωση, πρόγνωση και επιλογή της κατάλληλης θεραπείας της χρόνιας λεμφοκυτταρικής λευχαιμίας. Για το σκοπό αυτό, έγινε μελέτη σε διάφορες επιστημονικές δημοσιεύσεις σχετικές με microRNAs, τα οποία πιθανόν να μπορούν να συσχετισθούν με τη χρόνια λεμφοκυτταρική λευχαιμία. Μεταξύ άλλων, ελήφθη υπ' όψη μία μελέτη των Gao C., et al., που δημοσιεύθηκε το 2019 (Identification of key candidate genes and miRNA-mRNA target pairs in chronic lymphocytic leukemia by integrated bioinformatics[94]) ένας από τους σκοπούς της οποίας ήταν η αναγνώριση βιοδεικτών για την έγκαιρη διάγνωση και την επιλογή της κατάλληλης θεραπείας της χρόνιας λεμφοκυτταρικής λευχαιμίας.

Στη συγκεκριμένη δημοσίευση, έγινε χρήση δεδομένων microarrays σχετικά με την έκφραση microRNAs σε ασθενείς με ΧΛΛ, από βάση δεδομένων για microRNAs, και ανάλυση τους με εισαγωγή τους σε εξειδικευμένα εργαλεία βιοπληροφορικής ανάλυσης, ώστε να βρεθούν, μεταξύ άλλων, microRNAs που εκφράζονται διαφορετικά σε ασθενείς με ΧΛΛ. Θεωρήθηκε, λοιπόν, ότι θα ήταν σημαντικό να γίνει ανάλυση των συγκεκριμένων microRNAs σε ασθενείς με ΧΛΛ με άλλες μεθόδους, ώστε να επιβεβαιωθεί το συμπέρασμα που προκύπτει από την συγκεκριμένη δημοσίευση.

Συνοψίζοντας, οι βασικοί στόχοι αυτής της διπλωματικής εργασίας ήταν:

- Ο ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός των επιπέδων έκφρασης των microRNA-451a, microRNA-486-5p και microRNA-582-5p σε ασθενείς με Χρόνια Λεμφοκυτταρική Λευχαιμία, μέσω της διαδικασίας της Real-Time q-PCR.
- Η επιβεβαίωση ή όχι της συσχέτισης των microRNA-451a, microRNA-486-5p και microRNA-582-5p με υπερέκφραση ή υποέκφραση, σε σχέση με υγιή άτομα, και η εκτίμηση της πιθανής κλινικής σημασίας τους ως διαγνωστικοί παράγοντες.
- Η συσχέτιση των επιπέδων έκφρασης των microRNA-451a, microRNA-486-5p και microRNA-582-5p μεταξύ των ασθενών με ΧΛΛ, για την ανάλυση της Ολικής Επιβίωσης, και η εκτίμηση της πιθανής κλινικής σημασίας τους ως προγνωστικοί παράγοντες.
- Η συσχέτιση των επιπέδων έκφρασης των microRNA-451a, microRNA-486-5p και microRNA-582-5p μεταξύ των ασθενών με ΧΛΛ σε σχέση με τα διάφορα κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά τους.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1. ΥΛΙΚΑ

2.1.1. Χημικά Αντιδραστήρια

Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για τα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν για την παρούσα διπλωματική, ήταν τα εξής(Πίνακας 2.1.):

Πίνακας 2.1. Πίνακας Χημικών Αντιδραστηρίων που χρησιμοποιήθηκαν

Αντιδραστήριο	Εταιρία
Αιθανόλη	Sigma- Aldrich
Διμεθυλο-σουλφοξειδίο (DMSO)	Applichem
Εμβρυϊκός βόειος ορός (FBS)	Gibco
Ισοπροπανόλη	Applichem
Ρυθμιστικό Διάλυμα Φωσφορικών (PBS)	Biosera
Χλωροφόρμιο	PENTA
Ficoll-Paque PLUS	GE Healthcare
TRI REAGENT- BD	MRC

2.1.2. Μοριακά Αντιδραστήρια - Ένζυμα

Για τη συγκεκριμένη διπλωματική εργασία, ήταν απαραίτητη η χρήση συγκεκριμένων ενζύμων, για την πραγματοποίηση των διαδικασιών της PAP RT-PCR και Real-Time q-PCR.

Για τη διαδικασία της PAP RT-PCR, χρησιμοποιήθηκαν τα εξής αντιδραστήρια:

- Στο βήμα 1 (Πολυαδενυλίωση): PAP (Poly(A)) Buffer, ATPs και το ένζυμο Escherichia Coli Polymerase.
- Στο βήμα 2: Poly-(T) Adapter.
- Στο βήμα 3(Αντίστροφη Μεταγραφή): DTT, RT-Buffer, dNTPs, το ένζυμο αναστολέα των ριβονουκλεασών RNase OUT και το ένζυμο αντίστροφη μεταγραφή M-MLV, της Thermo Fisher Scientific.

Τέλος, για την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (Real-Time q-PCR), χρησιμοποιήθηκε το kit KAPA SYBR FAST Universal της KAPA BIOSYSTEMS, με την αντίστοιχη πολυμεράση.

Συγκεντρωτικά(Πίνακας 2.2):

Πίνακας 2.2. Πίνακας Μοριακών Αντιδραστηρίων που χρησιμοποιήθηκαν

Αντιδραστήριο	Εταιρία
10x Poly(A) Buffer	New England Biolabs
ATP	New England Biolabs
E. Coli Poly(A) Polymerase	New England Biolabs
Poly(T) Adaptor	Eurofins Genomics
0,1 M DTT	Invitrogen
5x First Strand RT- Buffer	Invitrogen
RNase OUT (Recombinant Ribonuclease Inhibitor)	Invitrogen
M-MLV	Invitrogen
KAPA SYBR FAST Universal kit	KAPA BIOSYSTEMS

2.1.3. Εκκινητές

Οι **Forward** εκκινητές- ολιγονουκλεοτίδια, οι οποίοι σχεδιάστηκαν, εξετάστηκαν για την αποτελεσματικότητά τους και έπειτα χρησιμοποιήθηκαν στα δείγματα ασθενών με ΧΛΛ με τη διαδικασία της Real-Time q-PCR ήταν οι εξής:

Πίνακας 2.3. Forward Εκκινητές των miR-582-5p, miR-451a, miR-95-3p και miR-486-5p

Όνομα Ολιγονουκλεοτιδίου	Αλληλουχία	Μήκος
miR-582-5p	GCTTACAGTTGTTCAACCAGTTACTA	26
miR-451a	GCAAACCGTTACCATTACTGAGTTA	25
miR-95-3p	GCTTCAACGGGTATTTATTGAGCA	24
miR-486-5p	TCCTGTACTGAGCTGCCCCGAG	22

Χρησιμοποιήθηκαν, επίσης, ο PAP Reverse Primer (Universal) που χρησιμοποιείται για όλα τα microRNA ως **Reverse** εκκινητής, και ο Forward εκκινητής του RNU48, που χρησιμοποιήθηκε ως γονίδιο αναφοράς για τα πειράματα που έγιναν με τη διαδικασία της Real-Time q-PCR. Οι αλληλουχίες τους είναι:

Πίνακας 2.4. Εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν στις αντιδράσεις Real-Time q-PCR

Όνομα Ολιγονουκλεοτιδίου	Αλληλουχία	Μήκος
PAP Reverse (Universal)	GCGAGCACACAATTAATACGAC	22
RNU48F	TGATGATGACCCCAGGTA ACTCT	23

2.1.4. Κυτταρικές Σειρές

Για τις ανάγκες της παρούσας διπλωματικής εργασίας, χρησιμοποιήθηκε RNA από 5 λευχαιμικές κυτταρικές σειρές, ώστε να εξεταστεί, με Real-Time q-PCR, η έκφραση των microRNA που επιλέχθηκαν, από τους συγκεκριμένους εκκινητές που σχεδιάστηκαν. Πραγματοποιήθηκε PAP Reverse Transcription PCR στο RNA από τις 5 κυτταρικές σειρές, ώστε να μετατραπούν σε cDNA, ξεκινώντας από συγκέντρωση 1μg/μL. Οι κυτταρικές σειρές που χρησιμοποιήθηκαν, είναι:

- K562,
- U937,
- HL-60,
- SUDHL-1 και
- Raji

2.2. ΜΕΘΟΔΟΙ

2.2.1. Συλλογή και επεξεργασία δειγμάτων περιφερικού αίματος ασθενών με Β-Χρόνια Λεμφοκυτταρική Λευχαιμία

Στην παρούσα διπλωματική εργασία χρειάστηκε να πραγματοποιηθεί συλλογή δειγμάτων περιφερικού αίματος ασθενών με Χρόνια Λεμφοκυτταρική Λευχαιμία. Ακολούθησε επεξεργασία των δειγμάτων αυτών, ώστε να γίνει απομόνωση των μονοπύρηνων κυττάρων του περιφερικού αίματος, που χρησιμοποιήθηκαν στις μετέπειτα πειραματικές μεθόδους. Αυτές οι διαδικασίες πραγματοποιήθηκαν στο εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας της Β΄ Προπαιδευτικής Παθολογικής Κλινικής της Αιματολογικής Μονάδας, στο Πανεπιστημιακό Γενικό Νοσοκομείο «Αττικών», σε συνεργασία με τον επιμελητή Ιατρό Αιματολόγο κ. Σωτήριο Παπαγεωργίου και τη συνεργάτη του κ. Φρίντα Κοντσιώτη.

Αρχικά πραγματοποιήθηκε λήψη 5 ml περιφερικού αίματος σε σωληνάριο (EDTA) γενικής αίματος από κάθε ασθενή με ΧΛΛ, και έπειτα φυγοκέντρησή του σε θερμοκρασία δωματίου σε 2000 g για 10 λεπτά. Στην πορεία ακολούθησαν δύο διαδικασίες για το διαχωρισμό και τον καθαρισμό του πλάσματος και των μονοπύρηνων κυττάρων περιφερικού αίματος (PBMCs), αντίστοιχα.

Για το διαχωρισμό του πλάσματος έγινε λήψη του υπερκειμένου που προέκυψε ύστερα από την φυγοκέντρωση που αναφέρθηκε παραπάνω(περίπου 1,5 ml από το σωληνάριο). Ακολούθησε νέα φυγοκέντρησή του στους 4° C σε 16000 g για 10 λεπτά. Η διαδικασία ολοκληρώθηκε με λήψη του υπερκειμένου (πλάσμα) και αποθήκευσή του στους -80° C σε Eppendorf των 0,2 ml.

Στην πορεία ακολούθησε διαχωρισμός των μονοπύρηνων κυττάρων περιφερικού αίματος (PBMCs). Ένα μονοπύρηνο κύτταρο περιφερικού αίματος (PBMC) είναι οποιοδήποτε κύτταρο του περιφερικού αίματος που έχει κυκλικό πυρήνα[102]. Αυτά τα

κύτταρα αποτελούνται από τα λεμφοκύτταρα (T κύτταρα, B κύτταρα, κύτταρα NK) και τα μονοκύτταρα, ενώ τα ερυθροκύτταρα και τα αιμοπετάλια δεν έχουν πυρήνα και τα κοκκιοκύτταρα (ουδετερόφιλα, βασεόφιλα και ηωσινόφιλα) έχουν πυρήνες πολλαπλών λοβών. Στους ανθρώπους, τα λεμφοκύτταρα αποτελούν την πλειοψηφία του πληθυσμού των PBMCs, ακολουθούμενα από μονοκύτταρα και μόνο ένα μικρό ποσοστό δενδριτικών κυττάρων[103]. Η χρήση των συγκεκριμένων κυττάρων σε ερευνητικά αντικείμενα όπως η ανοσολογία, αιματολογικές κακοήθειες, σχεδιασμός εμβολίων, λοιμώξεις και άλλες, είναι πολύ συχνή.

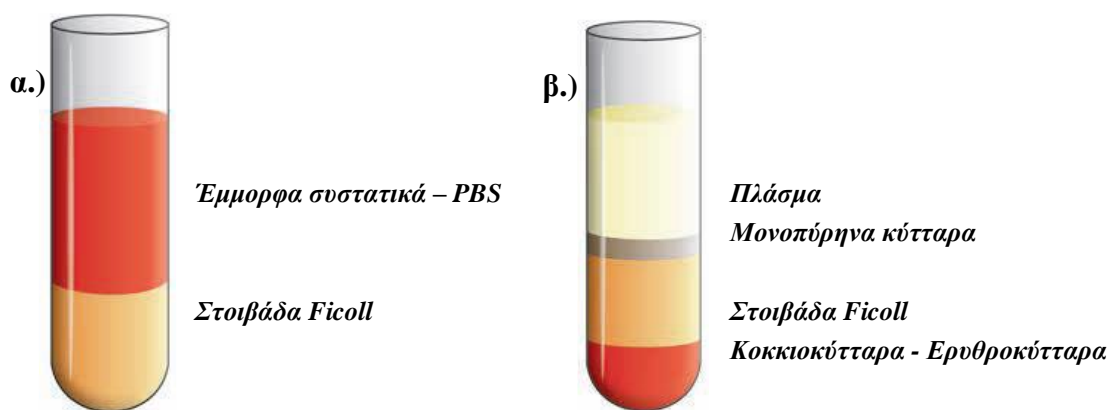
Αυτά τα κύτταρα μπορούν να εξαχθούν από περιφερικό αίμα χρησιμοποιώντας ficoll, έναν υδρόφιλο πολυσακχαρίτη που διαχωρίζει τα στρώματα αίματος. Το Ficoll είναι ένα αντιδραστήριο που χρησιμοποιείται για την απομόνωση μονοπύρηνων κυττάρων με υψηλή απόδοση και καθαρότητα από περιφερικό αίμα, με μία συγκεκριμένη μέθοδο, που περιλαμβάνει μια σειρά φυγοκεντρήσεων[104].

Η διαφορεική μετανάστευση των κυττάρων οδηγεί στο σχηματισμό στοιβάδων, που περιλαμβάνουν διαφορετικούς τύπους κυττάρων:

- Η κάτω στοιβάδα αποτελείται από ερυθροκύτταρα τα οποία κατακρημνίζονται από το Ficoll. Η ακριβώς ανώτερη περιέχει κυρίως κοκκιοκύτταρα, που, λόγω της ωσμωτικής πίεσης του διαλύματος του Ficoll, αποκτούν πυκνότητα τέτοια ώστε να μεταναστεύουν διαμέσου της στοιβάδας του Ficoll.
- Στην μεσόφαση μεταξύ του πλάσματος (πάνω στοιβάδα) και της στοιβάδας του Ficoll, τα μονοπύρηνια κύτταρα βρίσκονται μαζί με άλλα σωματίδια (π.χ. αιμοπετάλια) με χαμηλή πυκνότητα[104].

Τα βήματα για τον διαχωρισμό των PBMCs, ήταν τα εξής:

1. Λαμβάνονται τα έμμορφα συστατικά του αίματος με πιπέτα Pasteur και μεταφέρονται σε falcon των 15 ml.
2. Προστίθεται PBS σε ποσότητα όγκου ίση με εκείνη των έμμορφων συστατικών του αίματος και ελαφριά ανάδευση.
3. Προστίθεται, σε άλλο falcon των 15 ml, Ficoll σε ποσότητα όγκου ίση με εκείνη των έμμορφων συστατικών του αίματος.
4. Ακολουθεί αργή και προσεκτική προσθήκη του μίγματος έμμορφων συστατικών- PBS στο falcon με το Ficoll με πιπέτα Pasteur ώστε να σχηματιστεί επιστοιβάση(Σχήμα 2.1.).
5. Ακολουθεί φυγοκέντρηση σε θερμοκρασία δωματίου σε 300 g για 20 λεπτά, χωρίς φρένο και χωρίς acceleration.
6. Με αυτό τον τρόπο δημιουργούνται στοιβάδες και γίνεται διαχωρισμός των PBMCs(Σχήμα 2.1.). Στη συνέχεια, γίνεται απόρριψη της πάνω στοιβάδας, συλλογή της επόμενης (που είναι η στοιβάδα των PBMCs) με πιπέτα Pasteur και μεταφορά της σε falcon των 15 ml όπου προστίθενται 10-15 ml PBS.



Σχήμα 2.1. Διαχωρισμός μονοπύρηνων κυττάρων περιφερικού αίματος (PBMCs) με Ficoll - α.)Βήμα 4, β.)Βήμα 6[104]

7. Ακολουθεί φυγοκέντρηση σε θερμοκρασία δωματίου σε 400 g για 7 λεπτά.
8. Το υπερκείμενο απορρίπτεται, προστίθενται 10-15 ml PBS και ακολουθεί επανάληψη του βήματος 7.
9. Το υπερκείμενο απορρίπτεται, το ίζημα των κυττάρων διαμοιράζεται σε 4 Eppendorf των 0,2 ml, σε καθένα από τα οποία γίνεται προσθήκη 1 ml PBS, και ακολουθεί επανάληψη του βήματος 7.
10. Το υπερκείμενο απορρίπτεται.
11. Τα 4 Eppendorf αποθηκεύονται ως εξής:
 - Ένα, στο οποίο προστίθεται 1 ml TRI REAGENT, γίνεται έντονη ανάδευση για την διάλυση των κυττάρων και αποθηκεύεται στους -80°C .
 - Δύο, τα οποία αποθηκεύονται στους -80°C ως έχουν.
 - Ένα, στο οποίο προστίθενται 0,9 ml FBS και 0,1 ml DMSO (Freezing Mixture) και το οποίο αποθηκεύεται στους -80°C καλυμμένο με Φελιζόλ.

2.2.2. Απομόνωση ολικού RNA

Η πειραματική διαδικασία της απομόνωσης ολικού RNA βασίστηκε στη μέθοδο Chomczynski[105], κατά την οποία γίνεται χρήση του αντιδραστηρίου TRI REAGENT BD, το οποίο αποτελείται από ισοθειοκυανική γουανιδίνη(30%v/v) και φαινόλη(50%v/v) σε μονοφασικό διάλυμα. Η συγκεκριμένη μέθοδος χρησιμοποιείται ευρέως για την απομόνωση ολικού RNA, DNA και πρωτεϊνών.

Κατά τη μέθοδο της απομόνωσης RNA, το όξινο διάλυμα ισοθειοκυανικής γουανιδίνης, φαινόλης και γλωροφορμίου προκαλεί τη λύση των κυττάρων, αλλά και την αποδιάταξη των ανώτερων πρωτεϊνικών δομών. Ακόμη, πραγματοποιείται αδρανολοποίηση των ριβονουκλεασών που προέρχονται από τα ίδια τα κύτταρα και από το περιβάλλον της εκχύλισης, επιτρέποντας με αυτόν τον τρόπο την απομόνωση του ολικού RNA.

Η διαδικασία της απομόνωσης RNA απαιτεί προσοχή, επειδή τα μόρια RNA είναι λιγότερο σταθερά, όντας μονόκλινα, σε σύγκριση με τα μόρια DNA, ενώ ταυτόχρονα υπόκεινται σε αλκαλική υδρόλυση, μία διαδικασία που ευνοείται εξ αιτίας της ύπαρξης της ελεύθερης υδροξυλομάδας της ριβόζης.

Τα βήματα για την απομόνωση ολικού RNA, από τα μονοκύτταρα περιφερικού αίματος, ήταν τα εξής:

1. Αποψύχεται το δείγμα των κυττάρων που είναι διαλυμένα σε 1 ml TRI REAGENT BD. Ακολουθεί επώαση του δείγματος σε θερμοκρασία δωματίου (εκτός πάγου) για 5 λεπτά.
2. Προστίθενται 200 µl χλωροφόρμιο και έντονη ανάδευση με το χέρι για 15 δευτερόλεπτα. Το δείγμα επωάζεται σε θερμοκρασία δωματίου (εκτός πάγου) για 10-15 λεπτά.
3. Ακολουθεί φυγοκέντρηση σε 13300 rpm για 15 λεπτά στους 4°C.
4. Πραγματοποιείται διαχωρισμός φάσεων. Η υπερκείμενη υδατική (διαυγής) φάση μεταφέρεται σε νέο erpendorf των 2 ml, πολύ προσεκτικά ώστε να μην διαταραχθεί η μεσόφαση και η κατώτερη οργανική φάση.
5. Προστίθενται 500 µl ισοπροπανόλης και έντονη ανάδευση για 15 δευτερόλεπτα. Το δείγμα επωάζεται σε θερμοκρασία δωματίου για 10 λεπτά.
6. Ακολουθεί φυγοκέντρηση σε 13300 rpm για 10 λεπτά στους 4°C.
7. Παρατηρείται λευκό ίζημα (pellet). Το υπερκείμενο αφαιρείται με προσοχή.
8. Προστίθενται 1,0 ml αιθανόλης 75% v/v και ακολουθεί ήπια ανάδευση για 5-10 δευτερόλεπτα.
9. Ακολουθεί φυγοκέντρηση σε 13300 rpm για 8 λεπτά στους 4°C.
10. Απομακρύνεται η αιθανόλη προσεκτικά για να μην χαθεί το ίζημα.
11. Το Eppendorf αφήνεται να στεγνώσει ανοιχτό, αλλά όχι πλήρως, ώστε να εξατμιστεί η αιθανόλη.
12. Το ίζημα διαλυτοποιείται σε RNase/DNase-free d-H₂O, και φωτομετρείται.
13. Το RNA αποθηκεύεται στους -80°C.

2.2.3. Φασματοφωτομετρικός Προσδιορισμός της συγκέντρωσης και έλεγχος της καθαρότητας του απομονωμένου Ολικού RNA

Πριν το RNA χρησιμοποιηθεί, π.χ. για τη διαδικασία της RT-PCR, πρέπει να είναι γνωστή η συγκέντρωσή του. Η φωτομέτρηση αποτελεί μία διαδικασία κατά την οποία μπορεί να πραγματοποιηθεί ποσοτικός και ποιοτικός προσδιορισμός του RNA που απομονώθηκε. Η φωτομέτρηση των δειγμάτων ολικού RNA πραγματοποιείται με ειδικό φωτόμετρο, το Quawell Q3000 UV Spectrophotometer, το οποίο είναι κατάλληλο για μικρούς όγκους (απαιτείται μόλις 1 µL για τον υπολογισμό της συγκέντρωσης του RNA) και τα όρια ανίχνευσης είναι ιδιαιτέρως χαμηλά. Η αρχή της μεθόδου βασίζεται στην απορρόφηση των πουρινών και πυριμιδινών στο υπεριώδες, με μέγιστο τα 260 nm. Μία μονάδα οπτικής απορρόφησης αντιστοιχεί σε 40 µg/mL RNA. Μαζί με την ποσότητα του RNA, δίνεται και ο λόγος απορρόφησης A_{260}/A_{280} , δηλαδή για τα 260 nm ως προς τα 280 nm. Ο λόγος αυτός αντιπροσωπεύει την καθαρότητα του RNA και είναι επιθυμητό να βρίσκεται μεταξύ των τιμών 1,8-2. Εάν ο λόγος βρεθεί μικρότερος του 1,8 τότε πιθανότατα

υπάρχουν προσμίξεις με πρωτεΐνες, ενώ αν ξεπερνάει το 2, τότε υπάρχει πρόσμιξη από γενωμικό DNA.

2.2.4. Σχεδιασμός Εκκινητών για τα microRNA 451a, 486-5p, 582-5p και 95-3p

Για τις ανάγκες της συγκεκριμένης διπλωματικής εργασίας, χρειάστηκε να γίνει σχεδιασμός εκκινητών για συγκεκριμένα microRNA, των οποίων η έκφραση μελετήθηκε σε 82 δείγματα ασθενών με Χρόνια Λεμφοκυτταρική Λευχαιμία(ΧΛΛ) και 29 δείγματα υγιών. Για όλα τα microRNA χρησιμοποιείται ως Reverse εκκινητής ο PAP Reverse (Universal) Primer, επομένως χρειάστηκε ο σχεδιασμός μόνο των Forward εκκινητών.

Αρχικά, έγινε επιλογή τεσσάρων microRNA, τα οποία βρέθηκε, βιβλιογραφικά, να σχετίζονται με υπερέκφραση ή υποέκφραση σε ασθενείς με ΧΛΛ. Αυτά ήταν τα εξής: microRNA-451a, microRNA-486-5p, microRNA-582-5p και microRNA-95-3p. Στη συνέχεια, ακολούθησε μία συγκεκριμένη πορεία για το σχεδιασμό εκκινητών για τα συγκεκριμένα microRNA, για τη διαδικασία της Real-Time q-PCR.

Για την επιλογή των καταλληλότερων πιθανών εκκινητών, υπάρχουν κάποια κριτήρια, τα οποία ελέγχουμε, και προσπαθούμε να βρίσκονται, όσο αυτό είναι δυνατόν, στα επιθυμητά όρια. Αυτά είναι:

-Μήκος αλληλουχίας εκκινητή: 18-24 Βάσεις

-Tm: 55-62 °C

-Ποσοστό αλληλουχίας GC: 45-60%

-Self Complementarity και Self-3' Complementarity: 2-4

Επειδή τα miRNA έχουν μικρό μήκος(18-24 βάσεις), ως βάση για εκκινητές για αυτά επιλέγονται ολόκληρες οι αλληλουχίες τους με μικρές προσθήκες η αφαιρέσεις βάσεων στα άκρα τους. Συγκεκριμένα, προσθέτουμε GC στην αρχή της αλληλουχίας ή A στο τέλος, ώστε να έχουμε αύξηση του Tm του εκκινητή.

Τα βήματα, λοιπόν, για το σχεδιασμό των εκκινητών ήταν:

1. Εύρεση ώριμων αλληλουχιών των συγκεκριμένων miRNA. Αυτό έγινε με αναζήτηση των microRNA (με την πρόθεση -hsa) στην ιστοσελίδα miRbase.org.
 - Η ιστοσελίδα miRBase είναι το δημόσιο καταχωρητήριο για όλες τις δημοσιευμένες αλληλουχίες microRNA και τις σχετικές αναφορές σε αυτά. Το miRbase ιδρύθηκε το 2002, στην πορεία ονομάστηκε MicroRNA Registry, με πρωταρχικό στόχο τη εύρεση σταθερών και μόνιμων ονομάτων στα microRNAs που έχουν μόλις ανακαλυφθεί. Τα νέα microRNAs καταχωρούνται στο miRbase, εφόσον υπάρχει ένα άρθρο το οποίο που περιγράφει την αναγνώριση τους, το οποίο έχει γίνει αποδεκτό για δημοσίευση σε επιστημονικό περιοδικό. Το miRbase διανέμει όλες τις δημοσιευμένες αλληλουχίες microRNA, για αναζήτηση μέσω της αλληλουχίας και λέξεων-κλειδιά[106]
2. Αντικατάσταση, στην αλληλουχία των βάσεων, των U με T(επειδή πρόκειται για cDNA).

3. Χρήση του Primer-BLAST (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>). Εισαγωγή της αλληλουχίας, αρχικά ως έχει και στη συνέχεια με μικρές αλλαγές, ως πιθανούς Forward Primers.
4. Ελέγχουμε τα κριτήρια καταλληλότητας των εκκινητών κάθε φορά, και επιλέγουμε τον καταλληλότερο με βάση αυτά.

Παρακάτω ακολουθεί ενδεικτικό παράδειγμα (Πίνακας 2.5.) για τους πιθανούς εκκινητές που βρέθηκαν για το microRNA-451a. Αυτός που τελικά επελέγη είναι σημειωμένος με γκρι χρώμα.

Πίνακας 2.5. Ενδεικτικό παράδειγμα για τους πιθανούς εκκινητές που βρέθηκαν για το microRNA-451a (hsa-miR-451a, Sequence: AAACCGTTACCATTACTGAGTT)

miR-451a	Sequence (5'→3')	Length	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
F	AAACCGTTACCATTACTGAGTT	22	55.67	36.36	5.00	3.00
*F	GCAAACCGTTACCATTACTGAGTTA	25	59.59	40.00	5.00	5.00
F	CAAACCGTTACCATTACTGAGTT	23	57.07	39.13	5.00	3.00
F	CAAACCGTTACCATTACTGAGTTA	24	56.97	37.50	5.00	5.00
F	CGAAACCGTTACCATTACTGAGTTA	25	59.14	40.00	5.00	5.00
F	GAAACCGTTACCATTACTGAGTTAA	25	57.34	36.00	5.00	5.00

Οι εκκινητές που επιλέχθηκαν, και τα χαρακτηριστικά επιλογής τους, είναι οι παρακάτω (Πίνακας 2.6.):

Πίνακας 2.6. Εκκινητές που επιλέχθηκαν, και τα χαρακτηριστικά επιλογής τους

MiRNA	Sequence	F Primer Sequence (5'→3')	Length	Tm	GC%	Self/ Self 3' complementarity
miR-582-5p	TTACAGTTGTTCAACCAGTTACT	GCTTACAGTTGTTCAACCAGTTACTA	26	59.52	38.46	6/ 3
miR-451a	AAACCGTTACCATTACTGAGTT	GCAAACCGTTACCATTACTGAGTTA	25	59.59	40	5/ 5
miR-95-3p	TTCAACGGGTATTTATTGAGCA	GCTTCAACGGGTATTTATTGAGCA	24	59.9	41.67	4/ 2
miR-486-5p	TCCTGTTACTGAGCTGCCCGAG	TCCTGTTACTGAGCTGCCCGAG	22	65.71	63.64	4/ 2

2.2.5. Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (PCR)

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) είναι μια σχετικά απλή τεχνική που ενισχύει ένα πρότυπο τμήμα DNA για την παραγωγή μεγάλου αριθμού αντιγράφων ειδικών θραυσμάτων DNA. Οι παραδοσιακές μέθοδοι κλωνοποίησης μιας αλληλουχίας DNA σε ένα φορέα και η αντιγραφή του σε ένα ζωντανό κύτταρο συχνά απαιτούν ημέρες ή εβδομάδες

εργασίας, ενώ η ενίσχυση των αλληλουχιών DNA με PCR απαιτεί μόνο ώρες. Έτσι, η PCR μπορεί να επιτύχει πιο ευαίσθητη ανίχνευση και υψηλότερα επίπεδα ενίσχυσης συγκεκριμένων αλληλουχιών σε λιγότερο χρόνο από ότι οι προηγούμενες μέθοδοι. Αυτά τα χαρακτηριστικά καθιστούν την τεχνική αυτή εξαιρετικά χρήσιμη, όχι μόνο στη βασική έρευνα, αλλά και στις εμπορικές χρήσεις, συμπεριλαμβανομένων των εξετάσεων γενετικής ταυτότητας, της εγκληματολογίας και των *in vitro* διαγνωστικών. Η βασική PCR είναι συνήθης σε πολλά εργαστήρια μοριακής βιολογίας όπου χρησιμοποιείται για την ενίσχυση θραυσμάτων DNA και την ανίχνευση αλληλουχιών DNA ή RNA[107].

Απαραίτητη προϋπόθεση είναι η γνώση της αλληλουχίας που θα ενισχυθεί ή μέρος αυτής, έτσι ώστε να σχεδιαστούν τα κατάλληλα ολιγονουκλεοτίδια-εκκινητές, από όπου θα ξεκινήσει η αντιγραφή.

Ωστόσο, η PCR έχει εξελιχθεί πολύ πέρα από την απλή ενίσχυση και ανίχνευση και έχουν αναπτυχθεί πολλές επεκτάσεις της αρχικής μεθόδου PCR.

Μία τυπική αντίδραση PCR περιλαμβάνει :

- DNA στόχο,
- θερμοσταθερή DNA πολυμεράση,
- δύο ολιγονουκλεοτιδικά εναρκτήρια μόρια(Εκκινητές),
- τριφωσφορικά δεοξυνουκλεοτίδια (dNTPs),
- Ένα ρυθμιστικό διάλυμα αντίδρασης(Buffer) και
- Μαγνήσιο

Η αντίδραση της PCR πραγματοποιείται σε θερμικό κυκλοποιητή, ένα όργανο που υποβάλλει την αντίδραση σε μια σειρά διαφορετικών θερμοκρασιών για καθορισμένα χρονικά διαστήματα. Αυτή η σειρά ρυθμίσεων θερμοκρασίας και χρόνου αναφέρεται ως ένας κύκλος ενίσχυσης. Κάθε κύκλος PCR διπλασιάζει θεωρητικά την ποσότητα της στοχευόμενης αλληλουχίας (amplicon) στην αντίδραση.

Κάθε πλήρης κύκλος PCR περιλαμβάνει τα εξής στάδια (Σχήμα 2.2.):

α.) Μετουσίωση-Αποδιάταξη DNA εκμαγείου (Denaturation):

Κατά το στάδιο της αποδιάταξης, το τμήμα DNA στόχος αποδιατάσσεται, με θέρμανση σε θερμοκρασία 94 ° C ή υψηλότερη, για 15 δευτερόλεπτα έως 2 λεπτά. Στη διαδικασία αυτή, οι δύο αλληλοσυνδεδεμένοι κλώνοι του DNA διαχωρίζονται ο ένας από τον άλλο, παράγοντας το απαραίτητα μονόκλωνα τμήματα DNA, που θα λειτουργήσουν ως εκμαγείο για αντιγραφή, με τη δράση της DNA πολυμεράσης.

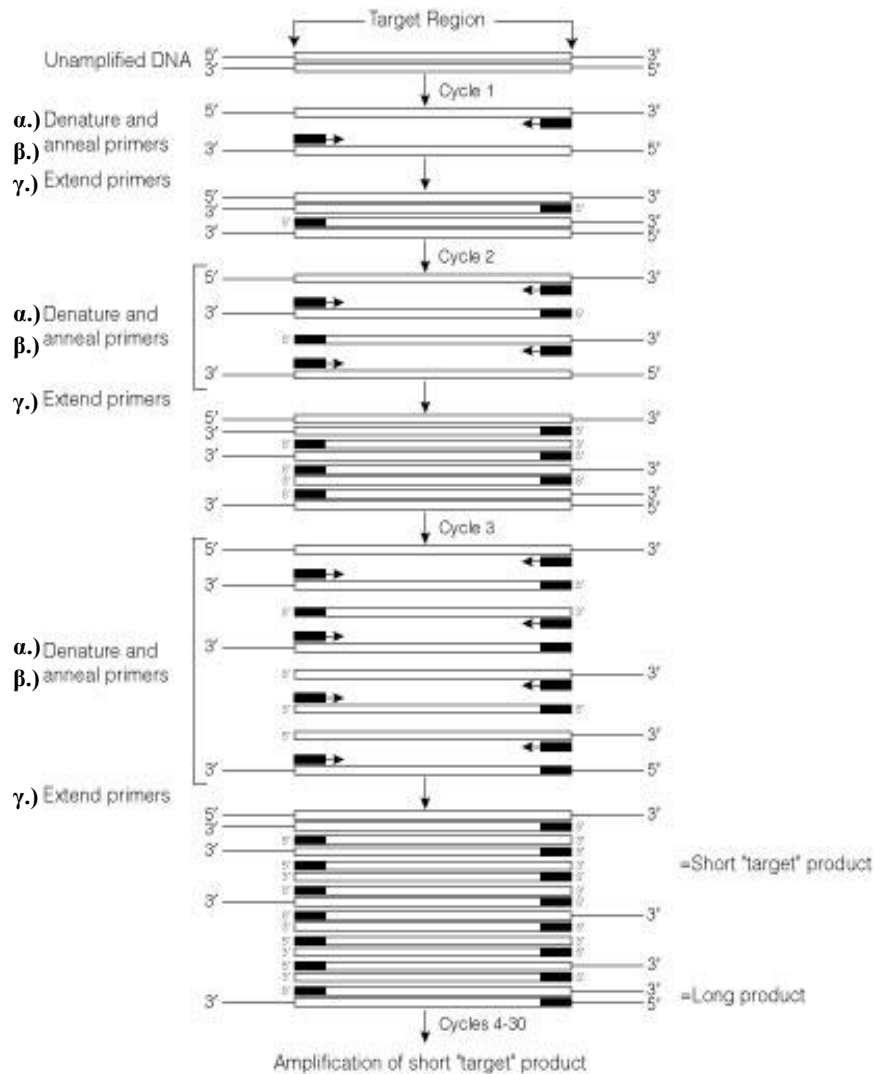
β.) Προσαρμογή εκκινητών στο DNA εκμαγείο (Annealing):

Στο επόμενο βήμα ενός κύκλου, η θερμοκρασία μειώνεται περίπου στους 40-60 ° C. Σε αυτή τη θερμοκρασία, οι ολιγονουκλεοτιδικοί εκκινητές προσδένονται, με υβριδισμό, με τις συμπληρωματικές αλληλουχίες του αποδιαταγμένου DNA στόχου. Αυτό το βήμα διαρκεί περίπου 15-60 δευτερόλεπτα.

γ.) Επέκταση εκκινητή(Extension/Elongation):

Τελευταίο στάδιο, είναι η σύνθεση του νέου DNA, με επιμήκυνση του εκκινητή από μία θερμοσταθερή DNA πολυμεράση. Αυτή ξεκινάει καθώς η θερμοκρασία αντίδρασης

αυξάνεται στο βέλτιστο για την DNA πολυμεράση. Για τις περισσότερες θερμοσταθερές DNA πολυμεράσες, αυτή η θερμοκρασία βρίσκεται στην περιοχή των 70-74 ° C. Το βήμα επέκτασης διαρκεί περίπου 1-2 λεπτά. Ο επόμενος κύκλος αρχίζει με επιστροφή στους 94 ° C για αποδιάταξη[107].



Σχήμα 2.2. Σχηματικό διάγραμμα των βημάτων της διαδικασίας PCR. α.) Μετουσίωση-Αποδιάταξη DNA εκμαγείου (Denaturation), β.) Προσαρμογή εκκινητών στο DNA εκμαγείο (Annealing), γ.) Επέκταση εκκινητή (Extension/Elongation). [107]

Καθώς η διαδικασία επαναλαμβάνεται, οι νεοσύστατοι κλώνοι με τη σειρά τους χρησιμοποιούνται ως εκμαγεία για την *in vitro* σύνθεση του DNA. Μετά από 20-40 κύκλους, το ενισχυμένο προϊόν μπορεί να αναλυθεί ως προς το μέγεθος, την ποσότητα, την ακολουθία κ.λπ. ή να χρησιμοποιηθεί για περαιτέρω πειραματικές διαδικασίες.

2.2.5.1. PCR Αντίστροφης Μεταγραφής με στάδιο Πολυαδενυλίωσης (PAP RT-PCR)

Οι DNA πολυμεράσες που χρησιμοποιούνται για την κλασσική PCR απαιτούν ως πρότυπο ένα DNA στόχο και ως εκ τούτου η τεχνική περιορίζεται στην ανάλυση δειγμάτων DNA. Ωστόσο, υπάρχουν πολλές περιπτώσεις στις οποίες προτιμάται η ενίσχυση ενός τμήματος RNA. Για να εφαρμοστεί PCR στη μελέτη του RNA, το δείγμα RNA πρέπει πρώτα να μετατραπεί αντίστροφα σε cDNA, ώστε να παραχθεί το απαραίτητο εκμαγείο DNA για την θερμοσταθερή πολυμεράση. Αυτή η διαδικασία ονομάζεται αντίστροφη μεταγραφή (RT), εξ ου και το όνομα RT-PCR, και πραγματοποιήθηκε κατά τη συγκεκριμένη διπλωματική εργασία, στα δείγματα RNA που απομονώθηκαν με τη χρήση TRI Reagent, όπως αναφέρθηκε παραπάνω.

Ο ιός της μυελοβλαστώσεως των πτηνών (AMV) ή οι αντίστροφες μεταγραφάσες του ιού της μυϊκής λευχαιμίας ποντικού Moloney (M-MLV ή MuLV) γενικά χρησιμοποιούνται για την παραγωγή ενός αντιγράφου DNA, από ένα εκμαγείο RNA, χρησιμοποιώντας μόρια που ονομάζονται εκκινητές. Υπάρχουν διαφόρων ειδών εκκινητές, όπως τα τυχαία εξαμερή, ειδικά ολιγονουκλεοτίδια στόχοι για συγκεκριμένο γονίδιο, oligo-dTs, κ.ά. Στην παρούσα διπλωματική εργασία χρησιμοποιήθηκε ως εκκινητής ο Poly(T) adaptor, ύστερα από το στάδιο της πολυαδενυλίωσης του RNA. Συνεπώς, κατά την αντίστροφη μεταγραφή, το σύνολο του mRNA θα μετατραπεί σε cDNA. Εναλλακτικά, μερικές θερμοσταθερές DNA πολυμεράσες (π.χ., Tth DNA πολυμεράση) έχουν μια δραστικότητα αντίστροφης μεταγραφάσης, η οποία μπορεί να ενεργοποιηθεί με τη χρήση μαγγανίου αντί μαγνησίου ως συμπαράγοντα.

Η ποιότητα και η καθαρότητα του προτύπου RNA είναι μεγάλης σημασίας για την επιτυχία της RT-PCR. Το ολικό RNA ή το poly(A) + RNA μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως πρότυπο εκκίνησης, αλλά αμφότερα πρέπει να είναι απαλλαγμένα από γονιδιωματικό DNA.

Η αποτελεσματικότητα της αντίδρασης σύνθεσης του πρώτου κλώνου, η οποία μπορεί να σχετίζεται με την ποιότητα του RNA, θα επηρεάσει επίσης σημαντικά τα αποτελέσματα της ενίσχυσης.

Στα πλαίσια της παρούσας διπλωματικής εργασίας, πραγματοποιήθηκε η αντίδραση της RT-PCR στα δείγματα RNA που απομονώθηκαν με τη χρήση TRI Reagent, με μία αρχική διαδικασία πολυαδενυλίωσης (PAP-RT PCR). Η συγκεκριμένη διαδικασία χρησιμεύει όταν ο στόχος που θέλουμε να μελετήσουμε είναι microRNA. Πιο συγκεκριμένα, τα βήματα της διαδικασίας PAP-RT PCR, ήταν τα εξής:

A. Πολυαδενυλίωση

Είναι το στάδιο, στο οποίο πραγματοποιείται η προσθήκη της Poly(A) ουράς στο RNA, με τη χρήση της Escherichia Coli Poly(A) Polymerase. Το συγκεκριμένο ένζυμο, με τη χρήση ATP ως δότη βάσεων Αδενίνης, προσθέτει περίπου 12-14 βάσεις A στο 3' τελικό άκρο του ολικού απομονωμένου RNA. Δημιουργείται, έτσι, η Poly(A) ουρά, η οποία θα

φανεί χρήσιμη για τα επόμενα στάδια της αντίστροφης μεταγραφής και, επακόλουθα, της ποσοτικής PCR πραγματικού χρόνου[108].

Για το συγκεκριμένο βήμα, χρησιμοποιήθηκε, όπως αναφέρθηκε, ποσότητα RNA που απομονώθηκε με τη διαδικασία της απομόνωσης με TRI Reagent, τόση ώστε να έχουμε συγκέντρωση RNA ίση με 1μg/μl, και ακολούθησε αραίωση της με d-H₂O, μέχρι να φτάσει συνολικό όγκο 8 μl. Στο αραιωμένο RNA, προστέθηκαν τα απαραίτητα αντιδραστήρια για την πολυαδενυλίωση, στις εξής ποσότητες ανά δείγμα, με τελικό όγκο 10μl(Πίνακας 2.7.):

Πίνακας 2.7. Αντιδραστήρια που απαιτούνται για τη διαδικασία της πολυαδενυλίωσης κατά την PAP-RT PCR

Αντιδραστήριο	Όγκος (μl)
10x Poly(A) Buffer (5,000 u/ml)	1
ATP (10 mM)	0,8
E. Coli Poly(A) Polymerase (5,000 u/ml)	0,2
RNA (1μg/μl)	8
Σύνολο	10

Στη συνέχεια, τα δείγματα επωάστηκαν σε θερμοκυκλοποιητή, αρχικά σε θερμοκρασία 37 C^o για 60 λεπτά, και έπειτα σε θερμοκρασία 65 C^o για 10 λεπτά. Τα δείγματα χρησιμοποιήθηκαν απ' ευθείας για το βήμα της υβριδοποίησης του Poly(T) Adaptor.

B. Υβριδοποίηση Poly(T) Adaptor

Στο στάδιο αυτό, προστίθεται στο RNA, που έχει γίνει η πολυαδενυλίωση, ο Poly(T) Adaptor, ο οποίος χρησιμεύει ως εκκινήτης για την πορεία της αντίστροφης μεταγραφής, αλλά και για τη διαδικασία της Real-Time q-PCR, στην οποία ο PAP Reverse Primer θα προσδεθεί στην αλληλουχία του Poly(T) Adaptor.

Ο Poly(T) Adaptor υβριδοποιείται με την Poly(A) ουρά, και έτσι το RNA είναι έτοιμο για την διαδικασία της αντίστροφης μεταγραφής[109].

Συγκεκριμένα, τα αντιδραστήρια και οι όγκοι που χρησιμοποιήθηκαν, για κάθε δείγμα, οδηγώντας σε τελικό όγκο 12,5μl, ήταν τα εξής(Πίνακας 2.8.):

Πίνακας 2.8. Αντιδραστήρια και όγκοι που απαιτούνται για την υβριδοποίηση του Poly(T) Adaptor σε δείγματα πολυαδενυλιωμένου RNA

Αντιδραστήριο	Όγκος (μl)
d-H₂O	2
Poly(T) adaptor (10μM)	0,5
Πολυαδενυλιωμένο RNA (1μg/μl)	10
Σύνολο	12,5

Μετά την προσθήκη των απαραίτητων αντιδραστηρίων, τα δείγματα επώαστηκαν σε θερμοκυκλοποιητή σε θερμοκρασία 65 C⁰ για 5 λεπτά. Τα δείγματα χρησιμοποιήθηκαν απ' ευθείας για τη διαδικασία της αντίστροφης μεταγραφής, η οποία αναλύεται παρακάτω.

Γ. Αντίστροφη Μεταγραφή (Reverse Transcription)

Κατά το τελευταίο στάδιο, πραγματοποιείται η σύνθεση του πρωταρχικού μορίου cDNA και στη συνέχεια η περαιτέρω ενίσχυσή του (Σχήμα 2.3.). Όπως αναφέρθηκε ανωτέρω, χρησιμοποιήθηκε το ένζυμο M-MLV. Επιπλέον, προστίθεται στην αντίδραση ρυθμιστικό διάλυμα διθειοθριτόλης (DTT), το οποίο αποτρέπει την οξείδωση των θειολομάδων, τριφωσφορικά δεοξυριβονουκλεοτίδια (dNTPs) για τη σύνθεση των νέων κλώνων, βάσει του κανόνα συμπληρωματικότητας από την πολυμεράση, και ο αναστολέας ριβονουκλεασών RNase Inhibitor. Έτσι, το αρχικό RNA προστατεύεται από αποικοδόμηση και μπορεί στη συνέχεια να ενισχυθεί.

Συγκεντρωτικά, τα αντιδραστήρια και οι όγκοι που χρησιμοποιήθηκαν, για κάθε δείγμα, ήταν τα εξής (Πίνακας 2.11.):

Πίνακας 2.9. Αντιδραστήρια και όγκοι που χρησιμοποιήθηκαν για τη διαδικασία της αντίστροφης μεταγραφής σε δείγματα πολυαδενυλιωμένου RNA

Αντιδραστήριο	Όγκος (μl)
0,1 M DTT	2
5x First Strand RT- Buffer [250 mM Tris-HCl (pH 8.3), 375 mM KCl, 15 mM MgCl ₂]	4
dNTPs (10mm)	1
RNaseOUT (40u/μl)	0,25
M-MLV (200u/μl)	0,25
Πολυαδενυλιωμένο RNA υβριδοποιημένο με Poly(T) adaptor (1μg/μl)	12,5
Σύνολο	20

Ύστερα από την προσθήκη των παραπάνω αντιδραστηρίων, τα δείγματα επώαστηκαν σε θερμοκυκλοποιητή, αρχικά στους 37 C⁰ για 60 λεπτά, και τέλος στους 70 C⁰ για 15 λεπτά.

Ο τελικός όγκος της αντίδρασης, και άρα, του cDNA που παράγεται, για κάθε δείγμα, θα πρέπει να είναι 20 μl. Το cDNA που έχει παραχθεί φυλάσσεται στους -20 °C μέχρι να χρησιμοποιηθεί για τη διαδικασία της ποσοτικής αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (Real-Time q-PCR).

2.2.5.2. Ποσοτική PCR Πραγματικού Χρόνου(Real-Time qPCR)

Η ποσοτική PCR πραγματικού χρόνου, είναι μία μέθοδος, που παρέχει την ικανότητα να βλέπει κανείς τα αποτελέσματα κάθε κύκλου ενίσχυσης. Ένα από τα βασικά του πλεονεκτήματα είναι ότι, ουσιαστικά, αποδεσμεύει τον ερευνητή από την ανάγκη για ανάλυση των προϊόντων της PCR με ηλεκτροφόρηση.

Η διαδικασία της ποσοτικής PCR πραγματικού χρόνου, βασίζεται στη χρήση ανιχνευτών φθορίζοντος ιχνηθετημένου ολιγονουκλεοτιδίου ή φθορίζοντων χρωστικών ουσιών που δεσμεύονται στο DNA, με αποτέλεσμα να είναι δυνατή η ανίχνευση και ποσοτικοποίηση ενός προϊόντος PCR. Τα ειδικά σχεδιασμένα όργανα που υπάρχουν, εκτελούν κυκλικά ένα συγκεκριμένο θερμικό πρωτόκολλο, ώστε να ενισχύσουν την ανίχνευση του τμήματος DNA στόχου[107].

Οι ανιχνευτές νουκλεϊκού οξέος με φθορίζουσα σήμανση έχουν το πλεονέκτημα ότι αντιδρούν μόνο με συγκεκριμένα προϊόντα PCR, αλλά μειονεκτούν στο ότι είναι δαπανηροί και δύσκολοι στο σχεδιασμό. Ορισμένες τεχνολογίες qPCR χρησιμοποιούν φθορίζοντες επισημασμένους εκκινητές PCR αντί για ανιχνευτές.

Η χρήση φθορίζοντων χρωστικών που δεσμεύονται στο DNA είναι μία από τις πιο εύκολες και εύχρηστες προσεγγίσεις της qPCR. Η χρωστική προστίθεται απλά στην αντίδραση και ο φθορισμός μετράται σε κάθε κύκλο PCR. Επειδή ο φθορισμός αυτών των χρωστικών αυξάνει δραματικά παρουσία διπλής έλικας DNA, η σύνθεση του DNA μπορεί να παρακολουθηθεί ως μία αύξηση στο φθορίζον σήμα. Συγκεκριμένα, η αύξηση του σήματος φθορισμού, είναι ανάλογη του συντιθέμενου προϊόντος και σχετίζεται με τη ποσότητα του αρχικού υποστρώματος. Ο φθορισμός μετρείται ανά κύκλο κατά τη διάρκεια της PCR, με αποτέλεσμα να προκύπτει καμπύλη ενίσχυσης (amplification plot).

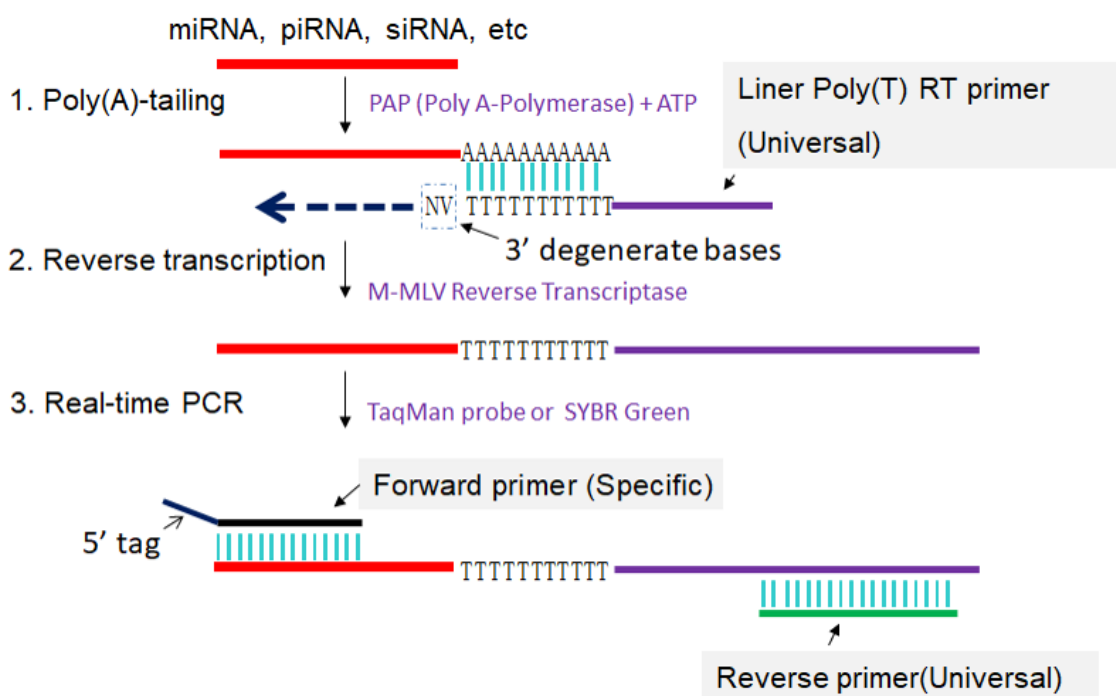
Διακρίνονται τρεις φάσεις στην καμπύλη ενίσχυσης: την εκθετική, τη γραμμική και τη φάση κορεσμού. Στην εκθετική φάση (exponential phase) σημειώνεται ακριβής διπλασιασμός του προϊόντος σε κάθε κύκλο, αφού όλα τα συστατικά βρίσκονται σε περίσσεια. Μετά την πάροδο όμως κάποιων κύκλων, επέρχεται η γραμμική φάση όπου τα αντιδραστήρια αρχίζουν και εξαντλούνται. Η αντίδραση της ενίσχυσης επιβραδύνεται και τέλος σταματάει εντελώς, οπότε η καμπύλη φθορισμού φθάνει σε σημείο κορεσμού (plateau). Αξίζει να σημειωθεί πως το σημείο αυτό διαφέρει μεταξύ των δειγμάτων και εξαρτάται από τις κινητικές των αντιδράσεων.

Εντούτοις, συχνά πρέπει να γίνουν προκαταρκτικές εργασίες για να εξασφαλιστεί ότι οι συνθήκες PCR αποδίδουν μόνο ένα συγκεκριμένο προϊόν. Η τεχνική αυτή έχει το μειονέκτημα ότι και μη ειδικά PCR προϊόντα μεγέθους διαφορετικού από τα αναμενόμενα, δίδουν φθορισμό. Τέτοια προϊόντα, για παράδειγμα, μπορεί να είναι διμερή εκκινητών ή άλλα παραπροϊόντα.

Για να επιβεβαιωθεί η ειδική ενίσχυση ενός προϊόντος, και όχι και άλλων μη ειδικών, χρησιμεύει η ανάλυση της καμπύλης τήξεως (Melt Curve Analysis), δηλαδή του ανιχνευόμενου φθορισμού βάσει του μεγέθους των προϊόντων. Το μήκος και η ακολουθία του προϊόντος επηρεάζουν τη θερμοκρασία τήξης (T_m), επομένως η καμπύλη τήγματος χρησιμοποιείται για να χαρακτηρίσει την ομοιογένεια και τη μοναδικότητα του επιθυμητού

προϊόντος. Η μη ειδική ενίσχυση μπορεί να ταυτοποιηθεί με ευρείες κορυφές στην καμπύλη τήγματος ή κορυφές με μη αναμενόμενες τιμές T_m . Με τη διάκριση ειδικών και μη ειδικών προϊόντων ενίσχυσης, η καμπύλη τήγματος προσθέτει μια πτυχή ελέγχου της ποιότητας της αντίδρασης κατά τη χρήση ρουτίνας.

Στην συγκεκριμένη διπλωματική εργασία χρησιμοποιήθηκε η χρωστική SYBR Green I, που διεγείρεται με ακτινοβολία μήκους κύματος 497 nm και εκπέμπει στα 520 nm, από το kit KAPA SYBR FAST Universal της KAPA BIOSYSTEMS. Κατά τη διάρκεια της PCR, τα μικρά μόρια της χρωστικής προσδένονται επάνω στο δίκλωνο DNA, το οποίο παράγεται χάρις την ύπαρξη ειδικών εκκινητών (Σχήμα 2.3.). Όσο συνεχίζεται η διαδικασία, τόσο παραπάνω δίκλωνο προϊόν σχηματίζεται, με αποτέλεσμα παραπάνω ποσότητα του μορίου της SYBR να προσδένεται σε αυτό. Έτσι, λοιπόν, προκαλείται μια αύξηση στη φωταύγεια η οποία αντιστοιχεί στο ποσό του γενετικού υλικού που έχει ενισχυθεί.



Σχήμα 2.3. Συνοπτικό σχήμα των βημάτων των αντιδράσεων PAP RT-PCR και Real-Time q-PCR για microRNA

Οι αντιδράσεις της Real-Time PCR πραγματοποιήθηκαν στο μηχάνημα 7500 Fast Real Time PCR System της Applied Biosystems.

Η πειραματική πορεία, που ακολουθήθηκε στα πλαίσια της συγκεκριμένης διπλωματικής εργασίας, είναι η εξής:

1. Δημιουργούμε ένα MIX για κάθε εκκινητή, με όλα τα αντιδραστήρια, εκτός του cDNA, ανάλογα με τον αριθμό των δειγμάτων, για τα οποία θα γίνει η αντίδραση. Τα αντιδραστήρια και οι όγκοι που χρησιμοποιήθηκαν για τη δημιουργία των MIX της αντίδρασης, για κάθε δείγμα υπολογίζοντας την προσθήκη διπλετών (duplicates), και για κάθε διαφορετικό forward εκκινητή, είναι (Πίνακας 2.10.):

Πίνακας 2.10. Αντιδραστήρια και όγκοι αντίδρασης Real-Time q-PCR

Αντιδραστήριο	Όγκος (μl)	Όγκος για duplicates(×2,2)(μl)
SYBR Green I	5	11
Reverse Primer (2μM)	1	2,2
Forward Primer (2μM)	1	2,2
d-H₂O	2	4,4
cDNA (αραιωμένο σε αναλογία 1:10)	1	2,2
Σύνολο	10	22

- Όλοι οι εκκινητές αραιώνονται σε αναλογία 1:50 από την αρχική τους συγκέντρωση (100μM), ώστε να χρησιμοποιηθούν στην αντίδραση σε συγκέντρωση 2μM.

- Το cDNA που έχει προκύψει από την αντίδραση της PAP RT-PCR, από ολικό RNA συγκέντρωσης 1μg/μl, αραιώνεται σε αναλογία 1:10.

- Πάντοτε προστίθεται στην αντίδραση της Real-Time q-PCR ένας αρνητικός μάρτυρας (Negative Control), όπου θα προστίθενται όλα τα αντιδραστήρια, εκτός από cDNA.

2. Το MIX ισομοιράζεται σε tubes των 0,2 ml, σε ποσότητα 19,8μl.

3. Στο κάθε tube προστίθενται 2,2 μl cDNA δείγματος και έπειτα ακολουθεί καλή ανάδευση του.

4. Προστίθενται 10 μl (2 φορές για κάθε δείγμα) σε κάθε πηγαδάκι του ειδικού Plate 96 θέσεων(wells) του ειδικού οργάνου 7500 Fast Real Time PCR System, τοποθετείται ένα ειδικό αυτοκόλλητο στην επιφάνεια του Plate και εισάγεται στο μηχάνημα, ώστε να ξεκινήσει το θερμικό πρωτόκολλο. Ο τελικός όγκος για κάθε αντίδραση, θα πρέπει να είναι 10 μl.

5. Στη συνέχεια, ακολουθεί η έναρξη του θερμικού πρωτοκόλλου στο ειδικό όργανο 7500 Fast Real Time PCR System, με τις εξής συνθήκες θερμοκρασιών και χρόνων(Πίνακας 2.11.):

Πίνακας 2.11. Συνθήκες αντίδρασης Real-Time q-PCR

Στάδιο	Βήμα	Θερμοκρασία (C ⁰)	Χρόνος (sec/min)	Κύκλοι
Στάδιο 1 (Holding Stage)	Βήμα 1	95	3 min	1
Στάδιο 2 (Cycling Stage)	Βήμα 1	95	3 sec	40
	Βήμα 2	60	30 sec	
Στάδιο 3 (Melt Curve Stage)	Βήμα 1	95	15 sec	1
	Βήμα 2	60	1 min	
	Βήμα 3	95	15 sec	
	Βήμα 4	60	15 sec	

Η διαδικασία της ποσοτικοποίησης γίνεται στην εκθετική φάση της καμπύλης ενίσχυσης βασίζεται σε έναν αριθμό που ονομάζεται Ct. Ο αριθμός Ct (threshold cycle) είναι η τομή μεταξύ μίας καμπύλης ενίσχυσης και ενός συγκεκριμένου ορίου φθορισμού (threshold), δηλαδή ο συνολικός αριθμός κύκλων αντίδρασης που έχουν πραγματοποιηθεί μέχρι να ξεπεραστεί αυτό το όριο. Πρόκειται για ένα σχετικό μέτρο της συγκέντρωσης του τμήματος DNA στόχου στην αντίδραση PCR. Πολλοί παράγοντες επηρεάζουν την απόλυτη τιμή του Ct εκτός από τη συγκέντρωση του στόχου. Όσο πιο μικρό είναι το Ct value, τόσο πιο σύντομα φτάνει η αντίδραση στην επιθυμητή τιμή φθορισμού, άρα τόσο περισσότερο αρχικό υπόστρωμα υπήρχε.

Απαραίτητα για την ποσοτικοποίηση μίας αντίδρασης Real Time PCR, είναι πάντοτε ένα γονίδιο αναφοράς και ένας θετικός μάρτυρας. Τα γονίδια αναφοράς και οι θετικοί μάρτυρες χρησιμεύουν ώστε να γίνεται κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων της Real-Time q-PCR.

Πολλά λάθη ποσοτικοποίησης μπορούν να πραγματοποιηθούν κατά την απομόνωση RNA ή την RT-PCR, για αυτό τα γονίδια αναφοράς χρησιμεύουν ως εσωτερικός έλεγχος της αντίδρασης. Στα πλαίσια της συγκεκριμένης διπλωματικής, χρησιμοποιήθηκε ως γονίδιο αναφοράς (housekeeping gene) το SNORD48 ή RNU48, το οποίο συχνά χρησιμοποιείται ως γονίδιο αναφοράς. Οι περιοχές εσωνίων, γονιδίων ριβοσωματικών πρωτεϊνών μπορούν να «φιλοξενήσουν» μη κωδικοποιημένα μικρά πυρηνισκικά RNAs (snoRNAs), όπως το SNORD48, τα οποία παράγονται κατά τη διάρκεια της επεξεργασίας pre-miRNAs. Τα snoRNAs αποτελούν μέρος των μικρών σωματιδίων νουλεοτιδικής ριβονουκλεοπρωτεΐνης (snoRNPs) που εμπλέκονται στην επεξεργασία και την τροποποίηση pre-rRNAs. Επιπλέον, ανήκει στη μεγάλη κατηγορία C/D Box αι η λειτουργία του σχετίζεται με τη μεθυλίωση της 2'-Ο-Ριβόζης του 28S rRNA C2279.

Ως θετικός μάρτυρας, βαθμονομητής, ή αλλιώς calibrator, χρησιμοποιήθηκε ένα pool, δηλαδή ανάμειξη του cDNA από 8 δείγματα υγιών, τα οποία βρέθηκε να έχουν υψηλή έκφραση στα συγκεκριμένα microRNA. Συγκεκριμένα από κάθε δείγμα προστέθηκαν 10μl (με αρχική αραίωση 1:10) cDNA με τελικό όγκο 80 μl.

Με αυτό τον τρόπο, είναι δυνατή η σχετική ποσοτικοποίηση με τη μέθοδο $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Κατά τη μέθοδο αυτή, αρχικά γίνεται κανονικοποίηση των τιμών Ct για τα microRNA που μελετώνται και για το γονίδιο αναφοράς, αφαιρώντας από τις τιμές του, τις τιμές Ct του δείγματος ΧΛΛ (CLL) για το κάθε microRNA από τις τιμές του δείγματος Calibrator για το αντίστοιχο microRNA, αλλά και για το γονίδιο αναφοράς (RNU48), βάσει των παρακάτω εξισώσεων:

$$\Delta Ct_{(\text{δείγματος ΧΛΛ, microRNA})} = Ct_{(\text{δείγματος ΧΛΛ, microRNA})} - Ct_{(\text{calibrator Sample, microRNA})}, \text{ και}$$

$$\Delta Ct_{(\text{δείγματος ΧΛΛ, γονιδίου αναφοράς})} = Ct_{(\text{δείγματος ΧΛΛ, γονιδίου αναφοράς})} - Ct_{(\text{calibrator Sample, γονιδίου αναφοράς})}$$

Στη συνέχεια, ακολουθεί περαιτέρω κανονικοποίηση του $\Delta Ct_{(\text{δείγματος ΧΛΛ, miRNA})}$ με το $\Delta Ct_{(\text{δείγματος ΧΛΛ, γονιδίου αναφοράς})}$, όπου προκύπτει:

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{(\text{δείγματος ΧΛΛ, microRNA})} - \Delta Ct_{(\text{δείγματος ΧΛΛ, γονιδίου αναφοράς})}.$$

Τέλος υπολογίζεται η ποσότητα $2^{-\Delta\Delta C_t}$, η οποία αντιστοιχεί στον αριθμό των φορών που μεταβλήθηκε η έκφραση του ελεγχόμενου microRNA στα διάφορα δείγματα, σε σύγκριση με το πρότυπο δείγμα, το οποίο κανονικοποιείται και ως προς το γονίδιο αναφοράς.

2.2.6. Στατιστική Ανάλυση

Τα αποτελέσματα που προέκυψαν, από τα 82 δείγματα ασθενών με Χρόνια Λεμφοκυτταρική Λευχαιμία και 29 δείγματα υγιών ατόμων, για τα microRNA-451a, microRNA-486-5p και microRNA-582-5p, χρησιμοποιήθηκαν για στατιστική ανάλυση, η οποία πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του προγράμματος SPSS Statistics 25 (Statistical Package for the Social Sciences).

Η στατιστική ανάλυση που ακολούθησε, περιλάμβανε:

- Τη σύγκριση των επιπέδων έκφρασης των συγκεκριμένων τριών microRNAs, μεταξύ ασθενών με ΧΛΛ και υγιών ατόμων, η οποία υπολογίστηκε με την εφαρμογή του μη-παραμετρικού στατιστικού τεστ Mann-Whitney U test και του στατιστικού μοντέλου λογιστικής παλινδρόμησης (Logistic Regression), και τη γραφική απεικόνιση της με τη μέθοδο Box Plot και την καμπύλη ROC Curve (Receiver operating characteristic).
- Τη σύγκριση των επιπέδων έκφρασης των τριών microRNA στους ασθενείς με ΧΛΛ, με τα κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά τους, με τη εφαρμογή των μη-παραμετρικών τεστ συσχέτισης (Non-Parametric Correlation) Spearman Two-Tailed Test, Jonckheere–Terpstra test και Mann-Whitney U test, και τη χρήση Crosstabs και στατιστικών τεστ Chi-Squared Test. Τα διάφορα κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά που συσχετίστηκαν με τα επίπεδα έκφρασης των συγκεκριμένων microRNAs, ήταν το φύλο, η ηλικία, τα κλινικά στάδια Binet και Rai για την ΧΛΛ, τα λευκά αιμοσφαίρια (WBC), τα λεμφοκύτταρα, το ποσοστό CD38% (< ή >30%), η ανεξίνη, η LDH και η ύπαρξη ή όχι της μετάλλαξης IgHV.
- Τη μελέτη της ανάλυσης επιβίωσης των ασθενών με ΧΛΛ, με το σχεδιασμό καμπυλών επιβίωσης Kaplan-Meier για την ολική επιβίωση (Overall Survival, OS) για κάθε microRNA, έχοντας θέσει ένα cut-off όριο, με το οποίο οι ασθενείς διακρίθηκαν σε υψηλής και χαμηλής έκφρασης για κάθε microRNA. Πραγματοποιήθηκε, επιπλέον, σχεδιασμός καμπυλών Kaplan-Meier για την ολική επιβίωση των ασθενών με ΧΛΛ, σε σχέση και με τα διάφορα κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά των ασθενών, όπως η ύπαρξη ή όχι της μετάλλαξης IgHV και το ποσοστό CD38% (< ή >30%). Άκομη, έγινε εφαρμογή του μοντέλου ανάλυσης παλινδρόμησης Cox (Cox Regression).

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1. ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΣ ΜΟΝΟΠΥΡΗΝΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΠΕΡΙΦΕΡΙΚΟΥ ΑΙΜΑΤΟΣ - ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΟΛΙΚΟΥ RNA

Στα πλαίσια την παρούσας εργασίας, έγινε λήψη περιφερικού αίματος 82 ασθενών με Β-Χρόνια Λεμφοκυτταρική Λευχαιμία και 29 υγιών ατόμων. Σε αυτό πραγματοποιήθηκε, αρχικά, διαχωρισμός των μονοπύρηνων κυττάρων περιφερικού αίματος(PBMCs) με τη χρήση Ficoll, και στη συνέχεια απομόνωση ολικού RNA με τη χρήση TRI Reagent, από τα κύτταρα αυτά.

Αυτές οι διαδικασίες πραγματοποιήθηκαν σύμφωνα με τις μεθόδους που αναπτύχθηκαν στις ενότητες 5.2.1.2. και 5.2.2. του προηγούμενου κεφαλαίου.

3.2. ΦΑΣΜΑΤΟΦΩΤΟΜΕΤΡΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ ΚΑΙ ΕΛΕΓΧΟΣ ΤΗΣ ΚΑΘΑΡΟΤΗΤΑΣ ΤΟΥ ΑΠΟΜΟΝΩΜΕΝΟΥ ΟΛΙΚΟΥ RNA

Στο τέλος κάθε απομόνωσης ολικού RNA, πραγματοποιήθηκε φασματοφωτομετρικός προσδιορισμός της συγκέντρωσης του RNA που απομονώθηκε, αλλά και έλεγχος της καθαρότητας του, όπως αναφέρεται στην ενότητα 5.2.3. Αυτά έγιναν με τη χρήση του συγκεκριμένου φωτόμετρου που αναφέρθηκε, του Quawell Q3000 UV Spectrophotometer. Η καθαρότητα του απομονωμένου RNA ελέγχεται από τον λόγο απορρόφησης A_{260}/A_{280} , δηλαδή για τα 260 nm ως προς τα 280 nm, ο οποίος πρέπει να βρίσκεται μεταξύ 1,8 και 2,0.

Ακολουθεί ενδεικτικό παράδειγμα αποτελεσμάτων του φωτόμετρου Quawell Q3000 UV Spectrophotometer για 4 δείγματα ασθενών με Β-Χρόνια Λεμφοκυτταρική Λευχαιμία, όπου το RNA είχε αραιωθεί σε 30 μl D-H₂O, στο τέλος της απομόνωσης(Πίνακας 3.1.):

Πίνακας 3.1. Ενδεικτικός Πίνακας αποτελεσμάτων φωτομέτρησης με το φωτόμετρο Quawell Q3000 UV Spectrophotometer για 4 δείγματα ασθενών με Χρόνια Λεμφοκυτταρική Λευχαιμία.

Όνομα Δείγματος	Συγκέντρωση(ng/μl)	260/280
6B	719,5	1,90
7B	698,2	1,90
9B	707,5	1,91
10B	495,3	1,88

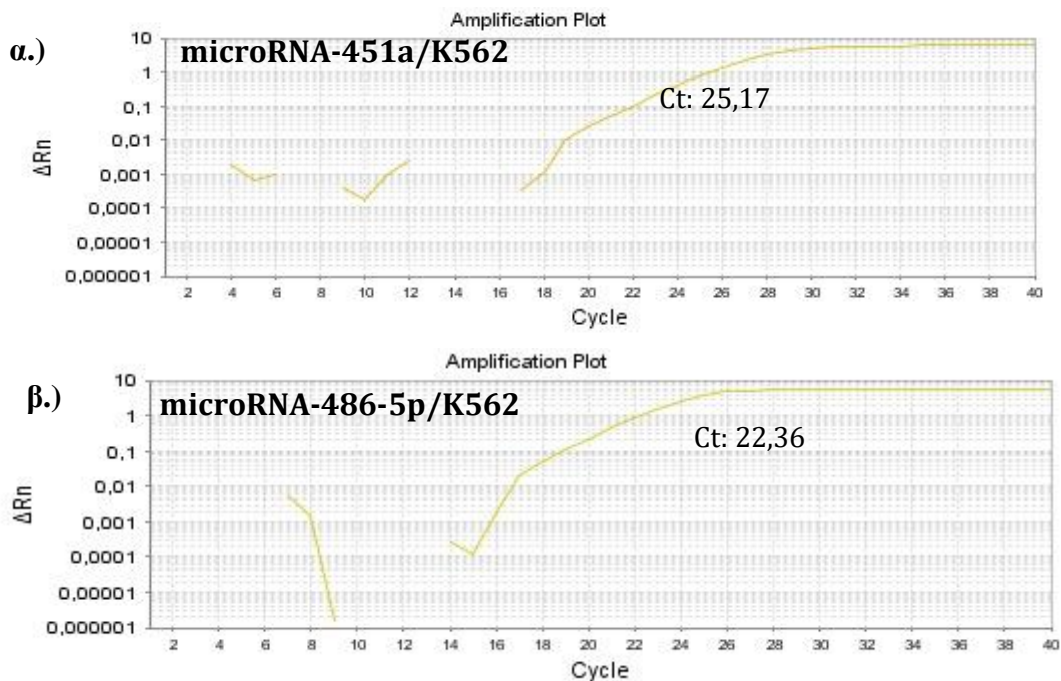
Τέλος, το RNA μοιράζεται σε aliquots, ώστε το καθένα να έχει συγκέντρωση RNA 1μg/μl, ώστε να χρησιμοποιηθεί απευθείας στη διαδικασία της Reverse Transcription-PCR.

3.3. ΕΛΕΓΧΟΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΩΝ *microRNA-451a*, *microRNA-486-5p*, *microRNA-582-5p* ΚΑΙ *microRNA-95-3p* ΜΕ REAL-TIME q-PCR

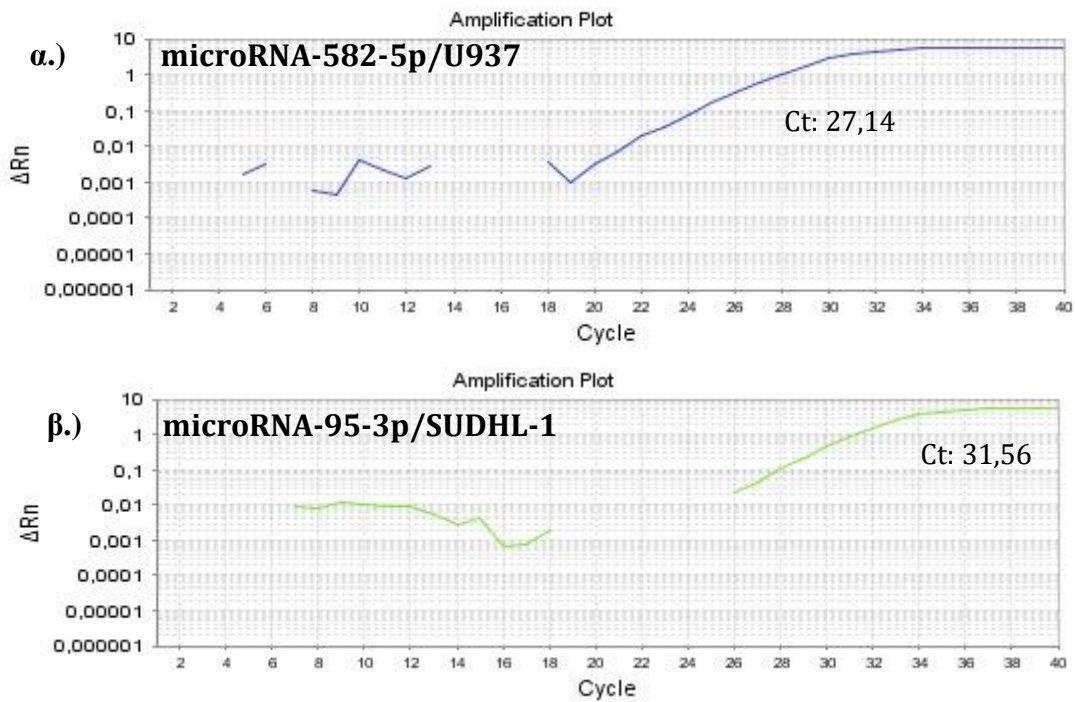
Πριν από τη χρήση τους σε δείγματα ασθενών με Χρόνια Λεμφοκυτταρική Λευχαιμία και δείγματα υγιών, οι Forward εκκινητές που σχεδιάστηκαν για τα συγκεκριμένα *microRNAs*, έπρεπε να εξεταστούν σχετικά με την έκφραση αλλά ειδικότητα τους στα συγκεκριμένα *microRNAs*. Αυτό πραγματοποιήθηκε με τη διαδικασία της Real-Time q-PCR σε cDNA από 5 λευχαιμικές κυτταρικές σειρές (K562, U937, HL-60, SUDHL-1, Raji), για όλα τα πιθανά *microRNAs* και το γονίδιο αναφοράς RNU48. Το cDNA προέκυψε ύστερα από PAP-RT PCR σύμφωνα με τη μέθοδο που αναλύθηκε στην ενότητα 5.2.5.1

Η μέθοδος που ακολουθήθηκε για τη Real-Time q-PCR, ήταν αυτή που περιεγράφηκε στην ενότητα 5.2.5.2. του προηγούμενου κεφαλαίου.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα του συγκεκριμένου πειράματος, παρατηρήθηκε ότι όλα τα *microRNA* που εξετάζονταν με τους συγκεκριμένους Forward Primers, εμφανίζουν έκφραση τουλάχιστον σε μία από τις 5 κυτταρικές σειρές, με βάση τον αριθμό Ct τους. Επιπλέον, τα *microRNA-451a*, *microRNA-486-5p* και *microRNA-582-5p* εμφάνιζαν τιμές Ct αρκετά μικρές, κάτι που δηλώνει ότι έχουν πιθανά υψηλή συγκέντρωση στο αρχικό δείγμα, εν προκειμένω τις κυτταρικές σειρές. Το *microRNA-95-3p* εμφάνιζε υψηλές τιμές Ct και στις 5 κυτταρικές σειρές. Παρακάτω παρατίθενται οι καμπύλες ενίσχυσης για κάθε *microRNA*, για την κυτταρική σειρά στην οποία εμφάνισε την υψηλότερη έκφραση (Εικόνες 3.1. και 3.2.).



Εικόνα 3.1. Καμπύλες ενίσχυσης για τα *microRNA-451a* και *microRNA-486-5p*, για την κυτταρική σειρά στην οποία εμφάνισαν την υψηλότερη και μοναδική έκφραση. Αναγράφονται οι τιμές Ct. Συγκεκριμένα: α.) *microRNA-451a* για την κυτταρική σειρά K562, β.) *microRNA-486-5p* για την κυτταρική σειρά K562

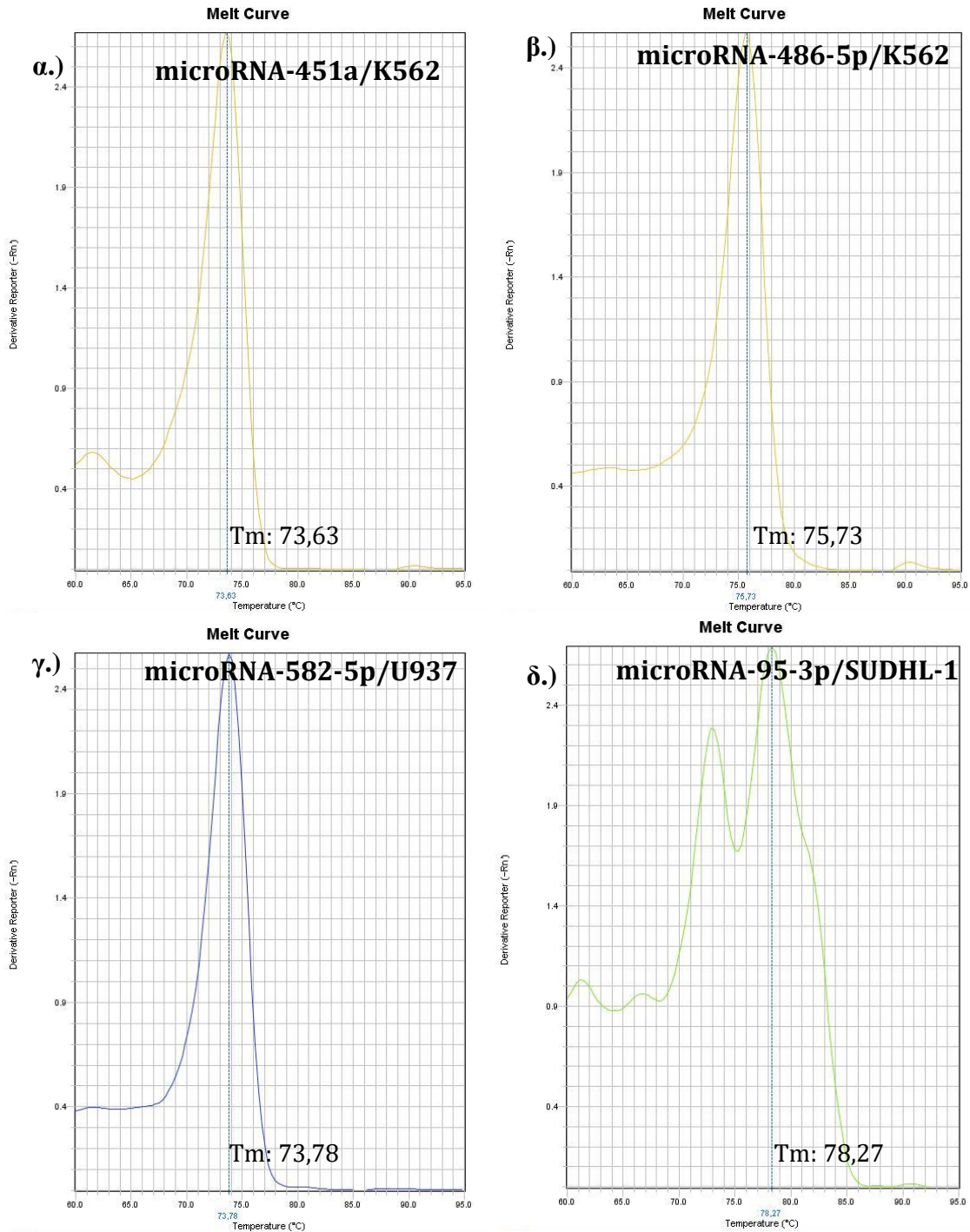


Εικόνα 3.2. Καμπύλες ενίσχυσης για τα *microRNA-582-5p* και *microRNA-95-3p*, για την κυτταρική σειρά στην οποία εμφάνισαν την υψηλότερη και μοναδική έκφραση. Αναγράφονται οι τιμές Ct. Συγκεκριμένα: α.) *microRNA-582-5p* για την κυτταρική σειρά U937, β.) *microRNA-95-3p* για την κυτταρική σειρά SUDHL-1

Πιο συγκεκριμένα, το *microRNA-451a* εμφάνισε Ct=25,17 για την κυτταρική σειρά K562(Εικόνα 3.1.α.), το *microRNA-486-5p* εμφάνισε Ct=22,36 για την κυτταρική σειρά K562(Εικόνα 3.1.β.), το *microRNA-582-5p* εμφάνισε Ct=27,14 για την κυτταρική σειρά U937(Εικόνα 3.2.α.) ενώ το *microRNA-95-3p* εμφάνισε Ct=31,56 για την κυτταρική σειρά SUDHL-1(Εικόνα 3.2.β.).

Προκειμένου να επιβεβαιωθεί η ύπαρξη μοναδικού προϊόντος, και άρα η ειδικότητά τους ως προς τα συγκεκριμένα *microRNAs*, φάνηκαν χρήσιμες οι καμπύλες αποδιάταξης (Melt Curve). Σε τουλάχιστον μία κυτταρική σειρά, τα *microRNA-451a*, *microRNA-486-5p* και *microRNA-582-5p* εμφάνισαν μοναδικό προϊόν, κάτι που έγινε αντιληπτό, λόγω την μοναδικής κορυφής που εμφανιζόταν σε συγκεκριμένη θερμοκρασία τήξεως. Αυτό δηλώνει πως δεν ενισχύθηκαν παραπροϊόντα ή διμερή εκκινητών. Στο *microRNA-95-3p* εμφανίζονταν σε κάθε κυτταρική σειρά παραπάνω από μία κορυφές.

Παρακάτω παρατίθενται οι καμπύλες αποδιάταξης για κάθε *microRNA*, για την κυτταρική σειρά στην οποία εμφάνισε μοναδική έκφραση, με εξαίρεση το *microRNA-95-3p*, όπως αναφέρθηκε(Εικόνα 3.3.).



Εικόνα 3.3. Καμπύλες αποδιάταξης για τα 4 *microRNA*, για την κυτταρική σειρά στην οποία εμφάνισε την υψηλότερη και μοναδική έκφραση (εκτός του *miR-95-3p*). Αναγράφονται τα T_m . Συγκεκριμένα: α.) *microRNA-451a* για την κυτταρική σειρά K562, β.) *microRNA-486-5p* για την κυτταρική σειρά K562, γ.) *microRNA-582-5p* για την κυτταρική σειρά U937, δ.) *microRNA-95-3p* για την κυτταρική σειρά SUDHL-1

Πιο συγκεκριμένα, το *microRNA-451a* εμφάνισε $T_m=73,63$ για την κυτταρική σειρά K562 (Εικόνα 3.3.α.), το *microRNA-486-5p* εμφάνισε $T_m=75,73$ για την κυτταρική σειρά K562 (Εικόνα 3.3.β.), το *microRNA-582-5p* εμφάνισε $T_m=73,78$ για την κυτταρική σειρά

U937(Εικόνα 3.3.γ.) ενώ το microRNA-95-3p εμφάνισε $T_m=78,27$ για την κυτταρική σειρά SUDHL-1(Εικόνα 3.3.δ.).

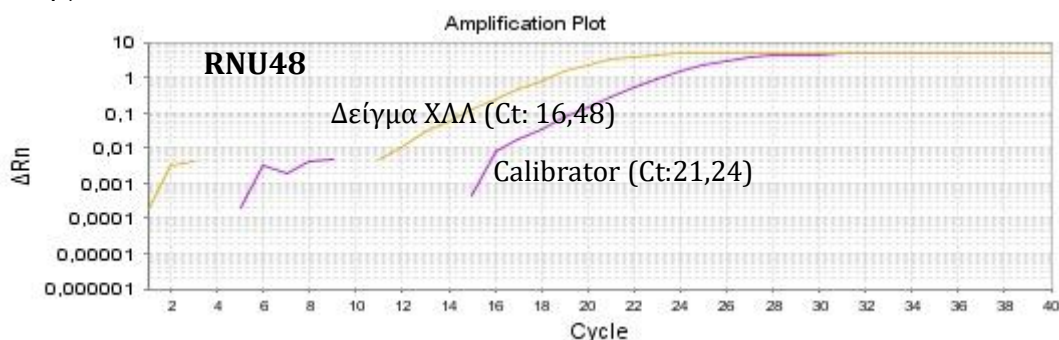
Από τα αποτελέσματα αυτά, λοιπόν, επιβεβαιώθηκε η έκφραση των microRNA-451a, microRNA-486-5p και microRNA-582-5p από τους εκκινητές που σχεδιάστηκαν, και η ειδικότητα τους ως προς αυτά, ως μοναδικά προϊόντα μιας αντίδρασης Real-Time q-PCR. Αντίθετα, με βάση τα συγκεκριμένα αποτελέσματα, επιλέχθηκε να μην συνεχιστεί περαιτέρω η εξέταση της ποσοτικής έκφρασης του microRNA-95-3p σε δείγματα ασθενών με ΧΛΛ, λόγω της χαμηλής ή μηδενικής, αλλά και μη ειδικής έκφρασής του.

3.4. ΠΟΣΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΩΝ microRNA-451a, microRNA-486-5p ΚΑΙ microRNA-582-5p ΣΕ ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ ΧΡΟΝΙΑ ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΛΕΥΧΑΙΜΙΑ

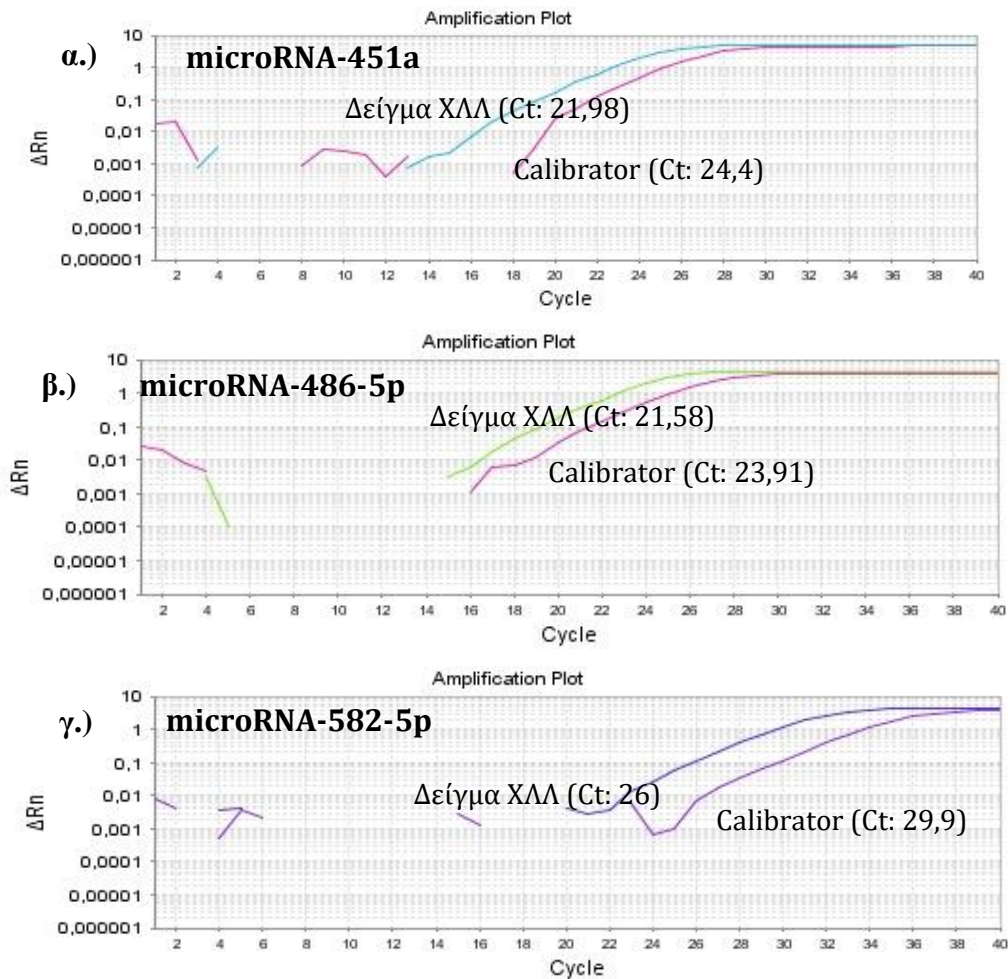
Ύστερα από την επιβεβαίωση της έκφρασης των συγκεκριμένων microRNAs, ακολούθησε ποσοτικός προσδιορισμός της έκφρασης τους στα δείγματα cDNA των 82 ασθενών με Χρόνια Λεμφοκυτταρική Λευχαιμία και 29 υγιών ατόμων με Real-Time PCR, όπως περιγράφεται αναλυτικά στην ενότητα 5.2.5.2 του προηγούμενου κεφαλαίου.

Συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκαν ως γονίδιο αναφοράς το RNU48, και ως βαθμονομητής(Calibrator) ένα pool από cDNA 8 δειγμάτων υγιών ατόμων με υψηλή έκφραση στα συγκεκριμένα microRNAs, ενώ σε κάθε αντίδραση που πραγματοποιήθηκε υπήρχε ένας αρνητικός μάρτυρας (Negative Control).

Από τις καμπύλες ενίσχυσης που προέκυψαν από τη Real-Time PCR για τα συγκεκριμένα δείγματα, συμπεραίνεται ότι τα microRNA-451a, microRNA-486-5p και microRNA-582-5p εκφράζονται σε όλα τα δείγματα ασθενών με ΧΛΛ που εξετάστηκαν, όπως και στα δείγματα υγιών ατόμων αλλά και το pool δειγμάτων που χρησίμευσε ως Calibrator. Παρακάτω παρατίθενται ενδεικτικά οι καμπύλες ενίσχυσης για το RNU48 (Εικόνα 3.4.) και τα microRNA-451a, microRNA-486-5p και microRNA-582-5p (Εικόνα 3.5.) για το cDNA του θετικού μάρτυρα (calibrator) και ενός δείγματος ΧΛΛ με υψηλή έκφραση για το εκάστοτε microRNA.



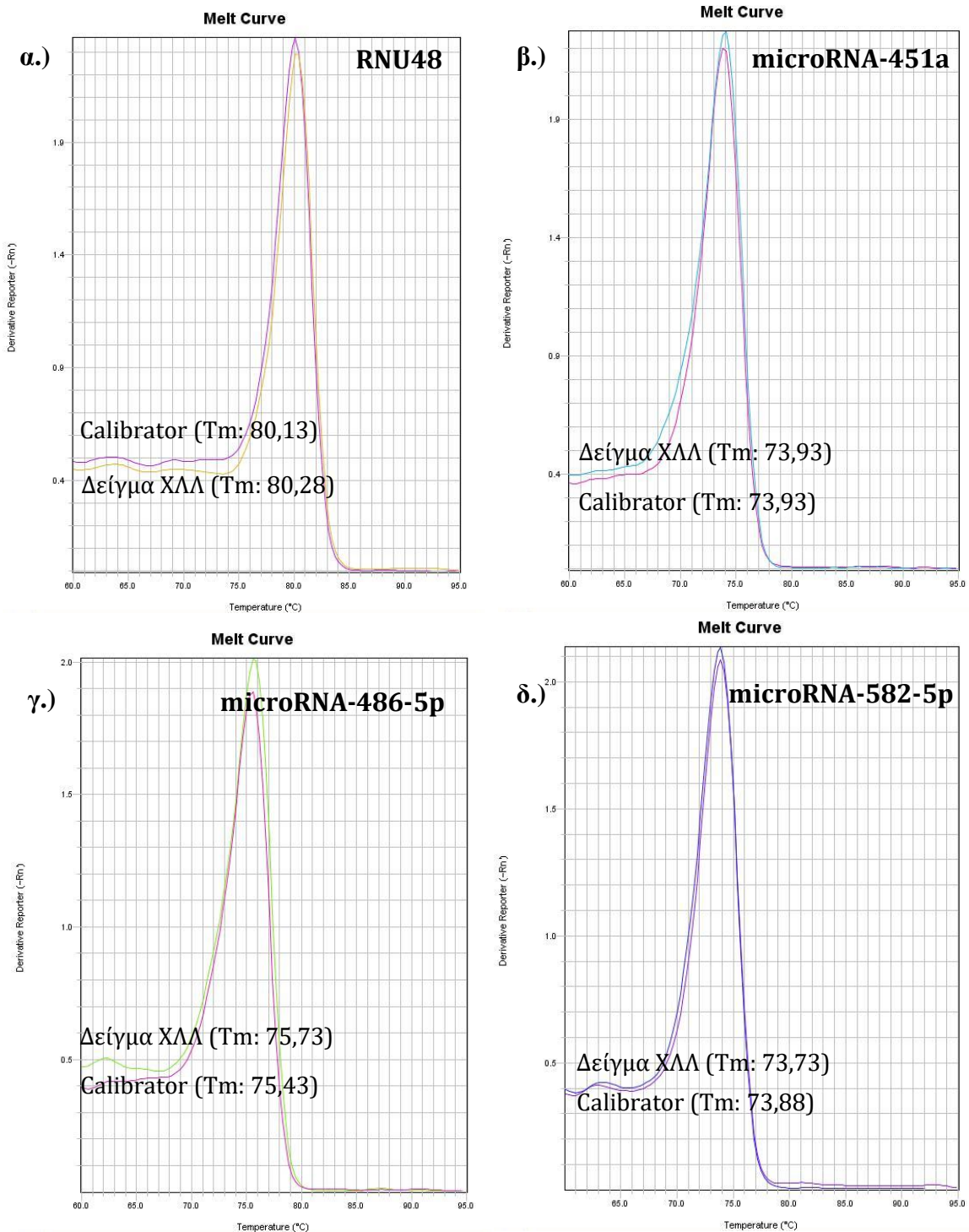
Εικόνα 3.4. Καμπύλες ενίσχυσης για το RNU48, για το cDNA του θετικού μάρτυρα (calibrator) και ενός δείγματος ΧΛΛ. Αναγράφονται οι τιμές Ct. Συγκεκριμένα για το RNU48 το δείγμα ΧΛΛ έχει $Ct=16,48$ και το Calibrator έχει $Ct=21,24$



Εικόνα 3.5. Καμπύλες ενίσχυσης για τα *microRNA-451a*, *microRNA-486-5p* και *microRNA-582-5p*, για το cDNA του θετικού μάρτυρα (calibrator) και ενός δείγματος ΧΛΛ. Αναγράφονται οι τιμές Ct. Συγκεκριμένα: α.) Για το *microRNA-451a* το δείγμα ΧΛΛ έχει Ct=21,98 και το Calibrator έχει Ct=24,4, β.) Για το *microRNA-486-5p* το δείγμα ΧΛΛ έχει Ct=21,58 και το Calibrator έχει Ct=23,91, γ.) Για το *microRNA-582-5p* το δείγμα ΧΛΛ έχει Ct=26 και το Calibrator έχει Ct=29,9

Πιο συγκεκριμένα, τα *microRNA-451a* και *microRNA-486-5p* εμφάνισαν αρκετά χαμηλές τιμές Ct στην πλειοψηφία των δειγμάτων, άρα είχαν υψηλή έκφραση σε αυτά, ενώ το *microRNA-582-5p* εμφάνισε υψηλότερες τιμές Ct σε σχέση με τα προηγούμενα, άρα χαμηλότερη έκφραση. Επιπλέον, το RNU48 εμφάνισε πολύ χαμηλές τιμές Ct για όλα τα δείγματα, κάτι που ήταν αναμενόμενο, ως γονίδιο αναφοράς, ενώ το Calibrator εμφάνισε τιμές Ct, παρόμοιες με εκείνες των υπολοίπων δειγμάτων, για κάθε *microRNA*.

Επιπλέον, για κάθε δείγμα ελέγχθηκαν οι καμπύλες αποδιάταξης τους. Παρακάτω παρατίθενται ενδεικτικά οι καμπύλες αποδιάταξης, για τα *microRNA-451a*, *microRNA-486-5p*, *microRNA-582-5p* και RNU48, για το cDNA του θετικού μάρτυρα (calibrator) και ενός δείγματος ΧΛΛ (Εικόνα 3.6.).



Εικόνα 3.6. Καμπύλες αποδιάταξης για τα για τα *microRNA-451a*, *microRNA-486-5p*, *microRNA-582-5p* και *RNU48*, για το *cDNA* του θετικού μάρτυρα (*calibrator*) και ενός δείγματος ΧΛΛ. Αναγράφονται τα T_m . Συγκεκριμένα: α.) Για το *RNU48* το δείγμα ΧΛΛ έχει $T_m=80,13$ και το *Calibrator* έχει $T_m=80,28$ β.) Για το *microRNA-451a* το δείγμα ΧΛΛ έχει $T_m=73,93$ και το *Calibrator* έχει $T_m=73,93$ γ.) Για το *microRNA-486-5p* το δείγμα ΧΛΛ έχει $T_m=75,73$ και το *Calibrator* έχει $T_m=75,43$ δ.) Για το *microRNA-582-5p* το δείγμα ΧΛΛ έχει $T_m=73,73$ και το *Calibrator* έχει $T_m=73,88$

Από τις καμπύλες αποδιάταξης γίνεται αντιληπτό, ότι για την πλειοψηφία των δειγμάτων, η αντίδραση της Real-Time PCR έδινε μοναδικό προϊόν και για τα τρία microRNAs όπως και το RNU48. Επιπλέον, παρατηρώντας ότι τα Tm στις καμπύλες αποδιάταξης είναι ίδια για κάθε δείγμα, όπως και το Calibrator, σε ένα συγκεκριμένο microRNA, υπήρχε ένα επιπλέον μέσο επιβεβαίωσης πως πρόκειται για το ίδιο προϊόν σε κάθε δείγμα.

Μετά τη συλλογή των αποτελεσμάτων για όλα τα δείγματα υγιών και ασθενών και για όλα τα microRNA και το RNU48, πραγματοποιήθηκε η σχετική ποσοτικοποίηση με τη μέθοδο $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Με τη χρήση των τιμών Ct, έγινε κανονικοποίηση ως προς το πρότυπο δείγμα (Calibrator) και υπολογισμός του ΔCt και στη συνέχεια ως προς το γονίδιο αναφοράς (RNU48) και υπολογισμός του $\Delta\Delta Ct$, για κάθε δείγμα για κάθε microRNA που μελετήθηκε. Τέλος, υπολογίστηκε η τιμή του $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

Ενδεικτικά παρατίθενται οι παρακάτω τιμές για 4 δείγματα ΧΛΛ που μελετήθηκαν:

Πίνακας 3.2. Ενδεικτικός Πίνακας τιμών $\Delta\Delta Ct$ και $2^{-\Delta\Delta Ct}$ για 4 δείγματα ΧΛΛ.

Όνομα Δείγματος	$\Delta\Delta(Ct)_{miR-451a}$	$2^{-\Delta\Delta(Ct)}_{miR-451a}$	$\Delta\Delta(Ct)_{miR-486-5p}$	$2^{-\Delta\Delta(Ct)}_{miR-486-5p}$	$\Delta\Delta(Ct)_{miR-582-5p}$	$2^{-\Delta\Delta(Ct)}_{miR-582-5p}$
6B	1.92	0.263	5.46	0.023	0.18	0.881
7B	0.36	0.778	2.46	0.182	1.71	0.305
9B	2.08	0.237	4.75	0.037	-0.46	1.379
10B	1.44	0.368	3.69	0.078	-1.12	2.179

3.5. ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Τα αποτελέσματα της Real-Time q-PCR, για τα 82 δείγματα ασθενών με Χρόνια Λεμφοκυτταρική Λευχαιμία και τα 29 δείγματα υγιών ατόμων, για τα microRNA-451a, microRNA-486-5p και microRNA-582-5p, υποβλήθηκαν, όπως αναφέρθηκε, σε στατιστική ανάλυση με τη χρήση του προγράμματος SPSS Statistics 25 (Statistical Package for the Social Sciences). Αρχικά, υπολογίστηκαν οι συχνότητες εμφάνισης διαφόρων κλινικοπαθολογικών χαρακτηριστικών στο σύνολο των ασθενών που εξετάστηκαν. Συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε ότι στο σύνολο των ασθενών η πλειοψηφία ήταν άντρες, ενώ σε σχέση με τις μεθόδους σταδιοποίησης, οι περισσότεροι ασθενείς βρίσκονταν στο στάδιο Binet A, στα στάδια Rai 0, I και II και στην ομάδα ενδιάμεσου κινδύνου. Ακόμη, η πλειοψηφία παρουσιάζει φυσιολογικές τιμές LDH, ποσοστό CD38 μικρότερο του 30% και δεν έχει τη χαρακτηριστική μετάλλαξη IGHV. Τέλος, η πλειοψηφία των ασθενών δεν έχει λάβει θεραπεία για τη νόσο.

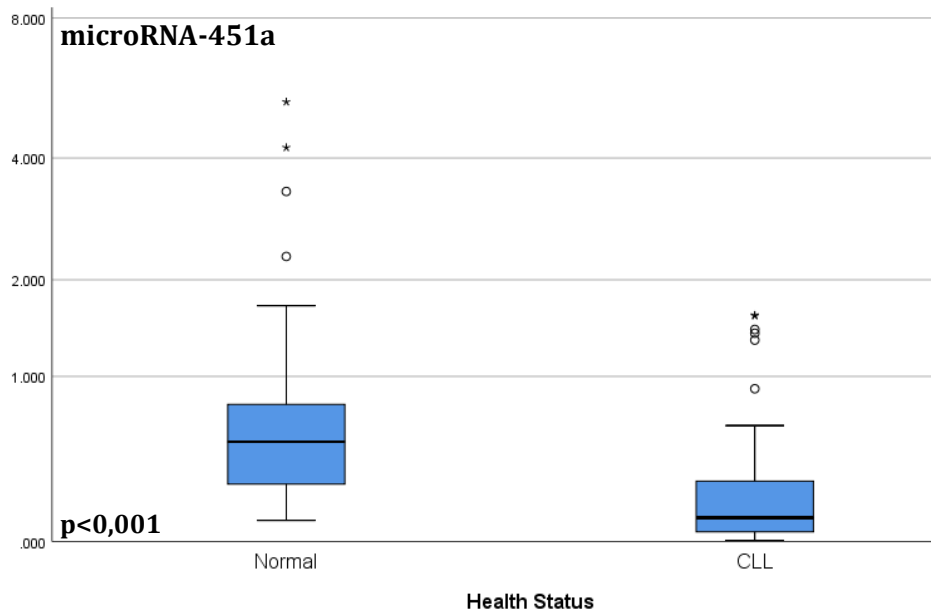
Ακολουθεί, συγκεντρωτικός πίνακας συχνοτήτων για τα κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά των ασθενών με Χρόνια Λεμφοκυτταρική Λευχαιμία(Πίνακας 3.3.).

Πίνακας 3.3. Συγκεντρωτικός πίνακας συχνοτήτων για τα κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά των ασθενών με ΧΛΛ.

Αριθμός Ασθενών με ΧΛΛ	Σύνολο: 82/82(100%)
Φύλο	Άνδρες: 53/82(64.6%)
	Γυναίκες: 29/82(35,4%)
Στάδιο Binet	A: 56/82(68,3%)
	B: 11/82(13,4%)
	C: 15/82(18,3%)
Στάδιο Rai	0: 24/82(29.3%)
	I: 23/82(28.0%)
	II: 20/82(24.4%)
	III: 5/82(6.1%)
	IV: 10/82(12.2%)
Ομάδα Κινδύνου	Χαμηλού: 14/82(17.1%)
	Ενδιάμεσου: 42/82(51.2%)
	Υψηλού: 14/82(17.1%)
LDH	Φυσιολογική: 57/82(69.5%)
	Μη φυσιολογική: 24/82(29.3%)
CD38(%)	<=30%: 67/82(81.7%)
	>30%: 10/82(12.2%)
Κατάσταση Μετάλλαξης IGHV	Με μετάλλαξη: 37/82(45.1%)
	Χωρίς μετάλλαξη: 43/82(52.4%)
Λήψη Θεραπείας	Όχι: 58/82(70.7%)
	Ναι: 24/82(29.3%)

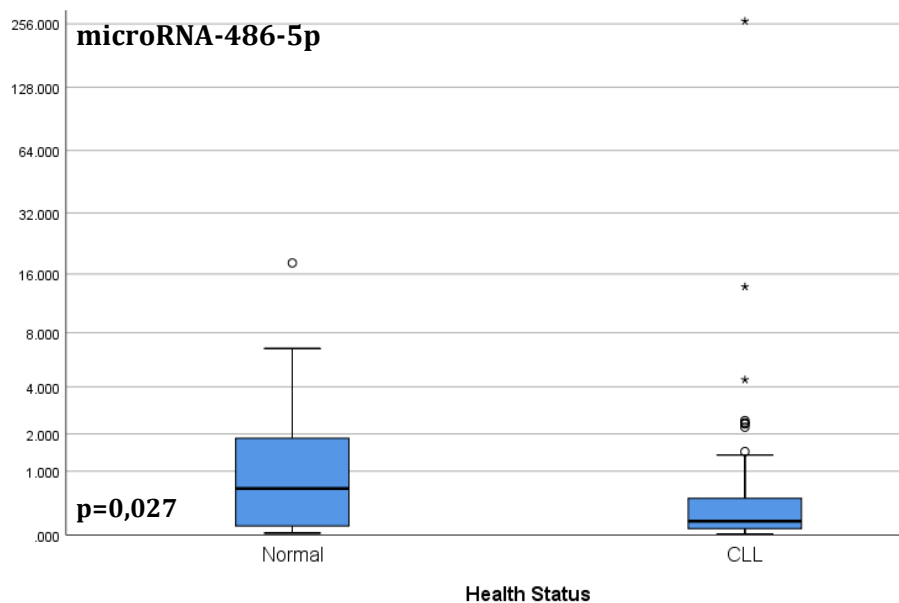
3.5.1. Σύγκριση των επιπέδων έκφρασης των microRNA-451a, microRNA-486-5p και microRNA-582-5p μεταξύ ασθενών με ΧΛΛ και υγιών ατόμων

Κατά την σύγκριση των επιπέδων έκφρασης στα δείγματα των 82 ασθενών με ΧΛΛ και των 29 υγιών ατόμων, παρατηρήθηκε ότι το microRNA-451a, εμφανίζει στατιστικά σημαντικά μειωμένα επίπεδα έκφρασης, σε σχέση με τα υγιή άτομα($p < 0,001$). Τα συγκεκριμένα συμπεράσματα είναι εμφανή και από το παρακάτω διάγραμμα έκφρασης Box-Plot η αλλιώς θηκόγραμμα (Εικόνα 3.7). Ο υπολογισμός του p , έγινε με το μη-παραμετρικό στατιστικό test Mann-Whitney U test.



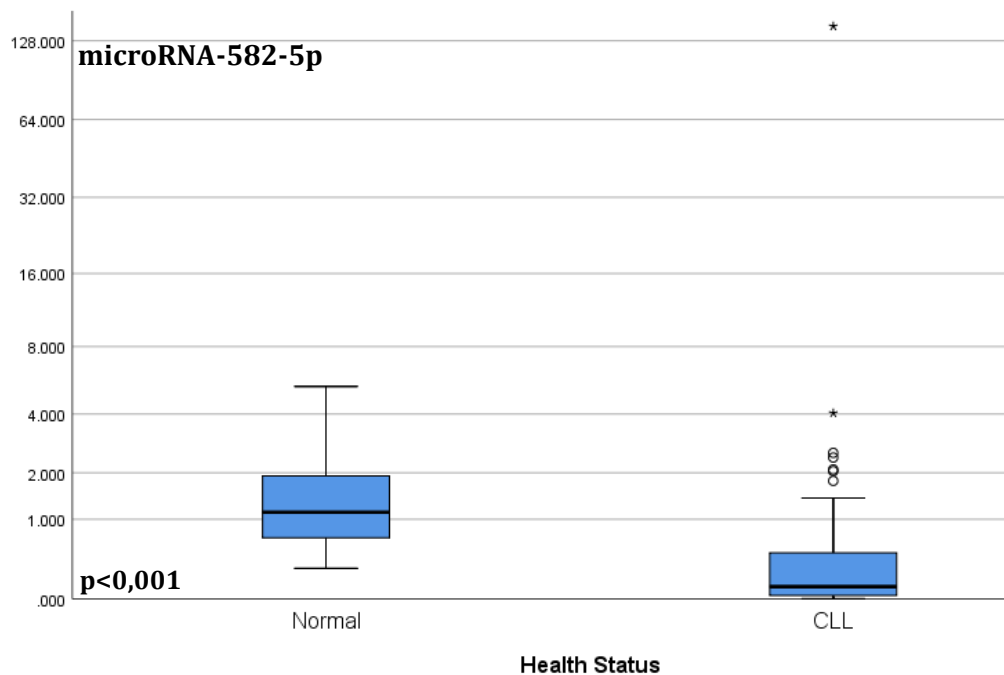
Εικόνα 3.7. Διάγραμμα έκφρασης (Box-Plot) των επιπέδων του *microRNA-451a* σε ασθενείς με ΧΛΛ και υγιή άτομα, $p < 0,001$

Αντίστοιχα, το *microRNA-486-5p*, επίσης εμφανίζει στατιστικά σημαντικά μειωμένα επίπεδα έκφρασης, σε σχέση με τα υγιή άτομα ($p = 0,027$), όπως είναι εμφανές και από το παρακάτω διάγραμμα έκφρασης Box-Plot (Εικόνα 3.8). Ο υπολογισμός του p , έγινε με το μη-παραμετρικό στατιστικό test Mann-Whitney U test.



Εικόνα 3.8. Διάγραμμα έκφρασης (Box-Plot) των επιπέδων του *microRNA-486-5p* σε ασθενείς με ΧΛΛ και υγιή άτομα, $p = 0,027$

Το *microRNA-582-5p*, εμφανίζει, επίσης, στατιστικά σημαντικά μειωμένα επίπεδα έκφρασης, σε σχέση με τα υγιή άτομα ($p < 0,001$). Παρακάτω παρατίθεται το αντίστοιχο διάγραμμα έκφρασης Box-Plot (Εικόνα 3.9). Ο υπολογισμός του p , έγινε με το μη-παραμετρικό στατιστικό test Mann-Whitney U test.



Εικόνα 3.9. Διάγραμμα έκφρασης (Box-Plot) των επιπέδων του *microRNA-582-5p* σε ασθενείς με ΧΛΛ και υγιή άτομα, $p < 0,001$

Το ευθύγραμμο τμήμα που εμφανίζεται μέσα στο ορθογώνιο αντιπροσωπεύει τη διάμεση τιμή (50%), και το κατώτατο και ανώτερο σημείο του ορθογωνίου αντιπροσωπεύει το 1^ο (25%) και 3^ο (75%) τεταρτημόριο, αντίστοιχα. Τα box plots επίσης έχουν γραμμές που εκτείνονται κάθετα από τα ορθογώνια (whiskers), τα οποία δείχνουν τη μεταβλητότητα εκτός του ανώτερου και κατώτερου τεταρτημόριου και τη μέγιστη και ελάχιστη τιμή. Οι ακραίες εξωτερικές τιμές εμφανίζονται ως μεμονωμένα σημεία εκτός των whiskers.

Επιπλέον, πραγματοποιήθηκε η στατιστική διαδικασία της Λογιστικής Παλινδρόμησης (Logistic Regression), κατά την οποία παρατηρήθηκε ότι τα χαμηλά επίπεδα έκφρασης του *MicroRNA-451a*, επιβεβαιώνουν την ύπαρξη νόσου στους ασθενείς με ΧΛΛ ($p = 0,002$) (Πίνακας 3.4.).

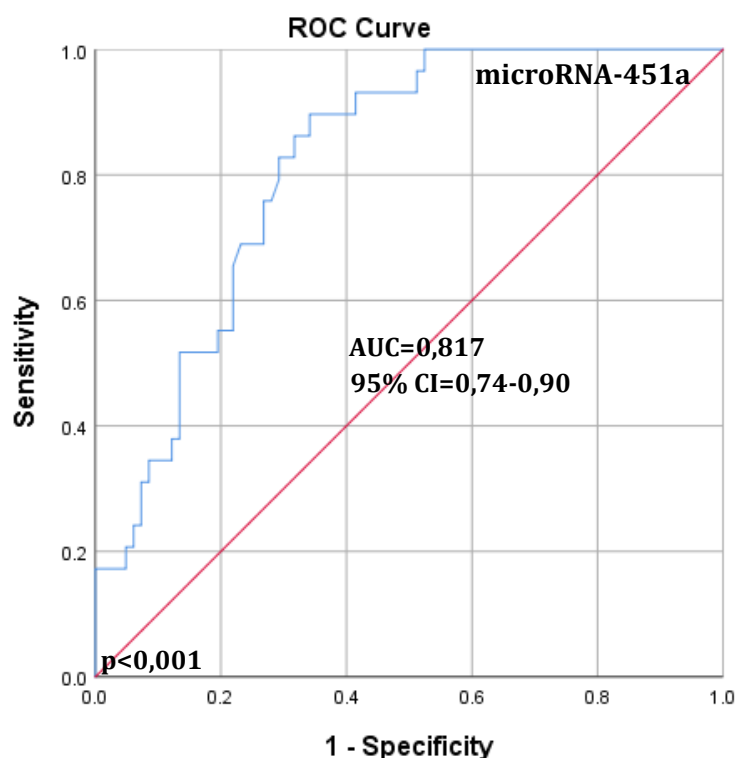
Πίνακας 3.4. Αποτελέσματα της στατιστικής διαδικασίας της Λογιστικής Παλινδρόμησης για τα τρία *MicroRNA*, σε σχέση με την ύπαρξη ή όχι της νόσου ΧΛΛ

Logistic Regression Analysis - Κατάσταση Υγείας			
microRNA	p-value	OR	95% CI
miR-451a	0.002	0.208	0.077 - 0.565
miR-486-5p	0.723	1.005	0.980 - 1.030
miR-582-5p	0.818	1.004	0.968 - 1.042

3.5.2. Καμπύλες ROC για τα microRNA-451a, microRNA-486-5p και microRNA-582-5p

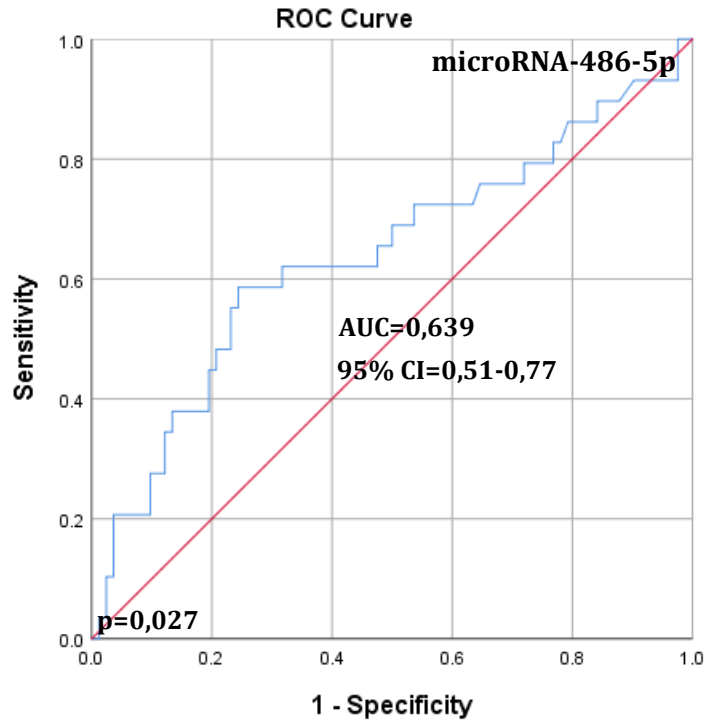
Στα πλαίσια της στατιστικής ανάλυσης που πραγματοποιήθηκε για τα microRNA-451a, microRNA-486-5p και microRNA-582-5p στους ασθενείς με ΧΛΛ, δημιουργήθηκαν καμπύλες σχέσης ευαισθησίας-ειδικότητας ή αλλιώς καμπύλες ROC (Receive Operator Characteristic Curves). Με αυτές τις καμπύλες μπορούμε να αξιολογήσουμε την πιθανή διαγνωστική ικανότητα των συγκεκριμένων microRNAs. Όσο μεγαλύτερο είναι το εμβαδόν κάτω από την καμπύλη (AUC, area under the curve), όσο δηλαδή πλησιάζει τη μονάδα, τόσο μεγαλύτερη είναι η διαγνωστική αξία ενός δείκτη. Οι καμπύλες ROC συσχετίζουν τη "χρυσή" τομή μεταξύ ευαισθησίας (θετικό αποτέλεσμα στους πάσχοντες) και ειδικότητας (αρνητικό αποτέλεσμα στους υγιείς).

Παρακάτω παρατίθενται οι καμπύλες ROC, για τα microRNA-451a, microRNA-486-5p και microRNA-582-5p. Από την καμπύλη ROC για το microRNA-451a, παρατηρείται ότι το συγκεκριμένο microRNA εμφανίζει AUC=0,817 με $p<0,001$, κάτι που δηλώνει πως η διαγνωστική αξία του είναι στατιστικά σημαντική. Επιπλέον εμφανίζει 95%CI=0,74-0,90(Εικόνα 3.10.).



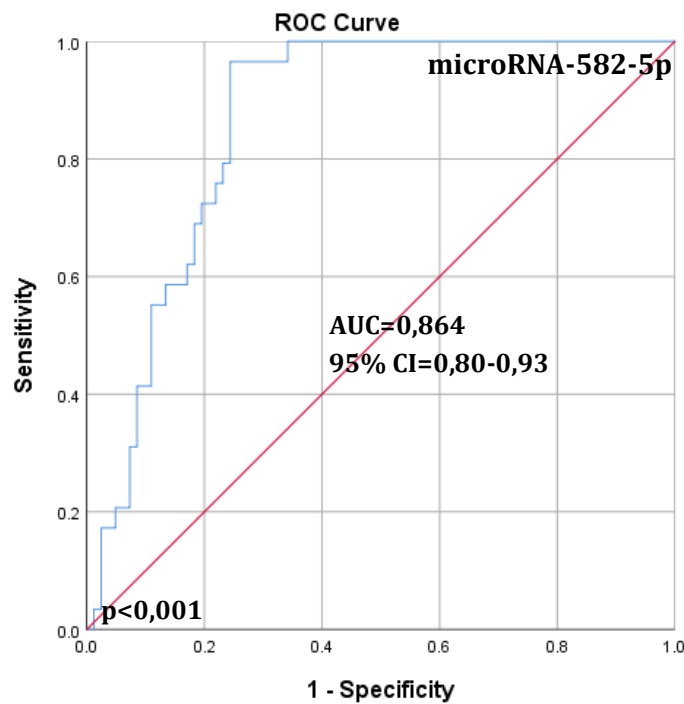
Εικόνα 3.10. Καμπύλη ROC για το microRNA-451a. AUC=0,817/ 95%CI=0,74-0,90/ $p<0,001$

Αντίστοιχα, για το microRNA-486-5p παρατηρείται, ότι εμφανίζει AUC=0,639 με $p=0,027$, που δηλώνει πως η διαγνωστική αξία του είναι επίσης στατιστικά σημαντική. Επιπλέον εμφανίζει 95%CI=0,51-0,77(Εικόνα 3.11.).



Εικόνα 3.11. Καμπύλη ROC για το *microRNA-486-5p*. AUC=0,639/ 95%CI=0,51-0,77/ p=0,027

Τέλος, το *microRNA-582-5p* εμφανίζει AUC=0,864 με $p < 0,001$, δηλώνοντας πως η διαγνωστική αξία του είναι στατιστικά σημαντική. Επιπλέον εμφανίζει 95%CI=0,80-0,93(Εικόνα 3.12.).



Εικόνα 3.12. Καμπύλη ROC για το *microRNA-582-5p*. AUC=0,864/ 95%CI=0,80-0,93/ p<0,001

3.5.3. Σύγκριση των επιπέδων έκφρασης των microRNA-451a, microRNA-486-5p και microRNA-582-5p στους ασθενείς με ΧΛΛ, με τα κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά τους

Στα πλαίσια της παρούσας διπλωματικής εργασίας, πραγματοποιήθηκε συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων έκφρασης των microRNAs που μελετήθηκαν, με τα διάφορα κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά που σχετίζονται με την νόσο της Χρόνιας Λεμφοκυτταρικής Λευχαιμίας. Τα κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά, λοιπόν, που συσχετίστηκαν με τα επίπεδα έκφρασης των συγκεκριμένων microRNAs, ήταν το φύλο, η ηλικία, τα κλινικά στάδια Binet και Rai για την ΧΛΛ, τα λευκά αιμοσφαίρια (WBC), τα λεμφοκύτταρα, το ποσοστό CD38%(< ή >30%), η ανεξίτηνη, η LDH και η ύπαρξη ή όχι της μετάλλαξης IgHV.

- **Μη παραμετρικές συσχετίσεις:**

Πραγματοποιήθηκε το στατιστικό test Spearman Two-Tailed Test, για τα τρία microRNAs σε συσχέτιση με τα διάφορα κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά των ασθενών με ΧΛΛ, συγκεκριμένα με την ηλικία, τα λευκά αιμοσφαίρια(WBC), τα λεμφοκύτταρα, την ανεξίτηνη(%), και το CD38(%), αλλά επίσης και με τα άλλα δύο microRNAs.

Για το microRNA-451a, φαίνεται ότι η συσχέτισή των χαμηλών επιπέδων έκφρασής του, είναι στατιστικά σημαντική με αυξημένες τιμές στα λευκά αιμοσφαίρια ($p=0,006$) και τα λεμφοκύτταρα($p=0,002$), όπως φαίνεται στον Πίνακα 3.5.

Πίνακας 3.5. Αποτελέσματα του στατιστικού test *Spearman Two-Tailed Test* για το *microRNA-451a*.

Spearman Two-Tailed Test - microRNA-451a			
	Συντελεστής Συσχέτισης Spearman	p-value	N
miR-486-5p	0.819	0.000	82
miR-582-5p	0.746	0.000	82
Ηλικία	0.171	0.128	81
WBC	-0.301	0.006	81
Λεμφοκύτταρα	-0.334	0.002	80
Ανεξίτηνη (%)	0.105	0.494	45
CD38 (%)	0.216	0.072	70

Αντίστοιχα, για το microRNA-486-5p, η συσχέτισή των χαμηλών επιπέδων έκφρασής του, είναι επίσης στατιστικά σημαντική με αυξημένες τιμές στα λευκά αιμοσφαίρια($p=0.014$) και τα λεμφοκύτταρα($p=0,003$), όπως φαίνεται από τον Πίνακα 3.6.

Πίνακας 3.6. Αποτελέσματα του στατιστικού τεστ *Spearman Two-Tailed Test* για το *microRNA-486-5p*

Spearman Two-Tailed Test - microRNA-486-5p			
	Συντελεστής Συσχέτισης Spearman	p-value	N
miR-451a	0.819	0.000	82
miR-582-5p	0.772	0.000	82
Ηλικία	0.187	0.095	81
WBC	-0.273	0.014	81
Λεμφοκύτταρα	-0.329	0.003	80
Ανεξίτη (%)	0.208	0.169	45
CD38 (%)	0.203	0.092	70

Για το *microRNA-582-5p*, βρέθηκε ότι η συσχέτιση των χαμηλών επιπέδων έκφρασης του, είναι στατιστικά σημαντική με μεγάλη ηλικία ($p=0.035$), αυξημένες τιμές στα λευκά αιμοσφαίρια ($p<0,001$) και τα λεμφοκύτταρα ($p<0,001$) και χαμηλές τιμές στην ανεξίτη (%) ($p=0,003$). Τα συγκεκριμένα συμπεράσματα φαίνονται στον Πίνακα 3.7.

Πίνακας 3.7. Αποτελέσματα του στατιστικού τεστ *Spearman Two-Tailed Test* για το *microRNA-582-5p*

Spearman Two-Tailed Test - microRNA-582-5p			
	Συντελεστής Συσχέτισης Spearman	p-value	N
miR-451a	0.746	0.000	82
miR-486-5p	0.772	0.000	82
Ηλικία	0.234	0.035	81
WBC	-0.420	0.000	81
Λεμφοκύτταρα	-0.503	0.000	80
Ανεξίτη (%)	0.432	0.003	45
CD38 (%)	0.234	0.051	70

Τα λεμφοκύτταρα, και άρα και τα λευκά αιμοσφαίρια γενικότερα, είναι αυξημένα σε ασθενείς με ΧΛΛ, και μάλιστα ο αυξημένος αριθμός των Β λεμφοκυττάρων αποτελεί διαγνωστικό κριτήριο για την νόσο της ΧΛΛ. Επομένως, παρατηρείται ότι χαμηλά επίπεδα έκφρασης και στα τρία *microRNAs* που μελετήσαμε, συσχετίζονται με το κυριότερο κριτήριο για τη διάγνωση της ΧΛΛ. Επιπλέον, γνωρίζουμε ότι όσο αυξάνεται η ηλικία τόσο μεγαλύτερη είναι η πιθανότητα εμφάνισης της νόσου, άρα το *microRNA-582-5p* συσχετίζεται με έναν επιπλέον παράγοντα που επηρεάζει την εμφάνιση ή όχι της νόσου.

• Πίνακες διπλής εισόδου(Crosstabs) και Chi-Square Test(χ^2)

Τα συγκεκριμένα στατιστικά τεστ πραγματοποιήθηκαν για τη συσχέτιση μεταξύ των υψηλών ή χαμηλών επιπέδων έκφρασης των τριών υπό εξέταση microRNAs με το φύλο, τα κλινικά στάδια Binet και Rai, την LDH, το ποσοστό CD38 και την κατάσταση μετάλλαξης IGHV, στους ασθενείς με ΧΛΛ. Συγκεκριμένα, έγινε κατηγοριοποίηση των επιπέδων έκφρασης των microRNA-451a, microRNA-486-5p και microRNA-582-5p, χρησιμοποιώντας ως βέλτιστο όριο λήψης απόφασης (cut-off) την τιμή της διαμέσου (50^ο τεταρτημόριο). Ως θετικοί, δηλαδή, θεωρήθηκαν οι ασθενείς με επίπεδα έκφρασης υψηλότερα της διαμέσου, για το καθένα από τα τρία microRNAs, ενώ αρνητικοί θεωρήθηκαν εκείνοι, των οποίων τα επίπεδα έκφρασης για τα τρία microRNAs ήταν χαμηλότερα της διαμέσου, για το καθένα από αυτά. Με τον τρόπο αυτό, τα επίπεδα έκφρασης των τριών microRNAs μετατράπηκαν σε κατηγορικές μεταβλητές, οι οποίες μπορούσαν να συσχετισθούν με το παραμετρικό τεστ Chi-Square test (χ^2).

Η συσχέτιση των επιπέδων έκφρασης των τριών microRNA με τη σταδιοποίηση Rai (Πίνακες 3.8 και 3.9), ιδιαίτερα σε σχέση με το microRNA-582-5p, έδειξε πως χαμηλά επίπεδα έκφρασης του microRNA-582-5p, αλλά και των microRNA-451a και microRNA-486-5p, συσχετίζονται με προχωρημένα στάδια στην κλίμακα Rai, δείκτη κακής πρόγνωσης για τη νόσο της ΧΛΛ. Ωστόσο, κανένα από αυτά δεν εμφάνισε στατιστικά σημαντική συσχέτιση.

Πίνακας 3.8. Πίνακας διπλής εισόδου(Crosstab) για τα microRNA-451a, microRNA-486-5p και microRNA-582-5p, σε συσχέτιση με τη σταδιοποίηση Rai

Crosstab - Σταδιοποίηση Rai								
Στάδιο Rai		miR-451a		miR-486-5p		miR-582-5p		Σύνολο
		Αρνητικοί	Θετικοί	Αρνητικοί	Θετικοί	Αρνητικοί	Θετικοί	
0	Αριθμός Ασθενών	8	16	7	17	6	18	24
	Ποσοστό %	33.30%	66.70%	29.20%	70.80%	25.00%	75.00%	100.00%
I	Αριθμός Ασθενών	14	9	15	8	14	9	23
	Ποσοστό %	60.90%	39.10%	65.20%	34.80%	60.90%	39.10%	100.00%
II	Αριθμός Ασθενών	10	10	10	10	11	9	20
	Ποσοστό %	50.00%	50.00%	50.00%	50.00%	55.00%	45.00%	100.00%
III	Αριθμός Ασθενών	2	3	2	3	3	2	5
	Ποσοστό %	40.00%	60.00%	40.00%	60.00%	60.00%	40.00%	100.00%
IV	Αριθμός Ασθενών	7	3	7	3	7	3	10
	Ποσοστό %	70.00%	30.00%	70.00%	30.00%	70.00%	30.00%	100.00%
Σύνολο	Αριθμός Ασθενών	41	41	41	41	41	41	82
	Ποσοστό %	50.00%	50.00%	50.00%	50.00%	50.00%	50.00%	100.00%

Πίνακας 3.9. Αποτελέσματα του στατιστικού τεστ *Chi-Square Test* για τα *microRNA-451a*, *microRNA-486-5p* και *microRNA-582-5p*, σε συσχέτιση με τη Σταδιοποίηση Rai

Chi-Square Test - Σταδιοποίηση Rai		
microRNA	Value	p-value
microRNA-451a	5.554	0.235
microRNA-486-5p	8.097	0.088
microRNA-582-5p	9.087	0.059

Ακόμη, η συσχέτιση των επιπέδων έκφρασης των τριών *microRNAs* με την έκφραση του CD38(30%) (Πίνακες 3.10 και 3.11), ιδιαίτερα σε σχέση με το *microRNA-582-5p*, έδειξε πως χαμηλά επίπεδα έκφρασης του *microRNA-582-5p*, αλλά και των *microRNA-451a* και *microRNA-486-5p*, συσχετίζονται με αυξημένα επίπεδα CD38, δείκτη κακής πρόγνωσης, για τη νόσο της ΧΛΛ. Στατιστικά σημαντικά αποτελέσματα εμφανίστηκαν μόνο για το *microRNA-582-5p* σε σχέση με το CD38($p=0.013$).

Πίνακας 3.10. Πίνακας διπλής εισόδου(*Crosstab*) για τα *microRNA-451a*, *microRNA-486-5p* και *microRNA-582-5p*, σε συσχέτιση με το CD38(30%)

Crosstab - CD38(30%)								
CD38		miR-451a		miR-486-5p		miR-582-5p		Σύνολο
		Αρνητικοί	Θετικοί	Αρνητικοί	Θετικοί	Αρνητικοί	Θετικοί	
<=30%	Αριθμός Ασθενών	34	33	33	34	32	35	67
	Ποσοστό %	50.70%	49.30%	49.30%	50.70%	47.80%	52.20%	100.00%
>30%	Αριθμός Ασθενών	7	3	8	2	9	1	10
	Ποσοστό %	70.00%	30.00%	80.00%	20.00%	90.00%	10.00%	100.00%
Σύνολο	Αριθμός Ασθενών	41	36	41	36	41	36	77
	Ποσοστό %	53.20%	46.80%	53.20%	46.80%	53.20%	46.80%	100.00%

Πίνακας 3.11. Αποτελέσματα του στατιστικού τεστ *Chi-Square Test* για τα *microRNA-451a*, *microRNA-486-5p* και *microRNA-582-5p*, σε συσχέτιση με το CD38(30%)

Chi-Square Test - CD38(30%)		
microRNA	Value	p-value
microRNA-451a	1.296	0.255
microRNA-486-5p	3.304	0.069
microRNA-582-5p	6.236	0.013

- **Εφαρμογή στατιστικού τεστ Jonckheere–Terpstra test**

Το συγκεκριμένο στατιστικό τεστ εφαρμόστηκε για τη συσχέτιση των επιπέδων έκφρασης των τριών microRNAs με τη σταδιοποίηση Binet και Rai, στους ασθενείς με ΧΛΛ. Από τα αποτελέσματα, σημαντική βρέθηκε να είναι η συσχέτιση των microRNAs, με τη σταδιοποίηση Rai, όπου τα αποτελέσματα ήταν στατιστικά σημαντικά για το microRNA-582-5p ($p=0,012$) (Πίνακας 3.12.). Η συσχέτιση των microRNA-451a ($p=0,125$) και microRNA-486-5p ($p=0,079$) με τη σταδιοποίηση Rai δεν βρέθηκε στατιστικά σημαντική.

Πίνακας 3.12. Αποτελέσματα του στατιστικού τεστ Jonckheere–Terpstra test για τα microRNA-451a, microRNA-486-5p και microRNA-582-5p, σε σχέση με το Rai Stage

Jonckheere-Terpstra Test - Σταδιοποίηση Rai					
microRNA	Αριθμός Σταδίων Rai	Αριθμός Δειγμάτων	Observed J-T Statistic	Std. J-T Statistic	p-value
microRNA-451a	5	82	1113.5	-1.533	0.125
microRNA-486-5p	5	82	1090	-1.759	0.079
microRNA-582-5p	5	82	1011	-2.516	0.012

Η συσχέτιση των microRNA-451a ($p=0,549$), microRNA-486-5p ($p=0,328$) και microRNA-582-5p ($p=0,175$), με τη σταδιοποίηση Binet, δεν βρέθηκε στατιστικά σημαντική (Πίνακας 3.13.).

Πίνακας 3.13. Αποτελέσματα του στατιστικού τεστ Jonckheere–Terpstra test για τα microRNA-451a, microRNA-486-5p και microRNA-582-5p, σε σχέση με το Binet Stage

Jonckheere-Terpstra Test - Σταδιοποίηση Binet					
microRNA	Αριθμός Σταδίων Binet	Αριθμός Δειγμάτων	Observed J-T Statistic	Std. J-T Statistic	p-value
microRNA-451a	3	82	757.500	-0.599	0.549
microRNA-486-5p	3	82	724.000	-0.978	0.328
microRNA-582-5p	3	82	690.500	-1.357	0.175

- **Εφαρμογή στατιστικού τεστ Mann-Whitney U test**

Με την εφαρμογή του μη παραμετρικού στατιστικού τεστ Mann-Whitney U test, πραγματοποιήθηκε συσχέτιση των τριών microRNAs, με το CD38 και την κατάσταση μετάλλαξης IGHV. Τα χαμηλά επίπεδα έκφρασης των τριών microRNA βρέθηκε να συσχετίζονται με αυξημένα επίπεδα CD38 (>30%) στους ασθενείς με ΧΛΛ, δείκτη κακής πρόγνωσης για τη ΧΛΛ.

Συγκεκριμένα, η συσχέτιση του microRNA-451a ($p=0,258$) και του microRNA-486-5p ($p=0,071$) με το ποσοστό του CD38 (30%), δεν ήταν στατιστικά σημαντική. Η συσχέτιση του microRNA-582-5p με το CD38, ήταν η μόνη που βρέθηκε στατιστικά σημαντική ($p=0,013$) (Πίνακας 3.14).

Πίνακας 3.14. Αποτελέσματα του στατιστικού τεστ *Mann-Whitney U test* για τα *microRNA-451a*, *microRNA-486-5p* και *microRNA-582-5p*, σε σχέση με το ποσοστό *CD38(30%)*

Mann Whitney U test - CD38(30%)				
microRNA	Mann-Whitney U	Wilcoxon W	Z-score	p-value
microRNA-451a	270.5	325.5	-1.131	0.258
microRNA-486-5p	232	287	-1.806	0.071
microRNA-582-5p	193.5	248.5	-2.481	0.013

Η συσχέτιση των *microRNA-451a*($p=0,364$), *microRNA-486-5p*($p=0,176$) και *microRNA-582-5p*($p=0,364$), με την κατάσταση μετάλλαξης *IGHV*, δεν βρέθηκε στατιστικά σημαντική(Πίνακας 3.15.).

Πίνακας 3.15. Αποτελέσματα του στατιστικού τεστ *Mann-Whitney U test* για τα *microRNA-451a*, *microRNA-486-5p* και *microRNA-582-5p*, σε σχέση με την κατάσταση μετάλλαξης *IGHV*

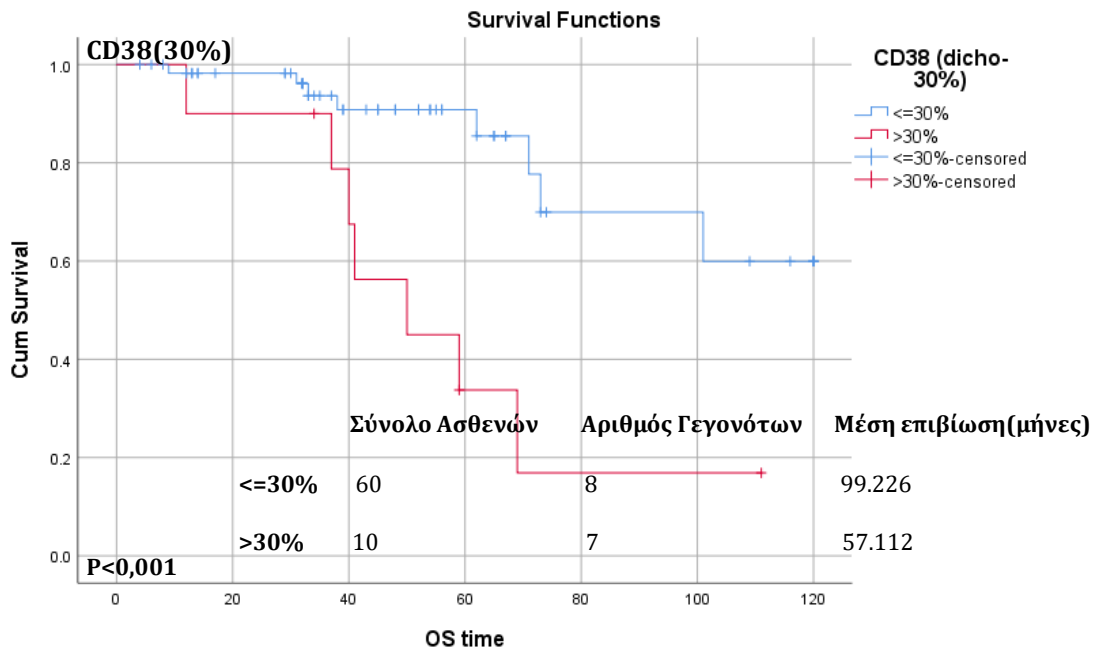
Mann Whitney U test - Κατάσταση Μετάλλαξης IGHV				
microRNA	Mann-Whitney U	Wilcoxon W	Z-score	p-value
microRNA-451a	714	1417	-0.908	0.364
microRNA-486-5p	674	1377	-1.354	0.176
microRNA-582-5p	714	1417	-0.908	0.364

3.5.4. Ανάλυση ολικής επιβίωσης (OS) των ασθενών με ΧΛΛ για τα *microRNA-451a*, *microRNA-486-5p* και *microRNA-582-5p*

3.5.4.1. Ενδεικτικές καμπύλες επιβίωσης *Karlan-Meier*, για διαδεδομένους δείκτες πρόγνωσης της ΧΛΛ

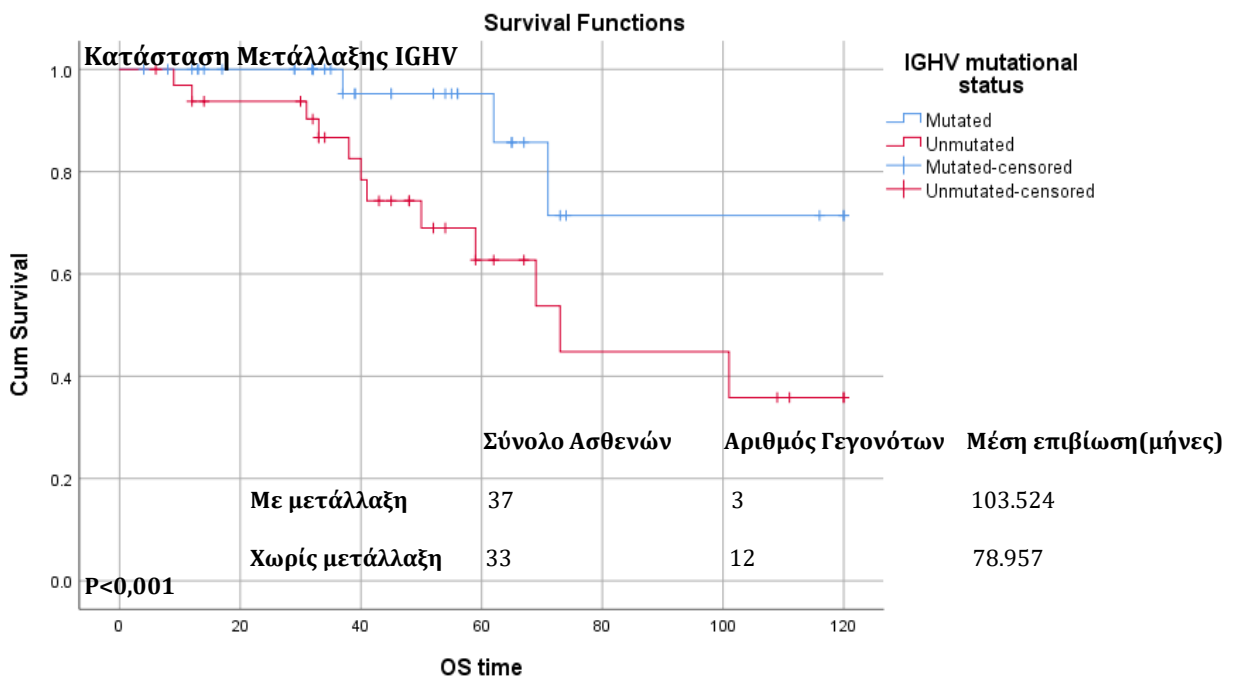
Στα πλαίσια της συγκεκριμένης διπλωματικής εργασίας, δημιουργήθηκαν ενδεικτικά οι καμπύλες επιβίωσης *Karlan-Meier*, για δύο δείκτες πρόγνωσης για την ασθένεια της ΧΛΛ, το *CD38(30%)*(Εικόνα 3.13) και την κατάσταση μετάλλαξης *IGHV*(Εικόνα 3.14.). Οι συγκεκριμένοι δείκτες χρησιμοποιούνται ευρέως στην κλινική πράξη, για την επιλογή της κατάλληλης θεραπείας σε ασθενείς με ΧΛΛ. Από τις καμπύλες επιβεβαιώνεται στατιστικά η προγνωστική αξία των συγκεκριμένων δεικτών($p<0,001$).

Πιο συγκεκριμένα, στο σύνολο 70 ασθενών με ΧΛΛ, οι 60 είχαν ποσοστό *CD38* μικρότερο του 30% με 8 γεγονότα θανάτου και μέση επιβίωση 99,226 μήνες, ενώ 10 ασθενείς είχαν ποσοστό *CD38* μεγαλύτερο του 30%, με 7 γεγονότα θανάτου και μέση επιβίωση 57,112 μήνες.



Εικόνα 3.13. Καμπύλη επιβίωσης Kaplan-Meier για το CD38, σε ασθενείς με ΧΛΛ.

Αντίστοιχα, στο σύνολο 70 ασθενών με ΧΛΛ, οι 37 εμφάνιζαν τη μετάλλαξη IGHV, με 3 γεγονότα θανάτου και μέση επιβίωση 103,524 μήνες ενώ 33 δεν είχαν τη συγκεκριμένη μετάλλαξη, με 12 γεγονότα θανάτου και μέση επιβίωση 78,957 μήνες.

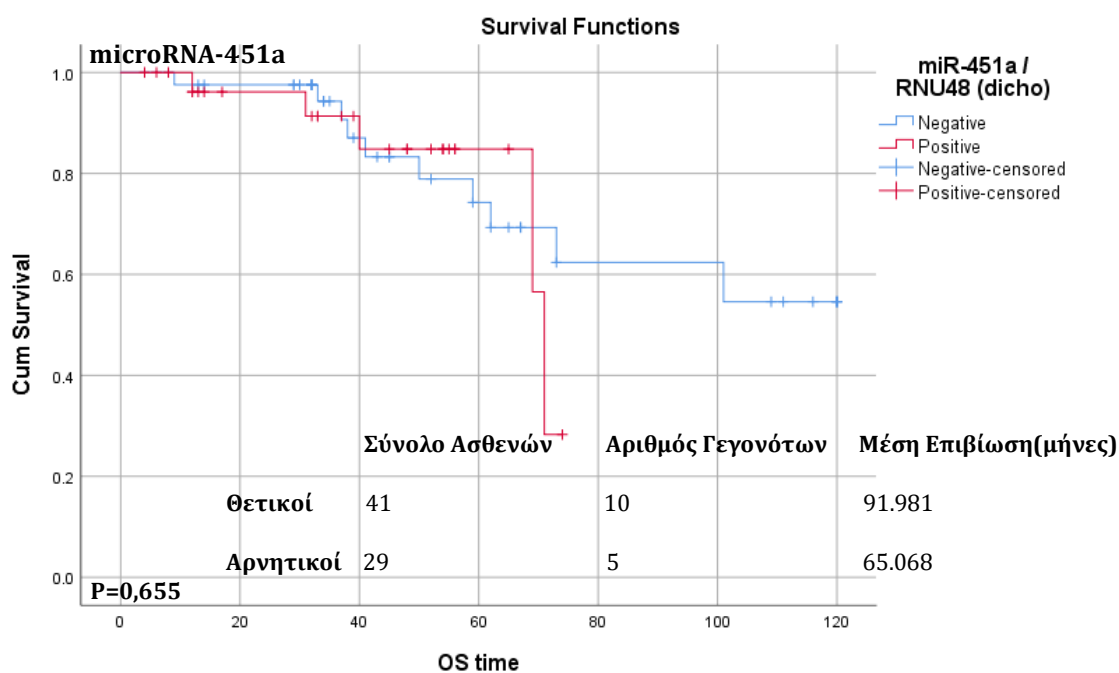


Εικόνα 3.14. Καμπύλη επιβίωσης Kaplan-Meier για την κατάσταση μετάλλαξης IGHV, σε ασθενείς με ΧΛΛ.

3.5.4.2. Καμπύλες ολικής επιβίωσης Kaplan-Meier για τα microRNA-451a, microRNA-486-5p και microRNA-582-5p

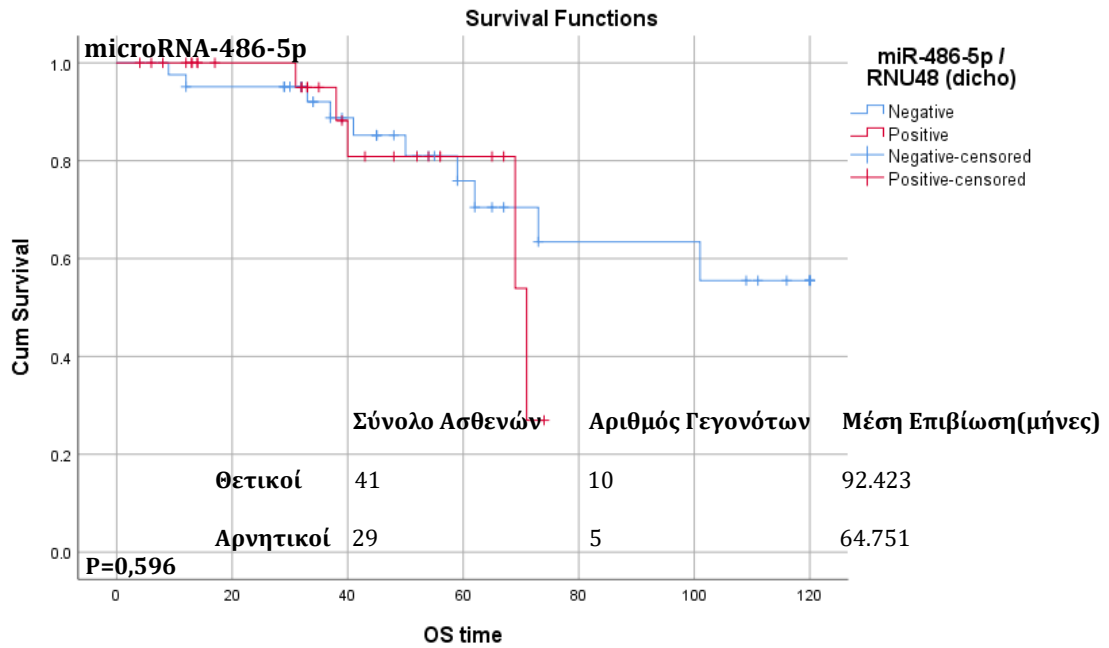
Στα πλαίσια της στατιστικής ανάλυσης που πραγματοποιήθηκε για τη συγκεκριμένη διπλωματική εργασία, δημιουργήθηκαν καμπύλες ολικής επιβίωσης Kaplan-Meier για κάθε microRNA, ορίζοντας ένα βέλτιστο όριο cut-off. Οι καμπύλες Kaplan-Meier παρατίθενται παρακάτω (Εικόνα 3.15 - Εικόνα 3.17.). Το p value υπολογίστηκε με το “log-rank test”. Οι συγκεκριμένες καμπύλες έδειξαν ότι και στα τρία microRNAs, οι θετικοί, δηλαδή με υψηλά επίπεδα έκφρασης, και αρνητικοί, δηλαδή με χαμηλά επίπεδα έκφρασης ασθενείς (σύμφωνα με το όριο cut-off), δεν φαίνεται να εμφανίζουν ουσιαστική διαφορά, μη δίνοντας στατιστικά σημαντικά αποτελέσματα σχετικά με την ολική επιβίωση ($p > 0,05$).

Πιο συγκεκριμένα, για το microRNA-451a, από τους 70 ασθενείς με ΧΛΛ, οι 41 είχαν υψηλά επίπεδα έκφρασης, από τους οποίους 10 αποτελούσαν γεγονότα θανάτου με μέση επιβίωση 91,981 μήνες. Αντίθετα, οι υπόλοιποι 29 είχαν χαμηλά επίπεδα έκφρασης με 5 γεγονότα θανάτου και μέση επιβίωση 65,068 μήνες. Η συγκεκριμένη ανάλυση ολικής επιβίωσης δεν βρέθηκε στατιστικά σημαντική ($p = 0,655$) (Εικόνα 3.15.).



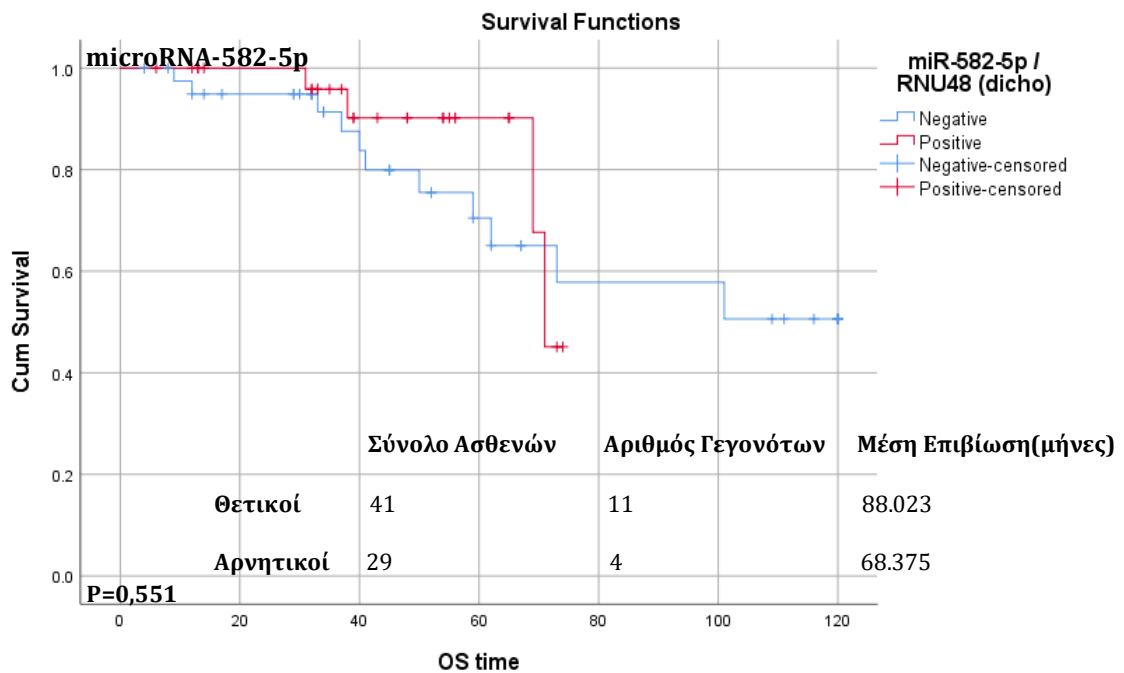
Εικόνα 3.15. Καμπύλη επιβίωσης Kaplan-Meier για το microRNA-451a, σε ασθενείς με ΧΛΛ.

Αντίστοιχα, για το microRNA-486-5p, στους 70 ασθενείς με ΧΛΛ, οι 41 είχαν υψηλά επίπεδα έκφρασης, από τους οποίους 10 αποτελούσαν γεγονότα θανάτου με μέση επιβίωση 92,423 μήνες, ενώ οι υπόλοιποι 29 είχαν χαμηλά επίπεδα έκφρασης με 5 γεγονότα θανάτου και μέση επιβίωση 64,751 μήνες. Από την συγκεκριμένη ανάλυση ολικής επιβίωσης, επίσης δεν προέκυψε κάποιο στατιστικά σημαντικό αποτέλεσμα ($p = 0,596$) (Εικόνα 3.16.).



Εικόνα 3.16. Καμπύλη επιβίωσης Kaplan-Meier για το *microRNA-486-5p*, σε ασθενείς με ΧΛΛ.

Για το *microRNA-582-5p*, όπως και στα προηγούμενα δύο *microRNAs*, οι 41 από τους 70 ασθενείς με ΧΛΛ, είχαν υψηλά επίπεδα έκφρασης. Από αυτούς, 11 αποτελούσαν γεγονότα θανάτου με μέση επιβίωση 88,023 μήνες. Οι υπόλοιποι 29 είχαν χαμηλά επίπεδα έκφρασης με 4 γεγονότα θανάτου και μέση επιβίωση 68,375 μήνες. Και αυτή η συγκεκριμένη ανάλυση ολικής επιβίωσης, δεν βρέθηκε στατιστικά σημαντική ($p=0,551$)(Εικόνα 3.17.).



Εικόνα 3.17. Καμπύλη επιβίωσης Kaplan-Meier για το *microRNA-582-5p*, σε ασθενείς με ΧΛΛ.

Επιπλέον, πραγματοποιήθηκε Ανάλυση Παλινδρόμησης κατά Cox (Cox regression analysis), από την οποία φαίνεται πως οι ασθενείς με χαμηλά επίπεδα έκφρασης στα συγκεκριμένα microRNAs, έχουν μεγαλύτερη πιθανότητα να πεθάνουν από τη νόσο(Πίνακας 3.16). Ακόμη, σε ένα πολυπαραγοντικό σύστημα, τα συγκεκριμένα microRNAs, δεν φαίνεται να μπορούν να συνδυαστούν με άλλες παραμέτρους, σχετικές με πρόγνωση της ΧΛΛ.

Πίνακας 3.16. Αποτελέσματα της μονοπαραγοντικής Ανάλυση Παλινδρόμησης κατά Cox, για τα *microRNA-451a*, *microRNA-486-5p* και *microRNA-582-5p*, σε συσχέτιση με την ολική επιβίωση(O.S.)

Univariate Cox Regression Analysis - Ολική Επιβίωση (O.S.)			
microRNA	p-value	HR	95.0% CI
microRNA-451a	0.60	0.56	0.064-4.871
microRNA-486-5p	0.75	0.83	0.267-2.587
microRNA-582-5p	0.47	0.47	0.06-3.66

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ - ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η Χρόνια Λεμφοκυτταρική Λευχαιμία είναι μία κακοήθης λεμφοπολλαπλασιαστική διαταραχή που χαρακτηρίζεται από τον ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό και τη συσσώρευση των Β λεμφοκυττάρων στο περιφερικό αίμα, το μυελό των οστών, τους δευτερεύοντες λεμφοειδείς ιστούς και τη σπλήνα. Αποτελεί την πιο κοινή μορφή λευχαιμίας σε ενήλικα άτομα στις δυτικές χώρες. Στα πρώτα στάδια της νόσου, οι ασθενείς συχνά δεν παρουσιάζουν συμπτώματα, και δεν απαιτείται θεραπεία. Σε προχωρημένα στάδια, ωστόσο, υπάρχει αυξημένος κίνδυνος σχετικά με την ποιότητα ζωής των ασθενών, αλλά και με την πιθανότητα θανάτου, και απαιτείται θεραπευτική παρέμβαση.

Οι περισσότερες περιπτώσεις ασθενών με Χρόνια Λεμφοκυτταρική Λευχαιμία στις δυτικές χώρες διαγιγνώσκονται με βάση την ανάλυση αίματος ρουτίνας σε ασυμπτωματικά άτομα. Συγκεκριμένα, η ασθένεια εντοπίζεται εξαιτίας του αυξημένου αριθμού των λεμφοκυττάρων στις εξετάσεις αίματος, δηλαδή όταν υπάρχει παρουσία τουλάχιστον $5 \times 10^9 / L$ Β-λεμφοκυττάρων στο περιφερικό αίμα. Λιγότερο συχνά, λεμφαδενοπάθεια, σπληνομεγαλία, αναιμία ή θρομβοπενία είναι πιθανό να οδηγήσουν σε διάγνωση της ΧΛΛ.

Επιπλέον, ο ανοσοφαινότυπος του περιφερικού αίματος, που ανιχνεύεται με Κυτταρομετρίας Ροής, απαιτείται για να επιβεβαιωθεί η διάγνωση της Χρόνιας Λεμφοκυτταρικής Λευχαιμίας, σε οποιαδήποτε περίπτωση άγνωστης λεμφοκυττάρωσης. Τα κύτταρα της Χρόνιας Λεμφοκυτταρικής Λευχαιμίας εκφράζουν Β-κυτταρικούς δείκτες, όπως το CD19 και η, μαζί με χαμηλά επίπεδα CD20, CD79b και ανοσοσφαιρίνης επιφανείας, και είναι θετικά για CD5 και CD23 και συνήθως αρνητικά για το FMC7. Η χρήση αυτών των δεικτών είναι απαραίτητη για τη διαφορική διάγνωση από άλλες λεμφοπολλαπλασιαστικές διαταραχές των Β-κυττάρων.

Σε ότι αφορά την πρόγνωση της Χρόνιας Λεμφοκυτταρικής Λευχαιμίας, τη βασικότερη μορφή πρόγνωσης αποτελούν τα συστήματα σταδιοποίησης, τα οποία αυτή τη στιγμή εφαρμόζονται για τον προσδιορισμό της βαρύτητας της νόσου, αλλά και ως ένδειξη για την επιλογή της κατάλληλης θεραπείας των ασθενών με ΧΛΛ. Αυτά είναι τα συστήματα Rai και Binet. Με βάση αυτά γίνεται η επιλογή της κατάλληλης θεραπείας, συνήθως. Τα αρχικά στάδια σε αυτά τα συστήματα, συνεπάγονται, συνήθως, μεγαλύτερη ολική επιβίωση, δηλαδή καλύτερη πρόγνωση.

Πέρα από τα συστήματα σταδιοποίησης Rai και Binet, σημαντικοί δείκτες πρόγνωσης της ΧΛΛ, είναι ορισμένοι γενετικοί προγνωστικοί παράγοντες. Συγκεκριμένα, το ρόλο αυτό παίζουν οι κυτταρογενετικές αλλοιώσεις που μπορούν να εντοπιστούν με φθορίζων in situ υβριδισμό (FISH) ενδιάμεσης φάσης σε περισσότερο από το 80% όλων των περιπτώσεων ΧΛΛ. Οι πιο κοινές είναι οι διαγραφές που βρίσκονται στον μακρύ βραχίονα του χρωμοσώματος 13 (del(13q14.1)) ή στο βραχίονα του χρωμοσώματος 17 (del(17p)), αλλά και συχνές χρωμοσωμικές ανωμαλίες όπως η τρισωμία του χρωμοσώματος 12, και διαγραφές στον μακρύ βραχίονα των χρωμοσωμάτων 11 (del(11q)) ή 6 (del(6q)). Οι ασθενείς που τα κύτταρα λευχαιμίας τους εμφανίζουν την διαγραφή del(17p), έχουν δυσμενή πρόγνωση, ενώ ακόμη παρουσιάζουν σχετική ανθεκτικότητα σε πρότυπα θεραπευτικά σχήματα χημειοθεραπείας, όπως είναι τα αλκυλιωτικά φάρμακα και / ή τα ανάλογα πουρινών.

Επιπλέον, υπάρχουν αρκετοί σημαντικοί μοριακοί προγνωστικοί παράγοντες. Ένας από τους σημαντικότερους είναι η κατάσταση μετάλλαξης IGHV, που προκύπτει από μεταλλάξεις του γονιδίου VH, και έχει αναγνωρισθεί ως ένας πολύ σημαντικός προγνωστικός δείκτης στη ΧΛΛ. Η κατάσταση μετάλλαξης IGHV θεωρείται ως μία σημαντική παράμετρος για τον προσδιορισμό του τύπου της θεραπείας. Σημαντικός

προγνωστικός δείκτης είναι και η CD38, μια διαμεμβρανική γλυκοπρωτεΐνη η οποία εκφράζεται σε διάφορα αιμοποιητικά κύτταρα, συμπεριλαμβανομένων των φυσιολογικών Β-κυττάρων. Το βέλτιστο όριο cutoff, για τον καθορισμό της υπερέκφρασης της CD38 εξακολουθεί να είναι αμφιλεγόμενο, αλλά η μεγάλη πλειοψηφία των μελετών το καθορίζει έως 20-30%. Η υπερέκφραση του CD38 έχει συσχετιστεί με προχωρημένο στάδιο της νόσου, δυσμενή καρυότυπο, σύντομο χρονικό διάστημα από τη χορήγηση της πρώτης θεραπείας και κατώτερη ελεύθερη εξέλιξης επιβίωση (PFS) και ολική επιβίωση (OS). Άλλοι προγνωστικοί μοριακοί δείκτες είναι το γονίδιο ZAP-70, αλλά και πληθώρα σωματικών μεταλλάξεων, οι οποίες έγιναν γνωστές με την έλευση του NGS και μπορούν να χρησιμεύσουν στην πρόγνωση της νόσου σε ασθενείς με ΧΛΛ, όπως είναι τα NOTCH1 και TP53. Συχνά, ο συνδυασμός κλινικών, μοριακών και γενετικών μεταβλητών μπορεί να δώσει σημαντικά συμπεράσματα.

Ένα από τα προβλήματα στην θεραπευτική αντιμετώπιση της νόσου σε προχωρημένα στάδια, είναι η επιλογή της κατάλληλης θεραπείας, ώστε να δράσει αποτελεσματικά για τον εκάστοτε ασθενή. Δεν υπάρχουν συγκεκριμένες οδηγίες σχετικά με την επιλογή της κατάλληλης θεραπείας, και ένας από τους λόγους είναι ότι αφορά άτομα μεγάλων ηλικιών. Οι προγνωστικοί παράγοντες μπορούν να βοηθήσουν να γίνει διαχωρισμός των ασθενών που απαιτούν θεραπεία σύντομα μετά τη διάγνωση, και περιλαμβάνουν συγκεκριμένα κλινικά στοιχεία, αλλά και γενετικά, μοριακά και βιοχημικά χαρακτηριστικά των κυττάρων της ΧΛΛ. Ακόμη, η προχωρημένη ηλικία του ασθενούς, άνω των 65 ετών, η παρουσία ιατρικής συννοσηρότητας και οι στόχοι της θεραπείας, έχουν ουσιαστική σημασία για την επιλογή της θεραπείας.

Δυστυχώς, ο ακριβής μοριακός μηχανισμός που υποδεικνύει την ανάπτυξη της ΧΛΛ παραμένει ασαφής, κάτι το οποίο περιορίζει την πρόωρη διάγνωση και, επακόλουθα έγκαιρη χορήγηση θεραπείας. Βασικοί στόχοι, λοιπόν, στην έρευνα για τη Χρόνια Λεμφοκυτταρική Λευχαιμία σήμερα, αποτελούν η εύρεση δεικτών που θα επιτρέπουν την όσο το δυνατόν πιο έγκαιρη διάγνωση της ασθένειας, και δεικτών που θα επιτρέπουν την εκτίμηση της πορείας της νόσου για κάθε ασθενή, και επακόλουθα την επιλογή της κατάλληλης θεραπείας, με βάση αυτή.

Τα microRNAs είναι ενδογενή μη κωδικά μικρά μόρια RNA που έχουν αρκετούς σημαντικούς ρυθμιστικούς ρόλους και λειτουργίες στα κύτταρα, μπορούν να επηρεάσουν μια ποικιλία βιολογικών διεργασιών και μονοπατιών. Δρουν ως ρυθμιστές γονιδίων (gene regulators), οι λειτουργίες των οποίων διαμεσολαβούνται από την καταστολή της μετάφρασης ή την αποικοδόμηση του mRNA, μέσω δέσμευσης miRNAs σε θέσεις στόχους στις 3'-αμετάφραστες περιοχές πρωτεϊνικών μεταγραφών. Οι πρώτες μελέτες των microRNA και της παρεμβολής RNA (RNA interference), έδειξαν ότι ο βαθμός συμπληρωματικότητας αλληλουχίας μεταξύ του microRNA και του mRNA-στόχου καθορίζει εάν το mRNA στόχος αποικοδομείται ή καταστέλλεται η μετάφρασή του σε πρωτεΐνη. Η κατανόηση της λειτουργίας των miRNAs στην ογκογένεση μπορεί να δώσει πληροφορίες για τα βασικά ερωτήματα που ακόμη υπάρχουν στην έρευνα για τον καρκίνο.

Όλο και περισσότερα στοιχεία υποδηλώνουν ότι μεγάλων αριθμός microRNAs στην παθογένεια της ΧΛΛ. Στην ΧΛΛ, τα microRNAs μπορούν να λειτουργήσουν ως ογκογονίδια ή ογκοκατασταλτικά γονίδια. Επιπλέον, πολλαπλές ενδείξεις έχουν δείξει ότι η έκφραση ενός συνόλου miRNAs σχετίζεται με την ανταπόκριση στη θεραπεία σε ασθενείς με ΧΛΛ. Ως εκ τούτου, αυτά τα μόρια θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ως διαγνωστικοί και θεραπευτικοί βιοδείκτες για την εμφάνιση ή εξέλιξη της ΧΛΛ. Τα miR-15/16, miR-34b/c, miR-29, miR-181b, miR-17/92, miR-150, miR-21, miR-181 και miR-192 και τα μέλη της οικογένειας miR-155, βρέθηκαν να ρυθμίζουν σημαντικά γονίδια που εμπλέκονται στην

παθογένεση της ΧΛΛ, συμβάλλοντας στην αποσαφήνιση των μοριακών βημάτων της έναρξης και προόδου της νόσου.

Για την παρούσα διπλωματική εργασία, έγινε μελέτη σε διάφορες επιστημονικές δημοσιεύσεις σχετικές με τη χρόνια λεμφοκυτταρική λευχαιμία. Μεταξύ άλλων, ελήφθη υπ' όψη μία μελέτη των Gao C., et al., που δημοσιεύθηκε το 2019 (Identification of key candidate genes and miRNA-mRNA target pairs in chronic lymphocytic leukemia by integrated bioinformatics[94]) ένας από τους σκοπούς της οποίας ήταν η αναγνώριση βιοδεικτών για την έγκαιρη διάγνωση και την επιλογή της κατάλληλης θεραπείας της χρόνιας λεμφοκυτταρικής λευχαιμίας. Στη συγκεκριμένη δημοσίευση, έγινε χρήση δεδομένων microarrays σχετικά με την έκφραση microRNAs σε ασθενείς με ΧΛΛ, από βάση δεδομένων για microRNAs, και ανάλυση τους με εισαγωγή τους σε εξειδικευμένα εργαλεία βιοπληροφορικής ανάλυσης, ώστε να βρεθούν, μεταξύ άλλων, microRNAs που εκφράζονται διαφορετικά σε ασθενείς με ΧΛΛ, σε σχέση με υγιή άτομα. Θεωρήθηκε, λοιπόν, ότι θα ήταν σημαντικό να γίνει ανάλυση ορισμένων microRNAs από αυτά, σε δείγματα ασθενών με ΧΛΛ με άλλες μεθόδους, όπως η Real-Time PCR, με τις οποίες δεν έχουν μελετηθεί στο παρελθόν, ώστε να επιβεβαιωθεί το συμπέρασμα που προκύπτει από την συγκεκριμένη δημοσίευση.

Στα πλαίσια αυτής της διπλωματικής εργασίας, λοιπόν, και με βάση τα παραπάνω θεωρήθηκε σημαντικό να μελετηθούν τα εξής: ο ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός των επιπέδων έκφρασης των microRNA-451a, microRNA-486-5p και microRNA-582-5p σε ασθενείς με Χρόνια Λεμφοκυτταρική Λευχαιμία, μέσω της διαδικασίας της Real-Time q-PCR, η επιβεβαίωση ή όχι της συσχέτισης τους με υπερέκφραση ή υποέκφραση, σε σχέση με υγιή άτομα, αλλά και μεταξύ των ασθενών, σε σύγκριση με την ολική επιβίωση, και τα διάφορα κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά τους και, εν τέλει, η εκτίμηση της πιθανής κλινικής σημασίας των συγκεκριμένων microRNAs ως διαγνωστικοί ή προγνωστικοί βιοδείκτες.

Ακολούθησε μία σειρά μεθόδων, με πρώτη το διαχωρισμό των μονοπύρηνων κυττάρων περιφερικού αίματος (PBMCs) με Ficoll από 82 δείγματα περιφερικού αίματος ασθενών με Χρόνια Λεμφοκυτταρική Λευχαιμία και 29 Υγιών Ατόμων, η οποία πραγματοποιήθηκε στο Πανεπιστημιακό Γενικό Νοσοκομείο «Αττικών» με τη βοήθεια και τη συνεργασία του επιμελητή Ιατρού Αιματολόγου κ. Παπαγεωργίου και της συνεργάτιδάς του κ. Φρίντας Κοντσιώτη. Στην πορεία ακολούθησε απομόνωση ολικού RNA από τα κύτταρα αυτά, με τη χρήση TRI REAGENT και φασματοφωτομετρικός προσδιορισμός της συγκέντρωσης του απομονωμένου Ολικού RNA.

Στη συνέχεια έγινε σχεδιασμός εκκινητών για τα microRNA 451a, 486-5p, 582-5p και 95-3p που αποφασίστηκε να μελετηθούν, αλλά αποφασίστηκε η πορεία των πειραμάτων να συνεχιστεί για τα microRNA 451a, 486-5p και 582-5p, επειδή τα δοκιμαστικά πειράματα με τον εκκινητή του microRNA-95-3p, δεν εμφάνισαν μοναδικό προϊόν ούτε επιθυμητές τιμές Ct. Ακολούθησε σύνθεση cDNA, από το RNA που είχε απομονωθεί, με τη διαδικασία της PCR Αντίστροφης Μεταγραφής με ένα αρχικό στάδιο Πολυαδενυλίωσης (PAP RT-PCR). Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός των επιπέδων έκφρασης των συγκεκριμένων microRNA στα δείγματα αυτά με την διαδικασία της PCR Πραγματικού Χρόνου (Real-Time qPCR). Από τις καμπύλες ενίσχυσης και αποδιάταξης που προέκυψαν από τη Real-Time PCR για τα συγκεκριμένα δείγματα, βγήκε το συμπέρασμα ότι τα microRNA-451a, microRNA-486-5p και microRNA-582-5p εκφράζονται σε όλα τα δείγματα ασθενών με ΧΛΛ που εξετάστηκαν, όπως και στα δείγματα υγιών ατόμων και ότι εμφανιζόταν μοναδικό προϊόν.

Μετά τη συλλογή των αποτελεσμάτων για όλα τα δείγματα, πραγματοποιήθηκε η σχετική ποσοτικοποίηση με τη μέθοδο $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Με τη χρήση των τιμών Ct, έγινε

κανονικοποίηση ως προς το πρότυπο δείγμα (Calibrator) και υπολογισμός του ΔCt και στη συνέχεια ως προς το γονίδιο αναφοράς (RNU48) και υπολογισμός του $\Delta\Delta Ct$, για κάθε δείγμα για κάθε microRNA που μελετήθηκε. Τέλος, υπολογίστηκε η τιμή $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Ακολούθησε στατιστική ανάλυση με τη χρήση του προγράμματος SPSS Statistics 25, όπου εξετάστηκε, με τη χρήση διαφόρων στατιστικών test, η συσχέτιση των επιπέδων έκφρασης στα συγκεκριμένα microRNAs, μεταξύ ασθενών με ΧΛΛ και υγιών ατόμων, καθώς και μεταξύ των διαφόρων κλινικοπαθολογικών χαρακτηριστικών των ασθενών, αλλά και η ολική επιβίωση(OS) των ασθενών, σε σχέση με τα microRNA-451a, microRNA-486-5p και microRNA-582-5p.

Πιο συγκεκριμένα, κατά τη σύγκριση των επιπέδων έκφρασης των microRNA-451a, microRNA-486-5p και microRNA-582-5p στα δείγματα των 82 ασθενών με ΧΛΛ και των 29 υγιών ατόμων, παρατηρήθηκε ότι το microRNA-451a, εμφανίζει στατιστικά σημαντικά μειωμένα επίπεδα έκφρασης, σε σχέση με τα υγιή άτομα($p<0,001$). Αντίστοιχα, το microRNA-486-5p, επίσης εμφανίζει στατιστικά σημαντικά μειωμένα επίπεδα έκφρασης, σε σχέση με τα υγιή άτομα($p=0,027$). Το microRNA-582-5p, εμφανίζει, επίσης, στατιστικά σημαντικά μειωμένα επίπεδα έκφρασης, σε σχέση με τα υγιή άτομα($p<0,001$). Τα συγκεκριμένα συμπεράσματα ήταν εμφανή και από τα αντίστοιχα θηκογράμματα (διαγράμματα έκφρασης Box-Plot). Ο υπολογισμός του p , έγινε με το μη-παραμετρικό στατιστικό test Mann-Whitney U test.

Επιπλέον, πραγματοποιήθηκε η στατιστική διαδικασία της Λογιστικής Παλινδρόμησης (Logistic Regression), με την οποία παρατηρήθηκε ότι τα χαμηλά επίπεδα έκφρασης του MicroRNA-451a, επιβεβαιώνουν την ύπαρξη νόσου στους ασθενείς με ΧΛΛ($p=0,002$). Τέλος, δημιουργήθηκαν καμπύλες σχέσης ευαισθησίας-ειδικότητας ή αλλιώς καμπύλες ROC για τα microRNA-451a, microRNA-486-5p και microRNA-582-5p στους ασθενείς με ΧΛΛ, και βρέθηκε πως η διαγνωστική αξία και των τριών microRNAs είναι στατιστικά σημαντική.

Συνολικά, λοιπόν, τα παραπάνω αποτελέσματα συμφωνούν με τα συμπεράσματα της μελέτης των Gao C., et al., ως προς τα διαφορετικά επίπεδα έκφρασης των microRNA-451a, microRNA-486-5p και microRNA-582-5p μεταξύ ασθενών με ΧΛΛ και υγιών ατόμων, επιβεβαιώνοντας την αρχική υπόθεση. Μοναδική διαφωνία εμφανιζόταν στην έκφραση του microRNA-582-5p, όπου από τα παραπάνω αποτελέσματα φαίνεται να είναι πιο χαμηλή σε ασθενείς με ΧΛΛ, σε σχέση με υγιή άτομα, ενώ στη μελέτη των Gao C., et al. είναι υψηλότερη σε ασθενείς με ΧΛΛ σε σχέση με υγιή άτομα. Στα microRNA-451a και microRNA-486-5p, υπάρχει συμφωνία στο ότι η έκφραση σε ασθενείς με ΧΛΛ είναι χαμηλότερη σε σχέση με τα υγιή άτομα.

Για τη συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων έκφρασης των τριών microRNAs σε σχέση με τα διάφορα κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά των ασθενών με Χρόνια Λεμφοκυτταρική Λευχαιμία, πραγματοποιήθηκαν διάφορα στατιστικά test. Τα κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά που συσχετίστηκαν με τα επίπεδα έκφρασης των συγκεκριμένων microRNAs, ήταν το φύλο, η ηλικία, τα κλινικά στάδια Binet και Rai για την ΧΛΛ, τα λευκά αιμοσφαίρια (WBC), τα λεμφοκύτταρα, το ποσοστό CD38(30%), η ανεξίτη, η LDH και η ύπαρξη ή όχι της μετάλλαξης IgHV.

Πραγματοποιήθηκε το στατιστικό test Spearman Two-Tailed Test, όπου έγινε συσχέτιση των microRNAs με την ηλικία, τα λευκά αιμοσφαίρια(WBC), τα λεμφοκύτταρα, την ανεξίτη και το CD38. Για το microRNA-451a, η συσχέτισή των επιπέδων έκφρασής του, ήταν στατιστικά σημαντική με τα λευκά αιμοσφαίρια ($p=0,006$) και τα λεμφοκύτταρα ($p=0,002$). Αντίστοιχα, για το microRNA-486-5p, η συσχέτισή των επιπέδων έκφρασής του, ήταν στατιστικά σημαντική, επίσης, με τα λευκά αιμοσφαίρια ($p=0,014$) και τα λεμφοκύτταρα ($p=0,003$). Τέλος, για το microRNA-582-5p, βρέθηκε ότι η συσχέτισή των

επιπέδων έκφρασής του, ήταν στατιστικά σημαντική με την ηλικία ($p=0.035$), τα λευκά αιμοσφαίρια ($p<0,001$), τα λεμφοκύτταρα ($p<0,001$) και την ανεξίνη ($p=0,003$).

Ακόμη, δημιουργήθηκαν πίνακες διπλής εισόδου (Crosstabs) και το στατιστικό τεστ Chi-Square Test. Τα συγκεκριμένα στατιστικά τεστ πραγματοποιήθηκαν για τη συσχέτιση μεταξύ των υψηλών ή χαμηλών επιπέδων έκφρασης των τριών υπό εξέταση microRNA με το φύλο, τα κλινικά στάδια Binet και Rai, την LDH, το ποσοστό CD38 και την κατάσταση μετάλλαξης IGHV, στους ασθενείς με ΧΛΛ. Η συσχέτιση των επιπέδων έκφρασης των τριών microRNA με τη σταδιοποίηση Rai, ιδιαίτερα σε σχέση με το microRNA-582-5p, έδειξε πως χαμηλά επίπεδα έκφρασης τους συσχετίζονται με προχωρημένα στάδια στην κλίμακα Rai, δείκτη κακής πρόγνωσης για τη νόσο της ΧΛΛ. Ακόμη, η συσχέτιση των επιπέδων έκφρασης των τριών microRNAs με την έκφραση του CD38(30%) ιδιαίτερα σε σχέση με το microRNA-582-5p, έδειξε πως χαμηλά επίπεδα έκφρασης τους συσχετίζονται με αυξημένα επίπεδα CD38, δείκτη κακής πρόγνωσης, για τη νόσο της ΧΛΛ. Στατιστικά σημαντικά αποτελέσματα εμφανίστηκαν μόνο για το microRNA-582-5p σε σχέση με το CD38.

Με την εφαρμογή του στατιστικού τεστ Jonckheere–Terpstra test συσχετίστηκαν τα επίπεδα έκφρασης των τριών microRNA με τη σταδιοποίηση Binet και Rai, στους ασθενείς με ΧΛΛ. Από τα αποτελέσματα, στατιστικά σημαντική βρέθηκε να είναι η συσχέτιση του microRNA-582-5p ($p=0,012$), με τη σταδιοποίηση Rai. Επιπλέον, με την εφαρμογή του στατιστικού τεστ Mann-Whitney U test πραγματοποιήθηκε συσχέτιση των τριών microRNA, με το CD38 και την κατάσταση μετάλλαξης IGHV. Συγκεκριμένα, τα χαμηλά επίπεδα έκφρασης των τριών microRNA συσχετίζονται με αυξημένα επίπεδα CD38(>30%), αλλά και με την ύπαρξη της μετάλλαξης IGHV, στους ασθενείς με ΧΛΛ, δείκτες κακής πρόγνωσης για τη ΧΛΛ. Η συσχέτιση του microRNA-582-5p με το CD38, ήταν η μόνη που βρέθηκε στατιστικά σημαντική($p=0,013$). Συνοψίζοντας, από τα παραπάνω αποτελέσματα συμπεραίνεται ότι υπάρχει στατιστικά σημαντική συσχέτιση μεταξύ του microRNA-582-5p και του κλασσικού δείκτη πρόγνωσης CD38, αλλά και της κλινικής σταδιοποίησης Rai.

Κατά την ανάλυση ολικής επιβίωσης (OS) των ασθενών με ΧΛΛ σε σχέση με τα microRNA-451a, microRNA-486-5p και microRNA-582-5p, δημιουργήθηκαν καμπύλες ολικής επιβίωσης Kaplan-Meier, ορίζοντας ένα βέλτιστο όριο cut-off. Οι συγκεκριμένες καμπύλες έδειξαν ότι και στα τρία microRNAs, οι θετικοί και αρνητικοί ασθενείς (σύμφωνα με το όριο cut-off), δεν φαίνεται να εμφανίζουν ουσιαστική διαφορά, μη δίνοντας στατιστικά σημαντικά αποτελέσματα σχετικά με την ολική επιβίωση($p>0,05$). Το p value υπολογίστηκε με το “log-rank test”.

Επιπλέον, πραγματοποιήθηκε Ανάλυση Παλινδρόμησης κατά Cox (Cox regression analysis), από την οποία φάνηκε πως οι ασθενείς με χαμηλά επίπεδα έκφρασης στα συγκεκριμένα microRNAs, έχουν μεγαλύτερη πιθανότητα να πεθάνουν από τη νόσο, χωρίς όμως τα συγκεκριμένα αποτελέσματα να είναι στατιστικά σημαντικά($p>0,05$). Ακόμη, σε ένα πολυπαραγοντικό σύστημα, τα συγκεκριμένα microRNAs, φάνηκε πως δεν μπορούν να συνδυαστούν με άλλες παραμέτρους, σχετικές με πρόγνωση της ΧΛΛ.

Μελλοντικά, με αφορμή την υποέκφραση που παρατηρήθηκε και στα τρία microRNAs σε ασθενείς με Χρόνια Λεμφοκυτταρική Λευχαιμία, θα είχε νόημα να γίνει περαιτέρω μελέτη των συγκεκριμένων microRNAs σε σχέση με τη Χρόνια Λεμφοκυτταρική Λευχαιμία, με στόχο να βρεθεί ο μηχανισμός με τον οποίο αυτά λειτουργούν στην παθογένεια της ΧΛΛ, όπως και τα γονίδια-στόχοι τους(όπως τα ETS2 και ARAP2 για το microRNA-582-5p), και επακόλουθα η πιθανή αξία των συγκεκριμένων microRNAs και των mRNA-στόχων τους ως θεραπευτικοί στόχοι για την ασθένεια της ΧΛΛ.

Επιπλέον, η έκφραση των συγκεκριμένων microRNAs θα μπορούσε πιθανώς να μελετηθεί για την διαγνωστική, προγνωστική και θεραπευτική τους αξία, σε ένα μεγαλύτερο αριθμό δειγμάτων ασθενών με ΧΛΛ, αλλά και σε άλλες μορφές αιματολογικών κακοηθειών και καρκίνου. Ακόμη, μπορεί να γίνει έλεγχος των συγκεκριμένων microRNAs, για την διερεύνηση της κλινικής τους σημασίας, και από διαφορετικές βιολογικές πηγές, όπως το πλάσμα και ο ορός του αίματος και τα εξωσώματα του ορού ή πλάσματος του αίματος. Η διαπίστωση αυτή προκύπτει επειδή έχει βρεθεί ότι τα microRNAs γενικά, αλλά και συγκεκριμένα τα microRNA-451a , microRNA-486-5p και microRNA-582-5p, βρίσκονται σε μεγαλύτερη αφθονία στα συγκεκριμένα, σε σχέση με τα Β-κύτταρα[110].

5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Juliusson, G. and R. Hough, *Leukemia*. Prog Tumor Res, 2016. **43**: p. 87-100.
2. Clarke, R.T., et al., *Clinical presentation of childhood leukaemia: a systematic review and meta-analysis*. Arch Dis Child, 2016. **101**(10): p. 894-901.
3. <https://www.mayoclinic.org/diseases-conditions/leukemia/symptoms-causes/syc-20374373>. 26/07/2019].
4. Hutter, J.J., *Childhood leukemia*. Pediatr Rev, 2010. **31**(6): p. 234-41.
5. *What You Need To Know About Leukemia*, N.C. Institute, Editor. 2013, National Cancer Institute.
6. Passegué, E., et al., *Normal and leukemic hematopoiesis: Are leukemias a stem cell disorder or a reacquisition of stem cell characteristics?* Proceedings of the National Academy of Sciences, 2003. **100**(suppl 1): p. 11842-11849.
7. Spangrude, G.J., S. Heimfeld, and I.L. Weissman, *Purification and characterization of mouse hematopoietic stem cells*. Science, 1988. **241**(4861): p. 58-62.
8. Morrison, S.J. and I.L. Weissman, *The long-term repopulating subset of hematopoietic stem cells is deterministic and isolatable by phenotype*. Immunity, 1994. **1**(8): p. 661-73.
9. Baum, C.M., et al., *Isolation of a candidate human hematopoietic stem-cell population*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. **89**(7): p. 2804-8.
10. Osawa, M., et al., *Long-term lymphohematopoietic reconstitution by a single CD34-low/negative hematopoietic stem cell*. Science, 1996. **273**(5272): p. 242-5.
11. Reya, T., et al., *Stem cells, cancer, and cancer stem cells*. Nature, 2001. **414**(6859): p. 105-11.
12. Sachs, L., *The control of hematopoiesis and leukemia: from basic biology to the clinic*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(10): p. 4742-9.
13. Jagannathan-Bogdan, M. and L.I. Zon, *Hematopoiesis*. Development, 2013. **140**(12): p. 2463-7.
14. *PDQ® Pediatric Treatment Editorial Board. PDQ Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia Treatment*. Bethesda, MD: National Cancer Institute. Available at: <https://www.cancer.gov/types/leukemia/hp/child-all-treatment-29/07/2019> 29/07/2019].
15. Hunger, S.P. and C.G. Mullighan, *Acute Lymphoblastic Leukemia in Children*. N Engl J Med, 2015. **373**(16): p. 1541-52.
16. *Global, regional, and national life expectancy, all-cause mortality, and cause-specific mortality for 249 causes of death, 1980-2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015*. Lancet, 2016. **388**(10053): p. 1459-1544.
17. Inaba, H., M. Greaves, and C.G. Mullighan, *Acute lymphoblastic leukaemia*. Lancet, 2013. **381**(9881): p. 1943-55.
18. Brown, P., *Treatment of infant leukemias: challenge and promise*. Hematology Am Soc Hematol Educ Program, 2013. **2013**: p. 596-600.
19. Paul, S., H. Kantarjian, and E.J. Jabbour, *Adult Acute Lymphoblastic Leukemia*. Mayo Clin Proc, 2016. **91**(11): p. 1645-1666.
20. *PDQ® Adult Treatment Editorial Board. PDQ Adult Acute Myeloid Leukemia Treatment*. Bethesda, MD: National Cancer Institute. Available at: <https://www.cancer.gov/types/leukemia/patient/adult-aml-treatment-pdq> 29/07/2019].
21. Swerdlow, S.H., C. International Agency for Research on, and O. World Health, *WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues*. 2017, Lyon: International Agency for Research on Cancer.
22. Dohner, H., D.J. Weisdorf, and C.D. Bloomfield, *Acute Myeloid Leukemia*. N Engl J Med, 2015. **373**(12): p. 1136-52.

23. Falini, B., et al., *New classification of acute myeloid leukemia and precursor-related neoplasms: changes and unsolved issues*. Discov Med, 2010. **10**(53): p. 281-92.
24. PDQ® Adult Treatment Editorial Board. *PDQ Chronic Lymphocytic Leukemia Treatment*. Bethesda, MD: National Cancer Institute. Available at: <https://www.cancer.gov/types/leukemia/patient/cll-treatment-pdq>. 24/07/2019.
25. Kipps, T.J., et al., *Chronic lymphocytic leukaemia*. Nat Rev Dis Primers, 2017. **3**: p. 17008.
26. Tefferi, A., *Classification, diagnosis and management of myeloproliferative disorders in the JAK2V617F era*. Hematology Am Soc Hematol Educ Program, 2006: p. 240-5.
27. Scarfo, L., A.J. Ferreri, and P. Ghia, *Chronic lymphocytic leukaemia*. Crit Rev Oncol Hematol, 2016. **104**: p. 169-82.
28. Hallek, M., et al., *Guidelines for the diagnosis and treatment of chronic lymphocytic leukemia: a report from the International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia updating the National Cancer Institute-Working Group 1996 guidelines*. Blood, 2008. **111**(12): p. 5446-56.
29. Caporaso, N.E., et al., *Monoclonal B cell lymphocytosis: clinical and population perspectives*. Cytometry B Clin Cytom, 2010. **78 Suppl 1**: p. S115-9.
30. Agathangelidis, A., et al., *Stereotyped B-cell receptors in one-third of chronic lymphocytic leukemia: a molecular classification with implications for targeted therapies*. Blood, 2012. **119**(19): p. 4467-75.
31. Slager, S.L., et al., *Genetic susceptibility to chronic lymphocytic leukemia*. Semin Hematol, 2013. **50**(4): p. 296-302.
32. Liang, X.S., et al., *Common genetic variants in candidate genes and risk of familial lymphoid malignancies*. Br J Haematol, 2009. **146**(4): p. 418-23.
33. Crowther-Swanepoel, D. and R.S. Houlston, *Genetic variation and risk of chronic lymphocytic leukaemia*. Semin Cancer Biol, 2010. **20**(6): p. 363-9.
34. Crowther-Swanepoel, D., et al., *Verification that common variation at 2q37.1, 6p25.3, 11q24.1, 15q23, and 19q13.32 influences chronic lymphocytic leukaemia risk*. Br J Haematol, 2010. **150**(4): p. 473-9.
35. Kipps, T.J., et al., *Chronic lymphocytic leukaemia*. Nature Reviews Disease Primers, 2017. **3**: p. 16096.
36. Marcucci, F. and A. Mele, *Hepatitis viruses and non-Hodgkin lymphoma: epidemiology, mechanisms of tumorigenesis, and therapeutic opportunities*. Blood, 2011. **117**(6): p. 1792-8.
37. Yu, E.M., A. Kittai, and I.A. Tabbara, *Chronic Lymphocytic Leukemia: Current Concepts*. Anticancer Res, 2015. **35**(10): p. 5149-65.
38. Mak, V., et al., *Preservation of lower incidence of chronic lymphocytic leukemia in Chinese residents in British Columbia: a 26-year survey from 1983 to 2008*. Leuk Lymphoma, 2014. **55**(4): p. 824-7.
39. Costinean, S., et al., *Pre-B cell proliferation and lymphoblastic leukemia/high-grade lymphoma in E(mu)-miR155 transgenic mice*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(18): p. 7024-9.
40. Cui, B., et al., *MicroRNA-155 influences B-cell receptor signaling and associates with aggressive disease in chronic lymphocytic leukemia*. Blood, 2014. **124**(4): p. 546-54.
41. Puente, X.S., et al., *Non-coding recurrent mutations in chronic lymphocytic leukaemia*. Nature, 2015. **526**(7574): p. 519-24.
42. Landau, D.A., et al., *Locally disordered methylation forms the basis of intratumor methylome variation in chronic lymphocytic leukemia*. Cancer Cell, 2014. **26**(6): p. 813-825.
43. Awan, F.T. and J.C. Byrd, *New strategies in chronic lymphocytic leukemia: shifting treatment paradigms*. Clin Cancer Res, 2014. **20**(23): p. 5869-74.

44. Getahun, A., et al., *Continuous inhibitory signaling by both SHP-1 and SHIP-1 pathways is required to maintain unresponsiveness of anergic B cells.* J Exp Med, 2016. **213**(5): p. 751-69.
45. Hodgson, K., et al., *Autoimmune cytopenia in chronic lymphocytic leukaemia: diagnosis and treatment.* Br J Haematol, 2011. **154**(1): p. 14-22.
46. Mina, A., et al., *Using prognostic models in CLL to personalize approach to clinical care: Are we there yet?* Blood Rev, 2018. **32**(2): p. 159-166.
47. Kostareli, E., et al., *Chronic lymphocytic leukaemia: an immunobiology approach.* Srp Arh Celok Lek, 2008. **136**(5-6): p. 319-23.
48. Greil, R., et al., *Rituximab maintenance versus observation alone in patients with chronic lymphocytic leukaemia who respond to first-line or second-line rituximab-containing chemoimmunotherapy: final results of the AGMT CLL-8a Mabtenance randomised trial.* Lancet Haematol, 2016. **3**(7): p. e317-29.
49. Woyach, J.A., *Patterns of resistance to B cell-receptor pathway antagonists in chronic lymphocytic leukemia and strategies for management.* Hematology Am Soc Hematol Educ Program, 2015. **2015**: p. 355-60.
50. James, D.F., et al., *Lenalidomide and rituximab for the initial treatment of patients with chronic lymphocytic leukemia: a multicenter clinical-translational study from the chronic lymphocytic leukemia research consortium.* J Clin Oncol, 2014. **32**(19): p. 2067-73.
51. Perron, M.P. and P. Provost, *Protein interactions and complexes in human microRNA biogenesis and function.* Front Biosci, 2008. **13**: p. 2537-47.
52. Wightman, B., I. Ha, and G. Ruvkun, *Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene lin-14 by lin-4 mediates temporal pattern formation in C. elegans.* Cell, 1993. **75**(5): p. 855-62.
53. Lee, R.C., R.L. Feinbaum, and V. Ambros, *The C. elegans heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14.* Cell, 1993. **75**(5): p. 843-54.
54. Rajewsky, N., *L(ou)sy miRNA targets?* Nat Struct Mol Biol, 2006. **13**(9): p. 754-5.
55. Rajewsky, N., *microRNA target predictions in animals.* Nat Genet, 2006. **38 Suppl**: p. S8-13.
56. Griffiths-Jones, S., *The microRNA Registry.* Nucleic Acids Res, 2004. **32**(Database issue): p. D109-11.
57. Cullen, B.R., *Transcription and processing of human microRNA precursors.* Mol Cell, 2004. **16**(6): p. 861-5.
58. Macfarlane, L.A. and P.R. Murphy, *MicroRNA: Biogenesis, Function and Role in Cancer.* Curr Genomics, 2010. **11**(7): p. 537-61.
59. Liu, J., et al., *MicroRNA-dependent localization of targeted mRNAs to mammalian P-bodies.* Nat Cell Biol, 2005. **7**(7): p. 719-23.
60. Liu, J., et al., *A role for the P-body component GW182 in microRNA function.* Nat Cell Biol, 2005. **7**(12): p. 1261-6.
61. Parker, R. and U. Sheth, *P bodies and the control of mRNA translation and degradation.* Mol Cell, 2007. **25**(5): p. 635-46.
62. Cougot, N., S. Babajko, and B. Seraphin, *Cytoplasmic foci are sites of mRNA decay in human cells.* J Cell Biol, 2004. **165**(1): p. 31-40.
63. Mayr, C., M.T. Hemann, and D.P. Bartel, *Disrupting the pairing between let-7 and Hmga2 enhances oncogenic transformation.* Science, 2007. **315**(5818): p. 1576-9.
64. Nelson, P.T., W.X. Wang, and B.W. Rajeev, *MicroRNAs (miRNAs) in neurodegenerative diseases.* Brain Pathol, 2008. **18**(1): p. 130-8.
65. Wang, W.X., et al., *The expression of microRNA miR-107 decreases early in Alzheimer's disease and may accelerate disease progression through regulation of beta-site amyloid precursor protein-cleaving enzyme 1.* J Neurosci, 2008. **28**(5): p. 1213-23.

66. Hansen, T., et al., *Brain expressed microRNAs implicated in schizophrenia etiology*. PLoS One, 2007. **2**(9): p. e873.
67. Denli, A.M., et al., *Processing of primary microRNAs by the Microprocessor complex*. Nature, 2004. **432**(7014): p. 231-5.
68. Gregory, R.I., et al., *The Microprocessor complex mediates the genesis of microRNAs*. Nature, 2004. **432**(7014): p. 235-40.
69. Lee, Y., et al., *The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing*. Nature, 2003. **425**(6956): p. 415-9.
70. Ruiz-Lafuente, N., et al., *IL-4 Up-Regulates MiR-21 and the MiRNAs Hosted in the CLCN5 Gene in Chronic Lymphocytic Leukemia*. PLoS One, 2015. **10**(4): p. e0124936.
71. Bartel, D.P., *MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function*. Cell, 2004. **116**(2): p. 281-97.
72. Kim, V.N., *Small RNAs: classification, biogenesis, and function*. Mol Cells, 2005. **19**(1): p. 1-15.
73. Ambros, V., et al., *A uniform system for microRNA annotation*. Rna, 2003. **9**(3): p. 277-9.
74. Rodriguez, A., et al., *Identification of mammalian microRNA host genes and transcription units*. Genome Res, 2004. **14**(10a): p. 1902-10.
75. Scott, P.H., et al., *Regulation of RNA polymerase III transcription during cell cycle entry*. J Biol Chem, 2001. **276**(2): p. 1005-14.
76. Chen, C.Z., et al., *MicroRNAs modulate hematopoietic lineage differentiation*. Science, 2004. **303**(5654): p. 83-6.
77. Han, J., et al., *Posttranscriptional crossregulation between Drosha and DGCR8*. Cell, 2009. **136**(1): p. 75-84.
78. Kim, V.N., *MicroRNA biogenesis: coordinated cropping and dicing*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2005. **6**(5): p. 376-85.
79. Matranga, C., et al., *Passenger-strand cleavage facilitates assembly of siRNA into Ago2-containing RNAi enzyme complexes*. Cell, 2005. **123**(4): p. 607-20.
80. Bagga, S., et al., *Regulation by let-7 and lin-4 miRNAs results in target mRNA degradation*. Cell, 2005. **122**(4): p. 553-63.
81. Zhang, W., J.E. Dahlberg, and W. Tam, *MicroRNAs in tumorigenesis: a primer*. Am J Pathol, 2007. **171**(3): p. 728-38.
82. Mirzaei, H., et al., *State of the art in microRNA as diagnostic and therapeutic biomarkers in chronic lymphocytic leukemia*. J Cell Physiol, 2018. **233**(2): p. 888-900.
83. Balatti, V., Y. Pekarky, and C.M. Croce, *Role of microRNA in chronic lymphocytic leukemia onset and progression*. J Hematol Oncol, 2015. **8**: p. 12.
84. Starnes, L.M., et al., *A transcriptome-wide approach reveals the key contribution of NFI-A in promoting erythroid differentiation of human CD34(+) progenitors and CML cells*. Leukemia, 2010. **24**(6): p. 1220-3.
85. Srivastava, S., G.J. Tsongalis, and P. Kaur, *Role of microRNAs in regulation of the TNF/TNFR gene superfamily in chronic lymphocytic leukemia*. Clin Biochem, 2016. **49**(16-17): p. 1307-1310.
86. Balatti, V., et al., *Novel mechanisms of regulation of miRNAs in CLL*. Trends Cancer, 2016. **2**(3): p. 134-143.
87. Goto, T., et al., *An elevated expression of serum exosomal microRNA-191, -21, -451a of pancreatic neoplasm is considered to be efficient diagnostic marker*. BMC Cancer, 2018. **18**(1): p. 116.
88. Trattig, C., et al., *MicroRNA-451a overexpression induces accelerated neuronal differentiation of Ntera2/D1 cells and ablation affects neurogenesis in microRNA-451a-/- mice*. PLoS One, 2018. **13**(11): p. e0207575.

89. Pase, L., et al., *miR-451 regulates zebrafish erythroid maturation in vivo via its target gata2*. Blood, 2009. **113**(8): p. 1794-804.
 90. Wang, R., et al., *Acquisition of radioresistance in docetaxel-resistant human lung adenocarcinoma cells is linked with dysregulation of miR-451/c-Myc-survivin/rad-51 signaling*. Oncotarget, 2014. **5**(15): p. 6113-29.
 91. Okamoto, M., et al., *MicroRNA-451a in extracellular, blood-resident vesicles attenuates macrophage and dendritic cell responses to influenza whole-virus vaccine*. J Biol Chem, 2018. **293**(48): p. 18585-18600.
 92. Kovalchuk, O., et al., *Involvement of microRNA-451 in resistance of the MCF-7 breast cancer cells to chemotherapeutic drug doxorubicin*. Mol Cancer Ther, 2008. **7**(7): p. 2152-9.
 93. van Jaarsveld, M.T., et al., *MicroRNAs in ovarian cancer biology and therapy resistance*. Int J Biochem Cell Biol, 2010. **42**(8): p. 1282-90.
 94. Gao, C., et al., *Identification of key candidate genes and miRNAmRNA target pairs in chronic lymphocytic leukemia by integrated bioinformatics analysis*. Mol Med Rep, 2019. **19**(1): p. 362-374.
 95. Shaham, L., et al., *MicroRNA-486-5p is an erythroid oncomiR of the myeloid leukemias of Down syndrome*. Blood, 2015. **125**(8): p. 1292-1301.
 96. Wang, L.S., et al., *MicroRNA-486 regulates normal erythropoiesis and enhances growth and modulates drug response in CML progenitors*. Blood, 2015. **125**(8): p. 1302-13.
 97. Jiang, M., et al., *MiR-486 as an effective biomarker in cancer diagnosis and prognosis: a systematic review and meta-analysis*. Oncotarget, 2018. **9**(17): p. 13948-13958.
 98. Huang, S., et al., *miR-582-3p and miR-582-5p Suppress Prostate Cancer Metastasis to Bone by Repressing TGF-beta Signaling*. Mol Ther Nucleic Acids, 2019. **16**: p. 91-104.
 99. Li, L. and L. Ma, *Upregulation of miR-582-5p regulates cell proliferation and apoptosis by targeting AKT3 in human endometrial carcinoma*. Saudi Journal of Biological Sciences, 2018. **25**(5): p. 965-970.
 100. Shu, Z., L. Chen, and D. Ding, *miR-582-5P induces colorectal cancer cell proliferation by targeting adenomatous polyposis coli*. World Journal of Surgical Oncology, 2016. **14**(1): p. 239.
 101. Liu, J., et al., *MicroRNA-582-5p suppresses non-small cell lung cancer cells growth and invasion via downregulating NOTCH1*. PLOS ONE, 2019. **14**(6): p. e0217652.
 102. Delves, P.J., et al., *Roitt's Essential Immunology*. 11th ed. 2010: Wiley India Pvt Ltd.
 103. Verhoeckx, K. and P. Cotter, European Cooperation in the Field of Scientific and Technical Research (Organization), *The impact of food bioactives on gut health : in vitro and ex vivo models*. 2015: Cham : SpringerOpen.
 104. *Isolation of mononuclear cells - Methodology and applications*
- G. Healthcare, Editor. 2014, GE Healthcare Bio-Sciences AB.
105. Chomczynski, P. and N. Sacchi, *The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction: twenty-something years on*. Nat Protoc, 2006. **1**(2): p. 581-5.
 106. Kozomara, A. and S. Griffiths-Jones, *miRBase: annotating high confidence microRNAs using deep sequencing data*. Nucleic Acids Res, 2014. **42**(Database issue): p. D68-73.
 107. *PCR Amplification - Protocols and background information about PCR and RT-PCR*. Promega Corporation(<https://worldwide.promega.com/resources/product-guides-and-selectors/protocols-and-applications-guide/pcr-amplification/>) 17/07/2019.
 108. Yehudai-Resheff, S. and G. Schuster, *Characterization of the E.coli poly(A) polymerase: nucleotide specificity, RNA-binding affinities and RNA structure dependence*. Nucleic Acids Res, 2000. **28**(5): p. 1139-44.
 109. Shi, R., et al., *Poly(T) adaptor RT-PCR*. Methods Mol Biol, 2012. **822**: p. 53-66.

110. Moussay, E., et al., *MicroRNA as biomarkers and regulators in B-cell chronic lymphocytic leukemia*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011. **108**(16): p. 6573-8.

ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΗΣ ΚΛΙΝΙΚΗΣ ΣΗΜΑΣΙΑΣ miRNA ΣΕ ΜΟΝΟΠΥΡΗΝΑ ΚΥΤΤΑΡΑ ΑΙΜΑΤΟΣ ΑΣΘΕΝΩΝ ΜΕ ΧΡΟΝΙΑ ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΛΕΥΧΑΙΜΙΑ

ΑΡΙΣΤΕΙΔΗΣ ΜΙΧΑΗΛ
ΧΗΜΙΚΟΣ
ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Εισαγωγή: Η χρόνια λεμφοκυτταρική λευχαιμία είναι μία κακοήθης διαταραχή που χαρακτηρίζεται από τον ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό και τη συσσώρευση των Β λεμφοκυττάρων στο περιφερικό αίμα, το μυελό των οστών, τους δευτερεύοντες λεμφοειδείς ιστούς και το σπλήνα. Αποτελεί την πιο κοινή μορφή λευχαιμίας σε ενήλικα άτομα στις δυτικές χώρες.

Η διάγνωση της νόσου μπορεί να πραγματοποιηθεί με απλές εξετάσεις αίματος, παρόλα αυτά είναι ακόμη σημαντική η εύρεση νέων δεικτών για την όσο το δυνατόν πιο έγκαιρη διάγνωση της νόσου. Επιπλέον, ένα από τα βασικά προβλήματα στην θεραπευτική αντιμετώπιση της ΧΛΛ, είναι η επιλογή της κατάλληλης θεραπείας, κάτι που μπορεί εύκολα να πραγματοποιηθεί με την εύρεση προγνωστικών δεικτών που θα δίνουν πληροφορία σχετικά με την ολική επιβίωση των ασθενών.

Τα microRNAs είναι ενδογενή μη κωδικά μικρά μόρια RNA που έχουν αρκετούς σημαντικούς ρυθμιστικούς ρόλους και λειτουργίες στα κύτταρα. Η κατανόηση της λειτουργίας των miRNAs στην ογκογένεση μπορεί να δώσει πληροφορίες για τα βασικά ερωτήματα που ακόμη υπάρχουν στην έρευνα για τον καρκίνο. Όλο και περισσότερα στοιχεία υποδηλώνουν ότι μεγάλων αριθμός microRNAs στην παθογένεια της ΧΛΛ.

Σκοπός: Οι βασικοί στόχοι αυτής της διπλωματικής εργασίας ήταν: ο ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός των επιπέδων έκφρασης των microRNA-451a, microRNA-486-5p και microRNA-582-5p σε ασθενείς με Χρόνια Λεμφοκυτταρική Λευχαιμία, μέσω της διαδικασίας της Real-Time q-PCR, η επιβεβαίωση ή όχι της συσχέτισης τους με υπερέκφραση ή υποέκφραση, σε σχέση με υγιή άτομα, αλλά και μεταξύ των ασθενών, σε σύγκριση με την ολική επιβίωση, και τα διάφορα κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά τους και, εν τέλει, η εκτίμηση της πιθανής κλινικής σημασίας των συγκεκριμένων microRNAs ως διαγνωστικοί ή προγνωστικοί βιοδείκτες.

Μέθοδοι: Στα πλαίσια της παρούσας διπλωματικής εργασίας, πραγματοποιήθηκε διαχωρισμός των μονοπύρηνων κυττάρων περιφερικού αίματος (PBMCs) με Ficoll από 82 δείγματα ασθενών με Χρόνια Λεμφοκυτταρική Λευχαιμία και 29 Υγιών Ατόμων και στην πορεία ακολούθησε απομόνωση ολικού RNA από τα κύτταρα αυτά, με τη χρήση TRI REAGENT και φασματοφωτομετρικός προσδιορισμός της συγκέντρωσης του απομονωμένου Ολικού RNA. Στη συνέχεια έγινε σχεδιασμός εκκινητών για τα microRNA 451a, 486-5p και 582-5p που αποφασίστηκε να μελετηθούν και σύνθεση cDNA με τη διαδικασία της PCR Αντίστροφης Μεταγραφής με ένα αρχικό στάδιο Πολυαδενυλίωσης (PAP RT-PCR).

Τέλος, πραγματοποιήθηκε ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός των επιπέδων έκφρασης των συγκεκριμένων microRNAs στα δείγματα αυτά με την διαδικασία της PCR Πραγματικού Χρόνου (Real-Time qPCR) και ακολούθησε Στατιστική Ανάλυση, όπου εξετάστηκε, με τη χρήση διαφόρων στατιστικών test, η συσχέτιση των επιπέδων έκφρασης στα συγκεκριμένα microRNA, μεταξύ ασθενών με ΧΛΛ και υγιών ατόμων, καθώς και μεταξύ των διαφόρων κλινικοπαθολογικών χαρακτηριστικών των ασθενών, αλλά και η

ολική επιβίωση(OS) των ασθενών, σε σχέση με τα microRNA-451a , microRNA-486-5p και microRNA-582-5p.

Αποτελέσματα & Συμπεράσματα: Τα αποτελέσματα των πειραματικών διαδικασιών που πραγματοποιήθηκαν, αρχικά βοήθησαν στον ποσοτικό προσδιορισμό των επιπέδων έκφρασης των συγκεκριμένων microRNAs στα δείγματα ασθενών με ΧΛΛ αλλά και υγείων. Η συσχέτιση των επιπέδων έκφρασης στα συγκεκριμένα microRNAs, μεταξύ ασθενών με ΧΛΛ και υγιών ατόμων, έδειξε ότι τα επίπεδα έκφρασης στα τρία microRNAs εμφανίζουν διαφορά σε σχέση με τα υγιή άτομα, που ήταν στατιστικά σημαντική ($p < 0,05$).

Η συσχέτιση των τριών microRNAs σε σχέση με τα κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά των ασθενών με ΧΛΛ, έδειξε ότι υπάρχει στατιστικά σημαντική συσχέτιση μεταξύ του microRNA-582-5p και του κλασσικού δείκτη πρόγνωσης CD38 αλλά και της κλινικής σταδιοποίησης Rai.

Τέλος, η ολική επιβίωση των ασθενών με ΧΛΛ σε σχέση με τα τρία microRNAs, ορίζοντας ένα βέλτιστο όριο cut-off, έδειξε ότι και στα τρία microRNAs, οι θετικοί και αρνητικοί ασθενείς (σύμφωνα με το όριο cut-off), δεν φαίνεται να εμφανίζουν ουσιαστική διαφορά, μη δίνοντας στατιστικά σημαντικά αποτελέσματα σχετικά με την ολική επιβίωση($p > 0,05$).

**INVESTIGATING THE CLINICAL SIGNIFICANCE OF miRNA IN BLOOD
MONONUCLEAR CELLS OF PATIENTS WITH CHRONIC LYMPHOCYTIC
LEUKEMIA**

ARISTEIDIS MICHAIL
CHEMIST
ABSTRACT

Introduction: Chronic lymphocytic leukemia is a malignant disorder characterized by the uncontrolled proliferation and accumulation of B lymphocytes in peripheral blood, bone marrow, secondary lymphoid tissues and the spleen. It is the most common form of leukemia in adults in Western countries.

CLL can be easily diagnosed via blood tests results, however, it is still necessary to find new markers for early diagnosis. In addition, one of the key problems in the treatment of CLL, is the about choosing the appropriate treatment, something that can be achieved with the help of prognostic biomarkers, that will provide information on the overall survival of patients.

MicroRNAs are endogenous non-coding small RNA molecules that have several important regulatory roles and functions in cells. Understanding the function of miRNAs in oncogenesis can provide information about key questions that still exist in cancer research. Increasing evidence suggests that large numbers of microRNAs are involved in the pathogenesis of CLL.

Purpose: The main objectives of this thesis were: the qualitative and quantitative determination of the expression levels of microRNA-451a, microRNA-486-5p and microRNA-582-5p in patients with Chronic Lymphocytic Leukemia, with Real-Time q-PCR, the confirmation or not of their association with overexpression or underexpression, comparing with healthy individuals but also among patients, compared to the overall survival, and their different clinical and pathological characteristics and, ultimately, the potential clinical significance of these microRNAs as diagnostic or prognostic biomarkers.

Methods: Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were separated with Ficoll from 82 samples of patients with Chronic Lymphocytic Leukemia and 29 Healthy Individuals, and total RNA was isolated from the cells using TRI REAGENT, followed by spectrophotometric determination of the concentration of the isolated Total RNA. Primers were then designed for microRNAs 451a, 486-5p and 582-5p, and cDNA synthesis followed, with reverse transcription PCR with an initial polyadenylation step (PAP RT-PCR).

Finally, the expression levels of these microRNAs in these samples were quantitatively and qualitatively determined by Real-Time q-PCR, followed by Statistical Analysis, which examined the correlation of expression levels of these microRNAs, between CLL patients and healthy individuals, as well as among the various clinicopathological characteristics of the patients, and the overall survival (OS) for these patients.

Results & Conclusions: The results of the experimental procedures referred, initially helped quantify the expression levels of these microRNAs in the samples of patients with CLL and healthy individuals. The correlation of expression levels in these microRNAs between CLL patients and healthy individuals showed a different expression in the three microRNAs compared to healthy individuals, with statistically significant results($p < 0.05$).

The correlation of the three microRNAs with the clinicopathological characteristics of CLL patients showed that there is a statistically significant correlation between microRNA-582-5p and the widely used prognosis factor CD38, and also between microRNA-582-5p and the Rai clinical staging system.

Finally, the overall survival of CLL patients in comparison to the three microRNAs, setting an optimal cut-off threshold, showed that in all three microRNAs, expression levels of positive and negative patients (according to the cut-off threshold), did not appear to be significantly different, with no statistically significant results on the overall survival ($p > 0.05$).