



ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ

Α' ΠΑΙΔΙΑΤΡΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΑΘΗΝΩΝ

ΔΙΕΥΘΥΝΤΡΙΑ-ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ: Χ. ΚΑΝΑΚΑ-GANTENBEIN

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

**«Διερεύνηση των κυτοκινών και των αγγειογενετικών παραγόντων στις
λευχαιμίες της παιδικής ηλικίας»**

ΖΑΜΠΟΓΙΑΝΝΗΣ ΑΡΧΟΝΤΗΣ

ΙΑΤΡΟΣ – ΕΙΔΙΚΕΥΟΜΕΝΟΣ ΠΑΙΔΙΑΤΡΙΚΗΣ

ΑΘΗΝΑ 2022

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

Διδάκτορας: Ζαμπογιάννης Αρχοντής

Θέμα: «Διερεύνηση των κυτοκινών και των αγγειογενετικών παραγόντων στις λευχαιμίες της παιδικής ηλικίας»

Ημερομηνία ορισμού τριμελούς επιτροπής: 06/06/13

Μέλη τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:

1. Μοσχόβη Μαρία, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Παιδιατρικής Αιματολογίας/Ογκολογίας Πανεπιστημίου Αθηνών, Επιβλέπον μέλος ΔΕΠ
2. Παπαβασιλείου Αθανάσιος, Καθηγητής – Διευθυντής Εργαστηρίου Βιολογικής Χημείας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Αθηνών
3. Γουργιώτης Δημήτριος, Ομότιμος Καθηγητής – Υπεύθυνος Εργαστηρίου Κλινικής Βιοχημείας – Μοριακής Διαγνωστικής Β' Παιδιατρικής Κλινικής της Ιατρικής Σχολής του ΕΚΠΑ

Ημερομηνία ορισμού του θέματος: 08/01/14

Ημερομηνία κατάθεσης πρώτης προόδου: 17/06/14

Ημερομηνία κατάθεσης δεύτερης προόδου: 28/07/15

Ημερομηνία κατάθεσης τρίτης προόδου: 12/05/20

Ημερομηνία κατάθεσης τέταρτης προόδου: 02/06/22

Ημερομηνία κατάθεσης διδακτορικής διατριβής: 02/06/22

Ημερομηνία ορισμού επταμελούς επιτροπής: 07/07/22

Μέλη επταμελούς επιτροπής:

1. Μοσχόβη Μαρία (επιβλέπουσα)
2. Παπαβασιλείου Αθανάσιος
3. Γουργιώτης Δημήτριος
4. Πιπέρη Χριστίνα
5. Κασσή Ευανθία
6. Βασιλακόπουλος Θεόδωρος
7. Αγγελοπούλου Μαρία

Ερευνητικό έργο

Δημοσιεύσεις σε ιατρικά περιοδικά

- **Low IL-23 levels in peripheral blood and bone marrow at diagnosis of acute leukemia in children increased with the elimination of leukemic burden**
Zampogiannis A, Piperi C, Baka M, Zoi I, Papavassiliou AG, Moschovi M.
Journal of Cellular and Molecular Medicine, 25(15):7426-7435, 2021
- **STAT transcript levels in childhood acute lymphoblastic leukemia: STAT1 and STAT3 transcript correlations**
Adamaki M, Tsotra M, Vlahopoulos S, Zampogiannis A, Papavassiliou AG, Moschovi M
Leukemia Research, 11;S0145-2126(15)30379-9, 2015
- **Low birth weight is a predisposing factor for the liver tumors**
MA Moschovi, M Nikolaou, A Zampogiannis, K Stefanaki, EA Antoniou
Ann Pediatr Child Health 3 (5), 1067, 2015

Εργασίες σε περιληπτική μορφή σε διεθνή συνέδρια

- **Third Primary Malignancy After 23 Years from the First Diagnosis of Lymphoma with Good Outcome**
M. Moschovi, A. Lagos, D. Stathaki, A. Zampogiannis
50th Congress of the International Society of Paediatric Oncology (SIOP)
Kyoto, Japan, November 16–19, 2018
Pediatric Blood & Cancer 65, S206-S207, 2018
- **Anthropometric Data in Childhood Brain Tumors**
M. Moschovi, A. Pavlopoulos, A. Zampogiannis, A. Lagos, D. Stathaki
50th Congress of the International Society of Paediatric Oncology (SIOP)
Kyoto, Japan, November 16–19, 2018
Pediatric Blood & Cancer 65, S444-S445, 2018
- **Diffuse intrinsic pontine gliomas: a 10-year single center experience**
A. Zampogiannis, I. Nikas, M. Synodinou, M. Moschovi
49th Congress of the International Society of Paediatric Oncology (SIOP)
Washington, DC, USA, October 12–15, 2017
- **Renal Tumors in Children: A 25-Year Single Center Experience**
M. Moschovi, A. Zampogiannis, A. Athanasiadou, I. Nikas, K. Stefanaki, G. Chrousos
49th Congress of the International Society of Paediatric Oncology (SIOP)
Washington, DC, USA, October 12–15, 2017
Pediatric Blood & Cancer 64, S249-S249, 2017
- **Familial Hemophagocytic Lymphohistiocytosis: A Single-Center Experience**
M. Moschovi, A. Zampogiannis
33rd Annual Meeting of the Histiocyte Society, Singapore, October 3-4, 2017
Pediatric Blood & Cancer 64, S27-S27, 2017

- **Co-Occurrence of Langerhans Cell Histiocytosis and Intermediate Type Osteopetrosis in a Male Child**
 M. Moschovi, **A. Zampogiannis**, I. Nikas, E. Charmandari, H. Fryssira
 32nd Annual Meeting of the Histiocyte Society Dublin, Ireland, October 17–19, 2016
 Pediatric Blood & Cancer 63, S26-S26, 2017
- **Burkitt leukemia/lymphoma in children: cytogenetic characteristics and outcome**
 M. Moschovi, **A. Zampogiannis**, M. Nikolaou, N. Tourkantoni, M. Tzanoudaki, M. Kanariou, G. P. Chrousos
 10th Biennial Childhood Leukemia Symposium, Athens, April 25 – 26, 2016.
 HemaSphere 3 (S1), 839-840, 2019
- **Use of flow cytometry and immunohistochemistry to rule out CNS relapse of acute lymphoblastic leukemia**
 M Moschovi, C Kelaidi, **A Zampogiannis**, N Tourkantoni, M Tzanoudaki, M Kanariou, K Stefanaki, G Paterakis
 10th Biennial Childhood Leukemia Symposium, Athens, April 25 – 26, 2016.
 HemaSphere 3 (S1), 777, 2019
- **Liver tumours in children; relation of hepatoblastoma with low birth weight and incidence of hepatocellular carcinoma earlier in age?**
 M. Moschovi, M. Nikolaou, **A. Zampogiannis**, K. Stefanaki, E. Antoniou
 47th Congress of the International Society of Paediatric Oncology (SIOP), Cape Town, South Africa, October 8–11, 2015
 Pediatric Blood & Cancer 62, S310-S311, 2015
- **Outcome of Langerhans cell histiocytosis in children under the age of 24 months-LCH-III protocol**
 M Moschovi, M Nikolaou, **A Zampogiannis**, N Tourkantoni, J Nikas, C Hadjigeorgi
 20th Congress of the European Hematology Association, Vienna, Austria, June 11-14, 2015
 Haematologica 100, 558-558, 2015
- **Intermittent dosing of Gleevec is efficacious in cases Of childhood Chronic Myeloid Leukemia with poor compliance**
 M. Moschovi, M. Adamaki, A. Athanasiadou, **A. Zampogiannis**, N. Tourkantoni
 55th American Society of Hematology (ASH) Annual Meeting and Exposition
 New Orleans, Louisiana, USA, December 5-10, 2013
 Blood 122 (21), 5182, 2013
- **Clinical presentation and outcome in children with LCH under the age of 24 MONTHS**
 Maria Moschovi, **Archontis Zampogiannis**, Maria Adamaki, Natalia Tourkantoni, John Nikas
 30th Annual Meeting of the Histiocyte Society
 Toronto, Ontario, Canada, October 28–30, 2014

- **Changes in the Clinical & Molecular epidemiology of respiratory viruses in a tertiary care center during the 2009-2012 consecutive winter seasons**
 Z. Oikonomopoulou, P. Karakitsos, **A. Zampogiannis**, I. Mastoris, K. Leventakos, A. Chranioti, C. Kottaridi, A. Attilakos, D. Plachouras, T. Kelesidis, P. Tofas, P. Nikolaidou-Karpathiou, G. Petrikkos, S. Tsiodras
 IDWeek 2012, October 17-21, 2012, San Diego
- **The role of GnRH analogs in children with congenital adrenal hyperplasia**
A. Zampogiannis, C. Zampetaki
 10th International Symposium of GnRH, Salzburg, Austria, February 6-8, 2011
- **Anti-mullerian hormone as a marker for ovarian aging**
A. Zampogiannis, C. Delimpalta
 9th Congress of the European Society of Gynecology, Copenhagen, Denmark, 8-11 September 2011
- **Assisted reproduction techniques for HIV serodiscordant couples**
 C. Delimpalta, **A. Zampogiannis**
 9th Congress of the European Society of Gynecology, Copenhagen, Denmark, 8-11 September 2011
- **The role of group treatment for obsessive-compulsive disorder**
 C. Zampetaki, C. Delimpalta, E. Varouchaki, **A. Zampogiannis**
 19th European Congress of Psychiatry-EPPA 2011, Vienna, Austria, 12-15 March 2011
- **Oral contraceptives and breast cancer risk in young women**
 C. Delimpalta, **A. Zampogiannis**
 13th Biennial Meeting of the International Gynecologic Cancer Society (IGCS 2010) October 23-26, 2010, Prague
- **Robotic Surgery for morbid obesity: Roux-en-Y gastric bypass, gastric banding, sleeve gastrectomy**
 C. Delimpalta, **A. Zampogiannis**
 MIRA 6th Annual International Congress, Athens, Greece, May 11-13, 2011
- **Robotic adrenalectomy for benign and malignant pathologies**
 C. Delimpalta, **A. Zampogiannis**
 MIRA 6th Annual International Congress, Athens, Greece, May 11-13, 2011
- **Transvaginal natural orifice transluminal endoscopic surgery (NOTES)- An overview**
 C. Delimpalta, **A. Zampogiannis**
 MIRA 6th Annual International Congress, Athens, Greece, May 11-13, 2011

Ευχαριστίες

Θα ήθελα να εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου προς την επιβλέπουσα Καθηγήτρια κα Μοσχόβη για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε, δίνοντας μου την ευκαιρία να εκπονήσω την παρούσα εργασία. Την ευχαριστώ από καρδιάς για το πρωτότυπο θέμα της έρευνας που μου εμπιστεύτηκε, για την αμέριστη συμπαράστασή της, την επίβλεψή της, την συνεχή της ενθάρρυνση να συνεχίσω τον μακρύ δρόμο της έρευνας αυτής, και την καθοδήγησή της, σε όλο το ερευνητικό και τεχνικό σκέλος, από την πρώτη έως και την τελευταία στιγμή. Είμαι ευγνώμων ακόμη στην κα Μοσχόβη γιατί με μύησε στην ομορφιά του εργαστηρίου, και στο εργαστήριό της με δίδαξε πολλές τεχνικές, αλλά και μου ενέπνευσε την γοητεία της εργαστηριακής έρευνας. Την ευχαριστώ ακόμη για τον διαρκή ενθουσιασμό της και το πάθος της για την έρευνα, την επιστημονική της συγκρότηση και την επιμονή της για την παραγωγή καινοτόμων και υψηλής ποιότητας ερευνητικών αποτελεσμάτων. Με τιμά η αμέριστη εμπιστοσύνη που μου έδειξε.

Θα ήθελα ακόμη να ευχαριστήσω από καρδιάς τον Καθηγητή κ. Παπαβασιλείου για την καθοδήγησή του και τις πολύτιμες συμβουλές του στην παρούσα μελέτη. Θα ήθελα από καρδιάς να εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου στην Καθηγήτρια κα Πιπέρη και σε όλη την επιστημονική ομάδα του εργαστηρίου Βιολογικής Χημείας της Ιατρικής Σχολής Αθηνών, για την βοήθεια που μου προσέφεραν στο τεχνικό σκέλος της διατριβής μου. Θεωρώ τον εαυτό μου εξαιρετικά τυχερό που μου δόθηκε η δυνατότητα να συνεργαστώ με τόσο καταρτισμένους επιστήμονες σε ένα τόσο παραγωγικό εργασιακό περιβάλλον.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω από καρδιάς τον Καθηγητή κ. Γουργιώτη για το αστείρευτο ενδιαφέρον, την υποστήριξη και την καθοδήγηση στην μελέτη αυτή.

Ένα τεράστιο ευχαριστώ οφείλω στους γονείς μου για την υπομονή, την ενθάρρυνση και την υποστήριξή τους σε όλη την διάρκεια των σπουδών μου. Η βοήθειά τους ήταν, είναι και θα είναι ανεκτίμητη.

Χωρίς την βοήθεια όλων των ανωτέρω, η εργασία αυτή δεν θα μπορούσε να ολοκληρωθεί.

Ὁ Ὀρκος τοῦ Ἱπποκράτη

Ὅμνυμι Ἀπόλλωνα ἰητρὸν, καὶ Ἀσκληπιὸν, καὶ Ὑγίαν, καὶ Πανάκειαν, καὶ θεοὺς πάντας τε καὶ πάσας, ἱστορας ποιούμενος, ἐπιτελέα ποιήσιν κατὰ δύναμιν καὶ κρίσιν ἐμὴν ὄρκον τόνδε καὶ ξυγγραφὴν τήνδε.

Ἠγήσασθαι μὲν τὸν διδάξαντά με τὴν τέχνην ταύτην ἴσα γενέτησιν ἐμοῖσι, καὶ βίου κοινώσασθαι, καὶ χρεῶν χρηρίζοντι μετάδοσιν ποιήσασθαι, καὶ γένος τὸ ἐξ ωὔτεου ἀδελφοῖς ἴσον ἐπικρινέειν ἄρρεσι, καὶ διδάξειν τὴν τέχνην ταύτην, ἣν χρηρίζωσι μανθάνειν, ἄνευ μισθοῦ καὶ ξυγγραφῆς, παραγγελίης τε καὶ ἀκροήσιος καὶ τῆς λοιπῆς ἀπάσης μαθήσιος μετάδοσιν ποιήσασθαι υἱοῖσί τε ἐμοῖσι, καὶ τοῖσι τοῦ ἐμὲ διδάξαντος, καὶ μαθηταῖσι συγγεγραμμένοισί τε καὶ ὠρκισμένοις νόμῳ ἰητρικῷ, ἄλλῳ δὲ οὐδενί.

Διαιτήμασί τε χρήσομαι ἐπ' ὠφελείῃ καμνόντων κατὰ δύναμιν καὶ κρίσιν ἐμὴν, ἐπὶ δηλήσει δὲ καὶ ἀδίκῃ εἴρξειν.

Οὐ δώσω δὲ οὐδὲ φάρμακον οὐδενὶ αἰτηθεὶς θανάσιμον, οὐδὲ ὑφηγήσομαι ξυμβουλίην τοιήνδε. Ὅμοίως δὲ οὐδὲ γυναικὶ πεσσὸν φθορίον δώσω. Ἄγνων δὲ καὶ ὀσίως διατηρήσω βίον τὸν ἐμὸν καὶ τέχνην τὴν ἐμήν.

Οὐ τεμέω δὲ οὐδὲ μὴν λιθιῶντας, ἐκχωρήσω δὲ ἐργάτησιν ἀνδράσι πρήξιος τῆσδε.

Ἐς οἰκίας δὲ ὀκόσας ἂν ἐσίω, ἐσελεύσομαι ἐπ' ὠφελείῃ καμνόντων, ἐκτὸς ἐὼν πάσης ἀδίκης ἐκουσίης καὶ φθορίης, τῆς τε ἄλλης καὶ ἀφροδισίων ἔργων ἐπὶ τε γυναικείων σωματῶν καὶ ἀνδρῶν, ἐλευθέρων τε καὶ δούλων.

Ἄ δ' ἂν ἐν θεραπείῃ ἦ ἴδω, ἦ ἀκούσω, ἦ καὶ ἄνευ θεραπήης κατὰ βίον ἀνθρώπων, ἃ μὴ χρή ποτε ἐκλαλέεσθαι ἔξω, σιγήσομαι, ἄρρητα ἠγεύμενος εἶναι τὰ τοιαῦτα.

Ὅρκον μὲν οὖν μοι τόνδε ἐπιτελέα ποιέοντι, καὶ μὴ ξυγγέοντι, εἴη ἐπαύρασθαι καὶ βίου καὶ τέχνης δοξαζομένῳ παρὰ πᾶσιν ἀνθρώποις ἐς τὸν αἰεὶ χρόνον. παραβαίνοντι δὲ καὶ ἐπιορκοῦντι, τάναντία τουτέων.

Περίληψη

Η IL-23 είναι μια κυτταροκίνη που ανήκει στην οικογένεια κυτταροκινών της IL-12 με αμφιλεγόμενο ρόλο στον καρκίνο, αφού μελέτες δείχνουν ότι κάποιες από τις δράσεις της προωθούν, ενώ άλλες αναστέλλουν την ανάπτυξη των καρκινικών κυττάρων. Διάφορες προκλινικές μελέτες υποστηρίζουν την αντιλευχαιμική δράση της IL-23 σε κύτταρα Β-ΟΛΛ της παιδικής ηλικίας. Ο πλακουντιακός αυξητικός παράγοντας (PIGF) είναι ένας αγγειογενετικός παράγοντας που ανήκει στην οικογένεια του VEGF. Αν και ο ρόλος του στην φυσιολογική ανάπτυξη του αγγειακού δικτύου είναι περιορισμένος, ο PIGF διαδραματίζει έναν σημαντικό ρόλο σε διάφορες παθολογικές καταστάσεις, συμπεριλαμβανομένων και των αιματολογικών κακοηθειών. Η σύνδεση του PIGF με την διαλυτή μορφή του υποδοχέα VEGFR-1 (sFlt-1) λειτουργεί ως ένας αντί-αγγειογενετικός μηχανισμός, αφού δεν επιτρέπει την ενδοκυττάρια μετάδοση του σήματος. Η μελέτη μας συμπεριέλαβε 65 παιδιά με οξεία λευχαιμία [59 παιδιά με οξεία λεμφοβλαστική λευχαιμία (ΟΛΛ) και 6 παιδιά με οξεία μυελογενή λευχαιμία (ΟΜΛ)] και 27 υγιείς μάρτυρες. Χρησιμοποιώντας την ανοσοενζυμική μέθοδο ELISA, προσδιορίσαμε τα επίπεδα της IL-23, του PIGF και του sFlt-1 στο περιφερικό αίμα και τον μυελό των οστών των ασθενών κατά την διάγνωση και κατά την ολοκλήρωση της θεραπείας εφόδου. Τα επίπεδα της IL-23 στο περιφερικό αίμα ήταν χαμηλότερα στους ασθενείς με λευχαιμία σε σύγκριση με τους υγιείς μάρτυρες. Στο σύνολο των ασθενών με λευχαιμία, τα επίπεδα της IL-23 ήταν σημαντικά χαμηλότερα κατά την διάγνωση, τόσο στο περιφερικό αίμα ($p=0.015$), όσο και στον μυελό των οστών ($p=0.037$), σε σύγκριση με τα αντίστοιχα επίπεδα κατά το τέλος της θεραπείας εφόδου. Το εύρημα αυτό ήταν παρόν τόσο στους ασθενείς με ΟΛΛ όσο και σε αυτούς με ΟΜΛ. Τα επίπεδα του PIGF στο περιφερικό αίμα ήταν σημαντικά υψηλότερα τόσο στους ασθενείς με ΟΛΛ ($p=0.006$), όσο και στους ασθενείς με ΟΜΛ ($p=0.004$), σε σχέση με τους υγιείς μάρτυρες. Στους ασθενείς με ΟΛΛ, τα επίπεδα του PIGF στο περιφερικό αίμα κατά την διάγνωση ήταν σημαντικά υψηλότερα σε όσους είχαν θετική υπολειπόμενη νόσο (MRD) στο τέλος της θεραπείας εφόδου, σε σχέση με όσους είχαν αρνητική MRD ($p=0.008$). Σε ασθενείς με ΟΜΛ, τα επίπεδα του PIGF στο περιφερικό αίμα κατά την διάγνωση ήταν σημαντικά υψηλότερα στους ασθενείς με αριθμό λευκών αιμοσφαιρίων μεγαλύτερο από 20.000/μλ, σε σχέση με όσους είχαν αριθμό λευκών αιμοσφαιρίων μικρότερο από 20.000/μλ ($p=0.049$). Τα επίπεδα του sFlt-1 στο περιφερικό αίμα ήταν επίσης υψηλότερα τόσο στους ασθενείς με ΟΛΛ ($p<0.001$) όσο και στους ασθενείς με ΟΜΛ ($p=0.065$) σε σχέση με τους υγιείς μάρτυρες. Το υψηλό λευχαιμικό φορτίο κατά την διάγνωση συσχετίστηκε με χαμηλότερα επίπεδα IL-23, τα οποία αυξήθηκαν με την ύφεση της νόσου. Λαμβάνοντας υπόψιν την πιθανή αντιλευχαιμική δράση της IL-23, η αύξηση της

συγκέντρωσης της IL-23 κατά την ύφεση της νόσου, καταδεικνύει έναν πιθανά ωφέλιμο ρόλο της IL-23 στην λευχαιμία της παιδικής ηλικίας. Τα αυξημένα επίπεδα του PlGF στους ασθενείς με λευχαιμία είναι ενδεικτικά της συμμετοχής του PlGF στην παθοφυσιολογία της λευχαιμίας. Επιπλέον, η συσχέτιση των επιπέδων του PlGF με ανεξάρτητους προγνωστικούς δείκτες για την λευχαιμία, όπως η ελάχιστη υπολειπόμενη νόσος στο τέλος της θεραπείας εφόδου και ο αριθμός των λευκών αιμοσφαιρίων κατά την διάγνωση, είναι ενδεικτική της προγνωστικής αξίας του PlGF στην λευχαιμία της παιδικής ηλικίας.

Abstract

IL-23 is an IL-12 cytokine family member with pleiotropic functions that regulates tumor growth in various cancer types, exhibiting both anti-tumorigenic and pro-tumorigenic properties. Preclinical studies have shown a potential anti-leukemic action on childhood B-ALL cells. Placental Growth Factor (PlGF) is an angiogenic factor that is a member of the VEGF family. Although PlGF appears to be redundant for normal vascular development, it has a significant role in various pathologic conditions, including hematologic malignancies. The binding of PlGF to the soluble form of the VEGFR-1 receptor (sFlt-1) serves as an anti-angiogenic regulatory mechanism, since it does not allow the intracellular signal transmission. The study involved 65 children with acute leukemia [59 patients with acute lymphoblastic leukemia (ALL) and 6 patients with acute myeloid leukemia (AML)] and 27 healthy controls. Using an enzyme-linked immunosorbent assay, we aimed to determine the IL-23, PlGF and sFlt-1 levels in the peripheral blood (PB) and bone marrow (BM) of patients at diagnosis and at the end of the induction therapy (EIT). PB IL-23 levels were lower in leukemia patients compared to the healthy controls. In all acute leukemia patients, IL-23 levels were significantly lower at diagnosis both in PB ($p=0.015$) and in BM ($p=0.037$) compared to the PB and BM concentrations at the EIT. The same pattern was present in both subgroups of ALL and AML patients. PB PlGF levels were significantly higher in both ALL ($p=0.006$) and AML ($p=0.004$) patients compared to healthy controls. In ALL patients, PB PlGF levels at diagnosis were significantly higher in patients with positive MRD at the EIT compared to patients with negative MRD ($p=0.008$). In AML patients, PB PlGF levels at diagnosis were significantly higher in patients with WBC count over $20.000/\mu\text{l}$ compared to those with WBC count below $20.000/\mu\text{l}$ ($p=0.049$). PB sFlt-1 levels were also higher in both ALL ($p<0.001$) and AML ($p=0.065$) patients compared to healthy controls. The high leukemic burden at diagnosis was related with lower IL-23 levels, which were increased with the disease remission. Considering the anti-leukemic potential of this cytokine, the elevation of the IL-23 concentration at the disease remission, indicates a beneficial role of IL-23 in pediatric acute leukemia. The increased PlGF levels in leukemia patients are indicative of the involvement of PlGF in leukemia's pathophysiology. Moreover, the correlation between PlGF levels and independent prognostic factors for leukemia, such as the MRD and WBC count, is indicative of the PlGF prognostic value.

Περιεχόμενα

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1. Η ιστορία της λευχαιμίας.....	2
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2. Η λευχαιμία της παιδικής ηλικίας.....	7
2.1. Γενική περιγραφή της νόσου.....	7
2.2. Η οξεία λεμφοβλαστική λευχαιμία.....	9
2.2.1. Οι κλινικές εκδηλώσεις της οξείας λεμφοβλαστικής λευχαιμίας.....	10
2.2.2. Η ταξινόμηση της οξείας λεμφοβλαστικής λευχαιμίας.....	13
2.2.3. Οι γενετικές ανωμαλίες στην οξεία λεμφοβλαστική λευχαιμία.....	16
2.2.4. Η ταξινόμηση σε προγνωστικές ομάδες.....	20
2.2.5. Η θεραπεία της οξείας λεμφοβλαστικής λευχαιμίας.....	21
2.3. Η οξεία μυελογενής λευχαιμία.....	27
2.3.1. Η κλινική εικόνα της οξείας μυελογενούς λευχαιμίας.....	27
2.3.2. Η ταξινόμηση της οξείας μυελογενούς λευχαιμίας.....	28
2.3.3. Οι κυτταρογενετικές ανωμαλίες στην οξεία μυελογενή λευχαιμία.....	30
2.3.4. Η θεραπεία της οξείας μυελογενούς λευχαιμίας.....	33
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3. Η κυτταρομετρία ροής στην παιδιατρική αιματολογία-ογκολογία.....	35
3.1. Η αρχή της μεθόδου της κυτταρομετρίας ροής.....	35
3.2. Οι εφαρμογές της κυτταρομετρίας ροής στην παιδιατρική αιματολογία-ογκολογία.....	38
3.3. Η ελάχιστη υπολειπόμενη νόσος στην οξεία λεμφοβλαστική λευχαιμία.....	43
3.4. Η ελάχιστη υπολειπόμενη νόσος στην οξεία μυελογενή λευχαιμία.....	47
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4. Οι κυτταροκίνες της οικογένειας της IL-12 στον καρκίνο.....	51
4.1. Ο ρόλος των προ-φλεγμονωδών και αντί-φλεγμονωδών κυτταροκινών στον καρκίνο.....	51
4.2. Η οικογένεια κυτταροκινών της IL-12.....	55
4.3. Ο ρόλος της IL-23 στον καρκίνο.....	58
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5. Ο ρόλος της αγγειογένεσης στον καρκίνο.....	61
5.1. Γενικά στοιχεία για την αγγειογένεση.....	61
5.2. Ο ρόλος της αγγειογένεσης στην λευχαιμία.....	63
5.3. Τα μέλη της οικογένειας VEGF και οι υποδοχείς τους.....	65
5.4. Ο πλακουντιακός αυξητικός παράγοντας PlGF.....	70

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6. Σκοπός της παρούσας μελέτης.....	75
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7. Υλικό-Μεθοδολογία.....	77
7.1. Ασθενείς και υγιείς μάρτυρες.....	77
7.2. Δήλωση ηθικής και δεοντολογίας.....	78
7.3. Συλλογή των δειγμάτων περιφερικού αίματος και μυελού των οστών.....	79
7.4. Προσδιορισμός της συγκέντρωσης της IL-23.....	80
7.5. Προσδιορισμός της συγκέντρωσης του PIGF.....	81
7.6. Προσδιορισμός της συγκέντρωσης του sFLT-1.....	81
7.7. Στατιστική ανάλυση.....	82
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8. Αποτελέσματα.....	83
8.1. Η μελέτη της IL-23.....	83
8.1.1. Σύγκριση της συγκέντρωσης της IL-23 με τα δημογραφικά και κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά των ασθενών.....	83
8.1.2. Σύγκριση της συγκέντρωσης της IL-23 κατά την διάγνωση στο περιφερικό αίμα ασθενών με λευχαιμία σε σχέση με τους υγιείς μάρτυρες.....	85
8.1.3. Σύγκριση της συγκέντρωσης της IL-23 στο περιφερικό αίμα και τον μυελό των οστών ασθενών με λευχαιμία κατά την διάγνωση σε σχέση με την ολοκλήρωση της θεραπείας εφόδου.....	86
8.2. Η μελέτη του PIGF.....	90
8.2.1. Σύγκριση της συγκέντρωσης του PIGF με τα δημογραφικά και κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά των ασθενών.....	90
8.2.2. Σύγκριση της συγκέντρωσης του PIGF κατά την διάγνωση στο περιφερικό αίμα ασθενών με λευχαιμία σε σχέση με τους υγιείς μάρτυρες.....	93
8.2.3. Σύγκριση της συγκέντρωσης του PIGF στον μυελό των οστών των ασθενών με λευχαιμία κατά την διάγνωση σε σχέση με την συγκέντρωση μετά την ολοκλήρωση της θεραπείας εφόδου.....	94
8.3. Η μελέτη του sFLT-1.....	95
8.3.1. Σύγκριση της συγκέντρωσης του sFLT-1 με τα δημογραφικά και κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά των ασθενών.....	95
8.3.2. Σύγκριση της συγκέντρωσης του sFLT-1 κατά την διάγνωση στο περιφερικό αίμα ασθενών με λευχαιμία σε σχέση με την συγκέντρωση στους υγιείς μάρτυρες.....	97
8.3.3. Σύγκριση της συγκέντρωσης του sFLT-1 στον μυελό των οστών των ασθενών με λευχαιμία κατά την διάγνωση σε σχέση με την συγκέντρωση μετά την ολοκλήρωση της θεραπείας εφόδου.....	98
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 9. Συμπεράσματα.....	100

9.1. Χαμηλά επίπεδα IL-23 στο περιφερικό αίμα και τον μυελό των οστών σε παιδιά με οξεία λευχαιμία κατά την διάγνωση, τα οποία αυξάνονται με την εξάλειψη του λευχαιμικού φορτίου, στο τέλος της θεραπείας εφόδου.....	100
9.2. Υψηλότερα επίπεδα PlGF και sFLT-1 σε παιδιά με οξεία λευχαιμία σε σχέση με τους υγιείς μάρτυρες.....	109
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 10. Βιβλιογραφία.....	117

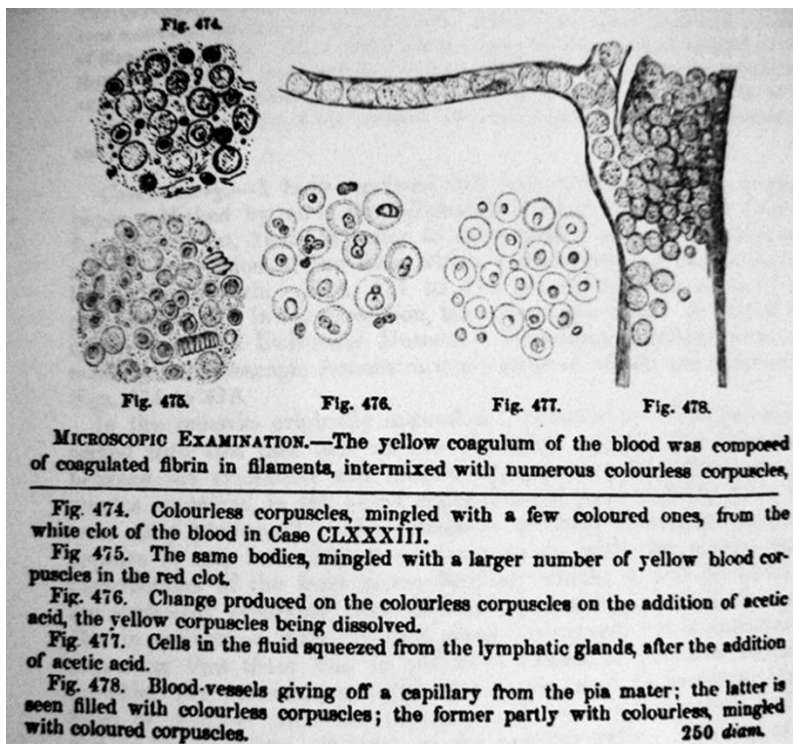
ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1. Η ΙΣΤΟΡΙΑ ΤΗΣ ΛΕΥΧΑΙΜΙΑΣ

Η παλαιότερη περιγραφή ασθενούς με καρκίνο αποδίδεται στην αρχαία Αίγυπτο και χρονολογείται γύρω στο 1600 π.Χ. Ο όρος «καρκίνος» αποδίδεται στον αρχαίο Έλληνα ιατρό Ιπποκράτη (460-370 π.Χ.), ο οποίος παρατήρησε ότι τα αγγεία γύρω από έναν κακοήγη όγκο ομοιάζουν με τις δαγκάνες του κάβουρα (καρκίνος), και ονόμασε την ασθένεια καρκίνο. Η επισκόπηση του αίματος δια γυμνού οφθαλμού μετά από φλεβοτομή εφαρμόστηκε από την αρχαιότητα. Οι αρχαίοι αναγνώρισαν τη σημασία του αίματος ως ζωογόνου ουσίας, πιστεύοντας ότι συγκρατεί τη ζωτική δύναμη του σώματος. Η επιστημονική μελέτη του αίματος ωστόσο, έπρεπε να περιμένει αρκετούς αιώνες, έως την ανακάλυψη του μικροσκοπίου. Ενώ οι μεγεθυντικοί φακοί ήταν γνωστοί στον φιλόσοφο και μελετητή της φυσικής ιστορίας Roger Bacon ήδη από τον 13^ο μ.Χ. αιώνα, φακοί επαρκούς ποιότητας για επιστημονική χρήση δεν θα ήταν διαθέσιμοι για άλλους τρεις αιώνες. Η ανακάλυψη του σύνθετου μικροσκοπίου το 1590 από τους Hans και Zacharias Janssen κατέστησε δυνατή την μελέτη των συστατικών του αίματος. Το 1658, ο Ολλανδός φυσιδίφης Jan Swammerdam (1637-1680) ήταν ο πρώτος ο οποίος παρατήρησε τα ερυθρά αιμοσφαίρια στο μικροσκόπιο. Τα λευκά αιμοσφαίρια αναγνωρίστηκαν για πρώτη φορά από τον Joseph Lieutaud (1703-1780).

Όπως συμβαίνει και με τις περισσότερες ανακαλύψεις στην ιατρική, δεν είναι απολύτως ξεκάθαρο ποιος ήταν ο πρώτος που περιέγραψε την λευχαιμία. Στις αρχές του 19^{ου} αιώνα έγινε δημοσίευση με μικρό αριθμό ασθενών, στους οποίους παρατηρήθηκαν ασυνήθιστες αλλοιώσεις στην σύσταση του αίματος. Η πρώτη περιγραφή ασθενούς με λευχαιμία αποδίδεται στον καθηγητή χειρουργικής στο Πανεπιστήμιο του Παρισιού, Alfred Armand Louis Marie Velpeau (1795–1867). Ο Velpeau το 1827 περιέγραψε μια εξηντατριάχρονη ασθενή η οποία υπέφερε από πυρετό, εκσεσημασμένη διόγκωση κοιλίας, αδυναμία και νεφρολιθίαση. Μετά τον θάνατο της ασθενούς, ο Velpeau διενήργησε αυτοψία, κατά την οποία το εξαιρετικά διογκωμένο ήπαρ και σπλήνας του τράβηξαν την προσοχή. Ένα άλλο ενδιαφέρον εύρημα στην ίδια ασθενή ήταν η ασυνήθιστη σύσταση του αίματος, το οποίο ο Velpeau περιέγραψε ως αίμα πηχτό σαν χυλό. Το 1845, ο παθολόγος John Hughes Bennett (1812–1875) εξέτασε το σώμα ενός 28χρονου ασθενή με ηπατοσπληνική διόγκωση. Η

αυτοψία ανέδειξε γενικευμένη λεμφαδενοπάθεια σε όλο το σώμα. Η εξέταση του αίματος στο μικροσκόπιο ανέδειξε πολυάριθμα άχρωμα σωματίδια (λευκά αιμοσφαίρια) τα οποία ποικίλαν σε μέγεθος, είχαν στρογγυλό σχήμα, και ο πυρήνας τους αποτελούνταν από ένα μεγάλο και μερικές φορές δύο ή τρία μικρότερα κοκκία, εικόνα η οποία σήμερα θα παρέπεμπε σε χρόνια κοκκιοκυτταρική λευχαιμία [1]. Ο όρος «λευχαιμία» αποδίδεται στον Γερμανό παθολόγο Rudolf Virchow ο οποίος αρχικά την απέδωσε ως “weisses blut” (λευκό αίμα). Το 1850, ο Henry Fuller, παθολόγος στο νοσοκομείο St. George’s του Λονδίνου, περιέγραψε για πρώτη φορά την νόσο σε παιδί. Το περιστατικό αφορούσε ένα κορίτσι 9 ετών με σπληνομεγαλία, συχνές αιμορραγίες και σπογγώδη ούλα. Η συσχέτιση της νόσου με τον μυελό των οστών έγινε το 1868, όταν ο Ernst Neumann (1834-1918), καθηγητής παθολογικής ανατομίας στο Königsberg, παρατήρησε αλλοιώσεις στον μυελό των οστών ασθενών με λευχαιμία. Σημαντικό ορόσημο στην κατανόηση της παθοφυσιολογίας της λευχαιμίας αποτέλεσε το 1877, όταν ο Γερμανός ιατρός Paul Ehrlich ανέπτυξε την τεχνική της χρώσης ταινιών αίματος, που του επέτρεψε να περιγράψει τις διαφορές μεταξύ των φυσιολογικών και παθολογικών λευκών αιμοσφαιρίων, και εισήγαγε τους όρους οξεόφιλο (αργότερα μετονομάστηκε σε ηωσινόφιλο), βασεόφιλο και ουδετερόφιλο για να περιγράψει τους τρεις τύπους κοκκιοκυττάρων. Το 1900 ο Ελβετός αιματολόγος Otto Naegeli διαχώρισε την λεμφοβλάστη από τη μυελοβλάστη, και το 1913 η νόσος ταξινομήθηκε σε οξεία λεμφοβλαστική, χρόνια λεμφοβλαστική, οξεία μυελογενή και χρόνια μυελογενή λευχαιμία [1-4].



Εικόνα 1. Τα «άχρωμα σωματίδια» που περιέγραψε ο Bennet στο αίμα ασθενούς με λευχαιμία.

Όπως ήταν αναμενόμενο, μετά την αναγνώριση της νόσου, αλλά και της δυσκολίας για ουσιαστική θεραπευτική παρέμβαση, έγιναν προσπάθειες αναζήτησης θεραπευτικών λύσεων. Οι προσπάθειες αυτές συμπεριέλαβαν την χορήγηση μετάλλων, όπως το αρσενικό, και αργότερα τις μεταγίσεις αίματος και τη χορήγηση ακτινοθεραπείας. Εξαιρετικής σημασίας στην προσπάθεια ανάπτυξης φαρμάκων έναντι της λευχαιμίας αποτέλεσε το έργο του Sidney Farber, παιδίατρου στο Children's Hospital της Βοστώνης. Ο Farber έχοντας υπόψη ότι η αναιμία των μη σιτιζόμενων με λαχανικά παιδιών μπορεί να βελτιωθεί με την χορήγηση φυλλικού οξέος, χορήγησε φυλλικό οξύ σε παιδιά με λευχαιμία. Ωστόσο, αυτό οδήγησε σε ταχύτερη εξέλιξη της νόσου και επίσπευση του θανάτου. Η παρατήρηση ότι το φυλλικό οξύ επιταχύνει τον πολλαπλασιασμό των λευχαιμικών κυττάρων, οδήγησε στην σκέψη ότι ένας αναστολέας του φυλλικού οξέος πιθανώς να αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό τους, και έτσι γεννήθηκε ο αντιμεταβολίτης του φυλλικού οξέος, αμινοπτερίνη. Ο Farber άρχισε να χορηγεί αμινοπτερίνη σε παιδιά με λευχαιμία, και το 1948 δημοσίευσε στο New England Journal of Medicine την πρώτη αναφορά ανταπόκρισης των 10 από 16

παιδιών με λευχαιμία στην αμινοπτερίνη. Στα επόμενα χρόνια, ως αναστολέας φυλλικού οξέος θα χορηγείται η αμεθοπτερίνη (μεθοτρεξάτη). Το 1950 ανακαλύφθηκε η θεραπευτική αξία των αδρενοκορτικοστεροειδών, και ιδιαίτερα της πρεδνιζόνης, η οποία έγινε το ευρύτερα χρησιμοποιούμενο φάρμακο για την επίτευξη της ύφεσης σε παιδιά με οξεία λευχαιμία. Λίγα χρόνια αργότερα, χρησιμοποιήθηκε η 6-μερκαπτοπουρίνη με επίσης θετικά αποτελέσματα στην επιβίωση των ασθενών. Στο θεραπευτικό οπλοστάσιο της λευχαιμίας προστέθηκαν σταδιακά περισσότερα φάρμακα, όπως αναφέρονται στον παρακάτω πίνακα χρονολογικά, με βάση την χορήγηση άδειας από τον FDA.

Αδειοδότηση (FDA) αντιλευχαιμικών φαρμάκων	
1953	Μερκαπτοπουρίνη, Μεθοτρεξάτη
1955	Πρεδνιζόνη
1958	Δεξαμεθαζόνη
1959	Κυκλοφωσφαμίδη
1963	Βινκριστίνη
1969	Κυτοσίνη-Αραβινοσίδη
1978	Ασπαραγινάση
1979	Νταουνορουμπικίνη
1983	Ετοποσίδη
1987	Μιτοξαντρόνη
1994	Πεγκυλιωμένη Ασπαραγινάση
1995	Τρανς-Ρετινοϊκό Οξύ
2000	Τριοξειδίο Αρσενικού
2001	Ιματινίμπη
2004	Κλοφαραμπίνη
2005	Νελαραμπίνη

Η μεγάλη πρόοδος στην θεραπεία της λευχαιμίας δεν προέκυψε μόνο ως αποτέλεσμα της ανάπτυξης νέων χημειοθεραπευτικών φαρμάκων και του σχεδιασμού θεραπευτικών πρωτοκόλλων, αλλά και της τεράστιας βελτίωσης των υποστηρικτικών θεραπειών, όπως η μετάγγιση αίματος, η χορήγηση παραγώγων αίματος και τα

αντιμικροβιακά φάρμακα. Η πρώτη μετάγγιση αίματος σε ασθενή με λευχαιμία πραγματοποιήθηκε το 1873. Το 1937 ιδρύθηκε η πρώτη νοσοκομειακή τράπεζα αίματος και παραγώγων αίματος.

Το 1957 ο Donald Thomas περιέγραψε την πρώτη ενδοφλέβια έγχυση μυελού των οστών σε άνθρωπο. Τις επόμενες δεκαετίες παρατηρήθηκε τεράστια πρόοδος στην μεταμόσχευση μυελού των οστών σε ασθενείς με οξεία λευχαιμία, σε περιπτώσεις ανθεκτικής νόσου ή υποτροπής της νόσου. Παράλληλα, η δωρεά μυελού των οστών εκτός από τα αδέρφια των ασθενών, επεκτάθηκε και σε εθελοντές συμβατούς δότες, και το πρώτο μητρώο δοτών μυελού των οστών ιδρύθηκε στο Ηνωμένο Βασίλειο το 1974.

Τις τελευταίες δεκαετίες, η μεγάλη πρόοδος στην θεραπεία της λευχαιμίας μπορεί να αποδοθεί στην αλματώδη πρόοδο της τεχνολογίας και στην καλύτερη κατανόηση της βιολογίας της λευχαιμίας που αυτή επέφερε. Η αναγνώριση των γενετικών ανωμαλιών που σχετίζονται με την λευχαιμία, βοήθησε στην ταξινόμηση των ασθενών σε ομάδες κινδύνου, ανάλογα με τα κυτταρογενετικά ευρήματα, και συνεπώς στην καλύτερη επιλογή θεραπείας. Η ανάπτυξη της τεχνικής της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) συνέβαλε στον ποσοτικό προσδιορισμό της υπολειπόμενης νόσου, και συνεπώς, στον καλύτερο σχεδιασμό της θεραπείας. Το 2008, η ΟΜΛ έγινε η πρώτη ασθένεια της οποίας το καρκινικό γονιδίωμα χαρτογραφήθηκε πλήρως. Το γονιδίωμα των λευχαιμικών κυττάρων συγκρίθηκε με αυτό των υγιών δερματικών κυττάρων, και έγινε εμφανές ότι αρκετά από τα γονίδια των υγιών κυττάρων είχαν μεταλλαχθεί στα λευχαιμικά κύτταρα, ακόμη και γονίδια που μέχρι πρόσφατα δεν θεωρούνταν ότι σχετίζονται με την νόσο [5-8].

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2. Η ΛΕΥΧΑΙΜΙΑ ΤΗΣ ΠΑΙΔΙΚΗΣ ΗΛΙΚΙΑΣ

2.1. Γενική περιγραφή της νόσου.

Οι νεοπλασίες της παιδικής ηλικίας είναι σπάνιες και η επίπτωσή τους είναι περίπου 1 ασθενής ανά 7.000 παιδιά ηλικίας μικρότερης των 15 ετών. Σε αντίθεση με τους ενήλικες, στους οποίους η πλειοψηφία των κακοηθειών είναι συμπαγείς όγκοι, στα παιδιά, το 40% των νεοπλασιών οφείλεται στις αιματολογικές κακοήθειες (λευχαιμία και λέμφωμα). Η λευχαιμία αποτελεί την συχνότερη κακοήθεια στα παιδιά και αντιπροσωπεύει περίπου το 30% των νεοπλασιών της παιδικής ηλικίας. Η λευχαιμία αποτελεί νεοπλασία του αιμοποιητικού συστήματος και χαρακτηρίζεται από διαταραχή στον πολλαπλασιασμό, την διαφοροποίηση και τον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο των κυττάρων. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την παρεκτόπιση των φυσιολογικών κυτταρικών σειρών στον μυελό των οστών από τα παθολογικά κύτταρα και την εκδήλωση μυελικής ανεπάρκειας (αναιμία, λευκοπενία και θρομβοπενία) αλλά και εξωμυελική νόσο λόγω της διήθησης διάφορων οργάνων (λεμφαδένες, ήπαρ, σπλήνας, όρχεις, εγκέφαλος, μήνιγγες και δέρμα) από λευχαιμικά κύτταρα [9].

Ιστορικά, οι λευχαιμίες αρχικά ταξινομήθηκαν σε 4 ομάδες με βάση την κλινική προβολή της νόσου και τα μορφολογικά χαρακτηριστικά των λευχαιμικών κυττάρων: την οξεία λεμφοβλαστική λευχαιμία (ΟΛΛ), την οξεία μυελογενή λευχαιμία (ΟΜΛ), την χρόνια λεμφοβλαστική λευχαιμία (ΧΛΛ) και την χρόνια μυελογενή λευχαιμία (ΧΜΛ). Με βάσει τις νεότερες γνώσεις από τα μορφολογικά, ανοσολογικά, κυτταρογενετικά και μοριακά χαρακτηριστικά των λευχαιμικών κυττάρων, προκύπτει ότι οι λευχαιμίες αποτελούν μια πιο ετερογενή ομάδα κακοηθειών από ότι αρχικά προτάθηκε με βάσει την αρχική ταξινόμηση. Εντούτοις, η ταξινόμηση των λευχαιμιών στις 4 ομάδες χρησιμοποιείται ακόμη και είναι ιδιαίτερα χρήσιμη στην κλινική πράξη. Οι χρόνιες λευχαιμίες, αν και θεωρητικά μπορούν να προσβάλλουν άτομα οποιασδήποτε ηλικίας, είναι πολύ συχνότερες στους ενήλικες. Τείνουν να εξελίσσονται πιο αργά από ότι οι οξείες λευχαιμίες, αφού μπορεί να χρειαστούν μήνες ή και χρόνια για να εκδηλωθούν κλινικά. Η ΧΜΛ, αν και σπάνια, μπορεί να εμφανιστεί στην παιδική ηλικία, και η αντιμετώπισή της είναι ίδια με αυτή των ενηλίκων. Η ΧΛΛ

είναι εξαιρετικά σπάνια στα παιδιά. Οι οξείες λευχαιμίες αποτελούν το 30% των νεοπλασιών της παιδικής ηλικίας. Ταξινομούνται στην ΟΛΛ, η οποία είναι η συχνότερη μορφή και αντιπροσωπεύει το 80% των λευχαιμιών της παιδικής ηλικίας και την ΟΜΛ η οποία αποτελεί το 15-20% των λευχαιμιών αυτή της ηλικίας. Οι χρόνιες λευχαιμίες αποτελούν το 5% των λευχαιμιών της παιδικής ηλικίας. Οι οξείες λευχαιμίες χαρακτηρίζονται από πιο επιθετικό χαρακτήρα σε σχέση με τις χρόνιες λευχαιμίες, και εάν δεν θεραπευτούν, εξελίσσονται ραγδαία σε θανατηφόρες. Παρόλα αυτά, σήμερα, με συνδυασμένα πρωτόκολλα χημειοθεραπείας, επιτυγχάνονται υψηλά ποσοστά επιβίωσης [9-11].

Στην παρούσα μελέτη, θα αναφερθούμε μόνο στις οξείες λευχαιμίες αφού αποτελούν την συχνότερη μορφή λευχαιμίας της παιδικής ηλικίας.

Η αιτία της λευχαιμίας παραμένει άγνωστη, αλλά φαίνεται ότι γενετικοί αλλά και περιβαλλοντικοί παράγοντες συνεισφέρουν στην ανάπτυξή της. Εκτεταμένες έρευνες προσπάθησαν να διερευνήσουν τους γενετικούς και περιβαλλοντικούς παράγοντες, εντούτοις σε μικρό μόνο ποσοστό οι αιτιολογικοί παράγοντες ανιχνεύονται στις λευχαιμίες. Ως προς τους γενετικούς παράγοντες, παιδιά με συγκεκριμένες χρωμοσωμικές διαταραχές, γενετικά σύνδρομα, παιδιά με ανοσοανεπάρκεια, συγγενή ή επίκτητη, έχουν αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης λευχαιμίας. Το πιο συχνό σύνδρομο το οποίο σχετίζεται με αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης λευχαιμίας είναι το σύνδρομο Down, το οποίο χαρακτηρίζεται από 15 φορές μεγαλύτερο σχετικό κίνδυνο από ότι ο γενικός πληθυσμός. Τα παιδιά με σύνδρομο Down έχουν αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης τόσο ΟΛΛ όσο και ΟΜΛ και έχει εκτιμηθεί ότι το 1% των παιδιών με σύνδρομο Down θα αναπτύξει λευχαιμία έως την ηλικία των 5 ετών [12, 13]. Άλλες συγγενείς διαταραχές οι οποίες σχετίζονται με αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης λευχαιμίας είναι διάφορες μορφές ανοσοανεπάρκειας, όπως η αταξία-τηλαγγειεκτασία, το σύνδρομο Wiskott-Aldrich καθώς και επίκτητες ανοσοανεπάρκειες σε ασθενείς με AIDS ή μεταμόσχευση συμπαγών οργάνων ή μυελού των οστών. Επίσης, αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης λευχαιμίας παρουσιάζει η αναιμία Fanconi, το σύνδρομο Bloom και το σύνδρομο Klinefelter [10, 14-16].

Περιβαλλοντικοί παράγοντες, όπως η έκθεση σε μεγάλες δόσεις ιονίζουσας ακτινοβολίας, έχουν επιβεβαιωμένο ρόλο στην λευχαιμογένεση. Χημικοί παράγοντες έχουν επίσης συσχετιστεί με την παθογένεση της λευχαιμίας, όπως για παράδειγμα η έκθεση σε βενζόλιο με την ανάπτυξη της ΟΜΛ. Η έκθεση του παιδιού στον καπνό του τσιγάρου, σε εντομοκτόνα και σε οργανικούς διαλύτες έχει επίσης συσχετιστεί με την ανάπτυξη λευχαιμίας [17-19]. Διάφορες ιογενείς λοιμώξεις έχουν ενοχοποιηθεί για την ανάπτυξη σπάνιων μορφών λευχαιμίας στον άνθρωπο, όμως δεν έχει αποδειχθεί ότι κάποιος ιογενής παράγοντας έχει καθοριστικό ρόλο στην ανάπτυξη των πιο συχνών υποτύπων της λευχαιμίας της παιδικής ηλικίας. Η αυξημένη επίπτωση της ΟΛΛ σε παιδιά που διαμένουν σε αναπτυγμένες χώρες έδωσε αφορμή να σχεδιαστούν μελέτες για την πιθανή συσχέτιση της ανάπτυξης ΟΛΛ με την συχνότητα των λοιμώξεων στην βρεφική και πρώιμη παιδική ηλικία. Η παρατήρηση ότι βρέφη και παιδιά προσχολικής ηλικίας με μεγαλύτερη κοινωνική απομόνωση και μικρότερη έκθεση σε λοιμογόνους παράγοντες στην πρώιμη παιδική ηλικία είχαν μεγαλύτερο κίνδυνο ανάπτυξης λευχαιμίας, οδήγησε στην υπόθεση ότι η απουσία ιογενών ερεθισμάτων του ανοσοποιητικού συστήματος του παιδιού πιθανώς οδηγεί σε αυξημένη προδιάθεση για ανάπτυξη λευχαιμίας. Αντιθέτως, η αυξημένη συχνότητα εμφάνισης λευχαιμίας σε παιδιά με επιβεβαιωμένη λοίμωξη κατά την νεογνική και πρώιμη βρεφική περίοδο οδήγησε στην υπόθεση ότι οι λοιμώξεις στην νεογνική και πρώιμη βρεφική ηλικία πιθανώς συνδέονται με ανώμαλη απάντηση του ανοσοποιητικού συστήματος, και αργότερα, με ανάπτυξη λευχαιμίας [16, 20-22].

2.2. Η οξεία λεμφοβλαστική λευχαιμία.

Η οξεία λεμφοβλαστική λευχαιμία (ΟΛΛ) αποτελεί την συχνότερη κακοήθεια της παιδικής ηλικίας και αντιπροσωπεύει περίπου το 80% των λευχαιμιών στα παιδιά. Αν και μπορεί να εμφανιστεί σε οποιαδήποτε ηλικία, είναι συχνότερη σε παιδιά ηλικίας 2-5 ετών, με την συχνότητα της σταδιακά να μειώνεται σε παιδιά μεγαλύτερα των 10 ετών. Η επίπτωσή της είναι μεγαλύτερη στην λευκή φυλή, καθώς επίσης και στο άρρεν φύλο [22-25]. Η ΟΛΛ προέρχεται από την κακοήθη εξαλλαγή και κλωνική αύξηση των άωρων κυττάρων της λεμφικής σειράς (λεμφοβλάστες), τα οποία καταλαμβάνουν

τον μυελό των οστών παρεκτοπίζοντας τις φυσιολογικές κυτταρικές σειρές, καθώς η λεμφοβλάστη έχει ταχύτερο ρυθμό ανάπτυξης σε σχέση με το φυσιολογικό λεμφοκύτταρο, αλλά και λόγω διαταραχών στον μηχανισμό απόπτωσης, δηλαδή στον μηχανισμό του φυσιολογικού κυτταρικού θανάτου. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την μεγαλύτερη διάρκεια ζωής της λεμφοβλάστης σε σχέση με το φυσιολογικό λεμφοκύτταρο. Οι μηχανισμοί αυτοί του ταχύτερου πολλαπλασιασμού και της μεγαλύτερης διάρκειας ζωής της λεμφοβλάστης έχουν ως αποτέλεσμα ο λευχαιμικός κλώνος να καταλαμβάνει συνεχώς μεγαλύτερο μέρος του μυελού των οστών παρεκτοπίζοντας την φυσιολογική αιμοποίηση. Η ΟΛΛ ταξινομείται κατά κύριο λόγο σε Β-ΟΛΛ και Τ-ΟΛΛ οι οποίες προέρχονται αντίστοιχα από την κλωνική εξαλλαγή του Β ή Τ λεμφοκυττάρου. Η Β-ΟΛΛ αντιπροσωπεύει περίπου το 80-85% της ΟΛΛ, ενώ η Τ-ΟΛΛ περίπου το 15%. Σπανιότερη μορφή λευχαιμίας αποτελεί η οξεία διφαινοτυπική λευχαιμία, η οποία εκφράζει δείκτες Β και Τ λεμφοκυττάρων στην ίδια λεμφοβλάστη ταυτόχρονα, και η οντότητά της αναγνωρίστηκε την τελευταία δεκαετία [10].

2.2.1. Οι κλινικές εκδηλώσεις της οξείας λεμφοβλαστικής λευχαιμίας.

Οι κλινικές εκδηλώσεις της ΟΛΛ είναι το αποτέλεσμα του πολλαπλασιασμού των λευχαιμικών κυττάρων στον μυελό των οστών και της διήθησης διαφόρων οργάνων από τα λευχαιμικά κύτταρα. Ο πολλαπλασιασμός των λευχαιμικών κυττάρων στον μυελό των οστών έχει ως αποτέλεσμα την απόθεση του υγιούς αιμοποιητικού ιστού και την μειωμένη παραγωγή φυσιολογικών λευκών αιμοσφαιρίων, ερυθρών αιμοσφαιρίων και αιμοπεταλίων. Κατά την ανάπτυξη και την διάγνωση της λευχαιμίας, οι τρεις κυτταρικές σειρές δεν διαταράσσονται ομόρροπα, και αυτό έχει ως αποτέλεσμα σε μερικές περιπτώσεις να προεξάρχει η κλινική προβολή της αναιμίας, της θρομβοπενίας ή της ουδετεροπενίας. Ως αποτέλεσμα της αναιμίας, τα παιδιά με οξεία λευχαιμία μπορεί να παρουσιάσουν ωχρότητα, εύκολη κόπωση, ατονία, δύσπνοια, ταχυκαρδία, και σε περιπτώσεις σοβαρής αναιμίας, ακόμη και συμφορητική καρδιακή ανεπάρκεια. Μερικές φορές, τα αρχικά συμπτώματα σε παιδιά με λευχαιμία οφείλονται στον χαμηλό αριθμό των φυσιολογικών λευκών αιμοσφαιρίων. με

αποτέλεσμα μεγαλύτερη επιρρέπεια σε λοιμώξεις. Ο πυρετός, με ή χωρίς εστία λοίμωξης, είναι από τις συχνότερες κλινικές εκδηλώσεις της ΟΛΛ. Οι σοβαρές λοιμώξεις, όπως είναι η σήψη ή η σοβαρή πνευμονία, συνιστούν μείζονες κλινικές εκδηλώσεις της λευχαιμίας, που μπορεί να είναι απειλητικές για την ζωή ήδη κατά την διάγνωση της λευχαιμίας. Ο κίνδυνος σήψης σχετίζεται άμεσα με τη σοβαρότητα της ουδετεροπενίας. Ο αριθμός των λευκών αιμοσφαιρίων κατά την διάγνωση είναι συνήθως αυξημένος και οφείλεται στον αυξημένο αριθμό λεμφοβλαστών, ενώ στην πραγματικότητα ο ασθενής έχει σοβαρή ουδετεροπενία γιατί τα φυσιολογικά πολυμορφοπύρρηνα είναι πολύ χαμηλά. Ο αριθμός των λευκών αιμοσφαιρίων κατά την διάγνωση μπορεί να είναι φυσιολογικός ή και μειωμένος και τα φυσιολογικά πολυμορφοπύρρηνα είναι επίσης μειωμένα. Η διάγνωση βασίζεται στην μορφολογία των κυττάρων στο περιφερικό αίμα και στον μυελό των οστών. Συχνό εύρημα σε παιδιά με οξεία λευχαιμία αποτελεί η θρομβοπενία, η οποία εκδηλώνεται κλινικά με πετέχειες, εκχυμώσεις και αιμορραγίες από τους βλεννογόνους (ρινική επίσταξη, ουλορραγία, και σπανιότερα αιματουρία, γαστρορραγία κλπ).

Η διήθηση του μυελού των οστών από τον λευχαιμικό κλώνο μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα την εμφάνιση συμπτωματολογίας από την συμμετοχή των οστών. Το 25% των παιδιών με οξεία λευχαιμία παρουσιάζει οστικό άλγος κατά την διάγνωση της νόσου. Το άλγος αποδίδεται στην συσσώρευση των λευχαιμικών κυττάρων στους μυελοχώρους, και ενίοτε προκαλείται καταστροφή των οστικών δοκίδων με αποτέλεσμα την διεύρυνση των μυελοχώρων. Σε περίπτωση που το οστικό άλγος εμφανίζεται στα οστά των κάτω άκρων, το παιδί μπορεί να παρουσιάσει χωλότητα ή και αδυναμία βάδισης. Στους εφήβους το οστικό άλγος εντοπίζεται συχνά στην σπονδυλική στήλη. Στην ακτινογραφία παρατηρείται οστεοπενία ή και λυτικές βλάβες. Παθολογικά κατάγματα, αν και σπάνια, μπορεί να παρατηρηθούν σε παιδιά με λευχαιμία.

Τα εξωμυελικά όργανα τα οποία συχνότερα διηθούνται από λευχαιμικά κύτταρα είναι το ήπαρ, ο σπλήνας και οι λεμφαδένες. Διογκωμένοι λεμφαδένες συνήθως ανευρίσκονται στον τράχηλο, τις μασχालιαίες και βουβωνικές χώρες και το μεσοθωράκιο. Η μεγάλη διόγκωση λεμφαδένων στο μεσοθωράκιο μπορεί να οδηγήσει

σε πίεση και απόφραξη των αεραγωγών και σοβαρή αναπνευστική δυσχέρεια, καθώς και σε σύνδρομο της άνω κοίλης φλέβας λόγω της πίεσης της άνω κοίλης φλέβας από τους διογκωμένους λεμφαδένες του πρόσθιου μεσοθωρακίου. Η μεγάλη λεμφαδενική διόγκωση του μεσοθωρακίου είναι συνηθέστερη στην ΟΛΛ από T-κύτταρα, έναν υποτύπο της ΟΛΛ που παρατηρείται συχνότερα σε αγόρια εφηβικής ηλικίας. Η ηπατοσπληνομεγαλία είναι από τα συχνότερα κλινικά ευρήματα σε παιδιά με λευχαιμία. Η ηπατομεγαλία, παρόλο που μπορεί να είναι εκσεσημασμένη, συνήθως δεν συνοδεύεται από έκπτωση της ηπατικής λειτουργίας. Σε σπάνιες περιπτώσεις όπου η διήθηση των λευχαιμικών κυττάρων στο ήπαρ οδηγεί σε ηπατική ανεπάρκεια, η σοβαρή ανεπάρκεια των παραγόντων πήξης μπορεί να αυξήσει τον κίνδυνο αιμορραγικής διάθεσης του ασθενούς.

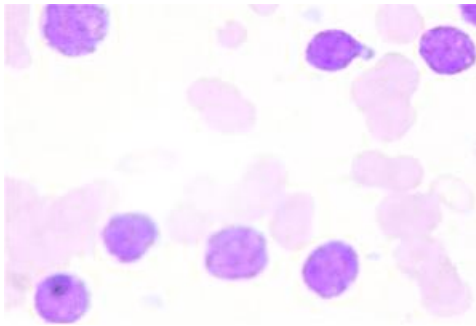
Διήθηση από λευχαιμικά κύτταρα μπορεί επίσης να παρατηρηθεί στο κεντρικό νευρικό σύστημα (ΚΝΣ). Στην περίπτωση αυτή, τα παιδιά μπορεί να παρουσιάσουν νευρολογική σημειολογία, όπως κεφαλαλγία, εμέτους, στραβισμό, πάρεση εγκεφαλικών συζυγιών ή ακόμη και ημιπληγία. Η διήθηση του ΚΝΣ είναι συχνότερη κατά την υποτροπή της νόσου. Η διήθηση των οφθαλμών κατά την διάγνωση είναι σπάνια, και μπορεί να αφορά τον αμφιβληστροειδή, τον κόγχχο, το οπτικό νεύρο ή άλλες δομές του οφθαλμού. Σπάνια, κατά την διάγνωση εμφανίζεται διήθηση του πρόσθιου θαλάμου από λεμφοβλάστες, μια κατάσταση που ονομάζεται λευχαιμικό υπόπυο,

Άλλα όργανα του σώματος στα οποία μπορεί να παρατηρηθεί διήθηση από λευχαιμικά κύτταρα είναι οι όρχεις, οι νεφροί, το δέρμα, οι πνεύμονες, οι υπεζωκοτικές κοιλότητες, το περικάρδιο και οι ωθήκες. Η νεφρική λειτουργία κατά την έναρξη της λευχαιμίας μπορεί επίσης να είναι επηρεασμένη για διάφορους λόγους, ένας εκ των οποίων είναι η διήθηση του νεφρικού παρεγχύματος από λευχαιμικά κύτταρα. Ακόμη, η λύση των λευχαιμικών κυττάρων έχει ως αποτέλεσμα την αυξημένη συγκέντρωση ουρικού οξέος στο αίμα των ασθενών, που μπορεί να οδηγήσει σε αποφρακτική ουροπάθεια και περαιτέρω επιδείνωση της νεφρικής λειτουργίας. Διαταραχές στον μεταβολισμό του ασβεστίου, είτε ως υποασβεστιαμία είτε ως υπερασβεστιαμία, ενδέχεται επίσης να παρατηρηθούν σε παιδιά με λευχαιμία [9-11, 26].

2.2.2. Η ταξινόμηση της οξείας λεμφοβλαστικής λευχαιμίας.

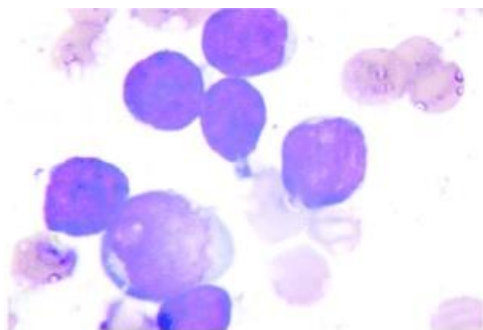
Στην κατάταξη FAB (French American British cooperative group) λαμβάνεται υπόψη το μέγεθος του κυττάρου, το σχήμα του πυρήνα, η παρουσία πυρηνίων, το χρώμα του κυτταροπλάσματος και η σχέση πυρήνα/κυτταροπλάσματος. Η κατάταξη κατά FAB έχει μόνο προγνωστική αξία αφού βασίζεται στα μορφολογικά χαρακτηριστικά των βλαστών. Σύμφωνα με την ταξινόμηση κατά FAB, η ΟΛΛ κατηγοριοποιείται ως εξής:

- L1: Υπερισχύουν οι μικροί λεμφοβλάστες, οι οποίοι έχουν λιγαστό κυτταρόπλασμα και δυσδιάκριτους πυρηνίσκους. Η ΟΛΛ τύπου L1 αντιπροσωπεύει το 85% της ΟΛΛ στην παιδική ηλικία.



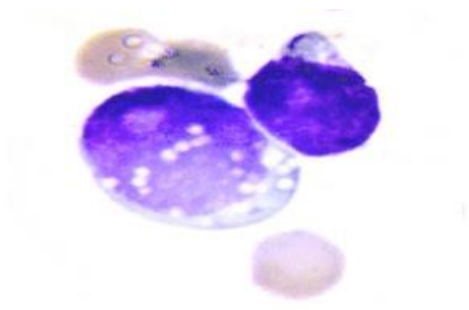
Εικόνα 2. Επίχρισμα περιφερικού αίματος με λεμφοβλάστες ΟΛΛ τύπου L1.

- L2: Οι λεμφοβλάστες είναι μεγαλύτεροι, έχουν άφθονο κυτταρόπλασμα, εμφανίζουν σημαντική ετερογένεια ως προς το μέγεθος και έχουν ευδιάκριτους πυρηνίσκους. Η ΟΛΛ τύπου L2 αντιπροσωπεύει περίπου το 14% της ΟΛΛ στα παιδιά.



Εικόνα 3. Επίχρισμα περιφερικού αίματος με λεμφοβλάστες ΟΛΛ τύπου L2.

- L3: Τα κύτταρα είναι μορφολογικά όμοια με τα κύτταρα του λεμφώματος Burkitt και αφορούν την Β-ΟΛΛ τύπου Burkitt. Αποτελείται από ομοιογενή πληθυσμό μεγάλων βλαστών, τα οποία έχουν βασεόφιλο κυτταρόπλασμα με κενोटόπια. Η ΟΛΛ τύπου L3 είναι η σπανιότερη μορφή στον παιδικό πληθυσμό, αφού αντιπροσωπεύει το 1-2% των περιπτώσεων.



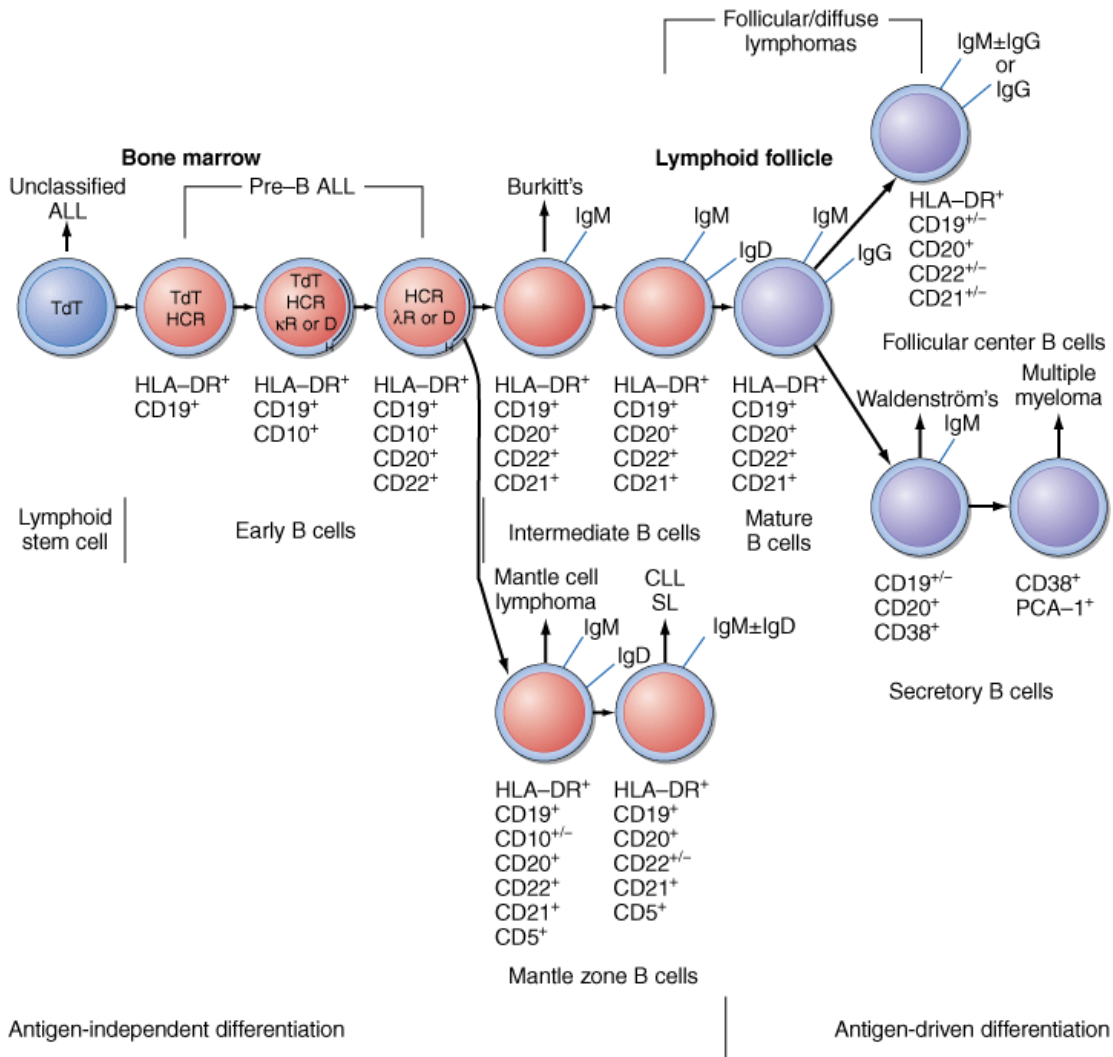
Εικόνα 4. Επίχρισμα περιφερικού αίματος με λεμφοβλάστες ΟΛΛ τύπου L3.

Η διάγνωση της ΟΛΛ και η αναγνώριση των διαφορετικών υποτύπων της νόσου γίνεται με βάση τα ανοσοφαινοτυπικά χαρακτηριστικά των κυττάρων. Η ΟΛΛ χωρίζεται σε δύο μείζονες από ανοσοφαινοτυπικής πλευράς ομάδες, την Β και την Τ κυτταρικής προέλευσης ΟΛΛ, με συχνότητα στα παιδιά 85% και 15% αντίστοιχα. Σε διαφορετικά στάδια ωρίμανσης της λεμφοβλάστης αναγνωρίζονται διαφορετικοί ανοσοφαινοτυπικοί δείκτες.

Πίνακας 1. Στάδια ωρίμανσης του Β λεμφοκυττάρου και αντίστοιχοι δείκτες.		
EGIL BI	Πρώιμη προ-B (pro-B)	cCD79a+, CD19+, CD10-, cμ-
EGIL BII	Κοινή (common)	cCD79a+, CD19+, CD10+, cμ-
EGIL BIII	Προ-B (pre-B)	cCD79a+, CD19+, CD10+/-, cμ+, σκ/λ-
EGIL BIV	Ωριμη Β-βλάστη	cCD79a+, CD19+, CD10+, Tdt-, σκ/λ κλωνική

Στην ΟΛΛ Β-προέλευσης, οι σημαντικότεροι ανοσοφαινοτυπικοί δείκτες για την διάγνωση και την περαιτέρω ταξινόμηση σε υποκατηγορίες είναι τα αντιγόνα CD19, CD20, CD22, CD24 και CD79a. Οι πιο πρώιμοι δείκτες της Β-σειράς είναι τα αντιγόνα CD19, CD22 και CD79a. Η θετική αντίδραση για δύο από τους τρεις αυτούς δείκτες, χωρίς την παρουσία άλλων δεικτών, αναγνωρίζει την πρώιμη προ-B ΟΛΛ (EGIL BI).

Η παρουσία του αντιγόνου CD10 (CALLA) ορίζει την «κοινή» υποομάδα ΟΛΛ (EGIL BII). Η αναγνώριση της βαριάς αλυσίδας ταυτοποιεί την προ-B ΟΛΛ (EGIL BIII), ενώ η παρουσία της ελαφριάς αλυσίδας της ανοσοσφαιρίνης ορίζει την ώριμη Β-ΟΛΛ (EGIL BIV).



Source: Fauci AS, Kasper DL, Braunwald E, Hauser SL, Longo DL, Jameson JL, Loscalzo J: *Harrison's Principles of Internal Medicine*, 17th Edition: <http://www.accessmedicine.com> Copyright © The McGraw-Hill Companies, Inc. All rights reserved.

Εικόνα 5. Τα διαφορετικά στάδια ωρίμανσης της λεμφοβλάστης και οι αντίστοιχοι ανοσοφαινοτυπικοί δείκτες που εκφράζονται σε κάθε στάδιο.

Στην ΟΛΛ Τ-προέλευσης, οι σημαντικότεροι ανοσοφαινοτυπικοί δείκτες είναι τα αντιγόνα επιφανείας CD1a, CD2, CD3 (μεμβρανικό και κυτταροπλασματικό), CD4, CD5, CD7 και CD8. Η ταξινόμηση της Τ-ΟΛΛ κατά EGIL με βάση τον ανοσοφαινότυπο παρουσιάζεται στον παρακάτω πίνακα:

Πίνακας 2. Στάδια ωρίμανσης του Τ λεμφοκυττάρου και αντίστοιχοι δείκτες.		
EGIL TIa	Προθυμική (pro-T)	cCD3+, CD7++, CD5-, CD2-, sCD3-
EGIL TIb	Προθυμική (pro-T)	cCD3+, CD7++, CD5+, CD2-, CD1a-, sCD3-
EGIL TII	Υποφλοιός (pre-T)	cCD3+, CD7++, CD5+, CD2+, CD1a-, sCD3-
EGIL TIII	Φλοιός θύμου (cortical T)	cCD3+, CD7++, CD5+, CD2+, CD1a+, sCD3-/+
EGIL TIV	Μυελός θύμου (mature T)	cCD3+, CD7++, CD5-, CD2-, CD1a-, sCD3-/+

2.2.3. Οι γενετικές ανωμαλίες στην οξεία λεμφοβλαστική λευχαιμία.

Περίπου στο 75% των περιπτώσεων ΟΛΛ της παιδικής ηλικίας ανευρίσκονται γενετικές ανωμαλίες, όπως ανευπλοειδία και δομικές χρωμοσωμικές ανωμαλίες [27]. Οι γενετικές ανωμαλίες που ανευρίσκονται στον λευχαιμικό κλώνο επηρεάζουν σημαντικά τόσο την πρόγνωση της νόσου όσο και την επιλογή της θεραπείας. Για την αναζήτηση των γενετικών ανωμαλιών, ο καρυότυπος και ο φθορίζων *in situ* υβριδισμός (FISH, Fluorescence In Situ Hybridisation) χρησιμοποιούν δείγμα μυελού των οστών κατά την διάγνωση της νόσου. Τα τελευταία χρόνια, η ανάπτυξη και η εφαρμογή νέων τεχνολογιών όπως οι μικροσυστοιχίες DNA και η αλληλούχιση επόμενης γενιάς (NGS) έχουν επιτρέψει την ανεύρεση επιπλέον επαναλαμβανόμενων υπομικροσκοπικών ανωμαλιών που σχετίζονται με την ΟΛΛ, χωρίς όμως ακόμη να έχουν προγνωστική αξία [28].

Ένας αριθμός επαναλαμβανόμενων γενετικών ανωμαλιών είναι κοινός στην ΟΛΛ και αποτελούν σημαντικό γεγονός για την λευχαιμογένεση. Στις γενετικές αυτές ανωμαλίες περιλαμβάνονται χρωμοσωμικές αναδιατάξεις, στις οποίες συνήθως συμμετέχουν γονίδια που κωδικοποιούν ρυθμιστές της αιμοποίησης, ογκογονίδια,

ογκοκατασταλτικά γονίδια και κινάσες της τυροσίνης. Πρέπει να σημειωθεί ότι συνήθως απαιτείται δεύτερο γενετικό «χτύπημα» για την δημιουργία του πλήρους φαινοτύπου της λευχαιμίας. Οι κλωνικές χρωμοσωμικές ανωμαλίες μπορεί να είναι αριθμητικές, δομικές ή συνδυασμός και των δύο.

Οι αριθμητικές χρωμοσωμικές ανωμαλίες περιλαμβάνουν την υπερδιπλοειδία και την υποδιπλοειδία. Η υπερδιπλοειδία διακρίνεται σε χαμηλή (47-50 χρωμοσώματα) και υψηλή (51-65 χρωμοσώματα). Η υψηλή υπερδιπλοειδία αποτελεί την συχνότερη επαναλαμβανόμενη χρωμοσωμική ανωμαλία στην Β-ΟΛΛ της παιδικής ηλικίας, και ανευρίσκεται στο 30% των περιπτώσεων [29]. Έχει παρατηρηθεί ότι τα υπεράριθμα χρωμοσώματα δεν είναι τυχαία. Πρόκειται συνήθως για τα χρωμοσώματα X, 4, 6, 10, 14, 17, 18 και 21. Η υψηλή υπερδιπλοειδία κατά κανόνα συνδυάζεται με καλή πρόγνωση. Πιο ευνοϊκές θεωρούνται οι τρισωμίες 4, 10, 17 και 18. Απαντάται συχνότερα στην ηλικία 1-4 ετών και συνδέεται με χαμηλό αριθμό λευκών αιμοσφαιρίων κατά την διάγνωση [30]. Οι υπερδιπλοειδικοί κλώνοι μπορεί να παρουσιάζουν συγχρόνως και δομικές χρωμοσωμικές ανωμαλίες, χωρίς όμως συνήθως οι τελευταίες να αλλάζουν την πρόγνωση [31]. Τα υπερδιπλοειδή λευχαιμικά κύτταρα είναι πολύ ευαίσθητα στην απόπτωση και συγκεντρώνουν υψηλά επίπεδα μεθοτρεξάτης ή ενεργών πολυγλουταμινικών μεταβολιτών, γεγονός που πιθανώς εξηγεί την καλή πρόγνωση των ασθενών [32].

Η υποδιπλοειδία χαρακτηρίζεται από λιγότερα από 46 χρωμοσώματα και παρατηρείται στο 5-8% της Β-ΟΛΛ [30]. Στις περισσότερες περιπτώσεις υποδιπλοειδικών Β-ΟΛΛ κλώνων, παρατηρούνται 45 χρωμοσώματα. Οι περιπτώσεις με μικρότερο αριθμό χρωμοσωμάτων είναι αρκετά σπανιότερες και περιλαμβάνουν την υψηλή υποδιπλοειδία (40-44 χρωμοσώματα), την χαμηλή υποδιπλοειδία (32-39 χρωμοσώματα) και την σχεδόν-απλοειδία (24-31 χρωμοσώματα) [31]. Η χαμηλή υποδιπλοειδία και η σχεδόν-απλοειδία έχουν συσχετιστεί με δυσμενή πρόγνωση [14]. Στην χαμηλή υποδιπλοειδία, τα χρωμοσώματα που συνήθως απουσιάζουν είναι τα 3, 4, 7, 13, 15, 16 και 17 [31]. Στην πλειοψηφία των περιπτώσεων χαμηλής υποδιπλοειδίας, συνυπάρχουν μεταλλάξεις στο γονίδιο *TP53* [14]. Περίπου στους μισούς ασθενείς, οι μεταλλάξεις στο γονίδιο *TP53* ανευρίσκονται και σε μη λευχαιμικά

κύτταρα. Το γεγονός αυτό πιθανώς σημαίνει ότι οι μεταλλάξεις αυτές βρίσκονται στα γαμετικά κύτταρα και η χαμηλού βαθμού υποδιπλοειδία σχετίζεται με το σύνδρομο Li-Fraumeni [31].

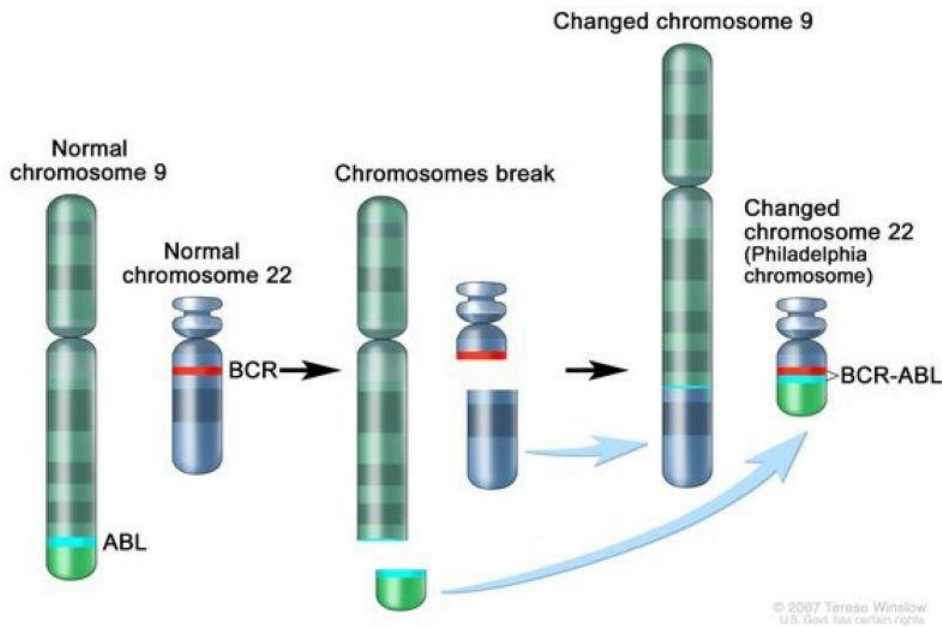
Οι δομικές χρωμοσωμικές ανωμαλίες περιλαμβάνουν μεταθέσεις, ελλείψεις, ενθέσεις ή αναστροφές. Η μετάθεση t(12;21)(p13;q22) ή ETV6-RUNX1, η οποία έχει ως αποτέλεσμα την σύντηξη του γονιδίου *ETV6* στο χρωμόσωμα 12 με το γονίδιο *RUNX1* στο χρωμόσωμα 21, αποτελεί την πιο συχνή επαναλαμβανόμενη μετάθεση στην Β-ΟΛΛ. Το αποτέλεσμα της μετάθεσης είναι η καταστολή της μεταγραφής του γονιδίου *AML1*. Πρόκειται για υπομικροσκοπική ανακατάταξη, η οποία απαιτεί FISH ή μοριακή ανάλυση για την ανίχνευσή της. Παρατηρείται περίπου στο 25% της Β-ΟΛΛ της παιδικής ηλικίας και σχετίζεται με ευνοϊκή πρόγνωση. Έχει παρατηρηθεί αυξημένη συχνότητα υποτροπής σε φορείς της μετάθεσης, ενώ και οι ασθενείς με υποτροπή της νόσου παρουσιάζουν ευνοϊκή πρόγνωση. [27, 31].

Ανακατατάξεις του γονιδίου *MLL* (ή αλλιώς *KMT2A*), το οποίο εδράζεται στην χρωμοσωμική θέση 11q23, παρατηρούνται συνολικά στο 10% των παιδιών με Β-ΟΛΛ, όμως ανευρίσκονται σε περισσότερο από το 80% των περιπτώσεων βρεφικής Β-ΟΛΛ [33, 34]. Το γονίδιο *MLL* έχει σημαντικό ρόλο στην φυσιολογική αιμοποίηση και διαφοροποίηση των κυττάρων, καθώς κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη με ενεργότητα μεθυλτρανσφεράσης ιστόνης, η οποία ρυθμίζει την έκφραση των γονιδίων *HOXA* και *MEIS1*, ελέγχοντας την εξέλιξη των πρώιμων αιμοποιητικών κυττάρων [35]. Έχουν αναγνωριστεί περισσότερες από 50 μεταθέσεις χρωμοσωμάτων που περιλαμβάνουν το *MLL* γονίδιο [31]. Οι ανακατατάξεις του γονιδίου *MLL* έχουν συσχετιστεί με ιδιαίτερα φτωχή πρόγνωση, με το ποσοστό EFS να μην ξεπερνά το 35% [36]. Η συχνότερα παρατηρούμενη μετάθεση είναι η t(4;11)(q21;q23). Οι ασθενείς είναι συνήθως βρέφη, με μεγάλο αριθμό λευκών αιμοσφαιρίων κατά την διάγνωση, και έχουν κακή ανταπόκριση στην αρχική θεραπεία. Άλλες συχνές μεταθέσεις περιλαμβάνουν τις t(11;19)(q23;p13.3) και t(10;11)(p13-14;q14-21) [37, 38].

Η μετάθεση t(1;19)(q23;p13.3) παρατηρείται περίπου στο 5% της παιδικής Β-ΟΛΛ και προκαλεί σύντηξη του γονιδίου *E2A* στο χρωμόσωμα 19 με το γονίδιο *PBX1* στο χρωμόσωμα 1. Η μετάθεση αυτή έχει ιστορικά συνδεθεί με δυσμενή πρόγνωση.

Ωστόσο, με τα σύγχρονα εντατικοποιημένα θεραπευτικά πρωτόκολλα, η μετάθεση αυτή στερείται σημαντικής προγνωστικής σημασίας [39, 40].

Το χρωμόσωμα Philadelphia είναι η διπλή μετάθεση $t(9;22)(q34;q11)$. Η μετάθεση οδηγεί στην συνένωση των 3' αλληλουχιών του ογκογονιδίου *c-ABL*, που βρίσκεται στο μακρύ σκέλος του χρωμοσώματος 9, με τις 5' αλληλουχίες ενός υποκινητή στην περιοχή θραύσης (*BCR*) του χρωμοσώματος 22. Το αποτέλεσμα αυτής της μετάθεσης είναι η δημιουργία του υβριδικού γονιδίου *BCR-ABL* και η παραγωγή της πρωτεΐνης *BCR-ABL1* με δραστικότητα κινάσης της τυροσίνης. Το χρωμόσωμα Philadelphia ανευρίσκεται στο 3-5% της Β-ΟΛΛ της παιδικής ηλικίας, και συνδυάζεται με δυσμενή πρόγνωση. Εμφανίζεται με μεγαλύτερη συχνότητα σε μεγαλύτερα παιδιά και εφήβους με μεγάλο αριθμό λευκών αιμοσφαιρίων κατά την διάγνωση. Η Β-ΟΛΛ με θετικό χρωμόσωμα Philadelphia έχει συσχετιστεί με συχνότερη προσβολή του ΚΝΣ [30]. Τα τελευταία χρόνια, η χορήγηση αναστολέων της κινάσης της τυροσίνης, όπως η ιματινίμπη, έχει αποδειχθεί ιδιαίτερα αποτελεσματική, οδηγώντας σε υψηλά ποσοστά επιβίωσης ακόμη και στην Β-ΟΛΛ με θετικό χρωμόσωμα Philadelphia [41].



Εικόνα 6: Η δημιουργία του υβριδικού γονιδίου *BCR-ABL* στο χρωμόσωμα Philadelphia.

Οι χρωμοσωμικές ανωμαλίες που ανευρίσκονται στην Β-ΟΛΛ σπάνια παρατηρούνται στα παιδιά με Τ-ΟΛΛ. Σταθερές χρωμοσωμικές ανωμαλίες ανευρίσκονται και στην Τ-ΟΛΛ, αλλά λίγες φαίνεται να έχουν προγνωστική σημασία. Από αυτές, οι σημαντικότερες είναι οι μεταλλάξεις του γονιδίου *NOTCH1* και η μετάθεση NUP214-ABL1. Το γονίδιο *NOTCH1* κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη που εμπλέκεται στην ανάπτυξη και διαφοροποίηση των Τ λεμφοκυττάρων. Μεταλλάξεις στο γονίδιο *NOTCH1* ανευρίσκονται περίπου στο 50% των περιπτώσεων Τ-ΟΛΛ και φαίνεται ότι διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην παθογένεση της νόσου. Η προγνωστική αξία των μεταλλάξεων στο *NOTCH1* γονίδιο δεν έχει αποσαφηνιστεί. Φαίνεται ότι σχετίζονται με ευνοϊκή πρόγνωση στα παιδιά και με δυσμενή πρόγνωση στους ενήλικες [42-44]. Η μετάθεση NUP214-ABL1 παρατηρείται στο 4-6% των περιπτώσεων Τ-ΟΛΛ και οδηγεί στην παραγωγή μια κινάσης τυροσίνης. Η προγνωστική αξία της μετάθεσης παραμένει ασαφής, με ορισμένες μελέτες να την συσχετίζουν με δυσμενή πρόγνωση, ενώ άλλες υποστηρίζουν ότι στερείται προγνωστικής σημασίας [45, 46].

2.2.4. Η ταξινόμηση σε προγνωστικές ομάδες.

Ανάλογα με τον κίνδυνο μη επίτευξης ύφεσης και του κινδύνου υποτροπής της νόσου, τα παιδιά με ΟΛΛ κατατάσσονται σε ομάδες κινδύνου. Οι παράγοντες κινδύνου σχετίζονται με τα χαρακτηριστικά του ασθενούς (φύλο, ηλικία), τα χαρακτηριστικά της κλινικής προβολής της νόσου (αριθμός των λευκών αιμοσφαιρίων κατά την διάγνωση, παρουσία ηπατοσπληνομεγαλίας, λεμφαδενοπάθεια), τον ανοσοφαινότυπο, την παρουσία χρωμοσωμικών ανωμαλιών καθώς και την ταχύτητα ανταπόκρισης στην θεραπεία.

Σύμφωνα με το πρωτόκολλο ALLIC 2009 (ALL Intercontinental) που ανήκει στην ομάδα του BFM, τα παιδιά με ΟΛΛ ταξινομούνται στις εξής τρεις ομάδες κινδύνου:

- **Ομάδα χαμηλού κινδύνου.** Περιλαμβάνει όλα τα κάτωθι κριτήρια:
 - <1000 βλάστες/μL στο περιφερικό αίμα την ημέρα 8
 - Ηλικία > 1 έτους ή < 6 ετών

- Αριθμός λευκών αιμοσφαιρίων κατά την διάγνωση <20.000/μL
- Μυελός την ημέρα 15: FC MRD < 0.1% ή M1 (βλάστες <5%) ή M2 (βλάστες 5-25%)
- Μυελός την ημέρα 33: M1
- **Ομάδα ενδιάμεσου κινδύνου.**
 - <1000 βλάστες/μL στο περιφερικό αίμα την ημέρα 8, και
 - Ηλικία <1 έτους ή > 6 ετών ή/και αριθμός λευκών αιμοσφαιρίων κατά την διάγνωση >20.000μL, και
 - Μυελός την ημέρα 15: FC MRD <10% ή M1/M2, και
 - Μυελός την ημέρα 33: M1

ή πλήρωση των κριτηρίων για ομάδα χαμηλού κινδύνου, αλλά FC MRD 0.1-10% ή M3 την ημέρα 15, και M1 την ημέρα 33.
- **Ομάδα υψηλού κινδύνου.** Θα πρέπει να ισχύει τουλάχιστον ένα από τα κατωτέρω κριτήρια:
 - Ομάδα ενδιάμεσου κινδύνου, αλλά FC MRD >10% ή μυελός M3 (βλάστες >25%) την ημέρα 15.
 - Ομάδα χαμηλού κινδύνου, αλλά FC MRD >10%
 - >1000 βλάστες/μL στο περιφερικό αίμα την ημέρα 8
 - Μυελός M2 ή M3 την ημέρα 33
 - Παρουσία της μετάθεσης t(9;22) ή της t(4;11)
 - Παρουσία υποδιπλοειδίας.

2.2.5. Η θεραπεία της οξείας λεμφοβλαστικής λευχαιμίας.

Τις τελευταίες δεκαετίες έχει σημειωθεί θεαματική βελτίωση στην επιβίωση των παιδιών με ΟΛΛ. Η βελτίωση στα ποσοστά επίτευξης πλήρους ύφεσης της νόσου και στην επιβίωση των παιδιών είναι πρωτίστως αποτέλεσμα της ανάπτυξης και του συνδυασμού αποτελεσματικών χημειοθεραπευτικών παραγόντων. Στην προ της χημειοθεραπείας εποχή, η μέση επιβίωση της ΟΛΛ στην παιδική ηλικία δεν ξεπερνούσε τους τρεις μήνες, με κύριες αιτίες θανάτου την μαζική αιμορραγία λόγω

της καταστολής της αιμοποίησης και τις σοβαρές λοιμώξεις. Αντίθετα, σήμερα, στον αναπτυσσόμενο κόσμο, με την εφαρμογή των σύγχρονων θεραπευτικών πρωτοκόλλων, η επιβίωση για την ΟΛΛ ξεπερνάει το 80% συνολικά, ενώ είναι μεγαλύτερη από 95% για παιδιά με νόσο χαμηλού κινδύνου [9, 11, 47]. Η ταξινόμηση των ασθενών σε υψηλού, μέσου και χαμηλού κινδύνου επιτρέπει την εφαρμογή εξατομικευμένης θεραπείας ανά ομάδα κινδύνου, έτσι ώστε τα παιδιά με ΟΛΛ χαμηλού κινδύνου να υποβάλλονται σε ηπιότερη θεραπεία. Αυτό έχει επιτρέψει σε μεγάλο βαθμό την αποφυγή των τοξικών ανεπιθύμητων ενεργειών της εντατικής χημειοθεραπείας σε ασθενείς χαμηλού ή ενδιάμεσου κινδύνου [48].

Η επιτυχής θεραπεία της ΟΛΛ στα παιδιά απαιτεί τον έλεγχο της νόσου στον μυελό των οστών καθώς επίσης και την θεραπεία ή προφύλαξη της εξωμυελικής νόσου, ιδιαίτερα στο ΚΝΣ. Η διάρκεια της θεραπείας είναι συνήθως 2 χρόνια και εξαρτάται από την ταξινόμηση με βάση τον βαθμό κινδύνου και το φύλο του ασθενούς. Ο ακρογωνιαίος λίθος της θεραπείας είναι η συστηματική χορήγηση χημειοθεραπευτικών παραγόντων σε συνδυασμό με την προφύλαξη του ΚΝΣ. Στον σχεδιασμό της θεραπείας της ΟΛΛ, τόσο της Β όσο και της Τ προέλευσης, διακρίνονται οι ακόλουθες φάσεις: 1. Θεραπεία εφόδου και επίτευξης ύφεσης, 2. Θεραπεία σταθεροποίησης της ύφεσης, 3. Θεραπεία επανεφόδου, 4. Θεραπεία προφύλαξης του ΚΝΣ, 5. Θεραπεία συντήρησης.

Ο στόχος της θεραπείας εφόδου είναι να εξαλειφθούν τα περισσότερα λευχαιμικά κύτταρα από τον μυελό των οστών και ο ασθενής να επιτύχει την ύφεση της νόσου, όπως αυτή μπορεί να καθοριστεί από το μυελόγραμμα και από την μέτρηση των λεμφοβλαστών με κυτταρομετρία ροής. Οι ασθενείς που επιτυγχάνουν γρήγορα ύφεση της νόσου έχουν καλύτερη πρόγνωση σε σχέση με όσους ανταποκρίνονται αργότερα. Η αποτυχία επίτευξης ύφεσης της νόσου στο τέλος της θεραπείας εφόδου σχετίζεται με υψηλότερο ποσοστό υποτροπής της νόσου [11]. Η θεραπεία εφόδου διαρκεί 4 εβδομάδες και τα περισσότερα θεραπευτικά πρωτόκολλα περιλαμβάνουν κορτικοστεροειδή (συνήθως πρεδνιζόνη και λιγότερο συχνά δεξαμεθαζόνη), βινκριστίνη, ασπαραγινάση και ανθρακυκλίνη. Με την χορήγηση δεξαμεθαζόνης αντί πρεδνιζόνης μειώνεται ο κίνδυνος υποτροπής στο ΚΝΣ αλλά αυξάνεται η τοξικότητα

και ο κίνδυνος λοιμώξεων. Στα πρωτόκολλα της ομάδας BFM και στο ALLIC, η θεραπεία εφόδου διαφέρει στα παιδιά χαμηλού κινδύνου στο ότι χορηγείται το 50% της δόσης των ανθρακυκλινών. Μετά την ολοκλήρωση της θεραπείας εφόδου, αναμένεται η εκρίζωση >99% των βλαστικών κυττάρων και η αποκατάσταση της φυσιολογικής αιμοποίησης.

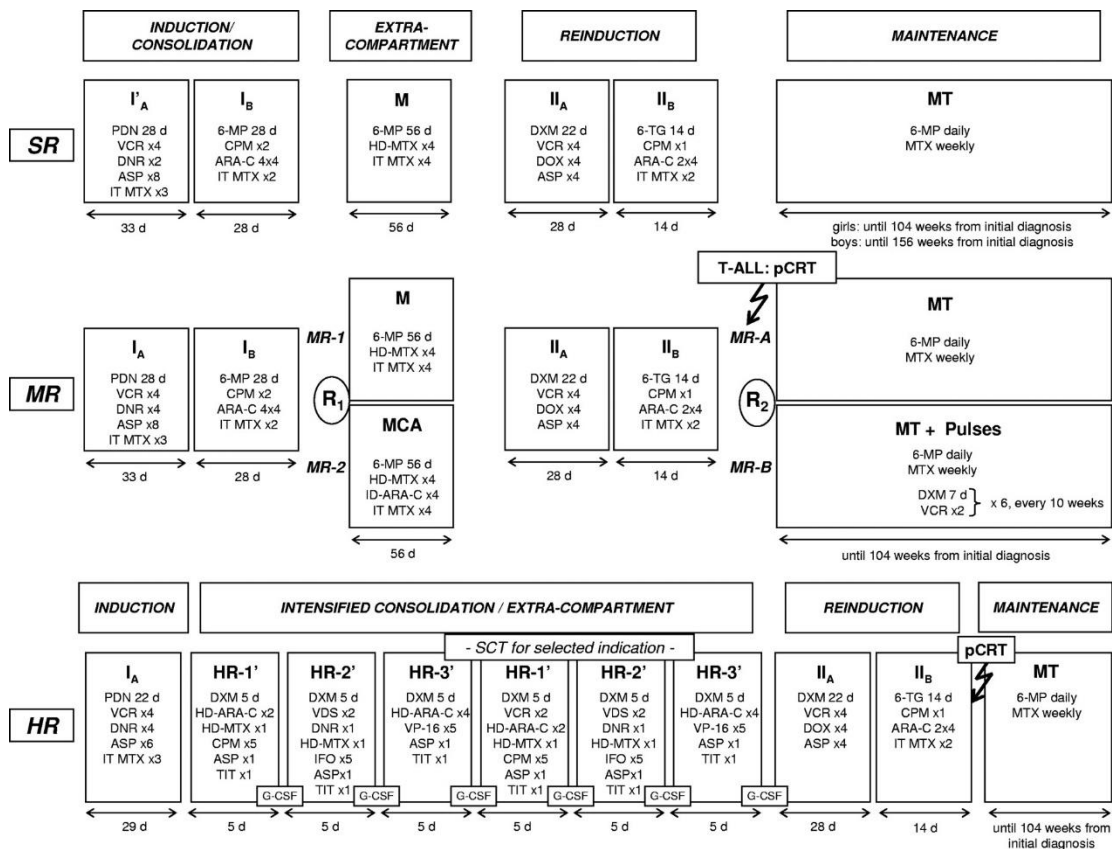
Η θεραπεία σταθεροποίησης της ύφεσης, η οποία ονομάζεται και φάση εντατικοποίησης, ακολουθεί την αποκατάσταση της φυσιολογικής αιμοποίησης στον μυελό των οστών. Η θεραπεία σταθεροποίησης διαρκεί περίπου τέσσερις εβδομάδες και τα θεραπευτικά πρωτόκολλα περιλαμβάνουν κυκλοφωσφαμίδη, τέσσερα τετραήμερα κυτοσίνης-αραβινοσίδης, 6-μερκαπτοπουρίνη και ενδοραχιαίες εγχύσεις. Η ομάδα BFM για τα παιδιά υψηλού κινδύνου χρησιμοποιεί παρατεταμένη χορήγηση ασπαραγινάσης.

Η προσθήκη της θεραπείας επανεφόδου μετά την θεραπεία εφόδου και την θεραπεία σταθεροποίησης, έχει βελτιώσει περαιτέρω την έκβαση της ΟΛΛ στα παιδιά [49]. Τα θεραπευτικά σχήματα που ακολουθούνται εξαρτώνται από την ομάδα κινδύνου. Στην φάση αυτή χορηγούνται φάρμακα και συνδυασμοί της φάσης εφόδου και της φάσης εντατικοποίησης, με μικρές τροποποιήσεις, ώστε να ελαχιστοποιηθεί ο κίνδυνος ανάπτυξης αντοχής στους χημειοθεραπευτικούς παράγοντες. Στα πρωτόκολλα της ομάδας BFM επιλέγεται δεξαμεθαζόνη αντί πρεδνιζόνης, ντοξορουμπικίνη αντί νταουνορουμπικίνης και θειογουανίνη αντί 6 μερκαπτοπουρίνης.

Η προφυλακτική θεραπεία του ΚΝΣ βασίζεται στο γεγονός ότι πολλά παιδιά μπορεί να παρουσιάζουν υποκλινική συμμετοχή του ΚΝΣ κατά την διάγνωση και στο ότι το ΚΝΣ μπορεί να λειτουργεί ως ένα όργανο-καταφύγιο των λευχαιμικών κυττάρων, καθώς προστατεύονται από την συστηματική χημειοθεραπεία εξαιτίας του αίματο-εγκεφαλικού φραγμού. Τα χοριοειδή πλέγματα αποτελούν τις συνηθέστερες εστίες εντόπισης των λευχαιμικών κυττάρων στον εγκέφαλο [11]. Η προφύλαξη του ΚΝΣ μπορεί να γίνει με 1) ενδοραχιαίες εγχύσεις (μεθοτρεξάτης ή συνδυασμού μεθοτρεξάτης-κορτικοστεροειδών-κυτοσίνης αραβινοσίδης ή λιποσωμικής κυτοσίνης αραβινοσίδης), 2) ενδιάμεσες ή υψηλές δόσεις ενδοφλέβιας μεθοτρεξάτης και 3)

ακτινοθεραπεία του ΚΝΣ [50, 51]. Η εμφάνιση νευρολογικών και νευροενδοκρινολογικών επιπλοκών, καθώς και ο κίνδυνος ανάπτυξης δευτερογενών νεοπλασμάτων του ΚΝΣ, έχει περιορίσει την χρήση της ακτινοθεραπείας του ΚΝΣ μόνο σε επιλεγμένες ομάδες ασθενών με αυξημένο κίνδυνο υποτροπής στο ΚΝΣ [52]. Μελέτες από το POG (Pediatric Oncology Group) έδειξαν ότι η τριπλή ενδοραχιαία έγχυση φαρμάκων έχει την ίδια προστατευτική δράση με την ακτινοθεραπεία του ΚΝΣ [53]. Σε πρόσφατα θεραπευτικά πρωτόκολλα χρησιμοποιείται υψηλή δόση ενδοφλέβιας μεθοτρεξάτης σε συνδυασμό με ενδοραχιαία έγχυση φαρμάκων. Με τα προφυλακτικά σχήματα που χρησιμοποιούνται, η υποτροπή στο ΚΝΣ έχει περιοριστεί σε λιγότερο από 5% [54].

Σκοπός της θεραπείας συντήρησης είναι η σταδιακή ελάττωση των λευχαιμικών κυττάρων που έχουν απομείνει έως την πλήρη εκρίζωσή τους. Η θεραπεία συντήρησης διαρκεί έως την συμπλήρωση συνολικά δύο ετών από την έναρξη της θεραπείας. Οι χημειοθεραπευτικοί παράγοντες που χρησιμοποιούνται στην θεραπεία συντήρησης περιλαμβάνουν την μερκαπτοπουρίνη, που χορηγείται από το στόμα καθημερινά, και την μεθοτρεξάτη, η οποία χορηγείται από το στόμα μια φορά την εβδομάδα. Σε ορισμένα πρωτόκολλα προστίθενται ώσεις χημειοθεραπείας (με βινκριστίνη και κορτικοστεροειδή) και ενδοραχιαίες εγχύσεις [26].



Εικόνα 7. Τα διαφορετικά χημειοθεραπευτικά σχήματα που εφαρμόζονται σε ασθενείς χαμηλού, μέσου και υψηλού κινδύνου σύμφωνα με το πρωτόκολλο της ομάδας ALLIC.

Όπως αναφέρθηκε, η ΟΛΛ με θετικό χρωμόσωμα Philadelphia αποτελεί μια ειδική κατηγορία της ΟΛΛ. Στην θεραπεία της ΟΛΛ με θετικό χρωμόσωμα Philadelphia χρησιμοποιείται ο αναστολέας της κινάσης της τυροσίνης ιματινίμη, σε συνδυασμό με τους συμβατικούς χημειοθεραπευτικούς παράγοντες, με ιδιαίτερα θετικά αποτελέσματα και χωρίς προστιθέμενη τοξικότητα [41, 55]. Η ντασατινίμη αποτελεί δεύτερης γενιάς αναστολέα της κινάσης της τυροσίνης με θετική δράση έναντι των λευχαιμικών κυττάρων που έχουν αναπτύξει αντοχή στην ιματινίμη [56].

Παρά τα εντατικοποιημένα θεραπευτικά πρωτόκολλα που εφαρμόζονται τα τελευταία χρόνια, υποτροπή της νόσου παρατηρείται περίπου στο 20% των παιδιών με ΟΛΛ [57]. Ως υποτροπή ορίζεται η επανεμφάνιση λευχαιμικών κυττάρων σε οποιοδήποτε σημείο του σώματος. Ο λευχαιμικός κλώνος της υποτροπής συνήθως

αποτελεί τμήμα του αρχικού λευχαιμικού κλώνου. Εντούτοις, η χημειοθεραπεία ασκεί ισχυρή εξελικτική πίεση στα λευχαιμικά κύτταρα, με αποτέλεσμα ο λευχαιμικός κλώνος κατά την υποτροπή να ανταποκρίνεται λιγότερο στην χημειοθεραπεία και να απαιτεί ακόμη πιο εντατικοποιημένη θεραπεία [58]. Η υποτροπή της νόσου μπορεί να είναι μεμονωμένη, είτε στον μυελό των οστών, είτε εξωμυελική, ή και συνδυασμός αυτών. Η μεμονωμένη εξωμυελική υποτροπή παρουσιάζει ευνοϊκότερη πρόγνωση σε σχέση με την υποτροπή της νόσου στον μυελό των οστών [59].

Ο μυελός των οστών αποτελεί το συχνότερο σημείο εμφάνισης της υποτροπής της ΟΛΛ στα παιδιά. Η υποτροπή στον μυελό ονομάζεται πρώιμη όταν συμβαίνει εντός των 36 πρώτων μηνών από την αρχική διάγνωση και όψιμη όταν συμβαίνει μετά τους 36 μήνες [60]. Η όψιμη υποτροπή παρουσιάζει καλύτερη πρόγνωση από ότι η πρώιμη [61]. Στα πρωτόκολλα της ομάδας BFM για την υποτροπή της ΟΛΛ, προστίθενται από νωρίς υψηλές δόσεις μεθοτρεξάτης και κυτοσίνης αραβινοσίδης. Μετά την θεραπεία εφόδου, χορηγούνται οκτώ εναλλασσόμενα σχήματα R1 και R2 που περιλαμβάνουν συνδυασμούς φαρμάκων. Στην υποτροπή της νόσου χορηγείται επίσης προφυλακτική ή θεραπευτική ακτινοθεραπεία του ΚΝΣ, ανάλογα με την συμμετοχή του ΚΝΣ. Η μεταμόσχευση αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην θεραπεία της υποτροπής της ΟΛΛ, καθώς αποτελεί την θεραπεία εκλογής για την πρώιμη υποτροπή στον μυελό των οστών [62].

Η μεμονωμένη υποτροπή στο ΚΝΣ παρατηρείται σε λιγότερο από το 5% της παιδικής ΟΛΛ και είναι συχνότερη στην T-ΟΛΛ και στην B-ΟΛΛ από ώριμα κύτταρα. Στα πρωτόκολλα υποτροπής της ομάδας BFM χορηγείται τριπλή ενδοραχιαία έγχυση και ακτινοθεραπεία εγκεφάλου/νευράξονα. Η πρώιμη υποτροπή στο ΚΝΣ παρουσιάζει ευνοϊκότερη πρόγνωση από ότι η όψιμη [63]. Η μεμονωμένη υποτροπή στους όρχεις είναι σπάνια, αφού παρατηρείται σε λιγότερο από το 2% των περιπτώσεων, και η αντιμετώπιση περιλαμβάνει συστηματική χημειοθεραπεία σε συνδυασμό με τοπική ακτινοθεραπεία [64].

2.3. Η οξεία μυελογενής λευχαιμία.

Ο όρος οξεία μυελογενής λευχαιμία (ΟΜΛ) αποτελεί τον γενικό τίτλο μια ομάδας οξείων λευχαιμιών, στις οποίες η αρχική βλάβη εντοπίζεται στο αρχικό στάδιο της αιμοποίησης. Αποτέλεσμα αυτής της βλάβης είναι να αναπτύσσονται λευχαιμίες από μυελοβλάστες (με ποικίλο βαθμό διαφοροποίησης), μονοβλάστες, ερυθροβλάστες και μεγακαρυοβλάστες. Αποτελεί την συχνότερη οξεία λευχαιμία στους ενήλικες. Στον παιδικό πληθυσμό, η ΟΜΛ είναι η δεύτερη σε συχνότητα λευχαιμία, αντιπροσωπεύοντας περίπου το 15-20% των λευχαιμιών [65]. Η ΟΜΛ είναι πιο σπάνια σε παιδιά κάτω των 10 ετών, στα οποία αντιπροσωπεύει το 13% των οξείων λευχαιμιών, ενώ το ποσοστό αυτό αυξάνεται στην δεύτερη δεκαετία ζωής και φτάνει το 36% στις ηλικίες 15-19 ετών [10, 66]. Η ΟΜΛ ευθύνεται για το 30% των θανάτων από λευχαιμία στην παιδική ηλικία. Με τις σύγχρονες μεθόδους θεραπείας, το συνολικό ποσοστό επιβίωσης των παιδιών με ΟΜΛ ξεπερνάει το 70% [67].

Η πλειοψηφία των περιπτώσεων ΟΜΛ στα παιδιά προκύπτει *de novo*, χωρίς δηλαδή την παρουσία υποκείμενων προδιαθεσικών παραγόντων. Παρόλα αυτά, η εμφάνιση ΟΜΛ μπορεί να σχετίζεται με παρουσία συνδρόμων, όπως το σύνδρομο Down, το σύνδρομο Schwachman-Diamond, η νόσος Kostmann, η αναιμία Fanconi και η συγγενής δυσκεράτωση. Επίσης, η ΟΜΛ μπορεί να αναπτυχθεί δευτεροπαθώς, σε περιπτώσεις που προϋπάρχουν άλλα αιματολογικά νοσήματα, όπως μυελοδυσπλαστικά ή μυελοϋπερπλαστικά σύνδρομα, ή μετά από χημειοθεραπεία ή ακτινοθεραπεία για άλλα νεοπλασματικά νοσήματα, όπως πχ μετά από συνδυασμό χημειοθεραπείας και ακτινοθεραπείας σε όγκους εγκεφάλου [10, 12].

2.3.1. Η κλινική εικόνα της οξείας μυελογενούς λευχαιμίας.

Οι κλινικές εκδηλώσεις της ΟΜΛ είναι παρόμοιες με αυτές της ΟΛΛ. Οι ασθενείς με ΟΜΛ συνήθως παρουσιάζουν κόπωση, ωχρότητα, αιμορραγία ή εμπύρετο, ως αποτέλεσμα της υποκείμενης αναιμίας, θρομβοπενίας ή ουδετεροπενίας. Τα παιδιά με ΟΜΛ κατά την διάγνωση συνήθως έχουν μεγαλύτερο αριθμό λευκών αιμοσφαιρίων σε σχέση με την ΟΛΛ, ενώ αντίθετα με την ΟΛΛ, η λεμφαδενοπάθεια και η

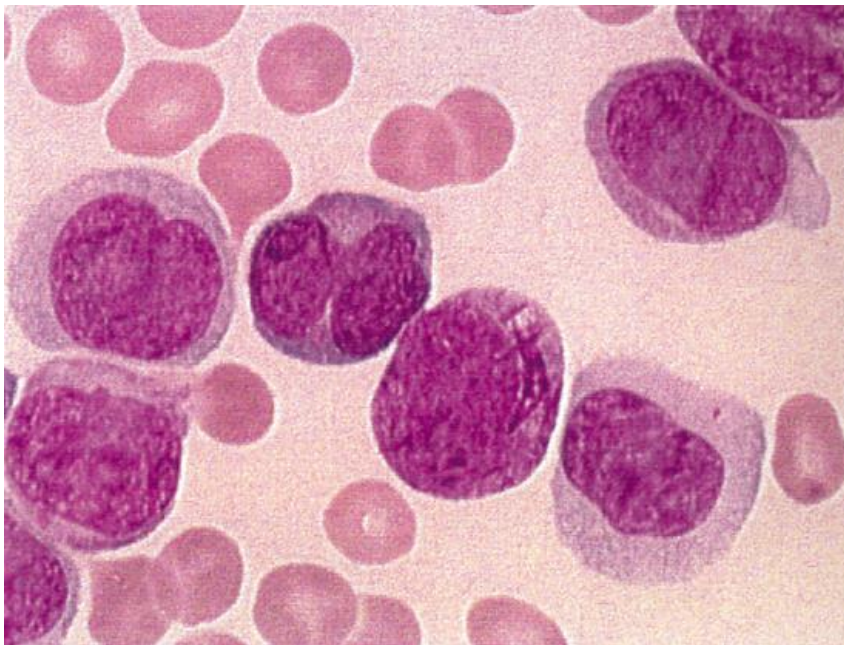
ηπατοσπληνομεγαλία δεν είναι τόσο συχνά ευρήματα. Εντούτοις, οργανομεγαλία, αλλά και διήθηση του κεντρικού νευρικού συστήματος στην διάγνωση είναι δυνατόν να παρατηρηθούν σε βρέφη και νήπια με ΟΜΛ [10, 11]. Τα χλωρώματα αποτελούν εντοπισμένες και συμπαγείς αθροίσεις λευχαιμικών κυττάρων που παρατηρούνται συχνά σε εξωμυελικές εστίες σε ασθενείς με ΟΜΛ. Οι συνηθέστερες εντοπίσεις είναι το κεντρικό νευρικό σύστημα, τα οστά, με συνηθέστερη εντόπιση τα οστά του οφθαλμικού κόγχου, και το δέρμα. Η εμφάνιση υποδόριων οζιδίων (leukemia cutis), ιδιαίτερα στα βρέφη, που είναι διαφόρου μεγέθους, χρώματος και εντόπισης (μερικές φορές έχουν την όψη “blueberry muffin”), είναι δυνατόν να προηγείται της διάγνωσης της ΟΜΛ, και ενδέχεται να υποχωρούν αυτόματα και να επανεμφανίζονται [68]. Υπερτροφία των ούλων επίσης μπορεί να παρατηρηθεί και ιστορικά σχετίζεται με ΟΜΛ με μονοβλαστικό στοιχείο. Σε συγκεκριμένους υποτύπους, όπως η οξεία προμυελοκυτταρική λευχαιμία, είναι δυνατόν να παρατηρηθεί διάχυτη ενδοαγγειακή πήξη κατά την διάγνωση της νόσου ή κατά τα πρώτα 24ωρα από την έναρξη της θεραπείας. Οι νέες θεραπευτικές προσεγγίσεις στην οξεία προμυελοκυτταρική λευχαιμία και η χρήση του ATRA μείωσαν σημαντικά την πρόιμη θνητότητα που οφειλόταν κυρίως στην διάχυτη ενδοαγγειακή πήξη. Το σύνδρομο υπεργλοιοποίησης παρατηρείται συχνότερα στην ΟΜΛ σε σχέση με την ΟΛΛ και αυτό οφείλεται στο ότι οι βλάστες της ΟΜΛ έχουν μεγαλύτερο μέγεθος, είναι περισσότερο άκαμπτοι και εμφανίζουν μεγαλύτερη τάση για συγκόλληση μεταξύ τους. Αποτέλεσμα αυτού είναι η λευκόσταση, δηλαδή η βραδεία κυκλοφορία και στάση στα μικρά αγγεία, με συνέπεια την απόφραξη και την ιστική ισχαιμία. Οι κλινικές εκδηλώσεις του συνδρόμου είναι οι αιμορραγίες, η ταχύπνοια και τα συμπτώματα από το ΚΝΣ [69].

2.3.2. Η ταξινόμηση της οξείας μυελογενούς λευχαιμίας.

Υπάρχουν επτά (7) τύποι ΟΜΛ και σύμφωνα με τα μορφολογικά και ανοσοϊστοχημικά ευρήματα των βλαστών, η ΟΜΛ ταξινομείται κατά FAB ως εξής:

- M0: ΟΜΛ χωρίς διαφοροποίηση.

- M1: Οξεία μυελοβλαστική χωρίς στοιχεία ωρίμανσης. Οι βλάστες είτε δεν έχουν κοκκία, είτε έχουν ελάχιστα αζουρόφιλα κοκκία καθώς και σωματίδια Auer.
- M2: Οξεία μυελοβλαστική με στοιχεία ωρίμανσης. Παρατηρούνται μυελοβλάστες καθώς και μυελοκύτταρα όλων των σταδίων διαφοροποίησης. Επίσης, παρατηρούνται δυσπλαστικά ώριμα λευκοκύτταρα (κύτταρα Peulger).
- M3: Οξεία προμυελοκυτταρική λευχαιμία. Τα προμυελοκύτταρα χαρακτηρίζονται από υπερκοκκίωση και παρουσία δεσμών από σωματίδια Auer. Κλινικά, η οξεία προμυελοκυτταρική λευχαιμία χαρακτηρίζεται από ταχεία εξέλιξη, έντονη αιμορραγική διάθεση λόγω υποϊνωδογοναιμίας, ανεπάρκειας του παράγοντα V και θρομβοπενίας, καθώς και από διάχυτη ενδοαγγειακή πήξη. Χρωμοσωμική ανωμαλία τυπική της οξείας προμυελοκυτταρικής λευχαιμίας είναι η μετάθεση t(15;17). Η έκφραση του γονιδίου σύντηξης *PML-RARA* χρησιμοποιείται ως μοριακός δείκτης για την παρακολούθηση του λευχαιμικού φορτίου και την ανίχνευση της ελάχιστης υπολειπόμενης νόσου.



Εικόνα 8. Επίχρισμα μυελού των οστών από ασθενή με οξεία προμυελοκυτταρική λευχαιμία (OMΛ-M3).

- M4: Οξεία μυελομονοκυτταρική λευχαιμία. Χαρακτηρίζεται από διαφοροποίηση προς την κοκκιοκυτταρική και μονοκυτταρική σειρά. Τουλάχιστον το 20% των λευχαιμικών κυττάρων είναι μονοκύτταρα. Ειδική μορφή της οξείας μυελομονοκυτταρικής λευχαιμίας αποτελεί η οξεία μυελομονοκυτταρική λευχαιμία με ηωσινοφιλία (M4Eo).
- M5: Οξεία μονοκυτταρική λευχαιμία. Ταξινομείται περαιτέρω στην οξεία μονοκυτταρική λευχαιμία χωρίς διαφοροποίηση (M5α): >80% των λευχαιμικών κυττάρων είναι μονοβλάστες, και στην οξεία μονοκυτταρική λευχαιμία με διαφοροποίηση (M5β): >80% των λευχαιμικών κυττάρων είναι μονοκύτταρα με παρουσία μονοβλαστών και προμονοκυττάρων.
- M6: Οξεία ερυθρολευχαιμία ή σύνδρομο di Guglielmo. Το 50% των κυττάρων αποτελείται από άτυπες ερυθροβλάστες.
- M7: Οξεία μεγακαρυοβλαστική λευχαιμία. Το 30% των κυττάρων αποτελείται από άωρες μεγακαρυοβλάστες διαφόρων μεγεθών.

2.3.3. Οι κυτταρογενετικές ανωμαλίες στην οξεία μυελογενή λευχαιμία.

Έως πρόσφατα, οι περισσότερες από τις γνώσεις μας πάνω στα κυτταρογενετικά ευρήματα της ΟΜΛ προερχόταν από μελέτες σε ενήλικες ασθενείς. Τα τελευταία χρόνια, η καλύτερη κατανόηση των γενετικών αλλαγών της παιδικής ΟΜΛ έχει προσφέρει καλύτερη γνώση της βιολογίας της νόσου καθώς και την δυνατότητα για τον συσχετισμό των αλλαγών αυτών με τον βιολογικό και κλινικό φαινότυπο. Ενώ στους ενήλικες οι περισσότερες περιπτώσεις ΟΜΛ προκύπτουν δευτερογενώς πάνω σε έδαφος προϋπάρχοντος μυελοδυσπλαστικού συνδρόμου ή έπειτα από χορήγηση ακτινοθεραπείας ή χημειοθεραπείας, στα παιδιά η πλειοψηφία των περιπτώσεων προκύπτει de novo. Τα κυτταρογενετικά ευρήματα στην παιδική ΟΜΛ είναι ιδιαίτερα σημαντικά, τόσο για την σωστή κατάταξη των ασθενών στους υποτύπους της νόσου, όσο και για την σωστή και έγκαιρη επιλογή των κατάλληλων θεραπευτικών πρωτοκόλλων. Επιπλέον, η μελέτη των κυτταρογενετικών ανωμαλιών αποτελεί έναν από τους πιο πολύτιμους δείκτες πρόγνωσης και παρακολούθησης της υπολειπόμενης νόσου.

Κλωνικές χρωμοσωμικές ανωμαλίες αποκαλύπτονται στο 75-80% της παιδικής ΟΜΛ και μπορεί να είναι αριθμητικές, δομικές ή συνδυασμός και των δύο. Οι κυτταρογενετικές ανωμαλίες μπορεί να είναι είτε πρωτοπαθείς, οι οποίες ανιχνεύονται σε όλα τα κύτταρα του λευχαιμικού κλώνου, είτε δευτεροπαθείς, που είναι παρούσες σε έναν ή περισσότερους υποκλώνους, υποδεικνύοντας εξέλιξη του λευχαιμικού κλώνου [70].

Οι συχνότερες χρωμοσωμικές ανωμαλίες της παιδικής ΟΜΛ είναι οι ισορροπημένες χρωμοσωμικές αναδιατάξεις που οδηγούν στον σχηματισμό ενός χμαιρικού γονιδίου σύντηξης [71]. Η Οξεία Προμυελοκυτταρική Λευχαιμία (ΟΠΛ) (M3 υπότυπος κατά την FAB ταξινόμηση) αντιπροσωπεύει το 5-10% της παιδικής ΟΜΛ και χαρακτηρίζεται από την παρουσία του γονιδίου σύντηξης *PML-RARA*, που προκύπτει από την μετάθεση t(15;17)(q24;q21). Η χμαιρική πρωτεΐνη που προκύπτει, οδηγεί σε αποκλεισμό της διαφοροποίησης της κοκκιώδους σειράς στο προμυελοκυτταρικό στάδιο [65]. Η ΟΠΛ αποτελεί επιθετική μορφή λευχαιμίας, στην οποία συχνά παρατηρείται διάχυτη ενδοαγγειακή πήξη με επικίνδυνες για την ζωή αιμορραγίες, και συνεπώς η διάγνωση της αποτελεί επείγουσα κατάσταση [72]. Εντούτοις, η ανάπτυξη και η εφαρμογή στοχευμένων θεραπειών, όπως το ATRA (all trans retinoid acid) και το ATO (arsenic trioxide), έχουν επιτύχει πολύ υψηλά ποσοστά ίασης [73].

Οι περιπτώσεις ΟΜΛ με την μετάθεση t(8;21)(q22;q22)/ *RUNX1-RUNX1T1* ή την αναστροφή inv(16) (p13q22)/ *CBFB-MYH11* αναφέρονται και ως ΟΜΛ με βασικό παράγοντα σύνδεσης (CBF, Core Binding Factor Leukemia). Η CBF ΟΜΛ αντιπροσωπεύει το 20-25% της ΟΜΛ στα παιδιά και μπορεί να ανευρεθεί σε όλο το φάσμα της παιδικής ηλικίας, με εξαίρεση τα βρέφη στα οποία παρατηρείται σπάνια [71, 74]. Και στις δύο χρωμοσωμικές αναδιατάξεις, το αποτέλεσμα είναι η δυσλειτουργία του μεταγραφικού παράγοντα CBF, ο οποίος διαδραματίζει κεντρικό ρόλο στην φυσιολογική αιμοποίηση [65]. Η CBF ΟΜΛ έχει συσχετιστεί με ευνοϊκή πρόγνωση, αφού στο 90% των περιπτώσεων επιτυγχάνεται πλήρης ύφεση της νόσου μόνο με χημειοθεραπεία. Επιπλέον, και τα δύο γονίδια σύντηξης αποτελούν εξαιρετικούς μοριακούς δείκτες για την παρακολούθηση της MRD [75].

Οι αναδιατάξεις του γονιδίου *KMT2A* (ή *MLL* σύμφωνα με την παλαιότερη ονομασία του) παρατηρούνται περίπου στο 15-20% της ΟΜΛ στα παιδιά [76]. Η συχνότητα είναι μεγαλύτερη στα βρέφη, στα οποία φτάνει το 35-60%, ενώ σταδιακά μειώνεται στην παιδική και εφηβική ηλικία, όπου ανευρίσκεται στο 10-15% των περιπτώσεων [77]. Παρατηρούνται συχνότερα στην οξεία μυελομονοκυτταρική και την οξεία μονοκυτταρική ΟΜΛ (M4 και M5 αντίστοιχα σύμφωνα με την FAB ταξινόμηση), ενώ μπορεί να παρατηρηθούν και στους M0, M1 και M7 υποτύπους [76]. Στις περισσότερες κλινικές μελέτες, οι αναδιατάξεις του *KMT2A* συνδέονται με δυσμενή πρόγνωση, με την προγνωστική όμως σημασία να διαφέρει ανάλογα με την αναδιάταξη [77].

Η ανευπλοειδία αποτελεί συχνό εύρημα στην ΟΜΛ της παιδικής ηλικίας. Εντούτοις, μόνο η σπάνια απώλεια του χρωμοσώματος 5 και η πλήρης ή μερική μονοσωμία του χρωμοσώματος 7 (-7/del 7q) έχουν προγνωστική αξία, καθότι έχουν συσχετιστεί με δυσμενή πρόγνωση [71].

Φυσιολογικός καρυότυπος ανευρίσκεται στο 22-26% των παιδιών με ΟΜΛ [78, 79]. Ένα ποσοστό των ασθενών με φυσιολογικό καρυότυπο φέρει μεταλλάξεις, όπως αυτές στα γονίδια *FLT1* και *NPM1*, που δεν ανιχνεύονται με καρυότυπο. Το γονίδιο *FLT3* κωδικοποιεί έναν υποδοχέα κινάσης τυροσίνης, που εκφράζεται στα φυσιολογικά προγονικά κύτταρα του μυελού των οστών και συμβάλλει στην φυσιολογική αιμοποίηση [80]. Οι μεταλλάξεις στο γονίδιο *FLT3* αποτελούν τις πρώτες γενετικές βλάβες που έχουν περιγραφεί στην ΟΜΛ τόσο των ενηλίκων όσο και των παιδιών. Ανευρίσκονται δύο τύποι μεταλλάξεων: πρώτον, ο τύπος του εσωτερικού εν σειρά διπλασιασμού, *FLT3-ITD* (Internal Tandem Duplication), που ανευρίσκεται στο 10-20% της ΟΜΛ της παιδικής ηλικίας, και δεύτερον, ο τύπος της σημειακής μετάλλαξης στο σημείο ενεργοποίησης της κινάσης [81]. Και οι δύο τύποι οδηγούν σε συνεχή ενεργοποίηση του υποδοχέα *FLT3* [77]. Η παρουσία της μετάλλαξης *FLT3-ITD* έχει συσχετιστεί με δυσμενή πρόγνωση [65].

Μεταλλάξεις του γονιδίου *NPM1* ανευρίσκονται στο 50% των περιπτώσεων ΟΜΛ με φυσιολογικό καρυότυπο [82]. Το γονίδιο *NPM1* κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη, η οποία λειτουργεί ως πυρηνική φωσφοπρωτεΐνη. Η μετάλλαξη του *NPM1* έχει ως αποτέλεσμα

η πρωτεΐνη που παράγεται να μεταναστεύει από τον πυρήνα στο κυτταρόπλασμα του κυττάρου, και να παραμένει εκεί, αναστέλλοντας με αυτόν τον τρόπο την λειτουργία ογκοκατασταλτικών πρωτεϊνών που απαιτούν την πυρηνική πρωτεΐνη NPM1 για την φυσιολογική τους λειτουργία [83]. Η παρουσία των *NPM1* μεταλλάξεων έχει συσχετιστεί με ευνοϊκότερη πρόγνωση [84].

2.3.4. Η θεραπεία της οξείας μυελογενούς λευχαιμίας.

Η θεραπεία της ΟΜΛ περιλαμβάνει την φάση επίτευξης της ύφεσης (θεραπεία εφόδου), την θεραπεία σταθεροποίησης της ύφεσης (θεραπεία εδραίωσης) και την προφυλακτική θεραπεία του ΚΝΣ. Σημαντικός αριθμός παιδιών με ΟΜΛ υποβάλλεται σε αλλογενή μεταμόσχευση μυελού των οστών.

Ο στόχος της θεραπείας εφόδου είναι να μειωθεί το λευχαιμικό φορτίο σε ποσοστό <5% (ιδανικά <0.1%) και να αποκατασταθεί η φυσιολογική αιμοποίηση [85]. Χορηγούνται ένας ή δύο κύκλοι της θεραπείας εφόδου, στην οποία χρησιμοποιείται το σχήμα «3+7», που περιλαμβάνει 3 ημέρες αγωγή με μια ανθρακυκλίνη (νταουνορουμπικίνη, ινταρουμπικίνη ή μιτοξαντρόνη) και 7-10 ημέρες αγωγή με κυτοσίνη αραβινοσίδη. Με αυτό το θεραπευτικό σχήμα, πάνω από το 85% των παιδιών και εφήβων με ΟΜΛ επιτυγχάνουν πλήρη ύφεση. Παρόλο που συχνά στην θεραπεία εφόδου χρησιμοποιείται και ένα τρίτο φάρμακο, όπως η ετοποσίδη ή η 6-θειογουανίνη, το όφελος τους δεν έχει αποδειχθεί [86].

Η θεραπεία εδραίωσης, η οποία ακολουθεί την θεραπεία εφόδου, σχεδιάζεται με βάση την ομάδα κινδύνου του κάθε παιδιού, ανάλογα με συγκεκριμένα κυτταρογενετικά χαρακτηριστικά, καθώς και από την ανταπόκριση στην θεραπεία εφόδου. Για παιδιά τα οποία δεν θα υποβληθούν σε μεταμόσχευση μυελού των οστών, η θεραπεία εδραίωσης περιλαμβάνει υψηλές δόσεις κυταραβίνης. Παρόλο που έχει τεκμηριωθεί η ανάγκη για τον εντατικό χαρακτήρα της θεραπείας κατά την φάση εδραίωσης, ο απαραίτητος αριθμός κύκλων χημειοθεραπείας δεν έχει ακόμη οριστικοποιηθεί. Οι περισσότερες ομάδες χορηγούν δύο με τρεις κύκλους χημειοθεραπείας κατά την φάση εδραίωσης, ώστε μαζί με την θεραπεία εφόδου, να

συμπληρωθούν τρεις με πέντε κύκλοι χημειοθεραπείας [87]. Σε ασθενείς υψηλού κινδύνου, όπως οι ασθενείς με φτωχή ανταπόκριση στην θεραπεία εφόδου και οι ασθενείς με συγκεκριμένες κυτταρογενετικές ανωμαλίες, όπως η μονοσωμία 7 και η μονοσωμία 5, έχει ένδειξη η μεταμόσχευση μυελού των οστών [67].

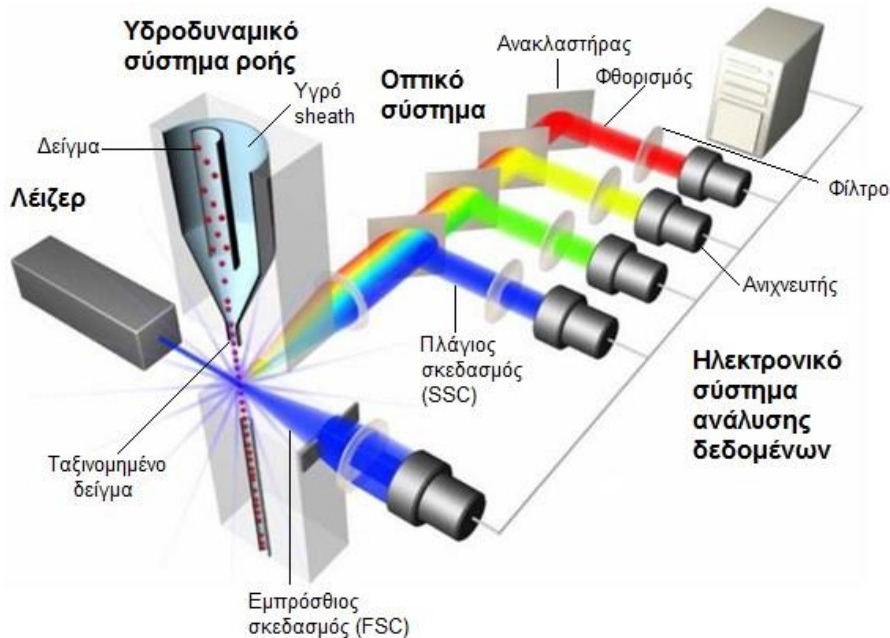
Όπως αναφέρθηκε, η προσθήκη του ATRA έχει συμβάλει ιδιαίτερα στην θεραπεία της οξείας προμυελοκυτταρικής λευχαιμίας, με το ποσοστό επιβίωσης στον συγκεκριμένο υπότυπο να φτάνει το 90% [88]. Λόγω της καλής πρόγνωσης της οξείας προμυελοκυτταρικής λευχαιμίας, δεν χορηγείται ετοποσίδη στο ανάλογο σχήμα. Το σύνδρομο ATRA που μπορεί να ακολουθήσει την χορήγηση του φαρμάκου, περιλαμβάνει πυρετό, πλευριτική ή περικαρδιακή συλλογή, διηθήματα πνευμόνων, καρδιοτοξικότητα και νεφροτοξικότητα, και αντιμετωπίζεται με χορήγηση δεξαμεθαζόνης. Σε περίπτωση υποτροπής στον μυελό, μοριακής υποτροπής, ή επιμονής της μοριακής βλάβης, χορηγείται τριοξείδιο του αρσενικού σε εναλλάξ σχήμα με το ATRA.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3. Η ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΙΑ ΡΟΗΣ ΣΤΗΝ ΠΑΙΔΙΑΤΡΙΚΗ ΑΙΜΑΤΟΛΟΓΙΑ-ΟΓΚΟΛΟΓΙΑ

3.1. Η αρχή της μεθόδου της κυτταρομετρίας ροής.

Η κυτταρομετρία ροής αποτελεί μέθοδο, της οποίας η εφαρμογή αποτελεί μια από τις σημαντικότερες καινοτομίες που χρησιμοποιούνται σε ένα εργαστήριο, τόσο ερευνητικό, όσο και νοσοκομειακό. Βασικός σκοπός της μεθόδου είναι η ταχεία αναγνώριση και καταμέτρηση ενός πολύ μεγάλου αριθμού σωματιδίων σε ένα εναίωρημα. Τα σωματίδια αυτά μπορεί να είναι ποικίλα, όπως ευκαρυωτικά ή και προκαρυωτικά κύτταρα ή σφαιρίδια Latex. Η μελέτη των σωματιδίων επιτυγχάνεται με την ανάλυση των σημάτων που παράγονται κατά την πρόπτωση μιας ακτίνας LASER σε κάθε ένα από τα σωματίδια. Τα σήματα τα οποία παράγονται, μετατρέπονται σε ηλεκτρικά και αναλύονται με ειδικά λογισμικά.

Ο κυτταρομετρητής ροής αποτελείται από τρία τμήματα, τα οποία είναι τα εξής: το υδροδυναμικό σύστημα, το οπτικό σύστημα και το ηλεκτρονικό σύστημα ανάλυσης δεδομένων. Ο ρόλος του υδροδυναμικού συστήματος είναι να μεταφέρει το προς εξέταση δείγμα στον κυτταρομετρητή ροής με σταθερή και ακριβή ροή. Δημιουργείται μια πολύ λεπτή (70μm) δέσμη νηματικής ροής των σωματιδίων, στην οποία τα σωματίδια ρέουν σε μια μονή σειρά, ομαλά και χωρίς στροβιλισμούς. Με τον τρόπο αυτό τα σωματίδια μπορούν να περνούν ένα-ένα μπροστά από μια ακτίνα LASER.



Εικόνα 9. Το υδροδυναμικό, το οπτικό και το ηλεκτρονικό σύστημα ενός κυτταρομετρητή ροής.

Το οπτικό σύστημα αποτελείται από την ακτινοβολία LASER για τον φωτισμό των σωματιδίων στο ρεύμα του δείγματος, από φίλτρα που διαχωρίζουν το φάσμα της ακτινοβολίας και από φωτοπολλαπλασιαστές που συλλέγουν τα φωτεινά σήματα. Όταν μια ακτίνα LASER συναντά ένα σωματίδιο, μπορούν να συμβούν τα εξής: πρώτον, να σκεδαστεί, και δεύτερον, να συναντήσει φθορίζουσες ενώσεις οι οποίες απορροφούν την φωτεινή ακτινοβολία, και στην συνέχεια εκπέμπουν ακτινοβολία μεγαλύτερου μήκους κύματος, δηλαδή μικρότερης ενέργειας.

Η ένταση της ακτινοβολίας που σκεδάζεται προς τα εμπρός, σε γωνία $0,5^\circ$ ως προς την αρχική διεύθυνση της ακτίνας LASER (πρόσθιος σκεδασμός), εξαρτάται από το μέγεθος του σωματιδίου. Ως εκ τούτου, ο πρόσθιος σκεδασμός μας δίνει πληροφορίες ως προς το μέγεθος των κυττάρων. Η ένταση της ακτινοβολίας που σκεδάζεται σε γωνία 90° ως προς την αρχική διεύθυνση της ακτίνας (πλάγιος σκεδασμός) είναι συνάρτηση της πολυπλοκότητας των φυσικών χαρακτηριστικών του κυττάρου, όπως

είναι το σχήμα του πυρήνα, ο αριθμός των κυτταροπλασματικών σωματιδίων ή η αδρότητα της κυτταρικής μεμβράνης.

Η μελέτη του φθορισμού αποτελεί βασικό κομμάτι της λειτουργίας του κυτταρομετρητή ροής. Τα μόρια συγκεκριμένων ουσιών, που ονομάζονται φθορίζουσες χρωστικές ή φθοριοχρώματα, έχουν την ιδιότητα να απορροφούν την ακτινοβολία που προσκρούει πάνω τους και να διεγείρονται. Τα ηλεκτρόνια των διεγερμένων μορίων βρίσκονται σε υψηλότερη στάθμη ενέργειας. Όταν τα ηλεκτρόνια επιστρέφουν στην αρχική τους ενεργειακή κατάσταση, εκπέμπουν την ενέργεια που απορρόφησαν ως φως μικρότερης ενέργειας (μεγαλύτερου μήκους κύματος), φαινόμενο που ονομάζεται φθορισμός.

Οι φθορίζουσες χρωστικές των κυττάρων που μελετώνται στον κυτταρομετρητή, μπορεί να είναι είτε ενδογενείς είτε εξωγενείς. Οι ενδογενείς φθορίζουσες χρωστικές παράγονται από το ίδιο το κύτταρο (φαινόμενο που ονομάζεται αυτοφθορισμός), όπως συμβαίνει κατά την απόπτωση των κυττάρων. Αυτοφθορίζοντα κύτταρα είναι από την φύση τους τα ηωσινόφιλα. Οι εξωγενείς φθορίζουσες χρωστικές είναι ουσίες οι οποίες προστίθενται κατά την παρασκευή του δείγματος. Υπάρχουν εξωγενείς χρωστικές, οι οποίες συνδέονται επιλεκτικά με συγκεκριμένες δομές του κυττάρου, όπως για παράδειγμα η χρωστική Propidium Iodine, η οποία συνδέεται στο DNA του κυττάρου ή η χρωστική Carboxyfluorescein succinimidyl ester (CFSE), η οποία συνδέεται με τις κυτταρικές πρωτεΐνες. Εντούτοις, η μεγάλη πλειοψηφία των φθορίζουσών χρωστικών που χρησιμοποιούνται είναι ουσίες συζευγμένες με μονοκλωνικά αντισώματα. Η τεχνολογία των μονοκλωνικών αντισωμάτων προσφέρει ένα μεγάλο φάσμα συγκεκριμένων αντισωμάτων που το καθένα έχει ως στόχο συγκεκριμένους επιφανειακούς, κυτταροπλασματικούς ή πυρηνικούς κυτταρικούς δείκτες. Οι κυτταρικοί αυτοί δείκτες είναι μόρια διαφορετικά, ανάλογα με το είδος και το στάδιο ανάπτυξης του κυττάρου. Οι περισσότεροι από αυτούς τους δείκτες έχουν κωδικοποιηθεί με ένα διεθνώς αποδεκτό σύστημα στο οποίο ονομάζεται CD (Clusters of Differentiation ή σύμπλοκα διαφοροποίησης), προκειμένου να καταστεί δυνατή η εύρεση και διαφοροποίηση των κυττάρων που τους φέρουν. Συνεπώς, η ένταση του φθορισμού της κάθε φθορίζουσας χρωστικής είναι ανάλογη της συγκέντρωσης των

μορίων τα οποία το συζευγμένο με την χρωστική μονοκλωνικό αντίσωμα αναγνωρίζει. Έτσι, με την χρήση περισσότερων αντισωμάτων, είναι δυνατή η μελέτη συγκεκριμένων υποπληθυσμών κυττάρων.

Η σκεδαζόμενη και η φθορίζουσα ακτινοβολία ανιχνεύονται με την χρήση των φωτοπολλαπλασιαστών (Photomultiplier tubes ή αλλιώς PMTs), οι οποίοι μετατρέπουν το φωτεινό σήμα σε ηλεκτρικό και ταυτόχρονα ενισχύουν την έντασή του. Όσο μεγαλύτερος είναι ο αριθμός των PMTs, τόσο περισσότερες φθορίζουσες χρωστικές μπορούν να χρησιμοποιηθούν ταυτόχρονα, και συνεπώς τόσο μεγαλύτερος αριθμός δεικτών μπορεί να μελετηθεί. Τέλος, τα ηλεκτρικά σήματα που παράγονται από τους PMTs μετατρέπονται σε ψηφιακά και εξάγονται σε υπολογιστή, που με το κατάλληλο λογισμικό μετατρέπει τα σήματα σε γραφήματα, όπως ιστογράμματα ή στικτογράμματα [89-92].

3.2. Οι εφαρμογές της κυτταρομετρίας ροής στην παιδιατρική αιματολογία-ογκολογία.

Τις τελευταίες δεκαετίες, η κυτταρομετρία ροής, ενώ ήταν μέθοδος που απαιτούσε εξειδικευμένο προσωπικό και εξοπλισμό και εξυπηρετούσε ερευνητικούς σκοπούς, έχει μετατραπεί σε τακτικό εξοπλισμό κάθε σύγχρονου νοσοκομειακού εργαστηρίου, ιδιαίτερα μεγάλης σημασίας για την διάγνωση και παρακολούθηση πολλών ασθενειών. Η πρώτη σημαντική κλινική εφαρμογή της κυτταρομετρίας ροής ήταν η ανοσοφαινοτυποποίηση των λεμφοκυττάρων σε ασθενείς με λευχαιμία και λέμφωμα. Αρχικά, η κυτταρομετρία ροής χρησιμοποιήθηκε για την ταξινόμηση της ασθένειας και τον χαρακτηρισμό των λευχαιμικών κυττάρων, αφού είχε προηγηθεί η διάγνωση της νόσου. Πλέον, η ανοσοφαινοτυποποίηση των λευχαιμιών, των λεμφωμάτων, και άλλων αιματολογικών κακοηθειών για διαγνωστικό σκοπό αποτελεί μια από τις πιο διαδεδομένες χρήσεις της κυτταρομετρίας ροής.

Στον τομέα της παιδιατρικής αιματολογίας-ογκολογίας, η διάγνωση και η τυποποίηση των αιματολογικών κακοηθειών, και ιδιαίτερα της οξείας λευχαιμίας, όπως ήδη αναλύθηκε, στηρίζεται σε μεγάλο βαθμό στην ανοσοφαινοτυπική μελέτη του

παθολογικού πληθυσμού. Με την χρήση της κυτταρομετρίας ροής, σε συνδυασμό με την παρατήρηση των μορφολογικών χαρακτηριστικών των λευχαιμικών κυττάρων καθώς και με διαγνωστικές μεθόδους ανοσοϊστοχημείας και μοριακής βιολογίας για την μελέτη γενετικών ανωμαλιών στον παθολογικό κυτταρικό πληθυσμό, ολοκληρώνεται το προφίλ της κακοήθειας με σκοπό την διάγνωση, την κατάταξη και την προγνωστική αξιολόγηση της πορείας της νόσου. Πιο συγκεκριμένα, σε πρώτη φάση επιτυγχάνεται ο προσδιορισμός της κυτταρικής σειράς από την οποία προέρχεται ο παθολογικός κυτταρικός πληθυσμός. Αναγνωρίζεται δηλαδή αν πρόκειται για οξεία λεμφοβλαστική ή οξεία μυελογενή λευχαιμία. Κατόπιν, η νόσος ταξινομείται σε υποκατηγορίες με βάση τους δείκτες που εντοπίζονται. Με την κυτταρομετρία ροής εκτιμάται η κυτταρική ωριμότητα, καθώς επίσης και η ετερογένεια του κυτταρικού πληθυσμού. Επίσης, αναγνωρίζονται τα άτυπα άωρα κύτταρα σε σχέση με τα φυσιολογικά άωρα κύτταρα, ενώ επιπλέον αναγνωρίζεται η παθολογική έκφραση αντιγόνων, όπως και η έκφραση δεικτών που συσχετίζονται με γενετικές διαταραχές. Συνεπώς, είναι εφικτή η πρόβλεψη των υφιστάμενων κυτταρογενετικών ανωμαλιών και η ανίχνευση προγνωστικών δεικτών [85, 91, 93].

Πέρα από την συμβολή της κυτταρομετρίας ροής στην διάγνωση της λευχαιμίας, εξίσου σημαντική είναι η συμβολή της μεθόδου στην παρακολούθηση της ανταπόκρισης στην θεραπεία, μέσω του ποσοτικού προσδιορισμού της Ελάχιστης Υπολειπόμενης Νόσου. Η μελέτη της Ελάχιστης Υπολειπόμενης Νόσου είναι εξαιρετικής σημασίας, ιδιαίτερα κατά τον πρώτο μήνα της θεραπείας, και έχει ενσωματωθεί στα πρωτόκολλα αντιμετώπισης των λεμφοβλαστικών λευχαιμιών της παιδικής ηλικίας. Η μελέτη της Ελάχιστης Υπολειπόμενης Νόσου στην ΟΛΛ είναι απαραίτητη, αφού η παρουσία της νόσου στον μυελό υποδηλώνει υποτροπή αυτής. Η μελέτη της Ελάχιστης Υπολειπόμενης Νόσου επιτυγχάνεται μέσω της ανίχνευσης των λευχαιμικών κυττάρων και της διάκρισής τους από τα φυσιολογικά προγονικά κύτταρα του αναγεννώμενου μυελού. Το πλεονέκτημα που προσφέρει η κυτταρομετρία ροής στην μελέτη της Ελάχιστης Υπολειπόμενης Νόσου είναι ότι η μέθοδος μπορεί να εφαρμοστεί καθολικά σε όλους τους ασθενείς με ΟΛΛ, ανεξαρτήτως της ύπαρξης ή όχι γενετικών διαταραχών. Η μελέτη της υπολειπόμενης νόσου σε ασθενείς με ΟΜΛ παρουσιάζει μεγαλύτερες δυσκολίες, λόγω της μεγαλύτερης ετερογένειας της νόσου.

Εντούτοις, τα τελευταία χρόνια γίνεται προσπάθεια βελτίωσης των πρωτοκόλλων μελέτης της Ελάχιστης Υπολειπόμενης Νόσου στους ασθενείς με ΟΜΛ, με σκοπό την ενσωμάτωσή τους στα αντίστοιχα θεραπευτικά πρωτόκολλα [94, 95].

Ιδιαίτερα σημαντική είναι η συμβολή της κυτταρομετρίας ροής στην μεταμόσχευση αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων (Hematopoietic Stem Cells – HSCs). Η μεταμόσχευση HSCs (Hematopoietic Stem Cell Transplantation – HSCT) αποσκοπεί στην αντικατάσταση των HSCs του ασθενούς από νέα, υγιή και λειτουργικά HSCs. Η HSCT εφαρμόζεται όταν η φυσιολογική λειτουργία του μυελού των οστών έχει διαταραχτεί από ασθένειες όπως οι αιματολογικές κακοήθειες, διάφοροι συμπαγείς όγκοι, ορισμένα γενετικά νοσήματα και από την τοξική επίδραση της αντικαρκινικής θεραπείας, όπως η χημειοθεραπεία και οι υψηλές δόσεις ακτινοβολίας. Οι αιματολογικές κακοήθειες, και συγκεκριμένα οι οξείες λευχαιμίες, αποτελούν την συχνότερη αιτία της HSCT, αφού η οξεία μυελογενής λευχαιμία αντιπροσωπεύει το 33% των περιπτώσεων και η οξεία λεμφοβλαστική το 16%. Τα HSCs τα οποία μεταμοσχεύονται στον ασθενή απομονώνονται από τρεις κύριες πηγές: τον μυελό των οστών, το περιφερικό αίμα και το ομφαλοπλακουντιακό αίμα. Η HSCT διακρίνεται στην μεταμόσχευση αυτόλογου μοσχεύματος, στην οποία τα HSCs συλλέγονται από τον ίδιο τον ασθενή, και ως εκ τούτου δεν υπάρχει κίνδυνος απόρριψης του μοσχεύματος, και στην μεταμόσχευση αλλογενούς μοσχεύματος, κατά την οποία χορηγούνται κύτταρα από άλλον κατάλληλο υγιή δότη.

Ο δείκτης CD34 βρίσκεται στην επιφάνεια των HSCs, και ο προσδιορισμός του αριθμού των CD34+ κυττάρων, με την μέθοδο της κυτταρομετρίας ροής, αποτελεί μέτρο της ποσότητας του μοσχεύματος. Ο ποσοτικός προσδιορισμός των CD34+ κυττάρων πραγματοποιείται στο μόσχευμα του δέκτη πριν από την λευκαφαίρεση. Εκτός από την ποσοτικοποίηση των HSCs στο μόσχευμα, η κυτταρομετρία ροής χρησιμοποιείται και για την παρακολούθηση της μετα-μοσχευτικής πορείας και της ανοσολογικής ανασύστασης. Ο τακτικός ποσοτικός προσδιορισμός των λεμφοκυτταρικών υποπληθυσμών μετά την μεταμόσχευση αποτελεί χρήσιμο εργαλείο για την αξιολόγηση της εγκατάστασης του μοσχεύματος [96-98].

Ιδιαίτερα σημαντική είναι η συμβολή της κυτταρομετρίας ροής στην διαγνωστική προσέγγιση πολλών πρωτοπαθών ανοσοανεπαρκειών. Οι πρωτοπαθείς ανοσοανεπάρκειες αποτελούν μια ιδιαίτερα ετερογενή ομάδα νοσημάτων, που χαρακτηρίζονται από υποτροπιάζουσες ή/και σοβαρές λοιμώξεις, αυτοανοσία και αυξημένο κίνδυνο για ανάπτυξη κακοηθειών. Πολλές από τις πρωτοπαθείς ανοσοανεπάρκειες μπορεί αρχικά να προβάλλουν ως αιματολογικά νοσήματα, κυρίως ως αυτοάνοσες κυτταροπενίες ή λεμφοϋπερπλαστικά σύνδρομα. Χρήσιμα εργαλεία για την διάγνωση των πρωτοπαθών ανοσοανεπαρκειών αποτελούν η γενική εξέταση αίματος, τα επίπεδα ανοσοσφαιρινών, ο τίτλος αντισωμάτων και η μελέτη του συμπληρώματος. Εντούτοις, καθώς το εύρος των πρωτοπαθών ανοσοανεπαρκειών συνεχώς διευρύνεται, καθίσταται όλο και δυσκολότερη η διάγνωσή τους χρησιμοποιώντας μόνο τους συμβατικούς εργαστηριακούς ελέγχους. Η κυτταρομετρία ροής λειτουργεί ως ένα ιδιαίτερα χρήσιμο συμπληρωματικό εργαλείο για την εκτίμηση της λειτουργίας του ανοσοποιητικού συστήματος και την διάγνωση των πρωτοπαθών ανοσοανεπαρκειών [99, 100].

Η συνεισφορά της κυτταρομετρίας ροής στην διάγνωση των πρωτοπαθών ανοσοανεπαρκειών περιλαμβάνει την μελέτη ειδικών κυτταρικών πληθυσμών και υποπληθυσμών, όπως για παράδειγμα στην φυλοσύνδετη αγαμμασφαιριναιμία ή νόσο Bruton, στην οποία παρατηρείται απουσία των Β λεμφοκυττάρων στο περιφερικό αίμα [101]. Η βαριά μικτή ανοσοανεπάρκεια (SCID, Severe Combined Immunodeficiency) αποτελεί μια ετερογενή ομάδα γενετικών νοσημάτων, που χαρακτηρίζεται από σοβαρή ποσοτική ή λειτουργική διαταραχή των Τ λεμφοκυττάρων. Στον έλεγχο με κυτταρομετρία ροής, δεν ανιχνεύονται Τ λεμφοκύτταρα, ενώ ο αριθμός των Β λεμφοκυττάρων και των κυττάρων φυσικών φονέων (NK) ποικίλει ανάλογα με την μοριακή βλάβη [102, 103]. Σε ασθενείς με φυλοσύνδετο λεμφοϋπερπλαστικό σύνδρομο τύπου 1 (XLP1, X-linked Lymphoproliferative syndrome type 1) παρατηρείται σημαντική μείωση σε έναν υποπληθυσμό των κυττάρων φυσικών φονέων [100, 104]. Στην IgE υπεργαμμασφαιριναιμία, ή σύνδρομο Job, που χαρακτηρίζεται από χρόνια έκζεμα από τις πρώτες ημέρες της ζωής και υποτροπιάζουσες μικροβιακές λοιμώξεις του δέρματος και του αναπνευστικού συστήματος, παρατηρείται χαμηλός αριθμός Τ βοηθητικών 17 (Th17) λεμφοκυττάρων

[105]. Στην κοινή ποικίλη ανοσοανεπάρκεια (CVID, Common Variable Immunodeficiency) παρατηρείται χαμηλός αριθμός Β λεμφοκυττάρων ή φυσιολογικός αριθμός με διαταραχές στα τελικά στάδια ωρίμανσης, ενώ σε ορισμένους ασθενείς μπορεί να παρατηρηθεί ποσοτική ή λειτουργική διαταραχή των Τ λεμφοκυττάρων [100, 106]. Τα υπέρ-IgM σύνδρομα αποτελούν ομάδα νοσημάτων με κοινό χαρακτηριστικό τον μειωμένο τίτλο των ανοσοσφαιρινών IgG, IgA και IgE και φυσιολογικό ή αυξημένο τίτλο της ανοσοσφαιρίνης IgM, και οφείλονται στην αδυναμία μεταστροφής της IgM στις υπόλοιπες τάξεις των ανοσοσφαιρινών κατά το τελικό στάδιο ωρίμανσης των Β λεμφοκυττάρων. Στην εξέταση του περιφερικού αίματος με κυτταρομετρία ροής, παρατηρείται, στους ασθενείς με φυλοσύνδετη μορφή υπέρ-IgM συνδρόμου, αδυναμία έκφρασης του συνδέσμου CD40 στα ενεργοποιημένα Τ λεμφοκύτταρα, ενώ σε ορισμένους ασθενείς με αυτοσωμική υπολειπόμενη μορφή υπέρ-IgM συνδρόμου, παρατηρείται έλλειψη της έκφρασης του CD40 στα Β λεμφοκύτταρα [107-109]. Στο σύνδρομο Wiskott-Aldrich το οποίο χαρακτηρίζεται από μεγάλη ευαισθησία στις λοιμώξεις, έκζεμα και θρομβοπενία, και κληρονομείται με φυλοσύνδετο υπολειπόμενο τρόπο, παρατηρείται απουσία ή μειωμένη έκφραση της πρωτεΐνης WAS στα λεμφοκύτταρα και στα κύτταρα της μυελικής σειράς [110, 111]. Η οικογενής αιμοφαγοκυτταρική λεμφοϊστικοκυττάρωση (FHLH, Familial Hemophagocytic Lymphohistiocytosis), ή αλλιώς πρωτογενής μορφή HLH, χαρακτηρίζεται από μη ελεγχόμενη ενεργοποίηση των Τ λεμφοκυττάρων και υπερπαραγωγή φλεγμονωδών κυτταροκινών [112]. Στους ασθενείς με FHLH τύπου 2 παρατηρείται απουσία έκφρασης της περφορίνης στα CD8+ Τ λεμφοκύτταρα και στα κύτταρα NK, ενώ σε ασθενείς με FHLH τύπου 3 παρατηρείται μειωμένη έκφραση της πρωτεΐνης Munc13-4 στα αιμοπετάλια [113, 114].

Η μελέτη των αιμοπεταλίων μέσω της κυτταρομετρίας ροής αποκτά ολοένα και περισσότερο έδαφος, τόσο στα ερευνητικά όσο και στα νοσοκομειακά εργαστήρια. Στην αυτοάνοση θρομβοπενική πορφύρα ανιχνεύονται αυτοαντισώματα που κυκλοφορούν ελεύθερα στο πλάσμα αλλά και αυτοαντισώματα που είναι συνδεδεμένα στα αιμοπετάλια. Η κυτταρομετρία ροής αποτελεί μια ιδιαίτερα αξιόπιστη μέθοδο στην άμεση ανάλυση των συνδεδεμένων με τα αιμοπετάλια αυτοαντισωμάτων, ενώ έχει αποδειχτεί επίσης χρήσιμη στην ανίχνευση των ελεύθερων αυτοαντισωμάτων στο

πλάσμα [91]. Σε διάφορες πρωτοπαθείς διαταραχές των αιμοπεταλίων, η παθογένεση της νόσου συνδέεται με λειτουργικές ή δομικές ανωμαλίες σε γλυκοπρωτεΐνες των αιμοπεταλίων. Η κυτταρομετρία ροής αποτελεί μια γρήγορη και αξιόπιστη μέθοδο για την ανίχνευση αυτών των ανωμαλιών, όπως για παράδειγμα για την ανίχνευση της ανώμαλης έκφρασης της γλυκοπρωτεΐνης gpIIb/IIIa της επιφάνειας των αιμοπεταλίων στην θρομβασθένεια Glanzmann και της γλυκοπρωτεΐνης gpIb στην νόσο Bernard-Soulier [115, 116].

Άλλες εφαρμογές της κυτταρομετρίας ροής αποτελούν η μελέτη του κυτταρικού κύκλου, η διάγνωση της παροδικής νυκτερινής αιμοσφαιρινουρίας (PNH, Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria) καθώς επίσης και η αξιολόγηση της εμβρυομητρικής αιμορραγίας σε περιπτώσεις Rhesus-αρνητικών μητέρων [91].

3.3. Η ελάχιστη υπολειπόμενη νόσος στην οξεία λεμφοβλαστική λευχαιμία.

Έως πρόσφατα, η ανταπόκριση στην θεραπεία των παιδιών με λευχαιμία προσδιοριζόταν με βάση μορφολογικά κριτήρια, υπολογίζοντας το ποσοστό των λευχαιμικών κυττάρων στον μυελό των οστών ή και στο περιφερικό αίμα, σε συγκεκριμένες χρονικές περιόδους, τόσο κατά την διάρκεια της θεραπείας εφόδου, όσο και μετά την ολοκλήρωσή της. Ο εντοπισμός των λευχαιμικών κυττάρων με βάση την μορφολογία τους δεν είναι πάντα εύκολος, αφού σε πολλές περιπτώσεις η μορφολογία των λευχαιμικών κυττάρων δεν μπορεί να διακριθεί από εκείνη των προγονικών κυττάρων του μυελού αλλά και των ώριμων ενεργοποιημένων λεμφοκυττάρων. Η διάκριση αυτή είναι ακόμη δυσκολότερη σε δείγματα μυελού των οστών μετά την διακοπή της χημειοθεραπείας ή μετά από αλλογενή μεταμόσχευση του μυελού των οστών, όπου το ποσοστό των προγονικών κυττάρων μπορεί να ξεπερνά το 10% των εμπύρηνων κυττάρων του μυελού. Η χρήση περισσότερο ευαίσθητων μεθόδων, όπως η κυτταρομετρία ροής, χρησιμοποιήθηκε αρχικά για την μελέτη της ελάχιστης υπολειπόμενης νόσου (MRD, Minimal Residual Disease) σε ασθενείς με T-ΟΛΛ και σταδιακά επεκτάθηκε και σε ασθενείς με Β-ΟΛΛ. Παράλληλα, αναπτύχθηκαν νέες τεχνικές για τον προσδιορισμό της MRD, όπως είναι η αλυσιδωτή αντίδραση

πολυμεράσης (PCR, Polymerase Chain Reaction) και η ποσοτική PCR ή qPCR (quantitative PCR) [117].

Η MRD σε ασθενείς με ΟΛΛ είναι η παρουσία, κατά την διάρκεια ή μετά το τέλος της χορηγούμενης θεραπείας, λευχαιμικών κυττάρων στον μυελό των οστών ή στο περιφερικό αίμα των ασθενών. Η μέτρηση της MRD γίνεται σε συγκεκριμένους χρόνους, όπως είναι η ημέρα 8 και η ημέρα 15 από την έναρξη της χημειοθεραπείας ή αμέσως μετά το τέλος της θεραπείας εφόδου [26]. Τα λευχαιμικά κύτταρα τα οποία προσδιορίζονται κατά την εξέταση της MRD μπορεί να είναι υπολειμματικά κύτταρα του προ της θεραπείας λευχαιμικού φορτίου ή κύτταρα δευτεροπαθούς λευχαιμίας. Η δευτεροπαθής λευχαιμία εμφανίζεται σε 2% έως και 20% των ασθενών που έχουν υποβληθεί σε θεραπεία για κάποια μορφή (πρώτης) κακοήθειας, και αποδίδεται στην θεραπεία με δύο ομάδες χημειοθεραπευτικών φαρμάκων, τους αλκυλιωτικούς παράγοντες και τους αναστολείς τοποϊσομεράσης 2. Τα κύτταρα δευτεροπαθούς λευχαιμίας διακρίνονται από τα υπολειμματικά κύτταρα του αρχικού λευχαιμικού φορτίου μέσω της ανίχνευσης των αναδιατάξεων στο γονίδιο του υποδοχέα T (TCR) και στο γονίδιο για την σύνθεση της ανοσοσφαιρίνης IG. Οι αναδιατάξεις στα γονίδια των TCR και IG είναι ειδικές για κάθε κυτταρικό κλώνο και θεωρούνται ως το «δακτυλικό αποτύπωμα» του κλώνου. Λευχαιμικά κύτταρα από υποτροπή της ΟΛΛ μπορούν επίσης να αναγνωριστούν με την εξέταση της MRD [118, 119].

Το όριο θετικότητας το οποίο κοινώς χρησιμοποιείται για την εξέταση MRD είναι το 0.01% ή αλλιώς 10^{-4} , το οποίο μεταφράζεται ως ένα λευχαιμικό κύτταρο σε 10.000 κύτταρα, στο σύνολο των μονοπύρηνων κυττάρων του μυελού των οστών του δείγματος [120]. Το όριο θετικότητας 0.01% έχει προκύψει από το όριο ανίχνευσης των κυτταρομετρητών ροής και των μοριακών μεθόδων που χρησιμοποιούνται στην καθημερινή πράξη. Η κλινική ερμηνεία του ορίου θετικότητας είναι πως ένας ασθενής με MRD μεγαλύτερη ή ίση από 0.01% σε δείγμα μυελού των οστών, σε καθορισμένο χρονικό σημείο κατά την διάρκεια της θεραπείας, έχει σημαντικά υψηλότερο κίνδυνο υποτροπής της λευχαιμίας σε σχέση με το αν η MRD ήταν μικρότερη από 0.01% [121, 122]. Ακόμη υψηλότερες τιμές MRD, όπως για παράδειγμα $MRD > 1\%$ έχει

συσχετιστεί με ακόμη υψηλότερο κίνδυνο υποτροπής της νόσου και με χαμηλότερα ποσοστά επιβίωσης [123].

Όπως ήδη αναφέρθηκε, οι μέθοδοι που χρησιμοποιούνται για τον προσδιορισμό της MRD είναι η κυτταρομετρία ροής και η μοριακή ανάλυση με την χρήση PCR. Τα λευχαιμικά κύτταρα χαρακτηρίζονται από ανώμαλη έκφραση κυτταρικών δεικτών. Με την ανοσοφαινοτυπική μελέτη της MRD, αναγνωρίζονται οι κυτταρικοί δείκτες και είναι δυνατή η διάκριση των λευχαιμικών κυττάρων από τα φυσιολογικά λεμφοκύτταρα και τα κύτταρα της μυελικής σειράς του μυελού των οστών. Επιπλέον, είναι δυνατή η σύγκριση του ανοσοφαινοτύπου κατά τον έλεγχο της MRD με τον ανοσοφαινότυπο της διάγνωσης, προ της έναρξης της θεραπείας. Πλεονεκτήματα της μελέτης της MRD με ανοσοφαινότυπο αποτελεί η ακριβής ποσοτικοποίηση της MRD αλλά και η δυνατότητα ταυτόχρονης αξιολόγησης της φυσιολογικής ωρίμανσης των αιμοποιητικών κυττάρων [124].

Η πιο διαδεδομένη τεχνική για την μοριακή ανάλυση της MRD βασίζεται στην ανάλυση των αναδιατάξεων των γονιδίων της ανοσοσφαιρίνης Ig και του υποδοχέα των T λεμφοκυττάρων TCR. Οι αναδιατάξεις αυτές αποτελούν φυσιολογικό φαινόμενο που δεν συνδέεται με την παθογένεση της λευχαιμίας. Κατά την διάρκεια του σχηματισμού των B και T λεμφοκυττάρων, τα γονίδια των Ig και TCR αναδιατάσσονται μέσω μιας διαδικασίας κατά την οποία ορισμένα νουκλεοτίδια μπορεί να διαγράφονται ή να εισάγονται τυχαία, με αποτέλεσμα η αλληλουχία που προκύπτει να είναι μοναδική για κάθε B ή T λεμφοκύτταρο. Στην περίπτωση νεοπλασματικής εξαλλαγής ενός λεμφοκυττάρου, ο λευχαιμικός κλώνος που θα προκύψει θα έχει την ίδια αλληλουχία στα γονίδια των Ig και TCR. Το γεγονός αυτό μπορεί να αξιοποιηθεί, ώστε να ανιχνευθεί ένας μικρός αριθμός λευχαιμικών κυττάρων μεταξύ ενός μεγάλου αριθμού φυσιολογικών λεμφοκυττάρων, που εκφράζουν γονιδιακές αναδιατάξεις με διαφορετικές αλληλουχίες [117, 125]. Τα λευχαιμικά κύτταρα στην B-ΟΛΛ αναγνωρίζονται από συγκεκριμένες αλληλουχίες στα γονίδια της βαριάς αλυσίδας της Ig (IGH), της ελαφριάς αλυσίδας κάππα (IGK) και της ελαφριάς αλυσίδας λάμδα (IGL), ενώ τα λευχαιμικά κύτταρα στην T-ΟΛΛ

αναγνωρίζονται από συγκεκριμένες αλληλουχίες στα γονίδια των αλυσίδων TCR-γάμμα (TCRG), TCR-δέλτα (TCRD) και TCR-βήτα (TCRB) [126, 127].

Μια άλλη μοριακή μέθοδος για την παρακολούθηση της MRD βασίζεται στην ανάλυση των γονιδίων σύντηξης. Περίπου στο 40% των ασθενών με ΟΛΛ παρατηρούνται χρωμοσωμικές μεταθέσεις, που οδηγούν στην δημιουργία γονιδίων σύντηξης. Τα γονίδια αυτά αποτελούν ιδανικούς στόχους για την παρακολούθηση της MRD, διότι συμμετέχουν στην παθογένεση της νόσου, ανιχνεύονται σε όλα τα λευχαιμικά κύτταρα, και είναι ιδιαίτερα σταθερά στην πορεία της νόσου [117, 128]. Η πιο συχνή μετάθεση στην Β-ΟΛΛ των ενηλίκων αποτελεί το χρωμόσωμα Philadelphia t(9;22), το οποίο προκύπτει από την συνένωση της 3' αλληλουχίας του ογκογονιδίου *c-ABL* με την 5' αλληλουχία ενός υποκινητή στην περιοχή θραύσης (*BCR*) του χρωμοσώματος 22. Το χρωμόσωμα Philadelphia παρατηρείται περίπου στο 3% των παιδιών με Β-ΟΛΛ, με υψηλότερη συχνότητα σε μεγαλύτερα παιδιά με μεγάλο αριθμό λευκών αιμοσφαιρίων και σε εφήβους. Η πιο συχνή χρωμοσωμική μετάθεση στην Β-ΟΛΛ της παιδικής ηλικίας είναι η μετάθεση ETV6-RUNX1, που παρατηρείται στο 25-30% των περιπτώσεων. Άλλες δομικές χρωμοσωμικές ανωμαλίες που χρησιμοποιούνται για την ανίχνευση της MRD περιλαμβάνουν τις ανακατατάξεις του γονιδίου *MLL* και την μετάθεση t(1;19) (E2A-PBX) [124, 128].

Τα τελευταία χρόνια, διάφορες ερευνητικές ομάδες έχουν αναδείξει την χρησιμότητα της αλληλουχίας επόμενης γενιάς (NGS, Next Generation Sequencing) για την παρακολούθηση της MRD σε ασθενείς με λευχαιμία. Η μεθοδολογία NGS χρησιμοποιείται για τον ακριβή καθορισμό της αλληλουχίας των νουκλεοτιδίων, είτε σε ολόκληρο το γονιδίωμα, είτε σε συγκεκριμένα τμήματα του DNA ή του RNA. Με την τεχνολογία NGS είναι δυνατή η ανίχνευση σημειακών μεταλλάξεων, όπως ενθέσεις ή διαγραφές νουκλεοτιδίων αλλά και αναδιατάξεις ή διαγραφές εξονίων ή ολόκληρων γονιδίων [129]. Η μέθοδος NGS έχει χρησιμοποιηθεί με επιτυχία για την μελέτη της MRD σε ασθενείς με ΟΛΛ αλλά και για την μελέτη επιγενετικών αλλαγών μεταξύ των κυττάρων κατά την ύφεση και κατά την υποτροπή της νόσου [130].

Η κλινική σημασία και η προγνωστική αξία του ποσοτικού προσδιορισμού της MRD στα παιδιά με ΟΛΛ έχει αναδειχθεί σε μεγάλες προοπτικές μελέτες σε κέντρα

της Ευρώπης και των Ηνωμένων Πολιτειών. Ο προσδιορισμός της MRD σε συγκεκριμένες χρονικές στιγμές κατά την διάρκεια της χημειοθεραπείας αποτελεί τον ισχυρότερο προγνωστικό παράγοντα για υποτροπή της νόσου στα παιδιά με ΟΛΛ [131-133]. Ο Cave, χρησιμοποιώντας την μέθοδο της PCR, παρατήρησε ότι η παρουσία υπολειπόμενης νόσου στο επίπεδο του 10^{-3} μετά την ολοκλήρωση της θεραπείας εφόδου συσχετίζεται με υψηλό ποσοστό υποτροπής της νόσου, ενώ η παρουσία υπολειπόμενης νόσου στο επίπεδο του 10^{-2} συσχετίζεται με ακόμη υψηλότερο κίνδυνο υποτροπής [131]. Ο Coustan-Smith, μελετώντας την MRD με κυτταρομετρία ροής, επίσης παρατήρησε ότι η θετική MRD μετά την ολοκλήρωση της θεραπείας εφόδου σχετίζεται με αυξημένο κίνδυνο υποτροπής της νόσου [132]. Ο κίνδυνος υποτροπής της νόσου είναι σημαντικά μεγαλύτερος όταν η MRD κατά την ολοκλήρωση της θεραπείας εφόδου υπερβαίνει το 0.01% [134, 135]. Η κλινική σημασία του ποσοτικού προσδιορισμού της MRD δεν περιορίζεται μόνο στον προγνωστικό της ρόλο, αφού η χρήση της έχει ιδιαίτερη αξία στην ταξινόμηση των ασθενών σε ομάδες κινδύνου και στην επακόλουθη λήψη θεραπευτικών αποφάσεων, καθώς επίσης και στην αξιολόγηση της αποτελεσματικότητας της χορηγούμενης θεραπείας [94]. Με βάση το αποτέλεσμα της MRD σε συγκεκριμένα χρονικά σημεία κατά την διάρκεια της θεραπείας εφόδου, σε συνδυασμό με άλλους παράγοντες κινδύνου, γίνεται η επιλογή των ασθενών που θα χρειαστούν εντατικοποίηση της θεραπείας. Αντίθετα, οι ασθενείς χαμηλού κινδύνου, με αρνητική MRD κατά την ολοκλήρωση της θεραπείας εφόδου, λαμβάνουν λιγότερο εντατικό θεραπευτικό σχήμα, ώστε να αποφευχθούν οι ανεπιθύμητες ενέργειες της χημειοθεραπείας, όπως οι δευτεροπαθείς κακοήθειες, η μυοκαρδιοπάθεια, οι ενδοκρινοπάθειες και διάφορες νευροαναπτυξιακές διαταραχές [94, 136].

3.4. Η ελάχιστη υπολειπόμενη νόσος στην οξεία μυελογενή λευχαιμία.

Παρόλο που η μελέτη του ποσοτικού προσδιορισμού της MRD έχει εδώ και αρκετά χρόνια ενσωματωθεί στον έλεγχο ρουτίνας των ασθενών με ΟΛΛ, μόνο τα τελευταία χρόνια έχει αναδειχθεί η σημασία της στην αντιμετώπιση ασθενών με ΟΜΛ. Όπως και στην ΟΛΛ, η εκτίμηση της πορείας και της πρόγνωσης της νόσου με βάση την MRD

προσφέρει μια πιο ακριβή και λεπτομερή εικόνα από ότι η εκτίμηση με βάση την μορφολογική εικόνα των κυττάρων. Με τα σύγχρονα διαγνωστικά εργαλεία, είναι δυνατή η ανίχνευση των λευχαιμικών κυττάρων έως και το επίπεδο του 0.001% του συνόλου των μονοπύρηνων κυττάρων του μυελού των οστών.

Οι τεχνικές που χρησιμοποιούνται για την ανάλυση της MRD στην ΟΜΛ περιλαμβάνουν την πολυπαραμετρική κυτταρομετρία ροής, την ανίχνευση γονιδίων σύντηξης με PCR και την μελέτη με αλληλουχία επόμενης γενιάς (NGS) [137]. Η χρήση της RT-PCR για τον προσδιορισμό της MRD, παρόλο που προσφέρει ιδιαίτερη ακρίβεια στην μέτρηση, περιορίζεται από το γεγονός πως μόλις στο 50-60% των παιδιών με ΟΜΛ ανιχνεύονται μεταλλάξεις ή γονίδια σύντηξης [138]. Επιπλέον, η παραμονή των γονιδίων σύντηξης *RUNX1-RUNX1T1* και *CBFB-MYH11* σε ασθενείς με μακροχρόνια ύφεση της νόσου, περιορίζει την κλινική σημασία του αποτελέσματος της MRD [139]. Αντίθετα, η πιο αργή μοριακή ανταπόκριση σε ασθενείς με *RUNX1-RUNX1T1*-θετική ΟΜΛ συσχετίστηκε με αυξημένο κίνδυνο υποτροπής σε σχέση με τους ασθενείς με ταχύτερη μείωση των RNA μεταγράφων [140]. Διαφορετικές μελέτες παρουσιάζουν αμφίβολα αποτελέσματα σχετικά με την χρήση των μεταλλάξεων στα γονίδια *FLT3* και *NPM1* ως δείκτες για την αξιολόγηση της MRD, λόγω της αστάθειας των βλαβών αυτών μεταξύ της διάγνωσης και της υποτροπής της νόσου [141, 142].

Η ΟΜΛ χαρακτηρίζεται από μεγάλη κλωνική ετερογένεια, και η τεχνολογία NGS εξελίσσεται σε ένα σημαντικό εργαλείο για την μοριακή ανατομία της ΟΜΛ κατά την διάγνωση, ιδιαίτερα σε περιπτώσεις που δεν παρατηρούνται κυτταρογενετικές ανωμαλίες [143]. Διαφορετικοί κυτταρικοί κλώνοι, που χαρακτηρίζονται από ειδικές μεταλλάξεις, παρουσιάζουν διαφορετική ευαισθησία στην θεραπεία, καθώς και διαφορετική τάση για υποτροπή. Η τεχνολογία NGS περιλαμβάνει τις μεθόδους Whole Genome Sequencing (WGS), Whole Exome Sequencing (WES), καθώς και την Targeted-gene Sequencing. Η τελευταία μέθοδος επιτρέπει την ταυτόχρονη καταγραφή πολλών γονιδίων ενδιαφέροντος και την ανίχνευση μεταλλάξεων που μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως βιοδείκτες και ως στόχοι για την εκτίμηση της MRD [95]. Η εκτίμηση της MRD με την τεχνολογία NGS μπορεί να αναγνωρίσει σημαντικές αλλαγές οι οποίες μπορεί να συμβούν σε υποκλωνικό επίπεδο κατά την εξέλιξη της

νόσου [144]. Η σημασία της παρουσίας θετικής MRD μετά από την θεραπεία εφόδου ως ανεξάρτητος προγνωστικός παράγοντας για την επιβίωση με την τεχνολογία NGS αναδείχθηκε από τον Jongen-Lavrencic [137]. Παρουσία μεταλλάξεων παρατηρήθηκε περίπου στο 50% των ασθενών κατά το τέλος της θεραπείας εφόδου, και η παρουσία των περισσότερων μεταλλάξεων συσχετίστηκε με αυξημένο κίνδυνο υποτροπής της νόσου [145]. Εντούτοις, κάποιες από τις παρατηρούμενες μεταλλάξεις, όπως αυτές στα γονίδια *DNMT3A*, *TET2* και *ASXL1*, γνωστές και ως DTA, είναι γνωστό ότι παρατηρούνται συχνά κατά την διάρκεια της φυσιολογικής αιμοποίησης, και ως εκ τούτου, δεν έχουν κάποια προγνωστική αξία [145]. Συνεπώς, η χρησιμότητα της τεχνολογίας NGS για την εκτίμηση της MRD μειώνεται λόγω της παρουσίας μεταλλάξεων οι οποίες συμβαίνουν φυσιολογικά κατά την αιμοποίηση.

Αν και η αξιολόγηση της MRD με βάση την πολυπαραμετρική κυτταρομετρία ροής (MFC, Multiparametric Flow Cytometry) έχει χαμηλότερη ευαισθησία από ότι η PCR και η τεχνολογία NGS, μπορεί να εφαρμοστεί σχεδόν στο σύνολο των ασθενών. Συνεπώς, η MFC είναι η μέθοδος εκλογής για τον προσδιορισμό της MRD σε ασθενείς με ΟΜΛ. Το 2003 η ομάδα COG δημοσίευσε τα αποτελέσματα μιας προοπτικής μελέτης, η οποία συμπεριέλαβε 252 παιδιά με ΟΜΛ. Η MFC-MRD αναδείχθηκε ως ο σημαντικότερος ανεξάρτητος προγνωστικός παράγοντας που σχετίζεται με δυσμενή πρόγνωση [146]. Στην μελέτη AML02 του νοσοκομείου St. Jude, η οποία συμπεριέλαβε 232 παιδιά, η MFC-MRD, μαζί με γενετικά χαρακτηριστικά, χρησιμοποιήθηκε ως κριτήριο για την ταξινόμηση των ασθενών σε ομάδες κινδύνου. Ως θετικότητα ορίστηκε η παρουσία ενός ή περισσότερων λευχαιμικών κυττάρων σε 1000 μονοπύρηνια κύτταρα του μυελού των οστών (>0.1%). Η θετική MRD μετά την φάση εφόδου 1 συσχετίστηκε με δυσμενή πρόγνωση στα παιδιά υψηλού κινδύνου, ενώ και η θετική MRD μετά την φάση εφόδου 2 ήταν προγνωστική δυσμενούς πορείας της νόσου [147]. Το 2016, ο Tierens ανέλυσε αναδρομικά την προγνωστική σημασία της MFC-MRD σε μια μελέτη κοόρτης 201 παιδιών που είχαν συμπεριληφθεί στην μελέτη NOPHO-AML 2004. Η MRD μελετήθηκε κατά την 15^η ημέρα της θεραπείας εφόδου και πριν από την θεραπεία σταθεροποίησης, και η θετικότητα ορίστηκε στο 0.1%. Η θετική MRD κατά την 15^η ημέρα θεραπείας και κατά το τέλος της θεραπείας εφόδου συσχετίστηκε σημαντικά με μικρότερη 5-ετή και συνολική επιβίωση [148].

Προκειμένου να διασφαλιστεί η συγκρισιμότητα των αποτελεσμάτων μεταξύ διαφορετικών εργαστηρίων και να διευκολυνθεί η χρήση της MFC-MRD στην κλινική παρακολούθηση των παιδιών με ΟΜΛ, τα τελευταία χρόνια γίνεται προσπάθεια βελτίωσης των πρωτοκόλλων προσδιορισμού της MRD σε ασθενείς με ΟΜΛ, με σκοπό την ενσωμάτωσή της στα αντίστοιχα θεραπευτικά πρωτόκολλα. Στο πλαίσιο αυτής της προσπάθειας, το 2018, η European Leukemia Network δημοσίευσε ένα consensus σχετικά με την μέτρηση της MFC-MRD με συστάσεις για κοινή προσέγγιση αναφορικά με τα χρονικά σημεία μετρήσεων, τα όρια θετικότητας, τις τεχνικές προδιαγραφές και την δημοσίευση των αποτελεσμάτων [149]. Η συνεπής τήρηση μιας τυποποιημένης προσέγγισης στην μέτρηση της MRD είναι πολύ πιθανό ότι θα βοηθήσει να ξεπεραστούν πολλοί από τους τρέχοντες περιορισμούς, με σκοπό να ενσωματωθεί η μέτρηση της MFC-MRD στα παιδιατρικά θεραπευτικά πρωτόκολλα.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4. ΟΙ ΚΥΤΤΑΡΟΚΙΝΕΣ ΤΗΣ ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑΣ ΤΗΣ IL-12 ΣΤΟΝ ΚΑΡΚΙΝΟ

4.1. Ο ρόλος των προ-φλεγμονωδών και αντί-φλεγμονωδών κυτταροκινών στον καρκίνο.

Οι κυτταροκίνες είναι πολυπεπίδια ή γλυκοπρωτεΐνες, το μοριακό βάρος των οποίων συνήθως δεν ξεπερνά τα 30kDa. Αποτελούν σηματοδοτικά μόρια του ενδογενούς και προσαρμοστικού ανοσοποιητικού συστήματος, τα οποία επιτρέπουν στα κύτταρα να επικοινωνούν μεταξύ τους σε κοντινές αποστάσεις, με αυτοκρινή ή παρακρινή τρόπο. Οι κυτταροκίνες συνήθως απελευθερώνονται για ένα καθορισμένο χρονικό διάστημα, ως απάντηση σε ένα ερέθισμα, και η διάρκεια της δράσης τους είναι σύντομη λόγω της περιορισμένης ημίσειας ζωής τους στην κυκλοφορία. Τα κύτταρα-στόχοι των κυτταροκινών εκφράζουν στην κυτταρική τους μεμβράνη υποδοχείς, οι οποίοι χαρακτηρίζονται από μεγάλη συγγένεια με τις κυτταροκίνες. Η σύνδεση της κυτταροκίνης με τον υποδοχέα της προκαλεί ενεργοποίηση της ενδοκυτταρικής σηματοδότησης, που οδηγεί σε τροποποιήσεις στην μεταγραφή γονιδίων. Τα κύτταρα-στόχοι εκφράζουν στην κυτταρική επιφάνειά τους διάφορους υποδοχείς κυτταροκινών, και ως εκ τούτου, συνθέτουν πληροφορίες από πολλές διαφορετικές κυτταροκίνες. Η συνέργεια ή ο ανταγωνισμός μεταξύ διαφορετικών κυτταροκινών είναι ένα συχνό φαινόμενο με μεγάλο βαθμό πολυπλοκότητας. Οι κυτταροκίνες μεταφέρουν μηνύματα που σχετίζονται με τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων, την διαφοροποίησή τους και την απόπτωση, ρυθμίζοντας με αυτόν τον τρόπο τον κυτταρικό κύκλο. Επιπλέον, μεταφέρουν μηνύματα για την ενίσχυση ή την αναστολή φλεγμονωδών διεργασιών στα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος, τροποποιώντας με αυτόν τον τρόπο την δράση τους.

Αν και οι βλάβες στα ογκογονίδια και τα ογκοκατασταλτικά γονίδια τονίζουν τον αυτόνομο χαρακτήρα των βλαβών στα καρκινικά κύτταρα, οι νεοπλασίες εμφανίζονται και εξελίσσονται μέσα σε ένα μικροπεριβάλλον με υγιή, μη μεταλλαγμένα κύτταρα. Η αλληλεπίδραση μεταξύ των νεοπλασματικών και των φυσιολογικών κυττάρων του μικροπεριβάλλοντος τους έχει αναγνωριστεί ότι επηρεάζει την καρκινογένεση σε

διάφορα στάδια [150]. Σε πρώιμο στάδιο της καρκινογένεσης, τα στρωματικά κύτταρα μπορούν να παρέχουν στα νεοπλασματικά κύτταρα σήματα που ρυθμίζουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την διαφοροποίηση, ενώ σε μετέπειτα στάδιο, σήματα τα οποία ρυθμίζουν την διείσδυση των καρκινικών κυττάρων και την δημιουργία μεταστάσεων [151]. Επιπλέον, τα νεοπλασματικά κύτταρα μπορούν να ελέγξουν το υπάρχον αγγειακό σύστημα ή να προωθήσουν την δημιουργία νέων αγγείων, ώστε να εξασφαλίσουν μια επαρκή παροχή αίματος [152].

Η πυκνή διήθηση λεμφοκυττάρων στο μικροπεριβάλλον του όγκου έχει συσχετιστεί με μικρότερη συχνότητα μεταστάσεων και καλύτερη επιβίωση των ασθενών. Το γεγονός αυτό καταδεικνύει ότι οι απαντήσεις του ανοσοποιητικού συστήματος μπορούν να επηρεάσουν και να μετριάσουν την εξέλιξη της νόσου [153]. Εντούτοις, σε δείγματα όγκων, ιδιαίτερα σε δείγματα που έχουν ληφθεί από προχωρημένη νόσο, έχει παρατηρηθεί απουσία διηθημένων κυττάρων του ανοσοποιητικού, γεγονός που υπογραμμίζει ότι τα καρκινικά κύτταρα έχουν την δυνατότητα να ξεφεύγουν των ανοσολογικών απαντήσεων [154]. Οι κυτταρικές αλλαγές οι οποίες οδηγούν στην ανάπτυξη του καρκίνου έχουν ως αποτέλεσμα αλλαγές στην τοπική έκκριση κυτταροκινών. Επιπλέον, οι αλλαγές αυτές κινητοποιούν την διήθηση από κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος, τα οποία απελευθερώνουν περισσότερες κυτταροκίνες με αυτοκρινή ή παρακρινή τρόπο. Η προσπάθεια να κατανοήσουμε την δράση των κυτταροκινών κατά την δημιουργία και την εξέλιξη του καρκίνου είναι ιδιαίτερα δύσκολη λόγω της πλειοτρόπου δράσης των κυτταροκινών καθώς επίσης και του μεγάλου αριθμού κυτταροκινών στο μικροπεριβάλλον του καρκινικού κυττάρου.

Η ισορροπία μεταξύ των προ-φλεγμονωδών και των αντί-φλεγμονωδών κυτταροκινών που εκκρίνονται από διαφορετικούς τύπους CD4+ T βοηθητικών λεμφοκυττάρων, τα Th1 και τα Th2 κύτταρα, φαίνεται να διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στον τρόπο με τον οποίο το ανοσοποιητικό σύστημα επηρεάζει την εξέλιξη του καρκίνου [155]. Η διαφοροποίηση υπέρ των Th1 ή των Th2 κυττάρων επηρεάζεται από πολλούς γενετικούς και περιβαλλοντικούς παράγοντες, και ιδιαίτερα από την τοπική συγκέντρωση κυτταροκινών, όπως η IL-12 και η IL-4, οι οποίες επάγουν την

διαφοροποίηση προς τα Th1 και Th2 κύτταρα αντίστοιχα. Οι κυτταροκίνες οι οποίες παράγονται από τα Th1 κύτταρα, όπως η IFN- γ , η IL-2, η IL-12, η IL-15, η λεμφοτοξίνη και ο TNF- α , είναι γενικά προ-φλεγμονώδεις κυτταροκίνες οι οποίες προωθούν την κυτταρική ανοσία, η οποία είναι υπεύθυνη για την αντιμετώπιση ιογενών λοιμώξεων και άλλων ενδοκυττάρων παθογόνων, καθώς επίσης και για την αντιμετώπιση των καρκινικών κυττάρων [156]. Αντίθετα, οι κυτταροκίνες οι οποίες παράγονται από τα Th2 κύτταρα, όπως είναι η IL-4, η IL-5, η IL-6, η IL-9, η IL-10 και η IL-13, προωθούν την χημική ανοσία και την παραγωγή αντισωμάτων για την αντιμετώπιση εξωκυττάρων παθογόνων [157]. Οι Th1 και οι Th2 κυτταροκίνες λειτουργούν ανταγωνιστικά μεταξύ τους. Η διαφοροποίηση προς τον Th1 φαινότυπο αναστέλλει την διαφοροποίηση προς τον Th2 φαινότυπο και αντίστροφα [158]. Έχει παρατηρηθεί ότι η ισορροπία μεταξύ των Th1 και Th2 κυττάρων είναι κεντρικής σημασίας στην ρύθμιση των ανοσολογικών απαντήσεων. Πιο συγκεκριμένα, η διαφοροποίηση υπέρ του Th1 φαινοτύπου, και συνεπακολούθως η αναστολή του Th2 φαινοτύπου, προωθεί την αντικαρκινική δράση του ανοσοποιητικού συστήματος [159]. Η παρατήρηση αυτή έχει επιβεβαιωθεί σε διάφορες *in vitro* μελέτες, οι οποίες έχουν αναδείξει την αντικαρκινική δράση της Th1 κυτταροκίνης IL-12, η οποία ενεργοποιεί το εγγενές και το προσαρμοστικό ανοσοποιητικό σύστημα εναντίον των καρκινικών κυττάρων και αναστέλλει την αγγειογένεση μέσω της παραγωγής της IFN- γ [160]. Και σε *in vivo* μελέτες, η συστηματική χορήγηση IL-12 ανέδειξε την αντικαρκινική δράση της κυτταροκίνης [161]. Αντίθετα, οι κυτταροκίνες οι οποίες παράγονται από τα Th2 κύτταρα χαρακτηρίζονται από αντί-φλεγμονώδεις και ανοσοκατασταλτικές ιδιότητες, και με τον τρόπο αυτό, αναστέλλουν τις αντικαρκινικές απαντήσεις του ανοσοποιητικού συστήματος [162].

Έχει αποδειχθεί σε διάφορες μελέτες, ότι σε ασθενείς με καρκίνο παρατηρούνται διαταραγμένες ανοσολογικές απαντήσεις και απορρύθμιση της έκφρασης των κυτταροκινών [163, 164]. Επίσης, έχει επιβεβαιωθεί ότι τα νεοπλασματικά κύτταρα, τόσο σε συμπαγείς όγκους όσο και σε αιματολογικές κακοήθειες, είναι ικανά να ξεφεύγουν της επιτήρησης του ανοσοποιητικού συστήματος μέσω πολλών μηχανισμών [165]. Η παραγωγή και η έκκριση από τα νεοπλασματικά κύτταρα διαλυτών μορίων τα οποία έχουν την ιδιότητα να αναστέλλουν συγκεκριμένες

απαντήσεις του ανοσοποιητικού συστήματος, φαίνεται να είναι ένας από τους σημαντικότερους μηχανισμούς. Η επαγόμενη από τα νεοπλασματικά κύτταρα διαφοροποίηση των CD4⁺ T κυττάρων σε Th2 λεμφοκύτταρα και η ταυτόχρονη καταστολή των Th1 απαντήσεων φαίνεται να σχετίζεται με την αύξηση και την διασπορά των καρκινικών κυττάρων [165, 166].

Ένας άλλος υπότυπος CD4⁺ T λεμφοκυττάρων, ο οποίος τα τελευταία χρόνια έχει κερδίσει το ενδιαφέρον πολλών ερευνητών όσο αφορά την σχέση τους με τον καρκίνο, είναι τα Th17 κύτταρα. Τα Th17 κύτταρα αρχικά μελετήθηκαν με λεπτομέρεια σε διάφορα αυτοάνοσα νοσήματα. Εσχάτως όμως, έχει αποδειχθεί ότι διαδραματίζουν κεντρικό ρόλο στην προώθηση της φλεγμονής σε διάφορα νοσήματα, συμπεριλαμβανομένου και του καρκίνου. Η διαφοροποίηση των ανώριμων CD4⁺ T λεμφοκυττάρων στα Th17 κύτταρα είναι το αποτέλεσμα της δράσης κυτταροκινών όπως η IL-6, η IL-1β, η IL-23 και ο TGF-β. Ο ρόλος των Th17 κυττάρων στον καρκίνο φαίνεται να είναι διττός. Πιο συγκεκριμένα, ενώ διάφορες μελέτες τονίζουν την πιθανή ογκοκατασταλτική δράση των Th17 κυττάρων, άλλες μελέτες υπογραμμίζουν τον πιθανό ρόλο τους στην προώθηση του καρκίνου. Σε διάφορους τύπους καρκίνου, όπως ο καρκίνος των πνευμόνων, του προστάτη, του μαστού, του παχέος εντέρου, του παγκρέατος και του ήπατος, η κυτταροκίνη IL-17, η οποία είναι το κύριο παράγωγο των Th17 κυττάρων, φαίνεται ότι βοηθάει τα καρκινικά κύτταρα. Οι μηχανισμοί με τους οποίους η IL-17 διευκολύνει την αύξηση των καρκινικών κυττάρων ποικίλουν μεταξύ των μελετών [167]. Φαίνεται ότι η IL-17 προωθεί τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων και επάγει την αγγειογένεση, ενεργοποιώντας τις ινοβλάστες να εκφράσουν τον παράγοντα VEGF που επάγει την νεοαγγείωση. Από την άλλη πλευρά, σε διάφορα καρκινικά μοντέλα, η χορήγηση Th17 κυττάρων είχε ως αποτέλεσμα μια ισχυρή αντικαρκινική δράση [168, 169]. Μάλιστα, η χορήγηση Th17 κυττάρων φαίνεται να προκαλεί υποχώρηση του καρκίνου σε μεγαλύτερο βαθμό από αυτήν που προκαλεί η χορήγηση Th1 κυττάρων. Ενώ ο μηχανισμός με τον οποίο τα Th17 κύτταρα ασκούν την αντικαρκινική τους δράση δεν είναι πλήρως κατανοητός, φαίνεται ότι προέρχεται από συνέργεια με τα CD8⁺ κύτταρα ή και απευθείας από τα ίδια τα Th17 κύτταρα μέσω άμεσης λύσης των καρκινικών κυττάρων [170]. Πρόσφατη ανάλυση μεγάλου αριθμού δημοσιευμένων αποτελεσμάτων συμπέρανε ότι ενώ τα αυξημένα

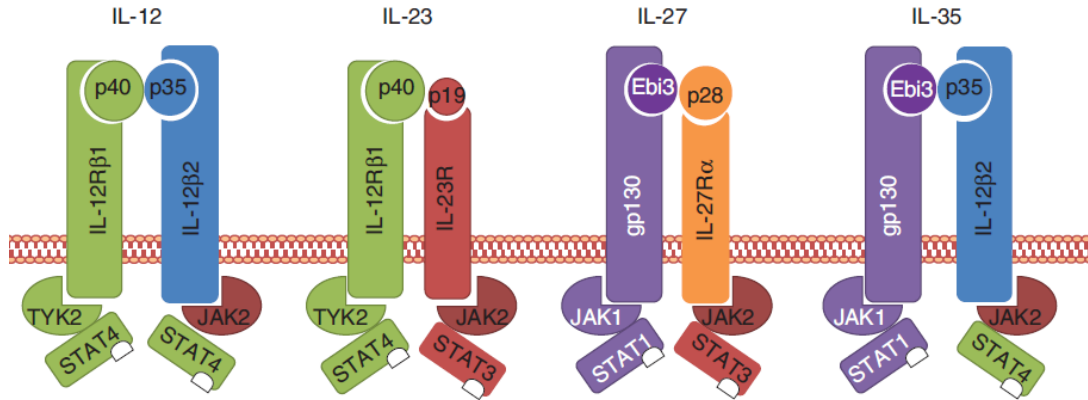
επίπεδα της IL-17 στον καρκίνο συσχετίζονται με δυσμενέστερη πρόγνωση, αντίθετα, ο μεγαλύτερος αριθμός των Th17 κυττάρων συσχετίζεται με καλύτερη πρόγνωση [171].

4.2. Η οικογένεια κυτταροκινών της IL-12.

Η ιντερλευκίνη 12 (IL-12) αναγνωρίστηκε το 1989 ως διαλυτό μόριο, το οποίο έχει την δυνατότητα να κινητοποιεί τα κύτταρα φυσικούς φονείς, ώστε να εκκρίνουν IFN- γ [172]. Η ανακάλυψη αυτή άνοιξε τον δρόμο σε μελέτες, στις οποίες αναγνωρίστηκε ότι τα μακροφάγα και τα δενδριτικά κύτταρα παράγουν αυτήν την πρωτεΐνη ως απάντηση σε διάφορες βακτηριακές και παρασιτικές λοιμώξεις, και η οποία με την σειρά της οδηγεί στην διαφοροποίηση των T κυττάρων, ώστε να προκαλέσουν την Th1 ανοσολογική απάντηση. Η έκκριση της IL-12 συνδέθηκε με την αναγνώριση παθογόνων μικροοργανισμών από το ενδογενές ανοσοποιητικό σύστημα και την ανάπτυξη ανοσολογικής απάντησης μέσω της παραγωγής IFN- γ από το επίκτητο ανοσοποιητικό σύστημα [173].

Η IL-12 αποτελεί το κύριο μέλος μιας οικογένειας κυτταροκινών, οι οποίες σχετίζονται μεταξύ τους δομικά και λειτουργικά, και περιλαμβάνει επιπλέον τις IL-23, IL-27 και IL-35. Με εξαίρεση τον υποδοχέα της IL-35, ο οποίος δεν έχει επακριβώς αναγνωριστεί, τα υπόλοιπα μέλη της οικογένειας της IL-12 καθώς και οι υποδοχείς τους, είναι ετεροδιμερείς πρωτεΐνες. Οι πρωτεΐνες οι οποίες σχηματίζουν τις κυτταροκίνες και τους υποδοχείς τους είναι άλλες κοινές μεταξύ των κυτταροκινών και άλλες αποκλειστικές της κάθε κυτταροκίνης [173]. Η IL-12 σχηματίζεται από τις υπομονάδες p35 και p40, ενώ ο υποδοχέας της σχηματίζεται από τις υπομονάδες IL-12R β 1 και IL-12R β 2 [172, 174]. Η IL-23 σχηματίζεται από την υπομονάδα p40, που είναι κοινή με την IL-12, και η οποία συνδέεται με την υπομονάδα p19 [175]. Ο υποδοχέας της IL-23 σχηματίζεται από την υπομονάδα IL-23R, η οποία συνδέεται με την υπομονάδα IL-12R β 1, η οποία είναι επίσης κοινή με τον υποδοχέα της IL-12 [176]. Η IL-27 αποτελείται από τις υπομονάδες p28 και EBI3, ενώ ο υποδοχέας της κυτταρονίνης σχηματίζεται από τις υπομονάδες gp130 και WSX-1 [177]. Η IL-35

αποτελεί την νεότερη προσθήκη στη οικογένεια κυτταροκινών της IL-12 και σχηματίζεται από τις υπομονάδες p35 και EB13 [178].



Εικόνα 10. Οι κυτταροκίνες της οικογένειας της IL-12 και οι υποδοχείς τους.

Οι IL-12, IL-23 και IL-27 παράγονται κυρίως από αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα, όπως τα δενδριτικά κύτταρα, και από μακροφάγα ως απάντηση σε μικροβιακά ερεθίσματα και σε ερεθίσματα από το ανοσοποιητικό σύστημα, όπως οι Toll-like υποδοχείς και οι ιντερφερόνες. Εκτός από τις δομικές τους ομοιότητες, οι κυτταροκίνες της οικογένειας της IL-12 μοιράζονται και αρκετές λειτουργικές ομοιότητες, αφού ασκούν την δράση τους μέσω της ενεργοποίησης του μονοπατιού κυτταρικής σηματοδότησης JAK-STAT, όπως είναι οι Jak2 και Tyk2 κινάσες και οι STAT1, -3, -4 και -5 μεταγραφικοί παράγοντες. Το γεγονός αυτό εξηγεί πολλές από τις αλληλεπικαλυπτόμενες δράσεις τους στα T λεμφοκύτταρα [173]. Σε αντίθεση με την IL-12 η οποία ασκεί την δράση της μέσω του μεταγραφικού παράγοντα STAT4, η IL-23 κυρίως ενεργοποιεί τον STAT3 [176, 179]. Και τα τρία μόρια (IL-12, IL-23 και IL-27) εμπλέκονται στην διαφοροποίηση των CD4⁺ T λεμφοκυττάρων σε T βοηθητικά κύτταρα 1 (Th1), αν και ασκούν διαφορετικούς ρόλους. Πιο συγκεκριμένα, η IL-27 επάγει την διαφοροποίηση των ανώριμων CD4⁺ λεμφοκυττάρων σε Th1 κύτταρα. Η IL-12 επάγει επίσης την διαφοροποίηση σε Th1 κύτταρα και επιπλέον επάγει την παραγωγή IFN- γ από τα κύτταρα αυτά. Η IL-23 επάγει τον πολλαπλασιασμό των Th1 κυττάρων μνήμης [180].

Οι κυτταροκίνες της οικογένειας IL-12 έχουν αρκετούς διακριτούς ρόλους όσο αφορά την βιολογική τους δράση. Πιο συγκεκριμένα, η IL-12 επάγει την διαφοροποίηση των κυτταροτοξικών T λεμφοκυττάρων και επίσης επάγει την παραγωγή της IFN- γ από τα κύτταρα φυσικούς φονείς και τα CD8+ λεμφοκύτταρα [181]. Η IL-23 επάγει την διαφοροποίηση και τον πολλαπλασιασμό των Th17 λεμφοκυττάρων, μιας ειδικής υποκατηγορίας CD4+ λεμφοκυττάρων, τα οποία χαρακτηρίζονται από την παραγωγή της IL-17, και τα οποία διαδραματίζουν κεντρικό ρόλο σε διάφορες φλεγμονώδεις παθήσεις και στην αυτοανοσία [182]. Η IL-27 αναστέλλει την διαφοροποίηση σε Th2 και Th17 λεμφοκύτταρα και ασκεί αντιφλεγμονώδη δράση επάγοντας την παραγωγή IL-10 από τα T λεμφοκύτταρα [180, 183].

Οι κυτταροκίνες της οικογένειας της IL-12 παίζουν επίσης σημαντικό ρόλο στην ρύθμιση των λειτουργιών των B λεμφοκυττάρων. Η IL-12 επάγει την παραγωγή της ανοσοσφαιρίνης IgM και της IFN- γ από τα B λεμφοκύτταρα [184]. Επίσης, η IL-27 ενεργοποιεί την διαφοροποίηση των πλασματοκυττάρων από τα ανώριμα B λεμφοκύτταρα και επάγει την παραγωγή της ανοσοσφαιρίνης IgG1 [185]. Η IL-27 λειτουργεί επίσης χημειοτακτικά προς τα πλασματοκύτταρα [186]. Η IL-23 φαίνεται ότι επάγει την παραγωγή της ανοσοσφαιρίνης IgM, ενώ μειώνει την παραγωγή της IgG από τα πλασματοκύτταρα [186].

Ένα άλλο κοινό χαρακτηριστικό των κυτταροκινών της οικογένειας της IL-12 είναι η αντινεοπλασματική τους δράση. Η αντινεοπλασματική δράση της IL-12 και IL-27 έχει μελετηθεί εκτεταμένα και φαίνεται να οφείλεται στην ενεργοποίηση των κυττάρων φυσικών φονέων και των κυτταροτοξικών T λεμφοκυττάρων, καθώς επίσης και στην αναστολή της αγγειογένεσης μέσω της παραγωγής της IFN- γ [187-190]. Όπως θα αναλυθεί εκτενέστερα παρακάτω, σε αντίθεση με τις IL-12 και IL-27, ο ρόλος της IL-23 φαίνεται να είναι αμφιλεγόμενος, αφού έχει παρατηρηθεί ότι ασκεί τόσο αντινεοπλασματική δράση όσο και δράση η οποία διευκολύνει τα νεοπλασματικά κύτταρα. Η άμεση αντινεοπλασματική δράση των κυτταροκινών της οικογένειας της IL-12 έχει παρατηρηθεί τόσο σε συμπαγείς όγκους, όσο και σε αιματολογικές κακοήθειες, συμπεριλαμβανομένης της χρόνιας λεμφοβλαστικής λευχαιμίας από B

κύτταρα, του πολλαπλούν μυελώματος, της ΟΜΛ της παιδικής ηλικίας καθώς επίσης και της Β-ΟΛΛ της παιδικής ηλικίας [179, 180, 191-193].

4.3. Ο ρόλος της IL-23 στον καρκίνο.

Όπως προαναφέρθηκε, ενώ ο ρόλος των υπόλοιπων μελών της οικογένειας της IL-12 στην αναστολή της αύξησης των καρκινικών κυττάρων είναι σαφής, ο ρόλος της IL-23 φαίνεται να είναι διττός, αφού φαίνεται ότι κάποιες από τις βιολογικές της δράσεις προωθούν την ανάπτυξη των καρκινικών κυττάρων, και κάποιες την αναστέλλουν.

Η αντικαρκινική δράση της IL-23 υπογραμμίζεται από έναν μεγάλο αριθμό μελετών. Σε πειραματικά μοντέλα με ποντίκια, σε διάφορους καρκινικούς τύπους, συμπεριλαμβανομένης της Β-ΟΛΛ της παιδικής ηλικίας, η χορήγηση IL-23 είχε μια άμεση αντικαρκινική και αντιμεταστατική δράση, παρόμοια με αυτήν της IL-12 [179, 194-198]. Παρόλα αυτά, ο μηχανισμός με τον οποίο η IL-23 ασκεί την αντικαρκινική της δράση φαίνεται να είναι αρκετά διαφορετικός. Η IL-23 επάγει την αναστολή της καρκινικής αύξησης σε μεταγενέστερο χρονικό σημείο από την έγχυσή της, ενώ η αναστολή που προκαλεί η IL-12 είναι εμφανής σε πιο πρώιμο χρονικό σημείο [199]. Η προστατευτική δράση της IL-23 φαίνεται ότι καταργείται πλήρως σε ποντίκια χωρίς CD8⁺ κύτταρα. Η παρατήρηση αυτή καταδεικνύει ότι τα CD8⁺ κύτταρα διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην αντικαρκινική δράση της IL-23 [200]. Σε κύτταρα Β-ΟΛΛ της παιδικής ηλικίας, η IL-23 ασκεί αντιλευχαιμική δράση μέσω της υπερέκφρασης του microRNA miR15a, που έχει ως αποτέλεσμα την υποέκφραση των πρωτεϊνών BCL-2 και Cyclin D1, οι οποίες διαδραματίζουν κεντρικό ρόλο στην ρύθμιση της απόπτωσης και του κυτταρικού πολλαπλασιασμού [180, 201]. Επιπλέον, όπως ήδη αναφέρθηκε, η IL-23 επάγει την διαφοροποίηση των ανώριμων CD4⁺ T λεμφοκυττάρων σε Th17 κύτταρα, τα οποία χαρακτηρίζονται από έντονη αντινεοπλασματική δράση σε διάφορους τύπους καρκίνου, η οποία οφείλεται είτε σε συνέργεια με τα CD8⁺ κύτταρα, είτε στα ίδια τα Th17 κύτταρα, μέσω λύσης των καρκινικών κυττάρων [170]. Επιπρόσθετα, η IL-23 επάγει τον πολλαπλασιασμό ενός ειδικού υποτύπου Th17 λεμφοκυττάρων, που ονομάζονται Th1-like Th17 κύτταρα,

των οποίων η δράση ομοιάζει με αυτήν των Th1 κυττάρων, αφού έχουν την ικανότητα να εκκρίνουν IFN- γ , και τα οποία ασκούν αντινεοπλασματική δράση [178]. Η IL-23 έχει επίσης την ιδιότητα να αναστέλλει την διαφοροποίηση προς τον Treg φαινότυπο, ο οποίος καταστέλλει την διαδικασία της φλεγμονής [202]. Ακόμη, η IL-23 ρυθμίζει τις λειτουργίες διαφόρων υποτύπων κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος στο μικροπεριβάλλον του καρκινικού κυττάρου. Για παράδειγμα, η IL-23 οδηγεί σε αύξηση της έκφρασης του υποδοχέα της, IL-23R, στα κοκκιοκύτταρα και στα κύτταρα φυσικούς φονείς, και μέσω αυτού, ενεργοποιεί την κυτταροτοξική τους δράση και την έκκριση προ-φλεγμονωδών κυτταροκινών από τα κύτταρα αυτά [178]. Από τις παραπάνω μελέτες καθίσταται σαφές ότι η IL-23 παρουσιάζει αντινεοπλασματική δράση μέσω μιας πληθώρας διαφορετικών βιολογικών δράσεων.

Όπως αναφέρθηκε, ο ρόλος της IL-23 στην ρύθμιση των ανοσολογικών απαντήσεων έναντι των καρκινικών κυττάρων είναι διττός, αφού φαίνεται ότι κάποιες από τις δράσεις της προωθούν την ανάπτυξη των καρκινικών κυττάρων. Πρώτος ο Langowski περιέγραψε την IL-23 ως ένα μόριο το οποίο διευκολύνει την επιβίωση των καρκινικών κυττάρων, αφού παρατήρησε ότι σε γενετικά τροποποιημένα ποντίκια ώστε να μην εκφράζουν την IL-23, υπήρξε αύξηση της διήθησης των όγκων από κυτταροτοξικά T λεμφοκύτταρα. Η IL-23 φαίνεται ότι καταστέλλει την παρουσία των CD8⁺ κυττάρων, και επιπλέον, αυξάνει την διήθηση από μακροφάγα, διευκολύνει την αγγειογένεση και αυξάνει τις μεταλλοπρωτεϊνάσες της εξωκυττάριας ουσίας [203]. Η ιδιότητα της IL-23 να διευκολύνει την επιβίωση των καρκινικών κυττάρων στηρίζεται και σε μια σειρά άλλων παρατηρήσεων. Η IL-17 που παράγεται από τα Th17 κύτταρα προωθεί την αγγειογένεση, αφού ενεργοποιεί την έκκριση των αγγειογενετικών παραγόντων VEGF και PGE2 από τα κύτταρα του καρκινικού μικροπεριβάλλοντος. Επιπλέον, η IL-17 ενεργοποιεί τον ογκογόνο μεταγραφικό παράγοντα STAT3 που είναι ιδιαίτερης σημασίας για την έκφραση γονιδίων που προωθούν την αγγειογένεση και την κυτταρική επιβίωση [204]. Η IL-17 επιπλέον, ενεργοποιεί τον μεταγραφικό παράγοντα NF κ B, ο οποίος ρυθμίζει την έκφραση γονιδίων που έχουν ως αποτέλεσμα την προσέλκυση μακροφάγων στο καρκινικό μικροπεριβάλλον, τα οποία χρησιμοποιούνται από τα καρκινικά κύτταρα για να διευκολύνουν την επιβίωσή τους [178]. Ακόμη, έχει παρατηρηθεί ότι εκπαιδευμένα από καρκινικά κύτταρα

ουδετερόφιλα παράγουν IL-23, η οποία ενεργοποιεί τα μονοπάτια AKT και p38 σε πολυδύναμα μεσεγχυματικά κύτταρα, με αποτέλεσμα τα κύτταρα αυτά να διαφοροποιούνται σε ινοβλάστες, που διευκολύνουν τον πολλαπλασιασμό και την μετάσταση των καρκινικών κυττάρων [205].

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5. Ο ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ ΑΓΓΕΙΟΓΕΝΕΣΗΣ ΣΤΟΝ ΚΑΡΚΙΝΟ

5.1. Γενικά στοιχεία για την αγγειογένεση.

Η ανάπτυξη ενός αγγειακού συστήματος υπήρξε εξαιρετικής σημασίας στην εξέλιξη των οργανισμών, καθώς ένα λειτουργικό αγγειακό σύστημα προσφέρει την βάση για την διατήρηση της ομοιόστασης των ιστών ενός οργανισμού, παρέχοντάς τους με οξυγόνο και θρεπτικά συστατικά και απομακρύνοντας από αυτούς τα άχρηστα προϊόντα του καταβολισμού. Κατά την διάρκεια της ανάπτυξης, προγονικά ενδοθηλιακά κύτταρα σχηματίζουν ένα πρωτόγονο δίκτυο από τριχοειδή αγγεία, μέσω μιας διαδικασίας η οποία ονομάζεται αγγειοπλασία. Σε επόμενα στάδια της ανάπτυξης, τα ενδοθηλιακά κύτταρα που καλύπτουν αυτό το πρωτόγονο τριχοειδικό δίκτυο επεκτείνονται και οργανώνονται, μέσω μιας διαδικασίας η οποία ονομάζεται αγγειογένεση. Τέλος, μέσω μιας διαδικασίας η οποία ονομάζεται αρτηριογένεση, τα κανάλια από ενδοθηλιακά κύτταρα καλύπτονται από περικύτταρα και λεία μυϊκά κύτταρα, τα οποία προσφέρουν στο αγγειακό δίκτυο ωρίμανση και σταθερότητα.

Με εξαίρεση την επούλωση των τραυμάτων, την δημιουργία του πλακούντα κατά την εγκυμοσύνη και τις αλλαγές που συμβαίνουν στην μήτρα κατά τον εμμηνορρυσιακό κύκλο, τα αγγεία στην ενήλικη ζωή, υπό φυσιολογικές συνθήκες, παραμένουν σε μια σταθερή κατάσταση, η οποία διατηρείται από ένα μικροπεριβάλλον στο οποίο σηματοδοτικά μόρια προωθούν και αναστέλλουν την αγγειογένεση. Εντούτοις, εκσεσημασμένη ή και ανεπαρκής αγγειογένεση έχει παρατηρηθεί σε διάφορες παθολογικές καταστάσεις. Οι συχνότερες καταστάσεις που συνδέονται με εκσεσημασμένη αγγειογένεση είναι ο καρκίνος, η αρθρίτιδα, οι λοιμώξεις, καθώς και οι φλεγμονώδεις και αυτοάνοσες παθήσεις. Αντίθετα, νοσήματα τα οποία συνδέονται με ανεπαρκή αγγειογένεση, περιλαμβάνουν την ισχαιμική καρδιοπάθεια, το ισχαιμικό αγγειακό εγκεφαλικό επεισόδιο, την νόσο Alzheimer, την διαβητική νευροπάθεια, την οστεοπόρωση και την περιφερική αρτηριακή νόσο [206].

Η διαδικασία της αγγειογένεσης ενεργοποιείται όταν στα κύτταρα εντοπίζεται χαμηλή πίεση οξυγόνου και ενεργοποιείται ο παράγοντας HIF-1a. Ο HIF-1a είναι ένας μεταγραφικός παράγοντας που ενεργοποιείται σε συνθήκες υποξίας, και ρυθμίζει την

έκφραση διαφόρων γονιδίων, συμπεριλαμβανομένου του πρότυπου αγγειογενετικού παράγοντα VEGF-A, ο οποίος αναφέρεται και απλά ως VEGF. Άλλα μέλη της οικογένειας του παράγοντα VEGF περιλαμβάνουν τους VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E και τον πλακουντιακό αυξητικό παράγοντα PlGF. Εκτενέστερη αναφορά στους αγγειογενετικούς παράγοντες της οικογένειας VEGF θα γίνει παρακάτω [207].

Η αγγειογένεση διαδραματίζει έναν κεντρικό ρόλο στην ανάπτυξη των συμπαγών όγκων και στην δημιουργία μεταστάσεων [150]. Πρώτος ο Folkman το 1971 τεκμηρίωσε ότι η αύξηση των όγκων και η δημιουργία μεταστάσεων εξαρτώνται από την αγγειογένεση και ότι η αναστολή της αγγειογένεσης θα μπορούσε να αποτελέσει στόχο για την θεραπεία του καρκίνου. Εξαιτίας του κεντρικού του ρόλου στην διαδικασία της αγγειογένεσης, ο παράγοντας VEGF βρέθηκε στο επίκεντρο πολλών ερευνητικών προσπαθειών για ανάπτυξη φαρμάκων που θα καταστείλουν την αγγειογένεση. Στην πρώτη γενιά αντιαγγειογενετικών παραγόντων που χρησιμοποιήθηκαν για την θεραπεία του καρκίνου, ανήκει το αντί-VEGF μονοκλωνικό αντίσωμα μπεβασιζουμάμπη (Avastin). Η μπεβασιζουμάμπη έχει χρησιμοποιηθεί, σε συνδυασμό με άλλους χημειοθεραπευτικούς παράγοντες, για την θεραπεία διαφόρων μορφών καρκίνου, όπως, ο καρκίνος του παχέος εντέρου, ο καρκίνος του μαστού, ο μικροκυτταρικός καρκίνος του πνεύμονα, ο καρκίνος του νεφρού καθώς επίσης και το πολύμορφο γλοιοβλάστωμα [208-213]. Στους αντιαγγειογενετικούς παράγοντες δεύτερης γενιάς ανήκουν οι παράγοντες σουνιτινίμπη, σοραφενίμπη, παζοπανίμπη και βαντετανίμπη, οι οποίοι στοχεύουν στους υποδοχείς των αγγειογενετικών παραγόντων VEGF.

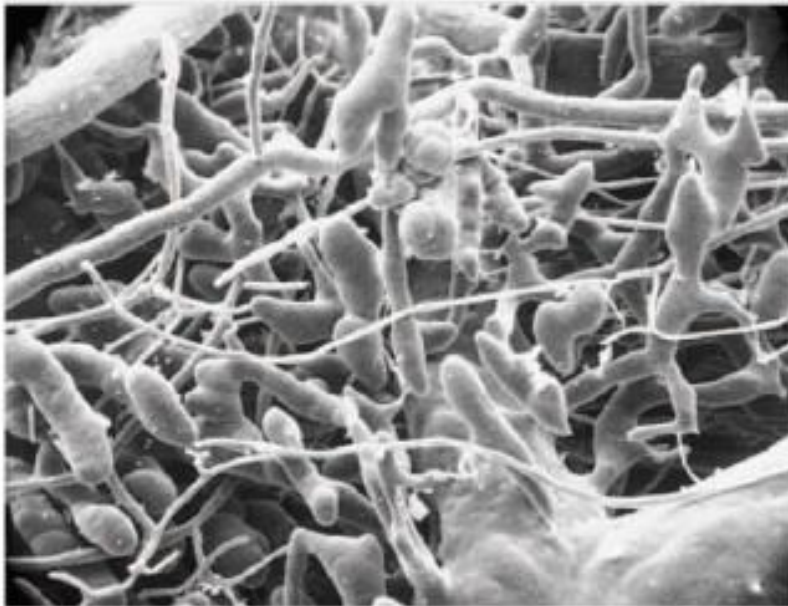
Φαίνεται ότι οι αντί-VEGF αντιαγγειογενετικοί παράγοντες επιμηκύνουν την επιβίωση των ασθενών για μερικούς μήνες σε ορισμένους τύπους καρκίνου, αλλά αποτυγχάνουν να προσφέρουν πλεονέκτημα όσο αφορά την επιβίωση σε άλλους τύπους [214]. Επίσης, σε διάφορους τύπους καρκίνου έχει παρατηρηθεί ανθεκτικότητα στην χρήση των αντιαγγειογενετικών παραγόντων [215]. Ένας ακόμη προβληματισμός προκύπτει από την παρατήρηση ότι η αναστολή της VEGF σηματοδότησης μπορεί να αναστέλλει την αύξηση του πρωτοπαθούς όγκου, αλλά προσαρμόζει τα καρκινικά κύτταρα, ώστε να υιοθετήσουν έναν περισσότερο μεταστατικό φαινότυπο [216].

Νεότερες θεραπευτικές στρατηγικές βασίζονται στην παρατήρηση ότι το αγγειακό δίκτυο στον καρκίνο εμφανίζεται ανώμαλο σε δομή και λειτουργία. Η αγγείωση του όγκου χαρακτηρίζεται από ένα χαοτικό, ελικοειδές και ακανόνιστο δίκτυο τριχοειδών. Τα ενδοθηλιακά κύτταρα έχουν ανώμαλο προσανατολισμό και είναι αποκολλημένα από την βασική μεμβράνη, ενώ περιβάλλονται από λιγότερα και ακανόνιστα περικύτταρα. Η βασική μεμβράνη επίσης εμφανίζεται ανομοιογενής στην δομή. Αυτή η ανώμαλη αγγείωση των όγκων διαταράσσει την παροχή αίματος αλλά και την παροχή των χημειοθεραπευτικών φαρμάκων [217]. Νεότερες έρευνες προτείνουν ότι η ομαλοποίηση της αγγείωσης των όγκων θα προσφέρει μια νέα επιλογή στην αντιαγγειογενετική θεραπεία. Η ομαλοποίηση του αγγειακού δικτύου μπορεί να επιτευχθεί με διάφορες προσεγγίσεις, συμπεριλαμβανομένων της γενετικής τροποποίησης των υποδοχέων οξυγόνου, της στόχευσης των περικυττάρων και της ωρίμανσης του αγγειακού δικτύου, καθώς επίσης και της αναστολής σύνθεσης του VEGF και PlGF [218, 219].

5.2. Ο ρόλος της αγγειογένεσης στην λευχαιμία.

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, η αγγειογένεση στους συμπαγείς όγκους διαδραματίζει ιδιαίτερα σημαντικό ρόλο στην εξέλιξη και την διασπορά του όγκου. Εντούτοις, συρρέοντα δεδομένα έχουν αναδείξει τον σημαντικό ρόλο που παίζει η αγγειογένεση και στην παθοφυσιολογία των αιματολογικών κακοηθειών [220]. Η αγγείωση στον μυελό των οστών είναι ιδιαίτερης σημασίας για την αιμοποίηση, τόσο υπό φυσιολογικές συνθήκες όσο και σε πολλές ασθένειες. Για παράδειγμα, τα ενδοθηλιακά κύτταρα, καθώς επίσης και τα περικύτταρα και τα λεία μυϊκά κύτταρα των αγγείων, παρέχουν στα πολυδύναμα αιμοποιητικά κύτταρα ένα αγγειακό «καταφύγιο». Αυτό το αγγειακό καταφύγιο υποστηρίζει τον πολλαπλασιασμό και την διαφοροποίηση των πολυδύναμων αιμοποιητικών κυττάρων [221]. Ταυτόχρονα όμως, αυτό το αγγειακό καταφύγιο, παρέχει προστασία και στα λευχαιμικά κύτταρα [222]. Επιπλέον, ενδοθηλιακά κύτταρα στον μυελό των οστών εκκρίνουν διάφορες κυτταροκίνες, όπως η IL-6 και οι παράγοντες VEGF, G-CSF και GM-CSF, που προωθούν τον πολλαπλασιασμό και την επιβίωση των λευχαιμικών κυττάρων [223].

Αύξηση της αγγειακής πυκνότητας στον μυελό των οστών, η οποία είναι ενδεικτική αγγειογένεσης, έχει παρατηρηθεί σε διάφορες αιματολογικές παθήσεις, όπως η λευχαιμία, το πολλαπλούν μυέλωμα και τα μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα. Η αγγειογένεση ενεργοποιείται με την διήθηση του μυελού των οστών από λευχαιμικά κύτταρα σε πολλές μορφές λευχαιμίας, όπως είναι η ΧΛΛ, η ΟΜΛ, η ΧΜΛ και η ΟΛΛ [224-226]. Η αύξηση της αγγειακής πυκνότητας στον μυελό των οστών έχει χρησιμοποιηθεί ως μια ανεξάρτητη προγνωστική παράμετρος σε ασθενείς με ΧΜΛ [227]. Η μοριακή βάση της ενεργοποίησης της διαδικασίας της αγγειογένεσης στον μυελό των οστών στην λευχαιμία δεν έχει πλήρως διευκρινιστεί. Μόρια τα οποία φαίνεται να εμπλέκονται είναι οι sVEGFR-1, sVEGFR-2, bFGF, οι κυτταροκίνες IL-6, IL-8 και TNF- α , η αγγειοτενσίνη και ο μεταγραφικός παράγοντας HIF-1 α [228]. Ο αγγειογενετικός παράγοντας VEGF εκκρίνεται από τα λευχαιμικά κύτταρα και συνδέεται με τον υποδοχέα του VEGFR, τόσο στα ενδοθηλιακά κύτταρα, ενεργοποιώντας την διαδικασία της αγγειογένεσης, όσο και σε άλλα λευχαιμικά κύτταρα, επάγοντας τον πολλαπλασιασμό τους [229]. Προκλινικές μελέτες έδειξαν ότι ο αποκλεισμός του υποδοχέα VEGFR μπορεί να επιβραδύνει την εξέλιξη των αιματολογικών κακοηθειών. Για παράδειγμα, σε ένα μοντέλο με T-λευχαιμία/λέμφωμα, η χορήγηση μπεβασιζουμάμπης σε συνδυασμό με δοξορουβικίνη καθυστέρησε περισσότερο την ανάπτυξη του όγκου από ότι η μονοθεραπεία με δοξορουβικίνη [230].



Εικόνα 11. Η μικροαγγείωση του μυελού των οστών.

5.3. Τα μέλη της οικογένειας VEGF και οι υποδοχείς τους.

Ο αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας VEGF-A, ο οποίος αναφέρεται και απλά ως VEGF, αποτελεί το βασικό και πρότυπο μέλος μιας οικογένειας κυτταροκινών, οι οποίες όπως προαναφέρθηκε, ασκούν κεντρικό ρόλο στην αγγειογένεση και λεμφαγγειογένεση, τόσο σε φυσιολογικές όσο και σε παθολογικές συνθήκες. Η οικογένεια των αγγειογενετικών παραγόντων VEGF περιλαμβάνει συνολικά πέντε μέλη: τους VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D καθώς και τον πλακουντιακό αυξητικό παράγοντα PlGF. Τα υπόλοιπα μέλη της οικογένειας VEGF, καθώς και οι υποδοχείς στους οποίους συνδέονται, έχουν μελετηθεί πολύ λιγότερο σε σχέση με τον VEGF-A. Τα μέλη της οικογένειας VEGF συνδέονται μεταξύ τους τόσο δομικά όσο και λειτουργικά. Η οικογένεια VEGF ανήκει στην υπεροικογένεια των αυξητικών παραγόντων που προέρχονται από τα αιμοπετάλια (PDGF, Platelet Derived Growth Factor) [231].

Το γονίδιο που κωδικοποιεί τον παράγοντα VEGF-A οργανώνεται σε οκτώ εξόνια και επτά ιντρόνια και βρίσκεται στην θέση p21.3 του 6^{ου} χρωμοσώματος. Διαφορετικοί συνδυασμοί του mRNA του γονιδίου του VEGF-A έχουν ως αποτέλεσμα την

δημιουργία εννέα συνολικά ισομορφών, και τεσσάρων μείζονων ισομορφών του παράγοντα, οι οποίες είναι οι: VEGF₁₂₁, VEGF₁₆₅, VEGF₁₈₉ και VEGF₂₀₆ οι οποίες διαθέτουν 121, 165, 189 και 206 κατάλοιπα αμινοξέων αντίστοιχα [232]. Οι διαφορετικές ισομορφές του VEGF-A μοιράζονται την ίδια αλληλουχία αμινοξέων στο αμινοτελικό τους άκρο, στο οποίο περιλαμβάνονται και οι περιοχές σύνδεσης με τον υποδοχέα τους, αλλά διαφορετικές αλληλουχίες αμινοξέων στο καρβοξυτελικό άκρο τους, στο οποίο εντοπίζεται η θέση δέσμευσης στην ηπαρίνη. Η βιοδιαθεσιμότητα των ισομορφών του VEGF-A εξαρτάται από την παρουσία ή την απουσία της θέσης δέσμευσης στην ηπαρίνη στο καρβοξυτελικό άκρο του παράγοντα. Ως εκ τούτου, οι ισομορφές VEGF₁₈₉ και VEGF₂₀₆ βρίσκονται δεσμευμένες στην κυτταρική επιφάνεια και στον εξωκυττάριο χώρο, ενώ αντίθετα, η ισομορφή VEGF₁₂₁ έχει την ιδιότητα να διαχέεται ελεύθερα [231]. Επιπλέον, η βιοδιαθεσιμότητα των διαφορετικών ισομορφών ρυθμίζεται από μια περιοχή πρωτεόλυσης από την πλασμίνη. Η πλασμίνη έχει την ικανότητα να πρωτεολύει τις ισομορφές VEGF₁₆₅ και VEGF₁₈₉ στο καρβοξυτελικό τους άκρο. Ως αποτέλεσμα της πρωτεόλυσης, απελευθερώνεται μια μικρότερη πρωτεΐνη, η οποία αποτελείται από τα πρώτα 110 αμινοτελικά κατάλοιπα αμινοξέων και η οποία είναι διαλυτή και βιοδραστική. Ο μηχανισμός ρύθμισης της βιοδιαθεσιμότητας του VEGF μέσω της πλασμίνης είναι σημαντικός στην ανταπόκριση σε διάφορες αλλαγές στο μικροπεριβάλλον των κυττάρων [233]. Ο VEGF-A αποτελεί μια κυτταροκίνη με πλειοτρόπο δράση, η οποία αφορά κυρίως αλλά όχι αποκλειστικά τα ενδοθηλιακά κύτταρα των αγγείων. Ο VEGF-A διαδραματίζει κεντρικό ρόλο στην αγγειογένεση, τόσο κατά την εμβρυογένεση, όσο και στην μετανεογνική ανάπτυξη και στην ενήλικη ζωή. Ο κεντρικός ρόλος του VEGF-A στην ανάπτυξη του εμβρυϊκού αγγειακού δικτύου έχει επιβεβαιωθεί από την παρατήρηση ότι η απενεργοποίηση του ενός αλληλίου του *VEGF-A* σε ποντίκια οδηγεί σε διαταραχή της αγγειογένεσης και εμβρυϊκό θάνατο. Επιπλέον, ο VEGF-A αυξάνει την αγγειακή διαπερατότητα και διεγείρει την μετανάστευση και πολλαπλασιασμό των ενδοθηλιακών κυττάρων. Η αύξηση της αγγειακής διαπερατότητας αποτελεί ένα χαρακτηριστικό γνώρισμα της μικροκυκλοφορίας του καρκίνου και επιτρέπει την τροφοδοσία των καρκινικών κυττάρων με θρεπτικά συστατικά καθώς επίσης και την μετανάστευσή τους [234].

Το γονίδιο *VEGF-B* οργανώνεται σε επτά εξόνια, και διαφορετικοί συνδυασμοί των εξονίων στο mRNA του VEGF-B οδηγούν στην δημιουργία των δύο ισομορφών VEGF-B₁₆₇ και VEGFB₁₈₆ [235]. Η λειτουργία του VEGF-B παραμένει σε έναν μεγάλο βαθμό άγνωστη, αν και προτείνεται ότι διαδραματίζει ρόλο στην καρδιακή λειτουργία των ενηλίκων, αλλά όχι στην αγγειογένεση ή την ανάπτυξη του καρδιαγγειακού συστήματος, αφού τα ποντίκια στα οποία έχει γενετικά απενεργοποιηθεί ο παράγοντας VEGF-B είναι βιώσιμα, αλλά εμφανίζουν διαταραχές στην καρδιακή αγωγιμότητα [236].

Το γονίδιο *VEGF-C* περιλαμβάνει οκτώ εξόνια, τα οποία όμως δεν συνδυάζονται σε διαφορετικούς συνδυασμούς, και ως εκ τούτου δεν υπάρχουν διαφορετικές ισομορφές του παράγοντα VEGF-C [237]. Ο παράγοντας VEGF-C εμπλέκεται στην ανάπτυξη και διατήρηση του λεμφαγγειακού συστήματος. Σε ποντίκια, η απενεργοποίηση και των δύο αλληλίων του *VEGF-C* οδηγεί σε εμβρυϊκό θάνατο, ενώ η ετερόζυγος απενεργοποίηση του *VEGF-C* οδηγεί σε ανάπτυξη λεμφοειδήματος από ανώμαλη ανάπτυξη του λεμφαγγειακού συστήματος. Ο VEGF-C δεν είναι απαραίτητος για την φυσιολογική ανάπτυξη των αιμοφόρων αγγείων [238].

Το γονίδιο *VEGF-D* οργανώνεται σε επτά εξόνια, και εντοπίζεται στο χρωμόσωμα X [239]. Ο βιολογικός ρόλος του παράγοντα VEGF-D δεν είναι σαφής. Τα ποντίκια με γενετική απενεργοποίηση του *VEGF-D* είναι βιώσιμα και εμφανίζουν φυσιολογικό αγγειακό και λεμφαγγειακό σύστημα [240].

Το τελευταίο μέλος της οικογένειας των παραγόντων VEGF είναι ο πλακουντιακός αυξητικός παράγοντας PlGF. Το γονίδιο του PlGF οργανώνεται σε επτά εξόνια, από τα οποία προκύπτουν τέσσερις διαφορετικές ισομορφές. Οι ισομορφές αυτές εκφράζονται κυρίως στον πλακούντα, αλλά ανευρίσκονται επίσης στην καρδιά, τον αμφιβληστροειδή χιτώνα, το δέρμα, τους σκελετικούς μύες και άλλους ιστούς [234, 241]. Ο βιολογικός ρόλος του PlGF θα αναλυθεί σε επόμενο κεφάλαιο.

Υπάρχουν τρεις υποδοχείς κινάσης τυροσίνης, μέσω των οποίων οι παράγοντες της οικογένειας VEGF ασκούν την αγγειογενετική τους δράση: οι VEGFR1, VEGFR2 και VEGFR3. Παρόλο που οι υποδοχείς αυτοί ενεργοποιούν διαφορετικά μονοπάτια ενδοκυττάριας σηματοδότησης, δομικά είναι παρόμοιοι. Αποτελούνται από ένα

εξωκυττάριο τμήμα αποτελούμενο από ανοσοσφαιρίνες, μια διαμεμβρανική περιοχή και μια ενδοκυττάρια περιοχή με ενεργότητα κινάσης τυροσίνης [241].

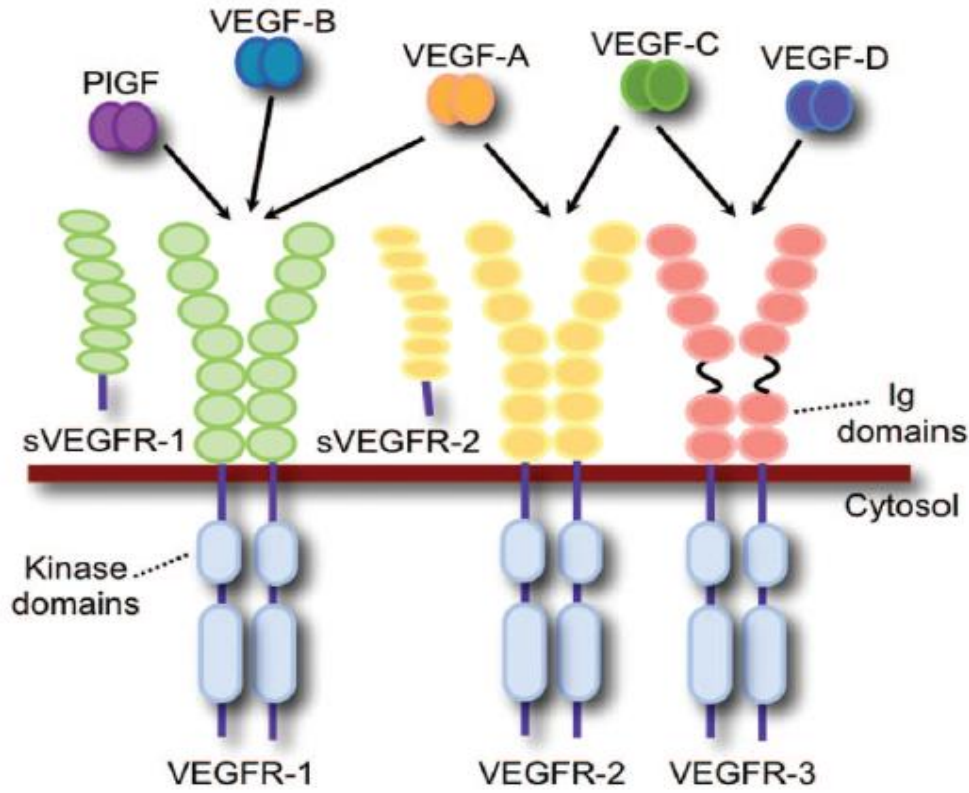
Ο υποδοχέας VEGFR1, ο οποίος ονομάζεται και Flt-1 (fms-like tyrosyl kinase-1) συνδέεται με τους παράγοντες VEGF-A, VEGF-B και PlGF [234]. Ο διαφορετικός συνδυασμός των εξονίων του γονιδίου *VEGFR1* παράγει την διαλυτή μορφή του υποδοχέα, sVEGR1 ή sFlt-1, ο οποίος συνδέεται με τον VEGF και αναστέλλει την λειτουργία του [242]. Ο sFLT-1 αποτελείται από ένα εξωκυττάριο τμήμα, το οποίο είναι πανομοιότυπο με το αντίστοιχο εξωκυττάριο τμήμα του FLT-1, αλλά δεν έχει το διαμεμβρανικό και το ενδοκυττάριο τμήμα του FLT-1, με αποτέλεσμα να μην διαθέτει δραστικότητα κινάσης τυροσίνης. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα, η πρόσδεση του VEGF και του PlGF στον s-FLT-1 να μην οδηγεί σε μετάδοση του ενδοκυττάριου σήματος. Ο VEGFR1 μπορεί να λειτουργήσει ως ένας υποδοχέας «δόλωμα» λόγω της μεγάλης συγγένειας με τον VEGF (η πρόσδεση του VEGF με τον VEGFR1 είναι δέκα φορές ισχυρότερη από ότι η πρόσδεση με τον VEGFR2). Παρά την μεγάλη συγγένεια πρόσδεσης του VEGF με τον VEGFR1, η δραστικότητα κινάσης τυροσίνης είναι πιο αδύναμη σε σχέση με την αντίστοιχη άλλων υποδοχέων [243]. Η παρουσία του VEGFR1 είναι απαραίτητη για την ανάπτυξη του αγγειακού συστήματος. Εκτός από την αγγειογένεση, ο VEGFR1 φαίνεται ότι διαδραματίζει σημαντικό ρόλο και σε άλλες λειτουργίες, όπως είναι η αιμοποίηση, η μετανάστευση των μονοκυττάρων και η παρακρινής έκκριση αυξητικών παραγόντων από τα ενδοθηλιακά κύτταρα [234].

Ο υποδοχέας VEGFR2, ο οποίος ονομάζεται και Flk-1 (Fetal liver kinase-1), αποτελεί τον σημαντικότερο διαμεσολαβητή της επαγόμενης από την οικογένεια VEGF αγγειογενετικής σηματοδότησης. Οι λειτουργίες του VEGFR2 περιλαμβάνουν την μετανάστευση, πολλαπλασιασμό και επιβίωση των ενδοθηλιακών κυττάρων, καθώς επίσης και την αύξηση της αγγειακής διαπερατότητας. Ο VEGFR2 συνδέεται με όλες τις isoμορφές του VEGFR-A καθώς επίσης και με τους VEGF-C και VEGF-D. Παρόλο που ο VEGFR2 έχει μικρότερη συγγένεια πρόσδεσης με τον VEGF-A από ότι ο VEGFR1, έχει ισχυρότερη δραστικότητα κινάσης από ότι ο τελευταίος. Η ενεργοποίηση του υποδοχέα VEGFR2 ενεργοποιεί έναν ενδοκυττάριο σηματοδοτικό

καταρράκτη που περιλαμβάνει τα μόρια PI3K, AKT, PLC γ , p38, MAPK και p42/44 MAPK [234, 244, 245].

Ο υποδοχέας VEGFR3, ή Flt-4, συνδέεται με τους παράγοντες VEGF-C και VEGF-D και διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην αναδιαμόρφωση του πρώιμου εμβρυϊκού τριχοειδικού δικτύου καθώς επίσης και στην αγγειογένεση και λεμφαγγειογένεση κατά την ενήλικη ζωή [246].

Η ομάδα των υποδοχέων των αγγειογενετικών παραγόντων της οικογένειας VEGF περιλαμβάνει ακόμη τους δύο συνυποδοχείς Nrp1 και Nrp2, οι οποίοι αρχικά αναγνωρίστηκαν ως υποδοχείς των σεμαφορινών, οι οποίες διαδραματίζουν ρόλο κατά την νευρογένεση [241]. Οι συνυποδοχείς Nrp αποτελούνται από ένα εξωκυττάριο τμήμα, ένα διαμεμβρανικό τμήμα και ένα ενδοκυττάριο τμήμα, το οποίο δεν διαθέτει καταλυτικές ιδιότητες όπως οι κινάσες τυροσίνης, αλλά λειτουργεί ως θέση πρόσδεσης άλλων συνυποδοχέων ή σηματοδοτικών μορίων. Ο συνυποδοχέας Nrp1 συνδέεται με τις ισομορφές του VEGF-A, τον PlGF και τις ισομορφές του VEGF-B και ενισχύει την σηματοδότηση μέσω του υποδοχέα VEGFR2 [247]. Ο συνυποδοχέας Nrp2 συνδέεται με τις ισομορφές VEGF₁₄₅ και VEGF₁₆₅, με τον παράγοντα VEGF-C και τον PlGF [248].



Εικόνα 12. Η οικογένεια των αγγειογενετικών παραγόντων VEGF και οι υποδοχείς τους.

5.4. Ο πλακουντιακός αυξητικός παράγοντας PIGF

Το 1991, ένας νέος αγγειογενετικός παράγοντας απομονώθηκε από μια cDNA βιβλιοθήκη ανθρώπινου πλακούντα, και ως εκ τούτου ονομάστηκε πλακουντιακός αυξητικός παράγοντας [249]. Όπως ήδη έχει αναφερθεί, ο PIGF αποτελεί μέλος της οικογένειας των αγγειογενετικών παραγόντων VEGF. Παρόλο που μοιράζεται μόνο το 42% της αλληλουχίας αμινοξέων με τον VEGF-A, που είναι το πρότυπο μέλος της οικογένειας, οι τρισδιάστατες δομές των δύο μορίων παρουσιάζουν σημαντικές ομοιότητες [250]. Το γονίδιο που κωδικοποιεί τον PIGF εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 14. Εξαιτίας διαφορετικού συνδυασμού των εξονίων του mRNA του *PIGF*, έχουν αναγνωρισθεί τέσσερις ισομορφές του PIGF: οι PIGF-1, PIGF-2, PIGF-3 και PIGF-4. Οι διαφορετικές ισομορφές του PIGF διαφέρουν μεταξύ τους όσο αφορά το μέγεθος,

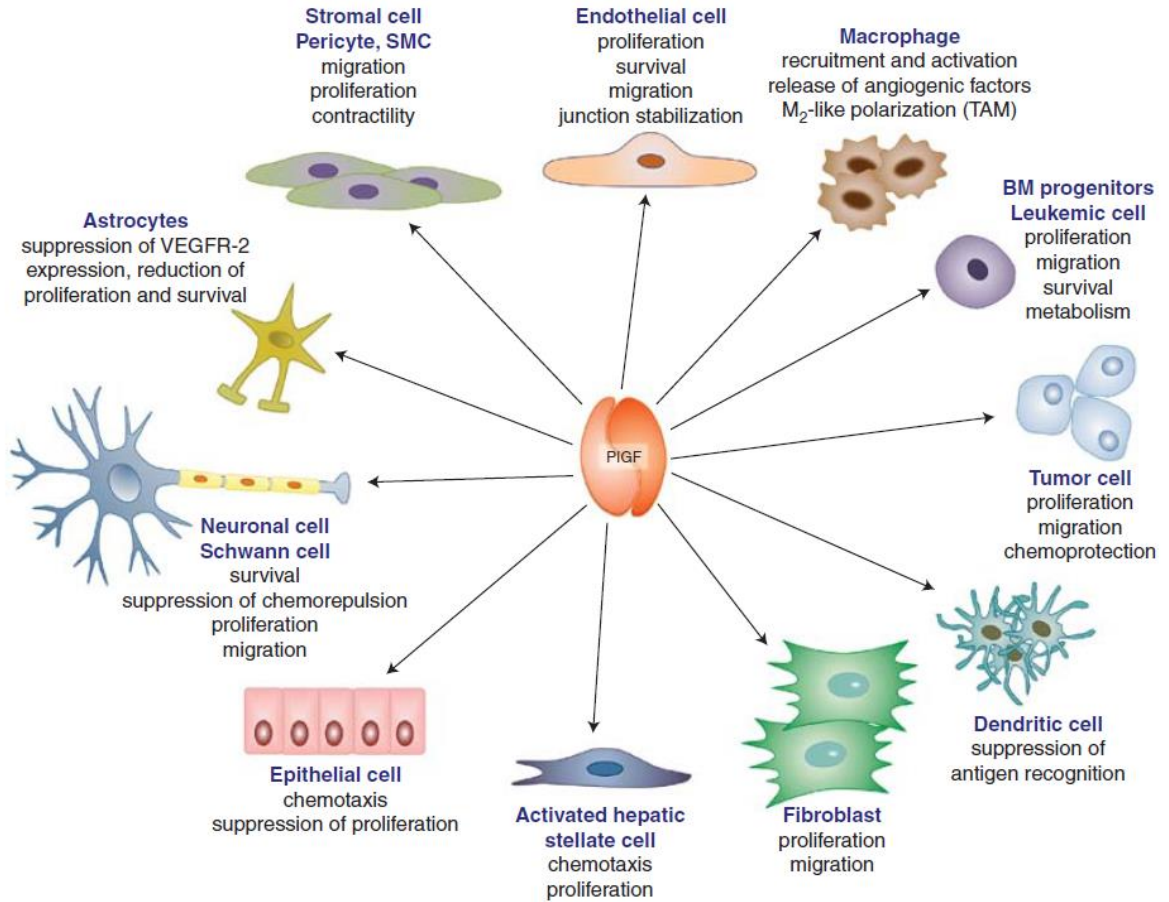
την συγγένεια σύνδεσης με την ηπαρίνη, τους υποδοχείς με τους οποίους συνδέονται, καθώς επίσης και τους ιστούς στους οποίους εκφράζονται [251]. Η πιο κοινή και καλά μελετημένη ισομορφή είναι ο PlGF-1, ο οποίος και αναφέρεται απλά ως PlGF. Ο PlGF συνδέεται μόνο στον υποδοχέα VEGFR-1, καθώς επίσης και στην διαλυτή μορφή του (sVEGFR-1 ή sFlt-1), από τον οποίο απουσιάζει το ενδοκυττάριο και διαμεμβρανικό τμήμα. Η σύνδεση του PlGF στον sFlt-1 λειτουργεί ως ένας αντί-αγγειογενετικός μηχανισμός, καθώς τα δύο μόρια έχουν μεγάλη συγγένεια σύνδεσης, αλλά δεν είναι εφικτή η μετάδοση του σήματος, καθώς από τον sFlt-1 απουσιάζει η δραστηριότητα κινάσης τυροσίνης [252].

Όπως αναφέρθηκε, ο PlGF αρχικά ανιχνεύτηκε στον πλακούντα, στον οποίο ρυθμίζει την διαφοροποίηση και αύξηση των τροφοβλαστών. Ποντίκια στα οποία έχει γίνει γενετική απενεργοποίηση του *PlGF* γεννιούνται χωρίς ανωμαλίες, γεγονός που υποδεικνύει ότι ο PlGF είναι περιττός για την ανάπτυξη των αγγείων και την φυσιολογική τους διατήρηση στην ενήλικη ζωή. Υπό φυσιολογικές συνθήκες, η έκφραση του PlGF είναι χαμηλή ή μη ανιχνεύσιμη στους περισσότερους ιστούς του οργανισμού. Χαμηλή έκφραση του PlGF έχει παρατηρηθεί στα ενδοθηλιακά κύτταρα και στους ερυθροβλάστες του μυελού των οστών [253].

Ο PlGF ενεργοποιεί την αύξηση, την μετανάστευση και την επιβίωση των ενδοθηλιακών κυττάρων. Επίσης, λειτουργεί χημειοτακτικά για τα μακροφάγα και για τα πρόδρομα κύτταρα του μυελού των οστών. Συμμετοχή και υπερέκφραση του PlGF έχει περιγραφεί στην επούλωση πληγών, στην ανάπτυξη παράπλευρου αγγειακού δικτύου στην ισχαιμία, αλλά και σε πολλές παθολογικές καταστάσεις όπως είναι η ρευματοειδής αρθρίτιδα και ο καρκίνος [254].

Ο PlGF προσδένεται μέσω του υποδοχέα του Flt1 σε μια σειρά κυττάρων επιπλέον των ενδοθηλιακών κυττάρων, όπως είναι οι ινοβλάστες, τα λεία μυϊκά κύτταρα, τα μακροφάγα, τα προγονικά κύτταρα του μυελού των οστών και τα ίδια τα καρκινικά κύτταρα, προωθώντας την αύξηση των καρκινικών κυττάρων και την αγγειογένεση, και διευκολύνοντας την μετάσταση [253, 255]. Καθίσταται σαφές ότι ο PlGF είναι ένα μόριο το οποίο εμπλέκεται σε πολλές διαφορετικές διαδικασίες στην βιολογία του καρκίνου. Σε προκλινικές μελέτες, η θεραπεία με αναστολείς του PlGF ή του υποδοχέα

του Flt-1, όπως με μονοκλωνικά αντισώματα έναντι του PlGF (αPlGF), είχε ως αποτέλεσμα την μείωση της φλεγμονής και της παθολογικής αγγειογένεσης, την μείωση του πολλαπλασιασμού των καρκινικών κυττάρων, χωρίς να επηρεαστούν τα φυσιολογικά αγγεία. Επιπλέον, η θεραπεία με μονοκλωνικά αντισώματα έναντι του PlGF οδήγησε σε μείωση της διήθησης από μακροφάγα και άλλα φλεγμονώδη κύτταρα τα οποία εκκρίνουν αγγειογενετικούς παράγοντες και άρα, διευκολύνουν την επιβίωση των καρκινικών κυττάρων [219, 253]. Σε προκλινικές μελέτες με ποντίκια, η γενετική απενεργοποίηση του PlGF είχε ως αποτέλεσμα την καθυστέρηση της ανάπτυξης ηπατοκυτταρικού καρκίνου και σχηματισμού θηλωμάτων του δέρματος στα ποντίκια με έλλειψη του PlGF. Επιπλέον, έχει παρατηρηθεί ότι τα υψηλά επίπεδα του PlGF συσχετίζονται με δυσμενέστερη πρόγνωση σε ασθενείς με ηπατοκυτταρικό καρκίνο [256]. Οι μελέτες αυτές αναδεικνύουν τον PlGF, καθώς και τον υποδοχέα του Flt-1, ως στόχο για την ανάπτυξη νέων αντικαρκινικών θεραπειών, οι οποίες, σε αντίθεση με τους αναστολείς του VEGFR, πιθανώς να έχουν καλύτερο προφίλ ανεπιθύμητων ενεργειών, καθώς δεν θα επηρεάζουν τα φυσιολογικά αιμοφόρα αγγεία.



Εικόνα 13. Ο PlGF είναι μια κυτταροκίνη με πλειοτρόπο δράση σε διάφορους τύπους κυττάρων.

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΠΑΡΟΥΣΑΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Λαμβάνοντας υπόψη την σημασία των κυτταροκινών, και ιδιαίτερα των κυτταροκινών της οικογένειας της IL-12, στην φυσιολογική αιμοποίηση, στην ρύθμιση των απαντήσεων του ανοσοποιητικού συστήματος, αλλά και στον κυτταρικό κύκλο των καρκινικών κυττάρων, είτε δρώντας ογκοκατασταλτικά, είτε προωθώντας τον πολλαπλασιασμό και την αύξηση των καρκινικών κυττάρων, διερευνούμε τον ρόλο της κυτταροκίνης IL-23 στην οξεία λευχαιμία της παιδικής ηλικίας. Πιο συγκεκριμένα, στην παρούσα μελέτη διερευνούμε την συγκέντρωση της IL-23 στο περιφερικό αίμα ασθενών με ΟΛΛ και ΟΜΛ και την συγκρίνουμε με την αντίστοιχη συγκέντρωση των υγιών μαρτύρων. Επιπλέον, προκειμένου να διερευνήσουμε τον τρόπο με τον οποίο το λευχαιμικό φορτίο, αλλά και η χορήγηση της χημειοθεραπείας, επηρεάζει τα επίπεδα της IL-23 στο περιφερικό αίμα και στον μυελό των οστών των ασθενών, συγκρίναμε τις συγκεντρώσεις της IL-23 στο περιφερικό αίμα και στον μυελό των οστών κατά την διάγνωση, με τις αντίστοιχες συγκεντρώσεις μετά την ολοκλήρωση της θεραπείας εφόδου. Ακόμη, εξετάσαμε αν υπάρχουν συσχετίσεις μεταξύ της συγκέντρωσης της IL-23 στο περιφερικό αίμα και τον μυελό των οστών κατά την διάγνωση με άλλες διαγνωστικές μεταβλητές, όπως το φύλο, η ηλικία, ο αριθμός των λευκών αιμοσφαιρίων και η γαλακτική δεϋδρογονάση. Τέλος, μελετήσαμε την προγνωστική επίπτωση των επιπέδων της IL-23 μέσω πιθανών συσχετίσεων με το αποτέλεσμα της ελάχιστης υπολειπόμενης νόσου κατά το τέλος της θεραπείας εφόδου.

Επίσης, λαμβάνοντας υπόψη την σημασία της αγγειογένεσης στην παθοφυσιολογία των αιματολογικών κακοηθειών, θελήσαμε να μελετήσουμε τον ρόλο του αγγειογενετικού παράγοντα PlGF καθώς και του διαλυτού του υποδοχέα sFLT-1, στην οξεία λευχαιμία της παιδικής ηλικίας. Πιο συγκεκριμένα, στην παρούσα μελέτη διερευνούμε τις συγκεντρώσεις των PlGF και sFLT-1 στο περιφερικό αίμα ασθενών με ΟΛΛ και ΟΜΛ και τις συγκρίνουμε με τις αντίστοιχες συγκεντρώσεις των υγιών μαρτύρων. Επιπλέον, συγκρίναμε την συγκέντρωση των PlGF και sFLT-1 στον μυελό των οστών κατά την διάγνωση με την αντίστοιχη συγκέντρωση στο τέλος της θεραπείας εφόδου. Ακόμη, εξετάσαμε αν υπάρχουν συσχετίσεις μεταξύ της συγκέντρωσης του PlGF και του sFLT-1 στο περιφερικό αίμα και τον μυελό των οστών

κατά την διάγνωση με άλλες διαγνωστικές μεταβλητές, όπως το φύλο, η ηλικία, ο αριθμός των λευκών αιμοσφαιρίων και η γαλακτική δεϋδρογονάση. Τέλος, μελετήσαμε την προγνωστική επίπτωση των επιπέδων του PIGF και του sFLT-1 μέσω πιθανών συσχετίσεων με το αποτέλεσμα της ελάχιστης υπολειπόμενης νόσου κατά το τέλος της θεραπείας εφόδου.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7. ΥΛΙΚΟ-ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

7.1. Ασθενείς και υγιείς μάρτυρες.

Η μελέτη μας συμπεριέλαβε 65 παιδιά με οξεία λευχαιμία, τα οποία διεγνώσθησαν και έλαβαν θεραπεία στην Μονάδα Αιματολογίας-Ογκολογίας της Α΄ Παιδιατρικής Κλινικής του Πανεπιστημίου Αθηνών, που βρίσκεται στην Ογκολογική Μονάδα Παίδων «Μαριάννα Β. Βαρδινογιάννη-Ελπίδα» στο Νοσοκομείου Παίδων «Η Αγία Σοφία» καθώς και στο Ογκολογικό Τμήμα του Νοσοκομείου Παίδων «Παναγιώτη και Αγλαΐας Κυριακού», στην Αθήνα, από τον Ιανουάριο του 2011 έως και τον Μάιο του 2016. Η μελέτη μας συμπεριέλαβε ακόμη 27 παιδιά τα οποία προσήλθαν στο Νοσοκομείο Παίδων «Η Αγία Σοφία» για ελάχιστον χειρουργικές επεμβάσεις, και τα οποία χρησιμοποιήθηκαν ως υγιείς μάρτυρες.

Η μελέτη μας συμπεριέλαβε 65 παιδιά (34 αγόρια και 31 κορίτσια) ηλικίας από 11 μηνών έως 18 ετών, με διάμεση ηλικία τα 4.9 έτη (2.9-9.8) (Πίνακας 1). Πενήντα εννέα (59) παιδιά διεγνώσθησαν με ΟΛΛ και 6 παιδιά διεγνώσθησαν με ΟΜΛ. Μεταξύ των παιδιών με ΟΛΛ, 50 διεγνώσθησαν με Β-ΟΛΛ, 6 διεγνώσθησαν με Τ-ΟΛΛ, 2 διεγνώσθησαν οξεία λευχαιμία τύπου Burkitt και ένα παιδί διαγνώσθηκε με ΧΜΛ με θετικό χρωμόσωμα Philadelphia που έκανε βλαστική κρίση της ΧΜΛ και εκτροπή σε ΟΛΛ. Τα παιδιά τα οποία διεγνώσθησαν με ΟΛΛ, συμπεριλαμβανομένου και του παιδιού με ΧΜΛ το οποίο παρουσίασε βλαστική κρίση, έλαβαν θεραπεία σύμφωνα με το πρωτόκολλο ALLIC BFM 2009. Τα δύο παιδιά με οξεία λευχαιμία τύπου Burkitt, έλαβαν θεραπεία σύμφωνα με το πρωτόκολλο FAB-LMB 96. Τέλος, οι ασθενείς με ΟΜΛ, έλαβαν θεραπεία σύμφωνα με τα πρωτόκολλα AML BFM 2004 και AML BFM 2012.

Η ομάδα των υγιών μαρτύρων συμπεριέλαβε 27 παιδιά (14 αγόρια και 13 κορίτσια), ηλικίας από 2 έως 13 ετών, με διάμεση ηλικία τα 5.5 έτη (3.5-10). Στην ομάδα των υγιών μαρτύρων, ελήφθη αναλυτικό ιατρικό ιστορικό και πραγματοποιήθηκε κλινική εξέταση που επιβεβαίωσαν την απουσία φλεγμονώδους νόσου για τουλάχιστον ένα μήνα πριν την συλλογή των δειγμάτων. Επίσης,

επιβεβαιώθηκε ότι στο διάστημα αυτό, οι υγείες μάρτυρες δεν έλαβαν οποιαδήποτε φαρμακευτική αγωγή.

Πίνακας 3: Τα δημογραφικά και κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά των ασθενών και των υγιών μαρτύρων.

	Ασθενείς				Υγείες Μάρτυρες
	ΟΛΛ	Β-ΟΛΛ	Τ-ΟΛΛ	ΟΜΛ	
Συνολικός Αριθμός (n)	59	53	6	6	27
Φύλο (άρρεν/θήλυ) (n)	34/31	25/28	6/0	3/3	14/13
Ηλικία					
<6 ετών (n)	35	32	3	1	15
>6 ετών (n)	24	21	3	5	12
Λευκά αιμοσφαίρια (WBC)					
<20.000/μl (n)	37	37	0	3	
>20.000/μl (n)	22	16	6	3	
LDH					
<1000 IU/l	25	25	0	4	
>1000 IU/l	30	24	6	2	
Αποτέλεσμα MRD κατά το τέλος της θεραπείας εφόδου					
Αρνητικό (n)	47	44	3	1	
Θετικό (n)	12	9	3	4	

7.2. Δήλωση ηθικής και δεοντολογίας.

Πριν τη δειγματοληψία του περιφερικού αίματος και του μυελού των οστών, δόθηκε συγκατάθεση από τους γονείς για περαιτέρω χρήση των δειγμάτων στην παρούσα μελέτη, ενώ όλα τα πειράματα διεξήχθησαν σύμφωνα με τις διεθνείς διατάξεις των βιοϊατρικών μελετών, αναφορικά με τη Διακήρυξη του Ελσίνκι του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας. Επιπλέον, η μελέτη εγκρίθηκε από το Διοικητικό

Συμβούλιο των διασυνδεδεμένων Νοσοκομείων Γ.Ν.Π.Α. «Η Αγία Σοφία», Γ.Ν. Παίδων Πεντέλης και Γ.Ν.Π.Α. «Π. & Α. Κυριακού», με αριθμό πρωτοκόλλου 16483/25-07-13.

7.3. Συλλογή των δειγμάτων περιφερικού αίματος και μυελού των οστών.

Τα δείγματα περιφερικού αίματος και μυελού των οστών συλλέχθηκαν από παιδιά με οξεία λευχαιμία πριν από την έναρξη της χημειοθεραπείας (ημέρα 0) και κατά την ολοκλήρωση της θεραπείας εφόδου. Η ολοκλήρωση της θεραπείας εφόδου αντιστοιχεί στην ημέρα +33 για τα παιδιά με ΟΛΛ και στην ημέρα +28 για τα παιδιά με ΟΜΛ. Για τις περιπτώσεις οξείας λευχαιμίας τύπου Burkitt, τα δείγματα συλλέχθηκαν κατά την διάγνωση και μετά την ολοκλήρωση του σχήματος COPADM1 της θεραπείας εφόδου.

Τα δείγματα μυελού των οστών συλλέχθηκαν σε σωληνάρια αιμοληψίας EDTA, ενώ τα δείγματα περιφερικού αίματος σε σωληνάρια διαχωρισμού του ορού. Ο ορός από το περιφερικό αίμα και το πλάσμα από τον μυελό των οστών συλλέχθηκαν μετά από φυγοκέντρηση, διαχωρίστηκαν σε μερίσματα (aliquots), και αποθηκεύτηκαν στους -80°C έως ότου πραγματοποιηθούν οι μετρήσεις. Επαναλαμβανόμενοι κύκλοι ψύξης-απόψυξης αποφεύχθηκαν για όλα τα δείγματα.

Η συγκέντρωση της IL-23 προσδιορίστηκε σε 60 δείγματα περιφερικού αίματος και 59 δείγματα μυελού των οστών διάγνωσης, σε 28 δείγματα περιφερικού αίματος και 35 δείγματα μυελού των οστών τα οποία ελήφθησαν κατά την ολοκλήρωση της θεραπείας εφόδου, και σε 27 δείγματα περιφερικού αίματος υγιών μαρτύρων.

Η συγκέντρωση του PIGF προσδιορίστηκε σε 56 δείγματα περιφερικού αίματος και 52 δείγματα μυελού των οστών διάγνωσης, σε 29 δείγματα μυελού των οστών κατά την ολοκλήρωση της θεραπείας εφόδου καθώς επίσης και σε 21 δείγματα περιφερικού αίματος υγιών μαρτύρων. Η συγκέντρωση του sFLT-1 προσδιορίστηκε σε 54 δείγματα περιφερικού αίματος και 46 δείγματα μυελού των οστών διάγνωσης, σε 26 δείγματα μυελού των οστών κατά την ολοκλήρωση της θεραπείας εφόδου και σε 21 δείγματα περιφερικού αίματος υγιών μαρτύρων.

7.4. Προσδιορισμός της συγκέντρωσης της IL-23.

Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης της IL-23 στο περιφερικό αίμα και στον μυελό των οστών πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας αντιδραστήρια για τον ποσοτικό προσδιορισμό της IL-23 με την ανοσοενζυμική δοκιμασία ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) της εταιρίας eBioscience (Human IL-23 Platinum ELISA, eBioscience, San Diego, CA, USA), σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Συγκεκριμένα, όλα τα αντιδραστήρια και τα δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν σε θερμοκρασία δωματίου. Αρχικά, πραγματοποιήθηκε η αραίωση των θέσεων standard στην πλάκα μικροτιτλοποίησης. Στην συνέχεια, προστέθηκαν 100μl των δειγμάτων των ασθενών και των υγιών μαρτύρων εις τριπλούν, καθώς και 50μl του sample diluent. Στην συνέχεια, η πλάκα μικροτιτλοποίησης καλύφθηκε και έγινε επώαση για δύο ώρες σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολούθως, τα πηγαδάκια της πλάκας άδειασαν και έγιναν 5 πλύσεις με το διάλυμα πλύσης. Ακολούθως, προστέθηκαν 100μl Biotin-Conjugate σε όλα τα πηγαδάκια της πλάκας μικροτιτλοποίησης, και η πλάκα καλύφθηκε και ακολούθησε επώαση για μια ώρα σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολούθως, τα πηγαδάκια της πλάκας άδειασαν και έγιναν 5 πλύσεις με το διάλυμα πλύσης. Ακολούθως, προστέθηκαν 100μl του διαλύματος Avidin-HRP σε όλα τα πηγαδάκια της πλάκας, και ακολούθησε επώαση για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολούθως, τα πηγαδάκια της πλάκας άδειασαν και έγιναν 5 πλύσεις με το διάλυμα πλύσης. Ακολούθως, προστέθηκαν 100μl του διαλύματος TMB Substrate σε όλα τα πηγαδάκια της πλάκας, η πλάκα καλύφθηκε και επώαστηκε για δεκαπέντε λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Τέλος, προστέθηκαν 100μl του διαλύματος παύσης. Η οπτική πυκνότητα μετρήθηκε σε μήκος κύματος 450nm χρησιμοποιώντας ειδικό φωτόμετρο (VersaMax Tunable, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA). Η πιο μικρή ανιχνεύσιμη συγκέντρωση (ευαισθησία) για την IL-23 είναι, σύμφωνα με το αντιδραστήριο, τα 5pg/ml. Το αντιδραστήριο περιέχει μάρτυρες (Standard) για την IL-23 μεταξύ των συγκεντρώσεων 31.3pg/ml και 2000 pg/m καθώς και έναν μηδενικό μάρτυρα. Τα inter-assay και intra-assay ήταν 4.5% και 6.7% αντίστοιχα.

7.5. Προσδιορισμός της συγκέντρωσης του PlGF.

Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης του PlGF στο περιφερικό αίμα και στον μυελό των οστών πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας αντιδραστήρια για τον ποσοτικό προσδιορισμό του PlGF με την ανοσοενζυμική δοκιμασία ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) της εταιρίας R&D Systems (Quantikine ELISA, Human PlGF Immunoassay, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA), σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Συγκεκριμένα, όλα τα αντιδραστήρια και τα δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν σε θερμοκρασία δωματίου. Αρχικά, 100μl του διαλύτη RD1-22 προστέθηκε σε κάθε πηγαδάκι της πλάκας μικροτιτλοποίησης. Ακολούθως, προστέθηκαν 100μl από το διάλυμα Standard, τα δείγματα των ασθενών με λευχαιμία και τα δείγματα των υγιών μαρτύρων, και η πλάκα καλύφθηκε και έγινε επώαση για δύο ώρες σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολούθως, τα πηγαδάκια της πλάκας άδειασαν και έγιναν 4 πλύσεις με το διάλυμα πλύσης. Προστέθηκαν 200μl του διαλύματος Human PlGF Conjugate, η πλάκα καλύφθηκε και έγινε επώαση για δύο ώρες σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολούθως, τα πηγαδάκια της πλάκας άδειασαν και έγιναν 4 πλύσεις με το διάλυμα πλύσης. Προστέθηκαν 200μl του διαλύματος Substrate και ακολούθησε επώαση για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Τέλος, προστέθηκαν 50μl του διαλύματος παύσης σε κάθε πηγαδάκι της πλάκας. Η οπτική πυκνότητα μετρήθηκε σε μήκος κύματος 450nm χρησιμοποιώντας ειδικό φωτόμετρο (VersaMax Tunable, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA). Η πιο μικρή ανιχνεύσιμη συγκέντρωση (ευαισθησία) για τον PlGF είναι, σύμφωνα με το αντιδραστήριο, τα 7pg/ml. Τα inter-assay και intra-assay ήταν 10.9% και 5.6% αντίστοιχα.

7.6. Προσδιορισμός της συγκέντρωσης του sFLT-1.

Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης του sFLT-1 στο περιφερικό αίμα και στον μυελό των οστών πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας αντιδραστήρια για τον ποσοτικό προσδιορισμό του sFLT-1 με την ανοσοενζυμική δοκιμασία ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) της εταιρίας eBioscience (Human VEGF-R1 Platinum ELISA, eBioscience, San Diego, CA, USA), σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Συγκεκριμένα, όλα τα αντιδραστήρια και τα δείγματα που

χρησιμοποιήθηκαν ήταν σε θερμοκρασία δωματίου. Αρχικά, πραγματοποιήθηκε η αραίωση των θέσεων standard στην πλάκα μικροτιτλοποίησης. Στην συνέχεια προστέθηκαν 50μl του Assay Buffer, 50μl από τα δείγματα των ασθενών και των υγιών μαρτύρων εις τριπλούν καθώς και 50μl του Biotin-Conjugate σε κάθε πηγαδάκι της πλάκας μικροτιτλοποίησης. Ακολούθως, η πλάκα καλύφθηκε και έγινε επώαση για δύο ώρες σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολούθως, τα πηγαδάκια της πλάκας άδειασαν και έγιναν 6 πλύσεις με το διάλυμα πλύσης. Ακολούθως, προστέθηκαν 100μl του διαλύματος Streptavidin-HRP σε όλα τα πηγαδάκια της πλάκας μικροτιτλοποίησης, και η πλάκα καλύφθηκε ώστε να γίνει επώαση για μια ώρα σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια, τα πηγαδάκια της πλάκας άδειασαν και έγιναν 6 πλύσεις με το διάλυμα πλύσης. Προστέθηκαν 100μl του διαλύματος TMB Substrate σε όλα τα πηγαδάκια της πλάκας μικροτιτλοποίησης, και η πλάκα καλύφθηκε ώστε να γίνει επώαση για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Τέλος, προστέθηκαν 100μl του διαλύματος παύσης. Η οπτική πυκνότητα μετρήθηκε σε μήκος κύματος 450nm χρησιμοποιώντας ειδικό φωτόμετρο (VersaMax Tunable, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA). Η πιο μικρή ανιχνεύσιμη συγκέντρωση (ευαισθησία) για τον sFLT-1 είναι, σύμφωνα με το αντιδραστήριο, τα 0.03ng/ml. Τα inter-assay και intra-assay ήταν 5.1% και 5.5% αντίστοιχα.

7.7. Στατιστική ανάλυση.

Ο έλεγχος κανονικότητας για τις συνεχείς μεταβλητές έγινε με τη δοκιμασία Kolmogorov – Smirnov. Οι συνεχείς μεταβλητές εκφράστηκαν ως μέση τιμή (τυπική απόκλιση) [mean (standard deviation)] ή διάμεσος (ενδοτεταρτημοριακό εύρος) [median (IQR)] ανάλογα με την κανονικότητα. Για τις συγκρίσεις μεταξύ μεταβλητών με κανονική κατανομή χρησιμοποιήθηκε η δοκιμασία Student's t-test και paired t-test κατά ζεύγη, ενώ για τις μεταβλητές με μη κανονική κατανομή, έγινε χρήση της μη παραμετρικής δοκιμασίας Mann – Whitney και Wilcoxon test, αντίστοιχα. Το επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας ορίστηκε ως $p < 0.05$. Η στατιστική επεξεργασία των δεδομένων έγινε με την χρήση του στατιστικού προγράμματος STATA 13 (STATA Corp., College Station, Texas, USA).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

8.1. Η μελέτη της IL-23.

8.1.1. Σύγκριση της συγκέντρωσης της IL-23 με τα δημογραφικά και κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά των ασθενών.

Τα επίπεδα της IL-23 (σε pg/ml) ανιχνεύτηκαν στο περιφερικό αίμα και τον μυελό των οστών, τόσο σε ασθενείς με ΟΛΛ [Π.Α.: 11.32 (6.21-19.38), Μ.Ο.: 12.08 (4.39-27.70)] όσο και σε ασθενείς με ΟΜΛ [Π.Α.: 14.72 (11.23), Μ.Ο.: 6.61 (5.56 - 7.64)]. Η συγκέντρωση της IL-23 δεν διέφερε σημαντικά ανάμεσα στους ασθενείς με ΟΛΛ και σε αυτούς με ΟΜΛ, ούτε στο περιφερικό αίμα ($p=0.834$), ούτε στον μυελό των οστών ($p=0.531$). Στους ασθενείς με ΟΛΛ, δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές ανάμεσα στις υποομάδες ασθενών με Β-ΟΛΛ και Τ-ΟΛΛ, ούτε στο περιφερικό αίμα [11.81 (6.14 - 21.49) vs 10.31 (7.25), $p=0.554$], ούτε στον μυελό των οστών [12.72 (4.17 - 28.20) vs 10.04 (6.46 - 12.08), $p=0.933$].

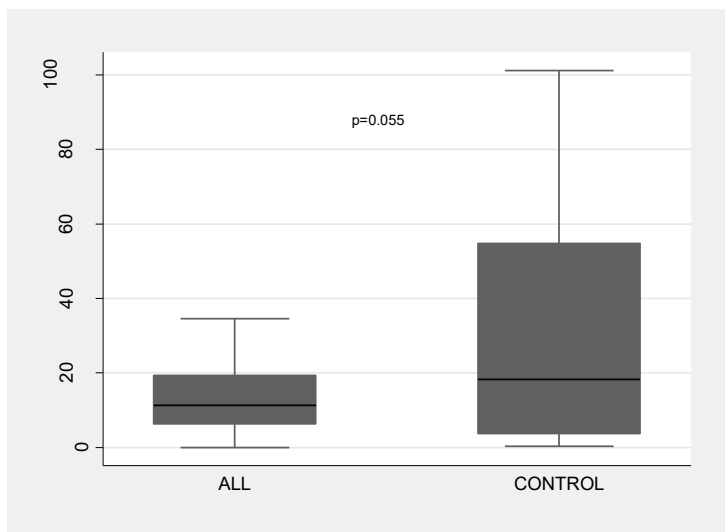
Η ανάλυση των δημογραφικών και κλινικών δεδομένων των ασθενών με ΟΛΛ και ΟΜΛ σε συνάρτηση με τα επίπεδα της IL-23 κατά την διάγνωση στο περιφερικό αίμα και στον μυελό των οστών, δεν ανέδειξε στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των υποομάδων για την ηλικία, το φύλο, τον αριθμό των λευκών αιμοσφαιρίων (white blood cells -WBC), την γαλακτική δεϋδρογονάση (lactate dehydrogenase - LDH) και το αποτέλεσμα της ελάχιστης υπολειπόμενης νόσου (minimal residual disease – MRD) στο τέλος της θεραπείας εφόδου, όπως φαίνεται στον πίνακα 4.

Πίνακας 4: Η συγκέντρωση της IL-23 (σε pg/ml) στο περιφερικό αίμα (Π.Α.) και τον μυελό των οστών (Μ.Ο.) των ασθενών με ΟΛΛ και ΟΜΛ σε σύγκριση με τα δημογραφικά και κλινικά δεδομένα των ασθενών. Η συγκέντρωση της IL-23 παρουσιάζεται ως διάμεση τιμή (ενδοτεταρτημοριακό εύρος) στις περιπτώσεις μη κανονικής κατανομής και ως μέση τιμή (σταθερή απόκλιση) στις περιπτώσεις κανονικής κατανομής. n: ο αριθμός των ασθενών.

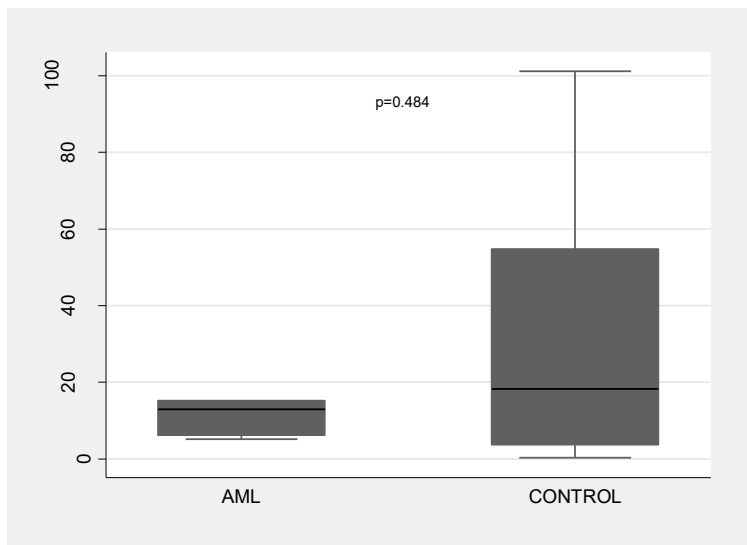
Disease		ΟΛΛ				ΟΜΛ			
		Π.Α. IL-23	p-value	Μ.Ο. IL-23	p-value	Π.Α. IL-23	p-value	Μ.Ο. IL-23	p-value
Φύλο	Άρρεν	11.81 (6.21-17.84) (n=30)	0.715	12.04 (4.50-25.70) (n=27)	0.915	19.08 (15.35) (n=3)	0.401	21.68 (28.15) (n=3)	0.402
	Θήλυ	10.77 (6.67-23.22) (n=24)		13.01 (4.17-29.20) (n=26)		10.36 (4.75) (n=3)		6.43 (1.08) (n=3)	
Ηλικία	<6 ετών	10.22 (6.21-15.58) (n=31)	0.309	8.67 (4.17-24.59) (n=32)	0.287	15.15 (n=1)	-	7.12 (n=1)	-
	>6 ετών	16.45 (6.07-30.0) (n=23)		16.84 (6.33-27.70) (n=21)		14.63 (12.55) (n=5)		6.10 (5.56-7.64) (n=5)	
WBC	<20000/μl	11.32 (6.07-17.47) (n=33)	0.818	12.72 (4.17-29.2) (n=33)	0.826	10.36 (4.75) (n=3)	0.401	6.43 (1.08) (n=3)	0.402
	>20000/μl	10.76 (7.13-18.61) (n=20)		10.51 (5.43-21.92) (n=20)		19.08 (15.35) (n=3)		21.68 (28.15) (n=3)	
LDH	<1000 IU/l	8.54 (4.39-13.43) (n=20)	0.271	13.0 (3.77-28.7) (n=24)	0.947	16.76 (13.40) (n=4)	0.586	6.87 (5.83-30.89) (n=4)	0.355
	>1000 IU/l	12.67 (7.49-19.38) (n=30)		12.04 (4.17-27.70) (n=27)		10.61 (6.42) (n=2)		5.46 (2.35) (n=2)	
MRD	Θετική	11.32 (4.95-19.38) (n=43)	0.982	8.53 (4.17-29.2) (n=42)	0.554	15.15 (n=1)	-	7.12 (n=1)	-
	Αρνητική	8.85 (6.76-19.97) (n=11)		15.52 (9.17) (n=11)		15.44 (14.34) (n=4)		6.60 (4.68 - 30.89) (n=4)	

8.1.2. Σύγκριση της συγκέντρωσης της IL-23 κατά την διάγνωση στο περιφερικό αίμα ασθενών με λευχαιμία σε σχέση με τους υγιείς μάρτυρες.

Σε όλους τους ασθενείς με λευχαιμία, η συγκέντρωση της IL-23 στο περιφερικό αίμα κατά την διάγνωση ήταν χαμηλότερη σε σχέση με τους υγιείς μάρτυρες [11.38 (6.14 - 18.61) vs 18.22 (3.60 - 54.79)] και παρατηρήθηκε μια οριακή στατιστική σημαντικότητα ($p=0.058$). Σε ασθενείς με ΟΛΛ, η διάμεση συγκέντρωση της IL-23 ήταν 11.32 (6.21-19.38), ενώ στους υγιείς μάρτυρες ήταν 18.22 (3.60 - 54.79), ($p=0.055$) (Γράφημα 1.). Δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα στην συγκέντρωση IL-23 των ασθενών με ΟΜΛ και τους υγιείς μάρτυρες [14.72 (11.23) vs 18.22 (3.60 - 54.79), $p=0.484$] (Γράφημα 2.). Επίσης, δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα στην συγκέντρωση της IL-23 στους ασθενείς με ΟΛΛ κατά το τέλος της θεραπείας εφόδου και στην αντίστοιχη συγκέντρωση των υγιών μαρτύρων [34.1 (22.35) vs 18.22 (3.60 - 54.79), $p=0.372$].



Γράφημα 1: Η συγκέντρωση της IL-23 στο περιφερικό αίμα των ασθενών με ΟΛΛ (ALL: Acute Lymphoblastic Leukemia) (n=54) σε σχέση με την αντίστοιχη συγκέντρωση στους υγιείς μάρτυρες (control) (n=27).



Γράφημα 2: Η συγκέντρωση της IL-23 στο περιφερικό αίμα των ασθενών με ΟΜΛ (AML: Acute Myeloid Leukemia) (n=6) σε σχέση με την αντίστοιχη συγκέντρωση στους υγιείς μάρτυρες (control) (n=27).

8.1.3. Σύγκριση της συγκέντρωσης της IL-23 στο περιφερικό αίμα και τον μυελό των οστών των ασθενών με λευχαιμία κατά την διάγνωση σε σχέση με την ολοκλήρωση της θεραπείας εφόδου.

Σε όλους τους ασθενείς με οξεία λευχαιμία, η συγκέντρωση της IL-23 στο περιφερικό αίμα κατά την διάγνωση ήταν σημαντικά χαμηλότερη σε σχέση με την αντίστοιχη συγκέντρωση στο τέλος της θεραπείας εφόδου [13.71 (6.21 - 30) vs 32.79 (21.72), $p=0.015$]. Σε ασθενείς με ΟΛΛ, η συγκέντρωση της IL-23 στο περιφερικό αίμα κατά την διάγνωση ήταν σημαντικά χαμηλότερη σε σχέση με την αντίστοιχη συγκέντρωση στο τέλος της θεραπείας εφόδου [13.71 (6.21 - 30) vs 32.79 (21.72), $p=0.015$] (Γράφημα 3). Αναφορικά με τους διαφορετικούς υποτύπους της ΟΛΛ, στους ασθενείς με Β-ΟΛΛ, η συγκέντρωση της IL-23 στο περιφερικό αίμα κατά την διάγνωση ήταν σημαντικά χαμηλότερη σε σχέση με την αντίστοιχη συγκέντρωση κατά το τέλος της θεραπείας εφόδου [10.41 (5.58 - 30) vs 30.51 (20.62), $p=0.039$]. Η ίδια τάση παρατηρήθηκε και στους ασθενείς με Τ-ΟΛΛ [18.61 (1.09) vs 60.1 (19.94)] χωρίς όμως η διαφορά να φτάσει το επίπεδο της στατιστικής σημαντικότητας ($p=0.179$), πιθανώς λόγω του μικρού αριθμού ασθενών με Τ-ΟΛΛ της μελέτης.

Σε όλους τους ασθενείς με οξεία λευχαιμία, η συγκέντρωση της IL-23 στον μυελό των οστών κατά την διάγνωση ήταν χαμηλότερη σε σχέση με την αντίστοιχη συγκέντρωση κατά το τέλος της θεραπείας εφόδου [12.04 (21.53 - 25.87) vs 29.2 (9.67 - 33.48), $p=0.037$] (Γράφημα 4).

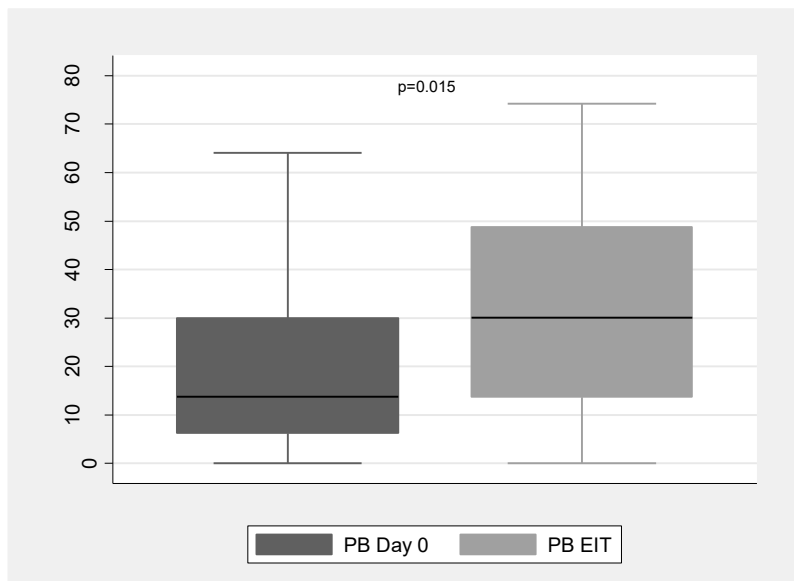
Σε ασθενείς με ΟΛΛ, παρατηρήθηκε χαμηλότερη συγκέντρωση IL-23 στον μυελό των οστών κατά την διάγνωση σε σχέση με το τέλος της θεραπείας εφόδου, με οριακή στατιστική σημαντικότητα [12.73 (4.33-30.0) vs 29.2 (11.4-35.6), ($p=0.060$)] (Γράφημα 4). Αναφορικά με τους υποτύπους της ΟΛΛ, χαμηλότερη συγκέντρωση της IL-23 παρατηρήθηκε στον μυελό των οστών κατά την διάγνωση σε σχέση με το τέλος της θεραπείας εφόδου τόσο στους ασθενείς με Β-ΟΛΛ [14.48 (4.17 - 30.81) vs 29.2 (11.55 - 33.48), $p=0.147$], όσο και σε αυτούς με Τ-ΟΛΛ [8.85 (2.87) vs 33.41 (24.52), $p=0.189$], χωρίς ωστόσο να παρατηρηθεί στατιστική σημαντικότητα.

Στους ασθενείς με ΟΜΛ, η συγκέντρωση της IL-23 στον μυελό των οστών κατά την διάγνωση ήταν σημαντικά χαμηλότερη σε σχέση με την αντίστοιχη συγκέντρωση στο τέλος της θεραπείας εφόδου. [5.49 (1.66) vs 8.10 (1.25), $p=0.047$] (Γράφημα 4).

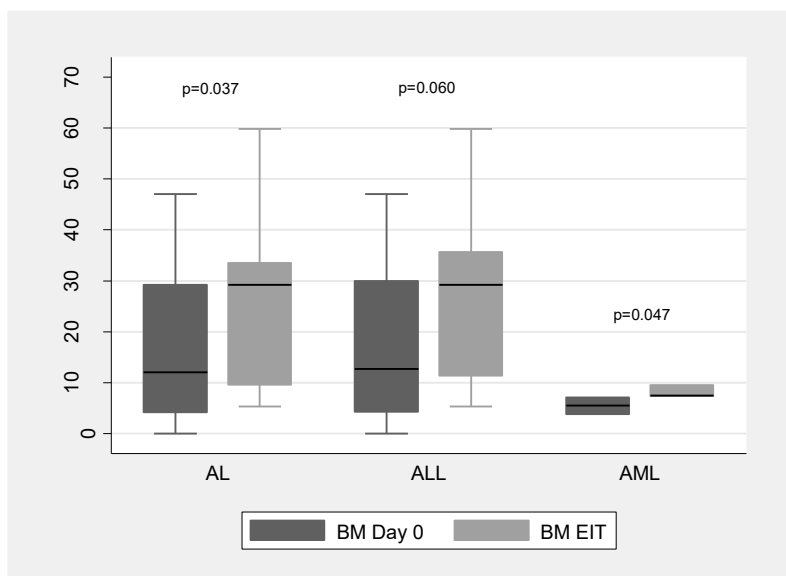
Η σύγκριση ανάμεσα στην συγκέντρωση της IL-23 κατά την διάγνωση σε σχέση με την αντίστοιχη συγκέντρωση στο τέλος της θεραπείας εφόδου στο περιφερικό αίμα και στον μυελό των οστών για τους ασθενείς με ΟΛΛ και ΟΜΛ φαίνεται στον πίνακα 5.

Πίνακας 5: Η συγκέντρωση της IL-23 (σε pg/ml) στο περιφερικό αίμα (Π.Α.) και στον μυελό των οστών (Μ.Ο.) κατά την διάγνωση και κατά το τέλος της θεραπείας εφόδου σε ασθενείς με ΟΛΛ και ΟΜΛ. Η συγκέντρωση της IL-23 παρουσιάζεται ως διάμεση τιμή (ενδοτεταρτημοριακό εύρος) στις περιπτώσεις μη κανονικής κατανομής και ως μέση τιμή (σταθερή απόκλιση) στις περιπτώσεις κανονικής κατανομής. n: ο αριθμός των ασθενών.

	Π.Α. IL-23				Μ.Ο. IL-23			
	n	Διάγνωση	Τέλος θεραπείας εφόδου	p- value	n	Διάγνωση	Τέλος θεραπείας εφόδου	p- value
Σύνολο λευχαιμιών	26	13.71 (6.21 - 30)	32.79 (21.72)	0.015	35	12.04 (21.53 - 25.87)	29.2 (9.67 - 33.48)	0.037
ΟΛΛ	26	13.71 (6.21 - 30)	32.79 (21.72)	0.015	32	12.73 (4.33-30.0)	29.2 (11.4- 35.6)	0.060
Β-ΟΛΛ	24	10.41 (5.58 - 30)	30.51 (20.62)	0.039	29	14.48 (4.17 - 30.81)	29.2 (11.55 - 33.48)	0.147
Τ-ΟΛΛ	2	18.61 (1.09)	60.1 (19.94)	0.179	3	8.85 (2.87)	33.41 (24.52)	0.189
ΟΜΛ	0				3	5.49 (1.66)	8.10 (1.25)	0.047



Γράφημα 3: Η συγκέντρωση της IL-23 στους ασθενείς με ΟΛΛ (n=26) στο περιφερικό αίμα κατά την διάγνωση (PB, Peripheral Blood, Day 0) σε σχέση με την αντίστοιχη συγκέντρωση στο τέλος της θεραπείας εφόδου (EIT: End of Induction Therapy).



Γράφημα 4: Η συγκέντρωση της IL-23 στον μυελό των οστών (BM: Bone Marrow) σε όλους τους ασθενείς με λευχαιμία (AL: All Leukemia) (n=35), στους ασθενείς με ΟΛΛ (ALL: Acute Lymphoblastic Leukemia) (n=32) και σε ασθενείς με ΟΜΛ (AML: Acute Myeloid Leukemia) κατά την διάγνωση (Day 0) και κατά το τέλος της θεραπείας εφόδου (EIT: End of Induction Therapy).

8.2. Η μελέτη του PIGF.

8.2.1. Σύγκριση της συγκέντρωσης του PIGF με τα δημογραφικά και κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά των ασθενών.

Στους ασθενείς με ΟΜΛ, τα επίπεδα του PIGF (σε pg/ml) στο περιφερικό αίμα κατά την διάγνωση ήταν σημαντικά πιο αυξημένα στους άρρενες ασθενείς συγκριτικά με τα θήλεα [58.04 (57.89-71.31) vs 38.29 (32.41-41.21), $p=0.049$]. Η διαφορά των αντίστοιχων επιπέδων στον μυελό των οστών των ασθενών με ΟΜΛ δεν ήταν στατιστικά σημαντική [73.36 (70.01-122.67) vs 59.45 (54.42-387.91), $p=0.513$]. Δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές στα επίπεδα του PIGF σε σχέση με το φύλο των ασθενών στους ασθενείς με ΟΛΛ στο περιφερικό αίμα ή στον μυελό των οστών.

Στους ασθενείς με ΟΜΛ, τα επίπεδα του PIGF στο περιφερικό αίμα κατά την διάγνωση ήταν σημαντικά πιο αυξημένα στους ασθενείς με αριθμό λευκών αιμοσφαιρίων $WBC > 20.000/\mu\text{l}$ σε σχέση με όσους είχαν $WBC < 20.000/\mu\text{l}$ [58.04 (57.89-71.31) vs 38.29 (32.41-41.21), $p=0.049$]. Η διαφορά των αντίστοιχων επιπέδων στον μυελό των οστών των ασθενών με ΟΜΛ δεν ήταν στατιστικά σημαντική [73.36 (70.01-122.67) vs 59.45 (54.42-387.91), $p=0.513$]. Δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές στα επίπεδα του PIGF σε σχέση με τον αριθμό των λευκών αιμοσφαιρίων κατά την διάγνωση στους ασθενείς με ΟΛΛ στο περιφερικό αίμα ή στον μυελό των οστών.

Στους ασθενείς με ΟΛΛ, παρατηρήθηκαν σημαντικά υψηλότερα επίπεδα PIGF κατά την διάγνωση στο περιφερικό αίμα των ασθενών οι οποίοι είχαν θετική υπολειπόμενη νόσο (MRD, Minimal Residual Disease) κατά την ολοκλήρωση της θεραπείας εφόδου, σε σχέση με όσους είχαν αρνητική MRD [57.32 (40.06) vs 32.82 (21.36), $p=0.008$]. Η διαφορά των αντίστοιχων επιπέδων στον μυελό των οστών των ασθενών με ΟΛΛ δεν ήταν στατιστικά σημαντική [64.30 (38.79-74.90) vs 45.91 (26.80-67.64), $p=0.231$]. Δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές στα επίπεδα του PIGF σε σχέση με το αποτέλεσμα της MRD στους ασθενείς με ΟΜΛ στο περιφερικό αίμα ή στον μυελό των οστών.

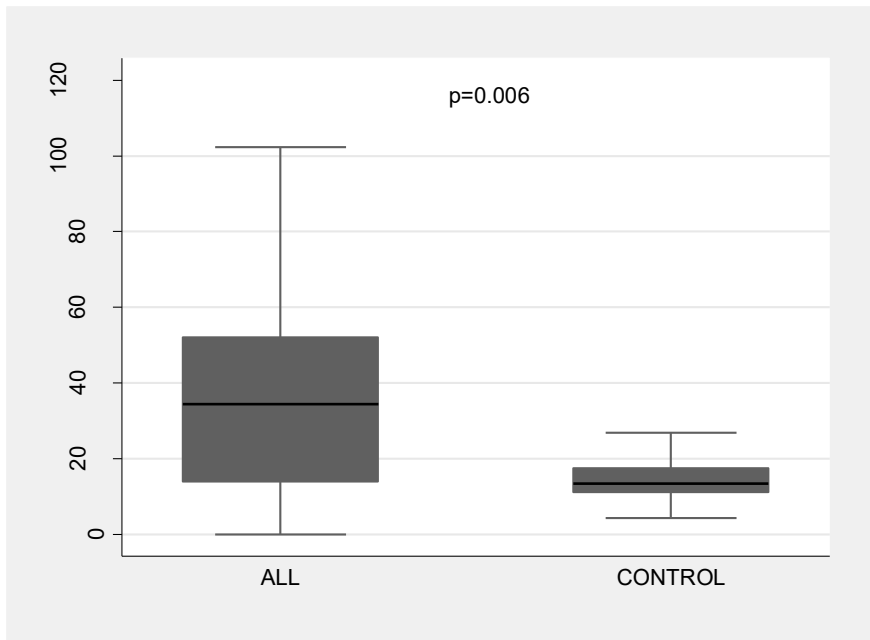
Η ανάλυση των δημογραφικών και κλινικών δεδομένων των ασθενών με ΟΛΛ και ΟΜΛ σε συνάρτηση με τα επίπεδα του PIGF κατά την διάγνωση στο περιφερικό αίμα και στον μυελό των οστών, δεν ανέδειξαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των υποομάδων για την ηλικία των ασθενών και την γαλακτική δεϋδρογονάση (lactate dehydrogenase - LDH). Τα επίπεδα του PIGF σε σχέση με τα δημογραφικά και κλινικά χαρακτηριστικά των ασθενών, περιγράφονται στον πίνακα 6.

Πίνακας 6: Η συγκέντρωση του PIGF (σε pg/ml) στο περιφερικό αίμα (Π.Α.) και τον μυελό των οστών (Μ.Ο.) των ασθενών με ΟΛΛ και ΟΜΛ σε σύγκριση με τα δημογραφικά και κλινικά δεδομένα των ασθενών. Η συγκέντρωση του PIGF παρουσιάζεται ως διάμεση τιμή (ενδοτεταρτημοριακό εύρος) στις περιπτώσεις μη κανονικής κατανομής και ως μέση τιμή (σταθερή απόκλιση) στις περιπτώσεις κανονικής κατανομής. n: ο αριθμός των ασθενών.

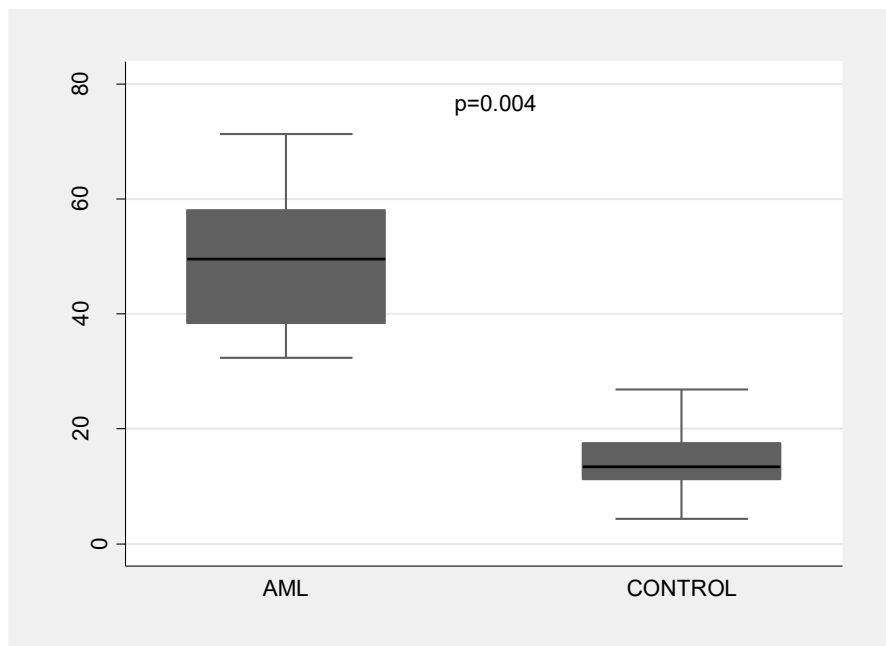
Disease		ΟΛΛ				ΟΜΛ			
		Π.Α. PIGF	p-value	Μ.Ο. PIGF	p-value	Π.Α. PIGF	p-value	Μ.Ο. PIGF	p-value
Φύλο	Άρρεν	32.68 (11.89-46.12) (n=24)	0.053	41.39 (24.35-58.66) (n=21)	0.053	58.04 (57.89-71.31) (n=3)	0.049	73.36 (70.01-122.67) (n=3)	0.513
	Θήλυ	43.11 (23.07-64.60) (n=26)		52.89 (38.83-79.91) (n=25)		38.29 (32.41-41.21) (n=3)		59.45 (54.42-387.91) (n=3)	
Ηλικία	<6 ετών	31.84 (12.65-52.06) (n=30)	0.322	40.91 (25.25-62.62) (n=29)	0.067	57.89 (n=1)	0.770	122.67 (n=1)	0.380
	>6 ετών	36.09 (20.37-53.99) (n=20)		63.58 (41.39-74.90) (n=17)		41.21 (38.29-58.04) (n=5)		70.01 (59.45-73.36) (n=5)	
WBC	<20000/μl	34.19 (16.69-46.12) (n=30)	0.759	42.78 (29.67-70.86) (n=29)	0.794	38.29 (32.41-41.21) (n=3)	0.049	59.45 (54.42-387.91) (n=3)	0.513
	>20000/μl	40.74 (11.69-60.98) (n=20)		49.57 (35.53-65.98) (n=17)		58.04 (57.89-71.31) (n=3)		73.36 (70.01-122.67) (n=3)	
LDH	<1000 IU/l	36.18 (16.26-50.18) (n=20)	0.956	49.03 (29.67-70.86) (n=21)	0.418	39.75 (35.35-56.26) (n=4)	0.355	66.40 (56.94-230.63) (n=4)	0.643
	>1000 IU/l	33.75 (13.79-54.36) (n=26)		52.89 (35.53-73.21) (n=23)		57.96 (57.89-58.04) (n=2)		96.34 (70.01-122.67) (n=2)	
MRD	Αρνητική	32.82 (21.36) (n=38)	0.008	45.91 (26.80-67.64) (n=36)	0.231	57.89 (n=1)	0.991	122.67 (n=1)	0.480
	Θετική	57.32 (40.06) (n=12)		64.30 (38.79-74.90) (n=10)		50.01 (17.94) (n=4)		71.69 (62.22-230.63) (n=4)	

8.2.2. Σύγκριση της συγκέντρωσης του PIGF κατά την διάγνωση στο περιφερικό αίμα ασθενών με λευχαιμία σε σχέση με τους υγιείς μάρτυρες.

Στο σύνολο των ασθενών με οξεία λευχαιμία, η συγκέντρωση του PIGF ήταν σημαντικά υψηλότερη στο περιφερικό αίμα των ασθενών σε σχέση με την αντίστοιχη συγκέντρωση στο περιφερικό αίμα των υγιών μαρτύρων [34.64 (16.26-55.88) vs 13.42 (11.17-17.48), **p=0.002**]. Το ίδιο εύρημα υπήρχε, τόσο στους ασθενείς με ΟΛΛ [34.42 (13.80-52.06) vs 13.42 (11.17-17.48), **p=0.006**], όσο και στους ασθενείς με ΟΜΛ [49.55 (38.29-58.04) vs 13.42 (11.17-17.48), **p=0.004**] (Γραφήματα 5 και 6).



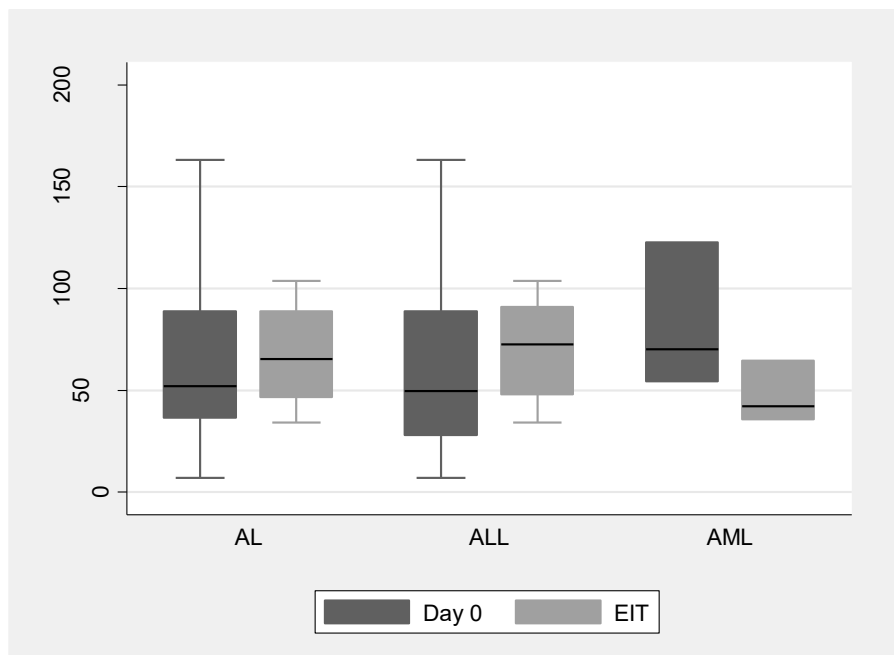
Γράφημα 5. Η συγκέντρωση του PIGF στο περιφερικό αίμα των ασθενών με ΟΛΛ (ALL: Acute Lymphoblastic Leukemia) (n=50) σε σχέση με την αντίστοιχη συγκέντρωση στους υγιείς μάρτυρες (control) (n=21).



Γράφημα 6. Η συγκέντρωση του PIGF στο περιφερικό αίμα των ασθενών με ΟΜΛ (AML: Acute Myeloid Leukemia) (n=6) σε σχέση με την αντίστοιχη συγκέντρωση στους υγιείς μάρτυρες (control) (n=21).

8.2.3. Σύγκριση της συγκέντρωσης του PIGF στον μυελό των οστών των ασθενών με λευχαιμία κατά την διάγνωση σε σχέση με την συγκέντρωση μετά την ολοκλήρωση της θεραπείας εφόδου

Δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές ανάμεσα στην συγκέντρωση του PIGF στον μυελό των οστών κατά την διάγνωση και την αντίστοιχη συγκέντρωση στο τέλος της θεραπείας εφόδου για το σύνολο των ασθενών με οξεία λευχαιμία [52.01 (36.60-88.78) vs 65.25 (46.52-88.83), $p=0.206$]. Δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές ανάμεσα στην συγκέντρωση του PIGF στον μυελό των οστών κατά την διάγνωση και την αντίστοιχη συγκέντρωση στο τέλος της θεραπείας εφόδου στους ασθενείς με ΟΛΛ [49.69 (28.11-88.78) vs 72.46 (48.01-90.96), $p=0,066$] ή στους ασθενείς με ΟΜΛ [70.01 (54.42-122.67) vs 42.25 (35.71-64.45), $p=0.109$]. Η διαφορά ανάμεσα στην συγκέντρωση του PIGF στον μυελό των οστών κατά την διάγνωση και κατά το τέλος της θεραπείας εφόδου αποτυπώνεται στο γράφημα 7.



Γράφημα 7. Η συγκέντρωση του PIGF στον μυελό των οστών σε όλους τους ασθενείς με λευχαιμία (AL: All Leukemia) (n=29), στους ασθενείς με ΟΛΛ (ALL: Acute Lymphoblastic Leukemia) (n=26) και σε ασθενείς με ΟΜΛ (AML: Acute Myeloid Leukemia) (n=3) κατά την διάγνωση (Day 0) και κατά το τέλος της θεραπείας εφόδου (EIT: End of Induction Therapy).

8.3. Η μελέτη του sFLT-1.

8.3.1. Σύγκριση της συγκέντρωσης του sFLT-1 με τα δημογραφικά και κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά των ασθενών.

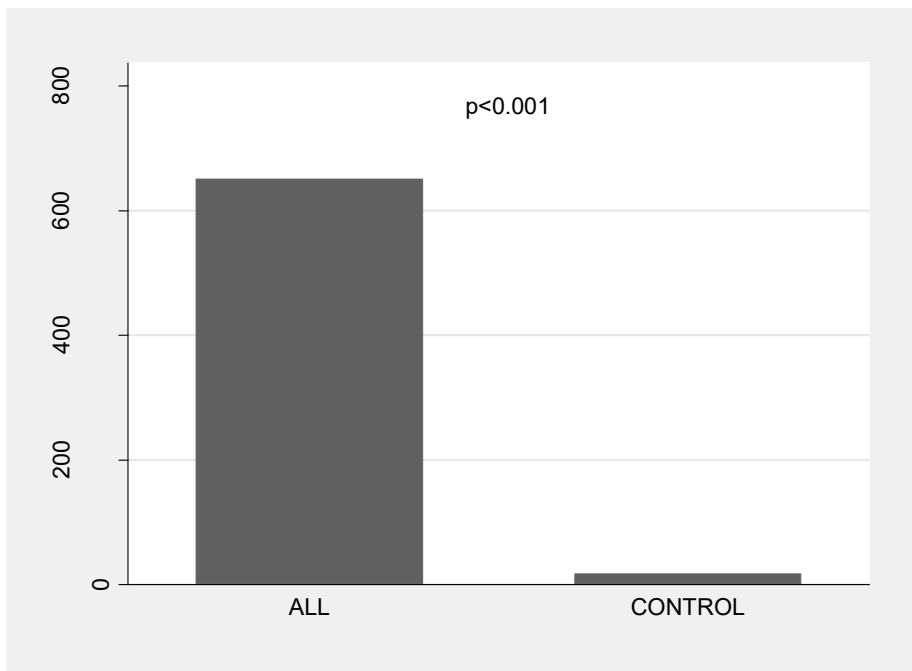
Η ανάλυση των δημογραφικών και κλινικών δεδομένων των ασθενών με ΟΛΛ και ΟΜΛ σε συνάρτηση με τα επίπεδα του sFLT-1 κατά την διάγνωση στο περιφερικό αίμα και στον μυελό των οστών, δεν ανέδειξαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των υποομάδων για την ηλικία, το φύλο, τον αριθμό των λευκών αιμοσφαιρίων (white blood cells -WBC), την γαλακτική δεϋδρογονάση (lactate dehydrogenase - LDH) και το αποτέλεσμα της ελάχιστης υπολειπόμενης νόσου (minimal residual disease – MRD) στο τέλος της θεραπείας εφόδου, όπως φαίνεται στον πίνακα 7.

Πίνακας 7: Η συγκέντρωση του sFLT-1 (σε ng/ml) στο περιφερικό αίμα (Π.Α.) και τον μυελό των οστών (Μ.Ο.) των ασθενών με ΟΛΛ και ΟΜΛ σε σύγκριση με τα δημογραφικά και κλινικά δεδομένα των ασθενών. Η συγκέντρωση του sFLT-1 παρουσιάζεται ως διάμεση τιμή (ενδοτεταρτημοριακό εύρος) στις περιπτώσεις μη κανονικής κατανομής και ως μέση τιμή (σταθερή απόκλιση) στις περιπτώσεις κανονικής κατανομής. n: ο αριθμός των ασθενών.

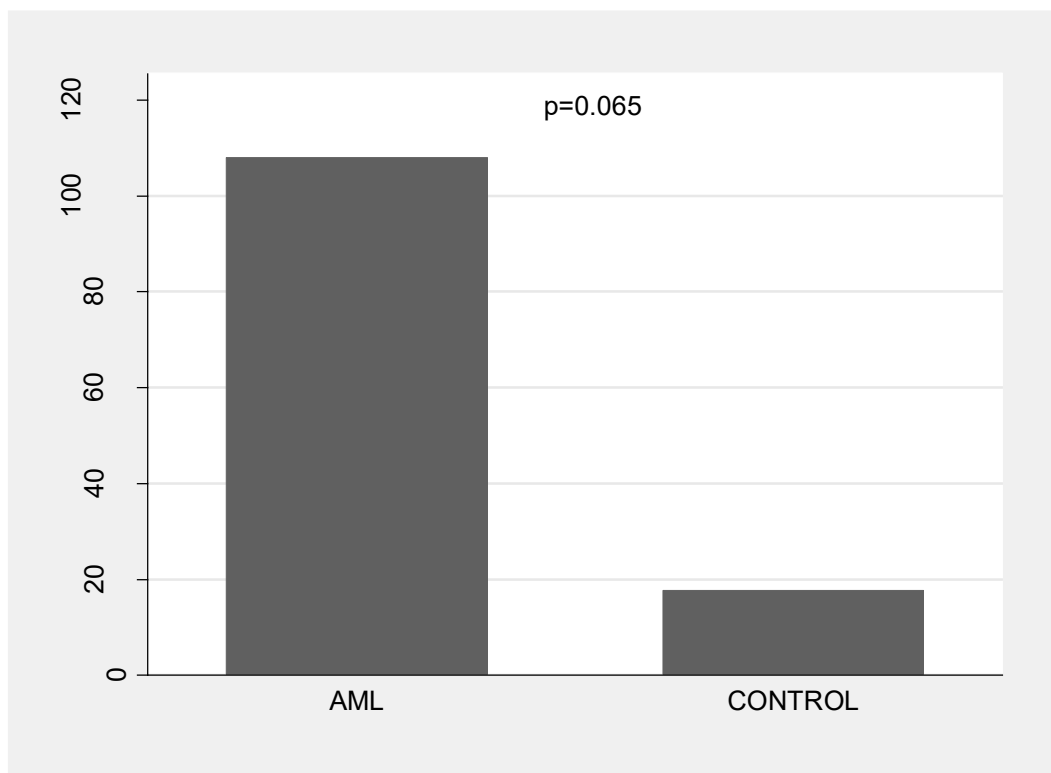
Disease		ΟΛΛ				ΟΜΛ			
		Π.Α. sFLT-1	p-value	Μ.Ο. sFLT-1	p-value	Π.Α. sFLT-1	p-value	Μ.Ο. sFLT-1	p-value
Φύλο	Άρρεν	160.5 (0-1388) (n=24)	0.296	2469 (1791-4898) (n=21)	0.097	13 (0-495) (n=3)	0.487	1424 (n=1)	0.317
	Θήλυ	71 (0-526) (n=25)		1457 (858-3673) (n=23)		0 (0-140) (n=3)		706 (n=1)	
Ηλικία	<6 ετών	0 (0-584) (n=29)	0.078	1791 (911-4242) (n=27)	0.971	0 (n=1)	0.351	- (n=0)	-
	>6 ετών	261 (67-775) (n=20)		2117 (1177-3673) (n=17)		13 (0-140) (n=5)		1065 (706-1424) (n=2)	
WBC	<20000/μl	25 (0-292) (n=29)	0.052	1819 (858-2854) (n=26)	0.152	0 (0-140) (n=3)	0.487	706 (n=1)	0.317
	>20000/μl	534.5 (0-1623) (n=20)		3101 (1643-4898) (n=18)		13 (0-495) (n=3)		1424 (n=1)	
LDH	<1000 IU/l	0 (0-271) (n=20)	0.053	1198 (824-2899) (n=20)	0.062	6.5 (0-76.5) (n=4)	0.623	706 (n=1)	0.317
	>1000 IU/l	281 (0-1361) (n=26)		2499 (1643-4898) (n=22)		248 (0-495) (n=2)		1424 (n=1)	
MRD	Αρνητική	188 (0-748) (n=37)	0.674	2145 (1013-4242) (n=34)	0.355	0 (n=1)	0.277	- (n=0)	-
	Θετική	66.5 (0-877) (n=12)		1695 (858-3740) (n=10)		76.5 (6.5-317.5) (n=4)		1065 (706-1424) (n=2)	

8.3.2. Σύγκριση της συγκέντρωσης του sFLT-1 κατά την διάγνωση στο περιφερικό αίμα ασθενών με λευχαιμία σε σχέση με την συγκέντρωση στους υγιείς μάρτυρες.

Στο σύνολο των ασθενών με οξεία λευχαιμία, η συγκέντρωση του sFLT-1 ήταν σημαντικά υψηλότερη στο περιφερικό αίμα των ασθενών σε σχέση με την αντίστοιχη συγκέντρωση στο περιφερικό αίμα των υγιών μαρτύρων [591.4 (1027.3) vs 17.67 (47.05), $p < 0.001$]. Η συγκέντρωση του sFLT-1 ήταν υψηλότερη τόσο στους ασθενείς με ΟΛΛ [650.6 (1072.6) vs 17.67 (47.05), $p < 0.001$] (Γράφημα 8), όσο και στους ασθενείς με ΟΜΛ [108 (197) vs 17.67 (47.05), $p = 0.065$], χωρίς ωστόσο στους τελευταίους η διαφορά να είναι στατιστικά σημαντική, ενδεχομένως λόγω του μικρού αριθμού των ασθενών με ΟΜΛ στην μελέτη ($n=6$) (Γράφημα 9).



Γράφημα 8. Η συγκέντρωση του sFLT-1 στο περιφερικό αίμα των ασθενών με ΟΛΛ (ALL: Acute Lymphoblastic Leukemia) ($n=49$) σε σχέση με την αντίστοιχη συγκέντρωση στους υγιείς μάρτυρες (control) ($n=21$).

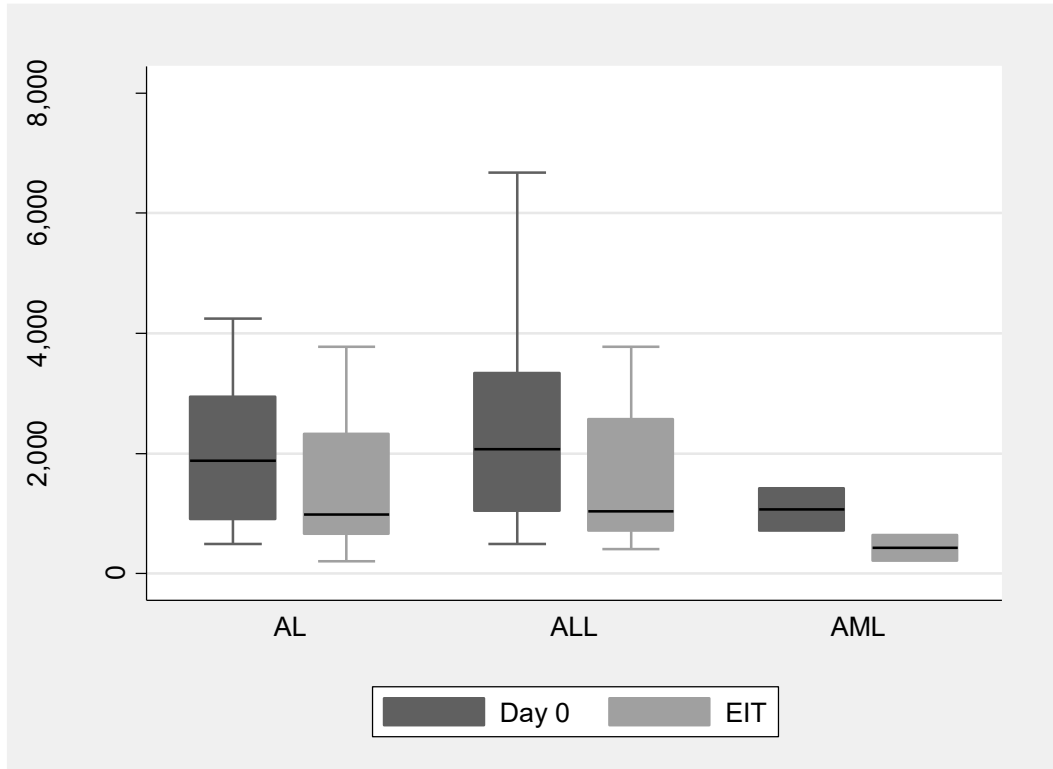


Γράφημα 9. Η συγκέντρωση του sFLT-1 στο περιφερικό αίμα των ασθενών με ΟΜΛ (AML: Acute Myeloid Leukemia) (n=6) σε σχέση με την αντίστοιχη συγκέντρωση στους υγιείς μάρτυρες (control) (n=21).

8.3.3. Σύγκριση της συγκέντρωσης του sFLT-1 στον μυελό των οστών των ασθενών με λευχαιμία κατά την διάγνωση σε σχέση με την συγκέντρωση μετά την ολοκλήρωση της θεραπείας εφόδου.

Δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές ανάμεσα στην συγκέντρωση του sFLT-1 στον μυελό των οστών κατά την διάγνωση και την αντίστοιχη συγκέντρωση στο τέλος της θεραπείας εφόδου για το σύνολο των ασθενών με οξεία λευχαιμία [1876 (896-2944) vs 986 (659-2331), p=0.107]. Δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα στην συγκέντρωση του sFLT-1 στον μυελό των οστών κατά την διάγνωση και την αντίστοιχη συγκέντρωση στο τέλος της θεραπείας εφόδου στους ασθενείς με ΟΛΛ [2066 (1036-3342) vs 1031 (701-2572), p=0.153] ή στους ασθενείς με ΟΜΛ [1065 (706-1424) vs 424 (206-642), p=0.180]. Η

διαφορά ανάμεσα στην συγκέντρωση του sFLT-1 στον μυελό των οστών κατά την διάγνωση και κατά το τέλος της θεραπείας εφόδου αποτυπώνεται στο γράφημα 10.



Γράφημα 10. Η συγκέντρωση του sFLT-1 στον μυελό των οστών σε όλους τους ασθενείς με λευχαιμία (AL: All Leukemia) (n=26), στους ασθενείς με ΟΛΛ (ALL: Acute Lymphoblastic Leukemia) (n=24) και σε ασθενείς με ΟΜΛ (AML: Acute Myeloid Leukemia) (n=2) κατά την διάγνωση (Day 0) και κατά το τέλος της θεραπείας εφόδου (EIT: End of Induction Therapy).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 9. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

9.1. Χαμηλά επίπεδα IL-23 στο περιφερικό αίμα και τον μυελό των οστών σε παιδιά με οξεία λευχαιμία κατά την διάγνωση, τα οποία αυξάνονται με την εξάλειψη του λευχαιμικού φορτίου, στο τέλος της θεραπείας εφόδου.

Προκειμένου να προσδιορίσουμε τον ρόλο της Th17-ανοσορρυθμιστικής κυτταροκίνης IL-23 σε παιδιά με οξεία λευχαιμία, συγκρίναμε την έκφραση της IL-23 στα παιδιά με οξεία λευχαιμία σε σχέση με τους υγιείς μάρτυρες, καθώς επίσης και την έκφραση της IL-23 στο περιφερικό αίμα και στον μυελό των οστών ασθενών κατά την διάγνωση σε σχέση με την έκφρασή της IL-23 μετά την ολοκλήρωση της θεραπείας εφόδου, όπου το λευχαιμικό φορτίο έχει ελαχιστοποιηθεί ή είναι μηδενικό, όπως προσδιορίζεται με την μέτρηση με κυτταρομετρία ροής. Τα αποτελέσματα μας αναδεικνύουν σημαντικά χαμηλότερη έκφραση της IL-23 στο περιφερικό αίμα και τον μυελό των οστών των ασθενών κατά την διάγνωση, συγκριτικά με την έκφραση της IL-23 μετά την ολοκλήρωση της θεραπείας εφόδου. Η μελέτη μας είναι η πρώτη η οποία ανιχνεύει μεταβολές στα επίπεδα της IL-23 σε παιδιά με οξεία λευχαιμία μετά την χορήγηση χημειοθεραπείας και τα συγκρίνει με το λευχαιμικό φορτίο κατά την διάγνωση αλλά και με το λευχαιμικό φορτίο στο τέλος της θεραπείας εφόδου.

Στην μελέτη μας, παρατηρήθηκαν χαμηλότερα επίπεδα IL-23 στο περιφερικό αίμα των ασθενών με οξεία λευχαιμία κατά την διάγνωση, σε σχέση με τους υγιείς μάρτυρες, χωρίς ωστόσο η διαφορά να είναι στατιστικά σημαντική. Δεν παρατηρήθηκαν διαφορές ως προς τα επίπεδα της IL-23 μεταξύ των ασθενών με οξεία λευχαιμία κατά το τέλος της θεραπείας εφόδου και των υγιών μαρτύρων. Τα ευρήματα αυτά παρατηρήθηκαν τόσο στους ασθενείς με ΟΛΛ όσο και στους ασθενείς με ΟΜΛ. Στα παιδιά με ΟΛΛ, παρατηρήθηκε χαμηλότερη συγκέντρωση IL-23 τόσο στο περιφερικό αίμα, όσο και στον μυελό των οστών κατά την διάγνωση σε σχέση με τις αντίστοιχες τιμές κατά το τέλος της θεραπείας εφόδου. Παρόλα αυτά, η διαφορά που παρατηρήθηκε ήταν στατιστικά σημαντική μόνο στο περιφερικό αίμα. Αξίζει εντούτοις να σημειωθεί, ότι και στον μυελό των οστών, η συγκέντρωση της IL-23 στην

διάγνωση ήταν σαφώς χαμηλότερη σε σχέση με την αντίστοιχη συγκέντρωση στο τέλος της θεραπείας εφόδου, και η διαφορά αυτή πλησίαζε το όριο του στατιστικά σημαντικού. Παρόμοια αποτελέσματα παρατηρήθηκαν και στους ασθενείς με ΟΜΛ, στους οποίους η συγκέντρωση της IL-23 στον μυελό των οστών ήταν σημαντικά χαμηλότερη κατά την διάγνωση συγκριτικά με την αντίστοιχη συγκέντρωση στο τέλος της θεραπείας εφόδου.

Ο ρόλος της IL-23 στην λευχαιμία της παιδικής ηλικίας έχει μελετηθεί από την ερευνητική ομάδα της Cocco, παρέχοντας ισχυρές ενδείξεις της αντιλευχαιμικής δράσης της κυτταροκίνης. Η ικανότητα της IL-23 να αναστέλλει την αύξηση των λευχαιμικών κυττάρων στην Β-ΟΛΛ μελετήθηκε τόσο *in vitro*, μέσω θεραπείας των λευχαιμικών κυττάρων της Β-ΟΛΛ με IL-23, όσο και *in vivo*, σε μη παχύσαρκα, διαβητικά ποντίκια με σοβαρή συνδυασμένη ανοσοανεπάρκεια (Nonobese diabetic/severe combined immunodeficiency mice ή NOD/SCID mice), στα οποία ενέθηκε η κυτταρική σειρά 697, η οποία εκφράζει τον υποδοχέα IL-23R. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η χορήγηση IL-23 άμεσα μείωσε την αύξηση των λευχαιμικών κυττάρων μέσω ενεργοποίησης της απόπτωσης και αναστολής του πολλαπλασιασμού των λευχαιμικών κυττάρων [179, 180]. Ο μηχανισμός μέσω του οποίου η IL-23 ασκεί την αντιλευχαιμική της δράση σχετίζεται με την ρύθμιση του microRNA, το οποίο ρυθμίζει την έκφραση διαφόρων γονιδίων και κυτταρικών λειτουργιών, απαραίτητων για την καρκινογένεση, όπως η απόπτωση, ο πολλαπλασιασμός και η διαφοροποίηση των κυττάρων. Σε κύτταρα Β-ΟΛΛ της παιδικής ηλικίας, η IL-23 επάγει την αυξορρύθμιση του miR15a, και ως αποτέλεσμα, την μειορρύθμιση των πρωτεϊνών-στόχων του miR15a, που είναι οι πρωτεΐνες BCL-2 και Cyclin-D1, που διαδραματίζουν κεντρικό ρόλο στην απόπτωση και τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων [180, 201, 257]. Η IL-23 έχει επίσης μελετηθεί σε διάφορους τύπους καρκίνου, και πολυάριθμες έρευνες έχουν αναδείξει ότι η IL-23 ασκεί αντικαρκινική δράση όταν υπερεκφράζεται σε διάφορες καρκινικές κυτταρικές σειρές σε προκλινικές μελέτες με ποντίκια [194-199, 258, 259]. Η αντικαρκινική και αντιμεταστατική δράση της IL-23 είναι παρόμοια με αυτήν της IL-12 και φαίνεται ότι διαμεσολαβείται μέσω των CD8⁺ Τ λεμφοκυττάρων [200]. Η μειορρύθμιση της IL-23 στους ασθενείς με οξεία λευχαιμία σε σχέση με τους υγιείς μάρτυρες είναι ενδεικτική

της συμμετοχής της στην ρύθμιση της αύξησης των λευχαιμικών κυττάρων. Επιπλέον, η αύξηση της συγκέντρωσης της IL-23 κατά το τέλος της θεραπείας εφόδου είναι ενδεικτική της ωφέλιμης δράσης της εναντίον των λευχαιμικών κυττάρων.

Προηγούμενες έρευνες έχουν δημοσιεύσει αντικρουόμενα αποτελέσματα τόσο όσο αφορά την έκφραση της IL-23 σε διάφορους τύπους καρκίνου, όσο και όσο αφορά την βιολογική της δράση στον καρκίνο. Υπάρχει μικρός μόνο αριθμός μελετών που έχουν ερευνήσει την έκφραση της IL-23 στις οξείες λευχαιμίες. Ο El-Maadawy αναφέρει αύξηση της συγκέντρωσης της IL-23 σε παιδιά με ΟΛΛ σε σύγκριση με υγιείς μάρτυρες [260]. Επίσης, σε ενήλικες ασθενείς με Β-ΟΛΛ και ΟΜΛ, έχει παρατηρηθεί αύξηση των κυτταροκινών που σχετίζονται με τα Th17 κύτταρα, συμπεριλαμβανομένης και της IL-23, στο περιφερικό αίμα και τον μυελό των οστών των ασθενών [261, 262]. Η μελέτη μας είναι η πρώτη που ανέδειξε χαμηλότερα επίπεδα IL-23 κατά την διάγνωση οξείας λευχαιμίας της παιδικής ηλικίας.

Οι περισσότερες μελέτες στην βιβλιογραφία ερευνούν την έκφραση της IL-23 στον καρκίνο σε συνδυασμό με τα Th17 λεμφοκύτταρα. Η IL-23 λειτουργεί ως διαμεσολαβητής των Th17 ανοσολογικών απαντήσεων, αφού διαδραματίζει κεντρικό ρόλο στον πολλαπλασιασμό των Th17 λεμφοκυττάρων και στην διατήρηση του Th17 φαινοτύπου [178]. Είναι επιβεβαιωμένο ότι οι Th1 ανοσολογικές απαντήσεις προωθούν την κυτταρική ανοσία, ενώ η Th2 απάντηση ασκεί ανοσοκατασταλτική δράση. Εντούτοις, ο ρόλος των Th17 κυττάρων στην προώθηση ή την προστασία από την αύξηση των καρκινικών κυττάρων δεν έχει ακόμη διευκρινιστεί.

Τα ευρήματα της μελέτης μας είναι σε συμφωνία με τα ευρήματα του Karmali, στην έρευνα του οποίου, οι ασθενείς με ΧΛΛ είχαν χαμηλότερα επίπεδα των κυτταροκινών IL-23 και IL-17 στον ορό του περιφερικού αίματος σε σχέση με τους υγιείς μάρτυρες [263]. Οι ασθενείς με ΧΛΛ είχαν χαμηλότερη έκφραση κυτταροκινών σχετιζόμενων με τα Th1 και Th17 κύτταρα, και αυξημένη έκφραση κυτταροκινών σχετιζόμενων με τα Th2 κύτταρα. Η μειορρύθμιση των Th17 ανοσολογικών απαντήσεων έχει παρατηρηθεί σε διάφορες μελέτες με ασθενείς με ΧΛΛ, και η μειωμένη έκφραση των Th17 κυττάρων συσχετίστηκε με εξέλιξη της νόσου. Τα ευρήματα αυτά αναδεικνύουν τον προστατευτικό ρόλο των Th17 κυττάρων σε

ασθενείς με ΧΛΛ [264, 265]. Ο Young δημοσίευσε ότι σε μοντέλα με ποντίκια, η εξέλιξη των προκαρκινικών βλαβών του στοματικού βλεννογόνου και η μετάπτωσή τους σε καρκίνο συνοδεύτηκε από μείωση της Th-17-ρυθμιστικής IL-23 και από αλλαγή στην παραγωγή κυτταροκινών, η οποία ευνόησε την μείωση του Th17 και την ενίσχυση του ανοσοκατασταλτικού Treg φαινοτύπου [266]. Η θεραπεία με IL-23 διατήρησε τον Th17 φαινότυπο και αύξησε την παραγωγή άλλων διαμεσολαβητών της φλεγμονής από τους τοπικούς λεμφαδένες και τον σπλήνα επιβραδύνοντας την εξέλιξη των προκαρκινικών βλαβών σε καρκίνο. Διάφορες έρευνες υποστηρίζουν ότι τα Th17 κύτταρα, όταν μεταφέρονται σε ποντίκια, μπορούν να οδηγήσουν σε ύφεση του καρκίνου σε μεγαλύτερο βαθμό από ότι τα Th1 κύτταρα [168-170, 267]. Συγκεντρωτικά, τα ευρήματα αυτά αναδεικνύουν τον προστατευτικό ρόλο των Th17 κυττάρων έναντι του καρκίνου, και ως εκ τούτου και της IL-23, ως μια κυτταροκίνη που επάγει την διαφοροποίηση των CD4+ κυττάρων σε Th17 κύτταρα.

Στην μελέτη μας παρατηρήσαμε ότι τα αρχικά χαμηλά επίπεδα της IL-23 κατά την διάγνωση σε παιδιά με οξεία λευχαιμία ομαλοποιήθηκαν όταν επήλθε η ύφεση της νόσου. Το φαινόμενο αυτό ενδεχομένως ερμηνεύεται από το ότι τα χαμηλά επίπεδα της IL-23 κατά την διάγνωση αποδίδονται σε αλλαγές στην έκφραση κυτταροκινών που ευνοούν τις ανοσοκατασταλτικές T ανοσολογικές απαντήσεις και αναστέλλουν τις προστατευτικές. Στην λευχαιμία έχει διαπιστωθεί ότι υπάρχει τροποποιημένο μικροπεριβάλλον στον μυελό των οστών, στο περιφερικό αίμα και στους λεμφικούς ιστούς, ως αποτέλεσμα της συγκέντρωσης ειδικών υποτύπων T λεμφοκυττάρων και στρωματικών κυττάρων με τροποποιημένη έκφραση κυτταροκινών [263, 268, 269]. Η απορρύθμιση των T λεμφοκυττάρων είναι επίσης κοινό χαρακτηριστικό των λευχαιμιών και περιλαμβάνει μειωμένη κυτταροτοξική ικανότητα έναντι των καρκινικών κυττάρων, τροποποιημένη έκφραση διαφόρων συν-διεγερτικών μορίων, αλλοιωμένη ισορροπία των υποτύπων των T λεμφοκυττάρων, μειορρύθμιση των υποδοχέων στην επιφάνεια των T λεμφοκυττάρων καθώς επίσης και μειωμένη έκκριση κυτταροκινών [268, 270-272]. Σε ασθενείς με ΧΛΛ έχει παρατηρηθεί αυξορρύθμιση των ανοσοκατασταλτικών Th2 και Treg ανοσολογικών απαντήσεων, με ταυτόχρονη μειορρύθμιση των προστατευτικών ανοσολογικών απαντήσεων Th1 και Th17 [263, 268, 269]. Το τροποποιημένο μικροπεριβάλλον των λευχαιμικών κυττάρων, σε

συνδυασμό με τις διαταραχές στην λειτουργία των T λεμφοκυττάρων ευνοεί την διαφυγή από το ανοσοποιητικό σύστημα και την εξάπλωση του λευχαιμικού κλώνου [269].

Αξίζει να επισημανθεί ότι η IL-23 ασκεί αντικαρκινική δράση ανεξαρτήτως των Th17 ανοσολογικών απαντήσεων. Η IL-23 δρα σε διάφορα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος στο μικροπεριβάλλον του καρκινικού κυττάρου και επάγει την κυτταροτοξική τους δράση και την παραγωγή φλεγμονωδών κυτταροκινών [178, 273, 274]. Επιπλέον, η IL-23 αναστέλλει την διαφοροποίηση των CD4+ κυττάρων στα Treg λεμφοκύτταρα, και ως εκ τούτου αναστέλλει την ανοσοκατασταλτική Treg κυτταρική απάντηση [178, 202]. Επιπρόσθετα, η παραγωγή της IL-23 από τα μακροφάγα στο μικροπεριβάλλον του καρκινικού κυττάρου επάγει την μετατροπή των Th17 κυττάρων, σε έναν ξεχωριστό τύπο λεμφοκυττάρων, που ονομάζονται μη-κλασικά Th1 κύτταρα (non-classical Th1 cells) ή Th17 κύτταρα που προσομοιάζουν στα Th1 (Th1-like Th17 cells) τα οποία ασκούν δράση εναντίον των καρκινικών κυττάρων μέσω της έκκρισης IFN- γ [275, 276]. Λαμβάνοντας υπόψιν τον πιθανό αντιλευχαιμικό ρόλο της IL-23, τα χαμηλά επίπεδα IL-23 τα οποία παρατηρήθηκαν στην μελέτη μας κατά την διάγνωση, μπορούν να εξηγηθούν ως τμήμα των μηχανισμών που χρησιμοποιούν τα λευχαιμικά κύτταρα προκειμένου να ρυθμίσουν το μικροπεριβάλλον τους και να διαφύγουν των ανοσολογικών απαντήσεων.

Στην μελέτη μας, τα αρχικά χαμηλά επίπεδα της IL-23 κατά την διάγνωση επιστρέφουν στα φυσιολογικά πρότυπα έκφρασης μετά την χορήγηση της θεραπείας εφόδου, τόσο στα παιδιά με ΟΛΛ όσο και στα παιδιά με ΟΜΛ. Από όσο γνωρίζουμε, αυτή είναι η πρώτη μελέτη που διερευνά πώς η χημειοθεραπεία επηρεάζει τη συγκέντρωση IL-23 σε παιδιά με οξεία λευχαιμία. Τα αποτελέσματα της μελέτης μας στηρίζουν την υπόθεση ότι το υψηλό λευχαιμικό φορτίο κατά την διάγνωση της λευχαιμίας σχετίζεται με μειωμένη έκφραση της IL-23, τα επίπεδα της οποίας αποκαθίστανται κατά την μείωση του λευχαιμικού φορτίου. Σε συμφωνία με τα ευρήματα της μελέτης μας, ο Wang δημοσίευσε ότι οι ασθενείς με καρκίνο του παγκρέατος είχαν χαμηλότερα επίπεδα IL-23, καθώς επίσης και χαμηλότερο ποσοστό

Th17 κυττάρων, με υψηλότερο ποσοστό Treg κυττάρων, σε σύγκριση με τους υγιείς μάρτυρες [277]. Ακολουθώντας την εξέλιξη της νόσου, παρατηρήθηκε ότι οι ασθενείς με προχωρημένο στάδιο νόσου είχαν ακόμη χαμηλότερα επίπεδα IL-23, καθώς επίσης και χειρότερη αναλογία των Th17/Treg λεμφοκυττάρων, με μικρότερο αριθμό Th17 και υψηλότερο αριθμό Treg λεμφοκυττάρων. Οι ασθενείς με υψηλότερα επίπεδα IL-23 είχαν πιο μακροχρόνια επιβίωση [278, 279]. Αξίζει να σημειωθεί, ότι στο υλικό μας υπάρχει ένα παιδί με ΧΜΛ με θετικό χρωμόσωμα Philadelphia, το οποίο παρουσίασε βλαστική κρίση της ΧΜΛ με ταυτόχρονη εκτροπή σε ΟΛΛ [280]. Στο περιστατικό αυτό, η συγκέντρωση της IL-23 μετρήθηκε τόσο κατά την διάγνωση της ΧΜΛ, κατά την χρόνια φάση της νόσου, όσο και κατά την βλαστική κρίση, και αυτό το οποίο παρατηρήθηκε είναι ότι ενώ η συγκέντρωση της IL-23 κατά την διάγνωση της ΧΜΛ, στην χρόνια φάση της νόσου, ήταν 40.015pg/ml, κατά την βλαστική κρίση με ταυτόχρονη εκτροπή σε ΟΛΛ μειώθηκε σε 19.973pg/ml. Τα ευρήματά μας στο περιστατικό αυτό ενισχύουν περαιτέρω την αρχική μας υπόθεση, δηλαδή ότι το υψηλό λευχαιμικό φορτίο σχετίζεται με χαμηλότερα επίπεδα της IL-23.

Σε αντιστοιχία με τα ευρήματα της μελέτης μας, ο Blogowski παρατήρησε χαμηλότερη συγκέντρωση IL-23 σε ασθενείς με καρκίνο του παγκρέατος σε σχέση με τους υγιείς μάρτυρες [279]. Στην μελέτη του Blogowski, παρουσιάζει ενδιαφέρον ότι η συγκέντρωση της IL-23 συσχετίστηκε με τον αριθμό των κυκλοφορούντων προερχόμενων από τον μυελό των οστών μεσεγχυματικών βλαστικών κυττάρων (BMMSCs, Bone Marrow-derived Mesenchymal Stem Cells), τα οποία διαδραματίζουν έναν σημαντικό ρόλο στην υποστήριξη της αιμοποίησης και στην ρύθμιση των ανοσολογικών απαντήσεων, μέσω της έκκρισης διαφόρων κυτταροκινών [281-283]. Σε διάφορες αιματολογικές διαταραχές, τα BMMSCs παρουσιάζουν τροποποιημένη έκφραση κυτταροκινών καθώς επίσης και διαταραγμένη ανοσορυθμιστική λειτουργία [284]. Έχει παρατηρηθεί ότι τα BMMSCs ασθενών με ΟΜΛ εμφανίζουν ανοσοκατασταλτική και αντιφλεγμονώδη δράση και χαρακτηρίζονται από μειωμένη έκκριση κυτταροκινών που προωθούν την διαδικασία της φλεγμονής, συνεισφέροντας με αυτόν τον τρόπο στην εξέλιξη της νόσου [285]. Επιπλέον, έχει παρατηρηθεί ότι στην ΟΛΛ της παιδικής ηλικίας, τα BMMSCs του μυελού των οστών συνδράμουν στην ανάπτυξη αντοχής στην θεραπεία με

ασπαραγινάση [286]. Είναι πιθανόν τα ίδια τα λευχαιμικά κύτταρα να επαναπρογραμματίζουν τα BMMSCs στον μυελό των οστών, ώστε τα τελευταία να τους προσφέρουν ένα ασφαλές καταφύγιο και να προωθούν την αύξηση και τον κλωνικό πολλαπλασιασμό τους [287]. Ο ρόλος που διαδραματίζει η IL-23 στην αλληλεπίδραση μεταξύ των λευχαιμικών κυττάρων και των BMMSCs δεν έχει ακόμη διευκρινιστεί. Η μειορρύθμιση της IL-23 κατά την διάγνωση της λευχαιμίας που παρατηρήθηκε στην μελέτη μας μπορεί να προκύπτει ως αποτέλεσμα της αλληλεπίδρασης μεταξύ των κακοηθών λευχαιμικών κυττάρων και των φυσιολογικών κυττάρων στο μικροπεριβάλλον του μυελού των οστών, ως μηχανισμός που χρησιμοποιούν τα λευχαιμικά κύτταρα για να προωθήσουν τον πολλαπλασιασμό τους.

Σε συνέπεια με τις προαναφερθείσες μελέτες, ο Wolf δημοσίευσε ότι η υψηλότερη έκφραση του IL-23 p19 mRNA σε καρκινικούς ιστούς ασθενών με καρκίνο ωοθηκών συσχετίστηκε με υψηλότερο ποσοστό συνολικής επιβίωσης [288]. Ωστόσο, αξίζει να σημειωθεί ότι από την βιβλιογραφία φαίνεται ότι η έκφραση της IL-23 και των Th17 κυττάρων χαρακτηρίζονται από σημαντική ασυνέπεια ως προς τα αποτελέσματα, τα οποία σε πολλές περιπτώσεις μοιάζουν αντιφατικά. Στην μελέτη της Sherry, η συγκέντρωση της IL-23 καθώς και ο αριθμός των Th17 λεμφοκυττάρων στο περιφερικό αίμα των ασθενών με ΧΛΛ ήταν σημαντικά αυξημένα σε σχέση με τους υγιείς μάρτυρες. Παρατηρήθηκε επιπλέον μεγάλη ετερογένεια όσο αφορά την συγκέντρωση της IL-23 σε διαφορετικούς ασθενείς [271]. Έχει παρατηρηθεί ότι τα Th17 λεμφοκύτταρα είναι αυξημένα σε ασθενείς με ΧΛΛ οι οποίοι παρουσιάζουν καλούς προγνωστικούς δείκτες και ότι ο αυξημένος αριθμός των Th17 λεμφοκυττάρων σχετίζεται με μακρόχρονη επιβίωση [289]. Οι παρατηρήσεις αυτές υποστηρίζουν την υπόθεση ότι τα Th17 κύτταρα, και συνεπώς και η IL-23, ως κυτταροκίνη η οποία διατηρεί τον Th17 φαινότυπο, σχετίζεται με ευνοϊκότερο κλινικό αποτέλεσμα.

Εντούτοις, ένας αριθμός ερευνών σε διάφορους τύπους καρκίνου υποστηρίζει ότι η δράση της IL-23 προωθεί την αύξηση των καρκινικών κυττάρων. Η εργασία του Langowski παρουσίασε τις πρώτες ενδείξεις ότι η IL-23 προωθεί τα καρκινικά κύτταρα, δείχνοντας ότι σε ποντίκια τα οποία ήταν γενετικά τροποποιημένα ώστε να μην εκφράζουν την IL-23, παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση της διήθησης των όγκων

από CD8+ T λεμφοκύτταρα τα οποία ασκούν προστατευτική δράση έναντι των καρκινικών κυττάρων [203]. Φαίνεται ότι η IL-23 επάγει διάφορες φλεγμονώδεις απαντήσεις, όπως είναι η αυξορρύθμιση της έκφρασης των μεταλλοπρωτεϊνών της εξωκυττάριας ουσίας (MMPs, Matrix Metalloproteases), η αγγειογένεση και η διήθηση από μακροφάγα, ενώ μειώνει την διήθηση από CD8+ T λεμφοκύτταρα και ως εκ τούτου, μειώνει την αντικαρκινική δράση του ανοσοποιητικού συστήματος [200, 203, 290]. Έχει προταθεί πως ενώ η ενδογενής έκφραση της IL-23 προωθεί την αύξηση των καρκινικών κυττάρων, η εξωγενής υπερέκφραση ασκεί αντικαρκινική δράση [180].

Στην μελέτη μας, πιθανώς λόγω του περιορισμένου αριθμού των ασθενών, τα επίπεδα της IL-23 κατά την διάγνωση δεν συσχετίστηκαν με το αποτέλεσμα της ελάχιστης υπολειπόμενης νόσου μετά την ολοκλήρωση της θεραπείας εφόδου. Συνεπώς, δεν μπορεί να εξαχθεί ασφαλές συμπέρασμα για την προγνωστική αξία της συγκέντρωσης της IL-23 κατά την διάγνωση όσο αφορά την αποτελεσματικότητα της θεραπείας και την ευαισθησία των λευχαιμικών κυττάρων στην θεραπεία. Προκειμένου να διερευνηθεί η πιθανή προγνωστική αξία της συγκέντρωσης της IL-23 στην λευχαιμία της παιδικής ηλικίας, θα πρέπει να μελετηθεί σε μεγαλύτερο αριθμό ασθενών.

Συνοψίζοντας, στην μελέτη μας παρατηρήσαμε μειωμένα επίπεδα IL-23 στο περιφερικό αίμα και στον μυελό των οστών σε παιδιά με οξεία λευχαιμία κατά την διάγνωση. Τα χαμηλά επίπεδα της IL-23 επανήλθαν στα φυσιολογικά επίπεδα μετά την ολοκλήρωση της θεραπείας εφόδου και την μείωση του λευχαιμικού φορτίου. Λαμβάνοντας υπόψιν τις αντιλευχαιμικές ιδιότητες της IL-23, όπως αυτές προκύπτουν από πολλές προαναφερθείσες μελέτες, η αλλαγή των επιπέδων της IL-23 που παρατηρήσαμε κατά την διάγνωση, ενδεχομένως να εμπλέκεται στην αύξηση των λευχαιμικών κυττάρων. Η υπόθεση αυτή ενισχύεται επιπλέον από την μείωση της συγκέντρωσης της IL-23 που παρατηρήθηκε κατά την βλαστική κρίση σε ένα παιδί με ΧΜΛ σε σχέση με τα υψηλότερα επίπεδα στην χρόνια φάση της νόσου. Οι μηχανισμοί μέσω των οποίων η έκφραση της IL-23 μειορρυθμίζεται στην λευχαιμία και σε άλλους τύπους νεοπλασιών δεν έχουν ακόμη διευκρινιστεί, και χρειάζονται περαιτέρω έρευνες για τον σκοπό αυτό. Οι διαλυτοί παράγοντες οι οποίοι εκκρίνονται από τα

νεοπλασματικά κύτταρα και οι οποίοι αναστέλλουν τις απαντήσεις του ανοσοποιητικού συστήματος καθώς επίσης και η γενετική ή επιγενετική ρύθμιση της λειτουργίας των κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος είναι πιθανοί μηχανισμοί με τους οποίους τα νεοπλασματικά κύτταρα μπορεί να ρυθμίζουν την έκφραση της IL-23. Ο ακριβέστερος χαρακτηρισμός των κυττάρων του μικροπεριβάλλοντος του μυελού των οστών στην λευχαιμία, καθώς επίσης και η ταυτοποίηση των κυττάρων που εκκρίνουν την IL-23 θα έριχνε φως στον ρόλο της IL-23 στις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των λευχαιμικών κυττάρων και του μικροπεριβάλλοντος του μυελού των οστών. Δεδομένου ότι οι υποδοχείς των σημείων ελέγχου των ανοσολογικών απαντήσεων (immune checkpoint receptors) αποτελούν βασικό μηχανισμό της επαγόμενης από τα καρκινικά κύτταρα καταστολής των ανοσολογικών απαντήσεων, ο ρόλος τους στην ρύθμιση της έκφρασης της IL-23 παρουσιάζει μεγάλο ενδιαφέρον για μελλοντικές έρευνες. Οι υποδοχείς των σημείων ελέγχου των ανοσολογικών απαντήσεων, όπως ο PD-1, ο οποίος εκφράζεται στα μονοκύτταρα και στα μακροφάγα, έχει την δυνατότητα να ρυθμίζει την έκφραση της IL-23 σε ιογενείς λοιμώξεις, όπως η ηπατίτιδα. Επιπλέον, η αντί-PD-1 αγωγή αυξάνει σημαντικά την έκφραση της IL-23 [194, 291].

Η κατανόηση του τρόπου με τον οποίο η IL-23 συνεισφέρει στον έλεγχο διαφόρων τύπου καρκίνου, συμπεριλαμβανομένης και της οξείας λευχαιμίας της παιδικής ηλικίας, μπορεί να οδηγήσει σε επαναξιολόγηση της χρήσης του μορίου αυτού για θεραπευτικούς σκοπούς. Η IL-12, η οποία είναι η πρότυπη κυτταροκίνη αυτής της οικογένειας κυτταροκινών, αποτελεί σημαντικό υποψήφιο μόριο για ανάπτυξη νέας μορφής στοχοθεραπείας. Τόσο σε προκλινικές, όσο και σε κλινικές δοκιμές, σε διαφόρους τύπους όγκων, η χορήγηση IL-12 άσκησε σημαντική αντικαρκινική και αντινεοπλασματική δράση [178]. Σε μελέτη η οποία διενεργήθηκε σε ασθενείς με λέμφωμα non-Hodgkin χαμηλής κακοήθειας, η συνδυασμένη χορήγηση IL-12 μαζί με ριτουξιμάμπη οδήγησε σε καλύτερα αποτελέσματα από ότι η θεραπεία μόνο με ριτουξιμάμπη [292]. Παρόλα αυτά, το θεραπευτικό αποτέλεσμα της IL-12 περιορίζεται από την συστηματική τοξικότητα που προκαλεί [200]. Η θεραπευτική χρήση της IL-23 σε ασθενείς με καρκίνο δεν έχει ακόμη διερευνηθεί. Εντούτοις, όπως προαναφέρθηκε, σε προκλινικές μελέτες, η χορήγηση IL-23 ανέδειξε άμεση

αντινεοπλασματική δράση σε διαφόρους τύπους κακοηθειών, συμπεριλαμβανομένης και της Β-ΟΛΛ της παιδικής ηλικίας, και μάλιστα, παρουσιάζοντας μικρότερη τοξικότητα σε σχέση με την IL-12 [180]. Τα δεδομένα αυτά υποδηλώνουν ότι η IL-23 θα μπορούσε να αποτελέσει πολλά υποσχόμενη θεραπεία και θα μπορούσε να εφαρμοστεί σε μελέτη φάσης 1, σε ασθενείς με οξεία λευχαιμία.

9.2. Υψηλότερα επίπεδα PIGF και sFLT-1 σε παιδιά με οξεία λευχαιμία σε σχέση με τους υγιείς μάρτυρες.

Προκειμένου να προσδιορίσουμε τον ρόλο του αγγειογενετικού παράγοντα PIGF, καθώς και του διαλυτού υποδοχέα του PIGF, sFLT-1, στην οξεία λευχαιμία της παιδικής ηλικίας, συγκρίναμε την έκφραση του PIGF και του sFLT-1 στο περιφερικό αίμα των ασθενών με οξεία λευχαιμία κατά την διάγνωση με τις αντίστοιχες συγκεντρώσεις στο περιφερικό αίμα υγιών μαρτύρων. Επιπλέον, συγκρίναμε τις συγκεντρώσεις των PIGF και sFLT-1 στον μυελό των οστών των ασθενών με οξεία λευχαιμία κατά την διάγνωση με τις αντίστοιχες συγκεντρώσεις κατά την ολοκλήρωση της θεραπείας εφόδου. Η μελέτη μας είναι η πρώτη που διερευνά τον ρόλο του PIGF καθώς και του διαλυτού υποδοχέα του, sFLT-1, στην οξεία λευχαιμία της παιδικής ηλικίας.

Όσο αφορά την μελέτη του PIGF, παρατηρήσαμε σημαντικά υψηλότερα επίπεδα του PIGF στο περιφερικό αίμα των ασθενών με οξεία λευχαιμία κατά την διάγνωση σε σχέση με τους υγιείς μάρτυρες. Η διαφορά αυτή ήταν στατιστικά σημαντική τόσο για τους ασθενείς με ΟΛΛ όσο και για τους ασθενείς με ΟΜΛ. Η σύγκριση των επιπέδων του PIGF με τα δημογραφικά και κλινικά χαρακτηριστικά των ασθενών, ανέδειξε ότι η συγκέντρωση του PIGF στο περιφερικό αίμα των ασθενών με ΟΜΛ ήταν σημαντικά υψηλότερη στους ασθενείς με άρρεν φύλο σε σχέση με τα θήλεα. Ακόμη, η συγκέντρωση του PIGF στο περιφερικό αίμα των ασθενών με ΟΜΛ ήταν σημαντικά υψηλότερη σε όσους ασθενείς είχαν κατά την διάγνωση αριθμό λευκών αιμοσφαιρίων μεγαλύτερο από 20.000/μl, συγκριτικά με τους ασθενείς με αριθμό λευκών αιμοσφαιρίων μικρότερο από 20.000/μl. Επιπρόσθετα, η συγκέντρωση του PIGF στο περιφερικό αίμα των ασθενών με ΟΛΛ κατά την διάγνωση ήταν σημαντικά υψηλότερη

στους ασθενείς με θετική υπολειπόμενη νόσο κατά την ολοκλήρωση της θεραπείας εφόδου, σε σχέση με όσους είχαν αρνητική υπολειπόμενη νόσο, όπως αυτή εκτιμήθηκε με την κυτταρομετρία ροής. Η μελέτη της συγκέντρωσης του PIGF στον μυελό των οστών των ασθενών δεν ανέδειξε σημαντικές διαφορές ανάμεσα στην διάγνωση και το τέλος της θεραπείας εφόδου.

Η μελέτη της έκφρασης του διαλυτού υποδοχέα sFLT-1 ανέδειξε ότι οι ασθενείς με οξεία λευχαιμία κατά την διάγνωση είχαν υψηλότερα επίπεδα sFLT-1 στο περιφερικό αίμα σε σχέση με τους υγιείς μάρτυρες. Η διαφορά αυτή παρατηρήθηκε και στους ασθενείς με ΟΛΛ και στους ασθενείς με ΟΜΛ, ωστόσο ήταν στατιστικά σημαντική μόνο στους ασθενείς με ΟΛΛ, πιθανώς γιατί ήταν μικρός ο αριθμός ασθενών με ΟΜΛ στην μελέτη μας, λόγω της σπανιότητας της νόσου. Η ανάλυση των δημογραφικών και κλινικών δεδομένων των ασθενών με ΟΛΛ και ΟΜΛ σε συνάρτηση με τα επίπεδα του sFLT-1 κατά την διάγνωση στο περιφερικό αίμα και στον μυελό των οστών, δεν ανέδειξαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των υποομάδων για την ηλικία, το φύλο, τον αριθμό των λευκών αιμοσφαιρίων, τα επίπεδα της γαλακτικής δεϋδρογονάσης και το αποτέλεσμα της ελάχιστης υπολειπόμενης νόσου στο τέλος της θεραπείας εφόδου. Επίσης, η μελέτη της συγκέντρωσης του sFLT-1 στον μυελό των οστών των ασθενών δεν ανέδειξε σημαντικές διαφορές μεταξύ της διάγνωσης και του τέλους της θεραπείας εφόδου.

Οι περισσότερες μελέτες στην βιβλιογραφία που αφορούν τον PIGF, αφορούν συμπαγείς όγκους. Τα αποτελέσματα της μελέτης μας βρίσκονται σε συμφωνία με μια σειρά μελετών στις οποίες έχει παρατηρηθεί αυξημένη έκφραση του PIGF, είτε σε επίπεδο mRNA, είτε σε επίπεδο πρωτεΐνης, σε διάφορους τύπους καρκίνου, συμπεριλαμβανομένων του μικροκυτταρικού καρκίνου του πνεύμονα, του καρκίνου του νεφρού, του καρκίνου του προστάτη, του καρκίνου του τραχήλου της μήτρας, του μελανώματος, του καρκίνου του στομάχου και του καρκίνου της μήτρας [293]. Τα αυξημένα επίπεδα του PIGF έχουν συσχετιστεί με το προχωρημένο στάδιο της νόσου, με την παρουσία μεταστάσεων και με την υποτροπή της νόσου. Επιπλέον, τα αυξημένα επίπεδα του PIGF σχετίζονται αντίστροφα με την επιβίωση των ασθενών [294].

Τα ευρήματα αυτά είναι σύμφωνα με τα αποτελέσματα της μελέτης μας, στην οποία παρατηρήθηκε αύξηση της συγκέντρωσης του PIGF σε ασθενείς με ΟΛΛ και ΟΜΛ. Όπως έχει ήδη αναλυθεί, η αγγειογένεση διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην παθοφυσιολογία της λευχαιμίας [220]. Τα αυξημένα επίπεδα του PIGF που παρατηρήθηκαν κατά την διάγνωση είναι ενδεικτικά συμμετοχής του PIGF στην παθογένεση της νόσου. Επιπλέον, ιδιαίτερα ενδιαφέρον εύρημα της μελέτης μας αποτελεί ότι οι ασθενείς με ΟΛΛ με θετική εξέταση υπολειπόμενης νόσου κατά την ολοκλήρωση της θεραπείας εφόδου είχαν σημαντικά υψηλότερα επίπεδα PIGF κατά την διάγνωση. Το αποτέλεσμα της υπολειπόμενης νόσου κατά την ολοκλήρωση της θεραπείας εφόδου αποτελεί ανεξάρτητο προγνωστικό δείκτη για την πορεία της νόσου, αφού η θετική εξέταση υπολειπόμενης νόσου έχει συσχετιστεί με τριπλάσιο κίνδυνο υποτροπής [295]. Η συσχέτιση των επιπέδων του PIGF με το αποτέλεσμα της υπολειπόμενης νόσου είναι ενδεικτική της προγνωστικής αξίας του PIGF στην ΟΛΛ της παιδικής ηλικίας.

Αξίζει να σημειωθεί ότι στην μελέτη μας, στους ασθενείς με ΟΜΛ, τα επίπεδα του PIGF ήταν σημαντικά υψηλότερα σε όσους ασθενείς είχαν κατά την διάγνωση αριθμό λευκών αιμοσφαιρίων μεγαλύτερο από 20.000/μl. Στους ασθενείς με ΟΜΛ, ο αριθμός των λευκών αιμοσφαιρίων αποτελεί ανεξάρτητο προγνωστικό δείκτη για την πορεία της νόσου, και αυξημένος αριθμός λευκών αιμοσφαιρίων έχει συσχετιστεί με μικρότερο ποσοστό συνολικής επιβίωσης [296]. Η παρατήρηση αυτή ενισχύει τις ενδείξεις για την προγνωστική αξία της συγκέντρωσης του PIGF κατά την διάγνωση της οξείας λευχαιμίας της παιδικής ηλικίας, αλλά και για τον δυνητικό του ρόλο στην παθογένεση της νόσου, όπως αυτές προκύπτουν από τα αποτελέσματα της μελέτης μας.

Περιορισμένος είναι ο αριθμός των ερευνών που μελετούν τον ρόλο του PIGF στην λευχαιμία. Ο Fragoso και οι συνεργάτες του μελέτησαν την δράση του PIGF και του υποδοχέα του FLT-1 σε κύτταρα ΟΛΛ. Παρατηρήθηκε ότι σε κύτταρα ΟΛΛ, *in vitro*, η ενεργοποίηση του FLT-1 οδηγεί σε πολλαπλασιασμό των λευχαιμικών κυττάρων και μετανάστευσή τους εκτός του μυελού των οστών. Επιπλέον, και σε *in vivo* πειράματα σε ποντίκια, παρατηρήθηκε ότι η ενεργοποίηση ή η εξουδετέρωση του FLT-1 ρυθμίζει

την λειτουργία των λευχαιμικών κυττάρων. Πιο συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε ότι τα λευχαιμικά κύτταρα που υπερεκφράζουν τον υποδοχέα FLT-1 συσσωρεύονται στον μυελό των οστών της επίφυσης των οστών και ανιχνεύονται στην συστηματική κυκλοφορία σε σύντομο χρονικό διάστημα. Αντίθετα, τα κύτταρα που εκφράζουν σε μικρότερο βαθμό τον υποδοχέα FLT-1, ή που η δράση του υποδοχέα αναστέλλεται από μονοκλωνικά αντισώματα, εντοπίζονται κυρίως στον μυελό των οστών που βρίσκεται στην διάφυση, το κεντρικό δηλαδή τμήμα των μακρών οστών. Ο εντοπισμός των λευχαιμικών κυττάρων στον μυελό των οστών της διάφυσης, συσχετίστηκε με καθυστερημένη παρουσία τους σε εξωμυελικές εστίες και στην συστηματική κυκλοφορία και με καλύτερη επιβίωση. Ο πολλαπλασιασμός και μετανάστευση των λευχαιμικών κυττάρων ήταν σε συνάρτηση με τα επίπεδα των παραγόντων VEGF και PlGF που προσδέονται και ενεργοποιούν τον υποδοχέα FLT-1. Επιπλέον, παρατηρήθηκε ότι η εξουδετέρωση του FLT-1 είχε ως αποτέλεσμα την αυξημένη απόπτωση των λευχαιμικών κυττάρων [297].

Παρόμοια αποτελέσματα είχε η μελέτη του Casalou, και των συνεργατών του. Πιο συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε ότι σε κυτταρικές σειρές OMA, ο PlGF επάγει την μετανάστευση των λευχαιμικών κυττάρων. Μάλιστα, επάγει την δράση αυτή ισχυρότερα από ότι ο VEGF-A. Ο PlGF οδηγεί σε φωσφορυλίωση των κινασών ERK-1/2 και p38 καθώς και σε ενεργοποίηση των Rho-GTPασών. Η χορήγηση PlGF είχε ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση της πρωτεΐνης κοφιλίνη, η οποία συνδέεται με την ακτίνη, καθώς επίσης και τον σχηματισμό σωρών λιπιδίων. Η χορήγηση παραγόντων που αποπολυμερίζουν την ακτίνη, είχε ως αποτέλεσμα την μείωση του πολλαπλασιασμού και της μετανάστευσης των λευχαιμικών κυττάρων [298].

Όπως προκύπτει από τις ανωτέρω μελέτες, ο PlGF φαίνεται ότι σχετίζεται με την μετανάστευση των λευχαιμικών κυττάρων και την παρουσία εξωμυελικής νόσου, πιθανώς μέσω της ρύθμισης της ακτίνης του κυτταροσκελετού. Η παρουσία εξωμυελικής νόσου αποτελεί δυσμενή προγνωστικό δείκτη στους ασθενείς με λευχαιμία [299-301]. Επιπλέον, η παρουσία βλαστών στην κυκλοφορία μετά την χορήγηση της θεραπείας εφόδου, έχει συσχετιστεί με μεγαλύτερο κίνδυνο υποτροπής της νόσου [302, 303]. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η ΟΛΛ της παιδικής

ηλικίας, όπου η παρουσία βλαστών στην κυκλοφορία συσχετίζεται με υποτροπή της νόσου στο ΚΝΣ [304]. Ως εκ τούτου, καθίσταται σαφές ότι οι μηχανισμοί οι οποίοι επάγουν την διασπορά των λευχαιμικών κυττάρων εκτός του μικροπεριβάλλοντος του μυελού των οστών συμβάλλουν σημαντικά στην παθοφυσιολογία της νόσου. Το γεγονός αυτό προσδίδει σημαντική αξία στα αποτελέσματα της μελέτης μας, στην οποία παρατηρήθηκε υπερέκφραση του PIGF κατά την διάγνωση της οξείας λευχαιμίας, αλλά και συσχέτιση με ανεξάρτητους προγνωστικούς δείκτες της λευχαιμίας, όπως είναι ο αριθμός των λευκών αιμοσφαιρίων κατά την διάγνωση και το αποτέλεσμα της εξέτασης της υπολειπόμενης νόσου μετά το τέλος της θεραπείας εφόδου.

Ο Ikaί και οι συνεργάτες του μέτρησαν την έκφραση του PIGF στον μυελό των οστών ασθενών με Β-ΟΛΛ χρησιμοποιώντας την μέθοδο Real Time PCR. Παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση των επιπέδων του PIGF στα δείγματα των ασθενών με ΟΛΛ με θετικό χρωμόσωμα Philadelphia, σε σχέση με τους ασθενείς με αρνητικό χρωμόσωμα Philadelphia. Σε κυτταρικές σειρές με κύτταρα ΟΛΛ με θετικό χρωμόσωμα Philadelphia, η χορήγηση PIGF είχε ως αποτέλεσμα την κυτταρική αύξηση των Philadelphia-θετικών λευχαιμικών κυττάρων με δόσοεξαρτώμενο τρόπο [305]. Τα ευρήματα της μελέτης του Ikaί και των συνεργατών του, υπογραμμίζουν έναν δυναμικό ρόλο του PIGF στην παθογένεση της ΟΛΛ με θετικό χρωμόσωμα Philadelphia.

Η πιθανή σχέση του PIGF και της παθογένεσης της λευχαιμίας, έδωσε ώθηση στην *in vivo* μελέτη του βιολογικού ρόλου του PIGF στην ΧΜΛ, καθώς επίσης και των δυναμικών θεραπευτικών οφελών από την φαρμακευτική απενεργοποίηση του PIGF. Στην διερεύνηση του ρόλου του PIGF στην ΧΜΛ, ιδιαίτερα σημαντική υπήρξε η μελέτη του Schmidt και των συνεργατών του. Στην μελέτη του Schmidt, τα επίπεδα των mRNA μεταγράφων του PIGF ήταν σημαντικά υψηλότερα στον μυελό των οστών και στο περιφερικό αίμα σε ποντίκια με ΧΜΛ σε σύγκριση με τα υγιή ποντίκια. Τα επίπεδα του PIGF τόσο στον μυελό των οστών, όσο και στο περιφερικό αίμα συσχετίστηκαν με το φορτίο της νόσου. Επιπλέον, παρατηρήθηκε ότι η παραγωγή PIGF από τα λευχαιμικά κύτταρα ήταν μικρή. Εντούτοις, τα λευχαιμικά κύτταρα

ρυθμίζουν τα στρωματικά κύτταρα του μυελού των οστών (bone marrow stroma cells) ώστε να παράγουν αυξημένες ποσότητες PlGF, μέσω της ενεργοποίησης του μεταγραφικού παράγοντα NF-κB. Φαίνεται ότι ο PlGF επάγει τον πολλαπλασιασμό των BCR-ABL1-θετικών λευχαιμικών κυττάρων με δόσοεξαρτώμενο τρόπο. Επίσης, ιδιαίτερα σημαντικό εύρημα ήταν ότι η χρήση μονοκλωνικού αντισώματος έναντι του PlGF καθυστέρησε την εξέλιξη της νόσου [306].

Ακόμη, παρατηρήθηκε ότι η συγκέντρωση του PlGF στο περιφερικό αίμα κατά την διάγνωση είναι υψηλότερη στους ασθενείς με ΧΜΛ, κατά την χρόνια φάση της νόσου, σε σχέση με τους υγιείς μάρτυρες. Επιπλέον, η συγκέντρωση του PlGF κατά την βλαστική κρίση της νόσου ήταν ακόμη υψηλότερη συγκριτικά με την χρόνια φάση [306]. Τα ευρήματα αυτά βρίσκονται σε συμφωνία με τα αποτελέσματα της μελέτης μας, και υποστηρίζουν την σχέση μεταξύ του PlGF και της παθογένεσης της ΧΜΛ.

Στην μελέτη μας παρατηρήθηκαν σημαντικά αυξημένα επίπεδα του διαλυτού υποδοχέα sFLT-1 στα παιδιά με οξεία λευχαιμία σε σχέση με τους υγιείς μάρτυρες. Παρόλο που η διαφορά ήταν παρούσα και στους ασθενείς με ΟΛΛ και στους ασθενείς με ΟΜΛ, ήταν στατιστικά σημαντική μόνο στους ασθενείς με ΟΛΛ. Όπως προαναφέρθηκε, ο υποδοχέας sFLT-1 ή sVEGFR-1 αποτελεί την διαλυτή μορφή του μεμβρανικού υποδοχέα FLT-1 ή VEGFR-1. Ο sFLT-1 διαθέτει ένα πανομοιότυπο με τον FLT-1 εξωκυττάριο τμήμα, αλλά απουσιάζει το ενδοκυττάριο και το διαμεμβρανικό τμήμα. Ως εκ τούτου, η πρόσδεση των VEGF-A και PlGF με τον sFLT-1, «παγιδεύει» τους δυο αγγειογενετικούς παράγοντες, αφού δεν μπορούν να επάγουν τον βιολογικό τους ρόλο, καθώς από τον sFLT-1 απουσιάζει η δραστικότητα κινάσης τυροσίνης. Ο sFLT-1 μπορεί να κυκλοφορεί ελεύθερα στο αίμα, και για αυτό έχει την ικανότητα, μέσω της πρόσδεσής του με τα μόρια αυτά, να μειώνει σημαντικά την συγκέντρωση των VEGF και PlGF. Ως εκ τούτου, δεσμεύοντας τους αγγειογενετικούς παράγοντες, αναστέλλει την σύνδεσή τους με τον VEGFR-2 που είναι ο κύριος υποδοχέας, μέσω του οποίου ενεργοποιείται η διαδικασία της αγγειογένεσης [307, 308]. Επιπλέον, η αντιαγγειογενετική δράση του sFLT-1 συντελείται και με δεύτερο μηχανισμό, αφού συνδέεται με τους μεμβρανικούς υποδοχείς VEGFR με αποτέλεσμα να δημιουργούνται ανενεργά ετεροδιμερή σύμπλοκα [309].

Αύξηση του μεμβρανικού υποδοχέα FLT-1 έχει παρατηρηθεί σε πολλούς τύπους συμπαγών όγκων αλλά και σε αιματολογικές κακοήθειες, όπως η ΟΜΛ και τα μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα, και αντανακλά την αγγειογένεση που παρατηρείται στα νοσήματα αυτά [310]. Στην ΟΜΛ και στα μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα, η αύξηση της συγκέντρωσης του μεμβρανικού υποδοχέα FLT-1 αποτελεί ανεξάρτητο αρνητικό προγνωστικό δείκτη για την πορεία της νόσου [311].

Ο sFLT-1 εκφράζεται σε πολλούς διαφορετικούς τύπους νεοπλασιών, όπως ο καρκίνος του μαστού, τα νεοπλάσματα από αστροκύτταρα, ο καρκίνος του παχέος εντέρου, η ΟΜΛ και τα μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα [310, 312-314]. Έχει παρατηρηθεί ότι ο λόγος sFLT-1/VEGF συνδέεται με την πρόγνωση σε διάφορα κακοήθη νοσήματα. Πιο συγκεκριμένα, ο χαμηλός λόγος sFLT-1/VEGF στον ορό των ασθενών ή σε δείγματα βιοψίας έχει συνδεθεί με μεγαλύτερο βαθμό κακοήθειας, μικρότερο ποσοστό επιβίωσης και φτωχότερη ανταπόκριση στην θεραπεία σε ασθενείς με καρκίνο του μαστού, γλοιώματα, καρκίνο του παγκρέατος και ΟΜΛ [309]. Επιπλέον, έχει παρατηρηθεί ότι η μεταφορά του γονιδίου *sFLT-1* αναστέλλει την αύξηση των καρκινικών κυττάρων και την αγγειογένεση. Πιο συγκεκριμένα, σε πειραματικά μοντέλα με ποντίκια, παρατηρήθηκε ότι η γενετική τροποποίηση ώστε να εκφράζουν το γονίδιο *sFLT-1* στρωματικών κυττάρων προερχόμενων από τον μυελό των οστών, αναστέλλει την αγγειογένεση και την δημιουργία μεταστάσεων, ενώ επάγει την απόπτωση των καρκινικών κυττάρων [315].

Σε ασθενείς με καρκίνο του μαστού, τα υψηλά επίπεδα του sFLT-1 στο περιφερικό αίμα συσχετίστηκαν με απουσία καρκινικών κυττάρων στην κυκλοφορία. Αντίθετα, ασθενείς με παρουσία καρκινικών κυττάρων στην κυκλοφορία, είχαν χαμηλότερα επίπεδα sFLT-1. Επιπλέον, υψηλότερα επίπεδα sFLT-1 παρατηρήθηκαν σε ασθενείς χωρίς λεμφαδενικές μεταστάσεις. Ο sFLT-1 αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό των ενδοθηλιακών κυττάρων και την διασπορά τους στο μικροπεριβάλλον του όγκου και ως εκ τούτου αναστέλλει την αγγειογένεση και την ανώμαλη αρχιτεκτονική των αιμοφόρων αγγείων στο περιβάλλον του όγκου. Ως αποτέλεσμα, αναστέλλει όχι μόνο τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων, αλλά και την δημιουργία λεμφαδενικών μεταστάσεων [316].

Όπως ήδη αναφέρθηκε, οι αντί-αγγειογενετικοί παράγοντες αποτελούν θεραπευτική επιλογή για την αντιμετώπιση διαφόρων συμπαγών όγκων. Στους πρώτης γενιάς αντί-αγγειογενετικούς παράγοντες ανήκουν τα μονοκλωνικά αντισώματα έναντι του παράγοντα VEGF-A, ενώ οι θεραπείες δεύτερης γενιάς στοχεύουν στους υποδοχείς της οικογένειας των μελών VEGF. Εντούτοις, κλινικές μελέτες καταδεικνύουν ότι οι όγκοι αναπτύσσουν μηχανισμούς μέσω των οποίων διαφεύγουν της VEGF αναστολής [317, 318]. Καθίσταται σαφής η ανάγκη για ανάπτυξη νέων αντί-αγγειογενετικών στρατηγικών, όπως η ομαλοποίηση του αγγειακού δικτύου των όγκων, και η στόχευση έναντι νέων αγγειογενετικών παραγόντων. Στην προσπάθεια αυτή, η θεραπευτική στόχευση του PlGF μπορεί να διαδραματίσει σημαντικό ρόλο. Σε προκλινικές μελέτες, σε διάφορους τύπους καρκίνου, η χρήση μονοκλωνικού αντισώματος έναντι του PlGF ανέστειλε την ανάπτυξη των όγκων και την δημιουργία μεταστάσεων. Επίσης, ανέστειλε την διήθηση των όγκων από μακροφάγα και ενίσχυσε την κυτταροτοξική δράση της χημειοθεραπείας. Επιπλέον, η αντί-PlGF θεραπεία παρουσίασε λιγότερες ανεπιθύμητες ενέργειες από ότι η αντί-VEGF και η αντί-VEGFR θεραπεία [219]. Σε κλινική μελέτη φάσης 1, χορηγήθηκε μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι του PlGF σε ασθενείς με συμπαγείς όγκους οι οποίοι ήταν μεταστατικοί ή μη εξαιρεσιμοί, και οι συχνότερες ανεπιθύμητες ενέργειες που παρατηρήθηκαν ήταν: κόπωση, δυσκοιλιότητα, ναυτία, βήχας, δύσπνοια και πυρετός [319]. Τα δεδομένα από προκλινικές αλλά και κλινικές μελέτες σε συμπαγείς όγκους υποστηρίζουν ότι η θεραπευτική στόχευση του PlGF και σε αιματολογικές κακοήθειες αποτελεί πολλά υποσχόμενη επιλογή, όχι μόνο στην κατεύθυνση της αναστολής της αγγειογένεσης, αλλά και της αναστολής της διήθησης από μακροφάγα και της διασποράς των λευχαιμικών κυττάρων. Ο sFLT-1, ως ένα διαλυτό μόριο το οποίο δεσμεύει στην κυκλοφορία τον PlGF και αναστέλλει την βιολογική του δράση, προσφέρει μια επιπλέον υποσχόμενη θεραπευτική επιλογή αναστολής της αγγειογένεσης σε ασθενείς με υψηλά επίπεδα PlGF.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 10. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Kampen, K.R., *The discovery and early understanding of leukemia*. Leuk Res, 2012. 36(1): p. 6-13.
2. Degos, L., *John Hughes Bennett, Rudolph Virchow... and Alfred Donne: the first description of leukemia*. Hematol J, 2001. 2(1): p. 1.
3. Goldman, J.M., *Chronic myeloid leukemia: a historical perspective*. Semin Hematol, 2010. 47(4): p. 302-11.
4. Geary, C.G., *The story of chronic myeloid leukaemia*. Br J Haematol, 2000. 110(1): p. 2-11.
5. Freireich, E.J., *The history of leukemia therapy--a personal journey*. Clin Lymphoma Myeloma Leuk, 2012. 12(6): p. 386-92.
6. Spain, P.D. and N. Kadan-Lottick, *Observations of unprecedented remissions following novel treatment for acute leukemia in children in 1948*. J R Soc Med, 2012. 105(4): p. 177-81.
7. Lichtman, M.A., *Battling the hematological malignancies: the 200 years' war*. Oncologist, 2008. 13(2): p. 126-38.
8. Beutler, E., *The treatment of acute leukemia: past, present, and future*. Leukemia, 2001. 15(4): p. 658-61.
9. Hutter, J.J., *Childhood leukemia*. Pediatr Rev, 2010. 31(6): p. 234-41.
10. Madhusoodhan, P.P., W.L. Carroll, and T. Bhatla, *Progress and Prospects in Pediatric Leukemia*. Curr Probl Pediatr Adolesc Health Care, 2016. 46(7): p. 229-241.
11. Seth, R. and A. Singh, *Leukemias in Children*. Indian J Pediatr, 2015. 82(9): p. 817-24.
12. Hasle, H., I.H. Clemmensen, and M. Mikkelsen, *Risks of leukaemia and solid tumours in individuals with Down's syndrome*. Lancet, 2000. 355(9199): p. 165-9.
13. Hasle, H., *Pattern of malignant disorders in individuals with Down's syndrome*. Lancet Oncol, 2001. 2(7): p. 429-36.
14. Holmfeldt, L., et al., *The genomic landscape of hypodiploid acute lymphoblastic leukemia*. Nat Genet, 2013. 45(3): p. 242-52.
15. Moriyama, T., M.V. Relling, and J.J. Yang, *Inherited genetic variation in childhood acute lymphoblastic leukemia*. Blood, 2015. 125(26): p. 3988-95.
16. Fujita, T.C., et al., *Acute lymphoid leukemia etiopathogenesis*. Mol Biol Rep, 2021. 48(1): p. 817-822.
17. Thomopoulos, T.P., et al., *Maternal and childhood consumption of coffee, tea and cola beverages in association with childhood leukemia: a meta-analysis*. Cancer Epidemiol, 2015. 39(6): p. 1047-59.
18. Metayer, C., et al., *Parental Tobacco Smoking and Acute Myeloid Leukemia: The Childhood Leukemia International Consortium*. Am J Epidemiol, 2016. 184(4): p. 261-73.
19. Bailey, H.D., et al., *Home pesticide exposures and risk of childhood leukemia: Findings from the childhood leukemia international consortium*. Int J Cancer, 2015. 137(11): p. 2644-63.

20. Bloom, M., et al., *Recent advances in genetic predisposition to pediatric acute lymphoblastic leukemia*. *Expert Rev Hematol*, 2020. 13(1): p. 55-70.
21. Marcotte, E.L., et al., *Exposure to infections and risk of leukemia in young children*. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2014. 23(7): p. 1195-203.
22. Malard, F. and M. Mohty, *Acute lymphoblastic leukaemia*. *Lancet*, 2020. 395(10230): p. 1146-1162.
23. Siegel, D.A., et al., *Cancer incidence rates and trends among children and adolescents in the United States, 2001-2009*. *Pediatrics*, 2014. 134(4): p. e945-55.
24. Ward, E., et al., *Childhood and adolescent cancer statistics, 2014*. *CA Cancer J Clin*, 2014. 64(2): p. 83-103.
25. Petridou, E.T., et al., *Childhood leukaemias and lymphomas in Greece (1996-2006): a nationwide registration study*. *Arch Dis Child*, 2008. 93(12): p. 1027-32.
26. Kato, M. and A. Manabe, *Treatment and biology of pediatric acute lymphoblastic leukemia*. *Pediatr Int*, 2018. 60(1): p. 4-12.
27. Mullighan, C.G., *The molecular genetic makeup of acute lymphoblastic leukemia*. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, 2012. 2012: p. 389-96.
28. Moorman, A.V., *New and emerging prognostic and predictive genetic biomarkers in B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia*. *Haematologica*, 2016. 101(4): p. 407-16.
29. Heerema, N.A., et al., *Specific extra chromosomes occur in a modal number dependent pattern in pediatric acute lymphoblastic leukemia*. *Genes Chromosomes Cancer*, 2007. 46(7): p. 684-93.
30. Woo, J.S., M.O. Alberti, and C.A. Tirado, *Childhood B-acute lymphoblastic leukemia: a genetic update*. *Exp Hematol Oncol*, 2014. 3: p. 16.
31. Shago, M., *Recurrent Cytogenetic Abnormalities in Acute Lymphoblastic Leukemia*. *Methods Mol Biol*, 2017. 1541: p. 257-278.
32. Kearney, L. and S.W. Horsley, *Molecular cytogenetics in haematological malignancy: current technology and future prospects*. *Chromosoma*, 2005. 114(4): p. 286-94.
33. Armstrong, S.A., et al., *MLL translocations specify a distinct gene expression profile that distinguishes a unique leukemia*. *Nat Genet*, 2002. 30(1): p. 41-7.
34. Armstrong, S.A., et al., *FLT3 mutations in childhood acute lymphoblastic leukemia*. *Blood*, 2004. 103(9): p. 3544-6.
35. Ansari, K.I. and S.S. Mandal, *Mixed lineage leukemia: roles in gene expression, hormone signaling and mRNA processing*. *FEBS J*, 2010. 277(8): p. 1790-804.
36. Biondi, A., et al., *Biological and therapeutic aspects of infant leukemia*. *Blood*, 2000. 96(1): p. 24-33.
37. Chessells, J.M., et al., *Clinical features, cytogenetics and outcome in acute lymphoblastic and myeloid leukaemia of infancy: report from the MRC Childhood Leukaemia working party*. *Leukemia*, 2002. 16(5): p. 776-84.
38. Moorman, A.V., et al., *No prognostic effect of additional chromosomal abnormalities in children with acute lymphoblastic leukemia and 11q23 abnormalities*. *Leukemia*, 2005. 19(4): p. 557-63.
39. Andersen, M.K., et al., *Paediatric B-cell precursor acute lymphoblastic leukaemia with t(1;19)(q23;p13): clinical and cytogenetic characteristics of 47 cases from the Nordic countries treated according to NOPHO protocols*. *Br J Haematol*, 2011. 155(2): p. 235-43.

40. Felice, M.S., et al., *Prognostic impact of t(1;19)/TCF3-PBX1 in childhood acute lymphoblastic leukemia in the context of Berlin-Frankfurt-Munster-based protocols*. *Leuk Lymphoma*, 2011. 52(7): p. 1215-21.
41. Schultz, K.R., et al., *Improved early event-free survival with imatinib in Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia: a children's oncology group study*. *J Clin Oncol*, 2009. 27(31): p. 5175-81.
42. Sanchez-Martin, M. and A. Ferrando, *The NOTCH1-MYC highway toward T-cell acute lymphoblastic leukemia*. *Blood*, 2017. 129(9): p. 1124-1133.
43. Girardi, T., et al., *The genetics and molecular biology of T-ALL*. *Blood*, 2017. 129(9): p. 1113-1123.
44. Weng, A.P., et al., *Activating mutations of NOTCH1 in human T cell acute lymphoblastic leukemia*. *Science*, 2004. 306(5694): p. 269-71.
45. Veltri, G., et al., *NUP214-ABL1 fusion in childhood T-ALL*. *Pediatr Blood Cancer*, 2022: p. e29643.
46. Burmeister, T., et al., *NUP214-ABL1 in adult T-ALL: the GMALL study group experience*. *Blood*, 2006. 108(10): p. 3556-9.
47. Pui, C.H. and W.E. Evans, *Treatment of acute lymphoblastic leukemia*. *N Engl J Med*, 2006. 354(2): p. 166-78.
48. Petropoulos, A.C. and M. Moschovi, *Cardiotoxicity among adult survivors suffered from childhood malignancies*. *Hell J Nucl Med*, 2019. 22 Suppl 2: p. 34-40.
49. Gaynon, P.S., et al., *Long-term results of the children's cancer group studies for childhood acute lymphoblastic leukemia 1983-2002: a Children's Oncology Group Report*. *Leukemia*, 2010. 24(2): p. 285-97.
50. Pui, C.H., *Central nervous system disease in acute lymphoblastic leukemia: prophylaxis and treatment*. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, 2006: p. 142-6.
51. Pui, C.H. and E. Thiel, *Central nervous system disease in hematologic malignancies: historical perspective and practical applications*. *Semin Oncol*, 2009. 36(4 Suppl 2): p. S2-S16.
52. Pui, C.H. and S.C. Howard, *Current management and challenges of malignant disease in the CNS in paediatric leukaemia*. *Lancet Oncol*, 2008. 9(3): p. 257-68.
53. Matloub, Y., et al., *Intrathecal triple therapy decreases central nervous system relapse but fails to improve event-free survival when compared with intrathecal methotrexate: results of the Children's Cancer Group (CCG) 1952 study for standard-risk acute lymphoblastic leukemia, reported by the Children's Oncology Group*. *Blood*, 2006. 108(4): p. 1165-73.
54. Pui, C.H., et al., *Treating childhood acute lymphoblastic leukemia without cranial irradiation*. *N Engl J Med*, 2009. 360(26): p. 2730-41.
55. Biondi, A., et al., *Imatinib after induction for treatment of children and adolescents with Philadelphia-chromosome-positive acute lymphoblastic leukaemia (EsPhALL): a randomised, open-label, intergroup study*. *Lancet Oncol*, 2012. 13(9): p. 936-45.
56. Koo, H.H., *Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia in childhood*. *Korean J Pediatr*, 2011. 54(3): p. 106-10.
57. Mullighan, C.G., et al., *Genomic analysis of the clonal origins of relapsed acute lymphoblastic leukemia*. *Science*, 2008. 322(5906): p. 1377-80.
58. Bhatla, T., et al., *The biology of relapsed acute lymphoblastic leukemia: opportunities for therapeutic interventions*. *J Pediatr Hematol Oncol*, 2014. 36(6): p. 413-8.

59. Gaynon, P.S., *Childhood acute lymphoblastic leukaemia and relapse*. Br J Haematol, 2005. 131(5): p. 579-87.
60. Locatelli, F., et al., *How I treat relapsed childhood acute lymphoblastic leukemia*. Blood, 2012. 120(14): p. 2807-16.
61. Saarinen-Pihkala, U.M., et al., *Pathways through relapses and deaths of children with acute lymphoblastic leukemia: role of allogeneic stem-cell transplantation in Nordic data*. J Clin Oncol, 2006. 24(36): p. 5750-62.
62. van den Berg, H., et al., *Outcome after first relapse in children with acute lymphoblastic leukemia: a report based on the Dutch Childhood Oncology Group (DCOG) relapse all 98 protocol*. Pediatr Blood Cancer, 2011. 57(2): p. 210-6.
63. Ritchey, A.K., et al., *Improved survival of children with isolated CNS relapse of acute lymphoblastic leukemia: a pediatric oncology group study*. J Clin Oncol, 1999. 17(12): p. 3745-52.
64. Jacobs, J.E. and C. Hastings, *Isolated extramedullary relapse in childhood acute lymphocytic leukemia*. Curr Hematol Malig Rep, 2010. 5(4): p. 185-91.
65. Quessada, J., et al., *Cytogenetics of Pediatric Acute Myeloid Leukemia: A Review of the Current Knowledge*. Genes (Basel), 2021. 12(6).
66. Dores, G.M., et al., *Acute leukemia incidence and patient survival among children and adults in the United States, 2001-2007*. Blood, 2012. 119(1): p. 34-43.
67. Taga, T., et al., *Acute myeloid leukemia in children: Current status and future directions*. Pediatr Int, 2016. 58(2): p. 71-80.
68. Reinhardt, D. and U. Creutzig, *Isolated myelosarcoma in children--update and review*. Leuk Lymphoma, 2002. 43(3): p. 565-74.
69. Inaba, H., et al., *Clinical and biologic features and treatment outcome of children with newly diagnosed acute myeloid leukemia and hyperleukocytosis*. Cancer, 2008. 113(3): p. 522-9.
70. Creutzig, U., et al., *Diagnosis and management of acute myeloid leukemia in children and adolescents: recommendations from an international expert panel*. Blood, 2012. 120(16): p. 3187-205.
71. Creutzig, U., et al., *Changes in cytogenetics and molecular genetics in acute myeloid leukemia from childhood to adult age groups*. Cancer, 2016. 122(24): p. 3821-3830.
72. Sanz, M.A., et al., *Management of acute promyelocytic leukemia: updated recommendations from an expert panel of the European LeukemiaNet*. Blood, 2019. 133(15): p. 1630-1643.
73. Conneely, S.E. and A.M. Stevens, *Advances in Pediatric Acute Promyelocytic Leukemia*. Children (Basel), 2020. 7(2).
74. Bolouri, H., et al., *Publisher Correction: The molecular landscape of pediatric acute myeloid leukemia reveals recurrent structural alterations and age-specific mutational interactions*. Nat Med, 2019. 25(3): p. 530.
75. von Neuhoff, C., et al., *Prognostic impact of specific chromosomal aberrations in a large group of pediatric patients with acute myeloid leukemia treated uniformly according to trial AML-BFM 98*. J Clin Oncol, 2010. 28(16): p. 2682-9.
76. Balgobind, B.V., et al., *Novel prognostic subgroups in childhood 11q23/MLL-rearranged acute myeloid leukemia: results of an international retrospective study*. Blood, 2009. 114(12): p. 2489-96.
77. Conneely, S.E. and R.E. Rau, *The genomics of acute myeloid leukemia in children*. Cancer Metastasis Rev, 2020. 39(1): p. 189-209.

78. Harrison, C.J., et al., *Cytogenetics of childhood acute myeloid leukemia: United Kingdom Medical Research Council Treatment trials AML 10 and 12*. J Clin Oncol, 2010. 28(16): p. 2674-81.
79. Marceau-Renaut, A., et al., *Molecular Profiling Defines Distinct Prognostic Subgroups in Childhood AML: A Report From the French ELAM02 Study Group*. Hemasphere, 2018. 2(1): p. e31.
80. Gilliland, D.G. and J.D. Griffin, *The roles of FLT3 in hematopoiesis and leukemia*. Blood, 2002. 100(5): p. 1532-42.
81. Meshinchi, S., et al., *Role of allogeneic stem cell transplantation in FLT3/ITD-positive AML*. Blood, 2006. 108(1): p. 400; author reply 400-1.
82. Falini, B., et al., *Cytoplasmic nucleophosmin in acute myelogenous leukemia with a normal karyotype*. N Engl J Med, 2005. 352(3): p. 254-66.
83. Falini, B., et al., *Acute myeloid leukemia with mutated nucleophosmin (NPM1): is it a distinct entity?* Blood, 2011. 117(4): p. 1109-20.
84. Rau, R. and P. Brown, *Nucleophosmin (NPM1) mutations in adult and childhood acute myeloid leukaemia: towards definition of a new leukaemia entity*. Hematol Oncol, 2009. 27(4): p. 171-81.
85. Rubnitz, J.E., *Current Management of Childhood Acute Myeloid Leukemia*. Paediatr Drugs, 2017. 19(1): p. 1-10.
86. Kaspers, G.J., *Pediatric acute myeloid leukemia*. Expert Rev Anticancer Ther, 2012. 12(3): p. 405-13.
87. Elgarten, C.W. and R. Aplenc, *Pediatric acute myeloid leukemia: updates on biology, risk stratification, and therapy*. Curr Opin Pediatr, 2020. 32(1): p. 57-66.
88. Bally, C., et al., *Outcome of acute promyelocytic leukemia (APL) in children and adolescents: an analysis in two consecutive trials of the European APL Group*. J Clin Oncol, 2012. 30(14): p. 1641-6.
89. Adan, A., et al., *Flow cytometry: basic principles and applications*. Crit Rev Biotechnol, 2017. 37(2): p. 163-176.
90. Manohar, S.M., P. Shah, and A. Nair, *Flow cytometry: principles, applications and recent advances*. Bioanalysis, 2021. 13(3): p. 181-198.
91. Brown, M. and C. Wittwer, *Flow cytometry: principles and clinical applications in hematology*. Clin Chem, 2000. 46(8 Pt 2): p. 1221-9.
92. McKinnon, K.M., *Flow Cytometry: An Overview*. Curr Protoc Immunol, 2018. 120: p. 5 1 1-5 1 11.
93. Chiaretti, S., G. Zini, and R. Bassan, *Diagnosis and subclassification of acute lymphoblastic leukemia*. Mediterr J Hematol Infect Dis, 2014. 6(1): p. e2014073.
94. Kruse, A., et al., *Minimal Residual Disease Detection in Acute Lymphoblastic Leukemia*. Int J Mol Sci, 2020. 21(3).
95. Voso, M.T., et al., *MRD in AML: The Role of New Techniques*. Front Oncol, 2019. 9: p. 655.
96. Stern, L., et al., *Mass Cytometry for the Assessment of Immune Reconstitution After Hematopoietic Stem Cell Transplantation*. Front Immunol, 2018. 9: p. 1672.
97. Voltarelli, J.C., *Applications of flow cytometry to hematopoietic stem cell transplantation*. Mem Inst Oswaldo Cruz, 2000. 95(3): p. 403-14.
98. Drenou, B., *Flow cytometry for CD34 determination in hematopoietic grafts*. Hematol Cell Ther, 1996. 38(6): p. 505-12.

99. Cabral-Marques, O., et al., *Flow Cytometry Contributions for the Diagnosis and Immunopathological Characterization of Primary Immunodeficiency Diseases With Immune Dysregulation*. *Front Immunol*, 2019. 10: p. 2742.
100. Kanegane, H., et al., *Flow cytometry-based diagnosis of primary immunodeficiency diseases*. *Allergol Int*, 2018. 67(1): p. 43-54.
101. Conley, M.E., et al., *Genetic analysis of patients with defects in early B-cell development*. *Immunol Rev*, 2005. 203: p. 216-34.
102. Chinn, I.K. and W.T. Shearer, *Severe Combined Immunodeficiency Disorders*. *Immunol Allergy Clin North Am*, 2015. 35(4): p. 671-94.
103. Buckley, R.H., et al., *Human severe combined immunodeficiency: genetic, phenotypic, and functional diversity in one hundred eight infants*. *J Pediatr*, 1997. 130(3): p. 378-87.
104. Shinozaki, K., et al., *Activation-dependent T cell expression of the X-linked lymphoproliferative disease gene product SLAM-associated protein and its assessment for patient detection*. *Int Immunol*, 2002. 14(10): p. 1215-23.
105. Ma, C.S., et al., *Deficiency of Th17 cells in hyper IgE syndrome due to mutations in STAT3*. *J Exp Med*, 2008. 205(7): p. 1551-7.
106. Grimbacher, B., et al., *Homozygous loss of ICOS is associated with adult-onset common variable immunodeficiency*. *Nat Immunol*, 2003. 4(3): p. 261-8.
107. Lee, W.I., et al., *Molecular analysis of a large cohort of patients with the hyper immunoglobulin M (IgM) syndrome*. *Blood*, 2005. 105(5): p. 1881-90.
108. Seyama, K., et al., *Mutations of the CD40 ligand gene and its effect on CD40 ligand expression in patients with X-linked hyper IgM syndrome*. *Blood*, 1998. 92(7): p. 2421-34.
109. Ferrari, S., et al., *Mutations of CD40 gene cause an autosomal recessive form of immunodeficiency with hyper IgM*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001. 98(22): p. 12614-9.
110. Notarangelo, L.D., C.H. Miao, and H.D. Ochs, *Wiskott-Aldrich syndrome*. *Curr Opin Hematol*, 2008. 15(1): p. 30-6.
111. Kawai, S., et al., *Flow cytometric determination of intracytoplasmic Wiskott-Aldrich syndrome protein in peripheral blood lymphocyte subpopulations*. *J Immunol Methods*, 2002. 260(1-2): p. 195-205.
112. Degar, B., *Familial Hemophagocytic Lymphohistiocytosis*. *Hematol Oncol Clin North Am*, 2015. 29(5): p. 903-13.
113. Kogawa, K., et al., *Perforin expression in cytotoxic lymphocytes from patients with hemophagocytic lymphohistiocytosis and their family members*. *Blood*, 2002. 99(1): p. 61-6.
114. Marcenaro, S., et al., *Analysis of natural killer-cell function in familial hemophagocytic lymphohistiocytosis (FHL): defective CD107a surface expression heralds Munc13-4 defect and discriminates between genetic subtypes of the disease*. *Blood*, 2006. 108(7): p. 2316-23.
115. Sharp, W.J., U.D. Khanduri, and B.S. Christie, *Rapid heterozygote detection in Glanzmann's thrombasthenia*. *Br J Haematol*, 1998. 101(1): p. 66-9.
116. Cohn, R.J., G.G. Sherman, and D.K. Glencross, *Flow cytometric analysis of platelet surface glycoproteins in the diagnosis of Bernard-Soulier syndrome*. *Pediatr Hematol Oncol*, 1997. 14(1): p. 43-50.
117. Della Starza, I., et al., *Minimal Residual Disease in Acute Lymphoblastic Leukemia: Technical and Clinical Advances*. *Front Oncol*, 2019. 9: p. 726.

118. Szczepanski, T., et al., *Molecular discrimination between relapsed and secondary acute lymphoblastic leukemia: proposal for an easy strategy*. Med Pediatr Oncol, 2001. 36(3): p. 352-8.
119. Rosenberg, A.S., et al., *Secondary acute lymphoblastic leukemia is a distinct clinical entity with prognostic significance*. Blood Cancer J, 2017. 7(9): p. e605.
120. Campana, D., *Molecular determinants of treatment response in acute lymphoblastic leukemia*. Hematology Am Soc Hematol Educ Program, 2008: p. 366-73.
121. Short, N.J. and E. Jabbour, *Minimal Residual Disease in Acute Lymphoblastic Leukemia: How to Recognize and Treat It*. Curr Oncol Rep, 2017. 19(1): p. 6.
122. Szczepanski, T., *Why and how to quantify minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia?* Leukemia, 2007. 21(4): p. 622-6.
123. Borowitz, M.J., et al., *Prognostic significance of minimal residual disease in high risk B-ALL: a report from Children's Oncology Group study AALL0232*. Blood, 2015. 126(8): p. 964-71.
124. Campana, D., *Minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia*. Semin Hematol, 2009. 46(1): p. 100-6.
125. Cazzaniga, G. and A. Biondi, *Molecular monitoring of childhood acute lymphoblastic leukemia using antigen receptor gene rearrangements and quantitative polymerase chain reaction technology*. Haematologica, 2005. 90(3): p. 382-90.
126. van der Velden, V.H., et al., *Detection of minimal residual disease in hematologic malignancies by real-time quantitative PCR: principles, approaches, and laboratory aspects*. Leukemia, 2003. 17(6): p. 1013-34.
127. Szczepanski, T., et al., *Comparative analysis of Ig and TCR gene rearrangements at diagnosis and at relapse of childhood precursor-B-ALL provides improved strategies for selection of stable PCR targets for monitoring of minimal residual disease*. Blood, 2002. 99(7): p. 2315-23.
128. Gabert, J., et al., *Standardization and quality control studies of 'real-time' quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction of fusion gene transcripts for residual disease detection in leukemia - a Europe Against Cancer program*. Leukemia, 2003. 17(12): p. 2318-57.
129. Behjati, S. and P.S. Tarpey, *What is next generation sequencing?* Arch Dis Child Educ Pract Ed, 2013. 98(6): p. 236-8.
130. Faham, M., et al., *Deep-sequencing approach for minimal residual disease detection in acute lymphoblastic leukemia*. Blood, 2012. 120(26): p. 5173-80.
131. Cave, H., et al., *Clinical significance of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia*. European Organization for Research and Treatment of Cancer--Childhood Leukemia Cooperative Group. N Engl J Med, 1998. 339(9): p. 591-8.
132. Coustan-Smith, E., et al., *Immunological detection of minimal residual disease in children with acute lymphoblastic leukaemia*. Lancet, 1998. 351(9102): p. 550-4.
133. Bruggemann, M. and M. Kotrova, *Minimal residual disease in adult ALL: technical aspects and implications for correct clinical interpretation*. Blood Adv, 2017. 1(25): p. 2456-2466.
134. Stow, P., et al., *Clinical significance of low levels of minimal residual disease at the end of remission induction therapy in childhood acute lymphoblastic leukemia*. Blood, 2010. 115(23): p. 4657-63.
135. Hunger, S.P. and C.G. Mullighan, *Acute Lymphoblastic Leukemia in Children*. N Engl J Med, 2015. 373(16): p. 1541-52.

136. Campana, D., *Minimal residual disease monitoring in childhood acute lymphoblastic leukemia*. *Curr Opin Hematol*, 2012. 19(4): p. 313-8.
137. Jongen-Lavrencic, M., et al., *Molecular Minimal Residual Disease in Acute Myeloid Leukemia*. *N Engl J Med*, 2018. 378(13): p. 1189-1199.
138. Buldini, B., et al., *Flow-Cytometric Monitoring of Minimal Residual Disease in Pediatric Patients With Acute Myeloid Leukemia: Recent Advances and Future Strategies*. *Front Pediatr*, 2019. 7: p. 412.
139. Yin, J.A., et al., *Minimal residual disease monitoring by quantitative RT-PCR in core binding factor AML allows risk stratification and predicts relapse: results of the United Kingdom MRC AML-15 trial*. *Blood*, 2012. 120(14): p. 2826-35.
140. Pigazzi, M., et al., *Minimal residual disease monitored after induction therapy by RQ-PCR can contribute to tailor treatment of patients with t(8;21) RUNX1-RUNX1T1 rearrangement*. *Haematologica*, 2015. 100(3): p. e99-101.
141. Coustan-Smith, E., et al., *Clinical significance of residual disease during treatment in childhood acute myeloid leukaemia*. *Br J Haematol*, 2003. 123(2): p. 243-52.
142. Coustan-Smith, E. and D. Campana, *Should evaluation for minimal residual disease be routine in acute myeloid leukemia?* *Curr Opin Hematol*, 2013. 20(2): p. 86-92.
143. Ley, T.J., et al., *DNA sequencing of a cytogenetically normal acute myeloid leukaemia genome*. *Nature*, 2008. 456(7218): p. 66-72.
144. Kronke, J., et al., *Clonal evolution in relapsed NPM1-mutated acute myeloid leukemia*. *Blood*, 2013. 122(1): p. 100-8.
145. Ravandi, F., *Is it time to routinely incorporate MRD into practice?* *Best Pract Res Clin Haematol*, 2018. 31(4): p. 396-400.
146. Sievers, E.L., et al., *Immunophenotypic evidence of leukemia after induction therapy predicts relapse: results from a prospective Children's Cancer Group study of 252 patients with acute myeloid leukemia*. *Blood*, 2003. 101(9): p. 3398-406.
147. Rubnitz, J.E., et al., *Minimal residual disease-directed therapy for childhood acute myeloid leukaemia: results of the AML02 multicentre trial*. *Lancet Oncol*, 2010. 11(6): p. 543-52.
148. Tierens, A., et al., *Residual disease detected by flow cytometry is an independent predictor of survival in childhood acute myeloid leukaemia; results of the NOPHO-AML 2004 study*. *Br J Haematol*, 2016. 174(4): p. 600-9.
149. Schuurhuis, G.J., et al., *Minimal/measurable residual disease in AML: a consensus document from the European LeukemiaNet MRD Working Party*. *Blood*, 2018. 131(12): p. 1275-1291.
150. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *The hallmarks of cancer*. *Cell*, 2000. 100(1): p. 57-70.
151. Liotta, L.A. and E.C. Kohn, *The microenvironment of the tumour-host interface*. *Nature*, 2001. 411(6835): p. 375-9.
152. Folkman, J., *Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease*. *Nat Med*, 1995. 1(1): p. 27-31.
153. Dunn, G.P., et al., *Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape*. *Nat Immunol*, 2002. 3(11): p. 991-8.
154. Ochsenbein, A.F., et al., *Roles of tumour localization, second signals and cross priming in cytotoxic T-cell induction*. *Nature*, 2001. 411(6841): p. 1058-64.
155. Becker, Y., *Molecular immunological approaches to biotherapy of human cancers--a review, hypothesis and implications*. *Anticancer Res*, 2006. 26(2A): p. 1113-34.

156. Shaker, O.G., et al., *The role of interleukin-12 in the pathogenesis of psoriasis*. Clin Biochem, 2006. 39(2): p. 119-25.
157. Kidd, P., *Th1/Th2 balance: the hypothesis, its limitations, and implications for health and disease*. Altern Med Rev, 2003. 8(3): p. 223-46.
158. Bien, E., et al., *Pre-treatment serum levels of interleukin-10, interleukin-12 and their ratio predict response to therapy and probability of event-free and overall survival in childhood soft tissue sarcomas, Hodgkin's lymphomas and acute lymphoblastic leukemias*. Clin Biochem, 2009. 42(10-11): p. 1144-57.
159. Nishimura, T., et al., *The critical role of Th1-dominant immunity in tumor immunology*. Cancer Chemother Pharmacol, 2000. 46 Suppl: p. S52-61.
160. Chamoto, K., et al., *Potential of tumor eradication by adoptive immunotherapy with T-cell receptor gene-transduced T-helper type 1 cells*. Cancer Res, 2004. 64(1): p. 386-90.
161. Gollob, J.A., et al., *Phase I trial of concurrent twice-weekly recombinant human interleukin-12 plus low-dose IL-2 in patients with melanoma or renal cell carcinoma*. J Clin Oncol, 2003. 21(13): p. 2564-73.
162. Moore, K.W., et al., *Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor*. Annu Rev Immunol, 2001. 19: p. 683-765.
163. Kurzrock, R., *Cytokine deregulation in cancer*. Biomed Pharmacother, 2001. 55(9-10): p. 543-7.
164. Contasta, I., et al., *Cell cycle control in cellular homeostasis during the immune response: interactions between TH1, TH2 cytokines, and Bcl2 and p53 molecules*. Cancer Biother Radiopharm, 2001. 16(1): p. 63-71.
165. Pawelec, G., J. Zeuthen, and R. Kiessling, *Escape from host-antitumor immunity*. Crit Rev Oncog, 1997. 8(2-3): p. 111-41.
166. Dummer, R., et al., *Immune stimulatory potential of B7.1 and B7.2 retrovirally transduced melanoma cells: suppression by interleukin 10*. Br J Cancer, 1998. 77(9): p. 1413-9.
167. Chang, S.H., *T helper 17 (Th17) cells and interleukin-17 (IL-17) in cancer*. Arch Pharm Res, 2019. 42(7): p. 549-559.
168. Muranski, P., et al., *Tumor-specific Th17-polarized cells eradicate large established melanoma*. Blood, 2008. 112(2): p. 362-73.
169. Martin-Orozco, N., et al., *T helper 17 cells promote cytotoxic T cell activation in tumor immunity*. Immunity, 2009. 31(5): p. 787-98.
170. Knochelmann, H.M., et al., *When worlds collide: Th17 and Treg cells in cancer and autoimmunity*. Cell Mol Immunol, 2018. 15(5): p. 458-469.
171. Punt, S., et al., *The correlations between IL-17 vs. Th17 cells and cancer patient survival: a systematic review*. Oncoimmunology, 2015. 4(2): p. e984547.
172. Kobayashi, M., et al., *Identification and purification of natural killer cell stimulatory factor (NKSF), a cytokine with multiple biologic effects on human lymphocytes*. J Exp Med, 1989. 170(3): p. 827-45.
173. Hunter, C.A., *New IL-12-family members: IL-23 and IL-27, cytokines with divergent functions*. Nat Rev Immunol, 2005. 5(7): p. 521-31.
174. Presky, D.H., et al., *A functional interleukin 12 receptor complex is composed of two beta-type cytokine receptor subunits*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. 93(24): p. 14002-7.

175. Oppmann, B., et al., *Novel p19 protein engages IL-12p40 to form a cytokine, IL-23, with biological activities similar as well as distinct from IL-12*. *Immunity*, 2000. 13(5): p. 715-25.
176. Parham, C., et al., *A receptor for the heterodimeric cytokine IL-23 is composed of IL-12Rbeta1 and a novel cytokine receptor subunit, IL-23R*. *J Immunol*, 2002. 168(11): p. 5699-708.
177. Pflanz, S., et al., *WSX-1 and glycoprotein 130 constitute a signal-transducing receptor for IL-27*. *J Immunol*, 2004. 172(4): p. 2225-31.
178. Mirlekar, B. and Y. Pylayeva-Gupta, *IL-12 Family Cytokines in Cancer and Immunotherapy*. *Cancers (Basel)*, 2021. 13(2).
179. Cocco, C., et al., *Interleukin-23 acts as antitumor agent on childhood B-acute lymphoblastic leukemia cells*. *Blood*, 2010. 116(19): p. 3887-98.
180. Cocco, C., V. Pistoia, and I. Airoidi, *Anti-leukemic properties of IL-12, IL-23 and IL-27: differences and similarities in the control of pediatric B acute lymphoblastic leukemia*. *Crit Rev Oncol Hematol*, 2012. 83(3): p. 310-8.
181. Trinchieri, G., *Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity*. *Nat Rev Immunol*, 2003. 3(2): p. 133-46.
182. Aggarwal, S., et al., *Interleukin-23 promotes a distinct CD4 T cell activation state characterized by the production of interleukin-17*. *J Biol Chem*, 2003. 278(3): p. 1910-4.
183. Fitzgerald, D.C., et al., *Suppression of autoimmune inflammation of the central nervous system by interleukin 10 secreted by interleukin 27-stimulated T cells*. *Nat Immunol*, 2007. 8(12): p. 1372-9.
184. Airoidi, I., et al., *Expression and function of IL-12 and IL-18 receptors on human tonsillar B cells*. *J Immunol*, 2000. 165(12): p. 6880-8.
185. Boumendjel, A., et al., *IL-27 induces the production of IgG1 by human B cells*. *Eur Cytokine Netw*, 2006. 17(4): p. 281-9.
186. Cocco, C., F. Morandi, and I. Airoidi, *Interleukin-27 and interleukin-23 modulate human plasmacell functions*. *J Leukoc Biol*, 2011. 89(5): p. 729-34.
187. Hisada, M., et al., *Potent antitumor activity of interleukin-27*. *Cancer Res*, 2004. 64(3): p. 1152-6.
188. Shimizu, M., et al., *Antiangiogenic and antitumor activities of IL-27*. *J Immunol*, 2006. 176(12): p. 7317-24.
189. Brunda, M.J., et al., *Antitumor and antimetastatic activity of interleukin 12 against murine tumors*. *J Exp Med*, 1993. 178(4): p. 1223-30.
190. Voest, E.E., et al., *Inhibition of angiogenesis in vivo by interleukin 12*. *J Natl Cancer Inst*, 1995. 87(8): p. 581-6.
191. Cocco, C., et al., *Interleukin-27 acts as multifunctional antitumor agent in multiple myeloma*. *Clin Cancer Res*, 2010. 16(16): p. 4188-97.
192. Pistoia, V., C. Cocco, and I. Airoidi, *Interleukin-12 receptor beta2: from cytokine receptor to gatekeeper gene in human B-cell malignancies*. *J Clin Oncol*, 2009. 27(28): p. 4809-16.
193. Ferretti, E., et al., *Direct inhibition of human acute myeloid leukemia cell growth by IL-12*. *Immunol Lett*, 2010. 133(2): p. 99-105.
194. Yan, J., M.J. Smyth, and M.W.L. Teng, *Interleukin (IL)-12 and IL-23 and Their Conflicting Roles in Cancer*. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2018. 10(7).
195. Lo, C.H., et al., *Antitumor and antimetastatic activity of IL-23*. *J Immunol*, 2003. 171(2): p. 600-7.

196. Chiyo, M., et al., *Antitumor effects produced by transduction of dendritic cells-derived heterodimeric cytokine genes in murine colon carcinoma cells*. *Anticancer Res*, 2004. 24(6): p. 3763-7.
197. Ngiow, S.F., M.W. Teng, and M.J. Smyth, *A balance of interleukin-12 and -23 in cancer*. *Trends Immunol*, 2013. 34(11): p. 548-55.
198. Hu, P., et al., *Expression of interleukins-23 and 27 leads to successful gene therapy of hepatocellular carcinoma*. *Mol Immunol*, 2009. 46(8-9): p. 1654-62.
199. Oniki, S., et al., *Interleukin-23 and interleukin-27 exert quite different antitumor and vaccine effects on poorly immunogenic melanoma*. *Cancer Res*, 2006. 66(12): p. 6395-404.
200. Xu, M., et al., *Regulation of antitumor immune responses by the IL-12 family cytokines, IL-12, IL-23, and IL-27*. *Clin Dev Immunol*, 2010. 2010.
201. Cimmino, A., et al., *miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005. 102(39): p. 13944-9.
202. Gaffen, S.L., et al., *The IL-23-IL-17 immune axis: from mechanisms to therapeutic testing*. *Nat Rev Immunol*, 2014. 14(9): p. 585-600.
203. Langowski, J.L., et al., *IL-23 promotes tumour incidence and growth*. *Nature*, 2006. 442(7101): p. 461-5.
204. Pan, B., et al., *Interleukin-17 promotes angiogenesis by stimulating VEGF production of cancer cells via the STAT3/GIV signaling pathway in non-small-cell lung cancer*. *Sci Rep*, 2015. 5: p. 16053.
205. Zhang, J., et al., *Tumor-Educated Neutrophils Activate Mesenchymal Stem Cells to Promote Gastric Cancer Growth and Metastasis*. *Front Cell Dev Biol*, 2020. 8: p. 788.
206. Carmeliet, P. and R.K. Jain, *Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis*. *Nature*, 2011. 473(7347): p. 298-307.
207. Olsson, A.K., et al., *VEGF receptor signalling - in control of vascular function*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2006. 7(5): p. 359-71.
208. Hurwitz, H., et al., *Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer*. *N Engl J Med*, 2004. 350(23): p. 2335-42.
209. Cella, D., et al., *Survival-adjusted health-related quality of life (HRQL) among patients with metastatic breast cancer receiving paclitaxel plus bevacizumab versus paclitaxel alone: results from Eastern Cooperative Oncology Group Study 2100 (E2100)*. *Breast Cancer Res Treat*, 2011. 130(3): p. 855-61.
210. Sandler, A., et al., *Paclitaxel-carboplatin alone or with bevacizumab for non-small-cell lung cancer*. *N Engl J Med*, 2006. 355(24): p. 2542-50.
211. Escudier, B., et al., *Phase III trial of bevacizumab plus interferon alfa-2a in patients with metastatic renal cell carcinoma (AVOREN): final analysis of overall survival*. *J Clin Oncol*, 2010. 28(13): p. 2144-50.
212. Rini, B.I., et al., *Phase III trial of bevacizumab plus interferon alfa versus interferon alfa monotherapy in patients with metastatic renal cell carcinoma: final results of CALGB 90206*. *J Clin Oncol*, 2010. 28(13): p. 2137-43.
213. Cohen, M.H., et al., *FDA drug approval summary: bevacizumab (Avastin) as treatment of recurrent glioblastoma multiforme*. *Oncologist*, 2009. 14(11): p. 1131-8.
214. Loges, S., T. Schmidt, and P. Carmeliet, *Mechanisms of resistance to anti-angiogenic therapy and development of third-generation anti-angiogenic drug candidates*. *Genes Cancer*, 2010. 1(1): p. 12-25.

215. Bergers, G. and D. Hanahan, *Modes of resistance to anti-angiogenic therapy*. Nat Rev Cancer, 2008. 8(8): p. 592-603.
216. Ebos, J.M. and R.S. Kerbel, *Antiangiogenic therapy: impact on invasion, disease progression, and metastasis*. Nat Rev Clin Oncol, 2011. 8(4): p. 210-21.
217. Carmeliet, P. and R.K. Jain, *Principles and mechanisms of vessel normalization for cancer and other angiogenic diseases*. Nat Rev Drug Discov, 2011. 10(6): p. 417-27.
218. Mazzone, M., et al., *Heterozygous deficiency of PHD2 restores tumor oxygenation and inhibits metastasis via endothelial normalization*. Cell, 2009. 136(5): p. 839-851.
219. Fischer, C., et al., *Anti-PlGF inhibits growth of VEGF(R)-inhibitor-resistant tumors without affecting healthy vessels*. Cell, 2007. 131(3): p. 463-75.
220. Schneider, P., et al., *What role for angiogenesis in childhood acute lymphoblastic leukaemia?* Adv Hematol, 2011. 2011: p. 274628.
221. Kopp, H.G., et al., *The bone marrow vascular niche: home of HSC differentiation and mobilization*. Physiology (Bethesda), 2005. 20: p. 349-56.
222. Konopleva, M., et al., *Therapeutic targeting of microenvironmental interactions in leukemia: mechanisms and approaches*. Drug Resist Updat, 2009. 12(4-5): p. 103-13.
223. Hatfield, K., et al., *Microvascular endothelial cells increase proliferation and inhibit apoptosis of native human acute myelogenous leukemia blasts*. Int J Cancer, 2006. 119(10): p. 2313-21.
224. Molica, S., et al., *Prognostic value of enhanced bone marrow angiogenesis in early B-cell chronic lymphocytic leukemia*. Blood, 2002. 100(9): p. 3344-51.
225. Perez-Atayde, A.R., et al., *Spectrum of tumor angiogenesis in the bone marrow of children with acute lymphoblastic leukemia*. Am J Pathol, 1997. 150(3): p. 815-21.
226. Hussong, J.W., G.M. Rodgers, and P.J. Shami, *Evidence of increased angiogenesis in patients with acute myeloid leukemia*. Blood, 2000. 95(1): p. 309-13.
227. Zhelyazkova, A.G., et al., *Prognostic significance of hepatocyte growth factor and microvessel bone marrow density in patients with chronic myeloid leukaemia*. Scand J Clin Lab Invest, 2008. 68(6): p. 492-500.
228. Negaard, H.F., et al., *Increased bone marrow microvascular density in haematological malignancies is associated with differential regulation of angiogenic factors*. Leukemia, 2009. 23(1): p. 162-9.
229. Dias, S., et al., *VEGF(165) promotes survival of leukemic cells by Hsp90-mediated induction of Bcl-2 expression and apoptosis inhibition*. Blood, 2002. 99(7): p. 2532-40.
230. Wang, L., et al., *Bevacizumab potentiates chemotherapeutic effect on T-leukemia/lymphoma cells by direct action on tumor endothelial cells*. Haematologica, 2011. 96(6): p. 927-31.
231. Shibuya, M., *Vascular endothelial growth factor and its receptor system: physiological functions in angiogenesis and pathological roles in various diseases*. J Biochem, 2013. 153(1): p. 13-9.
232. Leung, D.W., et al., *Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen*. Science, 1989. 246(4935): p. 1306-9.
233. Pepper, M.S., *Extracellular proteolysis and angiogenesis*. Thromb Haemost, 2001. 86(1): p. 346-55.
234. Sullivan, L.A. and R.A. Brekken, *The VEGF family in cancer and antibody-based strategies for their inhibition*. MAbs, 2010. 2(2): p. 165-75.

235. Olofsson, B., et al., *Genomic organization of the mouse and human genes for vascular endothelial growth factor B (VEGF-B) and characterization of a second splice isoform*. J Biol Chem, 1996. 271(32): p. 19310-7.
236. Aase, K., et al., *Vascular endothelial growth factor-B-deficient mice display an atrial conduction defect*. Circulation, 2001. 104(3): p. 358-64.
237. Lymboussaki, A., et al., *Vascular endothelial growth factor (VEGF) and VEGF-C show overlapping binding sites in embryonic endothelia and distinct sites in differentiated adult endothelia*. Circ Res, 1999. 85(11): p. 992-9.
238. Karkkainen, M.J., et al., *Vascular endothelial growth factor C is required for sprouting of the first lymphatic vessels from embryonic veins*. Nat Immunol, 2004. 5(1): p. 74-80.
239. Rocchigiani, M., et al., *Human FIGF: cloning, gene structure, and mapping to chromosome Xp22.1 between the PIGA and the GRPR genes*. Genomics, 1998. 47(2): p. 207-16.
240. Baldwin, M.E., et al., *Vascular endothelial growth factor D is dispensable for development of the lymphatic system*. Mol Cell Biol, 2005. 25(6): p. 2441-9.
241. Roskoski, R., Jr., *Vascular endothelial growth factor (VEGF) signaling in tumor progression*. Crit Rev Oncol Hematol, 2007. 62(3): p. 179-213.
242. Kendall, R.L. and K.A. Thomas, *Inhibition of vascular endothelial cell growth factor activity by an endogenously encoded soluble receptor*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. 90(22): p. 10705-9.
243. Waltenberger, J., et al., *Different signal transduction properties of KDR and Flt1, two receptors for vascular endothelial growth factor*. J Biol Chem, 1994. 269(43): p. 26988-95.
244. Quinn, T.P., et al., *Fetal liver kinase 1 is a receptor for vascular endothelial growth factor and is selectively expressed in vascular endothelium*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. 90(16): p. 7533-7.
245. Bernatchez, P.N., S. Soker, and M.G. Sirois, *Vascular endothelial growth factor effect on endothelial cell proliferation, migration, and platelet-activating factor synthesis is Flk-1-dependent*. J Biol Chem, 1999. 274(43): p. 31047-54.
246. Kaipainen, A., et al., *Expression of the fms-like tyrosine kinase 4 gene becomes restricted to lymphatic endothelium during development*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. 92(8): p. 3566-70.
247. Makinen, T., et al., *Differential binding of vascular endothelial growth factor B splice and proteolytic isoforms to neuropilin-1*. J Biol Chem, 1999. 274(30): p. 21217-22.
248. Yuan, L., et al., *Abnormal lymphatic vessel development in neuropilin 2 mutant mice*. Development, 2002. 129(20): p. 4797-806.
249. Maglione, D., et al., *Isolation of a human placenta cDNA coding for a protein related to the vascular permeability factor*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1991. 88(20): p. 9267-71.
250. Iyer, S., et al., *The crystal structure of human placenta growth factor-1 (PlGF-1), an angiogenic protein, at 2.0 Å resolution*. J Biol Chem, 2001. 276(15): p. 12153-61.
251. Maglione, D., et al., *Two alternative mRNAs coding for the angiogenic factor, placenta growth factor (PlGF), are transcribed from a single gene of chromosome 14*. Oncogene, 1993. 8(4): p. 925-31.
252. Charnock-Jones, D.S., *Soluble flt-1 and the angiopoietins in the development and regulation of placental vasculature*. J Anat, 2002. 200(6): p. 607-15.

253. Fischer, C., et al., *FLT1 and its ligands VEGFB and PlGF: drug targets for anti-angiogenic therapy?* Nat Rev Cancer, 2008. 8(12): p. 942-56.
254. Newell, L.F. and S.G. Holtan, *Placental growth factor: What hematologists need to know.* Blood Rev, 2017. 31(1): p. 57-62.
255. Loges, S., T. Schmidt, and P. Carmeliet, *"Antimyoangiogenic" therapy for cancer by inhibiting PlGF.* Clin Cancer Res, 2009. 15(11): p. 3648-53.
256. Van de Veire, S., et al., *Further pharmacological and genetic evidence for the efficacy of PlGF inhibition in cancer and eye disease.* Cell, 2010. 141(1): p. 178-90.
257. Cory, S. and J.M. Adams, *The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch.* Nat Rev Cancer, 2002. 2(9): p. 647-56.
258. Reay, J., A. Gambotto, and P.D. Robbins, *The antitumor effects of adenoviral-mediated, intratumoral delivery of interleukin 23 require endogenous IL-12.* Cancer Gene Ther, 2012. 19(2): p. 135-43.
259. Wang, Y.Q., et al., *Induction of systemic immunity by expression of interleukin-23 in murine colon carcinoma cells.* Int J Cancer, 2003. 105(6): p. 820-4.
260. El-Maadawy, E.A., et al., *Regulation of CD4(+)CD25(+)FOXP3(+) cells in Pediatric Acute Lymphoblastic Leukemia (ALL): Implication of cytokines and miRNAs.* Mol Immunol, 2020. 124: p. 1-8.
261. Bi, L., et al., *Increased Th17 cells and IL-17A exist in patients with B cell acute lymphoblastic leukemia and promote proliferation and resistance to daunorubicin through activation of Akt signaling.* J Transl Med, 2016. 14(1): p. 132.
262. Han, Y., et al., *Th17 cells and interleukin-17 increase with poor prognosis in patients with acute myeloid leukemia.* Cancer Sci, 2014. 105(8): p. 933-42.
263. Karmali, R., et al., *Aggressive disease defined by cytogenetics is associated with cytokine dysregulation in CLL/SLL patients.* J Leukoc Biol, 2013. 93(1): p. 161-70.
264. Jadidi-Niaragh, F., et al., *Downregulation of IL-17-producing T cells is associated with regulatory T cell expansion and disease progression in chronic lymphocytic leukemia.* Tumour Biol, 2013. 34(2): p. 929-40.
265. Hus, I., et al., *Th17/IL-17A might play a protective role in chronic lymphocytic leukemia immunity.* PLoS One, 2013. 8(11): p. e78091.
266. Young, M.R., C.A. Levingston, and S.D. Johnson, *Treatment to sustain a Th17-type phenotype to prevent skewing toward Treg and to limit premalignant lesion progression to cancer.* Int J Cancer, 2016. 138(10): p. 2487-98.
267. Mohammed, J., et al., *TGFbeta1-induced inflammation in premalignant epidermal squamous lesions requires IL-17.* J Invest Dermatol, 2010. 130(9): p. 2295-303.
268. Christopoulos, P., et al., *Definition and characterization of the systemic T-cell dysregulation in untreated indolent B-cell lymphoma and very early CLL.* Blood, 2011. 117(14): p. 3836-46.
269. Burger, J.A., *Nurture versus nature: the microenvironment in chronic lymphocytic leukemia.* Hematology Am Soc Hematol Educ Program, 2011. 2011: p. 96-103.
270. Yousefi, M., et al., *The skewed balance between Tregs and Th17 in chronic lymphocytic leukemia.* Future Oncol, 2015. 11(10): p. 1567-82.
271. Sherry, B., et al., *Identification and characterization of distinct IL-17F expression patterns and signaling pathways in chronic lymphocytic leukemia and normal B lymphocytes.* Immunol Res, 2015. 63(1-3): p. 216-27.
272. Forconi, F. and P. Moss, *Perturbation of the normal immune system in patients with CLL.* Blood, 2015. 126(5): p. 573-81.

273. Chen, F., et al., *mTOR Mediates IL-23 Induction of Neutrophil IL-17 and IL-22 Production*. *J Immunol*, 2016. 196(10): p. 4390-9.
274. Lee, P.W., et al., *IL-23R-activated STAT3/STAT4 is essential for Th1/Th17-mediated CNS autoimmunity*. *JCI Insight*, 2017. 2(17).
275. Bailey, S.R., et al., *Th17 cells in cancer: the ultimate identity crisis*. *Front Immunol*, 2014. 5: p. 276.
276. Guery, L. and S. Hugues, *Th17 Cell Plasticity and Functions in Cancer Immunity*. *Biomed Res Int*, 2015. 2015: p. 314620.
277. Wang, X., et al., *Changes of Th17/Treg cell and related cytokines in pancreatic cancer patients*. *Int J Clin Exp Pathol*, 2015. 8(5): p. 5702-8.
278. Hussain, S.M., et al., *IL23 and TGF- β diminish macrophage associated metastasis in pancreatic carcinoma*. *Sci Rep*, 2018. 8(1): p. 5808.
279. Blogowski, W., et al., *Selected cytokines in patients with pancreatic cancer: a preliminary report*. *PLoS One*, 2014. 9(5): p. e97613.
280. Moschovi, M., et al., *Possible implication of IKAROS gene deletion and BCR-ABL1 variants in progression of chronic myeloid leukemia to lymphoid blast crisis in childhood: a single-institution experience*. *Leuk Lymphoma*, 2015. 56(8): p. 2460-2.
281. Winkler, I.G., et al., *Bone marrow macrophages maintain hematopoietic stem cell (HSC) niches and their depletion mobilizes HSCs*. *Blood*, 2010. 116(23): p. 4815-28.
282. Ehninger, A. and A. Trumpp, *The bone marrow stem cell niche grows up: mesenchymal stem cells and macrophages move in*. *J Exp Med*, 2011. 208(3): p. 421-8.
283. Xia, C., et al., *Mesenchymal stem cells suppress leukemia via macrophage-mediated functional restoration of bone marrow microenvironment*. *Leukemia*, 2020. 34(9): p. 2375-2383.
284. Corradi, G., et al., *Mesenchymal stromal cells from myelodysplastic and acute myeloid leukemia patients display in vitro reduced proliferative potential and similar capacity to support leukemia cell survival*. *Stem Cell Res Ther*, 2018. 9(1): p. 271.
285. Diaz de la Guardia, R., et al., *Detailed Characterization of Mesenchymal Stem/Stromal Cells from a Large Cohort of AML Patients Demonstrates a Definitive Link to Treatment Outcomes*. *Stem Cell Reports*, 2017. 8(6): p. 1573-1586.
286. Iwamoto, S., et al., *Mesenchymal cells regulate the response of acute lymphoblastic leukemia cells to asparaginase*. *J Clin Invest*, 2007. 117(4): p. 1049-57.
287. Garcia-Gomez, A., et al., *Transcriptomic profile induced in bone marrow mesenchymal stromal cells after interaction with multiple myeloma cells: implications in myeloma progression and myeloma bone disease*. *Oncotarget*, 2014. 5(18): p. 8284-305.
288. Wolf, A.M., et al., *High IL-12 p35 and IL-23 p19 mRNA expression is associated with superior outcome in ovarian cancer*. *Gynecol Oncol*, 2010. 118(3): p. 244-50.
289. Jain, P., et al., *Th17 and non-Th17 interleukin-17-expressing cells in chronic lymphocytic leukemia: delineation, distribution, and clinical relevance*. *Haematologica*, 2012. 97(4): p. 599-607.
290. Langowski, J.L., R.A. Kastelein, and M. Oft, *Swords into plowshares: IL-23 repurposes tumor immune surveillance*. *Trends Immunol*, 2007. 28(5): p. 207-12.
291. Zhen, S., et al., *Enhanced antiviral benefit of combination therapy with anti-HBV and anti-PD1 gRNA/cas9 produces a synergistic antiviral effect in HBV infection*. *Mol Immunol*, 2021. 130: p. 7-13.

292. Younes, A., et al., *Phase II clinical trial of interleukin-12 in patients with relapsed and refractory non-Hodgkin's lymphoma and Hodgkin's disease*. Clin Cancer Res, 2004. 10(16): p. 5432-8.
293. Bagley, R.G., et al., *Placental growth factor upregulation is a host response to antiangiogenic therapy*. Clin Cancer Res, 2011. 17(5): p. 976-88.
294. Dewerchin, M. and P. Carmeliet, *PlGF: a multitasking cytokine with disease-restricted activity*. Cold Spring Harb Perspect Med, 2012. 2(8).
295. van Dongen, J.J., et al., *Prognostic value of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukaemia in childhood*. Lancet, 1998. 352(9142): p. 1731-8.
296. de Jonge, H.J., et al., *Prognostic impact of white blood cell count in intermediate risk acute myeloid leukemia: relevance of mutated NPM1 and FLT3-ITD*. Haematologica, 2011. 96(9): p. 1310-7.
297. Fragoso, R., et al., *VEGFR-1 (FLT-1) activation modulates acute lymphoblastic leukemia localization and survival within the bone marrow, determining the onset of extramedullary disease*. Blood, 2006. 107(4): p. 1608-16.
298. Casalou, C., et al., *VEGF/PLGF induces leukemia cell migration via P38/ERK1/2 kinase pathway, resulting in Rho GTPases activation and caveolae formation*. Leukemia, 2007. 21(7): p. 1590-4.
299. Dusenbery, K.E., et al., *Extramedullary leukemia in children with newly diagnosed acute myeloid leukemia: a report from the Children's Cancer Group*. J Pediatr Hematol Oncol, 2003. 25(10): p. 760-8.
300. Griffin, T.C., et al., *Slow disappearance of peripheral blood blasts is an adverse prognostic factor in childhood T cell acute lymphoblastic leukemia: a Pediatric Oncology Group study*. Leukemia, 2000. 14(5): p. 792-5.
301. Gaynon, P.S., et al., *Early response to therapy and outcome in childhood acute lymphoblastic leukemia: a review*. Cancer, 1997. 80(9): p. 1717-26.
302. Rivera, G.K., et al., *Bone marrow recurrence after initial intensive treatment for childhood acute lymphoblastic leukemia*. Cancer, 2005. 103(2): p. 368-76.
303. Sandlund, J.T., et al., *Persistence of lymphoblasts in bone marrow on day 15 and days 22 to 25 of remission induction predicts a dismal treatment outcome in children with acute lymphoblastic leukemia*. Blood, 2002. 100(1): p. 43-7.
304. Gajjar, A., et al., *Persistence of circulating blasts after 1 week of multiagent chemotherapy confers a poor prognosis in childhood acute lymphoblastic leukemia*. Blood, 1995. 86(4): p. 1292-5.
305. Ikai, T., et al., *Placenta growth factor stimulates the growth of Philadelphia chromosome positive acute lymphoblastic leukemia cells by both autocrine and paracrine pathways*. Eur J Haematol, 2005. 75(4): p. 273-9.
306. Schmidt, T., et al., *Loss or inhibition of stromal-derived PlGF prolongs survival of mice with imatinib-resistant Bcr-Abl1(+) leukemia*. Cancer Cell, 2011. 19(6): p. 740-53.
307. Maynard, S.E., et al., *Excess placental soluble fms-like tyrosine kinase 1 (sFlt1) may contribute to endothelial dysfunction, hypertension, and proteinuria in preeclampsia*. J Clin Invest, 2003. 111(5): p. 649-58.
308. Maynard, S.E., et al., *Soluble Fms-like tyrosine kinase 1 and endothelial dysfunction in the pathogenesis of preeclampsia*. Pediatr Res, 2005. 57(5 Pt 2): p. 1R-7R.
309. Wu, F.T., et al., *A systems biology perspective on sVEGFR1: its biological function, pathogenic role and therapeutic use*. J Cell Mol Med, 2010. 14(3): p. 528-52.

310. Hu, Q., et al., *Soluble vascular endothelial growth factor receptor 1, and not receptor 2, is an independent prognostic factor in acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndromes*. *Cancer*, 2004. 100(9): p. 1884-91.
311. Aguayo, A., et al., *Cellular vascular endothelial growth factor is a predictor of outcome in patients with acute myeloid leukemia*. *Blood*, 1999. 94(11): p. 3717-21.
312. Yamaguchi, T., et al., *Overexpression of soluble vascular endothelial growth factor receptor 1 in colorectal cancer: Association with progression and prognosis*. *Cancer Sci*, 2007. 98(3): p. 405-10.
313. Toi, M., et al., *Significance of vascular endothelial growth factor (VEGF)/soluble VEGF receptor-1 relationship in breast cancer*. *Int J Cancer*, 2002. 98(1): p. 14-8.
314. Lamszus, K., et al., *Levels of soluble vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor 1 in astrocytic tumors and its relation to malignancy, vascularity, and VEGF-A*. *Clin Cancer Res*, 2003. 9(4): p. 1399-405.
315. Yang, F., et al., *Potential role of soluble VEGFR-1 in antiangiogenesis therapy for cancer*. *Expert Rev Anticancer Ther*, 2011. 11(4): p. 541-9.
316. Vilsmaier, T., et al., *Angiogenic cytokines and their influence on circulating tumour cells in sera of patients with the primary diagnosis of breast cancer before treatment*. *BMC Cancer*, 2016. 16: p. 547.
317. Hurwitz, H., *Integrating the anti-VEGF-A humanized monoclonal antibody bevacizumab with chemotherapy in advanced colorectal cancer*. *Clin Colorectal Cancer*, 2004. 4 Suppl 2: p. S62-8.
318. Kramer, I. and H.P. Lipp, *Bevacizumab, a humanized anti-angiogenic monoclonal antibody for the treatment of colorectal cancer*. *J Clin Pharm Ther*, 2007. 32(1): p. 1-14.
319. Lassen, U., et al., *A phase I, dose-escalation study of TB-403, a monoclonal antibody directed against PlGF, in patients with advanced solid tumours*. *Br J Cancer*, 2012. 106(4): p. 678-84.